

· 论 著 ·

骨髓间充质干细胞来源的外泌体对骨再生机制研究

何伟 陈荣春 曾芳俊 曾文丛*

赣州市人民医院, 江西 赣州 341000

中图分类号: R681.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0477-07

摘要: **目的** 本研究旨在检测骨髓间充质干细胞外泌体(BMSC-Exos)的特征,并通过体内体外实验探讨其对成骨分化的影响及对骨再生的机制。**方法** ①原代培养人骨髓间充质干细胞(BMSCs),并对其表面抗原和多系分化潜能进行鉴定;②收集BMSC的P4~P6代细胞培养的培养上清液,应用试剂盒提取BMSC-Exos;③透射电镜观察BMSC-Exos的形态结构,免疫电泳检测BMSC-Exos的表面抗原;④茜素红、ALP染色验证BMSC-Exos在体外成骨分化中的作用;⑤通过大鼠颅骨缺损动物模型验证BMSC-Exos在体内骨再生的作用;⑥通过免疫电泳和qRT-PCR检测加入BMSC-Exos后的成骨细胞中相关蛋白和基因的表达情况。**结果** ①分离培养的BMSCs形态呈多角形或长梭形,表面抗原CD90、CD29、CD44为阳性,符合间充质干细胞的特征;②BMSC-Exos呈双面凹的圆形或椭圆形,直径约40~120 nm(81.7 ± 19.9),表面抗原与BMSC一致;③经茜素红染色和ALP染色后,染色强度与Exo浓度呈正相关;④通过对大鼠颅骨缺损模型拍摄X片、组织学分析,外泌体可促进大鼠颅骨缺损的修复和新生骨的形成;⑤免疫电泳显示经外泌体处理后,BMSC中的OCN、Runx2、 β -catenin蛋白含量增加,qRT-PCR结果显示Runx2、 β -catenin的基因表达上调。**结论** BMSC-Exos有促进骨再生的能力,并与上调Wnt/ β -catenin通路有关。

关键词: 外泌体;骨髓间充质干细胞;成骨分化;骨再生

The mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes for bone regeneration

HE Wei, CHEN Rongchun, ZENG Fangjun, ZENG Wencong*

Department of Spinal surgery, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou 341000, China

* Corresponding author; ZENG Wencong, Email: 54391871@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes (BMSC-Exos) and to verify its ability to promote osteogenic differentiation through in vitro and in vivo experiments, as well as to explore its mechanism of promoting bone regeneration. **Methods** ①Primary human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured and their surface antigen and multilineage differentiation potentials were identified; ② Culture supernatants of P4-P6 generation cell culture of BMSC were collected and passed. BMSC-Exos was extracted by the kit method; ③The morphological structure of BMSC-Exos was observed by transmission electron microscope; the surface antigen of BMSC-Exos was detected by immunoelectrophoresis; ④ Alizarin red and ALP staining was used to confirm that BMSC-Exos promoted osteogenic differentiation in vitro; ⑤ The ability of BMSC-Exos to promote bone regeneration was verified in vivo through a rat skull defect animal model; ⑥ The expression of related proteins and genes in osteoblasts after adding BMSC-Exos was detected by immunoelectrophoresis and qRT-PCR. **Results** ①The isolated and cultured BMSCs were polygonal or spindle-shaped, and the surface antigens CD 90, CD 29 and CD 44 were positive, which was consistent with the characteristics of mesenchymal stem cells; ② BMSC-Exos was of a biconcave round or oval shape with a diameter of about 40–120 nm (81.7 ± 19.9), and the surface antigen was consistent with BMSC; ③ After Alizarin red staining and ALP staining, the Exo group staining intensity was significantly higher than that of the control group, and the staining intensity was positively correlated with the Exo concentration; ④X-ray and histological analysis of the rat skull defect model showed that the repair of the bone defect in the exosome group was better than that of the control group, and there were more new bone formation; ⑤Immunoelectrophoresis showed that after treatment with exosomes, the content of OCN, Runx 2 and β -catenin protein in MSC cells increased, and qRT-PCR showed that the gene expression of Runx2 and β -catenin was up-regulated. **Conclusion** BMSC-Exos has the ability to promote bone regeneration and is associated with the up-regulation of Wnt/ β -catenin pathway.

Key words: exosomes; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; bone regeneration

* 通信作者: 曾文丛, Email: 54391871@qq.com

骨再生一直是骨科领域研究的热点问题,有效的骨再生治疗依然存在巨大临床需求。随着组织工程研究的逐渐深入,间充质干细胞在组织再生中的重要性得到了越来越多的关注。骨髓来源的间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 因其获取方法方便而较为常用。BMSC 具有修复骨组织损伤的能力^[1-2]。BMSCs 的上清液同样有修复受损组织的功能,其作用可能与干细胞通过旁分泌囊泡调节靶细胞功能有关^[3-4]。外泌体 (Exosome) 作为干细胞旁分泌成分之一,在干细胞调节靶细胞功能中起到了十分重要的作用。外泌体一般直径为 40~160 nm,其内包含来源细胞内合成的 mRNA、miRNA、酶等成分^[5-8],通过出芽的方式进入细胞外基质,被靶细胞内吞后释放内部成分,完成细胞间的通讯和信息交流^[9-11]。外泌体可以有效修复受损的组织、器官^[12-15] (如心、肺、肾、脑等),说明移植外泌体可以发挥移植干细胞类似的作用。因此假设骨髓间充质干细胞来源的外泌体 (BMSC-Exos) 能表现出与 BMSC 相似的生物学功能,即促进骨再生。本研究将验证 BMSC-Exos 对骨再生的作用,初步探索其骨再生的机制,希望能为将来外泌体治疗骨再生提供理论依据,同时为临床探索骨再生问题提供新的线索和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞取自外伤病人的股骨骨髓 (经知情同意后),大鼠成骨细胞取自乳鼠 (SD 大鼠) 颅骨。DMEM/F-12 培养基、IMDM 培养基购自美国 Gibco 公司,FBS 购自美国 hyclone 公司,外泌体分离试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,用于流式细胞检测的单克隆抗体购自美国 Pharmingen 公司,成骨诱导培养基和成脂诱导培养基的各组分购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSC 培养:采集骨髓血置于 15 mL 离心管中,加入等量 PBS,1 500 r/min 离心 20 min,弃去脂肪层,重复两次。取 Ficoll 分离液 5 mL (1.077 g/mL) 加入新的离心管中,将上述稀释后的骨髓液缓慢沿着管壁加至 Ficoll 分离液上层。室温下 2 500 r/min 离心 20 min。吸取离心管中白色细胞层至另一离心管中,此层细胞包含了 BMSC、造血干细胞等,加适量 PBS 重悬并冲洗,1 500 r/min 离心 15 min,重复两次。用 DMEM/F-12 完全培养基重悬细胞沉淀,接种至 T25 培养瓶中,CO₂ 恒温培养箱培养

72 h 后第一次换液,此时 BMSC 已贴壁生长,后每 3 天换液一次。原代细胞培养 14 d 左右可传代,传代细胞培养 6 d 左右可再次传代。

1.2.2 BMSC 表面抗原和多系分化能力鉴定:①取 P4~P6 代 BMSC 细胞,通过流式细胞仪检测 BMSC 表达 CD29、CD44、CD90、CD34、CD45 的情况;②进行成脂诱导培养。在 6 孔板中接种 BMSC,加入脂肪分化诱导培养基,每 3 天更换培养液,诱导 3 周后进行油红 O 染色鉴定;③进行成骨诱导培养。在 6 孔板中接种 BMSC,加入成骨分化诱导培养基,每 3 天更换培养液,诱导 3 周后进行茜素红染色鉴定。

1.2.3 BMSC-Exos 提取与鉴定:通过 invitrogen 试剂盒提取 BMSC-Exos。BMSCs 培养至 P4~P6 代,每次为细胞换液时注意收集培养上清,暂时保存在 4 ℃ 中。吸取培养上清至高速离心管中,在 4 ℃ 以 2 000 g 离心 30 min,以去除杂质。转移上清液至新的离心管中,按照上清液:试剂=2:1 的比例加入试剂,在涡旋振荡器上充分混匀后在 4 ℃ 冰箱孵育 12 h。取出离心管,在 4 ℃ 以 10 000 g 离心 60 min,弃去上清液,小心用 PBS 重悬离心沉淀即为 BMSC-Exos 悬液,将其置于 -20 ℃ 保存。通过透射电镜 (TEM) 和免疫电泳 (Western Blot) 观察 BMSC-Exos 的形态和抗原表达。

1.2.4 体外验证 BMSC-Exos 骨分化能力:参照文献方法^[16]培养原代成骨细胞。无菌条件下取出出生 24 h 内乳鼠 (SD 大鼠) 的颅盖骨,放入盛有 PBS 溶液 (内含 1% 双抗) 的培养皿中,并刮去表面结缔组织 (如骨膜、血管)。剪碎骨片成 1 mm 大小,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶 37 ℃ 消化 20 min,PBS 冲洗后弃去上清。再用 1.0 g/L 的 II 型胶原酶消化 2 次,每次 1 h。吸取上清液加入至 DMEM 培养基 (内含 10% FBS,1% 双抗) 中,置于二氧化碳恒温培养箱培养,每 3 天换液一次。收集 P4~P5 代成骨细胞,接种至 6 孔板上,加入 DMEM 培养基。每 3 天换液一次,每次换液除了加入 2 mL DMEM 外,按照如下分组加入 BMSC-Exos 悬液:①Exo 悬液 (50 μL);②Exo 悬液 (20 μL)+PBS (30 μL);③PBS (50 μL)。以上 3 组细胞培养 12 d 后,一部分细胞行茜素红和碱性磷酸酶 (ALP) 染色,一部分细胞行分子生物学检测。

1.2.5 BMSC-Exos 对骨再生机制的探索:取上述经过 BMSC-Exos 处理 12 d 后的 3 组成骨细胞。一部分用于提取蛋白,行 Western Blot 检测。用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,获得细胞内总蛋白,通过免疫电泳检测成骨细胞中 OCN、Runx2、β-catenin 蛋白含

量,并比较组间差异。另一部分细胞用于提取 RNA,行 qRT-PCR 检测。用 RNA 提取试剂盒提取细胞内的总 RNA,通过 qRT-PCR 定量检测 Runx2 基因表达量,并比较组间差异。

1.2.6 体外验证 BMSC-Exos 促进细胞增殖能力:取 P4~P5 代成骨细胞接种于 96 孔板上,通过 CCK-8 细胞增殖实验检测 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖能力的影响。按照每天加入培养基的不同分为以下 3 组:①Exo 悬液 50 μ L + DMEM 培养基 50 μ L;②Exo 悬液 20 μ L + DMEM 培养基 80 μ L;③Exo 悬液 0 μ L + DMEM 培养基 100 μ L。每组设置 5 个复孔,每孔加入 10 μ L CCK-8 检测液后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 h,放于酶标仪上测 450 nm 处的吸光度(OD 450)。连续测定一周,绘制成骨细胞生长曲线。

1.2.7 体内验证 BMSC-Exos 修复大鼠颅骨缺损能力:取 3 月龄 SD 大鼠 16 只,实验组与对照组各 8 只。4%水合氯醛腹腔麻醉,麻醉后备皮、消毒、无菌手术,在大鼠头部正中做 2.5 cm 切口,逐层分离至颅骨正中线,分离骨膜。用磨钻于双侧顶骨各做直径 5 mm 的全层颅骨缺损,注意不可钻过深以避免伤及颅内组织。实验组在颅骨缺损处注射 100 μ L BMSC-Exos 悬液,对照组颅骨缺损处注射 100 μ L PBS 缓冲液。术毕缝合,肌肉注射青霉素预防感染,放置在动物房中统一饲养。术后 8 周,将大鼠过量麻醉致死,取出颅盖骨,清理表面软组织后,一部分标本行 micro-CT 检测,一部分标本脱钙后制作石蜡切片观察。动物实验通过了赣州市人民医院医学伦理委员会批准。

1.3 统计学方法

所有实验数据通过 3 次以上独立实验得出,以均值 $\pm$ 标准差形式表示,组间差异比较通过方差分

析和 t 检验完成, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 培养与鉴定

原代提取的 BMSC 在镜下呈长梭形或多角形,贴壁生长,细胞核大,形态均一。表面抗原高表达 CD 29、CD 44、CD 90($\times 400$ 倍)这些间充质干细胞标志物,低表达 CD 34、CD 45 等造血细胞标志物,BMSC 细胞形态见图 1。CD 29、CD 44、CD 90 的 BMSC 百分比(%)分别为: 97 ± 0.43 , 98 ± 0.22 , 98 ± 0.78 ,未见 CD 34、CD 45 表达。经过成骨诱导培养和成脂诱导培养后,茜素红染色和油红 O 染色均为阳性($\times 100$ 倍),见图 2。以上结果表明分离培养所得的 BMSC 符合间充质干细胞特征。

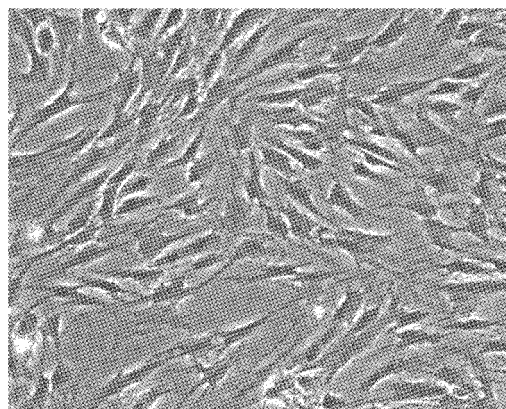


图 1 BMSC 细胞形态及表面抗原表达情况

Fig. 1 BMSC cell morphology and surface antigen expression

2.2 BMSC-Exos 鉴定

TEM 下观察外泌体呈两面凹的椭圆形或圆形,直径 40~120 nm(81.7 ± 19.9),有完整的磷脂双分

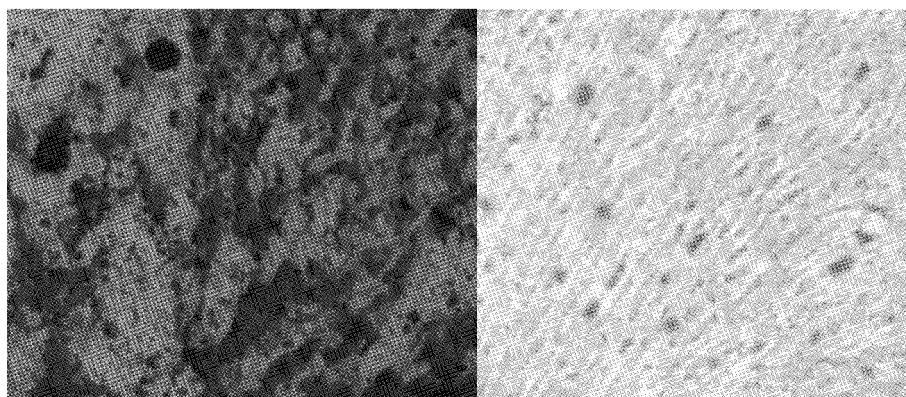


图 2 BMSC 分别经成骨诱导培养和成脂诱导培养后,茜素红染色(左)和油红 O 染色(右)均呈阳性($\times 100$ 倍)

Fig.2 BMSCs were positive for alizarin red staining (left) and oil red O staining (right) after osteogenic induction and adipogenic induction culture, respectively ($\times 100$ times)

子层膜结构。Western Blot 显示 BMSC-Exos 表达源 细胞表面蛋白 CD 69、CD 81($\times 100$)。

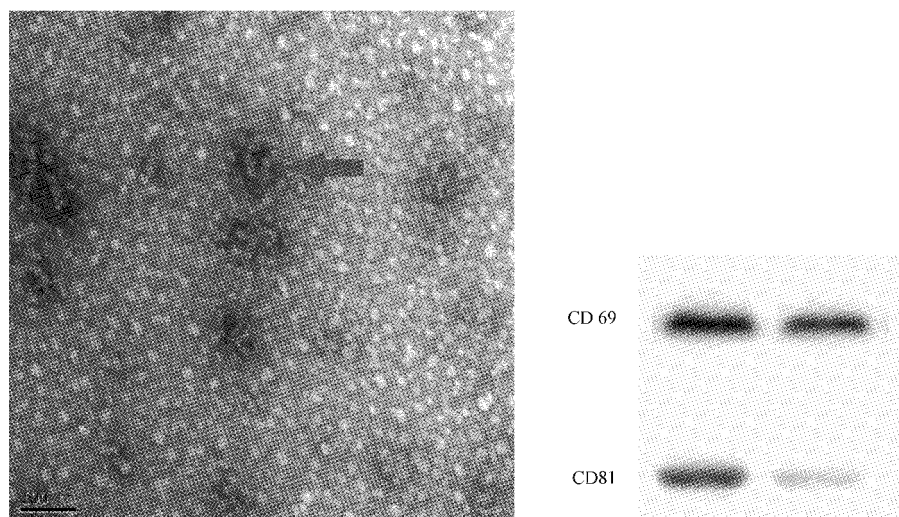


图3 TEM下BMSC-Exos形态

Fig.3 The morphology of BMSC-Exos in TEM

2.3 BMSC-Exos 体外促成骨、促细胞增殖

成骨细胞培养 12 d 后,茜素红染色和碱性磷酸酶(ALP)染色结果呈阳性。茜素红染色强度与成骨细胞内钙盐沉积量呈正相关,ALP 染色强度与成骨

细胞内 ALP 活性呈正相关。染色强度从强到弱依次为:Exos (50 μ L) 组,Exos (20 μ L) 组,PBS 对照组。表明 BMSC-Exos 的存在可以促进成骨细胞矿化过程($\times 100$ 倍)。

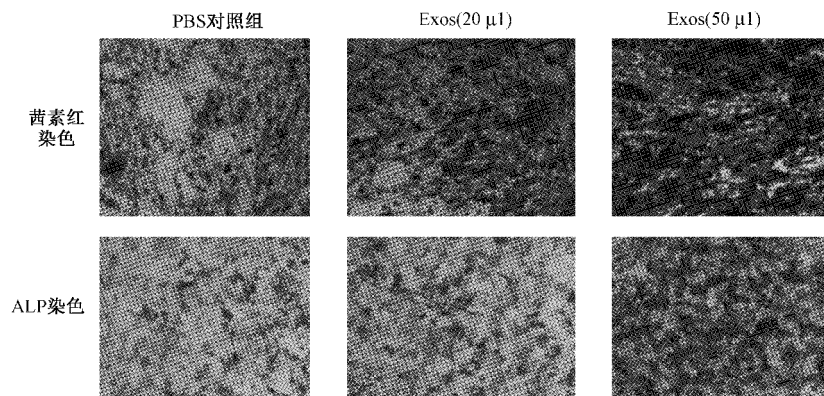


图4 茜素红和 ALP 染色结果

Fig.4 Alizarin red and ALP staining results

通过 CCK-8 细胞增殖实验,验证 BMSC-Exos 对成骨细胞的增殖影响,结果可以看出加入 BMSC-Exos 后成骨细胞增殖速度明显提高,且提高程度与加入 BMSC-Exos 的量呈正相关。结果提示 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖有促进作用。

2.4 BMSC-Exos 体内促进骨再生

对术后 8 周的标本行 Micro-CT 检测,结果如 6 图所示。加入 BMSC-Exos 的实验组(右)与空白对照组(左)相比,新生骨量更多,骨缺损修复程度更好。

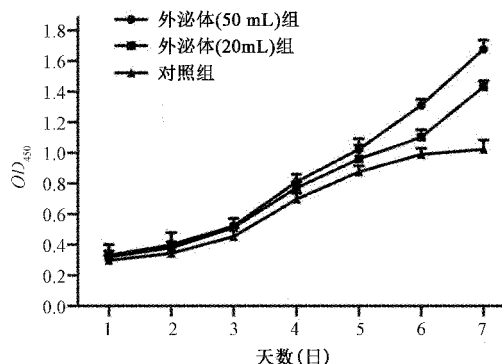


图5 CCK-8 细胞增殖实验验证 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖的影响

Fig.5 CCK-8 cell proliferation assay verified the effect of BMSC-Exos on osteoblast proliferation

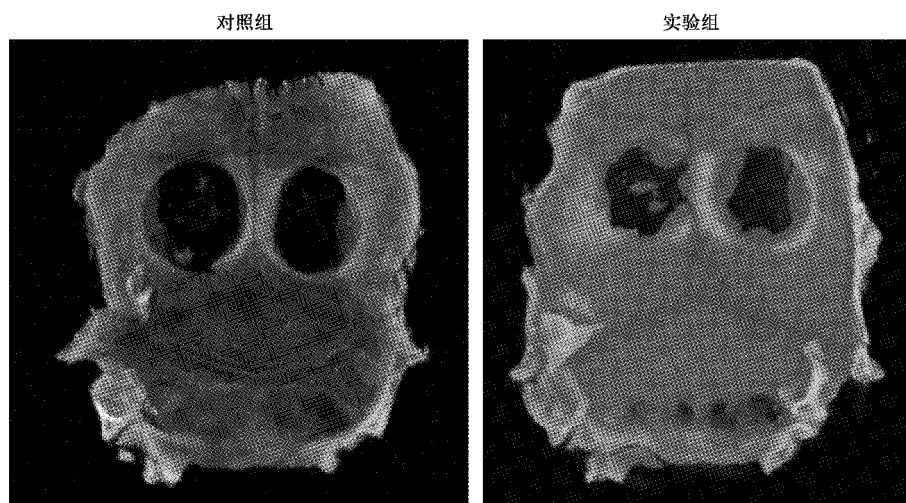


图 6 Micro-CT 检测结果

Fig.6 Micro-CT test results

对术后 8 周的颅骨标本脱钙后制作石蜡切片并行 HE 染色,结果显示,加入 BMSC-Exos 的实验组(下)与对照组(上)相比,新生骨明显增多(左×100 倍,

右×400 倍),骨缺损处成骨细胞、骨细胞更多,形成的编织骨组织更多、连接成片,有髓样组织,骨小梁样结构更多。见图 7。

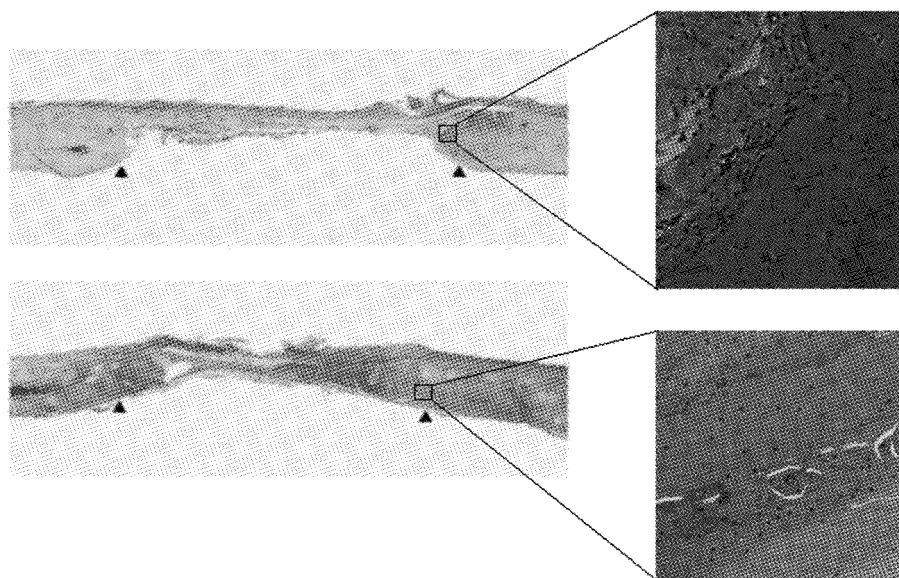


图 7 石蜡切片 HE 染色结果

Fig.7 HE staining results of paraffin sections

2.5 BMSC-Exos 促进骨再生机制

通过 Western Blot 检测成骨细胞中成骨相关蛋白 OCN、Runx2 的表达,结果显示加入 BMSC-Exos 后,成骨细胞中 OCN、Runx2 蛋白表达含量明显上升,且随着 BMSC-Exos 量的增加而增加。同时,检测了成骨过程重要调控通路 Wnt/ β -catenin 通路中的关键蛋白 β -catenin,结果显示 β -catenin 蛋白含量

也随 BMSC-Exos 量的增加而增加。表明 BMSC-Exos 促进骨再生过程可能与激活 Wnt/ β -catenin 调控通路有关。

通过 qRT-PCR 方法对 Runx2 基因表达量定量分析如图 9 所示,结果显示 BMSC-Exos 上调了 Runx2 基因的表达,进一步说明 BMSC-Exos 促进成骨的能力与上调成骨相关基因的表达有关。

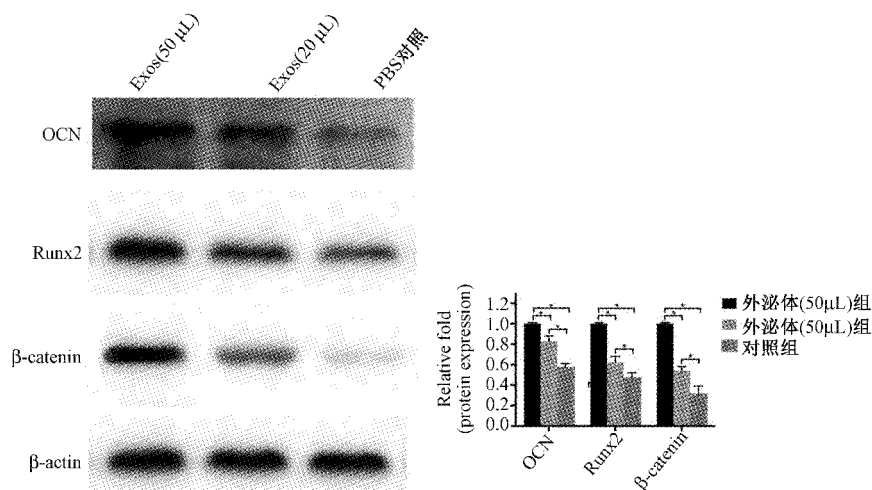


图8 Western Blot 结果

Fig.8 Western Blot results

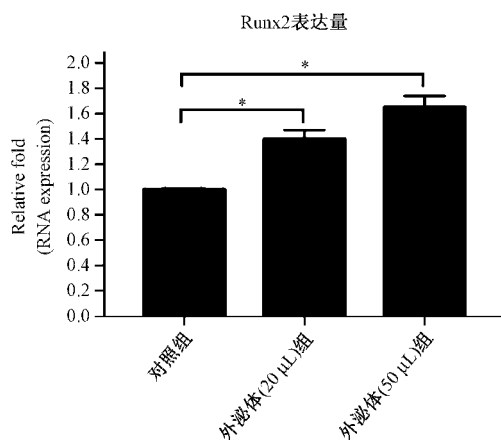


图9 qRT-PCR 结果

Fig.9 qRT-PCR results

3 讨论

间充质干细胞是一种能向多种细胞系分化同时自我更新能力强的干细胞,能在特定的条件下向多种组织细胞分化(如骨、软骨、脂肪、神经等),可在全身多种组织(如骨髓、脐带等)中分离而得,而骨髓来源的间充质干细胞因其获取方法方便而较为常用。大量研究者^[1,17]将间充质干细胞用于组织修复,无论应用于动物模型还是临床治疗都取得了很好的效果。然而,干细胞移植仍然无法避免移植效率低、致畸风险、伦理风险等诸多问题。

干细胞发挥组织修复作用与旁分泌机制密切相关,外泌体(Exosomes)作为干细胞旁分泌成分中的重要组成部分,其内含物包括核酸、蛋白质、酶等,通过内吞的方式进入靶细胞内发挥作用,可以代替干

细胞发挥组织修复能力,如修复心、肺、肾、脑等^[12-15]组织器官的损伤。同时由于外泌体的低免疫原性、无细胞活性等特点,也降低了干细胞移植的风险。

在细胞培养过程中,外泌体主要存在于细胞培养的上清液中。目前常用来富集浓缩外泌体的方法主要有超速离心法和试剂盒法,根据试剂盒厂家不同具体方法也不同。有研究^[18]比较了两种方法的差异,但业内对于两种方法的优缺点尚无统一意见。本研究采用的是试剂盒法提纯 BMSC-Exos,通过透射电镜观察可见 BMSC-Exos 呈两面凹的圆形或椭圆形,直径约 40~120 nm(81.7±19.9),表面抗原符合来源细胞表达特征,这与前人研究结果相类似。

BMSCs 在骨再生过程中发挥至关重要的作用,移植 BMSCs 可以促进骨缺损部位的骨修复。那么移植 BMSC-Exos 是否可以达到与移植 BMSC 相类似的效果呢?本研究通过体内体外实验予以了验证。首先,将 BMSC-Exos 加入成骨细胞培养基中,发现随着 BMSC-Exos 量的增多,成骨细胞的茜素红和 ALP 染色强度增加,表明成骨细胞内钙盐沉积和酶活性提高,因此 BMSC-Exos 有促进成骨作用。然后,将 BMSC-Exos 用于大鼠颅骨缺损模型,micro-CT 和组织切片显示,实验组与对照组相比新生骨量增多,BMSC-Exos 在体内也有促进骨再生作用。最后对加入 BMSC-Exos 后的成骨细胞进行了分子生物学分析,分析表明与成骨过程相关的蛋白 OCN、Runx2 均有明显升高,成骨相关基因 Runx2 表达上调。成骨过程受到复杂的信号通路的调节,Wnt/β-catenin 通路是其中一条重要的调节通路,β-catenin

是这条通路中的关键蛋白。本研究测定了成骨细胞中 β -catenin 的含量,免疫电泳显示 BMSC-Exos 处理后 β -catenin 含量升高并与 BMSC-Exos 浓度呈正相关,提示 BMSC-Exos 可能通过激活了 Wnt/ β -catenin 通路而促进成骨。具体的分子机制本研究尚未详细讨论,因此需要后续研究进一步验证。

本研究通过体内体外实验证明了移植 BMSC-Exos 同样可以发挥促进骨再生、修复骨缺损的作用。这也进一步验证了移植干细胞外泌体可以达到与移植干细胞类似的效果。外泌体具有低免疫原性、低细胞活性等特点,相比移植干细胞更安全,同时也避免了伦理等问题。基于外泌体的治疗方法对于受损组织、器官的修复具有巨大潜能,希望本研究的结果能够为外泌体的应用提供理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] 刘亚云,杨保华,陈光连. 经皮自体移植浓缩骨髓干细胞治疗骨不连的动物实验研究[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(23):7-8.
- [2] 张远成,吴立明,刘国辉,等. 自体骨髓干细胞移植在治疗骨不连中的疗效观察[J]. 临床医药实践, 2010, 16:1044-1046.
- [3] Fouraschen SM, Pan Q, de Ruiter PE, et al. Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy[J]. Stem Cells & Development, 2012, 21(13):2410-2419.
- [4] Ionescu L, Byrne RN, Van Haaften T, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice; in vivo evidence for stem cell paracrine action[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(11):L967-L977.
- [5] Im H, Shao H, Yong I P, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5):490-495.
- [6] Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles[J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(3):195-208.
- [7] Lee JK, Park SR, Jung BK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e84256.
- [8] Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression[J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(4):1542-1555.
- [9] Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles[J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(3):195-208.
- [10] Lee JK, Park SR, Jung BK, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(12):e84256.
- [11] Looze C, Yui D, Leung L, et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR γ as an exosome-associated protein [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2009, 378(3):433-438.
- [12] Yamaguchi T, Izumi Y, Nakamura Y, et al. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction [J]. International Journal of Cardiology, 2015(178):239-246.
- [13] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, et al. Exosomes Mediate the Cytoprotective Action of Mesenchymal Stromal Cells on Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension [J]. Circulation, 2012, 126(22):2601-2611.
- [14] Jiang Z, Liu Y, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2016, 7(1):24.
- [15] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes [J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(4):341-345.
- [16] Chen TL, Fry D. Hormonal regulation of the osteoblastic phenotype expression in neonatal murine calvarial cells [J]. Calcified Tissue International, 1999, 64(4):304-309.
- [17] Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting [J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 405(405):14-23.
- [18] 韩金秀, 李宏远, 撒亚莲, 等. 采用高速离心及 ExoQuick-TC 法提取小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体比较及鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4):611-614.

(收稿日期: 2018-05-15;修回日期: 2018-07-09)