

## القای استخوانسازی در کشت سلولهای استرومایی مغز استخوان رت توسط دگزامتازون

مهدی نیکبخت<sup>Ph.D.</sup>، محمد اکبری<sup>Ph.D.</sup>، علیقلی سبحانی<sup>Ph.D.</sup>\*، حسن مرزبان<sup>Ph.D.</sup>\*،  
بهروز نیک نفس<sup>Ph.D.</sup>\*

\* دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

\* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۲۳۱۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریح

### چکیده

**هدف:** استفاده از هورمون دگزامتازون برای القای استخوان سازی (Osteogenic Differentiation) در سلولهای

استرومایی مغز استخوان رت و ایجاد ندول استخوانی در محیط کشت *In Vitro*

**مواد و روشها:** سلولهای مغز استخوان از رنهای نر بالغ (۴ تا ۶ هفتگی) نژاد Spruge-Dawely به دست آمد و به مدت ۷ روز در کشت اولیه رشد داده شد. سپس سلولهای استرومایی مغز استخوان پاساژ داده شده و به مدت 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) آنتی بیوتیکها و اسید آسکوربیک تکمیل شد. در گروههای آزمایش به محیط فوق الذکر، ۸-۱۰ مول به دگزامتازون (DEX: Dexametjapsme) تنهایی یا همراه با ۱۰ میلی مول پتاگلیبروفنات سدیم (Na-βGP: Na-βGlycerophosphate) اضافه شد. کشتها به طور روزانه توسط میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شد. برای تشخیص دقیق سلولها از رنگ آمیزی تولوئیدین بلو و کربزیل و پولات استفاده شد و رنگ آمیزی با Alizarin Red S برای مشخص نمودن ندولهای معدنی شده به کار رفت.

**یافته‌ها:** در کشتهای اولیه، سلولهای استرومایی تا روز پنج تشکیل کلونی دادند و تا انتهای روز هفت، کلونیاها بهم متصل شدند. در کشتهای ثانویه فاقد Dex، کلونیاها سلولهای استرومایی تشکیل شده در روز دوم پس از سه تا پنج روز بهم متصل شدند ولی در حضور Dex کلونیهایی سلولهای استرومایی تشکیل شده در روز دوم پس از سه تا پنج روز بهم متصل شدند. 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.

**نتیجه گیری:** حضور Dex و Na-βGP به طور همزمان در محیط کشت منجر به تشکیل ندول استخوانی می شود. از این سیستم کشت می توان برای مطالعات دیگر از قبیل بررسی تأثیرات هورمونی بر روی روند استخوان سازی بهره مند شد.

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

## مقدمه

برای بازسازی مجدد استخوانها<sup>۱</sup> و ترمیم شکستگیهای استخوانی نیاز به منبعی از سلولهای استئوبلاست است که یکی از مهمترین منابع تأمین کننده این سلولها، مغز استخوان (BM)<sup>۲</sup> 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 ریشه مزانشیمی (MSCs) چند استعدادی گفته می شوند و تحت تأثیر فاکتورهای مناسب قادر هستند به سلولهای پروژنیاتور مزانشیمی تمایز یابند (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰).

فاکتورهای متعددی شناخته شده اند که دارای تأثیرات تنظیمی روی فعالیت سلولهای استئوبلاست و پیش سازهای آنها هستند. گلوکوکورتیکوئیدها و پروتئینهای شکل دهنده استخوان (BMPs)<sup>۳</sup> از جمله عواملی هستند که بیان نشانگرهای فنوتیپیک استئوبلاست را در استئوبلاستهای نابالغ و پیش سازهای آنها القا می نمایند (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶).

مکانیسمهایی که توسط آنها گلوکوکورتیکوئیدها روی استخوانسازی تأثیر می گذارند، کامکان تحت بررسی است؛ به هر حال گلوکوکورتیکوئیدها بیان ژنسی را در تمایز سلولها تنظیم می نمایند (۴). نشان مطالعات هدفی *in vivo* و *in vitro* داده است که سلولهای استخوان برای هورمونهای گلوکوکورتیکوئیدی بوده و این هورمونها بر روی ترزاید و تمایز سلولهای استوژنیک تأثیر می گذارند (۲) که این تأثیر بسته به گونه های مختلف حیوانی و همچنین مقدار هورمون مورد استفاده متفاوت است (۵).

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

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

همچنین می توان از سلولهای استئوپروژنیاتور و ندولهای استخوانی حاصل از آنها برای موارد بالینی مانند ترمیم ضایعات استخوانی بهره مند شد.

## مواد و روشها

### جمعیت مورد مطالعه

در این پروژه، نمونه های مغز استخوان از استخوان ران

رتسهای نسر بالغ (سن ۴ تا ۶ هفتگی به وزن ۱۲۰-۱۰۰ گرم) نژاد Spruge-Dawely به دست آمد (۱۱، ۱۲، ۱۳). در مجموع از ۲۴ سر رت در ۴ گروه شش تایی (دو گروه شاهد و دو گروه آزمایش) استفاده شد.

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

۲- گروه شاهد شماره ۲: کشت اولیه سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویه سلولهای استرومایی با اضافه کردن ۱۰ میلی مول Na-βGP

۳- گروه آزمایش شماره ۱: کشت اولیه سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویه سلولهای استرومایی با اضافه نمودن ۸-۱۰ مول Dex

۴- گروه آزمایش شماره ۲: کشت اولیه سلولهای مغز استخوان، سپس کشت ثانویه سلولهای استرومایی با اضافه کردن ۱۰ میلی مول Na-βGP و ۱۰<sup>-۸</sup> مول Dex به طور همزمان (۱۷، ۱۸)

### تهیه سلولهای مغز استخوان

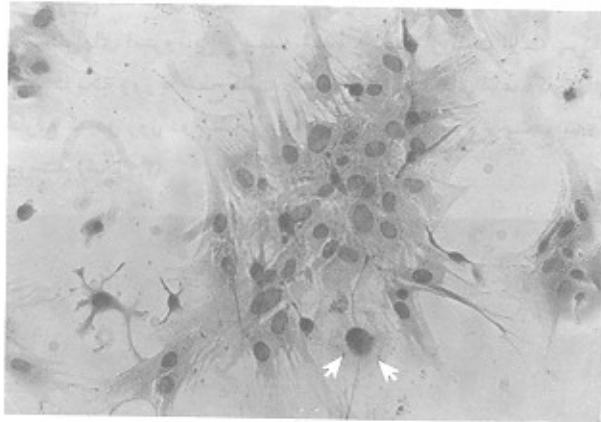
حیوانات با استفاده از کلروفرم (Over dose) کشته شده و استخوانهای ران آنها در شرایط استریل خارج و باقیهای نرم آنها به دقت جدا شد. سپس چهار مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در HBSS<sup>۴</sup> که محتوی غلظت بالای از آنتی بیوتیکها بود، شستشو داده شد. برای تخلیه مغز استخوان، انتهای پروگزیمال و دیستال استخوانها، توسط استخوان بر طرف قطع شد و مغز استخوان توسط سرنگ ۱۰ میلی لیتری (محتوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت) و از طریق سوزن نمره ۲۰ به داخل فلاسک پلاستیکی ۷۵ سانتی متر مربعی (۲۵۰ میلی لیتری) تخلیه شد. برای تهیه سوسپانسیون سلولی، سلولها به وسیله طریق سوزن نمره ۲۰ چند مرتبه آسیبه شدند (۱۰، ۱۱، ۱۸).

### کشت اولیه سلولهای مغز استخوان

بعد از تهیه سوسپانسیون سلولی از مغز استخوان، سلولها به مدت یک هفته در فلاسک ۷۵ سانتی متر مربعی (محتوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM) در یک اتمسفر مرطوب (محتوی ۹۵ درصد هوا، ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت نسی ۱۰۰ درصد و درجه حرارت ۳۷ سانتی گراد) انکوبه شدند. به این محیط کشت ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS) و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسید آسکوربیک و آنتی بیوتیکها اضافه شد.

آنتی بیوتیکهای مورد استفاده شامل: ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پنی سیلین G، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین سولفات و ۳ درصد میکروگرم در میلی لیتر فونجیزون بود (۱۹).

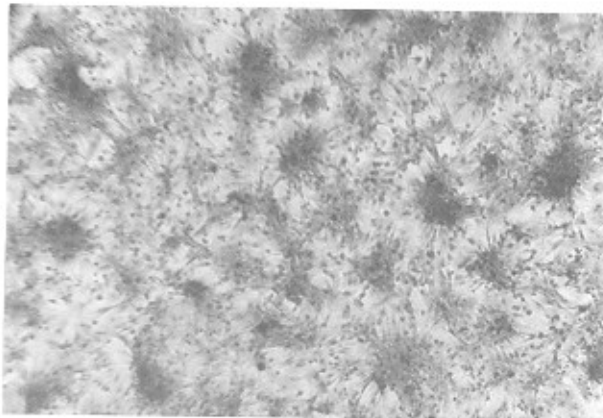
1. Bone remodeling
2. Bone Marrow
3. Bone Morphogenic Proteins
4. Hanks Balanced Salt Solution



شکل 1b: کلونی سلولهای استرومایی در روز پنجم

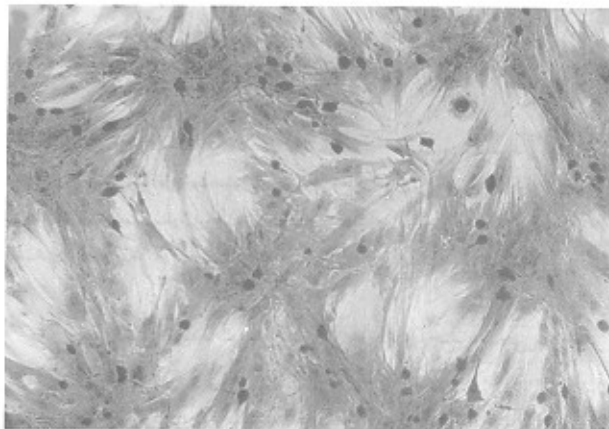
به سلول گرد دکهسته‌ای (↑) توجه کنید (رنگ‌آمیزی کریزیل ویولت - میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگنمایی: ×۱۲۰)

کلونهای سلولی در کشت اولیه تا انتهای روز هفتم به هم متصل شدند. (شکل ۲)



شکل ۲: کشت اولیه سلولهای استرومایی در روز هفتم

کلونهای سلولی به هم متصل شده و یک لایه سلولی را در سطح کشت تشکیل داده‌اند (میکروسکوپ فاز متضاد). شکل 2a: رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی: ×۶۵



شکل 2b: رنگ‌آمیزی کریزیل ویولت، بزرگنمایی: ×۱۲۰

### 1. Ethylenediamine Tetraacetic Acid

### \* کشت ثانویه سلولهای استرومایی مغز استخوان

بعد از گذشت یک هفته از کشت اولیه، سلولهای استرومایی مغز استخوان با استفاده از تریپسین ۲۵/۰ درصد همراه با ۱ میلی مول EDTA<sup>۱</sup> از سطح کشت جدا شد (۱). سپس سلولها توسط هماسیتومتر شمارش شده و در فلاسک پلاستیکی ۲۵ سانتی متر مربعی (۵۰ میلی لیتری) در تراکمی برابر با  $4 \times 10^3$  سلول در ۲۵ سانتی متر مربع ( $1 \times 10^5$  سلول در هر فلاسک) در محیط کشت DMEM که حاوی FCS، اسید اسکوربیک و آنتی بیوتیکها (به میزانی برابر با مقادیر استفاده شده در کشت اولیه) بود، به مدت ۲۰ روز کشت داده شد. در گروههای آزمایش به محیط فوق الذکر،  $10^{-8}$  مول Dex به تنهایی یا همراه با ۱۰ میلی مول Na-βGP اضافه شد.

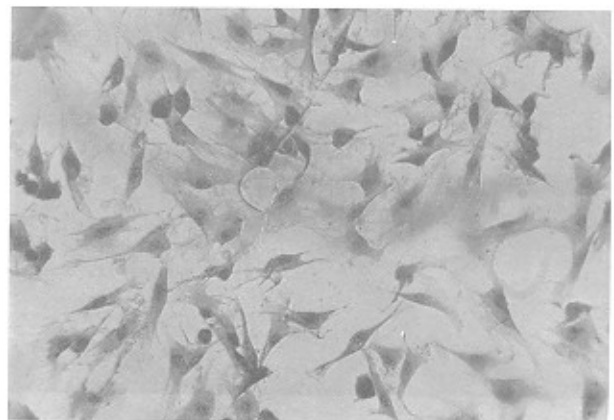
### \* بررسی کشتها

۱- کشتهای اولیه و ثانویه هر روز روزانه با میکروسکوپ فاز متضاد بررسی شدند. برای تشخیص دقیق سلولها، برخی از کشتها به طور درجا توسط الکل ۷۰ درصد تثبیت شده و با تولوئیدین بلو یا کریزیل ویولت ۱ درصد رنگ آمیزی شدند.  
۲- برای تشخیص ندولهای معدنی شده کشتهای ثانویه در روز ۱۵ و ۲۰ به طور درجا توسط الکل ۷۰ درصد تثبیت شده و توسط Alizarin Red S یک درصد، رنگ آمیزی شدند.

### یافته‌ها

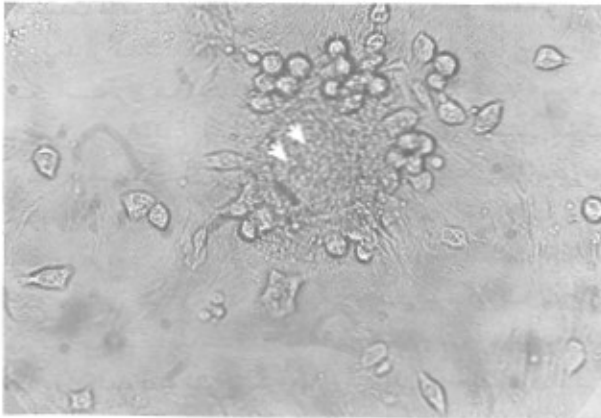
#### \* نتایج حاصل از کشت اولیه

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

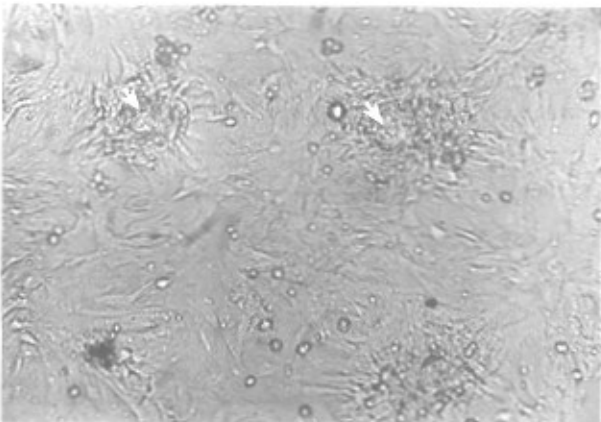


شکل 1a: کشت اولیه سلولهای استرومایی مغز استخوان در روز سوم

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

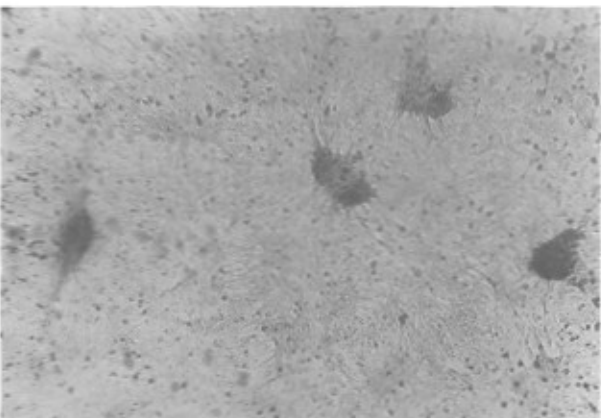


شکل ۵: کشت ثانویه سلولهای استرومایی در حضور Dex در روز هشتم به تیمعات ساوهای چند سطحی در مرکز کوشی توجه کنید (میکروسکوپ فاز متضاد) شکل ۵۵: بزرگمایی ۱۲۰x



شکل ۵۵: بزرگمایی ۳۶۵x

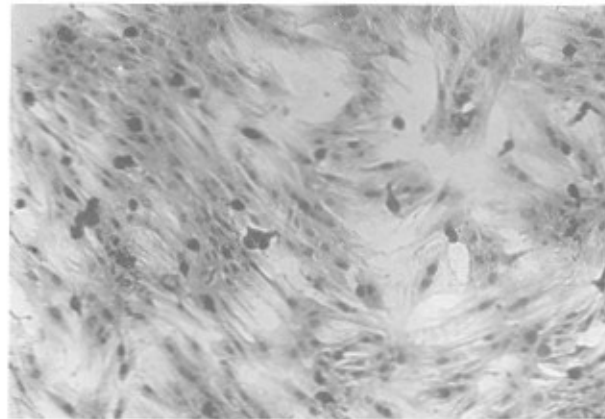
ساختمانهای ندولی شکل سه بعدی که در ظاهر کدر بودند، ۲ تا ۳ روز بعد در کشتهایی مشاهده شدند که هر دو ماده Dex و Na-βGP به طور همزمان ستفاده شده بود (شکل ۶).



شکل ۶: ندولهای استخوانی تشکیل شده در محیط کشت در روز چهارم (رنگآمیزی: Alizarin Red S، میکروسکوپ فاز متضاد) شکل ۶۵: بزرگمایی ۳۶۵x

### \* نتایج حاصل از کشت ثانویه

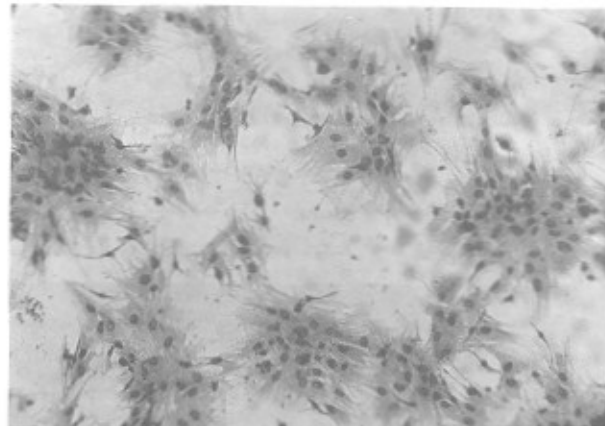
سلولهای استرومایی تریپسین شده حاصل از کشت اولیه پس از گذشت یک روز به سطح کشت چسبیدند. در نمونه‌های شاهد، کلونهای سلولی که در روز دوم تشکیل شده بود، در روز سوم تا پنجم به هم پیوستند (شکل ۳).



شکل ۳: کشت ثانویه سلولهای استرومایی در روز پنجم (نمونه شاهد، رنگآمیزی کریزیل ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگمایی: ۱۲۰x)

کلونهای سلولی در نمونه‌هایی که در حضور Dex به تنهایی یا همراه با Na-βGP کشت داده شدند به مرحله تلاقی نرسیدند. این کشتهای جزایر مجزا یا به هم متصل شده‌ای از سلولها را تشکیل دادند که به میزان وسیعی روی سطح فلاسک پراکنده شده بودند (شکل ۴).

۵۸



شکل ۴: کشت ثانویه سلولهای استرومایی در روز پنجم در حضور Dex توجه کنید که کلونهای سلولی به هم متصل نشده‌اند (رنگآمیزی کریزیل ویولت، میکروسکوپ فاز متضاد، بزرگمایی ۱۲۰x)

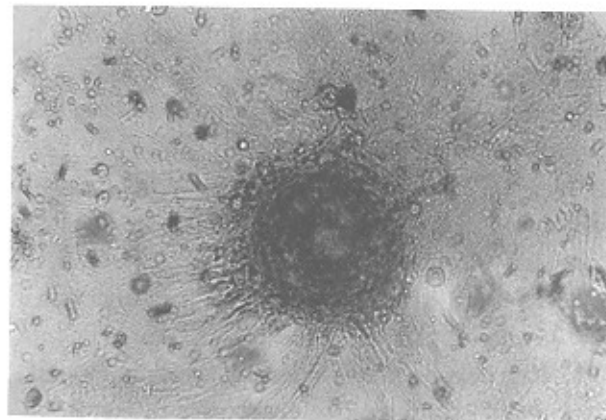
در روز هشتم تجمعات متراکمی از سلولهای چند سطحی در مرکز این جزایر مشهود بود ولی در انواع دیگر کشتهای ثانویه مشاهده نشد. این تجمعات در یک صحنه کانونی متمایز از صفحه چند لایه سلول مجاور قرار گرفته بود و با گذشت زمان، اندازه آن افزایش یافت (شکل ۵).

با گذشت زمان، تعداد آنها افزایش یافت. مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از هورمونهای گلوکوکورتیکوئیدی در محیط کشت سلولهای مغز استخوان، باعث افزایش فعالیتهای متابولیک مانند افزایش سنتز آلکالین فسفاتاز و کلاژن نوع I در MSCs می شود که نشانه تمایز این سلولها به سلولهای استئوبلاست است (۱۶، ۱۸). بنابراین به نظر می رسد 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 میکروکوپ فاز متضاد کدر به نظر می رسید، در کشت های مورد آزمایش مشاهده شد، که نشان دهنده معدنی شدن ندولهای تشکیل شده بود. رنگ آمیزی با Alizarin Red S مشخص کرد که معدنی شدن ندولها ابتدا در مرکز اتفاق می افتد و سپس به طرف محیط گسترش می یابد. نکته قابل تأمل، این است که ندولهای معدنی شده فقط در کشتهایی مشاهده شد که به طور همزمان هر دو ماده Dex و Na-βGP به آنها اضافه شده بود. تجارب قبلی (۲۱) نشان داده است که Na-βGP (نوعی فسفات ارگانیک) منبع القوه ای از یونهای فسفات را در محیط کشت فراهم آورده و موجب معدنی شدن ندولها می شود؛ همچنین در حضور Na-βGP استئوبلاستها فعال تر شده، کلاژن بیشتری سنتز می نمایند (۲۱).

یافته های ما با یافته های 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 یافته های Luria و همکارانش که معتقد بودند برای تشکیل ندول استخوانی در محیط کشت حضور کلیه سلولهای مغز استخوان لازم است و سلولهای استرومایی به تنهایی 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. به طوری 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 به نظر می رسد که سلولهای استرومایی برای رشد و تمایز خود نیاز به اجزای دیگر مغز استخوان به عنوان سلولهای تغذیه کننده<sup>۱</sup> نداشته باشند.

علاوه بر موارد فوق الذکر، تأثیر سرم (FCS) در کشتهای نباید نادیده گرفته شود. با توجه به اینکه FCS حاوی هورمونها و فاکتورهای رشدی فراوانی است که در تمایز سلولها دخالت دارند (۲۶)، افزودن Dex به عنوان یک مکمل به محیط کشت، می تواند تأثیر آنها را در تمایز سلولها تشدید نماید.

با استناد به نتایج این مطالعه و با توجه به شیوع ضایعات استخوانی، به نظر می رسد که تحقیق حاضر زمینه ساز مطالعات و تحقیقات گسترده تری باشد که در موارد بالینی بتواند نیازهای مربوطه را برطرف سازد. برای تکمیل این مطالعه، پیشنهاد می گردد که روشهای ارزیابی دیگری مانند روشهای هیستوشیمی و بررسیهای فرا ساختمانی به کار می رود.



شکل ۱۶: بزرگنمایی ×۱۲۰

رنگ آمیزی در جا با Alizarin Red S نشان داد که این ندولهای کدر بایستی معدنی شده باشند. با گذشت زمان در نتیجه رسوب مواد معدنی، ندولها متراکم شدند. رنگ Alizarin Red S ابتدا در مرکز ندولها ظاهر شد و سپس با گذشت زمان به طرف 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 کلونهای سلولی شبه فیروبلاستی، تشکیل دادند که در انتهای روز هفتم این کلونها به هم متصل شدند. در مطالعات قبلی با استفاده از محیط کشت α-MEM زمان لازم برای تشکیل کلونی شبه فیروبلاستی 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 تغذیه ای مختلفی هستند که روی سرعت تقسیم سلولهای استئوزئیک تأثیر می گذارند (۲۰).

نتایج حاصل از کشت ثانویه نشان داد که کلونهای سلولهای استرومایی در نمونه های شاهد بعد از ۳ تا ۵ روز بهم می پیوندند در حالی که در نمونه های آزمایش که Dex در مقادیر فیزیولوژیک (۱-۱۰ مول) به محیط کشت اضافه شد، کلونهای سلولی به مرحله تلاقی نرسیدند و جزایر مجزایی از سلولها را نشان دادند. این مسئله نشان می دهد که Dex در این شرایط باعث مهار تزیاید سلولهای استرومایی می شود. مطالعات قبلی که با MSCs انسانی صورت گرفته بود، نشان می داد که افزودن Dex در مقادیر فیزیولوژیک باعث تحریک تزیاید سلولهای استرومایی می شود (۴) که علت آن می تواند مربوط به عملکرد گونه های مورد آزمایش در پاسخدهی به Dex باشد.

در روز هشتم، نمونه های آزمایشی که حاوی Dex بود، در مراکز جزایر سلولی، تجمعاتی از سلولهای چند سطحی مشاهده شد که



## References

1. Phoebes Leboy, Jn N Beresford, Carole 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: Precursor cells of mechanocytes. *INT REV Cytol* 1976; 47: 327-359
4. Neelam Jaiswal, Stephen E, Haynesworth, Arnold I, Cephan 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 vehicles for rat-marrow-derived osteogenic cell delivery: effects of pretreatment with fibronectin 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 subcutaneously: effect of fibronectin 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 osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 1995; 219: 211-222
9. Francis J, Hughes, Christopher AG, Mc Culloch: 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, Rosen V, Wang: Identification transforming growth factor  $\beta$  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 osteoblast-like cells: Comparison with TGF- $\beta$ . *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 proteinis (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 Biophys 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. *Endocrinology* 1987; 121: 1985-1992
19. Maniatopoulos 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, Dahiluund J, Salo HK, Vaananen, Harkonen P: Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 1998; 22: 201-209

