

## 软骨损伤后 I、II 型胶原蛋白的表达

张 猛<sup>1</sup>, 周嘉俊<sup>2</sup>, 罗宗平<sup>1</sup>(<sup>1</sup>苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215006; <sup>2</sup>苏州大学机电学院, 江苏省苏州市 215006)

### 文章亮点:

1 作为骨性关节炎经典的动物模型前交叉韧带切断(ACLT)动物模型被广泛应用于实验研究, 然而, 这种动物模型骨性关节炎进程较快, 在前交叉韧带切断后 2 周软骨即发生改变, 无法观察软骨分泌 I 型胶原蛋白的变化模式。

2 实验采用软骨划痕这种软骨损伤模型, 该种模型软骨退化较慢, 能较好的模拟软骨退变的缓慢过程。结果表明, I 型胶原蛋白在骨关节炎早期即有表达, 在软骨退化过程中表达逐渐增加, 提示与骨关节炎的发生密切相关。

### 关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 关节软骨; I 型胶原蛋白; II 型胶原蛋白; 骨性关节炎; 软骨损伤

### 主题词:

胶原, I 型; 胶原, II 型; 膝关节; 软骨; 兔

### 基金资助:

国家自然科学基金项目(81320108018)

### 摘要

**背景:** 目前 I 型胶原蛋白与骨关节炎间的关系尚未被完全揭示, I 型胶原蛋白的表达模式亦未知, 缺乏相关的研究来探讨上述问题。

**目的:** 观察软骨退化过程中 I 型胶原蛋白表达的模式, 为进一步研究 I 型胶原蛋白与骨关节炎间的关系提供参考。

**方法:** 10 只新西兰大白兔, 用手术刀片在兔左下肢股骨滑车凹造一约 5 mm 长的纵向软骨损伤制备软骨损伤模型。造模后 2, 6 周分别处死 5 只动物, 取软骨损伤部位后制作石蜡切片, 免疫组织化学检测损伤周围 I、II 型胶原蛋白的表达情况, 番红 O-快绿染色检测损伤周围软骨的退变情况。

**结果与结论:** 免疫组织化学示: 造模后 2 周后即可在软骨损伤周围检测到少量 I 型胶原蛋白, 6 周后软骨损伤周围的 I 型胶原蛋白有所增加, II 型胶原蛋白则未见明显改变。番红 O-快绿染色示: 2, 6 周软骨损伤周围均未见明显退变。结果表明, I 型胶原蛋白在骨关节炎早期即有表达, 在软骨退化过程中表达逐渐增加, 提示与骨关节炎的发生密切相关。

张猛, 周嘉俊, 罗宗平. 软骨损伤后 I、II 型胶原蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51):8305-8309.

## Expression of collagen type I and type II after articular cartilage injury

Zhang Meng<sup>1</sup>, Zhou Jia-jun<sup>2</sup>, Luo Zong-ping<sup>1</sup> (<sup>1</sup>First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Electromechanical School, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The relationship between collagen type I and osteoarthritis is still controversial, and expression patterns of collagen type I are not yet fully understood. There is lack of relevant research addressing the above-mentioned issues.

**OBJECTIVE:** To investigate the patterns of expression of collagen type I, and to contribute to the roles of collagen type I in the pathogenesis of osteoarthritis.

**METHODS:** The articular cartilage injury model was created in 10 New Zealand white rabbits. A 5 mm longitudinal wound was made in the middle of femoral trochlear groove using a scalpel. At 2 and 6 weeks after modeling, five animals were sacrificed, respectively. The injured articular cartilage was taken to make paraffin sections. Immunohistochemistry detection was used to detect the expression of collagen type I and type II around the injury. Safranin O-fast green staining was used to detect the distribution of proteoglycan around the injury.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Results from the immunohistochemistry detection showed that a small amount of collagen type I was detected around the injury at 2 weeks after modeling, and there was much more collagen type I around cartilage injury at 6 weeks after modeling, but collagen type II had no obvious changes. Under the safranin O-fast green staining, no remarkable degeneration was found around the injured cartilage. These findings indicate that collagen type I has been increased in the early period of osteoarthritis. Expression of collagen type I is increased during the degeneration of articular cartilage, indicating a close relationship between collagen type I and osteoarthritis.

张猛, 男, 1987 年生, 江苏省宿迁市人, 汉族, 苏州大学在读硕士, 主要从事骨科生物力学研究。

通讯作者: 罗宗平, 博士, 教授, 苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215006

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.020  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)51-08305-05

稿件接受: 2014-11-02

Zhang Meng, Studying for master's degree, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Luo Zong-ping, M.D., Professor, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-11-02

**Subject headings:** collagen type I; collagen type II; knee joint; cartilage; rabbits

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81320108018

Zhang M, Zhou JJ, Luo ZP. Expression of collagen type I and type II after articular cartilage injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(51):8305-8309.

## 0 引言 Introduction

骨性关节炎是一种发病率较高, 以软骨退变、软骨下骨硬化、关节周围骨质增生为主要特征的关节病变<sup>[1]</sup>。骨性关节炎的发病机制已被广泛研究, 已产生多种假说, 然而, 关于骨性关节炎的发病机制至今未达成共识, 其具体的发病机制仍不清楚<sup>[2]</sup>。关于软骨胶原蛋白的研究一直被认为是揭示骨性关节炎的重要突破口之一<sup>[3]</sup>。

I 型胶原蛋白是一种成纤维胶原, 由 2 个  $\alpha 1$  链和 1 个  $\alpha 2$  链组成的异源三聚体平行排列成束, 多存在于骨、肌腱、韧带等组织中, 正常的关节软骨中含量甚微<sup>[4]</sup>, Mankin 等学者发现晚期骨性关节炎软骨中可检测到 I 型胶原蛋白, 从而推测 I 型胶原蛋白在骨性关节炎的发生机制中有着重要的作用<sup>[5-6]</sup>。然而, I 型胶原蛋白表达增加的起始时期尚不清楚。

本实验拟通过免疫组织化学法检测软骨损伤后不同时期损伤周围的 I、II 型胶原蛋白的表达情况, 探索骨性关节炎病程中 I 型胶原蛋白表达开始增加的时期。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于 2013 年 6 月至 12 月在苏州大学骨科研究所完成。

**材料:**

**实验动物:** 新西兰大白兔 10 只, 兔龄 16 周, 体质量为 2.0-2.5 kg, 雌雄不拘, 笼中饲养, 自由饮食、喝水、活动。

软骨损伤后 I、II 型胶原蛋白的表达实验用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
免疫组织化学试剂盒(Pk6200)	Vector lab, 美国
抗兔 I 型胶原蛋白抗体	Ab6308, abcam, 美国
EDTA-2Na、番红-O 染色(s2255-25G)、快绿染色液	sigma, 美国
切片机(leica-RM2165)	德国
光学显微镜(ZEISS)	德国

**实验方法:**

**软骨损伤模型制备:** 以体积分数 10% 的水合氯醛 (3.2 mL/kg) 麻醉动物, 剔除毛发, 安尔碘消毒皮肤 3 min, 取膝关节前内侧切口, 锐性分离皮下组织, 沿髌韧带内侧缘切开关节囊, 暴露股骨滑车凹; 用刀片直视下在软骨上制作一长约 5 mm 深度 0.3 mm 的划痕, 碘伏生理盐水冲洗, 顺序缝合关节囊、筋膜皮肤。术后  $8 \times 10^4$  U/kg 青霉素肌肉注射 1 周, 预防伤口感染。

**取材及处理:** 于术后 2, 6 周过量水合氯醛耳缘静脉注射法分别处死动物中的 5 只, 取下术侧膝关节置于体积分数 4% 的甲醛中固定 48 h, 后置于 10% EDTA 溶液 (pH 7.2-7.3) 中脱钙 6 周。将脱钙完全的组织梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 石蜡切片机 5  $\mu$ m 切片。

**兔软骨组织中 I 型胶原蛋白相对含量测定:** 每个标本行两张行免疫组织化学染色 (I、II 型胶原蛋白), IPP 图像分析软件对免疫组织化学图形进行吸光度分析, 检测 I 型胶原蛋白的相对含量。

**番红-O 染色过程:** ①二甲苯脱蜡。②无水乙醇、体积分数 95% 乙醇各 3 min。③蒸馏水浸洗冲洗 3 min。④苏木精染色 5 min。⑤流水冲洗。⑥快绿染色 7 min。⑦ 0.1% 番红-O 染色 8 min。⑧体积分数 95% 乙醇浸洗。⑨无水乙醇 3 min  $\times$  2 次。⑩二甲苯透明。⑪中性树胶封固。

**I、II 型胶原蛋白免疫组织化学:** ① 55  $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 20 min。②二甲苯脱蜡 30 min, 梯度乙醇水化。③室温下置于体积分数 1%  $H_2O_2$  中 30 min 除去内源性过氧化氢酶。④ 37  $^{\circ}$ C 透明质酸酶 1 h、链霉素蛋白酶 20 min 进行抗原修复。⑤体积分数 1.5% 正常马血清封闭, 常温, 30 min。⑥滴加一抗 (1 : 800) 37  $^{\circ}$ C 60 min。⑦ PBS 浸洗 5 min  $\times$  3。⑧滴加二抗, 常温 30 min。⑨ PBS 浸洗 5 min  $\times$  3。⑩滴加三抗, 常温, 30 min。⑪ PBS 浸洗 5 min  $\times$  3。⑫ DAB 显色 2 min。⑬ 苏木精复染 5 min。⑭ 乙醇脱水。⑮ 二甲苯透明。⑯ 中性树胶封固。

**主要观察指标:** ① I 型胶原蛋白免疫组织化学结果。② II 型胶原蛋白免疫组织化学结果。③ 番红 O-快绿染色结果。

**统计学分析:** 运用 IPP 6.0 图像分析软件对 I 型胶原蛋白免疫组织化学吸光度值进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 选择新西兰大白兔 10 只, 实验过程中无脱失, 全部进入结果分析。

### 2.2 I 型胶原蛋白免疫组织化学结果

**2周组:** 在软骨划痕周围, 可见散在分布的以软骨细胞为中心的棕色区域, 主要分布划痕的中下段, 软骨各层划痕以外区域未见明显的棕色 (图 1A)。

**6周组:** 与 2 周组相比棕色区域有所扩大, 以划痕的中下段最多, 均匀分布于软骨细胞周围, 软骨各层划痕以外区域未见明显棕色 (图 1B)。

6 周组兔软骨 I 型胶原蛋白免疫组织化学灰度值显著高于 2 周组 ( $0.217 \pm 0.060$ ,  $0.087 \pm 0.019$ ,  $P < 0.05$ )。

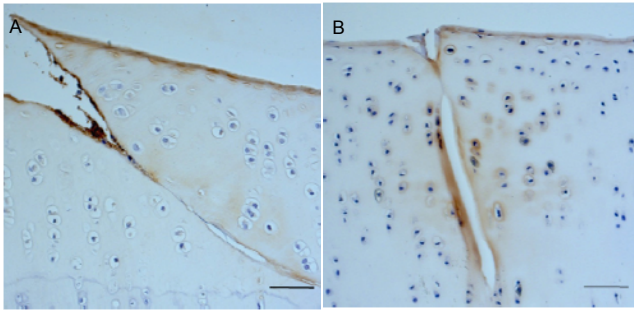


图 1 兔软骨 I 型胶原蛋白免疫组织化学染色( $\times 200$ , 标尺=100  $\mu\text{m}$ )  
Figure 1 Immunohistochemistry detection of collagen type I in the rabbit cartilage ( $\times 200$ , scale bar=100  $\mu\text{m}$ )

图注: 图 A 为 2 周后在软骨损伤周围检测到少量 I 型胶原蛋白; 图 B 为 6 周后软骨损伤周围的 I 型胶原蛋白有所增加。

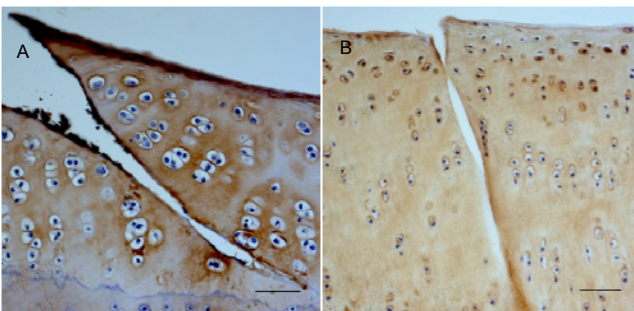


图 2 兔软骨 II 型胶原蛋白免疫组织化学染色( $\times 200$ )  
Figure 2 Immunohistochemistry detection of collagen type II in the rabbit cartilage ( $\times 200$ )

图注: 图 A 为 2 周组; B 为 6 周组。两组划痕周围均未见明显 II 型胶原蛋白免疫组织化学淡染区。

2.3 II 型胶原蛋白免疫组织化学结果 两组划痕周围均未见明显 II 型胶原蛋白免疫组织化学淡染区(图2)。

2.4 番红 O-快绿染色结果 ①2 周组: 划痕上端可见红色稍浅区域, 划痕中段及下段周围未见红色浅染区域(图3A)。②6 周组: 划痕上端可见红色稍浅区域, 划痕中段及下段周围未见红色浅染区域(图3B)。

### 3 讨论 Discussion

关节软骨是骨表面的一层间质丰富、细胞少的黏弹性物质。其主要由胶原蛋白及蛋白聚糖等成分组成, 其中 II 型胶原占胶原总数的 80%–90%<sup>[7-8]</sup>。在正常的软骨中 I 型胶原蛋白的含量甚微, 已有研究发现在骨性关节炎模型关节软骨中 I 型胶原蛋白含量增加。

诸多学者对 I 型胶原蛋白与骨关节炎间的关系进行了研究, Goldwasser 等<sup>[9]</sup>在骨性关节炎软骨中发现 I 型胶原蛋白 mRNA, 但是 Ronziere 等<sup>[10]</sup>既未在骨性关节炎软骨中检测到 I 型胶原蛋白的 mRNA, 也未检测到蛋白。

后来的研究证明了骨性关节炎软骨确实有 I 型胶原蛋白, Miosge 等<sup>[11]</sup>用生物化学法在晚期骨性关节炎软骨中检测到 I 型胶原蛋白。本实验在兔软骨损伤周围检测到 I 型

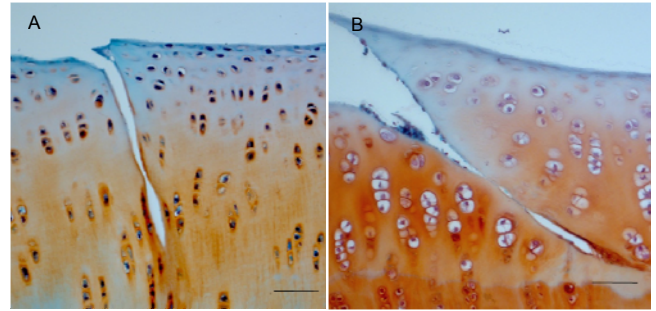


图 3 兔软骨番红 O-快绿染色( $\times 400$ )  
Figure 3 Safranin O-fast green staining of the rabbit cartilage ( $\times 400$ )

图注: 图 A 为 2 周组; B 为 6 周组。两组兔软骨损伤周围均未见明显退变。

胶原蛋白, 与上述研究结果相符, 此外还发现随着时间的增加 I 型胶原蛋白有逐渐增加的趋势。

本实验运用免疫组织化学法检测 I 型胶原蛋白, I 型胶原蛋白在 2 周组软骨损伤周围即可检测到, I 型胶原蛋白免疫组织化学结果可明确证实; 6 周后损伤周围的 I 型胶原蛋白稍有增加, 可看出随着时间的增加 I 型胶原蛋白有增加的趋势, 这说明表型发生改变的软骨细胞正日趋增加, 软骨退变可能在表型发生改变的软骨细胞超过一定水平时发生, 而 I 型胶原蛋白则可能伴随整个过程。然而, II 型胶原蛋白的表达并未发生明显的改变, 2 周组与 6 周组 II 型胶原蛋白的比较未见明显差异, 番红-O 染色稍见改变, 这说明发生表型改变的软骨细胞数量所占的比重还很小, 只有当表型改变的软骨细胞达到一定比例 II 型胶原蛋白的表达才能显示出差异, 届时软骨即发生明显的退变。

实验结果显示软骨损伤 2 周即有 I 型胶原蛋白产生, 发现 I 型胶原蛋白的时间有所提前, 结合前人发现晚期骨关节炎软骨中检测到 I 型胶原蛋白可推断出 I 型胶原蛋白的产生是伴随着骨关节炎整个病程中的, 这一发现更加确定了 I 型胶原蛋白在骨关节炎发病机制中的作用。此外, 本实验还发现 I 型胶原蛋白的产生是由局部开始向其余部位逐渐蔓延, 软骨损伤部位的中下段最先出现, I 型胶原蛋白产生的过程与软骨退变的过程很可能是一致的。

正常的软骨细胞分泌的胶原蛋白以 II 型胶原蛋白为主, I 型胶原蛋白的分泌微乎其微<sup>[12-13]</sup>, 可见在骨性关节炎病程中软骨细胞的表型发生了变化, 由以分泌 II 型胶原蛋白为主转变为以 I 型胶原蛋白为主, 作为骨性关节炎经典的动物模型前交叉韧带切断(anterior cruciate ligament transection, ACLT)动物模型被广泛应用于实验研究<sup>[14-18]</sup>, 然而, 这种动物模型骨性关节炎进程较快, 在前交叉韧带切断后 2 周软骨即发生改变, 无法观察软骨分泌 I 型胶原蛋白的变化模式。

本实验采用软骨划痕这种软骨损伤模型, 来观察软骨损伤后 I 型胶原蛋白表达的过程。Marijnissen 等<sup>[19]</sup>在比格犬关节软骨上造划痕的方法成功制造了骨性关节炎模型, 软骨退变的过程较为缓慢, 较适合于研究早期骨性关节炎及软骨退变的缓慢过程。这种模型软骨胶原的软骨机构的完整性及功能被认为主要依赖于二型胶原蛋白分子及周围基质<sup>[20-21]</sup>。II 型胶原蛋白形成的网状结构遭到破坏被认为是骨性关节炎发生过程中的重要环节<sup>[22-23]</sup>, 软骨的这种框架结构被破坏后会引发软骨生物力学、生物化学等一系列变化<sup>[24-26]</sup>。II 型胶原蛋白、蛋白聚糖等组织构成了软骨细胞生存的微环境, 在 II 型胶原蛋白构成的网状结构被破坏后, 软骨细胞所生存的微环境遭到了破坏, 由此引发的一系列变化<sup>[27]</sup>, 刺激了软骨细胞的表型发生了改变<sup>[28-29]</sup>。胶原蛋白的分泌情况发生改变, I 型胶原蛋白的表达上调即是其中重要的改变之一。

I 型胶原蛋白分子可通过整合素、盘蛋白结构域受体、糖蛋白等跨膜受体向细胞传递信号, 从而起到信号分子的作用<sup>[30-31]</sup>, 骨性关节炎病程中软骨细胞表型的变化很可能与 I 型胶原蛋白的这种信号分子作用有着密切的关系。

在骨性关节炎早期, 软骨细胞所生存的微环境正逐渐发生改变, 某种条件发生改变诱导软骨细胞 I 型胶原蛋白分泌增加, 产生的 I 型胶原蛋白不断的向周围细胞内传递、放大外界环境改变的信号, 促进软骨细胞表型的变化, 加速软骨的退变。

最近有报道称, 转化生长因子 $\beta$  能增强 I 型原蛋白的生物合成, 在组织修复的病理生理过程中发挥重要作用<sup>[32]</sup>。已有研究显示转化生长因子 $\beta$  与骨关节炎的发生密切相关在骨关节炎病程中转化生长因子 $\beta$  的分泌明显增加<sup>[33-34]</sup>, 在损伤发生后 I 型胶原蛋白增加试图修复损伤的软骨, 在修复的同时把外界环境改变的信号传导至细胞内诱导软骨细胞发生表型的变化。

I 型胶原蛋白主要存在于骨、肌腱、韧带等组织中, 这些组织的特性与关节软骨完全不同, 具有抵抗高强度暴力的特性, 弹性模量与关节软骨相差很大<sup>[35]</sup>。这些组织的特性是由 I 型胶原蛋白决定的, 当关节软骨中 I 型胶原蛋白的含量增加, 关节软骨的弹性模量等参数必将发生变化<sup>[36]</sup>, 致使软骨正常的缓冲关节压力的性能发生改变, 最终软骨的局部受力增加, 使软骨更容易遭到破坏。

本实验发现在 I 型胶原蛋白出现的部位并未见 II 型胶原蛋白的明显减少, 这可能是 I 型胶原蛋白异常表达先于 II 型胶原蛋白的表达; 或者 II 型胶原蛋白的表达先于或者同步于 I 型胶原蛋白的表达, 由于软骨中 II 型胶原蛋白本身所占比重较多, 故少量减少无法明显用免疫组织化学法来检测出。

本实验的研究意义在于, 在软骨局部制造软骨损伤, 观察软骨损伤周围 I 型胶原蛋白逐步向周围蔓延的过程。

通过对于这一过程的观察来验证以上的假设, 从而更进一步证明 I 型胶原蛋白在骨关节炎发病机制研究中的重要性。也为骨关节炎治疗的研究提供假想, 更深入的研究 I 型胶原蛋白产生机制, 通过抑制 I 型胶原蛋白的表达, 达到延缓甚至消除骨关节炎的目的。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估均为本文作者。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 胶原蛋白-有不同的类型, 目前为止已经发现了几十种。其中 I、III 型主要存在于皮肤血管等结缔组织中; II 型主要由软骨细胞产生, 多存在于骨骼、关节、肌腱等组织; VII 型主要存在于子宫胎盘中。不同类型的胶原蛋白所起到的作用也不同, I、III 型可直接到达皮肤真皮层修复, 美容养颜效果更快速。II 型比 I、III 型含有更丰富的羟脯氨酸, 更适合对骨骼肌腱组织的修复。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol.* 2001;2:771-773.
- [2] Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:408-419.
- [3] Hayashi M, Ninomiya Y, Parsons T, et al. Differential localization of mRNAs of collagen types I and II in chick fibroblasts, chondrocytes, and corneal cells by in situ hybridization using cDNA probes. *J Cell Biol.* 1986; 102: 2302-2309.
- [4] Albert B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Science, 2007.
- [5] Miosge N, Waletzko K, Bode C, et al. Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6(4):278-285.
- [6] Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, et al. Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther. Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R156-165.
- [7] Eyre DR, Wu JJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. *Journal of Rheumatology. Supplement.* 1995;43: 82-85.
- [8] Henrotina Y, Addison S, Kraus V, et al. Type II collagen markers in osteoarthritis: what do they indicate? *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007;19:444-450.
- [9] Goldwasser M, Astley T, van der Rest M, et al. Analysis of the type of collagen present in osteoarthritic human cartilage. *Clin Orthop.* 1982;167:296-302.

- [10] Ronziere MC, Richard-Blum S. Comparative analysis of collagens solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen. *Biochim Biophys Acta*.1990; 1038:2226-230.
- [11] Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, et al. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol*.2004; 122:229-236.
- [12] Eyre DR, McDevitt CA, Billingham ME, et al. Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experiment osteoarthritis. *Biochem J*.1980;188:823-837.
- [13] Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, et al. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression J *Bone Joint Surg Br*.2004;86:286-295.
- [14] Roos EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Current Opinion in Rheumatology*.2005;(2):195-200.
- [15] Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*.2002;402:21-37.
- [16] Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, et al. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage*.2008;16:1319e26.
- [17] Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*.2004; 50: 1193-1206.
- [18] Oestergaard S, Rasmussen KE, Doyle N, et al. Evaluation of cartilage and bone degradation in a murine collagen antibody-induced arthritis model. *Scand J Immunol*.2008;67: 304-312.
- [19] Marijnissen AC, van Roermund PM, TeKoppele JM, et al. The canine 'groove' model, compared with the ACLT model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10(2): 145-55. 1
- [20] Panula HE, Hyttinen MM, Arokoski J, et al. Articular cartilage superficial zone collagen fibrillation in experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1988;57:237-245.
- [21] Stoop R, Buma P, Peter M, et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*.2000;43:2121-2131.
- [22] Thibault M, Poole AR, Buschmann MD. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res*.2002;20:1265-1273.
- [23] Beville SL, Thambyah A, Broom ND. New insights into the role of the superficial tangential zone in influencing the microstructural response of articular cartilage to compression. *Osteoarthritis Cartilage*.2010;18:1310-1318.
- [24] Aigner T, Kurz B, Fukui N, et al. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002; 114:578-584.
- [25] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*.2006;20:1003-1025.
- [26] Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, et al. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage*.2008;16:1319e26.
- [27] 任红革, 崔逢德. 细胞因子在骨性关节炎中的表达与应用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(52):9828-9835.
- [28] Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, et al. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF- $\beta$ 1. *FEBS Lett*. 2003;545:115-119.
- [29] Pfander D, Swoboda B, Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, Syndecan-3, Annexin VI, and Alkaline Phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol*. 2001;159:1777-1783.
- [30] Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Nature*.1990;346:281.
- [31] Hay ED. Extracellular matrix. *J Cell Biol*.1981;91:205.
- [32] Lee JW, Qi WN, Scully SP. The involvement of beta1 integrin in the modulation by collagen of chondrocyte response to transforming growth factor-beta1. *J Orthop Res*.2002;20(1):66-75.
- [33] Yang X, Chen L, Xu X, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol*.2001;153: 35-46.
- [34] van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF $\beta$  signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. *Arthritis Res Ther*.2010;12(1):201.
- [35] 袁绍辉, 刘伟, 吴滨奇, 等. 骨质疏松性骨折愈合过程中 I, II 型胶原蛋白表达与其力学性能[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(2):208-212.
- [36] 张述卿, 张春秋, 高丽兰, 等. 组织工程修复关节软骨缺损的力学状态研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(20): 3629-3632.