

天然可降解脱钙骨基质材料复合脂肪干细胞的三维培养*☆◆

唐少锋¹, 李朝翠², 刘承杏³

Three-dimensional culture of adipose-derived stem cells combined with demineralized bone matrix scaffolds

Tang Shao-feng¹, Li Chao-cui², Liu Cheng-xing³

Abstract

BACKGROUND: Adipose-derived stem cells (ADSCs) and demineralized bone matrix (DBM) can be obtained from the same donor. However, there are few studies on the co-culture of ADSCs as seed cells while DBM as scaffold.

OBJECTIVE: To observe the growth and proliferation of ADSCs cultured combining with DBM.

METHODS: The subcutaneous adipose tissue was cut and collected from the inguinal fat pads of rabbits under aseptic condition. Primary ADSCs were isolated subsequently by the methods of stirring digestion within collagenase type I. After primary culture and subculturing, ADSCs were expanded to the 3rd passage. Cell morphology and growth were observed under an inverted microscope, and the expression of cell surface antigen was detected using immunofluorescence staining. DBM was prepared using rabbit ilium. The 3rd passage of ADSCs was seeded into the allogenic DBM scaffold sample for co-culture. Cell adherence and growth were observed under an inverted microscope at 1 week after co-culture, and the haematoxylin-eosin staining was performed at 2 weeks after co-culture.

RESULTS AND CONCLUSION: ADSCs isolated from rabbit subcutaneous adipose tissues expanded rapidly. After the third passage, most of the passage cells were positive for CD44 but negative for CD34. The prepared DBM was three-dimensional stereochemical structure with more hollows; there were good plasticity and tolerable mechanical strength. Scanning electron microscopy and haematoxylin-eosin staining revealed that ADSCs adhered and grew well within the DBM scaffolds, and could synthesize cartilage extracellular matrix in the scaffold. These results show that the DBM can provide an appropriate microenvironment for the proliferation and expressions of extracellular matrix of ADSCs.

Tang SF, Li CC, Liu CX. Three-dimensional culture of adipose-derived stem cells combined with demineralized bone matrix scaffolds. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(12):2101-2105.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脱钙骨基质是一种常用的组织工程支架材料, 脂肪干细胞是近年来发现的一种成体干细胞, 二者均可自体取材, 二者复合培养的研究还未见报道。

目的: 观察脂肪干细胞与脱钙骨基质复合后三维培养的生长、增殖情况。

方法: 无菌切取兔腹股沟皮下脂肪垫, 采用 I 型胶原酶搅拌消化法分离培养原代脂肪干细胞, 系列传代传至第 3 代, 倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况, 免疫荧光细胞化学染色检测细胞表面抗原的表达。切取兔髂骨, 制备脱钙骨基质。取第 3 代脂肪干细胞, 与脱钙骨基质复合后共培养, 1 周后扫描电镜观察细胞黏附和生长情况, 2 周后石蜡包埋切片进行苏木精-伊红染色。

结果与结论: 自兔皮下脂肪分离培养获得的脂肪干细胞增殖迅速, 第 3 代脂肪干细胞表面抗原 CD44 呈阳性表达, CD34 为阴性; 制备的脱钙骨基质为三维立体多孔结构, 具有良好的可塑性, 并有一定的机械强度。复合培养后电镜扫描、苏木精-伊红染色显示, 细胞在脱钙骨基质表面和孔隙内黏附生长良好, 并能继续增殖和分泌胞外基质。结果提示脂肪干细胞与脱钙骨基质复合共培养生长增殖良好, 并能分泌胞外基质。

关键词: 脱钙骨基质; 脂肪源性干细胞; 组织工程; 培养; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.12.004

唐少锋, 李朝翠, 刘承杏. 天然可降解脱钙骨基质材料复合脂肪干细胞的三维培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(12):2101-2105. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是近年来发现的一种成体干细胞^[1], 此细胞与骨髓间充质干细胞在细胞形态、生长动力学、细胞衰老性、表面标志、多向分化潜能以及外源基因的导入效率等方面没有明显区别^[2]。由于具有来源丰富, 取材方便、细胞获取量大等显著优势, 有望成为理想的组织工程种子细胞^[3-5],

其发现后迅速成为人们的研究热点。本实验自成年兔皮下脂肪分离培养脂肪源性干细胞, 与自体脱钙骨基质复合后三维培养, 观察细胞的生长增殖情况。为进一步以脂肪源性干细胞为种子细胞、脱钙骨基质为支架材料移植修复骨、软骨缺损提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

¹Department of Spinal Injury and Repair, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China;
²State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, Yunnan Province, China;
³Department of Anatomy, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Tang Shao-feng☆, Doctor, Attending physician, Department of Spinal Injury and Repair, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China
tshf200097@sina.com

Correspondence to: Liu Cheng-xing, Lecturer, Department of Anatomy, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China
lchx17168@yahoo.com.cn

Supported by: the Foundation of Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, No. YG2009016*

Received: 2010-01-18
Accepted: 2010-02-21

¹ 解放军成都军区昆明总医院脊髓损伤治疗科, 云南省昆明市 650032; ² 中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室, 云南省昆明市 650223; ³ 昆明医学院解剖教研室, 云南省昆明市 650031

唐少锋☆, 男, 1971年生, 安徽省砀山县人, 汉族, 主治医师, 2008年昆明医学院毕业, 博士, 主要从事骨、软骨损伤修复研究。tshf200097@sina.com

通讯作者: 刘承杏, 讲师, 昆明医学院解剖教研室, 云南省昆明市 650031 lchx17168@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)12-02101-05

收稿日期: 2010-01-18
修回日期: 2010-02-21
(20100118006/M·Z)

时间和地点: 实验于2008-09/2009-11在中国科学院昆明动物研究所完成。

材料:

实验动物: 健康成年新西兰大白兔8只, 质量2.5~3.0 kg, 雌雄不限, 由昆明医学院实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(滇)2005-0008, 实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[6]。

试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
速眠新注射液	长春农牧大学兽医研究所
DMEM 培养基、I 型胶原酶	美国 Gibco
胰蛋白酶	美国 Sigma
胎牛血清	杭州四季青
CD44 抗体	美国 Chemicon
CD34 抗体	福州迈新
EDTA	美国 Amresco
扫描电子显微镜	日本日立
病理切片机	德国 LEICA

实验方法:

脂肪干细胞的分离培养和传代^[7]: 大白兔以速眠新(0.2~0.3 mL/kg)肌注麻醉后, 80 g/L 硫化钠水溶液术区脱毛备皮, 仰卧固定于手术台上, 消毒, 铺单, 顺腹股沟作斜切口, 无菌切取腹股沟皮下脂肪垫。称质量后移入超净台上, PBS漂洗, 尽量清除组织中的小血管, 去除外包膜和明显的结缔组织。用眼科剪剪碎呈糜状, 加入3倍体积1 g/L的I型胶原酶, 于37℃搅拌消化60~90 min, 加入等量含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基, 用吸管轻柔吹打, 将液性部分移入离心管, 1 200 r/min离心10 min, 倾去上层残余脂肪及上清液, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基悬浮细胞, 200目筛网过滤后置于37℃、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中静置培养。2 d后首次换液, 用培养基轻柔漂洗以清除未贴壁细胞, 以后每3 d换液1次。每日在倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况, 至细胞长满80%左右时, 用含0.1 g/L EDTA-2Na·2H₂O的0.5 g/L胰酶消化, 按1:3传代培养。

细胞表面抗原的表达免疫荧光细胞化学染色:

取传至第3代细胞, 接种到预置有盖玻片的6孔板中, 培养2 d后行免疫荧光细胞化学染色, 一抗为CD44和CD34, 以PBS代替一抗作为阴性对照, 步骤如下: 收集长有细胞的盖玻片, PBS漂洗, 2 min×2次; 40 g/L多聚甲醛固定20 min;

吸除固定液, PBS漂洗, 2 min×3次; 用含体积分数为10%的羊血清封闭30 min; 弃血清, 不洗, 滴加一抗(CD44为1:200, CD34为1:500), 室温孵育1 h, 4℃过夜; 弃一抗, PBS漂洗3 min×3次; 滴加结合荧光素FITC的相应二抗(1:10), 室温孵育30 min; 弃二抗, PBS漂洗3 min×3次, 蒸馏水漂洗3 min; 荧光显微镜下观察并照相。

脱钙骨基质的制备: 取兔髌骨, 剔除所有软组织、骨膜以及一侧骨皮质, 修剪成一侧为松质骨、另一侧为皮质骨的骨块, 立即压力流水冲洗清除骨髓及残血, 蒸馏水多次漂洗至水澄清, 晾干。1:1氯仿甲醇溶液室温下浸泡脱脂(固/液=1/100)6 h×2次, 风干; 0.6 mol/L HCl 4℃脱钙, 每6 h更换液体一次(50 mL/g), 干燥骨块, 检查脱钙情况, 至镊子夹取时不再坚硬且有弹性即可, 约需24 h。蒸馏水反复洗酸至中性。再以1:1氯仿甲醇溶液脱脂一次, 37℃恒温箱干燥, 3次称质量恒定后-20℃冰箱保存备用。扫描电镜观察超微结构。与细胞复合前先将制备好的脱钙骨基质修剪成4 mm×4 mm×2 mm的小方块, 体积分数为75%乙醇浸泡30 min, 于超净台上过夜凉干, 紫外线照射30 min, DMEM预湿24 h。

脂肪干细胞与脱钙骨基质复合培养: 收集第3代脂肪干细胞, 计数后, 制成4×10¹⁰ L⁻¹悬液。取已预湿的支架, 无菌纱布吸除水分, 取上述细胞悬液30 μL均匀接种于脱钙骨基质的松质骨面, 置于培养箱中培养, 根据支架湿润程度, 于60~90 min后小心在支架周围轻柔加入常规培养基, 防止将细胞冲洗掉, 至将支架完全浸没, 隔2 d更换一次培养基。1周后扫描电镜观察细胞黏附和生长情况, 2周后石蜡包埋切片行苏木精-伊红染色。

主要观察指标: ①脂肪干细胞表面标志物的表达。②脱钙骨基质的超微结构。③脂肪干细胞与脱钙骨基质复合共培养后的超微结构、苏木精-伊红染色观察细胞黏附生长及基质分泌情况。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 实施为第一、二、三作者, 评估由第三作者完成。所有参与人员均接受过培训, 采用盲法评估。

2 结果

2.1 兔脂肪干细胞的形态 原代细胞中含有较

多漂浮的活细胞, 经换液、传代, 红细胞被去除, 自第2代开始, 细胞传代后生长较快, 低密度生长时呈短梭形或多角形, 分布均匀(图1), 长满培养瓶趋于融合时呈长梭形编织状, 局部呈漩涡状排列, 细胞形态非常单一。

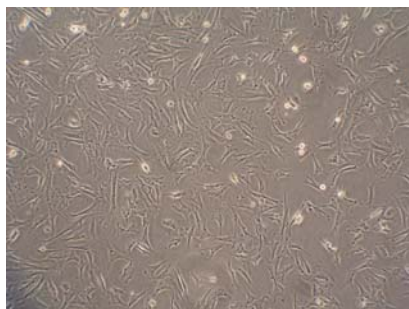


Figure 1 The 3rd passage of adipose-derived stem cells cultured for 24 hours ($\times 50$)
图1 第3代脂肪干细胞培养24 h ($\times 50$)

2.2 兔脂肪干细胞表面标志物的表达 免疫荧光细胞化学染色结果显示, 第3代脂肪干细胞CD44表达阳性, 而CD34表达阴性, 可初步确认这是一群脂肪来源的间充质干细胞(图2)。

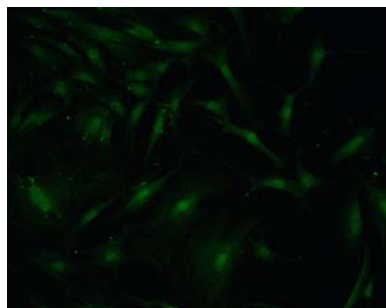


Figure 2 Immunofluorescence staining results show positive expression of CD44 in the 3rd passage of adipose-derived stem cells ($\times 200$)
图2 第3代脂肪干细胞 CD44 免疫荧光染色呈阳性 ($\times 200$)

2.3 脱钙骨基质大体观察及电镜扫描 经脱钙、脱脂、脱蛋白等处理制备得到的脱钙骨基质干燥前外观为白色海绵状, 质地柔软, 一侧皮质骨, 一侧松质骨, 皮质骨侧较致密, 而松质骨侧疏松多孔, 呈蜂窝状。用镊子夹持时弹性好, 且有一定的韧性和强度, 可按要求修剪成一定形状和大小。扫描电镜下见脱钙骨基质松质骨面布满大小不等的孔隙, 直径为100~500 μm , 各孔隙相互交通(图3)。

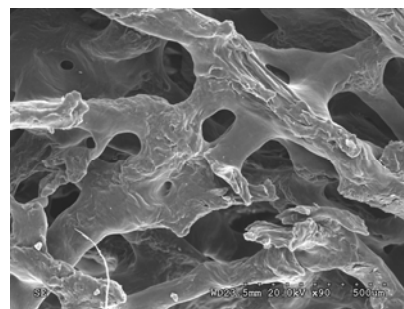


Figure 3 Ultrastructure of demineralized bone matrix (Scanning electron microscope, $\times 90$)
图3 脱钙骨基质的超微结构观察(扫描电镜, $\times 90$)

2.4 脂肪干细胞与脱钙骨基质相容性观察

扫描电镜观察结果: 脂肪干细胞与脱钙骨基质复合培养1周后扫描电镜下可见脱钙骨基质表面、孔隙中及其内壁有大量细胞附着生长, 成条索状并相互连接, 细胞分泌的胞外基质在局部形成膜状成片覆盖于脱钙骨基质表面及其孔隙内壁(图4)。

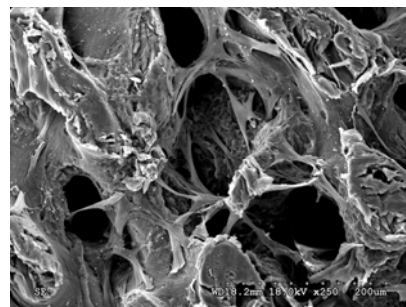


Figure 4 Ultrastructure of adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix complexes cultured for 1 week (Scanning electron microscope, $\times 250$)
图4 脂肪干细胞脱钙骨基质复合物培养1周的超微结构观察(扫描电镜, $\times 250$)

苏木精-伊红染色观察结果: 苏木精-伊红染色见支架表面及其孔隙中附着大量细胞, 培养2周后, 增殖的大量细胞及其分泌的胞外基质几乎将孔隙完全填充(图5)。

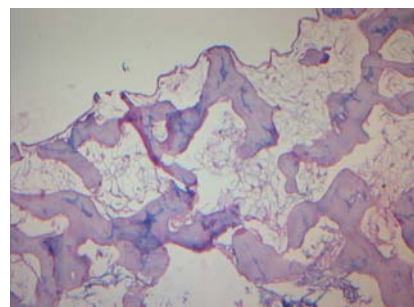


Figure 5 The adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix complexes cultured for 2 weeks using hematoxylin-eosin staining ($\times 100$)
图5 脂肪干细胞与脱钙骨基质复合培养2周后苏木精-伊红染色($\times 100$)

3 讨论

组织工程的研究涉及种子细胞、生物支架材料和组织构建三方面的内容^[8]。其中种子细胞的选择是组织工程研究中最基本也是首要的环节。种子细胞是组织工程研究的基础,也是制约组织工程发展的瓶颈。对于软骨组织工程而言,自体软骨细胞仍然是目前惟一批准用于临床的种子细胞^[9]。但自体软骨细胞来源有限、体外扩增困难、容易老化。种子细胞来源不足是目前制约软骨组织工程广泛应用于临床的关键性问题。寻找能够替代软骨细胞的种子细胞是近年来软骨组织工程研究的热点。脂肪干细胞是近年来发现的一种成体干细胞,具有与骨髓基质干细胞类似的多分化潜能和生物学特性^[10-11],因来源丰富、取材方便,对人体影响小等优点^[5],迅速成为组织工程学的研究热点^[12-15]。在实验中发现,成年新西兰大白兔一侧的腹股沟脂肪垫约为2.5 g,采用本实验所用的方法分离培养后,可得到 $(1.0\sim 2.0)\times 10^6$ 个原代脂肪干细胞,短期传代扩增,即可满足移植所需的细胞数量,必要时可两侧腹股沟和颈肩处同时取材以增加原代细胞的获取量。

支架材料是组织工程研究中涉及的另一重要环节,是影响组织工程化软骨构建质量的另一关键因素。支架材料是组织工程研究的桥梁和纽带。它是种子细胞在形成组织之前赖以生存和依附的三维支架,为细胞的增殖、分化、营养交换、新陈代谢以及细胞外基质分泌等生理活动提供空间场所。支架材料不仅影响种子细胞的生物学行为和培养的效率,而且决定着移植后能否与机体很好适应、结合和修复,这是限制组织工程能否应用于临床的一个关键因素。理想的软骨组织工程载体材料应具备以下特点:①良好的生物相容性。②良好的生物降解性和降解率。③具有三维立体多孔结构。④可塑性和一定的机械强度。⑤良好的细胞-材料界面。⑥材料易于获得,制备工艺简便。⑦消毒方法简单有效,材料不变性^[16-17]。

脱钙骨基质是一种天然可降解生物材料。在前期工作中,发现脂肪干细胞与骨基质明胶具有良好的组织相容性,而骨基质明胶是在脱钙骨基质的基础上,通过一系列的物理、化学处理而得到的^[18-19]。脱钙骨基质较骨基质明胶简化了制备步骤,缩短了操作流程。同骨基质明胶类似,脱钙骨基质表面具有特殊的细胞识别信号(如某些氨基酸序列:精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸,即RGD序列),能促进细胞黏附和增殖,并可刺激细胞分化,表达特定的基质成分。在实验中发现,脂肪干细胞与脱钙骨基质复合培养后,苏木精-伊红染色和电镜下均可见细胞在支架表面及孔隙内壁黏附良好,早期还可见单个胞体,随着培养时间延长,细胞继续生长增殖,密度增加,

并分泌胞外基质,成片状覆盖支架,未见细胞增殖受抑制或中毒迹象,说明支架材料具有良好的生物相容性及细胞亲和性。在本实验中,与脂肪干细胞复合的脱钙骨基质来自同一供体,这样就避免了异体移植可能产生的免疫排斥反应对移植效果的影响。

本实验将负载种子细胞的三维支架脱钙骨基质制备成一侧松质骨,另一侧骨皮质的特殊载体结构是基于以下考虑,一是松质骨侧疏松多孔,有利于细胞接种、黏附、生长、分泌的细胞外基质沉积以及营养物质和代谢产物交换,为组织工程种子细胞提供了一个良好的微环境。而皮质骨侧较致密,能使细胞有效地吸附和固定于支架内,防止接种细胞流失,从而保证足够的细胞接种数量。再者是在制备过程中,剔除了一侧皮质骨,同时通过控制脱钙程度,使制备的脱钙骨基质不仅具有良好的弹性和柔韧性,而且具有一定的机械强度,在将来植入体内后,不仅对维持支架形状、支撑新生组织具有重要意义,而且在局部微环境的影响下,更倾向于形成软骨下骨。

在本实验中,选用的支架材料脱钙骨基质不仅具有细胞载体的功能,其本身内在的多种生物活性因子对脂肪干细胞的增殖分化也具有重要的影响。脱钙骨基质在制备过程中去除了大部分非胶原蛋白,但保留了骨形态发生蛋白成分。骨形态发生蛋白最初是因其显著的骨诱导作用被发现的,骨形态发生蛋白诱导成骨作用主要是通过软骨内成骨实现的,软骨形成是其中的一个必然阶段,未分化的间充质细胞首先要分化为软骨细胞。骨形态发生蛋白属于转化生长因子 β 多肽超家族,其中骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白4、骨形态发生蛋白6和骨形态发生蛋白7均可上调蛋白聚糖和II型胶原的表达^[20-25],促进脂肪干细胞成软骨分化。在实验中发现,脂肪干细胞与脱钙骨基质复合后体外常规培养2周,利用RT-PCR虽然没能检测到II型胶原的表达,但却表达蛋白聚糖,而体外未分化状态的脂肪干细胞并不表达蛋白聚糖和II型胶原^[26]。Winter等^[27]甚至报道,脂肪干细胞单层培养成软骨诱导后,与同时培养的软骨细胞对比,成软骨分化是不充分、不完全的,在基因水平上虽然能够检测到一些软骨分化标记,如软骨低聚物基质蛋白、核心蛋白多糖(decorin)、扩增相关基因YKL39(expansion-related genes YKL39)等,但软骨连接蛋白1(cartilage-linking protein 1, CRTL1)、糖胺聚糖(aggrecan)、纤维调节素(fibromodulin)仍为阴性表达。尤其是一些软骨特异性基因,如软骨细胞表达的蛋白68(chondrocyte-expressed protein 68, CEP-68),利用cDNA芯片分析也未能检测到。这表明脱钙骨基质复合培养可促进或诱导脂肪干细胞表达软骨细胞的部分功能特征。由于脱钙骨基质中骨形态发生蛋白极其微量,其含量可能还不足以达到有效作用浓度,因此不能

断定蛋白聚糖的表达就是骨形态发生蛋白作用的结果,其作用机制还有待进一步研究。

本实验采用的支架材料脱钙骨基质较骨基质明胶制备更加容易,制备方法简单,使用前消毒方法简便有效。脂肪干细胞与其复合后共培养生长增殖良好,并能分泌细胞外基质。尤其是二者均可自体取材,表明以脂肪干细胞为种子细胞、脱钙骨基质为支架材料有望成为比较理想的软骨组织工程构建方法,可进一步用于移植修复骨、软骨缺损的实验研究。

4 参考文献

- [1] Wei Y, Sun X, Wang W, et al. Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy*. 2007;9(8):712-716.
- [2] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-109.
- [3] Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A. Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(6):621-640.
- [4] Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009;76(2):56-66.
- [5] Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-120.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestion for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Tang SF, Liu CX, Ji LS, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(10):1844-1848.
唐少锋,刘承杏,姬林松,等. 兔脂肪干细胞的体外分离培养特性[J]. 中国组织工程与临床康复, 2009, 13(10):1844-1848.
- [8] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-1260.
- [9] Wei Y, Sun X, Wang W, et al. Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy*. 2007;9(8):712-716.
- [10] Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-827.
- [11] Ju HB, Deng ZS, Zhang SL, et al. Zhongguo Yishi Zazhi. 2007;9(3):315-319.
鞠洪斌,邓展生,张胜利,等. 大鼠脂肪和骨髓来源间充质干细胞成骨分化比较的体外研究[J]. 中国医师杂志, 2007, 9(3):315-319.
- [12] Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009;79(4):235-244.
- [13] Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, et al. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234(1):1-9.
- [14] Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen Med*. 2009;4(1):109-117.
- [15] Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, et al. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(7):885-893.
- [16] Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1997;38(2):95-104.
- [17] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-2543.
- [18] Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(12):3511-3515.
- [19] Jin DD, Ou BP, Shao ZH, et al. Zhonghua Waikexi Zazhi. 1991;29(5):312-314.
金大地, 邵伯平, 邵振海, 等. 骨基质明胶的制备及其临床应用38例报告[J]. 中华外科杂志, 1991, 29(5):312-314.
- [20] Wei YY, Hu YY, Hao W, et al. Zhongguo Xuefu Chongjian Waikexi Zazhi. 2006;20(8):845-848.
魏义勇, 胡蕴玉, 郝伟, 等. 重组人骨形态蛋白2诱导脂肪干细胞向软骨细胞分化的形态学研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(8):845-848.
- [21] Zheng B, Cao B, Li G, et al. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1891-1901.
- [22] Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1222-1232.
- [23] Hennig T, Lorenz H, Thiel A, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol*. 2007;211(3):682-691.
- [24] Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(3):902-908.
- [25] Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1799-1808.
- [26] Ponticelli MS, Schinagl RM, Kadiyala S, et al. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):246-255.
- [27] Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003;48(2):418-429.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 解放军成都军区昆明总医院院管课题资助项目(YG2009016)。

利益冲突: 无利益冲突。

课题评估的“金标准”: 电镜扫描是观测种子细胞在支架材料上黏附、生长状况的金标准。