

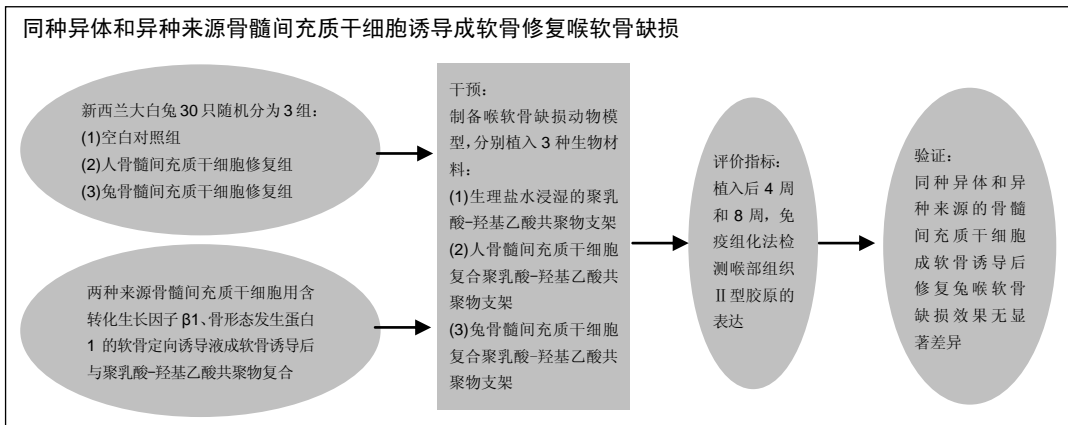
同种异体和异种来源骨髓间充质干细胞诱导成软骨修复喉软骨缺损

刘艺昌¹, 周敬²(¹南阳市中心医院, 河南省南阳市 473009; ²郑州大学第一附属医院, 河南省郑州市 450003)

引用本文: 刘艺昌, 周敬. 同种异体和异种来源骨髓间充质干细胞诱导成软骨修复喉软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(7):966-971.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.07.007 ORCID: 0000-0002-0574-1479(刘艺昌)

文章快速阅读:



刘艺昌, 男, 1975年生, 硕士, 主治医师, 主要从事耳鼻喉头颈外科方面的研究。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)07-00966-06

稿件接受: 2015-11-23

http://www.crter.org

文题释义:

软骨及软骨组织工程: 软骨由软骨组织及其周围的软骨膜构成, 软骨组织由软骨细胞、基质及纤维构成。根据软骨组织内所含纤维成分的不同, 可将软骨分为透明软骨、弹性软骨和纤维软骨3种, 其中以透明软骨的分布较广, 结构也较典型。软骨组织工程是将软骨种子细胞种植于可生物降解、组织相容性好的生物材料形成复合物, 然后再把该复合物植入软骨缺损处, 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。

骨髓间充质干细胞成软骨分化: 骨髓间充质干细胞在特定的条件下, 可诱导其向软骨细胞分化。研究报告在单层培养时使用骨形态发生蛋白2、转化生长因子 $\beta 1$ 、成纤维细胞生长因子2等可诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。与骨髓间充质干细胞单独诱导培养相比, 软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养可以产生更多的II型胶原和蛋白聚糖等软骨细胞特征性的细胞外基质成分。

摘要

背景: 由于软骨细胞缺乏再生能力, 选择合适的种子细胞是修复软骨缺损需首要解决的问题。

目的: 探讨同种异体和异种来源骨髓间充质干细胞成软骨诱导后修复喉软骨缺损的效果。

方法: 取第3代人骨髓间充质干细胞和兔骨髓间充质干细胞加入软骨定向诱导液(含转化生长因子 $\beta 1$ 和骨形态发生蛋白)进行成软骨诱导, 并滴加于聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架上。取30只新西兰大白兔随机分为3组: 空白对照组、人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组, 制备喉软骨缺损动物模型, 分别植入生理盐水浸湿的聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 人骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 兔骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架。术后4周和8周, 免疫组化法检测喉部组织II型胶原的表达。

结果与结论: 各组动物均呼吸通畅、正常, 未出现喘鸣等, 进食和活动情况良好, 未出现化脓或者感染现象。术后4周和8周, 人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组的II型胶原阳性率均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组间比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果表明同种异体和异种来源的骨髓间充质干细胞成软骨诱导后进行兔喉软骨缺损修复均可以获得良好的效果, 二者修复效果无显著差异。

关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 软骨缺损; 修复; 骨髓间充质干细胞; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 定向诱导; 同种异体; 异种

主题词:

喉软骨; 骨髓; 间质干细胞; 组织工程

Liu Yi-chang, Master,
Attending physician,
Nanyang Central Hospital,
Nanyang 473009, Henan
Province, China

Allogeneic versus heterogeneous bone marrow mesenchymal stem cells for laryngeal cartilage repair

Liu Yi-chang¹, Zhou Jing² (¹Nanyang Central Hospital, Nanyang 473009, Henan Province, China; ²First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Because chondrocytes have no regeneration ability, to select suitable seed cells is the primary problem to repair cartilage defects.

OBJECTIVE: To investigate the effect of allogeneic versus heterologous bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in repairing laryngeal cartilage defects after chondrogenic induction.

METHODS: BMSCs from human and rabbits were isolated and cultured. Passage 3 cells were cultured in chondrogenic induction medium containing transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein, and then were dropped onto a poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffold. Thirty New Zealand rabbits were randomly assigned into three groups: blank control group, human BMSCs group, rabbit BMSCs group. Animal models of laryngeal cartilage defects were made in the three groups. After modeling, saline-soaked PLGA scaffold, PLGA scaffold with human BMSCs or with rabbit BMSCs were implanted respectively into the rabbits in the normal blank, human BMSCs and rabbit BMSCs groups. The expression of type II collagen in the larynx and its surrounding tissues was detected by immunohistochemistry at 4 and 8 weeks postoperatively.

RESULTS AND CONCLUSION: The animals in each group breathed normally with no presence of wheezing, and their eating and activity were good. Moreover, there was no purulency or infection in the three groups. At 4 and 8 weeks after operation, the positive rates of type II collagen in the two BMSCs groups were significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between two BMSCs groups ($P > 0.05$). These results show that both allogeneic and heterologous BMSCs have good therapeutic effects on the repair of laryngeal cartilage defects in rabbits.

Subject headings: Laryngeal Cartilages; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Tissue Engineering

Cite this article: Liu YC, Zhou J. Allogeneic versus heterogeneous bone marrow mesenchymal stem cells for articular cartilage repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(7):966-971.

0 引言 Introduction

受到软骨再生能力有限等因素的影响, 软骨缺损修复大多无法获得理想的效果。组织工程学的发展, 为不同类型软骨缺损修复治疗开辟了新道路^[1]。种子细胞和支架材料是组织工程最基本的要素, 细胞种植于支架材料上构建组织是组织工程技术的核心, 也是形成组织工程化生物活性组织的关键所在^[2-3]。骨髓间充质干细胞是常用的种子细胞, 其具有分化为其他细胞的能力, 如成骨细胞、成脂细胞, 软骨细胞和肝样细胞等^[4], 可选用自体、同种异体和异种来源骨髓间充质干细胞进行成软骨诱导分化^[5]。实验探讨同种异体和异种来源骨髓间充质干细胞成软骨诱导后修复喉软骨缺损的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察性实验与随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年5至7月在郑州大学第一附属医院完成。

1.3 材料

实验试剂与仪器: PBS(上海博升生物科技有限公

司; 孵育箱(苏州市莱顿科学仪器有限公司); 胰酶(北京嘉康源科技发展有限公司); 流式细胞仪(上海天美科学仪器有限公司); 戊巴比妥(潍坊海之源生物制品有限公司); 超净工作台(江苏舜星科技有限公司); 青霉素钠(潍坊威森格化工有限公司); 链霉素(北京索莱宝科技有限公司); 两性霉素(临沂市泰尔化工科技有限公司); DMEM 培养液(金骏升科技国际有限公司); 流式管(上海弘顺生物科技有限公司); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架(上海甄准生物科技有限公司); 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)(上海高创化学科技有限公司); 骨形态发生蛋白1(上海希美化学有限公司); 离心机(张家港市恒大离心机有限公司); 切片机(温州顶历医疗器械有限公司); 倒置显微镜(北京中仪光科科技发展有限公司); 青霉素(上海研域生物科技有限公司); 酶联免疫测试仪(复纳科学仪器(上海)有限公司)。

实验动物: 纳入31只健康新西兰大白兔, 体质量2.5-3.0 kg, 6-10个月龄, 雌雄各半, 购自上海交大海科生物部, 许可证号SCKK(沪)2015-0023, 均喂饲精制颗粒饲料, 自由饮水。研究相关内容和方法均经郑州大

学第一附属医院伦理部门审核并批准。

1.4 实验方法

1.4.1 人骨髓间充质干细胞的分离与培养 抽取1名健康志愿者髂骨骨髓15 mL(35岁, 排除血液系统疾病, 经医院伦理委员会批准, 患者签署知情同意书), 添加15 mL PBS, 置于室温条件下进行离心, 再次添加PBS制备细胞悬液。分次加入Percoll分离液中, 离心后取中间细胞层, 添加PBS, 常规离心之后弃去上清液, 接种在培养瓶中, 接种细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 添加完全培养基进行常规原代培养, 连续培养7 d之后用胰酶进行消化, 并进行传代培养。

1.4.2 人骨髓间充质干细胞的鉴定 取第3-6代细胞进行鉴定, 于室温条件下用胰酶消化, 离心, 收集细胞沉淀, PBS洗涤3次, 制备细胞悬液。加入荧光标记的不同表型抗体, 常规孵育、洗涤之后上流式细胞仪检测, 利用Cell-Quest软件对所得数据进行处理。

1.4.3 兔骨髓间充质干细胞的分离与培养 取1只新西兰大白兔, 用戊巴比妥进行腹腔麻醉, 自胫骨近端内侧处进行骨髓穿刺, 获得3 mL骨髓液, 注入离心管内进行密度梯度离心。离心后吸取中间单个核细胞层, PBS洗涤后接种于培养皿中, 接种密度为 $1.6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 并添加含青霉素钠、链霉素、两性霉素的培养液进行原代培养, 待细胞爬满培养瓶底时进行传代培养。

1.4.4 兔骨髓间充质干细胞的表面抗原鉴定 取传代培养的第3代细胞, 用胰蛋白酶消化, 添加DMEM培养液中中止消化, PBS洗涤, 离心后弃去上清, 添加新鲜培养液制备细胞悬液, 调整细胞浓度后置于流式管中, 添加不同表面抗原抗体, 避光放置后利用流式细胞仪进行检测。

1.4.5 骨髓间充质干细胞定向诱导及与支架复合 分别取第3代人和兔骨髓间充质干细胞制备细胞悬液, 加入软骨定向诱导液(含转化生长因子 $\beta 1$ 、骨形态发生蛋白1), 并滴加到聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架上, 每3 d或4 d换液1次, 连续诱导21 d。干细胞与支架复合后大体情况见图1。

1.4.6 动物模型建立及实验分组 取剩余30只新西兰大白兔, 利用戊巴比妥进行腹腔麻醉, 于颈前正中作切口, 分离皮下组织及肌层, 暴露甲状软骨, 并于左侧做全层软骨缺损, 大小为 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$, 注意避免穿透喉黏膜。将动物随机分为3组, 每组10只, 分别为人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组以及空白对照组。

1.4.7 分组干预 空白对照组植入生理盐水浸湿的聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 人骨髓间充质干细胞修复组植入人骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 兔骨髓间充质干细胞修复组植入兔骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 术后进行常规青霉素注射治疗以抗感染。

1.4.8 标本获取与免疫组化检测 术后4周和8周, 分别处死各组5只动物, 即刻获得喉部及其周围组织标本并进行切片, 利用免疫组化法检测II型胶原表达。

1.5 主要观察指标 ①人、兔骨髓间充质干细胞的形态及鉴定。②免疫组化法检测喉部及其周围组织II型胶原的表达。

1.6 统计学分析 利用统计学软件SPSS 19.0进行分析, 实验指标参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 建模的30只动物均进入结果分析, 未出现死亡或者脱落。

2.2 人骨髓间充质干细胞培养结果 经分离培养, 人骨髓间充质干细胞为大圆形, 单核, 呈现出均一的形态。培养24 h之后, 出现部分细胞贴壁, 少量细胞呈短梭形; 培养48-72 h之后, 贴壁细胞数量显著增加, 且大多呈短梭形和圆形。传代培养至第3代, 细胞增殖速度显著加快, 呈长梭形, 几乎全部贴壁, 并呈漩涡状盘旋排列(图2)。经流式细胞术鉴定, 细胞表面标记物CD34、CD45呈阴性表达, 分别为 $(1.8 \pm 0.2)\%$, $(0.8 \pm 0.1)\%$, CD44呈阳性表达, 为 $(94.7 \pm 0.5)\%$, 见图3。

2.3 兔骨髓间充质干细胞培养结果 原代培养8-10 h之后, 可以观察到部分体积较大的单核细胞开始贴壁生长。培养48 h之后, 细胞呈多角形或者圆形, 细胞大小、形态不一。培养4 d之后, 大多数细胞均呈现出梭形, 数量显著增加(图4)。培养11 d之后, 可观察到细胞呈现出集落状生长; 培养至第3代, 细胞生长融合发生滞后现象, 呈均一、长梭形, 集落样分布, 部分发生重叠生长。

第3代兔骨髓间充质干细胞均一性达到90%以上。经流式细胞术鉴定, 细胞表面可以稳定表达CD29、CD105、CD166, 分别为 $(71.4 \pm 3.3)\%$, $(49.3 \pm 2.1)\%$, $(88.7 \pm 2.7)\%$, 提示所获得的细胞为实验所需的骨髓间充质干细胞。

2.4 大体观察 各组动物均呼吸通畅、正常, 未出现喘鸣等, 进食和活动情况良好, 术后伤口均一期愈合, 未出现化脓或者感染现象。人骨髓间充质干细胞修复组与兔骨髓间充质干细胞修复组植入的工程化软骨无移位及排斥反应, 与正常软骨对合良好, 空白对照组未形成软骨组织。

2.5 II型胶原表达 人骨髓间充质干细胞修复组(图5A)和兔骨髓间充质干细胞修复组(图5B) II型胶原免疫细胞化学染色阳性, 可见棕黄色颗粒分布于细胞质内, 而空白对照组未着色(图5C)。术后4周和8周, 人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组的II型胶原阳性率均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组间比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 各组术后4, 8周喉部及其周围组织II型胶原阳性率($\bar{x} \pm s$, $n=5$, %)

Table 1 The positive rate of type II collagen in the larynx and its surrounding tissues at 4 and 8 weeks after surgery

组别	实验4周	实验8周
人骨髓间充质干细胞修复组	36.28±0.85 ^a	83.15±3.74 ^a
兔骨髓间充质干细胞修复组	36.51±0.75 ^a	85.23±3.85 ^a
空白对照组	5.02±0.62	5.45±0.69

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

临床各种常规方法治疗喉软骨缺损大多无法获得理想的效果。随着组织工程学及相关技术的发展和应, 为关节软骨修复提供了新思路^[6]。在体外一定条件下, 骨髓间充质干细胞可以诱导分化为成各种细胞, 包括神经元细胞、软骨细胞、骨细胞以及心肌细胞和脂肪细胞等^[7]。Schagemann等^[8]通过研究指出, 成人软骨缺乏自我修复能力, 用组织工程软骨治疗可以获得良好的效果。Iwai等^[9]也通过构建巨细胞病毒即刻早期增强细胞启动子组合, 获得人骨髓间充质干细胞的高表达载体。结果发现, 转染载体的骨髓间充质干细胞显示出较高的细胞因子转基因生产能力, 具有较高的向软骨细胞分化能力。与其他类型种子细胞比较, 骨髓间充质干细胞具有十分明显的应用优势。首先, 取材十分方便, 且经过一定的体外扩增即可获得大量的骨髓间充质干细胞^[10-11]; 其次, 骨髓间充质干细胞具有良好的黏附性, 可以与多种支架材料发生良好的相互黏附; 另外, 骨髓间充质干细胞还具有免疫学特征, 不表达一定的共刺激

分子, 可以避免免疫排斥反应的出现^[12-15]。

目前对骨髓间充质干细胞进行鉴定的时候, 大多需要结合其形态学观察以及各种细胞表型表达等^[16-24]。本实验分离培养人骨髓间充质干细胞和兔骨髓间充质干细胞, 细胞均一性较好, 符合骨髓间充质干细胞表型特性。将不同来源骨髓间充质干细胞分别与聚乳酸-羟基乙酸支架进行复合, 构建组织工程软骨用于修复喉软骨缺损。聚乳酸与聚羟基乙酸共聚物支架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^[25-27]。软骨组织工程的研究已有很大进展, 但既往大多集中在组织工程化软骨组织的构建上, 实验在成功构建出同种异体组织工程化软骨的基础上, 尝试用工程化软骨修复甲状软骨缺损。经大体观察发现, 人骨髓间充质干细胞修复组与兔骨髓间充质干细胞修复组术区无感染、瘢痕及坏死迹象, 植入的工程化软骨无移位及排斥, 与周围正常软骨对合良好, 空白对照组未形成软骨组织。术后4周和8周, 人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组II型胶原阳性率均显著高于空白对照组。人骨髓间充质干细胞修复组和兔骨髓间充质干细胞修复组间比较, 差异无显著性意义。上述结果表明, 利用同种异体和异种来源的骨髓间充质干细胞诱导成软骨后进行兔喉软骨缺损修复, 均可以获得良好的效果, 且二者在修复效果方面基本相当。

作者贡献: 第一作者负责设计和实施, 第二作者负责实施及文章的修改。

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: ①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。②健康志愿者签署知情同意书, 自愿捐献骨髓。

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。



图1 干细胞与支架复合后大体图片
Figure 1 The general observation of stem cells and scaffolds

图注: 左为人骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 右为兔骨髓间充质干细胞复合聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架。

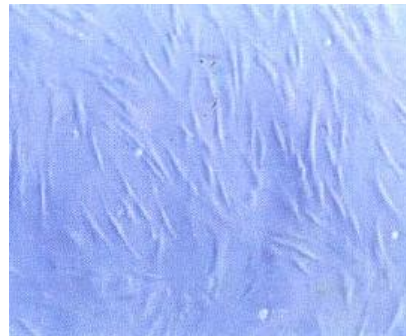


图2 第3代人骨髓间充质干细胞形态(相差显微镜, $\times 100$)

Figure 2 Human bone marrow mesenchymal stem cells at passage 3 were observed by phase contrast microscopy ($\times 100$)

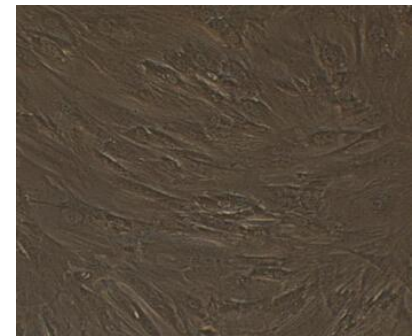


图4 兔骨髓间充质干细胞形态($\times 100$)

Figure 4 Morphology of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 100$)
图注: 培养 4 d 之后, 大多数细胞均呈现出梭形。

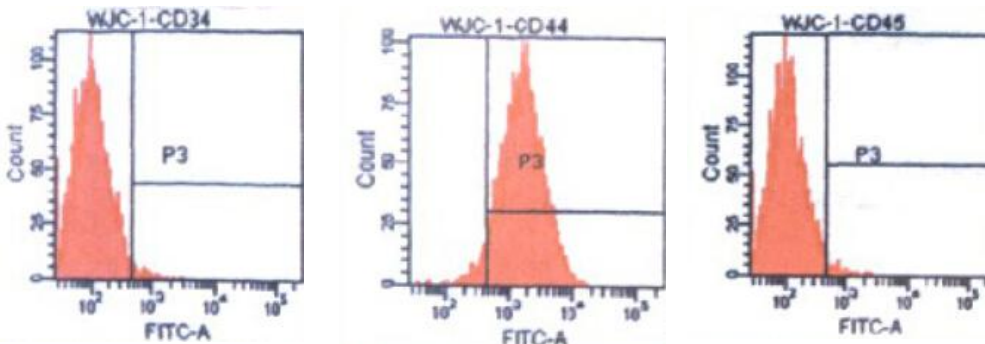


图3 人骨髓间充质干细胞表面标记物流式细胞仪检测结果

Figure 3 Surface markers of human bone marrow mesenchymal stem cells detected by flow cytometry



图5 各组 II 型胶原免疫组化染色结果($\times 200$)

Figure 5 Immunohistochemical staining of type II collagen in each group ($\times 200$)

图注: 人骨髓间充质干细胞修复组(A)和兔骨髓间充质干细胞修复组(B)可见棕黄色颗粒分布于细胞质内, 空白对照组(C)未着色。

4 参考文献 References

- [1] Tian HT, Yang SH, Xu L, et al. Chondrogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells induced by cartilage-derived morphogenetic protein-2 in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007;27(4): 429-432.
- [2] 石正松, 李强, 蔡伟良, 等. 腺病毒介导hBMP-2转染BMSCs复合DBM修复兔缺血性股骨头坏死的实验研究[J]. *天津医药*, 2015, 43(10): 1128-1132.
- [3] 蔡峰, 韦继南, 谢鑫芸, 等. 基质细胞衍生因子-1/趋化因子受体4信号轴调控骨髓间充质干细胞在退变椎间盘中迁移[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(4): 843-846.
- [4] 管大凡, 刘洪美, 张聪, 等. 骨形态发生蛋白2/血管内皮生长因子165转染骨髓间充质干细胞复合多孔纳米羟基磷灰石/聚酰胺66修复兔桡骨缺损[J]. *中华创伤杂志*, 2015, 31(4): 353-359.
- [5] 崔颖, 王月田, 姚梅, 等. 以转染CDMP1基因的BMSCs修复软骨缺损[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(4): 450-457.
- [6] 崔颖, 马林祥, 朱丽明, 等. CDMP和TGF联合诱导BMSCs修复软骨缺损[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(2): 155-160.
- [7] 徐斌, 周亮, 王英明, 等. 同种异体脱钙骨与骨髓间充质干细胞关节腔内共培养: 与同腔软骨性状的对比[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(8): 1165-1171.
- [8] Schagemann JC, Paul S, Casper ME, et al. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly- ϵ -caprolactone scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(6):1620-1628.
- [9] Iwai R, Kumagai Y, Fujiwara M, et al. Combination of cytomegalovirus enhancer with human cellular promoters for gene-induced chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2010;110(5): 593-596.

- [10] 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.
- [11] 蔺文魁,马敬.骨髓间充质干细胞分离扩增与诱导分化的研究进展[J].临床军医杂志,2014,42(3):291-295.
- [12] Zhu S, Zhang B, Man C, et al. Combined effects of connective tissue growth factor-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells and NaOH-treated PLGA scaffolds on the repair of articular cartilage defect in rabbits. *Cell Transplant*. 2014;23(6): 715-727.
- [13] Fu WL, Zhou CY, Yu JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 2014;42(3):592-601.
- [14] Qi BW, Yu AX, Zhu SB, et al. Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel combined with Ad-hTGF- β 1 transfected mesenchymal stem cells to repair rabbit articular cartilage defects. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(1):23-30.
- [15] 孙安科,李万同,孟庆延,等.带蒂肌筋膜瓣充填与包裹构建喉支架形态组织工程软骨[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011,46(12):1019-1023.
- [16] 崔颖,王宏,徐天睿,等.人胚胎关节软骨来源的间充质干细胞[J].北京大学学报:医学版,2004,36(3):281-286.
- [17] 庞永刚,崔鹏程,陈文弦,等.人骨髓间质干细胞作为骨、软骨组织工程种子细胞的实验研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(3):306-309.
- [18] Sato Y, Wakitani S, Takagi M. Xeno-free and shrinkage-free preparation of scaffold-free cartilage-like disc-shaped cell sheet using human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Biosci Bioeng*. 2013;116(6):734-739.
- [19] Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, et al. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2012;30(4): 634-642.
- [20] 赵可庆,翟立杰,王志强,等.基因芯片筛选骨髓间充质干细胞与透明软骨细胞的差异表达基因[J].大连医科大学学报,2008,30(5):405-409.
- [21] 崔翔,侯瑞霞,李群,等.壳聚糖在喉软骨组织工程中的应用[J].组织工程与重建外科杂志,2015,11(3):208-212.
- [22] Mimura T, Imai S, Okumura N, et al. Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells recruited using collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011; 98(2):360-368.
- [23] Truong MD, Chung JY, Kim YJ, et al. Histomorphochemical comparison of microfracture as a first-line and a salvage procedure: is microfracture still a viable option for knee cartilage repair in a salvage situation. *J Orthop Res*. 2014;32(6):802-810.
- [24] Wang W, Li B, Li Y, et al. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials*. 2010;31(23):5953-5965.
- [25] Cao L, Yang F, Liu G, et al. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2011;32(16):3910-3920.
- [26] Wang W, Li B, Li Y, et al. In vivo restoration of full-thickness cartilage defects by poly(lactide-co-glycolide) sponges filled with fibrin gel, bone marrow mesenchymal stem cells and DNA complexes. *Biomaterials*. 2010;31(23):5953-5965.
- [27] 陆达锴,沈志森,侯瑞霞,等.喉软骨支架结构与构建的研究进展[J].北京生物医学工程,2014,33(2):191-196.