

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.13.003

SD 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及鉴定的实验研究 *

李强强^{1,2} 谢亚东^{1,2} 张怀斌^{1,2} 杨国清^{1,2} 梁文强^{1,2} 王勇平^{2Δ}

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000; 2 兰州大学第一医院骨科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:探讨应用全骨髓贴壁法体外分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的可行性,研究其生物学特性,为骨组织工程提供种子细胞。**方法:**取 SPF 级 5 周龄健康 SD 大鼠 2 只,脱颈处死,分离双下肢股骨、胫骨,全骨髓贴壁法分离培养、纯化 BMSCs;通过倒置显微镜观察原代、传代细胞生长情况、绘制生长、贴壁率曲线,研究其生物学特性;流式细胞仪检测表面标志物、诱导成骨等方法进行鉴定。**结果:**应用全骨髓贴壁法可在体外分离出活性好、纯度高的 BMSCs。倒置显微镜下可见原代细胞呈梭形、多角形,传代细胞形态均一呈纤维样;P3 代 BMSCs 经流式细胞鉴定:CD44、CD90 高表达,CD31、CD45 低表达;定向诱导成骨细胞分化,可见明显矿化结节。**结论:**证实应用全骨髓贴壁培养法体外可成功分离 BMSCs,所分离培养、纯化的细胞生物学稳定,纯度高、活性好,具有多向分化潜能,能为骨组织工程、骨质疏松症和骨折不愈合疾病的研究提供种子细胞。

关键词:骨髓间充质干细胞;SD 大鼠;全骨髓贴壁法;流式细胞仪

中图分类号:R-33;R331.2;Q813 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)13-2410-05

Isolation, Cultivation and Identification of SD Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells*

LI Qiang-qiang^{1,2}, XIE Ya-dong^{1,2}, ZHANG Huai-bin^{1,2}, YANG Guo-qing^{1,2}, LIANG Wen-qiang^{1,2}, WANG Yong-ping^{2Δ}

(1 The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China;

2 Department of orthopedics, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the feasibility of the whole bone marrow attachment method to isolate and culture SD rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro, study their biological characteristics, and provide seed cells for bone tissue engineering. **Methods:** Two healthy SD rats aged 5 weeks with SPF grade were sacrificed by neck dissection. Femur and tibia of lower limbs were isolated, and BMSCs were cultured and purified by whole bone marrow adherent method. The growth of primary and passage cells was observed by inverted microscope, the growth and adherent rate curves were plotted to study their biological characteristics, and the surface markers, fat induction and bone formation were identified by flow cytometry. **Results:** BMSCs with good activity and high purity could be isolated by whole bone marrow adherent method in vitro. Under inverted microscope, the primary cells showed long spindle shape, short spindle shape and polygon shape, and the morphology of the passage cells was uniform and fibro-like. BMSCs were identified by flow cytometry: CD44 and CD90 were highly expressed, while CD31 and CD45 were low. The differentiation of osteoblasts was induced, and mineralized nodules were visible. **Conclusion:** BMSCs can be successfully isolated by whole bone marrow adherent culture method in vitro. The isolated, cultured and purified BMSCs are biologically stable, with high purity, good activity and multidirectional differentiation potential, which can provide seed cells for bone tissue engineering research.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; SD rats; Whole bone marrow adherent method; Flow cytometry

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)13-2410-05

前言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一类来源于中胚层的非造血干细胞,具有多向分化潜能^[1-4],不同诱导条件下可分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等^[5,6]。由于 BMSCs 具有取材简便、异体移植成功率高、易扩

增、表达稳定等优点,因此其已成为骨组织工程理想的种子细胞^[7-9]。然而骨髓中 BMSCs 所占比例偏低,占有核细胞总数的 0.001%-0.1%^[10,11],难以满足骨组织工程的研究应用,故需建立一种有效、稳定、能够迅速扩增的骨髓间充质干细胞体外分离培养、纯化方案是关键所在。目前,国内外分离 BMSCs 的方案尚无统一的标准^[12],其主要有:全骨髓贴壁法、红细胞裂解法、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81960398);甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA369);兰州市城关区科技计划项目(No.2018-1-2)

作者简介:李强强(1991-),男,硕士研究生,研究方向:骨与组织工程,E-mail: 2755534954@qq.com,电话:13359462406

Δ 通讯作者:王勇平(1975-),男,博士、博士后,副教授,硕士生导师,研究方向:骨与组织工程,

E-mail: wangyp312@163.com,电话:13519408076

(收稿日期:2021-01-28 接受日期:2021-02-23)

密度梯度离心法、流式细胞仪分选法及免疫磁珠分选法等^[13,14]。本实验通过全骨髓贴壁法体外分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 研究其生物学特性, 为骨组织工程进一步研究提供理想的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 5 周龄健康 SD 大鼠 2 只, 由兰州大学医学院实验动物中心提供, 均为雄性, 体重 80-100 g。实验过程中对 SD 大鼠的处置在《关于善待实验动物的指导性意见》标准下进行^[15-17]。

1.2 主要试剂与仪器

SD 大鼠骨髓间质干细胞专用培养基 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (赛业生物科技)、胰蛋白酶 (元升生物科技); 二甲基亚砜 (DMSO)、甲基噻唑基四唑 (MTT); CD44、CD45、CD90、CD31 单克隆抗体 (美国 Bioscience 公司); 倒置显微镜 (Olympas 公司); MCO-15AC 型 CO₂ 孵育箱 (Sanyo 公司); 流式细胞仪 (美国 FACScan Becton Dickinson); 酶标仪 (Anthos 公司); 眼科剪刀、眼科镊子、培养瓶等。

1.3 全骨髓贴壁法体外分离培养 SD 大鼠原代 BMSCs

将 2 只 5 周龄健康雄性 SD 大鼠全部脱颈处死, 75% 酒精浸泡消毒两次, 每次 5 min, 超净台无菌分离双侧股骨、胫骨并清除附着的肌肉组织, 放置于含有 PBS 的无菌培养皿中, 反复冲洗 3 次, 眼科剪剪掉双侧股骨和胫骨干骺端, 1 mL 注射器抽取 SD 大鼠骨髓间质干细胞专用培养基 10 mL 加入另一无菌培养皿中, 反复冲洗骨髓腔至发白, 收集培养皿中的培养液于 10 mL 离心管, 4℃ 1000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 用 SD 大鼠间充质干细胞培养液重悬沉淀物。将悬浮液接种于培养瓶中, 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中静置培养, 48h 后首次换液, 并在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况, 以后每隔 2 天换液、观察, 培养至第 8 天倒置显微镜下可见大多数细胞形成集落, 呈梭形, 长短不一。

1.4 SD 大鼠 BMSCs 传代培养及纯化

当原代培养的细胞贴壁融合达到 85% 时, 按 1:2 进行细胞传代。具体方案为: 倒废液, 3 mL PBS 液冲洗 3 次, 加 0.25% 胰蛋白酶 1 mL, 置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中消化 1 min; 倒置显微镜下观察细胞凸起缩为圆形时, 加入 2 mL 细胞培养液终止消化, 滴管反复吹打细胞贴壁面至清亮。收集培养液于 10 mL 离心管中, 4℃ 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 2 mL 细胞培养液重悬, 等量接种于 2 个细胞培养瓶, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况。重复上述实验步骤, 依次传代, 从而达到纯化。

1.5 SD 大鼠 BMSCs 冻存与复苏

冻存步骤: 取生长状态良好的 P2 代细胞, 倒废液, PBS 液冲洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心, 弃上清, 细胞冻存液重悬至冻存管中; 按 4℃ 2h, -20℃ 2h, 最后 -80℃ 的顺序冻存。复苏步骤: 从超低温冰箱中取出冻存管至泡沫冰盒, 37℃ 水浴, 待完全溶解, 吸入含有细胞培养液的离心管, 离心 5 min, 倒上清, 重悬, 接种于细胞培养瓶, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。按上述实验步骤依次冻存、复苏 P3-P5。

1.6 SD 大鼠 BMSCs 贴壁率的绘制^[18]

取生长状态良好的 P3 代细胞, 以 1×10^4 /mL 分别接种于

48 孔板中, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 分别于第 2、4、6、8、10、12、24 小时吸掉培养液和非贴壁细胞, 每次取 6 孔, 用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞并用计数板计数取平均值。计算细胞贴壁率, 以贴壁率 (%) 为纵坐标, 时间 (h) 为横坐标分别绘制各代细胞的贴壁率曲线^[19]。计算公式如下: 贴壁率 (%) = 贴壁细胞数 / 接种的细胞总数 $\times$ 100%。

1.7 SD 大鼠 BMSCs 不同代生长曲线的绘制^[20]

取生长状态良好的 P3 代细胞, 制成单细胞悬液, 以 1×10^4 /mL 分别接种于 10 个 96 孔板中, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。共分为 10 组, 每组 6 孔 (其中 3 孔设空白对照), 每天测 1 组, 共测 10 天。具体实验方案: 10 个 96 孔板培养 24 h 后, 取 1 组加入 20 μ L MTT (二苯基四氮唑盐), 对照组加入等量培养液, 避光培养 4 h, 吸掉上清液, 加入 150 μ L DMSO (二甲基亚砜), 震荡 10 分钟, 酶联免疫测定仪测定波长 570 nm 吸光度值。以时间 (T) 为横轴, OD 值为纵轴, 绘制 BMSCs 的生长曲线^[21]。

1.8 SD 大鼠 BMSCs 表面标志物的鉴定

取对数期生长的 P3 代细胞, 倒废液, PBS 液清洗, 0.25% 胰蛋白酶消化, 4℃ 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬; 再以 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤 3 次后重悬, 以 1×10^5 /管分加至 6 个 PE 管, 其中 3 管依次加入 10 μ L PE 标记的 CD90、CD44、APC 标记的 CD45 及 FITC 标记的 CD31, 另外 3 管设为空白对照 (加入等量的 PBS); 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中避光培养 30 min, PBS 清洗未标记的细胞, 流式细胞仪检测细胞相应抗原的表达。

1.9 SD 大鼠 BMSCs 多向分化能力的鉴定

取对数期生长的 P3 代细胞, 制成单细胞悬液, 以 1×10^4 /mL 分别接种于 6 孔板中, 每板设 3 个诱导孔、3 个对照孔, 待细胞融合至 90% 时, 向诱导孔各加入 1 mL 成骨诱导培养基, 对照孔加入等量干细胞专用培养基。倒置显微镜下观察细胞形态变化, 每隔 2 天换液、观察。成骨诱导分化 3 周茜素红染色^[22]。

2 结果

2.1 SD 大鼠 BMSCs 形态学观察

原代细胞刚接种时可见大量漂浮的红细胞、造血干细胞, 细胞成分复杂; 48 h 换液后漂浮的细胞减少, 可见已贴壁呈梭形、多角形的细胞 (图 1A); 3 d 后可见部分贴壁细胞形成集落, 依然可见部分杂细胞 (图 1B); 5 d 换液可见大部分细胞都已贴壁, 仅有少量漂浮细胞 (图 1C); 8-10 d 可见贴壁细胞形态呈梭形、多角形集落成片, 细胞紧密融合, 漩涡状排列 (图 1D)。传代细胞形态: 细胞生长迅速, 24 h 完全贴壁, 形态单一, 呈梭形、纤维样, 排列呈网状、漩涡状、鱼群状、辐射状 (图 1E)。

2.2 SD 大鼠 BMSCs 贴壁率

P3 代细胞第 2、4、6、8、10、12、24 小时的贴壁率分别为: 30%、41%、62%、72%、75%、80%、96%。图可以得出: BMSCs 24 小时内几乎完全贴壁且细胞贴壁率随培养时间增加而上升, 说明细胞活性良好 (图 2)。

2.3 SD 大鼠 BMSCs 不同代生长曲线

采用 MTT 法测定 BMSCs 生长曲线, 由图 3 可以看出曲线呈 "S" 形, 基本符合细胞生长曲线, 接种后 1-2 天, 吸光度值

较小,增长缓慢,说明此期细胞生长缓慢,处于潜伏期;第3天开始,吸光度值增加迅速,第5天达高峰且趋于稳定,说明此期

细胞增殖迅速,处于对数期;第6-7天,吸光度值几乎不增加,说明细胞进入平台期。

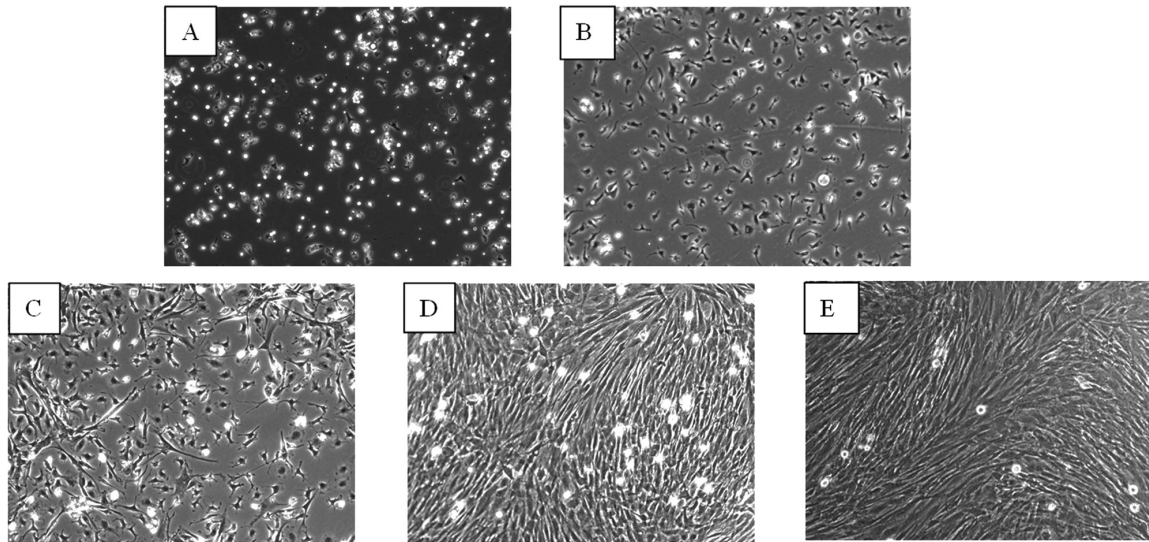


图1 (A-D):SD大鼠骨髓间充质干细胞分离培养在不同时间点形态变化(倒置相差显微镜,×100);E:第三代骨髓间充质干细胞形态
Fig.1 (A-D): the morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured in SD rats at different time points (inverted phase contrast microscope, ×100); E: The morphology of the third generation bone marrow mesenchymal stem cells.

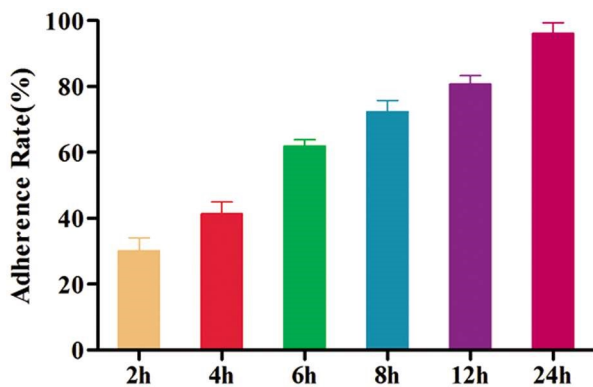


图2 第3代SD大鼠骨髓间充质干细胞贴壁率

Fig.2 Adherence rate of bone marrow mesenchymal stem cells of the third generation SD rats

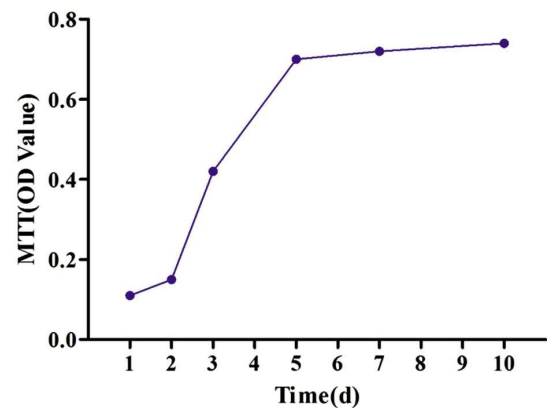


图3 第3代SD大鼠骨髓间充质干细胞生长曲线

Fig.3 Growth curve of the third generation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells

2.4 SD大鼠BMSCs表面标志物的鉴定结果

P3代细胞经流式细胞仪检测结果(图4)示,骨髓间充质干细胞呈阳性表达的CD90、CD44抗原表达量为:99.8%、99.5%,

而呈阴性表达的CD45、CD31抗原表达量为0.4%、0.004%。由此可初步说明SD大鼠骨髓分离出的贴壁细胞为骨髓间充质干细胞。

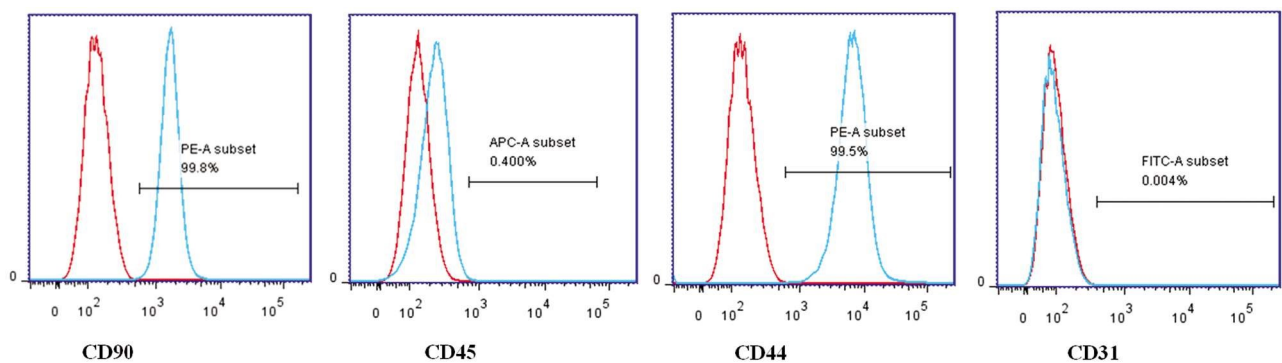


图4 所示,SD大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞仪检测结果

Fig.4 Flow cytometry detection results of bone marrow mesenchymal stem cells in SD rats

2.5 SD 大鼠 BMSCs 多向分化能力的鉴定结果

显微镜下可见明显的矿化结节,茜素红染色阳性。

SD 大鼠骨髓间充质干细胞定向诱导成骨细胞 3 周, 倒置

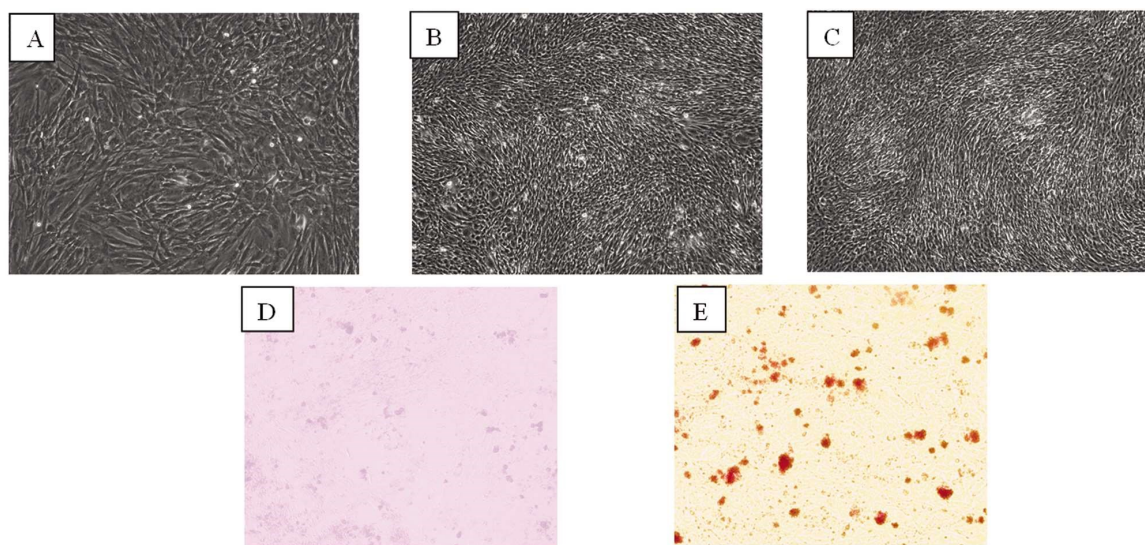


图 5(A-E):SD 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化在不同时间点形态变化(倒置相差显微镜, × 100)

Fig. 5 (A-E): morphologic changes of bone marrow mesenchymal stem cells induced by osteogenesis in SD rats at different time points (inverted phase contrast microscope, × 100)

注:5-A:对照组,未诱导染色;5-B:诱导分化 7 d;5-C:诱导分化 14 d;5-D:诱导分化 21 d,可见明显矿化结节;5-E:茜素红染色阳性。

Note: 5-A: Control group, no induced staining; 5-B: induced differentiation for 7 d; 5-C: Induced differentiation for 14 d; 5-D: Induced differentiation for 21 d with obvious mineralized nodules; 5-E: Alizarin red staining was positive.

3 讨论

骨髓间充质干细胞作为骨髓中常见的非造血干细胞,具有多向分化功能,可向成骨细胞、成脂细胞、内皮细胞、成纤维细胞等分化^[23],备受医疗界关注^[24]。其来源广泛,最初在骨髓内发现,随后在脐带血、胚胎组织、外周血或者肝脏内也同样存在。然而骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量极低,其在骨髓单个核细胞中仅占 0.0001-0.01%^[25],难以满足骨组织工程种子细胞的需求,因此需建立一种体外分离纯化的方式,达到大量扩增的目的。目前关于骨髓间充质干细胞分离培养的方式较多,其中包含流式细胞术分选法、全骨髓贴壁法、免疫磁珠法、密度梯度离心法等^[26],其中免疫磁珠法、流式细胞术分选法均可通过荧光、磁珠标记骨髓间充质干细胞表面抗原,具备操作简便、分选快速、精确度高等优势,但在分选期间可能造成细胞受损或者死亡,加上仪器设备较为昂贵,操作期间需要的细胞数量较多,故应用受到限制^[27,28]。密度梯度离心法虽然操作简便,但极易牵连生长因子、完整的原始骨髓间充质干细胞微环境受损,因此难以进行骨髓间充质干细胞集落。

SD 大鼠全骨髓贴壁法是依据骨髓中骨髓间充质干细胞贴壁生长而红细胞系、粒细胞系等非贴壁或贴壁能力弱的特性,通过间断性换液,达到纯化^[29-31]。由于此种分离培养法对细胞的伤害较小,保留了原始细胞生长所需的微环境,细胞增殖速度快,故用此法可获得高活性、高纯度的骨髓间充质干细胞^[32,33]。本实验研究采用全骨髓贴壁法分离出的骨髓间充质干细胞 48 h 换液后,可见已贴壁的梭形细胞,8-10 d 可见贴壁细胞集落成片,紧密融合。传代至第 3 代时,BMSCs 形态单一稳定、纯度高、活性好。

本实验用 MTT 法测定骨髓间充质干细胞的生长曲线以反映它们的生长增殖情况。生长曲线显示 BMSCs 经历了潜伏期、对数期和平台期,具有一定的增值能力^[34]。生长曲线呈 "S" 形,基本符合正常细胞生长曲线^[35]。

目前 BMSCs 缺少特异性表面标志物,对其鉴定的方法尚无统一标准^[36]。由于 BMSCs 无典型的形态学特征,选择倒置显微镜对细胞形态变化进行观察,难以达到鉴定的目的。BMSCs 通常表达 CD90、CD44、CD29、CD105、SH3 等表面标志物,并不会表达造血细胞的表面标志物 CD45、CD31、CD14^[37,38]。因此可利用流式细胞术检测表面分子 CD 是否表达来间接鉴定骨髓间充质干细胞^[39]。本实验通过流式细胞仪对 P3 代细胞检测,鉴定的结果显示 CD44、CD90 呈现阳性,而 CD45、CD31 呈现阴性,可初步证实此实验用全骨髓贴壁法可分离出纯度高、活性好的 BMSCs^[40]。

除通过 BMSCs 细胞表面表型鉴定外,其多向分化潜能也是 BMSCs 间接鉴定标准之一^[41]。本实验将培养良好的第三代骨髓间充质干细胞向成骨分化潜能诱导。成骨诱导成功后,依照成骨细胞的特征,例如分泌 I 型胶原、碱性磷酸酶或者是否形成矿化结节等方式进行鉴定。茜素红染色法是明确是否形成矿化结节的标准^[42]。本实验将 BMSCs 特定诱导培养 21d 后经茜素红染色显示矿化钙结节呈阳性,表明 BMSCs 向成骨细胞分化成功。说明 BMSCs 具有多向分化潜能,从而证实本实验分离的细胞为骨髓间充质干细胞。

综上所述,全骨髓贴壁培养法体外可成功分离 BMSCs,分离培养、纯化的细胞生物学稳定,纯度高、活性好,具有多向分化潜能。鉴于此法简单、快捷、有效^[43-45],可推荐为骨组织工程、骨质疏松症和骨折不愈合疾病的研究提供种子细胞,值得

临床推广。

参考文献(References)

- [1] Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells[J]. Korean J Intern Med, 2013, 28(4): 387-402
- [2] Alves H, Mentink A, Le B, et al. Effect of antioxidant supplementation on the total yield, oxidative stress levels, and multipotency of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells [J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(7-8): 928-937
- [3] Kawaguchi H, Kurihara H. Clinical trial of periodontal tissue regeneration[J]. Nippon Rinsho, 2008, 66(5): 948-954
- [4] Herzog EL, Chai L, Krause DS, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells[J]. Blood, 2003, 102(10): 3483-3493
- [5] Feng Z, Li C, Jiao S, et al. In vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes[J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(112): 2081-2086
- [6] Polisetti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells[J]. Neurol India, 2010, 58(2): 201-208
- [7] Schrepfer S, Deuse T, Reichenspumer H, et al. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier[J]. Transplantation Proceedings, 2007, 39(2): 573-576
- [8] 张明伟, 于晓批, 郭子宽, 等. 体外长期培养对人骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2005, 1(1): 51-53
- [9] Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies [J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82(3): 252-264
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147
- [11] Phinney DG, Kopen Q, Isaacson RL, et al. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation [J]. J Cell Biochem, 1999, 72: 570-585
- [12] Chiellini C, Cochet O, Negroni L, et al. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation[J]. BMC Mol Biol, 2008, 9: 26
- [13] 潘莹, 龚五星. 骨髓间充质干细胞的分离、培养技术研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2010, 33(3): 262-265
- [14] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 102-106
- [15] Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart[J]. Circ Res, 2005, 96(2): 151-163
- [16] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30
- [17] Rey D, Pfister C, Gobet F, et al. Study of the prognostic value of DNA ploidy and proliferation index (Ki-67) in renal cell carcinoma with venous thrombus[J]. Prog Urol, 2003, 13(6): 1300-1306
- [18] 段修芳, 桑海明, 王共先, 等. 骨髓间充质干细胞的分离培养鉴定与生物学特性[J]. 国际泌尿系统杂志, 2008, 28(6): 732-736
- [19] 刘卫鹏, 张传仓, 杜江, 等. 大鼠胰腺间质细胞体外培养过程及其形态学特征[J]. 中国临床康复, 2005, 9(26): 79-81
- [20] 舒晓春, 朱丹华, 刘君静, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外生长增殖特点的实验研究[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(10): 923-927
- [21] 吴琪, 刘波, 陈志, 等. 二仙汤对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及骨向分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(25): 3963-3968
- [22] 金鑫, 张志亮, 陆毅, 等. 大鼠 BMSC 与 ADSC 体外 Transwell 共培养诱导成骨的实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2019, 15(5): 322-324
- [23] 李东升, 王丙云, 陈志胜, 等. 禽类间充质干细胞的研究: 探索与前景[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10): 1624-1629
- [24] Sueji. Hirawatari, Hisaki. Watari, Shinichi. Nishida, et al. Hot Forging of Roll-Cast Magnesium Alloys with High Aluminum Content[J]. Key Engineering Materials, 2018, 4733(1578): 187-194
- [25] 吴伟, 雷乐, 杨亚南, 等. 不同形式运动对胰岛素抵抗小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化能力的影响研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2018, 26(4): 326-331
- [26] 蔡金宏, 林春博, 杨渊. 间充质干细胞分离方法的研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45): 7375-7380
- [27] 孙梦寒, 王宁. DMB 促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化并缓解小鼠卵巢切除导致的骨质疏松 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(10): 1428-1433
- [28] Wang Bin-sheng, Hu Yong-xian, Liu Li-zhen, et al. Phenotypal and Functional Characterization of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Patients with Chronic Graft-versus-Host Disease [J]. Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation, 2015, 21(6): 1020-1028
- [29] 刘伟, 陈剑, 宋佳, 等. 兔骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(8): 1366-1369
- [30] 肖仕辉, 韦庆军, 赵劲民, 等. 全骨髓贴壁法培养兔骨髓间充质干细胞体外定向成骨诱导分化及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6): 1069-1074
- [31] 银广悦, 陈素萍, 丁俊丽, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养和鉴定方法学探讨[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(4): 647-650
- [32] 苗雨润, 李娜, 匡德宣, 等. 不同诱导条件对树鼯骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J]. 实验动物科学, 2018, 35(5): 46-51
- [33] 卓灵剑, 郑健雄, 李杰, 等. Lasp1 蛋白和铁蛋白在重组入骨形态发生蛋白 2 介导的小鼠骨髓间充质干细胞成骨过程中的调控机制研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2018, 20(7): 611-616
- [34] Baglioni S, Cantini G, Poli G, et al. Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell[J]. PLoS One, 2012, 7: e365-369
- [35] 许晓婷, 胡文举, 陈晓佩, 等. 兔骨髓间充质干细胞体外分离培养及冻存[J]. 西北农业学报, 2014, 23(11): 17-23
- [36] 李妹玲, 文明. 肿瘤干细胞的 MR 可视化研究进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2014, 37(6): 568-571
- [37] Hamed Tanimowo Aiyelabegan, Malihe Ebadi, Gholam Ali Kardar, et al. k-Casein upregulates osteogenic differentiation on bone marrow mesenchymal stem cells cultured on agarose microcarriers[J]. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2020, 69(6): 373-380
- [38] ChiuChih-Hao, ChangTsan-Hsuan, ChangShih-Sheng, et al. Application of BoneMarrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Muscle Healing After Contusion Injury in Mice [J]. The American Journal of Sports Medicine, 2020, 48(5): 1226-1235

(下转第 2446 页)

- matol Arthrosc, 2012, 20(12): 2567-2572
- [7] 黄振, 宋双临, 张狄. 第二掌骨侧全息穴位埋线结合传统针灸治疗神经根型颈椎病的疗效观察 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(11): 961-964
- [8] 胡振勇, 成师, 陈连锁, 等. 扳机点深压按摩辅助治疗轻中度膝关节疼痛疗效及对患者血清 IL-1、TNF- α 水平的影响 [J]. 山东医药, 2020, 60(17): 75-77
- [9] 朱海丰, 陈福初. 按摩加牵引点压复位法治疗腰间盘突出临床观察[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 25(6): 1251-1251, 1299
- [10] H Hawksley. Pain assessment using a visual analogue scale [J]. Prof Nurse, 2000, 15(9): 593-597
- [11] 张堃, 宋哲, 李忠, 等. 肩关节悬吊复合体损伤的手术治疗策略[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2012, 27(3): 196-198
- [12] Jennifer A Coghlan, Simon N Bell, Andrew Forbes, et al. Comparison of self-administered University of California, Los Angeles, shoulder score with traditional University of California, Los Angeles, shoulder score completed by clinicians in assessing the outcome of rotator cuff surgery[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2008, 17(4): 564-569
- [13] Zhang T, Duan Y, Chen J, et al. Efficacy of ultrasound-guided percutaneous lavage for rotator cuff calcific tendinopathy: A systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(21): e15552
- [14] 刘选泽, 钟喜红, 程劲, 等. 关节镜下同期行冻结肩松解术对肩袖损伤患者的治疗效果评估 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(13): 2581-2584
- [15] Keener JD, Patterson BM, Orvets N, et al. Degenerative Rotator Cuff Tears: Refining Surgical Indications Based on Natural History Data [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2019, 27(5): 156-165
- [16] 韩长旭, 张婷, 王婧娟, 等. 肩袖撕裂保守治疗的临床疗效观察[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2020, 14(6): 752-755
- [17] 谢求恩, 王茜, 谢心军, 等. 体外冲击波联合续筋接骨液及理筋手法治疗肩袖损伤的疗效观察[J]. 中医药导报, 2017, 23(20): 93-95
- [18] Oh JH, Park HD, Han SH, et al. Duration of Treatment Effect of Extracorporeal Shock Wave on Spasticity and Subgroup-Analysis According to Number of Shocks and Application Site: A Meta-Analysis [J]. Ann Rehabil Med, 2019, 43(2): 163-177
- [19] 王国伟, 林永杰, 毛军胜, 等. 体外冲击波治疗慢性肩袖损伤的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(6): 479-480
- [20] Dedes V, Tzirogiannis K, Polikandrioti M, et al. Comparison of Radial Extracorporeal Shockwave Therapy versus Ultrasound Therapy in the Treatment of Rotator Cuff Tendinopathy [J]. Folia medica, 2019, 61(4): 612-619
- [21] 金星, 余德标, 王建斌, 等. 双氯芬酸二乙胺乳胶剂耦合下体外冲击波治疗肩袖损伤的疗效观察 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(7): 504-506
- [22] 张文武. 按摩加牵引点压复位法治疗腰间盘突出的临床观察[J]. 中国保健营养, 2018, 28(32): 62
- [23] 张选平, 李晓菲, 覃亮, 等. 第二掌骨侧针法的临床应用探讨[J]. 世界针灸杂志:英文版, 2018, 7(3): 209-211
- [24] 陈德成. 针刺层次与针感的关系 [J]. 中国针灸, 2017, 37(11): 1219-1222
- [25] 龚洪洋, 黄东旭, 孙希光, 等. 手部掌骨旺炽性反应性骨膜炎二例 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2020, 34(4): 541-542
- [26] 邱燕春. 电针配合穴位按摩对田径运动员胫骨疲劳性骨膜炎的疗效[J]. 体育学刊, 2015, 22(3): 135-137
- [27] 李嘉鸿, 赵自明, 潘华山, 等. 穴位按摩联合芪术通痹汤治疗田径运动员胫骨骨膜炎临床研究[J]. 新中医, 2018, 50(8): 154-157
- [28] 周婷, 丁琳. 中药热敷、按摩结合康复训练对轻中度肩袖损伤患者疼痛及肩关节功能的影响[J]. 四川中医, 2019, 37(10): 165-167
- [29] 戴斌, 高扬, 李文清, 等. 经穴疏导推拿对肩袖损伤修补术后患者功能康复的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(7): 71-73
- [30] 袁海光, 刘智斌, 冯卫星. 经筋触骨针法治疗脑卒中后肩痛疗效观察[J]. 中国针灸, 2017, 37(10): 1035-1039

(上接第 2414 页)

- [39] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147
- [40] Hennrick KT, Keeton AG, Nanua S, et al. Lung cells from neonates show mesenchymal stem cell phenotype [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(11): 1158-1164
- [41] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications Stem [J]. Cells, 2001, 19(3): 180-192
- [42] Nyquist F, Overgaard A, Duppe H, et al. Alcohol abuse and healing complications after cervical hip fractures[J]. Alcohol Alcohol, 1998, 33(4): 373-380
- [43] 张君红, 姜海行, 覃山羽, 等. 全骨髓细胞贴壁法分离与培养大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化能力 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36): 6685-6689
- [44] 赵大成, 汪玉良, 党跃修, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外成骨诱导[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14): 2491-2495
- [45] 赵林, 冯智慧, 焦淑贤, 等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其生物学特性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32): 5923-5927