

# 脂肪干细胞联合不同支架修复骨缺损的实验进展

熊永斌<sup>1\*</sup>, 李春亮<sup>2#</sup>, 刘俊豪<sup>1</sup>, 何永好<sup>1</sup>, 冷梓豪<sup>2</sup>

<sup>1</sup>青海大学, 青海 西宁

<sup>2</sup>青海省人民医院, 青海 西宁

收稿日期: 2022年9月15日; 录用日期: 2022年10月2日; 发布日期: 2022年10月11日

## 摘要

骨缺损是骨科临床常见热点, 而传统的骨缺损治疗方法各有优缺点, 大都不能达到预期希望, 故骨组织工程技术已经成为目前发展热点。而目前脂肪干细胞已成为骨组织工程技术的首选种子细胞。在利用脂肪干细胞修复骨缺损的过程中, 有三个重要因素: 能够进行成骨分化的细胞、生长因子和支架材料, 前两个因素目前已有大量研究, 故目前最需要找的就是合适的细胞支架, 目前已有很多相关实验, 现将一些利用不同支架复合脂肪干细胞修复兔骨缺损的实验进行综述。

## 关键词

兔, 骨缺损, 脂肪干细胞, 细胞支架

# Experimental Progress of Adipose-Derived Stem Cells Combined with Different Scaffolds to Repair Bone Defects

Yongbin Xiong<sup>1\*</sup>, Chunliang Li<sup>2#</sup>, Junhao Liu<sup>1</sup>, Yonghao He<sup>1</sup>, Zihao Leng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Qinghai University, Xining Qinghai

<sup>2</sup>Qinghai Provincial People's Hospital, Xining Qinghai

Received: Sep. 15<sup>th</sup>, 2022; accepted: Oct. 2<sup>nd</sup>, 2022; published: Oct. 11<sup>th</sup>, 2022

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 熊永斌, 李春亮, 刘俊豪, 何永好, 冷梓豪. 脂肪干细胞联合不同支架修复骨缺损的实验进展[J]. 临床医学进展, 2022, 12(10): 8951-8956. DOI: 10.12677/acm.2022.12101294

## Abstract

Bone defect is a common clinical hot spot in orthopaedics, and traditional bone defect treatment methods have their own advantages and disadvantages, and most of them fail to meet expectations. Therefore, bone tissue engineering technology has become a current development hotspot. At present, adipose-derived stem cells have become the preferred seed cells for bone tissue engineering technology. In the process of using adipose-derived stem cells to repair bone defects, there are three important factors: cells capable of osteogenic differentiation, growth factors and scaffold materials. The first two factors have been extensively studied, so the most important thing to find is suitable cells. Scaffolds, there are many related experiments, some experiments using different scaffolds combined with adipose stem cells to repair bone defects in rabbits are reviewed.

## Keywords

Rabbit, Bone Defect, Adipose Stem Cells, Cell Scaffold

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

近些年许多研究表明,脂肪干细胞(Adipose-derived stem cells, ADSCs)具有向脂肪、骨、软骨、肌肉、内皮、造血、肝、胰岛和神经等多种细胞方向分化的多分化潜能,因其体内分布广,取材创伤小,细胞获得量大,是一种理想的种子细胞[1]。在脂肪干细胞的研究中,开展最早、研究最多、结果比较肯定的是其向成骨方向的诱导分化[2]。目前脂肪干细胞凭借其获取途径创伤小、来源广、易取材及免疫能力强等诸多优势,受到越来越广泛的关注,成为骨组织工程研究的热点种子细胞[3]。

而骨缺损是骨科临床常见病、多发病,创伤、感染、老年性骨质疏松引起的压缩性骨折、骨肿瘤切除及关节置换术后翻修等导致的骨缺损较常见[4] [5]。传统的骨缺损治疗方式有自体骨移植与异体骨移植、骨搬运术和诱导膜技术等。由于其出现较早,技术不断的改进,操作越来越熟练,所以在临床中得到了广泛应用。组织工程近年来出现,并已在治疗骨骼缺陷方面的应用已成为一个受欢迎的研究方向,即骨组织工程技术。其原理和方法是从患者自身提取出所需的种子细胞,在体外经过特殊的体外培养技术,使其大量增殖,然后把培养的种子细胞放置在适合缺陷部位形态结构的细胞支架上,该支架需有良好的生物相容性,可以是天然的,也可以是人工的,作用是主要为种子细胞提供稳定的繁殖空间,为其输送养料,排出代谢产物,同时限制细胞群的生长形态,并提供缺损部位的力学强度,接着将已植入种子细胞的支架放入到清创后的骨缺损部位,随着种子细胞的成骨作用,支架材料也开始降解,最终完成骨缺损的治疗。传统的骨缺损治疗方法各有优缺点,传统骨缺损治疗技术大都存在一定的问题,经常不能达到预期希望,目前传统骨缺损治疗技术已经不能满足人们的需求,所以追求一种坚实的医治方法已经迫在眉睫。临床上对于骨缺损较大的无法自行修复的组织损伤患者,金标准是组织移植,但不幸的是,能从可移植组织中受益的患者数量远远大于供应量[6]。组织工程骨技术的出现打开了治疗骨缺损的新思路。而该技术的关键在于种子细胞的获取,目前骨髓间充质细胞和脂肪干细胞基本可以满足人们的需要[7],而 ADSCs 具有创伤小、来源广、易取材及免疫能力强等一系列骨髓间充质干细胞没有的优势[8],故脂肪干细胞(adipose derived stem cells, hADSCs)成为了治疗骨缺损的首选。

在利用脂肪干细胞修复骨缺损的过程中,有三个重要因素:能够进行成骨分化的细胞、生长因子和支架材料,前两个因素目前已有大量研究,故目前最需要找的就是合适的细胞支架[9][10]。生物支架材料可以是天然的,也可以是人工合成的,或者是脱细胞组织的支架,材质可以是有机物,也可以是无机物[9][10][11]。但是生物支架必须可以让细胞在支架上贴附并进行迁移生长同时可以载荷细胞、维持细胞形态同时保持其生物学功能,同时可以协助细胞能在支架环境下分泌因子并将代谢产物排出的特性[12][13]。

目前已有很多相关实验,实验对象多为大鼠和兔子,而兔子体形较大,实验结果更直观,故现将一些利用不同支架复合脂肪干细胞修复兔骨缺损的实验进行系统综述。

## 2. 兔脂肪干细胞与脱钙骨支架材料

杨函[14]等人利用兔脂肪干细胞与脱钙骨支架材料复合来修复尺骨缺损。实验构建兔子双侧尺骨缺损的动物模型后,将脱钙骨材料和成骨诱导后的兔脂肪来源干细胞与脱钙骨支架材料复合体分别植入右侧和左侧缺损区,设为对照组及实验组。复合体植入12周后,处死兔子获取两处骨缺损组织标本并进行CT扫描和组织学检测。得出结论:CT扫描结果提示实验组骨缺损断端与材料的接合部位已基本融合,并在断端外侧可看到骨痂形成。而对照组支架未完全降解,断端清晰未观察到骨性修复,骨缺损处几乎都为纤维连接。组织学检测结果提示实验组缺损处为典型再生骨组织的正常骨组织,存在骨细胞和骨陷窝以及骨小梁结构;对照组有脱钙骨基质残留现象,只能在边缘观察到轻度的成骨反应。最后结果表明成骨诱导后的兔脂肪干细胞与脱钙骨支架材料复合可用于修复临界骨缺损。

## 3. $\beta$ -磷酸三钙陶瓷为支架复合兔脂肪源性间充质干细胞

吴子征[15]等人探讨以 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -tricalcium,  $\beta$ -TCP)陶瓷为支架材料复合兔脂肪源性间充质干细胞(rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells, rADSCs)构建组织工程骨修复骨缺损的可行性。实验将体外培养的rADSCs接种于 $\beta$ -TCP支架上,构建rADSCs/ $\beta$ -TCP骨组织工程复合体,并进行体外培养。动物模型制成双侧桡骨2CM长度的节段性骨缺损模型,将24只新西兰大白兔随机平均分为3组,A组:空白对照组,不植入任何材料;B组:单 $\beta$ -TCP人工骨对照组;C组:rADSCs/ $\beta$ -TCP复合体实验组。在手术后2周、4周、6周和8周时进行X线检查,然后每组各选2只兔处死后取出标本,对标本进行大体观察以及常规HE染色,光镜下观察骨修复情况。结果rADSCs在适当的诱导条件下具有成骨细胞分化潜能,复合 $\beta$ -TCP后对其生长分化无影响。X线检查结果发现,术后8周,C组材料降解明显,材料孔隙基本消失,髓腔已基本再通;B组部分骨髓腔再通,而A组未发现骨髓腔再通。新生骨组织面积比较C组的面积最大,且其差异有统计学意义。结论rADSCs在适当诱导条件下具有成骨分化潜能。

## 4. 脂肪干细胞复合成骨性干细胞膜片

王之发[16]等人用实验验证ADSCs能否促进成骨性BMSCs膜片的骨缺损修复能力。方法ADSCs和BMSCs分别取自同一个供体的腹股沟和髂骨骨松质,通过连续成骨诱导的方法制备成骨性BMSCs膜片,并分析BMSCs膜片的特性;然后将ADSCs复合在BMSCs膜片上,构架ADSCs-BMSCs膜片复合体,移植到兔颅骨缺损模型,单纯BMSCs膜片和颅骨缺损组作为对照。移植8周后,Micro CT扫描和组织学分析其骨修复再生情况。结果发现相比于对照组,实验组新生组织骨密度更高,新生矿化组织量也更多。同时新生骨组织/总新生组织体积(Bv/Tv)的比值也更高,表明ADSCs显著提高了BMSCs膜片的骨缺损修复能力。

## 5. 脂肪干细胞复合羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙

王腾飞[17]等人目的:评价兔脂肪干细胞与羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙骨组织工程复合体修复兔椎体缺

损的效果。实验将第3代经成骨诱导分化的兔脂肪干细胞接种于羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙支架上进行体外培养2周。36只新西兰大白兔随机分为3组( $n=12$ )，均在L4/5椎体制备直径约5 mm、深约3 mm椎体缺损，A组、B组分别植入兔脂肪干细胞/羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙复合体、羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙支架，C组不植入材料。术后4, 8, 12周行脊柱正侧位DR照射，进行Lane-Sandhu X射线评分，术后12周处死取标本，行大体观察、组织病理学观察椎体缺损修复情况。结果发现A组椎体缺损区基本被新生骨组织取代，修复效果明显优于B组及C组。术后12周时，A组椎体缺损区材料基本吸收，B组椎体缺损材料部分吸收，可见骨痂形成，C组椎体缺损区边界尚清晰，可见片状钙化影。经Lane-Sandhu X射线评分后统计学分析，A组椎体缺损修复情况明显优于B组及C组( $P < 0.05$ )。以上结果表明，脂肪干细胞与羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙构建的骨组织工程复合体具有较好的修复椎体缺损的能力。

## 6. 脂肪干细胞与纳米羟基磷灰石/重组类人胶原蛋白/聚乳酸支架复合

Wei Hao [18]等人在这项研究中，首先将兔脂肪源性干细胞(rASC)分离、体外培养，并用含有人骨形态发生蛋白2 (Ad-hBMP2)的重组腺病毒载体转染。第一组将转染过的脂肪干细胞与纳米羟基磷灰石/重组类人胶原蛋白/聚乳酸支架(nHA/RHLC/PLA)结合(hBMP2/rASCs-nHA/RHLC/PLA)。第二组用未转染的脂肪干细胞与纳米羟基磷灰石/重组类人胶原蛋白/聚乳酸支架 nHA/RHLC/PLA 结合(rASCsnHA/RHLC/PLA)，第三组用单独的 nHA/RHLC/PLA 支架。在体外培养7天后，将三组植入兔子的15毫米长的节段性骨缺损中。12周后，进行影像学和组织学分析。1组髓腔再通，骨重建完成成型，骨轮廓开始重塑，第2组或第3组的骨缺损未得到修复。结果证明这种新型的生物复合材料在相对较短的时间内促进了骨缺损的修复。

## 7. 负载辛伐他汀的 $\beta$ -磷酸三钙三维支架材料与脂肪干细胞复合

徐恋祎[19]等人利用 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -TCP)三维支架材料负载辛伐他汀，与脂肪干细胞复合，构建组织工程骨，用于兔颅骨缺损模型的修复。实验提取兔脂肪干细胞后，原代培养兔脂肪干细胞(rabbit adipose-derived stem cells, rASCs)，分别以含0、0.01、0.1和1  $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀的培养液培养，计数法检测细胞数目；以0、0.05、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 浓度辛伐他汀培养ASCs，1、7d后，实时定量PCR检测成骨、成血管基因的表达(RUNX2、OPN、OCN、VEGF)；7d后行ALP染色；14d后行茜素红染色。12只新西兰大白兔颅顶双侧8 mm缺损，分别以4组材料修复(A:  $\beta$ -TCP, B:  $\beta$ -TCP/Cell, C:  $\beta$ -TCP/Sim, D:  $\beta$ -TCP/Cell/Sim)，每组6例，植入8周后进行组织学观察。结果发现0.05  $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀对脂肪干细胞RUNX2、OCN、OPN和VEGF等成骨、成血管基因的表达具有明显促进作用，植入体内8周后， $\beta$ -TCP/Cell/Sim组材料的成骨面积显著大于其他3组。证明0.05  $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀在体外对ASCs具有明显的促成骨作用，载辛伐他汀 $\beta$ -TCP复合脂肪干细胞可促进兔颅骨缺损的修复。

## 8. 非活化富血小板血浆联合脂肪干细胞

Woonhyeok Jeong [20]等人在这项研究中研究了nPRP和ASCs治疗与单一治疗相比对骨再生的联合作用。实验将30只 $15 \times 15 \text{ mm}^2$ 颅骨缺损的新西兰大白兔随机分为4个治疗组：对照组、nPRP、ASC或nPRP + ASC组。对于治疗，对照组兔子用1 ml生理盐水、nPRP组用1 ml非活化PRP、ASC组用 $2 \times 10^6$  ASC、nPRP + ASC组用 $2 \times 10^6$  ASC加1 ml饱和的nPRP胶原海绵。16周后，使用三维计算机断层扫描和数码摄影测量骨体积和新骨表面积。结果nPRP组的骨表面积显著高于对照组和ASC组(分别为 $p < 0.001$ 和 $p < 0.01$ )。nPRP + ASC组中再生骨表面积百分比也显著高于对照组的相应比率( $p < 0.001$ )。与对照组相比，nPRP组的新骨量增加( $p < 0.05$ )。结论：我们的结果表明，在这种骨愈合模型中，来自nPRP的缓释生长因子不影响ASC的激活。而PRP含有与骨再生相关的生长因子，包括PDGF、TGF、bFGF

和 IGF, 在 ASCs 中不存在的 PDGF 作为干细胞成骨分化的化学引诱剂作用是骨再生的一个特别重要的因素。所以 PRP 激活对于使用 nPRP 和 ASC 的联合治疗的成功很重要[21] [22] [23] [24]。

目前关于脂肪干细胞治疗骨缺损的相关研究日渐增多, 但仍停留在动物实验阶段。故此, 本研究对各种支架复合脂肪源性干细胞治疗骨缺损的方法及疗效进行系统综述, 旨在为脂肪干细胞修复骨缺损在临床上的应用提供一定的参考价值。而有报道称, 脂肪干细胞外泌体具有与来源细胞相同的信号分子等生物学物质, 在细胞间进行信息传递从而影响干细胞的增殖分化[25]。可得出结论: ADSCs 有望成为修复骨缺损的组织工程骨所需要的理想种子细胞, 为大段骨缺损修复提供可行的技术方案, 为临床治疗大段骨缺损提供新的方法, 但仍需进行更深入的研究才能达到目的。

## 参考文献

- [1] 陈崎, 彭智. 脂肪干细胞在骨、软骨组织工程中的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(14): 26-27.
- [2] 古振, 刘芳. 脂肪干细胞在骨组织工程中的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2012, 8(1): 53-55.
- [3] 李晓静, 王佐林. 脂肪干细胞在骨组织工程中的研究现状及应用前景[J]. 口腔颌面外科杂志, 2016, 26(3): 216-221.
- [4] Petite, H., Viateau, V., Bensaïd, W., *et al.* (2000) Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Nature Biotechnology*, **18**, 959-963. <https://doi.org/10.1038/79449>
- [5] 陈犹白, 陈聪慧, Zhang, Q.X., 韩岩. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2016, 11(2): 126-134.
- [6] Hurd, S.A., Bhatti, N.M., Walker, A.M., *et al.* (2015) Development of a Biological Scaffold Engineered Using the Extracellular Matrix Secreted by Skeletal Muscle Cells. *Biomaterials*, **49**, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.027>
- [7] 秦宇星, 任前贵, 沈佩锋. 组织工程骨技术治疗骨缺损的优越性[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(24): 3877-3882.
- [8] Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001) Multilineage Cells from Human Adipose tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, **7**, 211-228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
- [9] Szpalski, C., Sagebin, F., Barbaro, M., *et al.* (2013) The Influence of Environmental Factors on Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **101**, 663-675. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32849>
- [10] Szpalski, C., Wetterau, M., Barr, J., *et al.* (2012) Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques—Part I: Scaffolds. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, **18**, 246-257. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0427>
- [11] Laronda, M.M., Jakus, A.E., Whelan, K.A., *et al.* (2015) Initiation of Puberty in Mice Following Decellularized Ovary Transplant. *Biomaterials*, **50**, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.051>
- [12] Kim, I.G., Hwang, M.P., Du, P., *et al.* (2015) Bioactive Cell-Derived Matrices Combined with Polymer mesh Scaffold for Osteogenesis and Bone Healing. *Biomaterials*, **50**, 75-86. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.054>
- [13] Kutikov, A.B., Skelly, J.D., Ayers, D.C., *et al.* (2015) Templated Repair of Long Bone Defects in Rats with Bioactive Spiral-Wrapped Electrospun Amphiphilic Polymer/Hydroxyapatite Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7**, 4890-4901. <https://doi.org/10.1021/am508984y>
- [14] 杨函, 康建平, 丁裕名, 等. 同种异体脂肪干细胞复合脱钙骨支架材料修复尺骨缺损: CT 扫描及组织学检测[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28): 4520.
- [15] 吴子征, 李受珉, 王泽, 等. 同种异体脂肪源性间充质干细胞复合  $\beta$ -磷酸三钙支架修复兔桡骨大段骨缺损[J]. 复旦学报: 医学版, 2015, 42(3): 338-343.
- [16] 王之发, 孙硕辉, 马军利, 等. 脂肪干细胞复合成骨性干细胞膜片用于修复兔颅骨缺损的实验研究[J]. 口腔医学杂志, 2018, 38(7): 587-592.
- [17] 王腾飞, 宋兴华, 麦提艾力·阿不力克木, 陈江涛, 陶颖, 杨勇. 脂肪干细胞与羟基磷灰石/ $\beta$ -磷酸三钙复合体修复兔椎体缺损[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(13): 2081-2086.
- [18] Hao, W., Dong, J., Jiang, M., *et al.* (2010) Enhanced Bone Formation in Large Segmental Radial Defects by Combining Adipose-Derived Stem Cells Expressing Bone Morphogenetic Protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *International Orthopaedics*, **34**, 1341-1349. <https://doi.org/10.1007/s00264-009-0946-3>
- [19] Xu, L.-Y., Sun, X.-J., Jin, Y.-Q., *et al.* (2013) Repair of Calvarial Defect Using a Tissue-Engineered Bone with Sim-

- vastatin-Loaded  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffold and Adipose Derived Stem Cells in Rabbits. *Shanghai Journal of Stomatology*, **22**, 361.
- [20] Jeong, W., Kim, Y.S., Roh, T.S., *et al.* (2020) The Effect of Combination Therapy on Critical-Size Bone Defects Using Non-Activated Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells. *Child's Nervous System*, **36**, 145-151. <https://doi.org/10.1007/s00381-019-04109-z>
- [21] Pacifici, L., Casella, F. and Maggiore, C. (2002) Platelet Rich Plasma (PRP): Potentialities and Techniques of Extraction. *Minerva Stomatologica*, **51**, 341-350
- [22] Wen, Y.H., Lin, W.Y., Lin, C.J., Sun, Y.C., Chang, P.Y., Wang, H.Y., Lu, J.J., Yeh, W.L. and Chiueh, T.S. (2018) Sustained or Higher Levels of Growth Factors in Platelet-Rich Plasma during 7-Day Storage. *Clinica Chimica Acta*, **483**, 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.027>
- [23] Casati, L., Celotti, F., Negri-Cesi, P., Sacchi, M.C., Castano, P. and Colciago, A. (2014) Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Contained in Platelet Rich Plasma (PRP) Stimulates Migration of Osteoblasts by Reorganizing Actin Cytoskeleton. *Cell Adhesion & Migration*, **8**, 595-602. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972785>
- [24] Tajima, S., Tobita, M., Orbay, H., Hyakusoku, H. and Mizuno, H. (2015) Direct and Indirect Effects of a Combination of Adipose-Derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, **21**, 895-905. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0336>
- [25] Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., *et al.* (2013) Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Secrete Functional Nepri-Lysin-Bound Exosomes. *Scientific Reports*, **3**, Article No. 1197. <https://doi.org/10.1038/srep01197>