

STRO-1 阳性与阴性骨髓间充质干细胞成骨能力的对比

周万林¹, 何斌², 申雄成¹, 黄坤¹, 田仁元¹, 袁野¹, 黄文良³<https://doi.org/10.12307/2025.564>

投稿日期: 2024-09-23

采用日期: 2024-11-14

修回日期: 2024-12-14

在线日期: 2024-12-31

中图分类号:

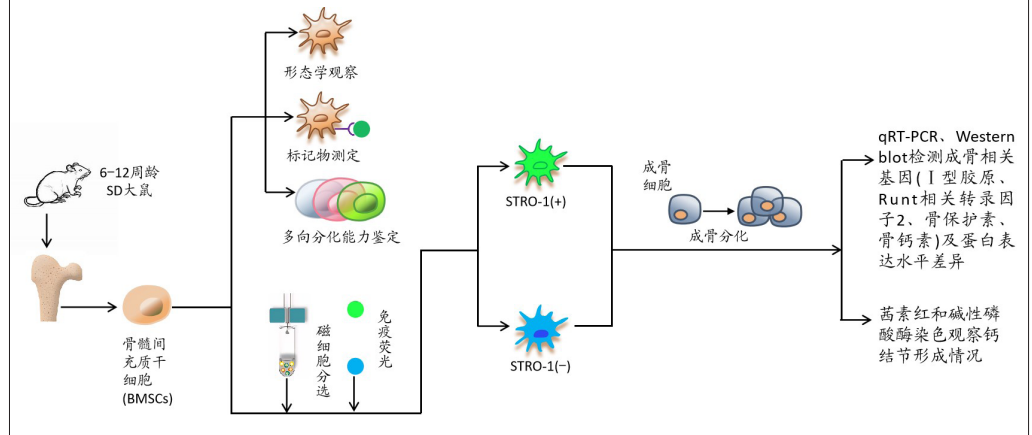
R459.9; R318; R681.7

文章编号:

2095-4344(2025)36-07719-09

文献标识码: A

文章快速阅读: STRO-1 阳性和阴性骨髓间充质干细胞的成骨分化能力差异



文题释义:

成骨分化: 指骨髓间充质干细胞在特定条件下向成骨细胞转变的过程, 包括细胞的增殖、基质合成和矿化沉积, 最终形成新的骨组织。成骨分化受到多种因素调控, 如特定基因表达和蛋白质生成。

STRO-1阳性骨髓间充质干细胞: 在骨髓间充质干细胞中表达STRO-1表面标志物的细胞群体。STRO-1是一种干细胞特异性标志物, STRO-1阳性细胞具有较强的增殖和多向分化潜能。

摘要

背景: 随着年龄增长, 骨髓间充质干细胞的再生能力和分化功能逐渐下降, 导致骨组织修复效果减弱。因此, 探索成骨潜能更高的骨髓间充质干细胞亚群对骨组织工程的发展具有重要意义。

目的: 评估STRO-1阳性和阴性骨髓间充质干细胞在成骨诱导培养条件下的成骨分化能力差异。

方法: 分离并培养SD大鼠骨髓间充质干细胞, 采用流式细胞术和免疫荧光鉴定CD29、CD45、CD90和STRO-1的表达; 利用免疫磁细胞分选技术分离STRO-1阳性和阴性骨髓间充质干细胞, 将两组细胞分别进行成骨诱导7, 14 d, 采用qRT-PCR和Western blot分析两组细胞成骨相关基因(I型胶原、Runt相关转录因子2、骨保护素、骨钙素)及蛋白表达水平差异, 采用茜素红染色和碱性磷酸酶染色观察钙结节形成情况。

结果与结论: 流式细胞术显示CD29和CD90高表达, CD45低表达, STRO-1的阳性表达率为12.8%, 免疫荧光结果与流式细胞术一致。磁细胞分选后发现STRO-1阳性细胞的集落形成率高于STRO-1阴性细胞; STRO-1阳性细胞在第14天的成骨分化能力显著高于第7天, 且在第14天时成骨相关标志物的表达水平显著高于STRO-1阴性细胞, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。结果表明: STRO-1阳性骨髓间充质干细胞在成骨能力上具有显著优势, 为骨组织工程中理想种子细胞的筛选提供了理论依据, 未来在骨缺损修复中有望成为一种潜在的治疗手段。

关键词: STRO-1; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 免疫磁细胞分选; 骨缺损修复; 种子细胞; 骨组织工程; 工程化干细胞

Comparison of osteogenic potential in STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells

Zhou Wanlin¹, He Bin², Shen Xiongcheng¹, Huang Kun¹, Tian Renyuan¹, Yuan Ye¹, Huang Wenliang³¹Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (First People's Hospital of Zunyi City), Zunyi 563000, Guizhou Province, China;²Department of Orthopedics, Honghuagang District People's Hospital of Zunyi City, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ³Department of Orthopedics, Moutai Hospital of Guizhou Province, Renhuai 564500, Guizhou Province, China

Zhou Wanlin, Master candidate, Physician, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (First People's Hospital of Zunyi City), Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Huang Wenliang, MS, Chief physician, Department of Orthopedics, Moutai Hospital of Guizhou Province, Renhuai 564500, Guizhou Province, China¹遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院)骨科, 贵州省遵义市 563000; ²遵义市红花岗区人民医院骨科, 贵州省遵义市 563000;³贵州省茅台医院骨科, 贵州省仁怀市 564500**第一作者:** 周万林, 男, 1998年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 遵义医科大学在读硕士, 医师, 主要从事干细胞成骨分化基础研究。**通讯作者:** 黄文良, 硕士, 主任医师, 贵州省茅台医院骨科, 贵州省仁怀市 564500<https://orcid.org/0009-0006-4525-1956>(周万林); <https://orcid.org/0009-0006-4385-4032>(黄文良)**基金资助:** 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK(2021)一般387), 项目负责人: 黄文良; 贵州省科技计划项目(黔科合成果-LC[2024]019), 项目负责人: 黄文良; 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwwj2024-410), 项目负责人: 申雄成; 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwwj2020-1-131), 项目负责人: 何斌**引用本文:** 周万林, 何斌, 申雄成, 黄坤, 田仁元, 袁野, 黄文良. STRO-1 阳性与阴性骨髓间充质干细胞成骨能力的对比 [J].

中国组织工程研究, 2025, 29(36):7719-7727.



Abstract

BACKGROUND: With aging, the regenerative capacity and differentiation function of bone marrow mesenchymal stem cells progressively decline, reducing bone tissue repair efficacy. Thus, identifying bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations with enhanced osteogenic potential is of significant importance for advancing bone tissue engineering.

OBJECTIVE: To evaluate the osteogenic differentiation potential differences between STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells under osteogenic induction conditions.

METHODS: SD rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured. The expression of CD29, CD45, CD90, and STRO-1 was identified via flow cytometry and immunofluorescence. Immunomagnetic cell sorting was used to separate STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells. The cells of two groups were subjected to osteogenic induction for 7 and 14 days. qRT-PCR and western blotting were performed to analyze differences in osteogenesis-related gene expression (Collagen I, Runt-related transcription factor 2, osteoprotegerin, and osteocalcin) and protein levels. Alizarin red staining and alkaline phosphatase staining were used to observe calcium nodule formation.

RESULTS AND CONCLUSION: Flow cytometry showed high expression levels of CD29 and CD90 and low expression of CD45, with a positive STRO-1 expression rate of 12.8%. Immunofluorescence results were consistent with those of flow cytometry. After magnetic cell sorting, STRO-1 positive cells demonstrated a higher colony formation rate than STRO-1 negative cells. On day 14, STRO-1 positive cells showed significantly higher osteogenic differentiation potential than on day 7, with significantly elevated osteogenesis-related marker levels compared to STRO-1 negative cells ($P < 0.01$). The findings indicate that STRO-1 positive bone marrow mesenchymal stem cells exhibit significant advantages in osteogenic potential, providing a theoretical basis for their selection as ideal seed cells in bone tissue engineering. In future applications, they may represent a promising therapeutic approach for bone defect repair.

Key words: STRO-1; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; immunomagnetic cell sorting; bone defect repair; seed cells; bone tissue engineering; engineered stem cells

Funding: Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project, No. ZK[2021]387 (to HWL); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project, No. LC[2024]019 (to HWL); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project, No. gzwjk2024-410 (to SXC); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project, No. gzwjk2020-1-131 (to HB)

How to cite this article: ZHOU WL, HE B, SHEN XC, HUANG K, TIAN RY, YUAN Y, HUANG WL. Comparison of osteogenic potential in STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7719-7727.

0 引言 Introduction

骨缺损修复是临床治疗中的重大挑战，骨缺损通常由创伤、肿瘤切除或先天性畸形引起^[1]，会导致患者骨结构和功能的丧失，严重影响生活质量。目前，自体骨移植是传统的骨缺损修复方法，但受限于供体不足、供区并发症和手术复杂性，应用存在诸多局限^[2]。因此，近年来基于干细胞的骨组织工程已成为骨再生领域的重要研究方向^[3-5]。

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 因具有自我增殖和多向分化能力，能够在特定条件下分化为成骨、软骨和脂肪细胞，使其成为骨组织修复和重建的理想选择^[6]。然而，BMSCs 是一个异质性群体，不同亚群的增殖和分化能力存在显著差异。基质前体抗原 1 (stromal precursor antigen-1, STRO-1) 作为 BMSCs 的特异性标志物，可用于鉴别具有更高增殖和多向分化潜能的特定亚群。STRO-1 不仅能富集多能性成纤维细胞集落，还显著增强了细胞的增殖、分化、归巢及免疫抗炎等能力^[7-8]。此外，在哺乳动物包括人退变的椎间盘中发现了表达典型干细胞标志物 (CD105、CD90、STRO-1) 的细胞群，在退变处试图进行修复反应，间接反映出干细胞的归巢能力^[9]。在免疫调节方面，PAGANELLI 等^[10]探讨了 STRO-1 阳性干细胞通过分泌含白细胞介素 10、转化生长因子 β 等抗炎因子的细胞外囊泡抑制巨噬细胞中促炎因子的表达，从而减少炎症反应。这些特性使 STRO-1 阳性 BMSCs 成为骨组织工程中的理想种子细胞。此外，STRO-1 阳性细胞在心力衰竭等疾病中也展现了积极效果。例如，通过心内膜注射不同剂量的 STRO-1 阳性间充质干细胞可改善慢性心力衰竭患者的心功能^[11]，在 II 期试验中，高剂量 STRO-1/STRO-3 阳性细胞显著改善了心室容积，

而在 III 期试验中，显著降低了炎症水平较高患者的心肌梗死和脑卒中发生风险。

该研究通过流式细胞术与免疫磁珠分选技术，从大鼠股骨和胫骨中分离出 STRO-1 阳性和阴性 BMSCs，在成骨诱导培养条件下，观察两者在成骨分化能力上的差异，为骨组织工程中种子细胞的选择提供理论依据，并评估 STRO-1 阳性 BMSCs 在骨缺损修复中的应用潜力。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照实验设计，两组间的比较 (STRO-1 阳性 vs. STRO-1 阴性) 使用 Student's *t* 检验；不同时间点的比较 (7 d vs. 14 d) 使用配对 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 10 月至 2024 年 8 月在遵义市第一人民医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6-12 周龄 SD 大鼠 6 只，雌雄各 3 只，体质量 220-300 g，由长沙市天勤生物技术有限公司提供，许可证号：SCXK(湘)2022-0011，常规饲料喂养，自由饮水。实验方案经遵义医科大学第三附属医院动物伦理委员会批准，审批号为伦审(2024)-6-642 号。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 仪器及试剂 倒置相差显微镜 (CKX53, 日本 OLYMPUS 公司); 倒置荧光显微镜 (IX53, 日本 OLYMPUS 公司); 流式细胞仪 (FACSCanto™ II, 美国 BD Biosciences 公司); DMEM-F12 培养基 (Gibco); 双抗青霉素-链霉素溶液 (Biochannel); 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导培养基

(Pricella); 成脂诱导小分子化合物 (Solarbio); 碱性磷酸酶染色试剂盒 (南京建成公司); PE anti-rat CD29 抗体、PE anti-rat CD45 抗体、PE anti-rat CD90 抗体 (Biolegend); STRO-1 单克隆抗体 (eBioscience™, Invitrogen); 山羊抗鼠 Ig-G-FITC (Proteintech); Anti-CD29 pAb、Anti-CD45 pAb、Anti-CD90 pAb (Servicebio); MACS 磁细胞分选器、MACS Buffer 缓冲液、MS 分选柱、鼠抗 Ig-M 免疫磁珠 (Miltenyi); I 型胶原、Runt 相关转录因子 2、骨保护素、骨钙素引物及 Western blot 抗体 (北京博奥森)。

1.3.3 成骨诱导分化培养基、成脂诱导分化培养基配置

(1) 成骨诱导分化培养基: 在严格无菌条件下, 将试剂盒中的成骨分化专用胎牛血清与大鼠 BMSCs 的成骨分化添加物均匀混合至成骨分化基础培养基中, 即成骨诱导分化培养基。

(2) 成脂诱导分化培养基: 基础培养基为含体积分数 12% 胎牛血清和青霉素-链霉素双抗的低糖 DMEM-F12 培养基。诱导液是在基础培养基中添加 200 μmol/L 吡哆美辛、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤、10 μg/mL 胰岛素、1 mmol/L 地塞米松及 2 mmol/L 谷氨酰胺; 维持液则在基础培养基中仅添加 10 μg/mL 胰岛素。

1.4 实验方法

1.4.1 BMSCs 的分离、培养、扩增 麻醉后使用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 分离出胫骨和股骨, 无菌操作下去除胫骨和股骨的干骺端, 使用 1 mL 注射器用生理盐水反复冲洗骨髓腔, 收集细胞悬液。将细胞悬液放入 15 mL 离心管中, 以 1 200 r/min 离心 7 min, 去上清, 再用 PBS 洗涤并离心 2 次 (1 200 r/min, 7 min), 加入含体积分数 12% 胎牛血清和青霉素、链霉素双抗的低糖 DMEM-F12 培养基, 轻轻吹打混匀后, 将骨髓细胞悬液接种于 T25 培养瓶中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中进行原代培养, 48 h 后首次换液, 之后每两三天换液 1 次。当单层细胞生长至 80%–90% 融合时按 1 : 2 比例进行传代培养。

1.4.2 BMSCs 成骨诱导与鉴定 当第 3 代 BMSCs 融合度达到 80%–95% 时, 使用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 以 2×10^7 L⁻¹ 细胞浓度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞融合度达到 80%–95%, 弃去上清液, 每孔加入 2 mL 成骨诱导分化培养基, 每两三天换液 1 次, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中持续培养 7–14 d, 观察细胞形态变化。根据钙结晶析出和钙质结节形成情况, 确定终止诱导的时间并进行染色鉴定。

茜素红染色: 吸除培养基, 用适量 PBS 清洗细胞 2 次, 弃去 PBS, 加入适量体积分数 4% 中性甲醛溶液覆盖培养

皿底部, 室温固定 30 min, PBS 清洗去除残留固定液, 加入茜素红染液覆盖培养皿底部, 室温染色 30 min, 吸弃染液, 用 PBS 清洗背景杂质, 在显微镜下观察并采集图像, 钙结节与茜素红染料结合呈现红色或橘红色。

碱性磷酸酶染色 (cAKP 钙钴法): 按照试剂盒说明, 先滴加固定液固定细胞, 再依次加入试剂 1–试剂 5, β-甘油磷酸钠水解产生磷酸, 与钙离子结合生成无色磷酸钙, 随后与硝酸钴反应, 经硫化铵处理后, 形成灰黑色颗粒、块状或条状沉淀。

1.4.3 BMSCs 成脂诱导与鉴定 当第 3 代 BMSCs 融合度达到 80%–95% 时, 使用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 以 2×10^7 L⁻¹ 细胞浓度接种至 6 孔板中, 每孔 2 mL, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞融合度达到 80%–95%, 弃去上清液, 每孔加入 2 mL 成脂诱导分化培养基, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d, 然后更换为含胰岛素的成脂诱导维持液培养 1 d, 后再更换为成脂诱导培养基培养 3 d。按照此换液频率进行 14–21 d 的成脂诱导培养, 期间观察细胞形态变化。根据脂滴的数量和大小, 确定终止诱导的时间并进行染色鉴定。

油红 O 染色: 吸除培养基, 用适量 PBS 清洗细胞 2 次, 弃去 PBS, 加入适量体积分数 4% 中性甲醛溶液覆盖培养皿底部, 室温固定 30 min, 弃去固定液, 再用 PBS 清洗 2 次, 按油红 O 原液与生理盐水或 PBS 3 : 2 的比例, 现配制油红 O 工作液。向清洗后的诱导孔中加入适量工作液, 室温静置染色 30 min, 吸除工作液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入适量 PBS 以避免细胞干燥, 显微镜下观察染色效果并采集图像, 脂滴与油红 O 结合后呈现红色或橘红色。

1.4.4 流式细胞术鉴定 BMSCs 表型 取第 3 代 BMSCs, 使用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化, 获得细胞悬液, 以 1 000×g 离心 5 min, 弃去上清液, PBS 洗涤细胞, 再以相同速度离心 2 次; 将细胞沉淀用 2.5 mL PBS 重悬, 分装至 5 个 EP 管, 配成细胞浓度为 1×10^{10} L⁻¹ 的细胞悬液, 依次加入 CD29-PE、CD45-PE、CD90-PE 和 STRO-1 单克隆抗体各 6 μL, 阴性对照组加入 6 μL PBS, 4 °C 避光孵育 30 min, 孵育完成后, STRO-1 单抗组再加入 10 μL 山羊抗小鼠 Ig-G-FITC 二抗, 继续 4 °C 避光孵育 30 min; 孵育完成后, 以 1 000×g 离心 5 min, 重复 2 次, 弃去上清液, 加入 500 μL PBS, 轻轻吹打混匀, 制备单细胞悬液; 将样本上流式细胞仪, 检测 PE(CD29)、PE(CD45)、PE(CD90) 及 Ig-G-FITC(STRO-1) 标记的细胞在总细胞中的比例。

1.4.5 免疫荧光鉴定 BMSCs 表型 取第 3 代 BMSCs, 胰酶消化后计数, 以 5×10^3 个 / 孔密度接种于 6 孔板中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养 2 h, 待细胞贴壁后取出, 通过免疫荧光染色检测 BMSCs 表面分子 (CD29、

CD45、CD90、STRO-1) 的表达。染色步骤如下：用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，加入 1% Triton X-100 室温透化 20 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；加入 5% BSA 封闭 30 min，去除 BSA 后，加入 1 : 200 稀释的 CD29、CD45、CD90、STRO-1 一抗，4 °C 孵育过夜，次日室温复温 10 min，PBS 洗涤 3 次，加入 1 : 200 稀释的 Coralite488 标记山羊抗鼠 IgG 二抗，室温避光孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，DAPI 复染 10 min，PBS 再洗涤 3 次；最后用抗荧光淬灭剂封固，荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.6 免疫磁细胞分选 取第 3 代 BMSCs，使用 STRO-1 单克隆抗体 (eBioscience™, Invitrogen) 按说明书分离 STRO-1 阳性细胞。将 1×10^7 个 BMSCs 重悬于 MACS 缓冲液 (pH 7.2、PBS、0.5% BSA、2 mmol/L EDTA)，加入 6 μ L STRO-1 单克隆抗体，4 °C 避光孵育 30 min，离心去除上清液 (300 \times g, 10 min)，用 80 μ L 缓冲液重悬，加入 20 μ L 鼠抗 Ig-M 免疫磁珠，4 °C 避光孵育 30 min，将试管置于 MACS 分选器中，分离 STRO-1 阳性 BMSCs 和 STRO-1 阴性 BMSCs。

1.4.7 诱导 STRO-1 阳性与阴性 BMSCs 成骨分化 以 STRO-1 阴性 BMSCs 作为对照组，与 STRO-1 阳性 BMSCs 一并在成骨诱导培养基的作用下，分别成骨诱导 7, 14 d，诱导完成后通过 qRT-PCR 和 Western blot 分析两组细胞中成骨相关基因 (I 型胶原、Runt 相关转录因子 2、骨保护素、骨钙素) 及蛋白表达水平差异；使用茜素红和碱性磷酸酶染色观察钙结节形成情况。

1.4.8 qRT-PCR 检测 I 型胶原、Runt 相关转录因子 2、骨保护素、骨钙素的 mRNA 表达 弃去成骨诱导培养基，用 PBS 冲洗 3 次，采用 Trizol 法提取 RNA，定量后进行反转录。荧光定量 PCR 反应体系：包括 7.5 μ L Sybr、1.5 μ L 引物、2.0 μ L cDNA 和 4 μ L 无酶水。PCR 反应条件：预变性 95 °C 30 s，变性 95 °C 15 s，退火 / 延伸 60 °C 30 s，共进行 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量，每组实验独立重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列
I 型胶原	F: 5'-CGT GGA AAC CTG ATG TAT GCT TG-3'
	R: 5'-CCT ATG ACT TCT GCG TCT GGT GA-3'
Runt 相关转录因子 2	F: 5'-CAG TAT GAG AGT AGG TGT CCC GC-3'
	R: 5'-AAG AGG GGT AAG ACT GGT CAT AGG-3'
骨钙素	F: 5'-GAG CTC AAC CCC AAT TGT GAC-3'
	R: 5'-AAC GGT GGT GCC ATA GAT GC-3'
骨保护素	F: 5'-AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG T-3'
	R: 5'-CAA ACT GTC CAC CAG AAC ACT CA-3'
GAPDH	F: 5'-CTG GAG AAA CCT GCC AAG TAT G-3'
	R: 5'-GGT GGA AGA ATG GGA GTT GCT-3'

1.4.9 Western blot 检测 I 型胶原、Runt 相关转录因子 2、骨保护素、骨钙素蛋白表达 弃去成骨诱导培养基，PBS 冲洗 3 次，用 RIPA 裂解液冰上裂解细胞，用移

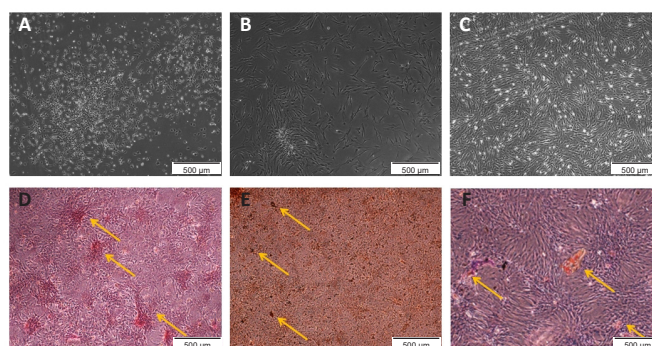
液枪收集细胞放入 1.5 mL EP 管内，4 °C、12 000 r/min 离心 5-15 min，将离心后的上清转移至新的 EP 管内，使用 BCA 法测定蛋白浓度，蛋白上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，每孔上样 5 μ g 蛋白，电泳结束后，将蛋白转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉封闭 30 min，加入一抗 (兔抗 I 型胶原、兔抗 Runt 相关转录因子 2、兔抗骨钙素、兔抗骨保护素，稀释比例均为 1 : 500；兔抗 β -actin，稀释比例为 1 : 5 000)，4 °C 孵育过夜，次日洗膜后，加入二抗 (HRP-山羊抗兔，稀释比例为 1 : 5 000)，37 °C 孵育 30 min，充分洗膜后，使用 ECL 化学发光显色。每组实验独立重复 3 次。用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.5 主要观察指标 STRO-1 阳性与阴性 BMSCs 的生长分布特征及成骨分化情况。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 24.0 软件进行数据处理与分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间的比较 (STRO-1 阳性 vs. STRO-1 阴性) 使用 Student's *t* 检验；不同时间点的比较 (7 d vs. 14 d) 使用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过遵义医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 BMSCs 培养和多向分化能力鉴定结果 扩增后的 BMSCs 表现出统一的梭形和成纤维细胞样形态 (图 1A, B)。经过 3 次传代，BMSCs 群体更加均一，显微镜下显示出大小均匀、折光性良好的贴壁细胞 (图 1C)。BMSCs 表现出成骨和成脂分化潜能，在茜素红、碱性磷酸酶和油红 O 染色下形成钙盐结节和脂肪细胞内脂质 (图 1D-F)。第 3 代 BMSCs 增殖能力强，形态稳定，培养至第 3 代后冷冻保存于 -80 °C，供后续实验使用。

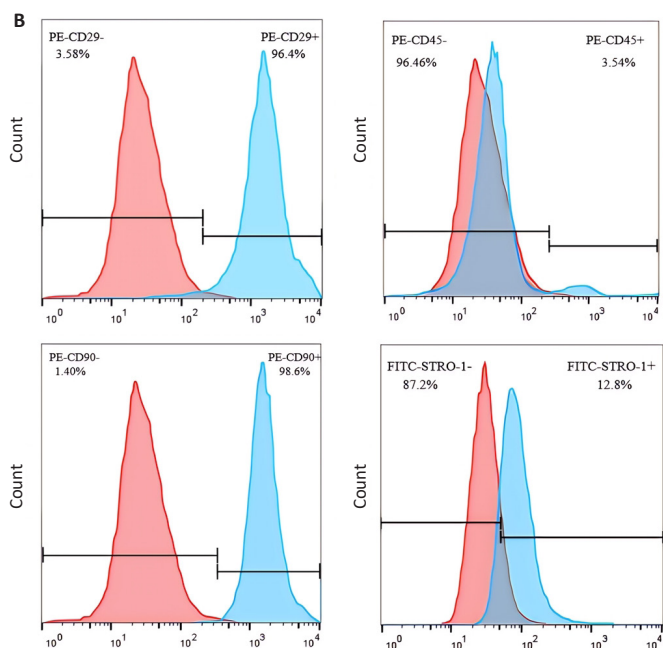
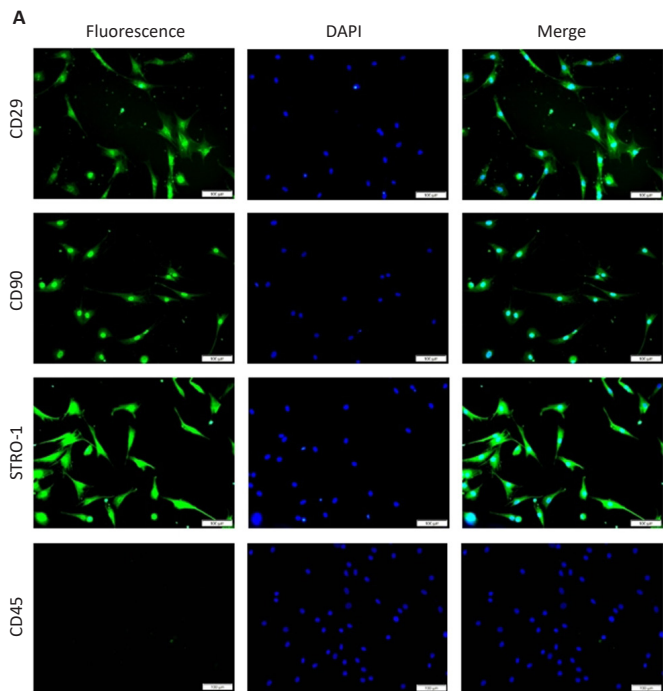


图注：图 A 为原代 BMSCs，细胞形态多样，分布较为松散；B 为第 2 代 BMSCs，表现出明显的梭形和成纤维细胞样形态，细胞增殖和形态趋于均一；C 为第 3 代 BMSCs，细胞群体更加均一，大小均匀，具有良好的贴壁特性，形态稳定；D 为成骨诱导 14 d 后茜素红 S 染色，可见钙盐结节形成 (箭头所指为红色钙盐结节)；E 为成骨诱导 14 d 后碱性磷酸酶染色，箭头所指为黑色钙颗粒；F 为成脂诱导 14 d 后油红 O 染色，可见脂质累积 (箭头所指为橘红色脂滴)。

图 1 | SD 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的形态学特征及成骨、成脂分化能力 (标尺为 500 μ m)

Figure 1 | Morphological characteristics of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells and osteogenic and adipogenic differentiation potential (scale bars: 500 μ m)

2.2 BMSCs 表面标记物鉴定结果 通过免疫荧光(图 2A)和流式细胞术(图 2B)分析第 3 代 BMSCs 的表面标记物,结果显示 CD29(96.4%)和 CD90(98.6%)高表达,CD45(3.54%)低表达,STRO-1 阳性表达率为 12.8%。免疫荧光与流式细胞术结果一致,确认提取的细胞为 BMSCs。

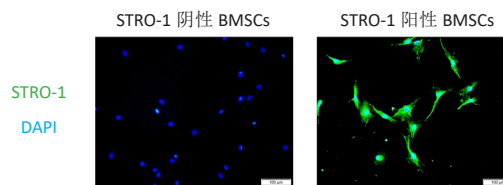


图注: 图 A 为免疫荧光染色图(标尺为 100 μm): CD29、CD90、STRO-1 可见绿色荧光表达,而 CD45 未见明显的绿色荧光; B 为第 3 代 BMSCs 表面标记物流式分析结果,CD29、CD90 高表达,CD45 低表达,STRO-1 部分阳性(12.8%)。蓝色峰代表阳性细胞群,红色峰代表阴性对照。

图 2 | 第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)表面标记物免疫荧光及流式分析

Figure 2 | Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis of surface markers on passage 3 rat bone marrow mesenchymal stem cells

2.3 免疫磁细胞分选 STRO-1 阳性 BMSCs 免疫荧光结果显示,STRO-1 阳性 BMSCs 中观察到明显的绿色荧光,而 STRO-1 阴性细胞中未见荧光(图 3)。结合流式细胞术结果,可见 STRO-1 阳性细胞在总 BMSCs 中的比例较低,但由于其增殖能力强,经过连续培养后,获得了数量较多且纯度更高的 STRO-1 阳性 BMSCs,便于后续实验。

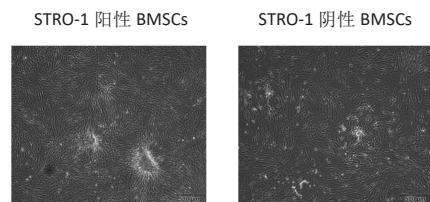


图注: 左图显示 STRO-1 阴性 BMSCs,未观察到明显的绿色荧光;右图显示 STRO-1 阳性 BMSCs,观察到明显的绿色荧光,表明成功富集 STRO-1 阳性细胞。STRO-1: 基质前体抗原 1。

图 3 | 免疫磁细胞分选 STRO-1 阳性和阴性骨髓间充质干细胞(BMSCs)免疫荧光染色图(标尺为 100 μm)

Figure 3 | Immunofluorescence representation of STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells sorted via immunomagnetic cell separation (scale bars: 100 μm)

2.4 STRO-1 阳性与阴性 BMSCs 生长分布特征 连续培养 STRO-1 阳性 BMSCs 后,显微镜下观察到细胞出现明显聚集现象,形成多个高密度细胞簇。相比之下,STRO-1 阴性 BMSCs 生长稀疏、分散,细胞间距较大,缺乏集落形成能力(图 4)。

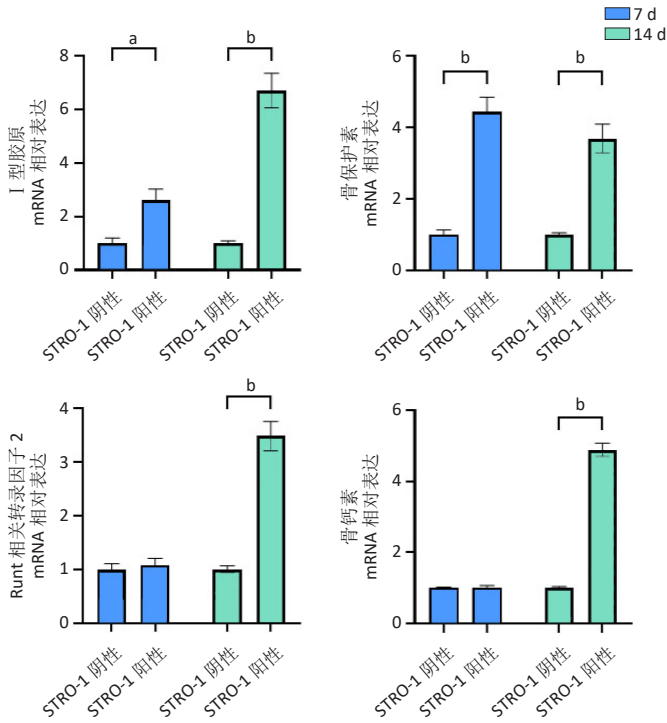


图注: 左图为 STRO-1 阳性 BMSCs,显示出明显的细胞聚集现象,形成多个高密度细胞簇;右图为 STRO-1 阴性 BMSCs,显示出细胞生长稀疏、分散,细胞间距较大,缺乏聚集形成能力的特征。STRO-1: 基质前体抗原 1。

图 4 | STRO-1 阳性和阴性骨髓间充质干细胞(BMSCs)生长分布特征(标尺为 500 μm)

Figure 4 | Growth distribution characteristics of STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells (scale bars: 500 μm)

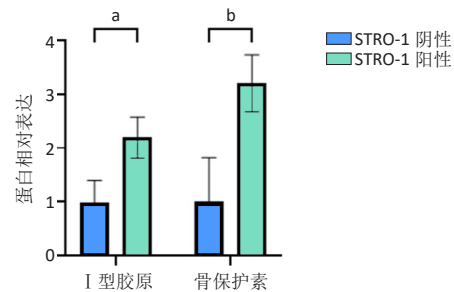
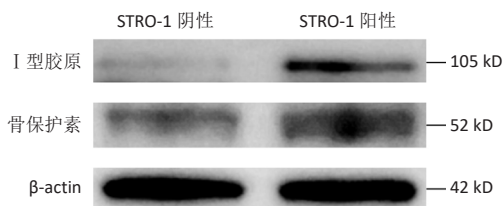
2.5 qRT-PCR 检测成骨基因的表达 在成骨诱导条件下培养 STRO-1 阳性和阴性 BMSCs 7, 14 d, qRT-PCR 检测成骨相关基因(I 型胶原、Runt 相关转录因子 2、骨保护素、骨钙素)的表达。如图 5 所示,成骨诱导第 7 天时,STRO-1 阳性组 I 型胶原和骨保护素基因表达显著高于 STRO-1 阴性组,而 Runt 相关转录因子 2 和骨钙素基因表达在两组之间未表现出显著差异。成骨诱导第 14 天时,STRO-1 阳性组 I 型胶原和骨保护素基因表达差异更加显著,同时 STRO-1 阳性组 Runt 相关转录因子 2 和骨钙素基因表达也显著高于 STRO-1 阴性组。



图注：^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.0001$ 。STRO-1: 基质前体抗原 1。
图 5 | 成骨诱导培养第 7, 14 天, STRO-1 阳性与阴性骨髓间充质干细胞的成骨相关基因表达

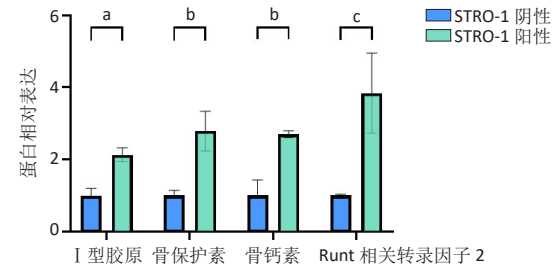
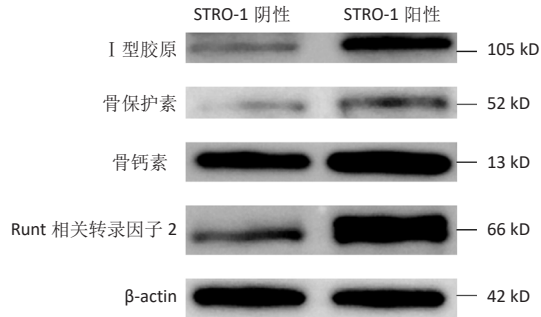
Figure 5 | Osteogenic-related gene expression in STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells on days 7 and 14 of osteogenic induction

2.6 Western blot 检测成骨蛋白的表达 成骨诱导第 7 天, STRO-1 阳性 BMSCs 中 I 型胶原和骨保护素蛋白表达显著增加, 但未检测到 Runt 相关转录因子 2 和骨钙素蛋白表达 (图 6)。成骨诱导第 14 天, STRO-1 阳性 BMSCs 中所有成骨相关蛋白表达显著上调 (图 7)。



图注：^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ 。STRO-1: 基质前体抗原 1。
图 6 | 成骨诱导培养第 7 天, STRO-1 阳性和阴性骨髓间充质干细胞中 I 型胶原和骨保护素的蛋白表达

Figure 6 | Protein expression of type I collagen and osteoprotegerin in STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells on day 7 of osteogenic induction



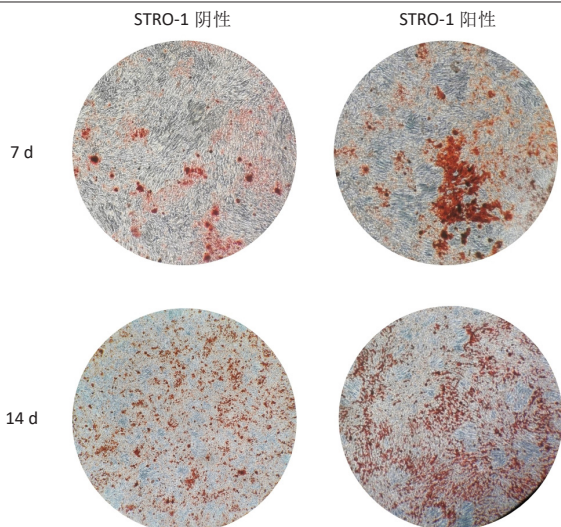
图注：^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.0001$ 。STRO-1: 基质前体抗原 1。
图 7 | 成骨诱导第 14 天, STRO-1 阳性与阴性骨髓间充质干细胞中成骨相关蛋白表达

Figure 7 | Expression of osteogenic-related protein in STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells on day 14 of osteogenic induction

2.7 茜素红染色及碱性磷酸酶染色检测胞外基质钙结节形成情况 成骨诱导第 7 天, 光镜下 ($\times 40$ 倍) 观察 STRO-1 阳性和阴性 BMSCs 钙盐结节均被染成红色, STRO-1 阳性组在染色范围和成骨方面表现更为突出, 显示更强的成骨活性 (图 8)。进一步从微观角度展示茜素红染色和碱性磷酸酶染色结果 (图 9), 在成骨诱导第 7 天时, STRO-1 阳性组显示更多的红色钙结节和黑色钙化颗粒, 且染色更加密集, 表明早期成骨分化活性较高。成骨诱导延长至第 14 天时, STRO-1 阳性组的钙盐结节数量和面积进一步增加, 钙化水平显著提升, 相较于 STRO-1 阴性组呈现出更广泛、密集的钙盐沉积, 表明成骨分化能力持续增强。

3 讨论 Discussion

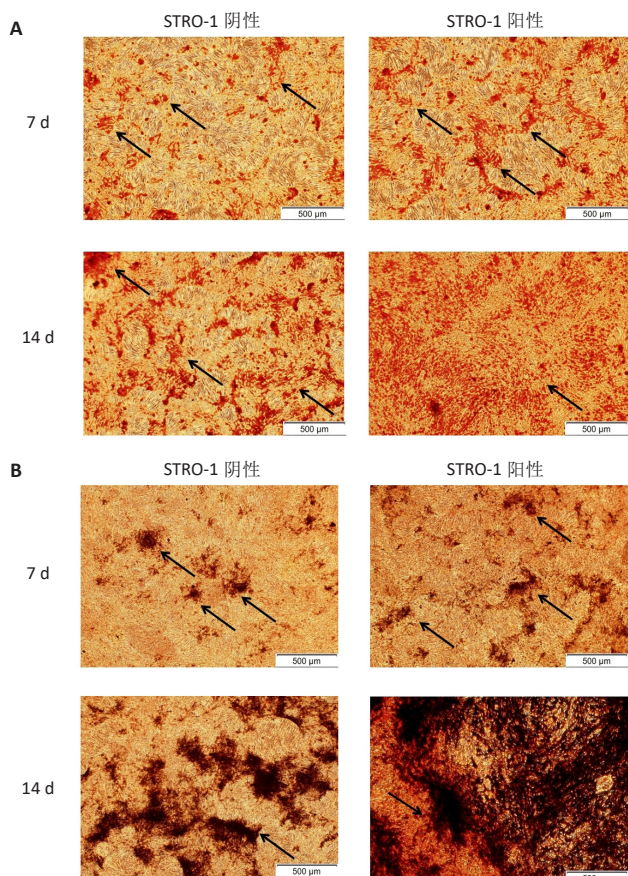
该研究通过对比 STRO-1 阳性与阴性 BMSCs 的成骨分化能力, 探索了 STRO-1 阳性 BMSCs 在骨缺损修复中的潜在应用价值。研究结果显示, STRO-1 阳性 BMSCs 在成骨相关基因和蛋白表达方面表现出显著优势, 特别是 I 型胶原和 Runt 相关转录因子 2 等成骨分化标志物的表达均显著高于 STRO-1 阴性 BMSCs, 同时 STRO-1 阳性 BMSCs 茜素红染色和碱性磷酸酶染色显示有更为密集的矿化沉积, 表明其具备更强的成骨分化能力。在细胞形态方面, STRO-1 阳性 BMSCs 形成高密度细胞集落, 与 STRO-1 阴性细胞的稀疏分布不同, 这可能与较高的增殖和分化潜力密切相关, 进一步支持了 STRO-1 阳性 BMSCs 作为优选种子细胞的理论依据。



图注：在成骨诱导第7天时，STRO-1阳性组的矿化水平明显高于STRO-1阴性组，红色染色区域更加密集；成骨诱导第14天时，STRO-1阳性组的矿化结节进一步增加，分布更为广泛，表明成骨活性显著增强。STRO-1：基质前体抗原1。

图8 | STRO-1阳性与阴性骨髓间充质干细胞成骨诱导后茜素红染色($\times 40$)

Figure 8 | STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells stained with Alizarin Red after osteogenic induction ($\times 40$)



图注：图A为茜素红染色显示钙结节的矿化情况，箭头为钙结节；B为碱性磷酸酶染色，箭头为黑色片状或条状钙颗粒，表明该区域具有较高的成骨活性。STRO-1：基质前体抗原1。

图9 | STRO-1阳性与阴性骨髓间充质干细胞成骨诱导后茜素红和碱性磷酸酶染色(标尺500 μm)

Figure 9 | STRO-1 positive and negative bone marrow mesenchymal stem cells stained with Alizarin Red and alkaline phosphatase after osteogenic induction (scale bars: 500 μm)

间充质干细胞在维持健康与疾病平衡中起着重要作用。结合不同支架材料(如羟基磷灰石和聚乳酸),间充质干细胞为骨再生领域提供了创新的治疗手段^[12-14]。考虑到间充质干细胞在组织和器官中的重要作用,许多研究深入探讨了其生物学机制及临床应用潜力^[15-23]。间充质干细胞的优势包括易于采集,并且可以减少移植后的免疫排斥反应^[24-25]。在特定的体外培养条件下,间充质干细胞还展现出自我更新和分化为多种细胞类型的能力。此外,不同来源的间充质干细胞还具备显著的免疫调节功能。在炎症性疾病中,间充质干细胞通过归巢到受损组织以调节局部免疫反应,这种独特的免疫调节特性使间充质干细胞成为许多临床研究的核心细胞类型^[26-29]。间充质干细胞在骨损伤和骨疾病的病理生理学中展现出广泛的应用前景,未来有望成为一种潜在的治疗策略。

在组织工程中,筛选最佳的种子细胞需综合考虑多个因素,除细胞的增殖能力和特定谱系分化潜力外,细胞来源的选择也至关重要。由于BMSCs在术中可从四肢骨的骨髓腔中便捷获取,且可自体利用,逐渐成为再生医学中有前景的细胞来源。尽管自体骨移植效果较好,但受到供体数量有限、手术复杂及并发症风险等限制,常见供区问题包括疼痛和感染等^[30-31]。而同种异体骨和人工骨面临高昂成本、免疫排斥风险及生物活性不足等局限,异体骨在愈合效果、整合度和机械强度方面均不如自体骨,且与人体骨骼的匹配性不足^[32-33]。上述限制不仅增加了患者的经济负担,还对生活质量产生了负面影响。因此,通过标志物筛选出优质的BMSCs,评估其在骨再生中的应用前景成为此次研究的重点。

通过从大鼠股骨和胫骨中分离BMSCs,流式细胞术和免疫荧光结果显示细胞高表达CD29和CD90,低表达CD45,且具有成骨和成脂分化潜力,符合国际细胞治疗标准^[34]。STRO-1阳性BMSCs占12.8%,与既往研究(6.7%–20%)相当^[7, 35]。STRO-1阳性细胞聚集成高密度细胞簇,而阴性细胞则稀疏分布,在增殖能力上有显著差异^[36-37]。

Runt相关转录因子是成骨分化过程中的核心转录因子,主要在成骨分化的早期阶段发挥重要作用。它通过启动下游成骨相关基因的表达,如I型胶原和骨钙素,来促进骨基质的合成和骨组织的矿化^[38],I型胶原是骨基质的主要组成部分,而骨钙素是成熟成骨细胞的标志物,参与骨的矿化过程^[39]。因此,Runt相关转录因子的激活对于成骨细胞的功能性发育至关重要,直接影响骨组织的形成和质量。BMSCs具有多向分化的潜能,成骨分化这一过程受到多种信号通路和调控因子的共同作用,包括Wnt/ β -catenin、ERK和Notch等通路^[40-41]。在该研究中,I型胶原和骨保护素基因在成骨诱导第7天时的表达有显

著差异,且STRO-1阳性组高于阴性组,而Runt相关转录因子2和骨钙素基因在两组之间无显著差异,造成这一现象很可能为STRO-1阳性BMSCs在成骨前期通过激活核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor kappa B, RANK)/核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)/骨保护素系统,为后期的成骨分化创造了一个更有利的环境。骨保护素作为RANKL的“诱饵受体”,通过抑制破骨细胞的活性,减少了骨吸收,从而使成骨细胞在一个较为稳定的微环境中进行分化。相比之下,Runt相关转录因子2虽然是成骨分化的早期关键因子,但其表达在早期阶段未见显著差异,可能是由于RANK/RANKL/骨保护素系统的优先激活,使得成骨前期的骨代谢平衡更多地倾向于抑制骨吸收,而非立即启动成骨基因的表达。STRO-1阳性细胞可能通过这一机制,间接为成骨分化的后期提供了更加有利的基础。在成骨分化的第14天,STRO-1阳性组Runt相关转录因子2和骨保护素基因开始表达,且基因和蛋白层面上骨保护素的表达量略低于第7天,这一结果支持了STRO-1阳性BMSCs在成骨早期通过RANK/RANKL/骨保护素系统调控骨代谢的假设。随着成骨诱导的时间推移,Runt相关转录因子2和骨钙素的表达逐渐增加,表明成骨分化已进入成熟期,成骨基因逐渐被激活,取代前期RANK/RANKL/骨保护素系统。MA等^[42]研究表明,Exendin-4通过抑制骨吸收和促进老年卵巢切除大鼠的骨形成来提高骨强度和改善骨微结构。因此,这种动态调控机制解释了早期RANK/RANKL/骨保护素系统的作用,其在成骨前期为后续分化创造的有利条件是有价值的。

尽管实验观察到STRO-1阳性BMSCs在成骨分化中的显著作用,但其潜在的分子机制尚未深入探讨。为更深入理解STRO-1阳性BMSCs的成骨分化潜力,未来可通过探索RANK/RANKL/骨保护素系统及Wnt和MAPK信号通路的调控作用,为揭示STRO-1阳性BMSCs的成骨机制提供更清晰的分子图谱。另外,该实验未量化碱性磷酸酶活性^[43],未来研究可弥补这一不足,并结合其他成骨标志物的表达,全面评估STRO-1阳性BMSCs的成骨能力。

综上所述,实验成功分离了STRO-1阳性和阴性BMSCs,并发现STRO-1阳性BMSCs在成骨能力上具有显著优势,这为骨组织工程中种子细胞的筛选提供了理论依据,在骨缺损修复中具有潜在的治疗应用价值。

作者贡献:周万林负责实验实施、论文撰写,何斌负责实验数据分析处理,申雄成负责细胞培养、指标检测,黄坤、田仁元、袁野负责数据和文章的校对,黄文良负责实验设计。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] WATSON E, MIKOS AG. Advances in In Vitro and In Vivo Bioreactor-Based Bone Generation for Craniofacial Tissue Engineering. *BME Front.* 2023;31(4):0004.
- [2] TOOSI S, NADERI-MESHKIN H, MORADI A, et al. Scaphoid Bone Nonunions: Clinical and Functional Outcomes of Collagen/PGA Scaffolds and Cell-Based Therapy. *ACS Biomater Sci Eng.* 2023;9(4):1928-1939.
- [3] APATZIDOU DA, ILIOPOULOS JM, KONSTANTINIDIS A, et al. Inflammatory and bone remodelling related biomarkers following periodontal transplantation of the tissue engineered biocomplex. *Clin Oral Investig.* 2024;28(7):361.
- [4] SEEBACH C, NAU C, HENRICH D, et al. Cell-Based Therapy by Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells for Bone Augmentation of Plate-Stabilized Proximal Humeral Fractures: A Multicentric, Randomized, Open Phase IIa study. *Stem Cells Transl Med.* 2024;13(1):3-13.
- [5] LIU HC, LIU TT, LIU YL, et al. Atelocollagen-Embedded Chondrocyte Precursors as a Treatment for Grade-4 Cartilage Defects of the Femoral Condyle: A Case Series with up to 9-Year Follow-Up. *Biomolecules.* 2021;11(7):942.
- [6] WANG J, WANG T, ZHANG F, et al. Roles of circular RNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (Review). *Mol Med Rep.* 2022;26(1):227.
- [7] COUTO DE CARVALHO LA, TOSTA DOS SANTOS SL, SACRAMENTO LV, et al. Mesenchymal stem cell markers in periodontal tissues and periapical lesions. *Acta Histochem.* 2020;122(8):151636.
- [8] ONOKI T, KANCZLER J, RAWLINGS A, et al. Modulation of osteoblastogenesis by NRF2: NRF2 activation suppresses osteogenic differentiation and enhances mineralization in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *FASEB J.* 2024;38(17):e23892.
- [9] BROWN S, MATTA A, ERWIN M, et al. Cell Clusters Are Indicative of Stem Cell Activity in the Degenerate Intervertebral Disc: Can Their Properties Be Manipulated to Improve Intrinsic Repair of the Disc? *Stem Cells Dev.* 2018;27(3):147-165.
- [10] PAGANELLI A, TRUBIANI O, DIOMEDE F, et al. Immunomodulating Profile of Dental Mesenchymal Stromal Cells: A Comprehensive Overview. *Front Oral Health.* 2021;2:635055.
- [11] SUNDIN A, IONESCU SI, BALKAN W, et al. Mesenchymal STRO-1/STRO-3+ precursor cells for the treatment of chronic heart failure with reduced ejection fraction. *Future Cardiol.* 2023;19(12):567-581.
- [12] STAMNITZ S, KRAWCZENKO A, SZALAJ U, et al. Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ β -TCP Scaffold. *Cells.* 2022;11(21):3446.

- [13] YANG K, LUAN YY, WANG S, et al. SGMS1 facilitates osteogenic differentiation of MSCs and strengthens osteogenesis-angiogenesis coupling by modulating Cer/PP2A/Akt pathway. *iScience*. 2024;27(4):109358.
- [14] LUO P, ZHANG Y, HUANG M, et al. Microdroplets Encapsulated with NFATc1-siRNA and Exosomes-Derived from MSCs Onto 3D Porous PLA Scaffold for Regulating Osteoclastogenesis and Promoting Osteogenesis. *Int J Nanomedicine*. 2024;19:3423-3440.
- [15] CAO Y, BOLAM SM, BOSS AL, et al. Characterization of adult human skeletal cells in different tissues reveals a CD90+CD34+ periosteal stem/progenitor population. *Bone*. 2024;178:116926.
- [16] ZHAO J, LI X, HU J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1205-1216.
- [17] BAI Z, HU K, SHOU Z, et al. Engineering a mucin coating to promote osteogenic differentiation of BMSCs in vitro and bone formation in vivo through the Wnt/ β -catenin pathway. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023;221:113000.
- [18] ZHAO XE, YANG Z, GAO Z, et al. 6-Bromindirubin-3'-oxime promotes osteogenic differentiation of canine BMSCs through inhibition of GSK3 β activity and activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(1):e20180459.
- [19] RUNGSIWIWUT R, NUMCHAIKRIKA P, THUWANUT P, et al. Characterization of stem cells from human ovarian follicular fluid; a potential source of autologous stem cell for cell-based therapy. *Hum Cell*. 2021;34(2):300-309.
- [20] SAADH MJ, RAMÍREZ-CORONEL AA, SAINI RS, et al. Advances in mesenchymal stem/stromal cell-based therapy and their extracellular vesicles for skin wound healing. *Hum Cell*. 2023;36(4):1253-1264.
- [21] HUANG F, GAO T, FENG Y, et al. Bioinspired Collagen Scaffold Loaded with bFGF-Overexpressing Human Mesenchymal Stromal Cells Accelerating Diabetic Skin Wound Healing via HIF-1 Signal Pathway Regulated Neovascularization. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024;16(35):45989-46004.
- [22] KERSTAN A, DIETER K, NIEBERGALL-ROTH E, et al. Translational development of ABCB5+ dermal mesenchymal stem cells for therapeutic induction of angiogenesis in non-healing diabetic foot ulcers. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):455.
- [23] LU X, SUN S, LI N, et al. Janus sponge/electrospun fibre composite combined with EGF/bFGF/CHX promotes reconstruction in oral tissue regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2024;243:114117.
- [24] 张文荟, 裴晓杭, 孔黛, 等. 脐带间充质干细胞替代供者骨髓细胞在单倍体相合造血干细胞移植中的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(13):2042-2046.
- [25] 李石旦, 邢伟, 谢晓瑜, 等. 提取人骨髓间充质干细胞的新方法与传统方法比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(24):3814-3820.
- [26] TAN C, TAN S, ZHANG H, et al. Enhanced migration and immunoregulatory capacity of BMSCs mediated by overexpression of CXCR4 and IL-35. *Mol Immunol*. 2022;150:1-8.
- [27] WANG K, ZHU H, YANG L, et al. miR-139 promotes homing of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to lung tissues of asthmatic rats to inhibit inflammatory response of Th2 cells by down-regulating Notch1/Hes1 pathway. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2021;37(2):97-104.
- [28] SONG Y, WU H, GAO Y, et al. Zinc Silicate/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds Promote Angiogenesis and Bone Regeneration via the p38 MAPK Pathway in Activated Monocytes. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(14):16058-16075.
- [29] MA TX, XU YW, JIANG DY. Effects and mechanism of interleukin-17-modified mouse bone marrow mesenchymal stem cells on rejection reaction of allogeneic skin transplantation in mice. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2020;36(3):234-243.
- [30] SANZ-SÁNCHEZ I, SANZ-MARTÍN I, ORTIZ-VIGÓN A, et al. Complications in bone-grafting procedures: Classification and management. *Periodontol 2000*. 2022;88(1):86-102.
- [31] SCHMIDT AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*. 2021;52 Suppl 2:S18-S22.
- [32] MATTHEWS JR, BRUTICO JM, ABRAHAM DT, et al. Differences in Clinical and Functional Outcomes Between Osteochondral Allograft Transplantation and Autologous Chondrocyte Implantation for the Treatment of Focal Articular Cartilage Defects. *Orthop J Sports Med*. 2022;10(2):23259671211058425.
- [33] ORYAN A, ALIDADI S, MOSHIRI A, et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):18.
- [34] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [35] CHOPRA H, LIAO C, ZHANG CF, et al. Lapine periodontal ligament stem cells for musculoskeletal research in preclinical animal trials. *J Transl Med*. 2018;16(1):174.
- [36] PENG Q, DUDA M, REN G, et al. Multiplex Analysis of Adipose-Derived Stem Cell (ASC) Immunophenotype Adaption to In Vitro Expansion. *Cells*. 2021;10(2):218.
- [37] SABBAGH J, GHASSIBE-SABBAGH M, FAYYAD-KAZAN M, et al. Differences in osteogenic and odontogenic differentiation potential of DPSCs and SHED. *J Dent*. 2020;101:103413.
- [38] KOMORI T. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10):5776.
- [39] LI C, QIAN YH. Inflammation-dependent activation of NCOA2 associates with p300 and c-MYC/Max heterodimer to transactivate RUNX2-AS1 and mediate RUNX2 downstream bone differentiation genes in the pathology of septic nonunion. *Cytokine*. 2022;158:155992.
- [40] DONSANTE S, PALMISANO B, SERAFINI M, et al. From Stem Cells to Bone-Forming Cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):3989.
- [41] XUE F, ZHAO Z, GU Y, et al. 7,8-Dihydroxyflavone modulates bone formation and resorption and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis. *Elife*. 2021;10:e64872.
- [42] MA X, MENG J, JIA M, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2013;28(7):1641-1652.
- [43] LIU H, HAN X, YANG H, et al. GREM1 inhibits osteogenic differentiation, senescence and BMP transcription of adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*. 2021;62(3):325-336.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)