

梅花鹿 *Col X* 基因的 RNAi 重组慢病毒载体的构建及鉴定

褚文辉^{1,2} 赵海平² 杨福合² 邢秀梅² 刘国庆³ 李春义^{2*}

(1. 江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018;

2. 中国农业科学院 特产研究所, 吉林 吉林 132109; 3. 北京大学 医学部, 北京 100871)

摘 要 研究Ⅰ型胶原蛋白(Collagen type X, Col X), 在软骨内成骨过程中所起的作用。本研究针对梅花鹿 *Col X* 基因设计筛选 2 条高分 RNAi 靶序列, 在 T4 DNA 连接酶的作用下分别与慢病毒载体质粒 pLVTHM 连接, 形成重组质粒 S2-pLVTHM/S3-pLVTHM; PCR 筛选阳性克隆并测序鉴定。用 Lipofectamine 2000 介导 S2-pLVTHM/S3-pLVTHM, pCMVdr8.91, pMD2G 三质粒共转染 293T 细胞。结果显示: 转染 24 h 后, 观察到表达荧光蛋白的 293T 细胞。收集培养液后进行 1 000 g 离心 5 min, 所得上清液含有重组慢病毒的组分。S2-pLVTHM/S3-pLVTHM 上清液中病毒滴度分别达到 9.96×10^7 TU/L 和 7.18×10^7 TU/L。以此病毒感染梅花鹿角柄骨膜细胞, 并进行微载体培养, 72 h 后出现肉眼可见的白色微团, 该细胞团有荧光表达。本试验成功地构建了针对梅花鹿 *Col X* 基因的慢病毒载体, 为了研究 Col X 蛋白在鹿茸角骨化中的作用奠定了基础。

关键词 鹿茸; 角柄; *Col X* 基因; RNAi; 慢病毒载体; 微载体培养

中图分类号 Q 782; S 865.42

文章编号 1007-4333(2009)04-0029-06

文献标志码 A

Construction and characterization of lentiviral vector of RNA interference of collagen type X gene of sika deer

CHU Wen-hui^{1,2}, ZHAO Hai-ping², YANG Fu-he², XING Xiu-mei², LIU Guo-qing³, LI Chun-yi^{2*}

(1. Jiangsu University of Science and Technology, School of Biotechnology and Environmental engineering, Zhenjiang 212018, China;

2. Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, CAAS, Jilin 132019, China;

3. Health Science Center, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract This study was designed for a preliminary study the role of *Col X* in endochondral ossification *in vitro*. Sequence of siRNA targeting collagen type X gene in sika deer was confirmed in our previous study. Oligo DNA containing both sense and antisense strands was ligated to pLVTHM (the lentivirus carrier plasmid) using T4 DNA ligase. The constructed plasmid was subsequently transformed into DH5 α . Positive clones were selected and confirmed by using PCR and then sequenced. The recombinant plasmids were named S2-pLVTHM/S3-pLVTHM. The cell line 293T was co-transfected with all the three plasmids: S2-pLVTHM/S3-pLVTHM, pCMVdr8.91, pMD2G. Twenty four hours after the transfection, green fluorescence was observed in the 293T cells. DMEM medium was collected and centrifugated, the supernatant contained recombinant lentivirus. The titer of the virus of S2-pLVTHM/S3-pLVTHM in the supernatant was 9.96×10^7 TU/L, 7.18×10^7 TU/L. Antler stem cells infected with the recombinant lentiviral vectors were seeded at high-density "pellet culture". Seventy two hours after the cultivation, a little white micro-bead structure were formed and green fluorescence could be observed under the microscope. This study successfully constructed recombinant lentiviral system with RNAi sequence aiming to target *Col X* gene and produced recombinant lentivirus. The results would lay the foundation for the further *in vivo* study.

Key words antler; pedicle; collagen type X gene; RNAi; lentiviral vector; micromass culture

收稿日期: 2008-11-28

基金项目: 吉林省科技支撑计划(20080901)

第一作者: 褚文辉, 硕士研究生, E-mail: jake-chu@hotmail.com

通讯作者: 李春义, 博士, 研究员, 主要从事鹿茸生物学研究, E-mail: tcslichunyi@126.com

软骨内成骨是骨形成过程中的重要步骤,其主要包括间质细胞的快速增殖并分化为前成软骨细胞,前成软骨细胞进一步分化为软骨细胞,当软骨细胞发育到一定的成熟阶段开始变得肥大时,便开始大量表达Ⅰ型胶原纤维蛋白(Col I)。因此,Col I蛋白是软骨内成骨过程中肥大软骨阶段的一种可靠标志,弄清 Col I 蛋白在成骨过程中的作用对成骨机理的探索具有重要的理论和实际意义。

研究表明在哺乳动物的关节软骨与韧带的结合处,及牙齿釉质基质中均有不同程度的 Col I 蛋白表达,在禽类的长骨及胫骨生长板中也发现 Col I 蛋白的表达^[1-5]。Col I 蛋白在软骨内成骨过程中的作用一直存在争议,有研究者推测其作为一种发育调控蛋白,但是也有人认为它仅是一种普通的结构蛋白。Rita 等^[6]建立了一个 Col I 基因缺失型小鼠模型,结果发现这只缺失型小鼠长骨的生长发育在形态学和组织学上与正常小鼠无大异常,生活也很正常且能生育。但是也有报道称,人的 Col I 基因突变可导致干骺端软骨发育异常。在 Col I 蛋白不足型小鼠模型中,小鼠的生长板静止区厚度减小,并且出现了与人系统性肥大细胞病表现类似的髓内翻^[7]。另外,Col I 蛋白表达的差别很可能与人椎间盘的退变发展有关^[8]。

先前的 Col I 的研究主要以小鼠及禽类为研究模型,但是制作基因缺失型动物模型在实验成本、周期、及动物福利方面都有很不便之处。另外,Col I 蛋白主要在软骨组织中表达,因此在上述模型中取材也不是十分的便利。近年来对鹿茸的研究逐渐受到关注,鹿茸是良好的生物医学模型^[9]。鹿茸是哺乳动物中唯一能完全再生的器官,鹿茸每年再生的过程中包含了完整的软骨内成骨过程^[10]。在此过程中,间质细胞增殖分化成软骨细胞,然后发育成为肥大软骨细胞,最后血管侵入并带入成骨细胞前体,导致软骨内成骨——软骨组织——完全由新生骨替代^[11]。鹿茸的再生又与低等生物(如蝾螈)的割处再生有本质区别。它是基于干细胞的,这种干细胞被称之为生茸干细胞。生茸干细胞定位于鹿生茸区骨膜及角柄骨膜中^[12-13]。生茸区骨膜细胞在体外可以分化为多种成体细胞,例如软骨细胞和脂肪细胞等,在体外的微粒体培养中还能形成连续的软骨柱^[9]。组织学研究表明,这些软骨柱中含有肥大的软骨细胞。

RNAi(RNA interference)技术是近年来发展

起来的研究内源性基因功能和信号转导途径强有力的研究工具。特别是基于慢病毒载体的 RNAi,可以对内源基因进行长期而有效的沉默。本研究旨在探索鹿茸干细胞的微粒体培养,将其作为研究 Col I 蛋白在骨化过程中作用的理想的离体模型,并建立梅花鹿 Col I 基因的 RNAi 慢病毒系统,为活体鹿茸试验打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 包装细胞与病毒载体

细胞株:人胚肾细胞 293T,由吉林大学宋宇博士惠赠。菌株:菌株 DH5 α ,由本实验室保藏。Plvthm、pCMV-Rd8.91 和 pMD2G 慢病毒 3 个质粒系统由北京大学医学部刘国庆教授惠赠(此处慢病毒的三质粒系统中:plvthm 质粒中含有 H1 启动子,能在宿主细胞中持续表达 shRNA,同时该质粒能表达由 EF1 启动子驱动的 GFP;pCMVdr8.91 质粒能编码病毒主要的结构及调控蛋白;pMD2G 提供病毒的 VSVG 蛋白外壳)。

1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Cla* I、*MLu* I、*Eco*R I、*Pst* I、*Kpn* I (New England 公司,中国);T4 DNA 连接酶 (New England 公司,中国);小量质粒提取试剂盒 (Transgen 公司,中国);大量质粒 DNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司,美国);琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司,美国);100 bp、1 kb DNA Marker (Tiangen 公司,中国);DMEM、标准胎牛血清、胰蛋白酶、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 能持续表达梅花鹿 Col I shRNA 的重组慢病毒载体的构建及鉴定

根据 Angela^[14]等的筛选法则设计 2 条针对东北梅花鹿 Col I (GeneBank gi EF103187)基因的高分 shRNA 寡核苷酸序列,

S2 正义链:5'-gcgtcccccGTATACAGGTGCA TATAGAttcaagagaTCTATATGCACCTGTATA Ctttttggaat-3';

S3 正义链:5'-cgcgccccACAGCATTATGA CCAAGAttcaagagaTCTTGGGTCATAATGCT GTttttt ggaat-3'(下划线为 *Cla* I 和 *MLu* I 酶切位点)。

上述 S2、S3 正义链及对应的反义链于上海生

工生物工程有限公司合成。经退火形成双链 Oligo DNA, 与经 *Cla* I、*MLu* I 双酶切后形成的 plvthm 载体连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌扩增。挑选的重组阳性克隆菌株 Transgen 小提试剂盒小量提取质粒后, 按如下引物对进行 PCR 鉴定:

上游 5'-ctgggaatcaccataaacg-3'(up)

下游 5'-ttattcccatgcgacggat-3'(down)

对 PCR 鉴定阳性的质粒进行测序鉴定(上海生工生物工程有限公司)。

使用 Qiagen 大量质粒提取试剂盒大量制备 pCMV-Rd8.91 和 pMD2G 以备后用。

1.2.2 重组慢病毒包装

胰酶消化 293t 细胞并计数, 接种于 10 cm 细胞皿中, 10 mL DMEM 添加其中, 含 10%(质量分数, ω) 标准胎牛血清(FBS)不含抗生素, 使 293t 细胞在转染日融合度达到 90% 以上。使用 1.5 mL 无血清 DMEM 稀释 24 μ g DNA (m (plvthm) : m (pCMVdr8.9) : m (pMD2G) 的比为 2 : 1.5 : 0.75)。同时将 60 μ L Lipofectamine 2000 稀释于 1.5 mL 无血清 DMEM 中于室温下孵育 5 min。混合稀释的 DNA 和稀释的 Lipofectamine 2000, 于室温下孵育 30 min。去除细胞皿中上清, 将复合物加到细胞培养皿中, 轻轻摇动培养皿以混匀。37 $^{\circ}$ C, 5%(体积分数, φ) 的 CO $_2$, 孵箱孵育 6 h, 然后后更换完全培养基。倒置荧光显微镜下, 检测 GFP 表达情况以确定转染效率。转染后 48 h 收集细胞培养皿中上清于 50 mL 离心管中。1 000 g 离心 5 min, 弃去细胞碎片沉淀。0.45 μ m 滤器过滤上清液, 滤液 1.5 mL EP 管分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 重组慢病毒滴度测定

取 50 μ L 病毒上清液, 倍比稀释于 6 个 EP 管中。于 96 孔板中, 每孔接种含 2.9×10^4 的 293t 细胞。每孔加入 20 μ L 病毒稀释液于 DMEM 细胞混合液中, 使其最终体积为 100 μ L。混匀后孵箱孵育 48 h。48 h 后去除上清, 加入 100 μ L DMEM 重悬细胞。在细胞计数板上的计数荧光细胞数百分数。按如下公式计算滴度: $\text{Titer}(\text{t}\mu/\mu\text{L}) = P \times N / 100 \times V \times 1/D$, (P =GFP 表达细胞百分比, N =每孔原始接种细胞数, V =接种病毒液体积, D =稀释倍数)

1.2.4 梅花鹿角柄骨膜细胞培养

取材于 7 岁龄雄性梅花鹿, 由中国农业科学院特产研究所实验动物站提供。局部严格消毒后取出

约 1 g 角柄骨膜, 使用 DMEM(FBS-双抗+)清洗, 在灭菌的一次性平皿中, 用消毒后的眼科剪将其剪绞至 1 mm 2 的碎块。使用 5 mL DMEM 液(含 13.4 U/mL Collagen I 酶), 37 $^{\circ}$ C 水浴中震荡消化约 1 h, 以大多数组织块周围出现毛边为宜。用枪头吸取消化产物均匀涂于培养瓶底部添加适量培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% (φ)CO $_2$ 孵育 7 d 后观察细胞生长, 细胞生长合适后冻存以备后用。

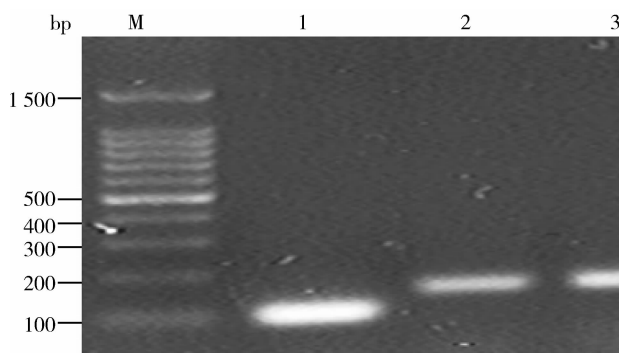
1.2.5 重组慢病毒感染角柄骨膜细胞及微粒体培养

消化并重悬一定的角柄骨膜细胞, 确定其最终浓度为 10^7 cell/mL。取 100 μ L 细胞重悬液, 加样于 6 孔板每孔中央。孵箱孵育 3 h 后, 每孔添加 2 mL 微粒体诱导培养液 DMEM(含 TGF- β 1.10 ng/mL)。其中实验组加入 50 μ L S2-plvthm 病毒上清, 阴性对照加入等量的 PBS 液, 72 h 后观察细胞生长状况。

2 结果

2.1 重组阳性载体质粒 plvthm 的 PCR 鉴定结果

PCR 鉴定结果显示, 阴性对照中(图 1, 1 号泳道)扩增片断靠近 100 bp Marker 而阳性克隆(图 1, 2、3 号泳道)扩增片断略小于 200 bp Marker, 与实验预期: 空白质粒 plvthm 扩增片段大小为 105 bp, 阳性克隆为 172 bp(插入片段为 67 bp)相符, 表明挑选的阳性克隆正是实验所需。测序结果最终确定阳性克隆中正确插入了所需的 shRNA, 即 RNAi 靶位点序列, 2 种阳性质粒分别命名为 S2-plvthm、S3-plvthm。



M: DNA Marker; 1: 空白质粒阴性对照;

2: 重组阳性克隆 S2-plvthm; 3: 重组阳性克隆 S3-plvthm

图 1 重组质粒 plvthm 阳性克隆 PCR 鉴定

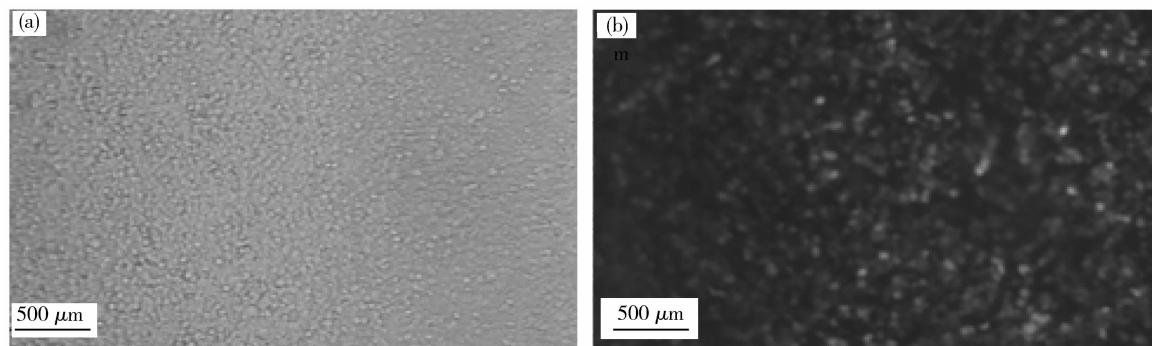
Fig. 1 PCR results of the recombinant positive clones of plvthm

Note: Recombinant positive plasmids of plvthm were confirmed by PCR; the positive clones, S2 and S3-plvthm, were heavier than the negative control due to the insertion of shRNA.

2.2 重组慢病毒包装及滴度测定结果

293t 细胞中进行 Lipofectamine 2000 介导的 S2-plvthm/S3-plvthm、pCMVdr8.91 和 pMD2G 三质粒共转染 24 h 后,在可见光下观察,293t 细胞生长旺盛紧密排列,细胞呈圆粒型,无死细胞或细胞碎片漂浮于上清中(图 2-a),倒置荧光显微镜下观察到

大量的 GFP 荧光,荧光均匀分布于视野中,明暗交替呈无规则状(图 2-b)。表明质粒成功共转染 293t 并包装成慢病毒颗粒。根据 Gustavo 等^[15]公布的方法测定培养液上清中的病毒滴度,在非超速离心浓缩的情况下 S2-plvthm/S3-plvthm 分别达到 9.96×10^7 和 7.18×10^7 TU/L。



(a)倒置相差显微镜下 293t 细胞生长情况

(b)倒置荧光显微镜下 293t 细胞生长情况

图 2 重组慢病毒 3 个质粒系统共转染 24 h 后,293t 细胞生长情况

Fig. 2 Growth of the 293t cells 24 hours after co-transfection

Note: After 24 hour co-transfection, the 293t cells grew well, fluorescence could be observed uniformly

2.3 梅花鹿角柄骨膜细胞培养结果

骨膜组织消化块呈絮状飘浮于培养基中,部分组织块粘附于细胞培养瓶底部,培养液中有些许的亮点悬浮其中为消化发散的细胞和细胞碎片。7 d 后观察细胞的生长情况,培养基颜色略黄。培养瓶底部贴附的是零散组织块,其四周发散状生长着骨膜细胞,在靠近组织块的中央地区细胞排列极其紧密,紧密程度依次向四周递减。在无组织块贴附的区域,只有零散的细胞生长。培养液中游离着丝状的透明物质,怀疑是骨膜组织发散细胞后遗留的纤维组织。原代培养细胞在一次传代后长势良好,细胞排列紧密呈梭状,其中央黑色区域为细胞核(图 3)。

2.4 重组慢病毒感染梅花鹿角柄骨膜细胞及微粒体培养结果

高浓度细胞重悬液孵育 3 h 后,形成一肉眼可见的淡粉色圆形沉淀圈,在添加诱导培养基后沉淀圈并不浮起或漂移。72 h 后沉淀圈消失,培养基中出现一肉眼可见的白色微球。在光学显微镜下该微球表现为黑色的不透光椭圆形沉淀物,原沉淀圈区域细胞消失,仅在其边缘有一环形的残余细胞带。实验组在倒置荧光显微镜下,整个沉淀通体呈绿色半透明状,表达绿色荧光的细胞如岛屿般点缀其中,其中边缘地区的亮度明显高于中央地区(图 4)。阴

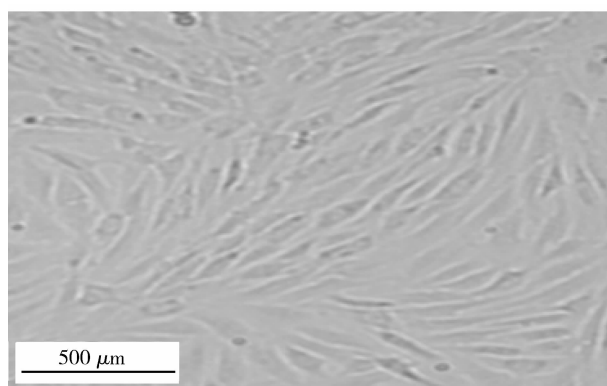


图 3 梅花鹿角柄骨膜细胞生长情况(第 2 代)

Fig. 3 Growth of antler periosteum cells
(The second generation)

性对照未见到荧光表达。

3 讨 论

1)鹿茸角是哺乳纲鹿科动物中雄鹿的第二性征,是非常难得的器官再生研究模型,同时它又是一个天然的骨化研究模型。鹿茸再生及骨化的机制的探明,将为动物自体及异体器官的移植,特别是为人体断肢的再生提供可借鉴的理论依据。目前,从分子水平上研究鹿茸的再生过程及机理成为新的切入点。Col X 蛋白在成熟肥大软骨细胞中表达,在鹿

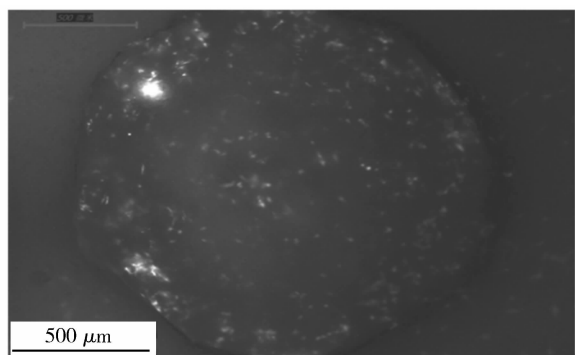


图4 重组慢病毒感染梅花鹿角柄骨膜细胞团荧光图

Fig. 4 Micromass culture of the infected pedicle periosteal stem cells(Fluorescence of the pellet)

Note : The cell nodule was formed 72 hours after infection by lentiviral S2-plvthm vectors and expressed strong fluorescent GFP

茸角钙化的前期可以被明显检测到^[16], 可以作为肥大软骨细胞的特有标记。Rucklidge^[17]等应用分子原位杂交证实人在股骨生长板软骨成熟层内有该蛋白的基因表达。Kwan 等^[18]把大鼠调控 *Col X* 蛋白合成的基因去除, 发现大鼠的股骨发育出现严重障碍。但是, 在鹿茸这一骨化研究模型中进行 *Col X* 蛋白及其基因的研究却鲜有报道。本研究首次针对梅花鹿 *Col X* 基因的 RNAi 技术展开对鹿茸再生中骨化过程的研究, 并在离体条件下使用重组慢病毒载体介导 shRNA 进入生茸干细胞, 为在活体上使用该技术研究 *Col X* 蛋白在成骨中所起的作用他下了基础。

2) 在一定的筛选法则下^[14], 从大量的 RNAi 靶序列中挑选了 2 条高分序列, 并通过 NCBI/blast 工具去除 off target 的情况, 将其化学合成后插入载体质粒形成重组慢病毒载体, 并在 HEK293t 细胞中包装成慢病毒。重组质粒共转染 48 h 后, 293t 细胞大量表达绿色荧光蛋白, 培养液上清中游离着包装细胞分泌的病毒粒子。经过病毒滴度测定重组慢病毒 S2-plvthm/S3-plvthm 的滴度分别达到 9.96×10^7 TU/L, 7.18×10^7 TU/L 可以用于病毒载体对组织的感染。为了便于后期的活体实验, 对角柄骨膜进行了组织取样和骨膜细胞的原代培养。培养的角柄骨膜干细胞的长势良好, 细胞外形规整核质分明均呈长条梭状, 无其他特异细胞的存在, 说明取材成功无其他非目标组织的摄取, 这样就保证了获取细胞的专一性避免了其他细胞污染, 可以进行下一步病毒感染和微粒体培养。

3) 骨化的研究长期使用鸡胚和小鼠胚胎等动物

模型, 离体研究一直以来以骨髓间质细胞为主^[19-21]。Anita 等^[22]将人骨髓间质细胞在软骨诱导培养基和骨化诱导培养基中进行连续的微粒体培养, 观察了间质细胞软骨内成骨及其骨化的过程, 在软骨形成期 I 型胶原和骨涎蛋白大量表达于软骨小球的外周, 在纵切面上表现为一环形带状区。而鹿的生茸骨膜干细胞在体外的微粒体培养环境中, 也能形成连续软骨柱。因此, 我们将靶向梅花鹿 *Col X* 基因的 RNAi 重组慢病毒添加到角柄骨膜细胞培养基中进行微粒体培养, 72 h 后形成了肉眼可见的椭圆形白色微球其直径达到 3.97 mm。在倒置荧光显微镜下可见到整个微团有较强的绿色荧光的表达, 且边缘地区稍亮于中央形成一条亮带。慢病毒更易感染非原代细胞^[22], 所以亮带的形成可能是由于边缘地区细胞率先进行了分化, 便于慢病毒粒子的入侵。白色微球及荧光的出现说明, 该慢病毒载体成功构建, 其对生茸干细胞也有一定的敏感性。

4 结 论

本实验成功构建了用于 RNAi 干扰的, 针对梅花鹿 *Col X* 基因的重组慢病毒载体并建立其包装系统。在微粒体培养中, S2-plvthm 病毒成功感染梅花鹿角柄骨膜细胞, 说明重组慢病毒载体构建成功, 可以用于下一步鹿茸活体中 *Col X* 基因的沉默, 以进一步研究 *Col X* 蛋白在成骨过程中的功能。

参 考 文 献

- [1] Rucklidge G J, Milne G, Robins S P. Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224(2):297-302
- [2] Niyibizi C, Sagarrigo V C, Gibson G, et al. Identification and immunolocalization of type X collagen at the ligament-bone interface [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 222(2):584-589
- [3] Felszeghy S, Holló K, Módos L, et al. Type X collagen in human enamel development: a possible role in mineralization[J]. Acta Odontol Scand, 2000, 58(4): 171-176
- [4] Gibson G J, Bearman C H, Flint M H. The immunoperoxidase localization of type X collagen in chick cartilage and lung[J]. Coll Rel Res, 1986, 6:163-184
- [5] Poole A R, Pidoux I. Immunoelectron microscopic

- studies of type X collagen in endochondral ossification [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1989, 109(5):2547-2554
- [6] Rosati R, Horan G S, Pinero G J, et al. Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice[J]. *Nat Genet*, 1994, 8(2):129-135
- [7] Kwan K M, Pang M M, Zhou S, et al. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function[J]. *Cell Biol*, 1997, 13(6):459-471
- [8] Boos N, Nerlich A G, Wiest I, et al. Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during aging and degeneration[J]. *Histochem Cell Biol*, 1997, 108(6):471-480
- [9] Li Chun-yi. Development of deer antler model for biomedical research. [J]. *Recent Adv & Res Updates*, 2003, 4(2):255-274
- [10] Li Chun-yi, Suttie J M. Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. *Anat Rec*, 1994, 239(2):198-215
- [11] 王万春, 林涨源, 孙材江, 等. 关节软骨缺损膜移植修复与自身修复的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(5):55-56
- [12] Li Chun-yi, James M S. Deer antlerogenic periosteum: a piece of ostnatally retained embryonic tissue [J]. *Anat Embryol*, 2001, 204(5):375-388
- [13] Li Chun-yi, Yang H H, Li Guang-yu, et al. Antler regeneration: A dependent process of stem tissue primed via interaction with its enveloping skin[J]. *J Exp Zool*, 2007, 307(2):95-105
- [14] Angela R, Devin L, Queta B, et al. Rational siRNA design for RNA interference [J]. *Nature*, 2004, 22(3):326-330
- [15] Gustavo T, Oded S. Production and purification of lentiviral vectors[J]. *Nature*, 2006, 27:241-245
- [16] Price J S, Oyajobi B O, Nalin A M, et al. Chondrogenesis in the regenerating antler tip in red deer: expression of collagen types I, IIA, IIB, and X demonstrated by in situ nucleic acid hybridization and immunocytochemistry[J]. *DevDyn*, 1996, 205(3):332-347
- [17] Rucklidge C J. Collagen type X: A component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage[J]. *Biochem & Biophys Res Commun*, 1996, 224(2):297-302
- [18] Kwan K M, Pang M K, Zhou S, et al. Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking Collagen X: Implications for function [J]. *Cell*, 1997, 136(2):459-471
- [19] Ashton B A, Allen T D, Howlett C, et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo* [J]. *Clin Orthop*, 1980, 151:294-307
- [20] Berry L, Grant M E, McClure J, et al. Bone-marrow derived chondrogenesis *in vitro* [J]. *Cell Sci*, 2004, 101:333-342
- [21] Johnstone B, Hering T M, Caplan A I, et al. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells[J]. *Cell Res*, 1998, 238(1):265-272
- [22] Anita M, Alessandro C, Mara R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells[J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(14):2949-2955