

组织工程半月板中干细胞的研究进展

青婉怡, 王星星, 周圣梁, 付维力(四川大学华西临床医学院/华西医院, 四川省成都市 610041)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2068

ORCID: 0000-0003-1497-4204(青婉怡)

文章快速阅读:

文章描述—

- (1)对目前干细胞在组织工程半月板中的应用进行系统分类分析;
- (2)对干细胞在各种动物模型中的研究来探讨人体应用的可能性;
- (3)总结组织工程中与干细胞应用相关的支架材料、细胞因子等发展现状。

(1)干细胞拥有强增殖能力和全能性;
(2)被作为种子细胞广泛应用于组织工程半月板研究。

干细胞在组织工程半月板中的作用

各分类的干细胞研究

多来源的干细胞研究

干细胞与其他细胞共培养

组织工程支架、细胞因子、外泌体等在组织工程半月板中的研究进展

青婉怡, 女, 1998年生, 四川省南充市人, 汉族, 四川大学康复治疗学(物理治疗方向)本科在读, 主要从事运动康复研究。

通讯作者: 付维力, 博士, 副教授, 四川大学华西医院骨科, 四川省成都市 610041

文献标识码:A

投稿日期: 2019-08-24

送审日期: 2019-08-28

采用日期: 2019-10-09

在线日期: 2020-02-29



文题释义:

组织工程: 为综合运用支架材料、种子细胞和生物分子, 通过在体外人工构建组织或器官并在体内移植以改善、替代和再生损伤或患病的组织和器官。然而, 由于目前该过程产生的组织范围有限, 为了扩展其在人类的临床应用, 在该领域中还需要很多研究推进。

膝关节半月板: 是一种月牙状纤维软骨, 充填在股骨与胫骨关节间隙内, 每个膝关节有 2 个半月板: 内侧半月板与外侧半月板。它们的周围部分较厚, 附着于胫骨平台的边缘而中央部分则较薄, 其接触股骨髁的上面略凹陷而接触胫骨髁的下面则平坦, 膝关节半月板中内分无血液供应区, 其营养主要来自滑液, 只有与胫骨缘连接的边缘部分能从滑膜得到血液供应。

摘要

背景: 半月板软骨损伤是膝关节最常见的损伤之一。在过去的 10 年中, 基于干细胞的治疗方法得到了广泛的应用, 有关这一课题的研究数量迅速增加。最近的几项研究表明多潜能干细胞存在于半月板内, 有可能在半月板愈合中发挥关键作用。

目的: 确定半月板组织工程相关的干细胞来源和培养条件, 了解组织工程半月板目前发展现状。

方法: 通过 PubMed、Embase、EBSCO、Cochrane library、Clinical library 数据库进行在线文献检索, 检索时间范围为 2009 至 2019 年。纳入与半月板组织工程和种子细胞选择有关的文章, 最终对 64 篇文章进行综述。

结果与结论: 干细胞因其强增殖能力和全能性而被作为种子细胞广泛应用于组织工程半月板研究, 且能很好地修复动物半月板损伤, 目前还无法确定在临床上有同样的效果, 因此离临床应用还有一定距离。

关键词:

干细胞; 半月板修复; 再生; 组织工程; 影响因素

中图分类号: R459.9; R318; R394.2

基金资助:

国家自然科学基金(81972123, 31741046), 项目负责人: 付维力; 中央高校基本科研业务费(2015SCU04A40), 项目负责人: 付维力; 四川大学创新火花项目库(2018SCUH0034), 项目负责人: 付维力; 四川大学华西医院学科卓越发展 1.3.5 工程临床研究孵化项目(2019HXFH039), 项目负责人: 付维力; 四川省卫计委课题(18ZD017), 项目负责人: 付维力

Advances in stem cells research concerning tissue-engineered meniscus

Qing Wanyi, Wang Xingxing, Zhou Shengliang, Fu Weili (West China Medical School/West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Meniscus cartilage injury is a most common injury of knee joint. In the past decade, stem cell based therapies have been widely applied, and the related studies have been increased rapidly. Pluripotent stem cells have been shown to exist in the meniscus, which may play a key role in the healing of meniscus.

Qing Wanyi, West China Medical School/West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Corresponding author: Fu Weili, MD, Associate professor, West China Medical School/West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

OBJECTIVE: To determine the source and culture conditions of stem cells related to tissue-engineered meniscus, and to understand the current development status of tissue-engineered meniscus.

METHODS: PubMed, Embase, EBSCO, Cochrane library, and Clinical library databases were retrieved for relevant articles published between 2009 and 2019. The articles concerning tissue-engineered meniscus and selection of seed cells were selected, and finally 64 eligible articles were included for analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Stem cells have been extensively used as seed cells in tissue-engineered meniscus due to its high proliferation ability and multipotent property. These cells can effectively repair the meniscus in animals, but the clinical outcomes still remain unclear. Therefore, there is a certain distance from basic research to clinical application.

Key words: stem cells; meniscus repair; regeneration; tissue engineering; influencing factors

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81972123 and 31741046 (both to FWL); the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 2015SCU04A40 (to FWL); the Innovative Spark Project of Sichuan University, No. 2018SCUH0034 (to FWL); 1-3-5 Project for Disciplines of Excellence of West China Hospital of Sichuan University, No. 2019HXFH039 (to FWL); Research Project for Sichuan Provincial Health and Family Planning Commission, No. 18ZD017 (FWL)

0 引言 Introduction

半月板是膝关节的纤维软骨结构,它在关节软骨负荷分布、稳定性、润滑、本体感受、营养等方面均有作用^[1],具有载荷传递、关节润滑、应力膨胀等功能^[2]。半月板软骨损伤是膝关节最常见的损伤之一,半月板组织丢失易导致骨关节炎的发生。

半月板在内外区域具有不同的特征^[3],其中内侧半月板较大,外侧半月板较小。除此以外,半月板血液供应分布特殊,会影响到半月板撕裂的治疗方法选择。大量研究证明,妊娠8-10周形成的半月板血供丰富,出生时整个半月板内都有血管分布和血液供应,而出生后半月板内部很快成为无血管区。学术界对半月板血供区域分类通常沿用1982年Arnoczky分区方法,将膝关节某一截面分为红-红区、红-白区、白-白区,其中白-白区营养完全由滑液供应,病变后内源性愈合潜力较差。

与外侧半月板相比,内侧半月板损伤更为常见^[4]。成人只有半月板的外部部分保留了血液供应,可以在撕裂后愈合,大多数半月板撕裂发生在无血管的内区,不能愈合。因此,症状性半月板撕裂的标准治疗是切除组织的损伤部分(部分半月板切除术)。如果能有一种增强半月板无血管区域撕裂愈合潜能的方法,将显著减少部分半月板切除术并可能长期降低骨关节炎的发病率^[5]。目前半月板再生的治疗方法包括半月板切除术和支架植入术,都不能完全实现组织的功能再生^[6]。因此,有必要通过恢复半月板的结构和功能来修复受损的半月板^[7]。

在过去的10年中,基于干细胞的治疗方法得到了广泛的应用,关于这一课题的研究数量迅速增加。今天,干细胞治疗是再生医学的一个重要分支^[8-9]。干细胞可以有效修复损伤的半月板,它们通过细胞分裂、分化以及产生细胞因子和生长因子在修复半月板损伤方面发挥着重要作用。然而,组织工程技术的应用面临着诸多挑战,包括组织修复所用的细胞来源、合适的细胞培养方法、合适的支架和合适的生物反应器^[10-11]。目前的关键是找到一种新的干细胞,以更适合半月板的修复。

最近的几项研究表明多潜能干细胞存在于半月板内,有可能在半月板的愈合中发挥关键作用^[12]。目前,

干细胞的广泛多样性可分为3类:①来源于早期胚胎的胚胎干细胞;②诱导多能干细胞;③成体干细胞,包括造血干细胞、神经干细胞和间充质干细胞。成体干细胞保证了成体组织、器官的维持和修复,是软骨组织工程中一个可期的替代细胞来源^[13]。然而,成体干细胞的应用充满了局限性:①成人骨髓间充质干细胞的百分比相当低;②来自老年患者的干细胞在培养中增殖率相对较低;③一些并存病也可能影响干细胞的增殖能力,研究显示来源于骨关节炎患者的间充质干细胞有软骨分化减少的趋势。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)疗法是一种以细胞为基础的治疗多种疾病的新技术^[13]。到目前为止,研究人员已经探索了来自骨髓、脂肪组织、滑膜和半月板自身的间充质干细胞的使用。间充质干细胞可从大多数成人组织中获得,其多能性尤其是软骨分化特性使间充质干细胞成为细胞治疗最合适的祖细胞来源。研究报道称脂肪组织中间充质干细胞的数量是骨髓的500倍左右^[14]。因此,脂肪来源间充质干细胞是一种有望实现半月板再生的细胞来源。

目前的研究均说明了细胞修复半月板的潜力,然而还没有一种应用于临床。此综述的目的是确定临床相关的干细胞来源和培养条件,了解组织工程半月板目前发展现状^[15]。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由2位作者分别检索PubMed、Embase、EBSCO、Cochrane library、Clinical library数据库,检索时间范围:2009至2019年,检索词为((((tissue engineering) OR histological engineering) OR tissue engineered) OR regeneration)) AND (((meniscus) OR menisci) OR demilune) OR semilunar cartilages)) AND ((stem cell) OR MSCs),合并所有检索文献。

1.2 入选标准 ①与半月板组织工程有关的文章;②与种子细胞选择有关的文章;③与干细胞的应用和最新研究进展有关的文章。

1.3 资料提取与文献质量评价 共检索到2 178篇相关文

献, 研究内容由第一作者独立提取并通过所有作者讨论解决分歧, 按筛选标准排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献2 114篇, 最终对纳入的64篇文献进行综述, 其中纳入了2篇在2009年之前的文献(分别是2005年和2008年), 因其为实验性文章且内容高度相关。大部分为英文文献, 且多数为实验性论著, 部分为综述、述评文章, 见图1。

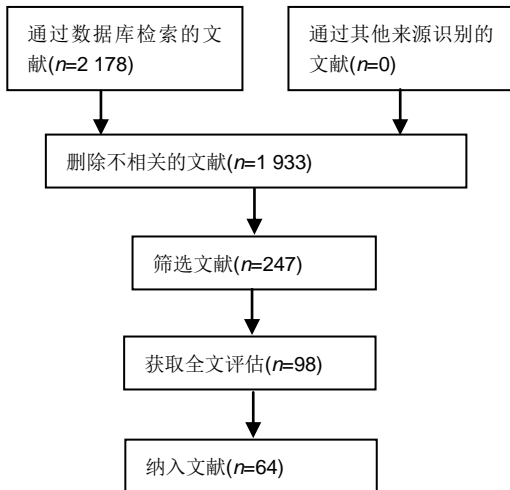


图1 文献入选流程

2 结果 Results

2.1 干细胞在组织工程半月板中的作用

在组织工程应用中, 为了寻求最合适的种子细胞, 学者们历年来研究过不同的细胞, 例如干细胞、滑膜细胞、软骨细胞、人类半月板细胞等^[16-38]。干细胞在其中是一个非常重要的角色, 可以分泌组织工程必要的细胞因子、生长因子, 且有很高的增殖能力和全能性, 这些特性让干细胞更适合构建组织工程半月板^[39]。一些实验有力地论证了干细胞能促进半月板修复^[5, 25]、诱导软骨再生^[23]。研究人员还在前期进行了一些体外实验, 证明了干细胞能在体外诱导分化为软骨细胞, 成功构建组织工程半月板^[29, 31, 33, 36]。

干细胞能分泌促进内皮生长的递质, 刺激祖细胞的自我增殖, 抑制软骨细胞凋亡以及软骨退变, 实现软骨再生和软骨保护^[40]。此外, 干细胞还可以通过分化和再生组织并产生细胞因子、生长因子, 在修复半月板损伤方面发挥重要作用^[41], 见表1。

2.2 干细胞的分类

干细胞具有多向分化的特点, 可分为胚胎干细胞和成体干细胞。成体干细胞例如骨髓间充质干细胞和脂肪来源干细胞是目前研究的热点^[42]。干细胞来源广泛^[5, 19-20, 22-23, 27], 骨髓、脂肪、胎盘、脐血、滑膜、外周血、肌腱、软骨等来源均可获得间充质干细胞^[40]。骨髓间充质干细胞、脂肪来源干细胞、滑膜间充质干细胞、外周血源间充质干细胞等都已进行了临床、动物实验。间充质干细胞具有对多种间充质组织的多谱系可塑性、潜在的免疫调节和抗炎特性。其他来源的干

细胞还包括滑膜干细胞^[18]、真皮分离的成体干细胞^[30]、脂肪来源的干细胞等^[24-25]。另外, 成人真皮分离的干细胞在软骨组织工程中应用良好, 并且能够增殖分化成为其他间充质组织细胞^[30]。

2.3 干细胞的来源

为了评估半月板维持软骨的稳定性, 并确定半月板切除后骨关节炎发生情况, 研究者制备了不同的半月板切除动物模型, 包括兔^[19-20, 24-25, 27]、猪^[28]、大鼠^[18, 37-38]、羊^[5]、牛^[22, 32]、马^[21]、狗等^[26, 29], 其中一些实验采用了灵长类动物猴及人体模型^[23, 34-35]。

JIANG等^[34]实验应用间充质干细胞负载脱细胞真皮基质修复食蟹猴膝关节软骨缺损模型, 其内侧半月板明显再生, 20-24周软骨缺损明显改善, 关节软骨退变、软骨下硬化减少, 结果证明间充质干细胞负载脱细胞真皮基质治疗非人灵长类软骨再生的可行性。这些动物模型可以近似模拟发生在人类的创伤性骨关节炎的发病机制和病理方面, 常常通过动物个体间比较或者动物自身双膝关节比较来进行实验。研究人员在做组织移植时通常选用同种异体移植或者自体移植, 由于自体组织移植没有免疫排斥反应, 成功率较高, 比异体组织移植更广泛^[43]。

马作为人类疾病的模型, 步态被认为最像人类^[44]。马站立的股胫关节角度大约是150°, 而人类站立的股胫关节角度几乎是180°。膝关节过度伸展可能导致马内侧半月板上角损伤, 类似于人类后内侧角过屈的情况。KREMER等^[21]比较研究了三维共培养马间充质干细胞和半月板细胞分别种植在3个不同支架的情况, 以期优化人类半月板组织工程的仿生学。结果显示半月板细胞和间充质干细胞共培养形成了半月板表型, 其GAG/DNA表达以及I型胶原、II型胶原和蛋白聚糖的产生与本来的半月板组织相似程度很高, 且在体外培养中拥有稳定性和可持续性。

人和动物有共性也有差别, 差别不仅体现在生理病理, 更重要的是心理上的差异。有创伤的人类通常会停止使用受影响的肢体, 而处于相同情况的动物通常不会。因此, 在动物模型中, 疾病进展通常要快得多^[41]。人体模型对于临床转化的意义更大, 在绝大多数情况下, 不能未经人体试验直接将动物实验的结果延伸到人体上。与小型动物模型相比, 大型动物模型和人体模型更接近人体状态, 因此需多进行大动物模型以填补人体试验和动物实验之间的证据, 以推进临床试验及应用。

2.4 细胞共培养

通常来说, 选择机体原有的半月板细胞作为种子细胞是一种相容性佳的方式, 然而为组织工程获得足够数量半月板细胞很困难。半月板细胞与间充质干细胞共培养可减少半月板细胞的需求量, 且能促进间充质干细胞向纤维软骨表型分化, 减少过度生长, 有利于纤维基质的形成。

表 1 纳入的 24 个实验性研究

作者	年份	细胞	来源	备注	结果	参考文献
FILARDO	2019	骨髓间充质干细胞	人	自体	利用三维生物打印技术, 实现了人体细胞胶原半月板	[16]
SHIMOMURA	2019	滑膜间充质干细胞	兔		与单独支架或未处理的对照组相比, 复合间充质干细胞的电纺纳米纤维复合支架对预防半月板挤压有显著作用, 并具有软骨保护作用	[17]
XIE	2018	滑膜干细胞和半月板细胞	鼠		相比对照组和其他比例组, 滑膜干细胞和半月板细胞在 1:3 的比例下共培养表现出更好的结果	[18]
KOCH	2018	间充质干细胞	兔		聚氨酯支架可能有促进血管生长的能力; 间充质干细胞具有加速半月板愈合的潜力	[19]
YING	2018	骨髓间充质干细胞	兔		骨髓间充质干细胞和丝素半月板多孔支架在兔半月板损伤修复中具有较好的组织相容性和结构功能可行性	[20]
KREMER	2017	间充质干细胞和半月板细胞	马		半月板细胞和间充质干细胞共培养形成了半月板表型, 其 GAG/DNA 表达以及 I 型胶原、II 型胶原和蛋白聚糖的产生与本来的半月板组织相似程度很高, 且在体外培养中拥有稳定性和可持续性	[21]
MCCORRY	2017	间充质干细胞和半月板纤维软骨细胞	牛		共培养在组织工程应用中能平衡间充质干细胞合成特性和半月板纤维软骨细胞基质重塑能力	[22]
WHITEHOUSE	2017	间充质干细胞	羊	自体	未分化的间充质干细胞可以提供一种安全的方法来促进半月板无血管区域的修复	[5]
SADLIK	2017	华通氏胶间充质干细胞(脐带间充质干细胞)	人	同种异体	脐带间充质干细胞可诱导半月板软骨再生	[23]
MORADI	2017	脂肪间充质干细胞和软骨细胞	兔		软骨细胞植入壳聚糖组 4 支架能成功再生撕裂伤半月板, 而脂肪间充质干细胞在愈合过程中无明显作用	[24]
TORATANI	2017	脂肪干细胞	兔	同种异体	三维无支架的同种异体脂肪干细胞促进了兔半月板的组织学愈合	[25]
WARNOCK	2014	滑膜细胞	狗	体外培养	滑膜细胞提前种植在猪肠黏膜下层培养具有较好的生物力学特性, 添加软骨生长因子可以改善体外轴向半月板基质的形成	[26]
ZELLNER	2013	骨髓间充质干细胞	兔	自体	骨髓间充质干细胞复合透明质酸胶原复合支架修复无血管半月板撕裂伤效果较好	[27]
MORIGUCHI	2013	滑膜间充质干细胞	猪	同种异体	由滑膜间充质干细胞形成的无支架组织工程结构有望成为一种半月板损伤修复材料, 具有预防半月板变性和创伤后关节炎发展的作用	[28]
李丹	2013	骨髓间充质干细胞	狗	体外	骨髓间充质干细胞在体外可以成功分化为异质软骨样组织并构建体外组织工程半月板	[29]
SANCHEZ-ADAMS	2012	真皮分离成体干细胞	羊		真皮分离成体干细胞可以应用于软骨组织工程	[30]
朱现玮	2012	骨髓间充质干细胞	兔	体外	骨髓间充质干细胞复合丝素蛋白/羟基磷灰石修复半月板软骨无血管区损伤是可行的	[31]
NERURKAR	2011	骨髓间充质干细胞	牛	体外	间充质干细胞结合电纺支架应用于纤维软骨组织工程中	[32]
尤微	2011	间充质干细胞	兔	体外	在碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子 $\beta 1$ 的刺激下, 间充质干细胞可分化为软骨细胞谱系	[33]
JIANG	2010	间充质干细胞	猴		间充质干细胞植入脱细胞真皮基质再生非人灵长类的动物软骨是可行的	[34]
TAN	2010	滑膜干细胞与半月板细胞	人		在小肠黏膜下层进行半月板细胞与滑膜干细胞联合培养可以在体外构建半月板	[35]
蔡贵泉	2010	骨髓间充质干细胞	猪	体外	骨髓间充质干细胞在体外诱导培养下可分泌纤维软骨细胞特征性细胞外基质, 可作为半月板组织工程种子细胞来源	[36]
YAMASAKI	2008	骨髓间充质干细胞	鼠		大鼠同种异体半月板支架和骨髓间充质干细胞移植再生半月板的有效性	[37]
YAMASAKI	2005	骨髓间充质基质细胞	鼠		由正常半月板衍生而来的支架植入骨髓间充质基质细胞后可形成近似于正常半月板结构	[38]

研究者尝试共同培养几种细胞作为组织工程的种子细胞^[18, 21-22, 24, 35], 将干细胞与半月板细胞等混合培养然后移植入动物模型。XIE等^[18]证明在1:3的比例下, 滑膜干细胞/半月板细胞共培养体系比两者单独培养或者其他比例有更好的效果。但并不是所有的联合培养都呈现更合适的结果, MORADI等^[24]的结论为单独关节软骨细胞种植在壳聚糖组4支架可以成功再生撕裂伤半月板, 而脂肪来源间充质干细胞在愈合过程中无明显用处。TAN等^[35]的实验证明了半月板细胞与滑膜干细胞在小肠黏膜下层联合培养对于半月板组织工程和再生的优势; 与滑膜干细胞共培养产生了细胞存活率更高并能

分化为软骨表型的基于半月板细胞的组织结构, 该结构表现出了较高的糖胺聚糖、II型胶原和Sox9表达, 而相对较低的I型胶原表达。MCCORRY等^[22]证实共培养可作为组织工程中平衡间充质干细胞合成特性和半月板纤维软骨细胞基质重塑能力的一种方法。

共培养的结果不一, 可能与实验设计有关, 也与不同干细胞来源和动物模型相关, 具体情况如何待进一步研究。

2.5 组织工程支架 间充质干细胞可以修复全层软骨缺损, 但不能产生足够的生物力学再生组织^[34], 因此研究者常常配合不同组织工程支架移植于动物模型体内, 如

聚氨酯支架^[19]、丝素半月板多孔支架^[20]、聚乙烯醇/壳聚糖支架^[24]、透明质酸胶原蛋白为基础的支架等^[27]，这些支架与种子细胞复合促进了半月板再生。

支架分为天然支架和人工支架两大类。天然支架主要来源于组织衍生基质的天然成分，如胶原蛋白、软骨膜组织和透明质酸。合成支架材料由聚氨酯、聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸-聚乳酸等合成高分子材料组成。多孔支架适用于组织工程，孔隙大小及其相互连通性、三维表面环境等有利于促进细胞间的接触^[45]。半月板组织可由合成的高分子支架材料或上述所有材料的混合/复合材料替代^[46-48]。然而合成材料制成的支架在高排斥、不可预测的降解或肿胀方面存在局限性。合成材料具有易获得性、易加工性、可定制支架性能和结构等特点，在未来的组织工程中会具有更广泛的用途^[45]。

目前可供临床使用的支架有胶原蛋白支架、聚氨酯支架、聚氨酯/聚己内酯支架、蚕丝支架、聚己内酯支架、聚乙烯醇支架、异体脱细胞支架，其中胶原蛋白支架是唯一被FDA批准的无细胞支架^[49]。

2.6 细胞因子和外泌体 支架材料^[47]、细胞因子等都是半月板组织工程中的重要因素。生长因子是组织/细胞培养中的信号蛋白分子。生长因子与细胞中各自的受体结合，促进细胞分化和增殖、细胞迁移和基质合成^[50-51]。不同生长因子治疗半月板均有促进细胞增殖、迁移和排列，增加胶原蛋白和蛋白聚糖的产量，促进无血管区撕裂的愈合以及血管形成的作用。转化生长因子刺激合成特定蛋白聚糖、细胞外基质和II型胶原蛋白。碱性成纤维细胞生长因子可促进半月板细胞的增殖和细胞外基质的生成^[51]。

外泌体已成为细胞间通讯的关键介质^[52]。外泌体被定义为细胞分泌的一种纳米级囊泡结构，含有核酸和蛋白质等多种具有生物活性的成分，可通过多种方式发挥调节作用，在多种类型的细胞中均发现外泌体的存在^[53]。不同细胞分泌的外泌体具有不同的组分，不同生理条件下外泌体的成分亦不相同，因而在机体的生命活动中分别发挥不同的作用，这些差别可以用来分辨其来源和特性^[52]。与基于干细胞的应用相比，在再生医学中使用无细胞疗法，如间充质干细胞来源外泌体具有明显的优势：①外泌体的应用解决了与活细胞和增殖细胞移植相关的几个安全问题，包括免疫相容性、致癌性、栓子形成和感染的传播；②可以在不使用可能有毒的冷冻保存剂的情况下长期储存，而不会降低产品的效力^[54-56]；③使用间充质干细胞来源分泌体，由于避免了侵入性细胞收集程序^[57]，因此更经济、更实用。

3 讨论 Discussion

在人们没有意识到半月板的重要生理意义时，半月板损伤通常采用半月板部分或全部切除治疗^[58]。在认识到切除半月板会增加骨关节炎发病率，且正常半月板能

保护软骨和预防骨关节炎，研究者们开始更倾向于保守治疗，尝试寻找能够替代或再生受损半月板的方法。组织工程半月板即是再生半月板的方式之一。

组织工程半月板的影响因素有许多，例如组织支架、种子细胞、生长因子、细胞因子等，在半月板再生和修复中募集内源性细胞非常重要^[59]。在该综述纳入的24个组织工程半月板实验中只有3个涉及到人体，且非种植到人体而只在体外扩增，其中FILARDO等^[16]在2019年提出了一个构建支架的新方法，运用三维建模和生物打印技术实现人体胶原半月板的构建。研究者根据健康志愿者的MRI图像，完成了一种定制的人体细胞胶原半月板，在培养28 d后，细胞能够生长并种植在生物材料上，说明生物打印的胶原基质水凝胶支架为间充质干细胞的存活和增殖提供了良好的微环境。虽然目前在组织工程中已应用多种生物材料，没有任何对比研究证明一种生物材料优于其他生物材料。3D生物打印具有精确控制细胞分布、细胞沉积高分辨率、可伸缩性和高效益等优点。在研究3D生物打印组织时，除了材料的选择外，还必须考虑几方面例如不适当的密度可能会阻碍细胞和组织在支架内正常生长。

干细胞因其很高的增殖能力和全能性而作为种子细胞被广泛应用于组织工程半月板研究，能很好修复动物半月板损伤。然而，临床研究几乎没有，目前还无法确定在临床上有同样效果，因此离临床应用还有一定距离。

目前已有许多研究外泌体在干细胞分化中的作用及从干细胞中分离出的外泌体的应用，以促进多种疾病的治疗。干细胞因其再生潜能会释放含有特殊蛋白质和遗传物质的外泌体^[60]。从多能干细胞和专能干细胞中释放出的外泌体已被证明在体内和体外能够刺激血管生成和细胞再生，抑制凋亡通路，调节慢性损伤组织的免疫功能^[60]。ZHANG等^[61]研究证明人脐带间充质干细胞来源外泌体介导的Wnt4可诱导内皮细胞 β -连环蛋白活化，并发挥促血管生成作用。BAGLIO等^[62-63]分析了超离心获得的外泌体RNA含量，发现外泌体含有许多tRNA特别是tRNA CTC，进一步表明间充质干细胞的分化状态可能由其外泌体的含量决定，特别是完整tRNA和tRNA长片段。间充质干细胞外泌体中高度表达的多种微小RNA调控细胞周期进展和增殖(miR-191、miR-222、miR-21、let-7a)，调节血管生成(miR-222、miR-21、let-7f)和内皮细胞分化(miR-6087)。WANG等^[64]认为人胚胎干细胞诱导的间充质干细胞产生的外泌体能够有效阻止软骨破坏的进展。外泌体在再生领域的研究中优势明显，且没有分化不良或免疫排斥的危险。然而目前外泌体研究仅处于早期阶段，还没有使用外泌体的再生疗法进行大规模的临床试验。今后的研究可以通过增加大动物及人体试验来为临床提供更多的有利

证据,在此基础上开展临床研究。另外,目前已经确定了多种细胞因子可以促进软骨细胞增殖分化,但机制尚不清楚,且其在组织工程半月板中的应用还处于起步阶段,也还需更多研究。

作者贡献: 付维力、青婉怡负责综述构思设计;青婉怡、王星星、周圣梁负责文献收集;青婉怡、王星星负责文章的撰写。全体作者都阅读并同意最终的文本。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81972123, 31741046)”“中央高校基本科研业务费(2015SCU04A40)”“四川大学创新火花项目库(2018SCUH0034)”“四川大学华西医院学科卓越发展 1-3-5 工程临床研究孵化项目(2019HXFH039)”“四川省卫计委课题(18ZD017)”的资助。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: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

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 4.0”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] KAZEMI M, LI LP, SAVARD P, et al. Creep behavior of the intact and meniscectomy knee joints. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(7):1351-1358.
- [2] NAIMARK MB, KEGEL G, O'DONNELL T, et al. Knee Function Assessment in Patients With Meniscus Injury: A Preliminary Study of Reproducibility, Response to Treatment, and Correlation With Patient-Reported Questionnaire Outcomes. *Orthop J Sports Med.* 2014;2(9):2325967114550987.
- [3] SHIMOMURA K, ROTHRAUFF BB, TUAN RS. Region-Specific Effect of the Decellularized Meniscus Extracellular Matrix on Mesenchymal Stem Cell-Based Meniscus Tissue Engineering. *Am J Sports Med.* 2017;45(3):604-611.
- [4] CUCCHIARINI M, MCNULTY AL, MAUCK RL, et al. Advances in combining gene therapy with cell and tissue engineering-based approaches to enhance healing of the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(8):1330-1339.
- [5] WHITEHOUSE MR, HOWELLS NR, PARRY MC, et al. Repair of Torn Avascular Meniscal Cartilage Using Undifferentiated Autologous Mesenchymal Stem Cells: From In Vitro Optimization to a First-in-Human Study. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(4):1237-1248.
- [6] ROMANAZZO S, VEDICHERLA S, MORAN C, et al. Meniscus ECM-functionalised hydrogels containing infrapatellar fat pad-derived stem cells for bioprinting of regionally defined meniscal tissue. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(3):e1826-e1835.
- [7] QI Y, CHEN G, FENG G. Osteoarthritis prevention and meniscus regeneration induced by transplantation of mesenchymal stem cell sheet in a rat meniscal defect model. *Exp Ther Med.* 2016;12(1):95-100.
- [8] PARK A, BARRERA-RAMIREZ J, RANASINGHE I, et al. Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Rep.* 2016;12(3):327-339.
- [9] WU Y, ZHOU J, BI L, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on the cardiac function and immune system of mice with endotoxemia. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):5317-5325.
- [10] TARNG YW, HUANG BF, SU FC. A novel recirculating flow-perfusion bioreactor for periosteal chondrogenesis. *Int Orthop.* 2012;36(4): 863-868.
- [11] WANG N, GRAD S, STODDART MJ, et al. Particulate cartilage under bioreactor-induced compression and shear. *Int Orthop.* 2014;38(5): 1105-1111.
- [12] HUANG H, WANG S, GUI J, et al. A study to identify and characterize the stem/progenitor cell in rabbit meniscus. *Cytotechnology.* 2016;68(5):2083-2103.
- [13] VIZOSO FJ, EIRO N, CID S, et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9): E1852.
- [14] QI Y, YANG Z, DING Q, et al. Targeted transplantation of iron oxide-labeled, adipose-derived mesenchymal stem cells in promoting meniscus regeneration following a rabbit massive meniscal defect. *Exp Ther Med.* 2016;11(2):458-466.
- [15] BAEK J, SOVANI S, CHOI W, et al. Meniscal Tissue Engineering Using Aligned Collagen Fibrous Scaffolds: Comparison of Different Human Cell Sources. *Tissue Eng Part A.* 2018;24(1-2): 81-93.
- [16] FILARDO G, PETRETTA M, CAVALLO C, et al. Patient-specific meniscus prototype based on 3D bioprinting of human cell-laden scaffold. *Bone Joint Res.* 2019;8(2):101-106.
- [17] SHIMOMURA K, ROTHRAUFF BB, HART DA, et al. Enhanced repair of meniscal hoop structure injuries using an aligned electrospun nanofibrous scaffold combined with a mesenchymal stem cell-derived tissue engineered construct. *Biomaterials.* 2019;192:346-354.
- [18] XIE X, ZHU J, HU X, et al. A co-culture system of rat synovial stem cells and meniscus cells promotes cell proliferation and differentiation as compared to mono-culture. *Sci Rep.* 2018;8(1): 7693.
- [19] KOCH M, ACHATZ FP, LANG S, et al. Tissue Engineering of Large Full-Size Meniscus Defects by a Polyurethane Scaffold: Accelerated Regeneration by Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:8207071.
- [20] YING XZ, QIAN JJ, PENG L, et al. Model research on repairing meniscus injury in rabbits using bone marrow mesenchymal stem cells and silk fibroin meniscus porous scaffold. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(12):3689-3693.
- [21] KREMER A, RIBITSCH I, REBOREDO J, et al. Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix-A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(9-10):390-402.
- [22] MCCORRY MC, BONASSAR LJ. Fiber development and matrix production in tissue-engineered menisci using bovine mesenchymal stem cells and fibrochondrocytes. *Connect Tissue Res.* 2017;58(3-4):329-341.
- [23] SADLIK B, JAROSLAWSKI G, GLADYSZ D, et al. Knee Cartilage Regeneration with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Embedded in Collagen Scaffold Using Dry Arthroscopy Technique. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1020:113-122.
- [24] MORADI L, VASEI M, DEGHAN MM, et al. Regeneration of meniscus tissue using adipose mesenchymal stem cells-chondrocytes co-culture on a hybrid scaffold. In vivo study. *Biomaterials.* 2017;126:18-30.
- [25] TORATANI T, NAKASE J, NUMATA H, et al. Scaffold-Free Tissue-Engineered Allogenic Adipose-Derived Stem Cells Promote Meniscus Healing. *Arthroscopy.* 2017;33(2):346-354.

- [26] WARNOCK JJ, SPINA J, BOBE G, et al. Culture of canine synoviocytes on porcine intestinal submucosa scaffolds as a strategy for meniscal tissue engineering for treatment of meniscal injury in dogs. *Vet J.* 2014;199(1):49-56.
- [27] ZELLNER J, HIERL K, MUELLER M, et al. Stem cell-based tissue-engineering for treatment of meniscal tears in the avascular zone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(7):1133-1142.
- [28] MORIGUCHI Y, TATEISHI K, ANDO W, et al. Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model. *Biomaterials.* 2013;34(9):2185-2193.
- [29] 李丹,周广东,刘滢,等.骨髓间充质干细胞体外构建组织工程半月板[J]. *组织工程与重建外科杂志*,2013,9(5):251-255,278.
- [30] SANCHEZ-ADAMS J, ATHANASIOU KA. Dermis isolated adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33(1):109-119.
- [31] 朱现玮,徐卫袁,张兴祥,等.多孔型丝素蛋白/羟基磷灰石复合骨髓间充质干细胞修复兔半月板无血运区软骨损伤[J]. *中国组织工程研究*, 2012,16(29): 5375-5378.
- [32] NERURKAR NL, HAN W, MAUCK RL, et al. Homologous structure-function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds. *Biomaterials.* 2011;32(2):461-468.
- [33] 尤微,熊建义,曹清丽,等.骨髓间充质干细胞构建组织工程半月板软骨种子细胞[J]. *海南医学*,2011,22(14): 4-7.
- [34] JIANG L, MA A, SONG L, et al. The combination of autologous mesenchymal stem cells, acellular dermal matrix and growth factors for cartilage regeneration in experimental cartilage defect model in nonhuman primates. *Transplantation.* 2010;90(2s): 466.
- [35] TAN Y, ZHANG Y, PEI M. Meniscus reconstruction through coculturing meniscus cells with synovium-derived stem cells on small intestine submucosa--a pilot study to engineer meniscus tissue constructs. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(1):67-79.
- [36] 蔡贵泉,崔一民,陈晓东.骨髓间充质干细胞向纤维软骨细胞表型的诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2010,14(2):218-222.
- [37] YAMASAKI T, DEIE M, SHINOMIYA R, et al. Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *Artif Organs.* 2008;32(7):519-524.
- [38] YAMASAKI T, DEIE M, SHINOMIYA R, et al. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *J Biomed Mater Res A.* 2005;75(1):23-30.
- [39] PILLAI MM, GOPINATHAN J, SELVAKUMAR R, et al. Human Knee Meniscus Regeneration Strategies: a Review on Recent Advances. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(3):224-235.
- [40] WANG M, YUAN Z, MA N, et al. Advances and Prospects in Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4130607.
- [41] DEPONTI D, DI GIANCAMILLO A, SCOTTI C, et al. Animal models for meniscus repair and regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(5):512-527.
- [42] NIU W, GUO W, HAN S, et al. Cell-Based Strategies for Meniscus Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4717184.
- [43] ZHANG Z, GUO W, GAO S, et al. Native tissue-based strategies for meniscus repair and regeneration. *Cell Tissue Res.* 2018;373(2):337-350.
- [44] MADRY H, OCHI M, CUCCHIARINI M, et al. Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop.* 2015;2(1):9.
- [45] VADODARIA K, KULKARNI A, SANTHINI E, et al. Materials and structures used in meniscus repair and regeneration: a review. *Biomedicine (Taipei).* 2019;9(1):2.
- [46] BULGHERONI P, MURENA L, RATTI C, et al. Follow-up of collagen meniscus implant patients: clinical, radiological, and magnetic resonance imaging results at 5 years. *Knee.* 2010;17(3):224-229.
- [47] MANDAL BB, PARK SH, GIL ES, et al. Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials.* 2011;32(2): 639-651.
- [48] SCOTTI C, HIRSCHMANN MT, ANTINOLFI P, et al. Meniscus repair and regeneration: review on current methods and research potential. *Eur Cell Mater.* 2013;26:150-170.
- [49] BILGEN B, JAYASURIYA CT, OWENS BD. Current Concepts in Meniscus Tissue Engineering and Repair. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(11):e1701407.
- [50] ELI N, ORAGUI E, KHAN W. Advances in meniscal tissue engineering. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2011;13(4):319-326.
- [51] IONESCU LC, LEE GC, HUANG KL, et al. Growth factor supplementation improves native and engineered meniscus repair in vitro. *Acta Biomater.* 2012;8(10):3687-3694.
- [52] CHEW E, PRAKASH R, KHAN W. Mesenchymal stem cells in human meniscal regeneration: A systematic review. *Ann Med Surg (Lond).* 2017;24:3-7.
- [53] BEER L, MILDNER M, ANKERSMIT HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Ann Transl Med.* 2017;5(7):170.
- [54] EIRÓ N, SENDON-LAGO J, SEOANE S, et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget.* 2014;5(21):10692-10708.
- [55] BERMUDEZ MA, SENDON-LAGO J, EIRO N, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(2):983-992.
- [56] BERMUDEZ MA, SENDON-LAGO J, SEOANE S, et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res.* 2016;149:84-92.
- [57] OSUGI M, KATAGIRI W, YOSHIMI R, et al. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(13-14):1479-1489.
- [58] KWON H, BROWN WE, LEE CA, et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(9):550-570.
- [59] GUO W, XU W, WANG Z, et al. Cell-Free Strategies for Repair and Regeneration of Meniscus Injuries through the Recruitment of Endogenous Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:5310471.
- [60] DERKUS B, EMREGUL KC, EMREGUL E. A new approach in stem cell research-Exosomes: Their mechanism of action via cellular pathways. *Cell Biol Int.* 2017;41(5):466-475.
- [61] ZHANG B, WU X, ZHANG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):513-522.
- [62] BAGLIO SR, ROOIJERS K, KOPPERS-LALIC D, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:127.
- [63] HOFER HR, TUAN RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):131.
- [64] WANG Y, YU D, LIU Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):189.