

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.008

[http://www.crter.org]

刘晓潭, 徐海斌, 路坦. 小鼠脂肪来源干细胞向成骨及软骨细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(14):2525-2531.

小鼠脂肪来源干细胞向成骨及软骨细胞的诱导分化★

刘晓潭¹, 徐海斌², 路坦²

1 新乡医学院第三附属医院骨科, 河南省新乡市 453003

2 新乡医学院第一附属医院骨科, 河南省新乡市 453100

文章亮点:

因小鼠附睾脂肪组织不与其他组织粘连, 血管和纤维组织少, 是理想的脂肪取材部位, 故实验取其部位脂肪。为避免红细胞裂解液会对干细胞产生一定的损伤, 实验未采用红细胞裂解液, 而获得出纯度较高的脂肪干细胞。将脂肪干细胞向成骨细胞和软骨细胞诱导分化, 诱导分化细胞能表达该种类细胞的特异性蛋白, 也反向证明了转化前的细胞具有干细胞特性。

关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 细胞培养; 成骨细胞; 软骨细胞; 分化; 碱性磷酸酶染色; 茜素红染色; II型胶原; 番红O染色; 干细胞图片文章

摘要

背景: 脂肪干细胞常从脂肪组织中分离获取, 脂肪组织在全身均有分布, 极易大量获得, 取材时对供区损伤小。

目的: 进一步验证小鼠脂肪来源干细胞的体外分离、培养方法, 并在特定条件下诱导其向成骨细胞和软骨细胞分化, 探讨其作为组织工程种子细胞的可行性。

方法: 取昆明种雄性小鼠附睾处脂肪, I型胶原酶消化法和差速贴壁法获取、纯化脂肪干细胞并进行细胞表型鉴定。采用成骨诱导培养基诱导脂肪干细胞, 进行钙钴法碱性磷酸酶染色和茜素红钙结节染色检测细胞分化情况; 采用软骨诱导培养基诱导脂肪干细胞, 进行甲苯胺蓝染色, 番红O染色, II型胶原免疫组织化学检测细胞分化情况。

结果与结论: 脂肪干细胞呈梭形贴壁生长, 原代7-9 d可达90%融合, 传至第3代后细胞形态趋向一致, 传代的脂肪干细胞生长曲线呈“S”形。细胞特异性抗原测定CD29、CD44表达阳性, 而CD34、CD45呈阴性表达。成骨诱导分化后细胞碱性磷酸酶染色和茜素红染色呈阳性。软骨诱导分化后细胞番红O染色、II型胶原免疫组织化学染色和甲苯胺蓝染色呈阳性。证实从脂肪组织中可分离到具有分化潜能的干细胞, 可在体外稳定增殖传代, 经诱导后可分化为成骨细胞、软骨细胞, 其具有来源广泛, 取材方便等优点, 可成为组织工程理想的种子细胞。

Adipose-derived stem cells differentiate into osteoblasts and chondrocytes

Liu Xiao-tan¹, Xu Hai-bin², Lu Tan²

1 Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

2 Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, Henan Province, China

刘晓潭★, 男, 1976年生, 河南省卫辉市人, 汉族, 2001年新乡医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事创伤骨科及脊柱外科研究。
liuxiaotan@sina.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344
(2013)14-02525-07

收稿日期: 2012-08-08

修回日期: 2012-09-26

(20120608002/W·C)

Liu Xiao-tan★, Master,
Lecturer, Department of
Orthopedics, the Third Affiliated
Hospital of Xinxiang Medical
University, Xinxiang 453003,
Henan Province, China
liuxiaotan@sina.com

Received: 2012-08-08
Accepted: 2012-09-26

Abstract

BACKGROUND: Adipose-derived stem cells can be separated and obtained from fat tissue. Fat tissue distributes in the whole body, and can be easily obtained in large quantities and has less damage to the donor site when drawing.

OBJECTIVE: To identify the methods of *in vitro* isolating and culturing of mice adipose-derived stem cells, to induce the adipose-derived stem cells to differentiate into chondrocytes and osteoblasts and to investigate the feasibility of being seed cells in tissue engineering.

METHODS: The adipose-derived stem cells were isolated from the epididymal fat tissue of Kunming mice. Primary adipose-derived stem cells were obtained and purified by collagenase I digestion and differential adherence method. The adipose-derived stem cells were induced with osteogenic induction medium, and then gomori alkaline phosphatase staining and alizarin red calcium nodules staining were performed to detect the differentiation of adipose-derived stem cells; the adipose-derived stem cells were induced with cartilage induction medium, and the toluidine blue staining, safranin-O staining and type II collagen immunohistochemistry testing were performed to detect the differentiation of adipose-derived stem cells.

RESULTS AND CONCLUSION: The adipose-derived stem cells were spindle-shaped and in adherent growth. After primary cultured for 7-9 days, the cells could reach 90% confluence. After passaged to the third generation, the cell morphology was in consistency, and the growth curve of the passaged adipose-derived stem cells presented "S" shape. The expressions of CD29 and CD44 antigens were positive detected with cell-specific antigen test, but the expressions of CD34 and CD45 were negative. After osteoblast-inducing culture, the differentiation of adipose-derived stem cells towards osteoblasts was verified positively by alkaline phosphatase staining and alizarin red staining. After chondrocyte-inducing culture, the differentiation of adipose-derived stem cells into the chondrocyte was verified positively by oil red O staining, type II collagen immunohistochemical staining and toluidine blue staining. The adipose-derived stem cells with differentiation potential can be isolated from the fat tissues, and can be the cells can be stably passaged and differentiated *in vitro*. The adipose-derived stem cells can be differentiated into osteoblasts and chondrocytes after induction, and the adipose-derived stem cells have the advantages of rich sources and easily obtained which can be considered as the ideal seed cells of tissue engineering.

Key Words: stem cells; adipose-derived stem cells; cell culture; osteoblasts; chondrocytes; differentiation; alkaline phosphatase staining; alizarin red staining; type II collagen; safranin-O staining; stem cell photographs-containing paper

Liu XT, Xu HB, Lu T. Adipose-derived stem cells differentiate into osteoblasts and chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(14):2525-2531.

0 引言

2001年Zuk等^[1]在人类抽脂处理细胞中发现同样存在着具有较强增殖能力和具有多向分化潜能的干细胞,称为脂肪来源干细胞,揭开了脂肪干细胞作为种子细胞应用于组织工程的序幕,脂肪干细胞常从脂肪组织中分离获取,脂肪组织在全身均有分布,极易大量获得,取材时对供区损伤小,研究发现脂肪干细胞体外增殖能力强,生长特征稳定,使其有可能成为种子细胞的理想来源。本次实验通过对获取脂肪源性干细胞的分离、培养、鉴定并向成骨细胞,软骨细胞诱导转化,观察脂肪源性干细胞的生物学活性,以期建立脂肪干细胞的分离、培养、鉴定的方法,为骨组织工程研究提供新的种子细胞以及为脂肪干细胞的进一步研究和应用提供理论依据。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 2009年6月至2010年1月在新乡医学院第一附属医院组织工程实验室完成。实验室为省级重点实验室,生物安全的防护水平为BSL-2。

材料:

实验动物: 健康7周龄昆明种雌性小鼠,体质量27-35 g,均由北京维通利华实验动物技

术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2006-0009。

小鼠脂肪来源干细胞的生物学活性所需主要试剂:

Main reagents:

试剂	来源
DMEM 培养基(高糖)、L-谷氨酰胺	美国 GIBCO 公司提供
胎牛血清	天津灏洋生物制品公司提供
注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素	华北制药股份有限公司提供
I 型胶原酶	美国 Invitrogen 公司提供
地塞米松、胰蛋白酶(1:250)、转化生长因子 β 1、Insulin、转铁蛋白、L-抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、碳酸氢钠	重庆北碚化学试剂厂
冰醋酸	上海化学试剂有限公司
CD29、34、44、45 单克隆抗体	Caltag 公司
丙酮	重庆川江化学试剂厂
巴比妥钠、茜素红	上海新中化学厂
氯化钙	成都市联合化工试剂研究所
氯化镁	成都化学试剂厂
硝酸钴、Tris	上海试剂二厂
硫化铵	上海振兴化工二厂
无水乙醇	上海振兴化工一厂
浓盐酸	遵义师范学院化学试剂厂

实验方法:

小鼠脂肪干细胞体外分离及原代培养: 昆明种成年雄性小鼠脱颈处死后浸泡于体积分数 75%乙醇中 0.5 h, 无菌操作获取附睾处脂肪, 无菌 D-hanks 液的培养皿中反复洗涤, 加入 0.075% I 型胶原酶, 37 °C 水浴振荡消化 1 h, 1 300 r/min 离心 10 min。去除漂浮的脂肪层及消化液, 无菌 D-hanks 液洗涤, 1 300 r/min 离心 10 min, 去上清。基础培养基(含体积分数 15%胎牛血清的高糖 DMEM)重悬沉淀, 100 目筛网过滤, 细胞计数板调整细胞密度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于 25 cm^2 培养瓶内, 静置 20 min。倒置显微镜下观察, 见部分细胞贴壁, 稍加振荡也不浮起时缓慢竖起培养瓶, 将悬液移入另一培养瓶。重复以上操作 2 次, 以去除混杂的成纤维细胞。将最后所得培养瓶置于饱和湿度、体积分数 5% CO_2 、37 °C 孵箱内培养。24 h 后, 无菌室内弃去培养瓶内原有培养基, D-hanks 液冲洗以除去未贴壁细胞, 然后加入新培养基。此后每 3 d 换液 1 次。每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

传代培养、生长曲线及倍增时间: 倒置显微镜下观察, 待细胞融合到 80%左右传代, 1:2 或 1:3 分瓶培养。每 3 d 换液 1 次, 细胞约 80%融合时, 再次传代。每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。取生长状态较好的第 3 代细胞, 以时间为横坐标, 细胞数量为纵坐标, 共 8 d 绘制细胞生长曲线。

脂肪干细胞的特异性表面抗原测定: 取生长状态较好的第 3 代细胞, 用 0.25%胰酶消化, 加入离心机, 1 100 r/min

离心 5 min 后细胞重悬, 细胞计数将细胞浓度调整为 $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 分别加入人抗鼠抗人 CD29, CD34, CD44, CD45 单克隆抗体室温反应 30 min, PBS 洗涤后上流式细胞仪检测。

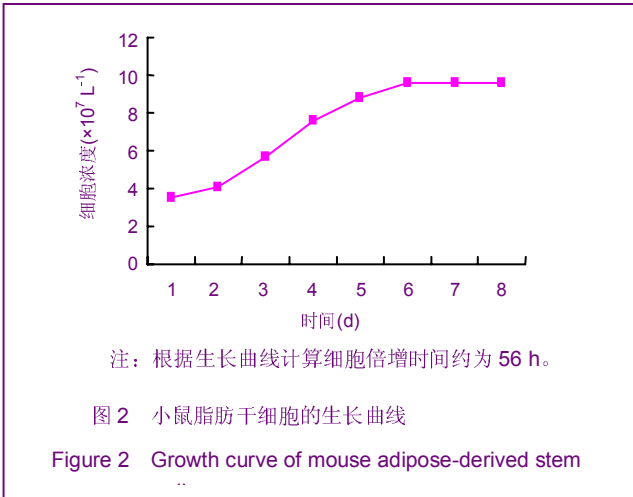
脂肪干细胞向成骨细胞分化、软骨细胞分化及鉴定: 取第 3 代脂肪干细胞, 分别加入含成骨诱导液和软骨诱导液的培养基, 继续培养, 对诱导后的细胞分别进行碱性磷酸酶染色、茜素红染色来鉴定成骨细胞及番红 O 染色、甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫组织化学染色来鉴定软骨细胞。对照组仍用基础培养基培养。

主要观察指标: 脂肪干细胞特异性表面抗原、碱性磷酸酶染色、茜素红染色、番红 O 染色、甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫组织化学染色结果。

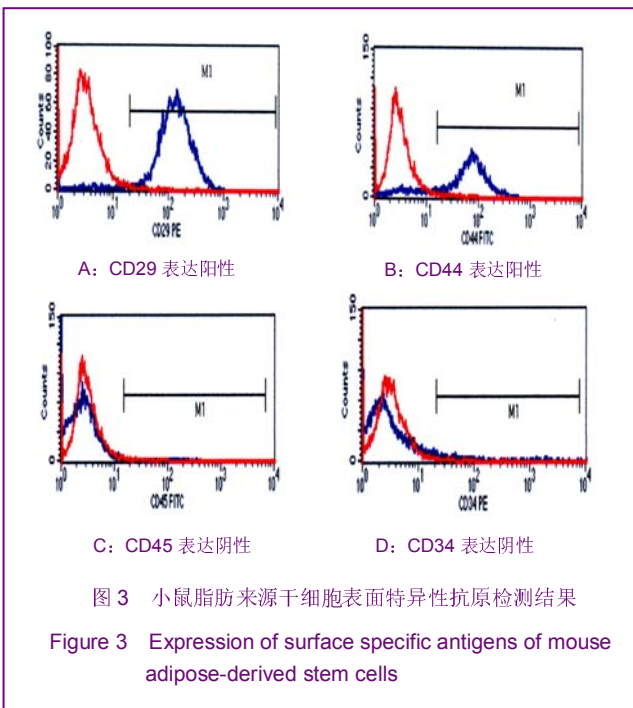
2 结果

2.1 小鼠脂肪干细胞体外分离培养结果 原代细胞接种后 6-24 h, 可见细胞开始贴壁, 细胞多呈三角形或梭形, 胞体较小, 单个核, 有较多漂浮细胞。接种后 72 h, 贴壁细胞数量明显增多, 部分聚集成团, 细胞呈典型成纤维细胞样生长, 呈短梭形、三角形, 见图 1A。培养 9-11 d, 细胞可达 80%融合, 细胞呈团簇状生长, 细胞成梭形及少量体积较大的多角性细胞, 并沿一定方向排列。细胞可稳定增殖和传代, 传代后细胞几乎全为长梭形, 4-6 d 可达 90%融合, 见图 1B。体外培养 10 代以后, 细胞增殖速率无明显减慢, 仍保持成纤维样单层生长。生长曲线呈 S 形, 接种后第 1, 2 天吸光度值变化不大, 为细胞的潜伏适应期, 从第 3 天开始细胞增殖加速并进入对数生长期, 第 7 天达高峰, 以后进入平台期, 见图 2。根据生长曲线计算细胞倍增时间约为 56 h。



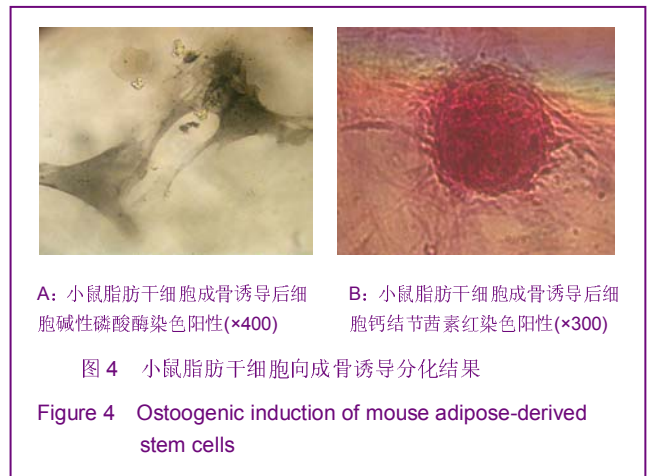


2.2 脂肪干细胞的特异性表面抗原测定结果 流式细胞仪脂肪干细胞的表面抗原分析显示, 所培养的脂肪干细胞表面有黏附分子的表达, CD29、CD44阳性标记出现单峰, 而CD34、CD45阴性表达, 见图3。

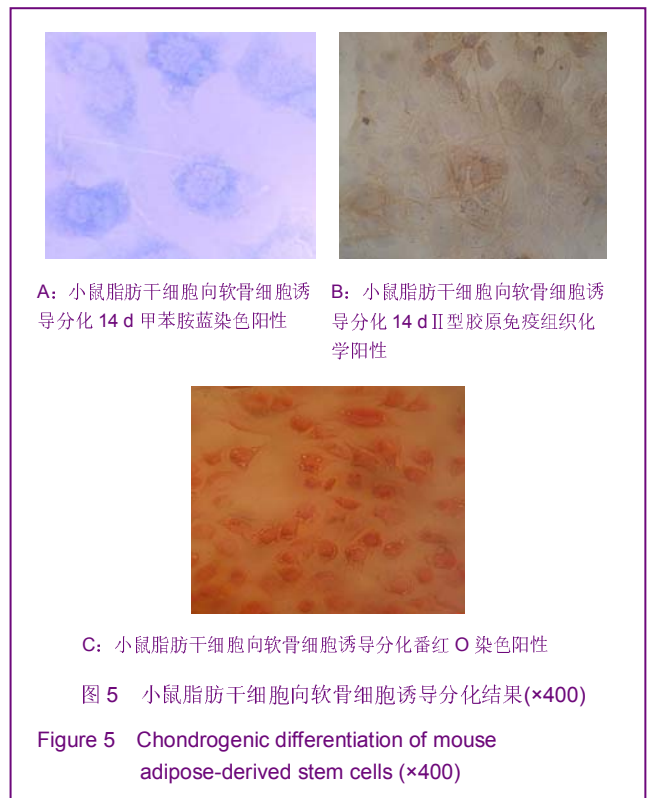


2.3 脂肪干细胞向成骨细胞诱导分化及鉴定 第3代细胞加入成骨诱导液后细胞增殖速度明显减慢, 前3 d细胞变圆, 胞质内颗粒增多。培养6 d后细胞呈多角形, 长梭形, 延展充分, 带有数个突起, 细胞内颗粒增多, 折光性较前差, 7 d后细胞融合成单层。诱导6 d后的细胞碱性磷酸酶染色结果显示, 细胞胞质内可见黑色的颗粒状物质, 在细胞周边也可见少量黑色颗粒分布。计数200个细胞, 碱性磷酸酶染色阳性率为90%, 阳性细胞多为梭形, 见图4A。未使用诱导液的细胞碱性磷酸酶染色大部分呈阴性, 少数为弱阳性。加入诱导液的细胞汇

合后呈多层重叠生长, 细胞呈矮柱状或方形, 21 d左右出现钙结节, 茜素红染色成红色散在的颗粒样物质, 见图4B。



2.4 脂肪干细胞向软骨细胞诱导分化及鉴定 见图5。



脂肪干细胞诱导培养后, 细胞形态逐渐变成圆形, 并渐渐有软骨结节形成。未加入诱导成分的对照组细胞仍保持为成纤维样细胞, 偶可见星形或多角形细胞, 生长速率无明显变化, 细胞无层叠生长, 汇合后有接触抑制, 随培养时间延长细胞出现老化脱落。软骨诱导14 d后, 甲苯胺蓝染色阳性表现为细胞内棕黑色颗粒, 见图5A。诱导14 d后, II型胶原免疫组织化学检测, 倒置显微镜下见有多角形边界较清晰, 胞浆富含棕色颗粒的软

骨细胞, 即II型胶原免疫组织化学检测阳性, 见图5B。成软骨诱导14 d后, 番红O染色阳性表现为细胞内红色颗粒, 见图5C。

3 讨论

虽然对脂肪干细胞的研究逐渐成熟, 但目前尚无分离脂肪干细胞的标准方法, 文献报道多采用胶原酶消化法。分离脂肪干细胞通常采用酶消化法, 选用的酶主要有两种: 胶原酶和胰酶。不同研究小组采用不同的酶的类型和消化时间消化不同部位的脂肪组织均能得到干细胞。Zuk等^[1]用0.75 g/L的胶原酶在37 °C下消化脂肪抽提物30 min后, 得到SVF细胞团, 用160 mmol/L NH₄Cl裂解红细胞, 通过这种方法得到的贴壁生长细胞, 命名为PLA细胞, 这种抽脂处理细胞在体外特定诱导条件下可向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和肌肉细胞分化。有些研究人员采用0.1% I型胶原酶+1% BSA在37 °C下消化人皮下脂肪也成功获得与骨髓基质干细胞相似表面标记的细胞^[2]。此外, Cousin等^[3]采用0.2%胶原酶II型+0.2% BSA在37 °C下消化小鼠腹股沟皮下脂肪也得到多能干细胞。但也有单用低浓度胰酶消化成功获得脂肪干细胞的, 如国内的王燕等^[4]用0.08%胰酶分次消化大鼠肠系膜脂肪组织, 也获得了干细胞, 并成功诱导其向心肌细胞分化, 这种方法也在一定程度上节约了费用, 但胰酶能严重损伤细胞的超微结构, 况且胰酶对结缔组织消化作用较弱, 需反复消化, 易进一步加重细胞损伤, 获取干细胞的效果差。所以胶原酶法常常选用I型胶原酶, 其对胶原的消化作用强, 仅对细胞间质有消化作用, 对干细胞影响不大, 所以目前获取脂肪干细胞常常选用I型胶原酶。

实验取材部位是小鼠附睾处脂肪, 因此处脂肪组织不与其他组织粘连, 血管和纤维组织少, 是理想的脂肪取材部位。为获得优良干细胞, 预防其他类型细胞污染, 取材后需仔细去除其他组织, 特别是血管和纤维组织, 剪碎, 再用胶原酶消化。单纯采用酶消化法获取的脂肪干细胞间杂其他的细胞, 譬如红细胞等, 如何纯化原代脂肪干细胞、鉴定并去除混杂细胞, 需要进一步研究, 以期建立一种获取高纯度原代脂肪干细胞的方法。Zuk等^[1]、Wickham等^[5]、杨立业等^[6]报道, 为排除红细胞干扰, 用氯化铵等红细胞裂解液后进行贴壁培养。因为红细胞裂解液会对干细胞产生一定的损伤, 本实验未采用红细胞裂解液, 仍获得了纯度较高的脂肪干细胞。其机

制可能是: ①实验中选用的是小鼠附睾处的脂肪组织, 因为该处脂肪组织中血管分布较少。②取材时用D-Hanks液反复冲洗及差速贴壁的方法也能去除红细胞, 有研究表明, 经过差速贴壁的方法获取的细胞经三四次连续传代后细胞基本得以纯化, 呈均一的克隆生长, 这与先前的实验结果相似^[3-4]。

目前国内外还没有找到干细胞特异性的标志分子, 所以脂肪干细胞的鉴定还没有较好的方法, 免疫组织化学染色和流式细胞仪检测等免疫表型的结果是确认脂肪干细胞的鉴定方法之一。国内梁笃等^[7]根据脂肪干细胞的概念提出脂肪干细胞的鉴定方法: ①首先来自脂肪组织, 呈成纤维细胞相似的形态。②该细胞的生长曲线和倍增时间与干细胞接近。③通过对诱导分化的细胞进行鉴定, 然后逆推得知原始细胞是否为干细胞, 这是目前鉴定脂肪干细胞时比较公认的方法^[8]。本实验中将脂肪干细胞向成骨细胞和软骨细胞诱导分化, 诱导分化细胞能表达该种类细胞的特异性蛋白, 也反向证明了转化前的细胞具有干细胞特性。④细胞表面有间充质干细胞特异性分子抗原, 因为脂肪干细胞与其他细胞表面特异性分子抗原之间有很多的交叉性, 所以单一的表面标志物测定不能准确的鉴定, 因此常需要多种表面标志物组合来鉴定。

国内外研究发现, 脂肪干细胞表达与骨髓间充质干细胞相似的CD标记抗原^[3,9-12], 两者均表达CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD166等, CD14, CD31, CD34, CD45等表达阴性, CD49d在脂肪干细胞中阳性表达, 在骨髓间充质干细胞中则为阴性表达, 而与CD106相反, CD49d和CD106是区分脂肪干细胞和骨髓间充质干细胞的方法之一。本实验中选用CD29、CD34、CD44、CD45组合对脂肪干细胞进行鉴定, CD29、CD44表达阳性, CD34、CD45表达阴性。

实验采用含 10^{-8} mol/L地塞米松、50 mg/L L-抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠的成骨诱导培养基成功诱导脂肪干细胞向成骨细胞分化, 这与先前研究结果相同^[13]。Halvorsen等^[10]研究表明, 地塞米松、 β -甘油磷酸钠和L-抗坏血酸是脂肪干细胞向成骨细胞分化和体外成骨的必要条件。地塞米松可促进成骨细胞的分化成熟, 提高碱性磷酸酶活性, 促进细胞外基质胶原合成。但地塞米松对成骨分化具有双重作用, 大于 10^{-6} mol/L能激活细胞表面的糖皮质激素受体, 使其向脂肪细胞分化, 限

制骨钙素表达, 从而减少向成骨分化, 小剂量的地塞米松可以成为促进诱导成骨^[14]。 β -甘油磷酸钠被碱性磷酸酶分解后能为成骨细胞提供钙化所需磷离子, 促进生理性钙盐的沉积和钙化, 是脂肪干细胞发生矿化结节的必要条件。L-抗坏血酸能促进细胞合成胶原, 形成钙化。

对体外诱导的成骨细胞的鉴定主要根据其所分泌的特异性蛋白、因子或受体来进行, 包括碱性磷酸酶、骨钙素、I型胶原蛋白、体外矿化的功能特征等。先前的研究发现诱导成骨过程是: 骨祖细胞-前成骨细胞-过渡型成骨细胞-分泌型成骨细胞-骨细胞性成骨细胞-骨细胞^[15-16], 前成骨细胞和过渡型成骨细胞通过基质小泡分泌碱性磷酸酶, 其碱性磷酸酶标记阳性, 所以碱性磷酸酶活性高低与成骨分化、成熟正相关, 能作为成骨细胞的鉴定方法之一。干细胞经过地塞米松作用后两三天内细胞内碱性磷酸酶的活性增加, 7-14 d活性达到高峰^[17], 所以本实验选用经成骨诱导7 d后的细胞进行碱性磷酸酶染色来检测成骨诱导; 钙结节是脂肪干细胞向成骨细胞诱导时在体外培养时形成矿化的细胞外基质, 是向成骨细胞诱导分化的最后阶段。钙结节的形成包括胶原的沉积和基质的矿化两个步骤实验中成骨诱导后连续培养22 d后茜素红染色显示有钙结节存在, 说明了成骨细胞分泌了大量的钙盐。将碱性磷酸酶和钙结节检测相结合可以较好说明脂肪干细胞转化为成骨细胞。

实验应用含转化生长因子 β 、胰岛素及地塞米松的软骨诱导培养基成功诱导脂肪干细胞向软骨细胞分化。在向软骨诱导分化过程中, 转化生长因子 β 家族是最具成效的诱导剂, 其中转化生长因子 β 1是调节细胞增殖和分化的关键因子^[18], 转化生长因子 β 1可使II型胶原、硫酸化蛋白多糖等因子的表达提高2倍以上, 另外, 其对软骨细胞的分化和功能具有双向调节作用, 促进未分化或分化早期软骨细胞DNA合成、增殖、分化及细胞外基质的合成, 抑制成熟软骨细胞的增殖和分化。胰岛素是一种有丝分裂原, 在体外细胞培养体系中, 对于维持细胞的活力, 促进细胞有丝分裂、糖原和脂肪酸的合成起着十分重要的作用^[19]。地塞米松可以激活间充质干细胞上的糖皮质激素受体, 促进间充质干细胞上的糖皮质激素受体, 促进间充质干细胞向软骨细胞分化, 并抑制其向脂肪细胞分化。维生素C在成软骨培养基中起到辅助作用, 对脂肪干细胞向软骨分化过程中胶原蛋白和蛋白聚糖的合成有一定的促进作用^[20]。

脂肪干细胞诱导培养后, 细胞形态逐渐变成圆形, 并渐渐有软骨结节形成, 继续培养, 多数细胞呈平坦的多边形形状细胞。诱导14 d后, 甲苯胺蓝染色实验阳性; II型胶原免疫组织化学检测, 倒置显微镜下见有多角形边界较清晰, 胞浆富含棕色颗粒的软骨细胞, 即II型胶原免疫组织化学检测阳性, 番红O染色实验阳性。本实验中也证明脂肪干细胞体外向软骨转化, 这与先前的研究结果相同^[21]。

实验难点是至今没有建立脂肪干细胞的鉴定筛选标准和完善高效的定向诱导体系。随着研究的逐渐深入, 出现了许多新的问题, 如脂肪干细胞的致瘤性问题, 国外研究发现脂肪干细胞在传代培养过程中染色体出现单体或异位^[22], 细胞出现脱离正常轨道。其具体原因不清楚, 另外, 为进一步探寻其在体内诱导分化的条件和最佳供体、供区提出了新的课题。同时体外培养的细胞最终要移入体内进行研究, 所以必须建立动物模型。总之, 从脂肪组织中可分离出大量可为组织工程所利用的干细胞, 而且将其成功诱导分化为软骨细胞。其来源广泛, 容易获取, 且对机体损伤小, 有可能成为新一代的骨组织工程种子细胞。

作者贡献: 实验设计为第一、第二作者, 实施为第一、二、三作者, 评估为第二作者, 资料收集为第一、三作者, 第一作者成文, 第二作者审校, 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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] 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.
- [2] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cellular Physiology.* 2001;189:54-63.
- [3] Cousin B, Andre M, Arnaud E, et al. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical Biophysical Res Communications.* 2003,301: 1016-1022.

- [4] Wang Y, Chen GH, Shao J, et al. Shandong Daxue Xuebao: Yi Xue Ban. 2005;43(7): 578-581.
王燕,陈光辉,邵建,等.大鼠脂肪组织源性间充质干细胞的分离及向心肌细胞的诱导分化[J].山东大学学报:医学版,2005,43(7): 578-581.
- [5] Wickham MQ, Geoffrey RE, Jeffrey MG, et al. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clin Orthop Relat Res. 2003;412(7): 196-212.
- [6] Yang LY, Liu XM, Sun B, et al. Zhonghua Shenjigong Zazhi. 2002;1(1):45-48.
杨立业,刘相名,孙兵,等.脂肪组织源性基质细胞表达神经元表型的实验研究[J].中华神经医学杂志,2002,1(1):45-48.
- [7] Liang D, Fan YG, Wang HB, et al. Guangzhou Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2009;26(4):412-418.
梁笃,樊粤光,王海彬,等.成人脂肪来源干细胞定向诱导分化为软骨细胞的实验研究[J].广州中医药大学学报,2009,26(4): 412-418.
- [8] Sen A, Leacurrie YR, Sujkowska D, et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. J Cell Biochem. 2001;81:312-319.
- [9] Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, et al. Biological alchemy-engineering bone and fat from fat-derived stem cells. Ann Plast Surg. 2003;50(6):610-710.
- [10] Halvorsen YD, Franklin D, Bond AI, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. Tissue Eng. 2001;7(6): 729-741.
- [11] Li BG, Zeng QT, Wang HX, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2006;27(3):142-144.
李宾公,曾秋棠,王红祥,等.脂肪来源与骨髓来源的基质干细胞的比较[J].中华器官移植杂志,2006,27(3):142-144.
- [12] 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.
- [13] Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, et al. Biological alchemy-engineering bone and fat from fat-derived stem cells. Ann Plast Surg. 2003;50(6):610-710.
- [14] Ju XD, Lou SQ, Ma QJ, et al. Gu Yu Guanjie Sunshang Zazhi. 2004;19(6):390-392.
鞠晓东,娄思权,马庆军,等.脂肪间充质干细胞的成骨诱导分化[J].骨与关节损伤杂志,2004;19(6):390-392.
- [15] Caplan AL. Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. Clin Orthop Relat Res. 1990;121(261):257-267.
- [16] Shimizu K, Ito A, Honda H. Mag-seeding of rat bone marrow stromal cells into porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. J Biosci Bioeng. 2007;104(3):171-177.
- [17] Huang JI, Beanes SR, Zhu M, et al. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. Plast Reconstr Surg. 2002;109(3):1033-1043.
- [18] Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, et al. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. Tissue Eng. 2003;9(6):1301-1312.
- [19] Hani A, David L. Autologous mesenchymal stem cells-mediated repair of tendon. Tissue Engineering, 1999;5: 267-274.
- [20] Heng BC, Cao T, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. Stem Cells. 2004;22: 1152-1167.
- [21] Gao H, Wang YL, Yao YN, et al. Zhongguo Quanke Yixue. 2011; 14(5B):1568-1571.
高华,王玉玲,姚亚妮,等.脂肪来源干细胞体外成骨和成脂及成神经的诱导分化研究[J].中国全科医学,2011,14(5B):1568-1571.
- [22] Bochkov NP, Voronina ES, Kosyakova NV, et al. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. Bull Exp Biol Med. 2007;143(1):122-126.