

脂肪干细胞与小肠黏膜下层构建仿生骨膜的体内成骨[☆]

张开刚¹, 张月东¹, 王 玫²

In vivo osteogenesis of bionic periosteum constructed by adipose-derived stem cells seeded onto small intestinal submucosa

Zhang Kai-gang¹, Zhang Yue-dong¹, Wang Mei²

Abstract

BACKGROUND: Both adipose-derived stem cells (ADSCs) and small intestinal submucosa (SIS) have good biocompatibility. But the effects of bionic periosteum composite constructed by them on bone defects repairment need further investigation.

OBJECTIVE: To study the osteogenic feasibility of bionic periosteum constructed by ADSCs seeded onto SIS *in vivo*.

METHODS: After osteogenic induction, ADSCs isolated from the rabbits inguinal fat were co-cultured with porcine SIS *in vitro* for 3 weeks to build bionic periosteum. Bionic periosteum was embedded in nude mice. ADSCs without osteogenesis induction seeded onto SIS were also embedded in nude mice as control.

RESULTS AND CONCLUSION: After osteogenic induction, ADSCs were well adhered onto the SIS and a large amount of extracellular matrix was found in cells. At 4, 8 and 12 weeks after grafting, there was a large amount of bone formation detected by immunohistochemistry and transmission electron microscope. There was no cortical bone formation in the non-induced composite group. At 8 weeks after bionic periosteum grafting, immunohistochemistry results of osteopontin and osteocalcin were positive. It is indicated that bionic periosteum transplanted into nude mice can form new bone with good blood supply.

Zhang KG, Zhang YD, Wang M. *In vivo* osteogenesis of bionic periosteum constructed by adipose-derived stem cells seeded onto small intestinal submucosa. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(3): 426-430.

[<http://www.crter.cn> <http://en.zgckf.com>]

摘要

背景: 脂肪干细胞与小肠黏膜下层两者具有良好的组织相容性, 但将二者复合构建仿生骨膜修复骨缺损的效果如何尚需进一步验证。

目的: 探讨以小肠黏膜下层为支架材料复合成骨诱导的脂肪干细胞构建仿生骨膜, 体内成骨的可行性。

方法: 取兔腹股沟区的脂肪分离培养脂肪干细胞经成骨诱导后, 与猪小肠黏膜下层复合体外培养3周, 构建仿生骨膜。将仿生骨膜埋置于裸鼠皮下, 并以小肠黏膜下层复合未成骨诱导的脂肪干细胞的复合材料置于裸鼠皮下做对照。

结果与结论: 兔脂肪干细胞经成骨诱导后与小肠黏膜下层体外复合培养, 见两者黏附良好, 细胞分泌大量的细胞外基质。植入4, 8, 12周组织学和透射电镜观察见有大量骨组织形成, 未成骨诱导材料复合组内无成骨细胞。仿生骨膜植入体内8周免疫组织化学测试骨钙蛋白、骨桥蛋白呈阳性反应。提示仿生骨膜植入裸鼠体内后可形成具有良好血运的新生骨组织。

关键词: 仿生骨膜; 脂肪干细胞; 小肠黏膜下层; 裸鼠; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.03.010

张开刚, 张月东, 王玫. 脂肪干细胞与小肠黏膜下层构建仿生骨膜的体内成骨[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):426-430. [<http://www.crter.org> <http://cn.zgckf.com>]

¹Department of Orthopedics Surgery, Taian Center Hospital, Taian 271000, Shandong Province, China; ²Taishan Medical College, Taian 271016, Shandong Province, China

Zhang Kai-gang[☆], Doctor, Chief physician, Department of Orthopedics Surgery, Taian Center Hospital, Taian 271000, Shandong Province, China. tachzkg@yahoo.com.cn

Received: 2011-05-13
Accepted: 2011-07-12

¹ 泰安市中心医院骨科, 山东省泰安市 271000; ² 泰山医学院, 山东省泰安市 271016

张开刚[☆], 男, 1965年生, 山东省泰安市人, 汉族, 2006年上海交通大学医学院毕业, 博士, 主任医师, 主要从事创伤骨科、骨组织工程研究。
tachzkg@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)03-00426-05

收稿日期: 2011-05-13
修回日期: 2011-07-12
(20110513004/W · G)

0 引言

理想、可靠的种子细胞是构建组织工程骨的基础和前提。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是近年来发现的一种成体干细胞, 可以在体外稳定增殖、具有多向分化潜能^[1], 因具有安全性高^[2]、获得率高等优点^[3-4], 迅速成为目前组织工程学的研究热点。

小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)是一种可降解的天然细胞外基质材料, 在骨科领域有广泛的用途, 可用于神经^[5]、血管^[6]、肌腱^[7]、半月板^[8]、骨软骨和骨缺损的修复^[9-10]。SIS含有多种活性生长因子^[11], 如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子 2、转化生长因

子 β 、血小板源性生长因子等, 具有促进组织再生的能力。SIS具有自我调节能力, 为宿主细胞提供良好的生长环境, 促进血管生成, 恢复组织功能, 具有良好的组织相容性^[12]。

实验应用SIS与成骨诱导的ADSCs共同培养后植入体内, 以探讨其成骨的可行性, 进而为骨缺损的治疗提供新思路。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2007-06/2010-09在泰山医学院基础学院实验中心及泰安市中心医院中心实验室完成。

材料: 取4月龄健康新西兰大白兔4只,

雌雄不限, 体质量 2.0~2.5 kg, 由泰山医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(鲁)2005-0005; 2 周龄雄性裸鼠 24 只, 体质量 100~120 g, 由泰山医学院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(鲁) 2005-0009。

主要试剂和仪器:

主要试剂和仪器	来源
胰蛋白酶、地塞米松、维生素 C、 β-甘油磷酸钠、I 型胶原酶	sigma 美国
高糖 DMEM	Gibco 美国
胎牛血清	杭州四季青生物制品公司
免疫组织化学试剂盒	DAKO, 美国
鼠抗兔骨钙蛋白(OCN)、 鼠抗兔骨桥蛋白(OPN)	Chenicon, 美国
相差显微镜	Olympus, 日本
透射电镜(JEM-200CX)	日本
病理切片机	leica, 德国

支架材料: 自备 SIS, 按照 Abraham 等^[1]的方法制备。

实验方法:

ADSCs 的分离和培养: 取新西兰大白兔 4 只, 经耳缘静脉注射空气栓塞致死, 8% 硫化钠脱毛, 清水反复冲洗干净, 固定于操作台, 碘伏液消毒, 取双侧腹股沟脂肪, 仔细清除脂肪外组织(筋膜及血管、淋巴结)。在超净工作台内, 无菌条件下, PBS 反复冲洗, 去除红细胞, 剪碎, 用装有 I 型胶原酶 50 mL 离心管吸取脂肪组织, 放入恒温 37 °C 摇床, 振荡, 180 r/min 消化 60 min, 1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入高糖 DMEM 培养液(含 1% 双抗液, 体积分数 10% 胎牛血清, 292 mg/L 谷氨酰胺, 50 mg/L 维生素 C)重悬浮, 接种于培养瓶, 放入恒温 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱内培养, 3 d 后换液, 洗去未贴壁的红细胞, 隔日换液, 融合达 90%~95% 后, 进行传代。

ADSCs 的鉴定^[13]: 流式细胞术鉴定第 3 代细胞表面标记物, CD29, CD44 表达为阳性, CD 45 为阴性, 第 3 代 ADSCs 经成脂、成骨、成软骨诱导鉴定, 具有多向分化潜能, 鉴定为 ADSCs。

ADSCs 与 SIS 体外复合培养构建仿生骨膜: 取 1 cm×1 cm SIS 材料 1 块分别放入 24 孔培养板, 加入高糖 DMEM 完全培养基(含 1% 双抗液, 体积分数 10% 胎牛血清, 292 mg/L 谷氨酰胺, 50 mg/L 维生素 C), 放入细胞培养箱中复水 72 h。将传至第 3 代细胞融合达 90% 后, 以 5.0×10⁵/孔密度接种于复水的 SIS, 再加入含有成骨诱导液的培养基 1 mL, 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度条件下复合培养。

仿生骨膜植入体内: 实验分为 2 组, 每组 12 只裸鼠。实验组: SIS 复合成骨诱导的脂肪干细胞 3 周制备的仿生骨膜组; 对照组: SIS 复合未成骨诱导的脂肪干细胞

的复合材料组。将 2 种复合材料随机分别植入雄性裸鼠背部。方法: 以 0.1 mL/kg 的速眠新肌肉注射麻醉后, 碘伏消毒, 铺单, 在裸鼠脊柱两侧背部皮下作 0.8 cm 切口, 在筋膜下钝性分离, 将 1 cm×1 cm 复合细胞与复合细胞未诱导的 SIS 对折成 0.5 cm×1 cm, 植入裸鼠背部皮下, 缝合切口后体积分数 75% 乙醇消毒皮肤, 相同条件下饲养。

组织学观察体外构建的仿生骨膜: 将 ADSCs 与 SIS 复合培养后, 分别于不同时期行苏木精-伊红染色观察复合组织的形态结构特征。

仿生骨膜植入裸鼠体内观察:

组织学观察: 植入后 4, 8, 12 周在麻醉下, 每时间点取 4 只, 取出植入物常规苏木精-伊红染色, 观察复合细胞成骨诱导的 SIS 和复合细胞未成骨诱导的 SIS 组织学形态结构特征, 观察是否有骨组织形成。

透射电镜观察: 术后 4, 8, 12 周在麻醉下, 每时间点取 4 只, 取出植入物, 放入 40 g/L 戊二醛溶液中固定 1 d, 再置于 2.5% 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中脱钙 2 周, 乙醇逐级脱水, 制成超薄切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 观察组织结构变化情况。

免疫组织化学观察: 植入后 8 周在麻醉下取出植入物, 进行骨钙蛋白、骨桥蛋白免疫双染色观察仿生骨膜植入裸鼠体内后的成骨情况。

主要观察指标: 组织学观察体外构建的仿生骨膜。仿生骨膜植入裸鼠体内组织学观察、透射电镜观察及免疫组织化学观察。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用裸鼠 24 只, 分为 2 组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 组织学观察体外构建的仿生骨膜 苏木精-伊红染色后观察, SIS 上附着 ADSCs 与 SIS 的数量逐渐增加, 细胞呈重叠生长, 细胞层数增加。ADSCs 与 SIS 分泌的细胞外基质逐渐增加, 在 SIS 表面的细胞外基质也逐渐增厚, 与 SIS 融合在一起, 两者相容性良好, 见图 1, 2。

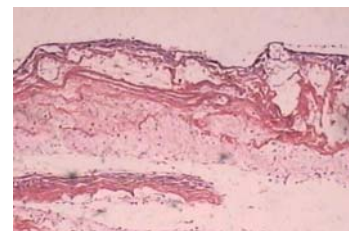


Figure 1 Small intestinal submucosa and adipose-derived stem cells composite cultured for 4 wk (Hematoxylin eosin staining, ×100)
图 1 ADSCs 与 SIS 复合培养 4 周(苏木精-伊红染色, ×100)

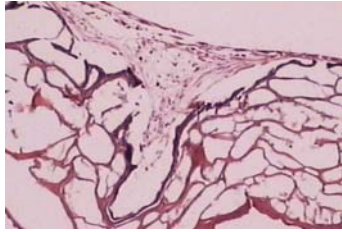


Figure 2 Small intestinal submucosa and adipose-derived stem cells composite cultured for 6 wk (Hematoxylin eosin staining, $\times 100$)
图2 ADSCs 与 SIS 复合培养 6 周(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

2.3 仿生骨膜植入裸鼠体内观察

组织学观察: 仿生骨膜植入体内4周时, 可见大量新生软骨细胞, 软骨细胞不够成熟, 见图3。

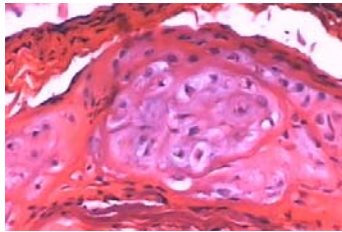


Figure 3 A large number of new cartilage cells and bone matrix were formed at 4 wk after composite grafting (Hematoxylin eosin staining, $\times 40$)
图3 成骨诱导材料植入 4 周时大量新生软骨细胞、有骨基质形成(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

8周时, 成骨诱导材料复合物组见软骨化骨及大量新生的松质骨小梁, 苏木精-伊红染色表现为红染的骨基质形成, 见图4。

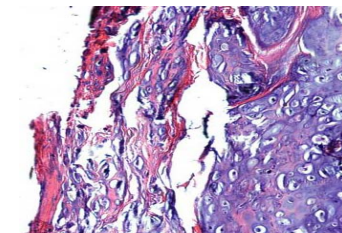


Figure 4 Cartilage cells growth and red-stained bone matrix at 8 wk after composite grafting (Hematoxylin eosin staining, $\times 40$)
图4 成骨诱导材料植入 8 周时软骨细胞生长、骨基质红染(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

12周时, 可见新骨形态由松质骨逐渐变为密质骨, 见图5。未成骨诱导材料复合物组内无成骨细胞, 只有少量的炎性细胞和成纤维细胞形成, 没有骨组织形成, 见图6。

透射电镜观察: 仿生骨膜植入体内 4 周时, 见有大量的成软骨细胞和成骨细胞, 细胞核较大, 细胞内有大量的线粒体、高尔基体和粗面内质网, 细胞分泌大量的细胞外基质, 并有血管和骨小梁形成, 见图 7。8 周时仍有成软骨细胞, 以成骨细胞和骨细胞为主, 骨小梁逐渐

成熟, 见图 8。

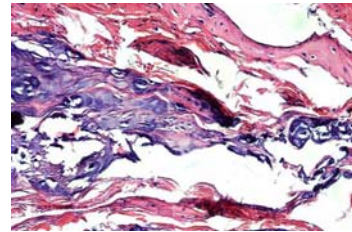


Figure 5 The formation of mature cortical bone at 12 wk after composite grafting (Hematoxylin eosin staining, $\times 40$)
图5 成骨诱导材料植入 12 周时有成熟密质骨形成(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

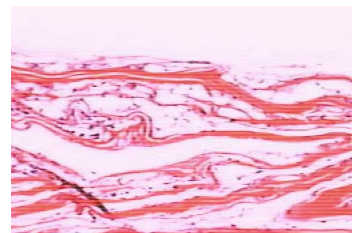


Figure 6 At 12 wk after non-induced composite grafting, there was no cortical bone formation (Hematoxylin eosin staining, $\times 40$)
图6 未成骨诱导材料植入 12 周时没有骨组织形成(苏木精-伊红染色, $\times 40$)



Figure 7 Complete vascular ingrowth in newly formed bone tissue at 4 wk after composite grafting (Transmission electron microscope, $\times 5800$)
图7 成骨诱导材料植入 4 周时新形成的骨组织中有完整血管长入(透射电镜, $\times 5800$)

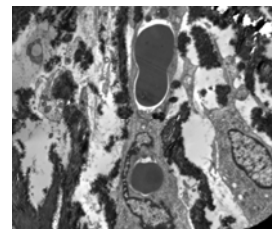


Figure 8 Trabecular bone matured gradually, blood vessels grew and a large number of trabecular bone formed at 8 wk after composite grafting (Transmission electron microscope, $\times 4200$)
图8 成骨诱导材料植入 8 周时骨小梁逐渐成熟, 长入大量血管和骨小梁开始逐渐形成(透射电镜, $\times 4200$)

12 周时中央部分成骨细胞数量减少, 胞浆中细胞器退化, 细胞狭长, 包埋于成熟的骨小梁中, 变为骨细胞,

见图 9。

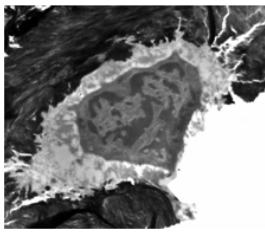


Figure 9 Mature bone turned into bone cells at 8 wk after composite grafting (Transmission electron microscope, $\times 7\ 400$)

图 9 成骨诱导材料植入 12 周时组织为成熟骨变为骨细胞 (透射电镜, $\times 7\ 400$)

免疫组织化学观察: 仿生骨膜植入体内 8 周, 免疫组织化学检测骨钙蛋白 (见图 10) 及骨桥蛋白 (见图 11), 结果呈阳性反应 (胞浆内呈棕黄色), 随时间延长, 阳性反应越明显, 表明细胞逐渐分化为成骨细胞并可在体内成骨。



Figure 10 Immunohistochemistry of osteocalcin reaction at 8 wk ($\times 40$)

图 10 成骨诱导材料 8 周免疫组织化学检测骨钙蛋白反应 ($\times 40$)



Figure 11 Immunohistochemistry of osteopontin reaction at 8 wk ($\times 40$)

图 11 成骨诱导材料 8 周免疫组织化学检测骨桥蛋白反应 ($\times 40$)

3 讨论

3.1 脂肪干细胞作为种子细胞的选择 对于脂肪干细胞成骨分化的潜能, Kaplan 等^[14]发现, 皮下脂肪组织具有异位成骨现象, 推测脂肪组织中具有成骨分化潜能细胞。Zuk 等^[15]应用 1, 25-二羟维生素 D3 诱导脂肪来源的干细胞向成骨方向分化, 并进行总钙测定及检测骨钙蛋白、骨桥蛋白、骨形态发生蛋白 2 等基因的表达,

结果均为阳性。研究报道, ADSCs 成骨培养 6~18 d, 细胞外基质中出现如 I 型胶原蛋白、骨形态发生蛋白 2、骨形态发生蛋白受体等相关成骨基因的表达产物, 认为 ADSCs 具有向成骨细胞分化的能力^[14]。除成骨能力外, 研究发现 ADSCs 还可以分化为间充质来源的脂肪、软骨、以及骨骼肌、心肌、血管内皮细胞等细胞^[16-18], 用以修复软骨、心肌、骨骼肌、血管以等组织^[19-21]。Traktuev 等^[22]发现脂肪干细胞较多集中在脂肪组织的血管周围, 利用细胞贴壁法分离得到的 ADSCs 相对较纯。ADSCs 可以分泌多种细胞因子, 保持结构与功能上的稳定, 如促进血管生成的相关因子, 以促进血管再生^[23]。ADSCs 也能促进成纤维细胞分泌胶原和纤连蛋白, 促进皮肤表皮细胞的成熟, 以利于创面愈合^[24]。细胞表型的研究对于干细胞诱导分化及干细胞的鉴定具有指导作用, 但关于脂肪干细胞的鉴定, 目前还没有发现 ADSCs 特异性表面分子标志物^[25-26]。

在体外培养中加入成骨诱导液(β -甘油酸钠, 地塞米松, L-抗坏血酸), 脂肪干细胞就开始表达成骨细胞表型, 表现为碱性磷酸酶阳性, 表达各种由成骨细胞分泌的骨基质蛋白(I 型胶原, 骨钙蛋白, 骨桥蛋白等), 同时细胞外基质出现钙化。但是目前, 对于 ADSCs 在骨缺损修复的应用研究, 仅限于动物模型试验阶段。有研究报道从犬脂肪组织提取 ADSCs^[27], 附于支架中, 植入犬尺骨骨缺损模型, 16 周后, 行 X 射线及组织学检查发现产生了显著的新生骨区, 可以部分或全部修复骨缺损。基于以上研究证实脂肪干细胞作为种子细胞的可行性。

3.2 SIS 作为支架材料的选择 理想的支架材料应该具有以下几个特征: 良好的生物组织相容性、合适的生物可降解性和降解速率可控性、可诱导组织再生、有一定孔隙率、无抗原作用、有一定机械强度^[28-29]。

Kropp 等^[30]、Palmer 等^[31]证实 SIS 中不含细胞, 无免疫原性, 不会引起免疫排斥反应。因此本实验选用小肠黏膜下层作为支架材料, 它具有以上所述自身的一些独特优势。通过实验证实 SIS 含有多种活性生长因子, 能为血管内皮细胞提供良好的附着、增殖的环境, 并且促进组织工程骨的血管化。

3.3 构建方式的选择 骨组织工程骨的构建多采用两种方法: ①体内构建: 将种子细胞与支架材料复合后, 直接植入体内。②体外构建: 将种子细胞与支架材料复合后, 在成骨培养液中进一步培养, 形成骨基质和骨样组织, 再将成骨细胞/支架复合物植入体内。体内构建, 将复合材料直接植入体内, 由于受体内多种环境因素的影响, 无法准确反应材料与细胞的相容性。体外构建, 将细胞与材料在体外复合培养, 可以直接观察两者的生长情况, 是一种快速、简捷、可重复性的方法, 在生物材料相容性评价中起着非常重要的作用^[32]。

本实验采用体外构建仿生骨膜, 经组织学和透射电镜结果显示成骨细胞分泌大量的细胞外骨基质, 并且出现钙化带, 形成正常的骨组织结构。免疫组织化学显示骨钙蛋白、骨桥蛋白表达阳性, 而骨钙素蛋白、骨桥蛋白为成骨细胞所特有, 是成骨表型特征性的标志, 表明细胞逐渐分化为成骨细胞并可在体内成骨。证实所构建的组织工程骨膜, 既含有成骨细胞, 又含有骨膜具有的胶原成分和促进细胞生长的生长因子, 是一种理想的构建方式。

基于ADSCs与SIS两者具有良好的组织相容性, 在体外将SIS与脂肪干细胞复合诱导成骨, 可构建出与机体自身生理骨膜类似的仿生骨膜, 在裸鼠体内可以成骨, 为脂肪干细胞作为种子细胞用于成骨, 为修复骨缺损, 最终代替自体移植修复骨缺损奠定实验基础和提供理论依据。

4 参考文献

- [1] Abraham GA, Murray J, Billiar K, et al. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial. *Biomed Mater Res.* 2000;51:442-452.
- [2] Housman TS, Lawrence N, Mellen BG, et al. The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol Surg.* 2002;28:971-978.
- [3] Gronthos S, Franklin DM, LeDdy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol.* 2001;189:54-63.
- [4] DeUgarte DA, Morizono K, Elbarbary A, et al. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174:101-109.
- [5] Hadlock TA, Sundback CA, Hunter DA, et al. A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayer. *Microsurgery.* 2001;21(3):96-101.
- [6] Roeder RA, Lantz GC, Geddes LA. Mechanical remodeling of small intestine submucosa small-diameter vascular grafts—a preliminary report. *Biomed Instrum Technol.* 2001; 35:110-120.
- [7] Loic MD, Steven PA, Benjamin JE, et al. Tissue-engineered rotator cuff tendon using porcine small intestine submucosa: histological and mechanical evaluation in dogs. *The American Journal of Sports Medicine.* 2001;29:175-184.
- [8] James LC, James LT, Steven PA, et al. Kinetic study of the replacement of porcine small intestinal submucosa grafts and the regeneration of meniscal-like tissue in large avascular meniscal defects in dogs. *Tissue Eng.* 2001;7:321-334.
- [9] Beatty MW, Ojha AK, Cook JL, et al. Small Intestinal Submucosa versus Salt-Extracted Polyglycolic Acid-Poly-L-lactic Acid: A Comparison of Neocartilage Formed in Two Scaffold Materials. *Tissue Eng.* 2002;8(6):955-968.
- [10] Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terril LA, et al. Enhanced bone regeneration using porcine small intestinal submucosa. *J Invest Surg.* 1999;12:277-287.
- [11] Hodde JP, Badylak SF, Record RD, et al. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium.* 2001;8(1):11-24.
- [12] Badylak SF, Record R, Lindberg K, et al. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998, 9(8):863-878.
- [13] Yang H, Wu D, Li SH, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2010;14(14):2601-2606. 杨浩, 吴迪, 李世和, 等. 家兔脂肪基质干细胞的分离培养及多向分化诱导[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(14):2601-2606.
- [14] Kaplan FS, Hahn GV, Zasloff MA. Heterotopic ossification: two rare forms and what they can teach us. *Am Acad Orthop Surg.* 1994;2:288-296.
- [15] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
- [16] Wang JJ, Liu XY, Li XS. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(36):7020-7024. 王建军, 刘兴安, 李旭升. 成人脂肪间充质干细胞体外长期培养后的骨分化潜能[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(36): 7020-7024.
- [17] Yu ZY, Fu Q, Zhang T. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(27):5234-5238. 于志永, 付勤, 张涛. 不同种植密度对大鼠脂肪间充质干细胞三维培养下成软骨能力的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(27): 5234-5238.
- [18] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Yang JQ, et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2008;187(4):263-274.
- [19] Merceron C, Portron S, Masson M, et al. Cartilage tissue engineering: From hydrogel to mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* 2010;20(3):159-166.
- [20] Chen Q, Yang Z, Huang H, et al. Adipose-derived stem cells modified genetically in vivo promote reconstruction of bone defect. *Cytotherapy.* 2010;12(6):831-840.
- [21] Zavan B, Vindigni V, Gardin C, et al. Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med.* 2010;10(50):37-43.
- [22] Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res.* 2008; 102(1):77-85.
- [23] Meliga E, Stream BM, Duckers HJ, et al. Adipose-derived cells. *Cell Transplant.* 2007;16(9):963-970.
- [24] Kim WS, Sung JH. Whitening effect of adipose-derived stem cells: a critical role of TGF- β 1. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(4):606-610.
- [25] Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy.* 2008;10(4):417-26.
- [26] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, et al. Phenotypic and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(1):91-104.
- [27] Li HW, Dai KR, Tang TT, et al. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007; 356:836-842.
- [28] Zhang KG, Zeng BF, Zhang CQ. *Guowai Yixue: Guke Fence.* 2004; 25:200-202. 张开刚, 曾炳芳, 张长青. 小肠黏膜下层用作组织工程支架材料研究进展[J]. *国外医学: 骨科分册*, 2004, 25:200-202.
- [29] Zhou X, Zuo CH. *Zhongguo Xiandai Shoushuxue Zazhi.* 2006;10(4):316-620. 周晓, 左朝晖. 组织工程骨修复骨缺损的研究进展[J]. *中国现代手术学杂志*, 2006, 10(4):316-620.
- [30] Kropp BP, Cheng EY. Bioengineering organs using small intestinal submucosa scaffolds: in vivo tissue engineering technology. *J Erzcoulour.* 2000;14(1):59-62.
- [31] Palmer EM, Beifuss BA, Nagai T, et al. Human helper T cell activation and differentiation is suppressed by porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng.* 2002; 8(5): 893-900.
- [32] Zhang KG, Zeng BF, Zhang CQ. *Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi.* 2005, 7(4):344-348. 张开刚, 曾炳芳, 张长青. 小肠黏膜下层的制备及细胞相容性的实验研究[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2005, 7(4):344-348.

来自本文课题的更多信息—

关于作者: 第一作者构思并设计本实验, 第一、二、三作者进行实施及资料收集, 第一作者成文, 作者对文章负责。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

本文创新性: 以成骨诱导的 ADSCs 为种子细胞, SIS 作为支架材料复合培养, 进行细胞相容性研究。应用 SIS 与成骨诱导的 ADSCs 构建“仿生骨膜”, 观察其成骨情况及仿生骨膜修复骨缺损的效果, 相关文献未见相关报道。

实验在体外将小肠黏膜下层与脂肪干细胞复合诱导成骨, 可构建出与机体自身生理骨膜类似的仿生骨膜, 在裸鼠体内可以成骨。