

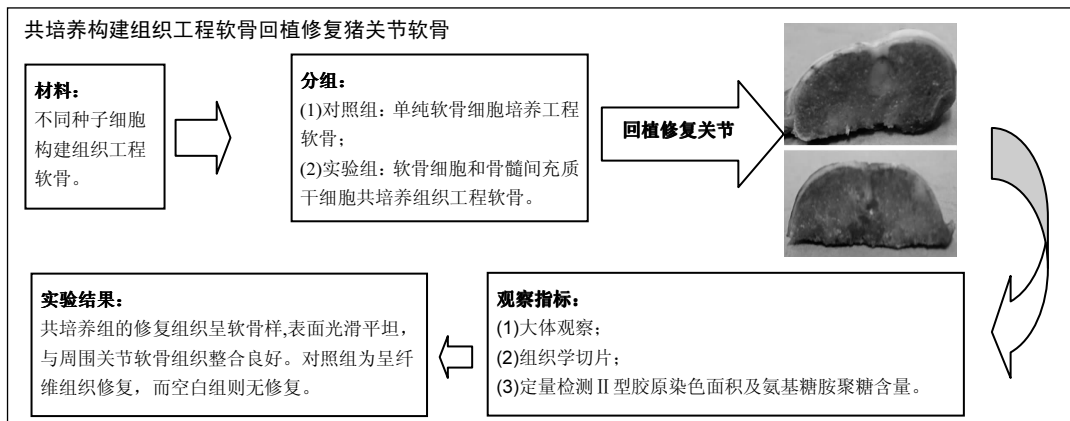
# 软骨细胞及骨髓间充质干细胞共培养修复关节软骨缺损

陈刚, 钱明权, 杜炜(南京医科大学附属无锡第二医院骨科, 江苏省无锡市 214002)

引用本文: 陈刚, 钱明权, 杜炜. 软骨细胞及骨髓间充质干细胞共培养修复关节软骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(32):5122-5127.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.32.007 ORCID: 0000-0003-1560-052X(陈刚)

文章快速阅读:



陈刚, 男, 1984 年生, 江苏省淮安市人, 汉族, 2010 年南京医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事关节外科方向的研究。

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344  
(2017)32-05122-06  
稿件接受: 2017-06-25

## 文题释义:

**软骨细胞:** 位于软骨陷窝内。幼稚的软骨细胞位于软骨组织的表层, 单个分布, 体积较小, 呈椭圆形, 长轴与软骨表面平行, 越向深层的软骨细胞体积之间增大呈圆形, 细胞核圆形或卵圆形, 染色浅, 细胞质弱嗜碱性, 常见数量不一的脂滴。成熟的软骨细胞多 2-8 个成群分布于软骨陷窝内, 这些软骨细胞由同一个母细胞分裂增殖而成, 称为同源细胞群。电镜下, 软骨细胞有突起和皱褶, 细胞质内有大量的粗面内质网和发达的高尔基复合体及少量的线粒体。在组织切片中, 软骨细胞收缩为不规则形, 在软骨囊和细胞之间出现较大的腔隙。

**骨髓间充质干细胞:** 骨髓原始间充质干细胞是骨髓基质干细胞, 对骨髓中的造血干细胞不仅有机械支持作用, 还能分泌多种生长因子(如白细胞介素 6、白细胞介素 11、白血病抑制因子、巨噬细胞集落刺激因子及干细胞因子等)来支持造血。用于骨髓间充质干细胞分离的方法主要有贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪法和免疫磁珠法。由于骨髓间充质干细胞取材方便, 来源充足, 增殖能力强, 且具有多向分化潜能, 可经多种细胞因子诱导成软骨细胞。

## 摘要

**背景:** 关节软骨损伤多由创伤及骨关节炎引起, 其治疗是临床研究的难点和热点。组织工程技术的发展为修复关节软骨缺损提供了新方法, 但软骨细胞来源不足一直是一个难题。

**目的:** 探讨软骨细胞及骨髓间充质干细胞共培养修复关节软骨缺损的可行性, 评价修复效果。

**方法:** 体外培养扩增猪骨髓间充质干细胞及关节软骨细胞, 共培养 2 代, 接种于聚乳酸-聚羟基乙酸聚合物上继续共培养 2 周, 构建共培养组织工程软骨(共培养组); 以单纯软骨细胞构建组织工程软骨为对照组, 回植修复关节软骨缺损; 空白组软骨缺损不作处理。半年后行大体观察及组织学观察, 定量检测 II 型胶原染色面积及氨基糖胺聚糖含量。

**结果与结论:** ①共培养组的修复组织呈软骨样, 表面光滑平坦, 与周围关节软骨组织整合良好; 对照组呈纤维组织修复; 而空白组则无修复; ②组织学观察显示, 共培养组结构致密, 细胞外基质分布更均匀, 与周围关节软骨组织及软骨下骨组织整合良好; ③共培养组的 II 型胶原染色面积及糖胺聚糖含量均优于对照组及空白组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ④综上, 软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养构建组织工程软骨能有效修复关节软骨缺损。

## 关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 共培养; 软骨细胞; 骨髓间充质干细胞; 关节软骨缺损

## 主题词:

软骨细胞; 间质干细胞; 软骨; 关节; 组织工程

## 基金资助:

南京医科大学科技发展基金项目(2013NJMU182)

## Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells for articular cartilage repair

Chen Gang, Qian Ming-quan, Du Wei (Department of Orthopedics, Wuxi Second Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China)

Chen Gang, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Wuxi Second Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Articular cartilage damage caused by traumatic articular cartilage defects and osteoarthritis is a common clinical disorder, and its treatment is an issue of concern. Tissue engineering provides a new method for articular cartilage repair. But insufficient cartilage cell source is always a thorny issue.

**OBJECTIVE:** To explore the feasibility of repairing articular cartilage defects with tissue-engineered cartilage constructed by co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and evaluate the curative efficacy.

**METHODS:** Chondrocytes and BMSCs were isolated from swine articular cartilages, expanded *in vitro*, mixed after the first passage, and then co-cultured for another passage. The mixed cells were seeded onto a polyglycolic acid/poly(lactic acid) scaffold and, followed by 2 weeks co-culture, then sutured into osteochondral complex. The co-culture tissue-engineered cartilage was transplanted into the defect region. The tissue-engineered cartilage constructed with single chondrocytes served as control group. Those received no intervention as blank control group. Six months later, the gross observation and histological staining were performed, as well as the dying area of collagen type II and level of glucosamine polysaccharide were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the co-culture group, the tissues were chondroid with smooth and glossy surface, and well connected with the surrounding tissues. The control group presented with fiber-like tissues, while the blank control group showed no changes. The distribution of cartilaginous extracellular matrix in the co-culture group was more homogenous than the others, and there was a good connection between newly born tissues and the surrounding tissues as well as subchondral bone. Furthermore, the dying area of collagen type II and level of glucosamine polysaccharide in the co-culture group were significantly higher than those in the other groups ( $P < 0.05$ ). To conclude, the co-culture of chondrocytes and BMSCs can improve the quality of tissue-engineered cartilage, which effectively contributes to the repair of articular cartilage.

**Subject headings:** Chondrocytes; Mesenchymal Stem Cells; Cartilage, Articular; Tissue Engineering

**Funding:** the Science and Technology Development Fund of Nanjing Medical University, No. 2013NJMU182

**Cite this article:** Chen G, Qian MQ, Du W. Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells for the repair of articular cartilage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(32):5122-5127.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎及创伤引起的关节软骨损伤是临床常见病多发病, 其治疗是临床研究的难点和热点。细胞生物学技术的进步和生物材料的革新, 促进了组织工程技术的发展, 为修复关节软骨缺损的提供了新方法<sup>[1-3]</sup>。然而, 软骨细胞来源不足一直是一个难题, 是组织工程软骨临床推广应用的一个瓶颈。骨髓间充质干细胞来源广泛, 增殖力强, 取材创伤小, 具有多向分化潜能, 是构建工程软骨常用的种子细胞。但骨髓间充质干细胞需多种细胞因子诱导分化, 培养成本高, 且随着骨髓间充质干细胞传代次数的增加, 其成软骨能力明显降低<sup>[4-7]</sup>, 故采用骨髓间充质干细胞作为种子细胞很难构建较大的工程软骨。作者前期将软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养, 成功在体外构建出高质量的组织工程软骨<sup>[8]</sup>。文章将软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养构建的组织工程软骨回植体内, 修复关节软骨缺损, 旨在探讨软骨细胞及骨髓间充质干细胞共培养修复关节软骨缺损的可行性, 评价修复效果。

## 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 于2014年1月至2015年6月在南京医科大学附属无锡第二医院转化医学中心进行细胞实验及动物实验。

1.3 材料

1.3.1 动物 小型猪, 1月龄, 雌雄各半, 泰州小型猪培育基地提供。

1.3.2 试剂与仪器 DMEM/F12培养基(Gibco公司, 美国), 胰蛋白酶(Gibco公司, 美国), 胎牛血清(杭州四季清公司), Percoll分离液(Sigma公司, 美国), II型胶原酶(Gibco公司, 美国), 六孔细胞培养板(Corning公司, 美国), 25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup>培养瓶(Corning公司, 美国), 10 cm细胞培养皿(Corning公司, 美国), 15 mL/50 mL离心管(Corning公司, 美国), 多聚赖氨酸(Sigma公司, 美国), 聚乳酸聚羟基乙酸聚合物无纺网支架(上海易括公司), 细胞培养箱(德国Hereus BB5060型), 倒置显微镜及照相系统(Olympus公司, 日本), YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂), DAB试剂盒(南京伯德生物试剂公司), II型胶原单克隆抗体(MAB1330, Calbiochem公司, 美国), 二硫苏糖醇 (Sigma公司, 美国), 1, 9-二甲基亚甲蓝(Sigma公司, 美国), 硫酸软骨素(Sigma公司, 美国), 碘乙酸(Sigma公司, 美国)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 18头1月龄小型猪分别编号, 按随机数字表法分入各组。空白组: 软骨缺损不作处理; 对照组: 单纯软骨细胞培养工程软骨; 共培养组: 软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养组织工程软骨。

1.4.2 猪关节软骨细胞的分离与扩增 对照组及共培养组小型猪, 手术切取膝关节非负重区关节软骨, 用PBS洗涤后剪成约1 mm<sup>3</sup>大小, 0.25%胰酶37 °C消化30 min后, 弃上清, 加入0.2% II型胶原酶37 °C消化4 h, 过滤, 滤液1 000 r/min离心5 min, 收集细胞。锥虫蓝拒染法细胞活性记数 $\geq 95\%$ , 原代细胞以 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶内培养。待细胞90%融合后传代, 至第2代末备用。

1.4.3 猪骨髓间充质干细胞的分离与扩增 无菌条件下于猪股骨下端骨穿, 抽取骨髓2 mL, 用不含血清的DMEM/F12培养基制成单细胞悬液, 小心加入预先有相对密度为1.108 3的Percoll分离液的离心管内, 离心, 吸取中间界面乳白色的单个核细胞层, 洗涤后加完全培养基(含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12)重悬, 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶内培养。每3 d换液1次。倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞铺满瓶底的90%时传代, 至第2代末备用。

1.4.4 软骨细胞的鉴定 第1代软骨细胞接种于玻璃盖玻片上3 d后, II型胶原免疫组织化学染色发现, 软骨细胞细胞质颜色棕黄, 较深, 说明软骨细胞有较高的II型胶原表达, 未有去分化现象出现, 符合实验要求(图1)。

1.4.5 骨髓间充质干细胞的鉴定 流式细胞仪检测第1代骨髓间充质干细胞, 90.07%的细胞表达CD29, 83.86%的细胞表达CD44, 仅有2.82%的细胞表达CD34。说明骨髓间充质干细胞纯度较高, 符合实验要求(图2)。

1.4.6 软骨细胞及骨髓间充质干细胞共培养 收获第2代软骨细胞和骨髓间充质干细胞, 按2:1混合, 细胞总数为1×10<sup>6</sup>吹匀接种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶培养至90%融合备用。

1.4.7 支架处理 将聚乳酸聚羟基乙酸聚合物支架剪成直径4 mm大小, 浸泡无菌10%多聚赖氨酸, 无菌环境下晾干, 环氧乙烷消毒后备用。

1.4.8 组织工程软骨的构建 收获共培养细胞和软骨细胞, 调整细胞浓度至4×10<sup>10</sup> L<sup>-1</sup>, 取24个备用支架, 置于六孔培养板内(每孔1个), 每个支架缓慢滴加40 μL细胞悬液(勿使悬液溢出支架外), 待细胞悬液渗入支架内, 将支架移入37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱静置4 h。每孔加2 mL培养液, 1 d后加足量培养液, 隔日换液, 培养2周(图3)。

1.4.9 动物实验 各组小型猪, 以氯胺酮肌注, 戊巴比妥钠静脉维持麻醉。常规消毒一侧膝关节, 取膝关节前正中切口切开皮肤皮下组织及深筋膜, 外翻髌骨, 暴露股骨髁。以4 mm环锯于股骨髁负重面钻孔做软骨缺损模型(图4A)。空白组关闭伤口。对照组植入相应编号的组织工程软骨(图4B), 共培养组植入相应编号的共培养组织工程软骨(图4C), 均用4-0可吸收缝线固定于周围软骨, 常规闭合伤口。半年后处死, 取材检测。

## 1.5 主要观察指标

1.5.1 大体标本观察 取组各实验膝关节, 大体观察缺损处修复情况, 包括修复组织的色泽、形态、组织弹性、表面光滑度。切面观察修复处组织的形态, 与周围组织的结合情况。

1.5.2 组织学观察 各组标本用40 g/L多聚甲醛固定, 每个标本取9张切片分别用苏木精-伊红染色, II型胶原免疫组织化学染色(SP法DAB显色)镜下观察。应用Image-pro plus 6.0图像分析系统对II型胶原免疫组织化学染色切片行II型胶原染色面积半定量分析。

1.5.3 糖胺聚糖含量检测 每个样本加1 mL消化液(含

1 mmol/L EDTA, 300 mg/L木瓜蛋白酶, 2 mmol/L二硫苏糖醇)匀浆, 65 °C消化1 h后加消化终止液(含50 mmol/L Tris/HCL, 20 mmol/L碘乙酸)至5 mL终止消化待测。吸取样品100 μL加2.5 mL显色剂(含3.04 g/L甘氨酸, 16 mg/L 1, 9二甲基亚甲蓝, 2.37 g/L NaCL)混匀, 反应15 s, 于525 nm波长处比色, 测定吸光度。以硫酸软骨素为标准品, 绘制标准曲线。计算糖胺聚糖含量(比色法)。

1.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0软件对实验结果进行处理, 各组之间比较采用单因素方差分析, 各组之间两两比较采用 $q$ 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 18头小型猪36个膝关节分别编号, 随机分入3组, 均进入结果分析, 无脱失。

2.2 大体标本观察 空白组仍可见较明显缺损, 且缺损周围软骨损伤不规则扩大(图5A)。对照组缺损处见纤维组织修复, 表面欠光滑, 光泽及弹性较差, 修复组织与周围组织整合不良(图5B)。共培养组缺损处可见软骨样组织修复, 表面平坦光滑, 有光泽, 有弹性, 修复组织与周围软骨整合良好(图5C)。

### 2.3 组织学观察

2.3.1 苏木精-伊红染色组织学观察 空白组修复组织内软骨细胞分布散乱, 少量细胞外基质, 无软骨陷窝(图6A); 对照组修复组织内较多软骨细胞, 较多细胞外基质, 少量软骨陷窝(图6B); 共培养组修复组织内大量软骨细胞, 分布均匀, 排列紧密, 细胞外基质融合成片, 可见软骨陷窝, 和周围组织整合紧密(图6C)。

2.3.2 II型胶原免疫组化染色观察 各组II型胶原免疫组化均有阳性染色。空白组阳性染色面积最小, 颜色最浅且分布散乱(图7A); 对照组阳性染色面积较空白组大, 颜色稍深(图7B); 共培养组阳性染色面积最大, 颜色最深, 分布均匀(图7C)。应用Image-pro plus 6.0图像分析系统对各组染色面积进行半定量分析(表1)。方差分析显示各组染色面积之间差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 各组两两比较 $q$ 检验显示: 空白组<对照组<共培养组。

2.4 糖胺聚糖含量结果比较 各组糖胺聚糖含量见表1, 方差分析显示各组之间差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 各组两两比较 $q$ 检验显示: 空白组<对照组<共培养组。

表1 各组II型胶原染色面积百分比和糖胺聚糖含量比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Table 1 Comparison of the dying area of collagen type II and level of glucosamine polysaccharide among groups

项目	空白组	对照组	共培养组	F值	P值
II型胶原染色面积百分比(%)	67.17±3.05	78.12±4.49	91.25±2.38	39.041	< 0.05
糖胺聚糖含量(mg/g)	9.63±0.69	13.14±0.66	18.23±0.19	3.050	< 0.05

表注: 各组两两比较, 空白组<对照组<共培养组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

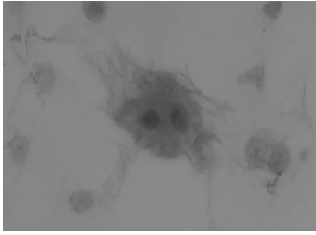


图1 软骨细胞II型胶原免疫组化染色(x400)  
Figure 1 Chondrocytes stained with immunohistochemistry of collagen type II (x400)  
图注: 细胞周围呈棕黄色。

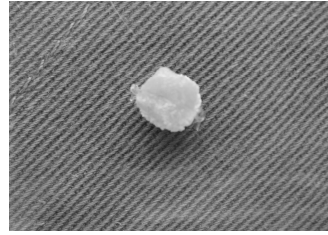


图3 组织工程软骨通过缝合固定于磷酸三钙  
Figure 3 Tissue-engineered cartilage fixed with tricalcium phosphate

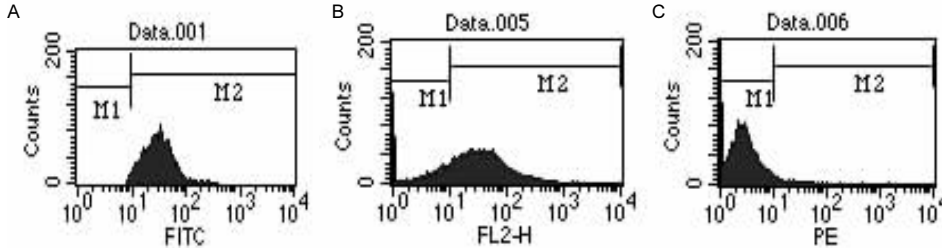


图2 骨髓间充质干细胞的流式鉴定  
Figure 2 Identification of bone marrow mesenchymal stem cells with flow cytometry  
图注: 图A示 CD29 阳性率 90.07%, B 示 CD44 阳性率 83.86%, C 示 CD34 阳性率 2.82%。

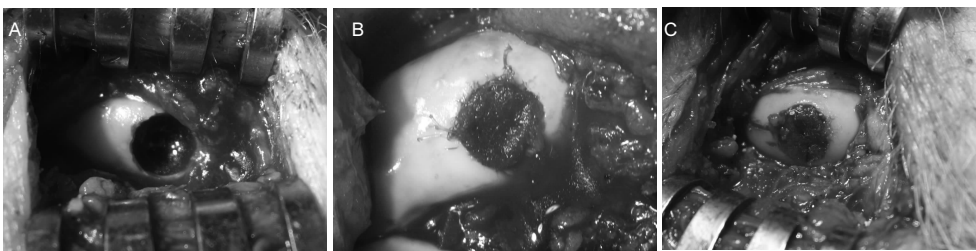


图4 组织工程软骨修复猪关节软骨缺损  
Figure 4 Swine articular cartilage defect repaired with the tissue-engineered cartilage

图注: 图A为空白组的关节软骨缺损模型; B为对照组在图A的基础上植入组织工程软骨; C为共培养组在图A的基础上植入共培养组织工程软骨。



图5 修复组织大体观察  
Figure 5 Gross appearance of the repaired cartilage

图注: 图A示空白组仍可见明显缺损; B示对照组呈纤维组织修复, 与周围组织整合不良; C示共培养组大体呈软骨样组织修复, 与周围软骨整合良好。

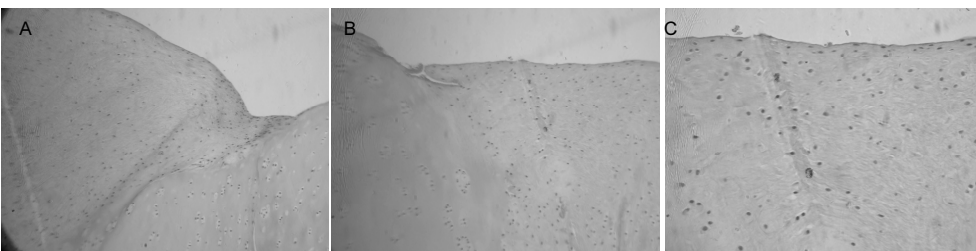


图6 修复组织苏木精-伊红染色(x100)  
Figure 6 Hematoxylin-eosin staining of the repaired cartilage (x100)

图注: 图A示空白组修复组织内软骨细胞分布散乱, 无软骨陷窝; B示对照组修复组织内较多软骨细胞, 少量软骨陷窝; C示共培养组修复组织内大量软骨细胞, 可见软骨陷窝, 和周围组织整合紧密。

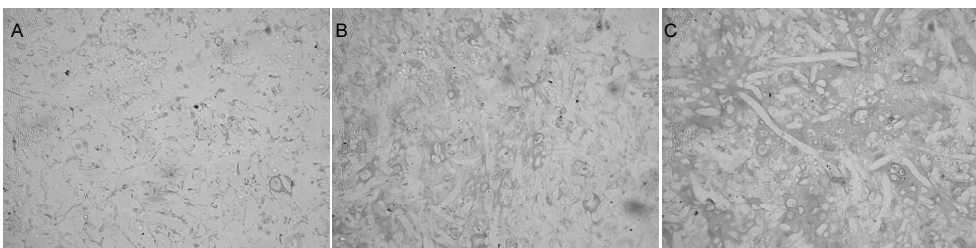


图7 组织工程软骨的II型胶原免疫组化染色(x100)  
Figure 7 The tissue-engineered cartilage stained immunohistochemically with collagen type II (x100)

图注: 图A示空白组阳性染色面积最小, 颜色最浅且分布散乱; B示对照组阳性染色面积较空白组大, 颜色稍深; C示共培养组阳性染色面积最大, 颜色最深, 分布均匀。

### 3 讨论 Discussion

种子细胞来源不足是制约软组织工程临床应用的重要因素, 其选择及体外培养扩增是软组织工程领域的一个研究热点。取自体软骨细胞, 分离培养扩增, 体外构建组织工程软骨, 回植修复关节软骨缺损, 已取得了较好的临床效果<sup>[9-12]</sup>。诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化, 也能够构建较高质量的组织工程软骨<sup>[13-15]</sup>。但关节软骨细胞来源有限, 体外长时间培养易致细胞老化失活<sup>[16-17]</sup>。而经骨髓间充质干细胞诱导分化生成的软骨细胞表型易丢失, 软骨质量欠佳<sup>[18-19]</sup>。故单独以软骨细胞或骨髓间充质干细胞构建工程软骨都存在一定的局限性。

鉴于单独采用软骨细胞或骨髓间充质干细胞构建工程软骨都存在一定的局限性, 那么软骨细胞和骨髓间充质干细胞共培养能否扬长避短<sup>[20-22]</sup>, 构建出更高质量的工程软骨? Chen等<sup>[23]</sup>将人软骨细胞与骨髓间充质干细胞以半透膜间隔, 进行非接触共培养, 1周后检测发现共培养组的骨髓间充质干细胞的aggrecan和II型胶原表达增加, 故他们认为在共培养体系中软骨细胞能诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化。Tsuchiya等<sup>[24]</sup>将牛软骨细胞和人骨髓间充质干细胞共培养, 发现共培养组生长明显优于单纯软骨细胞组, 且牛来源的II型胶原表达增加, 故他们认为骨髓间充质干细胞能够促进软骨细胞增殖和细胞外基质的合成。在作者前期的研究中, 将兔骨髓间充质干细胞与兔关节软骨细胞在体外共培养1代, 接种于聚乳酸-羟基乙酸共聚物支架, 构建组织工程软骨。作者发现共培养构建的工程软骨体积大, 光滑, 有弹性, 组织学观察显示细胞增殖旺盛, 分布均匀, 排列紧密, 较多细胞外基质融合成片, 有软骨陷窝形成; II型胶原染色面积、糖胺聚糖含量等均高于单纯软骨细胞培养组, 同时发现兔软骨细胞与兔骨髓间充质干细胞按2:1的比例共培养时, 效果最佳<sup>[8]</sup>。

目前在体外已经能够构建出高质量的组织工程软骨, 那么将工程软骨移植入体内修复关节软骨缺损效果如何呢<sup>[25-26]</sup>? Komárek等<sup>[27]</sup>将组织工程软骨以纤维蛋白凝胶固定于软骨下骨, 修复关节软骨缺损, 92.3%获得了满意效果, 但该方法固定较差, 易造成工程软骨的移位、丢失和塌陷。Knecht等<sup>[28]</sup>比较了软骨缝合、纤维蛋白凝胶、穿骨缝合工程软骨的生物力学性能, 发现穿骨缝合固定工程软骨生物力学性能最好, 而纤维蛋白凝胶固定性能最差。但穿骨固定的工程软骨和周围组织的融合仍然较差。那么, 如何才能实现组织工程软骨更加牢固的固定, 更快的愈合, 同时于周围组织更好的融合? 杨强等<sup>[29]</sup>将犬股骨头负重区骨柱脱细胞处理制备骨支架, 利用软骨细胞外基质制备软骨支架, 采用相分离技术制备骨-软骨双层支架。将成软骨诱导的骨髓间充质干细胞接种于双层支架, 构建骨软骨复合体, 修复犬股骨头负重区软骨缺损, 结果发现软骨缺损效果不佳。作者前期体外分离培养扩增猪成骨细胞及关节软骨细胞, 分别接种于磷酸三钙和聚乳酸聚羟基乙酸聚合

物上培养2周, 通过缝合组成自体骨软骨复合体, 并将该复合体嵌入缺损区, 修复关节软骨缺损。以组织工程软骨缝合固定为对照。半年后取材检测。作者发现骨软骨复合体组的大体观察及组织学评分等方面均优于对照组<sup>[30]</sup>。作者的实验不同于杨强等<sup>[29]</sup>以骨髓间充质干细胞作为种子细胞, 而是采用成骨细胞和软骨细胞作为种子细胞, 具有良好的软骨及骨的表型, 通过缝合方式构成骨软骨复合体, 能够实现工程软骨较好的固定, 以利与周围组织融合, 从而达到良好的修复效果。因此作者认为, 体外高质量的组织工程软骨, 结合体内良好的固定技术, 才能较好的修复关节软骨缺损。

在本次研究中, 体外培养扩增猪关节软骨细胞及骨髓间充质干细胞, 共培养2代, 接种于聚乳酸聚羟基乙酸聚合物上继续共培养2周构建共培养组织工程软骨。以单纯软骨细胞构建组织工程软骨为对照, 通过缝合固定于磷酸三钙形成骨软骨复合体, 回植修复关节软骨缺损。半年后行大体观察, 组织学切片, II型胶原免疫组化染色, 定量检测II型胶原染色面积及氨基糖聚糖含量。结果发现, 共培养组的修复组织呈软骨样, 表面光滑平坦, 与周围关节软骨组织整合良好。组织学观察显示其结构致密, 细胞外基质分布更均匀, 与周围关节软骨组织及软骨下骨组织整合良好。II型胶原染色面积及糖胺聚糖含量均优于对照组及空白组。作者认为, 软骨细胞和骨髓间充质干细胞体外共培养构建了高质量的组织工程软骨, 通过缝合于磷酸三钙构成骨软骨复合体, 实现了体内环境下的良好固定, 从而较好的修复了关节软骨缺损。

综上所述, 以软骨细胞和骨髓间充质干细胞作为种子细胞, 体外扩增后, 共培养构建高质量组织工程软骨, 通过缝合的方式组成骨软骨复合体移植, 可实现良好固定, 愈合较快, 组织工程软骨与宿主关节软骨间整合好, 能有效修复关节软骨缺损。

**致谢:** 感谢无锡市第二人民医院杜炜主任对课题的全程指导; 感谢施克勤主任的全程关心和支持; 感谢钱明权、潘霆、戴腾对课题的帮助; 感谢南京医科大学的资助。

**作者贡献:** 第一作者进行实验设计, 全部作者共同实施, 实验评估为第一作者, 资料收集为第二、三作者, 第一作者成文、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:** 实验方案经南京医科大学附属无锡第二医院动物实验伦理委员会批准。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)。

**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:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 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。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 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。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”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] Komárek J, Vališ P, Repko M, et al. Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation: long-term results. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2010;77(4): 291-295.
- [2] Duarte Campos DF, Drescher W, Rath B, et al. Supporting Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Cartilage.* 2012; 3(3): 205-221.
- [3] Mazar M, Lespessailles E, Coursier R, et al. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J Cell Mol Med.* 2014;18(12): 2340-2350.
- [4] Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, et al. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(5):503-509.
- [5] Chen S, Fu P, Cong R, et al. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis.* 2015;2(1): 76-95.
- [6] Li H, Sun S, Liu H, et al. Use of a biological reactor and platelet-rich plasma for the construction of tissue-engineered bone to repair articular cartilage defects. *Exp Ther Med.* 2016;12(2): 711-719.
- [7] Kopesky PW, Byun S, Vanderploeg EJ, et al. Sustained delivery of bioactive TGF- $\beta$ 1 from self-assembling peptide hydrogels induces chondrogenesis of encapsulated bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(5): 1275-1285.
- [8] 陈刚, 崔维顶, 范卫民. 软骨细胞和骨髓间充质干细胞混合培养构建组织工程软骨的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(7): 684-690.
- [9] Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, et al. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg(Br).* 2002;84:571-578.
- [10] Liu Y, Chen F, Liu W, et al. Repairing large poreine full-thickness defects of artilage using autologous chondrocyte engineered cartilage. *Tissue Eng.* 2002;8(4): 709-721.
- [11] Zhao M, Chen Z, Liu K, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits through tissue-engineered cartilage constructed with chitosan hydrogel and chondrocytes. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015;16(11): 914-923.
- [12] Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* 2012;347(3): 613-627.
- [13] Lv YM, Yu QS. Repair of articular osteochondral defects of the knee joint using a composite lamellar scaffold. *Bone Joint Res.* 2015; 4(4):56-64.
- [14] Ma X, Sun Y, Cheng X, et al. Repair of osteochondral defects by mosaicplasty and allogeneic BMSCs transplantation. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4): 6053-6059.
- [15] Yamasaki S, Mera H, Itokazu M, et al. Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies. *Cartilage.* 2014;5(4):196-202.
- [16] Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, et al. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Joint Surg (Br).* 2004;86(5):286-295.
- [17] Brittberg M, Gomoll AH, Canseco JA, et al. Cartilage repair in the degenerative ageing knee. *Acta Orthop.* 2016;87(sup363): 26-38.
- [18] Fujie H, Nakamura N. Frictional properties of articular cartilage-like tissues repaired with a mesenchymal stem cell-based tissueengineered construct. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013:401-404.
- [19] 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.
- [20] He X, Feng B, Huang C, et al. Electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membranes combined with a coculture of bone marrow stromal cells and chondrocytes for cartilage engineering. *Int J Nanomedicine.* 2015;17(10):2089-2099.
- [21] Zhang L, He A, Yin Z, et al. Regeneration of human-ear-shaped cartilage by co-culturing human microtia chondrocytes with BMSCs. *Biomaterials.* 2014;35(18): 4878-4887.
- [22] Kang N, Liu X, Guan Y, et al. Effects of co-culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage. *Biomaterials.* 2012;33(18):4535-4544.
- [23] Chen WH, Lai MT, Wu AT, et al. In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2009;60(2):450-459.
- [24] Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, et al. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Materials Sci Eng.* 2004;(24): 391-396.
- [25] Ko CY, Ku KL, Yang SR, et al. In vitro and in vivo co-culture of chondrocytes and bone marrow stem cells in photocrosslinked PCL-PEG-PCL hydrogels enhances cartilage formation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10): E485-E496.
- [26] Liu X, Sun H, Yan D, et al. In vivo ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials.* 2010;31(36):9406-9414.
- [27] Komárek J, Vališ P, Repko M, et al. Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation: long-term results. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2010;77(4): 291-295.
- [28] Knecht S, Erggelet C, Endres M, et al. Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue-engineered grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 83(1): 50-57.
- [29] 杨强, 彭江, 卢世璧, 等. 组织工程骨-软骨复合体修复犬股骨头负重区大面积骨软骨缺损的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(5): 549-555.
- [30] 陈刚, 钱明权, 朱国兴. 自体组织工程骨软骨复合体修复猪关节软骨缺损[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(3):593-595.