脂肪血管基质成分复合骨软骨一体化支架的体外评价

https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3230
投稿日期：2020-08-17
送审日期：2020-08-21
采用日期：2020-10-09
在线日期：2020-12-03
中图分类号：
R459.9；R394.2；R684
文章编号：
2095-4344(2021)22-03487-06
文献标识码：A

陈 磊，郑 蕊，杰永生，綦 惠，孙 磊，舒 雄

文章快速阅读：

文章特点—

△基于骨软骨天然分层组织结构，采用天然真皮基质、胶原和磷酸三钙等设计开发多层骨软骨一体化组织工程支架，充分模拟骨软骨天然结构功能特性；

△脂肪血管基质成分能够作为软骨组织工程理想的种子细胞，在骨软骨一体化支架提供的微环境中具有向软骨分化发育的能力。

不同处理的干细胞复合骨软骨一体化支架：

(1) 脂肪来源血管基质成分复合脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原一体化支架；

(2) 含转化生长因子 β3 的脂肪间充质干细胞复合脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原一体化支架；

(3) 含体积分数 10% 胎牛血清的脂肪间充质干细胞复合脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原一体化支架。

细胞增殖
Sox9
糖胺聚糖
Ⅱ型胶原

文题释义：

脂肪来源的血管基质成分：指脂肪组织去除成熟脂肪细胞后所获得的具有干细胞特性的基质细胞，是一组混合细胞群体。基质血管组分包括脂肪前体细胞、间充质干细胞、造血干(祖)细胞、内皮祖细胞、淋巴细胞(包括调节性T细胞)和巨噬细胞等。

骨软骨一体化支架：基于骨软骨界面处的天然分层组织结构、矿物质分布、结构-功能关系，采用真皮细胞外基质和磷酸三钙颗粒开发新型含有稳定界面的双相层状支架，充分模拟骨软骨界面组织的特性。

摘要

背景：大量的动物和临床实验已证实，脂肪来源的血管基质成分局部移植可促进关节软骨修复。

目的：探讨脱细胞真皮基质/生物矿化胶原一体化骨软骨支架复合脂肪来源血管基质成分构建组织工程软骨的可行性。

方法：无菌条件下取出雌兔双侧腹股沟脂肪垫，利用酶消法获得血管基质组分，采用流式细胞仪检测其表面特异性蛋白，观察其成脂、成骨与成软骨分化能力。将脂肪来源血管基质成分(实验组)、含转化生长因子β3的脂肪间充质干细胞(软骨诱导组)、含体积分数10%胎牛血清的脂肪间充质干细胞(对照组)分别接种于脱细胞真皮基质/生物矿化胶原一体化支架上共培养，CCK8法检测细胞增殖，荧光显微镜下观察细胞数量，实时定量PCR检测软骨相关基因表达，二甲基亚甲基蓝比色法测定胞外基质中糖胺多糖含量。

结果与结论：①流式细胞仪检测结果显示，脂肪来源血管基质成分高表达CD44、CD105与CD90，低表达CD14、CD19与CD45，脂肪来源血管基质成分具有向脂肪细胞、成骨细胞与软骨细胞分化的能力；②CCK8检测显示，随着培养时间的延长，脱细胞真皮基质/生物矿化胶原一体化支架上的3种细胞数量增加，其中实验组细胞数量高于其他两组($P < 0.05$)；培养7 d荧光显微镜下观察可见，实验组中的细胞数量多于其他两组；③培养21 d的实时定量PCR检测显示，实验组中的Sox9、蛋白聚糖和Ⅱ型胶原mRNA表达量高于其他两组($P < 0.05$)；④培养7，14，21 d的二甲基亚甲基蓝比色检测显示，实验组中的糖胺多糖含量高于其他两组($P <0.05$)；⑤结果表明，脂肪来源血管基质成分复合脱细胞真皮基质/生物矿化胶原一体化支架可以在体外有效支持软骨形成。

关键词：骨；材料；脂肪来源血管基质成分；脱细胞真皮基质；生物矿化胶原；一体化支架；软骨缺损；骨软骨

In vitro evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction combined with osteochondral integrated scaffold

Chen Lei, Zheng Rui, Jie Yongsheng, Qi Hui, Sun Lei, Shu Xiong

Beijing Jishuitan Hospital, Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100035, China

Chen Lei, Technician-in-charge, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100035, China

Corresponding author: Shu Xiong, Assistant Researcher, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing 100035, China

Abstract

BACKGROUND: A large number of animal and clinical experiments have confirmed that local transplantation of adipose-derived stromal vascular fraction can

北京积水潭医院 / 北京市创伤骨科研究所，北京市　100035

第一作者：陈磊，男，1979 年生，北京市人，汉族，主管技师，主要从事组织修复材料方面的研究。

通讯作者：舒雄，助理研究员，北京积水潭医院 / 北京市创伤骨科研究所，北京市　100035

https://orcid.org/0000-0003-4195-0099 (陈磊)

基金资助：北京市属医学科研院所科技发展项目 (PXM2018_026275_000004)，项目参与者：陈磊；北京市属医学科研院所公益发展改革试点项目 (BMHC2018-4，BMHC2019-9)，项目参与者：陈磊

引用本文：陈磊，郑蕊，杰永生，綦惠，孙磊，舒雄 . 脂肪血管基质成分复合骨软骨一体化支架的体外评价 [J]. 中国组织工程研究，2021，25(22):3487-3492.

promote articular cartilage repair.
OBJECTIVE: To explore the feasibility of constructing tissue-engineered cartilage with acellular dermal matrix/biomineralized collagen integrated bone cartilage scaffold combined with autologous adipose-derived stromal vascular fraction.
METHODS: The groin fat pads of both sides of the female rabbit were taken out under sterile conditions, and the stromal vascular fraction was obtained by enzyme digestion. Flow cytometry was used to detect the surface specific protein and observe the ability of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation. Adipose-derived stromal vascular fraction (experimental group), adipose-derived mesenchymal stem cells containing transforming growth factor-β3 (cartilage induction group) and adipose-derived mesenchymal stem cells containing 10% fetal bovine serum (control group) were co-cultured on acellular dermal matrix/biomineralized collagen scaffold. CCK8 assay was used to detect cell proliferation. The number of cells was observed under fluorescence microscope. Real time-quantitative PCR detection was used to detect cartilage related gene expression. The content of glycosaminoglycan in extracellular matrix was determined by dimethylmethylene blue colorimetry.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) The results of flow cytometry showed that the adipose-derived stromal vascular fraction had high expression of CD44, CD105 and CD90, and low expression of CD14, CD19 and CD45. Adipose-derived stromal vascular fraction had the ability to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. (2) CCK8 assay showed that with the extension of culture time, the number of three kinds of cells on the acellular dermal matrix/biomineralized collagen scaffold increased, and the number of cells in the experimental group was higher than that in the other two groups ($P < 0.05$). Under the fluorescence microscope, the number of cells in the experimental group was more than that in the other two groups at 7 days after culture. (3) Real time-quantitative PCR results showed that at 21 days after culture, the mRNA expression levels of Sox9, proteoglycan and type II collagen in the experimental group were higher than those in the other two groups ($P < 0.05$). (4) Dimethylmethylene blue colorimetry results demonstrated that at 7, 14, and 21 days, the content of glycosaminoglycan in the experimental group was higher than that in the other two groups ($P < 0.05$). (5) The results showed that adipose-derived stromal vascular fraction combined with acellular dermal matrix / biomineralized collagen scaffold could effectively support cartilage formation *in vitro*.
Key words: bone; material; adipose derived stromal vascular fraction; acellular dermal matrix; biomineralized collagen; integrated scaffold; cartilage defect; osteochondral

Funding: *the Science and Technology Development Project of Beijing Municipal Medical Research Institute, No. PXM2018_026275_000004 (to CL); the Public Welfare Development and Reform Pilot Project of Beijing Municipal Medical Research Institutes, No. BMHC2018-4, BMHC2019-9 (to CL)*
How to cite this article: *CHEN L, ZHENG R, JIE YS, QI H, SUN L, SHU X. In vitro evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction combined with osteochondral integrated scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2021;25(22):3487-3492.*

0 引言 Introduction

由创伤、骨关节炎和骨软骨病等引起的软骨损伤和退化，最终可导致膝关节疼痛、畸形、活动障碍等异常表现，严重时甚至致残[1-2]。由于关节软骨缺乏血管、淋巴和神经营养及氧气依赖性扩散特性，其自我修复能力很差，目前临床上常用微骨折术、骨软骨移植、自体 / 异体软骨细胞移植等技术和方法治疗关节软骨缺损[3-6]，取得了不同程度的疗效。但还有很多问题需要解决，如修复组织是纤维软骨、承重区修复效果不明显且易于复发等；同时供区有限，大块软骨缺损难以应用，易造成疾病传播和免疫排斥反应等一系列问题，制约传统治疗方法对骨软骨缺损修复的进展。因此，探究新型和有效促进软骨再生修复的方法具有重要的临床意义。

近年来，组织工程和再生医学技术逐渐成为研究热点，为软骨修复的质量提升带来新的希望。脂肪来源血管基质成分是脂肪组织中成熟脂肪细胞以外的混合细胞群，包括脂肪来源干细胞、脂肪前体细胞、巨噬细胞、内皮细胞和周细胞等[7-10]。脂肪来源血管基质成分含量丰富、获取简便，大量的动物和临床实验证实了脂肪来源血管基质成分局部移植均可促进关节软骨修复[11-12]。此外，前期研究已成功构建脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原骨软骨一体化支架，具有良好生物相容性特征[13]。

实验拟采用脂肪来源血管基质成分复合脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原骨软骨一体化支架，观察其生物相容性和体外成软骨的作用，为下一步脂肪来源血管基质成分复合骨软骨一体化支架修复骨软骨损伤动物实验提供相应的研究基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 7 至 10 月在北京市创伤骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂与材料 Ⅰ型胶原酶、胰酶、Trizol 试剂、DMEM 高糖、低糖培养基和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司；10% 的 $CaCl_2$ 溶液、阿利辛蓝染料购自北京索莱宝生物科技有限公司；地塞米松和 ITS^+ 购自 Sigma 公司；cDNA Synthesis SuperMix 和 UltraSYBR Mixture 购自日本 Takara 公司；糖胺多糖定量检测试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司；新鲜牛跟腱、新鲜牛皮来源市售；1% 的胃蛋白酶、CCK8、氯化钠、磷酸三钙、无水乙酸、36.5% 的甲醛和 DAPI 染料购自美国 Sigma 公司。

1.3.2 主要仪器 CO_2 细胞培养箱 (SHELLAB 公司，美国)；SEM-6380LV 型扫描电镜购自日本电子；往复式真空泵 (上海益化真空设备有限公司)；倒置相差显微镜 (Olympus 公司，日本)；SHW200R 型匀浆机购自上海盛海威电气仪表有限公司；冷冻大容量离心机 (湘仪，中国)；荧光显微镜 (Leica，德国)；荧光定量 PCR 仪 (Bio-rad，美国)；Nanodrop ND-2000 分光光度计 (Thermo Fisher 公司，美国)。

1.3.3 实验动物 12 月龄健康雌新西兰兔 1 只，普通级，体质量 2.5 kg，购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司。

1.4 实验方法

1.4.1 骨软骨一体化支架的制备

生物矿化胶原悬液的制备：取牛跟腱 5 g 剪碎，置于 0.5 mol/L 乙酸溶液中，并加入 2.5 g 胃蛋白酶，匀浆机匀浆；4 000 r/min 离心 30 min，取上清，加入 20%NaCl 体积 500 mL；4 000 r/min 离心 15 min，弃上清；取沉淀约 100 mL，加入蒸馏水 400 mL、0.5 mol/L 乙酸 15 mL；置于透析袋中透析 4 d，每日换水；透析结束后加入 0.5 mol/L 乙酸 10 mL，4 ℃保存，制备胶原溶液。将胶原和 β– 磷酸三钙按质量比 3 ∶ 7 通过匀浆机高速混匀，制备生物矿化

胶原悬液。

脱细胞真皮基质的制备：①脱细胞处理：取新生小牛背部皮肤，脱毛、清洗，乙酸溶液浸泡溶胀 2 h，使皮肤表皮、真皮和皮下组织各层有相对明显的界线，电动取皮刀切取厚度为 1.0–2.0 mm 的真皮层；流水冲洗乙酸后，室温下用 0.5% SDS 溶液水平振荡脱细胞 2 h，更换新的 SDS 溶液，再继续作用 2 h；流水冲洗过夜；蒸馏水再次冲洗 20 次后冷冻干燥机中冻干；②结构重塑：将脱细胞真皮基质置于 0.5% 胰蛋白酶溶液中，室温超声振荡 2.5 h，冷冻干燥机中冻干；③交联：结构重塑后，用甲醛作为交联剂室温浸泡 2 h；PBS 冲洗 3 次，流水冲洗过夜，以去除残留的交联剂，再用蒸馏水清洗 20 次后冻干，冷冻干燥，^{60}Co 照射后备用。

骨软骨一体化支架的制备：将脱细胞真皮基质作为一体化支架上层。首先将冷冻干燥的脱细胞真皮基质放入聚丙烯圆筒形模具中 (内径 5 mm、高 5 mm)，将制备的生物矿化胶原悬液经脱气后缓慢注入模具中。为使接触界面紧密，使悬液固化成型，即在 −80 ℃冰箱内维持 2 h，冷冻样品最终在冷冻干燥机内真空条件下冷冻干燥 48 h，脱模后成功取出支架。另将制作好的支架用 20 kGy ^{60}Co γ 射线辐照灭菌，4 ℃下密封保存备用。

1.4.2 脂肪来源血管基质成分的分离与鉴定 无菌条件下获取兔双侧腹股沟脂肪组织，PBS 中清洗 3 次，彻底去除红细胞与组织碎片。加入预热的 0.1% Ⅰ型胶原酶溶液，置 37 ℃水浴震荡消化 1 h。300×*g* 离心 5 min，去除上层脂肪细胞与胶原酶溶液。加入适量含 10% 牛血清白蛋白的 DMEM 重悬细胞，经 400 μm 细胞筛过滤，获得血管基质成分细胞进行计数。将血管基质成分置于 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中，以含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 48 h 后换液，去除未贴壁细胞及残留的红细胞，当细胞集落达到 80% 汇合后用胰蛋白酶消化细胞，这些细胞被称为脂肪间充质干细胞的 P1。

将脂肪来源血管基质成分经培养后的原代细胞经 Trypsin 消化后调整细胞浓度为 10^9 L^{-1}，与 FITC 和 PE 标记的抗体冰上避光孵育 30 min，用含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 重悬细胞，流式细胞术分析其表面特异性抗原的表达情况。

使用脂肪来源血管基质成分经培养后的原代细胞进行诱导分化，分别添加成脂诱导培养基 (10^{-6} mol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素和 0.5 mmol/L 3− 异丁基 −1− 甲基黄嘌呤)、成骨 (0.1 μmol/L 地塞米松、10 mmol/L β− 甘油磷酸钠和 50 μmol/L 抗坏血酸磷酸盐) 和成软骨 (6.25 mg/L 胰岛素、10 μg/L 转化生长因子 β 和 50 μg/L 抗坏血酸) 诱导培养基，观察其形态变化，并对诱导分化后的细胞分别进行油红 O 染色、茜素红染色与阿利新蓝染色。

1.4.3 脂肪来源血管基质成分与骨软骨一体化支架共培养 使用前期研究中含转化生长因子 β3 的 P3 代脂肪间充质干细胞作为软骨诱导组和含体积分数 10% 胎牛血清的 P3 代脂肪间充质干细胞作为对照组 [14]。脂肪来源血管基质成分 (实验组)、含转化生长因子 β3 的脂肪间充质干细胞和含体积分数 10% 胎牛血清的脂肪间充质干细胞分别接种于含骨软骨一体化支架的 96 孔板内，即在骨软骨一体化支架表面缓慢滴加 0.2 mL 细胞悬浮液，至完全覆盖支架，每个支架接种 2×10^5 个细胞，放在 37 ℃、体积分数 5%CO_2 培养箱中培养。

1.4.4 复合培养后的细胞增殖检测 复合培养 1，3，5，7，9，11 d 后，每孔加入 CCK8 孵育 4 h，测定 450 nm 处的吸光度值。复合培养 7 d 后，取出 3 组复合物，置于甲醇和丙酮等体积混合固定液中室温固定 10 min，PBS 洗 2 次，用刀片将膜割下，采用含 1 mg/L DAPI、50% 甘油的 PBS 染色，荧光显微镜下拍照。

1.4.5 复合培养后的细胞软骨相关基因检测 复合培养 21 d 后，通过 TRIzol 法提取总 RNA，根据试剂盒说明书进行反转录和 Real time-PCR 反应，反应条件：95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，55 ℃ 1 min，40 个循环，72 ℃延伸 1 min。检测相关目的基因，以 GAPDH 为内参基因，各引物序列见**表 1**，采用 ΔΔCt 法计算各组基因相对表达量。

表 1 | PCR 引物序列
Table 1 | **Primer sequence for PCR**

基因序列	正义链	反义链
Sox9	TTC AGC AGC CAA TAA GTG	GTG GAAT GTC TTG AAG GTT A
Ⅱ型胶原	AAG TCC CTC AAC AAC CAG AT	CCA GTA GTC TCC ACT CTT CCA
蛋白聚糖	CAG CAC CAC CAA TGT AAG	CCT CCA CGA ACT CAG AAG
GAPDH	GCA TCC ACG AAA CTA CCT TC	TCA GCT CAG GCA GGA AAG AC

1.4.6 复合培养后的细胞糖胺多糖含量检测 复合培 7，14，21 d 后，将组织消化液 50 μL 加入 96 孔板，另外加入 200 μL 预先配置好的二甲基亚甲基蓝比色染色液。利用二甲基亚甲基蓝比色法测定糖胺多糖的含量，实验步骤依据二甲基亚甲基蓝比色法测定糖胺多糖总含量定量检测试剂盒说明书进行。

1.5 主要观察指标 各组细胞增殖、软骨相关基因表达与糖胺多糖总含量。

1.6 统计学分析 各组所得计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 进行统计学分析，两组间均数比较用 *t* 检验。检验水准 α=0.05，P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脂肪来源血管基质成分的细胞培养和鉴定 脂肪来源血管基质成分细胞接种 24 h 后，细胞培养皿中大多数细胞呈现梭形，且处于分裂期；48–72 h 后细胞增殖明显增多，细胞集落数量明显增多 (**图 1**)。

流式细胞仪检测结果显示，脂肪来源血管基质成分分离培养的细胞表型呈 $CD44^+$、$CD105^+$、$CD90^+$、$CD14^-$、$CD19^-$、$CD45^-$，见**图 2**。脂肪来源的血管基质成分经成脂诱导 28 d 后，油红 O 染色显示大量红染的脂质沉淀；经成骨诱导 21 d 后，茜素红染色结果显示有大量红染的钙结节形成；经成软骨诱导 14 d 后，阿尔新蓝染色可见呈阳性，表明有软骨细胞外基质成分产生 (**图 3**)。

2.2 复合培养细胞增殖检测结果 CCK8实验结果显示，随着培养时间的延长，3组细胞数量增加，实验组复合培养7，9，11 d的细胞数量多于与其他两组($P < 0.05$)，见**图4A**。这表明脂肪来源血管基质成分在骨软骨一体化支架中的细胞增殖能力强。

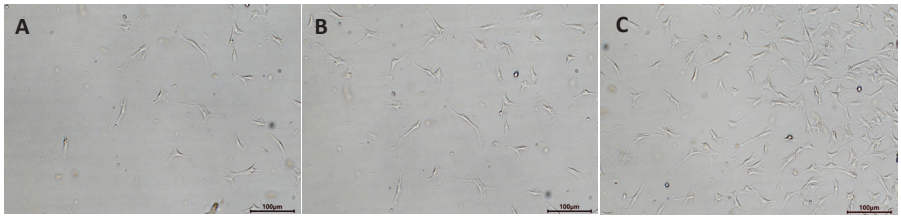
复合培养7 d后的荧光显微镜下可见，实验组蓝光细胞多于其他两组，见**图4B**。结果提示脂肪来源血管基质成分与骨软骨一体化支架具有良好的生物相容性。

2.3 复合培养细胞软骨相关基因表达检测结果 复合培养21 d后，实验组的Sox9、蛋白聚糖和Ⅱ型胶原mRNA相对表达量高于其他两组($P < 0.05$)，并且软骨诱导组Sox9、蛋白聚糖和Ⅱ型胶原mRNA相对表达量高于对照组($P < 0.05$)，见**图5**。

2.4 复合培养细胞糖胺多糖含量检测结果 实验组复合培养7，14，21 d的糖胺多糖含量高于其他两组($P < 0.05$)，软骨诱导组复合培养7，14，21 d的糖胺多糖含量高于对照组($P < 0.05$)，见**图6**。

3 讨论 Discussion

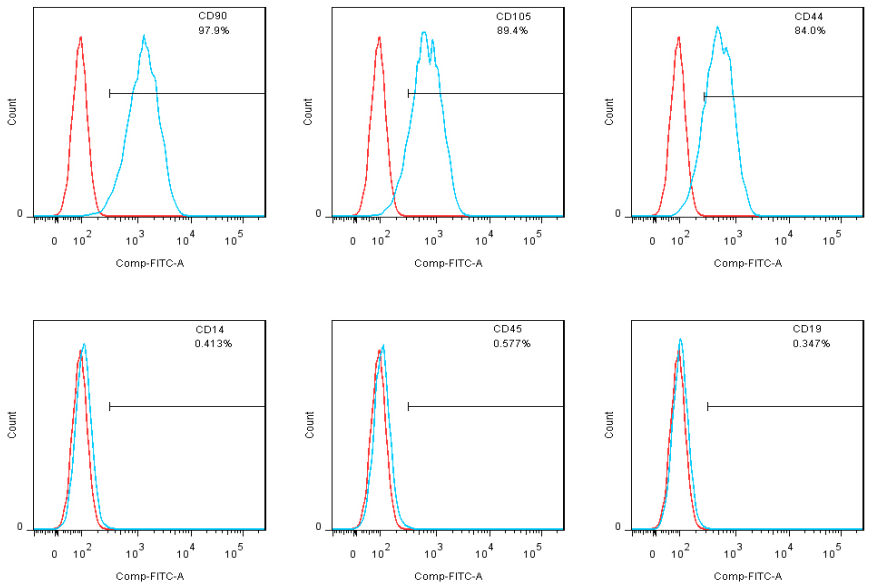
关节软骨无血管、无淋巴管、无神经组织的结构特点使其再生能力十分有限，一旦受损其难以自我修复。目前已被用于关节软骨缺损的治疗方法包括微骨折术、自体软骨细胞移植、人工关节置换等，这些治疗方法可暂时改善其临床症状，但长期修复效果不佳。近年来，组织工程学的发展为软骨缺损修复提供了新的治疗策略，其中以干细胞为基础的组织工程方法为软骨缺损修复开辟了一条全新的途径[15-25]，而拥有足够数量、功能正常、具有成软骨分化能力的种子细胞尤为重要。血管基质成分是脂肪组织通过胶原酶消化、过滤、离心除去成熟脂肪细胞后得到混杂的细胞群体。与其他的自体干细胞(比如与脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞等)相比，脂肪来源血管基质成分具有如下优势：第一，虽然在免疫调节、血管发生和抗炎等特征方面相似，异质细胞组成的脂肪来源血管基质成分可能在动物实验中



图注：A为接种24 h，大多数细胞呈现梭形，且处于分裂期；B，C为接种48，72 h，细胞增殖明显增多，细胞集落数量明显增多

图1 | 脂肪来源血管基质成分形态学观察(倒置相差显微镜，×40)

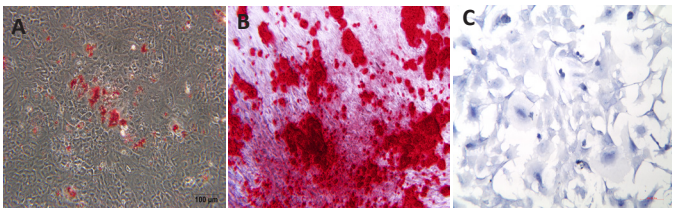
Figure 1 | Morphology observation of the adipose-derived stromal vascular fraction (inverted phase contrast microscope, ×40)



图注：脂肪来源血管基质成分分离培养的细胞表型呈$CD44^+$、$CD105^+$、$CD90^+$、$CD14^-$、$CD19^-$、$CD45^-$

图2 | 流式细胞仪检测兔脂肪来源血管基质成分表面特异性蛋白

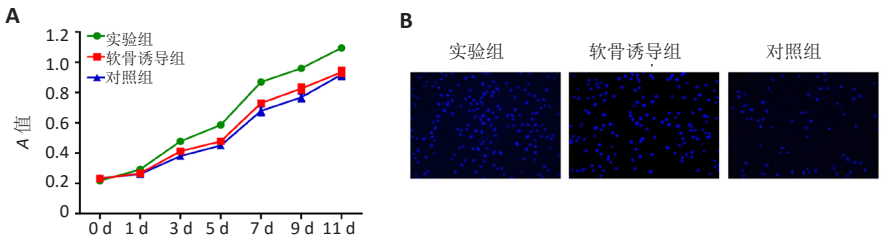
Figure 2 | Specific protein on the cells from rabbit adipose-derived stromal vascular fraction detected by flow cytometry



图注：图A为成脂诱导28 d，油红O染色观察到脂质滴；B为成骨诱导21 d，茜素红染色观察到钙沉积；C为软骨诱导14 d，阿利辛蓝染色观察到软骨特异性基质

图3 | 脂肪来源血管基质成分的多向诱导分化

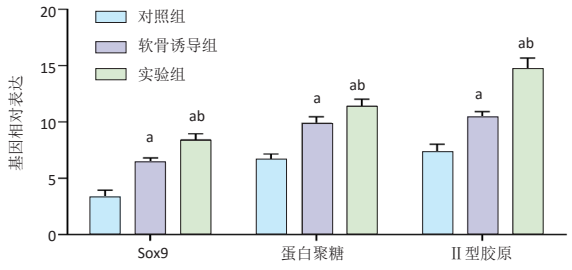
Figure 3 | Multiple induced differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction



图注：A为CCK8法检测细胞增殖情况，实验组复合培养7，9，11 d的细胞数量多于与其他两组($P < 0.05$)；B为复合培养7 d的DAPI染色荧光显微镜下观察，实验组蓝光细胞多于其他两组

图4 | 脂肪来源血管基质成分与骨软骨一体化支架的生物相容性

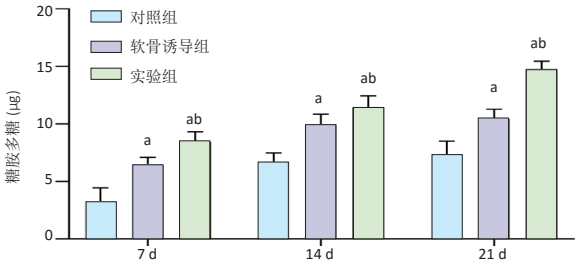
Figure 4 | Biocompatibility of cells on osteochondral integrated scaffold combined with adipose-derived stromal vascular fraction



图注：与对照组比较，[a]$P < 0.05$；与软骨诱导组比较，[b]$P < 0.05$

图 5 | 脂肪来源的血管基质成分复合骨软骨一体化支架的软骨分化相关基因检测

Figure 5 | Detection of genes related to osteochondral integrated scaffold combined with adipose-derived stromal vascular fraction



图注：与对照组比较，[a]$P < 0.05$；与软骨诱导组比较，[b]$P < 0.05$

图 6 | 脂肪来源血管基质成分复合骨软骨一体化支架的糖胺多糖含量检测

Figure 6 | Detection of glycosaminoglycan content of osteochondral integrated scaffold combined with adipose-derived stromal vascular fraction

有更好的疗效[26-30]；第二，脂肪来源血管基质成分获得更容易，不需要体外细胞分离和培养，因而可以通过一次手术广泛应用临床[31-35]。

实验首先从雌兔双侧腹股沟脂肪组织分离血管基质成分，进一步以干细胞诱导多向分化能力作为金标准鉴定。通过与含转化生长因子 β3 的脂肪间充质干细胞和含体积分数 10% 胎牛血清的脂肪间充质干细胞相比，证实脂肪来源血管基质成分在骨软骨一体化支架上的增殖快速。很多体内外实验证实，旁分泌在脂肪来源血管基质成分的促血管化作用中扮演了重要角色。转化生长因子 β3 是转化生长因子家族的主要成员之一，可促进脂肪干细胞的增殖分化、促进细胞外基质形成，尤其在软骨细胞生长中发挥关键的作用[36-40]。DAPI 染色显示，血管基质成分复合一体化支架组的细胞增殖明显，细胞数量高于软骨诱导组；另外，与软骨诱导组和对照组相比，实验组软骨表达相关基因和糖胺多糖含量增高。对于潜在的临床应用，含转化生长因子 β3 的脂肪间充质干细胞和体积分数 10% 胎牛血清的脂肪间充质干细胞存在两个方面的污染风险：其一为外源性物质在制备过程中可能发生的外源性污染；其二是添加试剂为外源蛋白，其本身生物污染不可小觑。另外，脂肪间充质干细胞的贴壁培养和纯化需要专业实验室设备和丰富经验操作人员，这限制了脂肪间充质干细胞在临床上的进一步应用[34-38]。实验显示，兔脂肪来源血管基质成分与骨软骨一体化支架具有良好的生物相容性，证实了自体血管基质成分复合骨软骨一体化支架修复关节软骨缺损的可行性方法，为软骨组织工程的临床应用提供了新的策略。

体外实验证实，脂肪来源血管基质成分与骨软骨一体化支架具有良好的生物相容性，接下来将进一步探讨其对关节软骨缺损修复动物实验的安全性和有效性。由于脂肪来源血管基质成分是一个组分十分复杂的细胞群，难以模拟细胞之间相互作用促进其关节软骨修复生长状态，对将脂肪来源的血管基质成分复合骨软骨一体化支架入动物体内的修复再生表现尚不明确。因此，下一步将探究脂肪来源血管基质成分主要的细胞成分如内皮细胞和其他循环细胞等各自在干细胞分化和软骨修复中如何发挥作用以及如何进行相互作用，为临床转化与应用做进一步努力。

作者贡献：舒雄进行实验设计，实验实施为陈磊、郑蕊和杰永生，实验评估为慕惠，资料收集为陈磊，陈磊成文，舒雄和孙磊审校。

经费支持：该文章接受了“北京市属医学科研院所科技发展项目(PXM2018_026275_000004)及北京市属医学科研院所公益发展改革试点项目(BMHC2018-4，BMHC2019-9)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该文统计学方法已经北京协和医学院生物统计学专家审核。

4 参考文献 References

[1] HUEY DJ, HU JC, ATHANASIOU KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. Science. 2012;338(6109):917-927.

[2] GUGJOO MB, SHARMA GT, AITHAL HP, et al. Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds. Indian J Med Res. 2016;144(3):339-347.

[3] ALBRIGHT JC, DAOUD AK. Microfracture and Microfracture Plus. Clin Sports Med. 2017;36(3):501-507.

[4] KRAEUTLER MJ, HOUCK DA, MCQUEEN MB, et al. A Cost-Effectiveness Analysis of Surgical Treatment Modalities for Chondral Lesions of the Knee: Microfracture, Osteochondral Autograft Transplantation, and Autologous Chondrocyte Implantation. Orthop J Sports Med. 2017; 5(5):1-8.

[5] GOMOLL AH, MADRY H, KNUTSEN G, et al. The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010;18(4):434-447.

[6] ASIK M, CIFTCI F, SEN C, et al. The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee: midterm results. Arthroscopy. 2008;24(11):1214-1220.

[7] ARMIENTO AR, STODDART MJ, ALINI M, et al. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. Acta Biomater. 2018;65:1-20.

[8] PATEL JM, WISE BC, BONNEVIE ED, et al. A Systematic Review and Guide to Mechanical Testing for Articular Cartilage Tissue Engineering. Tissue Eng Part C Methods. 2019;25(10):593-608.

[9] WALTER SG, OSSENDORFF R, SCHILDBERG FA, et al. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models: a systematic review. Arch Orthop Trauma Surg. 2019;139(3):305-316.

[10] KWON H, BROWN WE, LEE CA, et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. Nat Rev Rheumatol. 2019;15(9):550-570.

[11] MEHRANFAR S, ABDI RAD I, MOSTAFAV E, et al. The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019;47(1):882-890.

[12] BANSAL H, COMELLA K, LEON J, et al. Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis. J Transl Med. 2017; 15(1):141.

[13] 郑蕊 , 杰永生 , 陈磊 , 等 . 脱细胞真皮基质 / 生物矿化胶原一体化骨软骨支架的制备及其生物相容性的研究 [J]. 中国医药生物技术 , 2019,14(2):121-126.

[14] 舒雄 , 杰永生 , 郑蕊 , 等 . 激活的富血小板血浆促进 Pellet 培养的脂肪间充质干细胞成软骨样分化 [J]. 中国医药生物技术 ,2018, 13(4):328-333.

[15] ZHOU W, LIN J, ZHAO K, et al. Single-Cell Profiles and Clinically Useful Properties of Human Mesenchymal Stem Cells of Adipose and Bone Marrow Origin. Am J Sports Med. 2019;47(7):1722-1733.

[16] ZHAO Z, FAN C, CHEN F, et al. Progress in Articular Cartilage Tissue Engineering: A Review on Therapeutic Cells and Macromolecular Scaffolds. Macromol Biosci. 2020;20(2):e1900278.

[17] BAKHSHAYESH A, BABAIE S, NASRABADI HT, et al. An overview of various treatment strategies, especially tissue engineering for damaged articular cartilage. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2020;48(1):1089-1104.

[18] CIPOLLARO L, CIARDULLI MC, PORTA GD, et al. Biomechanical issues of tissue-engineered constructs for articular cartilage regeneration: in vitro and in vivo approaches. Br Med Bull. 2019;132(1):53-80.

[19] LEMOINE M, CASEY SM, O'BYRNE JM, et al. The development of natural polymer scaffold-based therapeutics for osteochondral repair. Biochem Soc Trans. 2020;48(4):1433-1445.

[20] DAN X, WEI L, LI JJ, et al. Engineering 3D functional tissue constructs using self-assembling cell-laden microniches. Acta Biomater. 2020; 114:170-182.

[21] BAPTISTA LS. Adipose stromal/stem cells in regenerative medicine: Potentials and limitations. World J Stem Cells. 2020;12(1):1-7.

[22] WEN YT, DAI NT, HSU SH. Biodegradable water-based polyurethane scaffolds with a sequential release function for cell-free cartilage tissue engineering. Acta Biomater. 2019;88:301-313.

[23] CARVALHO MS, SILVA JC, UDANGAWA RN, et al. Co-culture cell-derived extracellular matrix loaded electrospun microfibrous scaffolds for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;99:479-490.

[24] TAKAHASHI H, OKANO T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2019;138:276-292.

[25] NEO PY, TEH TK, TAY AS, et al. Stem cell-derived cell-sheets for connective tissue engineering. Connect Tissue Res. 2016;57(6): 428-442.

[26] CHOI JS, CHAE DS, RYU HA, et al. Transplantation of human adipose tissue derived-SVF enhance liver function through high anti-inflammatory property. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2019;1864(12):158526.

[27] KILINC MO, SANTIDRIAN A, MINEV I, et al. The ratio of ADSCs to HSC-progenitors in adipose tissue derived SVF may provide the key to predict the outcome of stem-cell therapy. Clin Transl Med. 2018;7(1):5.

[28] SOLODEEV I, ORGIL M, COHEN M, et al. Cryopreservation of Stromal Vascular Fraction Cells Reduces Their Counts but Not Their Stem Cell Potency. Plast Reconstr Surg Glob Open. 201;7(7):e2321.

[29] MORANDI EM, PLONER C, WOLFRAM D, et al. Risk factors and complications after body-contouring surgery and the amount of stromal vascular fraction cells found in subcutaneous tissue. Int Wound J. 2019;16(6):1545-1552.

[30] ZANATA F, BOWLES A, FRAZIER T, et al. Effect of Cryopreservation on Human Adipose Tissue and Isolated Stromal Vascular Fraction Cells: In Vitro and In Vivo Analyses. Plast Reconstr Surg. 2018;141(2): 232e-243e.

[31] MEHRANFAR S, RAD IA, MOSTAFAV E, et al. The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019;47(1):882-890.

[32] YOKOTA N, HATTORI M, OHTSURU T, et al. Comparative Clinical Outcomes After Intra-articular Injection With Adipose-Derived Cultured Stem Cells or Noncultured Stromal Vascular Fraction for the Treatment of Knee Osteoarthritis. Am J Sports Med. 2019;47(11):2577-2583.

[33] FRANKLIN SP, STOKER AM, BOZYNSKI CC, et al. Comparison of Platelet-Rich Plasma, Stromal Vascular Fraction (SVF), or SVF with an Injectable PLGA Nanofiber Scaffold for the Treatment of Osteochondral Injury in Dogs. J Knee Surg. 2018;31(7):686-697.

[34] DONGEN JA, HARMSEN MC, STEVENS HP, et al. Isolation of Stromal Vascular Fraction by Fractionation of Adipose Tissue. Methods Mol Biol. 2019;1993:91-103.

[35] YAO Y, DONG Z, LIAO Y, et al. Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel: A Novel Adipose Tissue-Derived Injectable for Stem Cell Therapy. Plast Reconstr Surg. 2017;139(4):867-879.

[36] SCHNEIDER MC, CHU S, RANDOLPH MA, et al. An in vitro and in vivo comparison of cartilage growth in chondrocyte-laden matrix metalloproteinase-sensitive poly(ethylene glycol) hydrogels with localized transforming growth factor β3. Acta Biomater. 2019;93: 97-110.

[37] JIA ZF, WANG SJ, LIANG YJ, et al. Combination of kartogenin and transforming growth factor-β3 supports synovial fluid-derived mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration. Am J Transl Res. 2019;11(4):2056-2069.

[38] QU D, ZHU JP, CHILDS HR, et al. Nanofiber-based transforming growth factor-β3 release induces fibrochondrogenic differentiation of stem cells. Acta Biomater. 2019;93:111-122.

[39] CHEN YR, ZHOU ZX, ZHANG JY, et al. Low-Molecular-Weight Heparin-Functionalized Chitosan-Chondroitin Sulfate Hydrogels for Controlled Release of TGF-β3 and in vitro Neocartilage Formation. Front Chem. 2019;7:745.

[40] NAKAGAWA Y, FORTIER LA, MAO JJ, et al. Long-term Evaluation of Meniscal Tissue Formation in 3-dimensional-Printed Scaffolds With Sequential Release of Connective Tissue Growth Factor and TGF-β3 in an Ovine Model. Am J Sports Med. 2019;47(11):2596-2607.

(责任编辑：GW，ZN，TXY)