

激素性股骨头坏死患者骨髓间充质干细胞 体外增殖分化能力的研究

康少平¹ 刘淑艳¹ 李永升² 李 萍^{1*}

(¹河北北方学院医学检验学院, 张家口 075000; ²张家口市第二医院骨外科, 张家口 075000)

摘要 通过对激素性股骨头坏死患者股骨头骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖及成骨、成脂分化能力的研究, 探讨激素性股骨头坏死的发病机理及自体BMSCs移植治疗股骨头坏死的可行性。选择激素性股骨头坏死患者10例, 无股骨头坏死的股骨颈骨折患者10例作为对照组。两组患者在行全髋关节置换术中抽取股骨头骨髓血, 密度梯度离心法分离BMSCs并培养至第3代细胞, 流式细胞仪检测细胞特异性表面抗原, 成纤维细胞-集落形成实验以及成骨、成脂诱导培养后分析细胞的增殖及成骨、成脂分化能力。结果显示, 股骨头坏死组细胞表达BMSCs特异性表面抗原CD44、CD73; 股骨头坏死组BMSCs形成集落数明显低于对照组; 股骨头坏死组碱性磷酸酶活性和钙结节数均低于对照组; 股骨头坏死组的成脂细胞数明显高于对照组。该研究结果表明, 激素性股骨头坏死患者股骨头BMSCs的增殖及成骨分化能力下降, 但其成脂分化潜能增强, 推测BMSCs增殖及分化能力的改变可能参与激素性股骨头坏死病理生理过程。

关键词 激素性股骨头坏死; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 分化

The Ability of Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *In Vitro* in Steroid-induced Osteonecrosis of Femoral Head

Kang Shaoping¹, Liu Shuyan¹, Li Yongsheng², Li Ping^{1*}

(¹College of Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

²Department of Orthopedics, the Second Hospital of Zhangjiakou, Zhanjiakou 075000, China)

Abstract The aim of the study was to explore the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of femoral head (ON) and the feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation in the treatment of ON. We studied the ability of the proliferation, osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs which were isolated from femoral heads of patients with steroid-induced ON. 10 patients with steroid-induced ON were selected and 10 patients with femoral neck fractures without ON were treated as the control group. Bone marrow blood of the femoral heads were collected during the total hip arthroplasty (THA). The BMSCs were isolated by density gradient centrifugation method and cultured to the 3rd passage. The specific antigens on cell surface were detected by flow cytometry. The ability of proliferation, osteogenic and adipogenic differentiation were analyzed by colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assay, osteogenic and adipogenic induction. The results

收稿日期: 2015-08-21 接受日期: 2015-10-08

张家口市科学技术研究与发展计划项目(批准号: 1321052D)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0313-4029271, E-mail: zjkliping@163.com

Received: August 21, 2015 Accepted: October 8, 2015

This work was supported by the Science Technology Research and Development Program of Zhangjiakou (Grant No.1321052D)

*Corresponding author. Tel: +86-313-4029271, E-mail: zjkliping@163.com

网络出版时间: 2015-11-12 12:46:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1246.014.html>

showed that specific surface antigen CD44 and CD73 of BMSCs were positive in the ON group. The CFU-F assay showed that the BMSCs obtained from the ON group reduced the amount of colonies compared with the control group. The alkaline phosphatase activity and the calcium nodules of ON group were lower than the control group. But the BMSCs of ON group had the higher ability to produce lipid droplets than the control group. These results showed that BMSCs from patients with steroid-induced ON possess reduced proliferation activity and less capability to differentiate into osteoblasts but more potential to differentiate into adipocytes. The changes of BMSCs proliferation and differentiation ability may be involved in the pathophysiological process of steroid-induced ON.

Keywords steroid-induced osteonecrosis of femoral head; bone marrow mesenchymal stem cell; proliferation; differentiation

股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head, ON)是指由于股骨头血供中断或受损引起骨细胞及骨髓成分死亡及随后的修复, 继而导致股骨头结构改变、股骨头塌陷、关节功能障碍的疾病^[1]。按照发病机理可将股骨头坏死分为创伤性与非创伤性, 非创伤性股骨头坏死的常见原因有激素使用、酗酒等。目前, 激素性股骨头坏死的发病率占非创伤性股骨头坏死首位^[2], 但其详细发病机理尚不清楚。许多研究提出, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的增殖与分化能力改变与激素性股骨头坏死的发生相关^[3]。

BMSCs是一种具有自我更新及多向分化能力的多能干细胞, 在不同的诱导条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞以及血管内皮细胞等多种细胞^[4], 而且BMSCs在骨折愈合的初期及骨骼修复的过程中可能发挥重要的作用^[5]。目前, 临床上尝试使用患者自体BMSCs治疗股骨头坏死^[6-7], 使其向成骨细胞和血管内皮细胞分化, 但治疗的前提是获得增殖与分化能力正常的BMSCs。因此, 本研究观察激素性股骨头坏死患者股骨头BMSCs的增殖及成骨、成脂分化能力, 探讨激素性股骨头坏死的发病机理, 并为临床上自体BMSCs移植治疗激素性股骨头坏死提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择2013年3月~10月在张家口市第二医院骨外科收治的10例糖皮质激素诱导ON患者, 其中男性4例, 女性6例, 平均年龄45.2岁(37~52岁)。10例新鲜股骨颈骨折患者(<1周)作为对照组, 其中男性5例, 女性5例, 平均年龄61岁(55~71岁)。激素性股骨头坏死组患者中有系统性红斑狼疮、肾病综合征及

特发性血小板减少性紫癜应用糖皮质激素治疗的病史, 临床主要表现为髋部疼痛、活动受限、跛行, 符合ON的诊断标准(X线正侧位片及MRI); 对照组无股骨头坏死、无激素应用史。两组患者在行全髋关节置换术(total hip arthroplasty, THA)中抽取股骨头骨髓血, 分离获得BMSCs。该项研究经医院伦理委员会批准并征得患者知情同意。

1.2 主要仪器和试剂

主要仪器有: 流式细胞仪(Becton Dickinson公司)、倒置相差显微镜(Leica公司)、细胞培养箱(SANYO公司)。主要试剂有: 胎牛血清(FBS)、DMEM/F-12培养基、青霉素-链霉素(双抗)、0.25%胰蛋白酶-EDTA, 以上均购自Gibco公司; 人外周血淋巴细胞分离液(Percoll, 1.077 g/mL)购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; Mouse anti-Human CD44-FITC、CD73、CD45和Mouse anti-Human CD34-PE均购自Becton Dickinson公司; 成骨诱导分化试剂盒、成脂诱导分化试剂盒、茜素红染液、油红O染液, 以上均购自Sigma公司; 碱性磷酸酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 BMSCs的分离、培养与鉴定

1.3.1 BMSCs分离、培养 手术过程中取5 mL股骨头骨髓血标本置于肝素抗凝管, 轻轻混匀, 与等量DMEM/F-12混合, 1 000 r/min离心10 min; 弃上清及脂肪层, 并用DMEM/F-12重悬细胞, 以等体积比缓慢沿管壁叠加在Percoll液面上, 2 000 r/min离心25 min; 吸取乳白色环状细胞层即单个核细胞层, PBS洗涤2次, 1 000 r/min离心10 min; 用细胞培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1%双抗)重悬细胞, 混匀后以 1×10^6 /mL接种至6孔板中, 镜下观察细胞分布均匀; 置于CO₂细胞培养箱中(37 °C、5% CO₂), 常氧下进行培养, 48 h更换新鲜培养液, 去除未贴壁细胞; 以

后每隔3 d换液1次,待贴壁细胞达到80%~90%融合后,0.25%胰蛋白酶-EDTA消化,以1:3的比例传代培养,镜下观察细胞形态^[8]。培养的第3代细胞用于实验。

1.3.2 BMSCs的鉴定 流式细胞仪检测细胞表面抗原:取生长状态良好的第3代BMSCs,0.25%胰蛋白酶-EDTA消化收集细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。PBS充分洗涤2次,各管依次加入单克隆抗体CD34-PE、CD45-FITC、CD44-FITC、CD73-FITC,同时每管样品设立同型对照。常温避光孵育30 min, PBS洗涤细胞3次,除去未结合抗体,用500 μL PBS重悬细胞,上流式细胞仪进行检测分析。

1.4 BMSCs的成纤维细胞-集落形成实验(colony forming unit-fibroblast, CFU-F)

分离各组骨髓血中单个核细胞(mononucleate cell, MNC),接种 1×10^4 MNC于60 cm^2 细胞培养皿中,每个培养皿中共10 mL培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗),置于 CO_2 细胞培养箱中(37°C 、5% CO_2)进行培养。孵育14 d后, PBS洗涤3次,0.5%结晶紫染液染色10 min,蒸馏水洗涤平皿直至背景颜色消失,倒置相差显微镜下观察计数集落的数目,并挑取单个集落用普通计数板进行每个集落细胞计数。

1.5 BMSCs成骨诱导与钙结节染色

将第3代细胞按 $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于6孔板中,基础培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗)进行培养,24 h后使用成骨细胞诱导分化培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸、60 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸)进行成骨诱导,每隔2 d换液1次,成骨诱导培养第14 d使用茜素红染液做钙结节染色。PBS洗涤细胞2次,4% 预冷甲醛(4°C)固定15 min,双蒸水洗涤3次,茜素红染液染色10 min,双蒸水洗涤2次。在低倍镜下观察每个视野中阳性钙结节的个数,每孔随机选取5个视野,取其平均数做比较。

1.6 细胞培养液上清中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性测定

收集第3代贴壁细胞成骨诱导培养第7、14 d各组培养液上清,测定ALP的活性,反映BMSCs成骨诱导分化^[9]。取96孔培养板,设定测定孔、标准孔、空白孔,按照碱性磷酸酶试剂盒说明书进行操作,计算各组细胞培养液上清中ALP活性(金氏单位/100 mL)。

1.7 BMSCs成脂诱导与脂滴染色

将第3代细胞按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于6孔板中,基础

培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗)进行培养,每隔2 d换液1次。待细胞达到100%融合后,使用成脂细胞诱导分化培养基(DMEM/F-12、10% FBS、1% 双抗、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素、0.5 mmol/L IBMX)进行成脂诱导分化。每隔2 d换液1次,成脂诱导培养第14 d,使用油红O染液进行脂滴染色。PBS洗涤细胞2次,10%中性甲醛固定60 min,双蒸水洗涤3次,待干,加入预配并过滤后的油红O染液,染色15 min;吸去多余染液, PBS洗涤2次。倒置相差显微镜下观察各组染色差异并照相记录,了解BMSCs向脂肪细胞的分化程度。

1.8 统计学方法

计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验评价组间差异,应用SPSS 13.0软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态观察与鉴定

取第3代细胞在倒置相差显微镜下观察,激素性股骨头坏死组(ON)与非股骨头坏死组(Non-ON) BMSCs形态相似,细胞贴壁生长,呈长梭型、多角型,漩涡状分布排列(图1)。

流式细胞仪检测ON组第3代BMSCs相对特异性表面抗原CD44、CD73均阳性,CD34(造血干细胞阳性)、CD45(白细胞阳性)均为阴性(图2)。

2.2 BMSCs成纤维细胞-集落形成实验

经密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(MNC)后,接种 1×10^4 MNC于60 cm^2 细胞培养皿中,孵育14 d后,结晶紫染液染色,计数集落数目及每个集落平均细胞数。Non-ON组BMSCs集落数目为ON组的4倍(图3A和图3B),且Non-ON组每个集落平均细胞数目高于ON组($P < 0.01$)(图3C和图3B)。结果提示,激素性ON患者股骨头BMSCs的集落数量及增殖活性下降。

2.3 BMSCs成骨诱导与钙结节染色

Non-ON组BMSCs向成骨细胞诱导培养3 d后,细胞体积变大,由长梭形变为多角形,逐渐细胞内颗粒增多,并逐渐出现细胞交叉重叠,培养11 d后可见细胞聚集成团,颗粒状钙盐沉积明显,14 d进行茜素红染色后,显微镜下可观察到细胞间出现多个体积较大的红色钙结节;ON组BMSCs向成骨细胞诱导培养11 d后仅可见少量颗粒状钙盐沉积,14 d进行茜素

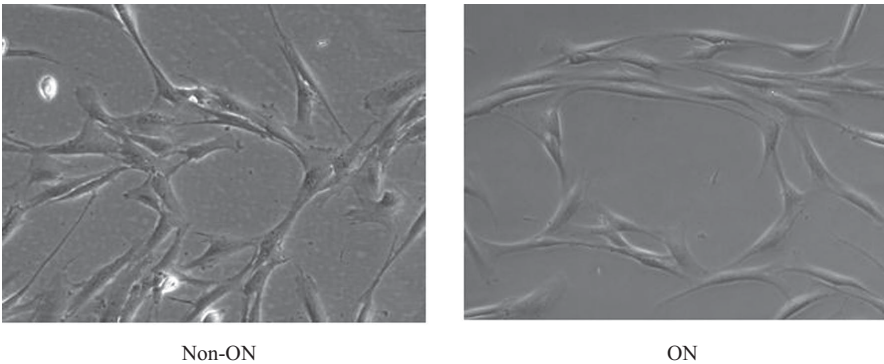
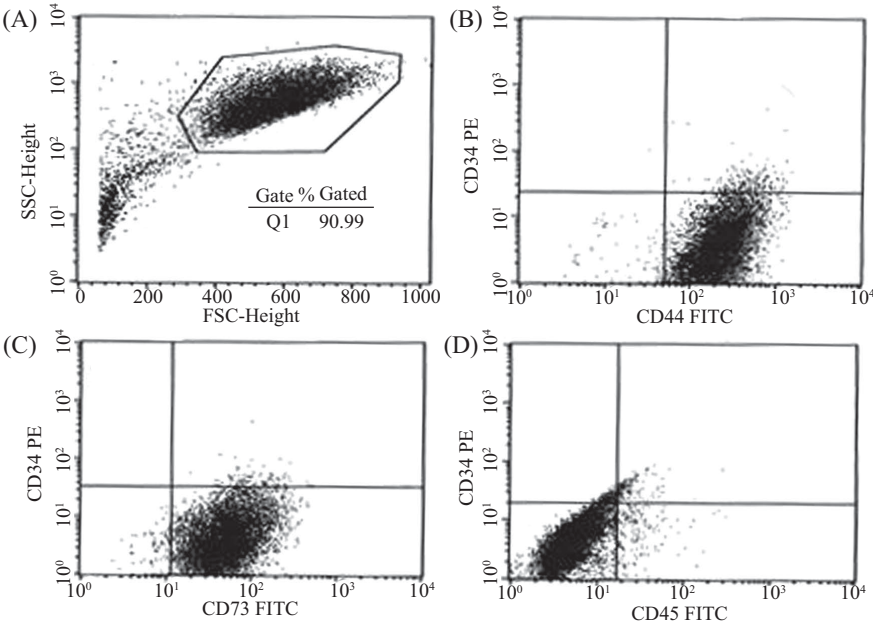


图1 ON与Non-ON组第3代BMSCs形态观察(200×)

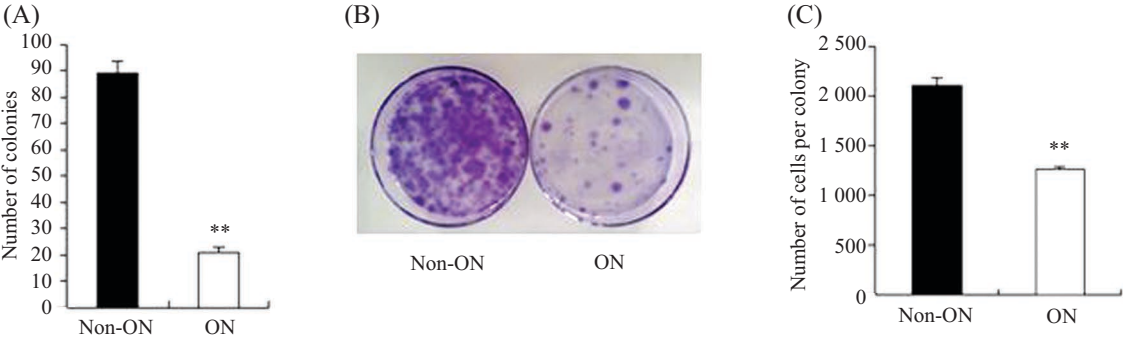
Fig.1 Morphological observation of BMSCs from ON and Non-ON group in the third passage of culture (200×)



A: FSC/SSC设门圈定细胞群; B: CD44-FITC/CD34-PE; C: CD73-FITC/CD34-PE; D: CD45-FITC/CD34-PE.
A: delineated cell group by FSC/SSC gating analysis; B: CD44-FITC/CD34-PE; C: CD73-FITC/CD34-PE; D: CD45-FITC/CD34-PE.

图2 流式细胞仪检测ON组第3代BMSCs表面抗原

Fig.2 Detection of cell surface antigens of BMSCs from ON group in the third passage of culture by FACS

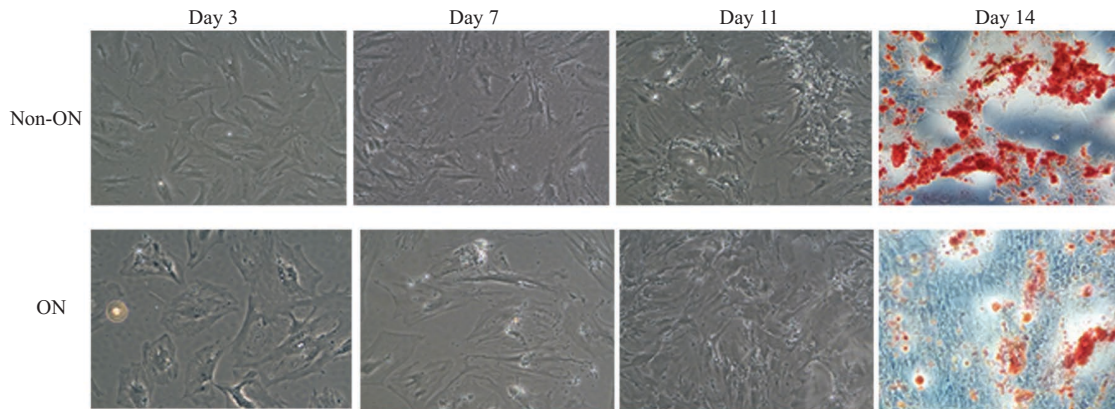


A: ON与Non-ON组BMSCs集落数目(** $P<0.01$, 与Non-ON组比较); B: ON与Non-ON组BMSCs孵育14 d后结晶紫染色细胞集落形成状态; C: ON与Non-ON组每个集落平均细胞数(** $P<0.01$, 与Non-ON组比较)。

A: the number of cell colonies of BMSCs in ON and Non-ON group (** $P<0.01$ compared with Non-ON group); B: photograph of cell colonies by crystal violet staining after 14 days of culture of BMSCs; C: the average number of cells per colony of ON and Non-ON group (** $P<0.01$ compared with Non-ON group).

图3 ON与Non-ON组BMSCs成纤维细胞-集落形成

Fig.3 Colony-forming unit fibroblast assays of BMSCs from ON and Non-ON group



Non-ON: BMSCs向成骨细胞诱导培养第3, 7, 11 d细胞形态及第14 d茜素红钙结节染色; ON: BMSCs向成骨细胞诱导培养第3, 7, 11 d细胞形态及第14 d茜素红钙结节染色。

Non-ON: the morphology of BMSCs after osteogenic induction culture on the day 3, day 7, day 11 and Alizarin red staining on the day 14; ON: the morphology of BMSCs after osteogenic induction culture on the day 3, day 7, day 11 and Alizarin red staining on the day 14.

图4 ON与Non-ON组BMSCs成骨细胞诱导形态(200×)

Fig.4 Morphology of BMSCs from ON and Non-ON group after osteogenic induction (200×)

红染色仅见少许散在体积较小红色钙结节(图4)。在非-ON组每个视野可见(21.1±3.5)个钙结节, 而ON

组每个视野钙结节数目为(9.5±1.8)个, ON组每个视野钙结节数明显低于Non-ON组($P<0.05$), 结果提示, 激素性ON患者股骨头BMSCs成骨分化能力下降。

表1 ON与Non-ON组BMSCs ALP活性($n=10$, U/100mL, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 ALP activities of BMSCs from ON and Non-ON group ($n=10$, U/100mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	第7 d	第14 d
Group	The day 7	The day 14
Non-ON	5.86±0.90	13.67±1.20
ON	0.75±0.10*	5.34±1.50 [△]

* $P<0.05$, ON组第7 d ALP活性与Non-ON组第7 d ALP活性比较;

[△] $P<0.05$, ON组第14 d ALP活性与Non-ON组第14 d ALP活性比较。

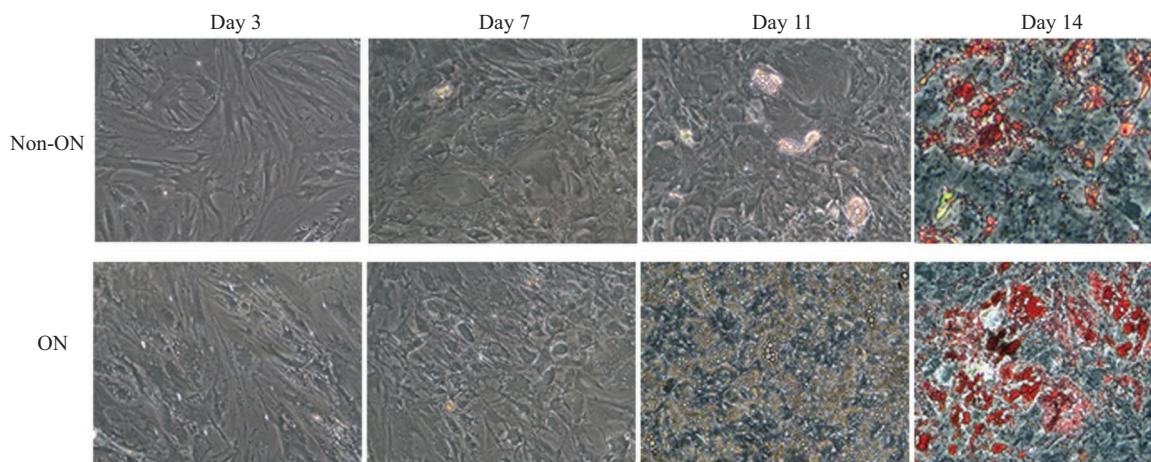
* $P<0.05$, ALP activity of ON group compare with Non-ON group on the day 7; [△] $P<0.05$, ALP activity of ON group compare with Non-ON group on the day 14.

2.4 细胞培养液上清中碱性磷酸酶(ALP)活性测定

BMSCs向成骨细胞诱导培养第7, 14 d, 收集各组细胞培养液上清, 检测ALP的活性(表1)。ON组ALP活性低于Non-ON组($P<0.05$), 结果提示, 激素性ON患者股骨头BMSCs成骨分化能力下降。

2.5 BMSCs成脂诱导与鉴定

Non-ON组BMSCs向脂肪细胞诱导培养3 d后, 倒置相差显微镜下观察可见BMSCs开始由长梭形变为圆形或多边形, 细胞突起逐渐变小变圆, 11 d后



Non-ON: BMSCs向脂肪细胞诱导培养第3, 7, 11 d细胞形态及第14 d油红O染色脂滴; ON: BMSCs向脂肪细胞诱导培养第3, 7, 11 d细胞形态及第14 d油红O染色脂滴。

Non-ON: the morphology of BMSCs after adipogenic induction culture on the day 3, day 7, day 11 and Oil red O staining on the day 14; ON: the morphology of BMSCs after adipogenic induction culture on the day 3, day 7, day 11 and Oil red O staining on the day 14.

图5 ON与Non-ON组BMSCs脂肪细胞诱导形态(200×)

Fig.5 Morphology of BMSCs from ON and Non-ON group after adipogenic induction (200×)

可见胞质内形成少量高折光性的脂滴, 主要集中于细胞核周围; ON组培养3 d后细胞胞质内出现类似脂滴样物质, 第11 d可见细胞中形成大量脂滴并覆盖细胞核, 14 d进行油红O染色后, 倒置显微镜下观察脂滴呈红色, 大部分BMSCs分化为脂肪细胞(图5)。结果表明, 激素性ON组BMSCs向脂肪细胞分化的时间较对照组提前且成脂细胞的数目较对照组增加, 因此推测, 激素性ON组股骨头BMSCs成脂分化能力增强。

3 讨论

在临床上, 糖皮质激素被广泛应用于治疗系统性红斑狼疮、白塞病、肾病综合征、特发性血小板减少性紫癜等疾病, 患者在使用激素治疗后容易发生股骨头坏死。糖皮质激素已经成为非创伤性股骨头坏死的主要危险因素, 但目前激素性股骨头坏死的确切病理机制尚未完全明确。许多研究表明, 激素性股骨头坏死除与成骨细胞及骨细胞的凋亡^[10]、脂肪栓塞、血管内凝血、骨内高压及骨细胞脂肪变性有关外, 还与股骨头颈内BMSCs的增殖与分化能力有关。Ching等^[11]发现, 酒精性和糖皮质激素诱导ON患者BMSCs的成骨分化能力Non-ON患者显著降低, 而酒精性ON患者BMSCs的成脂分化能力增强。Hernigou等^[12]对激素性ON患者BMSCs的体外培养发现, 细胞集落形成率明显低于正常人, 从而证明了股骨头坏死患者的BMSCs增殖活性下降。王佰亮等^[13]也发现, 激素性股骨头坏死患者股骨头BMSCs的数量减少及增殖活性下降。本研究所得激素性ON患者股骨头BMSCs增殖及成骨、成脂分化能力的结果与以上文献报道相似。

本文通过CFU-F实验检测激素性ON患者与非ON患者BMSCs的数量与增殖活性, 结果显示, ON组BMSCs细胞集落形成数目及每个集落平均细胞数目明显低于Non-ON组, 表明激素性ON患者的BMSCs的数量减少及增殖活性下降。为了比较激素性ON患者与非ON患者BMSCs的成骨和成脂分化能力, 对两组BMSCs进行成骨、成脂诱导培养, 并分析细胞培养液上清中ALP的活性及钙结节(茜素红染色)与脂滴(油红O染色)的形成。BMSCs成骨诱导培养第7, 14 d, ON组ALP活性明显低于non-ON组; 14 d进行茜素红染色, ON组每个视野钙结节数明显低于Non-ON组, 提示激素性ON患者股骨头

BMSCs成骨分化能力下降。对两组BMSCs进行成脂诱导培养, 倒置相差显微镜下观察发现, 激素性ON组BMSCs细胞胞质内开始出现脂滴样物质的时间较对照组提前, 即培养第3 d细胞胞质内开始出现脂滴样物质, 14 d进行油红O染色结果显示, 激素性ON组的成脂细胞明显多于对照组的成脂细胞, 提示激素性ON组股骨头BMSCs成脂分化能力增强。因此, 推测糖皮质激素可能具有抑制BMSCs向成骨分化作用但促进BMSCs向成脂分化的能力。

本研究存在一定的局限性。首先, 实验没有测定ON与非ON组这两组人群BMSCs在体内的成骨及成脂分化能力, 因此, 体内与体外实验结果是否一致并不清楚。其次, 正常人BMSCs对糖皮质激素的反应与糖皮质激素诱导ON患者是否相同也不明确。最后, 实验未设计激素性ON患者不同取材部位BMSCs增殖及成骨、成脂分化能力比较。从股骨头获取的BMSCs不能完全代表从髂骨取材获得BMSCs的增殖与分化能力。以上这些结果有待进一步实验探讨。

综上所述, 激素性股骨头坏死患者股骨头部BMSCs增殖活性及成骨分化能力下降, 更易向脂肪细胞分化。糖皮质激素引起股骨头BMSCs的增殖活性及成骨、成脂分化能力的改变可能参与激素性股骨头坏死病理生理过程。临床上如果使用此类患者自身股骨头骨髓间充质干细胞进行股骨头坏死的治疗, 其临床效果可能不是很理想。

参考文献 (References)

- 1 Levasseur R. Mechanisms of osteonecrosis. *Joint Bone Spine* 2008; 75(6): 639-42.
- 2 杨述华. 股骨头坏死及研究进展. 中国矫形外科杂志(Yang Shuhua. Progress of research on the necrosis of femoral head. *The Orthopedic Journal of China*) 2004; 12(18): 1428-31.
- 3 Lee JS, Lee JS, Roh HL, Kim CH, Jung JS, Suh KT. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: Comparative analysis according to the risk factor. *J Orthop Res* 2006; 24(4): 604-9.
- 4 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41-9.
- 5 Niedzwiedzki T, Dabrowski Z, Misztal H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 1993; 14(2): 115-21.
- 6 Gangji V, de Maertelaer V, Hauzeur JP. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective con-

- trolled study. *Bone* 2011; 49(5): 1005-9.
- 7 Angélique L, Alexandre P, Madeleine C. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: Study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6(1): 68-81.
- 8 Chang JK, Ho ML, Yeh CH, Chen CH, Wang GJ. Osteogenic gene expression decreases in stromal cells of patients with osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 453: 286-92.
- 9 Chen CH, Ho ML, Chang JK, Hung SH, Wang GJ. Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. *Osteoporos Int* 2005; 16(12): 2039-45.
- 10 Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(8): 2907-12.
- 11 Ching H, Jeken C, Meiling H, Chung H. Different differentiation of stroma cells from patients with osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467(8): 2159-67.
- 12 Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *Bone Joint Surg Br* 1999; 81(2): 349-55.
- 13 王佰亮, 李子荣, 娄晋宁. 激素性股骨头坏死骨髓基质干细胞增殖活性的检测. *中华关节外科杂志*(Wang Bailiang, Li Zirong, Lou Jinning. Decreased proliferation ability of the mesenchymal stem cell in steroid-induced osteonecrosis of femoral head. *Chin J Joint Surg*) 2008; 2(1): 40-5.