

低强度脉冲超声波对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化的影响

江婷 郭风劲 许涛 杨克勤

【摘要】 目的 探讨低强度脉冲超声波(LIPUS)对体外分离培养的大鼠脂肪干细胞(ADSCs)增殖及成骨分化的影响。方法 取4周龄Sprague-Dawley大鼠腹股沟处脂肪组织,分离出脂肪干细胞并体外培养,经免疫磁珠分选、流式细胞仪鉴定ADSCs表面标志后,取第3代ADSCs,经LIPUS作用不同时间后,采用流式细胞仪检测细胞周期,计算细胞增殖指数,采用CCK-8法比较细胞增殖活性。取第3代ADSCs,设置阴性对照组、LIPUS组、成骨诱导组及LIPUS联合成骨诱导组,于LIPUS作用7 d、14 d时测定各组细胞碱性磷酸酶(ALP)活性;于LIPUS作用21 d时采用Von kossa染色比较各组细胞成骨分化能力。结果 第3代ADSCs高表达CD29、CD44,低表达CD34,符合ADSCs表面标志物特征;LIPUS组细胞增殖指数较对照组明显提高,细胞增殖加快。与阴性对照组比较,LIPUS组于实验进行7 d、14 d后ALP活性明显升高;LIPUS作用能促进ADSCs致矿化结节形成,但其矿化结节数量不及LIPUS联合成骨诱导组。结论 LIPUS能加速ADSCs增殖,促进ADSCs向成骨细胞分化。

【关键词】 低强度脉冲超声波; 大鼠; 脂肪源干细胞; 增殖; 成骨分化

The effects of low intensity pulsed ultrasound on the proliferation and osteogenic differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells JIANG Ting*, GUO Feng-jing, XU Tao, YANG Ke-qing. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China
Corresponding author: XU Tao, Email: YYxutao@263.net

【Abstract】 Objective To investigate the biological effects of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the proliferation and osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) *in vitro*. **Methods** Primary ADSCs were harvested from the inguinal fat pads of 4-week-old female Sprague-Dawley rats, cultured *in vitro* and purified by magnetic-activated cell sorting. Surface ADSC markers were identified by flow cytometry. LIPUS at 100 mW/cm² was used to stimulate the cultured cells. Flow cytometry was performed for cell cycle analysis. Cellular proliferation was evaluated via CCK8 chromatometry, and a proliferation index was calculated. ADSCs were assigned to 4 groups: a negative control group, a LIPUS group, an osteoinduction group and a LIPUS plus osteoinduction group, and treated accordingly. Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined at the 7th and 14th day in each group, and calcium nodes were marked by Von Kossa staining. The levels of osteogenic differentiation in the different groups were evaluated. **Results** The ADSCs of passage 3 expressed CD 34^{low}, and CD29^{high} CD44^{high}, which was consistent with the characteristics of ADSC surface markers. Proliferation was upregulated significantly in the LIPUS group compared with the negative control group. ALP activity was also elevated significantly and it resulted in mineralization. The highest mineralization rate was observed in the LIPUS plus osteoinduction group. **Conclusions** LIPUS not only can stimulate the proliferation of rat ADSCs, it also promotes their osteogenic differentiation.

【Key words】 Low intensity pulsed ultrasound; Rats; Adipose tissue-derived stem cells; Proliferation; Osteogenic differentiation

超声波是一种超过人类听阈范围的高频声波,是机械能的一种形式,通过高频(1~12 MHz)的压力波来传递能量^[1]。低强度脉冲超声波(low intensity

pulsed ultrasound, LIPUS)一般指强度 ≤ 100 mW/cm²[2]。20世纪80年代初Duarte^[3]首先报道了LIPUS(强度为30 mW/cm²)能加速动物骨折愈合。间质干细胞因其在组织工程中的可行性,近年来受到高度重视^[4]。Zuk等^[5]首先报道了人类脂肪组织中存在间质干细胞,并证实其具有多重分化潜能;此后多种哺乳动物(包括大鼠)脂肪组织中同样存在干细胞被相继报道^[6]。这些细胞与人类脂肪干细胞一样,具有向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、成神经元甚至心肌细胞

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.06.004

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(江婷、郭风劲),康复医学科(许涛、杨克勤);安徽医科大学第三附属医院骨科(江婷)

通信作者:许涛,Email:YYxutao@263.net

谱系分化的能力。

干细胞的命运不仅取决于自身与外界调控信号间的相互作用,而且还受到自身及周围组织三维结构及机械力的影响。已有大量研究报道,LIPUS 对干细胞增殖及分化具有影响作用^[7-10],但鲜见采用 LIPUS 作用脂肪源干细胞(adipose tissue-derived stem cells, ADSCs)的相关研究。基于上述背景,本实验通过观察 LIPUS 对 ADSCs 细胞增殖及成骨分化的影响,为 ADSCs 在骨组织工程中的广泛应用提供参考数据。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:共选取 4 周龄雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 9 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,大鼠体重(100±10)g。

2. 仪器及试剂:主要实验仪器包括美国产 ELX-800UV 型酶标仪、日本产 OG GIKEN ES-2 型超声波治疗仪、美国产 BD Biosciences FACS Calibur 流式细胞仪等。MACS 磁珠细胞分选系统和羊抗兔 IgG 免疫磁珠由德国 Miltenyi 生物技术公司提供;I 型胶原酶、胰蛋白酶由美国 Sigma 公司提供;DMEM/F12 培养基由美国 Hyclone 公司提供;Oricell™ SD 大鼠脂肪干细胞成骨诱导培养基由广州赛业生物科技有限公司提供;细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(CCK-8)由上海 Best-Bio 贝博生物提供;Gibco 胎牛血清由美国 Invitrogen 公司提供;兔抗 CD29、CD34、CD44 多克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供;羊抗兔荧光 FITC 抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒由南京建成科技有限公司提供。

二、实验方法

1. ADSCs 的分离及培养:参照 Zaminy 等^[11]介绍的方法,采用乙醚处死 9 只 SD 大鼠,并浸泡于 75%酒精中 20 min,在无菌条件下取腹股沟处脂肪组织,用 I 型胶原酶消化结合梯度离心分离出 ADSCs 细胞,接种至培养瓶内,置于 37℃ 恒温、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。于 12 h 后更换培养基,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗,去除未贴壁细胞;随后每 3 天更换培养液 1 次。待 7~10 d 后细胞达 70%~80% 融合,用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。第 1 代细胞用于免疫磁珠分选,取第 3 代细胞用于表面标志物鉴定、细胞周期、细胞增殖检测及诱导分化实验等。

2. LIPUS 作用方法:设置 LIPUS 强度为 100 mW/cm²,频率为 1.5 MHz,脉冲频率为 1 kHz,脉冲宽度为 200 ms,间隙时间为 800 ms,每次持续作用 8 min,每天作用 1 次。在进行细胞周期检测及成骨分化实验时,

ADSCs 均使用直径为 35 mm 的培养皿培养,实验所使用的超声波探头直径为 5 cm,大于培养皿底部,可在培养皿底部涂抹耦合剂,探头平面向上,培养皿水平放置。在进行细胞增殖实验时,ADSCs 使用 96 孔板培养,每组设 6 个相邻复孔,超声波探头面积大于 6 个复孔面积,故超声波可同时作用 6 个复孔。

三、检测方法

1. ADSCs 生物学特性分析:①连续观察原代至第 8 代 ADSCs 形态特征;②采用流式细胞仪检测细胞表面标志 CD29、CD34、CD44,取第 3 代 ADSCs 消化、离心后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁹ 个/L,分别取 1 ml 滴加 CD29、CD34、CD44 抗体,于 4℃ 孵育 30 min,经 PBS 液洗涤后,滴加 FITC 标记抗体,4℃ 避光孵育 15 min,经流式细胞仪检测细胞表面 CD29、CD34、CD44 阳性表达情况。

2. 细胞周期检测:取第 3 代 ADSCs,将约 1×10⁵ 个细胞接种于 6 个直径为 35 mm 的培养皿中,将其分为实验组及阴性对照组。待细胞贴壁后,实验组给予 LIPUS 作用,阴性对照组未给予 LIPUS 作用。于实验进行 1 d、2 d、3 d、4 d 及 5 d 时,经消化、离心收集 LIPUS 作用后 24 h 的细胞,制成单细胞悬液,用预冷的 70% 乙醇固定,4℃ 孵育 30 min 后离心,再用 PBS 液漂洗离心,经 RNaseA(100 μg/ml)处理 30 min 后离心,用 100 μl 预冷的 70% 乙醇重悬,再加入等体积碘化丙锭(propidium iodide, 50 μg/ml),4℃ 避光反应 30 min,经流式细胞仪检测各组不同时间点处于 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期细胞百分率,计算细胞增殖指数(proliferation index, PI), $PI = (S\% + G_2/M\%) / (G_0/G_1\% + S\% + G_2/M\%) \times 100\%$ 。

3. 细胞增殖测定:取第 3 代 ADSCs,以 4 000 个/孔接种于 96 孔平板中,将其分为实验组及对照组,每组设相邻 6 个复孔。实验组细胞于培养 24 h 贴壁后给予 LIPUS 作用,对照组不给予 LIPUS 作用。于实验进行 1 d、3 d、5 d 及 7 d 时(待 LIPUS 作用结束 24 h 后)每孔更换 100 μl 新的培养基并加入 10 μl CCK-8 溶液,以培养基调零,经孵育 4 h 后在 450 nm 处测定样本吸光度值。

4. ALP 活性检测:将第 3 代 ADSCs 用培养基重悬后,以 2×10⁷ 个/L 的密度接种于 8 个直径为 35 mm 的培养皿中,设置阴性对照组、LIPUS 组、成骨诱导组及 LIPUS 联合成骨诱导组共 4 组。待细胞铺满瓶底约 70% 时,按既定方案分别给予 LIPUS 作用或成骨诱导培养剂(配比成分:SD 大鼠脂肪干细胞成骨分化基础培养基 175 ml、胎牛血清 20 ml、青霉素-链霉素 2 ml、谷氨酰胺 2 ml、维生素 C 400 μl、β-甘油磷酸钠 2 ml、地塞米松 20 μl)诱导,于实验进行 7 d、14 d 后检测各

组细胞 ALP 活性,提取各组细胞总蛋白并检测蛋白浓度,按 ALP 测定试剂盒说明书操作步骤,依次测定第 7 天及第 14 天时各组细胞总蛋白 ALP 活力单位(U/g 蛋白),活力单位定义为每克蛋白在 37 ℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个单位。

5. von Kossa 法检测矿化结节:将第 3 代 ADSCs 用培养基重悬后,以 2×10^7 个/L 的密度接种于 4 个直径为 35 mm 的培养皿中,设置阴性对照组、LIPUS 组、成骨诱导组及 LIPUS 联合成骨诱导组共 4 组;待细胞铺满皿底约 70% 时,按既定方案分别给予 LIPUS 作用或成骨诱导培养剂诱导。于实验进行 21 d 后观察矿化结节情况,取各组细胞培养皿,经 PBS 液冲洗 2 遍,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,经 5% 硫代硫酸钠溶液孵育 30 min,蒸馏水冲洗 2 遍,加入 2% 硝酸银溶液铺满皿底,开盖后在紫外灯下照射 30 min,用蒸馏水冲洗掉细胞表面黑色物质,继续用 5% 硫代硫酸钠溶液染色 2 min,1% 中性红复染 2 min,蒸馏水漂洗,晾干后用中性树胶封固后待测。

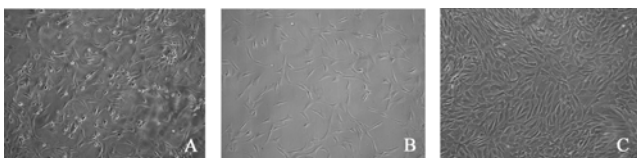
四、统计学分析

本研究所得计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析,组内比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、ADSCs 生物学特性分析

1. 形态学特征:脂肪干细胞原代培养 24 h 后可见贴壁细胞,初始阶段呈小圆形,48 h 后可见短梭形、梭形及多角形,3 d 后类成纤维细胞明显增多(图 1A);8~9 d 后单层细胞融合接近 90%。传代细胞 2 h 后即可贴壁、生长迅速(图 1B),多数为类成纤维细胞,圆形细胞数量逐渐减少,7 d 后细胞即可单层融合。分选后的第 3 代细胞形态均一、呈长梭形,接近融合状态时可呈漩涡样生长(图 1C),观察至第 8 代时,发现细胞形态特征无明显变化。

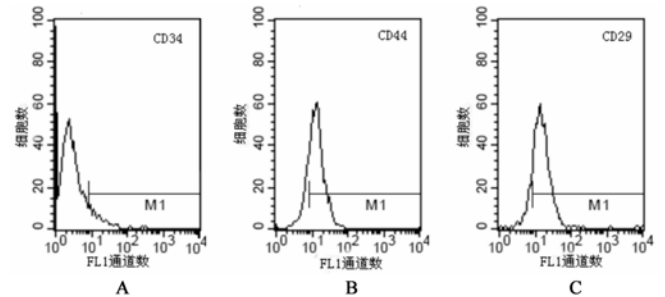


注:A 为原代 ADSCs 分离培养 3 d 时;B 为第 3 代 ADSCs 传代后 24 h 时;C 为第 3 代 ADSCs 接近融合时

图 1 ADSCs 形态学特征分析

2. 表面标志分析:经流式细胞仪检测后发现,第 3 代 ADSCs 表达 CD34 阳性率为 6.59% (图 2A),表达 CD44 阳性率为 80.18% (图 2B),表达 CD29 阳性率为

86.38% (图 2C),故基本可以认定分离培养的细胞为间充质干细胞。



注:A 为 CD34 阳性细胞表达比;B 为 CD44 阳性细胞表达比;C 为 CD29 阳性细胞表达比

图 2 第 3 代 ADSCs 表面分子标志的流式细胞仪检测结果分析

二、LIPUS 对 ADSCs 细胞周期及增殖的影响

1. LIPUS 对细胞周期的影响:LIPUS 作用不同时间后各组细胞周期分布以及增殖指数、凋亡指数结果详见表 1。表中数据显示,与阴性对照组比较,LIPUS 组 G_2/M 期细胞比例无明显变化; G_0/G_1 期细胞减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$);LIPUS 组 S 期细胞增多,以 LIPUS 作用 3 d、4 d 及 5 d 后变化较显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$);当实验进行 4 d、5 d 后,发现 LIPUS 组细胞增殖指数显著提高,与阴性对照组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);凋亡指数组间差异则无统计学意义($P > 0.05$)。

2. LIPUS 对细胞增殖的影响:阴性对照组及 LIPUS 组在实验进行 1 d、3 d、5 d 及 7 d 时细胞数量均逐渐增加,至第 7 天时增幅减缓,各自组内任一时间点与前一时间点比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);LIPUS 组在实验进行 3 d、5 d 及 7 d 时与阴性对照组相同时间点比较,可见前者细胞增殖速度相对较快,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),具体数据详见图 3。

三、LIPUS 对 ADSCs 分化的影响

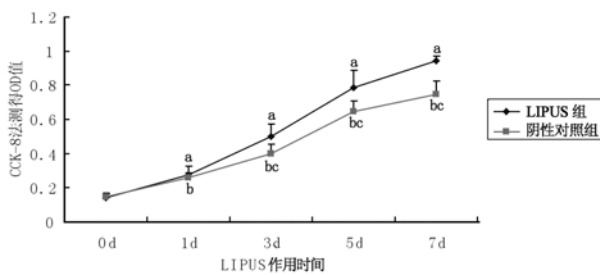
1. ALP 活性检测结果比较:实验进行 7 d 及 14 d 时,发现 LIPUS 组 ALP 活性较对照组明显提高,但仍显著低于成骨诱导组及 LIPUS 联合成骨诱导组,组间差异均具有统计学意义($P < 0.05$);成骨诱导组与 LIPUS 联合成骨诱导组间差异无统计学意义($P > 0.05$);另外各组细胞 ALP 活性检测结果在上述 2 个时间点组内差异均无统计学意义($P > 0.05$),具体结果详见表 2。

2. 矿化结节测定结果比较:实验进行 21 d 后,经 von Kossa 法检测发现,LIPUS 组细胞间出现黑染矿化结节,其数量不及成骨诱导组,以 LIPUS 联合成骨诱导组矿化结节数量最多,各组细胞矿化结节形成情况详见图 4。

表 1 LIPUS 作用不同时间后对 ADSCs 细胞周期分布、增殖指数及凋亡指数的影响($\bar{x} \pm s$)

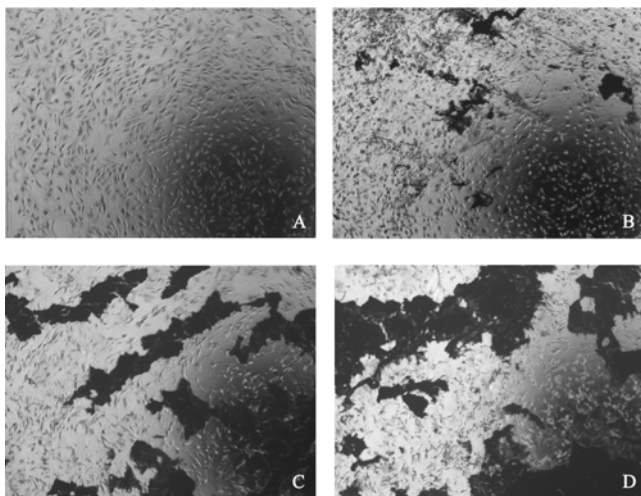
组 别	G ₀ /G ₁ 期 (%)	S 期 (%)	G ₂ /M 期 (%)	增殖指数 (%)	凋亡指数 (%)
阴性对照组	92.27 ± 2.73	2.32 ± 0.19	5.41 ± 0.37	7.73 ± 0.39	1.84 ± 0.31
LIPUS 组					
实验进行 1 d 时	91.88 ± 3.67	2.57 ± 0.17	5.55 ± 0.37	8.12 ± 0.36	1.89 ± 0.35
实验进行 2 d 时	91.83 ± 3.56	2.58 ± 0.28	5.59 ± 0.20	8.17 ± 0.45	2.04 ± 0.32
实验进行 3 d 时	91.66 ± 3.55	2.79 ± 0.27 ^a	5.57 ± 0.19	8.34 ± 0.48	1.84 ± 0.26
实验进行 4 d 时	90.70 ± 3.60	3.72 ± 0.19 ^a	5.58 ± 0.27	9.30 ± 0.35 ^a	1.94 ± 0.31
实验进行 5 d 时	90.21 ± 3.24	4.16 ± 0.30 ^a	5.63 ± 0.41	9.79 ± 0.41 ^a	1.86 ± 0.28

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$



注:与 LIPUS 组前一时间点比较,^a $P < 0.05$;与阴性对照组前一时间点比较,^b $P < 0.05$;与 LIPUS 组相同时间点比较,^c $P < 0.05$

图 3 LIPUS 作用不同时间对细胞增殖的影响



注:A 为阴性对照组;B 为 LIPUS 组;C 为成骨诱导组;D 为 LIPUS 联合成骨诱导组

图 4 实验进行 21 d 后各组细胞矿化结节形成情况比较 (von Kossa 染色, ×40)

表 2 各组细胞 ALP 活性检测结果比较 (U/g 蛋白, $\bar{x} \pm s$)

组 别	实验进行 7 d 时	实验进行 14 d 时
阴性对照组	17.09 ± 1.26	17.42 ± 0.99
LIPUS 组	23.84 ± 1.20 ^a	24.43 ± 0.81 ^a
成骨诱导组	32.63 ± 0.61 ^{ab}	33.52 ± 0.30 ^{ab}
LIPUS 联合成骨诱导组	32.52 ± 1.46 ^{ab}	33.82 ± 1.06 ^{ab}

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LIPUS 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

超声波的生物物理学效应大体分为热效应和非热

效应,一些研究者认为非热效应主要包括空腔化、声冲流、颗粒振动等机械效应,其中空腔化是指液体中气泡的形成及活动形式,声冲流可描述为液体中振动气泡周围的液流^[12-15]。LIPUS 的优势是在作用时传递给组织的机械能量($< 3 \text{ mg/cm}^2$)较小,通常在局部不会产生明显热量,避免了热损伤,仅通过其机械效应发挥治疗作用^[16]。目前强度为 30 mW/cm^2 的 LIPUS 已被美国食品与药品管理局认可,被广泛应用于促进骨折和骨不连愈合^[10];不过强度为 100 mW/cm^2 或小于 30 mW/cm^2 的 LIPUS 同样被证实有效^[10,17-18]。在临床康复治疗中,强度为 100 mW/cm^2 的 LIPUS 使用较普遍^[2],故本研究设置超声波强度为 100 mW/cm^2 ,刺激时间为每次 8 min,至于刺激 ADSCs 向成骨分化的最佳治疗参数,还有待进一步探索。

由于胚胎干细胞研究涉及一系列伦理、政治及立法等问题^[19],目前各国多倾向于开展成体干细胞实验。自 Zuk 等^[5]首次报道了脂肪干细胞之后,该细胞作为一个重要的成体干细胞源被广泛应用于细胞治疗、组织工程及再生医学等领域。目前研究已证实,ADSCs 与骨髓干细胞一样拥有多重分化能力,如给予骨髓干细胞成骨分化的培养条件,同样可以诱导脂肪干细胞向成骨细胞分化^[20]。由于脂肪来源于干细胞取材较骨髓来源于干细胞更丰富、更容易获得,故近年来关于脂肪来源于干细胞的研究逐渐增多^[21]。

从各组细胞增殖结果可以看出,LIPUS 作用能促进 ADSCs 增殖;进一步检测细胞周期发现,经 LIPUS 作用后,处于 DNA 合成期的细胞数量明显增多,增殖指数提高。该结果与相关文献^[22-23]基本一致,但与张超等^[24]报道结果有差异,可能是由于本研究所采用的靶细胞、超声波强度及设备不同的缘故。当然,LIPUS 促进 ADSCs 细胞增殖的确切机制还有待进一步研究。

ALP 是成骨前体细胞重要标志之一,其活性可以反映细胞向成骨方向分化的强弱^[25],ALP 活性越高,则表明成骨前体细胞向成骨细胞分化越显著。由于 ALP 能水解焦磷酸盐,并能水解抑制钙沉积的三磷酸腺苷(ATP),促进羟磷灰石结晶所必需的局部磷酸盐

类生成,所以矿化过程具有重要作用^[26]。虽然 ALP 活性会随成骨分化而逐渐增加,但随着矿化进展其水平会逐渐稳定甚至下调^[27]。成骨细胞在体外可产生特异性钙化现象,钙化结节为骨组织形成创造条件,是成骨细胞的又一重要特征^[28]。Angle 等^[10]研究了不同强度 LIPUS 对骨髓间质干细胞成骨分化的影响,发现 LIPUS 能不同程度提高细胞 ALP 活性并促进矿化结节形成。本研究也观察到类似结果,如 ADSCs 经 LIPUS 作用 7 d 后,同样出现 ALP 活性显著增高并维持到实验进行 14 d 时,但显著低于成骨诱导组水平,提示 LIPUS 对 ALP 活性的影响不及成骨诱导剂。本实验同时发现 LIPUS 联合成骨诱导组中 ALP 活性并没有显著高于成骨诱导组,推测 ALP 活性的升高还可能存在“天花板”效应,这种效应使 LIPUS 与成骨诱导剂联用并不能表现协同作用;但在观察 LIPUS 致 ADSCs 向成骨分化直至矿化结节形成的实验中,其结果与 ALP 活性检测不尽一致,如 LIPUS 作用既可单纯促进 ADSCs 分化乃至矿化结节形成,而且与成骨诱导剂联用还可表现协同作用,由此可推测 LIPUS 及成骨诱导剂的作用机制涉及不同分子机制。

综上所述,本实验发现 LIPUS 既可以促进 ADSCs 增殖,又能促进其向成骨细胞分化;在以 ADSCs 为种子细胞的骨组织工程研究中,可将 LIPUS 作为一个重要的调控因素。至于 LIPUS 的确切作用机制,仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 2001, 40:1331-1336.
- [2] Warden SJ. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Med*, 2003, 33:95-107.
- [3] Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1983, 101:153-159.
- [4] Hattori H, Masuoka K, Sato M, et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res*, 2006, 76:230-239.
- [5] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, 7:211-228.
- [6] Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC. Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. *Anat Rec A Discov Cell Evol Biol*, 2003, 272:398-402.
- [7] Sant' Anna EF, Leven RM, Viridi AS, et al. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res*, 2005, 23:646-652.
- [8] Schumann D, Kujat R, Zellner J, et al. Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. *Biorheology*, 2006, 43:431-443.
- [9] Lai CH, Chen SC, Chiu LH, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound dexamethasone/TGF-beta1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs osteogenic differentiation. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36:1022-1033.
- [10] Angle SR, Sena K, Sumner DR, et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasonics*, 2010, 51:281-288.
- [11] Zaminy A, Kashani IR, Barbarestani M, et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells. *Indian J Plast Surg*, 2008, 41:8-14.
- [12] Ter HG. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*, 1999, 9:3-9.
- [13] Suslick KS. Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects. New York: VCH Publishers Inc, 1988:287-303.
- [14] Ter HG. Basic physics of therapeutic ultrasound. *Physiotherapy*, 1987, 73:110-113.
- [15] Williams AR. Ultrasound: biological effects and potential hazards. London: Academic Press, 1983:126-151.
- [16] 孔璐, 赵进顺. 低剂量脉冲式超声波的生物学效应研究概况. *中国公共卫生*, 2002, 18:5151-5152.
- [17] Li J, Waugh LJ, Hui SL, et al. Low-intensity pulsed ultrasound and nonsteroidal anti-inflammatory drugs have opposing effects during stress fracture repair. *J Orthop Res*, 2007, 25:1559-1567.
- [18] Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, et al. Ultrasound produced by a conventional therapeutic ultrasound unit accelerates fracture repair. *Phys Ther*, 2006, 86:1118-1127.
- [19] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 2007, 100:1249-1260.
- [20] Liu TM, Martina M, Huttmacher DW, et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow and adipose tissue derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 2007, 25:750-760.
- [21] Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3:705-713.
- [22] Yoon JH, Roh EY, Shin S, et al. Introducing pulsed low-intensity ultrasound to culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett*, 2009, 31:329-335.
- [23] 梁伟, 苟三怀, 齐进, 等. 低强度脉冲超声波对体外培养的兔骨髓基质细胞成骨作用的影响. *第二军医大学学报*, 2007, 28:603-606.
- [24] 张超, 梁国穗, 张颖恺, 等. 低强度脉冲超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27:657-660.
- [25] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res*, 2004, 19:841-852.
- [26] Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype. *J Dent Res*, 2005, 84:390-406.
- [27] Unsworth J, Kanez S, Harris S, et al. Pulsed low intensity ultrasound enhances mineralisation in preosteoblast cells. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33:1468-1474.
- [28] Xiao Y, Haase H, Young WG, et al. Development and transplantation of a mineralized matrix formed by osteoblasts in vitro for bone regeneration. *Cell Transplant*, 2004, 13:15-25.

(修回日期:2011-03-28)

(本文编辑:易浩)