

脂肪来源的干细胞复合壳聚糖支架促进大鼠颅骨缺损修复的实验研究

黄健萍¹, 林思恩², 兰青¹

(广东医科大学附属医院 1. 口腔科; 2. 骨科中心, 湛江 524001)

【摘要】目的:探讨以脂肪来源的干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)为基础构建组织工程生物材料修复大鼠颅骨缺损的效果。**方法:**分离、培养 ADSCs, 并进行成骨、成脂、成软骨三系分化。制备壳聚糖多孔支架, 扫描电镜观察接种 ADSCs 前后的微结构变化, 以细胞活力试剂盒测试 ADSCs 接种于壳聚糖多孔支架后的细胞活力。取 15 只雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠予手术制备颅骨缺损模型, 将缺损留空或植入壳聚糖支架, 壳聚糖支架表面预先种植低密度(2.5×10^5)或高密度(1×10^6) ADSCs。术后 8 周收集样品用于微型计算机断层扫描分析, 随后脱钙, 石蜡包埋切片后行苏木素-伊红染色和免疫组化染色观察成骨指标骨涎蛋白。**结果:**ADSCs 可以成功诱导成骨、成软骨和成脂肪分化; 扫描电镜和细胞活力测试结果提示壳聚糖支架呈现多孔结构, ADSCs 可黏附于支架并增殖, 增殖效果与普通培养板相比无统计学差异。在大鼠颅骨缺损模型中, 高密度 ADSCs/壳聚糖支架组骨组织体积百分数分别比空白对照组和低密度 ADSCs/壳聚糖支架组升高 140.8% ($P=0.014$) 和 37.4% ($P=0.036$)。与空白缺损对照组相比, 低密度 ADSCs/壳聚糖支架组和高密度 ADSCs/壳聚糖支架组骨密度分别升高 29.4% ($P=0.123$) 和 64.1% ($P=0.022$)。组织学结果表明, 骨缺损区新生骨组织的分布和数量与微型计算机断层扫描分析结果一致。成骨分化指标骨涎蛋白在高密度组表达有增高趋势。**结论:**高密度 ADSCs 复合壳聚糖支架可有效修复大鼠的颅骨缺损。

【关键词】脂肪间充质干细胞; 组织工程学; 壳聚糖; 支架; 颅骨缺损

【中图分类号】R782.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-05-25

Adipose-derived stem cells loaded chitosan scaffold to promote the healing of calvarial defect: an experimental study

Huang Jianping¹, Lin Sien², Lan Qing¹

(1. Department of Stomatology; 2. Orthopaedics Center, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of tissue engineering biomaterials based on adipose-derived stem cells (ADSCs) for healing calvarial defects. **Methods:** ADSCs were isolated, cultured and conducted the three-lineage differentiation of osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis. Porous chitosan-based scaffolds were prepared and ADSCs were seeded onto the surface of scaffold. Microstructural changes before and after the implantation of ADSCs were detected by scanning electron microscope (SEM). Cell viability after ADSCs loaded on scaffolds was determined by cell viability assays. A total of 15 male Sprague Dawley (SD) rats were selected to create cranial defect models, and the defects were left in empty or implanted with chitosan scaffolds which were seeded with low (2.5×10^5) or high densities (1×10^6) of ADSCs. After operation of 8 weeks, samples were collected for Micro-CT analysis. And then, those samples were decalcified, paraffin embedded and sectioned; hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry stain-

作者介绍: 黄健萍, Email: 15811705615@163.com,

研究方向: 口腔生物骨材料及骨代谢。

通信作者: 兰青, Email: lanqing319@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81874000); 广东医科大学科研基金资助项目 (编号: M2014002); 广东医科大学附属医院登峰计划资助项目 (编号: 2120DFK20190057、526DFY20190159、20501DFY20190168); 广东医科大学海洋医药研究院南海海洋生物医药资源研发公共服务平台开放基金课题资助项目 (编号: 201806)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20200324.1423.016.html>

(2020-03-25)

ing were performed to observe the bone formation biomarker of bone sialoprotein. **Results:** ADSCs were able to induce osteogenesis, chondrogenesis and adipogenesis. Data from SEM and cell viability assays showed that chitosan-based scaffold had porous structure, and ADSCs were able to attach to the surface of scaffolds and proliferate, and proliferation effects on scaffolds surface were not significantly different when compared with those on the culture plate. In the rat calvarial defect model, the bone volume ratio (BV/TV) in the high-density ADSCs/chitosan scaffold group was increased by 140.8% ($P=0.014$) and 37.4% ($P=$

0.036) when compared with that in the blank control group and the low-density ADSCs/chitosan group, respectively. Compared with that in the control group, bone density in the low-density ADSCs/chitosan group and high-density ADSCs/chitosan group were increased by 29.4% ($P=0.123$) and 64.1% ($P=0.022$), respectively. Histological results showed that distribution and quantity of the new bone tissue in the bone defect area were consistent with results of Micro-CT analysis. Expression of bone formation markers of bone sialoprotein had an increasing tendency in the high-density group. **Conclusion:** High density of ADSCs-loaded chitosan scaffolds can effectively promote the healing of calvarial defect in rats.

[Key words] adipose-derived stem cells; tissue engineering; chitosan; scaffold; calvarial defect

随着社会的发展和水平的提高,人们对口腔功能的要求随之提高,牙体、牙列缺失应用种植修复越来越广^[1]。然而,老年人因创伤、恶性肿瘤、牙周炎等导致的牙列缺损,以及拔牙后即刻种植的种植体与牙槽窝骨壁间出现骨缺损,影响种植体良好的初期稳定性和种植的成骨率^[2]。如何安全有效地实现骨缺损修复,促进骨愈合是学者们一直探究的热点。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有分化成多个谱系的潜力和在体外扩增同时保持其原始谱系分化的能力,因此 MSCs 可用于组织工程中的细胞来源,将来有望替代自体骨、异体骨及异种骨移植来修复骨缺损。迄今为止,骨髓和脂肪组织是 MSCs 的主要来源。一些研究表明,脂肪组织来源的干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)的临床应用潜力比骨髓来源的 MSCs 临床应用潜力更大,同时也有研究认为骨髓来源的 MSCs 优于 ADSCs^[3-5]。但骨髓来源的 MSCs 获取条件较为严苛,获取不便,且来源有限,在很大程度上限制了其临床应用^[6]。ADSCs 作为来源于脂肪的多功能干细胞,具有良好的增殖能力和多向分化能力,且取材方便、来源丰富,逐渐成为组织工程中种子细胞的研究热点。本文通过分离鉴定人 ADSCs,并构建壳聚糖多孔支架,观察人 ADSCs 种植于壳聚糖支架后的微结构变化,并检测 ADSCs 在支架内的增殖能力。体内实验部分以 ADSCs 贴附的壳聚糖支架种植于大鼠颅骨缺损部位,用于评价 ADSCs 复合壳聚糖多孔支架对颅骨缺损部位的原位成骨能力。壳聚糖支架生物相容性好,可降解,而且质地比较柔软,移植到颅骨缺损部位后不容易对颅内组织造成损伤。本课题组以往的研究也曾以 2%壳聚糖支架作为颅骨缺损修复的支架材料^[7]。本研究从种子细胞来源、组织工程、动物模型等角度,采用细胞实验和颅骨缺损模型,探讨脂肪来源的间充质干细胞结合壳聚糖支架材料对颅骨缺损的修复潜能。

1 材料和方法

1.1 ADSCs 分离与培养

1.1.1 ADSCs 分离与培养 通过简单的抽脂术,从乳腺外科手术患者的皮下/腹部皮下脂肪组织获得人脂肪组织,反复冲洗去除血细胞,消化离心获得细胞悬液,接种待用。等体积磷酸盐缓冲盐水(PBS)充分洗涤脂肪组织,并用 0.075% 胶原酶(I 型;Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)在 37℃ 下消化细胞外基质 30 min。使用含 10%FBS 和抗生素(100 U/mL 青霉素 G 和 100 μg/mL 链霉素)的 α-MEM,将样品在室温下离心 10 min。将细胞沉淀重悬于 160 mmol/L NH₄Cl 中,并在室温下温育 10 min。通过 100 μm 尼龙网(Cell Strainer; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)除去细胞残余物后,将细胞在培养基中温育。将黏附的 ADSCs 培养约 2 周,并且几乎所有细胞都转化成成纤维细胞样细胞,其形态学上类似 BMSCs,显微镜下观察细胞形态。

1.1.2 ADSCs 分化潜能鉴定

1.1.2.1 成骨诱导 以 4×10^3 个细胞/cm² 接种在 12 孔板中培养至细胞达到汇合。然后将细胞在成骨诱导培养基中孵育,成骨诱导培养基是补充有 1 nmol/L 地塞米松、50 μmol/L 抗坏血酸和 20 mmol/L β-甘油磷酸盐(均来自 Sigma-Aldrich)的基础培养基。在第 14 天,通过茜素红 S 染色镜下观察钙结节。

1.1.2.2 成脂诱导 将 ADSCs 以 4×10^3 个细胞/cm² 接种于 6 孔培养板中培养至细胞达到汇合。然后将细胞在成脂诱导培养基中孵育,成脂诱导培养基补充有 500 nmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤、50 mmol/L 吡啶美辛和 10 mg/mL 胰岛素(均来自 Sigma-Aldrich)。将细胞再培养 21 d,然后将细胞用 70%乙醇固定 10 min,并用 0.3% 新鲜油红 O 溶液(Sigma-Aldrich)染色 10 min。用蒸馏水冲洗孔 3 次,使用显微镜观察脂滴形成情况。

1.1.2.3 成软骨诱导 将 1.6×10^7 个细胞/mL 的 ADSCs 20 μL 滴入 24 孔板的中心。将板置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,孵育 2 h 直至细胞贴壁,2 h 后加入成软骨诱导培养基中培养,成软骨诱导培养基是补充有 10 ng/mL 转化生长因子-β3(R & D Systems)、500 ng/mL 骨形态发生蛋白-2(R & D Systems)、 10^{-7} mol/L 地塞米松、50 mg/mL 抗坏血酸-2-磷酸、40 mg/mL

脯氨酸、100 mg/mL 丙酮酸盐 (均来自 Sigma-Aldrich) 和 1:100 稀释的 ITS+ 预混物 (BD Biosciences) 的基础培养基。软骨形成培养基每 3 d 更换 1 次。培养 21 d, 进行免疫组化染色观察成软骨基质指标 Aggrecan (抗 Aggrecan 抗体, Abcam, USA) 的表达, 辣根过氧化物酶显色后, 苏木素复染, 脱水封片后镜下观察。

1.2 壳聚糖多孔支架的制备

取 4 g 壳聚糖粉末 (Sigma-Aldrich, 脱乙酰度 75%~90%, 分子量 17 万~20 万) 溶解于 200 mL 蒸馏水中, 用稀盐酸将溶液 pH 调至 3.0~4.0; 加入 0.178 g/mL 明胶 (Sigma-Aldrich) 溶液, 搅拌 30 min; 用 5% NaHCO₃ 调节 pH 至 6.0 左右, 再加入 0.32 g/mL 甘油, 搅拌 30 min; 搅拌停止, 静置消泡, 得到混合溶液, 待用。将静置待用混合溶液加入 48 孔塑料培养板上浇注 (2 mL/孔), 分别在 -20 °C、-80 °C 条件下冷冻 24 h 以上, 然后移到冷冻干燥机内真空干燥 24 h, 得到壳聚糖多孔支架。将支架用 4% 的 NaOH 溶液浸泡后冲洗, 再用大量的蒸馏水冲洗, 直至浸泡液 pH 接近 6.0。室温晾干后, 以 70% 乙醇洗涤 3 次, 再以 PBS 反复冲洗, 冷冻干燥得到薄层圆柱形状的壳聚糖多孔支架待用。

1.3 ADSCs 黏附与增殖

将壳聚糖支架置于无菌 48 孔板 ADSCs 以 1×10^4 个细胞/mL 接种, 加入 1 mL 细胞培养液。随后将板置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育。24 h 后取出支架, 以 PBS 充分洗涤, 再以戊二醛固定样本。经真空干燥、镀金后进行扫描电镜 (FESEM; ZEISS SUPRA 40 VP; Germany) 测试, 测试条件为 3 kV、400 倍。未接种细胞的壳聚糖支架作为空白对照。

以上述同样方法接种细胞于无菌 48 孔板内的壳聚糖支架, 加入 1 mL 细胞培养液。随后将板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育。接种当天 (6 h) 及接种后 3 d 和 5 d, 以 AlamarBlue 细胞活力试剂盒 (Thermo Fisher, USA) 测试细胞的增殖活性。接种于无菌 48 孔板的相同数量细胞 (1×10^4 个) 作为空白对照。

1.4 颅骨缺损修复

1.4.1 不同数量的 ADSCs 种植于多孔支架材料后对大鼠颅骨缺损的修复 根据先前的方法进行动物手术^[9-10]。15 只雄性 SD 大鼠称重 [(412 ± 18) g] 后用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉, 置于立体定向架上进行立体定向对照。在横跨颅骨的矢状平面上制作延伸颅骨长度的约 15 mm 中线切口。使用具有 5 mm 外径的中空环钻 (图 1), 在颅骨的每个顶骨区域中移除 2 个双侧对称的 19.6 mm² 全厚度圆形骨。将缺损留空 ($n=10$, 5 只大鼠) 作为阴性对照或立即将 50 μL 含有低密度 (2.5×10^5 , $n=10$) 和高密度 (1×10^6 , $n=10$) 人 ADSCs 分别用 2% 壳聚糖支架包裹 (5 mm 直径圆柱体, 厚度=1 mm), 然后种植于大鼠颅骨缺损部位, 最后缝合封闭骨膜和头皮。麻醉恢复后, 大鼠正常活动, 并在手术后 8 周用过量戊巴比妥处死动物。

1.4.2 微型计算机断层扫描 (Micro-CT) Micro-CT 用于定量评估缺损部位新生骨形成^[9]。使用 Micro-CT (Scanco Medical, Bassersdorf, 瑞士) 进行高分辨率 70 kV 电压扫描成像。同时通过扫描采用标准化的分割参数 (sigma: 0.8, 阈值: 220~

1 000) 进行三维重建。在缺损区域 (直径=5 mm) 周围 (不包括相邻的原生骨) 绘制圆形轮廓线, 通过机器内置软件从 2D 切片生成样本的 3D 重建图像。最后再采用 Micro-CT 软件包中包含的定量三维评价程序计算所选圆形缺损内的骨体积。定量结果包括骨量/组织体积分数 (bone volume/tissue volume, BV/TV) 和骨密度 (bone mineral density, BMD)。



A. 手术制备颅骨缺损区域



B. 颅骨缺损区域植入复合有 ADSCs 的支架材料

注: 双向箭头所指为缺损区域, 直径为 5.0 mm

图 1 安装在立体定位框架上的大鼠颅骨缺损制备及支架材料植入的手术方法

1.4.3 组织学分析 将骨组织样品 (每个颅骨中保留 2 个缺损, 约 15 mm × 10 mm) 以 10% 福尔马林溶液固定, 然后以 9% 甲酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA) 在室温下置于摇床, 进行为期 3 周的脱钙。乙醇中梯度脱水后, 将样品包埋在石蜡中并以冠状平面进行切片 (厚度=5 μm)。切片经苏木素-伊红染色。为检测新生骨组织中成骨的活跃程度, 行免疫组化染色检测骨涎蛋白 (osteopontin, OPN; 抗 OPN 抗体, Santa Cruz, USA) 表达情况。辣根过氧化物酶显色, 苏木素复染, 脱水封片后镜下观察。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL, US) 进行统计学分析, 正态分布数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。通过单因素方差分析法分析计量资料 BV/TV 和 BMD 的组间统计学差异, 以 Turkey's *t* 检验进行组间两两比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ADSCs 分化潜能鉴定

采用茜素红染色法检测钙沉积的形成, 结果表明 OIM 诱导 14 d 后, ADSCs 发生矿化。ADSCs 成脂诱导 21 d 后, 固定细胞进行油红 O 染色, 结果表明 ADSCs 具有脂肪分化潜能 (图 2)。成软骨诱导培养基连续培养 ADSCs 3 周, 进行免疫组化染色, 结果提示具有显著的软骨基质 Aggrecan 沉积 (图 2)。这些结果表明 ADSCs 具有较好的分化成骨细胞、脂

肪细胞、软骨细胞的间质干细胞潜能,奠定了人 ADSCs 作为一种替代骨髓来源间充质谱系种子细胞的基础。

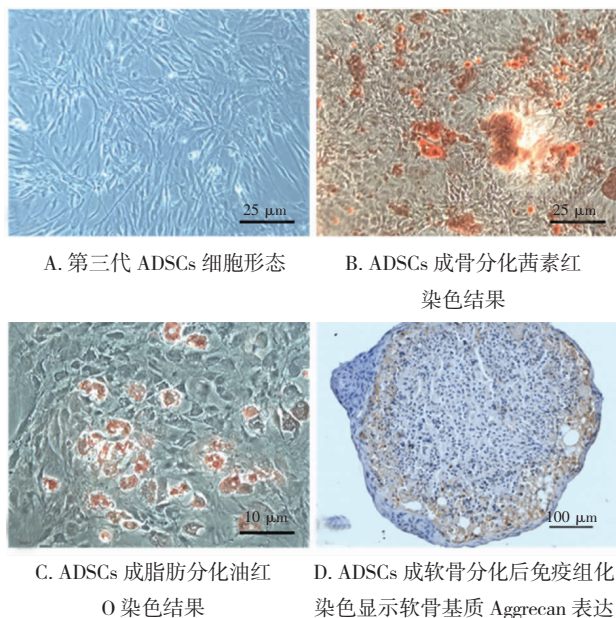


图 2 ADSCs 细胞形态及成骨分化、成脂肪分化及成软骨分化潜能

2.2 ADSCs 在壳聚糖多孔支架的黏附及增殖

扫描电镜和细胞活力试剂盒分别用以评估 ADSCs 在壳聚糖多孔支架的黏附和增殖效果。扫描电镜结果提示,未接种细胞的壳聚糖多孔支架呈均匀多孔的海绵状结构,平均孔径 25 μm (图 3)。ADSCs 接种 24 h 后,可牢固黏附于多孔支架表面(图 3)。细胞活力测试结果表明,种植到壳聚糖多孔支架后的 ADSCs 活力保持良好,在接种后 3 d 和 5 d 的细胞

增殖率与普通培养板内的空白对照相比,差异无统计学意义(图 3)。

2.3 使用颅骨缺损模型进行体内骨再生

为观察 ADSCs 对骨缺损修复的影响,以负载有低密度(2.5×10^5)和高密度(1×10^6)人 ADSCs 的壳聚糖为支架材料,在大鼠颅骨缺损模型中进行实验研究。通过 Micro-CT 定量分析缺损处再生骨量(包括 BV/TV 和 BMD),发现空白对照组缺损部位显示出规则点状或片状骨形成,边缘具有部分新生骨;而低密度 ADSCs/壳聚糖支架在缺损边缘具有较多矿化区域。与其他组相比,植入高密度 ADSCs/壳聚糖支架后,在缺损区域内发现了明显的矿化组织形成,基本覆盖缺损区域。定量数据统计分析结果显示,空白对照组、低密度 ADSCs/壳聚糖支架组和高密度 ADSCs/壳聚糖支架组的 BV/TV 分别是(5.23 ± 1.32)%、(9.17 ± 1.17)%和(12.6 ± 3.50)%,BMD 分别是(86.33 ± 14.98) mg/cm^3 、(111.71 ± 22.52) mg/cm^3 和(141.70 ± 24.01) mg/cm^3 ,多组间比较具有统计学差异(BV/TV: $F=7.948, P=0.020$; BMD: $F=5.283, P=0.048$)。通过 Turkey's t 检验进行两两比较,结果显示与空白对照组或低密度 ADSCs/壳聚糖支架组相比,高密度 ADSCs/壳聚糖支架组 BV/TV 分别升高 140.8%($P=0.014$)和 37.4%($P=0.036$)。与空白缺损对照组相比,低密度 ADSCs/壳聚糖支架组和高密度 ADSCs/壳聚糖支架组 BMD 分别升高 29.4%($P=0.123$)和 64.1%($P=0.022$),如图 4 所示。组织学结果表明,骨缺损区新生骨组织的分布和数量与 Micro-CT 分析结果一致。空白对照组仅有薄层纤维结缔组织覆盖,仍有大量未填充的间隙;而在植入低密度 ADSCs/壳聚糖支架后,缺损区比空白区发现更多的新生骨形成。在植入高密度 ADSCs/壳聚糖支架的缺损中,新骨形成明显增强,新生骨组织与颅骨缺损处的原骨融合良好。免疫组化染色结果提示成骨分化指标 OPN 在新生骨组织中高度表达(图 5)。

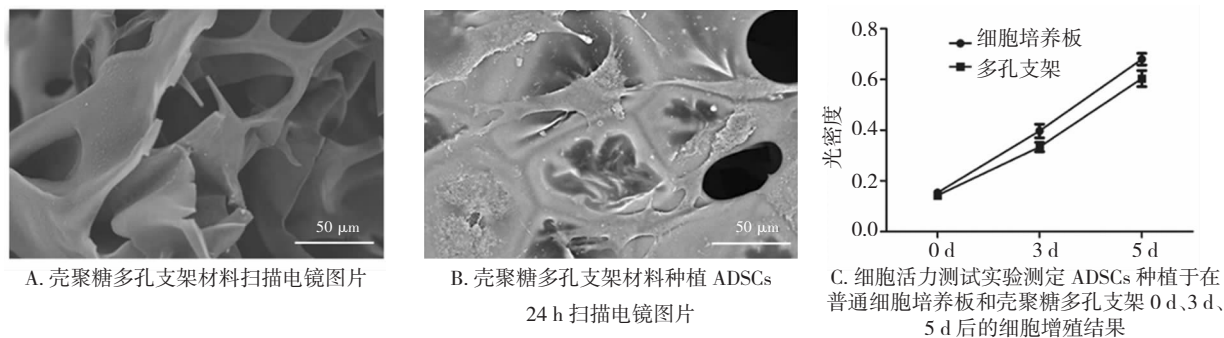


图 3 ADSCs 种植于壳聚糖多孔支架材料后扫描电镜和细胞活力测试实验结果 ($n=5$)

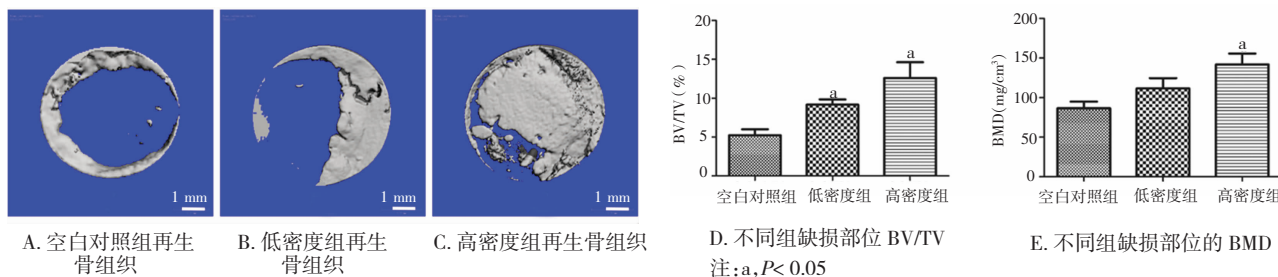


图 4 不同数量 ADSCs 种植于多孔支架材料后对大鼠颅骨缺损修复骨量变化 ($n=10$)

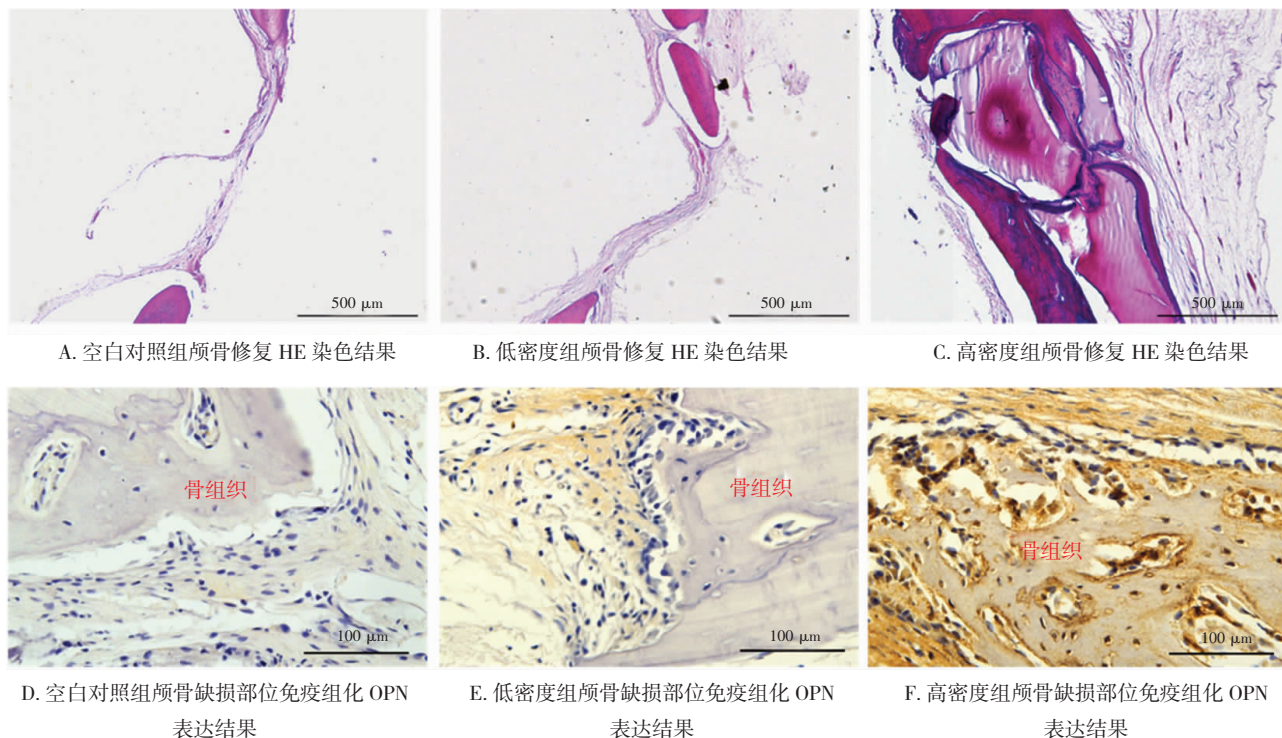


图 5 不同数量 ADSCs 种植于多孔支架材料后对大鼠颅骨缺损修复组织学染色结果

3 讨论

自体骨、同种异体骨、人工替代骨等是传统的治疗骨缺损的移植物^[11]。目前临床上使用的骨替代物由于存在免疫排斥、生物相容性较差、成骨效果不佳等不可忽视的问题,自体骨移植是最理想的骨缺损修复“黄金标准”,但其来源有限,需要开辟第二术创等风险限制了其临床应用^[12]。因此,目前亟须研究和开发一种新型骨修复材料,加速种植体成骨率,增强对骨缺损的修复效果。本研究结果表明,复合有高密度脂肪来源干细胞的 ADSCs 壳聚糖支架材料可以有效促进骨缺损的修复。

以往文献报道,在大鼠颅骨缺损模型中,缺损部位所用的人或大鼠 MSCs 细胞数量为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ ^[13-14]。因此,本研究选择细胞数量 2.5×10^5 或 1×10^6 分别作为低密度或高密度用于大鼠露骨缺损的修复。本研究结果提示,ADSCs 数量的多少可能是决定再生骨量多少的一个关键因素,细胞数量的多少与新生骨量的多少成正比。随着组织工程学的进一步发展,将 MSCs 复合支架材料用于替代传统的骨缺损修复方式逐渐成为当今研究的热点和方向^[15]。BMSCs 的获取条件较为苛刻,并且骨髓来源

十分有限,极大地限制了其临床应用^[15]。ADSCs 比 BMSCs 数量多且更容易分离,供者痛苦小,更适合临床应用。根据文献报道,ADSCs 具有较理想的骨组织修复能力。其中,小鼠 ADSCs 种植在磷灰石涂层的可吸收支架上用于治疗小鼠颅骨缺损,12 周后骨缺损封闭范围达 70%~90%^[16]。另外,ADSCs 复合自体骨修复患者严重颅骨缺损,以纤维蛋白胶和大孔板进行固定,术后 3 个月重建后观察到病例有新骨形成^[17]。然而,目前的研究仅仅只有病例报告,还需要进一步的全面研究来评估和验证临床结果。

壳聚糖是一种天然多糖,通过多种手段与其他材料(如生物玻璃、微纳米、生物活性因子等)复合后,可形成支架、薄膜等多种形式的材料,同时本身具有良好的生物相容性和抗菌活性,用于不同类型的骨缺损修复,均有良好的应用前景^[18]。从初生鹿茸中提取出胶原成分,应用化学交联方法将鹿角胶原及壳聚糖构建复合多孔支架,经体外细胞实验证明该多孔支架具有良好的生物相容性,通过构建大鼠颅骨缺损模型,证明壳聚糖多孔支架具有较好的修复作用^[7]。本研究结果证实,壳聚糖支架有利于 ADSCs 黏附和增殖,高密度 ADSCs 复合壳聚糖支架可安全而有效促进颅骨缺损,从而为骨缺损修复治疗开辟新的可能。

本研究应用大鼠作为实验动物。由于人 ADSCs 的特殊性,在进入临床试验之前,只能利用动物模型进行初步探讨。以往的研究认为,人的 MSCs 具有较低的免疫原性,种植到动物之后也可以存活和分化成骨^[13]。但是,人的 MSCs 在大鼠骨缺损修复愈合过程中的作用可能不是直接由成骨分化引起。MSCs 分泌的产物如生长因子和细胞因子等可能对局部的骨再生具有更显著的促进作用^[19]。

细胞治疗和生物材料产品的临床前安全性和有效性评价对其后续临床试验的进行至关重要。在本研究的颅骨缺损动物模型中,未发现 ADSCs/壳聚糖支架有免疫排斥、感染等不良反应。本研究证明了高密度 ADSCs/壳聚糖支架对颅骨缺损修复的有效性;提供了一种重复性较高的综合方法来评估基于 ADSCs 的复合壳聚糖支架促进大鼠颅骨缺损中的颅骨再生;证明了 ADSCs/壳聚糖支架在促进骨愈合方面的可行性和成骨能力,为基于 ADSCs 治疗骨缺损的细胞疗法的临床应用提供了前期研究基础。

综上所述,ADSCs 复合壳聚糖多孔支架可以修复颅颌面骨缺损,其修复效果与细胞密度高低成正比。但是,其详细的潜在机制仍不太清楚,需要进一步的研究来探讨。

参 考 文 献

- [1] Yang D, Sang M, Lee DW. Surface modification of titanium with BMP-2/GDF-5 by a heparin linker and its efficacy as a dental implant[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): E229.
- [2] Sundell G, Dahlin C, Andersson M, et al. The bone-implant interface of dental implants in humans on the atomic scale[J]. *Acta Biomater*, 2017, 48: 445-450.
- [3] Elman JS, Li M, Wang F, et al. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation[J]. *J Inflamm(Lond)*, 2014, 11(1): 1.
- [4] Rasmussen JG, Frobert O, Holst-Hansen C, et al. Comparison of human adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in a myocardial infarction model[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(2): 195-206.
- [5] Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM, et al. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(6): 1383-1389.
- [6] Zhang Y, Qiu B, Wang J, et al. Effects of BDNF-transfected BM-SCs on neural functional recovery and synaptophysin expression in rats with cerebral infarction[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3813-3824.
- [7] Yu L, Huang J, Wang J, et al. Antler collagen/chitosan scaffolds improve critical calvarial defect healing in rats[J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2015, 10(5): 774-779.
- [8] Rui YF, Lui PP, Lee YW, et al. Higher BMP receptor expression and BMP 2-induced osteogenic differentiation in tendon-derived stem cells compared with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Int Orthop*, 2012, 36(5): 1099-1107.
- [9] D'Mello S, Elangovan S, Hong L, et al. Incorporation of copper into chitosan scaffolds promotes bone regeneration in rat calvarial defects[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103(5): 1044-1049.
- [10] Wang KX, Xu LL, Rui YF, et al. The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120593.
- [11] Sanz M, Vignoletti F. Key aspects on the use of bone substitutes for bone regeneration of edentulous ridges[J]. *Dent Mater*, 2015, 31(6): 640-647.
- [12] Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, et al. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review[J]. *Biomater Res*, 2017, 21: 9.
- [13] Zong C, Xue D, Yuan W, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 109-120.
- [14] Zhu M, Lin S, Sun Y, et al. Hydrogels functionalized with N-cadherin mimetic peptide enhance osteogenesis of hMSCs by emulating the osteogenic niche[J]. *Biomaterials*, 2016, 77: 44-52.
- [15] Kokai LE, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration[J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 399-408.
- [16] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(5): 560-567.
- [17] Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, et al. Autologous stem cells(adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004, 32(6): 370-373.
- [18] 陆 遥, 尹庆水, 夏 虹. 壳聚糖复合材料在骨修复领域的研究进展[J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2018, 10(1): 46-52.
- [19] Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): E1852.

(责任编辑:冉明会)