

## 低氧对脂肪干细胞和关节软骨细胞三维共培养成软骨能力的影响

戴兵, 徐海艇, 金海东, 陈辉, 蔡建武, 范时洋, 潘骏(温州医科大学附属第二医院骨科, 浙江省温州市 325027)

### 文章亮点:

实验的特点在于利用低氧(体积分数为5%)促进脂肪干细胞向软骨细胞分化; 以及共培养仅需少量软骨细胞就可以产生和单纯软骨细胞相似的效果, 既减少来源有限的软骨细胞的用量, 又能诱导脂肪干细胞向成软骨分化, 优化干细胞向软骨细胞的分化条件, 为干细胞移植修复关节损伤提供更准确的理论依据。

### 关键词:

组织构建; 软骨细胞; 低氧; 脂肪干细胞; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 共培养; 组织工程; 免疫组织化学; 浙江省自然科学基金

### 主题词:

干细胞; 脂肪组织; 软骨细胞; 组织支架; 共同培养技术; 细胞低氧

### 基金资助:

浙江省自然科学基金资助项目(Y2100899); 浙江省科技厅基金资助项目(2009C33131); 温州市科技局基金资助项目(H20080057); 温州市科技局基金资助项目(Y20100026)

### 摘要

**背景:** 多项体内外研究表明低氧和共培养均促进干细胞向软骨细胞方向分化。

**目的:** 观察低氧对脂肪干细胞和关节软骨细胞三维共培养成软骨能力的影响。

**方法:** 脂肪干细胞和关节软骨细胞二者按3:1比例混合, 以 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 接种于聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶支架上, 分别在常氧(体积分数为20%  $\text{O}_2$ )、低氧(体积分数为5%  $\text{O}_2$ )环境下培养6周。苏木精-伊红染色进行组织学分析, 阿尔新蓝染色鉴定糖胺多糖的合成, 免疫组化鉴定II型胶原的表达, 并测定各组支架-细胞复合物的DNA、糖胺聚糖、羟脯氨酸含量。

**结果与结论:** 低氧组苏木精-伊红染色显示大量细胞及细胞外基质生成, 阿尔新蓝染色显示有大量糖胺多糖生成, 免疫组化显示II型胶原表达强阳性, 且DNA、糖胺聚糖、羟脯氨酸等各项指标均高于常氧组。表明低氧促进脂肪干细胞和关节软骨细胞共培养成软骨分化。

戴兵, 徐海艇, 金海东, 陈辉, 蔡建武, 范时洋, 潘骏. 低氧对脂肪干细胞和关节软骨细胞三维共培养成软骨能力的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(29):4630-4635.

## Hypoxia effects on the chondrogenic differentiation of three-dimensional co-cultured adipose-derived stem cells and articular chondrocytes

Dai Bing, Xu Hai-ting, Jin Hai-dong, Chen Hui, Cai Jian-wu, Fan Shi-yang, Pan Jun (Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Many *in vivo* and *in vitro* experiments indicate that hypoxic co-cultures promote stem cells differentiate into chondrocytes.

**OBJECTIVE:** To evaluate the influence of hypoxia on the chondrogenic differentiation of three-dimensional co-cultured adipose-derived stem cells and articular chondrocytes.

**METHODS:** Adipose-derived stem cells and articular chondrocytes were mixed at the ratio of 3:1, then the mixed cells were seeded onto poly(lactic-co-glycolic acid)-gelatin scaffold at the ultimate concentration of  $5.0 \times 10^{10}/\text{L}$ . The cells were cultured in normoxia (20%  $\text{O}_2$ ) and hypoxic (5%  $\text{O}_2$ ) conditions for 6 weeks. After culture, hematoxylin and eosin staining was performed for histological structure analysis, and alcian blue staining was used to evaluate glycosaminoglycan synthesis. Type II collagen expression was detected by immunohistochemistry staining. The content of DNA, glycosaminoglycan and hydroxyproline in the scaffold-cell complex was measured.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the hypoxia group, hematoxylin-eosin staining showed the formation of massive cells and extracellular matrix; alcian blue staining showed massive glycosaminoglycan formation; immunohistochemistry staining detected strongly positive expression of collagen type II, the content of DNA, glycosaminoglycan and hydroxyproline was higher than the normoxia group. Hypoxia promotes *in vitro* chondrogenic differentiation of co-cultured adipose-derived stem cells and articular chondrocytes.

**Subject headings:** stem cells; adipose tissue; chondrocytes; tissue scaffolds; co-culture techniques; cell hypoxia

**Funding:** the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. Y2100899; the Project of Science and

戴兵, 1987年生, 浙江省温州市人, 汉族, 温州医科大学在读硕士, 主要从事创伤外科专业研究。

通讯作者: 潘骏, 教授, 硕士生导师, 温州医科大学附属第二医院骨科, 浙江省温州市 325027

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.29.007  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:2095-4344  
(2014)29-04630-06  
稿件接受: 2014-04-15

Dai Bing, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Pan Jun, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Accepted: 2014-04-15

Technology Department of Zhejiang Province, No. 2009C33131; the Project of Wenzhou Municipal Science and Technology Bureau, No. H20080057; the Project of Wenzhou Municipal Science and Technology Bureau, No. Y20100026

Dai B, Xu HT, Jin HD, Chen H, Cai JW, Fan SY, Pan J. Hypoxia effects on the chondrogenic differentiation of three-dimensional co-cultured adipose-derived stem cells and articular chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(29):4630-4635.

## 0 引言 Introduction

关节软骨的损伤和缺损一直是骨外科临床治疗的难题, 随着人口的老齡化以及肥胖者越来越多, 这一大难题在未来将会越来越显著<sup>[1]</sup>。目前临床上的治疗方法主要产生纤维软骨而非透明关节软骨, 增加了治疗失败的风险。组织工程领域研究的进展为软骨缺损的修复提供了新的治疗策略<sup>[2]</sup>。最常见的软骨组织工程细胞来源是间充质干细胞和关节软骨细胞。自体关节软骨细胞在临床上的运用已取得可喜的成就<sup>[3]</sup>。但是关节软骨细胞来源有限, 需要在体外扩增, 在培养过程中易去分化并失去成软骨能力, 在植入组织后不能重新构建成稳定的透明状软骨<sup>[4]</sup>, 使其无法作为良好的种子细胞。

目前间充质干细胞和关节软骨细胞共培养体系作为软骨组织工程细胞种子以及模拟关节低氧环境促进干细胞向软骨细胞分化受到越来越多学者的关注。Wang等<sup>[5]</sup>将骨髓间充质干细胞分别置于体积分数为5%和20%的氧浓度下向成软骨诱导, 结果表明低氧条件下细胞能分泌大量软骨相关的基质分子, 包括II型胶原和硫酸软骨素。Levorson等<sup>[6]</sup>发现将骨髓间充质干细胞和关节软骨细胞在三维支架上共培养, 软骨细胞外基质分泌明显增加, 有利于骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。Dahlin等<sup>[7]</sup>研究证实将骨髓间充质干细胞和关节软骨细胞混合后种植于可降解支架上, 相比单独骨髓间充质干细胞, 明显减少转化生长因子 $\beta$ 3的用量和作用时间。Portron等<sup>[8]</sup>研究发现低氧条件下, 可以促进脂肪间充质干细胞向软骨细胞分化。脂肪干细胞获取十分简便, 可从抽脂术或脂肪切除术获取的脂肪组织中大量获得, 对机体创伤小、移植后无免疫排斥反应<sup>[9-11]</sup>。脂肪干细胞具有很强的体外增殖能力并具有向软骨细胞分化的潜能<sup>[12]</sup>。那么将低氧和关节软骨细胞同时作用与脂肪干细胞, 二者如果能协同促进脂肪干细胞向关节软骨细胞分化, 既可以减少诱导因子的使用、降低费用, 又可以减少关节软骨细胞的使用量。本实验通过观察低氧对脂肪干细胞和关节软骨细胞体外三维共培养成软骨分化的影响, 明确低氧、关节软骨细胞共培养是否有助于脂肪干细胞三维培养向软骨方向分化, 以便为修复关节软骨损伤提供可能的新方法。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 对比观察实验。

**时间及地点:** 实验于2013年6月至2014年1月在温州医科大学附属第二医院骨科实验室、科研中心完成。

**材料:**

**实验动物:** 4周龄SD大鼠8只, 雌雄不限, 由温州医科大学动物实验室提供; 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》<sup>[13]</sup>。

低氧促进脂肪干细胞和关节软骨细胞三维共培养成软骨能力实验试剂和仪器:	
试剂及仪器	来源
SD 大鼠脂肪干细胞、成软骨细胞诱导液	广州 Cyagen 公司
DMEM 培养基、II型胶原酶	Gibco 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
抗生素-抗真菌剂溶液	Life Technologies 公司
兔抗大鼠II型胶原多克隆抗体	Abcam 公司
HRP 标记山羊抗兔二抗、DAB 显色剂	北京中杉金桥生物技术有限公司
蛋白酶 K、Quant-iT PicoGreen dsDNA 试剂盒	Invitrogen 公司
DMMB、小牛胸腺标准 DNA 样品、硫酸软骨素	美国 Sigma-Aldrich 公司
Hoechst 33258	碧云天生物技术研究所
3111 型二氧化碳培养箱	Thermo 公司
CKX41 倒置荧光显微镜	奥林巴斯公司
DM2500 生物显微镜	Leica 公司
酶标仪	Thermo 公司

**实验方法:**

**脂肪干细胞复苏:** 解冻细胞, 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 加入含体积分数为10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基, 37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>的饱和湿度培养。每三四天更换培养基, 待细胞铺满瓶底80%以上, 0.05%胰蛋白酶处理, 传代培养, 传至第3代, 冻存备用。

**关节软骨细胞的分离培养:** 无菌操作下取SD大鼠股骨及胫骨, 刮取关节软骨, PBS冲洗3次, 剪碎后置于15 mL离心管, 0.25%胰酶消化30 min, 除去胰酶, 加入0.1%II型胶原酶, 37 °C水浴振荡消化6 h, 将收集的细胞悬液经200目金属滤网过滤后移入离心管, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 无血清培养基洗涤2次, 弃上清, 加入含体积分数为10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基吹打混匀后移入25 cm<sup>2</sup>培养瓶内, 每3 d换液1次, 细胞长至80%融合后, 0.05%胰蛋白酶处理, 传代培养, 传至第2代, 冻存备用。

**聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶支架的制备:** 将聚乳酸-

羟基乙酸共聚物无纺纤维加压强成1 cm×1 cm×0.1 cm大小, 环氧乙烷灭菌处理后滴加1%无菌明胶, 置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中1 h, PBS洗涤3次, DMEM培养基洗涤2次。

**细胞与聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶支架的复合及分组:** 将脂肪干细胞与关节软骨细胞按3:1比例混匀, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。将细胞接种于聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶支架上, 以细胞不溢出材料为宜。置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中4 h后, 分为常氧组(体积分数为20%O<sub>2</sub>)、低氧组(体积分数为5%O<sub>2</sub>), 分别置于常氧培养箱和低氧培养箱中每3 d换液1次。体外培养6周后取出做相应检测。

**组织学分析:** ①收集各组支架-细胞复合体, 40 g/L多聚甲醛固定、水洗、脱水、石蜡包埋, 制成5 μm厚度的切片, 行常规苏木精-伊红染色, 观察细胞及细胞外基质含量。②应用阿尔新蓝染色(按照Cyagen说明书操作), 观察糖胺多糖的合成及分泌情况。③免疫组织化学染色, 40 g/L的多聚甲醛固定0.5 h, PBS洗3遍; 加0.5% Triton X-100室温下30 min; 体积分数为3%过氧化氢室温孵育15 min; PBS洗3遍; 滴加山羊血清37 °C孵育30 min; 滴加II型胶原一抗(1:200稀释), 4 °C过夜; PBS洗3遍, 滴加二抗37 °C孵育30 min; PBS洗3遍, 滴加DAB显色1 min; PBS洗3遍, 苏木精复染, 流水冲洗30 min, 封固, 观察。

**DNA含量测定:** 参照Xue等<sup>[14]</sup>的方法。收集各组支架-细胞复合体, 剪碎, 加蛋白酶K, 37 °C, 过夜。取500 μL裂解液加到500 μL Hoechst 33258溶液中, 荧光分光光度计测450 nm处荧光强度, 样品中的DNA含量通过参照的标准曲线测定, 标准DNA为小牛胸腺DNA。

**糖胺聚糖含量测定:** 参照Isabelle等<sup>[15]</sup>的方法。收集各组支架-细胞复合体, 冷冻干燥机干燥, 加入500 μL木瓜蛋白酶溶液(pH=7.5), 56 °C水浴消化过夜, DMMB法测定糖胺聚糖含量(波长525 nm, 标准品为硫酸软骨素)。

**羟脯氨酸含量测定:** 收集各组支架-细胞复合体, 浸泡在体积分数为10%甲醛中固定过夜, 丙酮浸泡8 h, 更换新鲜丙酮过夜, 再更换乙醇: 乙醚(1:1)过夜。60 °C干燥后, 取6 mg样品磨碎, 加入0.3 mL纯水、0.3 mL浓盐酸离心混匀后高温高压2 h, NaOH调节pH至6, 纯水稀释至5倍, 加入氯胺-T和p-二甲氨基苯, 酶标仪测定570 nm处吸光度值。根据羟脯氨酸标准品制出的标准曲线, 得出样品浓度, 进而得出样品羟脯氨酸含量。

**主要观察指标:** ①大体观察细胞形态以及细胞与支架复合情况。②阿尔新蓝染色观察糖胺聚糖的分泌情况。③免疫组织化学染色观察II型胶原的表达。④支架上细胞分泌DNA、糖胺聚糖、羟脯氨酸含量。

**统计学分析:** 采用SPSS 18.0分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 细胞形态观察** 脂肪干细胞呈纺锤形或梭形, 漩涡样生长, 接种7-10 d可达80%以上融合(图1A); 关节软骨细胞呈多角形, 5 d左右可达80%以上融合(图1B)。

**2.2 细胞与聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶复合材料体外培养观察** 细胞接种至支架72 h后, 倒置显微镜观察发现支架局部有细胞分泌细胞外基质包埋纤维(图1C)。

**2.3 组织学分析** 苏木精-伊红染色发现低氧组细胞密度大, 分布紧密, 软骨细胞外有大量基质生成, 融合成片, 而常氧组细胞密度较小, 分布相对疏松, 软骨细胞外基质生成较少(图2A, B)。

阿尔新蓝染色发现低氧组有大片蓝色, 颜色较深, 质地较密, 分布均匀, 而常氧组着色较浅, 分布不均匀(图2C, D)。

II型胶原免疫组化显示常氧组和低氧组细胞均合成软骨特异性胶原成分II型胶原, 染色呈棕黄色, 其中低氧组II型胶原免疫组化着色更深(图2E, F)。

**2.4 DNA含量** 低氧组支架上细胞的DNA含量为 $(24.7 \pm 1.1) \mu\text{g}$ , 而常氧组支架上细胞DNA含量为 $(18.9 \pm 0.8) \mu\text{g}$ , 低氧组DNA含量较常氧组高, 且差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 说明低氧促进脂肪干细胞和关节软骨细胞增殖(图3A)。

**2.5 糖胺聚糖含量测定** 低氧组支架上细胞分泌的糖胺聚糖含量为 $(953.2 \pm 31.1) \mu\text{g}$ , 而常氧组分泌的糖胺聚糖含量为 $(870.6 \pm 27.9) \mu\text{g}$ , 低氧条件下细胞合成糖胺聚糖的量明显多于常氧条件, 且差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图3B)。

**2.6 羟脯氨酸含量测定** 低氧组细胞羟脯氨酸含量为 $(35.3 \pm 1.2) \mu\text{g}$ , 常氧组细胞羟脯氨酸含量为 $(31.8 \pm 1.4) \mu\text{g}$ , 低氧组羟脯氨酸含量较常氧组高, 且差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图3C)。

## 3 讨论 Discussion

应用组织工程技术修复软骨缺损过程中, 安全高效的种子细胞源是应用这一技术的前提和关键。脂肪干细胞在体外稳定扩增且衰亡率低, 而且在人体分布分为广, 获取比较简便, 对机体创伤小, 适合自体移植, 逐渐成为新的研究热点。

研究表明体内关节软骨细胞的微环境在干细胞的诱导分化中发挥重要的作用, 包括细胞分泌的生长因子, 低氧环境等。软骨细胞可以分泌多种生长因子如转化生长因子 $\beta$ 和胰岛素样生长因子1等, 可以协同诱导脂肪干细胞向软骨细胞定向分化。有学者发现, 软骨细胞条件培养液可以增加间充质干细胞中软骨细胞外基质如II型胶原的表达<sup>[16]</sup>, 这说明关节软骨细胞可能通过分泌某些形态发生因子诱导间充质干细胞向软骨细胞分化。尹航等<sup>[17]</sup>使用转化生长因子 $\beta$ 1+维生素C条件培养液诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化, 结果显示与原代细胞浆内糖胺多糖阳性率比较,

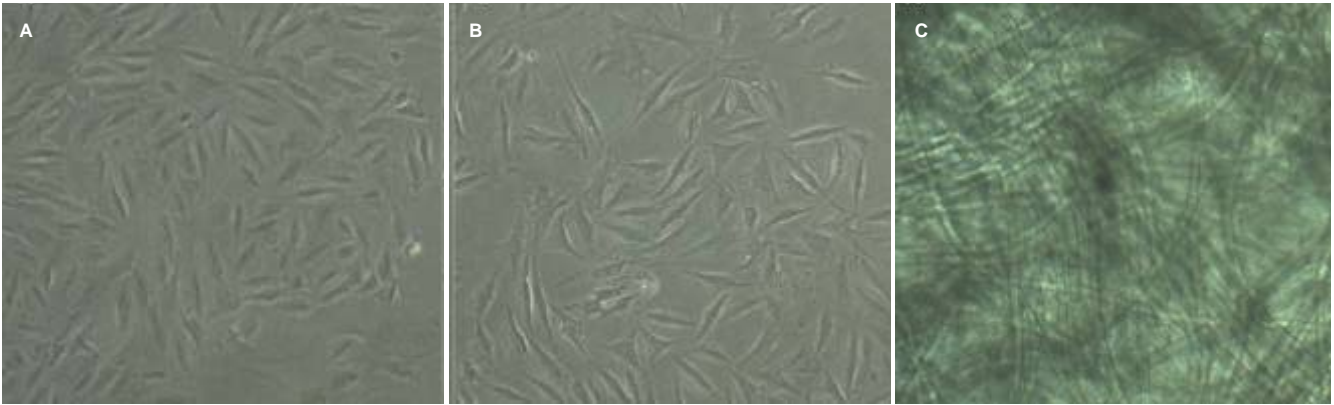


图1 倒置显微镜观察脂肪干细胞、关节软骨细胞形态以及细胞在复合支架材料上的黏附情况( $\times 100$ )

Figure 1 Morphology of adipose-derived stem cells and articular chondrocytes under phase contrast microscope and their adhesion in the composite ( $\times 100$ )

图注: 图中 A 为第 3 代脂肪干细胞呈长梭形, 漩涡样生长; B 为第 2 代关节软骨细胞呈多角形; C 为细胞与聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶复合材料体外培养 72 h, 可见支架局部有细胞分泌细胞外基质包埋纤维。

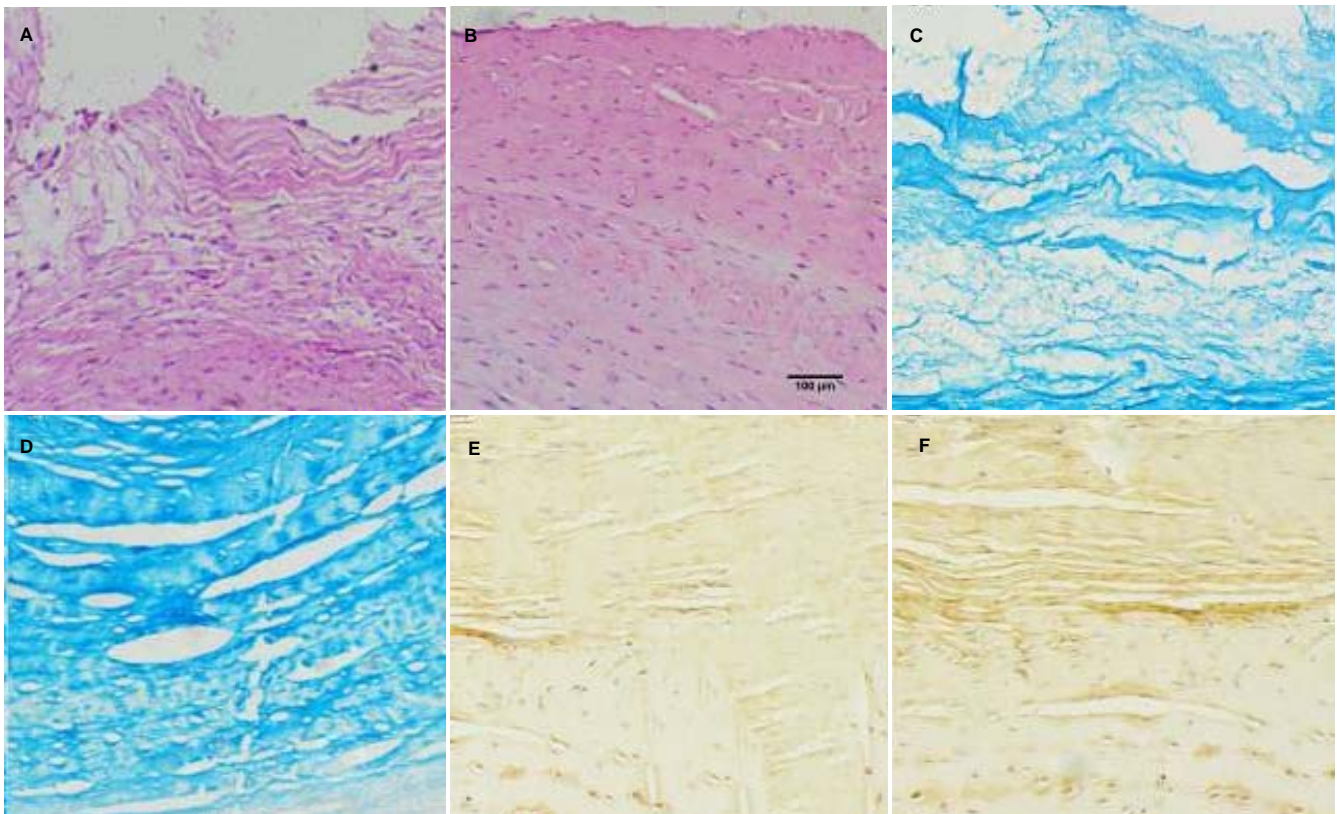


图2 细胞-聚乳酸-羟基乙酸共聚物/明胶复合培养 6 周组织学分析

Figure 2 Histological analysis of the cell-poly(lactide-co-glycolide)/gelatin composite cultured for 6 weeks

图注: 图中 A 为常氧组细胞密度较小, 分布相对疏松, 软骨细胞外基质生成较少(苏木精-伊红染色,  $\times 100$ ); B 为低氧组细胞密度大, 分布紧密, 软骨细胞外有大量基质生成(苏木精-伊红染色,  $\times 100$ ); C 为常氧组着色较浅, 分布不均匀(阿尔新蓝染色,  $\times 100$ ); D 为低氧组可见大片蓝色, 颜色较深, 质地较密, 分布均匀(阿尔新蓝染色,  $\times 100$ ); E 为常氧组染色呈棕黄色(II 型胶原免疫组化染色,  $\times 100$ ); F 为低氧组着色更深(II 型胶原免疫组化染色,  $\times 100$ )。

使用条件培养液的第 3 代细胞糖胺多糖阳性率有所降低, 但差异无显著性意义, 第 6 代细胞则显著降低, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。使用条件培养液的第 3, 6 代细胞 II 型胶原均呈阳性表达, 可见棕黄色的颗粒分布于细胞浆内, 而使用标准培养液的传代细胞均为阴性, 表明人骨髓间充质干细胞在转化生长因子  $\beta 1$  及维生素 C 条件培养基的作用下, 糖胺多糖和 II 型胶原表达阳性, 表现出软骨细胞的生物学

特性。联合培养间充质干细胞和软骨细胞可以增加软骨分化的潜能和抑制间充质干细胞肥大<sup>[18-19]</sup>。在这种共培养体系中, 间充质干细胞可以诱导软骨细胞增殖及分泌软骨基质<sup>[20]</sup>, 而软骨细胞可以抑制间充质干细胞肥大<sup>[21]</sup>。吕晶等<sup>[22]</sup>分离培养大鼠骨髓间充质干细胞和耳软骨细胞, 采用骨髓间充质干细胞与软骨细胞共培养及条件培养液诱导成软骨的方法, 诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。

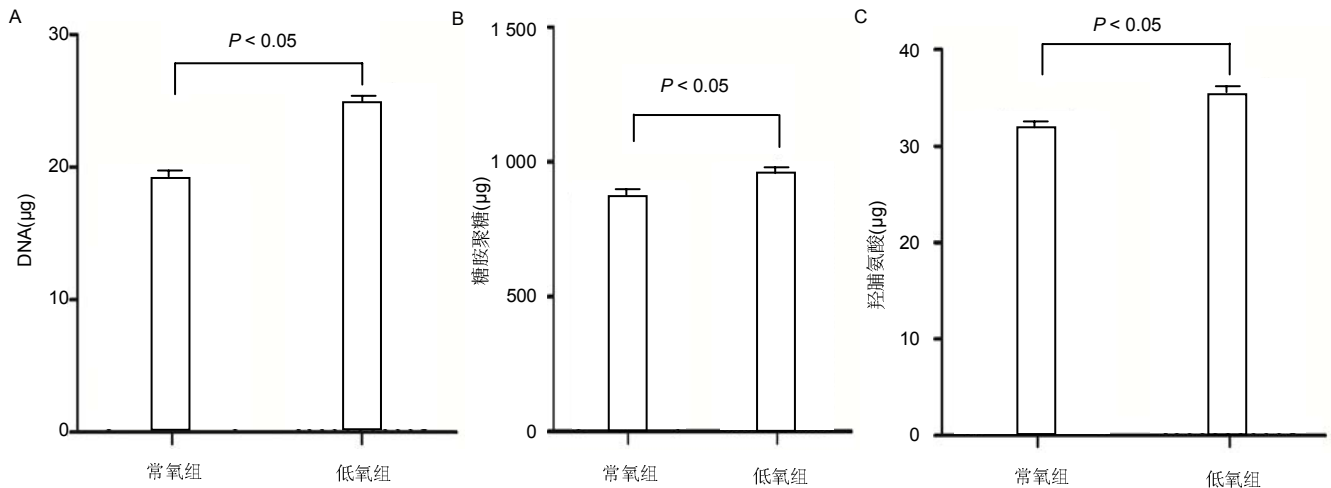


图3 培养6周时支架上细胞的DNA、糖胺聚糖和羟脯氨酸的含量

Figure 3 DNA, glycosaminoglycan and hydroxyproline content in the cells cultured on the scaffold for 6 weeks

图注: 图中A为培养6周时支架上细胞的DNA含量; B为培养6周时支架上细胞分泌的糖胺聚糖含量; C为培养6周时支架上细胞分泌羟脯氨酸的含量。

结果显示采用共培养方式诱导的软骨细胞, 其生物学特性与采用条件培养液诱导的软骨细胞相比, 前者优于后者, 如分泌糖胺多糖的能力以及基质分泌量均较高, 表明共培养方式诱导的软骨细胞更接近正常软骨细胞, 更有利于作为组织工程软骨的种子细胞。

有文献指出, 软骨细胞培养常用的最佳氧含量介于1%至5%之间<sup>[23-24]</sup>。低氧分压是模仿关节软组织的生理条件, 引起低氧诱导因子稳定表达<sup>[25]</sup>, 随后软骨的相关基因表达增加<sup>[26-27]</sup>。Müller等<sup>[28]</sup>证实低氧条件有利于间充质干细胞扩增及软骨分化。Kanichai等<sup>[29]</sup>研究结果显示大鼠间充质干细胞在成软骨诱导液的作用下, 低氧组II型胶原蛋白和蛋白多聚糖的表达较常氧组有明显增加。

三维立体培养在干细胞成软骨分化过程中起着重要作用。Mandl等<sup>[30]</sup>将去分化软骨细胞重新进行三维培养, 去分化的软骨细胞能够重新分化成软骨细胞, 并且表达大量II型胶原。

在这里, 作者假设低氧条件下脂肪干细胞-关节软骨细胞三维共培养相比常氧, 增加了软骨细胞形成能力。为了验证这一假设, 进行了脂肪干细胞和关节软骨细胞3:1的混合物在常氧(体积分数为20%O<sub>2</sub>)和低氧(体积分数为5%O<sub>2</sub>)条件下三维培养进行对比。实验结果显示, 低氧条件下, 明显促进细胞增殖, 糖胺聚糖、羟脯氨酸、II型胶原较常氧组有显著的增加, 这说明假设是成立的。

共培养仅需少量软骨细胞就可以产生和单纯软骨细胞相似的效果, 共培养时适当的细胞比例既能减少取材不便的关节软骨细胞的用量, 又能诱导脂肪干细胞向成软骨分化, 本实验采用3:1的比例(脂肪干细胞:关节软骨细胞)进行初步研究, 结果证实能够诱导脂肪干细胞成软骨分化。具体何种比例需要软骨细胞最少且成软骨效果最佳有待进一步研究。另外本研究初步证实了低氧(5%)可以促进脂肪

干细胞向软骨细胞分化, 下一步研究将比较不同氧浓度条件下脂肪干细胞的分化效果, 优化干细胞向软骨细胞的分化条件, 为干细胞移植修复关节损伤提供更准确的理论依据。

**致谢:** 感谢温州医科大学动物实验中心、温州医科大学附属第二医院骨科实验室及科研中心提供的技术支持。

**作者贡献:** 实验实施为戴兵、徐海艇、金海东、陈辉、蔡健武、范时洋。戴兵成文, 潘骏负责课题设计, 组织实施和文章的审核。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 羟脯氨酸(HYP)-胶原蛋白所特有的氨基酸, 占其氨基酸总量的13%, 测定羟脯氨酸含量可明确胶原总体水平。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000;133(8):635-646.
- [2] Edgington SM. A new force in biotech: tissue engineering. Understanding how mechanical force combines with cytokines and other growth factors may help shape future biotech drugs. *Biotechnology (N Y).* 1994;12(4):361-364.
- [3] Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, et al. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:109-115.
- [4] Mandelbaum B, Browne JE, Fu F, et al. Treatment outcomes of autologous chondrocyte implantation for full-thickness articular cartilage defects of the trochlea. *Am J Sports Med.* 2007;35(6):915-921.

- [5] Wang DW, Fermor B, Gimble JM, et al. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2005;204(1):184-191.
- [6] Levorson EJ, Santoro M, Kasper FK, et al. Direct and indirect co-culture of chondrocytes and mesenchymal stem cells for the generation of polymer/extracellular matrix hybrid constructs. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1824-1835.
- [7] Dahlin RL, Ni M, Meretoja VV, et al. TGF- $\beta$ 3-induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds. *Biomaterials.* 2014;35(1):123-132.
- [8] Portron S, Merceron C, Gauthier O, et al. Effects of in vitro low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their in vivo chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair. *PLoS One.* 2013;8(4):e62368.
- [9] Wu SC, Chen CH, Chang JK, et al. Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114(11):1610-1618.
- [10] Oni G, Lequeux C, Cho MJ, et al. Transdermal delivery of adipocyte-derived stem cells using a fractional ablative laser. *Aesthet Surg J.* 2013;33(1):109-116.
- [11] Araña M, Peña E, Abizanda G, et al. Preparation and characterization of collagen-based ADSC-carrier sheets for cardiovascular application. *Acta Biomater.* 2013;9(4):6075-6083.
- [12] An C, Cheng Y, Yuan Q, et al. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(4):1647-1654.
- [13] 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.
- [14] Xue D, Zheng Q, Zong C, et al. Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(1):259-270.
- [15] Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, et al. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology.* 2003;13(9):647-653.
- [16] Hwang NS, Varghese S, Puleo C, et al. Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):281-284.
- [17] 尹航, 张亚, 王晓东, 等. 条件培养基诱导人骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞的连续进行性特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(11):2170-2172, 2181.
- [18] Aung A, Gupta G, Majid G, et al. Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):148-158.
- [19] Bian L, Zhai DY, Mauck RL, et al. Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(7-8):1137-1145.
- [20] Wu L, Prins HJ, Helder MN, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(15-16):1542-1551.
- [21] Fischer J, Dickhut A, Rickert M, et al. Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2696-2706.
- [22] 吕晶, 柯杰, 王琳, 等. 与软骨细胞共培养和条件培养液诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3421-3426.
- [23] Egli RJ, Bastian JD, Ganz R, et al. Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 2008;26(7):977-985.
- [24] Foldager CB, Nielsen AB, Munir S, et al. Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes. *Acta Orthop.* 2011;82(2):234-240.
- [25] Wei W, Yu XD. Hypoxia-inducible factors: crosstalk between their protein stability and protein degradation. *Cancer Lett.* 2007;257(2):145-156.
- [26] Duval E, Baugé C, Andriamanalijaona R, et al. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33(26):6042-6051.
- [27] Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, et al. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(8):4778-4786.
- [28] Müller J, Benz K, Ahlers M, et al. Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in three-dimensional cultures. *Cell Transplant.* 2011;20(10):1589-1602.
- [29] Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, et al. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *J Cell Physiol.* 2008;216(3):708-715.
- [30] Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, et al. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng.* 2004;10(1-2):109-118.