القای استخوانسازی در کشت سلولهای استرومایی مغز استخوان رت توسط دگزامتازون

مهدی نیکبخت Ph.D.☆، محمد اکبری Ph.D.☆، علیقلی سبحانی Ph.D.☆★♦، حسن مرزبان Ph.D.☆، بهروز نیک‌نفس Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳ـ۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** استفاده از هورمون دگزامتازون برای القای استخوان‌سازی (Osteogenic Differentiation) در سلولهای استرومایی مغز استخوان رت و ایجاد ندول استخوانی در محیط کشت *In Vitro*

* **مواد و روشها:** سلولهای مغز استخوان از رتهای نر بالغ (۴ تا ۶ هفتگی) نژاد Spruge-Dawely به‌دست آمد و به‌مدت ۷ روز در کشت اولیه رشد داده شد. سپس سلولهای استرومایی مغز استخوان پاساژ داده شده و به‌مدت ۲۰ روز کشت ثانویه انجام شد. محیط کشت استفاده شده از نوع Dulbecco s Modified Eagle's Medium (DMEM)) بود که توسط ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS: Fetal Calf Serum) آنتی‌بیوتیکها و اسید آسکوربیک تکمیل شد. در گروههای آزمایش به محیط فوق‌الذکر، ۸-۱۰ مول به دگزامتازون (DEX: Dexametjapsme) تنهایی یا همراه با ۱۰ میلی‌مول بتا گلیسروفسفات سدیم (Na-βGP: Na-βGlycerophosphate) اضافه شد. کشتها به‌طور روزانه توسط میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شد. برای تشخیص دقیق سلولها از رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و کریزیل ویولت استفاده شد و رنگ‌آمیزی با Alizarin Red S برای مشخص نمودن ندولهای معدنی شده به‌کار رفت.

* **یافته‌ها:** در کشتهای اولیه، سلولهای استرومایی تا روز پنج تشکیل کلونی دادند و تا انتهای روز هفت، کلونیها به‌هم متصل شدند. در کشتهای ثانویه فاقد Dex، کلونیهای سلولهای استرومایی تشکیل شده در روز دوم پس از سه تا پنج روز به‌هم متصل شدند ولی در حضور Dex کلونی‌های سلولی به مرحلهٔ تلاقی نرسیدند و جزایر مجزایی از سلولها را تشکیل دادند. در روز هشتم در مرکز این جزایر، تجمعات سلولهای چند سطحی مشاهده شد که با گذشت زمان، وسعت آن افزایش یافت. در روز ۱۰ تا ۱۱ ساختمانهای ندول شکل سه بعدی مشاهده گردید.

* **نتیجه‌گیری:** حضور Dex و Na-βGP به طور همزمان در محیط کشت منجر به تشکیل ندول استخوانی می‌شود. از این سیستم کشت می‌توان برای مطالعات دیگر از قبیل بررسی تأثیرات هورمونی بر روی روند استخوانسازی بهره‌مند شد.

کل واژگان: دگزامتازون، مغز استخوان، استخوانسازی، کشت، رت، Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

مقدمه

برای بازسازی مجدّد استخوانها[1] و ترمیم شکستگیهای استخوانی نیاز به منبعی از سلولهای استئوبلاست است که یکی از مهمترین منابع تأمین کنندهٔ این سلولها، مغز استخوان (BM)[2] است (۱، ۲، ۳).

مغز استخوان از اجزای متعددی تشکیل شده که عبارتند: از عناصر خونی، سلولهای آندوتلیال و سلولهای استرومایی (۴، ۵). سلولهای استرومایی جمعیتی از سلولهای شبه فیبروبلاست هستند که اصطلاحاً سلولهای ریشهٔ مزانشیمی (MSCs) چند استعدادی گفته می‌شوند و تحت‌تأثیر فاکتورهای مناسب قادر هستند به سلولهای پروژنیتور مزانشیمی تمایز یابند (۱، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰).

تاکنون فاکتورهای متعددی شناخته شده‌اند که دارای تأثیرات تنظیمی روی فعالیت سلولهای استئوبلاست و پیش‌سازهای آنها هستند. گلوکوکورتیکوییدها و پروتئینهای شکل دهندهٔ استخوان (BMPs)[3] از جمله عواملی هستند که بیان نشانگرهای فنوتیپیک استئوبلاست را در استئوبلاستهای نابالغ و پیش‌سازهای آنها القا می‌نمایند (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶).

مکانیسمهایی که توسط آنها گلوکوکورتیکوییدها روی استخوانسازی تأثیر می‌گذارند، کماکان تحت بررسی است؛ به‌هر حال گلوکوکورتیکوییدها بیان ژنی را در تمایز سلولها تنظیم می‌نمایند (۴). نشان مطالعات هدفی *in vivo* و *in vitro* داده است که سلولهای استخوان برای هورمونهای گلوکوکورتیکوییدی بوده و این هورمونها بر روی تزاید و تمایز سلولهای استوژنیک تأثیر می‌گذارند (۲) که این تأثیر بسته به گونه‌های مختلف حیوانی و همچنین مقدار هورمون مورد استفاده متفاوت است (۵).

تجارب *in vitro* سلولهای استئوپروژنیتور کالواریای جنینی رت نشان داده است که مجاورت این سلولها با مقادیر معینی از دگزامتازون قدرت بالاتر (Dex) (نوعی گلوکوکورتیکوییدِ مصنوعی با نسبت به کورتیزول)، باعث القای تمایز در این سلولها شده و در نهایت تدول استخوانی تشکیل می‌شود (۵، ۶، ۷، ۸).

با توجه به تأثیرات تنظیمی گلوکوکورتیکوییدها روی سلولهای استوژنیک و پیش‌سازهای آنها، در این تحقیق سعی بر آن است که از خاصیت القاکنندگی هورمون دگزامتازون برای القای تمایز سلولهای ریشهٔ مزانشیمی مغز استخوان، برای تشکیل تدول استخوانی در محیط کشت استفاده شود. نتایج حاصل از این تحقیق برای بررسی مراحل استخوانسازی در محیط کشت قابل استفاده است.

همچنین می‌توان از سلولهای استئوپروژنیتور و تدولهای استخوانی حاصل از آنها برای موارد بالینی مانند ترمیم ضایعات استخوانی بهره‌مند شد.

مواد و روشها

جمعیت مورد مطالعه

در این پروژه، نمونه‌های مغز استخوان از استخوان ران رتهای نر بالغ (سن ۴ تا ۶ هفتگی به وزن ۱۲۰-۱۰۰ گرم) نژاد Spruge-Dawely به‌دست آمد (۱۱، ۱۲، ۱۳). در مجموع از ۲۴ سر رت در ۴ گروه شش‌تایی (دو گروه شاهد و دو گروه آزمایش) استفاده شد.

۱ـ گروه شاهد شماره ۱: کشت اولیهٔ سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویهٔ سلول‌های استرومایی بدون استفاده از Dex و Na-βGP

۲ـ گروه شاهد شمارهٔ ۲: کشت اولیهٔ سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویهٔ سلولهای استرومایی با اضافه کردن ۱۰ میلی‌مول Na-βGP

۳ـ گروه آزمایش شماره ۱: کشت اولیه سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویهٔ سلول‌های استرومایی با اضافه نمودن 10^{-8} مول Dex

۴ـ گروه آزمایش شماره ۲: کشت اولیهٔ سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویهٔ سلولهای استرومایی با اضافه کردن ۱۰ میلی‌مول Na-βGP و 10^{-8} مول Dex به‌طور همزمان (۱۷، ۱۸)

تهیهٔ سلولهای مغز استخوان

حیوانها با استفاده از کلروفرم (Over dose) کشته شده و استخوانهای ران آنها در شرایط استریل خارج و بافتهای نرم آنها به‌دقت جدا شد. سپس چهار مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه در HBSS[4] که محتوی غلظت بالایی از آنتی‌بیوتیکها بود، شستشو داده شد. برای تخلیه مغز استخوان، انتهای پروگزیمال و دیستال استخوانها، توسط استخوان‌بُر ظریف قطع شد و مغز استخوان توسط سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری (محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت) و از طریق سوزن نمرهٔ ۲۰ به‌داخل فلاسک پلاستیکی ۷۵ سانتی‌متر مربعی (۲۵۰ میلی‌لیتری) تخلیه شد. برای تهیهٔ سوسپانسیون سلولی، سلولها به‌وسیلهٔ طریق سوزن نمرهٔ ۲۰ چند مرتبه آسپیره شدند (۱۰، ۱۱، ۱۸).

کشت اولیهٔ سلولهای مغز استخوان

بعد از تهیهٔ سوسپانسیون سلولی از مغز استخوان، سلولها به مدت یک هفته در فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربعی (محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM) در یک انسفر مرطوب (محتوی ۹۵ درصد هوا، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد و درجهٔ حرارت ۳۷° سانتی‌گراد) انکوبه شدند. به این محیط کشت ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک و آنتی‌بیوتیکها اضافه شد.

آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده شامل: ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین G، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین سولفات و ۳ درصد میکروگرم در میلی‌لیتر فونجیزون بود (۱۹).

1. Bone remodeling
2. Bone Marroow
3. Bone Morphogenic Proteins
4. Hanks Balanced Salt Solution

* کشت ثانویهٔ سلولهای استرومایی مغز استخوان

بعد از گذشت یک هفته از کشت اولیه، سلولهای استرومایی مغز استخوان با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد همراه با ۱ میلی‌مول EDTA[1] از سطح کشت جدا شد (۱). سپس سلولها توسط هماسیتومتر شمارش شده و در فلاسک پلاستیکی ۲۵ سانتی‌متر مربعی (۵۰ میلی‌لیتری) در تراکمی برابر با ۴×۱۰^{۳} سلول در سانتی‌متر مربع (۱×۱۰^{۵} سلول در هر فلاسک) در محیط کشت DMEM که حاوی FCS، اسیدآسکوربیک و آنتی‌بیوتیکها (به میزانی برابر با مقادیر استفاده شده در کشت اولیه) بود، به‌مدت ۲۰ روز کشت داده شد. در گروههای آزمایش به محیط فوق‌الذکر، $۱۰^{-۸}$ مول Dex به‌تنهایی یا همراه با ۱۰ میلی‌مول Na-βGP اضافه شد.

* بررسی کشتها

۱ـ کشتهای اولیه و ثانویه هر روز روزانه با میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شدند. برای تشخیص دقیق سلولها، برخی از کشتها به‌طور در جا توسط الکل ۷۰ درصد تثبیت شده و با تولوئیدین‌بلو یا کریزیل ویولت ۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند.

۲ـ برای تشخیص ندولهای معدنی شده کشتهای ثانویه در روز ۱۵ و ۲۰ به‌طور درجا توسط الکل ۷۰ درصد تثبیت شده و توسط Alizarin Red S یک درصد، رنگ‌آمیزی شدند.

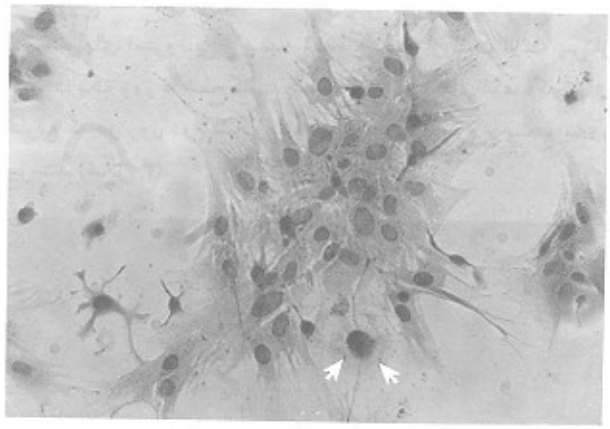
یافته‌ها

* نتایج حاصل از کشت اولیه

سلولهای استرومایی مغز استخوان در کشت اولیه پس از سه روز به سطح کشت چسبیده و در روز پنجم، کلونی شبه فیبروپلاستی را تشکیل دادند. اشکال سلولهای استرومایی در محیط کشت از فرم دوکی شکل فیبروبلاست تا سلولهای چند سطحی متغیر بود. سلولهای گرد تک‌هسته‌ای که از اجزای خونساز مغز استخوان است نیز در محیط کشت مشاهده شد (شکل ۱).

شکل ۱a: کشت اولیه سلولهای استرومایی مغز استخوان رت در روز سوم

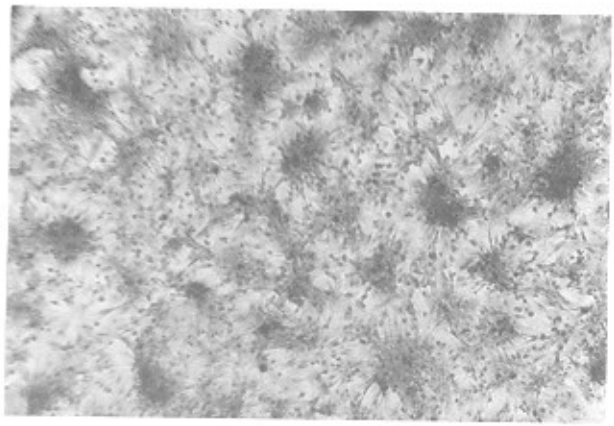
توجه کنید که شکل اغلب سلولها از فرم دوکی شکل تا چند سطحی متغیر است (رنگ‌آمیزی کریزیل ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگنمایی: ۱۲۰x)



شکل 1b: کلونی سلولهای استرومایی در روز پنجم

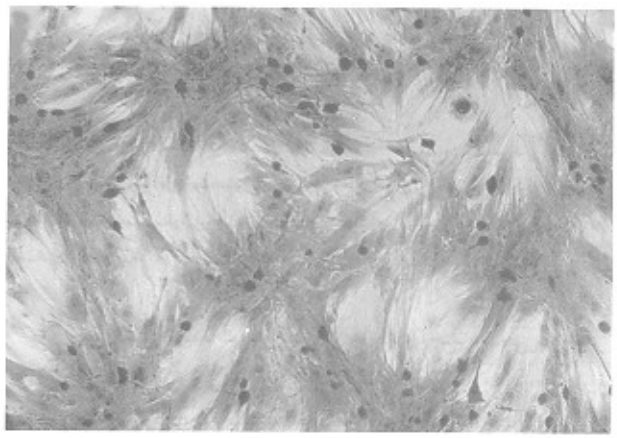
به سلول گرد تک‌هسته‌ای (↑) توجه کنید (رنگ‌آمیزی کریزیل‌ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگنمایی: ۱۲۰x)

کلونیهای سلولی در کشت اولیه تا انتهای روز هفتم به‌هم متصل شدند (شکل ۲).



شکل ۲: کشت اولیه سلولهای استرومایی در روز هفتم

کلونیهای سلولی به‌هم متصل شده و یک لایه سلولی را در سطح کشت تشکیل داده‌اند (میکروسکوپ فاز متضاد) شکل ۲b: رنگ‌آمیزی تولوئیدین‌بلو. بزرگنمایی: ۶۵x

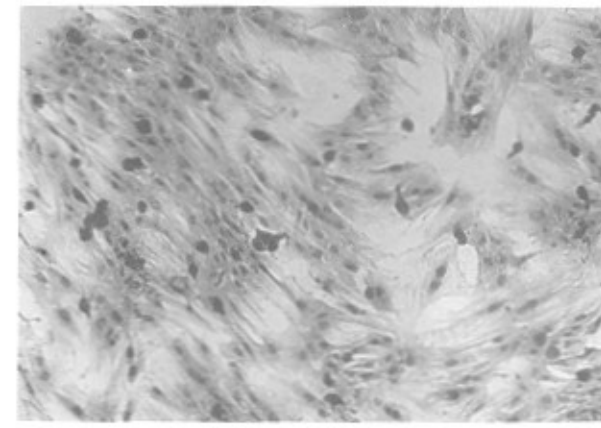


شکل ۲b: رنگ‌آمیزی کریزیل‌ویولت. بزرگنمایی: ۱۲۰x

1. Ethylenediamine Tetraacetic Acid

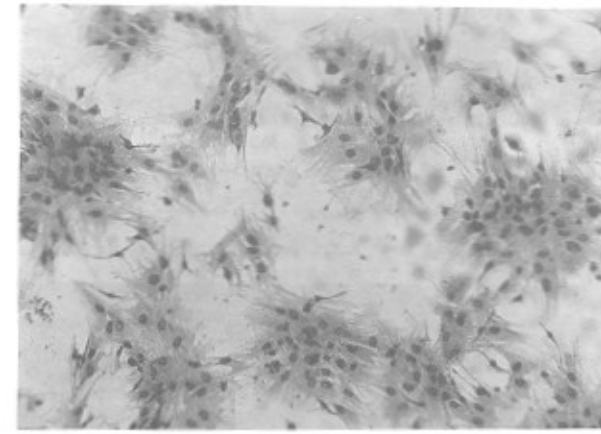
* نتایج حاصل از کشت ثانویه

سلولهای استرومایی ترپسینه شدهٔ حاصل از کشت اولیه پس از گذشت یک روز به سطح کشت چسبیدند. در نمونه‌های شاهد، کلونیهای سلولی که در روز دوم تشکیل شده بود، در روز سوم تا پنجم به‌هم پیوستند (شکل ۳).



شکل ۳: کشت ثانویهٔ سلولهای استرومایی در روز پنجم
(نمونهٔ شاهد، رنگ‌آمیزی کریزوئیدین‌ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگنمایی: ×۱۲۰)

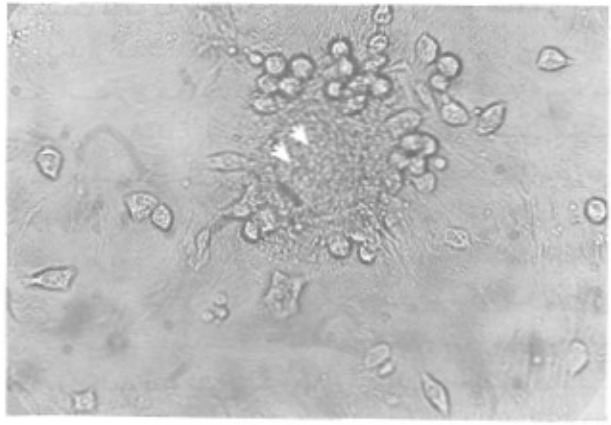
کلونیهای سلولی در نمونه‌هایی که در حضور Dex به‌تنهایی یا همراه با Na-βGP، کشت داده شدند به‌مرحلهٔ تلاقی نرسیدند. این کشتها، جزایر منزوی یا به‌هم متصل شده‌ای از سلولها را تشکیل دادند که به میزان وسیعی روی سطح فلاسک پراکنده شده بودند (شکل ۴).



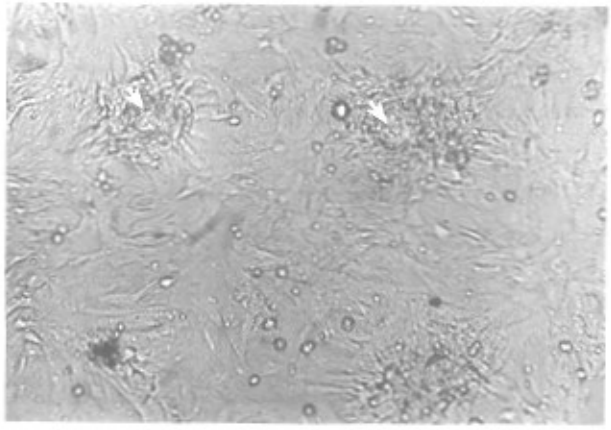
شکل ۴: کشت ثانویهٔ سلولهای استرومایی در روز پنجم در حضور Dex
توجه کنید که کلونیهای سلولی به هم متصل نشده‌اند. (رنگ‌آمیزی کریزوئیدین‌ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگنمایی ×۱۲۰)

در روز هشتم تجمعات متراکمی از سلولهای چند سطحی در مرکز این جزایر مشهود بود ولی در انواع دیگر کشتهای ثانویه مشاهده نشد.

این تجمعات در یک صفحهٔ کانونی متمایز از صفحهٔ چند لایهٔ سلول مجاور قرار گرفته بود و با گذشت زمان، اندازهٔ آن افزایش یافت (شکل ۵)

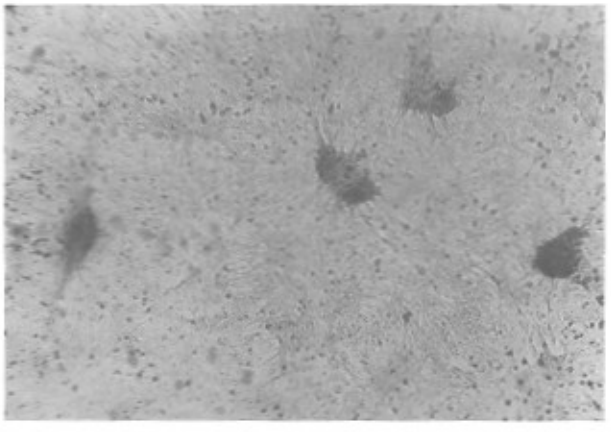


شکل ۵: کشت ثانویه سلولهای استرومایی در حضور Dex در روز هشتم
به تجمعات سلولهای چند سطحی در مرکز کلونی توجه کنید (میکروسکوپ فاز متضاد)
شکل a۵: بزرگنمایی ×۱۲۰

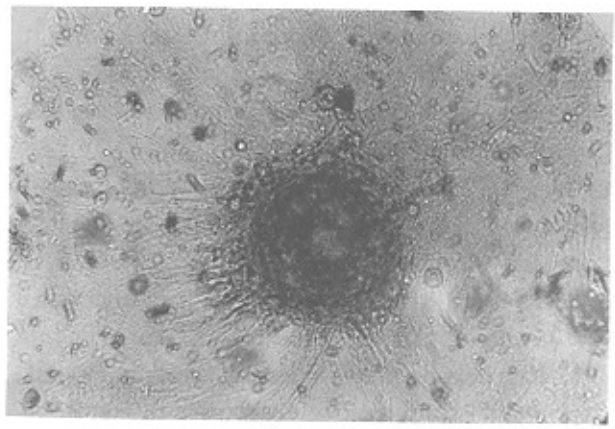


شکل b۵: بزرگنمایی ×۶۵

ساختمانهای ندولی شکل سه بعدی که در ظاهر کدر بودند، ۲ تا ۳ روز بعد در کشتهایی مشاهده شدند که هر دو مادهٔ Dex و Na-βGP به‌طور همزمان استفاده شده بود (شکل ۶).



شکل ۶: ندولهای استخوانی تشکیل شده در محیط کشت در روز چهارم
(رنگ‌آمیزی Alizarin Red S، میکروسکوپ فاز متضاد)
شکل a۶: بزرگنمایی ×۶۵



شکل ۶b: بزرگنمایی: x۱۲۰

رنگ‌آمیزی در جا با Alizarin Red S نشان داد که این ندولهای کدر بایستی معدنی شده باشند. با گذشت زمان در نتیجهٔ رسوب مواد معدنی، ندولها متراکم شدند. رنگ Alizarin Red S ابتدا در مرکز ندولها ظاهر شد و سپس با گذشت زمان به‌طرف محیط ندولها گسترش یافت.

بحث

در این تحقیق سلولهای استرومایی مغز استخوان در کشت اولیه پس از گذشت ۳ روز به سطح کشت چسبیده و در روز پنجم کلونیهای سلولی شبه فیبروبلاستی، تشکیل دادند که در انتهای روز هفتم این کلونیها به‌هم متصل شدند. در مطالعات قبلی با استفاده از محیط کشت α-MEM زمان لازم برای تشکیل کلونی شبه فیبروبلاستی هر هفت روز گزارش شده بود (۱۹) که احتمالاً علت این امر مربوط به نوع محیط کشت مورد استفاده است؛ زیرا محیطهای پایه محتوی مواد تغذیه‌ای مختلفی هستند که روی سرعت تقسیم سلولهای استئوژنیک تأثیر می‌گذارند (۲۰).

نتایج حاصل از کشت ثانویه نشان داد که کلونیهای سلولهای استرومایی در نمونه‌های شاهد بعد از ۳ تا ۵ روز بهم می‌پیوندند در حالی که در نمونه‌های آزمایش که Dex در مقادیر فیزیولوژیک (10^{-8} مول) به محیط کشت اضافه شد، کلونیهای سلولی به مرحلهٔ تلاقی نرسیدند و جزایر مجزایی از سلولها را نشان دادند. این مسئله نشان می‌دهد که Dex در این شرایط باعث مهار تزاید سلولهای استرومایی می‌شود. مطالعات قبلی که با MSCs انسانی صورت گرفته بود، نشان می‌داد که افزودن Dex در مقادیر فیزیولوژیک باعث تحریک تزاید سلولهای استرومایی می‌شود (۴) که علت آن می‌تواند مربوط به عملکرد گونه‌های مورد آزمایش در پاسخ‌دهی به Dex باشد.

در روز هشتم، نمونه‌های آزمایشی که حاوی Dex بود، در مراکز جزایر سلولی، تجمعاتی از سلولهای چند سطحی مشاهده شد که با گذشت زمان، تعداد آنها افزایش یافت. مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از هورمونهای گلوکوکورتیکوییدی در محیط کشت سلولهای مغز استخوان، باعث افزایش فعالیتهای متابولیک مانند افزایش سنتز آلکالین فسفاتاز و کلاژن نوع I در MSCs می‌شود که نشانهٔ تمایز این سلولها به سلولهای استئوبلاست است (۱۶، ۱۸). بنابراین به‌نظر می‌رسد که این سلولهای چند سطحی، سلولهای شبه استئوبلاست حاصل از تمایز سلولهای استرومایی باشند. ۲ تا ۳ روز بعد از این مرحله، ساختمانهای ندولی شکل سه بعدی که در زیر میکروسکوپ فاز متضاد کدر به‌نظر می‌رسید، در کشت‌های مورد آزمایش مشاهده شد، که نشان‌دهندهٔ معدنی شدن ندولهای تشکیل شده بود. رنگ‌آمیزی با Alizarin Red S مشخص کرد که معدنی شدن ندولها ابتدا در مرکز اتفاق می‌افتد و سپس به‌طرف محیط گسترش می‌یابد. نکتهٔ قابل تأمل، این است که ندولهای معدنی شده فقط در کشتهایی مشاهده شد که به‌طور همزمان هر دو مادهٔ Dex و Na-βGP به آنها اضافه شده بود. تجارب قبلی (۲۱) نشان داده است که Na-βGP (نوعی فسفات ارگانیک) منبع بالقوه‌ای از یونهای فسفات را در محیط کشت فراهم آورده و موجب معدنی شدن ندولها می‌شود؛ همچنین در حضور Na-βGP استئوبلاستها فعال‌تر شده، کلاژن بیشتری سنتز می‌نمایند (۲۱).

یافته‌های ما با یافته‌های Tibone و Bernard (۲۲) و Howlett و همکارانش (۲۳ و ۲۴) که تشکیل پلاکهای معدنی شده (نه ندولهای شبه استخوانی) را در کشت سلولهای مغز استخوان توصیف کردند و همچنین با یافته‌های Luria و همکارانش که معتقد بودند برای تشکیل ندول استخوانی در محیط کشت حضور کلیهٔ سلولهای مغز استخوان لازم است و سلولهای استرومایی به‌تنهایی قادر به تمایز یافتن به سلولهای استئوبلاست نیستند (۲۵)؛ مغایرت دارد. لازم به توضیح است که روش کار در این تحقیق با روش تحقیق محققین دیگر تفاوتی نداشته و اختلاف تنها در نوع محیط کشت مورد استفاده است. به‌طوری که در این بررسی از محیط کشت DMEM استفاده شد در حالی که محیط کشت مورد استفاده توسط محققین α-MEM بوده است. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که سلولهای استرومایی برای رشد و تمایز خود نیاز به اجزای دیگر مغز استخوان به‌عنوان سلولهای تغذیه‌کننده[1] نداشته باشند.

علاوه بر موارد فوق‌الذکر، تأثیر سرم (FCS) در کشتها نباید نادیده گرفته شود. با توجه به اینکه FCS محتوی هورمونها و فاکتورهای رشدی فراوانی است که در تمایز سلولها دخالت دارند (۲۶)، افزودن Dex به‌عنوان یک مکمل به محیط کشت می‌تواند تأثیر آنها را در تمایز سلولها تشدید نماید.

با استناد به نتایج این مطالعه و با توجه به شیوع ضایعات استخوانی، به‌نظر می‌رسد که تحقیق حاضر زمینه ساز مطالعات و تحقیقات گسترده‌تری باشد که در موارد بالینی بتواند نیازهای مربوطه را برطرف سازد. برای تکمیل این مطالعه، پیشنهاد می‌گردد که روشهای ارزیابی دیگری مانند روشهای هیستوشیمی و بررسیهای فرا ساختمانی به‌کار می‌رود.

1. Feeder cells

References

1. Phoebes Leboy, Jn N Beresford, Carcle Devlin Maureen E Owen: Dexamethasone induction of osteoblast mRNA in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol 1991; 146: 370-378

2. Owen M: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system, WA peack (ed). in: Bone and Mineral/3, 1985

3. Friedenstein AJ: Percursor cells of mechanocytes. INT REV Cytol 1976; 47: 327-359

4. Neelam Jaiswal, Stephen E, Haynesworth, Arnoid I, Ceplan and Scottp, Bruder: Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem cells In Vitro. J Cell Biochem, 1977; 64: 295-312

5. Caplan AI: Mesenchymal Stem cells. J Orthop Res 1993; 9: 641-650

6. Caplan AI: Porous ceramic vechicles for rat-marrow-derived osteogenic cell delivery: effects of pretreatment with fibronection or laminin. J Oral Implantol 1993; 19: 106-115

7. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI: Osteogenesis in marrow- derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted sabcutaneously: effect of fibronection and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant 1992; 1: 23-32

8. Lenon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI: A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the odteochondral potential of rat marrow- derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 1995; 219: 211-222

9. Francis J, Hughes, Christopher AG, Mc Culioch: Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures. Lab Invest 1991; 64: 617-622

10. Kassugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL: Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. J Cell Physiol 1991; 147, 111-120

11. Benyahu D, kletter Y, Zipori D, Wientroub S: Bone marrow - derived stromal cell line expressing Osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo. J Cell Physiol 1989; 140: 1-7

12. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, RM, Rosen V, Wange: Identification transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. Proc Natl Acad Sci, USA 87, 1990; 9843-9847

13. Chen TI, Bates RL, Dudle A, Hammonds RG, Jr, Amento EP: Bone Morphogenic Protein-2 b Stimulation of growth and osteogenic Phenotypes in rat osteoteoblast-lake cells: Comparison with TGF-β. J Bone Miner 1991; Res 6: 1387-1393

14. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, Sanma Y, Bentz H, Rosen DM, Asada A, Ausvki F: Bone morphogenic protenis (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated Phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. J Bone Miner Res 6, 1991; 1373-1385

15. Ktagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Uda T: The nonosteogenic mous pluripotent cell line, C3H10T1L2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenic protein -2. Biochem Biophysi Res Commun 1990; 172: 295-299

16. Yamaguchi A, Katugiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahu AJ, Suda T, Yoshiki S: Recombinant human bone morphogenic protein -2 stimulates osteoblast maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol 1991; 113: 681-687

17. Green S, Chambon P: A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. Nature 1986; 324: 615-617

18. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM: Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. Endocccrinology 1987; 121: 1985-1992

19. Maniatopouls C, Sodek J, Melcher AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats cell tissue. Res 1988; 254: 317-330

20. Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE: Caplan proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow- derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 219: 211-222

21. Tenenbaum HC: Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro. J Dentale Res 1981; 60: 1586-1589

22. Tibone KW, Bernard GW: A new in vitro model of intramembranous osteogenesis from adult bone marrow stem cells. in: Dixon AD, Sarnot BG (eds). Factors and mechanisms influencing bone growth.

Alan R, Liss Inc, New York, 1982, pp 107-123
23. Howlett CR, Owen M, Cave J, Williamson M, Bab I, Maybees, Trifittjt: In vitro mineralization and alkaline phosphatase activity in cultures of rabbit bone marrow cells. Calsif Tissue Int 39 1984; suppl 2: S 67
24. Howlett CR, cave J, Williamson M, Farmer J, Alisy Bab I, Owen ME: Mineralizatoin in in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells. Clin Orthop 1986; 213: 251-263
25. Luria EA, Owen ME, Friedenstin AJ, Morris JE, Kuznetsow SA: Bone Formation in organ cultures of bone marrow. Cell Tissue Re 1987; 248: 449-454
26. Qu Q, Perala M, Heape A, Kapanen J, Dahlluund J, Salo HK, Vaananen, Harkonen P: Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. Bone 1998; 22: 201-209