行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

人類骨髓中胚層幹細胞培養成專業生骨能力的研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC91-2314-B-002-264-
執行期間：91年08月01日至92年07月31日
執行單位：國立臺灣大學醫學院骨科

計畫主持人：林繼昌

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 93年6月26日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

計劃名稱: 人類骨髓中胚層幹細胞培養成專業生骨能力的研究

計劃編號: NSC 91-2314-B-002-264
執行期間: 九十一年八月一日至九十二年七月三十一日
計劃主持人: 林 繼 昌
執行單位: 台灣大學醫學院骨科部

一、中文摘要

臨床上中遇到重大外傷、感染清創或是腫瘤切除後，都會有骨大量缺損的問題發生，過去以骨移植為唯一的利器，而新的策略有很多選擇，乃根據外傷修復和硬骨癒合的必要條件予以增強，其中最重要的組件即為生骨能力細胞。已有研究嘗試於老鼠治療大腿骨幹之分段型缺損，用同源中胚層幹細胞使骨頭再生，其中顯示細胞裝載在多孔性陶瓷材料上後植入動物體缺損區內，可不經軟骨中介階段，產生新生硬骨頭。也有實驗室顯示範可以從人體的骨髓取得中胚層幹細胞，加上有關臨床研究提供了此以人體中胚層幹細胞為根基治療修復長骨幹分段型缺損模型的契機。

本研究計劃目的為建立人類骨髓中胚層幹細胞分離和組織培養的流程，並試驗其生骨的實際能力。直接採用骨外型之實驗，在未具免疫之裸鼠背部皮下植入，同時比較將此幹細胞載入二鈣磷酸鹽陶瓷材料片與否，有否影響其真正生骨之能力，冀求其能在臨床應用有所助益。

實驗內容選擇十位骨科病人抽取骨髓 10 ml，以 Percoll 溶液依密度離心取出低密度細胞層，以 $1x10^7$ 細胞密度平鋪於 60cm^2 培養皿培養，培養液主要內含 10% 胎牛血清、適量抗生素之 DMEM，培養兩至三星期。再將細胞轉入二代次培養 Subculture，培養液加調有 100nM dexamethasone、10nM β-glyerophosphate、0.05mM ascorbic acid 及低葡萄糖濃度之 DMEM，培養十四天。培養過程中，依次做細胞計數、細胞活性、細胞繁殖能力檢測及鹼性磷酸鹽酵素檢測，以做比較。將新鮮骨髓細胞、初級及二代次培養幹細胞，分別裝載到 GTG 載體材料片上，植入於裸鼠背部皮下，從植入後二至四週取下標本，從組織切片驗證其生骨之能力。

研究結果證明可以成功的從人類骨髓中獲得大量的中胚層幹細胞，並可在活體外表現分化生骨能力，同時以 GTG 材料作為移植載體，將人類骨髓中胚層幹細胞移植在裸鼠肌肉下，細胞可以成功地分化增生有生骨能力的細胞，而植入皮下者表現遠不如肌肉植入。顯示在肌肉的環境下，含有能夠持續刺激幹細胞分化增生的因子；也可能是在肌肉中分布的微血管比皮下更多，能提供豐富的養分使細胞生長分化所造成的差異。

關鍵詞：中胚層幹細胞、人類骨髓、磷酸鹽陶瓷、組織培養

Abstracts

Study of osteogenic specificity in cultured human mesenchymal stem cells

Numerous clinical and research proposals erupted in the past two decades for the enhancement of bone formation for the healing in the large bone defect. There are many alternatives concentrated in upgrade one of the cascade in natural bone healing in stead of conventional autogenous bone graft. Osteogenic precursors in the cancellous bone marrows come from the mesenchymal stem cells (MSC) inherent in the body since birth. Several researches reported the success in segmental bone defect in rat by such kind of syngenetic MSC. These cells were loaded in a cermic plate to fill the defect, new bone ingrowth could be seen inside the pore. Human MSC has been also tried in culture expansion with attempt to apply for clinical use. This provide a new approach in the treatment of large bone defect through the research of human MSC.

The present research plan is to build up a human MSC cell bank where MSC can be isolated and multiplicated in culture when we get the bone marrow harvest in clinical cases. Although the culture technique here has been well set up, but the characteristics and potential of human MSC are still unknown at present. In order to examine their osteogenic potential, the heterotopic model in animal is also designed. After loaded in the ceramic plate, they will be implanted on the back subcutaneously for their bone forming capability. Once the cells are proved effective, it will help a great in clinical application.

The experiment starts with aspiration of bone marrows 10ml form 10 clinical patients. The cells in low density layer can be isolated well by way of Percoll solution. Optimal density $1x10^7$ *of the cells are plated on 60* cm^2 *culture dishes with DMEM medium containing 10% FBS, antibiotics. After 2 to 3 weeks, cells are collected and replated for a subculture with 100nM dexamethasone 、 10nM β-glyerophosphate 、 0.05mM ascorbic acid in their medium for another 2 weeks. During the procedure, cell counting, cell viability, cell proliferation capability and alkaline phosphatase assay will be subsequently done. Thre types of cells as fresh marrow cells, primary MSC, secondary MSC are loaded in each GTG carrirer disc. Then the plates were implanted subcutaneously on the back of nude mice, 6 plates for each animal. The animals were followed at 2 to 4 weeks. The plates in certain time of period will be harvest and sent for histological preparation.*

The result has shown that the technique of isolation and culture expansion of human MSC can be steadily obtained in the laboratory, also these cells were capable to differentiate into bone forming cells in vitrofor the potential enhancement in clinical bone healing. In vivo test by implantation the cells with GTG carrier material in the compatible nude mice, potential to present osteoblast and positive bone markers can be well demonstated in the the intramuscular implantation. However, less cells viability and bone forming capability was noted in the subcutaneous implantation. With such a proceeding, we believe clinical application of human MSC for large bone defect is right on the hand.

Keywords：mesenchymal stem cells, human marrow, calcium phosphate ceramics, tissue culture

二、緣由與目的

臨床上中遇到重大外傷，骨幹出現分段型缺損是最難處理的事，其他諸如骨折治療期間發生感染，須以清創刮骨除去感染的骨塊後，或是腫瘤切除後也會有類似的問題發生，過去是以骨移植為主要治療的利器，而新一代的策略則為選擇正常生理狀況下修復和硬骨形成的必要條件再予以提高增強，以達到硬骨癒合的目標。

中胚層幹細胞的研究目前在世界各地如火如荼的展開，每一研究機構均列為優先對象，主要是中胚層幹細胞的潛能無窮，可以分化成各種組織，彌補製造臨床上某器官組織的損失。骨髓中胚層幹細胞是其中最容易取得，並因使用於同一病人，不必有免疫植入反應之顧慮。如能發展骨髓中胚層幹細胞分離和培養技術，並可引導其有分化製造專業細胞的能力，則對臨床上某器官組織的損失的替補，將可提供希望。不只在造骨方面，也可及於軟骨再生、肌肉、韌帶和神經的再造，減少人造器官或關節之依賴。

三、材料與方法

人類骨髓分離之單核細胞 Bone Marrow Isolation Procedure

選擇約十位不同年齡性別不拘之骨科病人，排除其有感染疾病者，紀錄其全血檢查、尿液檢查，事先予以說明並簽署同意書，在實施原骨科手術—骨折固定或關節重建手術之同時，在其前上腸骨脊(anterior superior iliac crest)上抽取骨髓，針筒內潤濕有0.1ml 肝素(1000 單位/ml)鹽水血清溶液，每次抽取 2ml 後將針頭抽出換方位再進入，一共抽取 10 ml。

準備二倍量(20 ml)之 Phosphated Buffered Saline (PBS) (0.01M)與骨髓混合攪拌離心，以 400g 重力速度離心 10 分鐘，上層脂肪層澄清液去除丟棄，取包含 buffet coat 之血球團 pellet 之骨髓 7.5ml，加等量 7.5ml 之 PBS 打散均勻，放入在 70% Percoll(密度 1.075gm/l) 30ml，以 13,000g 重力速度離心 20 分鐘，分別取出低密度細胞及紅血球團塊，用內含 10% 胎牛血清 Fetal Bovine Serum(FBS)、青黴素 G (100 單位/ml)、鏈黴素 (100 μg/ml)與 amphotericin B(0.25 μg/ml))及低葡萄糖濃度的 Dulbecco 修正 Eagle 培養液 (DMEM)沖洗收集，以 $1x10^7$ 細胞密度平鋪於 $60cm^2$ 培養皿，置於 37^oC、95% 空氣、5%CO2 之適度溼度大氣壓環境培養。兩天後患半量培養液，以後每週換兩次，直到長滿全盤培養皿，大約要兩至三星期。

骨髓幹細胞培養 Culture of BM Mesenchymal Stem Cells

將由骨髓分離之單核細胞懸浮液倒在 10 cm culture dish 中培養，以 DMEM with 10% FBS 培養液。將培養將近長滿培養盤的細胞，去除培養基。以 Ca^{++}-free and Mg^{++}-free 的 PBS 清洗細胞層。將培養盤傾斜，吸除上層液。加入 1 ml 之 0.25% trypsin-EDTA，緩緩搖勻，覆蓋到所有細胞，於 37℃作用 5 分鐘。以 1：4 進行繼代培養。

生骨幹細胞培養

二代次培養 Subculture─將長滿全盤培養皿加入含有 1mM EDTA 之 0.25%Trysin 溶液, 於 37^oC 置五分鐘使細胞散開，離心後收集，再培養將 2-5 $\times10^4$ cells 接種到 24 wellculture plate 中，以 1 ml 維持培養基進行培養 1 天, 之後去除培養基, 分別以 1 ml/well 維持培養基（control medium）及生骨培養基（osteogenesis medium：DMEM-Low Glucose +10%FBS +

Dexamethasone + β -Glycerol phosphate + Ascorbic acid + 1%PS）培養 14 天後，進一步進行骨髓中胚層幹細胞生骨及生脂能力測試。

細胞繁殖能力檢測 Cell Proliferation Assay

細胞培養皿以 Tyrodes 平衡鹽溶液清洗兩次, 用 1% gluteraldehyde (v/v) 固定 15 分鐘，在用 deionized 無離子水清洗兩次, 涼乾。然後用 0.1% crystal violet (w/v) in water 染色 30 分鐘，清洗後，加入 1% Triton X-100 在烘培盤轉動 25°C 四小時，使 crystal v iolet 從細胞萃取出來，此 Triton X 萃取液可在 Microplate reader 於 595 nm 光譜下讀出吸光率，再代算出細胞數目。

生脂能力測試

將 $2\text{-}5 \times 10^4$ cells 接種到 24 well culture plate 中, 以 1 ml 維持培養基進行培養 1 天，之後去除培養基，分別以 1 ml/well 維持培養基（control medium）及生脂培養基（adipogenesis medium ： DMEM-High glucose +10%FBS + Isobutyl-1-methyl xanthine + Indomethacin + Dexamethasone + Insulin+1%PS）培養 14 天後，進一步進行骨髓中胚層幹細胞生骨能力測試。

Von Kossa 染色

先將細胞以 2% Paraformaldehyde 固定 30 分鐘, 以 ddH_2O 清洗。以 0.5% Hydroquinone 作用 3 分鐘或以 60-100 watt 日光燈作用 1 小時，直到 Ca^{++}反應變成黑色。以 ddH_2O 清洗 2 次。浸於 5% Hypo 2-5 分鐘，ddH_2O 清洗。以 Mayer’s Hematoxylin 作用 5 分鐘作對比染色，ddH_2O 清洗後觀察結果。

鹼性磷酸鹽酵素染色

先將細胞以 2% Paraformaldehyde 固定 30 分鐘，以 ddH_2O 清洗。以新鮮配製的作用液（含 Naphthol AS phosphate、N,N dimethyl formamide 及 Fast Blue BB salt 的 Tris buffer), 以 0.22 μ m filter 過濾後使用, 0.5 ml/well 於室溫中作用 60 分鐘. 以 ddH_2O 清洗 2 次. 以 Mayer’s Hematoxylin 作用 5 分鐘作對比染色，ddH_2O 清洗後觀察結果。

骨蛋白 Sialoprotein (BSP)染色

標本以 10% formalin 或 2% pareformaldehyde 固定, 以 3% H_2O_2 於室溫中作用 5 分鐘後，以 PBS 清洗。以 Protein Blockng Agent 室溫中作用 5 分鐘，以 rabbit anti-huBSP Ab 覆蓋切片於室溫作用 30 分鐘, 以 PBS 清洗 3 次，加入 Biotinylated Secondary Ab 室溫作用 10 分鐘，以 PBS 清洗 3 次，加入 Streptavidin-peroxidase reagent 室溫作用 10 分鐘，以 PBS 清洗 3 次，加入 DAB (Substrate/chromogen) 作用 15 分鐘以 ddH2O 清洗 2 分鐘。封片後於顯微鏡下觀察呈色。

冷凍細胞與檢體

將所分離之單核細胞或培養之細胞, 以 1000 rpm 離心 10 分鐘。去除培養基，以冷凍培養基(FBS:DMSO=9:1)懸浮後, 細胞密度約 $1x10^6$ cells/ml/vial 裝到冷凍小管中，以-20℃、-80℃緩慢降溫冷凍，最後移至液態氮筒進行長期保存。

活體細胞載體植入試驗

細胞載體 GTG

移植之 MSC 吸附材料為 GTG 多

孔性材質（孔隙大小：100-150 μm；孔隙度：75%），由台大醫工所林峰輝教授所提供。將材料剪裁成直徑 5mm 厚度 5mm 之圓盤，以 PBS 浸泡後，以高溫高壓滅菌 30 分鐘後，以生骨培養基於 37℃浸泡過夜後，再進行細胞接種。

細胞接種載體 GTG

培養所得之 BM MSC（第三代），1╳10^6 cells 以生骨培養基懸浮後接種到每個材料上，於 37℃，5%CO_2 培養 48 小時後進行移植，未接種細胞之材料為對照組。

動物手術程序

選擇未有免疫功能之裸鼠(Nude mice)，作為人類骨髓中胚層幹細胞植入之對象，實驗以直接採用骨外型(heterotropic)之植入方式，即在裸鼠背部皮下植入，以試驗其真正生骨之能力大。植入的方式包括細胞載體 GTG 不含細胞、載入細胞、細胞再分為新鮮骨髓細胞、初級骨髓幹細胞及次級骨髓幹細胞三種，最後關上傷口。以乙醚進行麻醉後將處理過的材料放到裸鼠體內，分別將材料移植到大腿之肌肉內以及脊椎兩側之皮下進行測試。於三週後取出進行各項檢測。

組織學和組織形態學分析

動物在八週前植入物直接由手術部位取出後，以 10%緩衝福爾馬林液固定，以 DeCal 脫鈣液脫鈣六小時以上，然後經過脫水、清潔，用石蠟包埋，用 Hemtoxylin & Eosin 染色法染色，薄切下 5μm 厚之切片標本觀察。第八週犧牲後之標本已未脫鈣組織片製作，以 70% ethanol 液固定，在一序列不等濃度酒精脫水及脫脂後，以樹脂 methyl methacrylate 包埋，用 Villanueva’s 染色法染色，用 microtome 薄切下 7μm 厚之切片，標本在光學及螢光顯微鏡下觀察。組織形態學分析，觀察測量植入陶瓷材料片、骨頭和軟組織佔有的區域面積，最後使用 Student’s t 測驗分析資料。

結果

骨髓中胚層幹細胞培養

在初步實驗中，我們從 15-30 歲成年人抽取 15-20ml 骨髓，經分離之單核細胞數範圍在 4.8╳10^7 cells 到 7.1╳10^7 cells（mean=5.84╳10^7 cells，n=12），以 2.5╳10^5 cells/cm_2 於 10 cm 細胞培養盤中進行培養，3 天後會出現呈纖維母細胞狀(fibroblast-like)的吸附細胞群落，去除未吸附之細胞，以新鮮培養基繼續培養，每 3-4 天進行培養基更換，約 14 天可以進行繼代培養，之後平均每 5-7 天繼代培養，以維持培養基約可培養至 12-13 代。平均長滿 10 cm 細胞培養盤可獲得 1.31╳10^6 cells/dish。

體外培養幹細胞生骨能力之分析

為了進一步測試所得到的骨髓中胚層幹細胞分化成骨細胞的能力，我們將 2-5╳10^4 cells 接種到 24 well culture plate 中，以 1 ml 維持培養基進行培養 1 天，之後去除培養基，分別以 1 ml/well 維持培養基（Control medium）及生骨培養基（Osteogenesis medium）培養 7 天後，進一步進行骨髓中胚層幹細胞生骨能力測試。實驗結果發現，在維持培養基的對照培養下，所得到的細胞經過生骨培養基環境刺激 7 天之後，骨髓中胚層幹細胞表現 ALP 的能力明顯增加。

實驗中為了同時了解所得到的細胞是否具有多重分化的能力，我們將 2-5

×10^4 cells 接種到 24 well culture plate 中，以 1 ml 維持培養基進行培養 1 天，之後去除培養基，分別以 1 ml/well 維持培養基（Control medium）及生脂培養基（Adipogenesis medium）培養 14 天後，進行 oil red 染色分析。實驗結果亦顯示，在生脂培養基的環境刺激下，我們所得到的細胞確實同時具有能分化成脂肪細胞的能力。

活體培養幹細胞生骨能力之分析

培養所得之 BM MSC（第三代），1×10^6 cells 以 50μl 生骨培養基懸浮後接種到在 96 well culture plate 的每個材料上，於 37℃，5% CO_2 培養 48 小時後分別移植到裸鼠的皮下以及肌肉下，21 天後取出材料，進行石蠟包埋與切片染色各項分析。

在活體外（Day 0）的實驗結果中，我們起初接種的骨髓中胚層幹細胞雖然僅分佈在部分材料孔隙中，然而在生骨培養基的環境刺激下，已經可以看出細胞開始表現骨涎蛋白（Bone sialoprotein, BSP）。經過活體內 21 天後觀察發現，移植到裸鼠肌肉下的骨髓中胚層幹細胞已經長滿整個 GTG 材料的空隙，而且在 BSP 的抗體染色結果亦呈陽性反應，不但確定了在 GTG 材料空隙中的細胞的確是我們所接種的人類骨髓中胚層幹細胞，同時顯示這些幹細胞在裸鼠肌肉環境下具有能分化成骨細胞的能力。在活體實驗中，我們同時將含有人類骨髓中胚層幹細胞的 GTG 材料移植於裸鼠皮下，然而經過 21 天之後，GTG 孔隙中的人類骨髓中胚層幹細胞細胞消失，而有部分裸鼠結締組織黏附在 GTG 上；未接種人類骨髓中胚層幹細胞的 GTG 亦無細胞。

骨髓內含核部份細胞雖富含中胚層幹細胞，但亦含有其他細胞會影響預期生長及生骨能力，中胚層幹細胞的特性是類似纖維母細胞樣，較易粘附在塑膠或玻璃細胞培養皿上，不粘附細胞可在培養初期因浮懸而可以排除，但更精確的是經由密度分層離心法分離所要的中胚層幹細胞。用 Percoll 溶液可以達到此目標。

初級培養所得之細胞較雜，繁殖及骨閒質鹼性磷酸鹽酵素的標記染色均較差，二代次培養 Subculture 將可得到較純、固定生長速度之中胚層幹細胞。本研究即將比較新鮮骨髓細胞、初級骨髓幹細胞及次級骨髓幹細胞三種不同來自骨髓之細胞，可以驗證那一類型細胞確實真正生骨能力。在過去兩年以老鼠及兔為對象，發現小動物生骨能力相當強，在向骨型(orthotropic)之實驗中，生骨來源除了所供給之細胞外，原有之骨膜及軟組織之中胚層來源之細胞都會加入生骨陣容，容易發生混淆。此次實驗中則是直接採用骨外型(heterotropic)之實驗，在未具免疫之裸鼠背部皮下植入，真正具有生骨能力，有骨誘導作用者(osteoinduction) 的細胞始能產生新骨細胞長入現象。

討論

在本研究中，分離骨髓中胚層幹細胞的方式是直接利用其吸附特性來獲得幹細胞。不同於目前許多研究，嘗試以幹細胞表面特定抗原表現來進行篩選。在體外培養幹細胞的分化能力各項分析結果中，我們發現在尚未刺激誘導幹細胞分化的培養之下，我們的細胞已有少數 ALP 的表現，可能原因在於 a)以吸附方式分離得到的細胞為許多種細胞所組成；b)得到的細胞

可能含有不同程度分化的中胚層幹細胞及生骨母細胞等。如何確定這些細胞究竟處於哪一個階段，有待進一步實驗確定。而以抗體分離篩選的骨髓中胚層幹細胞，目的在於純化特定幹細胞，兩者對於臨床應用的最大效益仍需進一步探討。同時，我們選擇以15到30歲的青壯年病患作為抽取健康骨髓的限制，對於幹細胞數目與抽取骨髓年齡的關係，並無進一步探討。

研究中，我們初步嘗試以GTG材料作為移植載體，骨髓中胚層幹細胞在接種時並未均勻分布到材料上，未來更希望能以組織工程的方式改善體外培養的技術。

研究發現，我們將人類骨髓中胚層幹細胞移植在裸鼠肌肉下，細胞可以成功地分化增生，顯示在肌肉的環境下，含有能夠持續刺激幹細胞分化增生的因子；也可能是在肌肉中分布的微血管比皮下更多，能提供豐富的養分使細胞生長分化所造成的差異。

結論

本研究計畫主要目標是人類骨髓中胚層幹細胞分離和培養，並且要測試此類細胞分化專業細胞的能力，本研究計畫主要培養基內之成分如 Dex, Glyerol,Ascorbic Acid 較容易取得，特殊之生長因子可能更有誘導能力，先從較經濟之藥物著手，若得到相同生骨能力，便可省略昂貴之生長因子之測試。本研究計畫預期目標是經由次級培養，建立有專業生骨能力的骨髓中胚層幹細胞株，使其具有臨床應用意義。人體的骨髓取得中胚層幹細胞，加上有關臨床研究提供了此以人體中胚層幹細胞為根基治療修復長骨幹分段型缺損模型的契機。

在本研究中，我們成功的從人類骨髓中獲得中胚層幹細胞，同時證明了幹細胞在活體外以及活體內的分化能力。然而，如何去有效控制幹細胞在移植後的分化程度以及延長幹細胞在移植後的再生能力仍是臨床上的一大難題，許多研究正嘗試以基因轉殖的方式來克服。

參考文獻：

[1] Hollinger, J. O.; Brekke, J.; Gruskin, E.; and Lee, D.: Role of bone substitutes. Clin. Orthop., 324: 55-65, 1996

[2] Holmes, R. E.; Bucholz, R. W.; and Mooney, V.: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. J. Orthop. Res., 5: 114-121, 1987

[3] Johnson, K. D.; Frierson, K. E.; Keller, T. S.; Cook, C.; Scheinberg, R.; Zerwekh, J.; Meyers, L.; and Sciadini, M. F.: Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. J. Orthop. Res., 14: 351-369, 1996

[4] Martin, R. B.; Chapman, M. W.; Holmes, R. E.; Sartoris, D. J.; Shors, E. C.; Gordon, J. E.; Heitter, D. O.; Sharkey, N. A.; and Zissimos, A. G.: Effects of bone ingrowth on the strength and non-invasive assessment of a coralline hydroxyapatite material. Biomaterials, 10: 481-488, 1989.

5 Zardiackas, L. D.; Teasdall, R. D.; Black, R. J.; Jones, G. S.; St. John, K. R.; Dillon, L. D.; and Hughes, J. L.: Torsional properties of healed canine diaphyseal defects grafted with a fibrillar collagen and hydroxyapatite/tricalcium phosphate composite. J. Appl. Biomater., 5: 277-283, 1994.

[6] Zardiackas, L. D.; Teasdall, R. D.; Black, R. J.; Jones, G. S.; St. John, K. R.; Dillon, L. D.; and Hughes, J. L.: Torsional properties of healed canine

diaphyseal defects grafted with a fibrillar collagen and hydroxyapatite /tricalcium phosphate composite. J. Appl. Biomater., 5: 277-283, 1994.

[7] Cook, S. D.; Baffes, G. C.; Wolfe, M. W.; Sampath, T. K.; and Rueger, D. C.: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. Clin. Orthop., 301: 302-312, 1994.

[8] Gerhart, T. N.; Kirker-Head, C. A.; Kriz, M. J.; Holtrop, M. E.; Hennig, G. E.; Hipp, J.; Schelling, S. H.; and Wang, E.: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. Clin. Orthop., 293: 317-326, 1993.

[9] Hunt, T. R.; Schwappach, J. R.; and Anderson, H. C.: Healing of a segmental defect in the rat femur with use of an extract from a cultured human osteosarcoma cell-line (Saos-2). A preliminary report. J. Bone and Joint Surg., 78-A: 41-48, Jan. 1996.

[10] Mayer, M.; Hollinger, J.; Ron, E.; and Wozney, J.: Maxillary alveolar cleft repair in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a polymer carrier. Plast. and Reconstr. Surg., 98: 247-259, 1996.

[11] Schmitz, J. P., and Hollinger, J. O.: The critical sized defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin. Orthop., 205: 299-308, 1986.

[12] Stevenson, S.; Cunningham, N.; Toth, J.; Davy, D.; and Reddi, A. H.: The effect of osteogenin (a bone morphogenetic protein) on the formation of bone in orthotopic segmental defects in rats. J. Bone and Joint Surg., 76-A: 1676-1687, Nov. 1994.

[13] Yasko, A. W.; Lane, J. M.; Fellinger, E. J.; Rosen, V.; Wozney, J. M.; and Wang, E. A.: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. J. Bone and Joint Surg., 74-A: 659-670, June 1992.

[14] Bruder, S. P.; Fink, D. J.; and Caplan, A. I.: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. J. Cell. Biochem., 56: 283-294, 1994.

[1]5 Bruder, S. P.; Kurth, A. A.; Shea, M.; Hayes, W. C.; Jaiswal, N.; and Kadiyala, S.: Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res., 16: 155-162, 1998.

[16] Caplan, A. I., and Bruder, S. P.: Cell and molecular engineering of bone regeneration. In Textbook of Tissue Engineering, pp. 603-618. Edited by R. Lanza, R. Langer, and W. Chick. Georgetown, Texas, R. G. Landes, 1997.

[17] Dennis, J. E.; Haynesworth, S. E.; Young, R. G.; and Caplan, A. I.: Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant., 1: 23-32, 1992.

18 Goshima, J.; Goldberg, V. M.; and Caplan, A. I.: The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. Clin. Orthop., 269: 274-283, 1991.

[19] Haynesworth, S. E.; Goshima, J.; Goldberg, V. M.; and Caplan, A. I.: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone, 13: 81-88, 1992.

[20] Kadiyala, S.; Jaiswal, N.; and Bruder, S. P.: Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. Tissue Eng., 3: 173-185, 1997.

[21] Kadiyala, S.; Young, R. G.; Thiede, M. A.; and Bruder, S. P.: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant., 6: 125-134, 1997.

[22] Ohgushi, H.; Goldberg, V. M.; and

Caplan, A. I.: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramics. Experiments in rats. Acta Orthop. Scandinavica, 60: 334-339, 1989.
[23] Caplan, A. I.: Mesenchymal stem cells. J. Orthop. Res., 9: 641-650, 1991
[2]4 Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; and Haynesworth, S. E.: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J. Cell. Biochem., 64: 278-294, 1997.
[25] Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; and Bruder, S. P.: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J. Cell. Biochem., 64: 295-312, 1997.
[26] Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; and Yoo, J. U.: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exper. Cell Res., 238: 265-272, 1998.
[27] Lennon, D. P.; Haynesworth, S. E.; Bruder, S. P.; Jaiswal, N. J.; and Caplan, A. I.: Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation. In Vitro Cell. and Devel. Biol., 32: 602-611, 1996.
[28] Majumdar, M. K.; Thiede, M. A.; Mosca, J. D.; Moorman, M. K.; and Gerson, S. L.: Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J. Cell. Physiol., 176: 57-66, 1998.
[2]9 Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; and Beck, S. C.: Human mesenchymal stem cells can be directed into chondrocytes, adipocytes and osteocytes [abstract]. Molec. Biol. Cell, 7: 305a, 1996.
[30] Wakitani, S.; Saito, T.; and Caplan, A. I.: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle and Nerve, 18: 1417-1426, 1995.
[31] Young, R. G.; Butler, D. L.; Weber, W.; Gordon, S. L.; and Fink, D. J.: Mesenchymal stem cell-based repair of rabbit Achilles tendon. Trans. Orthop. Res. Soc., 22: 249, 1997.
32 Caplan, A. I.; Fink, D. J.; Goto, T.; Linton, A. E.; Young, R. G.; Wakitani, S.; Goldberg, V. M.; and Haynesworth, S. E.: Mesenchymal stem cells and tissue repair. In The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts, pp. 405-417. Edited by D. W. Jackson, S. P. Arnoczky, S. L-Y. Woo, C. B. Frank, and T. M. Simon. New York, Raven Press, 1993.
[33] Saito, T.; Dennis, J. E.; Lennon, D. P.; Young, R. G.; and Caplan, A. I.: Myogenic expression of mesenchymal stem cells within myotubes of mdx mice in vitro and in vivo. Tissue Eng., 1: 327-343, 1995.
[34] Wakitani, S.; Goto, T.; Pineda, S. J.; Young, R. G.; Mansour, J. M.; Caplan, A. I.; and Goldberg, V. M.: Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J. Bone and Joint Surg., 76-A: 579-592, April 1994.
35 Ohgushi H, Okumura M: Osteogenic capacity of rqt and human marrow cells in porous ceramic. Acta Orthop Scan 61:431-4, 1990.