

# 兔软骨细胞与骨髓基质细胞的平面共培养：两者培养比例筛选\*☆○

孙磊<sup>1</sup>, 綦惠<sup>1</sup>, 陈磊<sup>1</sup>, 陈海燕<sup>1</sup>, 江健<sup>1</sup>, 陶剑锋<sup>1</sup>, 杰永生<sup>1</sup>, 高新生<sup>1</sup>, Peter I. Lelkes<sup>2</sup>○

## Monolayer coculture of rabbit chondrocytes and bone marrow stromal cells: Screening of culture proportion

Sun Lei<sup>1</sup>, Qi Hui<sup>1</sup>, Chen Lei<sup>1</sup>, Chen Hai-yan<sup>1</sup>, Jiang Jian<sup>1</sup>, Tao Jian-feng<sup>1</sup>, Jie Yong-sheng<sup>1</sup>, Gao Xin-sheng<sup>1</sup>, Peter I. Lelkes<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Bone marrow stromal cells (BMSCs) can differentiate into chondrocytes under a certain condition, but there are lack of studies concerning monolayer coculture of chondrocytes and BMSCs at present.

**OBJECTIVE:** To identify percentage choice of coculture of BMSCs and chondrocytes, cell proliferation activity and cartilage specific protein expression rule, and to find the best time and subculture frequency during cell transplantation.

**METHODS:** Chondrocytes and BMSCs were isolated, cultured, and divided into 5 groups following passage: chondrocyte group, coculture (chondrocytes and BMSCs at 7: 3, 5: 5, 3: 7) groups, and BMSC group. At generation 4(G4), cell morphology was observed at different passages in each group under an inverted phase contrast microscope. MTT assay was performed for testing the cell viability. The proteoglycan expression was detected by toluidine blue and alcian blue staining. Type II collagen expression was determined by immunocytochemical method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Cells showed normal appearance in all the coculture groups. From G1-G3, cells had good viability, which was decreased at G4. Proteoglycan (detected by toluidine blue and alcian blue staining) and type II collagen expression were highly positively determined in the coculture groups during the second and third generations (G2 and G3). Synthetic each index showed that each index was best in the chondrocytes and BMSCs at 5: 5, 3: 7 groups. Results displayed that monolayer coculture of chondrocytes and BMSCs kept chondrocyte morphology and protein expression property. The proportion of chondrocytes and BMSCs at 5: 5 or 3: 7 was optimal for cell transplantation.

Sun L, Qi H, Chen L, Chen HY, Jiang J, Tao JF, Jie YS, Gao XS, Lelkes PI. Monolayer coculture of rabbit chondrocytes and bone marrow stromal cells: Screening of culture proportion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27):4955-4959. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 骨髓基质细胞一定条件下可以分化为软骨细胞,但目前还缺少将软骨与骨髓基质细胞平面共培养的深入探讨。

**目的:** 拟明确骨髓基质细胞与软骨细胞共培养时比例的选择、细胞增殖活性、软骨特异性蛋白表达的规律,用于细胞移植的最佳时间和传代次数。

**方法:** 软骨细胞与骨髓基质细胞的分离培养,传代后分为5组:单纯软骨细胞组;共培养组,软骨细胞与骨髓基质细胞7:3,5:5,3:7组;以及单纯骨髓基质细胞组。传代至第4代(G4),倒置相差显微镜观察各组细胞在不同传代时期的细胞形态,MTT实验检测细胞增殖活性,甲苯胺蓝与阿利新蓝染色,细胞免疫化学法检测II型胶原的表达。

**结果与结论:** 共培养各组在各个时期细胞表型正常。G1-G3代细胞增殖活跃,G4代细胞增殖能力下降。共培养各组甲苯胺蓝与阿利新蓝染色以及II型胶原表达在G2和G3代均较高。综合各指标认为,以软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5,3:7组为最佳。软骨细胞与骨髓基质细胞平面共培养,保持了软骨细胞的形态和蛋白表达特性,如进行细胞移植,选取软骨细胞与骨髓基质细胞5:5或3:7的比例为最佳。

**关键词:** 软骨细胞;骨髓基质细胞;共培养;蛋白聚糖;II型胶原

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.004

孙磊, 綦惠, 陈磊, 陈海燕, 江健, 陶剑锋, 杰永生, 高新生, Peter I. Lelkes. 兔软骨细胞与骨髓基质细胞的平面共培养: 两者培养比例筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27):4955-4959. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

关节软骨损伤主要由创伤和各种疾病如骨关节炎、剥脱性骨软骨炎、骨坏死等引起<sup>[1-2]</sup>。关节软骨损伤后,自身修复能力有限,直径>4 mm的缺损则很难自行修复<sup>[3]</sup>。随着生物技术、材料、免疫组织化学和分子生物学的发展及应用于临床,人们在关节软骨损伤修复的实验研究方面取得了许多重大进步,尤其是基于细胞

和材料组织工程技术的发展,形成了软骨组织工程学方法<sup>[4-5]</sup>。软骨组织工程学中十分重要的问题是种子细胞的选择,首先是自体的软骨细胞,但是体内软骨细胞再生能力差,必须获取足量稳定的自体软骨细胞才能确保自体软骨细胞的移植<sup>[6-7]</sup>;另外一种细胞是骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell, BMSC),其具有多向分化潜能,在特定条件下可以向包括软骨细胞在内的多种细胞分化,而且增殖能力强,来源广泛,取材方便,因而倍受研究者的关注<sup>[8]</sup>。但是,目

<sup>1</sup>Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; <sup>2</sup>School of Biomedical Engineering, Drexel University, United States

Sun Lei☆, Doctor, Associate Investigator, Beijing Institute of Traumatology and Orthopaedics, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China  
dr.sunlei2009@gmail.com

Supported by: the Science and Technology New Star Project of Beijing City, No. H013610310113\*

Received: 2010-01-07  
Accepted: 2010-02-21

<sup>1</sup>北京市创伤骨科研究所,北京积水潭医院,北京市100035; <sup>2</sup>School of Biomedical Engineering, Drexel University, United States

孙磊☆,男,1966年生,黑龙江省牡丹江市人,汉族,1998年白求恩医科大学(现吉林大学白求恩医学院)毕业,博士,副研究员,主要从事软骨组织工程研究。  
dr.sunlei2009@gmail.com

中图分类号:R394.2  
文献标识码:A  
文章编号:1673-8225  
(2010)27-04955-05

收稿日期:2010-01-07  
修回日期:2010-02-21  
(20100107006W-Q)

前为止, 还未有研究对于二者平面共培养的情况进行细致的探讨, 希望通过本实验对于二者共培养时比例的选择、细胞增殖规律、软骨特异性蛋白表达的规律进行研究, 综合分析在平面共培养的情况下, 细胞移植的最佳时间和传代次数的选择。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照细胞实验。

**时间及地点:** 实验于2007/2008在北京市创伤骨科研究所完成。

**材料:** 清洁级出生3 d内新西兰大白兔乳兔20只, 雌雄不限。由北京积水潭医院动物室提供, 许可证号: SCXK(京)2002-0003。实验过程中对动物处置符合2006年科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[9]</sup>。

**主要试剂和仪器:**

主要试剂和仪器	来源
DMEM/F-12 培养基与胎牛血清	Hyclone 公司
II型胶原酶与胰蛋白酶	Sigma 公司
四甲基偶氮唑盐(MTT)	Biosharp 公司
甲苯胺蓝、阿利新蓝、II型胶原 免疫细胞化学试剂盒	北京中杉金桥生物技术有限公司
培养板	Corning 公司
细胞培养箱	Thermo 公司
倒置相差显微镜	Olympus
酶标仪	Bio-Rad

**实验方法:**

**软骨细胞的分离与培养:** 3 d内新生乳兔, 处死并浸泡消毒, 无菌室超净台内取膝关节股骨髁软骨组织。置于培养皿中, PBS反复冲洗, 剪碎, 转移至离心管, 加入II型胶原酶, 于37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下进行消化。3 h后取出离心管, 静置, 将上清转移到另一离心管中, 800 r/min离心6 min, 弃上清, 加入含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基, 用吸管吹打均匀, 种于培养瓶中, 此为原代软骨细胞。5 d后第1次换液, 倒置相差显微镜下观察细胞贴壁情况。此后每3 d换液1次, 待细胞达80%~90%融合时, 用5 g/L胰蛋白酶消化传代, 传代时细胞数调整至10<sup>6</sup>, 此为G1代细胞, G2~G4代细胞传代方法相同。

**骨髓基质细胞的分离与培养:** 3 d内新生乳兔, 处死并浸泡消毒, 无菌室超净台内取乳兔的股骨, 用PBS冲洗。抽取骨髓, 用加有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基稀释细胞, 移置培养瓶中, 在37 °C, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养, 此为原代骨髓基质细胞。5 d后首次换液。此后每3 d换液1次, 待细胞达80%~90%融合时, 用5 g/L胰蛋白酶消化传代, 传代时细胞数调整

至1×10<sup>6</sup>, 此为G1代细胞, G2~G4代细胞传代方法相同。

**软骨细胞与骨髓基质细胞共培养:** 待原代软骨细胞与骨髓基质细胞生长达80%~90%融合时, 用5g/L胰蛋白酶消化。对消化下来的细胞进行细胞计数, 软骨细胞与骨髓基质细胞按照以下比例(7×10<sup>6</sup>: 3×10<sup>6</sup>, 7:3), (5×10<sup>6</sup>: 5×10<sup>6</sup>, 5:5), (3×10<sup>6</sup>: 3×10<sup>6</sup>, 3:7)进行混合, 分别种于96孔板和已铺有细胞转移膜的24孔板。此为共培养的G1代细胞, G2~G4代细胞传代方法相同。

**MTT实验:** 分别取培养2, 4, 6 d的G1~G4代细胞, 置于96孔培养板, 每孔加入MTT溶液20 μL, 置于培养箱, 孵育4 h。取出96孔板, 离心, 去除上清之后, 每孔加入150 μL DMSO。震荡溶解后, 酶标仪在490 nm处测吸光度值。

**甲苯胺蓝、阿利新蓝染色:** 将5组细胞(单纯软骨细胞组; 共培养组, 软骨细胞与骨髓基质细胞的比例分别为7:3, 5:5, 3:7; 单纯骨髓基质细胞组)的细胞转移膜取出, PBS冲洗后, 甲苯胺蓝或阿利新蓝染色10 min, 水洗, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。

**免疫细胞化学法检测II型胶原的表达:** 将上述5组细胞的细胞转移膜取出, 参照说明书进行SP法染色, 检测各组中II型胶原的表达情况。

**图像分析:** 采用医学图像分析系统软件(Image-Pro Plus 5.0)对II型胶原免疫细胞化学的结果进行半定量分析。所有细胞爬片均在同一放大倍数(40×10)、同一强度下分析, 计算平均灰度值。

**主要观察指标:** ①细胞形态学观察。②细胞增殖情况。③特异性蛋白染色。④II型胶原的表达情况观察。

**设计、实施、评估者:** 设计为第一作者, 实施为第一、二、三、四作者, 评估为第一、二作者, 均经过相关正规培训。

**统计学分析:** 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.0统计学软件, 多组间比较使用单因素方差分析, 以双侧P < 0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞形态的观察** 单纯软骨细胞组: 早期的细胞呈现典型的软骨细胞特异性砖块状或者球形, 折光性好, 随着传代次数的增加, 细胞形态逐渐变为纺锤形或者不规则, 体积变大, 并且胞浆内可见空泡、脂滴, 说明软骨细胞逐渐老化; 软骨细胞与骨髓基质细胞比例为7:3组, 细胞呈短梭形、长梭形或者砖块形, 以细胞集落的形式生长; 软骨细胞与骨髓基质细胞比例为5:5组, 大量砖块样细胞聚集形成细胞集落生长; 软骨细胞与骨髓基质细胞比例为3:7组, 细胞形状以短梭形或者砖块形为主, 呈集落样生长, 而且所有共培养组细胞形态并未随着传代次数的增加发生明显变化; 单纯骨髓基

质细胞组, 细胞由典型的骨髓基质细胞特异性短梭形逐渐变大, 细胞壁变薄, 细胞仍以集落形式生长, 但典型的骨髓基质细胞形态消失, 可能已经发生分化。

**2.2 MTT法检测细胞生长活力的结果** 在G1~G3代, 细胞生长增殖良好, 在G3代第6天, 细胞仍处于对数生长期, 细胞增殖能力较强。但在G4代随着培养时间的延长, 细胞增殖已经处于停滞状态, 说明细胞增殖能力下降, 进入衰退期, 见表1。

表 1 MTT 法检测细胞生长活力的结果  
Table 1 Determination of cell viability by MTT assay ( $\bar{x}\pm s$ )

Generation (d)	C	C:BMSC=7:3	C:BMSC=5:5	
G1	2	0.197±0.002	0.209±0.001	0.199±0.001
	4	0.395±0.003	0.362±0.005	0.308±0.005
	6	0.651±0.003	0.705±0.004	0.647±0.009
G2	2	0.278±0.004	0.256±0.003	0.307±0.004
	4	0.452±0.001	0.384±0.004	0.471±0.002
	6	0.725±0.006	0.733±0.006	0.744±0.003
G3	2	0.247±0.003	0.221±0.002	0.303±0.005
	4	0.547±0.005	0.598±0.001	0.621±0.001
	6	0.723±0.002	0.730±0.004	0.767±0.006
G4	2	0.260±0.008	0.289±0.004	0.257±0.004
	4	0.350±0.006	0.398±0.006	0.404±0.007
	6	0.351±0.002	0.394±0.008	0.411±0.004

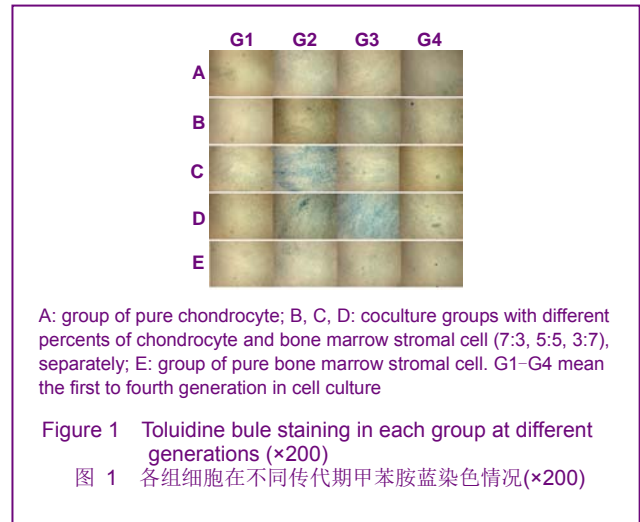
Generation (d)	C:BMSC=3:7	BMSC	
G1	2	0.194±0.004	0.212±0.004
	4	0.342±0.005	0.366±0.002
	6	0.649±0.004	0.598±0.003
G2	2	0.317±0.002	0.219±0.003
	4	0.454±0.001	0.302±0.003
	6	0.773±0.001	0.787±0.005
G3	2	0.270±0.008	0.285±0.003
	4	0.676±0.009	0.523±0.004
	6	0.781±0.006	0.738±0.005
G4	2	0.283±0.004	0.236±0.007
	4	0.426±0.006	0.339±0.001
	6	0.434±0.008	0.392±0.002

C: group of pure chondrocyte; C: BMSC: coculture group with different percent of chondrocyte and bone marrow stromal cell (7:3, 5:5, 3:7); BMSC: group of pure bone marrow stromal cell

**2.3 甲苯胺蓝与阿利新蓝染色的结果**

**甲苯胺蓝染色:** 共培养各组的染色强度明显强于单纯软骨细胞组或者单纯骨髓基质细胞组, 且呈先升高后降低的模式, G2或者G3代达到高峰, G4代染色强度下降, 而且软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5以及3:7组的染色强度高于比例为3:7组, 见图1。

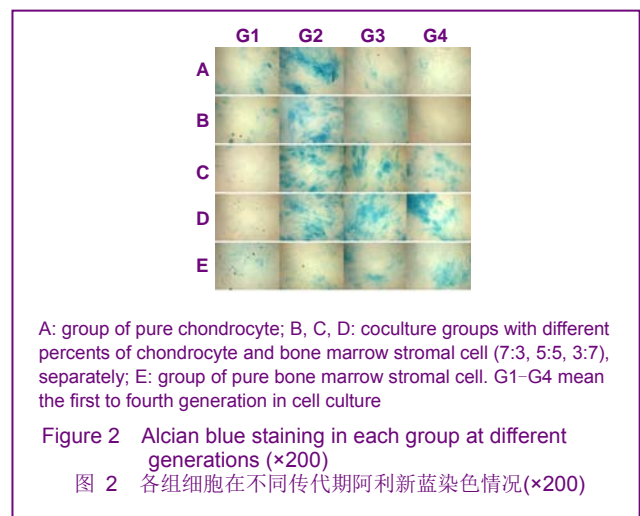
**阿利新蓝染色:** 染色强度在不同的组呈现不同模式。单纯软骨细胞组以及软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为7:3组, G1代染色较弱, G2代显著增强, 然后迅速下降, G3, G4代染色明显减弱; 软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5组以及3:7组, G1代染色较弱, G2~G4代均可见到明显的染色, 且G2或者G3代达到高峰, 染色维持时间长, 程度也较强; 单纯骨髓基质细胞组, 染色呈逐渐增强的趋势, G1代最弱, G4代最强, 但总体染色强度比其他组各组弱, 见图2。



A: group of pure chondrocyte; B, C, D: coculture groups with different percents of chondrocyte and bone marrow stromal cell (7:3, 5:5, 3:7), separately; E: group of pure bone marrow stromal cell. G1-G4 mean the first to fourth generation in cell culture

Figure 1 Toluidine blue staining in each group at different generations (x200)

图 1 各组细胞在不同传代期甲苯胺蓝染色情况(x200)

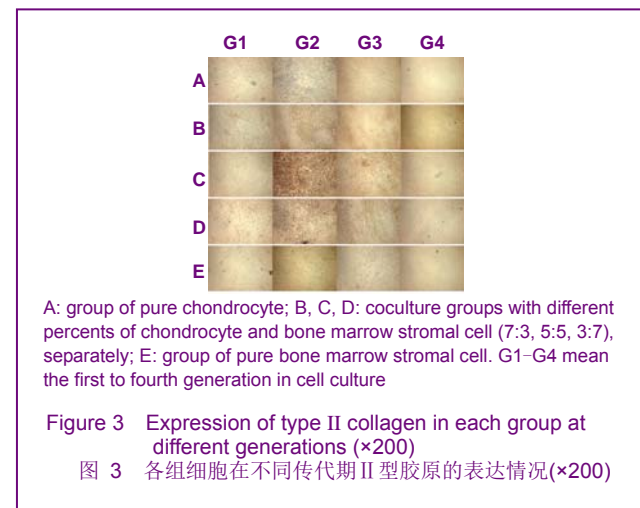


A: group of pure chondrocyte; B, C, D: coculture groups with different percents of chondrocyte and bone marrow stromal cell (7:3, 5:5, 3:7), separately; E: group of pure bone marrow stromal cell. G1-G4 mean the first to fourth generation in cell culture

Figure 2 Alcian blue staining in each group at different generations (x200)

图 2 各组细胞在不同传代期阿利新蓝染色情况(x200)

**2.4 II型胶原表达的结果** 单纯骨髓基质细胞组的II型胶原表达较弱, 而且各个传代期变化不大; 共培养各组以及单纯软骨细胞组, II型胶原的表达呈现先增强后减弱的模式, 而且共培养组各组G2、G3和G4代的II型胶原表达强度均显著高于单纯软骨细胞组, 而且软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5以及3:7组的表达强度高于比例为7:3组, 见图3, 图4。

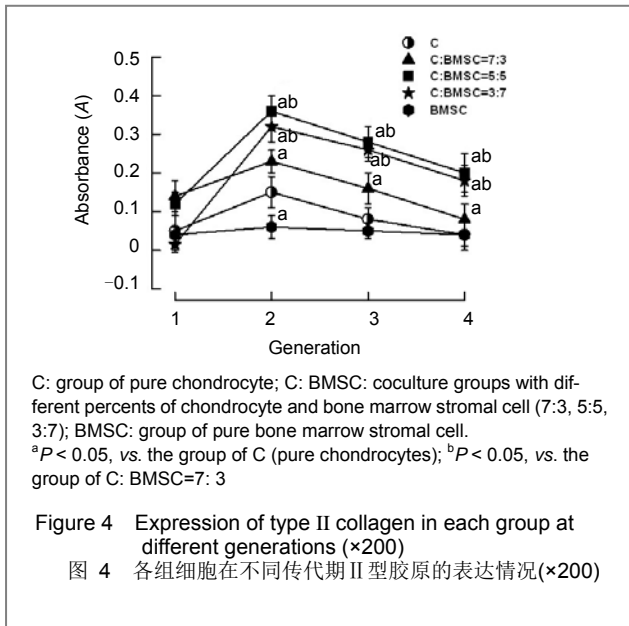


A: group of pure chondrocyte; B, C, D: coculture groups with different percents of chondrocyte and bone marrow stromal cell (7:3, 5:5, 3:7), separately; E: group of pure bone marrow stromal cell. G1-G4 mean the first to fourth generation in cell culture

Figure 3 Expression of type II collagen in each group at different generations (x200)

图 3 各组细胞在不同传代期II型胶原的表达情况(x200)





### 3 讨论

如何修复关节软骨的损伤一直是关节外科研究的热点<sup>[10-12]</sup>。应用软骨组织工程的技术方法为修复软骨损伤开辟了一条新的道路<sup>[4-5, 12]</sup>。安全高效的种子细胞源是应用软骨组织工程的前提和关键, 但是至今尚无一种细胞能够完全满足软骨组织工程对种子细胞的要求<sup>[5, 13-15]</sup>。

骨髓基质细胞是一种异质细胞群, 由处于不同分化阶段的多种细胞组成, 具有多向分化潜能, 在一定条件下可以被诱导向软骨细胞分化<sup>[8, 16-17]</sup>。因此, 近年常用的方法是各种生长因子诱导骨髓基质细胞向软骨细胞分化<sup>[18]</sup>, 但是其问题是: 一方面生长因子用量大, 成本高; 第二方面, 某些生长因子不仅仅具有诱导软骨细胞分化的功能, 还可以促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化, 因此, 如何调整生长因子的浓度和应用方式, 使其可以特异性促进骨髓基质细胞向软骨细胞分化还值得进一步探讨; 再者, 许多生长因子具有非特异性的多向性功能, 从而激活多种细胞间的信号转导过程, 对机体产生不良反应, 因此该方法的应用受到一定程度的限制<sup>[19-20]</sup>。

有研究表明, 软骨细胞可以为骨髓基质细胞向软骨定向分化提供所需的诱导因子或微环境, 因此可以作为骨髓基质细胞良好的诱导因素, 促进骨髓基质细胞形成成熟的软骨组织<sup>[21-22]</sup>。于是将软骨细胞与骨髓基质细胞共培养成为软骨组织工程获得种子细胞的一种理想的方法。已经有研究表明, 将已分化细胞与未分化细胞共培养, 不仅可以使细胞维持较强的更新增殖的能力, 而且通过细胞信号转导过程能够使未分化细胞向特定的已分化细胞进行分化, 从而获得更多的种子细胞。因此, 共培养为细胞在体外的更新增殖提供了与体内环境十

分相似的生理条件。作者采用了平面共培养的方法。目前, 平面共培养主要有3种不同的方式: 第1种, 将两种细胞在一个培养体系中进行培养; 第2种, 两种细胞也是在一个培养体系中培养, 但是中间用半透膜分隔开, 某些可溶性因子可以通过半透膜进行交换; 第3种, 两种细胞分别在两个体系中进行培养, 培养基进行互换。后两种方法的优势在于, 培养基的互换使得对于细胞的生长和分化起决定性作用的可溶性因子更加直接的发挥作用, 而且由于细胞并未直接接触, 不会发生不同类型的细胞的融合, 不会产生异核体; 但是由于细胞之间没有发生物理性接触, 因此不存在细胞之间的直接对话和信号转导, 而细胞之间的直接对话可能也会对细胞更新增殖起到决定性作用<sup>[23]</sup>。

实验采用的是第1种培养方法。通过骨髓基质细胞与软骨细胞体外平面共培养未发现两种细胞融合的现象, 而且共培养组与单纯软骨细胞培养相比, 随着培养时间的延长, 单纯软骨细胞在G4代呈现明显形态不规则, 体积变大, 并且胞浆内可见空泡、脂滴, 说明软骨细胞逐渐老化, 而共培养组, 无论细胞比例如何, 细胞形态仍呈现典型的软骨细胞样特征, 呈砖块样、集落式生长, 未呈现老化的趋势。MTT实验也同时表明, 尽管共培养组G4代细胞增殖能力明显下降, 但若采取早期移植, 选取G1~G3代细胞进行移植, 细胞将具有良好的增殖活性。

实验进一步检测了软骨特异性蛋白的染色。甲苯胺蓝染色是对胞浆内的蛋白多糖进行染色, 阿利新蓝染色是一种较好的测定细胞外基质中蛋白多糖的方法, 从而鉴定各个组的细胞是否具有软骨细胞的分泌功能<sup>[24]</sup>。结果看到, 共培养组都良好的保持了软骨细胞的特异性蛋白的染色特征, 并且在G2、G3代分泌功能达到高峰, G4代会有不同程度的下降。而且, 当软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5和3:7时, 甲苯胺蓝与阿利新蓝的染色均较比例为7:3时强度要强, 并且比例为5:5和3:7时阿利新蓝的染色可以一直持续至传代达到第4代。软骨细胞还具有一种分泌功能即分泌II型胶原, 这是其维持组织强度的来源, 是鉴定软骨细胞功能的又一标志。对各组细胞不同的传代期行II型胶原的免疫细胞化学染色, 发现将两种细胞共培养时, II型胶原的染色与甲苯胺蓝和阿利新蓝染色的变化趋势一致, 均为G2、G3代强, 而G4代减弱, 并且, 当软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5和3:7时与比例为7:3时相比, II型胶原的表达显著增强。从以上软骨细胞功能的检测结果可以看出, 当软骨细胞与骨髓基质细胞共培养时, 蛋白多糖的分泌与II型胶原的表达均在G2、G3代达到最高。而此时也正是软骨细胞形态以及增殖能力良好的时期, 用于组织工程的种子细胞是比较好的时期。对比3个比例的混合细胞组, 软骨细胞与骨髓基质细胞的比例为5:5组或者3:7组的细胞无论从细胞形态、增殖能力以

及软骨细胞的功能等方面均较比例为7:3组要好。因此, 为了减少软骨细胞的使用, 可以采取软骨细胞与骨髓基质细胞为3:7的比例共培养至G2或者G3代, 该时期是进行细胞移植的最佳时期。

骨髓基质细胞和软骨细胞共培养, 细胞不仅具有良好的软骨细胞形态, 而且具有较强的增殖活性和分泌特性, 是良好的种子细胞。但是共培养的两种细胞间相互作用的机制及其调节机制尚不清楚。软骨细胞所形成的微环境在胚胎干细胞的诱导分化中起到十分重要的作用, 这种微环境包括生长因子以及相邻细胞间的相互作用, 可以使胚胎干细胞产生蛋白多糖和II型胶原等, 形成向软骨细胞分化的趋势<sup>[25]</sup>。有学者发现, 软骨细胞条件培养液可以显著提高间充质干细胞中软骨细胞外基质和II型胶原的表达, 说明软骨细胞可能通过分泌某种因子诱导间充质干细胞向软骨细胞分化<sup>[26-28]</sup>。

#### 4 参考文献

- [1] Kramer J, Böhrnsen F, Schlenke P, et al. Stem cell-derived chondrocytes for regenerative medicine. *Transplant Proc.* 2006; 38(3): 762-765.
- [2] Ryan JA, Eisner EA, DuRaine G et al. Mechanical compression of articular cartilage induces chondrocyte proliferation and inhibits proteoglycan synthesis by activation of the ERK pathway: implications for tissue engineering and regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009; 3(2): 107-116.
- [3] Nakata K, Bullough PG. The injury and repair of human articular cartilage: a morphological study of 192 cases of coxarthrosis. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1986; 60(7): 763-775.
- [4] Getgood A, Brooks R, Fortier L, et al. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br.* 2009; 91(5): 565-576.
- [5] Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, et al. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol.* 2009; 27(5): 307-314.
- [6] Saadeh PB, Brent B, Mehrara BJ, et al. Human cartilage engineering: chondrocyte extraction, proliferation, and characterization for construct development. *Ann Plast Surg.* 1999; 42(5): 509-513.
- [7] Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, et al. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A(Suppl 3): 109-115.
- [8] Ma D, Ren L, Liu Y, et al. Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. *J Orthop Res.* 2009 Nov 4 [Epub ahead of print].
- [9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [10] Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg.* 2001; 18(1):35-53.
- [11] Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc.* 2006; 14(3): 146-154.
- [12] Mithoefer K, McAdams TR, Scopp JM, et al. Emerging options for treatment of articular cartilage injury in the athlete. *Clin Sports Med.* 2009; 28(1): 25-40.
- [13] Freimark D, Czermak P. Cell-based regeneration of intervertebral disc defects: review and concepts. *Int J Artif Organs.* 2009; 32(4): 197-203.
- [14] Nabzdyk C, Pradhan L, Molina J, et al. Review: auricular chondrocytes-from benchwork to clinical applications. *In Vivo.* 2009; 23(3): 369-380.
- [15] Onyekwelu I, Goldring MB, Hidaka C. Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem.* 2009; 107(3): 383-392.
- [16] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2739-2749.
- [17] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone.* 2006; 39(4): 678-683.
- [18] Potier E, Noailly J, Ito K. Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *J Biomech.* 2009 Dec 2. [Epub ahead of print]
- [19] Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9 (suppl A): S36-S40.
- [20] Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, et al. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003; 90(6): 1112-1127.
- [21] Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, et al. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy.* 2000; 16(6): 571-577.
- [22] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276(5309): 71-74.
- [23] Meyer U, Wiesmann HP. Bone and cartilage engineering. Berlin: Springer. 2006: 256-258.
- [24] Chopra R, Anastassiades T. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Rheumatol.* 1998; 25(8): 1578-1584.
- [25] Vats A, Bielby RC, Tolley N, et al. Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells: the effect of the micro-environment. *Tissue Eng.* 2006; 12(6): 1687-1697.
- [26] Takagi M, Umetsu Y, Fujiwara M, et al. High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocyte cells. *Tissue Eng Part A.* 2007; 103(1): 98-100.
- [27] Erickson IE, Huang AH, Chung C, et al. Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(5): 1041-1052.
- [28] Hillel AT, Taube JM, Cornish TC, et al. Characterization of human mesenchymal Stem cell-engineered cartilage: analysis of its ultrastructure, cell Density and chondrocyte phenotype compared to native adult and fetal Cartilage. *Cells Tissues Organs.* 2009 Jun 18. [Epub ahead of print]

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 北京市科技新星计划项目 ( 合同编号 : H013610310113 ), 课题题目《复合生物技术组织工程软骨的制备研究》。

**致谢:** 感谢袁润英老师和黎广平老师在细胞培养和免疫细胞化学染色等实验中给予的指导和帮助。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 通过软骨细胞与骨髓基质细胞的共培养, 从细胞形态、特异性蛋白的染色、II型胶原的分泌以及增殖情况的测定多个角度探讨了软骨细胞与骨髓基质细胞培养的最佳比例, 证实了以一定比例接触式平面共培养的软骨细胞与骨髓基质细胞能够达到良好的种子细胞的标准, 为软骨组织工程种子细胞的获得提供了新的依据, 具有一定的创新性。

**课题评估的“金标准”:** 课题主要结果指标评价目前未有公认的“金标准”。

**设计或课题的偏倚与不足:** 本课题研究由于时间和条件的限制, 未对蛋白多糖以及II型胶原的 mRNA 和蛋白表达进行定量检测, 未进行应力条件下的培养和动物体内实验。

**提供临床借鉴的价值:** 将软骨组织工程应用于临床为修复关节软骨损伤提供了良好的前景, 但是至今尚无一种细胞能够完全满足软骨组织工程对种子细胞的要求。本课题研究应用接触式平面共培养的方法, 将软骨细胞与骨髓基质细胞进行体外共培养, 调整两种细胞的比例, 可以使细胞具有良好的种子细胞的特征, 方法简单, 可操作性强, 具有良好的临床应用前景。