

# 兔脂肪干细胞体外构建组织工程软骨：负载胰岛素样生长因子1基因的作用\*\*

张传辉, 杨 军, 李建军, 孙仰白

## In vitro construction of tissue-engineered cartilage using rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells: Effects of transfected insulin-like growth factor-1 gene

Zhang Chuan-hui, Yang Jun, Li Jian-jun, Sun Yang-bai

### Abstract

**BACKGROUND:** The preliminary study confirmed that transfection of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) gene can significantly promote the proliferation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) in two-dimensional culture conditions.

**OBJECTIVE:** On the basis of preliminary study, to investigate the proliferation capacity of rabbit ADSCs transfected with IGF-1 gene in three-dimensional culture conditions using chitosan gelatin complex scaffold as carrier, and to construct tissue-engineered cartilage initiatively.

**METHODS:** ADSCs were harvested from the posterior subcutaneous adipose tissue of adult New Zealand white rabbits. After being transfected with pcDNA3.1-IGF-1, the cells were seeded onto Chitosan-gelatin scaffolds, and divided into groups: Blank control group, non-transfected ADSCs was incubated; Empty vector group: ADSCs induced by IGF-1 was incubated; Gene transfection group was transfected ADSCs/scaffold composite. After culture for 1 week, cell morphology was observed by scanning electron microscope (SEM), and the growth curve was measured by MTT, the proliferation and distribution of cells were labeled by CM-DiL, and the contents of glycosaminoglycan in each group were determined by using dimethylmethylene blue dye-binding assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The stable expression of pcDNA3.1-IGF-1 cell lines were established successfully and showed stable expression of IGF-I in mRNA and protein level. SEM showed that the cells exhibited a good attachment and stretch in the scaffold, in which gene transfection group grew the most vigorously. MTT and GAG results suggested that gene transfection group displayed strongest proliferate ability with highest glycosaminoglycan content ( $P < 0.01$ ). CM-DiL fluorescence showed that the cells distributed well with the highest survival rate ( $P < 0.05$ ). Those revealed that transfected rabbit ADSCs with IGF-1 gene can promote the proliferation of ADSCs/scaffold composite and the secretion of chondral extracellular matrix such as glycosaminoglycan.

Zhang CH, Yang J, Li JJ, Sun YB. In vitro construction of tissue-engineered cartilage using rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells: Effects of transfected insulin-like growth factor-1 gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(28): 5131-5135. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 前期研究证实在二维培养条件下, 转染胰岛素样生长因子1基因能够明显促进脂肪间充质干细胞的增殖。

**目的:** 在前期研究基础上, 利用壳聚糖明胶复合物为立体培养的载体, 观察三维立体培养条件下胰岛素样生长因子1基因转染对兔脂肪间充质干细胞增殖能力的影响, 体外初步构建组织工程软骨。

**方法:** 分离、培养成年新西兰大白兔脂肪间充质干细胞, 构建稳定表达 pcDNA3.1-IGF-1 的细胞株, 鉴定后接种于壳聚糖三维支架材料上, 分组培养: 空白对照组接种未转染基因的脂肪间充质干细胞, 空载体组接种胰岛素样生长因子1诱导条件下培养的脂肪间充质干细胞, 基因转染组接种稳定转染胰岛素样生长因子1基因的脂肪间充质干细胞, 培养1周。扫描电镜观察各组细胞形态, MTT法绘制细胞增殖曲线, CM-DiL荧光标记后观察细胞增殖比率及细胞分布, DMMB法测定糖胺聚糖含量。

**结果与结论:** 成功构建稳定表达 pcDNA3.1-IGF-1 的细胞株, 转染后的细胞株在 mRNA 水平上获得胰岛素样生长因子1的表达, 并成功翻译为蛋白。扫描电镜示各组细胞在支架上贴附、伸展良好, 基因转染组细胞生长最为旺盛。MTT 及 GAG 检测结果提示, 基因转染组增殖能力最强、糖胺聚糖最高 ( $P < 0.01$ ), 荧光标记显示细胞分布均匀, 存活率高 ( $P < 0.05$ )。提示胰岛素样生长因子1基因转染联合三维立体培养能够有效促进脂肪间充质干细胞的增殖和软骨细胞外基质糖胺聚糖的分泌。

**关键词:** 胰岛素样生长因子1; 软骨组织工程; 脂肪间充质干细胞; 软骨细胞; 基因转染

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.28.001

Chaoyang Central Hospital, Chaoyang 122000, Liaoning Province, China

Zhang Chuan-hui★, Master, Working at Chaoyang Central Hospital, Chaoyang 122000, Liaoning Province, China zhang\_chuanhui@hotmail.com

Correspondence to: Yang Jun, Doctor, Associate professor, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China yangj1@sj-hospital.org

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30772216\*

Received: 2010-01-22 Accepted: 2010-03-13

朝阳市中心医院, 辽宁省朝阳市 122000

张传辉★, 男, 1982年生, 汉族, 辽宁省大连市人, 硕士, 医师, 主要从事脊柱、创伤骨科研究。 zhang\_chuanhui@hotmail.com

通讯作者: 杨军, 博士, 副教授, 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁省沈阳市 110004 yangj1@sj-hospital.org

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1673-8225 (2010)28-05131-05

收稿日期: 2010-01-22 修回日期: 2010-03-13 (20091109009/GW-Z)

张传辉, 杨军, 李建军, 孙仰白. 兔脂肪干细胞体外构建组织工程软骨: 负载胰岛素样生长因子1基因的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(28):5131-5135. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

创伤和骨性关节炎等疾病所引起关节软骨损伤的临床临床上仍然难以修复, 所以应用组织工程软骨修复软骨缺损的研究成为近年来一个热门研究领域, 而种子细胞则是其中的一个重要因素<sup>[1]</sup>。自从Zuk等<sup>[2]</sup>发现脂肪间充质干细胞的存在, 因其具有多能分化潜能, 并且来源广泛、取材方便、损伤小、免疫原性低、增殖迅速、表型稳定等优点<sup>[3-7]</sup>, 已经逐渐成为一种较为理想的种子细胞。

基因强化是组织工程研究的新思路, 它克服了以往外源性生长因子持续时间短, 需要反复添加的缺点。作者前期研究中成功分离培养兔脂肪间充质干细胞, 并证实二维培养条件下, 胰岛素样生长因子1基因转染能够明显促进脂肪间充质干细胞的增殖<sup>[8]</sup>。本实验应用基因转染技术构建稳定表达pcDNA3.1-IGF-1的细胞株, 并在此基础上进行体外构建组织工程软骨的初步研究。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞基因转染体外构建组织工程软骨观察实验。

**时间及地点:** 于2008-12/2009-10在中国医科大学附属盛京医院小儿外科中心实验室完成。

**材料:** 成年新西兰大白兔4只, 由盛京医院小儿外科中心实验室动物中心提供, 动物使用许可证号: SYXK(辽)2003-0019, pcDNA3.1-IGF-1由吉林大学徐莘香教授馈赠。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。壳聚糖/明胶支架由天津大学生物材料研究生生产制造(孔径100-20 μm)。

### 试剂及仪器:

| 试剂及仪器                                     | 来源                    |
|-------------------------------------------|-----------------------|
| DMEM-HG 及 FBS                             | Hyclone, USA          |
| I 型胶原酶, MTT                               | Biosharp, USA         |
| 鼠抗人 IGF-1 单克隆抗体                           | Neumarker, USA        |
| Lipofectamine2000, Trizol                 | Invitrogen, USA       |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit | Fermentas, 立陶宛        |
| Vybrant® CM-Dil cell-labeling solution    | Molecular Probes, USA |
| 1, 9-二甲基亚甲蓝、硫酸软骨素及木瓜蛋白酶                   | Sigma, USA            |
| 核酸、蛋白电泳及转移装置、梯度                           | Bio-Rad, USA          |
| PCR 仪和 UV 凝胶成像仪                           |                       |
| 酶标仪 Elx808                                | BioTek, USA           |
| 冰冻切片机, 荧光显微镜                              | MICROM, 德国            |
| 扫描电镜                                      | KYKY-EM3200, 中国       |

### 实验方法:

**原代细胞的分离和体外培养<sup>[9-11]</sup>:** 取兔颈后皮下脂肪组

织, 按文献介绍 I 型胶原酶法分离细胞, 锥虫蓝染色检测细胞活力, 接种至50 mL细胞培养瓶中, 置37 ℃、饱和湿度、体积分数5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱内培养。2 d后首次换液, 以后隔日换液。细胞长满培养瓶底后按1:2比例传代、培养。

**真核表达质粒pcDNA3.1-IGF-1及空载体pcDNA3.1的大量制备及鉴定:** 取pcDNA3.1-IGF-1高频转化感受态细胞单挑克隆, 小量提取质粒DNA, 酶切鉴定并送Invitrogen公司测序, 碱裂解法大量制备质粒DNA。

**基因转染及转染后鉴定:** 利用阳离子脂质体Lipofectamine2000介导的基因转染法转染脂肪间充质干细胞真核表达质粒pcDNA3.1-IGF-1, 转染后24 h按照1:20比例传代, 48 h后利用G418筛选(G418筛选质量浓度为500 mg/L, 维持质量浓度为200 mg/L), 挑单克隆传代培养以获得稳定转染株。转染后应用RT-PCR及Western blot法行细胞转染后鉴定<sup>[11]</sup>。

**支架材料的处理:** 将厚度为3.5 mm, 直径为15 mm的圆片状壳聚糖支架材料环氧乙烷消毒, 晾干, 紫外灯下照射备用, 实验前完全培养基预湿。

**细胞的接种与分组培养:** 本次实验分为3组, 各组支架材料均为壳聚糖/明胶支架: 空白对照组接种未转染基因的脂肪间充质干细胞-支架复合材料; 空载体组接种体外胰岛素样生长因子1诱导后的脂肪间充质干细胞-支架复合材料, 继续胰岛素样生长因子1外源诱导培养(胰岛素样生长因子1 100 μg/L, 维生素C 50 mg/L, 地塞米松10<sup>-7</sup> mol/L); 基因转染组接种转染胰岛素样生长因子1基因的脂肪间充质干细胞支架复合组。各组细胞均为第4代, 以5×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>的密度接种于支架材料上, 温箱中孵育4 h, 待细胞附着贴壁后, 空白对照组与基因转染组各滴加 5 mL完全培养基, 空载体组滴加5 mL软骨诱导培养基, 均于37 ℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养7 d。

**大体形态观察及扫描电镜观察:** 1周后收集标本, 大体观察组织工程软骨的大体形态, 表面光泽。标本以25 g/L戊二醛固定, 丙酮脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥, 表面喷金镀膜, 扫描电镜观察。

**MTT法绘制细胞增殖曲线:** 将壳聚糖制成直径5 mm, 厚度3.5 mm, 放于96孔细胞培养板中, 如上所述分组, 接种、培养细胞, 每块材料接种5×10<sup>5</sup>个细胞, 每组设定6个复孔。分别于1, 3, 5, 7 d应用MTT法观察细胞-支架复合物的增殖情况。实验前以PBS冲洗标本2次, 各滴加50 μL的MTT溶液(5 g/L)和150 μL培养基, 37 ℃孵育4 h后弃去各孔内培养液, 加入200 μL DMSO, 振荡10 min, 选取490 nm波长, 在酶标仪上测定各孔的吸光度值, 计算各组的平均值, 进行统计学处理, 绘制细胞增殖曲线。

**DiI荧光染料标记后计数细胞存活率:** 应用即用型

CM-DiL, 按每毫升PBS加5  $\mu$ L DiL标记液的比例配成工作液, 按说明书标记细胞后, 完全培养基培养, 待细胞80%以上融合后, 胰酶消化收集细胞, 接种于壳聚糖支架材料上, 按上述分组施加干预因素, 收集样本, 冰冻包埋剂常规包埋, 以10  $\mu$ m厚度冷冻切片, 立即置于荧光显微镜下观察。随机选取6张切片, 100倍镜下选5个视野, 观察细胞在支架材料上的分布情况, 计数荧光标记的细胞数。

**(1, 9)-二甲基亚甲蓝(DMMB)法定量测定总糖胺聚糖含量**<sup>[12-13]</sup>: 取细胞-支架复合材料, 以PBS冲洗, 冷冻干燥, 加入300  $\mu$ L木瓜蛋白酶溶液(5 g/L), 调整pH值为6.5, 在65  $^{\circ}$ C水浴中消化16 h, 取250  $\mu$ L上述孵化消化液加入2.5 mL的1, 9-二甲基亚甲蓝溶液(16 mg/L, pH为2.0), 5 min后525 nm波长比色测定糖胺聚糖含量(标准为硫酸软骨素)。

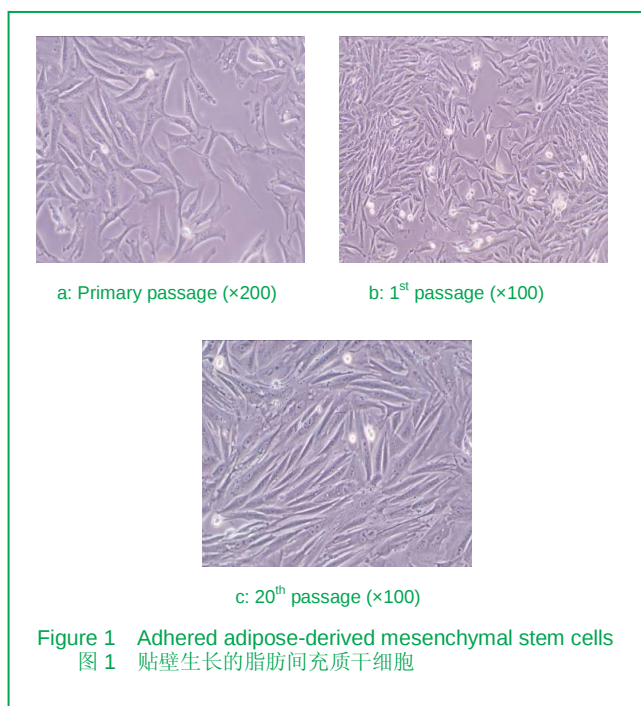
**主要观察指标**: ①RT-PCR及Western blot法检测细胞转染后胰岛素样生长因子1的表达。②脂肪间充质干细胞-支架复合材料大体形态及扫描电镜观察。③MTT法绘制细胞增殖曲线。④CM-DiL荧光染料标记后计数细胞存活率。⑤DMMB法定量测定总糖胺聚糖含量。

**设计、实施、评估者**: 设计为第三作者, 实施为第一、四作者, 评估为第二作者, 均经过系统培训, 未应用盲法。

**统计学分析**: 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 由第一作者采用SPSS13.0软件对实验结果进行方差分析。

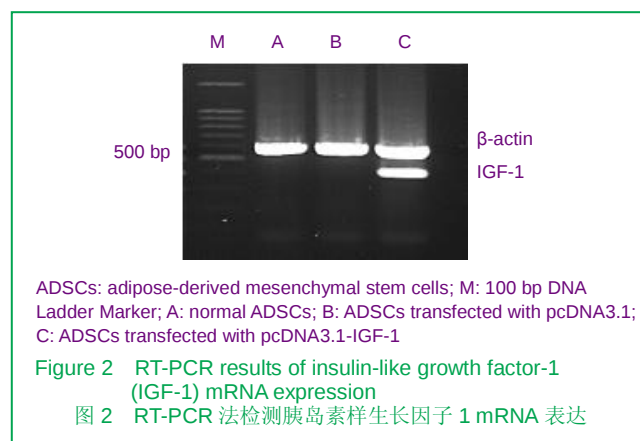
## 2 结果

### 2.1 兔脂肪间充质干细胞的形态学观察 见图1。

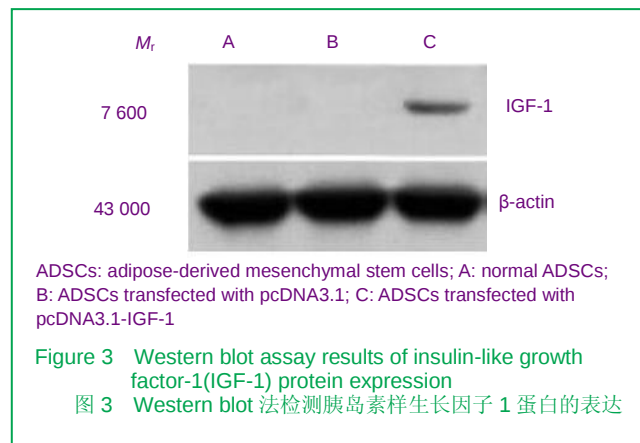


成功分离出的脂肪间充质干细胞接种后6 h就有少许贴壁, 24 h贴壁增多, 形态呈典型的长梭形或多角形细胞, 呈团簇状生长, 约接种后5 d细胞融合超过80%时传代。细胞倍增时间约为2 d, 传20代以上仍具有较高增殖速率, 且形态未见显著改变。

**2.2 胰岛素样生长因子1质粒的鉴定以及细胞转染后的鉴定** RT-PCR电泳结果显示, 转染组在电泳结果的300~500 bp的位置出现一条灰度较高的特异性条带, 而未转染组和空载体组均未出现特异性条带, 提示转染pcDNA3.1-IGF-1组的脂肪间充质干细胞在mRNA水平获得胰岛素样生长因子1的表达, 见图2。

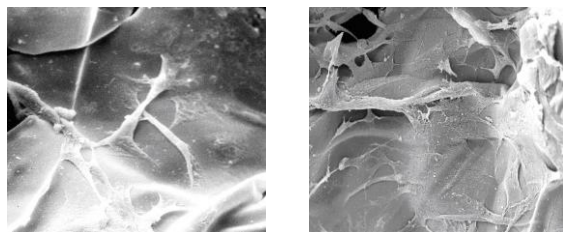


Western blot法结果显示, 基因转染组有胰岛素样生长因子1蛋白的特异性表达, 相对分子质量7 600, 未转染组和空载体组均未出现, 提示质粒pcDNA3.1-IGF-1在基因转染组的脂肪间充质干细胞中获得良好的表达, 胰岛素样生长因子1成功翻译为蛋白, 见图3。



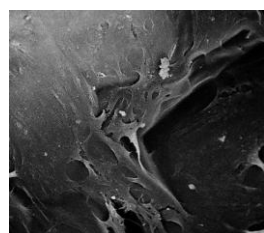
**2.3 大体形态观察及扫描电镜观察结果** 基因转染组细胞-支架复合材料表面光滑, 有光泽, 弹性好。空载体组次之, 空白对照组细胞-支架复合材料表面欠光滑, 无光泽, 质软, 弹性差。

扫描电镜显示各组细胞生长旺盛, 在支架上附着、伸展良好, 其中基因转染组细胞生长最好, 密度较高, 形态饱满, 细胞成片, 可见明显细胞外基质分泌, 见图4。



a: Blank control group (×350)

b: Empty vector group (×350)



c: Gene transfection group (×300)

Figure 4 Scanning electron micrograph of cells in each group  
图4 各组扫描电镜结果

**2.4 MTT法检测胰岛素样生长因子1基因转染对脂肪间充质干细胞增殖活性的影响** MTT比色法测定各实验组在490 nm波长处的A值, 取均值列表绘制折线图, 见图5。经统计学分析, 空载体组、基因转染组与空白对照组差异均存在显著性意义, 其中基因转染组A值明显高于空白对照组( $P < 0.01$ )。

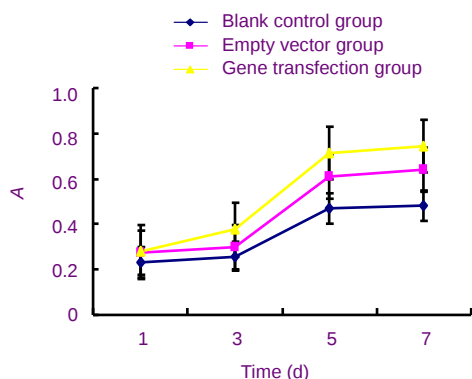
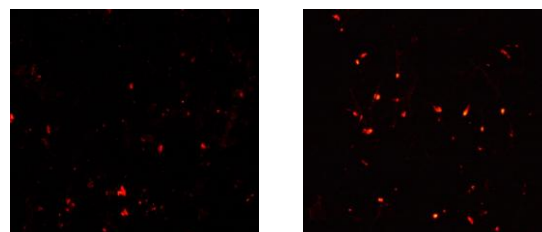


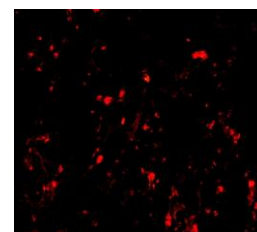
Figure 5 Cell proliferation curve determined by MTT assay  
图5 MTT法绘制细胞增殖曲线

**2.5 DiI荧光染料标记后计数细胞存活率及糖胺聚糖含量比较** DiI是一种较为理想的亲脂性碳花青染料, 标记率可在95%以上<sup>[14]</sup>。荧光显微镜下细胞在支架材料上外周分布较密, 中心较差, 细胞计数结果显示细胞增殖趋势与MTT法结果一致。基因转染组细胞数明显高于其他组( $P < 0.01$ ), 见图6。对各组糖胺聚糖含量进行方差分析结果显示各组之间糖胺聚糖含量有统计学差异, 进一步做两两比较的SNK检验, 提示基因转染组>空载体组>空白对照组( $P < 0.01$ ), 见表1。



a: Blank control group

b: Empty vector group



c: Gene transfection group

Figure 6 Results of CM-DiI cell-labeling (×100)  
图6 各组 CM-DiI 荧光标记结果(×100)

表1 组织工程软骨 CM-DiI 荧光标记细胞计数结果和糖胺聚糖含量

Table 1 Results of CM-DiI cell-labeling and glycosaminoglycan contents in each group (x±s)

| Group             | CM-DiI cell-labeling | Content of glycosaminoglycan (μg) |
|-------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Blank control     | 16.58±5.16           | 15.89±0.04                        |
| Empty vector      | 22.27±3.34           | 19.03±0.14                        |
| Gene transfection | 26.23±3.70           | 22.05±0.52                        |

### 3 讨论

目前, 包括细胞或组织工程复合物移植在内的新技术正在应用于骨或软骨的损伤修复, 种子细胞的选择是组织工程的核心问题之一。脂肪间充质干细胞因其突出的优点, 已经被越来越多的研究者所青睐。研究证实, 脂肪干细胞具有强大的多能分化潜能, 它可以在特定的诱导条件下向软骨细胞、成骨细胞、神经细胞、心肌细胞、平滑肌细胞等多个方向定向分化, 是一种优秀的种子细胞<sup>[3-7, 15]</sup>。应用脂肪间充质干细胞构建组织工程软骨是较为理想的选择。

大量不同的生长因子存在于关节与软骨之中, 它们对软骨细胞的新陈代谢起着非常重要的作用, 并且II型胶原的合成及其mRNA表达均受到诸如胰岛素样生长因子1、转化生长因子β、碱性成纤维细胞生长因子、白细胞介素1β等细胞因子的调节<sup>[16]</sup>。胰岛素样生长因子1是一种丝裂素生长因子, 与前胰岛素在氨基酸序列上有同源性, 是一种既有促进细胞增殖活性, 又具胰岛素样作用的生长激素依赖性多肽, 它通过生长激素-IGF轴来实现其刺激合成代谢、抑制细胞凋亡的作用<sup>[17]</sup>。此外,

胰岛素样生长因子1在软骨细胞自稳态调节中也有着重要的调节意义<sup>[18]</sup>。研究表明, 胰岛素样生长因子1不仅能诱导人关节软骨细胞中II型胶原和aggrecan基因表达, 刺激细胞分裂, 促进II型胶原和蛋白多糖合成<sup>[17, 19-21]</sup>, 而且能促进Sox-9表达增强, 调控软骨分化, 刺激软骨细胞分化的稳定表型<sup>[22-23]</sup>。前期研究已经证实, 利用脂质体转染技术, 得到持续、稳定表达pcDNA3.1-IGF-1的细胞株, 使细胞自身胰岛素样生长因子1的分泌水平增加, 用RT-PCR法和Western blot法证实细胞在mRNA水平获得胰岛素样生长因子1的高表达, 并且成功翻译为蛋白, 并且避免了体外诱导的一些弊端, 故而基因强化技术为组织工程提供了良好的种子细胞来源<sup>[8]</sup>。

目前研究认为, 三维立体培养要优于平面培养, 能够明显促进软骨细胞的增殖和II型胶原的分泌<sup>[1]</sup>。国外早有应用琼脂糖及其复合物作为支架材料来研究细胞三维培养的报道, 并且证实能够促进II型胶原和aggrecan的表达<sup>[24]</sup>。本实验应用结构类似于动物体内的糖胺聚糖的天然支架材料——壳聚糖明胶复合物作为立体培养的载体, 利于其在体外向软骨分化的效果。众所周知, 软骨细胞外基质的主要成分为水、胶原、蛋白多糖等。其中, 蛋白多糖主要以聚合形式和非聚合的蛋白多糖两种形式存在, 聚合素是由核心蛋白及糖胺聚糖组成蛋白多糖单体。因而, 糖胺聚糖是软骨细胞外基质的主要结构成分之一。本实验证实, 应用转染后细胞株构建的细胞-支架复合材料中, 糖胺聚糖含量明显高于对照组。表明胰岛素样生长因子1基因转染联合三维立体培养能够有效促进兔脂肪间充质干细胞的增殖和向软骨细胞分化。

#### 4 参考文献

- [1] Chokalingam K, Hunter S, Gooch C, et al. Three-dimensional in vitro effects of compression and time in culture on aggregate modulus and on gene expression and protein content of collagen type II in murine chondrocytes. *Tissue Eng Part A*.2009;10 (15): 2807-2816.
- [2] Zuk PA,Zhu M,Mizuno H, et al.Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.*Tissue Eng*. 2001;7(2): 211-228.
- [3] Strem BM, Hicok KC, Zhu M,et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*.2005;54(3):132-141.
- [4] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*.2002;13(12): 4279-4295.
- [5] Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006; 1(1):13-20.
- [6] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z,et al.Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006; 24(4): 150-154.
- [7] Schäffler A, Büchler C.Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*.2008;25(4):818-827.
- [8] An CH,Cheng Y,Yuan Q,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(23):4433-4436. 安春厚,程扬,原泉,等.胰岛素样生长因子1基因转染兔脂肪间质干细胞的增殖[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(23):4433-4436.
- [9] Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C,et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.*Methods*. 2008;45(2): 115-120.
- [10] Shu W, Shu YT, Shi HB, et al. An easy method to discover cell membrane antigen with atomic force microscopy. *Mol Biol Rep*. 2008;35(4):557-561.

- [11] Lin Y, Tang W, Wu L, et al. Bone regeneration by BMP-2 enhanced adipose stem cells loading on alginate gel. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129(2): 203-210.
- [12] Zhao H, Ma L, Gong Y, et al. A polylactide/fibrin gel composite scaffold for cartilage tissue engineering: fabrication and an in vitro evaluation. *J Mater Sci: Mater Med*.2009;20(1):135-143.
- [13] Mohan N, Nair PD, Tabata Y. A 3D biodegradable protein based matrix for cartilage tissue engineering and stem cell differentiation to cartilage. *J Mater Sci Mater Med*.2008. [Epub ahead of print].
- [14] Zhang YS,Gao JH,Lu F,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2007;11(15):2897-2899. 张云松,高建华,鲁峰,等.荧光活性染料Dil标记人脂肪干细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(15):2897-2899.
- [15] de Villiers JA, Houreld N, Abrahamse H. Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: Implications for regenerative medicine. *Stem Cell Rev*.2009;5(3):256-265.
- [16] Kondo S,Cha SH,Xie WF,et al. Cytokine regulation of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) in primary articular chondrocytes: suppression by IL-1, bFGF, TGF-beta and stimulation by IGF-1.*J Orthop Res*.2001;19(4): 712-719.
- [17] Bonassar LJ, Grodzinsky AJ, Frank EH, et al.The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res*.2001;19(1): 11-17.
- [18] 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.
- [19] Yeager PC, Masi TL, de Ortiz JL, et al. Synergistic action of transforming growth factor-β and insulin-like growth factor-1 induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes.*Exp Cell Res*.1997;237(2): 318-325.
- [20] Solheim SB. Growth factors in bone. *Int Orthop*.1998;22 (6): 410-416.
- [21] Fortier LA,Last G,Mohammed HO,et al. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-1.*Orthop Res*.1999;17 (4): 467-474.
- [22] Salmon WD Jr, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *Lab Clin Med*.1990;116(3):408-419.
- [23] Carrascosa A, Audi L. Human studies of IGF-1.Evidence suggesting that human fetal and postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF-1 action. *Pediatr Endocrinol*.1993;6(3-4): 257-261.
- [24] Mio K, Saito S, Tomatsu T, et al.Intermittent compressive strain may reduce aggrecanase expression in cartilage. *Clin Orthop Relat Res*.2005;(433):225-232.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 国家自然科学基金资助项目(30772216)。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的意义:** 应用脂肪间充质干细胞作为种子细胞, 采用基因转染的方法使其向软骨细胞分化构建组织工程软骨, 在动态压力的作用下构建仿生梯度增殖分化的组织工程软骨板的相关研究, 前期工作中已经成功转染基因, 体外构建组织工程软骨。

**课题评估的“金标准”:** 糖胺聚糖含量定量测定采用改良的 DMMB 法, 它相对于 Alcian blue 染色法操作简单、实用, 已被国内外大多数学者采用。其他均采用金标准。

**设计或课题的偏倚与不足:** 体内微环境与体外培养环境不同, 存在多种生长因子, 它们相互作用调控软骨的新陈代谢, 故而, 采用单一生长因子转染的体外培养条件相对于复杂的生理内环境来说略显不足。

**提供临床借鉴的价值:** 组织工程软骨应用于修复软骨缺损是目前研究的热门领域之一, 但其修复效果仍不理想, 临床应用较为局限, 本实验在于探讨新的构建组织工程软骨较为可行的方法。