

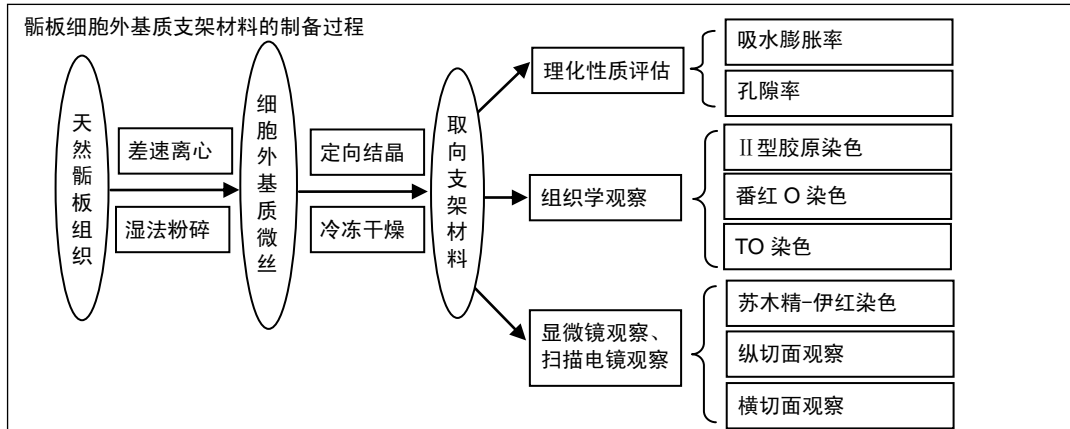
骺板细胞外基质源性仿生支架的制备及性能评估

李文超, 许瑞江, 黄靖香, 李浩宇, 蔡刚, 陈辉(解放军总医院小儿外科, 北京市 100853)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0782

ORCID: 0000-0002-0308-070X(李文超)

文章快速阅读:



李文超, 男, 1984年生, 河北省保定市人, 汉族, 博士, 主治医师, 主要从事儿童骺板损伤的临床及实验研究。

通讯作者: 李文超, 解放军总医院小儿外科, 北京市 100853

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-02-27



文题释义:

骺板组织的结构及生物学功能: 骺板是儿童骨骺和干骺端之间具有纵向生长能力的软骨组织, 组织学呈现柱状及分层机构。依据骺板细胞特有的形态变化和生物学功能将其分为: 静止区、增殖区、肥大区和钙化区。静止区中的前软骨干细胞, 通过增殖分化并逐渐分泌细胞外基质, 之后在多种因素共同作用下调节钙盐沉积形成钙盐晶体, 形成促进肢体生长的生物学功能。

组织工程化骺板软骨支架材料: 支架材料是种子细胞基本的生存环境和代谢场所, 其组织结构和功能变化直接影响着组织工程骺板的生理功能。组织工程化骺板支架材料主要集中在天然支架、人工合成支架及两者的复合物, 包括藻酸盐、胶原、聚乙醇酸、聚乳酸、透明质烷、聚壳糖、胶原-氨基葡萄糖聚合物、聚乳酸-透明质烷聚合物、透明质烷-壳聚糖复合水凝胶、脱钙骨基质及骺板细胞外基质等。良好的细胞基质材料能够提高组织工程骺板软骨的修复效果。

摘要

背景: 骺板细胞外基质具有丰富的胶原、蛋白多糖及信号分子, 其成分和特征最接近天然骺板组织, 是构建组织工程骺板的最理想原料之一。

目的: 采用骺板细胞外基质构建取向柱状仿生支架材料, 并对其性能进行评估。

方法: 取胎牛膝关节标本, 采用超湿法粉碎、差速离心及有机溶剂分离等技术联合处理获得细胞外基质微丝, 利用定向结晶、冷冻干燥技术及物理/化学交联方法制备出骺板细胞外基质源性仿生柱状支架材料, 扫描电镜观察支架的内部结构及孔径, 检测支架的孔隙率及吸水膨胀率, 同时对支架进行组织学观察。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色显示, 细胞外基质微丝呈纤维状, 形状规则, 均匀一致; 甲苯胺蓝、番红O及II型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 说明保留了天然骺板细胞外基质的有效成分; ②显微镜显示支架横截面呈多孔蜂窝状结构, 孔径均匀一致, 形状规则, 纵切面显示平行排列的柱状结构, 均匀一致, 孔径分布均匀, 相互连通好, 支架外壁纤维呈纵向取向排列, 类似于天然骺板软骨的柱状分布结构。扫描电镜显示支架横切面呈多孔蜂窝状, 均匀分布, 形状规则, 支架的横向孔径为 $(117.5 \pm 15.37) \mu\text{m}$ 。支架孔隙率为 $(92.05 \pm 1.54)\%$, 吸水膨胀率为 $(95.95 \pm 1.07)\%$; ③结果表明, 骺板细胞外基质源性仿生柱状组织工程支架材料在成分来源和结构特征方面均达到了模仿天然骺板软骨的特点。

关键词:

细胞外基质; 骺板细胞; 生物材料; 软骨生物材料; 组织工程; 国家自然科学基金

主题词:

软骨; 细胞外基质; 生长面; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81702169); 解放军总医院苗圃基金(17KMM12); 解放军总医院扶持基金(2017FC-TSYS-2043, 2017FC-TSYS-3015)

Preparation and performance evaluation of a biomimetic scaffold derived from the extracellular matrix of a native growth plate

Li Wen-chao, Xu Rui-jiang, Huang Jing-xiang, Li Hao-yu, Cai Gang, Chen Hui (Department of Pediatric Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract

BACKGROUND: The extracellular matrix from the growth plate contains abundant sources of collagens,

Li Wen-chao, M.D., Attending physician, Department of Pediatric Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Li Wen-chao, Department of Pediatric Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

proteoglycan and signaling molecules. These components and characteristic are very similar to the natural growth plate tissue, and therefore, it is an ideal material to construct tissue-engineered growth plate.

OBJECTIVE: To prepare the columnar biomimetic scaffold using native growth plate extracellular matrix and to evaluate the scaffold performance.

METHODS: The knee joint of fetal bovine was separated and purified by pulverization technology in moist environment, differential centrifugation and organic solvent to obtain extracellular matrix microfilaments. Then the extracellular matrix microfilaments were treated by directed crystallization technology, freeze drying and physicochemistry crosslinking method in order to prepare the extracellular matrix biomimetic scaffold. The scaffold was evaluated by scanning electron microscope for internal structure and pore size, porosity and swelling rate of water absorption as well as by histological observation.

RESULTS AND CONCLUSION: The extracellular matrix microfilaments were fibriform with the even and regular shape shown by hematoxylin-eosin staining, and were also positive for toluidine blue, Sarranine O and collagen II staining, indicating the existence of active components of the growth plate in the scaffold. (2) The scaffold under the scanning electron microscope showed porous honeycomb structure on the transverse section plane with uniform pore size and regular shape, while there was a parallel arrangement of columnar structure on the longitudinal section plane of the scaffold with well-distributed and mutual communication, and scaffold fibers on the outer wall were longitudinally arranged, which imitated the columnar structure from the native growth plate. The pore diameter of scaffold was $(117.5 \pm 15.37) \mu\text{m}$, the porosity was $(92.05 \pm 1.54)\%$ and the water absorption was $(95.95 \pm 1.07)\%$. To conclude, the columnar scaffold from the extracellular matrix of the growth plate imitates the native growth plate in terms of components and structures.

Subject headings: Cartilage; Extracellular Matrix; Growth Plate; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81702169; PLA General Hospital Nursery Foundation, No. 17KMM12; PLA General Hospital Support Foundation, No. 2017FC-TSYS-2043, 2017FC-TSYS-3015

0 引言 Introduction

骺板损伤是儿童特有损伤形式,其损伤后出现的骨桥组织,导致肢体发育不平衡,引起患儿肢体短缩或/及成角畸形。目前,临床上主要采用切除骨桥,填充脂肪、肌肉、骨水泥或骨蜡等方法治疗骺板损伤^[1-5]。随着组织工程技术的飞速发展,组织工程化骺板组织被广泛应用于骺板损伤的实验研究^[6-9],其中,填充材料的选择及研制成为学者们的研究方向。前期实验主要采用胶原、生物凝胶、琼脂糖、藻酸盐及脱钙骨基质等材料构建组织工程骺板支架;并且前期研究工作将骺板组织进行湿法粉碎,获得天然软骨细胞外基质材料,在生化组成上类似于骺板细胞外基质,利用冷冻干燥技术制备出三维多孔海绵样结构支架,用于修复骺板损伤,虽然可在一定程度上矫正肢体畸形,但是组织学显示新生的骺板细胞呈簇状聚集排列,无法重建天然骺板组织的柱状分层结构,影响新生组织工程骺板组织的生物学功能。此次实验拟采用骺板细胞外基质构建取向柱状生物仿生支架材料并对其进行性能评估,为下一步构建组织工程骺板软骨垫底实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014至2015年在解放军总医院骨科研究所完成。

1.3 材料 胎牛骺板软骨由解放军总医院实验动物中心提供,实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[10];脱氧核糖核酸酶、核糖核酸酶、含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟的Tris-HCL(Sigma公司,美国)。

实验用主要仪器: THZ-95型台式恒温振荡培养箱(北京四环科学仪器厂); MS260型电子天平(上海电子天平一厂); 85-2恒温磁力搅拌器(常州国华仪器公司); Allegra X-22R 型离心机、BeckmanAllegra X-22R低温离心机(美国Beckman公司); S-530扫描电子显微镜(日本日立公司); FD-1冷冻干燥机(北京博医康技术公司);家用九阳粉碎机JYL-350A型(山

东九阳股份有限公司); Bi-link紫外线交联仪(北京博威兴业科技发展有限公司); LKB8800型超薄组织切片机(瑞典LKB公司); Sanyo -80 °C深低温冰箱(日本SANYO公司); BH-2型OLYMPUS生物显微镜(日本OLYMPUS公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨外基质微丝悬液的制备 将无菌条件下保存的胎牛膝关节标本置于无菌操作台上,碘伏消毒标本,铺无菌巾单,去除周围软组织,暴露胫骨近端及股骨远端骺板组织,用手术刀片分部分提取骺板软骨,不含任何骨组织。用生理盐水将骺板软骨反复冲洗以去除杂质,在无菌操作台中将其剪碎成 1 mm^3 大小,加入含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(0.35 mmol/L)的Tris-HCl($\text{pH}=7.4$)缓冲液,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行超湿法粉碎。充分稀释后进行差速离心,收集上清,加入1% Triton X -100持续振荡24 h,去垢及去除残余细胞成分,用脱氧核糖核酸酶 $5 \times 10^4 \text{ U/L}$ 及核糖核酸酶 $1 \times 10^3 \text{ U/L}$ 混合液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下进行消化,以去除核酸。将剩余浆料进行差速离心处理,收集骺板细胞外基质微丝,置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

1.4.2 骺板细胞外基质源性仿生柱状支架的制备过程 将骺板细胞外基质微丝置于无菌容器中,充分搅拌均匀,离心去除气泡。将悬液注入聚乙烯圆柱状的支架模具中,垂直放置在 $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的金属板上预冻30 min。待完全冻结后,将支架模具转移到冷冻干燥机中升华干燥,冰相在真空下($<13.33 \text{ Pa}$)升华24 h。室温下平衡后,将支架从模具中取出,在距离光源5-10 cm、波长258 nm紫外线交联4-8 h,并在EDAC与NHS无水乙醇溶液中(浓度为:EDAC 50 mmol/L; NHS 20 mmol/L)交联24 h。然后采用 $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4(\text{pH}=9.1)$ 洗2 h,无菌PBS中浸泡2 h,三蒸水漂洗。⁶⁰Co密封后消毒, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。

1.5 主要观察指标

扫描电镜观察: 取支架材料的横切面和纵切面,以2.5%戊二醛溶液固定2 h, PBS漂洗后,浸入2%饿酸水溶液中固定2 h,梯度乙醇脱水,临界点干燥,喷金,扫描电镜观察支架的内部孔结构及孔径。用UTHSCSA ImageTool 3.0软件处理扫描电镜图像和光镜图像计算得

出, 共计算100个孔的孔径大小, 取平均值。

支架孔径测定: 用UTHSCSA ImageTool 3.0软件处理扫描电镜图像和光镜图像计算得出, 共计算100个孔的孔径大小, 取平均值。

骺板细胞外基质源性仿生柱状支架的孔隙率测定: 选用一带刻度的试管装入无水乙醇, 得初始乙醇体积 V_1 , 将支架浸入其中5 min, 接负压吸引脱气, 使乙醇充盈于多孔支架的孔中, 无气泡逸出, 得乙醇体积(支架浸没在其中) V_2 。取出浸满乙醇的支架后读数, 得乙醇体积 V_3 , 按公式计算支架的孔隙率 E , $E=(V_1-V_3)/(V_2-V_3)$, 每个样本测试5次, 取平均值。

骺板细胞外基质源性仿生柱状支架的吸水膨胀率测定: 将组织支架材料浸于去离子水中室温下放置10 min取出, 悬挂在桌面上1 min中, 至没有水滴滴落, 称质量 m , 然后将支架在50 °C的真空干燥箱内干燥12 h, 取出后称质量 m_0 。吸水率 $X=(m-m_0)/m$, 每个样本测5次, 取平均值。

骺板细胞外基质源性仿生柱状支架的组织学观察: 把骺板细胞外基质源性生物仿生柱状支架进行冰冻切片, 乙醇固定10 min, 进行苏木精-伊红染色、番红花O、甲苯胺蓝及II型胶原免疫组织化学染色, 光镜下观察。

2 结果 Results

2.1 骺板软骨细胞及细胞外基质浆料微丝的形态学及组织学观察 骺板软骨呈半透明状, 形状呈波浪状, 凹凸不平, 质地适中, 厚度0.5-1.0 mm, 不含软组织及骨组织等杂质(图1A, B)。苏木精-伊红染色显示天然骺板组织中可见明显的软骨陷窝(图1C), 甲苯胺蓝免疫组织化学染色呈阳性(图1D)。经过超湿法粉碎获得乳白色、黏稠的细胞外基质浆液, 组织学观察可见骺板细胞外基质呈粗细混乱、杂乱排列的纤维状, 分布欠规则并可见大量细胞碎片(图1E)。将基质浆料进行低速离心处理后, 细胞外基质微丝形态粗细趋于一致性, 呈纤维状分布, 仍有残留部分小的细胞碎片(图1F)。

差速离心后的细胞外基质微丝浆料呈乳白色、黏稠状, 苏木精-伊红染色显示细胞外基质微丝呈纤维状, 形状规则, 均匀一致; 番红O、甲苯胺蓝及II型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 说明基质浆料中含有糖胺聚糖成分及II型胶原(图2A, B)。Hochest 33258染色显示, 湿法粉碎的浆料内有大量细胞碎片存留(图2C), 经过差速离心及核酶消化后的浆料中基质微丝形态规则, 分布均匀, 未见细胞核物质残留(图2D)。

2.2 生物仿生柱状支架的形态学观察及显微镜观察 实验采用圆柱状支架材料, 直径6 mm, 长约3 cm, 处理后消毒备用(图3A, B)。支架形状规则, 呈乳白色, 质地较硬, 支架的横断面呈多孔状, 分布均匀一致; 纵向断面可见平行排列的柱状结构。

显微镜下观察显示支架横截面呈多孔蜂窝状结构, 孔径均匀一致, 形状规则(图3C); 纵切面显示平行排列的柱状结构, 均匀一致, 孔径分布均匀, 相互连通好, 支架外

壁纤维呈纵向取向排列(图3D), 类似于天然骺板软骨的柱状分布结构。

扫描电镜观察显示横切面显示多孔呈蜂窝状, 均匀分布, 形状规则(图3E, F), 扫描电镜下进行孔径的测量, 支架的横向孔径为(117.5±15.37) μm; 纵切面显示支架表面纵向排列的柱状结构, 均匀一致, 分布规整。

2.3 生物仿生柱状支架的理化特性检测 骺板细胞外基质源性生物仿生柱状支架的孔隙率为(92.05±1.54)%, 吸水膨胀率为(95.95±1.07)%。

3 讨论 Discussion

近年来, 生物医学及实验科学的飞速发展极大地促进了组织工程技术的实验及临床应用。众多学者对组织工程的研表现出前所未有的关注和热情, 尤其是组织工程软骨方面。骺板损伤是儿童骨折中的常见病例, 可引起儿童肢体的生长障碍, 组织工程骺板软骨的实验研究在治疗骺板损伤方面起着重要作用, 支架材料作为组织工程的关键因素, 模拟种子细胞生长及增殖的微环境, 利于细胞吸附、增殖及发挥生物学功能^[11-12]。因此, 此次研究在总结前期研究的基础上, 试图以骺板细胞外基质作为支架来源, 模拟天然骺板组织的柱状结构, 构建一种生物仿生组织工程骺板软骨支架材料。

脱细胞组织基质技术的基本原理是通过物理、化学等各种技术去除组织中的细胞、可溶性蛋白、核酸等具有免疫原性的物质, 同时保留细胞外基质的主要成分, 以获得天然的无免疫原性且具有生物学功能的组织工程支架材料^[13]。目前, 脱细胞的生物支架在再生医学和组织工程中得到了广泛应用, 其中血管、皮肤、神经、骨骼肌、肌腱等多种组织都经过脱细胞处理得到细胞外基质源性支架材料^[14-18]。本课题在总结前期脱细胞技术的基础上, 采用超湿法粉碎、差速离心技术获得无免疫原性的骺板细胞外基质微丝, 作为构建细胞外基质源性生物仿生柱状支架的材料来源。超湿法粉碎技术是指在超湿、低渗条件下将骺板软骨进行粉碎处理获得含有骺板细胞外基质碎片的组织浆料。动力粉碎过程对骺板组织产生强大的剪切力及摩擦作用, 破坏骺板软骨的组织结构, 获得含有细胞外基质及细胞碎片的浆料悬液。潮湿条件能够降低粉碎过程的作用温度, 避免粉碎过程中产生的高热条件破坏细胞外基质的有效成分而影响支架材料的生物学功能。此外, 浆料中加入DNA酶和RNA酶对细胞核内的核酸产生水解作用, 加入去污剂破坏脂蛋白和细胞膜以去除细胞外基质浆料中的免疫原性物质。应用非离子型去污剂Triton-100能够对骺板软骨产生相对柔和的脱细胞处理效果。还利用蛋白酶抑制剂降低细胞裂解过程中的蛋白水解酶及粉碎过程中其他因素对骺板细胞外基质中蛋白成分产生的水解作用, 最大程度上保留细胞外基质的有效成分^[19-20]。此次实验中经过粉碎过的浆料悬液, 苏木精-伊红染色显示浆料中含有大量细胞碎片及细胞外基质微丝成分; 甲苯胺蓝染色、番红O染色及II型胶原免疫组织化学阳性, 说明浆料中含有糖胺聚糖和II型胶原等细胞外基质成分。

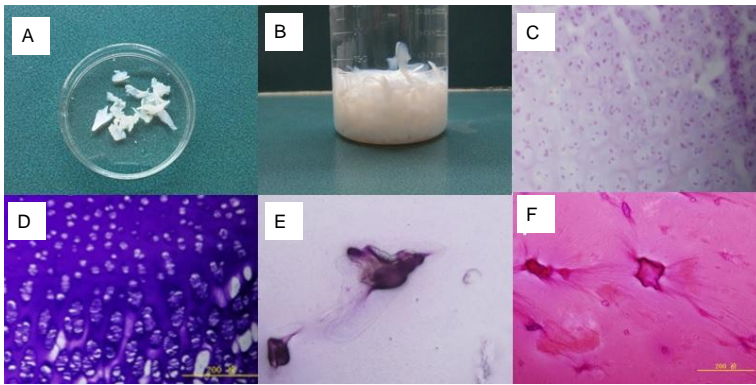


图1 骺板细胞外基质分离提取情况

Figure 1 The extracellular matrix extracted from the native growth plate

图注: 图中 A、B 为分离获得的天然骺板软骨组织; C、D 分别为天然骺板组织苏木精-伊红染色及甲苯胺蓝染色, 显示软骨陷窝及细胞外基质($\times 100$); E 为超湿法粉碎获得的骺板细胞外基质(苏木精-伊红染色, $\times 100$), 显示粗细混乱及杂乱排列的细胞外基质微丝, 以及大量细胞碎片; F 为差速离心后的骺板细胞外基质(番红 O 染色, $\times 100$), 细胞外基质微丝趋于一致, 呈纤维状, 伴有少量细胞碎片。

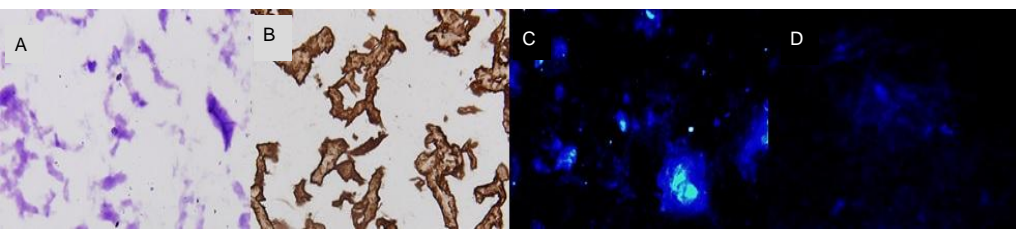


图2 纯化的细胞外基质微丝及 Hoechst 33258 染色情况

Figure 2 Purification and Hoechst 33258 staining of extracellular matrix microfilaments from the native growth plate

图注: 图中 A 为差速离心后的骺板细胞外基质甲苯胺蓝染色($\times 200$), 呈阳性, 说明细胞外基质微丝后含有糖胺聚糖成分; B 为差速离心后的骺板细胞外基质 II 型胶原免疫组织化学染色($\times 200$), 呈阳性, 说明细胞外基质微丝中含有 II 型胶原成分; C 为差速离心前的骺板细胞外基质 Hoechst 33258 染色, 含有大量细胞碎片($\times 100$); D 为差速离心后的骺板细胞外基质 Hoechst 33258 染色($\times 200$), 无细胞碎片及杂质, 得到纯化的细胞外基质微丝。

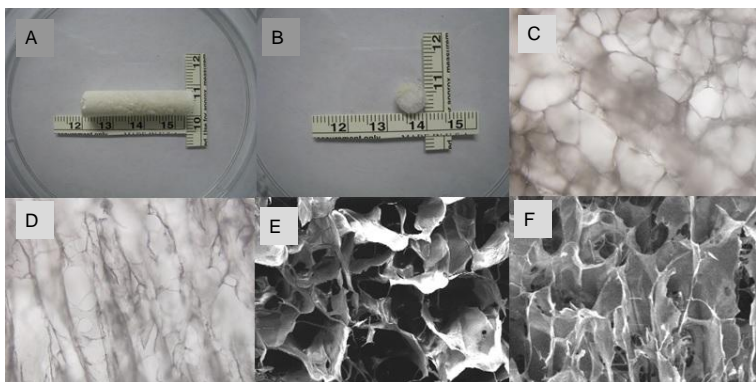


图3 骺板细胞外基质源性支架材料的观察及电镜表现

Figure 3 Performance and scanning electron microscope observation of the biomimetic scaffold derived from the native growth plate extracellular matrix

图注: 图中 A、B 为支架的大体结构; C 为显微镜观察支架横截面($\times 100$), 呈多孔蜂窝状结构, 孔径均匀一致, 形状规则; D 为显微镜观察支架纵切面($\times 100$), 显示平行排列的柱状结构, 均匀一致, 孔径分布均匀, 相互连通好, 支架外壁纤维呈纵向取向排列; E、F 为扫描电镜观察支架横切面($\times 200$), 显示多孔呈蜂窝状, 均匀分布, 形状规则。

差速离心技术是指根据实验需要采用逐渐增加离心速度或低速和高速交替进行离心处理, 使具有不同沉降速度的颗粒在不同的离心速度和离心时间作用下分批分离的纯化方法^[21-22]。实验采用差速离心的方法可有效去除浆料中残留的细胞碎片, 获得纳米尺度的骺板细胞外基质微丝。实验中可见经过差速离心后, 细胞外基质浆料中含有大量形态规则、均匀一致的基质微丝, 不含有任何细胞碎片^[23-24]。甲苯胺蓝、番红 O 染色及 II 型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 说明浆料中含有糖胺聚糖和 II 型胶原等细胞外基质成分, 与天然骺板细胞外基质相似。进一步验证了超湿法粉碎技术、差速离心技术能够较大程度上保留骺板细胞外基质的有效成分, 为制备生物仿生柱状组织工程骺板支架材料创造了的实验基础。

骺板组织因其特殊的细胞形态及生物学功能, 在结构分布上呈现典型的柱状结构, 包括静止区、增殖区、肥大区和钙化区^[25-26]。静止区含有大量呈休眠状态的前软骨干细胞, 细胞体积相对较小, 其细胞外基质与细胞体积之间

的比例成份较高, 对骺板柱状结构的形成、肢体的纵向生长起着重要作用^[27]。骺板细胞典型的柱状结构是其发挥生物学功能的重要基础。前期的组织工程骺板支架多呈现无序的、随机排列的三维多孔结构, 虽然三维多孔结构在促进种子细胞黏附、分布及营养物质渗透方面起着重要作用, 但因其不符合骺板组织的纵向分布特点, 致使体内重建的骺板细胞呈无序堆积状态, 不具有柱状结构, 致使无法完全发挥促进肢体生长的生物学功能, 无法实现真正意义上的功能性骺板组织修复。

此次研究采用定向结晶及冷冻干燥技术构建具有典型柱状结构的组织工程骺板支架材料, 类似于天然骺板组织的柱状排列结构, 能够引导种子细胞及其周围的细胞外基质沿着柱状结构分布, 在干骺端及骨骺之间的特有微环境作用下, 诱导新生骺板细胞按照不同生物学功能进行垂直分布排列。柱状支架结构使种子细胞呈纵向分布, 能够保护种子细胞及新生组织免于外界应力的影响。均匀一致的支架孔道结构具有良好的连通性, 利于营养物质、代谢产物在支架与外

界之间的交换。显微镜及扫描电镜观察显示, 支架横截面呈分布均匀、形状规则的孔状结构, 类似蜂窝状外观; 纵切片呈分布均匀、平行排列的柱状结构, 在结构上模拟了骺板组织的柱状结构, 利于种子细胞沿着孔状结构纵向生长, 使柱状结构下的种子细胞发挥生物学功能。支架材料的孔隙率为(92.05±1.54)%, 吸水膨胀率为(95.95±1.07)%, 符合组织工程骺板支架材料的要求。苏木精-伊红染色显示支架材料均一红色, 无细胞残留, 横切面及纵切面形状特明显; 番红O染色、甲苯胺蓝染色及II型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 表明支架的基本成分与骺板细胞外基质的基本成分相一致。

骺板细胞外基质源性仿生柱状组织工程支架材料, 在成份来源和结构特征方面均达到了模仿天然骺板软骨的特点, 为移植修复骺板损伤奠定了良好的实验基础。

实验构建骺板细胞外基质仿生支架材料, 模拟天然骺板组织的结构和功能, 其理化性质满足组织工程骺板软骨的需求。然而, 缺乏对于支架材料的生物相容性的进一步研究, 而且是否能够在骺板修复过程中恢复骺板损伤的生物学功能需要继续研究。

致谢: 感谢解放军总医院骨科研究所卢世壁院士、彭江主任对此次课题研究的支持和帮助。

作者贡献: 第一作者成文审核; 第二作者负责实验设计、实施、成文; 第三、四、五、六作者参与实验相关检测及实验审核; 第一作者、通讯作者对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81702169)”、“解放军总医院苗圃基金(17KMM12)”和“解放军总医院扶持基金(2017FC-TSYS-2043, 2017FC-TSYS-3015)”的基金资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的第一作者李文超, 于解放军总医院小儿外科工作。该作者声明在课题研究和文章撰写过程, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

伦理问题: 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: 李文超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, 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] Williamson RV, Staheli LT. Partial physeal growth arrest: treatment by bridge resection and fat interposition. *J Pediatr Orthop*. 1990;10(6):769-776.
- [2] Langenskiold A. The possibilities of eliminating premature partial closure of an epiphyseal plate caused by trauma or diseases. *Acta Orthop Scand*. 1967;38:267-279.
- [3] Martiana K, Low CK, Tan SK, et al. Comparison of various interpositional materials in the prevention of transphyseal bone bridge formation. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(325):218-224.
- [4] Lee EH, Gao GX, Bose K. Management of partial growth arrest: physis, fat, or silastic. *J Pediatr Orthop*. 1993;13(3):368-372.
- [5] Cheon JE, Kim IO, Kim CJ, et al. Imaging findings after fat graft interposition in an injured growth plate: an experimental study in rabbits. *Invest Radiol*. 2003;38(11):695-703.
- [6] Li EC, Xu RJ, Xue YL, et al. Treatment of growth plate injury with microencapsulated chondrocytes. *Biotechnol Bioproc E*. 2013;18:655-662.
- [7] Ahn JI, Erdin RA, Smith R, et al. Chondrocyte injection in distraction epiphysiolysis (rabbit model). *J Orthop Res*. 2006; 24(3):355-365.
- [8] Lee EH, Gao GX, Bose K. Experimental studies on the prevention of growth arrest in immature rabbits. *J Bone Joint Surg*. 1989;721-726.
- [9] Li W, Xu R, Huang J, et al. Treatment of rabbit growth plate injuries with oriented ECM scaffold and autologous BMSCs. *Sci Rep*. 2017;7:44140-44151.
- [10] 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.
- [11] Vaeanti CA, Langer R, Schloo B, et al. Synthetic Polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*. 1991;88(5):753-759.
- [12] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress: a review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(6):432-463.
- [13] He M, Callanan A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(3):194-208.
- [14] Chung S, Ingle NP, Montero GA, et al. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomater*. 2010;6(6):1958-1967.
- [15] Chen RN, Ho HO, Tsai YT, et al. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004;25(13):2679-2686.
- [16] Rovak JM, Mungara AK, Aydin MA, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on nerve regeneration in acellular nerve grafts. *J Reconstr Microsurg*. 2004;20(1):53-58.
- [17] Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM Jr. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113:595-602; discussion 603-604.
- [18] Cartmell JS, Dunn MG. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*. 2000; 49(1):134-140.
- [19] Gilbert TW, Sellaro TL, Badyak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27:3675-3683.
- [20] Parmaksiz M, Elçin AE, Elçin YM. Decellularization of Bovine Small Intestinal Submucosa. *Methods Mol Biol*. 2017. doi:10.1007/7651_2017_33.
- [21] Nagasaka A, Hige S, Matsushima T, et al. Differential flotation centrifugation study of hepatitis C virus and response to interferon therapy. *J Med Virol*. 1997;52(2):190-194.
- [22] Ye S, Su ZP, Zhang J, et al. Differential centrifugation in culture and differentiation of rat neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2008; 28(4):511-517.
- [23] 王玉, 彭江, 张莉, 等. 软骨细胞外基质/壳聚糖复合多孔支架和骨髓间充质干细胞构建组织工程软骨[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18(20):1715-1718.
- [24] Zhao YH, Yang Q, Xia Q, et al. In vitro cartilage production using an extracellular matrix-derived scaffold and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(16):3130-3137.
- [25] Yang Q, Peng J, Lu SB, et al. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(23):3930-3938.
- [26] Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech*. 1994;28(6):505-519.
- [27] Abad V, Meyers JL, Weise M, et al. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 2002;143(5):1851-1857.