

· 基础研究 ·

# 头蛋白 shRNA 和骨形态发生蛋白 2 的协同作用对骨髓间充质干细胞成骨能力的影响

张瑞萍<sup>1</sup>, 邱相君<sup>2</sup>, 苏兵<sup>3</sup>, 郑路路<sup>1</sup>

(1. 洛阳市第一人民医院, 河南 洛阳 471002; 2. 河南科技大学, 河南 洛阳 471003;

3. Quater 诊断实验室, 纽约 布法罗 14200)

**摘要 目的:**观察头蛋白 shRNA 和骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)的协同作用对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨能力的影响。**方法:**分离、培养兔 BMSCs, 分为头蛋白 shRNA 基因干扰组、BMP-2 过表达组、双基因转染组。构建慢病毒头蛋白 shRNA 干扰载体和 BMP-2 过表达载体。头蛋白 shRNA 基因干扰组、BMP-2 过表达组分别加入头蛋白 shRNA 基因干扰载体和 BMP-2 过表达载体, 双基因转染组同时加入头蛋白 shRNA 基因干扰载体和 BMP-2 过表达载体, 进行基因转染。基因转染成功后, 采用荧光定量 PCR 检测 3 组 BMSCs 中头蛋白和 BMP-2 的 mRNA 相对表达量, 采用茜素红染色和碱性磷酸酶染色检测 3 组 BMSCs 的诱导成骨能力。**结果:**①细胞培养和基因转染鉴定结果。流式细胞仪检测第 2 代培养细胞, CD44 和 CD29 表达分别为 61.3% 和 57.2%, CD34 和 CD45 表达分别为 3.6% 和 2.4%, 符合 BMSCs 表型特征。基因转染 72 h 后, 3 组 BMSCs 的转染率为  $(92.5 \pm 2.5)\%$ , 基因转染成功。②头蛋白和 BMP-2 mRNA 表达检测结果。基因转染成功后, 3 组细胞中头蛋白 mRNA 相对表达量的组间总体比较, 差异有统计学意义  $(0.343 \pm 0.124, 1.040 \pm 0.269, 0.123 \pm 0.057; F=22.390, P=0.002)$ ; BMP-2 过表达组较头蛋白 shRNA 基因干扰组和双基因转染组高  $(P=0.016, P=0.005)$ , 头蛋白 shRNA 基因干扰组和双基因转染组的组间差异无统计学意义  $(P=0.054)$ 。3 组细胞中 BMP-2 mRNA 相对表达量的组间总体比较, 差异有统计学意义  $(1.120 \pm 0.363, 3.667 \pm 0.431, 4.833 \pm 0.475; F=59.680, P=0.000)$ 。双基因转染组较头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组高  $(P=0.000, P=0.035)$ , BMP-2 过表达组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组  $(P=0.001)$ 。③茜素红和碱性磷酸酶染色结果。茜素红染色可见胞浆边缘呈现不透光的矿化结节。3 组细胞茜素红染色阳性率的组间总体比较, 差异有统计学意义  $[(62.317 \pm 3.969)\%, (39.267 \pm 2.170)\%, (72.320 \pm 4.133)\%, F=68.870, P=0.000]$ ; 双基因转染组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组  $(P=0.039, P=0.000)$ , 头蛋白 shRNA 基因干扰组高于 BMP-2 过表达组  $(P=0.001)$ 。碱性磷酸酶染色细胞内呈现灰黑色颗粒或块状沉淀。3 组细胞碱性磷酸酶染色阳性率组间总体比较, 差异有统计学意义  $[(55.157 \pm 9.959)\%, (35.353 \pm 6.494)\%, (82.337 \pm 10.594)\%, F=19.750, P=0.002]$ ; 双基因转染组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组  $(P=0.032, P=0.003)$ , 头蛋白 shRNA 基因干扰组高于 BMP-2 过表达组  $(P=0.045)$ 。**结论:**头蛋白 shRNA 和 BMP-2 的协同作用可以强化 BMSCs 的成骨能力。

**关键词** 间质干细胞; 骨髓; 骨形态发生蛋白质 2; 转染; 头蛋白

## The synergistic effects of Noggin shRNA and bone morphogenetic protein 2 on osteogenic ability of bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Ruiping<sup>1</sup>, QIU Xiangjun<sup>2</sup>, SU Bing<sup>3</sup>, ZHENG Lulu<sup>1</sup>

1. The First People's Hospital of Luoyang, Luoyang 471002, Henan, China

2. Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

3. Quater diagnosis laboratory, Buffalo 14200, New York, America

**ABSTRACT Objective:** To observe the synergistic effects of Noggin shRNA and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) on osteogenic ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** The BMSCs were isolated from the femoral bone marrow of rabbits and were cultured in vitro. The second-generation BMSCs were randomly divided into Noggin shRNA gene interference group, BMP-2 overexpression group and double-gene transfection group. The lentivirus-mediated Noggin shRNA interference vectors and BMP-2 overexpression vectors were constructed. The BMSCs in Noggin shRNA gene interference group and BMP-2 overexpression group were transfected with Noggin shRNA gene interference vectors and BMP-2 overexpression vectors respectively, and the BMSCs in double-gene transfection

通讯作者: 张瑞萍 E-mail: lyxiew@126.com

group were co-transfected with Noggin shRNA gene interference vectors and BMP-2 overexpression vectors. After successful gene transfection, the relative expression levels of Noggin mRNA and BMP-2 mRNA in BMSCs were detected by using fluorescent quantitative PCR method, and the ability of BMSCs to induce osteogenesis was detected by using alizarin red staining (ARS) and alkaline phosphatase (ALP) staining. **Results:** The second-generation BMSCs were detected by using flow cytometry, and the results showed that the expressions of CD44, CD29, CD34 and CD45 were 61.3%, 57.2%, 3.6% and 2.4% respectively, which were consistent with the phenotypic characteristics of BMSCs. After 72-hour gene transfection, the transfection rate of BMSCs was  $(92.5 \pm 2.5)\%$  in the 3 groups. After successful gene transfection, there was statistical difference in the relative expression level of Noggin mRNA in BMSCs between the 3 groups in general ( $0.343 \pm 0.124, 1.040 \pm 0.269, 0.123 \pm 0.057; F = 22.390, P = 0.002$ ). The relative expression level of Noggin mRNA in BMSCs was higher in BMP-2 overexpression group compared to Noggin shRNA gene interference group and double-gene transfection group ( $P = 0.016, P = 0.005$ ), and there was no statistical difference in the relative expression level of Noggin mRNA in BMSCs between Noggin shRNA gene interference group and double-gene transfection group ( $P = 0.054$ ). There was statistical difference in the relative expression level of BMP-2 mRNA in BMSCs between the 3 groups in general ( $1.120 \pm 0.363, 3.667 \pm 0.431, 4.833 \pm 0.475; F = 59.680, P = 0.000$ ). The relative expression level of BMP-2 mRNA in BMSCs was higher in double-gene transfection group compared to Noggin shRNA gene interference group and BMP-2 overexpression group ( $P = 0.000, P = 0.035$ ), and was higher in BMP-2 overexpression group compared to Noggin shRNA gene interference group ( $P = 0.001$ ). The opaque mineralized nodules along the cytoplasmic margin were found through ARS. There was statistical difference in the positive rate of ARS for BMSCs between the 3 groups in general ( $62.317 \pm 3.969, 39.267 \pm 2.170, 72.320 \pm 4.133\%; F = 68.870, P = 0.000$ ). The positive rate of ARS for BMSCs was higher in double-gene transfection group compared to Noggin shRNA gene interference group and BMP-2 overexpression group ( $P = 0.039, P = 0.000$ ), and was higher in Noggin shRNA gene interference group compared to BMP-2 overexpression group ( $P = 0.001$ ). The gray-black granules or block-shaped sediments were found within BMSCs through ALP staining. There was statistical difference in the positive rate of ALP staining for BMSCs between the 3 groups in general ( $55.157 \pm 9.959, 35.353 \pm 6.494, 82.337 \pm 10.594\%; F = 19.750, P = 0.002$ ). The positive rate of ALP staining for BMSCs was higher in double-gene transfection group compared to Noggin shRNA gene interference group and BMP-2 overexpression group ( $P = 0.032, P = 0.003$ ), and was higher in Noggin shRNA gene interference group compared to BMP-2 overexpression group ( $P = 0.045$ ). **Conclusion:** The synergistic effects of Noggin shRNA and BMP-2 can enhance the osteogenic ability of BMSCs.

**Keywords** mesenchymal stem cells; bone marrow; bone morphogenetic protein 2; transfection; Noggin

具有多向分化潜能的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 可被诱导分化成人体内的多种细胞<sup>[1-3]</sup>。BMSCs 在特定诱导条件下可分化为成骨细胞, 进而促进骨与软骨损伤的修复, 且自体 BMSCs 移植可避免移植后的排异反应, 为骨缺损的修复提供了一条新途径<sup>[4]</sup>。然而在体外诱导分化的过程中需加入多种诱导因子才能使 BMSCs 向成骨细胞分化, 且转化效率不稳定。随着基因工程技术的发展, 基因修饰为干细胞的成骨分化研究提供了新的思路。近年来, 最初由非洲爪蟾的胚胎中分离出来的头蛋白, 作为调节骨骼系统生长发育的重要细胞因子, 正逐渐被学者们认知。头蛋白具有调节胚胎的形态发生、抑制体外成骨细胞增殖与分化以及抑制体内骨形成等作用, 其作用机制主要是通过抑制骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 的表达, 调节骨形态发生蛋白信号通路从而间接调节骨形成<sup>[5-7]</sup>。BMP 属转化生长因子  $\beta$  超家族成员, 具有多

种生物学功能, 参与胚胎时期骨组织的发育、成年骨缺损修复及机体某些骨疾病的发生过程, 其中 BMP-2 是最主要的骨形成调控因子<sup>[8]</sup>。BMP 在骨形成中各个阶段都发挥作用<sup>[9-11]</sup>, 近年来, 基因重组 BMP-2 和 BMP-7 的安全性和有效性得到了充分的证实, BMP-2 已用于脊柱融合<sup>[12-14]</sup>。为进一步探讨头蛋白 shRNA 和 BMP-2 的协同作用对 BMSCs 成骨分化能力的影响, 笔者采用 RNA 干扰技术和基因过表达技术进行了研究, 现报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 雌性新西兰大白兔 5 只, 体质量 1.5 ~ 2.0 kg, 购自河南省实验动物中心, 实验动物合格证号 SCXK(豫)2015-0005。

**1.2 实验试剂和仪器** 胎牛血清、DMEM、PBS、0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司), TRIZOL (美国 Invitrogen 公司), 反转录试剂盒 (美国 ABI 公司), 茜素红染色试剂、碱性磷酸酶染色试剂盒 (武汉博士德生物工

程有限公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),Real-timePCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方 法

**2.1 BMSCs 的分离、培养和鉴定** 按照 30 mg · kg<sup>-1</sup> 的剂量经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠麻醉动物,消毒、铺巾,无菌操作下分离股骨。用骨髓穿刺针抽取新鲜骨髓,按照 1:3 的体积比加入含 10% 胎牛血清和青霉素(100 单位 · mL<sup>-1</sup>) 的 DMEM 细胞培养液,充分混匀后,移入 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,差速贴壁法培养。3 d 后去掉培养瓶中的油脂等杂质,之后每 3 d 换 1 次细胞培养液,待细胞融合率达 70% ~ 80% 后进行传代培养<sup>[15-16]</sup>。倒置显微镜观察 BMSCs 的形态。采用流式细胞仪检测 CD29、CD44、CD34、CD45 等表面标志物对培养的细胞进行鉴定<sup>[17]</sup>。

## 2.2 慢病毒载体的构建

**2.2.1 慢病毒头蛋白 shRNA 干扰载体的构建** 由上海吉凯公司采用文献[18]的方法合成头蛋白 shRNA 基因干扰载体,采用 DNAMAN 软件进行同源性分析,将 cDNA 与 pCS2 + Tα - 1 成功结合,构建 shRNA 基因干扰载体。

**2.2.2 慢病毒 BMP-2 过表达载体的构建** 由上海吉凯公司采用文献[19]的方法合成 BMP-2 过表达载体,克隆入 pHBLV - U6 - ZsGreen - PGK - Puro 质粒载体,克隆切入点为 Xho I / BamH I。经基因测序证明序列正确。

**2.3 细胞分组及基因转染** 取第 2 代 BMSCs,按照 5 × 10<sup>5</sup> 个 · 孔<sup>-1</sup> 的密度,接种到 6 孔板。分为头蛋白 shRNA 基因干扰组、BMP-2 过表达组、双基因转染组。待细胞融合率为 50% 时进行基因转染,转染复数为 50。头蛋白 shRNA 基因干扰组、BMP-2 过表达组分别加入头蛋白 shRNA 基因干扰载体和 BMP-2 过表达载体 50 μL · 孔<sup>-1</sup>,双基因转染组同时加入头蛋白 shRNA 基因干扰载体和 BMP-2 过表达载体各 50 μL · 孔<sup>-1</sup>。转染后 72 h,倒置荧光显微镜观察转染率<sup>[20]</sup>。

## 2.4 实验指标检测

**2.4.1 荧光定量 PCR 检测头蛋白和 BMP-2 mRNA 的表达** 基因转染成功后取各组细胞,提取总 RNA。检测总 RNA 的纯度在 1.9 ~ 2.0,利用反转录试剂盒

进行反转录操作,合成 cDNA,4 ℃ 保存。取 20 μL 反应体系进行荧光定量 PCR 检测,反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 扩增,40 个循环。熔解曲线分析条件为 95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,降温 50 ℃ 30 s,1 个循环<sup>[21]</sup>。头蛋白、BMP-2 和磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物(表 1)由上海生工公司设计。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 的方法计算各组细胞中头蛋白和 BMP-2 的 mRNA 相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列
头蛋白	正义链:5' - GTG ATA AAG GTT TCG GTT GCT G - 3'
	反义链:5' - TGT TTT CTG TGG CTC CTC CTC TGG - 3'
BMP-2	正义链:5' - CAA GAG GTC CTG TCT TCA GAT GA - 3'
	反义链:5' - TCT GTT TCC GTT TCC TGG TTC - 3'
GAPDH	正义链:5' - GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC - 3'
	反义链:5' - TGG TGA AGA CGC CAG TGG A - 3'

BMP-2:骨形态发生蛋白 2;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

**2.4.2 茜素红染色和碱性磷酸酶染色** 基因转染后,每 3 d 换液 1 次,连续培养 14 d 后,去掉培养基,PBS 冲洗 3 次,40 g · L<sup>-1</sup> 多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗 3 次。①茜素红染色。具体操作按照试剂盒说明书进行。将配制好的茜素红染液加入细胞培养孔中(1 mL · 孔<sup>-1</sup>),孵育 15 min,PBS 冲洗 2 次,干燥、封固。倒置显微镜下观察,采用 Image Pro Plus 6.0 软件计算茜素红染色阳性率。②碱性磷酸酶染色。具体操作按照试剂盒说明书进行。将配制好的碱性磷酸酶显色缓冲液加入细胞培养孔中(1 mL · 孔<sup>-1</sup>),孵育 15 min,PBS 冲洗 2 次;适量 BCIP/NBT 染色工作液加入培养孔中(1 mL · 孔<sup>-1</sup>),孵育 15 min,PBS 冲洗 2 次。干燥,封固,倒置显微镜下观察,计数 200 个细胞,计算碱性磷酸酶染色阳性率[(碱性磷酸酶染色阳性细胞数/200) × 100%]<sup>[22-23]</sup>。

**2.5 数据统计** 应用 SPSS16.0 统计软件处理数据。3 组细胞头蛋白和 BMP-2 mRNA 相对表达量及茜素红染色、碱性磷酸酶染色阳性率的组间总体比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 *q* 检验。检验水准 α = 0.05。

### 3 结果

**3.1 BMSCs 培养和鉴定结果** 接种 48 h 后, 原代细胞开始贴壁, 细胞为梭形或多角形[图 1(1)]; 培养至第 2 代后, 呈漩涡状或辐射状生长, 细胞增殖迅速[图 1(2)]。流式细胞仪检测第 2 代培养细胞, CD44 和 CD29 表达分别为 61.3% 和 57.2%, CD34 和 CD45 表达分别为 3.6% 和 2.4%, 符合 BMSCs 表型特征(图 2)。

**3.2 基因转染鉴定结果** 基因转染 72 h 后, 3 组 BMSCs 的转染率为  $(92.5 \pm 2.5)\%$ , 基因转染成功。

**3.3 头蛋白和 BMP-2 mRNA 表达检测结果** 基因转染成功后, 3 组细胞中头蛋白 mRNA 相对表达量的组间总体比较, 差异有统计学意义; BMP-2 过表达组较头蛋白 shRNA 基因干扰组和双基因转染组高 ( $P =$

0.016,  $P = 0.005$ ), 头蛋白 shRNA 基因干扰组和双基因转染组的组间差异无统计学意义 ( $P = 0.054$ )。3 组细胞中 BMP-2 mRNA 相对表达量的组间总体比较, 差异有统计学意义。双基因转染组较头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组高 ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.035$ ), BMP-2 过表达组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组 ( $P = 0.001$ )。见表 2。

**3.4 茜素红和碱性磷酸酶染色结果** 茜素红染色可见胞浆边缘呈现不透光的矿化结节。3 组细胞茜素红染色阳性率的组间总体比较, 差异有统计学意义; 双基因转染组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组 ( $P = 0.039$ ,  $P = 0.000$ ), 头蛋白 shRNA 基因干扰组高于 BMP-2 过表达组 ( $P = 0.001$ ), 见表 2、图 3。碱性磷酸酶染色细胞内呈现灰黑色颗粒或块

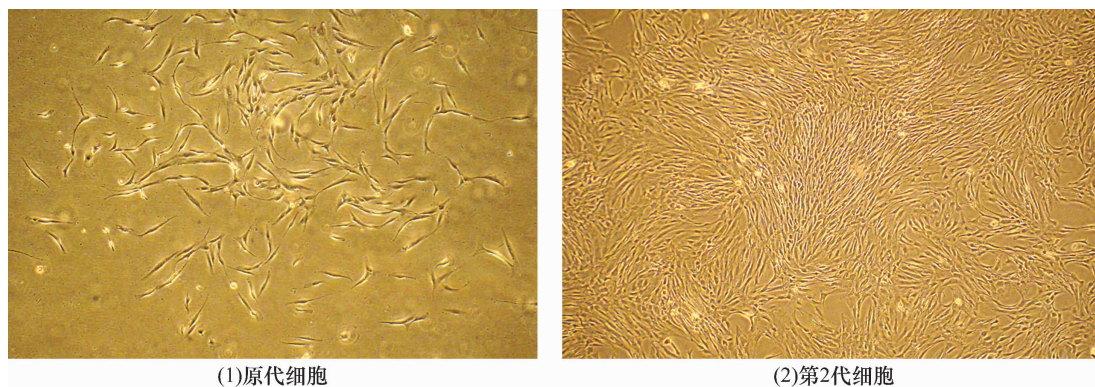


图 1 兔骨髓间充质干细胞培养结果 ( $\times 200$ )

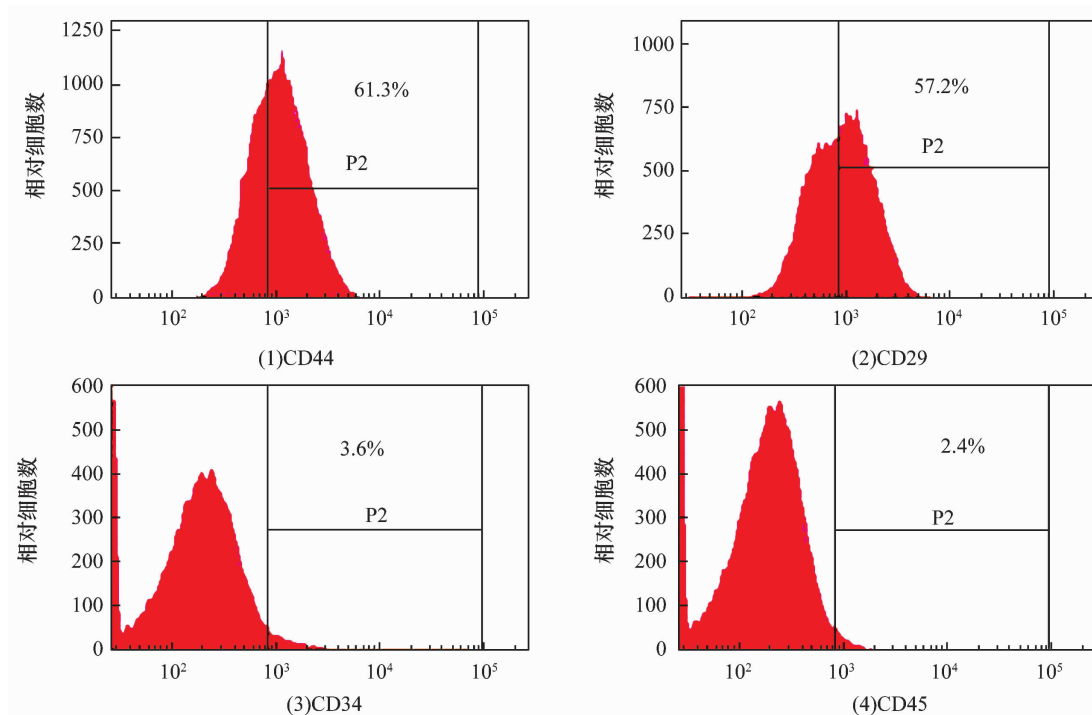


图 2 第 2 代兔骨髓间充质干细胞流式细胞仪鉴定结果 ( $\times 200$ )

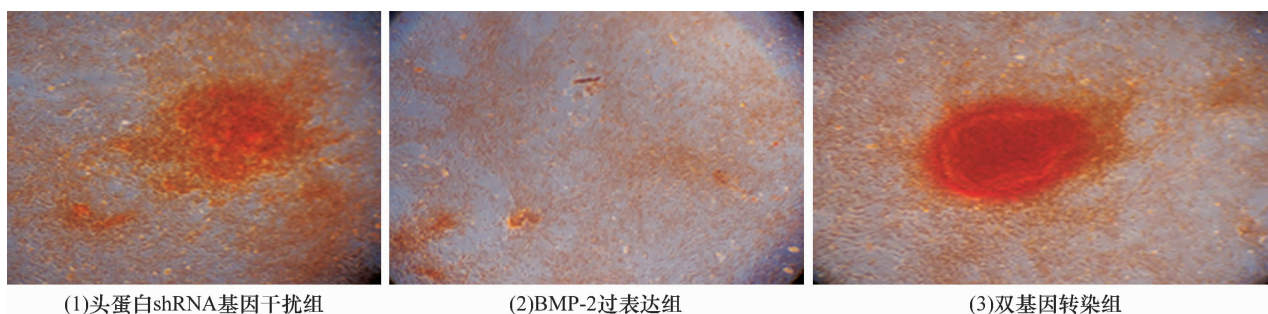


状沉淀。3 组细胞碱性磷酸酶染色阳性率的组间总体比较,差异有统计学意义;双基因转染组高于头蛋白 shRNA 基因干扰组和 BMP-2 过表达组 ( $P = 0.032, P = 0.003$ ),头蛋白 shRNA 基因干扰组高于 BMP-2 过表达组 ( $P = 0.045$ )。见表 2、图 4。

表 2 3 组兔骨髓间充质干细胞基因转染后检测结果

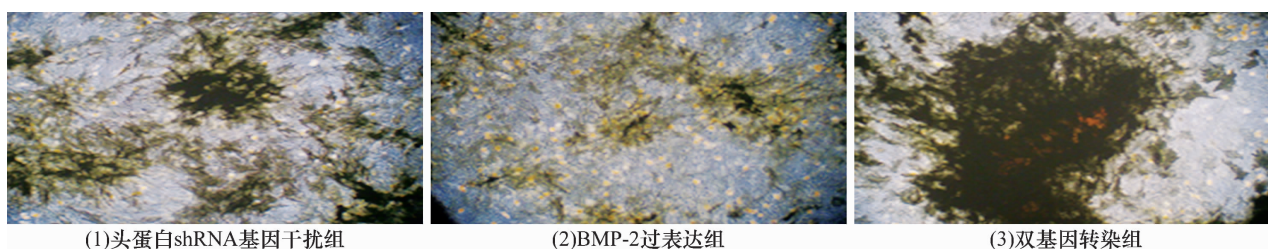
组别	样本量(孔)	头蛋白 mRNA	BMP-2mRNA	茜素红染色阳性率	碱性磷酸酶染色阳性率
头蛋白 shRNA 基因干扰组	3	$0.343 \pm 0.124$	$1.120 \pm 0.363$	$(62.317 \pm 3.969)\%$	$(55.157 \pm 9.959)\%$
BMP-2 过表达组	3	$1.040 \pm 0.269$	$3.667 \pm 0.431$	$(39.267 \pm 2.170)\%$	$(35.353 \pm 6.494)\%$
双基因转染组	3	$0.123 \pm 0.057$	$4.833 \pm 0.475$	$(72.320 \pm 4.133)\%$	$(82.337 \pm 10.594)\%$
<i>F</i> 值		22.390	59.680	68.870	19.750
<i>P</i> 值		0.002	0.000	0.000	0.002

BMP-2:骨形态发生蛋白 2



BMP-2:骨形态发生蛋白 2

图 3 3 组兔骨髓间充质干细胞基因转染后茜素红染色结果 ( $\times 200$ )



BMP-2:骨形态发生蛋白 2

图 4 3 组兔骨髓间充质干细胞基因转染后碱性磷酸酶染色结果 ( $\times 200$ )

## 4 讨论

干细胞具有自我更新和多向分化的特点,且无抗原性,不会引起自身的免疫反应,是具有优良潜质的种子细胞,已被广泛应用于多个领域<sup>[24]</sup>。BMP-2 蛋白参与骨细胞生成和分化的各个阶段<sup>[25]</sup>。BMP-2 蛋白的表达量与骨量有直接相关性,可作为判断骨量的指标之一<sup>[26-28]</sup>。头蛋白可抑制 BMP-2 的表达,也是 BMP 蛋白信号通路的抑制剂。经头蛋白 shRNA 基因干扰载体和 BMP-2 过表达载体转染后, BMSCs 中 BMP-2mRNA 的表达均可增加,且经 BMP-2 过表达载体转染的 BMSCs 中 BMP-2mRNA 表达量高于经头蛋白 shRNA 基因干扰载体转染的 BMSCs,但标志骨形成的矿化结节的形成率却低于后者。这可能与头蛋白也调控骨形态发生蛋白家族其他基因的

表达,从而加强成骨作用有关。而经两种基因转染的 BMSCs 中的 BMP-2mRNA 相对表达量最高,矿化结节的形成率也最高,说明头蛋白 shRNA 和 BMP-2 的协同作用可以强化 BMSCs 的成骨能力。

## 5 参考文献

- [1] ZHANG H, MA X, ZHANG L, et al. The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4):4989-4996.
- [2] ZHANG W, ZHANG F, SHI H, et al. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e88794.
- [3] LAUDES M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes[J]. J Mol Endocrinol, 2011, 46(2):R65-R72.
- [4] NAJI A, EITOKU M, FAVIER B, et al. Biological functions

- of mesenchymal stem cells and clinical implications [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(17): 3323–3348.
- [5] WANG S, HU S, WANG J, et al. Conditioned medium from bone marrow – derived mesenchymal stem cells inhibits vascular calcification through blockade of the BMP2 – Smad1/5/8 signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 160.
- [6] METAVARAYUTH K, MATURAVONGSADIT P, CHEN X, et al. Nanotopographical cues mediate osteogenesis of stem cells on virus substrates through BMP – 2 intermediate [J]. Nano Lett, 2019. doi:10.1021/acs.nanolett.9b02001.
- [7] LOWERY J W, ROSEN V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton [J]. Physiol Rev, 2018, 98(4): 2431–2452.
- [8] 王洁, 王萧枫. 淫羊藿总黄酮的抗骨质疏松作用及其对调控成骨细胞分化及骨形成关键信号通路的影响 [J]. 中医正骨, 2017, 29(1): 45–48.
- [9] KANG N, LIU X, GUAN Y E, et al. Effects of co – culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage [J]. Biomaterials, 2012, 33(18): 4535–4544.
- [10] KIM J W, HA K Y, MOLON J N, et al. Bone marrow – derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intraleisional and intravenous transplantation [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2013, 38(17): E1065–1074.
- [11] DUMIC – CULE I, PERIC M, KUCKO L, et al. Bone morphogenetic proteins in fracture repair [J]. Int Orthop, 2018, 42(11): 2619–2626.
- [12] FISHERO B A, KOHLI N, DAS A, et al. Current concepts of bone tissue engineering for craniofacial bone defect repair [J]. Craniomaxillofac Trauma Reconstr, 2015, 8(1): 23–30.
- [13] BRAGDON B, THINAKARAN S, MOSEYCHUK O, et al. Casein kinase 2 beta – subunit is a regulator of bone morphogenetic protein 2 signaling [J]. Biophys J, 2010, 99(3): 897–904.
- [14] XIAO Y T, XIANG L X, SHAO J Z. Bone morphogenetic protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(3): 550–553.
- [15] 全仁夫, 汤样华, 黄忠名, 等. 兔骨髓间充质干细胞的分离培养及诱导分化 [J]. 中医正骨, 2010, 22(11): 15–18.
- [16] 全仁夫, 郑宣, 许世超, 等. 大鼠毛囊干细胞体外培养及基因转染方法 [J]. 中医正骨, 2014, 26(6): 19–23.
- [17] FRANCISCO J S, MORAES H P, DIAS E P. Evaluation of the Image – Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry [J]. Braz Oral Res, 2004, 18(2): 100–104.
- [18] 许蕾, 韩建国, 李家锋. 人 BMP – 2 体外定向诱导犬 BMSCs 向成骨方向分化的实验研究 [J]. 泰山医学院学报, 2015, 36(9): 971–974.
- [19] 臧程程, 赵志颖, 陈阵, 等. 人牙髓成牙本质细胞和神经组织中钠钙交换体 1 型通道蛋白的免疫组化研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 2015, 50(10): 627–630.
- [20] CUI L, YIN S, LIU W, et al. Expanded adipose – derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2 [J]. Tissue Eng, 2007, 13(6): 1185–1195.
- [21] SUN L Y, WU L, BAO C Y, et al. Gene expressions of Collagen type I, ALP and BMP – 4 in osteo – inductive BCP implants show similar pattern to that of natural healing bones [J]. Mater Sci Eng C, 2009, 29(6): 1829–1834.
- [22] 李景辉, 刘大勇, 张方明, 等. 应用人恒牙牙髓干细胞与明胶支架构建组织工程骨的研究 [J]. 北京口腔医学, 2013, 21(1): 21–26.
- [23] 黄小龙, 全仁夫, 胡华辉, 等. HLA – B2704 基因型强直性脊柱炎患者来源的人诱导多能干细胞体系的建立 [J]. 中医正骨, 2017, 29(12): 11–18.
- [24] SONG S J, JEON O, YANG H S, et al. Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(7): 1113–1119.
- [25] HOFFMAN T, KHADEMHOSEINI A, LANGER R. Chasing the paradigm: clinical translation of 25 years of tissue engineering [J]. Tissue Eng Part A, 2019, 25(9/10): 679–687.
- [26] WANG G, YANG H, LI M, et al. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co – cultured with rabbit bone – marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect [J]. J Bone Joint Surg Br, 2010, 92(2): 320–325.
- [27] QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells [J]. N Engl J Med, 2001, 344(5): 385–386.
- [28] DEMITRACK E S, GIFFORD G B, KEELEY T M, et al. Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function [J]. EMBO J, 2015, 34(20): 2522–2536.

(收稿日期: 2019-08-01 本文编辑: 杨雅)