

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.002

文章编号: 1005-8982(2019)03-0008-07

不同培养方法对小鼠脂肪干细胞成骨分化的影响*

郝宇卉¹, 李美宁², 张凯丽², 杨丽红², 刘志贞²

(1. 忻州职业技术学院 医学系, 山西 忻州 034000; 2. 山西医科大学
生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001)

摘要: **目的** 比较组织块贴壁法及胶原酶消化法所得脂肪干细胞的成骨分化能力。**方法** 分别采用组织块贴壁法及胶原酶消化法原代培养小鼠脂肪干细胞, 观察细胞形态及细胞增殖情况, 并进行细胞鉴定, 比较两者成骨分化能力。**结果** 两种方法所得脂肪干细胞在形态学上无差异, 培养至第3代, 细胞生长状态良好, 生物学特性稳定, CD44、Sca-1 表达率 >90%, CD31 表达率 <10%, 具有较好的成脂、成骨分化能力; 组织块贴壁法培养所得脂肪干细胞增殖率高于胶原酶消化法 ($P < 0.05$); 组织块贴壁法培养所得脂肪干细胞矿化结节、ALP 活性及钙离子浓度高于胶原酶消化法 ($P < 0.05$)。**结论** 组织块贴壁法相对胶原酶消化法在脂肪干细胞培养及成骨诱导分化过程中更具优势。

关键词: 脂肪干细胞 / 干细胞; 组织块贴壁法 / 细胞培养技术; 胶原酶消化法 / 细胞培养技术; 成脂分化; 成骨分化; 小鼠

中图分类号: R68; R34

文献标识码: A

Influence of different culture methods on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells*

Yu-hui Hao¹, Mei-ning Li², Kai-li Zhang², Li-hong Yang², Zhi-zhen Liu²

(1. Department of Medicine, Xinzhou Vocational and Technical College, Xinzhou, Shanxi 034000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: Objectives To investigate the influence of different culture methods on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. **Methods** Adipose-derived stem cells (ASCs) were cultured by tissue cultivation (group A) or collagenase digestion method (group B). Morphology and cell proliferation of ASCs were observed. ASCs were identified, and osteogenic differentiation capacity was compared. **Results** No morphological differences were found among groups. ASCs grew well with stable biological property. Expression rate of CD44 and Sca-1 is greater than 90%, and the expression rate of CD31 is less than 10% in the third generation. Both cells were presented with fine adipogenic and osteogenic differentiation capacity. The proliferation rate of ACSs in group A was significantly increased than that in group B ($P < 0.05$). Furthermore, mineralized nodule, ALP activity and concentration of calcium ion of ASCs in group A were enhanced than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusions** Tissue cultivation method exerts better advantages in ACSs culture and osteogenic differentiation compared with collagenase digestion method.

Keywords: adipose-derived stem cells/stem cells; tissue cultivation method/cell culture techniques; collagenase digestion method/cell culture techniques; osteogenic differentiation; adipogenic differentiation; mice

收稿日期: 2018-07-04

* 基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目 (No: 20160051); 山西省忻州市科技计划项目 (No: 20180103)

[通信作者] 刘志贞, E-mail: zhizhenliu2013@163.com

由于骨组织再生能力极其有限,骨损伤修复成为目前临床医学、药学等领域研究的热点与难点。骨组织工程学是在探索骨损伤修复治疗模式基础上发展起来的一门新兴学科,其包括三大要素,即种子细胞、支架及诱导因子,其中种子细胞是骨损伤修复治疗的基础^[1-2]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其组织来源丰富,免疫原性低,具有较强的增殖与分化潜能和免疫调节作用,逐渐成为较为理想的种子细胞,在骨损伤修复领域取得较大研究进展^[3-4]。脂肪干细胞是来源于脂肪组织的MSCs,相对于其他组织来源的MSCs,脂肪干细胞取材更为方便,创伤小,可极大降低实验成本。此外,脂肪组织中脂肪干细胞含量丰富,具有极强的增殖分化能力,可分化为成骨细胞,较易体外培养,适合作为骨组织工程学的种子细胞^[5-7]。研究发现,脂肪干细胞在治疗骨缺损和骨折中具有显著效果^[8-9]。原代脂肪干细胞体外培养方法有多种,常用的方法包括胶原酶消化法和组织块贴壁法^[10],不同培养方法对脂肪干细胞成骨分化是否有影响,目前尚无定论。本实验分别采用胶原酶消化法和组织块贴壁法对小鼠脂肪干细胞进行体外培养,对两种方法所得细胞进行鉴定并对其增殖能力、成骨分化能力进行比较,以期寻找更适合体外培养脂肪干细胞的方法,为骨组织损伤修复研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与仪器

无特定病原体(SPF)级6~8周龄雌性BALB/c小鼠8只,体重20~25g,购自山西医科大学实验动物中心。L-DMEM培养基(美国Gibco公司)、10%胎牛血清(美国Gibco公司)、青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司)、EDTA(美国Gibco公司)、TRYPsin 1:250(北京索莱宝科技有限公司),成脂诱导培养基组合、成骨诱导培养基组合(广州赛业生物科技有限公司),Anti-Ly-6A/E(Sca-1)PE、Anti-CD44 PE、Anti-CD31(PECAM) FITC(美国eBioscience公司),磷酸盐缓冲溶液(PBS)粉剂(北京索莱宝科技有限公司),I型胶原酶、油红O染液、茜素红染液(美国Sigma公司),碱性磷酸酶试剂盒-ALP(金氏法)(北京北化康泰临床试剂有限公司),钙含量比色检测分析试剂盒(美国Bio Vision公司),其余试剂如多聚甲醛、CCK-8试剂盒、二甲基亚砜、生理盐水均购自上海生工生物工程股份有限公司,为

国产分析纯。

低温冰箱(合肥中科美菱低温科技有限责任公司),恒温水浴箱(上海应用恒温设备厂),电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),超纯水制备仪(美国Millipore公司),外科手术器械(上海医疗器械厂),移液器(北京吉尔森科技有限公司),超净工作台(安徽航天生物科技),流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),细胞培养箱(美国Thermo公司),普通光学显微镜(德国Leica公司),其他耗材如EP管、离心管、细胞培养皿、培养瓶等均购自美国Corning公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脂肪干细胞的分离与培养 脱颈处死实验小鼠,常规脱毛备皮,固定于实验台上,消毒皮肤,沿腹股沟、腹白线剪开皮肤,暴露皮下组织,仔细剥离腹部、腹股沟皮下脂肪组织,收集于盛PBS液(含双抗)的培养皿中,皿置于冰上。

组织块贴壁法:将分离的脂肪组织用手术剪剪碎成1 mm × 1 mm × 1 mm,用含双抗的PBS冲洗组织块3次,将组织块按一定间距转入L-DMEM培养基预处理过的T25细胞培养瓶,静置30~40 min,加入少量L-DMEM培养基(含10%胎牛血清,1%青链霉素),置于37℃ 5%二氧化碳CO₂恒温培养箱内培养,观察细胞贴壁情况,定期更换培养液,待细胞融合达90%后进行传代。

胶原酶消化法:将收集的脂肪组织剪碎成1 mm × 1 mm × 1 mm,加入适量0.075% I型胶原酶,37℃恒温水浴50 min,等体积L-DMEM培养基终止消化,离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清液,L-DMEM培养基(含10%胎牛血清,1%青链霉素)重悬,过滤,等量接种于T25细胞培养瓶,置于37℃ 5% CO₂的恒温培养箱内培养,观察细胞生长情况,定期换液,待细胞融合达90%后,进行传代培养。

1.2.2 脂肪干细胞形态观察 称取同等重量的脂肪组织,分别用上述两种方法培养,选择第3代生长状态较好的细胞,显微镜下观察细胞形态并计数。脂肪干细胞形态类似成纤维细胞,呈长梭形,胞浆丰富,核偏大,贴壁生长,呈旋涡状。

1.2.3 脂肪干细胞生长曲线分析 分别取上述两种培养方法所得生长状态良好的第3代脂肪干细胞,胰酶消化后制备成单细胞悬液,细胞计数仪计数,调整细胞浓度均以1 × 10⁴个/孔接种到24孔板,对照组不

接种细胞加入等量细胞培养液。采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况,按说明书进行操作,连续 7 d,每天检测 1 个 24 孔板,酶标仪检测光密度 (OD) 值,绘制这两种不同培养方法所得细胞的生长曲线。

1.2.4 脂肪干细胞表面标志物检测 分别取上述两种培养方法下生长状态良好的第 3 代细胞进行细胞表面标志物 Sca-1、CD44、CD31 检测。将细胞用胰酶消化后制备成单细胞悬液,细胞计数仪计数,调整细胞浓度为 3×10^7 个/ml,各取 50 μ l 细胞悬液到流式管中,分别加入 50 μ l 稀释好的待检抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,每管加入缓冲液 2 ml,离心 (1 000 r/min, 5 min),弃上清,PBS 冲洗,0.2 ml 缓冲液重悬细胞后采用流式细胞仪进行分析检测。

1.2.5 脂肪干细胞成脂诱导分化能力检测 分别选取上述两种培养方法所得第 3 代细胞,胰酶消化后制备成细胞悬液,两组分设阴性对照组,继续用 L-DMEM 培养;两种培养方法的诱导组以 2×10^5 个/ cm^3 密度分别接种于 2 个 6 孔板,每孔加等量 L-DMEM 培养基,观察细胞生长情况,待细胞长满时换等量成脂分化诱导培养基 A 液,培养 3 d 换成脂分化诱导培养基 B 液,培养 24 h 后再换为等量 A 液,如此循环,10 d 后显微镜下观察脂滴形成情况,再换为 B 液培养 3 d,去培养基,PBS 清洗细胞,4% 多聚甲醛固定,PBS 清洗,油红 O 染色 40 min,PBS 洗去染液,显微镜下观察。

1.2.6 脂肪干细胞成骨诱导分化能力检测 分别取上述两种培养方法所得生长状态良好的第 3 代细胞,胰酶消化后制备成细胞悬液,以 3×10^5 个/ cm^3 密度接种于明胶预处理过的 6 孔板,阴性对照组加入 L-DMEM 培养,诱导组加入成骨诱导液 2 ml,每 3 天换液 1 次,诱导培养 15 d 后,弃培养基,PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛固定,室温放置 30 min,PBS 洗涤 2 次,茜素红染液染色 20 min,PBS 洗涤。显微镜下观察细胞成骨分化情况,分别选取 5 个不同视野拍照,用于图像分析,采集矿化结节面积、视野面积。应用公式 (矿化结节面积 / 视野面积 \times 100%) 计算矿化面积百分比。

1.2.7 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测 分别取成骨诱导培养 15 d 的两组细胞,弃培养液,PBS 洗涤细胞,超声细胞破碎仪裂解细胞,离心 (3 000 r/min, 10 min),取上清液,按照 ALP 说明书操作,首先绘制标准曲线,每组样本均稀释 10 倍,分 5 份在 520 nm 波长下测定 OD 值,通过标准曲线获得每一份样本浓度并乘以稀释倍数,计算出各组 ALP 活性浓度。

1.2.8 钙离子浓度检测 分别取成骨诱导培养 15 d 的两组细胞,培养液中加入 0.5 mol/L HCl 常温下过夜,使细胞中钙盐分解为钙离子。两组样本各分 5 份,按钙含量比色检测分析试剂盒说明书要求进行操作。首先通过标准曲线 OD 值获得钙含量值 (μ g/well),再通过公式 $C=Sa/Sv$ (mg/dl) 计算出钙离子浓度。

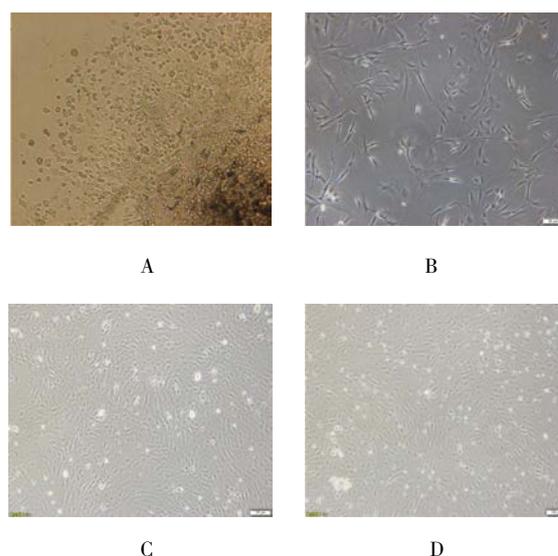
1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件、Image Pro Plus 6.0 软件和 Prism 5 作图软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验或重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂肪干细胞形态比较

组织块贴壁法培养脂肪干细胞,第 3 天时,组织块边缘开始出现少量细胞,贴壁生长,呈短梭形、多角形或者圆形 (见图 1A);培养第 10 天,细胞生长迅速,融合达 80%。胶原酶消化法培养脂肪干细胞,第 20 小时,细胞开始逐渐贴壁生长,第 3 天,细胞生长增快,呈短梭形、三角形 (见图 1B),培养第 7 天,细胞融合达 80% 左右。两种方法所得脂肪干细胞,传代后生长迅速,传至第 3 代,可见细胞形态均一,均呈长梭形,漩涡样生长 (见图 1C、1D)。培养至第 10 代,细胞均开始老化,形态出现变化。



A: 组织块贴壁法培养第 3 天细胞 ($\times 100$); B: 胶原酶消化法培养第 3 天细胞 ($\times 200$); C: 组织块贴壁法培养传代至第 3 代细胞 ($\times 100$); D: 胶原酶消化法培养传代至第 3 代细胞 ($\times 100$)

图 1 脂肪干细胞生长情况

2.2 脂肪干细胞生长曲线比较

两种方法所得的脂肪干细胞在第 4、5、6 和 7 天的增殖情况进行比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①各时间点的增殖情况有差异 ($F=0.562, P=0.000$)。②两种培养方法所得细胞的增殖情况有差异

($F=0.221, P=0.000$), 从第 4 天开始, 组织块贴壁法培养所得细胞的增殖情况高于胶原酶消化法。③两种培养方法所得细胞增殖的变化趋势有差异 ($F=0.613, P=0.000$)。从生长曲线可以看出, 细胞生长具有滞留期、对数生长期和平台期。见附表和图 2。

附表 两种方法所得脂肪干细胞各时间点的增殖状况比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

方法	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
组织块贴壁法	0.51 ± 0.49	0.72 ± 0.67	0.80 ± 0.74	0.82 ± 0.67
胶原酶消化法	0.39 ± 0.37	0.56 ± 0.56	0.60 ± 0.54	0.61 ± 0.59

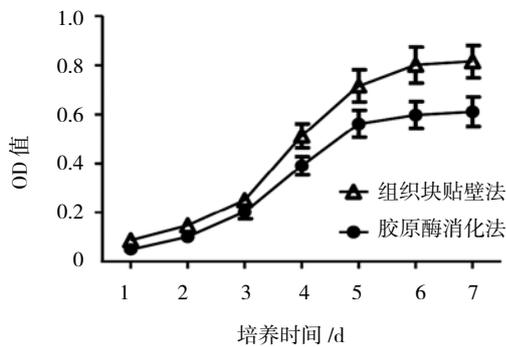


图 2 两种方法所得脂肪干细胞生长曲线 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 脂肪干细胞表面标志物检测结果

组织块贴壁法所得脂肪干细胞 CD44 表达率为 98.57%, Sca-1 表达率为 95.16%, CD31 表达率为 7.09%。胶原酶消化法所得脂肪干细胞 CD44 表达率

为 95.83%, Sca-1 表达率为 92.72%, CD31 表达率为 7.04%。见图 3。

2.4 脂肪干细胞成脂诱导结果

从第 5 天开始可见脂滴形成, 第 7 ~ 9 天, 脂滴形成量增多, 呈融合趋势, 油红 O 染色呈阳性, 阴性对照组染色为阴性, 证实所培养细胞为脂肪干细胞。见图 4。

2.5 脂肪干细胞成骨诱导结果

诱导 15 d 后, 阴性对照组茜素红染色阴性, 诱导组可见矿化结节形成, 茜素红染色后证实为矿化结节。组织块贴壁法培养所得脂肪干细胞矿化面积百分率 [$(30.10 \pm 2.03)\%$] 高于胶原酶消化法 [$(12.03 \pm 1.22)\%$], 差异有统计学意义 ($t=17.071, P=0.000$)。见图 5。

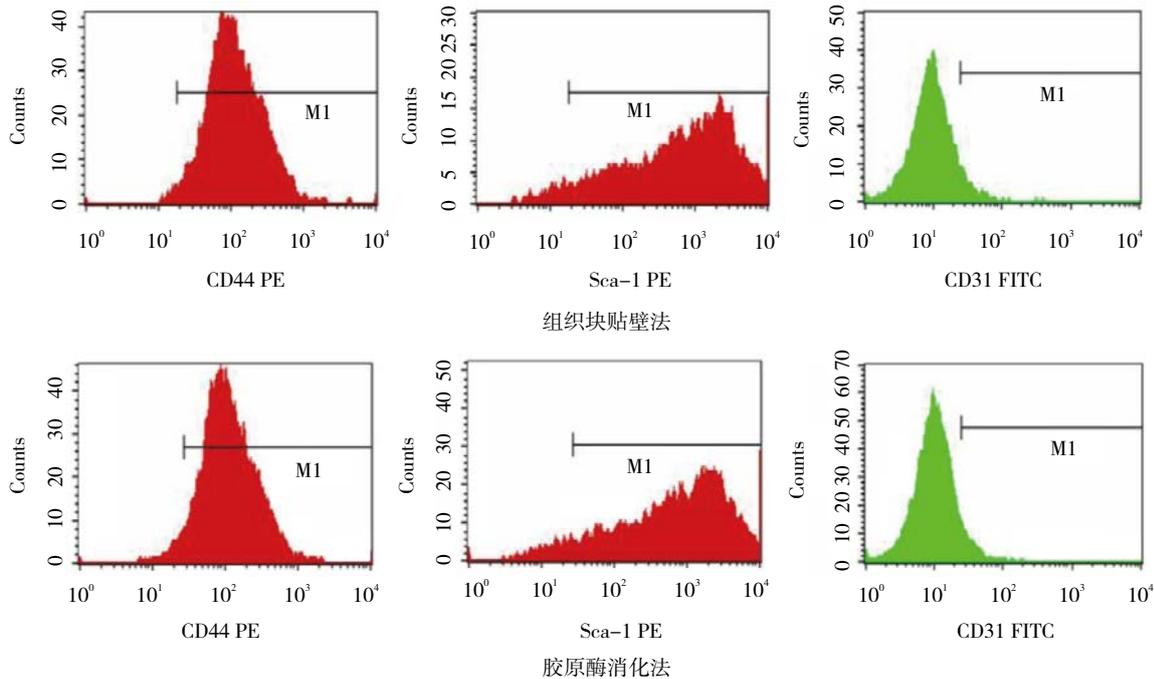
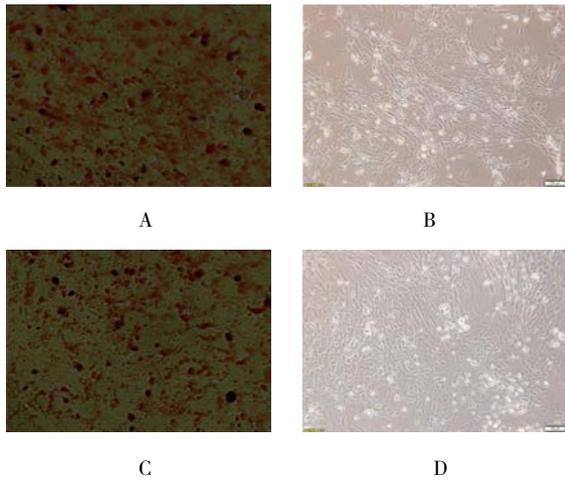
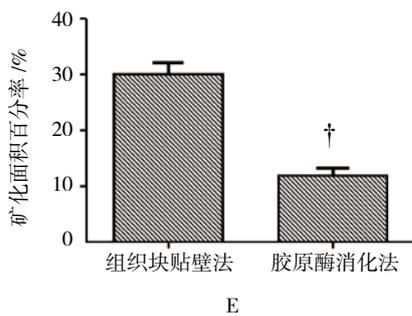
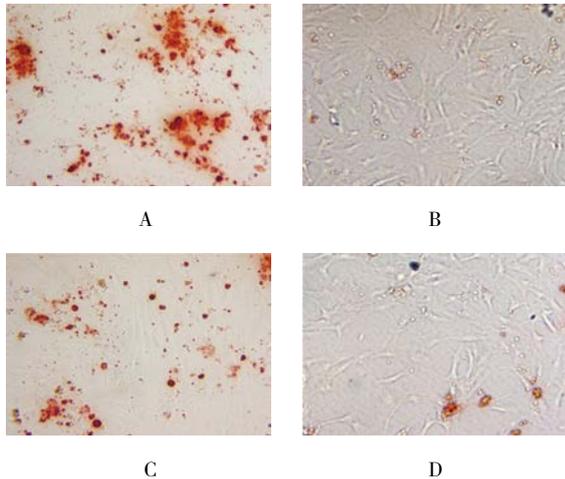


图 3 两种方法所得脂肪干细胞表面标志物检测结果



A: 组织块贴壁法诱导组; B: 组织块贴壁法阴性对照组; C: 胶原酶消化法诱导组; D: 胶原酶消化法阴性对照组

图 4 两种方法所得脂肪干细胞成脂分化结果 (×100)



A: 组织块贴壁法诱导组 (×100); B: 组织块贴壁法阴性对照组 (×200); C: 胶原酶消化法诱导组 (×100); D: 胶原酶消化法阴性对照组 (×200); E: 两组成骨分化矿化面积百分率比较。†与组织块贴壁法比较, $P < 0.05$

图 5 两种方法所得脂肪干细胞成骨分化结果

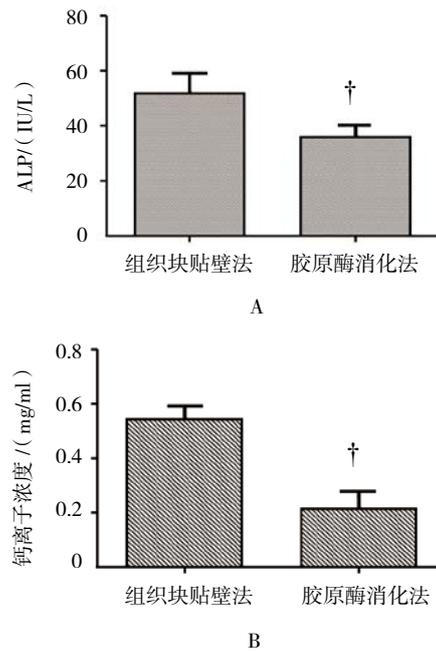
2.6 脂肪干细胞 ALP 活性检测结果

成骨诱导培养第 14 天后, 两种培养方法所得脂肪干细胞 ALP 活性比较, 差异有统计学意义 ($t = 4.338$,

$P = 0.002$), 与胶原酶消化法比较, 组织块贴壁法所得脂肪干细胞 ALP 活性更高, 见图 6A。

2.7 脂肪干细胞钙离子浓度检测结果

成骨诱导培养第 14 天后, 两种培养方法所得脂肪干细胞培养液中钙离子浓度比较, 差异有统计学意义 ($t = 9.430$, $P = 0.000$), 与胶原酶消化法比较, 组织块贴壁法所得细胞培养液中钙离子浓度活性更高。见图 6B。



A: ALP 活性检测; B: 钙离子浓度检测。†与组织块贴壁法比较, $P < 0.05$

图 6 两种方法所得脂肪干细胞成骨分化能力检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

脂肪干细胞作为骨损伤修复的种子细胞, 在细胞治疗领域有很大潜能^[11-19]。但关于不同培养方法对其成骨分化能力的影响, 目前鲜有报道。骨损伤定义为由于各种因素包括感染、外伤、肿瘤等引起的骨质破坏与缺损^[20]。由于骨的再生能力极其有限, 骨损伤修复成为骨科医学、再生医学等研究的热点与难点^[21-22]。近年来, 骨组织工程的兴起为骨损伤修复研究带来曙光, 种子细胞作为骨组织工程学研究的重要基础, 受到众研究学者的青睐^[23]。脂肪干细胞因其取材方便, 创伤小, 实验成本低, 体外较易培养及强大的增殖分化能力, 包括成骨分化能力, 逐渐成为骨组织工程较理想的种子细胞^[24-25]。实验研究发现, 脂肪干细胞可

通过归巢机制修复骨质疏松小鼠骨损伤, 并可修复不同病理状态下的软骨损伤, 定向分化为成软骨细胞, 促进骨损伤修复^[18-9, 26]。

原代脂肪干细胞的培养主要包括组织块贴壁法和酶消化法, 本研究结果发现两种培养方法所得细胞形态一致, 生物学特性稳定, 均高表达 CD44、Sca-1, 弱表达 CD31, 在诱导剂作用下, 可定向分化为成脂细胞、成骨细胞, 因此证实所培养细胞为脂肪干细胞。并且组织块贴壁法培养所得脂肪干细胞比胶原酶消化法细胞增殖更快, 表明前者具有更强的增殖能力。

脂肪干细胞成骨分化的过程大致分为 2 个阶段, 首先, 脂肪干细胞分化为成骨细胞, 其次, 成骨细胞进行增殖并分泌骨基质, 骨基质钙化成骨, 全程大约需要 2~3 周。ALP 是成骨细胞早期分化的标志酶, 其促进成骨细胞钙和磷的沉积。通常认为, ALP 是成骨细胞外基质成熟的早期标志物, 因而研究中常用该酶的活性体现成骨细胞的存在和分化程度^[27]。成骨细胞是促进骨矿化的主要细胞, 可分泌 ALP 和钙盐结晶体至细胞外基质, 促使基质矿化, 而矿化则是细胞进一步分化成熟的表现。因此检测细胞外基质中 ALP 活性及钙离子浓度可间接反应脂肪干细胞成骨分化能力。脂肪干细胞成骨分化过程受多种因素影响, 包括供体因素、实验因素、生长因子、理化因素等^[28]。在本研究中, 组织块贴壁法培养所得脂肪干细胞成骨诱导分化 15 d 后, 所形成矿化面积百分比高于胶原酶消化法, 其次, ALP 活性在组织块法所得脂肪干细胞成骨诱导分化 15 d 后活性高于胶原酶消化法, 细胞外基质中钙离子浓度亦然。以上结果均表明, 组织块贴壁法相对胶原酶消化法在脂肪干细胞培养及成骨诱导分化过程中更具优势。

胶原酶消化法的优点是接种细胞数可定量, 培养细胞纯度高; 但其缺点是取材量大、酶对细胞的损伤不好控制、操作步骤多, 影响因素多, 耗时长。组织块贴壁法缺点是分离纯度不是很理想, 接种细胞数不能定量; 但其优点是经济, 取材量较酶消化法少, 操作简单, 影响因素少, 可避免酶对组织细胞的损害。结合本次实验结果, 本研究认为组织块贴壁法更适合体外脂肪干细胞成骨诱导分化研究。

参 考 文 献:

- [1] MITIĆ Ž, STOLIĆ A, STOJANOVIĆ S, et al. Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: a review[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017, 79: 930-949.
- [2] TANNER K E. Bioactive composites for bone tissue engineering[J]. Proc Inst Mech Eng H, 2010, 224(12): 1359-1372.
- [3] GIANNELLI M, CHELLINI F, SASSOLI C, et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(1): 172-181.
- [4] EL-BADRI N S. The mesenchymal stem cell advantage[J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(4): 473-474.
- [5] PHILIPS B J, MARRA K G, RUBIN J P. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(2): 155-163.
- [6] RAMOS T V, WANG T, MAKI C B, et al. Adipose stem cell side population in the mouse[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(6): 430-441.
- [7] NORDBERG R C, LOBOA E G. Our fat future: Translating adipose stem cell therapy[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(9): 974-979.
- [8] BARBA M, DI TARANTO G D, LATTANZI W. Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration[J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(6): 677-689.
- [9] WANG Z, LI Z, DAI T, et al. Addition of adipose-derived stem cells to mesenchymal stem cell sheets improves bone formation at an ectopic site[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 1-10
- [10] TIRKKONEN L, HALONEN H, HYTTINEN J, et al. The effects of vibration loading on adipose stem cell number, viability and differentiation towards bone-forming cells[J]. J R Soc Interface, 2011, 8(65): 1736-1747.
- [11] ZANETTI A S, MC CANDLESS G T, CHAN J Y, et al. In vitro human adipose-derived stromal/stem cells osteogenesis in akermanite: poly-ε-caprolactone scaffolds[J]. Journal of Biomaterials Applications, 2013 Mar, 28(7): 998-1007.
- [12] SAYIN E, RASHID R H, RODRÍGUEZ-CABELLO J C, et al. Human adipose derived stem cells are superior to human osteoblasts (HOB) in bone tissue engineering on a collagen-fibroin-ELR blend[J]. Bioact Mater, 2017, 2(2): 71-81.
- [13] WANG Y H, WU J Y, KONG S C, et al. Low power laser irradiation and human adipose-derived stem cell treatments promote bone regeneration in critical-sized calvarial defects in rats[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195337.
- [14] JEVOTOVSKY D S, ALFONSO A R, EINHORN T A, et al. Osteoarthritis and stem cell therapy in humans: a systematic review[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(6): 711-729.
- [15] WANG H J, CAI B, ZHAO X Y, et al. Repairing diabetic rats with bone defect by VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells[J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2017, 30(6): 545-551.
- [16] REZAI R M, BOHLOLI M, AKHAVAN R M, et al. Impact of tissue harvesting sites on the cellular behaviors of adipose-derived stem cells: Implication for bone tissue engineering[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 2156478-2156487.
- [17] TABATABAEI Q R, SHEYKHHASAN M. Adipose-derived

- stromal cell in regenerative medicine: a review[J]. *World J Stem Cells*, 2017, 9(8): 107-117.
- [18] SALEHI-NIK N, REZAI R M, KHEIRI L, et al. Buccal fat pad as a potential source of stem cells for bone regeneration: A literature review[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 8354640-8354653.
- [19] ZHANG C, LI M, ZHU J, et al. Enhanced bone repair induced by human adipose-derived stem cells on osteogenic extracellular matrix ornamented small intestinal submucosa[J]. *Regen Med*, 2017, 12(5): 541-552.
- [20] ORYAN A, MONAZZAH S, BIGHAM-SADEGH A. Bone injury and fracture healing biology[J]. *Biomed Environ Sci*, 2015, 28(1): 57-71.
- [21] HEALY K E, GULDBERG R E. Bone tissue engineering[J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2007, 7(4): 328-330.
- [22] LEVI B, PÉAULT B, JAMES A W. Bone tissue engineering and regeneration[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 137529-137531.
- [23] JADLOWIEC J A, CELIL A B, HOLLINGER J O. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(3): 409-423.
- [24] WANG X, WANG Y, GOU W, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review[J]. *Int Orthop*, 2013, 37(12): 2491-2498.
- [25] JURGENS W J, KROEZE R J, BANK R A, et al. Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(6): 853-860.
- [26] SHI Y, NIEDZINSKI J R, SAMANIEGO A, et al. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(13/14): 1313-1321.
- [27] LOU M, LI X H, RAO G Z. BMP-2, BGP mRNA expression quantity and ALP active change to rat bone marrow mesenchymal stem cell in vitro induction osteoblasts influence[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2008, 23(5): 28-31.
- [28] HUANG S J, FU R H, SHYU W C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4): 701-709.

(王荣兵 编辑)