

脂肪干细胞成骨分化的研究进展

陈犹白^{1,2} 陈聪慧³ Qixu Zhang² 韩岩¹

【摘要】 创伤或肿瘤导致的骨缺损是骨科、整形修复科、口腔颌面外科等科室的常见疾病,现有的治疗手段均有一定局限性。脂肪干细胞(ASC)是来自脂肪组织的多能干细胞,基于ASC的干细胞疗法和骨组织工程,为骨缺损的修复和再生提供了新的思路。ASC成骨分化是多种基因、蛋白和信号通路相互作用的复杂过程,其中Runx2和Osterix、Wnt、骨形成蛋白、Notch、成纤维细胞生长因子、环磷酸腺苷/蛋白激酶A、Hedgehog、丝裂原活化蛋白激酶等均扮演了重要角色。体外化学诱导ASC的成骨分化已经非常成熟,利用细胞共培养和各种支架也可诱导ASC的成骨分化。验证ASC分化成骨的方法包括茜素红染色和相关基因与蛋白的检测。影响ASC成骨分化的因素包括供体种属、年龄、脂肪获取部位等供体因素,培养液糖浓度、ASC的代数、冻存等实验因素,血管内皮细胞生长因子、生长分化因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 、尼尔样1型分子、LIM矿化蛋白1、低氧诱导因子1、肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 、IL-6等生长因子,糖皮质激素、雌激素、胰岛素、褪黑素、瘦素等激素,一氧化氮、组蛋白H1、白藜芦醇、曲古抑菌素A、小檗碱、硼替佐米、阿司匹林、辛伐他汀等化学因子及药物,电磁场和超声波等物理因素,拉伸力和剪切力等生物力学因素,钙、锌、锂、锶、硒等金属或非金属离子,微小RNA以及富血小板血清和富血小板纤维蛋白、降钙素基因相关肽、中药和咖啡因等其他因素。本文总结了ASC成骨分化的过程,分析了相关基因和信号通路,回顾了诱导和验证方法,讨论了主要影响因素及其机制,并展望了未来研究方向。

【关键词】 转录因子; 组织工程; 再生医学; 脂肪干细胞; 成骨分化; 基因; 信号通路

Research progress on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cell Chen Youbai^{1,2}, Chen Conghui³, Zhang Qixu², Han Yan¹. ¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China. ²Department of Plastic Surgery, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA. ³Dental Cosmetic Center, Mylike Aesthetic and Plastic Surgery Hospital, Beijing 100020, China

Corresponding: Han Yan, Email: 13720086335@163.com

【Abstract】 Bone defect due to trauma or tumor resection is the common disease in orthopedics, oral maxillofacial surgery, plastic and reconstructive surgery. Existing methods including artificial bone material filling and bone grafting all have limitations. Adipose-derived stem cell (ASC) is multipotent stem cell isolated from adipose tissue. Stem cell therapy and bone tissue engineering based on the osteogenic differentiation capacity of ASC opens a new era of bone defect repairment and regeneration. The osteogenic differentiation of ASC is a complex procedure associated with interactions of numerous genes, proteins and signal pathways, in which the activation and transcription of Runx2 and Osterix play an important role. Wnt, bone morphogenetic protein, Notch, fibroblast growth factor, cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, Hedgehog and mitogen activated protein kinase are also involved in the regulation of ASC's osteogenic differentiation. In vitro osteogenic induction of ASC using chemical had been well established. Cell co-culture and various biomaterial scaffold can promote ASC's osteogenic differentiation. Osteogenic differentiation of ASC can be verified by alizarin staining and detection of osteogenic genes and proteins. Factors that may affect ASC's osteogenic differentiation include donor factors, experimental factors, growth factors, hormones, medication and chemicals, physical factors, biomechanical factors, micro RNAs, metallic and nonmetallic ions, et al. Although research, clinical trials and applications of ASC osteogenesis

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2016.02.011

作者单位:100853 北京,解放军总医院整形修复科¹;77030 休斯敦,美国德克萨斯大学 MD 安德森肿瘤中心 整形外科²;100020 北京,美莱医疗美容医院口腔美容中心³

通讯作者:韩岩,Email: 13720086335@163.com

are the most focused fields, there are some issues need to be clarified. For example genes, transcription factors, and signal pathways involved in the early stage of ASC's osteogenic differentiation are still unclear. Interactions between signal pathways are unknown. Factors that may affect ASC's osteogenic differentiation are lack of summary. Therefore, it is essential to review pathways of ASC's osteogenic differentiation, to combine growth factors and various scaffold for improvement of ASC's proliferation and specific differentiation. This review focused on the genes, transcription factors and signal pathways, induction and verification methods, factors and their mechanisms of ASC's osteogenic differentiation. We also looked forward the future research interest of ASC's osteogenic differentiation based on current issues.

【Key words】 Transcription factors; Tissue engineering; Regenerative medicine; Adipose-derived stem cell; Differentiation; Genes; Signal pathway

创伤或肿瘤导致的骨缺损是骨科、整形修复科、口腔颌面外科等科室的常见疾病,严重影响患者的外形和功能。骨水泥或其他人工材料可促进轻度骨缺损的愈合,较大的骨缺损则需要血管化的骨移植修复。常用的髂骨或腓骨瓣移植虽然可以修复大部分骨缺损,但供区损伤较大。组织工程和再生医学为修复或替换受损组织提供了新的思路,而种子细胞是其中的关键。脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ASC)的来源充足、获取简便、产量高、增殖快,具有多向分化潜能,可旁分泌各种细胞因子,促进血管形成,发挥免疫调节作用,并能招募其他细胞参与重建,因此一直是种子细胞的热门之选。Zuk等^[1]最早验证了ASC具有向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞和肌细胞分化的多向分化潜能。有关ASC成骨分化和基于ASC的骨组织工程的研究虽较多,但仍存在许多亟待明确的问题,比如对调控ASC成骨分化的基因、转录因子和信号通路尚未完全掌握,对生物材料支架促进ASC成骨分化的机制尚不完全了解,对影响ASC成骨分化的各种因素尚缺乏系统总结等。某些细胞因子和激素对ASC成骨分化的影响具有浓度或时间效应,即根据浓度或作用于分化阶段的不同,可能发挥促进或抑制ASC成骨分化的双向作用。

本文总结了ASC成骨分化的过程、相关基因和信号通路、诱导和验证分化方法,讨论了影响ASC成骨分化的各种因素和机制,并展望了其未来研究的方向。

一、数据来源

于2016年2月20日在PubMed中以“(((adipose stem cell[Title]) OR adipose-derived stem cell[Title]) OR adipose-derived mesenchymal stem cell[Title]) AND differentiation[Title])”作为检索式,以“adipose stem cell” and “differentiation”作为关键词检索,共有文献35篇,其中近5年文献30篇。在Sinomed中以“(‘脂肪干细胞’[中文标题:智能]) AND ‘分化’[中文标题:智能]”作为检索式检索,共有文献176篇,其中综述13篇,近5年文献104篇。通过标题及摘要选取与ASC的成骨分化相关的文献,并阅读其参考文献标题和摘要,从中再次选取与ASC成骨分化的过程和机制、信号通路、诱导和鉴定方法、影响因素等相关的文献,剔除重复文献,最终纳入代表性中英文文献73篇。

二、ASC成骨分化的过程

在进行性骨发育异常中,可见皮下脂肪中生成钙化结节,这是ASC能够分化成骨的有力证据。从ASC到成熟的骨组织的过程可分为两个阶段,第一阶段:ASC分化为成骨干细胞-成骨前体细胞-过渡性成骨细胞-成熟成骨细胞;第

二阶段:成骨细胞增殖-分泌骨基质-骨基质钙化。每个阶段都伴随着细胞形态的变化,体外化学诱导3~5 d后,ASC从长梭形变为不规则的多角形或类圆形,胞核变大变圆;5~10 d时,胞质中可见黑色颗粒;10~15 d时,细胞重叠生长,出现矿化结节;14~21 d时细胞宽大扁平,交叉呈网,茜素红染色可见深红色的大小不一的球形矿化结节。

三、ASC成骨分化的主要因子和信号通路

(一)Runx2和Osterix

核心结合因子(core binding factor $\alpha 1$, Cbfa1)又称Runx2,是成骨细胞特异性转录因子,可增加骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨唾液蛋白(bone sialoprotein, BSP)、I型胶原等成骨基因的表达,促进ASC成骨分化和成骨细胞的成熟。Runx2是转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)和骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等细胞因子的共同信号分子,通过调控上述因子的表达,促进成骨分化。在敲除Runx2基因的小鼠中,其成骨分化受到完全抑制,软骨内和膜内骨化均不能发生^[2]。

Osterix是含有锌指结构的转录因子,在发育的骨组织中特异性表达。Osterix缺失的小鼠无骨形成,但是具有软骨内骨结构,Runx2表达阳性。Runx2的激活和Osterix的转录是ASC成骨分化中的关键通路,ASC先分化为软骨前体细胞,在Runx2作用下转化为成骨前体细胞,然后在Osterix作用下转化为成骨细胞^[2]。

(二)Wnt信号通路

1. 经典Wnt信号通路(Wnt/ β -catenin):Wnt/ β -catenin刺激ASC增殖和自我更新,减少凋亡,维持ASC的分化活性^[3]。Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a、Wnt8、Wnt8b及Wnt10b等通过激活Wnt/ β -catenin通路,提高Runx2和Osterix的表达,促进ASC成骨分化,并抑制成骨细胞凋亡。相反,阻断Wnt/ β -catenin导致ASC成骨分化减弱,向脂肪细胞或软骨细胞分化增加。在间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)中,Wnt10b基因的过表达可促进成骨细胞形成。Wnt10b基因敲除小鼠中可见OCN等成骨基因表达减少和骨量降低。Wnt/ β -catenin具有配体浓度依赖性。以Wnt3a为例,50 ng/mL的Wnt3a可以提高 β -catenin、Runx2和OCN的表达,但是ASC的增殖和成骨分化并未显著增强,而100 ng/mL的Wnt3a则显著促进了成骨分化。

2. 非经典Wnt信号通路:在Wnt/ Ca^{2+} 通路中,Wnt5a与卷曲蛋白受体结合后,活化G蛋白触发 Ca^{2+} /钙调素依赖性蛋白激酶或蛋白激酶C,促进细胞内钙离子释放。Wnt5a与

Rho 激酶结合后,提高 Runx2 和 OCN 的表达,增强碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,促进 ASC 成骨分化。此外,非经典 Wnt 通路还可通过招募抑制性组氨酸甲基,抑制过氧化物酶体增殖物激活受体的功能,限制 ASC 的成脂分化,使其倾向于成骨分化^[4]。

(三)BMP

BMP 是成骨分化中关键的调节因子。BMP 共有 20 多种,其中 BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7、BMP-9 等可通过与细胞表面的 BMP 受体结合,磷酸化下游分子 R-Smad (Smad1/5/8),磷酸化的 R-Smad 与 Smad4 形成复合体,上调远端缺失基因 5,提高 Runx2 和 Osterix 表达,刺激 ALP、BSP、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、OCN 和 I 型胶原蛋白等成骨基因和蛋白的转录、合成和分泌,促进 ASC 成骨分化和基质钙化^[5]。在骨修复的最后阶段,BMP 促进单核造血细胞融合,激活破骨细胞,促进骨的更新重塑。

Knippenberg 等^[6]发现利用 BMP-2 仅用 15 min 即可启动骨髓干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)的成骨分化。用含 BMP-2 的成骨诱导液培养糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)基因沉默的 ASC,12 d 后发现 ALP 和 OPN 升高,钙结节明显。头蛋白是 BMP-2 信号通路抑制剂,将头蛋白基因沉默的 ASC 种植于可释放 BMP-2 的支架上,发现其 Runx2、ALP 和 OCN 升高。Al-Nbaheen 等^[7]利用 BMP-2 和 BMP-7 基因重组表达 BMP-1,将其加入 ASC 的成骨诱导液中,发现更多的钙沉积。用 BMP-2 和 BMP-7 基因共转染 ASC,可见成骨分化增强,将转染后的 ASC 种植于 β -磷酸三钙支架上,成功修复了骨缺损。研究显示^[8]利用 BMP-7 治疗胫骨骨折、开放性骨折、感染创伤和骨缺损的治愈率均达到 80%。

不同信号通路间存在着协同或拮抗的作用。对成骨前体细胞来说,Wnt/ β -catenin 维持其前体状态并促进其增殖,BMP 则刺激其分化为成骨细胞,二者发挥拮抗作用。当成骨前体细胞分化为成骨细胞时,二者发挥协同作用促进成骨分化^[9]。目前 BMP 已被广泛用于治疗关节炎、骨和软骨缺损、半月板撕裂及韧带损伤、陈旧性骨折、骨不连、脊柱融合、股骨头缺血性坏死等^[5-9]。

(四)Notch 信号通路

Notch 与配体结合水解后,产生 Notch 胞内域(notch intracellular domain, NICD)。NICD 从细胞膜上脱离进入细胞核,诱导靶基因转录^[10]。Notch 对 ASC 成骨分化可能具有正反两种作用,Notch 及其下游因子抑制 Runx2 的转录活性,进而抑制成骨分化。 γ 分泌酶抑制剂 DAPT 通过阻止 Notch 受体的清除,促使 Notch 裂解和 NICD 转位,从而抑制 Notch 信号通路,增加 Runx2 的表达,增强由维生素 D3 诱导的成骨分化能力。在成骨分化中,Notch 与 Wnt/ β -catenin 相互拮抗,过表达的 NICD 抑制 Wnt3a,降低 Wnt/ β -catenin 水平和 ALP 活性,抑制成骨^[4]。也有研究显示^[11]过表达的 NICD 可协同 BMP 促进成骨分化,在加入 Notch 抑制剂后 ALP 活性下降。

(五)成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)

FGF 具有趋化性、促血管生成及促有丝分裂活性,在软骨内和膜内成骨中扮演着重要角色^[12]。但是 FGF 对 ASC

成骨分化的影响目前尚无定论。Rider 等^[13]认为 FGF 可以激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、蛋白激酶 C (protein kinase, PKC)和磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)信号通路,促进 hASC 的增殖和成骨分化。FGF 和 BMP 对骨形成具有协同效应,FGF-2 和 FGF-9 能增加 BMP-2 和 TGF- β 的表达,激活 Runx2,促进成骨分化。FGF-2 基因敲除小鼠中 Runx2 的聚集受阻,阻碍 BMP-2 诱导的骨形成。此外,FGF2 能够通过拮抗视黄酸,抑制 ASC 成脂分化,促进成骨分化。但 Biver 等^[14]则认为 FGF2 抑制 BMPR-IB 基因的上调和 BMP 的表达,抑制人 MSC 的成骨分化。

(六)环磷酸腺苷/蛋白激酶 A(cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA)

张磊等^[15]的研究显示 cAMP/PKA 的激动剂 db-cAMP 可促进 PKA 活化,激活环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的磷酸化,促进 Runx2 和 OPN 的表达和 ASC 的成骨分化。而 cAMP/PKA 信号通路抑制剂 H-89 可阻断上述通路,抑制 ASC 成骨分化,推测 cAMP/PKA 通过放大相关因子的信号而调控细胞分化。

(七)Hedgehog 信号通路

Hedgehog 可促进 MSC 成骨和成软骨分化,阻止其成脂分化。研究显示^[16]高表达的 sonic hedgehog(SHH)可显著促进 MSC 成骨相关基因和胶原的表达和分泌,诱导 MSC 成骨分化,形成钙结节。SHH 可以减轻高浓度葡萄糖对 BMSC 的成骨抑制。SHH 与 BMP 有协同作用,在培养基中同时加入 BMP-2 和 SHH,可显著促进 MSC 成骨分化。但是 Hedgehog 信号通路对 ASC 成骨分化的作用尚缺少研究。

(八)MAPK 信号通路

MAPK/p38、MAPK/ERK 和 MAPK/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在 ASC 成骨分化中发挥作用。Ye 等^[17]认为 BMP-9 通过 ERK 和 p38 信号通路促进成骨分化。Gu 等^[18]的研究显示 JNK 信号通路在 ASC 成骨诱导 15 min 后被激活,在 30 min 时达到高峰,在 45 min 时回到原水平。在成骨诱导中,阻断 JNK 信号通路可抑制 Runx2、ALP、OCN 等成骨相关基因的表达,减少钙沉积,抑制成骨分化。在地塞米松存在的情况下,阻断 ERK 会使 ASC 从成骨分化转向成脂分化,而阻断 JNK 并无此现象。hASC 可通过激活 Smad/ERK/JNK 促进成骨细胞的增殖和分化,可通过激活 ERK/p38 刺激破骨细胞的分化。

四、诱导 ASC 成骨分化的方法

(一)化学诱导法

Zuk 等^[1]于 DMEM 培养基中加入地塞米松、 β 磷酸甘油钠、维生素 C 和维生素 D 诱导 ASC 成骨分化。地塞米松等糖皮质激素通过与受体结合,促进成骨相关基因的转录,增强 ALP 活性,ALP 水解磷酸酶,提高局部磷离子浓度和钙结合度,促进基质合成和钙化^[19]。地塞米松等糖皮质激素能与 BMP 协同作用,激活 JAK/STAT 通路,或直接促进 BMP-6 基因转录而激活 BMP 信号通路。但是,地塞米松的作用与其作用时间和剂量相关,长期大量的应用糖皮质激素会减少骨量^[20]。黎洪棉等^[21]的研究显示地塞米松等糖皮质激素与

β -catenin 结合,减少 β -catenin 的核内蓄积,抑制细胞周期蛋白 D3、细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)等,促进 CDK 抑制因子 P21 和 P27 的表达,抑制 DNA 的复制和 ASC 的增殖。地塞米松等糖皮质激素还能激活 MKP-1,使 ERK 去磷酸化,从而抑制 ASC 的增殖。此外,地塞米松可抑制包括血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)和白介素-6(interleukin 6, IL-6)等促血管形成因子的表达,从而抑制 ASC 诱导的血管新生。因此决定诱导液中地塞米松的浓度、寻求 ASC 增殖和定向分化的平衡非常重要。维生素 C 能促进 ASC 合成胶原,形成钙化。 β 磷酸甘油钠则提供钙化沉积所需的磷离子,加速钙化。维生素 D 可直接作用于细胞膜受体,调节钙离子转运,促进钙、磷代谢,同时抑制 ASC 向软骨细胞分化。维生素 D 还可以在转录水平降低成脂分化相关基因的表达,抑制地塞米松等糖皮质激素诱导的成脂分化。

不同研究小组所用的成骨诱导液成分大致相同,但浓度存在较大差异。目前市场上有很多商业化的分化诱导液,可以避免配制诱导液过程中的差异。美国 MD 安德森肿瘤中心整形科组织再生和分子细胞工程实验室体外化学诱导 ASC 成骨分化的步骤如下^[22]:将第 2 代的 ASC 采用 PBS 漂洗后,用胰蛋白酶 + 乙二胺四乙酸处理,将细胞悬液以 1 000 rpm 离心 5 min 后去上清,重悬后细胞计数,将细胞以 5×10^3 个/cm² 的密度种植于 12 孔板,添加成骨分化诱导液(StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA),每 3 天换液一次,培养 3 周后利用茜素红染色验证分化结果。

(二)生物诱导法

1. 细胞共培养:在体内,ASC 的周围细胞和细胞外基质可通过释放信号,调控 ASC 的分化。体外实验^[23]发现将大鼠 ASC 与血管内皮细胞按 1:1 的比例共培养,ALP 和 OCN 表达升高,促进 ASC 成骨分化。其机制可能是血管内皮细胞分泌 BMP,促进 ASC 分化为成骨细胞并分泌 VEGF 和 I 型胶原,协同促进成骨分化和血管新生,但是具体机制尚需进一步研究。

2. 生物支架:目前证实的可促进 ASC 成骨分化或可结合 ASC 构建组织工程骨的支架主要包括^[24]:羟基磷灰石、 β 磷酸三钙、藻酸钙等可降解的磷酸钙类生物陶瓷,聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸聚乙醇酸共聚物、甲基丙烯酸酯、聚乙烯乙二醇丙烯酸酯、聚乙烯对苯二甲酸酯、聚对苯二甲酸乙酯、聚四氟乙烯、石墨烯水凝胶等可降解合成高分子材料,壳聚糖、胶原、透明质酸及其衍生物、丝素蛋白等天然衍生材料^[25]。单独应用上述材料可能无法达到最佳效果,因此结合各种材料构建复合材料,并运载促进成骨分化和血管形成的细胞因子,是目前骨组织工程的研究热点^[26]。

体外培养组织工程骨植入物需要耗费大量的时间和费用,在临床中可行性较低。Laschke 等^[27]将绿色荧光蛋白标记的 ASC 小球种植于聚氨酯支架中,体外诱导其成骨分化后移植到小鼠的背部皮下,发现复合物的血管形成能力很低,种植 14 d 后无矿化基质形成。其原因可能是体内环境使已分化的 ASC 去分化,并失去了在支架中形成血管和重构微血管网的能力。有研究^[28]将 hASC 种植于细胞外基质支架后移植到免疫缺陷小鼠模型中,可观察到异位成骨,hASC 聚集

于成骨区域并分布于新生骨中。新生骨细胞的人核抗原阳性,说明新生骨来源于 hASC。

五、验证 ASC 分化成骨的方法

(一)染色

验证 ASC 分化成骨最简单的方法是茜素红染色,但是人成纤维细胞也可能出现阳性,因此茜素红染色并不是 ASC 成骨分化的特异性验证方法^[29]。本实验室茜素红染色的具体步骤为:配置茜素红染料,将 1 g 茜素红放入 100 mL 去离子水中,调整 pH 值至 4.2,用 0.45 μ m 的过滤网过滤,现用现配。弃诱导分化液,PBS 漂洗细胞 2 次,每次 5 min,蒸馏水再漂洗 2 次。4% 多聚甲醛室温下固定 5 min,去离子水漂洗 2 次,每次 5 min,用上述配置好的茜素红室温下染色 20 min,去离子水漂洗 3 次,每次 5 min,显微镜下观察拍照。

(二)相关基因或蛋白表达

在成骨分化诱导下,ASC 表达包括 Runx2、ALP、I 型胶原、OPN 及其 mRNA 标记物 SPPI、OCN 及其 mRNA 标记物 BGLAP、骨粘连蛋白、BSP、BMP-2、BMP-4 及 BMP 受体等一系列成骨细胞相关基因和蛋白^[30]。

ALP 是成骨分化早期的标记物,在诱导 4 d 左右出现,7~14 d 时表达较高,随后下降。OCN 约在诱导 14 d 后表达。OPN 能够促进成骨过程钙、磷沉积,是成骨分化的晚期标记物。I 型胶原是成骨细胞分泌的主要蛋白,在成骨诱导前后都有表达。综合利用茜素红染色和上述基因或蛋白的检测,可能比单独应用一种方法更具有说服力^[31]。

(三)其他验证方法

Bagnaninchi 和 Drummond^[32]将 ASC 培养在多电极阵列上并诱导其成脂和成骨分化,12 h 后测量底物阻抗,发现成骨诱导的隔离电阻上升至 1.7 ohm $\cdot$ cm²,而成脂诱导为 0.63 ohm $\cdot$ cm²。诱导 4 d 后,成脂诱导的细胞膜电容显著高于成骨诱导的 ASC。通过长时间的监测,发现成脂和成骨诱导的 ASC 有着截然不同的介电性能。这一方法利用 ASC 分化中的细胞底物的电阻抗传感差异,实时监测 ASC 的分化,从学科交叉的角度为验证 ASC 的分化提供了新的思路。

六、影响 ASC 成骨分化的因素及机制

(一)供体因素

1. 种属:除人类之外,鼠、兔、猪、马、羊等不同种动物的 ASC 均可分化为成骨细胞,但是其分化能力可能不同,有研究显示^[33]小鼠 ASC 的分化成骨能力高于 hASC。

2. 年龄:供体年龄对 ASC 成骨分化能力的影响未达成共识。Schipper 等^[34]认为随着年龄的增长,ASC 的凋亡增加,ALP 活性和钙离子浓度降低,成骨分化能力降低。

3. 脂肪获取部位:脂肪获取部位对 ASC 成骨分化能力的影响未达成共识。有学者认为皮下脂肪来源的 ASC 分化成骨能力优于内脏脂肪来源的 ASC^[35]。

(二)实验因素

1. 培养液糖浓度:李冬松等^[36]的研究显示含有 27.5 mmol/L 浓度的葡萄糖和 100 mg/L 浓度的糖基化终末产物的培养基会抑制 ASC 的增殖和成骨分化,但是其机制尚不清楚。

2. ASC 的代数:10 代以前的 ASC 成脂成骨分化能力接近,而 10 代以后的 ASC 趋于向骨细胞分化,成脂能力逐渐降

低。有研究显示^[37]将ASC传至第4代,然后分别诱导其向脂肪、骨、软骨和神经细胞方向分化,结果显示81%的ASC可以分化为其中一种细胞,52%的ASC可分化为两种或两种以上的细胞,分化为脂肪、骨、软骨和神经样细胞的比率分别为52%、48%、43%和12%,证明第4代时ASC的成脂和成骨能力接近。有学者^[38]将体外分离培养至第6代的ASC经尾静脉注射到骨质疏松大鼠模型,发现第6代的ASC也可以提高腰椎及股骨骨密度,降低骨吸收,促进骨形成,改善骨组织微结构。

3. 冻存:ASC可以耐受长期的低温冻存,复苏后存活率高,对增殖和分化能力无明显影响^[39]。

(三)生长因子

生长因子与其膜受体之间复杂的相互作用调控ASC分化成骨,其作用取决于生理和病理状态下的可用性、定位、聚集、生物活性、细胞膜上受体的表达与活化、作用时机、作用浓度以及不同生长因子间的相互作用。BMP和FGF等生长因子对ASC成骨分化的影响前文已经详述,此处不再赘述。

1. VEGF:血管新生并形成有功能的微血管网络是组织工程骨体内存活的关键。VEGF是最强效的血管形成因子^[40],作用于成骨细胞的flt-1受体,促进成骨细胞迁移和分化。在一项比较VEGF和BMP-2成骨诱导能力的研究中^[41],VEGF诱导组的Runx2和Osterix的表达均没有BMP-2诱导组高,但高于单纯诱导组。VEGF+BMP-2诱导组虽然Osterix表达较高,但Runx2的表达未见显著差异,说明VEGF在ASC分化成骨的早期阶段对Runx2的作用并不明显。在缺乏Runx2基因的ASC中,VEGF可以通过Smads信号转录上调Mx2表达,Mx2增强Wnt信号通路,上调Osterix的表达,促进ASC成骨分化。李冬松等^[42]将VEGF基因修饰的ASC结合凝胶海绵材料植入糖尿病大鼠骨质疏松性骨缺损区,2周后发现有小血管网生成,4周时较多,骨质密度明显提高。

2. 生长分化因子-5(growth differentiation factor 5, GDF-5):GDF-5能通过增加VEGF的表达刺激ASC成骨分化。

3. 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF):IGF-1通过激活雷帕霉素靶点促进干细胞的成骨分化,IGF-1浓度下降可抑制骨形成,导致骨量下降^[43]。IGF-2可维持干细胞多能性,防止其分化。

4. TGF- β :TGF- β 能激活 β -catenin,通过经典wnt信号通路促进ASC和成骨前体细胞的增殖,增加成骨细胞数量,提高ALP的表达,促进其分泌胞外基质,促进成骨分化,并抑制成脂分化。TGF- β 对ASC成骨分化具有浓度相关的双向调控作用,即高浓度时抑制成骨分化,低浓度时促进成骨分化^[44]。

5. LIM矿化蛋白1:LIM矿化蛋白1是一种具有高效成骨特性的胞内蛋白,可诱导产生多种成骨因子,促进ASC成骨分化。有研究显示将LIM矿化蛋白1转染入细胞后,BMP-2/4/6/7、Runx2、TGF- β 的表达均上调,认为LIM矿化蛋白1通过招募生长因子参与成骨细胞分化;研究显示VEGF联合LIM矿化蛋白1可上调Runx2的表达,但OCN和I型胶原蛋白的表达无明显上升^[45]。

6. 低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor, HIF-1):

HIF-1是组织处于低氧环境所产生的转录因子,可促进VEGF、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、诱导型一氧化氮合酶、人血红素氧合酶1、血管生成素2等血管生成因子表达,增加红细胞数量并提高其携氧能力,促进血管形成,扩张血管,改善局部血运。单独应用HIF-1发现BMP-2、Runx2、ALP、OCN的表达无明显增加。HIF-1与LIM矿化蛋白1联合双基因转染的ASC的ALP及OCN的表达明显提高,其机制可能是二者协同作用,HIF-1增强Smad磷酸化,提高Runx2水平,LIM矿化蛋白1上调BMP-2以及Runx2的表达,因此二者联合应用进一步促进Runx2的表达和ASC对BMP的反应,促进成骨分化^[45]。IGF-1和TGF是HIF-1的靶基因,能激活HIF-1信号通路,促进细胞增殖,继而增加成骨细胞数量。

7. 尼尔样-1型分子(Nel-like type 1 molecule, Nell-1):Nell-1是与人类缝早闭相关的生长因子。用Nell-1和BMP-2基因修饰ASC,发现可显著促进ASC的成骨分化,且Nell-1可抑制ASC的成脂分化,保持高效的成骨作用。但Nell-1无法单独诱导异位成骨,因此安全性更高。

8. 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α):TNF- α 对MSC发挥与浓度相关的双向调控作用,具体表现在低浓度时促进成骨分化,高浓度时抑制Runx2、ALP、OCN的表达,抑制成骨分化。但是TNF- α 对ASC成骨分化的作用尚缺少研究。

9. 干扰素 γ (IFN- γ):IFN- γ 可通过增强TNF- α 信号,抑制Runx2的表达,抑制BMSC的成骨分化,通过注射Foxp3+Treg,降低IFN- γ 和TNF- α 的浓度,可显著提高外源性BMSC的成骨能力。但是IFN- γ 对ASC成骨分化的作用尚缺少研究。

10. 白细胞介素6(interleukin, IL-6):IL-6可通过促进Ror2和Wnt5a表达,激活非经典Wnt信号通路,促进ASC的成骨分化^[46]。

11. 脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF):BDNF对ASC的成骨分化具有浓度依赖的双向作用,研究显示^[47]高浓度的BDNF(100 ng/mL)可促进hASC增殖,抑制Runx2、ALP、OCN的表达,抑制ASC成骨分化。

(四)激素

干细胞是激素的重要靶点,激素可直接与干细胞内相应的激素受体结合,通过信号转导调控干细胞的分化,或间接地改变干细胞周围的微环境,通过细胞间作用或旁分泌作用调控干细胞的分化。地塞米松等糖皮质激素对ASC成骨分化的影响前文已经详述,此处不再赘述。

1. 雌激素:雌激素可以通过上调前列腺素E2、BMP、TGF- β 、IGF等细胞因子,增强ASC的成骨能力,且这种作用与雌激素的剂量呈正相关。Taskiran和Evren^[48]发现含有50 mmol/L的17- β -雌二醇和1000 nmol/L的地塞米松的成骨诱导液可以提高ALP活性,增加矿化沉积。雌激素受体通过调控Wnt/ β -catenin信号通路促进干细胞的增殖和成骨分化,敲除细胞中的雌激素受体后发现皮质骨的骨密度下降。雌激素缺乏导致T细胞的异常活化并释放大量炎症因子,使血液中TNF- α 、IFN- γ 、IL-6等因子水平上升,抑制干细胞的

成骨分化。

2. 瘦素:瘦素可以促进 ASC 的增殖,并通过调节成骨信号通路,促进成骨分化^[49]。

3. 褪黑素:褪黑素在细胞增殖方面的作用与其浓度和细胞类型密切相关。Zaminy 等^[50]的研究显示,生理剂量的褪黑素抑制了 ASC 的增殖,并促进其凋亡,进而抑制 ASC 的成骨分化能力。

4. 胰岛素:胰岛素与 IGF-1 通过同一信号通路促进 ASC 的成骨分化。

(五)化学因子或药物

1. 一氧化氮:一氧化氮可以促进 ASC 的成骨分化,其机制是一氧化氮激活可溶性鸟苷酸环化酶,进而催化环磷酸鸟苷合成,环磷酸鸟苷与蛋白激酶 G 结合进入细胞核,促进 Runx2、ALP、BMP-2 和 I 型胶原蛋白的表达。选择性雌激素受体调节剂雷洛昔芬可以通过上调一氧化氮的释放,促进 ASC 的成骨分化^[51]。

2. 组蛋白 H1:Hsu 等^[52]的研究显示添加了组蛋白 H1 的诱导液可通过上调 MAPKs/ERK 和核因子- κ B 的转位,促进 ASC 的成骨分化,而利用微小 RNA 抑制组蛋白 H1 则减少了 ALP 等成骨分化标记物的表达。组蛋白去乙酰化酶 HDAC 可结合至 Runx2,如 HDAC 中的 p300/CBP 相关因子通过乙酰化 Runx2,促进成骨细胞分化。

3. 曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA):TSA 是乙酰化酶抑制剂,利用含 TSA 的培养液体外诱导大鼠 ASC,发现可以促进 ASC 的成骨分化。其机制是 TSA 提高 ASC 中组蛋白 H3/H4 在核外乙酰化的水平,增强转录活性。李娜等^[53]的研究发现 TSA 结合三维复合纳米羟基磷灰石+胶原支架,可以显著促进 ASC 的成骨分化。

4. 白藜芦醇:Dosier 等^[54]利用含 25 μ mol/L 白藜芦醇的成骨诱导培养液培养 ASC,并种植于聚乙内酯胶原的 3D 支架上,发现 ALP、BMP 和 OCN 的表达升高,证明白藜芦醇可以促进 ASC 的成骨分化。

5. 其他:小檗碱^[55]、硼替佐米和阿司匹林等均能激活 Runx2,促进 BMSC 成骨分化,提高骨量。辛伐他汀则通过 MAPK/p38 信号通路促进 BMSC 的成骨分化^[56-57]。

(六)物理因素

研究显示^[58],将 ASC 暴露于场强 0.5 T 的磁场 7 d,可以抑制其成骨分化。采用频率为 12 Hz、场强为 1.1 mT 的脉冲电磁场刺激 ASC,每天 8 h,共 2 周,可以促进 ASC 的成骨分化。强度 ≤ 100 mW/cm² 的低强度脉冲超声波能促进 ASC 的成骨分化,但是机制尚不明确^[59]。

(七)生物力学因素

适宜的生物力学可以促进 ASC 的成骨分化^[60]。持续性和间歇性的周期拉伸可增加 ASC 分化为成骨前体细胞的比例,提高 ASC 的成骨能力,且间歇性拉伸优于持续性拉伸。将脉动流体剪切力加载在 ASC 上,发现 ASC 成骨基因的表达上调。以均匀的动态水压刺激 ASC,发现培养 7 d 后 ALP 等成骨标记物升高,并出现了明显的钙结节。

(八)微小 RNA (microRNA, miRNA)

有研究^[61]发现 miRNA-218 靶向作用于 Wnt 抑制剂分泌型卷曲相关蛋白,增强 Wnt/ β -catenin 信号,促进 ASC 成骨

分化。此外,miR-233、miR-141、miR-200a 均可调节干细胞的成骨分化。miR-204、miR-211 可以直接结合 Runx2,抑制 Runx2 的表达,抑制成骨分化。在 BMP-2 处理的小鼠成肌细胞 C2C12 中 miR-133 的表达下降。miR-125b 在小鼠 MSC 中抑制了 BMP-4 诱导的成骨分化。

(九)金属及非金属离子

1. 钙:钙离子显著提高磷酸盐的浓度及磷酸盐/蛋白的比值,从而增加钙结节。

2. 锌:Haimi 等^[62]评估了可以缓释锌离子的 3D 生物玻璃支架对 hASC 增殖和成骨分化的影响,发现锌可以减缓生物支架的降解速率,抑制 hASC 的扩散和增殖,但对 hASC 的 DNA 含量、ALP 活性和 OPN 浓度无明显影响。

3. 氯化锂:氯化锂是 GSK-3 抑制剂,在胞质内大量累积 β -catenin,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 ASC 成骨分化。

4. 镉:镉能够激活 β -catenin 表达,通过 Wnt/ β -catenin 信号通路上调细胞外基质相关基因的表达,促进 ASC 的成骨分化。

5. 镁黄长石:镁黄长石是一种含有钙、镁、硅的生物活性陶瓷,镁黄长石浸提液可以促进 hASC 成骨分化,且具有浓度依赖性。谷辉杰等^[63]认为 1/4 浓度的镁黄长石浸提液可以抑制 ASC 体外增殖并促进其成骨分化。其机制可能是镁黄长石析出的钙、镁、硅离子启动 ERK 通路,调控细胞迁移、增殖和分化,但是具体机制仍不明确。

6. 硒:Zheng 等^[64]的研究显示硒纳米颗粒可以通过 BMP 信号通路增强干细胞的成骨分化。

(十)其他

1. 富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 和富血小板纤维蛋白 (platelet-rich fibrin, PRF):PRP 是将全血离心后得到的含高浓度血小板的自体血浆,能够释放出 PDGF、VEGF、TGF- β 、IGF 等多种生长因子,诱导细胞分化,刺激成骨前体细胞有丝分裂,增加成骨细胞数量,促进细胞外基质合成和分泌^[65]。研究表明^[66]PRP 通过下调细胞周期抑制蛋白 p27,促进 ASC 的增殖和成骨分化。利用含 1% 体积分数的 PRP 的成骨诱导液,发现 14 d 时的茜素红染色和钙结节显著增加。相比 PRP,PRF 能够缓慢持久地释放生长因子,有效地刺激 ASC 的增殖和分化^[67]。

2. 降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP):CGRP 与 ASC 的 CGRP 受体结合,促进 ASC 增殖,提高 ALP、I 型胶原、OCN 和 OPN 的表达,促进 ASC 成骨分化^[68]。

3. 中药及其提取物:李玲慧等^[69]发现右归丸可以显著促进 ASC 的增殖和成骨分化。罗志军等^[70]认为低剂量的人参皂苷 Rb1 可促进 hASC 的增殖,而高剂量的人参皂苷 Rb1 则抑制 hASC 的增殖,并促进其成骨分化。

4. 咖啡因:Su 等^[71]的研究显示咖啡因对于 ASC 成骨分化具有与浓度相关的双向作用,0.1 mM 的咖啡因可以上调 ALP、OCN、骨保护素、Runx2 和 Sirtuin1 的表达水平,促进 ASC 成骨分化。而 0.3 mM 的咖啡因则抑制 Runx2 活性,进而抑制成骨分化。

表1 影响ASC成骨分化的因素

作用方式	影响因素
促进	
信号通路	Runx2、Osterix、Wnt、BMP
生长因子	VEGF、GDF-5、IGF-1、LIM 矿化蛋白1、HIF-1、Nell-1
激素	糖皮质激素、雌激素、瘦素、胰岛素
化学因子和药物	一氧化氮、组蛋白 H1、曲古抑菌素 A、白藜芦醇、小檗碱、硼替佐米、阿司匹林、辛伐他汀
物理因素	低强度磁场、低脉冲超声波
生物力学	拉伸应力、剪切力
微小 RNA	miR-218、miR-233、miR-141、miR-200a
支架材料	β -磷酸三钙、羟基磷灰石、藻酸钙、透明质酸、胶原、聚乳酸、聚氨酯、聚羟基乙酸、Medpor、石墨烯水凝胶
离子	钙、氯化锂、锶、镁、黄长石
其他	PRP 和 PRF、CGRP、右归丸
抑制	GSK3、头蛋白、高糖培养基、IGF-2、IFN- γ 、褪黑素、miR-204、miR-211、miR-133、miR-125b
无影响	细胞代数、冻存、锌离子
双向	Notch、TGF- β 、TNF- α 、BDNF、人参皂苷 Rb1、咖啡因
尚无定论	Hedgehog、FGF、cAMP/PKA、MAPK、供体种属、年龄、脂肪获取部位

注:ASC:脂肪干细胞;BMP:骨形成蛋白;VEGF:血管内皮细胞生长因子;GDF-5:生长分化因子-5;IGF:胰岛素样生长因子;HIF-1:缺氧诱导生长因子-1;Nell-1:尼尔样1型因子;PRP:富血小板血浆;PRF:富血小板纤维蛋白;CGRP:降钙素基因相关肽;IFN- γ :干扰素 γ ;TGF- β :转化生长因子 β ;TNF- α :肿瘤坏死因子 α ;BDNF:脑源性神经营养因子;FGF:成纤维细胞生长因子;cAMP/PKA:环磷酸腺苷/蛋白激酶A;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶

汇总上述影响ASC成骨分化的因素,按照促进、抑制、无影响、双向作用和影响尚无定论进行归类(表1),以利于下一步应用。

七、总结与展望

ASC成骨分化是多种基因、蛋白和信号通路交互作用的复杂过程,大约有847个基因和95个信号通路参与调控ASC的成骨分化。其中Runx2激活和Osterix转录发挥了重要的作用,Wnt、BMP、Notch、FGF、cAMP/PKA、Hedgehog、MAPK等信号通路均参与了ASC的成骨分化。尽管对于ASC的成骨分化研究开展较早,大多数分化研究局限于体外或动物实验阶段,体外和体内微环境、动物和人体内微环境的差异,使得无法将目前的研究结果直接推至人体内^[72]。更为重要的是,ASC的分化与肿瘤的发生发展有很多重叠的信号通路,因此,ASC在体内是否有致癌风险是需要重点研究的问题^[73]。

总之,各种信号通路和细胞因子对于细胞的作用与细胞所处微环境密切相关,如何捋顺信号通路之间的相互作用,综合利用细胞因子,结合细胞外基质支架模拟体内微环境,促进ASC的黏附、增殖和定向成骨分化,进而构建组织工程骨并应用于临床,是未来的研究方向。

参 考 文 献

- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies [J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.
- 唐宇欣, 金晗, 史册, 等. 脂肪干细胞及其向成骨细胞分化的调控机制[J]. 国际口腔医学杂志, 2014, 41(4): 418-423.
- 陈力莹, 范锐镭, 王金水, 等. Wnt-1 基因对人表皮干细胞的分化与增殖的影响研究[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2012, 7(1): 24-28.
- 施彦, 舒斌, 杨荣华, 等. Wnt 和 Notch 信号通路在大鼠创面愈合模型中的表达作用[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2014, 9(2): 151-157.
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(8): 1544-1552.
- Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 902-908.
- Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential [J]. Stem Cell Rev, 2013, 9(1): 32-43.
- Desmyter S, Goubau Y, Benahmed N, et al. The role of bone morphogenetic protein-7 (Osteogenic Protein-1) in the treatment of tibial fracture non-unions. An overview of the use in Belgium [J]. Acta Orthop Belg, 2008, 74(4): 534-537.
- Bess S, Line BG, Lafage V, et al. Does recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in adult spinal deformity increase complications and are complications associated with location of rhBMP-2 use? A prospective, multicenter study of 279 consecutive patients [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(3): 233-242.
- 王妹月, 樊磊, 白晓智, 等. 重度烧伤大鼠血清对巨噬细胞 Notch1 的激活及分泌功能的影响[J/CD]. 中华损伤与修复杂志

- 志; 电子版, 2015, 10(2): 120-125.
- 11 Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, et al. Characterization of Notch Signaling During Osteogenic Differentiation in Human Osteosarcoma Cell Line MG63 [J]. *J Cell Physiol*, 2016, doi: 10.1002/jcp.25366, [Epub ahead of print].
- 12 靳波, 徐盈斌, 刘旭盛. 酸性成纤维细胞生长因子生物学特性及其应用研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2010, 5(1): 117-121.
- 13 Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, et al. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(6): 1598-1608.
- 14 Biver E, Soubrier AS, Thouverey C, et al. Fibroblast growth factor 2 inhibits up-regulation of bone morphogenic proteins and their receptors during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(4): 737-742.
- 15 张磊, 肖扬, 吴震东, 等. cAMP/PKA 信号通路介导人脂肪干细胞成骨分化的体外试验[J]. *临床骨科杂志*, 2010, 13(5): 556-558.
- 16 Li L, Dong Q, Wang Y, et al. Hedgehog signaling is involved in the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1641-1650.
- 17 Ye G, Li C, Xiang X, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces PDLSCs osteogenic differentiation through the ERK and p38 signal pathways [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(10): 1065-1072.
- 18 Gu H, Huang Z, Yin X, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(1): 112-121.
- 19 王伟, 陈磊杰, 张晨, 等. 不同浓度地塞米松诱导脂肪干细胞成骨分化的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(12): 1486-1492.
- 20 汪亮, 刘耀升, 刘蜀彬. 糖皮质激素诱导股骨头坏死发病机制的研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2015, 10(5): 439-445.
- 21 黎洪棉, 高建华, 余元龙, 等. 大鼠脂肪干细胞定向分化为成骨细胞及体外增殖过程中地塞米松的抑制性干预[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(36): 7025-7028.
- 22 陈犹白, 陈聪慧, Qixu Zhang, 等. 脂肪干细胞表型和标记物的研究进展[J]. *中国美容医学*, 2016, 25(3): 91-100.
- 23 Correia CR, Pirraco RP, Cerqueira MT, et al. Semipermeable Capsules Wrapping a Multifunctional and Self-regulated Co-culture Microenvironment for Osteogenic Differentiation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21883.
- 24 夏琰, 周潘宇, 许硕贵. 生物材料与支架在骨组织工程领域的研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2012, 7(5): 516-519.
- 25 吕成奇, 陆家瑜, 于佳, 等. 自撑式石墨烯水凝胶诱导人脂肪干细胞成骨分化的体外研究[J]. *口腔医学*, 2014, 34(7): 486-491.
- 26 金光辉, 张馨雯, 孙晓飞, 等. 组织工程化纳米羟基磷灰石/聚己内酯人工骨支架修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2015, 10(1): 43-49.
- 27 Laschke MW, Schank TE, Scheuer C, et al. In vitro osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids impairs their in vivo vascularization capacity inside implanted porous polyurethane scaffolds [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(10): 4226-4235.
- 28 Zanetti AS, Sabliov C, Gimble JM, et al. Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: a review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2013, 101(1): 187-199.
- 29 张园园, 刘真, 贾赤宇. 脂肪干细胞在促进移植皮瓣血管化中的研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2015, 10(5): 446-449.
- 30 Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4): 701-709.
- 31 肖建红, 张阳春, 张常然, 等. 人皮下脂肪干细胞的成骨、成脂分化诱导及鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(32): 5155-5161.
- 32 Bagnaninchi PO, Drummond N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6462-6467.
- 33 Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation [J]. *Methods*, 2008, 45(2): 115-120.
- 34 Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells [J]. *Ann Plast Surg*, 2008, 60(5): 538-544.
- 35 相新新, 赵晶, 李茵, 等. 脂肪干细胞定向分化的影响因素[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(5): 341-346.
- 36 李冬松, 李叔强, 蔡波, 等. 高糖及糖基化终末产物对人脂肪干细胞成骨分化能力的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14): 2657-2660.
- 37 Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential [J]. *Cytherapy*, 2003, 5(5): 362-369.
- 38 黄成龙, 肖金刚. 脂肪干细胞成骨分化及与复合支架结合: 在修复骨质疏松症骨缺损中的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(41): 6696-6702.
- 39 López M, Bollag RJ, Yu JC, et al. Chemically Defined and Xeno-Free Cryopreservation of Human Adipose-Derived Stem Cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152161.
- 40 孙天骏, 韩焱福, 柴家科, 等. 腺病毒介导血管内皮细胞生长因子基因体外转染人脐带间充质干细胞[J/CD]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2010, 5(2): 176-185.
- 41 李冬松, 蔡波, 刘建国, 等. 血管内皮生长因子对脂肪干细胞成骨分化基因转录水平的调节[J/CD]. *中华关节外科杂志: 电子版*, 2012, 6(4): 574-580.
- 42 李冬松, 李叔强, 蔡波, 等. 血管内皮生长因子基因修饰脂肪干细胞对糖尿病骨质疏松性骨缺损的修复作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(2): 193.
- 43 Bakker AD, Jaspers RT. IL-6 and IGF-1 Signaling Within and Between Muscle and Bone: How Important is the mTOR Pathway for Bone Metabolism? [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(3): 131-139.
- 44 张楠, 洪雷, 张喜, 等. 转化生长因子- β 在病理性瘢痕形成方

- 面的作用的研究进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2014, 9(5): 545-549.
- 45 潘玮敏, 刘民, 杨建昌, 等. LIM 矿化蛋白 1/低氧诱导因子 1 α 慢病毒载体转染脂肪源性干细胞的成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5140-5147.
 - 46 张庆富, 高学坡. 促炎性白细胞介素在烧伤炎症反应中的作用[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2015, 10(5): 427-430.
 - 47 吴小莹, 杨斌. 脑源性神经营养因子与骨/牙组织发育代谢: 促成或抑制细胞的增殖与分化? [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2): 283-288.
 - 48 Taskiran D, Evren V. Stimulatory effect of 17 β -estradiol on osteogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived stem cells[J]. Gen Physiol Biophys, 2011, 30(2): 167-174.
 - 49 张清彬, 张兆强, 郑日成. Leptin 对人牙周膜细胞骨向分化作用的实验研究[J]. 北京口腔医学, 2012, 20(2): 77-79.
 - 50 Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor[J]. Iran Biomed J, 2008, 12(3): 133-141.
 - 51 胡新永, 吕原, 杨华清, 等. 糖皮质激素对膝关节周围成骨细胞一氧化氮酶和骨重建的影响[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2008, 3(4): 439-444.
 - 52 Hsu LW, Goto S, Nakano T, et al. The effect of exogenous histone H1 on rat adipose-derived stem cell proliferation, migration, and osteogenic differentiation in vitro [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(10): 3417-3425.
 - 53 李娜, 陈刚, 刘珏, 等. 曲古抑菌素 A 对大鼠脂肪干细胞在二维及三维培养下早期骨向分化的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(4): 472-477.
 - 54 Dosier CR, Erdman CP, Park JH, et al. Resveratrol effect on osteogenic differentiation of rat and human adipose derived stem cells in a 3-D culture environment [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2012, 11: 112-122.
 - 55 杨玮, 徐道华, 周晨慧, 等. 小檗碱对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1560-1563.
 - 56 Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, et al. Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 447(1): 139-144.
 - 57 刘家寅, 刘光源, 田发明, 等. 辛伐他汀通过 p38MAPK 信号通路诱导 BMSCs 成骨分化的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2): 125-130, 149.
 - 58 Wang J, Xiang B, Deng J, et al. Inhibition of Viability, Proliferation, Cytokines Secretion, Surface Antigen Expression, and Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells by Seven-Day Exposure to 0.5 T Static Magnetic Fields [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 7168175.
 - 59 江淳, 郭洪劲, 许涛, 等. 低强度脉冲超声波对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(6): 408-412.
 - 60 张鹏, 房兵, 俞创奇, 等. 持续张应力大鼠骨髓基质干细胞骨向分化影响的基因芯片分析[J]. 医用生物力学, 2014, 29(1): 14-19.
 - 61 Chen J, Deng S, Zhang S, et al. The role of miRNAs in the differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(3): 268-279.
 - 62 Haimi S, Gorianc G, Moimas L, et al. Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation [J]. Acta Biomater, 2009, 5(8): 3122-3131.
 - 63 谷辉杰, 巩伦理, 张昀, 等. 镁黄长石浸提液影响人脂肪干细胞增殖和成骨分化的实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2010, 6(6): 301-305.
 - 64 Zheng C, Wang J, Liu Y, et al. Functional Selenium Nanoparticles Enhanced Stem Cell Osteoblastic Differentiation through BMP Signaling Pathways [J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(43): 6872-6883.
 - 65 邹国友, 郑闽前, 贾伟涛, 等. 富血小板血浆与透明质酸钠关节腔内注射治疗膝关节炎的疗效比较[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2014, 9(6): 630-633.
 - 66 Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, et al. The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation [J]. Iran Biomed J, 2014, 18(3): 151-157.
 - 67 胡钟旭, 李东卿, 李贵涛, 等. 富血小板血浆联合骨髓间充质干细胞治疗家兔股骨头缺血坏死的研究[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2014, 9(1): 22-26.
 - 68 黄长智, 杨效宁, 刘大诚, 等. 降钙素基因相关肽诱导藻酸钙凝胶复合脂肪干细胞的成骨细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(42): 7356-7362.
 - 69 李玲慧, 詹红生, 丁道芳, 等. 左归丸和右归丸对大鼠脂肪干细胞增殖及成骨分化影响的比较[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(11): 1146-1151.
 - 70 罗志军, 黎洪棉, 王和庚, 等. 人参皂苷 Rb1 对体外培养人脂肪干细胞增殖与成骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(32): 5799-5805.
 - 71 Su SJ, Chang KL, Su SH, et al. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line [J]. Int J Food Sci Nutr, 2013, 64(4): 429-436.
 - 72 陈犹白, 陈聪慧, Qixu Zhang, 等. 脂肪干细胞的分离、纯化和保存: 研究进展和发展方向 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(10): 1508-1520.
 - 73 New SE, Alvarez-Gonzalez C, Vagaska B, et al. A matter of identity-Phenotype and differentiation potential of human somatic stem cells [J]. Stem Cell Res, 2015, 15(1): 1-13.

(收稿日期:2016-02-01)

(本文编辑:谷俊朝)

陈犹白, 陈聪慧, Qixu Zhang, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2016, 11(2): 126-134.