

探索·发现

Wistar大鼠BMSCs的分离与生物学特性分析

薛娜¹ 伍志伟^{1,2*} 刘丹¹ 刘永琦^{1,2} 苏韞¹ 颜春鲁¹¹甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000;²甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治省级重点实验室, 兰州 730000)

摘要 该文建立了一种简便、高效的Wistar大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分离方法, 为研究其生物学特性奠定了基础。采用全骨髓贴壁培养与密度梯度离心结合筛选法无菌分离Wistar大鼠BMSCs, 常规传代和成骨、成脂诱导后, 经显微观察、细胞计数、免疫印迹、qPCR和流式细胞术检测, 分析细胞形态、增殖与分化特性。结果表明, 分离细胞传至3代后细胞呈漩涡状生长、形态为长梭形, 细胞生长曲线呈“S”形, 表面分子CD29、CD34、CD44、CD45和CD90的阳性率分别为98.21%、0.78%、91.62%、0.93%和99.27%。成脂和成骨诱导后, 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ_2 (PPAR- γ_2)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、骨髓基质细胞核心结合因子 $\alpha 1$ (Runx2)和骨形态发生蛋白-2(BMP-2)表达水平显著升高, 细胞内分别出现了大量的红色脂滴和钙化结节。该研究运用全骨髓贴壁培养与密度梯度离心结合筛选法成功分离了BMSCs, 分离细胞具有向成骨和成脂细胞分化的潜能与骨髓间充质干细胞的生物学特性。

关键词 骨髓间充质干细胞; Wistar大鼠; 成骨分化; 成脂分化

Isolation and Biological Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Wistar Rats

Xue Na¹, Wu Zhiwei^{1,2*}, Liu Dan¹, Liu Yongqi^{1,2}, Su Yun¹, Yan Chunlu¹¹Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;²Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with TCM Research in Gansu Colleges and Universities, Lanzhou 730000, China)

Abstract This work was aim to establish a simple, efficient and optimum isolation and culture method of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) derived from Wistar rat. This method would lay the foundation for the study of its biological characteristics. In this study, BMSCs-derived from Wistar rats were isolated by the method-combined of whole bone marrow adherent culture and density gradient centrifugation under the sterile environment. The cells which were cultured in routine conditions and the cells which were induced respectively by osteogenic fluid and adipogenic fluid were observed by inverted phase contrast microscope, and the characteristics of cell proliferation and differentiation were analysed by counting cell, Western blot, Real-time PCR and flow cytometry. The results showed that the isolated cells presented typical uniform swirling growth state and long spindle-shaped

收稿日期: 2016-12-14 接受日期: 2017-01-04

甘肃省自然科学基金(批准号: 1212RJ2A081)和甘肃省省属普通本科高校基本科研业务费专项(批准号: 2305136301)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-8765427, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

Received: December 14, 2016 Accepted: January 4, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.1212RJ2A081) and Gansu Provincial General Undergraduate Colleges and Universities Fundamental Research Funds (Grant No.2305136301)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8765427, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

网络出版时间: 2017-02-23 17:10:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170223.1710.008.html>

after the third generation, the growth curve was for "S" shape, the positive rate of cell surface antigen markers CD29, CD34, CD44, CD45 and CD90 were 98.21%, 0.78%, 91.62%, 0.93% and 99.27%, respectively. After adipogenic and osteogenic induction, protein levels of PPAR- γ_2 , LPL, Runx2 and BMP-2 were significantly increased, and large amounts of lipid droplets and calcium nodules appeared in the cells of different induction by the Oil Red O and the Alizarin Red staining, respectively. BMSCs-derived from Wistar rat were successfully isolated and cultured by the method of whole bone marrow adherent culture and density gradient centrifugation. The cells-isolated have the potential abilities of osteogenic and adipogenic differentiation and the biological properties of BMSCs.

Keywords bone mesenchymal stem cells; Wistar rat; adipogenic differentiation; osteogenic differentiation

骨髓间充质干细胞(bonemesenchymal stem cells, BMSCs)是存在于骨髓网状间质内的一类非造血干细胞,来源于中胚层,具有自我更新和多向分化的潜能。大量研究表明,在特定的诱导和培养条件下,BMSCs可分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞和心肌细胞等多种组织细胞^[1-2]。同时,BMSCs具有取材方便、易于分离培养、遗传背景稳定、可塑性强、免疫原性低及易于外源基因转染等优点,作为理想的生物工程种子细胞,广泛应用于组织修复、基因和细胞治疗等临床领域和科学研究^[3-8]。然而,对于BMSCs的鉴定国内外尚无统一的标准,因此,如何获取遗传稳定、纯度高、活性正常的BMSCs,是进行其后续深入研究的关键。本研究将目前常用全骨贴壁培养法与密度梯度离心法相结合对Wistar大鼠BMSCs进行无菌分离,通过形态学观察、细胞荧光计数法、特异性表面抗原分子检测和成骨、成脂诱导等方法分析细胞增殖、分化等生物学特性,以期获得高质量的BMSCs,为其后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8周龄SPF级Wistar雄性大鼠5只(体重 196 ± 16 g),由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供[动物质量合格证号:SCXK(甘)2015-0005]。

1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶及青链霉素购自Gibco公司。成骨、成脂诱导培养基购自美国Cyagen Biosciences Inc公司。Percoll细胞分离液购自美国Sigma公司。茜素红染色试剂盒、油红O染色试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司。PrimeScript RT Reagent Kit、Trizol及SYBR Premix EX Taq购自Roche公司。FITC-CD29、

FITC-CD34、FITC-CD44、FITC-CD45、PE-CD90、PPAR- γ_2 (peroxisome proliferator activated receptor gamma 2)、LPL(lipoprotein lipase)、Runx2(core binding factor alpha 1)和BMP-2(bone morphogenetic protein-2)单克隆抗体和羊抗鼠IgG-HRP购自Abcam公司。PPAR- γ_2 、LPL、Runx2和BMP-2引物由生物工程(上海)有限公司合成。

本实验所用仪器有:CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司)、流式细胞仪(美国BD公司)、倒置显微镜(日本Olympus公司)、Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 Wistar大鼠BMSCs的分离与培养

取Wistar大鼠1只,经腹腔注射(10%水合氯醛)麻醉后,置于75%乙醇中浸泡10 min,在无菌条件下分离其胫骨和股骨。无菌剪除两端骨骺,用吸有5 mL完全培养基(10% FBS的高糖DMEM/F12)的注射器冲洗骨髓腔,将吹散均匀的冲洗物经200目无菌滤膜过滤后,于1 000 r/min常温离心10 min,弃上清。用5 mL DMEM/F12完全培养基重悬沉淀至均匀,接种于25 cm²培养瓶。于常规培养条件下培养至2 d后,胰酶消化重悬于22 mL完全培养基。将上述细胞悬液置于Percoll细胞分离液中离心分离,具体操作见说明书。用2 mL DMEM/F12完全培养基洗涤分离细胞2次后,重悬于DMEM/F12完全培养基,调节细胞浓度至 2×10^6 /mL(记为G₀)。

将上述分离细胞以 2×10^4 /cm²接种于含有完全培养基的25 cm²培养瓶,置于37 °C、5% CO₂、100%饱和湿度的培养箱中,48 h后半量换液,以后每隔48 h全量换液1次,直至细胞汇合率达80%以上。吸弃培养液,用无菌PBS洗涤细胞2次,加入含0.25%胰蛋白酶的D-Hanks消化液(含0.2% EDTA)1 mL,按1:3传代培养,具体操作同前。连续传3代,依次记为G₁、G₂、G₃,并于传代前观察细胞形态。

1.4 BMSCs增殖能力检测

将G₁、G₂、G₃代细胞以2×10³/孔分别接种于3块24孔板中,应用全自动荧光细胞计数仪每天每代计数3孔,连续计数12 d。以培养时间(d)为横坐标、细胞数为纵坐标,绘制BMSCs细胞生长曲线。

1.5 BMSCs表面标志物检测

常规培养G₃代BMSCs至细胞汇合达到80%~90%时,将其消化制成单细胞悬液,10% BSA封闭30 min, PBS洗涤2次,调整细胞浓度至1×10⁵/mL后分装于10个EP管中。分别加入FITC-CD29、FITC-CD34、FITC-CD44、FITC-CD45和PE-CD90单克隆抗体,室温避光孵育30 min。用PBS洗涤2次后,于1 000 r/min离心10 min,弃上清。加入500 μL PBS混匀,应用BD FACSEALIBUR流式细胞仪检测。

1.6 BMSCs成脂分化分析

1.6.1 BMSCs成脂诱导培养 取常规培养G₃代BMSCs,以2×10³/孔接种于6孔板,每孔加入2 mL完全培养基,置于37 °C、5% CO₂、100%饱和湿度的培养箱中培养。至细胞汇合达到80%~90%时,弃培养液,加入成脂诱导培养液诱导培养(具体操作见Cyagen Biosciences Inc RAWMX90031说明书)。

1.6.2 油红O染色成脂 诱导成脂诱导结束后,弃培养液,用PBS洗涤细胞2次,每孔加入2 mL 4%中性甲醛于4 °C固定30 min。弃甲醛, PBS洗涤2次,每孔加入1 mL油红O染液染色30 min。弃染液, PBS洗涤2次,置于显微镜下观察。

1.6.3 PPAR-γ₂和LPL的qPCR检测 提取成脂诱导BMSCs总RNA。应用大鼠成脂相关基因PPAR-γ₂和LPL引物(表1),通过qPCR检测其mRNA的表达水平。

1.6.4 PPAR-γ₂和LPL的Western blot 提取成脂诱导细胞总蛋白。通过SDS-PAGE分离并转印至PVDF膜。将膜置于3%脱脂奶粉中4 °C过液封闭,弃封闭

液。分别加入大鼠PPAR-γ₂和LPL单克隆抗体,室温孵育4 h,收集孵育液, PBST洗涤3次。加入二抗,室温孵育反应2 h;应用Western blot ECL化学发光试剂盒(Bio-Rad)进行染色,具体操作参见说明书;将膜置于凝胶成像系统进行检测。

1.7 BMSCs成骨分化鉴定

1.7.1 BMSCs成骨诱导培养 取常规培养G₃代BMSCs,以2×10³/孔接种于6孔板,每孔加入2 mL完全培养基,置于37 °C、5% CO₂、100%饱和湿度的培养箱中培养。细胞汇合达到80%~90%时,弃培养液,加入成骨诱导培养液(基础培养基175 mL、胎牛血清20 mL、青链霉素2 mL、谷氨酰胺2 mL、抗坏血酸400 μL、β-甘油磷酸钠2 mL、地塞米松20 μL),每孔2 mL, 37 °C、5% CO₂、100%饱和湿度的培养箱中培养4周,每隔3 d换液1次(具体操作见Cyagen Biosciences Inc RAWMX90021说明书)。

1.7.2 茜素红染色成骨诱导 成骨诱导分化结束后,弃培养液,用PBS洗涤细胞2次,每孔加入2 mL 4%中性甲醛于4 °C固定30 min。弃甲醛, PBS洗涤2次,每孔加入1 mL茜素红染液染色5 min;弃染液, PBS洗涤2次,置于显微镜下观察。

1.7.3 Runx2和BMP-2的qPCR检测 提取成骨诱导细胞总RNA。应用大鼠成骨相关基因Runx2和BMP-2引物(表1),通过qPCR检测其mRNA水平。

1.7.4 Runx2和BMP-2的Western blot检测 提取成骨诱导细胞总蛋白,通过SDS-PAGE分离并转印至PVDF膜。将膜置于3%脱脂奶粉中于4 °C封闭过液,弃封闭液。分别加入大鼠Runx2和BMP-2单克隆抗体,室温孵育4 h,收集孵育液, PBST洗涤3次。加入二抗,室温孵育反应2 h;应用Western blot ECL化学发光试剂盒(Bio-Rad)进行染色,具体操作参见说明书;将膜置于凝胶成像系统进行检测。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因 | 长度(bp) | 引物序列 |
|---------------------------|-------------|---|
| Gene | Length (bp) | Primer sequence |
| <i>β-actin</i> | 172 | F: 5'-AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3' |
| | | R: 5'-GGA AAA GAG CCT CAG GGC AT-3' |
| <i>PPAR-γ₂</i> | 195 | F: 5'-ATA AGG GAC GCG AGG AGG TCA-3' |
| | | R: 5'-AGG GGT GTG GAT TTG GTT GTG-3' |
| <i>LPL</i> | 236 | F: 5'-TCA GAA GAC ATC AGG CAG GAG A-3' |
| | | R: 5'-AAA GGC CAG GTG TTT CAA CCG-3' |
| <i>Runx2</i> | 203 | F: 5'-GCC AAT CCC TAA GTG TGG CT-3' |
| | | R: 5'-AAC AGA GAG CGA GGG GGT AT-3' |
| <i>BMP-2</i> | 199 | F: 5'-AGG TGG CCG AAC AAA TTC CA-3' |
| | | R: 5'-GCC ATC TTG TGT TGA CTC ACT CT-3' |

1.8 数据分析

应用SPSS 16.0对数据进行统计分析,采用单因素方差分析进行各组间均数比较, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态学分析

在倒置光学显微镜下观察,初次分离细胞悬浮于培养液中,呈圆形,折光性较强,细胞大小不一。1 d后,瓶底有少量呈圆形的贴壁细胞(图1A)。2~3 d后,瓶底贴壁细胞数量增多,部分细胞伸出伪足(图1B和图1C)。4~5 d后,贴壁细胞数量继续增多,细胞伪足增长呈短梭形,如成纤维样细胞,瓶底出现克隆样生长的细胞集落(图1D)。7 d后,细胞形态呈长梭型,细胞纵轴相互平行排列,细胞汇合度达到80%~90%,局部呈旋涡状生长(图1E)。细胞接种传代后,贴壁速度加快,通常在2 d后基本完全贴壁,细胞增殖速度较原代快,呈均匀分布的纺锤形,4~5 d即可传代(图1F)。

2.2 BMSCs生长曲线

分别对G₁、G₂、G₃代细胞1~12 d连续培养计数,结果如图2所示,细胞生长曲线均为“S”形。1~3 d细胞处于潜伏期,细胞增殖速度缓慢;3~9 d细胞进入对数增长期,细胞呈几何指数形式增长;9~12 d后进入

平台期,细胞增殖速度减缓,死亡细胞与增殖细胞数量趋于平衡。G₁代细胞增殖速度相对于G₂和G₃代细胞缓和,G₂与G₃代细胞生长特性趋于一致(图2)。

2.3 BMSCs表面标志物分析

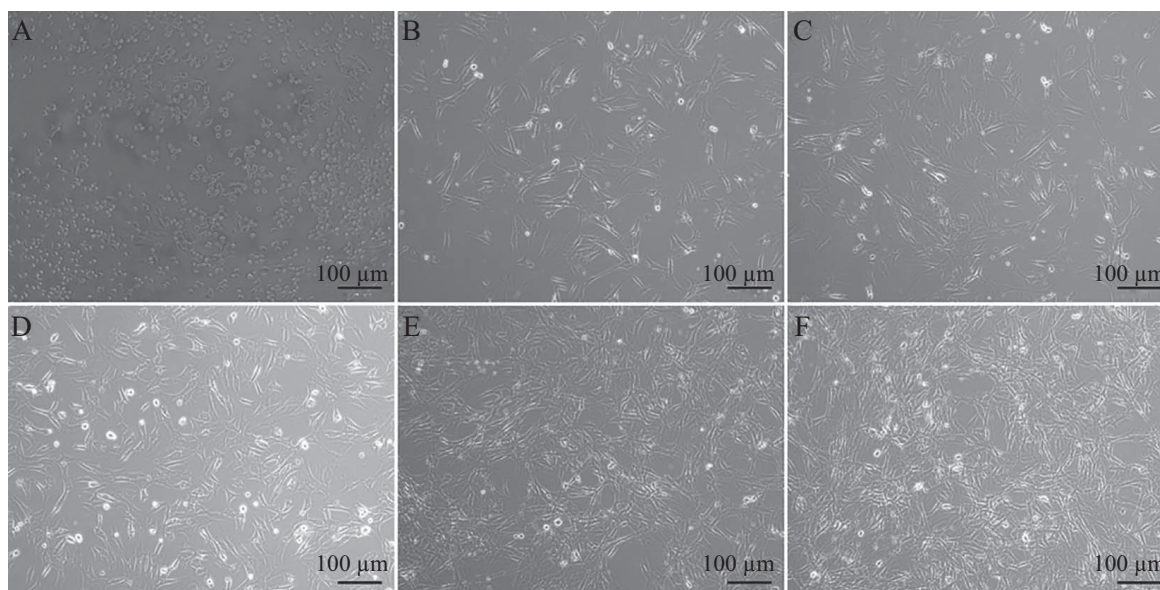
对G₃代BMSCs表面分子CD29、CD34、CD45、CD44和CD90进行流式细胞术检测。结果发现,CD29、CD34、CD44、CD45和CD90的阳性率分别为98.21%、0.78%、91.62%、0.93%和99.27%。结果表明,所分离细胞为BMSCs,且纯度较高(图3)。

2.4 BMSCs成脂诱导分化分析

BMSCs成脂诱导培养4、16、22 d后,细胞形态由长梭形逐渐转变为圆形或椭圆形的脂肪样细胞(图4)。经油红O染色后,部分细胞的细胞核周边出现大量的红色脂滴,随着诱导时间的延长,细胞内脂滴数不断增多,部分脂滴出现融合(图4B、图4C和图4D)。采用Western blot(图5)和qPCR(图6)检测成脂相关成分PPAR- γ_2 和LPL的表达水平,结果发现,与对照组相比,PPAR- γ_2 和LPL的表达量明显上调,且随诱导时间延长,表达量逐渐上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 BMSCs成骨诱导分化分析

BMSCs成骨诱导培养7 d后,细胞体积有所增大,形态由长梭形逐渐转变为三角形或不规则形,茜素红染色后,细胞内出现了砂粒样的橘红色钙化结节;随着诱导时间延长,钙结节逐渐增多(图7B、图

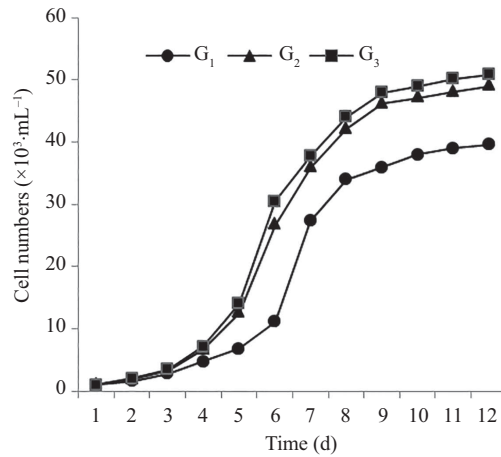
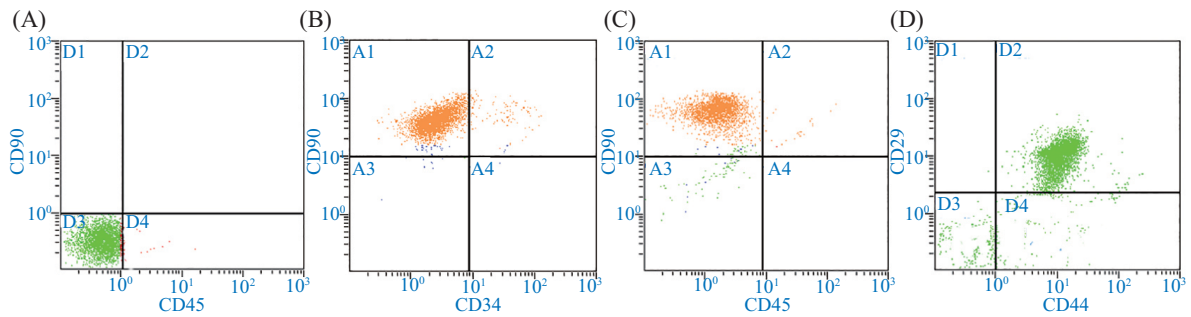


A~F为分别培养1、2、3、4、5、7 d的G₀代BMSCs的形态。

A-F: the morphology of BMSCs cultured for 1, 2, 3, 4, 5, 7 d (the primary cell).

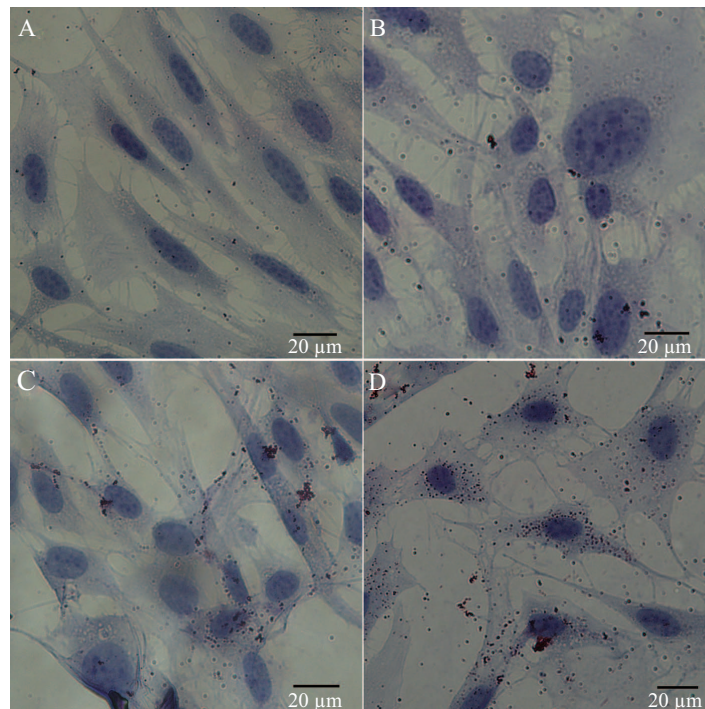
图1 不同培养时间BMSCs增殖和形态学观察

Fig.1 Observation of the proliferation and morphology of BMSCs cultured in different times

图2 G₁、G₂和G₃代BMSCs生长曲线Fig.2 Cell growth curves of BMSCs in G₁, G₂ and G₃

A: 对照组(CD45和CD90); B~D: 分别代表CD34和CD90、CD45和CD90、CD29和CD44的流式细胞术分析。

A: control group (CD45 and CD90); B~D: flow cytometry analyses of CD34 and CD90, CD45 and CD90, CD29 and CD44, respectively.

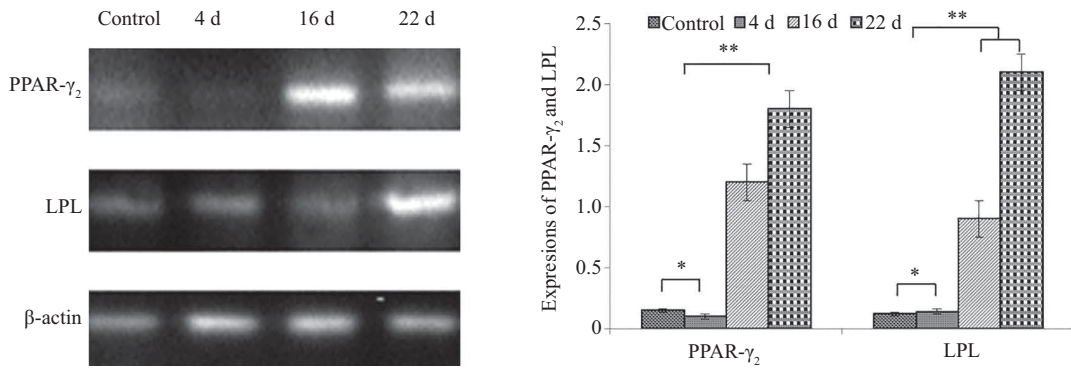
图3 G₃代BMSCs细胞表面标记分子的流式细胞术检测Fig.3 Analyses of molecules marker on G₃ BMSCs surface by flow cytometry

A: 对照组; B: 诱导4 d组; C: 诱导16 d组; D: 诱导22 d组。

A: control group; B: induced for 4 d group; C: induced for 16 d group; D: induced for 22 d group.

图4 BMSCs成脂诱导分化的油红O染色分析

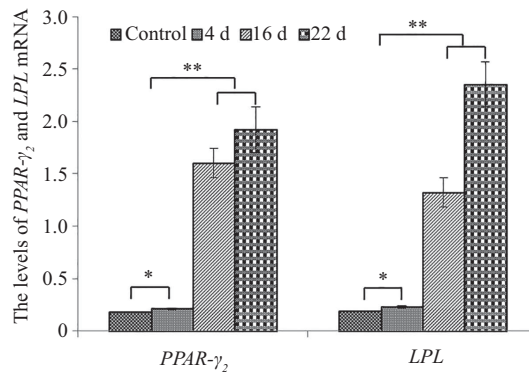
Fig.4 Analyses of adipogenic differentiation of BMSCs by Oil Red O staining



** $P < 0.01$.

图5 成脂相关蛋白PPAR-γ₂和LPL的Western blot分析

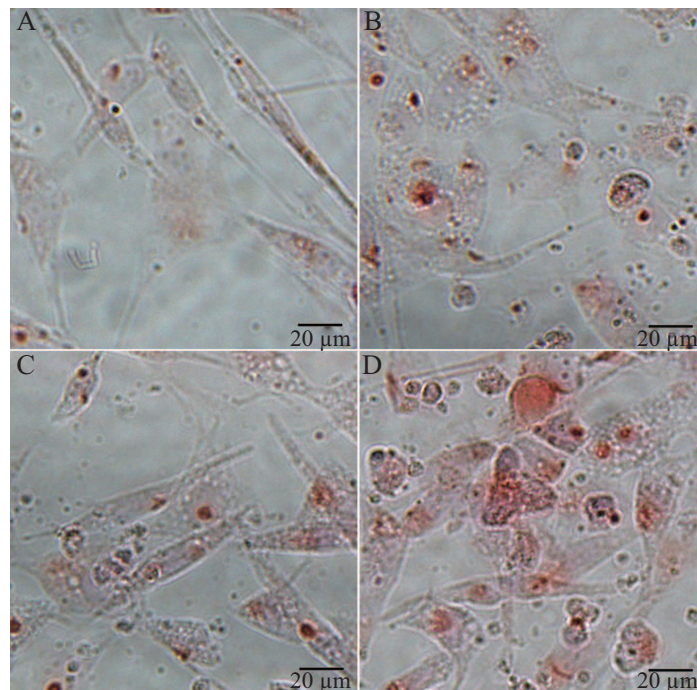
Fig.5 Analyses of the levels of PPAR-γ₂ and LPL adipogenic protein by Western blot



** $P < 0.01$.

图6 PPAR-γ₂和LPL mRNA水平的qPCR分析

Fig.6 Analyses of the levels of PPAR-γ₂ and LPL mRNA by qPCR

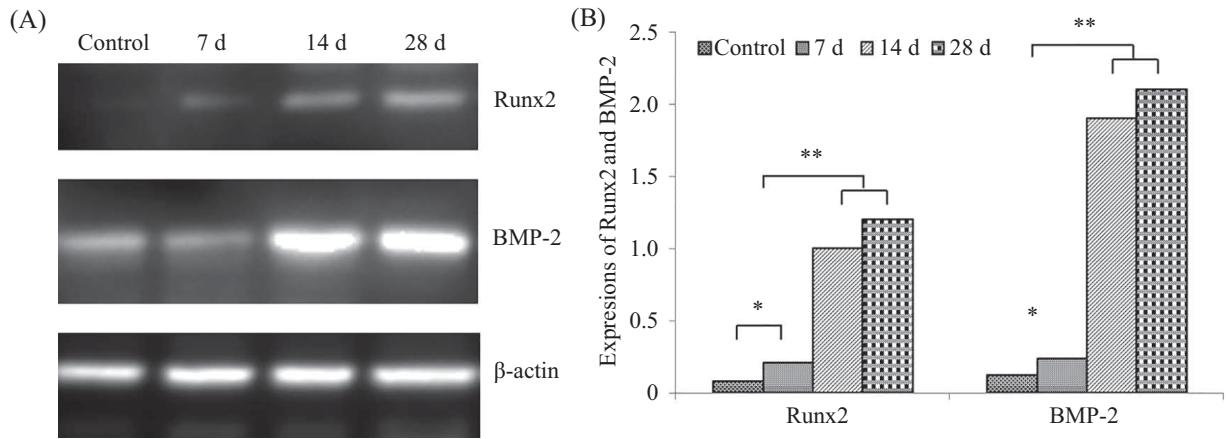


A: 对照组; B: 诱导7 d组; C: 诱导14 d组; D: 诱导28 d组。

A: control group; B: induced for 7 d group; C: induced for 14 d group; D: induced for 28 d group.

图7 BMSCs成骨诱导分化的茜素红染色分析

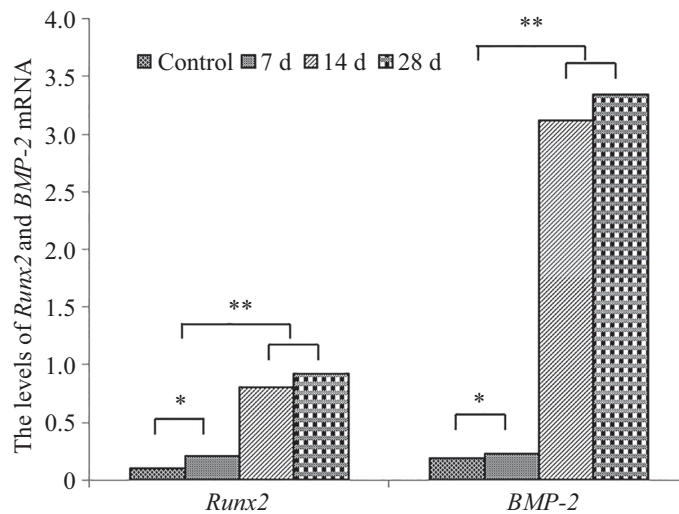
Fig.7 Analyses of osteogenic differentiation of BMSCs by Alizarin Red staining



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图8 成骨相关蛋白Runx2和BMP-2水平的Western blot检测

Fig.8 Analyses of the levels of Runx2 and BMP-2 osteogenic protein by Western blot



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图9 成骨相关基因Runx2和BMP-2 mRNA水平的qPCR分析

Fig.9 Analysis of the levels of Runx2 and BMP-2 mRNA by qPCR

7C和图7D)。采用Western blot(图8)和qPCR(图9)检测成骨相关成分Runx2和BMP-2的表达水平, 结果发现, 与对照组相比, Runx2和BMP-2的表达量明显上调, 随着诱导时间的延长, 其表达量逐渐上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

BMSCs自我更新和多向分化的生物学特性已得到国内外学者的广泛认同, 在临床应用和科学研究中具有广阔的开发前景和重要的社会效益。然而, 由于BMSCs在骨髓中丰度低、分选难、分离细胞活性弱、纯度低、生物学活性易改变等缺点, 严重限制了BMSCs的应用。如何有效克服这些困难成为

BMSCs推广应用的关键。

目前, 对于BMSCs的分离与纯化多采用密度梯度离心法、全骨髓贴壁培养法、流式细胞分选法和免疫磁珠分离法^[9]。不同技术或方法在BMSCs分离、纯度、细胞活力等方面均存在一定的差异。密度梯度离心法因对骨髓细胞进行长时间高速离心易造成细胞损伤和细胞活力下降、纯度低等原因而不能推广。流式细胞分选法和免疫磁珠法虽然在短时间内可培养出高纯度的BMSCs, 但对设备要求高、获得的细胞数量少, 同时对细胞活力有一定影响。全骨髓贴壁分离法操作简单、快速、实用、所获细胞活力高, 但细胞纯度低、数量少。同时, BMSCs分化受到多种因素的调控与作用。极易

受到接触性或非接触性理化因素、生物因素和生存微环境等的影响,引起细胞内部分基因转录、翻译及修饰过程的改变,从而导致细胞形态、结构和分化异常,甚至造成BMSCs恶性转变,最终导致肿瘤的发生^[10-13]。

通过对上述几种BMSCs分离方法优缺点分析并结合其生物学特性,本研究应用全骨髓贴壁培养法与密度梯度离心法相结合的方法,既克服了原有分离培养技术的不足,也提高了BMSCs的数量和纯度,进一步维持了其生物学活性和遗传稳定性。首先,通过全骨髓贴壁培养可为BMSCs的增殖和维持干细胞活性提供了生存的微环境,促进了BMSCs在适宜环境中的稳定和快速增殖;其次,通过全骨髓贴壁培养和密度梯度分离的二重筛选,可提高BMSCs的得率和纯度。此外,该方法可提高BMSCs均一性和稳定性,减少后续分析的误差。不足之处是本法分离BMSCs操作过程繁琐,花费较高。

对于BMSCs的鉴定目前尚无统一的国际标准,主要通过细胞形态学、贴壁性、增殖能力、表面标志物检测、多向分化潜能分析等生物学特性进行鉴定^[14-17]。本研究分离BMSCs细胞形态呈长梭形、旋涡状生长,细胞分布均匀,增殖能力旺盛,与前提研究结果^[8]完全一致,达到了预期目的。细胞表面标志物CD29⁺(98.21%)、CD90⁺(99.27%)和CD44⁺(91.62%)的阳性率均在91%以上,而CD34和CD45的阳性率均在1%以下,表明本研究方法在分离BMSCs方面具有优点和可推广性。BMSCs经成脂和成骨诱导分化后,成脂相关蛋白和mRNA(PPAR- γ_2 和LPL)、成骨相关蛋白(Runx2和BMP-2)的mRNA和蛋白质水平均上调,差异具有统计学意义($P<0.05$);油红O染色后,成脂诱导细胞核周围内出现了大量深染的红色脂滴;茜素红染色后,成骨诱导细胞内出现了砂粒样的橘红色钙化结节,这一研究结果与前提报道^[18-20]一致。通过以上结果表明,本研究所采用的全骨髓贴壁培养-密度梯度离心分离技术能有效分离BMSCs和提高其纯度,所分离细胞具有干细胞的生物学特性和多向分化的潜能。

参考文献 (References)

1 Jiang Y, Jahagirda BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(4): 41-9.

2 Ho IA, Toh HC, Ng WH, Teo YL, Guo CM, Hui KM, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells* 2013; 31(1): 146-55.

3 Pan XN, Zheng LQ, Lai XH. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for decompensated liver cirrhosis: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(38): 14051-7.

4 Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 341-7.

5 Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther* 2015; 151: 107-20.

6 Clarke LE, Richardson SM, Hoyland JA. Harnessing the potential of mesenchymal stem cells for IVD regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015; 10(4): 296-306.

7 Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells* 2013; 5(4): 136.

8 刘慧娟, 胡若愚, 戴王娟, 刘元果, 闵波, 蒋犁. 绿色荧光蛋白转基因大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定. *中国医学科学院学报* (Liu Huijuan, Hu Ruoyu, Dai Wangjuan, Liu Yuanguo, Min Bo, Jiang Li. Culture and identification of bone marrow mesenchymal stem cells from enhanced green fluorescent protein-transgenic rats. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*) 2016; 38(1): 9-15.

9 Haeri SM, Sadeghi Y, Salehi M, Farahani RM, Mohsen N. Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on gum tragacanth hydrogel. *Biologicals* 2016; 44(3): 123-8.

10 Gottipamula S, Muttigi MS, Chaansa S, Ashwin KM, Priya N, Kolkundkar U, *et al.* Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10(2): 108-19.

11 Ikeda S, Itoh S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Matsushita K, Naruse H, *et al.* Developmental stage-dependent effects of leukemia inhibitory factor on adipocyte differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Cell Biochem Biophys* 2016; 74(1): 11-7.

12 Huang Y, Zheng Y, Jin C, Li X, Jia L, Li W. Long Non-coding RNAH19 inhibits adipocyte differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through epigenetic modulation of histone deacetylases. *Sci Rep* 2016; 6: 28897.

13 Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res* 2016; 7(12): 2527-35.

14 Cai M, Shen R, Song L, Lu M, Wang J, Zhao S, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells (bm-mscs) improve heart function in swine myocardial infarction model through paracrine effects. *Sci Rep* 2016; 6: 28250.

15 Jin H, Xu T, Chen Q, Wu C, Wang P, Mao Q, *et al.* The fate and distribution of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with intra-arterial infusion in osteonecrosis of the femoral head in dogs. *Stem Cell Int* 2016; 2016(9): doi: 10.1155/2016/8616143.

16 Hu X, Xie P, Li W, Li Z, Hong S. Direct induction of hepatocyte-like cells from immortalized human bone marrow mesenchymal stem cells by overexpression of HNF4a. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 478(2): 791-7.

- 17 Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, Kuroda Y, Wakao S, Ishida K, *et al.* A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, muse cells, directly commit to the replacement of liver components. *Am J Transplant* 2015; 16(2): 468-83.
- 18 Shen CC, Chen B, Gu JT, Ning JL, Chen L, Zeng J, *et al.* The angiogenic related functions of bone marrow mesenchymal stem cells are promoted by CBDL rat serum via the Akt/Nrf2 pathway. *Exp Cell Res* 2016; 344(1): 86-94.
- 19 Yang Y, Fan C, Deng C, Zhao L, Hu W, Di S, *et al.* Melatonin reverses flow shear stress-induced injury in bone marrow mesenchymal stem cells via activation of AMP-activated protein kinase signaling. *J Pineal Res* 2016; 60(2): 228-41.
- 20 Luo F, Liu T, Wang J, Li J, Ma P, Ding H, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells participate in prostate carcinogenesis and promote growth of prostate cancer by cell fusion *in vivo*. *Oncotarget* 2016; 7(21): 30924-34.