

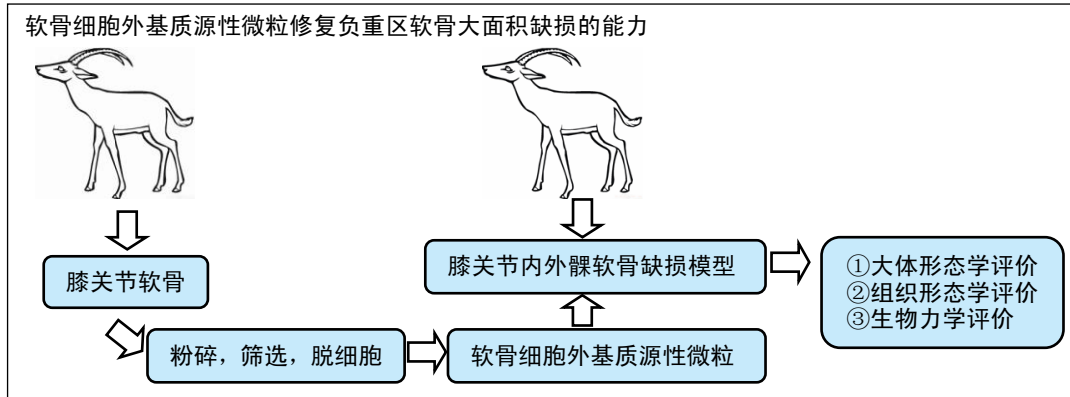
软骨细胞外基质源性微粒修复山羊负重区大面积软骨缺损

侯昂扬^{1,2,3}, 陈鹏³, 汤贺³, 韩公海³, 刘平^{1,2,3}, 陈凯鹏^{1,2}, 彭江³, 张宇明² (¹山西医科大学, 山西省太原市 030001; ²山西医科大学附属人民医院, 山西省太原市 030012; ³解放军总医院全军骨科研究所, 北京市 100853)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1567

ORCID: 0000-0001-9854-9381(侯昂扬)

文章快速阅读:



侯昂扬, 男, 1993年生, 山西省运城市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士, 主要从事关节软骨再生研究。

通讯作者: 张宇明, 硕士, 主任医师, 山西省人民医院骨科, 山西省太原市 030012

文献标识码:A

稿件接受: 2018-10-25



文题释义:

软骨细胞外基质源性微粒: 将新鲜软骨通过粉碎、过筛、脱细胞等一系列处理, 得到的富含软骨细胞外基质, 具有良好的生物相容性, 可快速扩增种子细胞并具有促进干细胞成软骨分化能力的软骨微粒。

细胞外基质: 是由细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子, 主要是一些多糖和蛋白或蛋白聚糖, 这些物质构成复杂的网架结构, 支持并连接组织结构、调节组织的发生和细胞的生理活动。

摘要

背景: 随着组织工程技术的发展, 使用天然的生物材料作为支架可以加快新生软骨组织的生成, 有利于软骨缺损的修复。

目的: 探究软骨细胞外基质源性微粒修复负重区软骨大面积缺损的能力。

方法: 刮取山羊膝关节软骨, 通过脱细胞技术制备细胞外基质源性微粒。取 12 只中国山羊(解放军总医院动物实验中心提供), 制作右股骨内外髌负重区直径 8 mm、深 2 mm 的全层骨软骨缺损模型, 随机分为 2 组, 实验组($n=6$)于缺损处植入同种异体软骨细胞外基质源性微粒, 并用纤维蛋白胶固定; 对照组($n=6$)仅填入纤维蛋白胶。植入 3, 6 个月取右膝关节股骨远端样本, 进行组织学及生物力学评价。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色: 对照组植入 3 个月时缺损基本无修复, 有少量纤维组织填充, 缺损区凹陷, 基质无异染, 两侧交界面整合差; 植入后 6 个月缺损区仍主要为纤维组织, 少量纤维软骨填充, 新生组织与周围正常组织仍有明显界限。实验组植入 3 个月时缺损处面积较对照组小, 新生组织为纤维软骨与透明软骨复合体, 内部可见典型软骨陷窝, 细胞排列较为有序; 植入 6 个月时缺损区组织透明软骨比例增大, 表面较为平滑, 与周围正常软骨组织类似, 并整合良好, 放大可见典型软骨陷窝, 细胞排列有序; ②番红 O-固绿染色: 植入 3 个月时, 对照组缺损区基本无蛋白多糖红染, 实验组缺损区显示明显蛋白多糖着色; 植入 6 个月时, 实验组新生组织中蛋白多糖着色明显多于对照组, 且实验组新生组织透明软骨比例大, 与周围正常软骨类似; ③生物力学: 植入后 6 个月, 实验组平均杨氏模量明显高于对照组($P < 0.05$); ④结果表明: 使用软骨细胞外基质源性微粒可促进软骨缺损的修复。

关键词:

软骨修复; 软骨细胞外基质源性微粒; 杨氏模量; 负重区软骨缺损; 大面积缺损; 蛋白聚糖

主题词:

软骨, 关节; 细胞外基质; 组织工程

中图分类号: R459.9; R314

基金资助:

解放军总医院转化医学项目(2016TM-020), 项目负责人: 彭江; 山西省重点研发计划项目(201703D321027-4), 项目负责人: 张宇明

缩略语:

软骨细胞外基质源性微粒: cartilage extracellular matrix derived particles, CEDPs

Cartilage extracellular matrix-derived particles for repairing large-area cartilage defects in goat weight-bearing area

Hou Angyang^{1,2,3}, Chen Peng³, Tang He³, Han Gonghai³, Liu Ping^{1,2,3}, Chen Kaipeng^{1,2}, Peng Jiang³, Zhang Yuming² (¹Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China; ³PLA Orthopedics Institute of PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Hou Angyang, Master candidate, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China; PLA Orthopedics Institute of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Zhang Yuming, Master, Chief physician, People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: With the development of tissue engineering technology, the use of natural biological materials as scaffolds can accelerate the formation of new cartilage tissue and facilitate the repair of cartilage defects.

OBJECTIVE: To explore the ability of cartilage extracellular matrix-derived particles to repair cartilage defects in the weight-bearing area.

METHODS: Extracellular matrix-derived particles were prepared by decellularization of goat knee cartilage. Twelve Chinese goats (provided by the Experimental Animal Center of PLA General Hospital in China) were selected to make a full-thickness osteochondral defect model with a diameter of 8 mm and a depth of 2 mm in the weight-bearing area of the inner and outer condyles of the right femur. These goat models were randomly divided into two groups. In the experimental group ($n=6$), the cartilage extracellular matrix-derived particles were implanted to the defect and fixed with fibrin glue. The control group ($n=6$) was only filled with fibrin glue. General, histological and biomechanical evaluations were conducted with distal right femur samples taken at 3 and 6 months after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin-eosin staining: The defect was basically not repaired at 3 months after implantation in the control group, with a small amount of fibrous tissue filling, sag in the defect area, matrix staining and poor integration of the bilateral interface; at 6 months after implantation, the defect area in the control group was still mainly filled with fibrous tissues and contained a small amount of fibrous cartilage, and there was still a clear boundary between the new tissue and surrounding normal tissue. At 3 months after implantation, the defect area of the experimental group was smaller than that of the control group, and the new tissue was a complex of fibrocartilage and hyaline cartilage. At 6 months after implantation, the proportion of tissue hyaline cartilage in the defect area of the experimental group increased, and the surface was relatively smooth, similar to the surrounding normal cartilage tissue, and well integrated. Enlarged cartilage lacunae were visible and the cells are arranged in order. (2) Safranin O-Fast Green staining: At 3 months after implantation, the defect area of the control group was basically free of proteoglycan red stain, while the defect area of the experimental group showed obvious proteoglycan coloring. At 6 months after implantation, the amount of proteoglycan-stained new tissue in the experimental group was significantly higher than that in the control group, and the proportion of hyaline cartilage in the new tissue was higher in the experimental group, similar to that of surrounding normal cartilage. (3) Biomechanical analysis: Six months after implantation, the average Young's modulus of the experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). All the findings reveal that the use of cartilage extracellular matrix-derived microparticles can promote the repair of cartilage defects.

Subject headings: Cartilage, Articular; Extracellular Matrix; Tissue Engineering

Funding: the Translational Medicine Program of PLA General Hospital, No. 2016TM-020 (to PJ); the Major Research and Development Plan of Shanxi Province, No. 201703D321027-4 (to ZYM)

0 引言 Introduction

骨关节炎是目前已知的一种最常见的关节软骨及其周围组织的慢性退行性关节疾病^[1]。在骨关节炎的病理表现中, 关节软骨损伤是一个非常明显且严重的改变^[2]。由于关节软骨是一种缺乏血管、神经和淋巴的组织, 所以其再生能力非常有限, 于是如何能促进软骨组织再生成为一直以来大家研究的热点^[3]。近年来, 软骨组织工程技术作为一种新的治疗手段正在逐渐成熟, 为这一损伤的治疗带来了希望。

组织工程3要素中, 种子细胞一直以来都是大家研究的热点^[4]。目前针对这一问题, 许多研究表明成年人体内存在能够修复和再生受损组织的细胞, 包括胚胎干细胞及具有多项或全能分化能力的成体干细胞^[5]。间充质干细胞是来源于间质组织、具有增殖和多向分化能力的细胞, 广泛参与体内的组织稳定、重塑、损伤修复过程^[6]。随着组织工程研究的发展, 间充质干细胞作为组织修复种子细胞的应用越来越广泛。脂肪组织来源干细胞能够在特定诱导条件下自我更新并分化为各种结缔组织细胞, 包括软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞^[7]。由于脂肪组织还具有分布广泛、易于获取的优点, 所以脂肪间充质干细胞成为目前研究和应用较为广泛的一类干细胞^[8]。据文献报道, 在关节腔内的关节液及滑膜中可检测到间充质干细胞, 并且这些间充质干细胞被证明具有很强的分化能力, 尤其是成软骨分化潜力^[9-10]。

软骨细胞外基质源性微粒(cartilage extracellular matrix derived particles, CEDPs)具有良好的生物相容性, 微粒表面的绒毛状微丝结构利于软骨细胞的黏附, 其中绒

毛状微丝结构显著增加了微粒的比表面积, 为细胞增长提供了足够生长增殖空间, 能够在短时间内大量扩增种子细胞; 进一步形成的软骨微组织可直接用于构建组织工程软骨, 并且提供了天然的细胞外基质, 缩短了软骨形成周期。细胞外基质源性微粒为种子细胞提供了一个天然的软骨微环境, 这有利于种子细胞生长, 并可促进干细胞成软骨分化^[11-12]。

功能性软骨组织工程的一个关键目标是开发具有接近于天然组织力学性质的结构。关节软骨的主要功能是承载负荷, 因此抗压性能是其非常重要的力学性能^[13]。通过杨氏模量能够直观反映出软骨组织的力学性能。有研究表明, 正常关节软骨基质中的主要抗压成分是蛋白多糖, 随着蛋白多糖含量的下降, 其抗压能力降低^[14]。

此次实验中, 利用CEDPs填充山羊关节负重区软骨缺损, 并为关节液中的间充质干细胞提供附着载体, 通过大体观察、组织学分析及生物力学数据来评价最终的软骨缺损区修复效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组, 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年9月至2018年5月在解放军总医院骨科研究所进行。

1.3 材料

实验主要试剂及仪器: 十二烷基磺酸钠(Sigma, 美国); 体积分数4%中性甲醛溶液、EDTA脱钙液、苏木精-伊红染色试剂盒、番红O-固绿染色试剂盒(索莱宝, 中国); Live/Dead细胞死活染色试剂盒(Life Technologies公司, 美

国);猪源纤维蛋白黏合剂(倍绣;中国);组织粉碎机DJ13B-C669SG(九阳,中国);BH-51显微镜、DP70图像采集系统(Olympus,日本);RM2135石蜡切片机、石蜡包埋机、组织脱水机(Leica,德国);纳米压痕测试仪Piuma(Optics11公司,荷兰)。

实验动物: 12只健康雄性1岁中国山羊,体质量30-35 kg,由解放军总医院动物实验中心提供。实验动物的管理和使用获得解放军总医院动物管理委员会的许可。

1.4 实验方法

1.4.1 CEDPs的制备 从农贸市场买新鲜的完整羊膝关节,用手术刀刮取关节软骨,浸泡于PBS中,冲洗3遍;然后用组织粉碎机物理粉碎成小颗粒状,而后将这些颗粒重新悬浮于PBS,分别通过150, 300 μm 的筛网过滤,获得直径150-300 μm 的CEDPs。继而用1%SDS溶液、DNase (50 U/mL)及RNase(1 U/mL)逐步浸泡进行脱细胞处理。冲洗残留化学试剂, ^{60}Co γ 射线消毒后,将CEDPs保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 下备用^[15],见图1。

1.4.2 山羊软骨缺损模型的建立与缺损填充 取12只健康雄性中国山羊,术前肌注3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,常规消毒铺巾,取右膝关节内侧入路,逐层切开皮肤、关节囊,使髌骨向外侧完全脱位,充分暴露股骨内外侧髁,使用无菌环钻在股骨内外侧髁负重区分别作一个直径8 mm、深2 mm的全层骨软骨缺损,随机分为2组:对照组($n=6$)仅由纤维蛋白黏合剂填充;实验组($n=6$)由CEDPs填充,并用纤维蛋白黏合剂固定。填充完毕后保证缺损处表面光滑平整。待纤维胶快速凝固后复位髌骨,检查关节活动情况,确保填充物不会掉落后,逐层缝合关节囊、皮下筋膜及皮肤。植入后3, 6个月取材,分别进行大体观、组织学及生物力学分析,评估软骨缺损修复效果。

1.5 主要观察指标

1.5.1 标本大体观察评价 植入后3, 6个月,每组每个时间点随机选取3只山羊,通过过量麻醉处死,打开右膝关节腔,观察有无感染或异常分泌物现象。取下右膝关节股骨远端,观察缺损修复区新生组织填充高度与周围组织整合情况、表面光滑平整度等。使用国际软骨修复协会-软骨修复大体评分系统进行大体观察评分,评分由3个专业领域人员独立完成,盲法评估,评分越高修复效果越好^[16]。

1.5.2 标本组织学评价 大体观察后,取缺损区组织,经固定、脱钙等一系列处理后,石蜡包埋、切片,然后进行苏木精-伊红染色和番红O-固绿染色,显微镜下观察修复情况。根据国际软骨修复协会关节软骨修复评估标准,分别从平整度、基质类型、细胞分布、细胞活力、软骨下骨等方面进行评价,评分由3个专业人员独立完成,盲法评估,其结果反映了关节软骨修复程度,得分越高修复效果越好^[17]。

1.5.3 标本生物力学评价 植入后6个月,缺损区基本被新生组织覆盖,取缺损处修复组织,将样本固定在载玻片

上,固定于纳米压痕测试仪Piuma底座上,将缺损中心调整至探头的垂直正下方,分别于各个缺损区不同的点进行压缩测试,缺损区周围正常软骨组织也进行同样的测试,得到各压力点的接触刚度S,通过软件内置公式分析得到各自的杨氏模量^[18]。

1.6 统计学分析 采用统计软件SPSS 22.0进行数据分析,数据表示为 $\bar{x}\pm s$,采用t检验进行两组间比较,多组间比较采用单因素方差分析,多时点观测资料则采用重复测量方差分析,当 $P < 0.05$ 时表示所分析的数据差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 12只中国山羊均进入结果分析。

2.2 修复区域大体观察及评分结果 植入后3个月,实验组缺损处部分被新生组织填充,修复平面较平整,修复面色泽与周围正常组织类似,与周围正常组织仍可见明显界限;对照组缺损处未被新生组织填充,软骨下骨暴露。植入后6个月,实验组修复表面光滑平整,整合良好,与周围正常组织基本类似;对照组缺损处由少量新生组织填充,修复平面粗糙。实验组各个时间点的国际软骨修复协会大体评分均明显高于对照组($P < 0.05$),见图2。

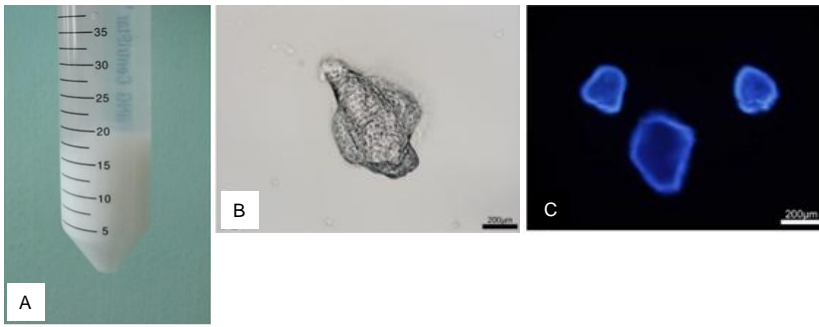
2.3 修复区域组织学观察及评分结果

苏木精-伊红染色: ①对照组:植入3个月时,缺损基本无修复,有少量纤维组织填充,缺损区凹陷,基质无异染,两侧交界面整合差;植入后6个月时,缺损区仍主要为纤维组织,少量纤维软骨填充,新生组织与周围正常组织仍有明显界限;②实验组:植入3个月时,缺损处面积较对照组小,新生组织为纤维软骨与透明软骨复合体,内部可见典型软骨陷窝,细胞排列较为有序^[19];植入6个月时,缺损区组织透明软骨比例增大,表面较为平滑,与周围正常软骨组织类似,并整合良好,放大可见典型软骨陷窝,细胞排列有序,见图3A。

番红O-固绿染色: ①植入3个月时,对照组缺损区基本无蛋白多糖红染,实验组缺损区显示明显蛋白多糖着色;植入6个月时,实验组新生组织中蛋白多糖着色明显多于对照组;实验组新生组织透明软骨的比例大,与周围正常软骨类似,表现出较好的修复效果,见图3B。证明填充的软骨微粒能很好地整合进去,为软骨再生提供组成成分。

国际软骨修复协会组织学评分显示^[20],实验组不同时间点组织学评分高于对照组($P < 0.05$),见图4。

2.4 生物力学测试结果及分析 植入后6个月时使用纳米压痕测试仪Piuma测试结果,见图5A-C,每张图中通过拟合得到的斜率即为接触刚度,而杨氏模量正比于接触刚度,所以当接触面积相等时,斜率越大其杨氏模量就越大^[21]。实验组平均杨氏模量为2.53 MPa,明显高于对照组的1.15 MPa($P < 0.05$),见图5D,实验组的杨氏模量更接近于缺损区周围正常软骨的杨氏模量(4.55 ± 1.24) MPa。



图注: 图中 A 为软骨细胞外基质源性微粒大体观; B 为脱细胞后软骨微粒形态观察(光学显微镜, $\times 100$), 微粒表面较多凹陷, 利于细胞附着生长; C 为软骨细胞外基质源性微粒 DAPI 染色(荧光显微镜, $\times 100$), DAPI 染色显示微粒中几乎无细胞残留。

图 1 软骨细胞外基质源性微粒大体观及镜下观
Figure 1 General and microscopic views of cartilage extracellular matrix-derived particles

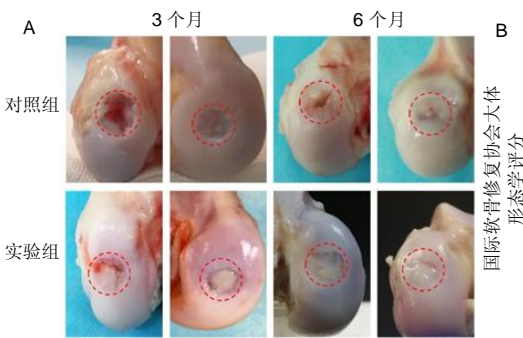
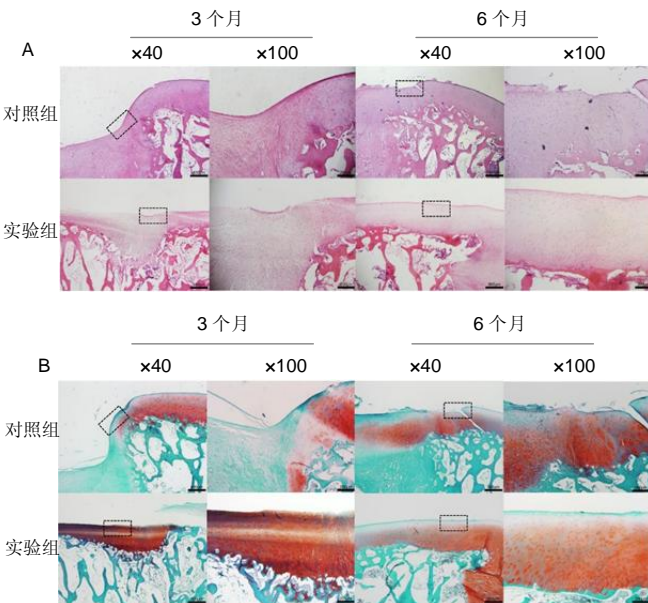


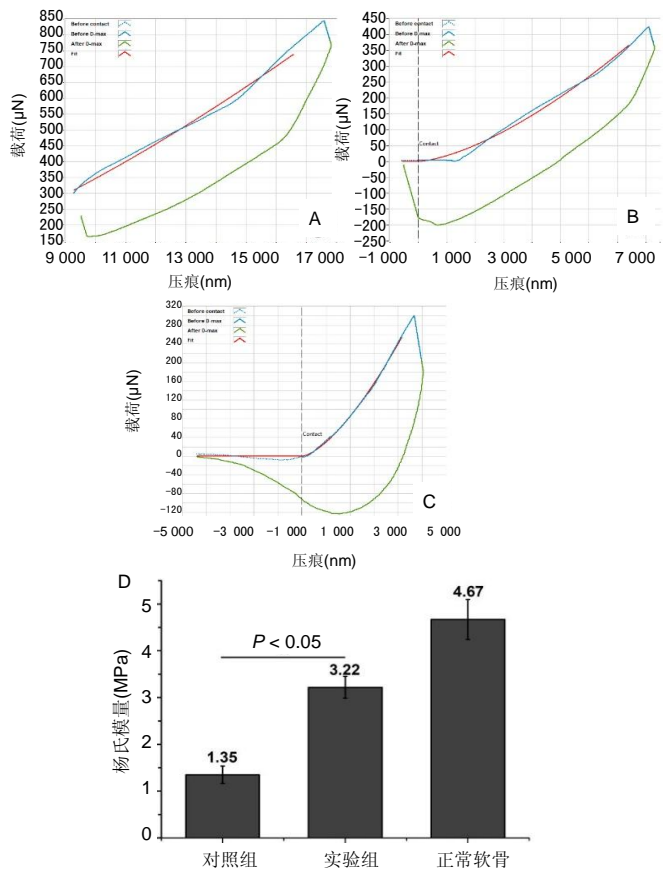
图 2 实验组与对照组软骨缺损区大体观及评分结果

Figure 2 General view and scoring of the cartilage defect area in the experimental and control groups



图注: 图中 A 为苏木精-伊红染色(光学显微镜): 对照组植入 3 个月时缺损基本无修复, 有少量纤维组织填充, 缺损区凹陷, 基质无异染, 两侧交界面整合差; 植入后 6 个月时, 缺损区仍主要为纤维组织, 少量纤维软骨填充, 新生组织与周围正常组织仍有明显界限。实验组植入 3 个月时缺损处面积较对照组小, 新生组织为纤维软骨与透明软骨复合体, 内部可见典型软骨陷窝, 细胞排列较为有序; 植入 6 个月时, 缺损区组织透明软骨比例增大, 表面较为平滑, 与周围正常软骨组织类似并整合良好, 放大可见典型软骨陷窝, 细胞排列有序; B 为番红 O-固绿染色(光学显微镜): 植入 3 个月时, 对照组缺损区基本无蛋白多糖染色, 实验组缺损区显示明显蛋白多糖着色; 植入 6 个月时, 实验组新生组织中蛋白多糖着色明显多于对照组; 实验组新生组织透明软骨的比例大, 与周围正常软骨类似, 表现出较好的修复效果。每组右图均为左图黑色虚线框区域放大图。

图 3 材料植入后不同时间点实验组与对照组缺损区组织学染色结果
Figure 3 Histological staining results for the cartilage defect area at different time after implantation



图注: 图中 A 为对照组纳米压痕测试结果, B 为实验组纳米压痕测试结果, C 为周围正常软骨纳米压痕测试结果, 红色线为拟合后的压头负荷与位移的线性关系, 其斜率正比于杨氏模量; D 为实验组与对照组杨氏模量统计分析。

图 5 材料植入后 6 个月实验组与对照组软骨标本生物力学测试结果
Figure 5 Biomechanical testing of the cartilage samples at 6 months after implantation

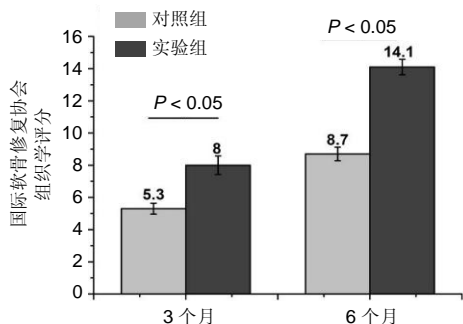


图4 材料植入后不同时间点实验组与对照组软骨缺损区组织学评分
Figure 4 Histological scoring of the cartilage defect area at different time after implantation

3 讨论 Discussion

目前, 软骨再生仍然是一个非常困难的临床问题, 其原因就是软骨组织缺乏血管结构, 自我再生能力极其有限^[22-23]。临床上虽然有多种软骨损伤的治疗方法, 如微骨折技术、自体软骨移植等^[24], 但均存在一定的局限性。随着组织工程技术的发展, 利用组织工程技术构建软骨组织给软骨损伤的治疗带来了新的希望^[25-26]。可用于构建组织工程支架的材料, 主要分为人工合成的高分子聚合物和天然来源的生物大分子蛋白^[27]。相较于人工合成材料, 天然来源的生物材料具有良好的生物相容性和亲水性, 是构建组织工程支架的理想材料^[28-29]。

CEDPs作为来源于软骨本身的材料, 不仅能为细胞增殖和分化提供良好的微环境, 还能够为新生软骨合成提供现成的原材料。有文献认为, 直径在3 mm以下的缺损有可能通过自身部分或全部修复, 但直径大于4 mm的缺损则不能自行修复^[30-31]。在此次实验中, 对照组2个时间点的结果表明大面积软骨缺损无法自行完全修复, 部分修复的组织为纤维组织或纤维软骨, 而不是正常的透明样软骨。使用CEDPs填充后, 一方面, 给了缺损区软骨下骨一个良好的保护, 使之不会进一步损害; 另一方面, 给关节液中的滑膜间充质干细胞提供了附着载体^[32], 加快了新生软骨的生成。

正常关节软骨是一种黏弹性体, 在恒定应力或应变时分别呈现蠕变或应力松弛现象。虽然杨氏模量是反映线弹性固体材料刚性的参数, 但人们常使用线弹性理论模型来模拟关节软骨这样黏弹体的弹性性质, 即测试时取软骨上层, 即全厚的10%–15%应变时的应力-应变数据来计算^[33-34]。在此次研究中, 使用CEDPs修复实验组的生物力学特性要高于对照组, 说明填充进去的微粒不仅能让细胞附着, 还可更好地整合进新生组织, 提供良好的力学特性。

实验创新性使用脱细胞的CEDPs修复山羊这类大动物负重区大面积软骨缺损, 采用一次手术修复, 并且在验证术后修复效果时从宏观大体, 组织学及生物力学方面进行了较为全面的分析。术后3, 6个月时实验组均显示较对照组好的修复效果, 说明这种天然细胞微载体可加快缺损区软骨的生成, 且新生软骨组织与天然软骨组织形态结构

类似, 具有一定的应用价值。但此次实验并未明确微载体在体内会招募哪类细胞, 这需要接下来进行探索, 进一步研究出更好的修复负重区大面积软骨缺损办法, 为将来的临床应用提供有力证据。

致谢: 感谢解放军总医院全军骨科研究所提供实验仪器及设备, 感谢彭江教授等全体老师和同学的指导帮助。同时感谢张宇明教授对论文提出的宝贵意见。

作者贡献: 第一作者与通讯作者负责实验的设计与实施, 其他共同作者协助实验操作与文章修改。

经费支持: 该文章接受了“解放军总医院转化医学项目(2016TM-020)”、“山西省重点研发计划项目(201703D321027-4)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经解放军总医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经由山西医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Lourenco S, Lucas R, Araujo F, et al. Osteoarthritis medical labelling and health-related quality of life in the general population. *Health Qual Life Outcomes*. 2014;12:146.
- [2] Dell'Accio F, Vincent TL. Joint surface defects: clinical course and cellular response in spontaneous and experimental lesions. *Eur Cell Mater*. 2010;20:210-217.
- [3] Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11:21-34.
- [4] Huang H, Zhang X, Hu X, et al. A functional biphasic biomaterial homing mesenchymal stem cells for in vivo cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2014;35:9608-9619.
- [5] Ko JY, Im GI. Chondrogenic and Osteogenic Induction from iPS Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1357:441-450.
- [6] Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*. 2012;336:717-721.
- [7] 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. *PLoS One*. 2017;12:e0176107.

- [8] Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, et al. Combating Osteoarthritis through Stem Cell Therapies by Rejuvenating Cartilage: A Review. *Stem Cells Int.* 2018;2018:5421019.
- [9] Jones EA, English A, Henshaw K, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):817-827.
- [10] van Lent PL, van den Berg WB. Mesenchymal stem cell therapy in osteoarthritis: advanced tissue repair or intervention with smouldering synovial activation? *Arthritis Res Ther.* 2013; 15(2):112.
- [11] 卢强, 张莉, 彭江, 等. 可注射性组织工程软骨源性微载体的微观结构及其生物相容性观察[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(9): 688-691.
- [12] Sutherland AJ, Converse GL, Hopkins RA, et al. The bioactivity of cartilage extracellular matrix in articular cartilage regeneration. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(1):29-39.
- [13] Olvera D, Daly A, Kelly DJ. Mechanical Testing of Cartilage Constructs. *Methods Mol Biol.* 2015;1340: 279-287
- [14] DiSilvestro MR, Suh JK. Biphasic poroviscoelastic characteristics of proteoglycan-depleted articular cartilage: simulation of degeneration. *Ann of Biomed Eng.* 2002,30: 792-800
- [15] Yin H, Wang Y, Sun Z, et al. Induction of mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and functional cartilage microtissue formation for in vivo cartilage regeneration by cartilage extracellular matrix-derived particles. *Acta Biomater.* 2016;33:96-109.
- [16] Hsieh YH, Shen BY, Wang YH, et al. Healing of Osteochondral Defects Implanted with Biomimetic Scaffolds of Poly(epsilon-Caprolactone)/Hydroxyapatite and Glycidyl-Methacrylate-Modified Hyaluronic Acid in a Minipig. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).pii: E1125. doi: 10.3390/ijms19041125.
- [17] Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, et al. Cartilage repair and subchondral bone remodeling in response to focal lesions in a mini-pig model: implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(3-4):850-860.
- [18] Doyran B, Tong W, Li Q, et al. Nanoindentation modulus of murine cartilage: a sensitive indicator of the initiation and progression of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(1):108-117.
- [19] Chang NJ, Lin CC, Shie MY, et al. Positive effects of cell-free porous PLGA implants and early loading exercise on hyaline cartilage regeneration in rabbits. *Acta Biomater.* 2015;28: 128-137.
- [20] Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:45-57.
- [21] Mattei G, Gruca G, Rijnveld N, et al. The nano-epsilon dot method for strain rate viscoelastic characterisation of soft biomaterials by spherical nano-indentation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;50:150-159.
- [22] Jeznach O, Kolbuk D, Sajkiewicz P. Injectable hydrogels and nanocomposite hydrogels for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2018. doi: 10.1002/jbm.a.36449. [Epub ahead of print] Review.
- [23] 方洪松, 周建林, 彭昊, 等. 组织工程支架材料修复关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(52): 7891-7898
- [24] Polat G, Ersen A, Erdil ME, et al. Long-term results of microfracture in the treatment of talus osteochondral lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(4):1299-1303.
- [25] Noeaid P, Salih V, Beier JP, et al. Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications. *J Cell Mol Med.* 2012;16(10):2247-2270.
- [26] Vinatier C, Guicheux J. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59(3):139-144.
- [27] Agarwal T, Narayan R, Maji S, et al. Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 2016;93(Pt B):1499-1506.
- [28] Cheng NC, Estes BT, Awad HA, et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):231-241.
- [29] 侯立刚, 杨建义. 骨修复中应用的生物降解可吸收材料[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(3):441-445..
- [30] Christensen BB, Foldager CB, Olesen ML, et al. Experimental articular cartilage repair in the Gottingen minipig: the influence of multiple defects per knee. *J Exp Orthop.* 2015;2(1):13.
- [31] Gotterbarm T, Breusch SJ, Schneider U, et al. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim.* 2008;42(1):71-82.
- [32] Baboolal TG, Mastbergen SC, Jones E, et al. Synovial fluid hyaluronan mediates MSC attachment to cartilage, a potential novel mechanism contributing to cartilage repair in osteoarthritis using knee joint distraction. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(5):908-915.
- [33] Saarakkala S, Korhonen RK, Laasanen MS, et al. Mechano-acoustic determination of Young's modulus of articular cartilage. *Biorheology.* 2004;41(3-4):167-179.
- [34] Bhumiratana S, Eton RE, Oungouljian SR, et al. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown in vitro by mesenchymal condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 ;111(19):6940-6945.