

综述

脂肪来源的间充质干细胞及外囊泡促成骨分化的研究进展

崔雅琦, 白玉冰, 许怡晨, 谭心辰, 李梦莹, 贾 浩

上海交通大学基础医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海市肿瘤微环境与炎症重点实验室, 上海 200025

[摘要] 脂肪来源的间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 是从脂肪组织中分离得到的一类多能干细胞, 可以在一定处理后诱导分化成为成骨细胞, 在骨骼修复中具有重要的作用。研究发现 ADMSCs 通过分泌细胞因子和外囊泡, 激活 GF- β /BMPs 和 Wnt 等信号通路, 促进 MSCs 向成骨细胞分化。研究还发现相较于骨髓来源的间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs), 应用 ADMSCs 及其外囊泡治疗骨质疏松症的提取成本低, 安全性高, 应用前景好。该文回顾 ADMSCs 诱导成骨分化的主要方式及分子机制, 并进一步探讨 ADMSCs 及外囊泡应用于治疗骨质疏松症的优势和前景。

[关键词] 脂肪来源的间充质干细胞; 外囊泡; 成骨分化; 骨质疏松; 信号通路

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.12.019 **[中图分类号]** Q291 **[文献标志码]** A

Research progress of adipose-derived mesenchymal stem cell and its extracellular vesicles in osteogenesis

CUI Ya-qi, BAI Yu-bing, XU Yi-chen, TAN Xin-chen, LI Meng-ying, JIA Hao

Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences; Shanghai Key Laboratory for Tumor Microenvironment and Inflammation, Shanghai 200025, China

[Abstract] Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) are a kind of multipotent stem cells which are isolated from the adipose tissue. They can induce the differentiation of osteoblasts under certain treatment, and are important in the repair of osseous tissue. Research has found that ADMSCs can induce the differentiation of MSCs in the direction of osteogenesis by secreting cytokines and extracellular vesicles and activating GF- β /BMPs, Wnt and other signaling pathways. Research has also found that applying ADMSCs and their extracellular vesicles to the clinical treatment of osteoporosis has low extraction cost, high safety and good application prospect, compared with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. This review intends to summarize the major patterns and molecular mechanisms of ADMSCs in inducing osteogenic differentiation and further discusses the advantages and prospects of applying ADMSCs and their extracellular vesicles to the clinical treatment of osteoporosis.

[Key words] adipose-derived mesenchymal stem cell (ADMSC); extracellular vesicle; osteogenesis; osteoporosis; signal pathway

近年来, 我国骨质疏松症患病率逐渐攀升。一项最新研究^[1]显示, 我国骨质疏松症的总患病率为 13%, 总人数已超过 1.78 亿。老年人是骨质疏松症的重点人群, 自 1982 年起, 我国 65 岁以上老年人占人口比重不断升高, 2019 年我国 65 岁以上老年人占人口比重已达到 12.6%^[2]。预计到 2050 年, 我国骨质疏松症或骨密度低的患者将达到 2.12 亿^[1]。骨质疏松症使得骨质脆性增加、易于骨折, 导致患者的生活水平急剧下降。利用脂肪来源的间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 诱导成为成骨细胞治疗骨质疏松症是医学研究的新方向^[1]。ADMSCs 可以通过旁分泌功能, 分泌一些生物活性分子, 为组织修复建立良好的微环境, 促进新生血管的形

成和伤口愈合, 并且减少组织的炎症反应。ADMSCs 也可分泌促进血管生成和抗凋亡潜能的生长因子, 如转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)、胰岛素样生长因子 (insulin growth factor, IGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)^[3] 和骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 家族 BMP-2、BMP-7 等^[4]。ADMSCs 来源丰富, 通过脂肪抽吸术易于获得, 无免疫排斥。平均每 300 mL 脂肪组织可获得 10^8 个细胞, 每克动物脂肪可获得 5 000 个成纤维集落形成单位 (colony forming unit-fibroblast, CFU-F)^[5]。同时, 与其他来源的 MSCs 相比, 脂肪组织来源更为丰富, 容易获得。

[基金项目] 国家自然科学基金 (31970679); 上海市青年科技启明星项目 (19QA1405000)。

[作者简介] 崔雅琦 (1999—), 女, 本科生, 电子信箱: cyq2017@aliyun.com。

[通信作者] 贾 浩, 电子信箱: fonney@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31970679); Shanghai Rising-Star Program (19QA1405000)。

[Corresponding Author] JIA Hao, E-mail: fonney@sjtu.edu.cn。

因此, ADMSCs 逐渐成为干细胞研究的热点, 应用价值主要表现在组织的修复与重建。本文对 ADMSCs 及外囊泡应用于组织工程的状况及未来展望进行综述。

1 ADMSCs 向成骨分化诱导的主要方式

1.1 分泌细胞因子

ADMSCs 可以自分泌或旁分泌多种细胞因子促进其向成骨分化。ADMSCs 分泌成纤维细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23) 和胎球蛋白 A (fetuin-A), 这两者可以提高细胞内 *RUNX2* (runt-related transcription factor 2, *RUNX2*) 的表达, 促进其向成骨细胞分化^[6]。另外, ADMSCs 也可以通过分泌细胞因子 BMP2 和 TGF- β , 激活 TGF- β /BMPs 信号通路, 诱导其向成骨细胞分化^[7]。研究^[7]还发现 ADMSCs 中存在高表达 Toll 样受体 1 ~ 5 (Toll-like receptors 1–5, TLRs1–5), 应用 TLRs 的激动剂可以诱导 ADMSCs 分泌高浓度的白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6)。IL-6 单独存在时对成骨分化没有作用, 但与可溶性白细胞介素 6 受体 (soluble interleukin-6 receptor, sIL-6R) 结合形成复合体后, 两者可共同发挥促进成骨分化的作用。另外, 有研究^[8]显示, 组织微环境中分泌的其他细胞因子, 例如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), 在经巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 与核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 的预处理之后, 也可以显著提高 ADMSCs 向成骨分化。

1.2 分泌外囊泡

细胞外囊泡是由脂质双分子层包绕形成的球状膜性囊泡, 由细胞分泌产生, 包括外泌体、微囊泡和凋亡小体等。目前, 关于细胞外囊泡促成骨分化的研究主要集中在外泌体的作用上^[9]。

外泌体直径为 30 ~ 150 nm, 由内涵体产生, 通过多泡体与质膜融合后释放到细胞外环境中^[10-11], 是细胞旁分泌的重要组成部分。人源 ADMSCs 的外泌体形态呈杯状, 具有 CD63 和 CD9 等特异性标记^[12]。研究^[12-13]显示, ADMSCs 的外泌体可以促进骨髓来源的间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 向成骨细胞分化。通过释放的外泌体激活了 BM-MSCs 中的 *RUNX2*、*ALP* (alkaline phosphatase) 和 *COL1A1* (collagen type 1 α 1) 等促成骨相关基因的表达, 但是具体机制还有待进一步探讨。进一步研究^[14-15]还发现, ADMSCs 的外泌

体可以作用于成骨分化后期的 BM-MSCs, 具体表现为碱性磷酸酶活性大幅升高, 有新生钙质生成, *RUNX2*、*ALP* 和 *COL1A1* 等促成骨相关基因的表达上调。目前还有研究^[14]发现, ADMSCs 的外泌体具有阻止 MSCs 细胞凋亡、促进 MSCs 的增殖、促进血管生成和促进骨形成等作用。

2 ADMSCs 向成骨分化的信号通路调节机制

2.1 TGF- β /BMPs 信号通路

TGF- β /BMPs 信号通路参与绝大多数哺乳动物骨形成。研究^[16-17]发现鼠和人的 ADMSCs 都可以被骨形态发生蛋白, 如 BMP-2 和 BMP-7, 诱导向成骨细胞分化。BMPs 通过激活细胞表面受体复合物 BMPR-I (bone morphogenetic proteins receptor I, BMPR-I)、BMPR-II 将信号传递到细胞内后, 受体活化型 Smad (receptor-regulated Smad, R-Smad) 与共同通路型 Smad (common Smad, Co-Smad) 形成复合物进入细胞核, 与 DNA 启动子区域相互作用以激活成骨的重要转录因子如 *RUNX2*^[18]。BMPs 由多种细胞产生, 并累积在细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中。在组织修复和重塑过程中, BMPs 从 ECM 中释放出来, 并与附近的细胞相互作用。研究^[19-20]发现, 这两类复合体 BMP2/BMP7 和 BMP2/BMP9 均可以诱导 ADMSCs 向成骨分化。Xie 等^[18]在大鼠中研究发现, 微小 RNA-146a (microRNA-146a, miR-146a) 是一个 ADMSCs 向成骨分化的负调控因子, 抑制 miR-146a 的表达可以显著提高成骨分化的能力。miR-146a 与 Smad4 的 3'非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 结合, 抑制了 Smad4 的表达, 降低了 BMP2 诱导的 ADMSCs 向成骨分化。这也提示我们 miR-146a 可以作为一个 ADMSCs 向成骨分化的靶标。Lee 等^[21]利用小鼠颅脑损伤模型的研究发现, BMP9 处理的 ADMSCs 向成骨分化的能力远高于对照组, 处理 12 周的小鼠颅骨愈合度达到 27.39%, 远高于对照组的 9.89% ($P < 0.05$)。

2.2 Wnt 信号通路

Wnt (wingless/integrated, Wnt) 信号通路可以促进 ADMSCs 向成骨细胞分化。Wnt 是 FZD (frizzled protein family) 受体的大家族配体。Wnt 信号通路存在 3 种不同的细胞内信号级联: Wnt/ β -catenin 途径 (经典)、Wnt/ Ca^{2+} 途径 (非经典) 和 Wnt/planar polarity 途径。研究^[22]表明, 经典的 Wnt/ β -catenin 途径和非经典的 Wnt/ Ca^{2+} 都参与 ADMSCs 向成骨细胞分化的信号通路。经典途径是 Wnt 与 FZD 或低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (low density

lipoprotein receptor related protein5/6, LRP5/6) 结合后, 使 β -catenin 处于未磷酸化的状态, 转移到细胞核中调控基因的转录, 促进成骨分化。非经典途径是 Wnt5 与 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 结合后, 激活磷脂酶 C (phospholipases C, PLC) 的表达, 促进 Ca^{2+} 的释放。释放的 Ca^{2+} 激活细胞内的 *RUNX2*、*ALP* 和 *COL1A1* 等促成骨相关基因的表达, 促进 ADMSCs 向成骨细胞分化。研究^[23]发现, 姜黄素通过抑制 miR-126a-3p 的转录, 促进 ADMSCs 向成骨方向分化。miR-126a-3p 是一个 ADMSCs 成骨分化抑制因子, 通过与 LRP6 的 3'UTR 结合, 降低 LRP6 的表达, 阻断 Wnt 通路的激活, 抑制 ADMSCs 向成骨方向分化。

2.3 Notch 信号通路

Notch 信号通路在 ADMSCs 的分化及器官形成的过程中发挥作用。在胚胎发育时, Notch 信号通路可以参与小鼠的软骨及骨骼的形成。Liu 等^[24]利用小鼠骨关节炎的模型研究发现, 注射了 BMP9 刺激的 ADMSCs 可以促进软骨的再生, 达到治疗骨关节炎的目的。主要机制是 BMP9 通过上调 Notch1 和 Jagged1 的表达, 激活 Notch 信号通路, 促进 ADMSCs 向软骨分化。Notch 信号通路可调节成骨细胞的分化, 但是方式相对复杂。Engin 等^[25]研究发现, Notch 配体与受体互相作用后, 激活细胞内的结构域, 与核内转录因子 CSL (CBF-1, suppressor of hairless, Lag 的合称) 结合, 激活 *HES-1* (hairless and enhancer of split-1), *HES-1* 可以进一步上调 *RUNX2* 的转录, 促进成骨分化。Ji 等^[26]研究还发现, Notch 信号在成骨的早期与晚期会有不同效果。因为 Notch 信号通路在成骨分化中的作用还不完全清楚, 所以 Notch 信号通路参与 ADMSCs 向成骨分化还有待进一步研究。

2.4 Hedgehog 信号通路

Yalom 等^[27]研究发现, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的羟基胆固醇 (一种胆固醇的氧化衍生物) 可以显著提高人的 ADMSCs 向成骨分化。具体表现为碱性磷酸酶活性大幅升高, 有新生钙质生成, *RUNX2*、*ALP* 和 *COL1A1* 等促成骨相关基因的表达上调。加入环巴胺 (Hedgehog 途径抑制剂) 可以逆转这个现象, 表明 Hedgehog 信号通路促进 ADMSCs 向成骨分化。Shigunov 等^[28]利用吗啡胺 (Hedgehog 途径激活剂) 处理 ADMSCs 后, 发现 Hedgehog 通路的相关蛋白——SHh 蛋白 (Sonic hedgehog)、IHh 蛋白 (Indian Hedgehog) 和 DHh 蛋白 (Desert Hedgehog) 等作为细胞外信号与 PTCH1 (Patched-1)、PTCH2 (Patched-2) 以及 Smo

(Smoothed) 相应受体结合, 激活 SUFU (suppressor of Fused)、葡萄糖合成激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3)、GSK3 β 等胞内小分子信使, 促进下游 *Gli1*、*Gli2*、*Gli3* 的转录, 上调 *RUNX2*、*ALP* 和 *COL1A1* 等促成骨相关基因的表达; 而利用环巴胺处理细胞后, 结果正好相反。以上研究均证明了 Hedgehog 信号通路参与调控 ADMSCs 向成骨细胞分化。

2.5 FGF 信号通路

成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 成员可以参与 ADMSCs 向不同方向分化的调控^[29]。FGF 信号通路受多条信号通路调控, 比如细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、应激激活蛋白激酶 /C-Jun 氨基末端蛋白激酶 (stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 系统和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等, 这些通路均与成骨细胞分化相关^[30]。研究^[31]发现, 重组人血小板衍生生长因子 BB (recombinant human platelet-derived growth factor-BB, rhPDGF-BB) 可通过磷酸化 ERK 激活 MAPK 信号通路, 促进 ADMSCs 向成骨分化。进一步研究^[32]发现, 分别利用 3 种可以诱导成骨分化的试剂 FGFb、BMP2 和 NELL1 依次处理 ADMSCs 后, 10 ng/mL 的 FGFb 成骨效果最好, 而 BMP2 促进成骨分化的效果略差于 FGFb。该结果提示 FGFb 可以作为 ADMSCs 成骨分化的首选激活剂。

3 ADMSCs 及外囊泡的临床应用前景

ADMSCs 可以通过分泌细胞因子、细胞外囊泡的方式激活 TGF- β /BMPs、Wnt、Notch、Hedgehog 和 FGF 信号通路, 促进 MSCs 向成骨细胞分化, 因此 ADMSCs 及外囊泡可能通过增加骨细胞数量治疗骨质疏松症。本文从成本、安全性和应用前景 3 个角度, 比较 ADMSCs、ADMSCs 外囊泡和 BM-MSCs 的异同点, 探讨 ADMSCs 及其外囊泡治疗骨质疏松症的优势和前景。

3.1 ADMSCs 及其外囊泡的提取成本低

ADMSCs 及其外囊泡可以取材于吸脂手术获取的脂肪组织, 创伤小, 获取方便。BM-MSCs 的分离提纯则以骨髓作为原料, 需要进行侵入性手术, 难度大, 可行性低^[14]。研究^[33]发现, 脂肪提取物中 MSCs 的数量约占提取体积

的2%, 而骨髓中MSCs的数量仅占0.001%~1.004%。同样体积的脂肪提取物与骨髓相比较, ADMSCs提取率约是BM-MSCs的8倍。比较连续培养5代的ADMSCs与BM-MSCs的累计细胞群落增殖(cumulative population doublings, CPD), 结果^[34]显示每一代ADMSCs的CPD均高于BM-MSCs, 说明ADMSCs比BM-MSCs具有更强的增殖能力。因此, ADMSCs的获得率远高于BM-MSCs, 且增殖能力更强, 用于临床治疗的可行性高。

3.2 ADMSCs及其外囊泡的安全性高

MSCs可以通过分泌炎症细胞因子(如IFN- γ 、TNF- α 、IL-6)和免疫调节相关细胞因子(如PGR₂、TGF- β 和IDO)起到免疫调节的作用^[34]。利用ADMSCs或者BM-MSCs治疗骨质疏松症, 免疫排异反应的发生概率可能会显著降低。有临床研究向患者注射自体的含有丰富ADMSCs的脂肪来源的基质血管成分(adipose-derived stromal vascular fraction, ADSVF)^[35]或同种异体ADMSCs^[36], 患者的心电图、生命体征和体格检查没有变化, 不良反应(包括瘘管、轻度至中度的疼痛和注射部位肿胀)也是短暂和可恢复的, 证明ADMSCs及其外囊泡的临床应用具有可行性和安全性。有研究^[37-38]发现, BM-MSCs的系统性输入可能会诱发呼吸衰竭、心力衰竭、弥散性血管内凝血等不良反应, 说明直接注射BM-MSCs治疗骨质疏松症具有一定的危险性。但是, 无论是活细胞的ADMSCs还是BM-MSCs注入人体后, 其分化、增殖和凋亡等情况都不可控^[39]。与之相比, 采取注射MSCs分泌的外囊泡(如ADMSCs外囊泡)等非细胞疗法治疗骨质疏松症可能是最安全可控的方法。

3.3 ADMSCs外囊泡的应用前景好

目前已经有多项研究发现, 体内分别移植含有

ADMSCs^[40-41]、ADMSCs外囊泡^[42]和BM-MSCs^[43]的人工支架均可以促进成骨再生。但是, MSCs在体内扩增时可能发生表型的变化^[42], 影响疗效甚至造成不良反应。相比之下, ADMSCs的外囊泡无细胞分化的风险, 更安全可控。另外, ADMSCs的外囊泡可以直接从人的脂肪组织中提取, 避免培养细胞耗费时间。但是ADMSCs的外囊泡促成骨分化的具体原因还不清楚, 这也是今后研究的重点。现有研究^[44]发现, 人体不同部位的ADMSCs增殖及其成骨分化能力具有差异。膝盖和臀部的ADMSCs增殖能力最强, 但是成骨分化能力较弱, 需要诱导成骨因子刺激才能向成骨方向分化。臀部和股区的ADMSCs增殖速度较膝盖和臀部弱, 但显示出很强的碱性磷酸酶活性和基质矿化能力, 向成骨分化能力最强^[44]。但是这种差异的原因还不清楚。未来可以通过优化脂肪提取部位, 降低ADMSCs及其外囊泡的应用成本。

综上所述, 利用ADMSCs外囊泡相较于ADMSCs与BM-MSCs具有更好的安全性, 经济性和可行性, 促进成骨再生的应用前景最好。

4 结语与展望

本文介绍了ADMSCs向成骨分化诱导的主要方式和ADMSCs及外囊泡促成骨分化的相关调控信号通路。通过比较ADMSCs、ADMSCs外囊泡与BM-MSCs的提取成本、安全性和应用前景, 阐述了ADMSCs及外囊泡具有转化应用于治疗骨质疏松症的优势。随着我们对外囊泡认识的不断加深, 外囊泡逐渐被认为是细胞间通信、疾病诊断和预后的循环生物标志物的重要载体, 具有很高的临床应用潜质。我们期待也相信未来会有更多的针对ADMSCs及其外囊泡促成骨分化的研究, 进而服务于更多的骨质疏松症患者。

参·考·文·献

- [1] 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近5年来骨质疏松症流行病学研究现状[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2): 253-258.
- [2] 中华人民共和国统计局. 中国统计年鉴[M/OL]. 北京: 中国统计出版社, 2019[2020-08-02]. <http://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01>.
- [3] Tajima S, Tobita M, Orbay H, et al. Direct and indirect effects of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration[J]. Tissue Eng Part A, 2015, 21(5-6): 895-905.
- [4] Li B, Wang H, Qiu GX, et al. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor on bone morphogenetic proteins induced bone formation *in vivo*: influencing factors and future research directions[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2869572.
- [5] 陆伟, 冀堃. 脂肪组织来源干细胞的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(20): 9332-9335.
- [6] Mattinzoli D, Ikehata M, Tsugawa K, et al. FGF23 and fetuin-A interaction and mesenchymal osteogenic transformation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): e915.
- [7] Huh JE, Lee SY. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 2608-2616.
- [8] Cao YX, Jansen IDC, Sprangers S, et al. TNF- α has both stimulatory and inhibitory effects on mouse monocyte-derived osteoclastogenesis[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3273-3285.
- [9] 吴晓恋, 吴珺华. 细胞外囊泡与衰老的关系及其在骨代谢疾病中的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 1034-1039.
- [10] 黄春煌, 马媛媛, 任林, 等. 脂肪间充质干细胞条件培养基及其外泌体促成骨作用的体外研究[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2018, 12(2): 101-109.
- [11] Li Y, Jin DX, Xie WX, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes: a possible therapeutic strategy for osteoporosis[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018,

- 13(5): 362-368.
- [12] Lu ZF, Chen YJ, Dunstan C, et al. Priming adipose stem cells with tumor necrosis factor- α preconditioning potentiates their exosome efficacy for bone regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(21-22): 1212-1220.
- [13] Shapiro IM, Landis WJ, Risbud MV. Matrix vesicles: are they anchored exosomes?[J]. *Bone*, 2015, 79: 29-36.
- [14] Li WY, Liu YS, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(6): 5240-5254.
- [15] Wang XQ, Omar O, Vazirani F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193059.
- [16] Fu HL, Diao ZY, Shao L, et al. BMP-2 promotes chondrogenesis of rat adipose-derived stem cells by using a lentiviral system[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4): 8620-8631.
- [17] Taşlı PN, Aydın S, Yalvaç ME, et al. Bmp 2 and bmp 7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(6): 3016-3025.
- [18] Xie Q, Wei W, Ruan J, et al. Effects of miR-146a on the osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells and bone regeneration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42840.
- [19] Drevelle O, Daviau A, Lauzon MA, et al. Effect of BMP-2 and/or BMP-9 on preosteoblasts attached to polycaprolactone functionalized by adhesive peptides derived from bone sialoprotein[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1051-1062.
- [20] Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 94: 3-12.
- [21] Lee CS, Bishop ES, Dumanian Z, et al. Bone morphogenetic protein-9-stimulated adipocyte-derived mesenchymal progenitors entrapped in a thermoresponsive nanocomposite scaffold facilitate cranial defect repair[J]. *J Craniofac Surg*, 2019, 30(6): 1915-1919.
- [22] Li SS, Hu C, Li JW, et al. Effect of miR-26a-5p on the Wnt/ Ca^{2+} pathway and osteogenic differentiation of mouse adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 99(2): 174-186.
- [23] Li HL, Yue LF, Xu HY, et al. Curcumin suppresses osteogenesis by inducing miR-126a-3p and subsequently suppressing the Wnt/Lrp6 pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(17): 6983-6998.
- [24] Liu XW, Du MC, Wang Y, et al. BMP9 overexpressing adipose-derived mesenchymal stem cells promote cartilage repair in osteoarthritis-affected knee joint via the Notch1/Jagged1 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4623-4631.
- [25] Engin F, Lee B. Notching the bone: insights into multi-functionality[J]. *Bone*, 2010, 46(2): 274-280.
- [26] Ji YT, Ke YX, Gao S. Intermittent activation of notch signaling promotes bone formation[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2933-2944.
- [27] Yalom A, Hokugo A, Sorice S, et al. *In vitro* osteoinductive effects of hydroxycholesterol on human adipose-derived stem cells are mediated through the hedgehog signaling pathway[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2014, 134(5): 960-968.
- [28] Shigunov P, Balvedi LT, Santos MDM, et al. Crosstalk between Hedgehog pathway and energy pathways in human adipose-derived stem cells: a deep sequencing analysis of polysome-associated RNA[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8411.
- [29] Hayrapetyan A, Jansen JA, van den Beucken JJ. Signaling pathways involved in osteogenesis and their application for bone regenerative medicine[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015, 21(1): 75-87.
- [30] James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation[J]. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 2013: 684736.
- [31] Jin YQ, Zhang WJ, Liu Y, et al. RhPDGF-BB via ERK pathway osteogenesis and adipogenesis balancing in ADSCs for critical-sized calvarial defect repair[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(23-24): 3303-3313.
- [32] Nielsen EØ, Chen L, Hansen JO, et al. Optimizing osteogenic differentiation of ovine adipose-derived stem cells by osteogenic induction medium and FGFb, BMP2, or NELL1 *in vitro*[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 9781393.
- [33] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. *Keio J Med*, 2005, 54(3): 132-141.
- [34] Li CY, Wu XY, Tong JB, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 55.
- [35] Lightner AL. The present state and future direction of regenerative medicine for perianal Crohn's disease[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(8): 2128-2130.e4.
- [36] Lu LJ, Dai CX, Du H, et al. Intra-articular injections of allogeneic human adipose-derived mesenchymal progenitor cells in patients with symptomatic bilateral knee osteoarthritis: a Phase I pilot study[J]. *Regen Med*, 2020, 15(5): 1625-1636.
- [37] Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back[J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(5): 203-209.
- [38] Liao L, Shi BZ, Chang HR, et al. Heparin improves BMSC cell therapy: Anticoagulant treatment by heparin improves the safety and therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell cytottherapy[J]. *Theranostics*, 2017, 7(1): 106-116.
- [39] Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease[J]. *J Gastroenterol*, 2019, 54(9): 763-773.
- [40] Marycz K, Pazik R, Zawisza K, et al. Multifunctional nanocrystalline calcium phosphates loaded with Tetracycline antibiotic combined with human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs)[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 69: 17-26.
- [41] Birhanu G, Akbari JH, Seyedjafari E, et al. An improved surface for enhanced stem cell proliferation and osteogenic differentiation using electrospun composite PLLA/P123 scaffold[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(6): 1274-1281.
- [42] Li WY, Liu YS, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(6): 5240-5254.
- [43] Rodriguez-Collazo ER, Urso ML. Combined use of the Ilizarov method, concentrated bone marrow aspirate (cBMA), and platelet-rich plasma (PRP) to expedite healing of bimalleolar fractures[J]. *Strategies Trauma Limb Reconstr*, 2015, 10(3): 161-166.
- [44] Reumann MK, Linnemann C, Aspera-Werz RH, et al. Donor site location is critical for proliferation, stem cell capacity, and osteogenic differentiation of adipose mesenchymal stem/stromal cells: implications for bone tissue engineering[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): e1868.

[收稿日期] 2019-11-01

[本文编辑] 包 玲 瞿麟平