doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.005

不同龄大鼠骨髓间充质干细胞活性对比 *

刘 凯 马伟康 张 雷 孙崇毅△

（哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150001）

摘要 目的：分别在低氧环境和正常氧环境下研究不同周龄 SD 大鼠骨髓间充质干细胞（BMSCs）的细胞活性以及细胞分化能力的差别，并观察和检测不同周龄大鼠的骨髓间充质干细胞成骨活性有何差异。**方法：**1）、进行不同周龄 SD 大鼠骨髓间充质干细胞的提取及在低氧环境及正常氧环境下的培养。2）、进行细胞生物活性的测定及比较。**结果：**低氧环境下培养的 2 周 4 周龄大鼠的骨髓间充质干细胞（BMSCs）活性好于常氧状态下培养的 2 周 4 周龄大鼠的骨髓间充质干细胞（BMSCs）。**结论：**低氧环境下培养的年轻大鼠的骨髓间充质干细胞活性较好。

关键词：骨髓间充质干细胞；细胞活性；低氧环境

中图分类号：R-33；R329.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2018)06-1024-05

The Comparison of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Ossification Activity*

LIU Kai, MA Wei-kang, ZHANG Lei, SUN Chong-yi△

(The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: Comparative study of different week-old sd rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) cell activity and cell differentiation respectively in hypoxia environment and normal oxygen environment. **Methods:** 1,Extract different week-old SD rat bone marrow mesenchymal stem cells and culture the cells respectively in hypoxia environment and normal oxygen environment. 2, Points out the best age of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells biological activity. **Results:** The biological activity and osteogenic cells differentiation of 2 weeks and 4 weeks of sd rat bone marrow mesenchymal stem cells are better than those of 8 weeks, 12 weeks and 40 weeks especially in hypoxia environment. **Conclusion:** The experiment proves that biological activity of 2 weeks and 4 weeks sd rat bone marrow mesenchymal stem cells is better than those derived from 8 weeks, 12 weeks and 40weeks especially in hypoxia environment.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Cell activity hypoxia environment

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1024-05

前言

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells,BMSCs) 是骨髓中除造血干细胞外存在的另一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,在特定的诱导条件下可向三个胚层的细胞分化[1],其所具有的多向分化潜能,能促进组织的再生,如:骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质等组织[2]。在骨髓中,虽然 BMSCs 占骨髓有核细胞总数的 0.001%~0.1%,含量极低。但由于骨髓间充质干细胞自身增殖能力强、分化范围广,能够修复损伤的功能组织以及免疫调节等功能,不像人类胚胎干细胞一样涉及伦理道德方面的问题[3]。且体外分离培养纯度高、活力强、生物特性均一等特点,使得 BMSCs 对组织工程及细胞的体内、体外实验显得至关重要[4]。本实验通过 BMSCs 的黏附特性,应用全骨髓贴壁培养法,建立了一个简便、有效的原代培养、增殖和纯化 BMSCs 的方法,观察大鼠 BMSCs 的生物学特性及其成骨分化潜能,为组织工程寻找良好的种子细胞提供实践基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

根据鼠龄对哈尔滨医科大学动物实验中心提供的纯系 sd 大鼠进行随机分组(表 1)。另选平均体重约 300 克左右 6 月龄 sd 大鼠约 80 只,去卵巢建立骨质疏松模型。

1.2 主要仪器及试剂

洁净工作台(SW-CJ-2FD)、研究级倒置显微镜(IX41)、冷冻离心机(5810R)、二氧化碳孵箱(NU4750E)、Discovery Wi (S/N 86447)骨密度仪、DMEM 低糖、DMEM 高糖、二氯化钴、胎牛血清(FBS)胰酶细胞消化液、25 cm^2 培养瓶(带滤膜)、成骨诱导剂等由哈尔滨医科大学实验中心提供。

1.3 方法

* 基金项目：黑龙江省自然科学基金项目(H201419)

作者简介：刘凯(1987-)，硕士研究生，住院医师，主要研究方向：骨外科学，E-mail: 316074147@qq.com

△ 通讯作者：孙崇毅(1972-)，硕士生导师，教授，主要研究方向：骨外科学，E-mail: sunchongyi@gmail.com，电话：13674688580

（收稿日期：2017-08-31 接受日期：2017-09-25）

表 1 不同龄大鼠 MSCs 试验分组

Table 1 Different age of rat bone marrow mesenchymal stem cells in experimental groups

Age of rat	Number	culture a week later	culture two weeks later	Culture three weeks later
2 weeks	20	5	5	10
4 weeks	20	5	5	10
8 weeks	20	5	5	10
12 weeks	20	5	5	10
40 weeks	20	5	5	10

1.3.1 MSCs 的体外分离 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠,体积分数 75%乙醇全身浸泡消毒 10 min。无菌条件取股骨及胫骨,PBS 清洗 3 次。剪掉股骨和胫骨的骨骺端,露出骨髓腔。用添加青、链霉素的 L-DMEM 培养基冲出骨髓,反复吹打;将冲出的骨髓制成单细胞悬液。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重悬以 1×10^9 L^{-1} 的细胞浓度接种于 25 cm^2 培养瓶中,置 37 ℃、CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.3.2 原代、传代培养 原代培养过程中,48 h 后全量更换培养基,以后每 3 d 全量更换新鲜培养基。待细胞铺满培养瓶底至细胞融合成单层,密度长至 70%~80%融合时,用 0.25%胰酶消化,1:2 的比例进行传代培养。低氧环境的模拟依靠在培养基内预先加入为了模拟低氧环境的 100 μmol/L 二氯化钴。

1.4 不同周龄不同氧环境下骨髓间充质干细胞增殖测定(MTT 法)

将传至第三代的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞按照 1000 个/孔细胞数的要求,然后分为低氧条件组和正常氧条件组分别在恒温培养箱中培养一日后,每日选取若干份不同氧环境下不同周龄的 SD 大鼠的骨髓间充质干细胞,每孔加入 20 μL0.5% MTT 溶液,然后放于恒温培养箱培养 4 h,培养后弃去培养孔中的 MTT 溶液,再用 PBS 冲洗后。每孔加入二甲基亚砜 150 μL,然后放于摇床上振荡 15 min。用酶标仪测定其 490 nm 处的吸光度,然后分别计算低氧条件组和正常氧条件组大鼠骨髓间充质干细胞的平均吸光度,连续测定 9 d,以时间为横轴,以平均吸光度为纵轴分别绘制低氧条件组和正常氧条件组的细胞生长曲线。

1.5 不同周龄不同氧环境下骨髓间充质干细胞分化及矿化率的比较

将 SD 大鼠骨髓间充质干细胞传至第三代,然后在内含有预处理载玻片的 6 孔板中以密度为 $10^5/cm^2$ 的接种细胞,放在恒温培养箱中培养 1 d,将细胞培养液弃去,加入含有 10 mmol/L β—甘油磷酸钠,0.05mmol/L 维生素 C 和 100 mmol/L 地塞米松的成骨诱导剂 0.5 mL 的细胞培养液。分别进行低氧环境和正常氧环境下的常规细胞培养。每隔 3~5 d 更换培养液,连续培养 20 d 后进行茜素红染色,染色后将细胞至于倒置显微镜的低倍镜下任选 10 个视野,观察后计算细胞分化后的钙化面积平均值与载玻片的总面积比值,并计算钙化率。

2 结果

2.1 原代培养

骨髓细胞接种于培养瓶后,细胞呈圆型,大小不一,悬浮于培养液中。继续培养 24 h 后可见贴壁的球形细胞形态逐渐改变,在倒置显微镜下观察发现细胞呈现椭圆形、梭型或多角形,同时贴壁细胞还表现出对光的通透性及折射型较好的特点。原代细胞培养约 72 h 后可见细胞明显的变形,呈现多角形。在原代培养进行至 5～6 d 时可见大部分细胞贴壁,几乎遍布瓶底。细胞呈现鱼群样。原代培养约 6 d 后分布在瓶底的细胞群互相接近、细胞形态发生变化,呈现旋涡状。经过约 9 d 的原代培养后发现细胞遍布在瓶底,甚至融合为一层。原代培养约 12 d 时,可见贴壁细胞呈现细丝样改变(成纤维样外观)。

2.2 传代培养

原代培养的贴壁细胞在生长至约 8~12 d 时即可进行传代培养。消化与传代都需要在无菌条件下进行,子代细胞比原代细胞生长快,经过 4~6 h 的传代培养就能看到贴壁生长的细胞,细胞完全贴壁生长发生在培养一天后。细胞贴壁后即可见细胞变形,用倒置显微镜观察可见细胞呈现圆形、梭型或多角形,同时贴壁细胞胞体对光的通透性及折射型也比较好。子代细胞培养约一周时间即可见细胞融合完全。

细胞传至第 3 代以后,各子代细胞在倒置显微镜下观察生长情况基本相同。我们所提取的原代骨髓间充质干细胞大致传代 10 代左右,贴壁细胞的形态基本一致。但随着传代次数于细胞活性呈现反比。传至 3 代以后 MSCs 可见细胞变形能力以及贴壁所用的时间明显改变,能力下降。实验表明生物活性最强的骨髓间充质干细胞是传代至第 3 代的骨髓间充质干细胞。

2.3 不同周龄不同氧环境下骨髓间充质干细胞增殖测定(MTT 法)

将传至第三代的 SD 大鼠骨髓间充质干细胞以 1000 个/孔的细胞数以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,分为低氧条件组和正常氧条件组恒温培养箱培养一日后,每日选取若干份不同周龄不同氧环境下的 SD 大鼠的骨髓间充质干细胞加入 0.5% MTT 溶液溶液,每孔 20 μL,后置于恒温培养箱培养 4 h,培养后将培养孔中的 MTT 溶液弃去,用 PBS 液冲 2 遍后。加入二甲基亚砜,每孔 150 μL 后置于摇床上振荡 15 min,结晶物溶解后。用酶标仪测定其 490 nm 处的吸光度,然后分别计算低氧条件组和正常氧条件组大鼠骨髓间充质干细胞的平均吸光度,连续测定 9 d,以时间为横轴,以平均吸光度为纵轴分别绘制低氧条件组和正常氧条件组的细胞生长曲线(图 5、图 6)。

可见细胞生长曲线呈带有平台期的抛物线形,骨髓间充质干细胞接种后 1～2 d 为细胞生长的潜伏期,细胞接种后第 3 d 进入细胞生长对数生长期,细胞接种后 5～6 d 进入细胞生长达到高峰,细胞接种 6 d 以后进入细胞生长平台期。

2.4 不同周龄不同氧环境下骨髓间充质干细胞分化及矿化率的比较

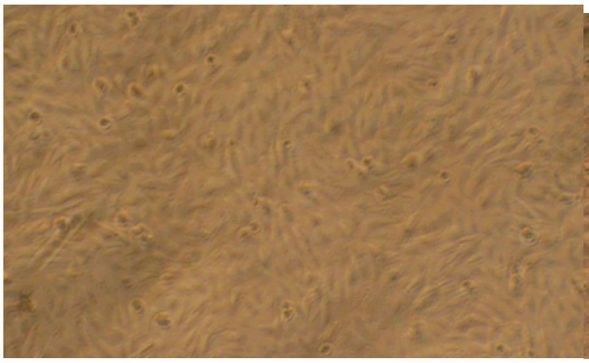

图 1 2 周龄 SD 大鼠 MSCs(200 倍)

Fig.1 2 week old sd rat MSCs

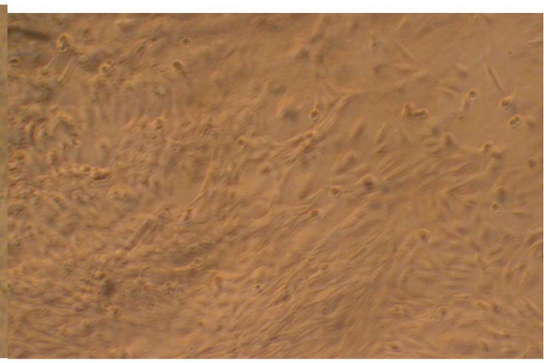

图 2 4 周龄 SD 大鼠 MSCs(200 倍)

Fig.2 4 week old sd rat MSCs

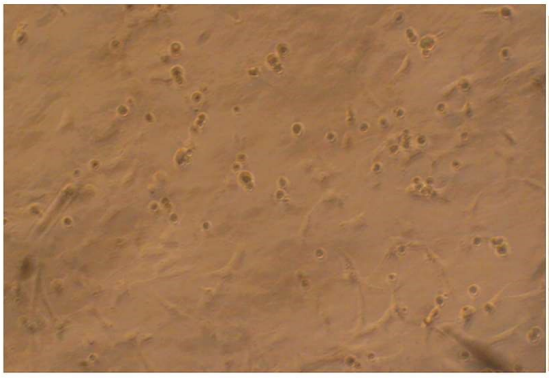

图 3 8 周龄 SD 大鼠 MSCs(200 倍)

Fig.3 8 week old sd rat MSCs

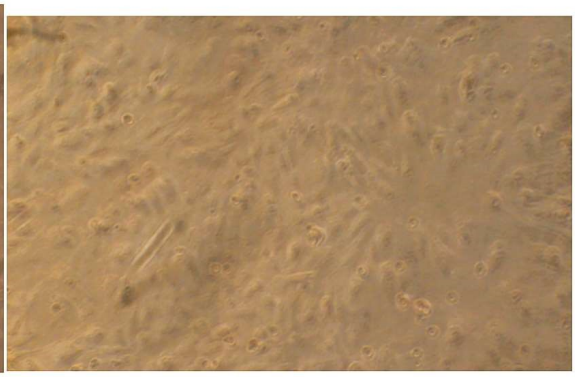

图 4 12 周龄 SD 大鼠 MSCs(200 倍)

Fig.4 12 week old sd rat MSCs

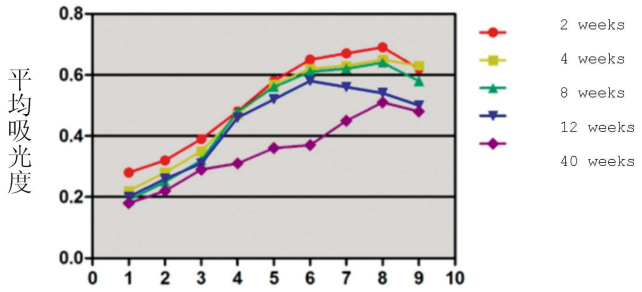

图 5 正常氧条件下的细胞活性

Fig.5 Cell activity under normal oxygen conditions

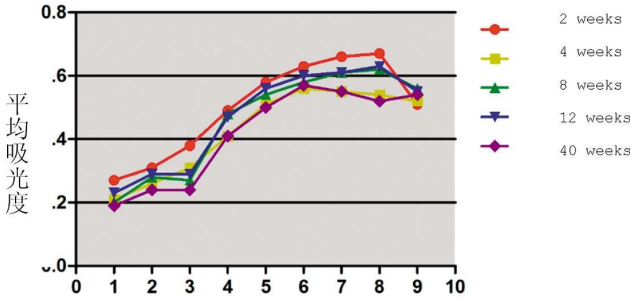

图 6 低氧条件下的细胞活性

Fig.6 cell activity under hypoxic conditions

同样应用传至第三代的 SD 大鼠 MSCs 以 $10^5/cm^2$ 的密度接种于内含载玻片的 6 孔板中,置于恒温培养箱中培养 1 d,之后更换含有成骨诱导剂的培养液。常规细胞培养液下培养。更换培养液的频率为每隔 3~5 d 一次,经过 20 d 的连续培养后采用茜素红进行染色,在倒置显微镜的低倍镜(100×)下任选 10 个视野观察染色后的细胞,观察并计算细胞成骨诱导后钙化面积平均值与总面积比值,计算平均钙化率(表 2)。诱导后的 BMSCs 经过茜素红染色呈现红色的矿化结节(图 7)。

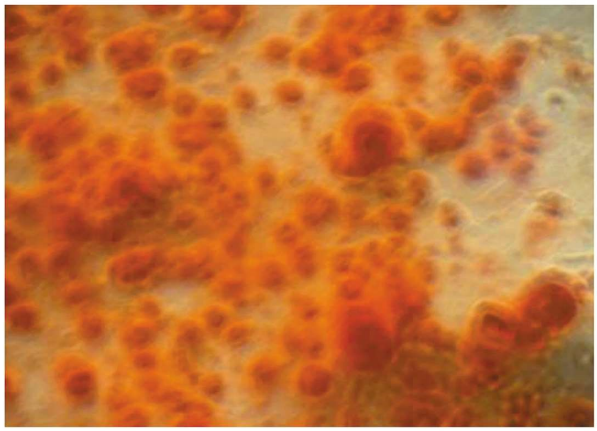

图 7 成骨细胞茜素红染色(100 倍)

Fig.7 Alizarin red staining of osteoblasts

3 讨论

近年来,对胚胎干细胞与造血干细胞等相关成体干细胞的研究已有了突飞猛进的发展,但由于受到伦理方面的制约,其临床应用受到了限制。骨髓间充质干细胞不像人类胚胎干细胞一样涉及伦理道德方面的问题[3],因此 BMSCs 有了越来越多

表 2 不同周龄 SD 大鼠骨髓间充质干细胞矿化能力的比较

Table 2 Sd different age rat MSCs Comparison of mineralization

Aeg of rat	Number	Mineralization rate
2 weeks	20	52.72%± 0.05%
4 weeks	20	50.15%± 0.05%
8 weeks	20	46.35%± 0.05%
12weeks	20	45.26%± 0.05%
40weeks	20	36.37%± 0.05%

的发展空间。研究证实，体外分化诱导下，骨髓间充质干细胞可以转化分裂形成多种系别的中胚层细胞包括包括骨、软骨[5]、肌键[6]等。而且其优越性已得到了共识，比如来源广、免疫排斥弱等，因而 BMSCs 在临床骨组织修复有广泛潜能，已受到越来越多专家学者的重视。目前在不同的疾病方面都有学者在研究骨髓间充质干细胞，如退行性疾病、遗传性疾病和恶性肿瘤[7-9]。

1991 年 Caplan 等人通过将自己多年的研究结果和他人的研究进行总结，认为维持骨骼和肌肉的创伤修复和新陈代谢的基质细胞存在骨骼肌肉系统中[10]。1994 年 Bruder 等人在前人的研究基础上，认为利用自体的 BMSCs 可以修复骨骼肌肉系统的组织缺损[8]。Ma[11]等采用大鼠胫骨骨不连模型研究冰冻骨髓对骨折愈合的影响，证实了自体骨髓间充质干细胞移植可以促进骨折愈合和骨修复。 Koob 等[12]报道了骨髓间充质干细胞复合上皮细胞治疗实验性巨大骨缺损取得了较好的效果。有研究证 实骨不连部位仍存有骨髓间充质干细胞，骨髓间充质干细胞注射可增加局部骨髓间充质干细胞的浓度[13]。Cancedda 等[14]报道显示，自体骨髓移植可以用于治疗 较大范围的骨不连、骨缺损。

由于骨髓间充质干细胞在骨髓中的含量很低，因此对于提取及分离纯化扩增骨髓间充质干细胞就显得格外重要。早在 1989 年，Connolly 等通过动物实验发现骨髓中的间充质干细胞具有成骨能力[15]。骨分离纯化及体外扩增 BMSCs 技术是生物工程上一项重要工作，因为在临床实验研究和医治上都有重要应用。本实验采用密度梯度离心法和贴壁培养法提取原代细胞。并选用了细胞分离液，提取出比较纯净的大鼠骨髓间充质干细胞[16]。

骨髓间充质干细胞随着细胞传代次数的增加，贴壁生长的细胞逐渐失去原有的组织结构和细胞形态。这就是我们临床实验中常见的“返祖现象”，即随着传代培养次数增加细胞分化能力呈递减趋势[17]。细胞在体内外培养环境有相应差异，主要体现在内环境的生物信号转导上，内环境有调控细胞转化分裂的能力，因而体外培养细胞虽然可以维持持久的分裂能力，但是体内外环境差异造成的细胞分化差异不容忽视。通过以上理论可得出骨髓间充质干细胞传代培养也会产生相应差别，但是根据目前已知多项研究结论，传代培养 2-4 代可以满足实验研究的精确性[18]，因而本实验采取 3 代 BMSCs 来建立大鼠模型。

本实验需建立骨髓间充质干细胞成长曲线，研究表明 BMSCs 原代培养曲线特点为后期呈平台期生长的抛物线型曲线，即 1-2 天为潜伏期；第 3 天开始大量递增为对数生长期；第 5-6 天达到高峰；第 6 天后为平台期，最终转归为直线形。通过原代骨髓间充质干细胞生长曲线可见细胞在骨髓中含量较低。也说明骨髓间充质干细胞在对数生长期的体外分化能力很强。表明在体外对骨髓间充质干细胞的提取扩增是可行的。

多项实验研究已经证实大鼠 BMSCs 的多项分化潜能和他们可作为细胞治疗的有用来源。例如：Woodbury 等[19]刺激大鼠 BMSCs 分化成神经元通过种植密度为 8 000 cells/cm^2 的大鼠 BMSCs，并培养至融合。第 6 代细胞应用于神经元分化。Hofstetter 等[20]将大鼠 BMSCs 植入脊髓，培养密度为 5 000 cells/cm^2，培养生长至融合，第 5 代细胞用于植入。Dezawa 等[21]体外诱导大鼠 BMSCs 分化为许旺细胞并植入坐骨神经中。细胞在用于实验前，至少要传代扩增 3 代以上以获得足够量的细胞。有报道称在第 2 代初始密度为 6 000/cm^2 培养至第 4 代共可获得 10^8 个细胞[22]。

目前骨髓间充质干细胞在分化为表皮、胃肠及造血细胞的方面都有很多的成果。但是都为体外正常氧环境下的培养模式。但生物体内的细胞所处的微环境是低氧张力的微环境。因此，低氧环境下骨髓间充质干细胞的提取分化研究更接近骨髓间充质干细胞所生长的微环境。本实验采用模拟低氧氧环境进行骨髓间充质干细胞的培养方法进行成骨培养及 sd 大鼠体内移植证明了低氧环境下培养的细胞移植后成活分化能力更强。因此，通过进行骨髓间充质干细胞的体外低氧环境培养，为移植提供成活能力强的骨髓间充质干细胞是有力的条件之一。目前为止，利用骨髓间充质干细胞（BMSCs）进入成骨细胞或软骨细胞分化谱系的方法来修复骨组织、关节软骨组织缺损的方法已被很多研究证实[23,24]。

研究表明所有细胞在其生长发育的不同阶段其活性以及细胞增殖能力明显不同。Komiyama 等[25]通过分离对比证明老龄鼠胸腺细胞活性明显低于幼龄鼠胸腺细胞的活性。说明鼠龄与其细胞活性呈反比。目前，对于骨髓间充质干细胞的研究的实验动物年龄的选择各不相同。此实验随机筛选 0.5 个月至 4 个月的 SD 大鼠， 探究大鼠 BMSCs 成体干细胞的生物活性及增殖能力与月龄之间的关系。本实验结果可得出：0.5 个月、1 月龄大鼠的骨髓间充质干细胞的增殖、贴壁时间和贴壁率高于 2 个月、三个月及 10 个月的大鼠。40 周龄大鼠 MSCs 的细胞生长最为缓慢，同时 8、12 周龄大鼠的 MSCs 贴壁细胞数目少，细胞形态不规则，呈短小的梭形细胞，细胞融合缓慢，分裂很少。Co1．ter 等 [26] 认为此原因即骨髓间充质干细胞内含有 RS 细胞。与此同时，相关实验也发现 MSCs 中 RS 随大鼠月龄递增而呈递减趋势。我们可以通过大量实验得出 SD 大鼠 BMSCs 的生物活性、含量随着月龄的增加而递减的重要结论。与此同时，0.5 个月和 1 个月的大鼠更易去骨骺， 具备了骨髓间充质干细胞分离提取的优点。

全骨髓贴壁法是一种更加简单有效的 BMSCs 分离方法。Friedenstein 等[27]应用全骨髓贴壁法获得了高纯度,活性好,形态均一的大鼠 BMSCs。Polisetti 等[28]通过实验研究证实应用简单的粘附方法,可建立一种有效地富集相当纯度的 BMSCs,其表型特征及多分化潜能具有干细胞的特征。本实验利用全骨髓贴壁法,通过简单的体外分离,利用大鼠 BMSCs 的贴附特性,建立了一种有效地富集相当纯度的 BMSCs 方法,证实其具有向成骨细胞诱导分化的潜能。由此可见实验分离培养的高纯度的 BMSCs 是组织工程学中种子细胞的重要来源。

参 考 文 献(References)

[1] North American Menopause Society. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society[J]. Menopause, 2010, 17(1): 25-54

[2] Pittenger MF,Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147

[3] Timper K, Seboek D, Eberhardt M, et a1. Human tissue-derived stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341: 135-140

[4] PunwarS, KhanWS. Mesenchymalstemcellsand articular cartilage repair: clinical studies and future direction [J]. Open Orthop, 2011, 5 (Suppl 2): 296-301

[5] Young RG, Butler DL, Weber W. The use of mesenchymal stem cells in achilles tendon repair[J]. Orthop Res, 1998, 20(6): 406-413

[6] Prokop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue[J]. Science, 1997, 46(6): 71-74

[7] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. Blood, 2001, 98(8): 2396-2402

[8] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood [J]. Blood, 2004, 103(5): 1669-1675

[9] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49

[10] Bruder SP, Fink DJ, Caplan Ai. Mesenchymal sten cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy [J]. Cell Biochem, 1994, 20(4): 283-294

[11] Ma HL, Chen TH, Hung SC. Development of a new method in promoting fracture healing: multiple cryopreserved bone marrow injections using a rabbit model [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2004, 124(7): 448-454

[12] Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, et al.Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects [J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(3-4): 311-321

[13] wakura T, Miwa M, Sakai Y, et al. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro[J]. Orthop Res, 2009, 27(2): 208-215

[14] Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, et al. Cell therapy for bone disease: a review of current status[J]. Stem Cells, 2003, 21(5): 610-619

[15] Clay Smith MD, Bob Storms. Heatopoietic stem cells[J]. ClinOrthop Res, 2000, 36(7): 591-597

[16] Evans CH, BobbinsPD. Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system[J]. ClinOrthop Res, 1999, 28(4): 410-417

[17] Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality[J]. Stem Cells, 2002, 20 (6): 530-541

[18] Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation[J]. J Cell Biochem, 1999, 72(3): 396-410

[19] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-370

[20] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery[J]. Proc Natl AcadSci USA, 2002, 99(4): 2199-2204

[21] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(11): 1771-1776

[22] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327 (3): 449-462

[23] Wakitani S, GotoT, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large of full thickness defects of articular[J]. Bone joint Surg, 1994, 52(1): 579-592

[24] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential[J]. Blood, 2004, 103(5): 1662-1668

[25] Komiyama A, Suzuki K. Age-related changes in attachment and proliferation of mouse Schwann cells in vitro[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1991, 62(1): 7-l9

[26] 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

[27] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. Embryol Exp Morphol, 1966, 16 (3): 381-390

[28] 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