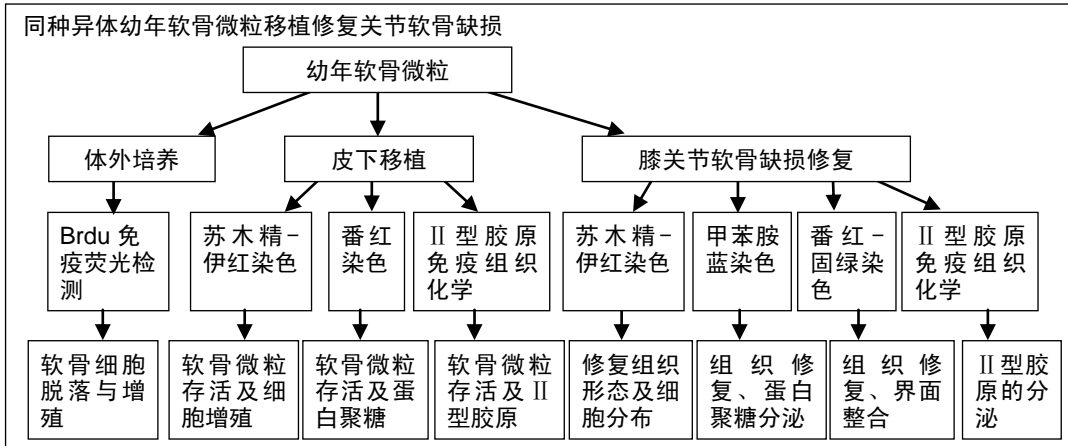


同种异体幼年软骨微粒移植修复关节软骨缺损的可行性

尤奇¹, 段小军², 张骏¹, 金瑛¹, 彭旭¹, 葛振¹, 刘毅¹ (1遵义医学院附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000; 2陆军军医大学西南医院关节外科, 重庆市 400038)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1574 ORCID: 0000-0002-9081-1805(尤奇)

文章快速阅读:



尤奇, 男, 1989年生, 安徽省阜阳市人, 汉族, 遵义医学院在读硕士, 主要从事软骨组织工程研究。

通讯作者: 刘毅, 教授, 遵义医学院附属医院关节外科, 贵州省遵义市 563000

文献标识码:A
稿件接受: 2018-10-15



文题释义:

同种异体移植: 同一物种内不同基因型的个体间器官、组织、细胞的移植, 是临床最常见的移植类型, 也是移植免疫学研究的重点。

幼年软骨微粒: 是将取得的幼年关节软骨组织, 切成大小为 1 mm×1 mm×1 mm 的软骨微粒。在美国, 同种异体幼年软骨微粒已经进入临床研究阶段, 目前中国还没有相关技术的报道。

摘要

背景: 同种异体幼年软骨微粒制备简单, 获取容易, 该技术在美国已经进入临床研究阶段, 但临床上还处于“黑箱”操作阶段, 对于移植的幼年软骨微粒是如何通过生物化学机制和基因信号转导发挥生物学效应, 目前还不清楚。目前, 中国还没有相关技术的报道。

目的: 探索同种异体幼年软骨微粒移植修复关节软骨缺损的可行性。

方法: 从幼年贵州小香猪(陆军军医大学实验动物中心提供)膝关节获取同种异体幼年软骨微粒, 体外培养 1, 3, 7 d 进行 Brdu 免疫荧光检测。将同种异体幼年软骨微粒/纤维蛋白凝胶复合物移植于 SCID 大鼠(陆军军医大学实验动物中心提供)皮下, 1 个月后取材, 进行苏木精-伊红染色、番红染色、免疫组织化学检测。在 10 只成年贵州小香猪(陆军军医大学实验动物中心提供)膝关节软骨面制作直径 8 mm 的软骨缺损, 随机分 2 组干预, 实验组软骨缺损处移植同种异体幼年软骨微粒/纤维蛋白凝胶复合物, 空白组不移植任何材料, 3 个月后取材, 对修复组织进行苏木精-伊红、番红-固绿、甲苯胺蓝、免疫组织化学检测。

结果与结论: ①在同种异体幼年软骨微粒的体外培养中, 第 1 天见到极少的软骨细胞脱落与增殖; 第 3 天可见少量的软骨细胞脱落与增殖; 第 7 天见到有明显的细胞脱落与增殖, 且增殖的细胞分布在切缘周围; ②皮下移植 1 个月后, 移植的同种异体幼年软骨微粒仍然存活且周围有少量的软骨细胞增殖; ③软骨缺损修复 3 个月后, 空白组未见明显修复组织; 实验组可见明显的修复组织, 新生的软骨组织颜色与正常软骨组织颜色相似, 且与周围正常软骨组织界面整合良好, 细胞分布较均匀; ④结果表明, 同种异体幼年软骨微粒修复关节软骨缺损可取得良好的效果。

关键词:

同种异体; 关节软骨缺损; 幼年软骨微粒; 增殖; 修复; 生物材料

主题词:

软骨, 关节; 纤维蛋白; 组织工程

中图分类号: R459.9; [R318.06]

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81071484), 项目负责人: 段小军; 贵州省科技厅联合基金(黔科合 LH 字 [2017]7015 号)

You Qi, Master candidate, Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Liu Yi, Professor, Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China.

Feasibility of repairing articular cartilage defects with particulated juvenile cartilage allograft

You Qi¹, Duan Xiaojun², Zhang Jun¹, Jin Ying¹, Peng Xu¹, Ge Zhen¹, Liu Yi¹ (1Department of Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; 2Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract

BACKGROUND: Particulated juvenile cartilage allograft is simple and easy to obtain, and relevant clinical studies are underway in the USA. However, how the transplanted juvenile cartilage fragments exert biological effects through biochemical mechanisms and genetic signal transduction is still unclear. There is as yet no report on this technology in China.

OBJECTIVE: To explore the feasibility of articular cartilage defects repaired with particulated juvenile cartilage allograft.

METHODS: The cartilage fragments were obtained from juvenile Pitman-Moore strains (provided by the Laboratory Animal Center of the Army Medical University in China) and cultured *in vitro*. Brdu immunofluorescence assay was performed at 1, 3, and 7 days of culture. The particulated juvenile cartilage allograft/fibrin gel composites were subcutaneously transplanted into the SCID rats (provided by the Laboratory Animal Center of the Army Medical University). The specimens were taken for hematoxylin-eosin staining, safranin O staining and immunohistochemistry after 1 month. Cartilage defects of 8 mm in diameter were made in the knee joint of 10 adult Pitman-Moore strains (Laboratory Animal Center of the Army Medical University), and were randomized into two groups, which were then transplanted with the particulated juvenile cartilage allograft/fibrin gel composites (experimental group) or nothing (control group). The specimens were taken for hematoxylin-eosin staining, safranin O fast green staining, toluidine blue and immunohistochemistry at 3 months after transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Little Brdu incorporation was detected in juvenile cartilage fragments at 1 day of culture, some Brdu incorporation was detected at 3 days of culture. At 7 days of culture, a progressive increase in the Brdu signal was detected in chondrocytes within the cultured cartilage fragments, which seemed to localize along the tissue edge. At 1 month after subcutaneous transplantation, the particulated juvenile cartilage allograft still survived and were surrounded by few proliferative chondrocytes. There was no obvious tissue repair in the control group at 3 months after transplantation. In the experimental group, there was obvious tissue repair, the color of the newly formed tissues was similar to the normal cartilage tissue, which integrated well with the surrounding normal cartilage tissue, and the cells distributed evenly. These results imply that particulated juvenile cartilage allograft can achieve good results in repairing articular cartilage defects.

Subject headings: Cartilage, Articular; Fibrin; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81071484 (to DXJ); the Combined Foundation of Science & Technology Department of Guizhou Province, No. LH[2017]7015

0 引言 Introduction

关节软骨是一种缺乏血管、神经、淋巴系统的结缔组织，所以关节软骨一旦损伤很难依靠自身完全修复。关节软骨损伤后若未能及时有效处理，后期可能导致严重后遗症^[1]。目前软骨缺损的修复方法很多，包括微骨折术^[2]、骨软骨移植^[3]、软骨细胞移植^[4-8]、细胞膜片技术^[9-12]、脱细胞基质膜片^[13-14]、静电纺丝膜片^[15-16]、无细胞支架材料等^[17-19]，但由于以上每种方法均有其自身的局限性，尚不能很好地满足临床需求。1983年，Albrecht等^[20]报道了软骨微粒移植技术，近年来该技术在美国取得了重要进展，由美国Zimmer公司生产的软骨修复移植商品(DeNovo-NT)已获得美国药品与食物管理局(FDA)批准^[21-22]，但中国目前尚无生产此类产品的技术，DeNovo-NT还未进入国内市场。目前关于同种异体幼年软骨微粒移植修复关节软骨缺损的文献报道还不是很多，还没有大量系统的临床数据支撑该技术的长期有效性，该技术尚处于不断的发展与完善中。实验探讨了同种异体幼年软骨微粒体外增殖情况、异体移植存活情况及对于关节软骨缺损的修复效果，旨在从源头上证明移植的异体幼年软骨微粒的存活情况及发挥生物学效应情况，为以后阐明异体幼年软骨微粒修复关节软骨缺损的通路机制奠定坚实的理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外及体内观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年11月至2018年6月在遵义医学院实验动物中心和免疫实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 2月龄贵州小香猪2只，平均体质量9 kg; 6

月龄贵州小香猪10只，体质量(22±2) kg，雌雄不拘，由陆军军医大学实验动物中心提供，动物使用许可证号：SYXK(军)2012-0030。6只成年SCID鼠，平均体质量290 g，雌雄不拘，由陆军军医大学实验动物中心提供。

实验主要试剂、仪器: H-DMEM培养基、FBS(GIBCO公司，美国); Brdu(SIGMA，美国); 鼠抗Brdu抗体、山羊抗鼠IgG(Abcom，美国); DAPI(SIGMA，美国); EDTA脱钙液(索莱宝，北京); 甲苯胺蓝、番红-固绿(索莱宝，北京); 兔抗猪II型胶原抗体(Abcom，美国); 山羊抗兔IgG(中杉金桥，北京); 纤维蛋白凝胶(由20 g/L的纤维蛋白原溶液(SIGMA，美国)和50 U/mL的凝血酶(SIGMA，美国)及50 mmol/L的CaCl₂溶液混合而成); 超净工作台(TDGC2J-0.5，上海先锋，中国); 低温离心机(Centrifuge 5417R，Eppendorf，德国); CO₂恒温细胞培养箱(41311/R，Thermo scientific，美国); 倒置荧光显微镜(DMIRB，Leica，德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 体外实验

幼年软骨微粒的制备: 以3%戊巴比妥钠按0.5 mL/kg对幼年小香猪进行耳缘静脉麻醉，常规消毒铺巾，逐层切开暴露关节腔，用手术刀削取大小为1 mm×1 mm×1 mm的软骨微粒，将软骨微粒接种于12孔板中(200 mg/孔)，每孔中加入2 mL H-DMEM，每隔2 d换液1次。

幼年软骨微粒体外增殖免疫荧光检测: 将体外培养的1, 3, 7 d的幼年软骨微粒，加入Brdu培养过夜，甲醇固定; 2 mol/L盐酸室温变性DNA; 封闭液封闭; 加入大鼠抗Brdu一抗过夜，加入荧光二抗，加入DAPI; 荧光显微镜观察。

1.4.2 体内实验

幼年软骨微粒皮下移植及相关检测: 以10%水合氯醛按5 mL/kg对SCID大鼠行腹腔注射麻醉, 将获取的幼年贵州小香猪膝关节软骨微粒复合纤维蛋白凝胶移植于SCID大鼠皮下。术后1个月取出软骨微粒-纤维蛋白凝胶复合物, 40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, 进行苏木精-伊红染色、番红染色、II型胶原免疫组化检测, 观察软骨微粒的存活及细胞增殖情况。

同种异体幼年软骨微粒复合纤维蛋白凝胶修复膝关节软骨缺损及相关检测: 常规将成年小香猪麻醉, 消毒铺巾, 逐层切开, 暴露膝关节腔, 外侧髌骨脱位, 用直径8 mm的空心环钻在髌骨关节面做一个直径为8 mm的软骨缺损, 确保缺损底部无明显渗血^[23]。将小香猪随机分为2组, 每组5只, 空白组对缺损不做特殊处理; 实验组将获得的幼年软骨微粒与纤维蛋白凝胶复合, 制成软骨微粒纤维蛋白凝胶复合体(将幼年软骨微粒与20 g/L的纤维蛋白原500 μL混合, 再向其中加入50 U/mL的凝血酶500 μL及50 mmol/L的氯化钙溶液20 μL), 移植到成年小香猪的软骨缺损处, 髌骨复位, 逐层缝合切口, 切口碘伏消毒。术后统一圈养, 不限制活动, 连续7 d肌注头孢噻肟钠 60×10^4 U/只。术后3个月处死动物, 取下膝关节软骨缺损修复标本, 大体观察关节软骨缺损修复区域, 按照国际关节软骨修复协会大体形态评分方法进行评分^[24], 评分越高形态越好; 将取下的膝关节标本用40 g/L多聚甲醛固定24 h, EDTA脱钙液进行脱钙, 石蜡包埋切片, 对修复组织进行苏木精-伊红、甲苯胺蓝、番红-固绿、II型胶原免疫组织化学检测, 并按照O'Driscoll评分法进行评分^[25], 评分越高修复效果越好。

1.5 主要观察指标 ①幼年软骨微粒体外培养软骨细胞脱落及增殖情况; ②幼年软骨微粒皮下移植存活情况及细胞增殖情况; ③异体幼年软骨微粒移植修复关节软骨缺损的效果。

1.6 统计学分析 应用SPSS 17.0统计软件对数据进行分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 空白组与实验组采用配对t检验, 采用单因素方差分析, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 幼年软骨微粒体外增殖情况检测 倒置荧光显微镜观察显示, 幼年软骨微粒体外培养第1天仅见到极少的BrdU结合到软骨微粒中, 第3天可见到少量的软骨细胞的脱落与增殖, 第7天见到有明显的细胞脱落与增殖, 而且增殖的细胞在切缘周围, 见图1。

2.2 皮下移植幼年软骨微粒的相关检测 石蜡切片苏木精-伊红染色结果示, 幼年软骨微粒能够存活, 且幼年软骨微粒周围有少量的软骨细胞增殖, 见图2A。番红染色结果示, 移植的幼年软骨微粒染色阳性, 幼年软骨微粒仍存活, 见图2B。II型胶原免疫组织化学结果示, 移植的幼年软骨

微粒染色阳性, 幼年软骨微粒具有增殖活性, 见图2C。

2.3 膝关节软骨缺损修复效果

2.3.1 大体观察 所有动物伤口愈合良好, 膝关节活动良好, 关节液清亮, 关节腔未见粘连。空白组缺损区域可见明显凹陷, 无明显填充物, 或仅有少量纤维组织样物填充; 实验组缺损区域被乳白色组织填充, 表面光滑平整, 缺损边缘整合良好, 见图3。

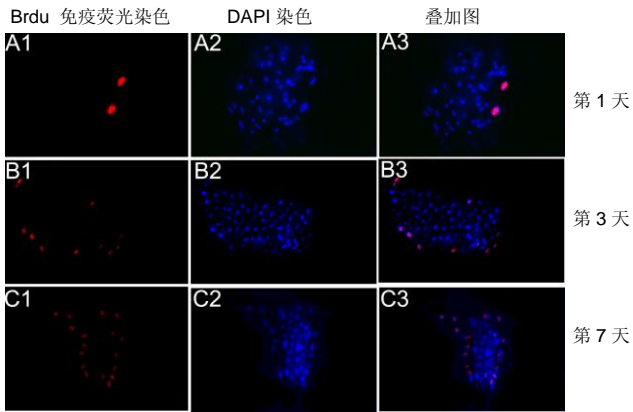
2.3.2 大体评分及组织学评分 空白组、实验组大体形态评分分别为 6.2 ± 1.2 , 17.4 ± 0.9 , 两组评分比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。空白组、实验组组织学评分分别为 4.8 ± 0.8 , 15.8 ± 0.8 , 两组评分比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图4。

2.3.3 组织学观察 苏木精-伊红染色结果显示, 空白组无明显填充物, 仅有少量纤维组织样物填充; 实验组缺损被软骨样组织填充, 与周围正常软骨整合良好。甲苯胺蓝染色结果显示, 空白组缺损未见明显着色的修复组织; 实验组缺损可见蓝染的修复组织填充, 着色强度与周围正常软骨组织类似, 界面整合良好。番红-固绿染色结果显示, 空白组缺损中修复组织着色不明显; 实验组缺损中可见红染的修复组织填充, 且着色强度与周围正常软骨类似, 潮线结构完整, 软骨与骨界面整合良好。II型胶原免疫组织化学染色结果显示, 空白组缺损中未见明显着色的II型胶原; 实验组缺损中可见着色阳性的II型胶原, 且着色强度与周围正常软骨组织类似。实验组与对照组关节软骨缺损组织学观察结果, 见图5。

3 讨论 Discussion

关节软骨损伤一直是医学界亟待解决的难题, 传统的修复方法很多, 虽然在短期的随访中具有较好的临床疗效, 能够改善患者的运动功能和缓解疼痛, 但最终会导致软骨的退行性变和骨关节炎的发生^[26]。1983年Albrecht等^[20]开创了运用自体软骨微粒移植修复关节软骨缺损的技术。虽然该技术避免了细胞的体外分离培养且临床效果较为稳定, 但面临着供区移植组织受限、供区并发症、费用高等问题^[27-28]。2011年美籍华人Yao及其团队创建了同种异体幼年软骨微粒移植技术修复关节软骨缺损^[29]。Farr等^[30]、Mcmillan等^[31]报道了应用幼年软骨微粒移植修复膝关节软骨缺损, 结果显示术后患者膝关节疼痛减轻、运动功能明显改善。Arshi等^[32]、Buckwalter等^[33]报道了应用幼年软骨微粒修复髌骨缺损具有良好的修复效果。近年来, 也有研究报道了应用幼年软骨微粒修复踝、肘、髋关节软骨损伤^[34-36]。虽然该技术在美已经进入临床研究阶段, 但临床上还处于“黑箱”操作阶段, 对于移植的幼年软骨微粒是如何通过生物化学机制和基因信号转导发挥生物学效应的, 目前还不清楚。

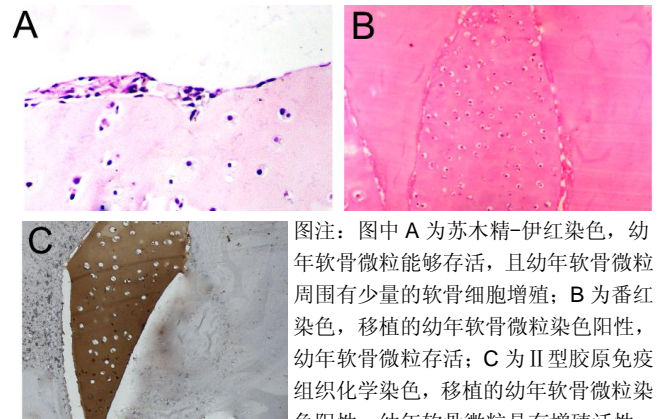
Adkisson等^[37]报道相较于成熟的软骨细胞, 体外培养的幼年软骨细胞能够产生更多的新生软骨蛋白, 其中糖胺



图注：第 1 天仅见到极少的 BrdU 结合到软骨微粒中(A1-A3)，第 3 天可见到少量的软骨细胞的脱落与增殖(B1-B3)，第 7 天见到有明显的细胞脱落与增殖，而且增殖的细胞在切缘周围(C1-C3)。

图 1 幼年软骨微粒体外增殖检测(x100)

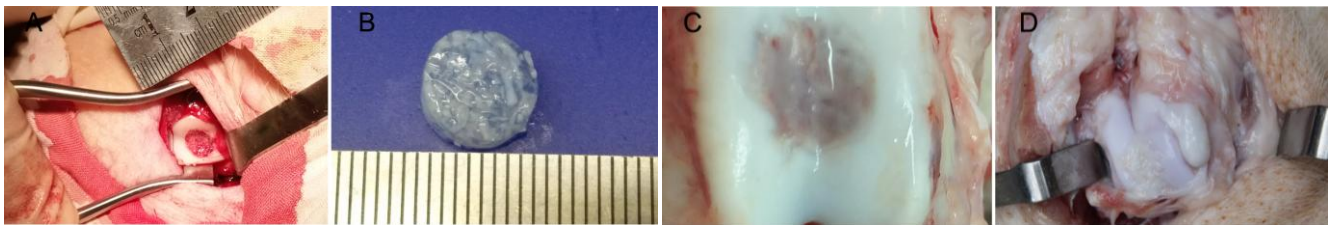
Figure 1 Proliferation of juvenile cartilage fragments *in vitro* (x100)



图注：图中 A 为苏木精-伊红染色，幼年软骨微粒能够存活，且幼年软骨微粒周围有少量的软骨细胞增殖；B 为番红染色，移植的幼年软骨微粒染色阳性，幼年软骨微粒存活；C 为 II 型胶原免疫组织化学染色，移植的幼年软骨微粒染色阳性，幼年软骨微粒具有增殖活性。

图 2 皮下移植幼年软骨微粒的相关检测(x100)

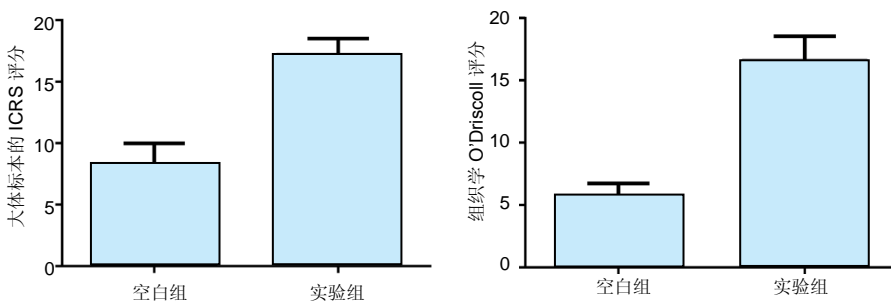
Figure 2 Related detection of juvenile cartilage fragments subcutaneously transplanted (x100)



图注：图中 A 为软骨缺损模型；B 为幼年软骨微粒和纤维蛋白凝胶复合体；C 为空白组大体表现，缺损底部仅见少量类似纤维组织填充；D 为异体幼年软骨微粒复合纤维蛋白凝胶修复 3 个月后，可见缺损被乳白色组织填充。

图 3 幼年软骨微粒修复关节软骨缺损的大体观察

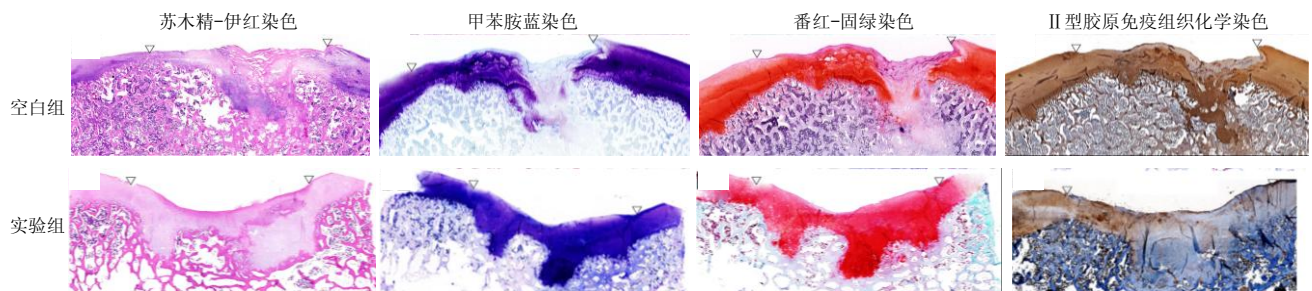
Figure 3 Gross observation of articular cartilage defects repaired with particulated juvenile cartilage allograft



图注：实验组 ICRS 大体形态学评分和 O'Driscoll 组织学评分均高于空白组($P < 0.05$)。

图 4 实验组与空白组 ICRS 大体形态学评分和 O'Driscoll 组织学评分比较

Figure 4 Comparison of International Cartilage Repair Society scores and O'Driscoll scores between the experimental and control groups



图注：空白组未见明显的修复组织，实验组可见明显的透明软骨样修复组织。

图 5 实验组与空白组关节软骨缺损处组织学观察(x40)

Figure 5 Histological observation of the articular cartilage defects in the experimental and control groups (x40)

聚糖的含量是成熟软骨细胞的100倍, II型胶原和IX型胶原的表达量分别是成熟软骨细胞的100倍和700倍, 而且新生的II型胶原和IX型胶原分布和自体软骨组织分布相似。Smeriglio等^[38]也得出相类似的结论。Skaalure等^[39]研究发现幼年软骨细胞不仅形成的胶原蛋白比成熟软骨细胞多, 而且幼年软骨细胞蛋白聚糖的降解速度比成熟软骨细胞低。Bonasia等^[40]也证明相较于成熟软骨细胞, 幼年软骨细胞的增殖能力和体外形成组织工程软骨的能力更强。Marmotti等^[41]也证实幼年软骨微粒增殖能力要强于成年软骨微粒, 而且实验中还证实转化生长因子 β 和集落刺激因子能够促进幼年软骨微粒中细胞的迁移和增殖。此次研究将幼年软骨微粒体外培养, 发现软骨细胞能够脱落增殖, 且随着培养时间的延长增殖细胞逐渐增多, 同时发现增殖的细胞在软骨微粒切缘周围均匀分布。

此次研究将猪的幼年软骨微粒移植到SD大鼠皮下, 1个月后取材, 结果显示: 移植的幼年软骨微粒能够存活且周围有脱落增殖的软骨细胞。Adkisson等^[42]报道了幼年软骨细胞不会引起T细胞增殖, 也不会表达引起T细胞免疫反应的细胞分子, 如组织相容性复合体II类抗原和共刺激分子B7-1和B7-2。此外幼年软骨细胞能够表达抑制T细胞增殖的多种负性调节因子, 如B7家族分子、软骨调节素。Farr等^[29]发现幼年软骨细胞不仅能够低表达引起免疫排斥反应的刺激分子(如CD80、CD60), 还能够表达抑制淋巴细胞增殖的表面蛋白分子。在组织结构上, 软骨组织缺乏血管、淋巴系统而且又具有致密、坚硬的细胞外基质, 可在一定程度上避免宿主免疫细胞的攻击, 这也可能是其低免疫原性的原因之一^[43]。此次研究结果与以上结论相符合, 说明幼年软骨微粒的抗原性较弱, 体内移植能够存活且不会引起强烈的免疫排斥反应。

体内实验结果显示, 同种异体幼年软骨微粒复合纤维蛋白凝胶修复膝关节软骨缺损具有良好的效果。同空白组相比, 实验组缺损被透明软骨样组织填充, 通过苏木精-伊红染色、甲苯胺蓝染色、番红-固绿染色、II型胶原免疫组织化学检测显示修复组织与周围正常的软骨组织类似, 且修复组织与周围正常软骨界面整合良好。但作者也发现在修复组织中存在一定小间隙, 这可能与幼年软骨微粒和支架材料的接种密度及支架材料的结构和生化性能有关。因此, 优化组织工程支架材料, 联合应用更多的创新技术成果可能是未来软骨组织工程研究的一个方向。

综上所述, 幼年软骨微粒具有良好的增殖潜能且不会产生明显的免疫排斥, 应用同种异体幼年软骨微粒修复关节软骨缺损具有良好的修复效果。因此, 未来将异体幼年软骨微粒作为种子细胞应用于软骨组织工程, 将具有良好的发展前景。然而移植的幼年软骨微粒是如何通过生物化学机制和基因信号转导发挥修复作用的, 实验并未进行过多研究, 因此在后续的研究中, 课题组将加大对同种异体幼年软骨微粒移植修复关节软骨缺损的通路机制研究。

作者贡献: 刘毅教授设计实验, 尤奇进行实验实施, 段小军教授进行实验评估, 尤奇、张骏、彭旭、葛震完成资料收集, 金璇审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81071484)、贵州省科技厅联合基金(黔科合 LH 字[2017]7015号)”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。实验动物在戊巴比妥钠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。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

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通过遵义医学院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] Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. Acta orthop Belg. 2011;77(6):709-726.
- [2] Min BH, Choi WH, Lee YS, et al. Effect of different bone marrow stimulation techniques (BSTs) on MSCs mobilization. J Orthop Res. 2013;31(11):1814-1819.
- [3] Bedi A, Feeley BT, Williams RJ. Management of Articular Cartilage Defects of the Knee. J Bone Joint Surg Am. 2010;92(4):994-1009.
- [4] Perterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two-to-9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop Relat Res. 2000;374:212-214.
- [5] Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al. The use of chondrocyte membrane in autologous chondrocyte implantation. The knee. 2004;(11)1:51-55.
- [6] Filardo G, Kon E, Di Martino A, et al. Second-generation arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of degenerative cartilage lesions. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012;20(9):1704-1713.
- [7] Kon E, Delcogliano M, Filardo G, et al. A novel nano-composite multi-layered biomaterial for treatment of osteochondral lesion: technique note and an early stability pilot clinical trial. Injury. 2010;41(7):693-701.
- [8] Gille J, Behrens P, Schulz AP, et al. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation: A Clinical Follow-Up at 15 Years. Cartilage. 2016;7(4):309-315.
- [9] Karoubi G, Ormiston ML, Stewart DJ, et al. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. Biomaterials. 2009;30(29):5445-5455.

- [10] Shimizu H, Ohashi K, Utoh R, et al. Bioengineering of a functional sheet of islet cells for the treatment of diabetes mellitus. *Biomaterials*. 2009;30(30):5943-5949.
- [11] Hayashi S, Kamei N, Ikuta Y, et al. Chondrocyte cell-sheet transplantation for treating monoiodoacetate-induced arthritis in rats. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017;23(6):346-356.
- [12] Xu X, Shi D, Liu Y, et al. Synovium-derived mesenchymal stem cell sheet enhance autologous osteochondral transplantation in a rabbit model. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(6):10322-10332.
- [13] Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, et al. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: Implications for tracheal transplantation. *Head Neck*. 1998;20(6):522-527.
- [14] Liu K, Zhou GD, Liu W, et al. The dependence of in vivo stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation in vitro. *Biomaterials*. 2008;29(14):2183-2192.
- [15] Ge Y, Gong YY, Xu Z, et al. The application of sheet technology in cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(2):114-124.
- [16] Mouthuy PA, Elsherbini Y, Cui Z, et al. Layering PLGA-based electrospun membranes and cell sheets for engineering cartilage-bone transition. *Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(4):263-274.
- [17] Verdonk P, Dhollander A, Almqvist KF, et al. Treatment of osteochondral lesions in the knee using a cell-free scaffold. *Bone Joint J*. 2015;97-B(3):318-323.
- [18] Brix M, Kaipel M, Kellner R, et al. Successful osteoconduction but limited cartilage tissue quality following osteochondral repair by a cell-free multilayered nano-composite scaffold at the knee. *Int Orthop*. 2016;40(3):625-632.
- [19] Filardo G, Kon E, Di MA, et al. Treatment of knee osteochondritis dissecans with a cell-free biomimetic osteochondral scaffold: clinical and imaging evaluation at 2-year follow up. *Am J Sports Med*. 2013;41(8):1786-1793.
- [20] Albrecht F, Roessner A, Zimmermann E. Closure of osteochondral lesions using chondral fragments and fibrin adhesive. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1983;101(3):213-217.
- [21] Riboh JC, Cole BJ, Farr J. Particulated articular cartilage for symptomatic chondral defects of the knee. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2015;11(1):21-34.
- [22] Bonasia DE, Marmotti A, Rosso F, et al. Use of chondral fragments for one stage cartilage repair: a systematic review. *World J Orthop*. 2015;6(11):1006.
- [23] 宁志刚, 杨柳, 王富友, 等. 保留钙化层结构的猪股骨滑车全厚软骨缺损模型建立[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(5):527-531.
- [24] Brittberg M, Aglietti P, Gamberella R, et al. ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. 2002:16-18. https://www.secot.es/uploads/descargas/formacion/escalas_valoracion/ICRS_TRAUMA_CARTaLAGO.pdf
- [25] 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 2(1):45-57.
- [26] Kontturi LS, Jarvinen E, Muhonen V, et al. An injectable, in situ forming type II collagen/hyaluronic acid hydrogel vehicle for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res*. 2014;4(2):149-158.
- [27] Cole BJ, Farr J, Winanski CS, et al. Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2011;39(6):1170-1179.
- [28] Kon E, Filardo G, Zaffagnini S, et al. Biodegradable polyurethane meniscal scaffold for isolated partial lesions or as combined procedure for knees with multiple comorbidities: clinical results at 2 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014;22(1):128-134.
- [29] Farr J, Yao JQ. Chondral Defect Repair with Particulated Juvenile Cartilage Allograft. *Cartilage*. 2011;2(4):346-353.
- [30] Farr J, Tabet SK, Margerrison E, et al. Clinical, Radiographic, and histological outcomes after cartilage repair with particulated juvenile articular cartilage: a 2-year prospective study. *Am J Sports Med*. 2014;42(6):1417.
- [31] Mcmillan S, Light GT, Brtz C. All-arthroscopic implantation of minced juvenile chondral allograft for an isolated, full-thickness chondral lesion in the trochlea of an adult knee. *Arthrosc Tech*. 2016;5(2):397-401.
- [32] Arshi A, Wang D, Jones KJ. Combined particulated juvenile cartilage allograft transplantation and medial patellofemoral ligament reconstruction for symptomatic chondral defects in the setting of recurrent patellar instability. *Arthrosc Tech*. 2016;5(5):1149-1154.
- [33] Buckwalter JA, Bowman GN, Albright JP, et al. Clinical outcomes of patellar chondral lesions treated with juvenile particulated cartilage allografts. *Iowa Orthop J*. 2013;34(1):44-49.
- [34] Kruse DL, Ng A, Paden M, et al. Arthroscopic De Novo NT(R) juvenile allograft cartilage implantation in the talus: a case presentation. *J Foot Ankle Surg*. 2012;51(2):218.
- [35] Dunn JC, Kusnezov N, Orr J, et al. Osteochondral defects of the upper extremity treated with particulated juvenile cartilage transfer. *HAND*. 2015;10(4):683-687.
- [36] Pascual-Garrido C, Hao J, Schrock J, et al. Arthroscopic juvenile allograft cartilage implantation for cartilage lesions of the hip. *Arthrosc Tech*. 2016;5(4):929-933.
- [37] Adkisson HD, Martin JA, Amendola RL, et al. The potential of human allogeneic juvenile chondrocytes for restoration of articular cartilage. *Am J Sports Med*. 2010;38(7):1324-1333.
- [38] Smeriglio P, Lai JH, Dhulipala L, et al. Comparative potential of juvenile and adult human articular chondrocytes for cartilage tissue formation in three-dimensional biomimetic hydrogels. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(1-2):147-155.
- [39] Skaalure SC, Milligan IL, Bryant SJ. Age impacts extracellular matrix metabolism in chondrocytes encapsulated in degradable hydrogels. *Biomed Mater*. 2012;7(2):024111.
- [40] Bonasia DE, Martin JA, Marmotti A, et al. Cocultures of adult and juvenile chondrocytes compared with adult and juvenile chondral fragments: in vitro matrix production. *Am J Sports Med*. 2011;39(11):2355-2361.
- [41] Marmotti A, Bonasia DE, Bruzzone M, et al. Human cartilage fragments in a composite scaffold for single-stage cartilage repair: an in vitro study of the chondrocyte migration and the influence of TGF-beta1 and G-CSF. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(8):1819-1833.
- [42] Adkisson HD, Milligan C, Zhang X, et al. Immune evasion by neocartilage-derived chondrocytes: Implications for biologic repair of joint articular cartilage. *Stem Cell Res*. 2010;4(1):57-68.
- [43] Tompkins M, Adkisson HD, Bonner KF. De Novo NT Allograft. *Oper Tech Sports Med*. 2013;21(2):82-89.