

补肾中药血清联合 BMP-2 对人脐血间充质干细胞增殖及形态学的影响

马勇^{1,2} 郭杨^{1*} 鲁俊山¹ 黄桂成¹ 王建伟³

1. 南京中医药大学骨伤研究所,江苏 南京 210023
2. 南京中医药大学附属医院骨伤科,江苏 南京 210029
3. 南京中医药大学无锡附属医院骨伤科,江苏 无锡 214001

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 01-0013-06

摘要: **目的** 观察补肾中药血清联合 BMP-2 对人脐血间充质干细胞 (UCB-MSCs) 增殖及形态学的影响,并探讨其最佳时效。**方法** 倒置显微镜观察原代、传代培养及干预后 UCB-MSCs 的形态学变化;取第 3 代 UCB-MSCs,随机分为 8 组,给予不同浓度补肾中药血清及 BMP-2 条件培养基培养,分别于诱导后 1 d、3 d、5 d 采用 MTT 法检测各组细胞增殖情况。**结果** 原代培养 UCB-MSCs 随时间延长,数量逐渐增多且逐渐变长,2 周时多呈长梭形、旋涡状生长,传代培养 3 d 即达到 70% ~ 80% 融合,以梭形为主,符合干细胞的生长特征;干预后第 3、5 d,5%、10% 中药 + BMP-2 组和 BMP-2 组均能够促进 UCB-MSCs 增值 ($P < 0.05$),且 5% 中药 + BMP-2 组优于 BMP-2 组 ($P = 0.041$),增殖高峰出现在干预后第 3 d;经条件培养 3 d 后,各组细胞均可见由长梭形变成立方形或多角形,尤以 5% 中药联合 BMP-2 组及 BMP-2 组较为明显。**结论** 补肾中药血清联合 BMP-2 可协同促进体外培养 UCB-MSCs 增殖,增殖效应与干预时间和中药血清浓度有一定相关性。**关键词:** 中医中药;补肾中药;BMP-2;脐血间充质干细胞;细胞增殖

Effect of the combination of kidney-tonifying Chinese herb containing serum and BMP-2 on the proliferation and morphology of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood

MA Yong^{1,2}, GUO Yang¹, LU Junshan¹, HUANG Guicheng¹, WANG Jianwei³

1. Institute of Traumatology and Orthopedics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023
2. Department of Traumatology and Orthopedics, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029
3. Department of Traumatology and Orthopedics, Wuxi Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi 214001, China

Corresponding author: GUO Yang, E-mail: guoyang12345@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of kidney-tonifying Chinese herb containing serum combined with BMP-2 on the morphology and proliferation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCB-MSCs). **Methods** The morphology change of primary, passaged, and intervened UCB-MSCs was observed using an inverted microscope. The third passage of UCB-MSCs was randomly divided into 8 groups culturing in different concentrations of kidney-tonifying Chinese herb containing serum and BMP-2. The cell proliferation was detected using MTT method at 1-, 3-, and 5-day after the intervention. **Results** The number of primary UCB-MSCs increased and the shape enlarged gradually along with the culturing time. After 2 weeks, most of the UCB-MSCs were characterized by spiral shape growth. In 3 days after passage, 70% – 80% of the cells fused in the culture, which met the growth characteristics of the stem cells. The cell proliferation in 5% and 10% combining groups and BMP-2 group increased after 3-and 5-day intervention ($P < 0.05$). The effect in 5% combining group was superior to that in BMP-2 group ($P = 0.041$). The proliferation peak appeared on the third day after the intervention. The UCB-MSCs became cubical or polygonal shape in 3 days

基金项目: 江苏省中医领军人才培养对象资助项目 (LJ200924);江苏省自然科学基金资助项目 (BK2011812)

* 通讯作者: 郭杨, E-mail: guoyang12345@126.com

after the conditioned culture, especially in 5% Chinese herb containing serum combined with BMP-2 group and BMP-2 group.

Conclusion Kidney-tonifying Chinese herb containing serum combined with BMP-2 can synergistically promote the proliferation of UCB-MSCs. The stimulation is time and concentration dependent.

Key words: Chinese medicine and Chinese herb; Kidney-tonifying Chinese herbs; BMP-2; Umbilical cord blood mesenchymal stem cells; Cell proliferation

人脐血间充质干细胞 (umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCB-MSCs) 是一类具有多向分化潜能的组织干细胞,与骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 相比,具有采集方便、低免疫原性、避免伦理学争议等优点,在骨创伤修复方面显示出广阔的应用前景^[1],其成骨分化潜能更是受到骨组织工程研究的青睐^[2]。但脐血中 MSCs 含量较少,体外增殖能力低下,获取足够数量的 UCB-MSCs,很大程度上依赖于良好的刺激条件^[3]。

近年来,许多学者根据“肾主骨生髓”理论,进行了以补肾填精壮骨为主要功效的单味中药或复方促进 MSCs 增殖及成骨分化研究,并取得了较为满意的结果,但多集中于 BMSCs^[4]。鉴于 UCB-MSCs 的生物学特点,我们根据“肾主骨生髓”、“肾藏精,精生髓”理论,筛选了以“补肾壮阳、强筋健骨”为主要功效的 14 味中药,联合骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2),观察其对体外培养 UCB-MSCs 形态学及增殖功能的影响,并探讨两者是否具有协同效应,以及影响 UCB-MSCs 生物学变化的最佳时效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:4 月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠 10 只,体重 180 ~ 220 g,由南京医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK (苏)2008-0004,饲养于南京中医药大学动物实验中心。

1.1.2 主要实验仪器与设备:细胞培养皿、培养瓶、离心管 (美国 Corning);超净工作台 (苏州净化设备仪器厂);CO₂ 恒温细胞培养箱 (德国 Heraeus);ELx800 酶标仪 (美国 BioTek 公司);倒置相差显微镜 (日本 Olympus);常温低速离心机 (德国 Heraeus 公司);可调移液器 (Eppendorf)。

1.1.3 主要试剂:低糖 DMEM 培养液、胎牛血清 (美国 Hyclone);胰蛋白酶、青链霉素混合液 (美国 Gibco);二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma);人淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物);MTT 试剂盒 (凯基生物)。

1.1.4 补肾中药:生黄芪 20 g,淫羊藿 10 g,山萸肉 10 g,骨碎补 30 g,女贞子 10 g,狗脊 10 g,制附子 9 g,蛇床子 10 g,细辛 6 g,白术 10 g,白芍 20 g,鸡血藤 15 g,鹿衔草 15 g,生甘草 9 g,上述中药为颗粒剂,由南京中医药大学附属医院中药房提供 (江阴中药厂生产)。

1.2 方法

1.2.1 补肾中药血清的制备:将上述补肾中药煎制浓缩成含生药量为 2 g/ml 的药液,根据人和动物体表面积折算法,按 250 mg/(kg·d)生药剂量给药,每日分 2 次灌胃,连续 7 d,颈动脉取血,分离血清,56 °C 水浴 30 min 灭活,分装, -20 °C 保存备用。

1.2.2 人脐血标本的采集:脐血来自南京市妇幼保健院剖宫产或顺产的足月正常分娩的产妇,采集前均征得产妇同意,并已排除传染性疾病及家族遗传疾病。

采集方法:胎儿娩出后立即在距脐轮 5 ~ 7 cm 处双结扎脐带,无菌条件下,选取脐带靠近胎盘处的脐静脉作为穿刺部位,负压抽吸脐静脉血 60 ~ 100 ml,置于含肝素抗凝剂的采血袋中,4 °C 保存。

1.2.3 脐血间充质干细胞的体外分离与培养:(1)将脐血与 Hank's 液 1:1 混匀后,小心将稀释脐血按 2:1 叠加于淋巴细胞分离液面上,勿使稀释脐血与淋巴细胞分离液混合。

(2)2000 rpm 离心 20 min,离心管中由上到下分为四层:第一层为黄色血浆层;第二层为环状乳白色淋巴细胞层;第三层为透明分离液层;第四层为红细胞层。

(3)小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞层,1500 rpm 离心 15 min, Hank's 液洗涤 2 次,每次 1000 rpm 离心 10 min,弃上清。

(4)用含 10% FBS、1% 双抗的 LG-DMEM 培养液重悬细胞,以 1×10^6 /ml 的密度接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中,5 ~ 7 d 后首次换液,以后每 3 d 换液一次。当细胞生长达到 70% ~ 80% 融合时,按照 1:2 进行传代培养。

1.2.4 实验分组:取生长状态良好的第 3 代 UCB-MSCs,用含 10% FBS 的 LG-DMEM 重悬细胞,随机

分为 8 组,每组 5 孔,24 h 后更换无血清培养液,待细胞周期同步化后,各孔分别加入 200 μ L 相应条件培养液进行培养,具体分组如下:空白对照组:加入单纯的含 10% FBS 的 LG-DMEM 全培。5% 中药组:加入含 5% 补肾中药血清、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;10% 中药组:加入含 10% 补肾中药血清、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;15% 中药组:加入含 15% 补肾中药血清、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;5% 中药 + BMP-2 组:加入含 5% 补肾中药血清、50 ng/ml BMP-2、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;10% 中药 + BMP-2 组:加入含 10% 补肾中药血清、50 ng/ml BMP-2、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;15% 中药 + BMP-2 组:加入含 15% 补肾中药血清、50 ng/ml BMP-2、10% FBS 的 LG-DMEM 全培;BMP-2 组:加入含 50 ng/ml BMP-2、10% FBS 的 LG-DMEM 全培。

1.2.5 脐血间充质干细胞的形态学观察:倒置显微镜下逐日观察原代、传代培养及分组干预后 UCB-MSCs 的生长情况及形态学变化,随机选取视野摄片,记录结果。

1.2.6 脐血间充质干细胞生长曲线的绘制:取第 3 代细胞,调整浓度至 6×10^3 /ml,接种于 24 孔板中,共 5 孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养,分别于培养后 1 ~ 11d 进行细胞计数,以培养天数为横坐标,细胞数量为纵坐标,绘制 UCB-MSCs 的生长曲线图。以原代培养的细胞作为对照。

1.2.7 MTT 比色法检测 UCB-MSCs 的增殖活性:① 细胞接种及培养:取第 3 代 UCB-MSCs,以终浓度 1×10^4 /ml、每孔 200 μ L 接种于 96 孔板,分组如上,每组 5 个复孔,细胞同步化 24 h 后弃上清,PBS 洗涤 2 次,各孔依次加入 200 μ L 条件培养液,放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

② 加入 MTT:将 5 $\times$ MTT 用 Dilution Buffer 稀释成 1 $\times$ MTT,分别于处理后第 1、3、5d,每孔加入 1 $\times$ MTT 溶液 50 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 4 h 后终止培养,每孔加入 150 μ L DMSO,平板摇床振荡 10 min。

③ 比色:酶标仪上 490nm 波长处测定各孔吸光度值(OD 值),记录实验结果。

1.2.8 统计学分析:采用 SPSS17.0 统计软件包进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 检验,不满足方差分析条件时采用 Kruskal-Wallis H 及 Mann-Whitney U 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代及传代培养 UCB-MSCs 的形态学变化

原代培养 UCB-MSCs 数量较多,培养 72 h 后仅见少量贴壁细胞,呈圆形或椭圆形(图 1a),5 d 后细胞数量逐渐增多且逐渐变长(图 1b),7 d 后可见分散的 MSCs 小集落,呈放射状生长(图 1c)。2 周时细胞多呈现长梭形,并相互融合,呈旋涡状生长(图 1d)。传代培养细胞大部分可在 24 h 内贴壁,并充分展开,生长速度加快,分裂能力优于原代培养细胞(图 2a),一般 3 d 即可达到 70% ~ 80% 融合,细胞排列紧密,形态较均一,以梭形为主(图 2b),符合干细胞的生长形态特征。

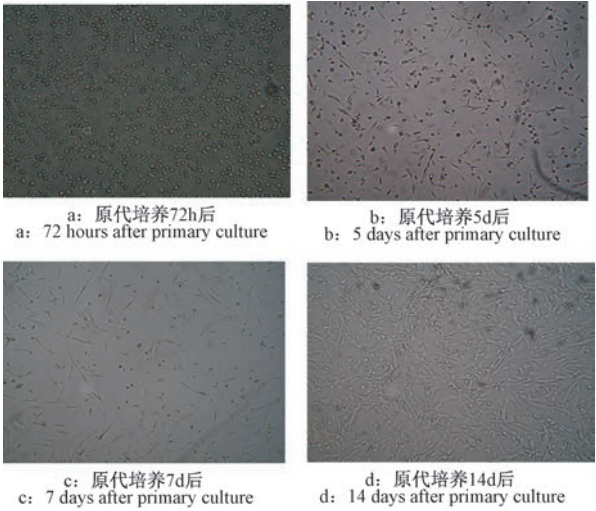


图 1 原代培养 UCB-MSCs 的形态学变化($\times 40$)

Fig. 1 Morphology of UCB-MSCs in primary cultures ($\times 40$).

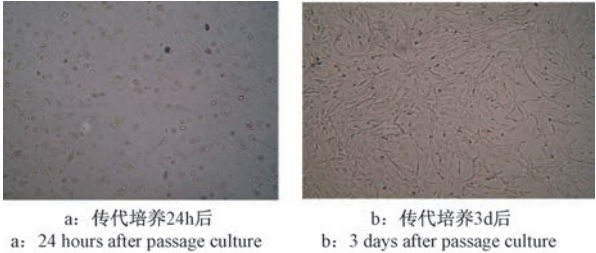


图 2 传代培养 UCB-MSCs 的形态学变化($\times 40$)

Fig. 2 Morphology of UCB-MSCs in passaged cultures ($\times 40$).

2.2 脐血间充质干细胞生长曲线分析

由图 3 可以看出,第 3 代 UCB-MSCs 在接种后 1 ~ 3 d 处于生长潜伏期,第 4 ~ 9 d 为对数生长期,随着时间的延长,细胞生长速度逐渐变慢,进入生长平

台期,其生长规律符合干细胞的生长特征。

2.3 MTT 法检测 UCB-MSCs 的增殖活性

经单因素方差分析及 LSD 检验,由表 1 可以看出,干预后第 3、5d 时,5%、10% 中药 + BMP-2 组、BMP-2 组均能促进 UCB-MSCs 增殖 ($P < 0.05$),尤以 5% 中药 + BMP-2 组、BMP-2 为佳 ($P < 0.01$),且第 5d 时,5% 中药 + BMP-2 组优于 BMP-2 组,差异有统计学意义 ($P = 0.041$),而第 3 d,两者差异无统计学意义 ($P = 0.064$)。结果提示补肾中药血清联合 BMP-2 可协同促进体外培养 UCB-MSCs 增殖,补肾中药血清最佳浓度为 5%,增殖高峰出现在干预后第 3 天(见表 1)。

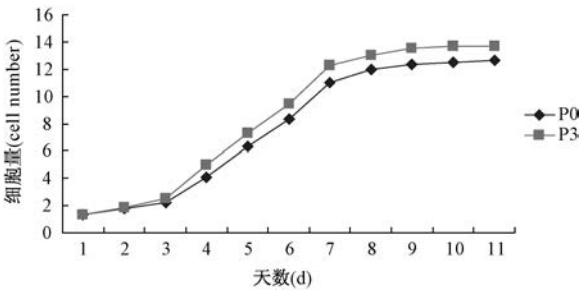


图 3 人脐血间充质干细胞的生长曲线(细胞量: $\times 10^4$)
Fig.3 Growth curve of UCB-MSCs
(cell number: $\times 10^4$).

表 1 MTT 比色法检测各组 UCB-MSCs 增殖情况

Table 1 Proliferation of UCB-MSCs in each group detected with MTT assay ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Group	OD 值 OD Value		
	1 d	3 d	5 d
空白对照组 Control group	0.190 $\pm$ 0.054	0.352 $\pm$ 0.022	0.399 $\pm$ 0.015
5% 中药组 5% Chinese herbs group	0.201 $\pm$ 0.025	0.389 $\pm$ 0.023	0.407 $\pm$ 0.032
10% 中药组 10% Chinese herbs group	0.204 $\pm$ 0.030	0.388 $\pm$ 0.030	0.411 $\pm$ 0.028
15% 中药组 15% Chinese herbs group	0.195 $\pm$ 0.014	0.375 $\pm$ 0.035	0.401 $\pm$ 0.030
5% 中药 + BMP-2 组 5% Chinese herbs combined with BMP-2 group	0.225 $\pm$ 0.040	0.444 $\pm$ 0.034 *	0.474 $\pm$ 0.018 $\blacktriangle$
10% 中药 + BMP-2 组 10% Chinese herbs combined with BMP-2 group	0.221 $\pm$ 0.027	0.401 $\pm$ 0.029 $\triangle$	0.447 $\pm$ 0.036 $\triangle$
15% 中药 + BMP-2 组 15% Chinese herbs combined with BMP-2 group	0.202 $\pm$ 0.023	0.389 $\pm$ 0.042	0.413 $\pm$ 0.012
BMP-2 组 BMP-2 group	0.214 $\pm$ 0.025	0.407 $\pm$ 0.017 *	0.437 $\pm$ 0.037 $\triangle$
统计值 Statistical value	F = 0.749 P = 0.633	F = 3.877 P = 0.004	F = 4.612 P = 0.001

注:与空白对照组相比: $\triangle P < 0.05$, * $P < 0.01$; 与 BMP-2 组相比: $\blacktriangle P < 0.05$ 。
Compared with Control group: $\triangle P < 0.05$, * $P < 0.01$; Compared with BMP-2 group: $\blacktriangle P < 0.05$.

2.4 分组干预后 UCB-MSCs 的形态学变化

UCB-MSCs 经条件培养 3d 后,各组细胞形态均可见由单一的长梭形变成立方形和多角形,随着培养时间的延长,多角形、立方形细胞数量逐渐增多,尤以 5% 补肾中药联合 BMP-2 组及 BMP-2 组较为明显(图 4c、4d),与条件培养后 UCB-MSCs 增殖检测结果相一致,形态学变化提示补肾中药血清联合 BMP-2 可诱导 UCB-MSCs 成骨分化,并具有协同效应。

3 讨论

间充质干细胞最早在骨髓中被发现,在特定的培养条件下,可定向分化为骨、软骨、脂肪、肌肉等细胞,被广泛应用于细胞替代治疗、基因治疗及组织工程学^[5]。随着研究的深入,发现获取 BMSCs 创伤大、分化潜能随年龄的增长而下降,并存在高度污染可能。一直作为胎儿分娩后废弃物的脐带以及脐血因此受到了关注。研究表明,脐血中确存在 MSCs,其特性与 BMSCs 相似,具有采集方面、低免疫原性、

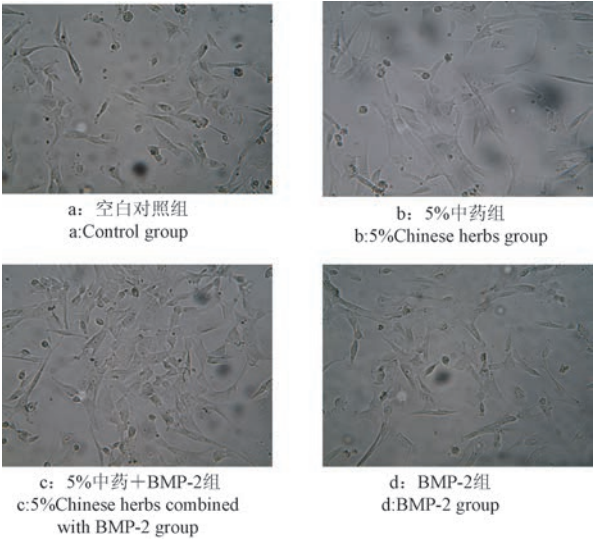


图 4 各组干预后 7 d UCB-MSCs 形态学变化(×40)

Fig. 4 Morphology of UCB-MSCs in each group 7 days after the intervention (×40).

避免伦理学争议等特点^[6-7]。与 BMSCs 相比,体外培养 UCB-MSCs 存在脐血中 MSCs 含量少、培养速度慢、培养成功率不高等困难^[8]。优化 UCB-MSCs 培养条件,寻找安全有效的刺激因子,已成为 UCB-MSCs 应用于骨组织工程的关键环节。

BMP-2 是促进骨形成和诱导成骨细胞分化最重要的细胞外信号分子之一。周明等^[9]构建携带 BMP-2 的 Tet-on 慢病毒载体,转染脐血 MSCs,可显著促进 MSCs 增殖,且成骨诱导培养 2 周后发现大量红色的钙化基质沉积。张春等^[10]发现 BMP-2 在含有 10%、15% 和 20% FBS 的培养条件下,可显著促进 BMSCs 增殖。但 BMP-2 合成困难、价格昂贵,且安全性仍不明确,限制了其在骨组织工程中的应用。

中医学认为“肾主骨生髓”,肾精是全身脏腑阴阳之本,而干细胞是构成机体各器官组织的原始细胞,二者有较多共性之处。黄晓芹等^[11]就肾精与干细胞的内在联系进行了探讨,提出肾精与干细胞在来源、作用上均具有同一性。大量学者从干细胞角度对“肾主骨生髓”理论进行了探讨,并开展了相关实验研究,结果表明补肾单味中药或复方可维持并促进干细胞数量及功能状态,诱导其定向分化^[4,12]。黄胜杰等^[12]研究提出淫羊藿、骨碎补、鹿角胶、巴戟天等补肾壮阳中药均可促进大鼠 BMSCs 增殖。程志安等^[13]提出补肾中药在 MSCs 体内存活、成骨分化等方面具有重大潜力。

目前,“肾主骨生髓”、“肾藏精”理论与干细胞相关性研究多集中在 BMSCs,鉴于 UCB-MSCs 与 BMSCs 的共性及独特优势,本研究将补肾填精法运用于 UCB-MSCs 体外扩增,筛选了生黄芪、淫羊藿、山萸肉、骨碎补、狗脊、女贞子、制附子、蛇床子、白术、白芍、鹿衔草等 14 味中药组成补肾中药复方,并联合具有促进 MSCs 增殖及定向分化确切作用的 BMP-2^[14],观察其对体外培养 UCB-MSCs 增殖及形态学改变的影响。方中淫羊藿、骨碎补、制附子、蛇床子补肾壮阳;狗脊、山萸肉、鹿衔草补肝肾,强筋骨;白芍、女贞子滋肾润燥制约补阳伤阴之虞,平调阴阳;黄芪、白术益气补肾,全方共奏补肾填精,强筋健骨之效。现代研究也表明^[12,15]淫羊藿、骨碎补、女贞子、蛇床子等中药,或单体,或含其复方,均能促进 MSCs 增殖,定向成骨分化。

实验结果表明,原代培养 72h 后 UCB-MSCs 呈现圆形或椭圆形,5d 后细胞数量逐渐增多且逐渐变长,7d 后可见分散的 MSCs 小集落,呈放射状生长,2 周时多呈现长梭形,呈旋涡状生长,传代培养 3d 即可达到 70%~80% 融合,形态较均一,以梭形为主,结合生长曲线,表明其符合干细胞的生长形态特征。MTT 结果显示补肾中药血清联合 BMP-2 可协同促进体外培养 UCB-MSCs 增殖,且补肾中药血清最佳浓度为 5%,增殖高峰出现在干预后第 3 天。同时,UCB-MSCs 经条件培养 3d 后,各组细胞形态均可见由单一的长梭形变成立方形和多角形,尤以 5% 补肾中药联合 BMP-2 组及 BMP-2 组较为明显,提示补肾中药血清联合 BMP-2 可诱导 UCB-MSCs 成骨分化,并具有协同效应。

本研究初步验证了补肾中药血清联合 BMP-2 可协同促进体外培养 UCB-MSCs 增殖,并筛选了补肾中药血清最佳效应浓度,为后续定向成骨分化研究奠定了基础。我们下一步将重点进行补肾中药血清联合 BMP-2 诱导 UCB-MSCs 定向成骨分化研究,并探讨其协同增效及具体作用机制,揭示以“肾主骨生髓”、“肾藏精”理论指导构建的补肾中药在骨组织工程中的应用价值。

【参考文献】

[1] Cabrera C, Carriquiry G, Pierinelli C, et al. The role of biologically active peptides in tissue repair using umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1270: 93-97.

[2] Mekala NK, Baadhe RR, Rao Parcha S, et al. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical

- cord blood stem cells by L-ascorbic Acid, in vitro[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(2): 156-162.
- [3] 孙国军, 赵文静, 陈曦, 等. 脐血间充质干细胞的分离培养及生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(14): 2504-2507.
- Sun Guo-jun, Zhao Wen-jing, Chen Xi, et al. Isolation, culture and biological characteristics of umbilical cord blood mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(14): 2504-2507.
- [4] 陈卫衡, 王和鸣. 温阳补肾中药促进骨髓基质细胞分化的实验研究进展[J]. 中国骨伤, 2011, 24(4): 352-356.
- Chen Wei-heng, Wang He-ming. Experimental research progress of warming yang and reinforcing kidney (温阳补肾) of Chinese medicine to promote the differentiation of bone marrow stromal cells[J]. China J Orthop Trauma, 2011, 24(4): 352-356.
- [5] Deus GC, Normanton M, Hamerschlak N, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters[J]. Einstein (Sao Paulo), 2012, 10(3): 296-301.
- [6] Li DR, Cai JH. Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(24): 4504-4510.
- [7] 何晓婷, 李怀芳. 人脐血间充质干细胞分离培养的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版) 2011, 32(1): 120-124.
- He Xiao-ting, Li Huai-fang. Research progress on isolation and culture of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Journal Tongji University (Medical Science), 2011, 32(1): 120-124.
- [8] Wang Xiao-feng, Wu Yan. Stem cells in bone tissue engineering[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 17(19): 3558-3565.
- [9] Zhou Ming, Shi Xin-yan, Tian Shao-qi, et al. Construction of inducible lentiviral vector containing human bone morphogenetic protein 2 gene and its expression in human umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2011, 25(4): 482-487.
- [10] Zhang Chun, Wei Qin, Wang Xue-mei, et al. Effect of Synthetic BMP-2 on Proliferation and Differentiation of OPG^{-/-} BMSCs in Different Serum Concentration [J]. Journal of Biomedical Engineering Research, 2012, 31(2): 107-110.
- [11] 黄晓芹, 罗再琼. 中医“肾精”与现代干细胞研究的同一性探讨[J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(2): 5-6, 9.
- Huang Xiao-qin, Luo Zai-qiong. Discussion on the identity of kidney essence of traditional chinese medicine and stem cells of modern medicine [J]. Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 35(2): 5-6, 9.
- [12] 黄胜杰, 李媚, 王和鸣. 温阳补肾药对骨髓间充质干细胞促增殖的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2012, 20(10): 1-4.
- Huang Sheng-jie, Li Mei, Wang He-ming. Proliferation-promoting Effect of Warming Kidney Yang Medicine on Bone Marrow Mesenchyma Stem Cells [J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics. 2012, 20(10): 1-4.
- [13] Cheng Zhi-an, Han Ling, Wei Jian-an, et al. Regulation Effect of Liuwei Dihuang Pill, Jinkui Shenqi Pill, Jiangu Erxian Pill Containing Serums on Adipogenic and Osteogenic Differentiation-related Genes Expressions in the Differentiation Process of Preadipocytes to Osteoblasts [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional And Western Medicine, 2013, 33(2): 261-265.
- [14] He C, He C, Mo J, et al. In vitro construction of tissue-engineered bone with bone morphogenetic protein-2-transfected rabbit bone marrow mesenchymal stem cells and hydroxyapatite nanocomposite[J]. Biomed Tech (Berl), 2013, 58(1): 97-104.
- [15] 卞琴, 刘书芬, 黄建华, 等. 3 种补肾中药有效成分对去卵巢骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞的调控作用[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 889-893.
- Bian Qin, Liu Shu-fen, Huang Jian-hua. et al. Regulation and control of three active components of TCM effective in reinforcing kidney on ovariectomy-induced osteoporosis rat's bone marrow stem cells revealed by gene microarray [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 26(5): 889-893.

(收稿日期: 2014-08-13)

作者：[马勇](#)，[郭杨](#)，[鲁俊山](#)，[黄桂成](#)，[王建伟](#)，[MA Yong](#)，[GUO Yang](#)，[LU Junshan](#)，[HUANG Guicheng](#)，[WANG Jianwei](#)

作者单位：[马勇,MA Yong\(南京中医药大学骨伤研究所, 江苏南京 210023; 南京中医药大学附属医院骨伤科, 江苏南京 210029\)](#)，[郭杨,鲁俊山,黄桂成,GUO Yang,LU Junshan,HUANG Guicheng\(南京中医药大学骨伤研究所, 江苏南京,210023\)](#)，[王建伟,WANG Jianwei\(南京中医药大学无锡附属医院骨伤科, 江苏无锡, 214001\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#)

英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：2015(1)

引用本文格式：[马勇. 郭杨. 鲁俊山. 黄桂成. 王建伟. MA Yong. GUO Yang. LU Junshan. HUANG Guicheng. WANG Jianwei](#)
[补肾中药血清联合BMP-2对人脐血间充质干细胞增殖及形态学的影响\[期刊论文\]-中国骨质疏松杂志 2015\(1\)](#)