

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130303

大鼠骨髓间充质干细胞的培养鉴定以及
向神经干细胞分化的实验研究蒲晓姝¹, 果磊¹, 张敏珠², 陈文海¹, 王灿¹, 汪燕¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科, 重庆 400016; 2. 重庆市急救医疗中心整形颅颌面外科, 重庆 400014)

【摘要】目的:体外培养并鉴定大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 研究其生物学特性, 初步探索酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)诱导其向神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化的可行性。**方法:**全骨髓贴壁培养法分离培养大鼠 BMSCs, 倒置相差显微镜观察其形态特征, MTT 法绘制生长曲线, 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定细胞周期并鉴定细胞表面标志物。用 80 ng/ml aFGF 的无血清 DMEM/F12 培养液诱导大鼠 BMSCs 向 NSCs 分化, 镜下观察细胞形态特征, 免疫荧光染色方法检测神经巢蛋白(Nestin)、神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)的表达。**结果:**大鼠 BMSCs 贴壁生长, 呈梭形, 多角形。第 1、3、5 代 BMSCs 的生长曲线均呈 S 形, 活性无明显差异。细胞周期显示 94.34% BMSCs 处于 G0/G1 期, 有较强的分裂增殖能力。FCM 检测 CD29、CD54、CD90 表达阳性, CD45 表达阴性。诱导 6 h 后细胞的胞体收缩成椭圆形或球形并伸出细长突起, 免疫荧光染色显示 Nestin 表达阳性, 继续诱导发现双极和多极细胞增多, 诱导 6 d 后相互连接成网状, 成典型的神经元样细胞, NSE 表达阳性。**结论:**全骨髓贴壁培养法能培养出高纯度的 BMSCs, 细胞生长稳定、增殖快、可多次传代, 具有干细胞特性。经 aFGF 诱导后具有向 NSCs 分化的潜能, NSCs 能进一步分化为神经元样细胞。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 全骨髓贴壁培养法; 诱导分化; 神经干细胞; 酸性成纤维细胞生长因子

【中国图书分类法分类号】R62

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-26

Experimental study of cultivation and identification of rat bone marrow
mesenchymal stem cells and their differentiation into neural stem cellsPU Xiaoshu¹, GUO Lei¹, ZHANG Minzhu², CHEN Wenhai¹, WANG Can¹, WANG Yan¹

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Plastic and Cranial Maxillofacial Surgery, Chongqing First-aid Medical Center)

【Abstract】Objective: To culture in vitro and identify rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), to study their biological characteristics and to tentatively explore the feasibility of differentiation of BMSCs into neural stem cells (NSCs) induced by acidic fibroblast growth factor (aFGF). **Methods:** Rat BMSCs were isolated and cultured by the whole bone marrow adherent culture method. Morphological characteristics of BMSCs were observed under the inverted phase contrast microscope and cell growth curves were drawn by MTT method. Cell cycle and surface markers were detected with flow cytometry (FCM). Rat BMSCs were induced to differentiate into NSCs by 80 ng/ml aFGF of DMEM/F12 medium. Cell morphological changes were continuously observed after using aFGF. Immunofluorescence staining was used to detect the expressions of Nestin and neuron specific enolase (NSE). **Results:** Rat BMSCs showed adherent growth and was spindle shaped or in polygonal appearance. Growth curves of the 1st, 3rd, 5th-generation BMSCs were in S shape and their activities were not significantly different. FCM showed that 94.34% BMSCs were in G0/G1 phase of the cell cycle, having strong proliferation ability. FCM detected that CD29, CD54 and CD90 were positively expressed, but CD45 was negatively expressed. At 6 h after the induction, cell bodies became to shrink into oval or sphere, and stretched out long and thin protrusions. Immunofluorescence staining showed that Nestin was positively expressed. Bipolar and multipolar cells were constantly increased after continuous induction. At 6 d after the induction, cells interconnected into a mesh and became typical neuron-like cells. NSE was positively expressed. **Conclusions:** Whole bone marrow adherent culture method can cultivate highly purified rat BMSCs with stem cells' characteristics: growing stably, proliferating rapidly and be multiple-passaged. By the induction of aFGF, BMSCs have the potentiality of differentiating into NSCs, which can further differentiate into neuron-like cells.

作者介绍: 蒲晓姝, Email: momopu134@163.com,

研究方向: 创面愈合与瘢痕防治。

通信作者: 果磊, Email: cqguolei@sina.com。

基金项目: 重庆市科委自然科学基金资助项目 (编号: 2010BB5394)。

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cells; whole bone marrow adherent culture method; induction and differentiation; neural stem cells; acidic fibroblast growth factor

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓细胞中的非造血干细胞,为成纤维样细胞,有较强的可塑性,不仅能被诱导分化为骨、软骨、脂肪等中胚层细胞,还能在特定培养条件下分化为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)、神经元等^[1-2]。BMSCs 取材方便,能在体外大量扩增,具有多向分化潜能,可自体取材,解决了免疫排斥和伦理道德问题^[3],已成为研究的热点。本实验通过分离培养并鉴定大鼠 BMSCs,研究其生物学特性,为进一步的实验研究提供稳定的细胞基础。

酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)属于神经营养因子,对中枢及周围神经均有营养作用,是神经系统发育的重要细胞因子。有文献报道创面呈酸性,使用 aFGF 能很好的适应创面环境,促进创面愈合。本实验拟用 aFGF 作为诱导剂,依据文献参考其使用剂量,初步探索其诱导 BMSCs 分化为 NSCs 的可行性,为进一步深入研究移植 NSCs 对去神经支配大鼠创面愈合的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄不拘,体质量 120~150 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养液(Hyclone 公司),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),多聚赖氨酸(PDL, Sigma 公司),aFGF、B27 (Pepro-tech 公司),兔抗大鼠单克隆抗体 CD29-PE、CD54-PE、CD90-PE、CD45-PE (BD phamingen 公司),兔抗大鼠神经巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(Santa 公司),兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)单克隆抗体(Epitomics 公司),FITC 标记山羊抗兔 IgG(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

1.3 大鼠 BMSCs 体外分离、培养与纯化

颈椎脱臼法处死大鼠,75%酒精浸泡 5~10 min。准备 2 套无菌手术器械。用第 1 套无菌分离出股骨胫骨,剔净肌肉组织,保持骨完整性,置于有 PBS 的无菌培养皿中,转移至超净工作台。用第 2 套器械处理残留组织,将骨膜尽量刮除干净,去干骺端,剪断股骨胫骨放于 DMEM/F12 培养液中(含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml 及 10% FBS)。取培养液反复冲洗骨髓腔。吹打混匀,将细胞悬液接种于培养瓶中,原代细胞标记为 P₀。于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱内培养。24 h 后全量换液,去除未贴壁细胞。每 3 d 换液 1 次,换液后倒置显微镜下观察生长情况和形态特征。待细胞融合达 80%以上时,用 0.25%胰蛋白酶消化 2~6 min,镜下观察细胞由梭形皱缩成

圆形,细胞之间彼此分散时,细胞消化适度,终止消化后,800 r/min 离心 5 min,去上清,用含 15% FBS 的培养液重悬细胞,按 1:2 比例传代培养,此为第 1 代细胞,标记为 P₁,以此类推。

1.4 MTT 法绘制生长曲线

选取 P₁、P₃、P₅ 代大鼠 BMSCs 用 0.25%胰蛋白酶消化,计数,以 1.0×10^4 个/ml 接种于 7 块 96 孔板内,每孔 200 μ l 细胞悬液。每 24 h 取各代细胞各 5 孔,连续检测 7 d。测定前每孔加 MTT 溶液 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,轻轻吸尽上清液,每孔加入 150 μ l DMSO,室温震荡 10 min,送入酶标仪检测,选择波长为 492 nm。以培养时间(d)为横坐标,吸光度值(A_{492 nm})为纵坐标,绘制生长曲线。

1.5 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞周期

取 P₃ 代大鼠 BMSCs:采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)荧光染色法。胰蛋白酶消化,计数,细胞密度为 1.0×10^6 个/ml,4 $^{\circ}$ C 预冷的 70%乙醇隔夜固定,预冷 PBS 漂洗离心,37 $^{\circ}$ C 的 RNase 处理 30 min,离心,加入 0.5 ml 的 PI,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,FCM 检测细胞周期。

1.6 FCM 鉴定大鼠 BMSCs

取 P₃ 代大鼠 BMSCs, PBS 洗涤 3 次,消化,计数,细胞密度为 1.0×10^6 个/ml,分别装入 1.5 ml EP 管内。分别加入 CD29-PE、CD45-PE、CD54-PE、CD90-PE 兔抗大鼠单克隆抗体。设立同型阴性对照。37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, PBS 冲洗 2 遍, FCM 检测。

1.7 体外诱导大鼠 BMSCs 分化

取 P₃ 代大鼠 BMSCs,以 5.0×10^5 个/ml 接种于 24 孔板内,板内放有用 PDL 包被过的盖玻片以制备细胞爬片。接种 24 h 后换用 5 ng/ml aFGF 的 DMEM/F12 培养液(青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml 及 20% FBS)预诱导 24 h, PBS 洗涤 3 次,再换用 80 ng/ml aFGF 的无血清 DMEM/F12 培养液(2% B27)诱导,24 h 后换为 80 ng/ml aFGF+5% FBS 继续培养。倒置相差显微镜下观察诱导前后细胞的形态变化。

1.8 免疫荧光染色鉴定诱导前后细胞

对诱导前和诱导 6 h、6 d 的细胞用免疫荧光染色方法检测 Nestin、NSE 的表达。4%的多聚甲醛室温固定细胞爬片 30 min,5%的封闭血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min,滴加兔抗大鼠的 Nestin、NSE 单克隆抗体(1:100),每张爬片 100 μ l,4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加荧光二抗,避光孵育 30 min,50%甘油封片,每步操作前均要用 PBS 洗 2~3 遍,5 min/次,但是血清封闭后不洗,直接加一抗。激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代及传代细胞:细胞接种时镜下呈透亮圆形细胞,单个悬浮于培养液中。24 h 后可见部分细胞贴壁生长,呈圆形、短梭形。2~3 d 贴壁细胞逐渐增加,形成大小不同的细胞集落。4~5 d 细胞集落数量增加,其中部分细胞体积增大,向四

周扩散,呈长梭形或多角形。6~7 d 集落中细胞数量增加,呈放射状生长,集落之间互相融合。8~10 d 细胞融合成单层,逐渐铺满瓶底,呈漩涡状。传代细胞增殖迅速,2~4 h 开始贴壁,24 h 完全贴壁生长,3~5 d 可达 80%以上融合。

诱导分化前后细胞:诱导前细胞扁平,胞体较大,细胞质丰富。诱导 6 h 后细胞的胞体向细胞核收缩,细胞呈双极或多极状,胞体缩小,细胞质较少,折光性强。诱导 6 d 后细胞可见较多的细长突起,细胞间的突起相互连接,交织成网,变为典型的神经元样细胞形态(图 1)。

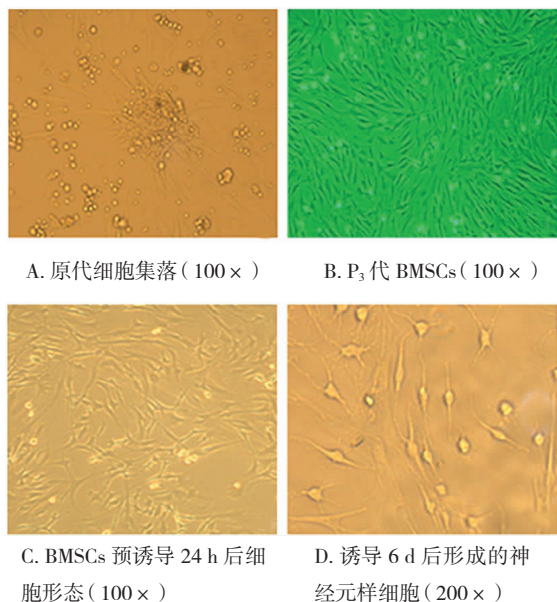


图 1 大鼠 BMSCs 诱导前后的形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of rat BMSCs before and after induction

2.2 大鼠 BMSCs 的生长曲线

P_1 、 P_3 、 P_5 代细胞生长曲线均呈现 S 型,生长特征基本一致,潜伏期为 1~2 d,2 d 后进入对数增殖期,第 4~6 天可以到达 80%以上融合,此后进入平台期(图 2)。

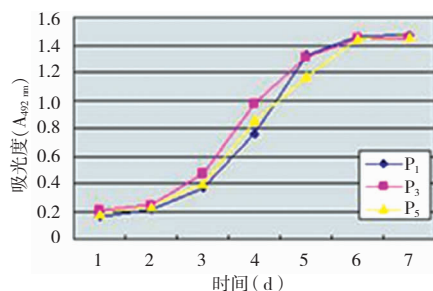


图 2 P_1 、 P_3 、 P_5 代大鼠 BMSCs 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of BMSCs of the P_1 , P_3 and P_5 rats

2.3 大鼠 BMSCs 的细胞周期

FCM 分析结果显示:BMSCs 有 94.34%处于 G0/G1 期,1.72%处于 G2/M 期,3.95%处于 S 期。表明 BMSCs 有较强的分裂增殖潜能,符合干细胞特征(图 3)。

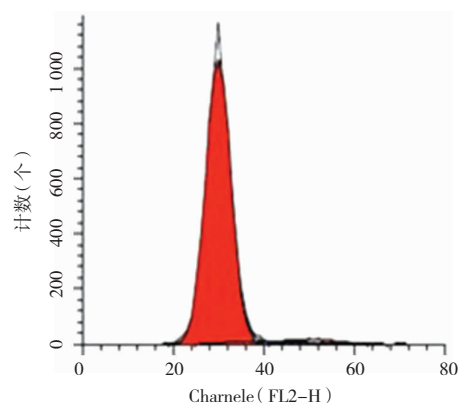


图 3 P_3 代大鼠 BMSCs 的细胞周期

Fig.3 Cell cycle of BMSCs of the P_3 rats

2.4 大鼠 BMSCs 的鉴定

FCM 检测 BMSCs 表面标志物结果显示:CD29、D54、CD90 表达阳性,阳性率分别为 99.90%、99.93%、99.86%,CD45 表达阴性,其阳性率为 3.19%(图 4)。

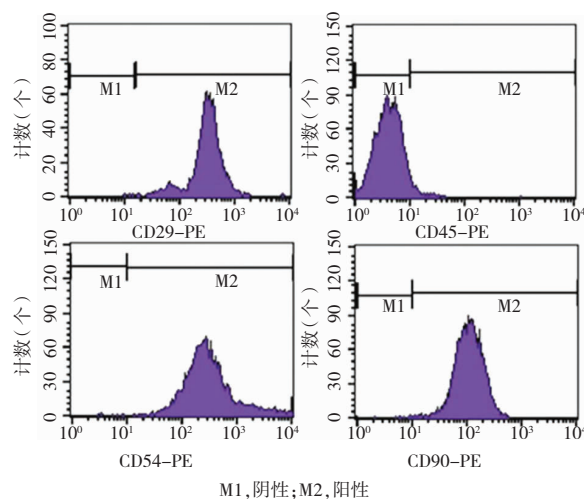


图 4 P_3 代大鼠 BMSCs 表面标志物的表达

Fig.4 Expressions of BMSCs surface markers of the P_3 rats

2.5 免疫荧光染色鉴定诱导前后的细胞

免疫荧光检测诱导前和诱导后 6 h、6 d 细胞 Nestin、NSE 的表达。结果显示诱导前 Nestin、NSE 几乎无表达,aFGF 诱导 6 h 后 Nestin 表达阳性,诱导 6 d 后 NSE 表达阳性(图 5)。

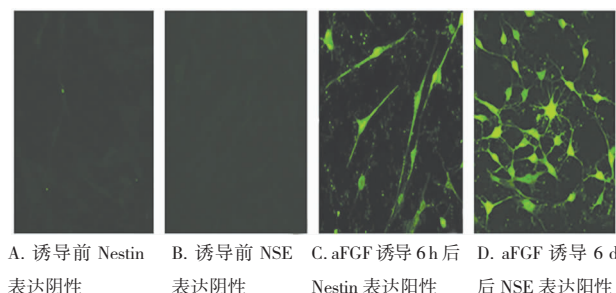


图 5 免疫荧光染色检测 Nestin、NSE 的表达 (400 ×)

Fig.5 Expressions of Nestin and NSE detected by immunofluorescence staining (400 ×)

3 讨 论

虽然目前已经能从多种组织(肝脏、脐带血和羊水等)中分离培养间充质干细胞,但细胞的获得和研究主要集中在骨髓^[4]。由于 BMSCs 的数量非常少,骨髓中每 1.0×10^4 个核细胞中仅有 2~5 个 BMSCs,因此需要体外分离纯化和大量增殖^[5]。体外培养 BMSCs 的方法主要有全骨髓贴壁培养法、密度梯度离心法、FCM 分选法和免疫磁珠分选法等^[6-8],各有优缺点。本实验采用全骨髓贴壁培养法,此方法简单易行,避免了分选和反复离心造成的细胞损伤和丢失,保存了 BMSCs 生长所需的微环境,因此能保持旺盛的增殖能力^[9]。BMSCs 经过换液和传代,细胞逐渐得到纯化,为后续诱导分化实验提供良好的细胞来源。

BMSCs 体外培养受血清浓度等因素的影响较大。本实验原代培养用 10% FBS,传代后改用 15% FBS,是因为全骨髓贴壁培养法保存了 BMSCs 生长所需的微环境,全骨髓中含有滋养细胞和某些细胞因子,有助于细胞的存活和功能维持,传代后 BMSCs 的数量剧增而骨髓中的营养成分随着换液被去除,因此适当增加血清浓度有助于 BMSCs 体外扩增,而过高的血清浓度会加速细胞衰老。本实验用 15% FBS 可以满足传代细胞迅速增长并且保持良好的细胞形态。

目前 BMSCs 的鉴定还没有统一标准,主要通过观察细胞形态学特征、分析细胞增殖能力、检测细胞表面标志物、鉴定多向分化潜能等方法予以鉴定。实验中观察到 BMSCs 体积大,呈梭形、三角形、多角形,贴壁牢,不易消化,传代细胞增殖迅速,培养 3~5 d 可再次传代,多次传代后以均匀有序排列的梭形细胞为主,与许永涛等^[10]的研究结果相符合。FCM 检测 P₃ 代大鼠 BMSCs 有 94.34% 处于 G0/G1 期,表明 BMSCs 有较强的分裂增殖能力,符合干细胞特征。FCM 检测 P₃ 代大鼠 BMSCs 表面标志物 CD29、CD54、CD90、CD45^[11],结果 CD29、CD54、CD90 表达阳性,阳性率分别为 99.90%、99.93%、99.86%,CD45 表达阴性,其阳性率为 3.19%,提示经 3 代以上的传代后可获得高纯度的大鼠 BMSCs。

早在 1998 年 Satomura 等^[12]就利用 DNA 测序方法检测出 BMSCs 表面存在成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)受体,当 FGF 单独或

联合其他生长因子作用于 BMSCs 时可以促使其向神经细胞分化。Chen 等^[13]通过使用无血清神经诱导方法发现 aFGF 呈剂量依赖性地促进小鼠胚胎干细胞分化为 NSCs,他认为 aFGF 以 20、40、80 ng/ml 能成功培养出 NSCs,并且 NSCs 的生成率存在浓度依赖性。故本实验选用 80 ng/ml aFGF 诱导 BMSCs 分化,初步探索 aFGF 诱导 BMSCs 向 NSCs 分化的可行性,同时鉴定 BMSCs 的分化潜能,结果显示诱导 6 h 后细胞胞体收缩,折光性强,细胞呈两极或多极状,诱导 6 d 后细胞间的突起相互连接,交织成网,变为典型的神经元样细胞形态,与 Chen 等^[13]的研究基本符合。免疫荧光染色显示 Nestin、NSE 表达阳性,说明 aFGF 成功诱导 BMSCs 向 NSCs 分化,并能进一步分化为神经元样细胞,表明分化而来的 NSCs 具有分化的潜能^[14]。aFGF 作为新的神经诱导物质,具有神经营养作用,促神经细胞分裂作用以及神经保护作用,目前还没有查阅到相关文献报道运用 aFGF 诱导 BMSCs 分化为 NSCs 的研究。aFGF 是一种呈酸性的小分子蛋白,相比其他诱导物更适应在酸性环境下发挥作用,创面的微环境呈酸性,移植由 aFGF 诱导而来的 NSCs 入创面避免了因酸碱度变化对细胞造成的伤害。

本实验已成功培养出高纯度的大鼠 BMSCs,并使用 aFGF 成功诱导大鼠 BMSCs 向 NSCs 分化。aFGF 作为新的神经诱导物质,需要继续对比研究其与源性较高的碱性成纤维细胞生长因子在诱导分化中的作用及优势,并为进一步深入研究移植 NSCs 对去神经支配大鼠创面愈合的影响奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1797-1800.
- [2] Brohlin M, Mahay D, Novikov L N, et al. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells[J]. Neurosci Res, 2009, 64(1): 41-49.
- [3] 汪浩文, 何志旭, 王志华, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞多向分化潜能的研究[J]. 复旦学报(医学版), 2009, 36(5): 528-532.
Wang H W, He Z X, Wang Z H, et al. Multilineage differentiation potential of marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of Fudan University (Medical Sciences), 2009, 36(5): 528-532.
- [4] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725.

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130304

不同浓度七氟醚对老年大鼠认知功能的影响

左 蕾, 李琪英, 刘丹彦

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察不同浓度七氟醚麻醉对老年大鼠认知功能的影响。**方法:**将 80 只老年 SD 大鼠, 采用数字表法随机分为 5 组, 每组各 16 只。分别吸入 0%(C)、1%(S₁)、2%(S₂)、3%(S₃)、4%(S₄)七氟醚 6 h。用 Morris 水迷宫检测大鼠的认知功能, 同时检测 β -淀粉样物质前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)、 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β) 以及人 BACE-1 (beta-site APP-cleaving enzyme-1) 的表达。**结果:**(1) Morris 水迷宫进行定位航行实验和空间探索实验表明, S₃、S₄ 组的老年大鼠学习记忆与 C 组相比, 潜伏期延长, 穿越平台象限的次数减少 ($F=14.215, P<0.05$); 而 S₁、S₂ 组潜伏期及平台穿越次数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(2) 大鼠海马内的 APP、A β 表达都随着吸入浓度的增加而增加 ($P<0.05$)。(3) 大鼠海马中 BACE-1 的表达与 C 组相比, S₃、S₄ 组的表达显著增高 ($F=14.215, P<0.05$)。**结论:**七氟醚对老年大鼠术后认知功能的影响具有剂量依赖性, 而高浓度七氟醚可能通过诱导 APP、A β 生成从而引起 BACE-1 表达上调而发挥作用。

【关键词】七氟醚; 认知功能; Morris 水迷宫; β 淀粉样蛋白; BACE-1

【中国图书分类法分类号】R971.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-18

作者介绍: 左 蕾, Email: machiatto0@qq.com,

研究方向: 认知功能障碍与麻醉。

通信作者: 李琪英, Email: Alny68@163.com。

基金项目: 重庆市卫生局科学技术研究资助项目 (编号: 20102076)。

Li X F, Zhao J M, Su W, et al. Culture and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(10): 1721-1725.

[5] Friedenstein A J. Precursor cells of mechanocytes[J]. Int Rev Cytol, 1976, 47: 327-359.

[6] Neuhuber B, Swanger S A, Houard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics[J]. Exp Hematol, 2008, 36(9): 1176-1185.

[7] Kode J A, Mukherjee S, Joglekar M V, et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration[J]. Cytotherapy, 2009, 11(4): 377-391.

[8] Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow[J]. Exp Med, 2009, 206(11): 2483-2496.

[9] 叶小凤, 何援利, 王雪峰, 等. 全骨髓法体外培养分离大鼠骨髓间充质干细胞及 PKH26 标记[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1711-1714.

Ye X F, He Y L, Wang X F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by whole bone marrow adherent culture in vitro and PKH26 labeling[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(10): 1711-1714.

[10] 许永涛, 李 锋, 鲁厚庚. 大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖与多

向分化的能力[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23): 4195-4198.

Xu Y T, Li F, Lu H G. In vitro proliferation and multi-directional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(23): 4195-4198.

[11] 陈晓云, 刘阳生, 汪维伟. 大鼠骨髓间充质干细胞体外分离培养及成骨成脂诱导[J]. 咸宁学院学报, 2011, 25(3): 185-188.

Chen X Y, Liu Y S, Wang W W. Isolation, cultivation and differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into adipocytes and osteoblasts in vitro[J]. Journal of Xianning University (Medical Sciences), 2011, 25(3): 185-188.

[12] Satomura K, Derubeis A R, Fedarko N S, et al. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells[J]. Cell Physiol, 1998, 177(3): 426-438.

[13] Chen C W, Liu C S, Chiu I M, et al. The signals of FGFs on the neurogenesis of embryonic stem cells[J]. Biomed Sci, 2010, 17: 33.

[14] Yun S J, Byun K, Bhin J, et al. Transcriptional regulatory networks associated with self-renewal and differentiation of neural stem cells[J]. Cell Physiol, 2010, 225(2): 337-347.

(责任编辑: 冉明会)