

# 鹅骨胶原蛋白及肽对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及向成骨分化的影响

蒋金利<sup>1</sup>, 潘道东<sup>1,2</sup>, 孙杨赢<sup>1</sup>, 曹锦轩<sup>1</sup>, 曾小群<sup>1</sup>

(1 浙江省动物蛋白精深加工技术重点实验室, 宁波大学, 浙江宁波 315211)

(2 南京师范大学食品科学与营养系, 江苏南京 210097)

**摘要:** 本实验通过研究鹅骨胶原蛋白、含钙胶原蛋白、胶原肽、含钙胶原肽对大鼠骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 增殖及向成骨细胞 (Osteoblast, OB) 分化的影响, 阐述鹅骨胶原蛋白及多肽对骨质疏松的作用机制。采用 MTT (噻唑蓝) 法测定鹅骨胶原蛋白及多肽对 BMSCs 增殖的影响; 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 染色、ALP 活性测定、茜素红染色和骨钙素 (BGP) 分泌量测定分析 BMSCs 成骨分化能力。结果表明, 相较于对照组, 试验组可促进 BMSCs 的增殖, 第 14d ALP 染色试验组 ALP 染色阳性率显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 第 7 d 和第 14 d 鹅骨胶原蛋白及肽可显著提高 ALP 的活性表达 ( $p < 0.05$ ), 第 21 d 茜素红染色试验组钙结节个数相较于对照组显著增加 ( $p < 0.05$ ), 骨钙素分泌量试验组显著高于对照组 ( $p < 0.05$ )。由此表明, 大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽均可促进 BMSCs 的增殖及向成骨细胞分化, 以含钙小分子胶原多肽作用效果最佳。

**关键词:** 鹅骨胶原蛋白; 鹅骨胶原多肽; 骨髓间充质干细胞; 增殖和分化

文章编号: 1673-9078(2015)7-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.001

## Effects of Goose Bone Collagen and Peptides on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation into Osteoblasts

JIANG Jin-li<sup>1</sup>, PAN Dao-dong<sup>1,2</sup>, SUN Yang-ying<sup>1</sup>, CAO Jin-xuan<sup>1</sup>, ZENG Xiao-qun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Protein Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China) (2. Department of Food Science & Nutrition, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** The effects of collagen, collagen containing calcium, collagen peptides, and collagen peptides containing calcium extracted from goose bones on the proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and their differentiation into osteoblasts (OBs) were studied, and the mechanism by which collagen and peptides influence osteoporosis was described. The effects of goose bone collagen and peptides on BMSC proliferation were determined by an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay. The osteogenic differentiation capacity of BMSCs was measured by alkaline phosphatase (ALP) staining, ALP activity, Alizarin Red staining, and osteocalcin secretion. The experimental groups exhibited greater proliferation of BMSCs than the control group. The positive ALP staining rate of the experimental group on day 14 was significantly higher than that of the control group ( $p < 0.05$ ); ALP activity levels of the experimental group on days 7 and 14 were significantly higher than that of the control group ( $p < 0.05$ ). On day 21, the number of calcified nodules of the experimental groups, detected by Alizarin Red staining, was significantly high than that of the control group ( $p < 0.05$ ). The osteocalcin secretion of experimental groups was significantly higher than that of the control group. These results indicated that macromolecular collagen, macromolecular collagen containing calcium, small collagen peptides, and small collagen peptides containing calcium promote BMSC proliferation and the differentiation of BMSCs into OBs, and the small collagen peptides containing calcium displayed the strongest effect.

**Key words:** goose bone collagen; goose bone collagen peptides; bone marrow mesenchymal stem cells; proliferation; differentiation

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LQ14C200002); 国家农业科技成果转化资金 (2013GB2C200191); 宁波市科技创新基金 (2013C910017)

作者简介: 蒋金利 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 潘道东教授

骨质疏松症是单位体积内骨量减少, 骨的微观结构受到破坏, 从而导致骨脆性增加甚至骨折的一类骨代谢疾病。I 型胶原蛋白和胶原多肽在骨有机质中起支撑作用, 对骨细胞成熟和矿化具有关键作用, 研究证实摄食胶原蛋白和胶原蛋白多肽可提高骨骼强度,

促进矿物质吸收,对骨质疏松有有效防治作用<sup>[1~2]</sup>。钙与胶原结合的产品可更好的防治骨质疏松<sup>[3]</sup>。

骨代谢异常是导致骨质疏松的要素之一,骨重建是骨形成与骨吸收的动态过程,成骨细胞和破骨细胞参与骨重建<sup>[4~5]</sup>。骨髓间充质干细胞(BMSCs)贴壁容易,易于培养,可塑性强,可自我更新,不同条件下可向多种细胞分化,如OB、神经细胞、软骨细胞、脂肪细胞、皮肤细胞等,是骨组织工程中有颇具研究价值与应用价值的种子细胞,在骨质疏松的预防和治理方面具有广阔的应用前景<sup>[6~9]</sup>。随着年龄的增长,BMSCs的增殖能力减弱,向成骨分化能力降低,成骨细胞与破骨细胞之间的动态平衡被打破,使得骨质丢失的速度加快、单位体积骨量减少、骨强度降低,骨脆性增加,从而导致骨质疏松症<sup>[10~11]</sup>。所以,筛选能提高BMSCs的细胞增殖能力,促进其向成骨细胞分化能力增强的药物将成为研制治疗骨质疏松药物的新方向。研究证实,从畜骨中提取的胶原多肽对骨质疏松有一定的预防和治疗作用。猪骨胶原多肽能有效改善骨质疏松大鼠骨微观结构,猪骨胶原含钙磷多肽可明显改善骨质疏松大鼠症状,并且多肽中分子量最低的成分对成骨细胞的增殖作用最明显<sup>[12]</sup>,但至今还没有有关鹅骨胶原蛋白及胶原蛋白多肽对骨质疏松作用的研究报导。

本实验通过观察鹅骨大分子胶原蛋白、大分子含钙胶原蛋白、小分子胶原蛋白多肽、小分子含钙胶原蛋白多肽对于促进大鼠BMSCs的增殖及向成骨细胞分化过程中ALP活性的表达、钙结节等的变化,研究不同类型的胶原蛋白在促进大鼠BMSCs向成骨细胞分化过程中所起的作用,为应用胶原蛋白治疗骨质疏松提供新的实验依据,并取得治疗骨质疏松的最佳胶原蛋白类型,同时也为鹅骨的综合利用开辟新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

DMEM-F12培养基(Hyclone),BMSCs,茜素红(广州赛业);胎牛血清,0.25%胰酶-EDTA(Gibco);青霉素-链霉素,PBS,BCA蛋白浓度测定试剂盒,MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒,TritonX-100(南京碧云天);4%甲醛(宜兴市第二化学试剂厂);鹅骨大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽(均实验室自制,从鹅骨中提取,大分子的分子量>250ku,小分子的分子量<30ku);碱性磷酸酶染色试剂盒,碱性磷酸酶测试盒(微板法)(南京建成)大鼠骨钙素(BGP)ELISA

试剂盒(上海桥杜)。

### 1.2 仪器与设备

CO<sub>2</sub>培养箱 SANYO; 倒置相差显微镜 Olympus; 酶标仪 TECAN; 超净工作台苏州净化设备有限公司; 微孔滤膜 MILLEX.GP。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 大鼠 BMSCs 的传代培养及诱导

将大鼠 BMSCs 以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于培养板中,以每毫升分别添加 0.1 毫克大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原蛋白多肽、含钙小分子胶原蛋白多肽的培养基(DMEM-F12+10%的胎牛血清(FBS)+1%的双抗)为试验组 A 组、B 组、C 组、D 组,以 DMEM-F12 (10% FBS+1%双抗)作为对照组。在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养,三天换液一次,待细胞生长到 80%~90% 融合时, PBS 洗 2~3 遍, 0.25%胰酶-EDTA 消化 1~2 min, 显微镜下观察,当细胞间隙变大,接近圆形时,加入完全培养基终止消化,用吸管吹打成单细胞悬液,移入离心管, 20 °C, 250 g。离心 5 min。弃上清,按 1:2 的比例接进行传代培养。

#### 1.3.2 BMSCs 成骨分化相关指标的检测

##### 1.3.2.1 MTT 法检测细胞增殖绘制细胞生长曲线

取 P3 代生长良好的 SD 大鼠 BMSCs, 融合达到 80% 时候, 0.25%胰酶-EDTA 消化, 20 °C, 250 g。离心 5 min, 重悬细胞, 计数, 调整细胞密度, 以约  $2 \times 10^4$  个/mL 细胞接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L。每个样本重复 4 次, 另取平行 4 孔作为空白对照组, 不加细胞悬液, 其他步骤一样, 放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养, 待 24 h 后细胞完全贴壁时, 分别加入对照组培养液和试验组培养液 A、B、C、D 进行培养, 于第 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 各测一板。用 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒测定细胞活性, 以时间为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

##### 1.3.2.2 钙钴法碱性磷酸酶染色

选择 P3 代 SD 大鼠 BMSCs, 按  $1 \times 10^5$  cells/mL 密度接种于 6 孔细胞培养板, 3 d 更换培养液一次, 待细胞贴壁达 70%~80% 融合时, 弃原培养基, 分别加入对照组培养液和试验组培养液 A、B、C、D。培养 14 d 后, 按照碱性磷酸酶染色试剂盒对 5 组细胞进行碱性磷酸酶染色。在 100 $\times$ 倒置相差显微镜下拍照观察, 分别于上下左右中 5 个方位随机取 5 个非重叠视野, 每个视野随机取 100 个细胞计数 ALP 阳性细胞, 以分组为横坐标, ALP 染色阳性率为纵坐标绘图。

### 1.3.2.3 ALP 活性检测

取生长良好 P3 代 SD 大鼠 BMSCs, 消化后制成单细胞悬液调整浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 每组 4 个复孔, 24 h 后分别添加对照组培养液和试验组培养液, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度孵箱内孵育, 于第 7 d 和第 14 d 分别测定对照组和试验

$$\text{培养细胞中的AKP活力} = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{酚标准品浓度} (0.02\text{mg/mL}) \div \text{待测样本蛋白浓度} (\text{gprot/mL})$$

(金氏单位/gprot)

### 1.3.2.4 茜素红染色及钙结节的计数

取生长良好的 P3 代 BMSCs, 以每孔  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞接种于 6 孔板, 用完全培养基培养细胞达到 80% 融合后, 更换培养液, 分别加入对照组培养液和试验组 A、B、C、D 培养液, 每 3 d 换液, 连续培养 21 d 后进行茜素红染色液染色鉴定。吸去各孔培养液, 用 1×PBS 冲洗。2 mL 4% 甲醛溶液固定 30 min。再用 1×PBS 冲洗孔两次, 用 1 mL 的茜素红溶液染色 3~5 min。1×PBS 冲洗孔 2~3 次, 然后放在倒置相差显微镜下观察照相。低倍镜 (40×) 下, 每孔随机取 5 个视野, 进行矿化结节计数。

### 1.3.2.5 骨钙素检测

将 BMSCs 以  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种于 6 孔板, 分别用对照组和试验组培养液培养, 3 d 换液一次, 分别在第 3、6、9、12、14 d 收集细胞培养上清液, 250 g 离心 15 min, 取上清, 用酶联免疫法 (ELISA) 检测骨钙素分泌。

### 1.3.3 统计学处理

数据结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 最终处理结果用 origin 7.5 作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞生长曲线

SD 大鼠的 BMSCs 细胞开始生长时成纤维状、梭形, 生长后期呈现多角形, 方形, 鳞片状, 个别近似圆形, 局部成结节状, 6 d 左右达到 70%~80% 的融合率。图 1 可知, 各组细胞增殖曲线均成 S 型生长, 第 1 至 3 d 细胞生长缓慢, 处于潜伏期, 从第 4 d 开始快速生长, 进入对数生长期, 到第 7 d 生长缓慢, 基本不生长, 进入平台期, 并且在促进细胞生长方面, 整体上含钙小分子胶原多肽组 (D 组) > 小分子胶原多肽组 (C 组) > 含钙大分子胶原蛋白组 (B 组) > 大分子胶原蛋白 (A 组) > 对照组 (control)。试验组细胞生长较对照组生长快速, 含钙小分子胶原多肽对

组的 ALP 活性, 吸去孔内培养液, PBS 洗 3 次, 加入 1 mL 2% Triton X-100, 4 °C 冰箱过夜裂解, 12000 g, 4 °C 离心 5 min 取上清, 取 30 μL 于 96 孔板, 按照 ALP 试剂盒说明书测定, 酶标仪测各管吸光度, 根据下列公式计算 ALP 活性。

BMSCs 的促进作用效果最佳。

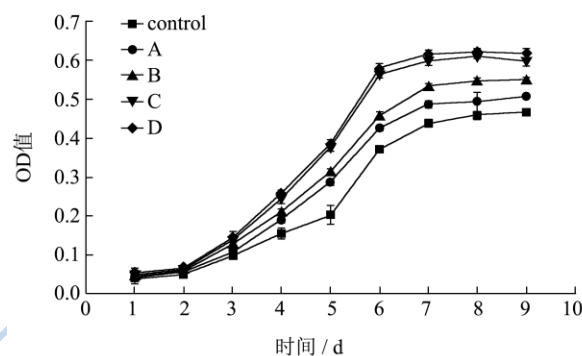


图 1 对照组和试验组细胞生长曲线

Fig.1 Cell growth curves for the control and experimental groups

Guillerminet 证实对切除卵巢的小鼠饲喂水解胶原蛋白, 可改善骨的质量, 提高骨性能, Yoshihiro 研究表明, 鲨鱼胶原蛋白可有效改善去卵巢大鼠的骨矿物密度, 增加骨胶原和氨基葡聚糖含量。Han 研究表明对去卵巢大鼠饲喂鱼骨胶原, 可有效改善骨的微结构, 改善骨代谢相关的生理生化指标。鹿骨胶原蛋白、鹿角鹿角脱盘胶原蛋白、鹿筋胶原对骨质疏松均有一定的预防和治疗作用。BMSCs 是骨组织中成骨细胞的来源细胞, 其数量和功能活性直接影响成骨细胞的数目及功能活性, 维持了骨形成和骨吸收的平衡, 在骨重建中有重大调控作用。随着年龄增长, BMCSs 的增殖能力及成骨能力都会降低, 成脂能力升高, 进而导致骨质疏松。胶原蛋白和胶原多肽中的羟脯氨酸是血浆中钙的运输工具, 可将钙运送到骨细胞, 在一定程度上促进钙吸收, 增加骨胶原结构, 提高骨强度, 增加骨密度, 促进骨形成, 具有预防和治疗骨质疏松的作用。胶原蛋白广泛存在于各组织中, 生理功能广泛, 胶原蛋白对细胞有锚定和支持作用, 可为细胞的增殖生长提供适宜的微环境。小分子胶原多肽有利于细胞生长, 具有促进多种细胞增殖的功能。与胶原蛋白相比, 胶原多肽一些活性基团的暴露, 小分子信号物质的释放, 诱导了细胞内生物信号的传递, 导致细胞生理功能的改变。细胞增殖受多种因素影响, 胶原多肽

的促增殖活性，可能是因为改变了细胞的其他生理功能，如促进细胞粘附，具体作用机制还有待研究。

## 2.2 ALP 染色结果

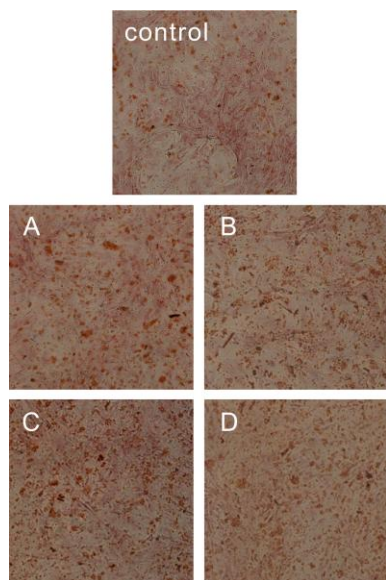


图2 对照组和试验组碱性磷酸酶染色结果图

Fig.2 Images of alkaline phosphatase staining for the control and experimental groups

从图2可以看出，染色第14d，各组均有阳性反应，但程度不同，染色后呈咖啡色，红棕色、棕褐色甚至黑色颗粒，部分呈片状或块状沉淀，呈现阳性反应，但对照组染色较少，对照组染色阳性率明显低于四组试验组，对照组、A组、B组、C组、D组的染色阳性率呈增加趋势。四组试验组与对照组相比，均差异显著( $p < 0.05$ )；除A组与B组相比差异不显著( $p > 0.05$ )，其余各组间均有显著差异( $p < 0.05$ )。

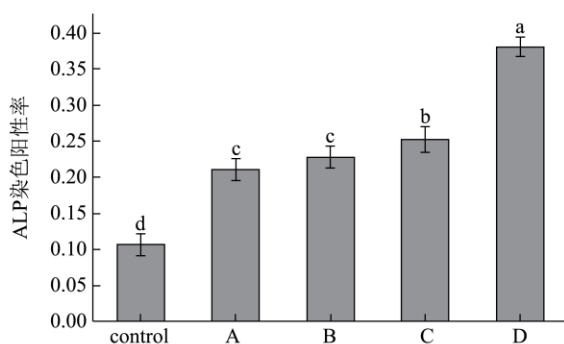


图3 对照组和试验组 ALP 染色阳性率

Fig.3 Positive ALP staining rates for the control and experimental groups

注：相同字母代表无显著差异，字母不同表示有显著差异，下同。

## 2.3 ALP 活性测定结果

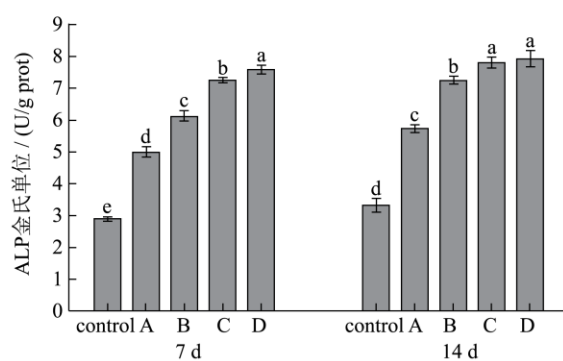


图4 对照组和试验组 ALP 活性

Fig.4 ALP activities for the control and experimental groups

ALP 阳性表达是 BMSCs 向成骨细胞分化的前期标志，ALP 与骨钙化有关，可促进骨的矿化。ALP 活性表达值的升高代表着 BMSCs 向成骨细胞的分化能力的增强<sup>[13-14]</sup>。从图4可以看出，对照组和四组试验组碱性磷酸酶活性均有表达，第7d和第14d各试验组较对照组比均可显著的促进 BMSCs 的 ALP 活性的表达，含钙小分子胶原多肽组 ALP 活性表达最高。随着培养时间延长，第14d对照组和四组试验组的组细胞内 ALP 活性较第7d呈增加趋势，且第7d和第14d，ALP 活性平均值 D组>C组>B组>A组>对照组。统计学结果分析，第7d和第14d与对照组相比，A、B、C、D 胞内 ALP 活性显著高于对照组 ( $p < 0.05$ )，D 组细胞 ALP 活性最高。第7d和第14d，A组与B组，A组和C组，A组与D组，B组与C组，B组与D组之间，有显著差异( $p < 0.05$ )。C组和D组在第7d有显著差异( $p < 0.05$ )，到第14d无显著差异( $p > 0.05$ )。由此可知，在正常情况下，BMSCs 可能有部分向成骨细胞分化，但是在加入鹅骨大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽的情况下，可明显地促进 ALP 的表达，对 BMSCs 向成骨细胞分化有明显的促进作用，大分子胶原蛋白组、含钙大分子胶原蛋白组、小分子胶原多肽组、含钙小分子胶原多肽组促进作用逐渐增强。并且对 BMSCs ALP 活性的促进作用随着时间的延长呈增加趋势。

## 2.4 茜素红钙结节染色结果

由第21d茜素红钙结节染色可知(图5)，对照组和试验组结节处均呈橘红色，对照组仅有少数钙结节生成，大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽均可显著促进钙结节生成，以含钙小分子胶原多肽效果最佳。A、B、C、D 四组的钙化结节数呈现逐渐增多的趋势，钙结节的面积增大，大的染色结节数目也逐渐增多。通过钙结

节计数可知, 试验组与对照组相比, 均有显著差异 ( $p < 0.05$ ), A组与C组, A组与D组, B组与D组之间  $p < 0.05$ , 差异显著; B组与C组, C组与D组之间  $p < 0.05$ , 具有显著差异; A组与B组之间  $p > 0.05$ , 差异不显著, 没有统计学意义 (图6)。

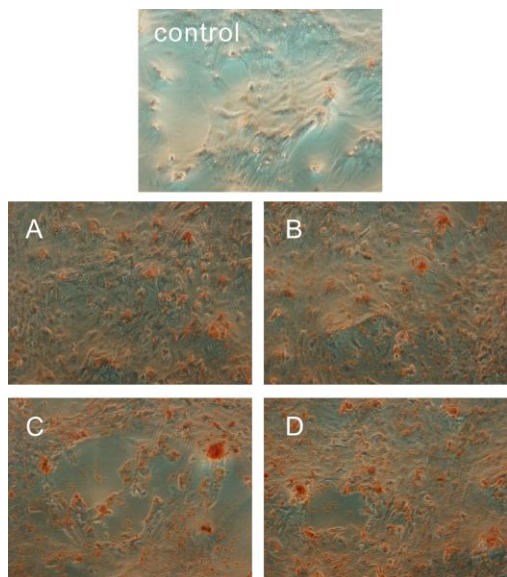


图5 对照组和试验组茜素红染色结果

Fig.5 Alizarin Red staining for the control and experimental groups

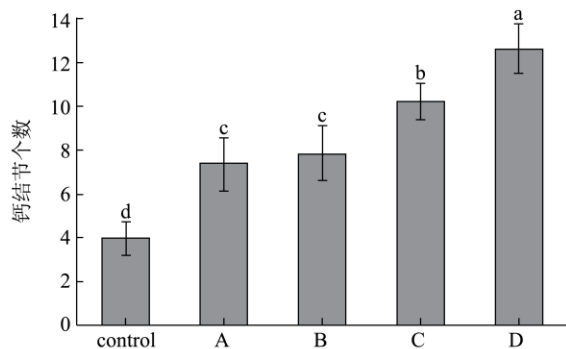


图6 对照组和试验组钙结节计数

Fig.6 Calcified nodule counts for the control and experimental groups

### 2.5 骨钙素分泌量比较

骨钙素又称骨钙蛋白 (Osteocalcin, OCN), 是一种多肽, 是向成骨分化中晚期的标志, BGP 含量越高, 说明骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化能力越强。由图7可知, 试验组较对照组骨钙素含量均明显升高, 且整体上骨钙素分泌量, 含钙小分子胶原多肽组 > 小分子胶原多肽组 > 含钙大分子胶原蛋白组 > 大分子胶原蛋白组 > 对照组, 随着培养时间的延长, 骨钙素含量逐渐增加。

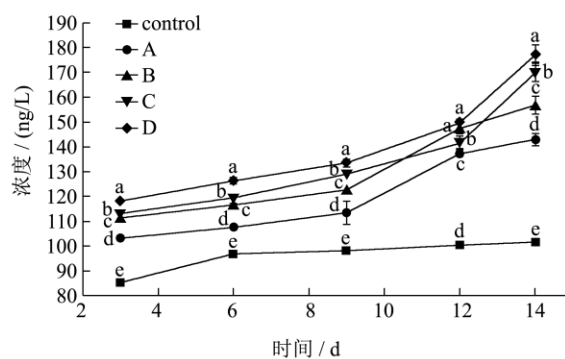


图7 对照组和试验组骨钙素分泌量

Fig.7 Amount of secreted osteocalcin for the control and experimental groups

### 3 结论

本研究证明鹅骨大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽均对SD大鼠BMSCs向OB分化有一定的诱导促进作用, 大分子胶原蛋白、含钙大分子胶原蛋白、小分子胶原多肽、含钙小分子胶原多肽对BMSCs向OB分化的作用逐渐增强, 含钙小分子胶原多肽对BMSCs向OB分化作用能力最强, 但具体多少分子量肽段的作用效果最佳还需进一步研究。本研究结果可为利用鹅骨开发含钙小分子胶原多肽功能食品提供理论依据。

### 参考文献

- [1] Glimcher M J. Composition, structure, and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification [J]. Handbook of Physiology, 1976, 7: 25-116
- [2] Piez K A, Eigner E A, Lewis M S. The Chromatographic Separation and Amino Acid Composition of the Subunits of Several Collagens [J]. Biochemistry, 1963, 2(1): 58-66
- [3] 李彦春,程宝箴,靳立强.胶原蛋白的应用[J].皮革化工, 2002, 19(3):10-14
- LI Yan-chun, CHENG Bao-zhen, JIN Li-qiang. Application of Collagen [J]. Leather Chemicals, 2002, 19(3): 10-14
- [4] Gien J, Kinsella J P. Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2011, 23(3): 305-313
- [5] Perrone S, Tataranno M L, Buonocore G. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia [J]. Journal of Clinical Neonatology, 2012, 1(3): 109-114
- [6] Kaur G, Wang C, Sun J, et al. The synergistic effects of multivalent ligand display and nanotopography on osteogenic differentiation of rat bone marrow stem cells [J]. Biomaterials, 2010, 31(22): 5813-5824

- [7] Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 109(2): 277-282
- [8] Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow - derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 111(2): 249-257
- [9] Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *BMC Cell Biology*, 2010, 11(1): 11
- [10] Gurban C V, Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis [J]. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2011, 52 (supplement 3): 1113-1119
- [11] Sharif P S, Abdollahi M, Larijani B. Current, new and future treatments of osteoporosis [J]. *Rheumatology International*, 2011, 31(3): 289-300
- [12] 谢静. 自制猪骨胶原多肽对去卵巢骨质疏松大鼠与成骨细胞增殖的影响[D]. 湖南农业大学, 2009
- XIE Jing. Effect of Self-Made Swine Bone Collagen Polypeptides On the Ovariectomized Rats and Proliferation of Osteoblast [D]. Hunan Agricultural University, 2009
- [13] Abdallah B M, Jensen C H, Gutierrez G, et al. Regulation of Human Skeletal Stem Cells Differentiation by Dlk1/Pref - 1[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, 19(5): 841-852
- [14] Anderson H C, Sipe J B, Hessle L, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice [J]. *The American Journal of Pathology*, 2004, 164(3): 841-847