

胰岛素样生长因子1对人脂肪来源的间充质干细胞向软骨细胞定向诱导分化的作用☆

周全¹, 邓展生², 朱勇², 李宝军², 张少先¹, 赵加力¹

Insulin-like growth factor-1 effects on directional differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes

Zhou Quan¹, Deng Zhan-sheng², Zhu Yong², Li Bao-jun², Zhang Shao-xian¹, Zhao Jia-li¹

Abstract

BACKGROUND: Recently, researches have found that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) can induce the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) into chondrocytes, but there are no reports concerning the differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) into chondrocytes induced by IGF-1, as well as interaction with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) during this process.

OBJECTIVE: To explore the possibility of inducing ADMSCs chondrogenic differentiation by using IGF-1 and the interaction with TGF- β 1 in induction.

METHODS: ADMSCs were obtained, and seeded at 2×10^5 cells/cm² in culture flask. Insulin-free chondrogenic media containing IGF-1 or (and) TGF- β 1 were used to induce ADMSCs. 2 weeks later, cells were harvested and stained by using toluidine blue and collagen II antibody immunohistochemistry. Intracellular sulfated proteoglycan and collagen II coloring were observed. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of collagen II, aggrecan and Sox9 mRNA.

RESULTS AND CONCLUSION: After induced, toluidine blue stain exhibited that the cells in the three induction groups were polygonal, with cytoplasm and cell membrane of blue different dyeing. Immunohistochemistry for type II collagen demonstrated that cytoplasm and cell membrane were stained brown in three induction groups. RT-PCR revealed that the expression of collagen II, aggrecan, Sox9 mRNA of IGF + TGF group were significantly greater than the IGF and TGF groups, and IGF and TGF groups were significantly stronger than the control group. No significant difference was determined between the IGF and TGF groups. These results indicated that IGF-1 can induce chondrogenic differentiation from ADMSCs, expressing chondrocyte specific cell phenotype. There is synergism of IGF-1 and TGF- β 1 to induce the differentiation of ADMSCs into chondrocytes.

Zhou Q, Deng ZS, Zhu Y, Li BJ, Zhang SX, Zhao JL. Insulin-like growth factor-1 effects on directional differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10): 1785-1790. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

¹Department of Orthopaedics, Huaian Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Huaian 223002, Jiangsu Province, China; ²Department of Spinal Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Zhou Quan☆, Doctor, Attending physician, Department of Orthopaedics, Huaian Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Huaian 223002, Jiangsu Province, China wuque1@yahoo.com.cn

Received: 2009-12-17
Accepted: 2010-02-10

摘要

背景: 近年研究者发现胰岛素样生长因子1还可以诱导骨髓来源间充质干细胞向软骨细胞方向分化,但目前尚未见胰岛素样生长因子1诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞方向分化及在此过程中与转化生长因子 β 1相互作用的报道。

目的: 观察胰岛素样生长因子1诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞定向分化的可能性及在诱导分化中和转化生长因子 β 1的相互作用。

方法: 获取脂肪来源间充质干细胞,以 2×10^5 cells/cm² 的密度接种于培养瓶,使用含胰岛素样生长因子1或(和)转化生长因子 β 1的无胰岛素软骨诱导剂诱导脂肪来源间充质干细胞。2周后获取细胞,制备细胞爬片,进行甲苯胺蓝染色和II型胶原免疫组织化学染色,观察细胞内高硫酸化的蛋白聚糖和II型胶原着色情况。RT-PCR检测II型胶原蛋白、aggrecan及Sox9 mRNA的表达。

结果与结论: 加入诱导剂后,甲苯胺蓝染色显示3个诱导组细胞呈多角形,胞浆及胞膜呈蓝色异染。II型胶原免疫组织化学染色显示3个诱导组细胞胞浆及胞膜呈棕黄色着色。RT-PCR检测显示胰岛素样生长因子+转化生长因子组II型胶原蛋白、aggrecan、Sox9 mRNA的表达均显著强于胰岛素样生长因子组和转化生长因子组,胰岛素样生长因子组和转化生长因子组显著强于对照组,而胰岛素样生长因子组与转化生长因子组差异无显著性意义。提示胰岛素样生长因子1可以单独诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞分化,表达软骨细胞特异性细胞表型,胰岛素样生长因子1与转化生长因子 β 1诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞分化有协同作用。

关键词: 脂肪间充质干细胞; 细胞因子; 组织工程; 分化; 软骨

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.015

¹徐州医学院附属淮安医院骨科,江苏省淮安市223002; ²中南大学湘雅医院脊柱外科,湖南省长沙市410008

周全☆,男,1979年生,江苏省淮安市人,汉族,2008年中南大学毕业,博士,主治医师,主要从事骨与软组织工程方面的研究。wuque1@yahoo.com.cn

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)10-01785-06

收稿日期:2009-12-17
修回日期:2010-02-10
(20091217001/WL-Q)

周全, 邓展生, 朱勇, 李宝军, 张少先, 赵加力. 胰岛素样生长因子1对人脂肪来源的间充质干细胞向软骨细胞定向诱导分化的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1785-1790. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

有众多的细胞因子被证实能够诱导人间充质干细胞向软骨细胞的定向分化和维持诱导后细胞表型及促进细胞增殖。如转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、骨形态发生蛋白等。TGF- β 家族的生长因子在诱导软骨形成中起最主要的作用, 他们被广泛应用于胚胎干细胞和各种间充质干细胞向软骨细胞的定向诱导分化^[1-2], 同时这些细胞因子还可以增加软骨细胞外基质合成和促进软骨细胞增殖^[3-4]。IGF-1被认为是调节软骨形成和代谢最关键性的细胞因子^[5]。研究显示IGF-1能够调节牛关节软骨细胞合成蛋白多糖的动态平衡^[6], 促进关节软骨细胞合成和分泌细胞外基质并抑制软骨细胞凋亡^[7-8], 加速细胞增殖和前软骨细胞向软骨细胞分化^[9]。

既往对IGF-1的研究多关注于其对软骨细胞的作用, 而对IGF-1能否诱导间充质干细胞向软骨细胞定向分化尚不明确。有研究结果显示IGF-1不能单独诱导间充质干细胞向软骨细胞分化, 但在TGF- β 信号存在的条件下, IGF-1可以促进间充质干细胞向软骨细胞分化^[10-11]。最近的一些研究显示IGF-1可以单独诱导鸡胚肢芽的间充质细胞和骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化而不依赖于TGF- β 信号^[12-13]。本实验以人脂肪来源间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AMSCs)为研究对象, 探讨IGF-1单独诱导人AMSCs向软骨细胞定向分化的可能性, 及在诱导分化中和TGF- β_1 的相互作用。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2007-05/2008-04在中南大学湘雅医院中心实验室完成。

材料: 皮下脂肪组织来源于股骨颈骨折手术患者6例, 年龄25~64岁, 对实验及治疗均签署知情同意书, 实验方案经医院医学伦理委员会批准。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
高糖 DMEM, 低糖 DMEM, 新生牛血清	Gibco, 新西兰
II 型胶原蛋白抗体, Aggrecan 抗体, IGF-1, TGF- β_1	Santa Cruz, 美国
I 型胶原酶, 胰岛素, 转铁蛋白, 地塞米松, 维生素 C	Sigma, 美国
细胞总蛋白提取试剂盒	天为生物, 中国
倒置显微镜	Olympus, Japan
PCR 扩增仪	Eppendorf, Germany

实验过程:

AMSCs的分离及培养: 从行股骨颈手术的患者皮下获取脂肪组织, 以PBS冲洗3次以上, 无菌条件下用眼科剪去除肉眼可见的血管和致密结缔组织, 剪碎至糊状, 加入3倍体积的0.075% I 型胶原酶, 37 °C振荡消化2 h, 加入等量含体积分数为10%新生牛血清的低糖DMEM终止消化, 以200目滤网滤去未消化完全的大块脂肪组织, 将滤过液2 000 r/min离心10 min, 弃上清, 加入5 mL 160 nmol/L NH₄Cl室温下放置10 min裂解红细胞, 再次离心, 弃上清, 加入低糖DMEM(含体积分数为10%新生牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)重悬沉淀细胞, 移入培养瓶, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 3 d换液1次, 细胞铺满瓶底80%时按1:2传代。

诱导AMSCs向软骨细胞定向分化: 以0.25%的胰蛋白酶消化获取第6代AMSCs, 细胞计数板计数, 按 2×10^5 个/cm²的密度将细胞接种于50 mL培养瓶, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中孵育30 min, 以助于细胞贴壁; 然后, 倾弃培养基, 分为对照组、IGF组、TGF组及IGF+TGF组, 根据分组不同分别给予不同的诱导剂(对照组含高糖DMEM、体积分数为1%新生牛血清、37.5 mg/L维生素C、6.25 mg/L转铁蛋白、 10^{-7} mol/L地塞米松、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素; 此外, IGF组诱导剂还含100 μ g/L IGF-1, TGF组诱导剂还含10 μ g/L TGF- β_1 , IGF+TGF组诱导剂还含100 μ g/L IGF-1和10 μ g/L TGF- β_1), 根据诱导剂颜色的变化, 每两三天更换诱导剂1次。倒置显微镜下观察细胞形态及聚集情况。

免疫化学染色: 诱导2周后, 胰蛋白酶消化, 获取细胞, 将多聚赖氨酸处理的灭菌盖玻片置于6孔培养皿中, 滴加细胞悬液至盖玻片上, 置于体积分数为5%CO₂、37 °C的细胞培养箱中孵育12 h, 取出盖玻片, PBS冲洗, 体积分数为10%甲醛室温下固定细胞10 min, 室温干燥。①甲苯胺蓝染色: 观察细胞胞内、外高硫酸化的蛋白聚糖的着色情况。②II型胶原免疫组织化学染色: 观察II型胶原蛋白表达情况。

RT-PCR检测: 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

引物序列:

引物	序列	产物大小 (bp)
β -actin	上游 5'-ACT CTT CCA GCC TTC CTT CC-3' 下游 5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT TGC-3'	313
II 型胶原蛋白	上游 5'-TTC AGC TAT GGA GAT GAC AAT C-3' 下游 5'-AGA GTC CTA GAG TGA CTG AG-3'	472
Aggrecan	上游 5'-GCA GAG ACG CAT CTA GAA ATT G-3' 下游 5'-GGT AAT TGC AGG GAA CAT CAT T-3'	504
Sox9	上游 5'-GAA CGC ACA TCA AGA GGG AG-3' 下游 5'-TCT CGT TGA TTT CGC TGC TC-3'	631

分别采用Trizol试剂盒提取细胞总RNA, RT试剂盒合成cDNA, 根据设计引物进行PCR扩增合成cDNA, PCR产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。检测各组II型胶原蛋白、Aggrecan和Sox9 mRNA的表达。

主要观察指标: ①诱导后细胞形态。②甲苯胺蓝染色和II型胶原免疫组织化学染色观察细胞内高硫酸化的蛋白聚糖和II型胶原着色情况。③RT-PCR检测II型胶原蛋白、aggrecan及Sox9 mRNA的表达。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二、三作者, 干预实施为第一、四、五、六作者, 评估为第二、三作者, 经过正规培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学方法采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

甲苯胺蓝染色: 诱导2周后, IGF组、TGF组及IGF+TGF组细胞均呈多角形或类圆形, 胞浆及胞膜呈蓝色异染, 见图1~3。

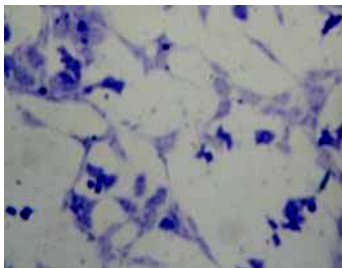


Figure 1 After induced for 2 weeks, cells of insulin-like growth factor group turned to polygonal cells, with blue stained cytoplasm and cell membrane (Toluidine blue staining, $\times 400$)
图1 IGF组诱导2周后细胞呈多角形, 胞浆及胞膜蓝色着色(甲苯胺蓝染色, $\times 400$)

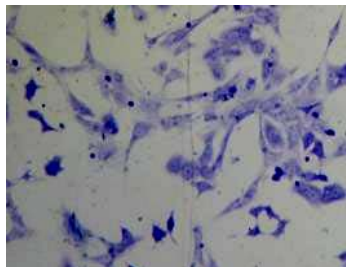


Figure 2 After induced for 2 weeks, cells of transforming growth factor group turned to polygonal cells, with blue stained cytoplasm and cell membrane (Toluidine blue staining, $\times 400$)
图2 TGF组诱导2周后细胞呈多角形, 胞浆及胞膜蓝色着色(甲苯胺蓝染色, $\times 400$)

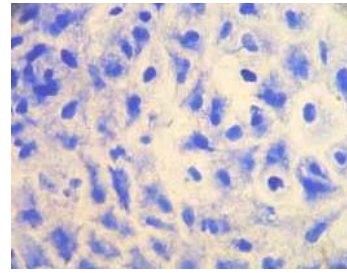


Figure 3 After induced for 2 weeks, cells of insulin-like growth factor+ transforming growth factor group turned to polygonal cells or spherical shape, with blue stained cytoplasm (Toluidine blue staining, $\times 400$)
图3 IGF+TGF组诱导2周后细胞呈多角形或类圆形, 胞浆呈蓝色着色(甲苯胺蓝染色, $\times 400$)

而对照组细胞则依旧呈梭形, 细胞呈阴性着色, 见图4。

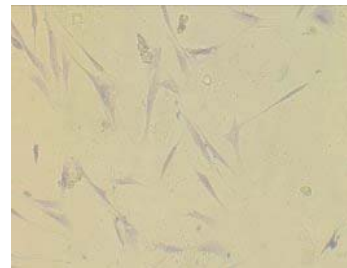


Figure 4 After induced for 2 weeks, cells of control group were still shuttle shape, with negative staining of cytoplasm (Toluidine blue staining, $\times 400$)
图4 对照组细胞培养2周后, 细胞仍呈梭形, 胞浆阴性着色(甲苯胺蓝染色, $\times 400$)

II型胶原免疫组织化学染色: IGF组、TGF组及IGF+TGF组诱导后细胞呈多角形或类圆形, 细胞的胞浆内均呈阳性着色, 细胞内可见棕黄色颗粒存在, 见图5~7。

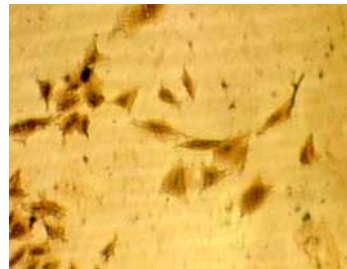


Figure 5 After induced for 2 weeks, cells of insulin-like growth factor group turned to polygonal cells, with brown stained cytoplasm and cell membrane (Collagen II immunohistochemical staining, $\times 400$)
图5 IGF组诱导2周后细胞呈多角形, 胞浆及胞膜棕色着色(II型胶原免疫组织化学染色, $\times 400$)

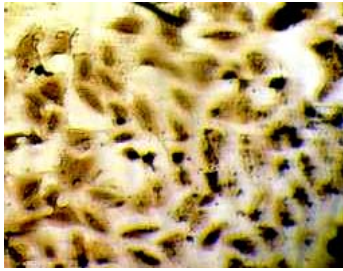


Figure 6 After induced for 2 weeks, cells of transforming growth factor group turned to polygonal cells, with brown stained cytoplasm and cell membrane (Collagen II immunohistochemical staining, $\times 400$)
图 6 TGF 组诱导 2 周后细胞呈多角形, 胞浆及胞膜棕色着色(II 型胶原免疫组织化学染色, $\times 400$)

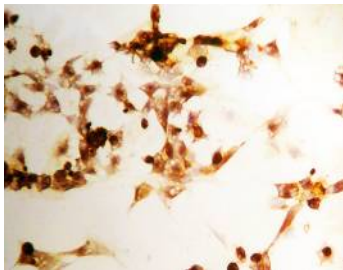


Figure 7 After induced for 2 weeks, cells of insulin-like growth factor+ transforming growth factor group turned to polygonal cells, with brown stained cytoplasm and cell membrane (Collagen II immunohistochemical staining, $\times 200$)
图 7 IGF+TGF 组诱导 2 周后细胞呈多角形, 胞浆及胞膜棕色着色(II 型胶原免疫组织化学染色, $\times 200$)

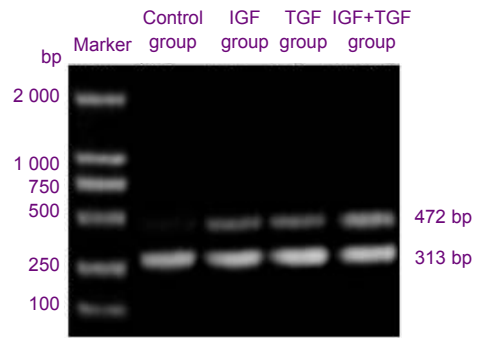
而对照组细胞则仍呈梭形, 细胞内未见明显的棕黄色颗粒, 见图 8。



Figure 8 After induced for 2 weeks, cells of control group were still shuttle shape, with negative stain of cytoplasm (Collagen II immunohistochemical staining, $\times 400$)
图 8 对照组诱导 2 周后细胞呈梭形, 胞浆阴性着色(II 型胶原免疫组织化学染色, $\times 400$)

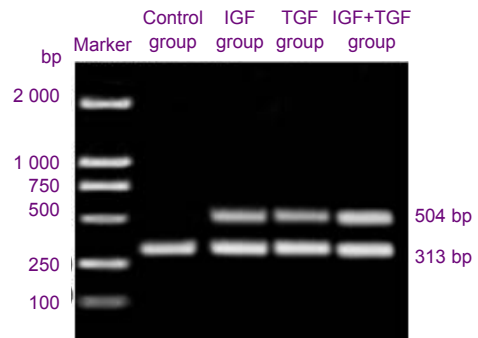
2.2 RT-PCR 检测结果 RT-PCR 检测结果显示 IGF 组、TGF 组及 IGF+TGF 组 II 型胶原蛋白、aggrecan、

Sox9 的 mRNA 在对应区域均有目的条带出现, 而对照组未见明显的目的条带, 见图 9~11。



TGF: transforming growth factor; IGF: insulin-like growth factor

Figure 9 Expression of collagen II mRNA of every group detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)
图 9 RT-PCR 检测各组 II 型胶原 mRNA 的表达



TGF: transforming growth factor; IGF: insulin-like growth factor

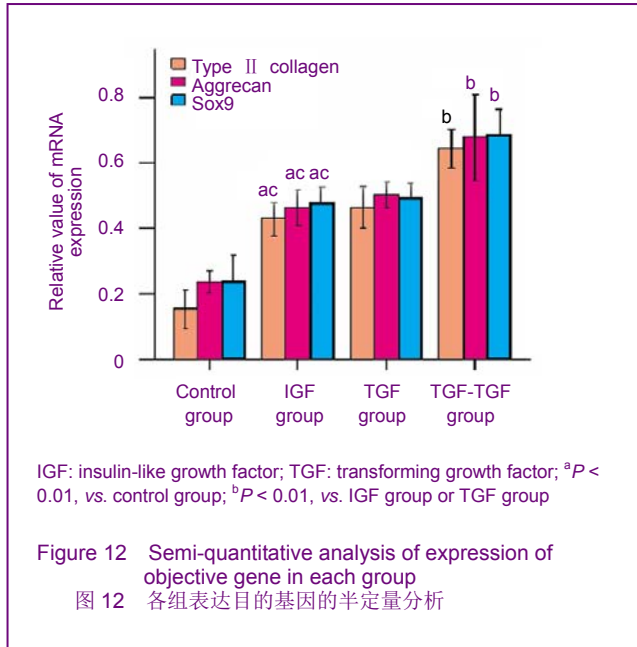
Figure 10 Expression of aggrecan mRNA of every group detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)
图 10 RT-PCR 检测各组 aggrecan mRNA 的表达



TGF: transforming growth factor; IGF: insulin-like growth factor

Figure 11 Expression of Sox9 mRNA of every group detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)
图 11 RT-PCR 检测各组 Sox9 mRNA 的表达

半定量分析可见IGF+TGF组II型胶原蛋白、aggrecan、Sox9 mRNA的表达显著强于IGF组和TGF组, IGF组与TGF组差异无显著性意义, IGF组和TGF组显著强于对照组, 见图12。



3 讨论

生长因子是细胞之间进行信息传递和调节细胞生长及分化的一系列多肽。生长因子能促进和抑制细胞的增殖、分化、迁移和基因表达^[15]。目前已经用于软骨组织工程研究的生长因子种类繁多, 如TGF- β 家族、骨形态发生蛋白家族、成纤维细胞生长因子家族、IGF家族、PDGF及HGF等。其中TGF- β 家族是一组广泛存在的具有多种活性功能的多肽类生长因子。目前已经发现5种亚型, 其中在哺乳动物体内发现的有3个亚型, 即TGF- β_{1-3} 。骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞及骨髓细胞可以通过自分泌和旁分泌途径分泌TGF- β ^[16]。TGF- β 经分泌后, 以一种无活性的方式存在于细胞外基质中, 当基质局部pH值改变后, 在一些活性蛋白酶的作用下, 激活TGF- β , 从而发挥其生理作用。TGF- β 对细胞生长增殖的调节具有双向性, 低浓度的TGF- β 促进细胞增殖, 而高浓度的TGF- β 则抑制细胞增殖^[17-18]。在调控干细胞向软骨细胞分化时, TGF- β 与细胞膜的TGF- β II型受体(T β R II)结合, 从而磷酸化TGF- β I型受体(T β R I), 并形成T β R II-T β R I复合物, 进而激活Smad通路和MEK1/2-Erk1/2通路, 发挥其向软骨细胞诱导分化的作用。IGF-1是一种能够强有力刺激细胞合成代谢的生长因子, 能够促进细胞DNA合成, 促进细胞合成蛋白多糖。

目前对IGF-1能否单独诱导间充质干细胞向软骨细胞分化尚存在争议, Kawamura等^[19]通过腺病毒将TGF- β_1 或(和)IGF-1基因转染人骨髓间充质干细胞, 进行微球培养, 发现培养3 d后, TGF- β_1 转染的间充质干细胞即表达aggrecan mRNA, 10 d后才检测到细胞内表达II型胶原蛋白mRNA; 而IGF-1转染的间充质干细胞以及IGF-1和TGF- β_1 复合转染的间充质干细胞则未能检测到II型胶原蛋白和aggrecan mRNA的表达, 这些结果显示TGF- β_1 有更有效的软骨诱导作用, 而IGF-1则无明显的软骨诱导作用。胰岛素-转铁蛋白-硒(insulin-transferrin-selenium, ITS)经常被用作成软骨诱导剂的添加成分。Chua等^[20]的研究结果显示ITS可以促进软骨细胞增殖, 抑制软骨细胞去分化, 在诱导剂中添加ITS有助于形成高质量的组织工程化软骨。但在软骨诱导剂中常规添加ITS后, 软骨诱导剂中胰岛素的浓度大约是生理浓度的100倍以上, 高浓度的胰岛素可以与IGF-1竞争性地结合细胞膜上的受体, 导致IGF-1的作用显著降低^[12]。最近Longobardi等^[12]的研究发现在无胰岛素存在的条件下, IGF-1可以刺激间充质干细胞增殖、调控细胞凋亡、可以单独诱导BMSCs表达软骨细胞特异性标志II型胶原蛋白和Sox9 mRNA, 并在TGF- β 存在的条件下, 两者的成软骨能力有协同作用。参考Longobardi等^[12]的研究, 本实验中使用的诱导剂未加入胰岛素, IGF-1的浓度为100 μ g/L。

实验结果显示使用含IGF-1无胰岛素诱导剂诱导细胞2周后, AMSCs由原来的长梭形变为多角形和类圆形, 与使用TGF- β_1 诱导后类似; 对甲苯胺蓝染色阳性, 提示细胞内有高硫酸化的蛋白多糖合成; 诱导后AMSCs II型胶原蛋白免疫组织化学染色阳性, 提示细胞内有II型胶原蛋白合成; RT-PCR结果显示诱导后细胞内有II型胶原蛋白、aggrecan、Sox9 mRNA表达。提示AMSCs经含IGF-1的诱导剂诱导后, 细胞能够表达软骨细胞特异性的II型胶原蛋白和aggrecan, IGF-1具有诱导AMSCs体外成软骨能力。

Takagi等^[21]将不同密度的人间充质干细胞采用含TGF- β_3 、IGF-1及地塞米松的软骨诱导剂诱导, 发现随着细胞密度的增加, 诱导后间充质干细胞成软骨能力明显增强。采用含有100 μ g/L IGF-1和10 μ g/L TGF- β_1 的成软骨诱导剂诱导2周后, IGF+TGF组AMSCs聚集非常紧密。对RT-PCR结果进行分析也显示IGF+TGF组细胞表达II型胶原蛋白、aggrecan、Sox9 mRNA显著高于TGF组和IGF组细胞。提示IGF-1和TGF- β_1 在诱导AMSCs向软骨细胞分化中有协同作用, 能够更好地诱导AMSCs向软骨细胞定向分化。付勤等^[22]将TGF- β_1 和IGF-1基因共同转染大鼠骨髓间充质干细胞, 发现共转染后细胞合成II型胶原较单独转染组显著增加。

除了实验中采用的生长因子TGF- β_1 和IGF-1外, 研

研究者们还探索了其他许多细胞因子在软骨组织工程中的应用。成纤维细胞生长因子2也是常用于软骨组织工程研究的细胞因子, 研究证明成纤维细胞生长因子2可以抑制单层扩增的软骨细胞去分化并促进细胞增殖^[23], 从而促进软骨细胞合成细胞外基质和促进软骨修复^[24]。骨形态发生蛋白家族对软骨形成和骨形成均有促进作用, 所以修复软骨同时损伤时应用骨形态发生蛋白更有利。研究显示骨形态发生蛋白2可以促进软骨细胞表达TIMP-1、Sox9、II型胶原及aggrecan的mRNA^[25]。骨形态发生蛋白7可以提高软骨细胞外基质中蛋白多糖的含量。Mason等^[26]将转染骨形态发生蛋白7的骨髓来源的间充质干细胞与PGA复合后植入兔关节骨软骨全层缺损模型, 8周后, 发现受损骨软骨完全或基本完全修复。

诱导间充质干细胞向软骨细胞分化是一个复杂的过程, 包括细胞因子在内的各种诱导条件都需要进行深入研究, 探索合适的细胞因子浓度和细胞因子的配对, 以达到诱导间充质干细胞向软骨细胞分化的最佳条件, 便于构建更加优质的组织工程化软骨。

4 参考文献

- [1] Hwang NS, Kim MS, Sampattavanich S, et al. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24(2):284-291.
- [2] Seyedin SM, Rosen DM, Segarini PR. Modulation of chondroblast phenotype by transforming growth factor-beta. *Pathol Immunopathol Res*. 1988;7(1-2):38-42.
- [3] Kim SE, Park JH, Cho YW, et al. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: implications for cartilage tissue engineering. *J Control Release*. 2003;91(3):365-374.
- [4] Vivien D, Galéra P, Lebrun E, et al. Differential effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on the cell cycle of cultured rabbit articular chondrocytes. *J Cell Physiol*. 1990;143(3):534-545.
- [5] Nixon AJ, Brower-Toland BD, Bent SJ, et al. Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(379 Suppl):S201-213.
- [6] Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, et al. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*. 1988; 267(2):416-425.
- [7] Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, et al. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(2):276-288.
- [8] Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, et al. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res*. 1998;47(3):90-100.
- [9] Maor G, Hochberg Z, Silbermann M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1993;128(1):56-64.
- [10] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*. 2003;89(6):1235-1249.
- [11] Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):914-919.
- [12] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res*. 2006;21(4):626-636.
- [13] Oh CD, Chun JS. Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem*. 2003;278(38): 6563-6571.
- [14] Lin JH. *Zhongguo Linchuang Kangfu*. 2004;23(8):4808-4809. 林建华. 组织工程软骨研究中各种生长因子的协同作用和最佳效应[J]. *中国临床康复*, 2004, 23(8): 4808-4809.
- [15] Lin Y, Luo E, Chen X, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):929-939.
- [16] Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;(289):292-312.
- [17] Pujol JP, Galera P, Redini F, et al. Role of cytokines in osteoarthritis: comparative effects of interleukin 1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbit articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl*. 1991;27:76-79.
- [18] Ilin G, Beck S, Hardwick R, et al. Opposite effects of recombinant human transforming growth factor-beta 1 on bone regeneration in vivo: effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone*. 1998;22(6):613-620.
- [19] Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, et al. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta 1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol*. 2005;33(8):865-872.
- [20] Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, et al. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater*. 2005;9: 58-67.
- [21] Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, et al. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. *Biosci Bioeng*. 2007;103(1):98-100.
- [22] Fu Q, Yu DD, Wang Y, et al. *Zhongguo XiuFu Chongjian Waiké Zazhi*. 2008;22(2):157-162. 付勤, 于东东, 王勇, 等. TGF-β 1和IGF-1共同转染大鼠BMSCs向软骨细胞分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(2): 157-162.
- [23] Martin I, Suetterlin R, Baschong W, et al. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem*. 2001;83(1):121-128.
- [24] Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(4):278-286.
- [25] Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(3):980-990.
- [26] Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(379 Suppl):S171-178.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 胰岛素样生长因子 1 被认为是调节软骨形成和代谢最关键性的细胞因子, 能够促进关节软骨细胞合成和分泌细胞外基质并抑制软骨细胞凋亡, 加速细胞增殖和软骨细胞向软骨细胞分化。实验以人脂肪来源间充质干细胞为研究对象, 探讨胰岛素样生长因子 1 单独诱导人脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞定向分化的可能性, 及在诱导分化和转化生长因子 β1 的相互作用, 结果显示胰岛素样生长因子 1 可以单独诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞分化, 表达软骨细胞特异性细胞表型, 胰岛素样生长因子 1 与转化生长因子 β1 诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞分化有协同作用。

课题评估的“金标准”: 检测成软骨诱导结果评价的标准无明确公认的金标准, 通常检测指标评价主要包括软骨细胞的特异性表型, 如II型胶原, 蛋白多糖等, 内容很多, 本课题中选择部分指标进行研究评价。

设计或课题的偏倚与不足: 本课题实施中未采用盲法, 胰岛素样生长因子 1 诱导脂肪来源间充质干细胞向软骨细胞进行分化的目的是构建组织工程软骨, 由于时间原因, 未能进行体内试验, 存在不足, 后续研究中将继续进行此方面研究。