

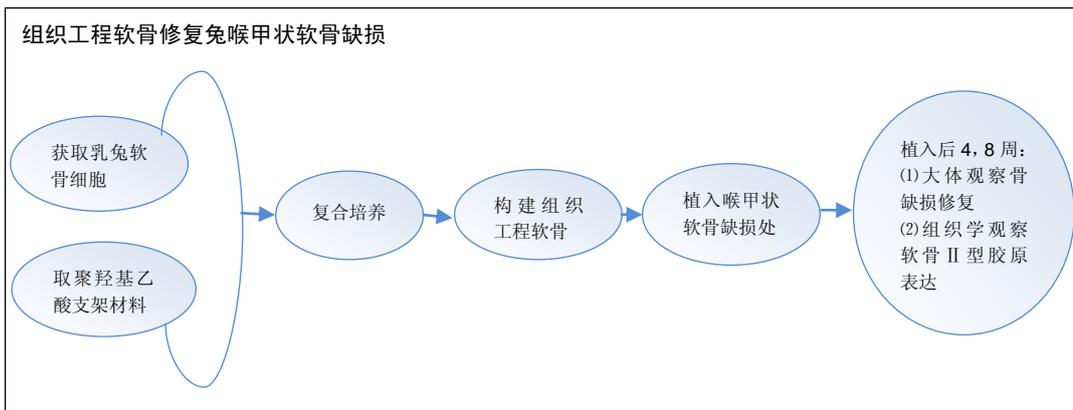
同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸支架复合物修复甲状软骨缺损

乔占清¹, 张俊¹, 马赛¹, 马振亚¹, 司远征¹, 乔新明² (¹南阳医学高等专科学校第一附属医院耳鼻喉科, 河南省南阳市 473058; ²郑州大学基础学院, 郑州大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 河南省郑州市 450001)

引用本文: 乔占清, 张俊, 马赛, 马振亚, 司远征, 乔新明. 同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸支架复合物修复甲状软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(12):1711-1717.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.12.006 ORCID: 0000-0001-7948-8704(乔占清)

文章快速阅读:



乔占清, 男, 1966 年生, 河南省南阳市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事耳鼻喉咽喉科研究。

通讯作者: 乔占清, 副主任医师, 副教授, 南阳医学高等专科学校第一附属医院耳鼻喉科, 河南省南阳市 473058

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)12-01711-07

稿件接受: 2016-01-12

<http://www.crter.org>

文题释义:

软骨组织工程: 是将软骨种子种植于可生物降解、组织相容性好的生物材料上, 形成复合物, 然后再把该复合物植入软骨缺损处, 在生物材料自行降解的过程中, 种植的细胞形成新的软骨来填充缺损。

自体软骨移植: Donald 等采用自体软骨移植的方式对不同类型软骨缺损进行治疗, 并与自体软骨缺损的临床效果进行比较。通过比较发现, 两种不同的软骨移植方式在排斥率和感染率方面经比较差异均无显著性意义。但较之自体软骨移植, 自体软骨移植存在明显吸收现象。学者们还认为, 如果在临床治疗中利用良好的方法对自体软骨予以妥善保存, 则可显著降低其移植后的吸收现象, 达到与自体软骨移植相同的治疗效果。

异体软骨移植: 郑信民等通过实验发现, 利用具有良好活力的同种异体软骨进行软骨修复治疗可以获得理想的临床效果。在将同种异体软骨植入人体之后, 可以维持 20 年左右的存活时间且很少会出现明显的吸收现象, 临床修复效果十分理想。

摘要

背景: 将聚羟基乙酸支架与软骨细胞复合, 可获得组织工程人工骨。

目的: 观察同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸支架复合物修复兔喉甲状软骨缺损的效果。

方法: 取新西兰成年大白兔 20 只, 构建喉甲状软骨缺损模型后随机分组, 实验组于缺损处植入同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸支架复合物, 对照组于缺损处植入聚羟基乙酸支架。植入后 4, 8 周进行大体观察、组织学观察。

结果与结论: ①大体观察结果: 植入后 4 周, 实验组软骨缺损得到一定的修复, 修复区域未出现坏死; 对照组缺损区域填充有肌肉和结缔组织。植入后 8 周, 实验组软骨缺损得到进一步修复, 修复界限不明显; 对照组软骨缺损未得到修复, 与周围正常软骨之间存在明显界限。②免疫组织化学染色结果: 实验组植入后 4, 8 周的 II 型胶原表达均高于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸支架复合物可促进兔喉甲状软骨缺损的修复。

关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 喉甲状软骨; 软骨缺损; 同种异体软骨细胞; 聚羟基乙酸

主题词:

甲状软骨; 软骨细胞; 组织工程

Qiao Zhan-qing, Associate
chief physician,
Department of
Otolaryngology, First
Affiliated Hospital of
Nanyang Medical College,
Nanyang 473058, Henan
Province, China

Allogenic chondrocytes-polyglycolic acid compound for repair of thyroid cartilage defects

Qiao Zhan-qing¹, Zhang Jun¹, Ma Sai¹, Ma Zhen-ya¹, Si Yuan-zheng¹, Qiao Xin-ming² (¹Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473058, Henan Province, China; ²Basic School of Zhengzhou University, Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China)

Corresponding author:

Qiao Zhan-qing,
Department of
Otolaryngology, First
Affiliated Hospital of
Nanyang Medical College,
Nanyang 473058, Henan
Province, China

Abstract

BACKGROUND: Tissue-engineered bone can be obtained by the combination of chondrocytes and polyglycolic acid scaffold.

OBJECTIVE: To investigate the effect of allogeneic chondrocytes/polyglycolic acid scaffold compound in the repair of thyroid cartilage defects in rabbits.

METHODS: Twenty New Zealand adult rabbits were randomly divided into experimental group with implantation of allogeneic chondrocytes/polyglycolic acid scaffold compound and control group with implantation of polyglycolic acid scaffold. Gross and histological observations were done at 4 and 8 weeks after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Gross observation results: 4 weeks after surgery, cartilage defects in the experimental group were repaired certainly, and no necrosis appeared in the repair area; in the control group, the defects were filled with muscle and connective tissues. At 8 weeks after implantation, cartilage defects in the experimental group were further repaired, with unclear repair boundaries, and in the control group, cartilage defects were not repaired and showed a notable boundary with the surrounding normal cartilage tissues. (2) Immunohistochemical staining results: the expression of type II collagen in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$) at 4 and 8 weeks after implantation. These findings indicate that the allogeneic chondrocytes/polyglycolic acid scaffold compound can promote the repair of thyroid cartilage defects in rabbits.

Subject headings: Thyroid Cartilage; Chondrocytes; Tissue Engineering

Cite this article: Qiao ZQ, Zhang J, Ma S, Ma ZY, Si YZ, Qiao XM. Allogenic chondrocytes-polyglycolic acid compound for repair of thyroid cartilage defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(12):1711-1717.

0 引言 Introduction

喉是人体中一个十分重要的部位且结构十分复杂, 包含多种软骨类型, 包括环状软骨、会厌软骨、甲状软骨和杓状软骨等^[1]。这些软骨一同聚集在小小的咽喉通道之中, 对喉腔的正常力学状态予以支撑和维持。但受到疾病及外伤等诸多因素的影响, 极易导致喉部软骨缺损的出现^[2], 对患者的外观产生一定的影响, 引起失音及嗅觉变化等一系列问题^[3]。以往修复喉甲状软骨缺损时, 可采用患者自体软骨移植方式^[4]。Bhavana等^[5]曾经利用髂嵴作为移植物, 治疗喉气管软骨缺损, 以实现声门下喉重建。但患者自体软骨来源十分有限, 且在移植时不可避免地会对患者造成新的创伤, 导致各种术后并发症的出现, 影响患者术后恢复^[6]。

随着临床医学的不断发展, 组织工程学得到了较快发展, 组织工程人工骨的出现也为各种喉软骨损伤治疗提供了新的方法。在进行修复时, 需要结合不同患者软骨缺损的具体情况组织人工骨构建。构建过程中需要具备种子细胞和理想的支架材料^[7]。受到喉软骨中空不规则结构的影响, 需要使用良好的细胞外基质支架材

料, 相应的材料应该具备良好的机械强度、孔隙结构及生物相容性等^[8]。

现如今, 软骨组织工程细胞外基质材料主要包括天然生物材料和各种人工合成生物材料等。其中聚羟基乙酸是一种常用的人工合成生物材料, 具有良好的生物相容性和孔隙结构, 是一种理想的支架材料^[9], 将其与软骨细胞进行复合, 可以获得修复所需的人工骨。此次实验过程中, 从具有免疫力的乳兔体内获得软骨细胞, 并与聚羟基乙酸进行复合, 获得软骨修复复合物, 对喉甲状软骨缺损动物进行软骨修复治疗, 以探讨同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸复合物对有免疫力乳兔体内喉甲状软骨缺损的修复效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年7至8月在南阳医学高等专科学校第一附属医院实验室完成。

1.3 材料 聚羟基乙酸支架材料由广州市济源生物科技有限公司提供, 原材料为聚乙醇酸, 可降解, 具有良

好的生物相容性。

实验动物: 1周龄纯种新西兰健康乳兔21只, 由西安市迪乐普生物资源开发有限公司提供, 许可证号: SCXK(陕)2013-0006, 健康状况良好。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
双抗(青霉素、链霉素溶液)	潍坊瑞华生物科技有限公司
戊巴比妥	北京清大天一科技有限公司
胎牛血清	上海弘顺生物科技有限公司
II型胶原酶	上海韵涵生物科技有限公司
MTT液	南京有为生物科技有限公司
DMSO	北京智杰方远科技有限公司
多聚赖氨酸	上海信帆生物科技有限公司
Ham-F12培养液	上海哈灵生物科技有限公司
II型胶原免疫组化试剂盒	上海雅吉生物科技有限公司
超净工作台	上海远慕生物科技有限公司
恒温箱	上海素尔生物科技有限公司
酶联免疫检测仪	南京华东电子集团医疗装备有限责任公司
扫描电镜	复纳科学仪器(上海)有限公司
紫外线杀菌仪	徐州市科诺医学仪器设备有限公司
培养箱	深圳市芬析仪器制造有限公司

1.4 实验方法

乳兔软骨细胞的分离和培养^[10]: 取1只乳兔脱颈处死, 在超净工作台上于无菌环境下切下双膝, 放入含双抗的PBS内。利用眼科剪游离软骨予, 之后添加胰蛋白酶。消化结束之后, 添加含双抗和胎牛血清的培养基终止消化。利用眼科将软骨剪为小碎块, 添加II型胶原酶, 置于恒温箱进行消化, 获得细胞悬液。利用150目网筛进行过滤, 将过滤液置于离心管中进行离心, 离心结束弃掉上清, 添加含双抗和胎牛血清的培养基, 进行机械吹打, 之后接种于培养瓶中, 进行培原代和传代培养。取第4代细胞, 利用胰蛋白酶进行消化之后接种在96孔板中, 连续培养10 d, 添加MTT液进行孵育, 添加DMSO溶解结晶物, 利用酶联免疫检测仪对细胞在492 nm处的吸光度值进行检测和记录, 根据检测结果并绘制细胞生长曲线。

聚羟基乙酸支架材料处理: 对聚羟基乙酸支架材料进行剪裁, 剪为片状, 大小为1.2 cm×1.5 cm。利用多聚赖氨酸对材料进行浸泡, 待材料完全浸透之后取出,

置于自然条件下进行风干。干燥之后利用乙醇浸泡消毒, 并使用三蒸水清洗。清洗结束后置于无菌培养皿中自然干燥, 妥善保存备用, 并取部分材料进行扫描电镜观察。

软骨细胞复合聚羟基乙酸支架材料: 复合之前利用紫外线对支架材料进行照射, 之后对软骨细胞进重悬, 调整细胞浓度为 $6 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。将软骨细胞接种在支架材料上, 置于培养箱中培养4 h。之后添加Ham-F12培养液, 培养48 h之后换液。

实验分组: 取20只乳兔, 随机分为对照组和实验组, 每组10只。两组均构建喉甲状软骨缺损模型, 具体方法为: 利用戊巴比妥对动物进行全麻, 将动物固定在手术台, 对动物颈部进行脱毛和术区消毒, 于动物颈部正中做切口, 对肌层进行分离, 暴露甲状软骨, 从两侧甲状软骨板交界位置将软骨切开, 在一侧甲状软骨板上造成0.6 cm×0.5 cm的缺损, 连同内外软骨膜一并去除, 保留喉黏膜, 制备单侧甲状软骨板缺损模型。单侧甲状软骨板缺损模型制备完毕之后, 实验组动物植入同种异体软骨细胞复合聚羟基乙酸支架材料, 对照组植入同样大小的聚羟基乙酸材料。植入结束后进行切口缝合。

术后处理: 术后对两组动物予以耳缘青霉素静脉注射 $80 \times 10^4 \text{ U}$, 待动物清醒之后, 对动物进行常规喂食、喂水。术后每天对两组动物肌肉注射青霉素 $80 \times 10^4 \text{ U}$, 连续注射3 d, 术后观察动物一般情况, 并进行记录。

1.5 主要观察指标 植入后4周和8周, 分别处死两组动物各5只, 获得标本进行观察, 了解喉甲状软骨缺损大体情况。利用II型胶原免疫组化试剂盒对两组II型胶原表达情况进行检测, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 观察两组的II型胶原表达阳性率, 利用图像分析软件进行半定量分析。

1.6 统计学分析 实验所得数据均利用统计学软件SPSS 19.0进行分析, $P < 0.05$ 表示数据间差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 20只乳兔全部进入最终结果分析, 见图1。

2.2 聚羟基乙酸支架材料扫描电镜观察 对聚羟基乙酸支架材料进行扫描电镜观察, 可以观察到支架材料具有良好的孔隙结构, 见图2。

2.3 乳兔软骨细胞培养结果观察 对乳兔软骨细胞进行培养, 原代培养1 d, 细胞开始贴壁, 呈短梭形、圆

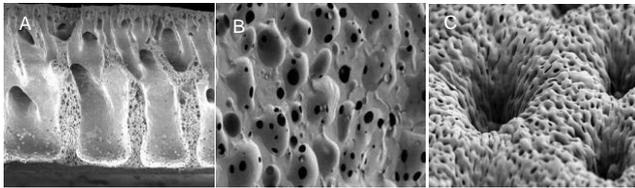
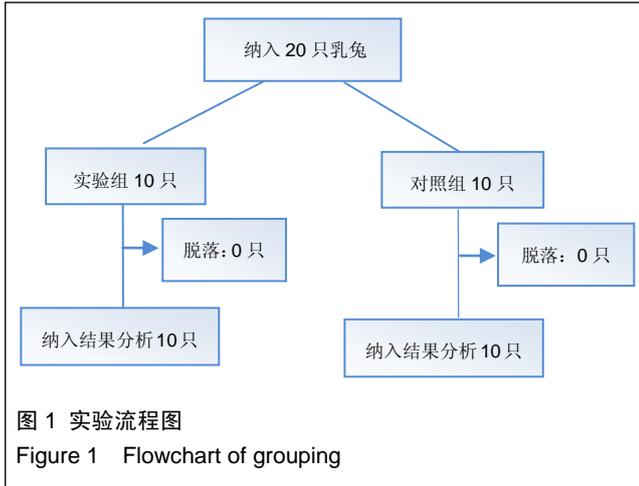


图 2 扫描电镜观察聚羟基乙酸支架材料
 Figure 2 Scanning electron microscope observation of polyglycolic acid scaffold
 图注: 图中 A 为材料侧面($\times 10^6$), B 为材料正面($\times 10^6$), 均可见孔状结构; C 为材料孔状结构细节图(2×10^6)。

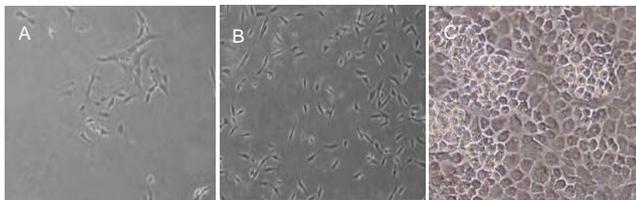


图 3 乳兔软骨细胞培养结果($\times 100$)
 Figure 3 Results of rabbit chondrocyte culture ($\times 100$)
 图注: 图中 A 为原代培养 1 d, B 为原代培养 3 d, C 为原代培养 10 d。

形; 培养 3 d, 细胞多呈三角形及多边形, 其胞浆丰富; 培养 10 d, 可观察到细胞胞浆丰富, 细胞之间相互连接, 并呈现出“铺路石”状, 见图 3。

2.4 乳兔软骨细胞培养体外生长情况检测 利用酶联免疫检测仪对细胞在 492 nm 处的吸光度值进行检测和记录, 按照检测结果绘制细胞生长曲线, 见图 4。

2.5 术后动物一般情况分析 术后两组实验动物均正常呼吸, 呼吸维持在良好的通畅状态, 未出现喘鸣等情况, 正常进食、饮水、活动, 术后颈部伤口均一期愈合, 未出现感染或死亡。

表 1 两组植入后 4, 8 周的 II 型胶原阳性率分析

($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 The positive rate of type II collagen at 4 and 8 weeks after surgery

组别	植入后 4 周	植入后 8 周
实验组	35.23 \pm 2.15	85.23 \pm 5.24
对照组	5.25 \pm 0.54	5.65 \pm 1.03
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05

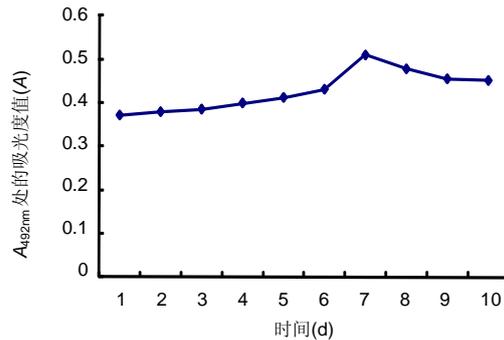


图 4 乳兔软骨细胞体外培养生长曲线
 Figure 4 Growth curve of neonatal rabbit chondrocytes cultured *in vitro*

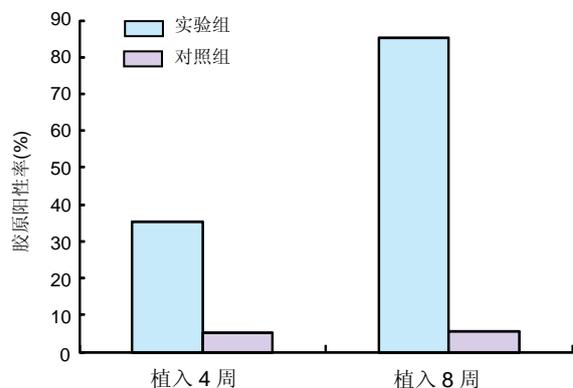


图 5 两组植入后不同时间点的 II 型胶原阳性率分析
 Figure 5 The positive rate of type II collagen at 4 and 8 weeks after surgery

2.6 标本大体情况分析

植入后 4 周: 实验组可观察到软骨缺损得到一定的修复, 修复区域未出现坏死; 对照组缺损区域填充有肌肉和结缔组织。

植入后 8 周: 实验组软骨缺损得到进一步修复, 修复界限不明显; 对照组软骨缺损未得到修复, 与周围正常软骨之间存在明显界限。

2.7 两组 II 型胶原表达分析 实验组植入后 4, 8 周的 II 型胶原阳性率显著高于对照组 (P 均 < 0.05), 见表 1, 图 5。

3 讨论 Discussion

喉部较易出现软骨缺损, 其中喉甲状软骨缺损十分常见, 但软骨的修复能力十分有限^[11-13]。国外学者 Kim 等^[14]通过研究指出, 对于直径在 3 mm 以下的软骨缺损, 可实现全部或者部分修复。但对于直径在 4 mm 以上的软骨缺损, 依靠机体自身的修复能力则大多无法自行修复。

在进行软骨修复时, 采用自体软骨移植是常用的方法, 但受到来源和创伤等因素的影响, 存在一定的应用局限性^[15-19]。随着组织工程学的不断发展, 临床开始积极的通过构建组织人工骨的方式进行软骨缺损修复治疗^[20-25]。郑信民等^[26]通过实验发现, 利用具有良好活力的同种异体软骨进行软骨修复治疗可以获得理想的临床效果。在将同种异体软骨植入人体之后, 可以维持 20 年左右的存活时间且很少会出现明显的吸收现象, 临床修复效果十分理想。Donald 等^[27]也采用异体软骨移植的方式对不同类型软骨缺损进行治疗, 并与自体软骨缺损的临床效果进行比较。通过比较发现, 两种不同的软骨移植方式在排斥率和感染率方面经比较差异均无显著性意义。但较之自体软骨移植, 异体软骨移植存在明显吸收现象。学者们还认为, 如果在临床治疗中利用良好的方法对异体软骨予以妥善保存, 则可显著降低其移植后的吸收现象, 达到与自体软骨移植相同的治疗效果。在采用组织工程人工骨进行软骨修复治疗时, 基本要素是种子细胞和支架材料。构建过程中, 需要用到一定的种子细胞^[28-29]。软骨内无血管、淋巴管和神经, 细胞被包埋在由软骨基质形成的软骨囊内, 因此软骨细胞具有抗原性弱, 不易被机体免疫系统攻击的特点, 而且作为种子细胞, 在获取过程中经过酶的消化、传代培养及与生物材料的复合培养等系列处理, 细胞表面抗原可被进一步削弱和包裹^[30]。软骨的这些免疫学优势使得同种异体软骨细胞作为组织工程种子细胞成为可能。

此次实验过程中, 选择具备免疫力的乳兔体内获得软骨细胞作为实验所需的种子细胞。除种子细胞之外, 在组织工程软骨的构建过程中, 还需要使用相应的支架材料。在软骨组织工程生物材料研究中, 人工合成和天然类等多种材料都被尝试用于组织工程化软骨组织构建, 以形成片状和无中空结构的简单形态组织工程化软骨为主, 尚无适宜大块中空形态软骨组织构建需求的生物材料, 且普遍存在价格昂贵、加工工艺复杂等问题。因此, 继续探索理想的软骨组织工程生物支架材料研究仍是面临的课题。理想的支架材料应该具有耐拉伸、生

物相容性良好、无致炎性、无排斥性和易降解等特点, 可为种子细胞提供所需的支撑。本次实验过程中, 选择使用的支架材料为聚羟基乙酸。聚羟基乙酸具有良好的生物降解性和生物相容性, 有很好的吸附性、成膜性、通透性、成纤性、吸湿性, 可作为支架材料, 与软骨细胞复合起来予以应用^[31-33]。将支架与软骨细胞进行复合并进行软骨缺损修复, 植入动物体内一段时间之后, 支架材料会逐渐发生降解^[34-35]。本次实验过程中对聚羟基乙酸支架材料进行扫描电镜观察, 可以观察到聚羟基乙酸支架材料具有良好的孔隙结构, 说明聚羟基乙酸具有良好的空间结构, 可为软骨细胞的附着和黏附等提供良好的条件^[36]。实验过程中, 对标本进行大体观察可以发现, 植入后 4 周, 实验组可以观察到软骨缺损得到一定的修复, 修复区域未出现坏死, 对照组缺损区域填充有肌肉和结缔组织; 植入后 8 周, 实验组软骨缺损得到进一步修复, 且修复界限不明显, 对照组软骨缺损未得到修复, 与周围正常软骨之间存在明显的界限。结果显示, 使用同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸复合物对存在免疫力的乳兔进行喉甲状软骨缺损修复, 可以获得良好的软骨修复效果。II 型胶原由软骨细胞分泌, 是软骨的主要胶原成分之一^[37-39]。II 型胶原的表达可反映出机体内软骨细胞的生长情况^[40-51]。此次实验中, 实验组细胞中富含丰富的 II 型胶原, 表明软骨细胞大量增殖, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 即提示, 利用同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸复合物对存在免疫力的乳兔喉甲状软骨缺损进行修复, 可获得理想的治疗效果。

作者贡献: 乔占清进行实验设计, 实验实施为乔占清、张俊、马赛、乔新明, 实验评估为乔占清、马振亚, 资料收集为司远征, 乔占清成文, 乔占清、乔新明审核。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经南阳医学高等专科学校第一附属医院医学伦理部分审核并批准, 实验过程中对动物的使用和处理方法及动物福利等问题均符合伦理要求。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

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。

4 参考文献 References

- [1] 孙安科,陈文弦,崔鹏程,等.同种异体工程化软骨的构建和修复甲状软骨缺损的实验研究[J].中华耳鼻咽喉科杂志, 2001,36(4):278-280.
- [2] 孙安科,陈文弦,崔鹏程,等.同种异体软骨细胞-聚羟基乙酸复合物修复喉软骨缺损[J].现代康复, 2001,5(7):43-44.
- [3] 孙安科,孙靖,孙伟,等.无纺网与多孔海绵状材料作为软骨组织工程支架的适用性及体内降解性[J].中国组织工程研究,2014,18(8):1172-1178.
- [4] 孙安科,裴国献,周国平,等.改良以聚羟基乙酸为支架同种异体组织工程化塑形软骨的构建[J].第一军医大学学报, 2002,22(11):996-999.
- [5] Bhavana K,Tyragi I,Ramani MK.Laryngotracheal reconstruction using iliac crest graft: an institutional experience.Indian J Otolaryngol Head Neck. 2010; 62(1):75-78.
- [6] 杨大鉴,黄定强,胥方元,等.兔骨髓间充质干细胞及聚羟基乙酸支架材料构建人工软骨的可行性[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(14):2761-2764.
- [7] 孙安科,裴国献,陈文弦,等.聚羟基乙酸负载软骨细胞修复同种异体甲状软骨缺损[J].中华耳鼻咽喉科杂志, 2003, 38(5):347-350.
- [8] 李军政,成诗银,崔鹏程,等.低温冻存同种异体软骨细胞在喉功能重建中的应用[J].中国临床康复, 2005,9(2):45-47.
- [9] 李军政.低温冻存软骨细胞构建组织工程化软骨及组织工程化软骨的低温冻存[D].第四军医大学,2005.
- [10] 吴海涛,钟翠平,王薇,等.软骨细胞三维支架短期固定培养实验研究[J].耳鼻咽喉头颈外科,2000,7(5):298-301.
- [11] 杨大鉴,黄定强,胥方元,等.骨髓间充质干细胞-支架复合体向软骨诱导分化的实验研究[J].泸州医学院学报, 2005,28(5):394-396.
- [12] 倪云峰,李小飞,刘源,等.兔骨髓基质干细胞与软骨细胞混和培养体内成软骨[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(16):3185-3188.
- [13] 崔玉明,伍骥,胡蕴玉,等.聚乳酸/聚羟基乙酸复合骨形成蛋白修复兔关节软骨缺损[J].中国修复重建外科杂志, 2007,21(11):1233-1237.
- [14] Kim HKW,Moran ME,Salter RB.The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion.J Bone Joint Surg Am. 1991;73(9):1301-1315.
- [15] 吴玉家,江华,周广东,等.构建带内支撑组织工程软骨的实验研究[J].中华整形外科杂志,2007,23(4):328-331.
- [16] 孙安科,陈文弦,李东军,等.聚羟基乙酸无纺网设计在软骨组织工程中的适用研究[J].现代康复,2001,5(6):38-39.
- [17] 李德保,田甜,章庆国等.膨体聚四氟乙烯(ePTFE)内支撑组织工程软骨的构建实验研究[J].中国美容医学, 2009, 18(6):823-826.
- [18] 韩志军,任华.两种聚羟基乙酸支架与猪软骨样细胞体外相容性比较[J].协和医学杂志,2011,2(1):42-45.
- [19] 王永春,沈尊理,钱鋈,等.冻干骨和PLGA材料表面软骨细胞增殖的形态学观察比较[J].组织工程与重建外科杂志, 2007,3(1):19-21,51.
- [20] 崔玉明,伍骥,胡蕴玉,等.骨髓基质细胞源性软骨细胞复合聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物修复兔关节软骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(51):10049-10054.
- [21] 李红喜,张睿,李华哲,等.软骨细胞联合BMP/bFGF移植对关节软骨损伤的修复作用[J].现代生物医学进展, 2013, 13(22):4237-4241.
- [22] Kiss A,Cucchiarini M,Menger MD,et al.Enamel matrix derivative inhibits proteoglycan production and articular cartilage repair, delays the restoration of the subchondral bone and induces changes of the synovial membrane in a lapine osteochondral defect model in vivo.J Tissue Eng Regen M.2014;8(1):41-49.
- [23] Lohmann CH,Schwartz Z,Niederauer GG,et al. Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo.Biomaterials. 2000;21(1):49-61.
- [24] Lim SY,Mun GH,Hyon WS,et al.The elevation of the constructed auricle with a temporoparietal fascial flap wrapping a resorbable plate.J Plast Reconstr Aesthet surg.2006;59(5):505-509.
- [25] Homicz MR,Chia SH,Schumacher BL,et al.Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. Laryngoscope.2003;113(1):25-32.
- [26] 郑信民,董淑芬,胡永声,等.人同种软骨移植的临床及实验室观察[J].中华整形烧伤外科杂志,1990,37(2):91-93.
- [27] Donald PJ.Cartilage grafting in facial reconstruction with special consideration of irradiated grafts. Laryngoscope.1986;96(7):786-807.
- [28] 夏万尧,刘伟,刘天一,等.应用骨髓基质干细胞体外构建组织工程化管状软骨的实验研究[J].中华显微外科杂志, 2005,28(4):328-330,插图4-4.
- [29] 苗春雷,周广东,刘天一,等.软骨细胞与骨髓基质细胞共培养体外构建软骨的初步研究[J].上海第二医科大学学报, 2004,24(4):246-249,283.
- [30] 孙晋客,刘锋,范卫民,等.不同材料包埋的PGA支架对软骨细胞体外培养的影响[J].江苏医药, 2006,32(7):642-644, 插4.
- [31] 欧阳彬,范卫民,马益民,等.壳聚糖、II型胶原和PGA三种支架体外构建组织工程软骨的比较研究[J].江苏医药, 2007,33(9):904-906

- [32] 倪云峰,李小飞,刘源,等.兔骨髓基质干细胞与软骨细胞共培养体内成软骨的实验观察[J].第四军医大学学报, 2006,27(7):612-614.
- [33] Jiang J,Zhao Z,Guoyu L,et al.Syntheses and evaluation of copolymer 6-amino hexanoic acid and 4R-hydroxy-L-proline for bone repair//Materials Engineering and Automatic Control.2012:491-496.
- [34] Poologasundarampillai G,Ionescu C,Tsigkou O,et al.Synthesis of bioactive class II poly(γ -glutamic acid)/silica hybrids for bone regeneration.J Mater Chem.2010;20(40):8952-8961.
- [35] Thomson RC,Yaszemski MJ,Powers JM et al. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration.Biomaterials. 1998;19(21):1935-1943.
- [36] I.Raizer,W.Chrzanowski,W.Binias et al.Nano Hydroxyapatite Polylactic Acid Electrospun Scaffolds for Bone Tissue Engineering[C].//23rd European conference on biomaterials 2010.2010:449-449.
- [37] Hollinger JO,Mayer M,Buck D.Poly(α -hydroxy acid) carrier for delivering recombinant human bone morphogenetic protein-2 for bone regeneration.J Control Release.1996;39(39):287.
- [38] Fukuda A,Kato K,Hasegawa M,et al.Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor. Biomaterials.2005;26(20):4301-4308.
- [39] Tang C,Xu Y,Jin C,et al.Feasibility of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Matrix Scaffold for Cartilage Tissue Engineering. Artificial Organs.2013;37(12):E179-E190.
- [40] 崔玉明,伍骥,胡蕴玉,等.聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物修复髌股关节软骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(16):2877-2880.
- [41] Lee CC,Lo Y,Ho LJ,et al.A New Application of Parallel Synthesis Strategy for Discovery of Amide-Linked Small Molecules as Potent Chondroprotective Agents in TNF- α -Stimulated Chondrocytes.PLoS One. 2016; 11(3):e0149317.
- [42] Anbarasan S,Baraneedharan U,Paul SF,et al.Low dose short duration pulsed electromagnetic field effects on cultured human chondrocytes: An experimental study.Indian J Orthop.2016;50(1):87-93.
- [43] Mueller M,Weinmann D,Toegel S,et al.Compounds from *Caesalpinia sappan* with anti-inflammatory properties in macrophages and chondrocytes.Food Funct. 2016;7(3):1671-1679.
- [44] Dai X,Li Y,Zhang R,et al.Effects of sodium selenite on c-Jun N-terminal kinase signalling pathway induced by oxidative stress in human chondrocytes and c-Jun N-terminal kinase expression in patients with Kashin-Beck disease, an endemic osteoarthritis.Br J Nutr.2016:1-9. [Epub ahead of print]
- [45] Huang Z,Du S,Huang L,et al.Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating Lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis.Osteoarthritis Cartilage. 2016.pii: S1063-4584(16)01042-6.
- [46] Recha-Sancho L,Semino CE.Heparin based self-assembling peptide scaffold reestablish chondrogenic phenotype of expanded de-differentiated human chondrocytes.J Biomed Mater Res A.2016.doi: 10.1002/jbm.a.35699. [Epub ahead of print]
- [47] Huang Z,Li J,Du S,et al.Effects of UCP4 on the Proliferation and Apoptosis of Chondrocytes: Its Possible Involvement and Regulation in Osteoarthritis. PLoS One.2016;11(3):e0150684.
- [48] Yoon HI,Yhee JY,Na JH,et al.Bioorthogonal Copper Free Click Chemistry for Labeling and Tracking of Chondrocytes In Vivo.Bioconjug Chem. 2016. [Epub ahead of print]
- [49] Cizelj I,Dušanić D,Benčina D,et al.Mycoplasma and host interaction: In vitro gene expression modulation in Mycoplasma synoviae and infected chicken chondrocytes. Acta Vet Hung.2016;64(1):26-37.
- [50] Yeh HY,Hsieh FY,Hsu SH.Self-patterning of adipose-derived mesenchymal stem cells and chondrocytes cocultured on hyaluronan-grafted chitosan surface.Biointerphases. 2016 5;11(1):011011.
- [51] Xu HG,Ma MM,Zheng Q,et al.P120-Catenin Protects Endplate Chondrocytes from Intermittent Cyclic Mechanical Tension Induced Degeneration by Inhibiting the Expression of RhoA/ROCK-1 Signaling Pathway.Spine (Phila Pa 1976).2016.[Epub ahead of print]