



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.013

<http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201902201.pdf>

## 诱导脂肪干细胞成软骨分化的研究进展

纪晓琳<sup>1</sup>, 王慷慨<sup>2</sup>, 王念<sup>2</sup>

(中南大学 1. 湘雅医学院临床医学八年制, 长沙 410013; 2. 病理生理学系, 长沙 410078)

**[摘要]** 由创伤或其他病因引起的关节软骨病变通常难以自愈, 且目前临床上的治疗方法疗效欠佳。脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)是一种来自脂肪组织、具有多向分化潜能的干细胞, 基于ADSCs成软骨分化能力的组织工程学疗法为关节软骨缺损的修复再生提供了新的思路。体外诱导ADSCs分化成软骨的方法主要是采用生长因子和支架材料模拟体内微环境, 进而促进ADSCs向软骨细胞分化, 其相关应用已取得初步成功。

**[关键词]** 脂肪干细胞; 关节软骨; 组织工程; 生长因子; 三维培养

## Research advance in chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells

Ji Xiaolin<sup>1</sup>, Wang Kangkai<sup>2</sup>, Wang Nian<sup>2</sup>

(1. Eight-year Clinical Medicine Program, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013;

2. Department of Pathophysiology, Central South University, Changsha 410078, China)

### ABSTRACT

Articular cartilage lesions due to injury or other pathology are often difficult to heal, and the outcomes of the clinical treatment widely used today are far from satisfaction. Adipose-derived stem cells (ADSCs) are multipotent stem cells from adipose tissue. Tissue engineering based on the ability of ADSCs to differentiate into chondrocytes provides a new idea for the repair and regeneration of articular cartilage defects. The method for inducing the differentiation of ADSCs into chondrocytes in vitro who have been quite well established, which mainly include the use of growth factors and scaffolds to mimic the in vivo microenvironment, thereby promoting the differentiation of ADSCs into chondrocytes.

### KEY WORDS

adipose derived stem cells; articular cartilage; tissue engineering; growth factors; three-dimensional culture

收稿日期(Date of reception): 2018-02-28

第一作者(First author): 纪晓琳, Email: 3266388520@qq.com, ORCID: 0000-0002-5488-4097

通信作者(Corresponding author): 王念, Email: csuwangnian@163.com, ORCID:0000-0002-8303-0365; 王慷慨, Email: wangkangkai@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0001-9487-2376

关节软骨病变特别是膝关节病变的治疗一直是最具挑战性的临床难题之一<sup>[1]</sup>。关节软骨属于透明软骨,有缓冲机械应力和保证关节的灵活运动等重要功能。但成年人的关节软骨组织缺乏血管、神经,无淋巴回流<sup>[2]</sup>,并且组织细胞类型单一、高度分化,软骨细胞包埋于大量致密基质中,限制了其增殖、迁移能力<sup>[3]</sup>。因此,组织的自愈能力有限,即使较小的软骨损伤也可能导致骨关节炎,并发展为进行性炎症从而导致关节退化和运动能力丧失<sup>[4]</sup>。目前,手术治疗关节软骨损伤的方法主要包括软骨下钻孔、微骨折、磨削成形术、关节置换术和自体软骨细胞移植等<sup>[1-2,5]</sup>,但这些方法因受技术难度、组织整合差和发育形成纤维软骨的影响存在局限性<sup>[6]</sup>,而软骨组织工程为解决这些难题提供了新的思路。

软骨组织工程的主要目标是通过种子细胞、具有诱导分化能力的生物活性分子以及能为细胞生长创造适当环境的生物材料(如支架)的有效组合产生与天然软骨生物学功能相近的新透明软骨,实现组织结构和功能的再生<sup>[4]</sup>。种子细胞可来源于软骨细胞、胚胎干细胞或组织干细胞,是修复或替换受损组织的关键<sup>[7]</sup>,其中成体多功能干细胞的应用不涉及伦理问题,来源相对充足且增殖修复能力较强,成为较理想的研究对象。成体多功能干细胞中的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),特别是骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)一直备受关注。与BMSCs相比,脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)的组织来源丰富、取材方便、免疫排斥低、增殖快且具有多向分化潜能,已成为软骨组织工程研究的热点<sup>[4,8]</sup>。本文主要总结ADSCs的特性和成软骨分化过程,讨论ADSCs向软骨分化的主要影响因素,并展望未来的研究方向。

## 1 ADSCs概述

### 1.1 ADSCs的发现及特点

脂肪组织来自于胚胎发育期间的中胚层并且广泛存在于各种哺乳动物的全身各部位。2001年, Zuk等<sup>[9]</sup>从吸脂术获取的人类脂肪组织基质血管中首次分离得到了可在体外稳定增殖分化的成纤维细胞样细胞群,并将此类来源于脂肪组织的多能干细胞命名为ADSCs。目前研究所用的ADSCs主要来源于白色脂肪组织,其应用面广并且具有分化成中胚层其他类型组织的能力<sup>[10]</sup>。ADSCs在特异性诱导因子的作用下可分化为脂肪细胞、软骨细胞、成肌细胞和成骨细胞<sup>[9]</sup>。其还具有向神经、内皮、肝细胞样细胞、造血细胞分化的多向分化潜能,并且具有旁分泌功能,可合成并分泌各种生长因子、炎症因子、多肽、气

体分子等生物活性物质,发挥免疫调节、促进血管生成、造血支持等作用,并能招募其他细胞参与组织重建<sup>[9,11]</sup>。

### 1.2 ADSCs的优势

MSCs具有贴壁生长、表达特异性细胞表面抗原和多向分化潜能等特征<sup>[12]</sup>。BMSCs是软骨组织工程中研究最为深入的MSCs类型,可由骨髓抽吸物中分离获得,在特定培养条件下可向骨、软骨、肌、脂肪细胞谱系分化。与之相比,ADSCs的主要优点在于组织来源丰富且易获取<sup>[8]</sup>。

此外, BMSCs与ADSCs还有诸多异同之处。如骨髓和脂肪组织的贴壁细胞百分比相近,培养的ADSCs传代后形态上与BMSCs没有区别;但在相同培养条件下, BMSCs的细胞集落形成效率呈传代相关性下降, ADSCs则表现出更强的增殖率<sup>[2]</sup>。在细胞表型方面, ADSCs的细胞表型与BMSCs非常相似,二者在近50个标志分子中除CD146, CD49d, CD106和神经生长因子受体(nerve growth factor receptor, NGFR)外,其他表面抗原的表达无明显差异,都能够阳性表达CD13, CD29, CD44, CD73和CD90, 阴性表达造血谱系标志物c-kit, CD14, CD34, CD45, CD79, CD11b和人类白细胞抗原-DR(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)。但BMSCs与ADSCs有着不同的转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )受体库,且有着不同的转录和转录后调节网络<sup>[13-14]</sup>,导致二者诱导形成软骨时需要不同的生长因子刺激。在诱导成软骨分化的过程中,虽然在体外和体内实验<sup>[15]</sup>中BMSCs向软骨分化的能力更强,但ADSCs增殖更快,更能耐受缺血、缺氧的关节软骨微环境引起的凋亡;并且在疾病微环境中,与BMSCs相比ADSCs能够较好地维持其细胞状态(包括增殖分化潜能、能量代谢和抗氧化防御系统)不受疾病微环境的影响,从而保留了其抗炎能力,使ADSCs在病理环境中仍能发挥微环境调节作用<sup>[15]</sup>。此外, ADSCs的人类白细胞抗原-ABC(human leukocyte antigen-ABC, HLA-ABC)表达较BMSCs少,免疫排斥更低,因而更适用于同种异体移植<sup>[8,12]</sup>。髌下脂肪垫(infrapatellar fat pad, IPFP)来源的ADSCs(IPFP-derived stem cells, IPFSCs)在抗炎和抗衰老的能力方面具有一定优势,与取材于皮下脂肪组织的ADSCs相比,在软骨修复方面具有更好的应用前景<sup>[5,16]</sup>。

## 2 ADSCs成软骨分化的过程

研究<sup>[5]</sup>表明ADSCs的骨系分化和成脂分化相互关联,一旦ADSCs失去向脂肪细胞谱系分化的能

力,可能的分化方向有成骨细胞或软骨细胞,即二者有共同的祖细胞——骨-软骨祖细胞(osteochondral progenitors)。骨系诱导时,与ADSCs分化为骨-软骨祖细胞相关的转录因子Runx2从胞质转移到胞核,成脂分化相关转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )则保留在胞质中,故而骨系基因的表达增强,成脂基因的表达受到抑制。骨-软骨祖细胞的成软骨分化由Sox-9触发,其最终发育为成骨细胞或软骨细胞由Sox-9和Runx2二者的平衡严格控制: Sox-9使细胞保留软骨形态表型,而Runx2加速软骨细胞向肥大表型分化并被成骨细胞取代。骨-软骨祖细胞经诱导向软骨细胞方向分化后,细胞持续表达Sox-9,后者引发II型胶原(COL II)、IX型胶原(COL IX)、蛋白聚糖(ACAN)和软骨低聚基质蛋白(COMP)等软骨基质蛋白的表达。随后,成熟软骨细胞分泌一组细胞因子以维持Sox-9和其他成软骨标志物基因如COL II和ACAN的表达<sup>[5]</sup>。

### 3 诱导ADSCs成软骨分化的微环境

#### 3.1 生长因子

##### 3.1.1 生长因子类型

体外诱导ADSCs成软骨分化所需的分化培养基通常为含有一系列生长因子的混合物。其中,转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )是ADSCs成软骨分化培养基中最重要的组分,其在哺乳动物体内有3种亚型: TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2和- $\beta$ 3<sup>[5]</sup>。TGF- $\beta$ 通过与ADSCs表面受体结合,使I型受体即激活素受体激酶-5(activin receptor-like kinase-5, ALK-5)磷酸化,进而激活Smad通路,启动软骨特异性基因的转录<sup>[17]</sup>。TGF- $\beta$ 1具有双相作用: 在100 pg/mL~1 ng/mL的浓度范围内增强内皮细胞的增殖和侵袭效应,在5~10 ng/mL范围内抑制内皮细胞侵袭和毛细血管形成,诱导ADSCs的成软骨分化。TGF- $\beta$ 的3种亚型对ADSCs都有一定的成软骨诱导效应,但3种亚型诱导效应的不同之处暂无定论,目前研究<sup>[18]</sup>表明对ADSCs而言TGF- $\beta$ 1与TGF- $\beta$ 3的诱导效应并无显著差异。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是ADSCs成软骨分化培养基中另一种重要的生长因子。与BMSCs相比,ADSCs对TGF- $\beta$ 诱导形成软骨的应答较少,但通过添加BMP-6已经建立了68种有效的分化。实验<sup>[8]</sup>证明将500 ng/mL BMP-6加入分化培养基中,与未处理的对照组相比,ACAN基因的表达增加200倍,COL II基因的表达增加38倍。Knippenberg等<sup>[19]</sup>对BMP-2和BMP-7诱导ADSCs分化的能力进行了研究,发现BMP-7刺激ADSCs分化为软骨

形态表型,用BMP-2处理15 min则将ADSCs诱导到成骨谱系<sup>[5,8]</sup>。BMP-14是调控ADSCs成软骨分化过程中诱导能力最强的生长因子之一,在早期软骨形成至其后多个阶段中都发挥着作用,且在促进ACAN表达的同时能够抑制COL X型表达<sup>[5,8,20]</sup>。研究<sup>[21]</sup>证实腺病毒携带BMP-14基因转染ADSCs后细胞COL II和Sox-9基因表达水平均明显提高,修复软骨损伤的能力大幅提升。

胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)被认为是调节软骨形成和代谢最关键的细胞因子。IGF-1能够增加人关节软骨细胞中COL II和ACAN的表达,促进软骨细胞表达Sox-9并形成COL2A1,同时通过抑制蛋白酶(如基质金属蛋白酶等)的生成与释放而减少ACAN降解。有学者<sup>[22]</sup>推测IGF-1是通过下调肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂(TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK)基因的表达,抑制TWEAK-Fn 14信号通路,从而对软骨组织起到保护作用。

关于成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)-2诱导软骨形成的能力颇有争议。研究<sup>[8]</sup>证实配体与FGF受体1~4结合会激活丝裂原活化蛋白激酶/ERK激酶(MEK)、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),随后MAPK的激活会对激酶和转录因子的级联进行调节,最终上调Sox-9的表达。实验<sup>[23]</sup>表明在平面扩增期添加FGF-2能增强人类脂肪干细胞(human adipose derived stem cells, hADSCs)的成软骨分化;但也有研究<sup>[24]</sup>显示在生长因子联合诱导过程中FGF-2抑制了BMP-6诱导软骨形成的能力。Chiou等<sup>[25]</sup>发现用TGF- $\beta$ 1和FGF-2诱导的小鼠ADSCs沉淀培养物中COL II的表达增加。而Henning等<sup>[26]</sup>的研究结果显示在FGF-2和TGF- $\beta$ 3的联合诱导下未能在hADSCs中检测到COL II的表达。因此,FGF-2对于细胞增殖是必不可少的,但在分化阶段对软骨形成具有负面影响,并且FGF-2与不同生长因子联合诱导效果不同。对于MSCs而言,在扩增期细胞大量表达FGF受体1,FGF-2对其有强亲和力,故提高了MSCs的增殖速率与分化潜能;在细胞聚集期间,此受体表达减少,故在后期(3~14 d)加入FGF-2会对MSCs成软骨分化起抑制作用。然而,对于ADSCs,FGF-2产生双重效应的机制还有待探究<sup>[8]</sup>。

##### 3.1.2 诱导方式

利用外源生长因子诱导ADSCs成软骨分化又称为化学诱导,包括单一诱导和联合诱导。目前认为TGF- $\beta$ 1, 2, 3和BMP-2, 6, 7, 14单独使用就能使ADSCs向软骨方向分化。然而,有研究<sup>[24]</sup>显示虽然BMSCs能够受TGF- $\beta$ 单一诱导分化成软骨,ADSCs却还需要额外的生长因子刺激。其中TGF- $\beta$ 与BMP-6组

合使用能上调COL II和ACAN的表达, 并且产生的不良反应(如COL X的表达或其他肥大表型的上调等)最少。TGF- $\beta$ 与BMP-6具有协同效应是因为BMP-6能够诱导TGF- $\beta$ 1型受体表达, 而ADSCs通常不表达此受体。有实验<sup>[27]</sup>表明10 ng/mL TGF- $\beta$ 3与10 ng/mL BMP-6组合使用是诱导ADSCs成软骨分化的“黄金搭档”, 与单独使用TGF- $\beta$ 3相比能有效增强ADSCs的软骨分化潜能; 还有实验<sup>[28-29]</sup>使用2.5  $\mu$ g/mL的TGF- $\beta$ 2和2.5  $\mu$ g/mL的BMP-7复合壳聚糖/II型胶原支架搭载ADSCs进行动物体内软骨修复, 12周时缺损区已接近正常软骨; 而与单独使用TGF $\beta$ 1相比, TGF- $\beta$ 1和BMP-14联合诱导时COL X的表达水平下降<sup>[20]</sup>。

因应用外源性生长因子效率低、半衰期短, 有学者<sup>[28, 30-31]</sup>提出了一种长期稳定的诱导方式, 即利用基因转染上述生长因子的目的基因得到内源性生长因子, 通过分泌途径发挥作用。尽管基因操作可控制特定生长因子的分泌, 但由于软骨形成是由多种生长因子和其他信号分子协调操控的, 所以一次只能靶向一种基因限制了基因转染的应用潜力, 且由于各类生长因子的作用机制以及最佳剂量还处于探究阶段, 故也有研究采用ADSCs与软骨细胞共培养以营造类似于体内关节软骨的微环境。在共培养体系中, ADSCs对软骨细胞具有营养和调节作用从而促进软骨细胞增殖, 同时与软骨细胞的直接或间接接触能够促进ADSCs成软骨分化并抑制肥大表型的发生<sup>[20, 32-34]</sup>。实验<sup>[35-36]</sup>表明将软骨细胞与脂肪干细胞进行微球Transwell间接共培养, 当脂肪干细胞与关节软骨细胞比例为5:1时, 诱导效果可以与10 ng/mL TGF- $\beta$ 3+10 ng/mL BMP-6的生长因子诱导组相媲美, 并且可以抑制诱导后干细胞的早期肥大。

此外, 分化过程中ADSCs也会分泌这些生长因子, 成为能够刺激内源性软骨再生的旁分泌因子的潜在来源。然而, ADSCs分泌的物质也可抑制软骨修复, 如ADSCs大量分泌的血管内皮生长因子(VEGF)-A可增加软骨细胞中的基质金属蛋白酶的表达。因此, 为了有效地治疗软骨缺损, 如何增加软骨细胞增殖和软骨组织生成因子的分泌、限制肥大因子和VEGF的分泌成为研究的关键<sup>[18, 37]</sup>。

### 3.2 三维培养

虽然ADSCs在适当的诱导条件下可分化为软骨细胞, 但实验<sup>[38]</sup>发现软骨细胞在单层平面和二维表面上长期培养会发生去分化, 导致COL II等软骨细胞特异性基质的表达减少, 而成纤维细胞特异性基质COL I表达增加。此外, 单层培养时细胞特异性蛋白主要集中在胞内, 胞间积累较少, 软骨细胞的生长很快达到接触抑制, 细胞由圆形转变为梭形<sup>[39]</sup>。因

此, 除了适当的生长因子环境外, ADSCs还需要三维培养条件以将细胞维持在圆形状态, 这对软骨形成和预防成纤维细胞表型的出现至关重要。

三维立体培养采用具有各种物理化学和生物学特性的支架构建的三维模型, 其性质对细胞行为具有潜在的影响, 在ADSCs分化中起关键作用<sup>[40]</sup>。Yoon等<sup>[40]</sup>研究发现与单层培养相比, 三维培养增强了hADSCs的体外成软骨分化; 乔添柱<sup>[41]</sup>的实验证实了三维培养下ADSCs增殖明显快于平面培养组, 且三维培养组的生长曲线未见明显的平台期。这是因为软骨细胞分泌的胶原蛋白等胞外基质近乎完全包裹细胞以维持其圆形形态, 形成了一个更接近于体内生理微环境的体外微球体系细胞团。三维环境可能增强了hADSCs球体中的细胞间相互作用, 而基于干细胞的软骨修复治疗功效高度依赖于其与关节中局部细胞的相互作用<sup>[40]</sup>; 同时轻度缺氧的环境激活了缺氧相关的级联通路, 如p-p38, 蛋白激酶B(又称Akt)和低氧诱导因子-1a(hypoxia inducible factor-1a, HIF-1a)信号通路, 从而增强了Sox-9表达<sup>[40-43]</sup>。通过模仿人体内软骨细胞这一生长特性可使ADSCs分化形成更完整的软骨组织。

常用的三维培养方法包括微球培养(pellet culture)、微团培养(micromass culture)和支架(scaffold)法<sup>[28, 42]</sup>。微球培养即利用ADSCs在特殊培养条件下自发形成小聚集体的特点, 将离心管内细胞悬浮液离心, 以使细胞在管底形成圆形细胞微球(pellet)而用于三维培养<sup>[44]</sup>。在微团培养中, 细胞被放置在24孔板孔内, 使其在37  $^{\circ}$ C下黏附2 h, 然后加入软骨介质培养基, 经过一段时间后, 细胞会聚结成球形<sup>[45]</sup>。支架法是将人工合成的支架复合ADSCs进行体外三维培养或置入关节软骨缺损处进行体内培养<sup>[46]</sup>。微球和微团法都存在营养不足的缺陷, 故支架材料成为研究的趋势。在支架材料中, 水凝胶(hydrogels)因其优异的溶胀性质和与软组织的相似性, 被认为是软骨组织天然细胞外基质的最佳替代材料<sup>[47]</sup>。

凝胶的结构和含量影响着ADSCs的分化效果。刘金兰等<sup>[48]</sup>发现利用藻酸钙作为载体有利于脂肪干细胞成软骨分化——藻酸钙凝胶能形成三维多孔结构, 有利于细胞附着、生长。陈秀慧等<sup>[49]</sup>将ADSCs与藻酸钙凝珠载体进行立体培养, 发现细胞增殖较快, 藻酸钙的不断降解为细胞产生细胞外基质提供了空间。Guneta等<sup>[50]</sup>发现在不同孔隙率和孔径的藻酸盐支架中ADSCs分化效率不同。Mineda等<sup>[51]</sup>实验证实用4%的非交联透明质酸凝胶培养hADSCs是形成尺寸一致软骨细胞微球(20~50  $\mu$ m)的最适条件。

大部分三维模型的构造焦点一直是模拟软骨细胞所处的天然软骨细胞外基质, 要考虑到模型理化

性质(如孔隙大小、分布等)和模型生物学特性(如生物降解能力、引发抗原反应能力等),以形成接近生理状态的软骨结构。在此基础上,可以使用多功能支架递送营养因子、调节分子或遗传组分以控制细胞分化和增强细胞支架间相互作用。如水凝胶支架存在短时间内释放大生长因子的缺点,持续释放时间不超过1周,微球体可长时间持续释放生长因子,但这些生长因子易迁移而离开植入部位被组织清除。使用将聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)微球固定于水凝胶的联合递送系统则能使生长因子的释放延长到21 d<sup>[52-53]</sup>。

### 3.3 其他因素

除生长因子与三维培养条件外,诱导ADSCs成软骨分化的效率还受诸多因素的影响,如低氧诱导、动态环境和电磁场刺激等。

低氧环境模仿了关节软骨组织的生理条件,引起低氧诱导因子稳定表达,随后诱导软骨相关基因表达。聚集蛋白聚糖(aggrecan, AGC), COL II和Sox-9于低氧张力下在ADSCs和软骨细胞中的表达均明显增强<sup>[54]</sup>。Portron等<sup>[55]</sup>证明了低氧条件可以促进ADSCs向软骨细胞分化;随后有学者<sup>[56-57]</sup>指出软骨细胞培养的最佳氧含量为1%~5%;戴兵等<sup>[58]</sup>实验证实,在体积分数为5%的氧气条件下,ADSCs增殖加快,COL II和ACAN等的表达较常氧组显著增加。在缺氧条件下ADSCs和软骨细胞中的生长因子HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A/B, BMP-2/4/-6, FGF-2和IGF-1均显著增加,但TGF- $\beta$ 1变化不明显<sup>[58]</sup>。Kakudo等<sup>[59]</sup>研究进一步证明低氧可促进ADSCs增殖,而HIF-1 $\alpha$ 的活化、FGF-2的产生以及ERK1/2和Akt通路参与了这一调控机制。

由于人体内为动态环境,传统静态形式的细胞培养会产生生物化学组成和机械性能相对较差的软骨组织。宋克东等<sup>[60]</sup>证实多孔复合支架与转瓶结合提供的三维动态环境可提高ADSCs的存活率和软骨分化效率。转瓶的搅拌培养产生了剪切力,可加速ADSCs的分化并促进支架内外代谢产物与营养物质的交换。离心重力也可诱导ADSCs成软骨分化,离心(2 400 g, 30 min)可通过增加BMP-4的表达而上调Sox-9的表达,且与TGF- $\beta$ 1具有相似的诱导Sox-9表达的能力<sup>[61]</sup>。低频(35 Hz)低幅度振动亦能显著抑制ADSCs的成脂分化,上调Sox-9和细胞表面软骨细胞特征性整合素的表达<sup>[62]</sup>。

尽管ADSCs有免疫调节和抗炎特性,但关节炎微环境仍会抑制其软骨分化潜能,且由促炎因子诱导发生的氧化应激阻碍了软骨基质的合成,从而干扰软骨修复过程。将hADSCs暴露于炎症因子IL-1 $\beta$  24 h后,细胞内ROS显著增加,有抗氧化和抗炎能力

的二烯丙基二硫化物则能显著改善ADSCs的氧化应激损伤<sup>[63]</sup>。

在组织工程疗法中,肝素可以静电结合生长因子,防止生长因子被酶类降解并调控其局部浓度。一般认为外源性肝素也可以增强TGF- $\beta$ 超家族成员的生物活性,从而将其加入生物支架材料中以提高组织工程的疗效<sup>[20]</sup>。虽然许多TGF- $\beta$ 超家族成员已被证实可以结合肝素,但这种相互作用并不是此类蛋白质的普遍特性,比如BMP-14的生物学活性就能被肝素强烈抑制,且肝素可能会损害人MSCs的生物学和分子特征,故临床需谨慎应用<sup>[64-65]</sup>。

此外,诱导时间也会对ADSCs分化产生影响。以BMP-6为例,诱导前期短暂添加BMP-6可上调ADSCs的透明软骨分化,持续添加BMP-6则会导致细胞分化为纤维软骨<sup>[28]</sup>。

## 4 展望

ADSCs应用于软骨缺损修复已取得初步的成功,但其研究仍处于动物试验阶段。组织工程化软骨与宿主的完美结合是软骨修复的终极目标,目前不管是体外研究还是体内研究仍存在许多问题,如:1)ADSCs没有明确的特异性表面抗原,如何在体外高效分离、纯化得到ADSCs;2)如何诱导ADSCs分化完全,防止早期肥大的出现;3)体外诱导培养基微环境的构建、理想三维支架的构建以及三维支架植入关节的可实施性;4)细胞、不同的生长因子、三维诱导环境三者关系如何,如何形成最优分化条件;5)将诱导分化形成的软骨组织移植于软骨缺损处后,如何在局部微环境中保持分化状态,且不会导致软骨组织间出现免疫反应、炎症反应;6)修复后的软骨组织能否满足关节形态和功能的需要、组织工程软骨能否得到长期保持等。随着组织工程和相关学科的发展,相信利用ADSCs产生具有成熟关节软骨组成、结构和力学性能的工程软骨会成为临床治疗软骨缺损的理想方案。

**利益冲突声明:** 作者声称无任何利益冲突。

## 参考文献

- [1] Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 21-34.
- [2] Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, et al. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair[J]. *Stem Cells Cloning*,

- 2014, 7(7): 1-17.
- [3] 张永兴, 赵庆华. 间充质干细胞在关节软骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45): 7342-7347.  
ZHANG Yongxing, ZHAO Qinghua. Application of mesenchymal stem cells in articular cartilage tissue engineering[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, 18(45): 7342-7347.
- [4] Veronesi F, Maglio M, Tschon M, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: state-of-the-art in in vivo studies[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(7): 2448-2466.
- [5] Wu L, Cai X, Zhang S, et al. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: Perspectives from stem cell biology and molecular medicine[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(5): 938-944.
- [6] Freitag J, Shah K, Wickham J, et al. The effect of autologous adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a large osteochondral defect of the knee following unsuccessful surgical intervention of osteochondritis dissecans—a case study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 298-309.
- [7] 张世浩, 朱立新. 关节软骨组织工程种子细胞的研究进展关节软骨组织工程种子细胞的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(12): 1505-1507.  
ZHANG Shihao, ZHU Lixin. Progress in the study of articular cartilage tissue engineering seeding cells[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2008, 22(12): 1505-1507.
- [8] Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, et al. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(4): e36-e51.
- [9] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies[J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 211-228.
- [10] Minter D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013, 129: 59-71.
- [11] 郭吉安, 余丕军, 王露萍, 等. 脂肪干细胞旁分泌功能在面部抗衰老领域的研究应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 38(5): 789-794.  
GUO Ji'an, YU Pijun, Wang Luping, et al. Research progress and application outlook of paracrine functions of adipose-derived stem cells in facial anti-aging[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2017, 38(5): 789-794.
- [12] Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, et al. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(2): 419-427.
- [13] Su X, Liao L, Shuai Y, et al. MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1851.
- [14] Bionaz M, Monaco E, Wheeler MB. Transcription adaptation during in vitro adipogenesis and osteogenesis of porcine mesenchymal stem cells: Dynamics of pathways, biological processes, up-stream regulators, and gene networks[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e137644.
- [15] Zheng CX, Sui BD, Liu N, et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5215.
- [16] Sun Y, Chen S, Pei M. Comparative advantages of infrapatellar fat pad: an emerging stem cell source for regenerative medicine[J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(12): 2072-2086.
- [17] 杨午, 刘畅. 生长因子对人脂肪干细胞成软骨诱导作用研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2014, 31(6): 1409-1413.  
YANG Wu, LIU Chang. Growth factors-mediated effects on the differentiation of human adipose-derived stem cells into chondrocytes[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2014, 31(6): 1409-1413.
- [18] Lee CS, Watkins E, Burnsed OA, et al. Tailoring adipose stem cell trophic factor production with differentiation medium components to regenerate chondral defects[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(11/12): 1451-1464.
- [19] Knippenberg M, Helder MN, Zandieh DB, 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.
- [20] Ayerst BJ, Smith RA, Nurcombe V, et al. Growth differentiation factor 5-mediated enhancement of chondrocyte phenotype is inhibited by heparin: implications for the use of heparin in the clinic and in tissue engineering applications[J]. Tissue Eng Part A, 2017, 23(7/8): 275-292.
- [21] 马洪斌, 李运祥, 王铭伦. 腺病毒携带骨形态发生蛋白14基因转染脂肪干细胞修复损伤关节软骨[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1): 54-60.  
MA Hongbin, LI Yunxiang, WANG Minglun. Adipose-derived stem cells transfected with adenovirus carrying bone morphogenetic protein 14 for repair of articular cartilage injury[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(1): 54-60.
- [22] 刘玉平, 王明明, 刘涛, 等. 胰岛素样生长因子 I 转染对脂肪干细胞TWEAK/Fn14信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(45): 7217-7223.  
LIU Yuping, WANG Mingming, LIU Tao, et al. Effect of adipose-derived stem cells modified by insulin-like growth factor I gene on TWEAK/Fn14 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(45): 7217-7223.
- [23] 赵珮娟, 程辰, 谢芸, 等. 脂肪来源干细胞相关生长因子及其作用的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2013, 9(5): 285-288.  
ZHAO Peijuan, CHENG Chen, XIE Yun, et al. Growth factors related with adipose-derived stem cells and their biological effects[J].

- Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2013, 9(5): 285-288.
- [24] Hildner F, Peterbauer A, Wolbank S, et al. FGF-2 abolishes the chondrogenic effect of combined BMP-6 and TGF-beta in human adipose derived stem cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 94(3): 978-987.
- [25] Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 644-652.
- [26] Hennig T, Lorenz H, Thiel A, et al. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGFbeta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6[J]. J Cell Physiol, 2007, 211(3): 682-691.
- [27] Ude CC, Chen HC, Norhamdan MY, et al. The evaluation of cartilage differentiations using transforming growth factor beta3 alone and with combination of bone morphogenetic protein-6 on adult stem cells[J]. Cell Tissue Bank, 2017, 18(3): 355-367.
- [28] 赵明臻, 刘畅. 脂肪干细胞在软骨组织工程中的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2014, 33(4): 475-480.
- ZHAO Mingcan, LIU Chang. Research progress on adipose-derived stem cells in cartilage tissue engineering[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2014, 33(4): 475-480.
- [29] Ude CC, Chen HC, Norhamdan MY, et al. The evaluation of cartilage differentiations using transforming growth factor beta3 alone and with combination of bone morphogenetic protein-6 on adult stem cells[J]. Cell Tissue Bank, 2017, 18(3): 355-367.
- [30] 黄朋, 李立新, 杨绿林, 等. 脂肪干细胞分离培养鉴定及成软骨分化的实验研究[J]. 宁夏医学杂志, 2016, 38(8): 679-682.
- HUANG Peng, LI Lixin, YANG Lulin, et al. The experimental study of the isolation, cultivation, identification and chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Ningxia Medical Journal, 2016, 38(8): 679-682.
- [31] 张传辉, 李建军, 杨军. 调控脂肪间充质干细胞成软骨分化基因Sox-9和低氧诱导因子1 $\alpha$ 的表达[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(45): 6766-6773.
- ZHANG Chuanhui, LI Jianjun, YANG Jun. Regulation of Sox-9 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(45): 6766-6773.
- [32] Shi J, Liang J, Guo B, et al. Adipose-derived stem cells cocultured with chondrocytes promote the proliferation of chondrocytes[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 1709582.
- [33] Zhong J, Guo B, Xie J, et al. Crosstalk between adipose-derived stem cells and chondrocytes: when growth factors matter[J]. Bone Res, 2016, 4: 15036.
- [34] Hubka KM, Dahlin RL, Meretoja VV, et al. Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2014, 20(6): 641-654.
- [35] 赵明臻, 杨午, 刘畅. 兔脂肪干细胞与软骨细胞微球共培养成软骨分化最适诱导比例的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2016, 35(5): 570-576.
- ZHAO Mingcan, YANG Wu, LIU Chang. An experimental study on optimal ratio of chondrogenesis in pellet co-culture of adipose-derived stem cells and chondrocytes differentiation in rabbits[J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2016, 35(5): 570-576.
- [36] Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e176107.
- [37] Lee CS, Nicolini AM, Watkins EA, et al. Adipose stem cell microbeads as production sources for chondrogenic growth factors[J]. J Stem Cells Regen Med, 2014, 10(2): 38-48.
- [38] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(5): 431-440.
- [39] 毕晓娟, 郭晨明, 李亮, 等. 三维培养诱导人脂肪间充质干细胞微球的成软骨分化能力[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1): 24-29.
- BI Xiaojuan, GUO Chenming, LI Liang, et al. Three-dimensional culture method induces the chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell microspheres[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(1): 24-29.
- [40] Yoon HH, Bhang SH, Shin JY, et al. Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(19/20): 1949-1956.
- [41] 乔添柱. BMP-7诱导脂肪干细胞微团培养下成软骨能力的实验研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
- QIAO Tianzhu. The study of the ADSCs differentiate to chondrocyte ability under micromass culture condition induced by BMP-7[D]. Shenyang: China Medical University, 2009.
- [42] Estes BT, Guilak F. Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2011, 702: 201-217.
- [43] 陈志浩, 郑济林, 苏泽鑫, 等. 诱导脂肪源干细胞分化成软骨细胞的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(15): 1393-1396.
- CHEN Zhihao, ZHENG Jilin, SU Zexin, et al. Research progress of inducing the adipose-derived stem cells to differentiate into cartilages[J]. Orthopedic Journal of China, 2014, 22(15): 1393-1396.
- [44] 宋雄波, 吴江怡, 黄术, 等. 二维及微团培养法对软骨细胞表型的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(11): 1456-1458.
- SONG Xiongbo, WU Jiangyi, HUANG Shu, et al. Effects of 2D culture and micropellet culture on the chondrocyte phenotype[J]. Chongqing Medical Journal, 2016, 45(11): 1456-1458.
- [45] Zhang L, Su P, Xu C, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(9): 1339-1346.

- [46] 刘泽汉, 王立春, 张宏颖, 等. 动物脂肪干细胞联合双重转化生长因子释放支架修复关节软骨损伤的实验研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2012, 27(12): 1098-1101.  
LIU Zehan, WANG Lichun, ZHANG Hongying, et al. Experiment research of repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits[J]. Chinese Journal of Bone Joint Injury, 2012, 27(12): 1098-1101.
- [47] Huang Q, Zou Y, Arno MC, et al. Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Chem Soc Rev, 2017, 46(20): 6255-6275.
- [48] 刘金兰, 朱兵. 关于藻酸钙凝胶负载脂肪干细胞向软骨细胞分化的研究[J]. 求医问药(下半月), 2013, 11(5): 16-17.  
LIU Jinlan, ZHU Bing. The study on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocytes by calcium alginate[J]. Seek Medical and Ask the Medicine, 2013, 11(5): 16-17.
- [49] 陈秀慧, 孟玉茜, 刘兴龙. IGF-1与TGF- $\beta$ 1联合诱导藻酸钙-脂肪干细胞混合凝珠软骨化的研究[J]. 潍坊医学院学报, 2016, 38(4): 245-248.  
CHEN Xiuhui, MENG Yuhuan, LIU Xinglong. The study on calcium alginate beads and adipose derived stem cells mixture into cartilage cells Induced by IGF-1 and TGF- $\beta$ 1 combination[J]. Acta Academiae Medicinae Weifang, 2016, 38(4): 245-248.
- [50] Guneta V, Loh QL, Choong C. Cell-secreted extracellular matrix formation and differentiation of adipose-derived stem cells in 3D alginate scaffolds with tunable properties[J]. J Biomed Mater Res Part A, 2016, 104(5): 1090-1101.
- [51] Mineda K, Feng J, Ishimine H, et al. Therapeutic potential of human adipose-derived stem/stromal cell microspheroids prepared by three-dimensional culture in non-cross-linked hyaluronic acid gel[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(12): 1511-1522.
- [52] Sun Q, Zhang L, Xu T, et al. Combined use of adipose derived stem cells and TGF-beta3 microspheres promotes articular cartilage regeneration in vivo[J]. Biotech Histochem, 2018, 93(3): 168-176.
- [53] Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering[J]. J Control Release, 2015, 219: 119-128.
- [54] Shi S, Xie J, Zhong J, et al. Effects of low oxygen tension on gene profile of soluble growth factors in co-cultured adipose-derived stromal cells and chondrocytes[J]. Cell Prolif, 2016, 49(3): 341-351.
- [55] 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[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62368.
- [56] Egli RJ, Bastian JD, Ganz R, et al. Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes[J]. J Orthop Res, 2008, 26(7): 977-985.
- [57] Foldager CB, Nielsen AB, Munir S, et al. Combined 3D and hypoxic culture improves cartilage-specific gene expression in human chondrocytes[J]. Acta Orthop, 2011, 82(2): 234-240.
- [58] 戴兵, 徐海艇, 金海东, 等. 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.  
DAI Bing, XU Haiting, JIN Haidong, et al. Hypoxia effects on the chondrogenic differentiation of three-dimensional co-cultured adipose-derived stem cells and articular chondrocytes[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014, 18(29): 4630-4635.
- [59] Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, et al. Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1 $\alpha$  activation[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e139890.
- [60] 宋克东, 杨延飞, 李文芳, 等. ADSCs-壳聚糖/明胶水凝胶工程化软骨的三维动态构建[J]. 功能材料, 2015, 46(15): 15021-15030.  
SONG Kedong, LI Yanfei, LI Wenfang, et al. Three-dimensional dynamic construction of ADSCs-Chitosan / Gelatin hydrogel engineered cartilage[J]. Functional Materials, 2015, 46(15): 15021-15030.
- [61] Jang Y, Jung H, Nam Y, et al. Centrifugal gravity-induced BMP4 induces chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells via SOX9 upregulation[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 184.
- [62] Marycz K, Lewandowski D, Tomaszewski KA, et al. Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs)[J]. Peer J, 2016, 4: e1637.
- [63] Bahrapour J K, Kamarul T, Najafi M, et al. Restoring the IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B-induced impaired chondrogenesis by diallyl disulfide in human adipose-derived mesenchymal stem cells via attenuation of reactive oxygen species and elevation of antioxidant enzymes[J]. Cell Tissue Res, 2018, 373(2): 407-419.
- [64] Lee J, Wee S, Gunaratne J, et al. Structural determinants of heparin-transforming growth factor-beta1 interactions and their effects on signaling[J]. Glycobiology, 2015, 25(12): 1491-1504.
- [65] Bramono DS, Murali S, Rai B, et al. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)[J]. Bone, 2012, 50(4): 954-964.

(本文编辑 陈丽文)

本文引用: 纪晓琳, 王慷慨, 王念. 诱导脂肪干细胞成软骨分化的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(2): 201-208. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.013

Cite this article as: Ji Xiaolin, WANG Kangkai, WANG Nian. Research advance in chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2019, 44(2): 201-208. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.013