

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.34.004 [http://www.crter.org]

刘刚, 汪明星, 闫长明, 王云清, 魏学杰, 胡兆丽. 脂肪干细胞复合明胶海绵修复兔桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(34):6083-6088.

## 脂肪干细胞复合明胶海绵修复兔桡骨缺损★

刘刚<sup>1</sup>, 汪明星<sup>1</sup>, 闫长明<sup>1</sup>, 王云清<sup>1</sup>, 魏学杰<sup>1</sup>, 胡兆丽<sup>2</sup> (1徐州医学院第二附属医院, 江苏省徐州市 221000; 2徐州医学院生物化学与分子生物学实验室, 江苏省徐州市 221004)

### 文章亮点:

- 1 目前脂肪干细胞复合明胶海绵修复兔桡骨缺损的动物体内实验较少。
- 2 实验特点在于分离培养兔脂肪干细胞, 以骨形态发生蛋白 2 为诱导因子, 以明胶海绵为支架, 制作脂肪干细胞-明胶海绵复合体。兔桡骨骨缺损模型实验侧植入脂肪干细胞-明胶海绵复合体, 对照侧植入明胶海绵, 双侧自体对照。
- 3 结果证实脂肪干细胞明胶海绵复合体对兔长骨骨缺损修复有促进作用, 具有较明显的体内诱导成骨作用。

### 关键词:

生物材料; 组织工程骨材料; 脂肪干细胞; 桡骨缺损; 骨形态发生蛋白; 细胞培养; 组织学; 放射学

### 摘要

**背景:** 脂肪干细胞是近年来新发现的一种成体干细胞, 有很强的多向分化能力, 但其在体内成骨分化的能力研究较少。

**目的:** 考察脂肪组织来源间充质干细胞复合明胶海绵修复骨缺损的效果。

**方法:** 从兔腹股沟脂肪垫分离和培养脂肪干细胞, 用含骨形态发生蛋白 2 的成骨诱导培养液进行培养, 然后注入明胶海绵继续培养。制作兔桡骨缺损模型, 将脂肪干细胞-明胶海绵复合体植入实验侧兔桡骨缺损区, 对照侧植入明胶海绵。于骨缺损修复后第 6、12 周处死动物, 取标本进行 X 射线、CT 扫描、苏木精-伊红染色作放射学和组织学评价。

**结果与结论:** 兔桡骨缺损修复后 6、12 周, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧的 Lane-Sandhu X 射线评分和 Lane-Sandhu 组织学评分均比对照侧显著升高, 说明实验侧骨缺损修复更好。结果表明脂肪干细胞-明胶海绵复合体对兔长骨骨缺损修复有促进作用, 具有较明显的体内诱导成骨作用。

## Adipose-derived stem cells combined with gelatin sponge for repair of rabbit radial defects

Liu Gang<sup>1</sup>, Wang Ming-xing<sup>1</sup>, Yan Chang-ming<sup>1</sup>, Wang Yun-qing<sup>1</sup>, Wei Xue-jie<sup>1</sup>, Hu Zhao-li<sup>2</sup> (1Department of Orthopedics, Second Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China; 2Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Adipose-derived stem cells discovered recently are a new kind of adult stem cells, and have a strong multi-differentiation capacity. However, there are rare studies concerning *in vivo* osteogenic capacity of adipose-derived stem cells.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of adipose-derived stem cells combined with gelatin sponge on repairing bone defects.

**METHODS:** Adipose-derived stem cells from rabbit inguinal fat pads were isolated and cultured, and then induced using an osteogenic medium containing bone morphogenetic protein 2 followed by injection of gelatin sponge. Radial defect models of rabbits were prepared. Compound of adipose-derived stem cells and gelatin sponge was implanted into the lesion side, while gelatin sponge alone was implanted into the contralateral side. Rabbits were killed at weeks 6 and 12 after bone defect repair for X-ray examination, CT scan, and hematoxylin-eosin staining.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Lane-Sandhu X-ray and Lane-Sandhu histological scores after compound implantation were significantly higher than those after repair with gelatin sponge alone. It indicates that adipose-derived stem cells combined with gelatin sponge can promote bone defect healing of rabbits, showing an obvious osteogenic capacity *in vivo*.

**Key Words:** biomaterials; tissue-engineered bone materials; adipose-derived stem cells; radial defects; bone morphogenetic protein; cell culture; histology; radiology

刘刚★, 男, 1980 生, 江苏省新沂市人, 2006 年徐州医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱外科的工作和研究。  
liugangmd@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344  
(2013)34-06083-06

收稿日期: 2013-04-27  
修回日期: 2013-06-18  
(201204120090/MWJ · W)

Liu Gang★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Second Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China  
liugangmd@163.com

Supported by: the Science and Technology Bureau of Xuzhou City, No. XN09B095\*

Received: 2013-04-27  
Accepted: 2013-06-18

Liu G, Wang MX, Yan CM, Wang YQ, Wei XJ, Hu ZL. Adipose-derived stem cells combined with gelatin sponge

for repair of rabbit radial defects. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(34):6083-6088.

## 0 引言

骨缺损是骨科临床的难题之一。组织工程学的兴起为骨缺损的修复带来新技术和方法。组织工程学研究主要包括：种子细胞、支架材料和组织构建。其中种子细胞一直是骨组织工程学研究重点和热点<sup>[1]</sup>。脂肪干细胞是近年来新发现的一种成体干细胞，其细胞标志与骨髓间充质干细胞相似<sup>[2-5]</sup>。众多研究表明，脂肪干细胞有很强的多向分化能力，可在不同培养基中诱导分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞、内皮细胞、肌肉细胞和心肌细胞等<sup>[6-9]</sup>。

成骨细胞是来源于中胚层的细胞，脂肪干细胞可以在一定的体外培养条件下分化为成骨细胞<sup>[10-11]</sup>。在体内实验方面，有学者将Lewis大鼠脂肪干细胞接种于聚乳酸/聚乙醇酸共聚物支架上，植入裸鼠背部皮下肌袋内培养，成功生成组织工程骨，这是首次利用脂肪干细胞体内培养成骨的实验报道<sup>[12]</sup>。后来，他们将脂肪干细胞诱导为成骨细胞和成软骨细胞，并且在植入体内后分别形成了透明软骨和骨组织<sup>[13]</sup>。学者们将兔脂肪干细胞接种到明胶海绵支架上体外培养之后植入头盖骨缺损处，术后6周成功修复头盖骨缺损<sup>[14]</sup>。此外，体内实验表明，脂肪干细胞在体内修复骨和软骨缺损的能力与骨髓间充质干细胞相同。有学者利用成年雌性山羊脂肪干细胞在诱导培养基中分别加入骨形态发生蛋白2和骨形态发生蛋白7，促进了成骨诱导分化和成软骨诱导分化<sup>[15]</sup>。还有学者通过人类腹部、臀部和髌下脂体脂肪组织的诱导分化研究，证实了骨形态发生蛋白2对促进脂肪干细胞的成骨能力至关重要<sup>[16-17]</sup>。

实验以兔为实验对象，分离培养兔脂肪干细胞，以明胶海绵为支架，骨形态发生蛋白2为诱导因子将脂肪干细胞向成骨细胞转化，而后将诱导后的脂肪干细胞复合明胶海绵支架植入兔桡骨缺损区，考察桡骨缺损的修复情况。在不同时期处死动物，对桡骨缺损修复区进行组织学观察，以及X射线测量，考察脂肪干细胞修复骨缺损的特点，以期对脂肪干细胞进一步研究应用奠定基础。

## 1 材料和方法

**设计：**配对设计。

**时间及地点：**实验于2011年4月至11月在徐州医学院实验动物中心、徐州医学院生物化学与分子生物学实验室、徐州医学院第二附属医院病理科完成。

### 材料：

**实验动物：**新西兰兔30只，三至四月龄，体质量3.0-3.5 kg，均为雌性。购自徐州医学院实验动物中心，许可证号SCXK(苏)2010-0003。动物饲养室温度在15-28 ℃、湿度在45%-55%，自然光照，自由进食水。实验中对动物的处置符合徐州医学院实验动物伦理委员会的要求。

**脂肪干细胞复合明胶海绵修复兔桡骨缺损实验所用主要试剂及仪器：**

试剂及仪器	来源
胎牛血清	杭州四季青公司
胰蛋白酶、高糖 DMEM 干粉培养基、PBS 干粉	美国 Gibco 公司
骨形态发生蛋白 2	以色列 ProSpec 公司
明胶海绵	南京金陵药业公司
CO <sub>2</sub> 培养箱	美国 Sheldon 公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司
X 射线设备	徐州医学院第二附属医院放射科

### 实验方法：

**脂肪干细胞分离和培养：**实验兔全部进行脂肪采集。实验动物称质量，用3%戊巴比妥钠以1 mL/kg作耳缘静脉麻醉后，置动物于手术台。术区剪毛、消毒，取双侧腹股沟切口，显露双侧腹股沟脂肪垫，完整取出。置于培养皿中，在无菌条件下清除外包膜、明显的结缔组织和肉眼可见的小血管。剪碎，PBS清洗2次；双抗液(青霉素100 mg/L，链霉素100 mg/L)冲洗，在37 ℃条件下，胰酶震荡消化2 h，然后离心10 min，离心力500×g，除去上层脂肪及上清，PBS洗涤沉淀2次。用体积分数为10%胎牛血清的DMEM 培养基稀释，200目尼龙网格滤网过滤，离心10 min，离心力500×g，将细胞收集调整细胞浓度在 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 左右置于50 mL培养瓶，在37 ℃、体积分数5%的CO<sub>2</sub>孵箱培养。2 d初次换液，去除未贴壁细胞，3 d换液1次，细胞80%左右融合时，用含0.1 mmol/L EDTA-Na的2.5 g/L胰酶在室温消化5 min左右，用适量小牛血清终止消化反应，用吸管轻轻吹打，转入离心管中离心10 min，离心力500×g。弃上清，按 1 : 3 比例传代。定期在倒置显微镜下，观察原代及子代细胞形态学改变情况。

**明胶海绵-脂肪干细胞复合体制备：**细胞传至第3代后，加入成骨诱导培养液。成骨诱导培养基含体积分数10%FBS的DMEM，0.1 μmol/L地塞米松，50 mg/L抗坏血酸，10 mmol/L β-磷酸甘油钠，成骨诱导因子为1 mg/L的骨形态发生蛋白2。培养至细胞浓度为 $3 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ <sup>[18]</sup>，将其注入明胶海绵中继续培养3 d然后植入骨缺损区。

**桡骨缺损模型制作和明胶海绵-脂肪干细胞复合体植入：**脂

脂肪干细胞分离培养后1周, 进行兔桡骨缺损模型制备。实验动物不分组, 采用左右侧配对设计, 动物实验侧和对照侧用随机方法。动物称质量后用3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射麻醉, 1 mL/kg。麻醉成功后剪除前臂兔毛, 将肢体朝上俯卧位固定于自制手术架上, 术区碘伏消毒, 铺无菌巾。前臂内侧中上段切口切开皮肤、皮下组织及深筋膜, 分离肌间隙显露桡骨。参照陈光忠等<sup>[19]</sup>的方法在桡骨中段前面用薄椎板咬骨钳咬出20 mm长的骨缺损, 咬除骨质及骨膜。对照侧植入含生理盐水的明胶海绵, 实验侧植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体。缝合皮肤, 伤口碘伏消毒。骨缺损修复后常规分笼饲养, 动物饲养室温度在15-28 °C、湿度在45%-55%, 自然光照, 自由进食水。患肢不行外固定。造模后常规予头孢唑林肌注预防感染。观察动物的饮食、活动及伤口愈合情况。

**放射学评价:** 桡骨缺损修复后第6周和第12周处死动物, 每次15只。取兔桡骨标本进行X射线拍摄及CT扫描, 观察桡骨缺损区的修复情况和特点。动物的骨缺损修复放射学评价按Lane-Sandhu X射线评分法<sup>[20]</sup>, 评分标准见表1。分值越高, 骨缺损修复越好。

表1 Lane-Sandhu X射线评分标准

Table 1 Criteria for Lane-Sandhu X-ray scoring

分类	含义	分值
骨形成	无骨形成	0
	骨形成占缺损 25%	1
	骨形成占缺损 50%	2
	骨形成占缺损 75%	3
	骨形成充满缺损	4
骨连接	骨折线清楚	0
	骨折线部分存在	2
	骨折线消失	4
骨塑形	未见骨塑形	0
	骨髓腔形成	2
	皮质骨塑形	4

**组织学评价:** 取桡骨, 大体观察骨缺损修复情况, 再做组织学检查。用体积分数4%甲醛固定5 d, 常规脱钙、脱水、石蜡包埋, 苏木精-伊红染色, 标本制作用电脑全自动染色机完成。用Lane-Sandhu组织学评分记录观察结果<sup>[20]</sup>, 评分标准见表2。分值越高, 骨缺损修复越好。

**主要观察指标:** 将成骨诱导后的脂肪干细胞联合明胶海绵支架植入兔桡骨缺损区后, 桡骨缺损修复的Lane-Sandhu X射线评分和Lane-Sandhu组织学评分。

**统计学分析:** 对所测数据采用SPSS 11.5统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对统计结果进行配对 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

表2 Lane-Sandhu 组织学评分标准

Table 2 Criteria for Lane-Sandhu histological scoring

项目	含义或标准	分值
连接	无连接	0
	纤维连接	1
	骨与类骨连接	2
	骨连接	3
	骨干完全再生	4
疏松质骨	无骨细胞活性	0
	新骨早期聚集	1
	有活性的新骨聚集	2
	松质骨正在改造	3
皮质骨	松质骨完全形成	4
	无皮质骨生长	0
	皮质骨生长的早期表现	1
	皮质骨正在形成	2
	大部分被改造	3
	完全骨再生	4

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 有1只兔腹股沟区伤口裂开, 清创缝合后愈合, 但机体营养状况变差, 1只死于麻醉意外。摒除异常情况, 重新建模补足数量。最后30只新西兰兔进入结果分析。

**2.2 脂肪干细胞形态** 倒置显微镜下, 培养的细胞具有旺盛的生长性, 可以认为其是脂肪干细胞。见图1。



A: 消化培养后第2天的脂肪干细胞 B: 第1次传代后的脂肪干细胞

注: 倒置显微镜下, 原代及子代细胞具有旺盛的生长性。

图1 兔脂肪干细胞形态( $\times 200$ )Figure 1 Morphology of rabbit adipose-derived stem cells ( $\times 200$ )

**2.3 放射学评价结果** 在骨缺损修复后6, 12周处死动物, 取桡骨标本进行X射线观察。显示造模后6周时对照侧骨缺损修复少, 实验侧部分修复; 12周时对照侧仍有大块骨缺损, 而实验侧骨缺损大多修复, 髓腔通畅, 见图2, 3。

根据Lane-Sandhu X射线评分标准评分, 记录结果进行统计分析,  $t$  检验, 统计结果见表3。兔桡骨缺损修

复后6, 12周, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧的Lane-Sandhu X射线评分比对照侧显著升高, 说明实验侧骨缺损修复更好。

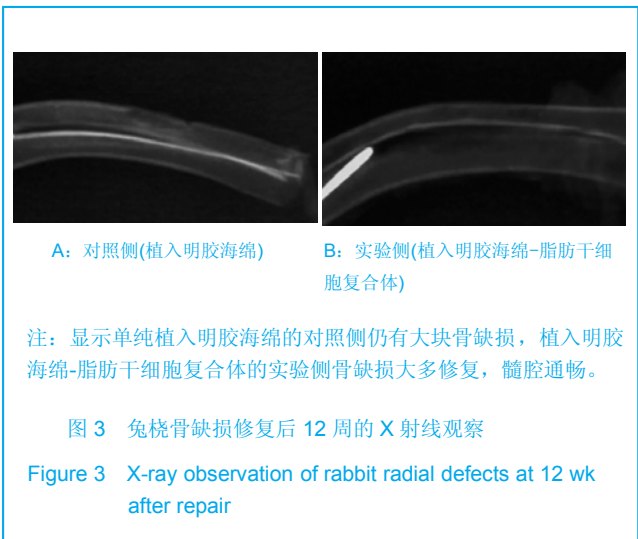
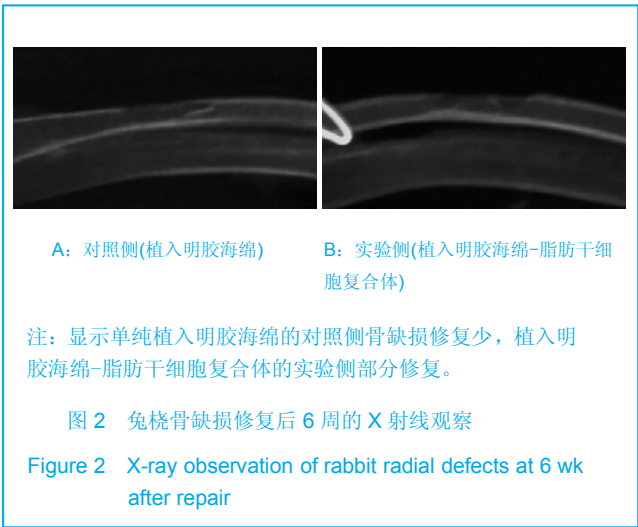


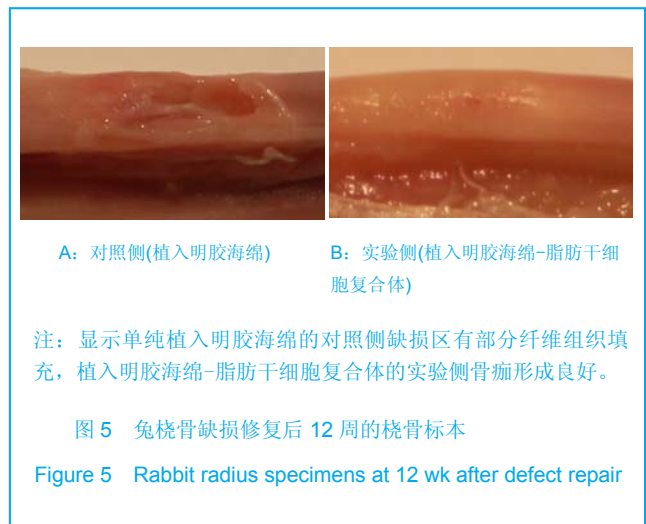
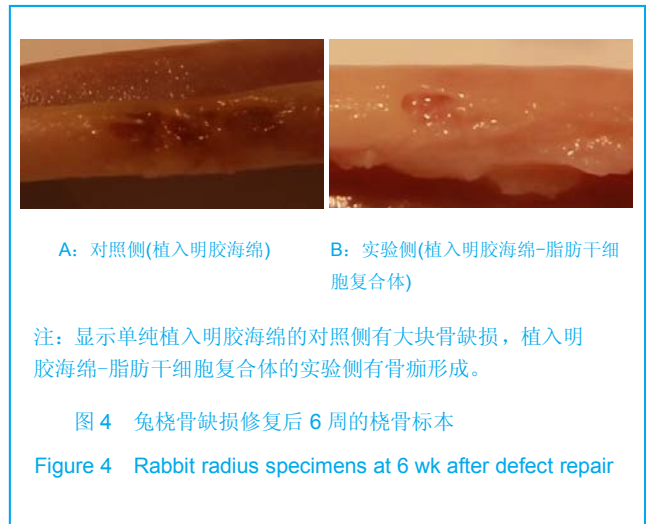
表3 兔桡骨缺损修复后的 Lane-Sandhu X射线评分

Table 3 Lane-Sandhu X-ray scores after repair of rabbit radial defects ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照侧	实验侧	t	P
6周	1.73±1.75	6.73±2.21	10.68	< 0.001
12周	2.73±2.12	7.13±1.36	8.00	< 0.001

注: 兔桡骨缺损修复后6, 12周, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧的 Lane-Sandhu X射线评分比单纯植入明胶海绵的对照侧显著升高, 说明实验侧骨缺损修复更好。

2.4 组织学观察 兔桡骨标本观察可见, 造模6周时对照侧有大块骨缺损, 实验侧有骨痂形成, 见图4; 造模12周时对照侧缺损区有部分纤维组织填充, 实验侧骨痂形成良好, 见图5。



根据Lane-Sandhu组织学评分标准评分, 记录结果进行统计分析, t 检验, 统计结果见表4。兔桡骨缺损修复后6, 12周, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧的Lane-Sandhu 组织学评分比对照侧显著升高, 说明实验侧骨缺损修复更好。

表4 兔桡骨缺损修复后的 Lane-Sandhu 组织学评分

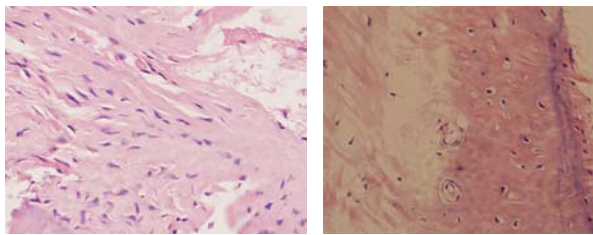
Table 4 Lane-Sandhu histological scores after repair of rabbit radial defects ( $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照侧	实验侧	t	P
6周	1.53±1.30	4.87±1.72	5.89	< 0.001
12周	1.80±1.15	7.80±2.04	10.7	< 0.001

注: 兔桡骨缺损修复后6, 12周, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧的 Lane-Sandhu 组织学评分比单纯植入明胶海绵的对照侧显著升高, 说明实验侧骨缺损修复更好。

兔桡骨标本经苏木精-伊红染色后光镜下观察, 造模后6周对照侧骨缺损区大多为纤维组织填充, 而实验

侧有编织骨形成, 骨小梁紊乱, 见图6。造模后12周, 实验侧形成板层骨, 骨小梁排列致密有序, 见图7。



A: 对照侧(植入明胶海绵) B: 实验侧(植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体)

注: 苏木精-伊红染色显示单纯植入明胶海绵的对照侧为纤维组织填充, 植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧有编织骨形成, 骨小梁排列紊乱。

图6 兔桡骨缺损修复后6周的组织形态(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )

Figure 6 Morphology of rabbit radial defects at 6 wk after repair (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )



注: 苏木精-伊红染色显示植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧形成板层骨, 骨小梁排列有序。

图7 兔桡骨缺损修复后12周实验侧的组织形态(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )

Figure 7 Morphology of rabbit radial defects at 12 wk after repair (Hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

**2.5 不良反应** 除脱失的动物外, 纳入结果分析的新西兰兔骨缺损修复后摄食, 活动良好。切口愈合正常, 缝线自行脱落。未见发生明显免疫排斥反应。

### 3 讨论

目前, 骨缺损修复已经成为临床骨科工作的一个重点和难点。其关键性问题就是骨的来源。以自体骨移植效果最好, 但受限于取材量受限制。组织工程学的进展为骨缺损修复带来很多希望。

**3.1 脂肪干细胞的研究** 脂肪干细胞是近年来新发现的一种成体干细胞。具有多种分化潜能, 有研究显示能

促进颅骨骨缺损的修复<sup>[14]</sup>。骨形态发生蛋白是已经证实的成骨生长因子, 它能诱导干细胞分化成骨细胞。本组实验用骨形态发生蛋白2为诱导因子, 以期促进脂肪干细胞向成骨细胞分化<sup>[16-17]</sup>。实验从兔脂肪组织中提取的细胞具有旺盛生长特性, 具有分化能力, 具备干细胞特点。

**3.2 细胞载体的选择** 众所周知, 组织工程的基本要素有: 种子细胞、支架材料和生长因子。脂肪干细胞取材方便, 分离体外培养扩增技术已成熟, 有良好分化潜能, 具有极大的应用前景。而骨组织工程研究不仅需要取材简便、成骨能力强的种子细胞, 也需要适宜的细胞外基质材料。理想的细胞外基质材料有如下要求<sup>[21]</sup>: ①良好的生物相容性。②良好的生物降解性。③具有三维立体多孔结构。④可塑性和一定的机械强度。⑤良好的材料-细胞界面。明胶海绵满足大部分要求, 且廉价。本组实验未见发生明显免疫排斥反应, 载体和细胞复合容易, 显示出良好的组织相容性, 具有来源广泛、成本价格低廉等优点, 能够作为骨组织工程中的载体使用。

**3.3 骨缺损模型的制作** 临界性骨缺损是评价骨缺损的最好选择。周芳等<sup>[22]</sup>研究认为临界骨缺损长度为17 mm。大多数动物临界骨缺损大小随年龄增长而下降。这次实验制作20 mm长桡骨骨缺损。结果表明, 骨缺损的模型的制备是有效的, 能够用于检测缺损的修复情况。实验去除了骨质及骨膜, 因为骨膜对骨缺损的修复具有重要作用, 去除骨膜, 使模型更加符合临床情况。

**3.4 移植复合物的细胞浓度** 脂肪干细胞种植于载体上必须保持有效的浓度才能确保新骨的形成。有研究表明体外培养的骨髓间充质干细胞移植修复人工骨缺损时, 不宜选择 $10^7 L^{-1}$ 以下的密度级别, 应该尽可能提高移植细胞的密度<sup>[18]</sup>。李明等<sup>[23]</sup>用骨髓间充质干细胞的浓度为 $5 \times 10^8 L^{-1}$ , 成功修复兔桡骨骨缺损。本组实验细胞浓度为 $3 \times 10^8 L^{-1}$ 。细胞浓度能够满足体内细胞成骨的需要。

**3.5 骨缺损修复的评价** 研究从组织学及影像学两方面评价骨缺损修复情况。Lane-Sandhu评分方法可操作性强。研究结果显示植入明胶海绵-脂肪干细胞复合体的实验侧修复情况优于对照侧。

综上所述, 实验表明来源于新西兰大白兔的脂肪干细胞能够经体外分离培养并扩增后与明胶海绵载体在体外复合培养, 植入骨缺损区后具有较明显的体内诱导成骨作用, 能够加速骨缺损的修复, 可以作为骨组织工程治疗骨缺损的一种较好的方法。

**基金资助:** 徐州市科技局课题(XN09B095)。

**作者贡献:** 刘刚、汪明星进行实验设计, 实验实施为刘刚, 胡兆丽, 实验评估为闫长明、魏学杰、王云清, 资料收集为胡兆丽, 刘刚成文, 汪明星审校, 刘刚对文章负责。

**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:** 实验过程中对动物处置经徐州医学院实验动物伦理委员会批准。

**学术术语:** 骨形态发生蛋白-从脊椎动物骨骼基质中分离提纯的蛋白质。具有内肽酶(含锌离子)活性、表皮生长因子模体,同源二聚体之间以二硫键相连,属于转化生长因子 $\beta$ 家族,能诱导骨与软骨形成。

**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] Seong JM, Kim BC, Park JH, et al. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010;5(6):062001.
- [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] Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell.* 2010;42(4):211-216.
- [5] Lin CS, Xin ZC, Deng CH, et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):807-815.
- [6] Safford KM, Safford SD, Gimble JM, et al. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Experimental Neurology.* 2004;187(2):319-328.
- [7] Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004;109(5):656-663.
- [8] Yoon E, Dhar S, Chun DE, et al. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *tissue Engineering.* 2007;13(3): 619-627.
- [9] Ho JH, Ma WH, Tseng TC, et al. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(1-2):255-266.
- [10] Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, et al. Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2003;50(6): 610-617.
- [11] Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, et al. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch.* 2004; 71(4):240-241.
- [12] Mehlhorn AT, Zwingmann J, Finkenzeller G, et al. Chondrogenesis of adipose-derived adult stem cells in a poly-lactide-co-glycolide scaffold. *Tissue Engineering.* 2009; 15(5):1159-1167.
- [13] Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(5):740-747.
- [14] Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg.* 2006;56(5):543-548.
- [15] 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.
- [16] Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg.* 2005;115(6):1665-1673.
- [17] Chen Q, Yang Z, Sun S, et al. Adipose-derived stem cells modified genetically in vivo promote reconstruction of bone defects. *Cytotherapy.* 2010;12(6):831-840.
- [18] 康强军,刘长安,王江泳,等.不同密度骨髓间充质干细胞移植对家兔股骨头缺血性坏死的治疗作用[J].解剖科学进展,2010,16(1): 54-57.
- [19] 陈光忠,朱建民,金忠达.兔桡骨缺损实验模型的标准化研究[J].解剖学杂志,1992,15(3):166-168.
- [20] 孙梁,熊卓.快速成型聚乳酸-聚羟乙酸/磷酸三钙支架修复兔桡骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(12): 2091-2094.
- [21] 魏冀荣,章莹.骨移植支架材料的理论与临床应用[J].中国组织工程研究,2012,16(47):8880-8884.
- [22] 周芳,李静,余磊,等.兔桡骨临界骨缺损模型的制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(50):9385-9388.
- [23] 李明,曹豫江,张德文,等.骨髓间充质干细胞及其复合物修复兔桡骨缺损的实验研究[J].中国矫形外科杂志,2006,14(24):1896-1900.