

## • 组织工程与细胞培养 •

# 人工软骨支架中 TGF- $\beta$ 1 缓释壳聚糖微球对 ATDC-5 细胞生长的促进作用

常亚南<sup>1</sup>, 刘浩<sup>2</sup>, 冯成宝<sup>1</sup>, 何晓亮<sup>1</sup>, 周晓辉<sup>1</sup>

1 河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050000

2 河北科技大学 继续教育学院, 河北 石家庄 050000

常亚南, 刘浩, 冯成宝, 等. 人工软骨支架中 TGF- $\beta$ 1 缓释壳聚糖微球对 ATDC-5 细胞生长的促进作用. 生物工程学报, 2017, 33(4): 664-671.

Chang YN, Liu H, Feng CB, et al. ATDC-5 growth promoted by sustained-releasing chitosan microspheres loading TGF- $\beta$ 1 in artificial cartilage scaffolds. Chin J Biotech, 2017, 33(4): 664-671.

**摘 要:** 为了提高本课题组前期构建的 II 型胶原蛋白-透明质酸-硫酸软骨素的人工三维软骨支架对软骨细胞生长的促进作用, 采用乳化交联法以壳聚糖为原料, 加入细胞转化生长因子 TGF- $\beta$ 1, 并通过真空冷冻干燥技术制备了包裹 TGF- $\beta$ 1 的壳聚糖微球。然后分别将其与空白壳聚糖微球整合进软骨支架中, 并接种小鼠软骨细胞 ATDC-5, 通过观察细胞生长状态来评价缓释微球在人工软骨支架中对软骨细胞生长是否具有促进作用。结果显示所制得的壳聚糖微球球体表面光滑, 分散均匀, 直径在 100 nm 左右, 吸水率良好可达 983.73%±4.38%, 抗酶解作用较强, 第 28 天时降解率仅达到 51.0%±1.8%。由 TGF- $\beta$ 1 累积释放曲线可知 TGF- $\beta$ 1 在开始的 24 h 内释放最快, 之后逐渐减慢, 在 120 h 之后进入平台期, 具有缓释效果。MTT 试验以及荧光染色试验充分表明, 由 II 型胶原蛋白、透明质酸以及硫酸软骨素构建的三维软骨支架适合 ATDC-5 细胞的生长增殖, 并且壳聚糖微球对 TGF- $\beta$ 1 的缓释能够显著促进细胞的生长。

**关键词:** 组织工程, 软骨支架, 壳聚糖微球, 转化生长因子, 小鼠软骨细胞

**Received:** September 26, 2016; **Accepted:** January 17, 2017

**Supported by:** "100 Talent Program" of Hebei Province (No. E2012100005), Scientific Research Staring Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Education of China, Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2012208019).

**Corresponding author:** Xiaohui Zhou. Tel/Fax: +86-311-81668487; E-mail: zhouxh2003@aliyun.com

河北省“百人计划”项目 (No. E2012100005), 教育部留学回国人员科研启动基金, 河北省自然科学基金 (No. C2012208019) 资助。

# ATDC-5 growth promoted by sustained-releasing chitosan microspheres loading TGF- $\beta$ 1 in artificial cartilage scaffolds

Ya'nan Chang<sup>1</sup>, Hao Liu<sup>2</sup>, Chengbao Feng<sup>1</sup>, Xiaoliang He<sup>1</sup>, and Xiaohui Zhou<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

<sup>2</sup> School of Continuing Education, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

**Abstract:** In order to promote the growth of chondrocyte ATDC-5 in collagen type II-hyaluronic acid-chondroitin sulfate composite scaffolds constructed previously *in vitro*, the sustained-releasing chitosan microspheres loading TGF- $\beta$ 1 were prepared by emulsification and cross-linking. In addition, ATDC-5 was inoculated into the scaffolds incorporating the chitosan microspheres with TGF- $\beta$ 1. Results show that the morphology of microsphere was round and uniform, mean diameter was about 100 nm, absorption rate was up to 983.7% $\pm$ 4.38%. When the microsphere was incubated under the condition of 10<sup>7</sup> U/L lysozyme, the degradation rate was only 51.0% $\pm$ 1.8% on day 28. Moreover, to compare the effect of TGF- $\beta$ 1, the growth of ATDC-5 in different scaffolds was observed by MTT assay and fluorescence staining test. According to the cumulative release curve, TGF- $\beta$ 1 was released quickly at initial 24 h, then gradually decelerated, finally reached the plateau after 120 h. MTT assay and fluorescence staining test demonstrated that the scaffolds were suitable for ATDC-5 growth and proliferation, as well as, suggested that the sustained-releasing chitosan microspheres loading TGF- $\beta$ 1 could significantly promote the growth of ATDC-5.

**Keywords:** tissue engineering, cartilage scaffolds, chitosan microsphere, transforming growth factor, mouse chondrocyte

关节软骨的损伤和病变是临床骨科的常见疾病。由于软骨组织自身修复能力有限,一旦发生损伤病变,必须进行修复或置换,如何有效地修复关节软骨损伤始终是医学界尚待解决的难题之一<sup>[1]</sup>。近年来快速发展的组织工程技术为关节软骨缺损的修复治疗提供了新思路和新方法,研究者们纷纷把目光聚集到构建人工软骨支架的研究中<sup>[2]</sup>。

转化生长因子  $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚族组成的大家族<sup>[3]</sup>。其中 TGF- $\beta$ 1 是一个多功能蛋白,调节细胞的多种功能,比如细胞的增殖、分化以及细胞外基质的代谢并可以抑制软骨形成过程中软骨细胞的终末分化<sup>[4]</sup>。有关细胞因子对成骨细胞的作用研究表明,单独将细胞因

子植入体内并不能显著地促进骨的生成,这是因为细胞因子易被体液稀释、降解等,因此需要有合适的缓释体系才能有效地发挥细胞因子的作用<sup>[5-6]</sup>。

本课题组已经初步构建了 II 型胶原蛋白-透明质酸-硫酸软骨素的人工三维软骨支架<sup>[7]</sup>。为了进一步提高该支架的生物学性能,本研究利用生物相容性好、无细胞毒副作用的壳聚糖作为载体材料<sup>[8-10]</sup>来制备缓释微球,用于包裹 TGF- $\beta$ 1,然后将空白壳聚糖微球和包裹有 TGF- $\beta$ 1 的壳聚糖微球分别整合进软骨支架中,接种小鼠软骨细胞 ATDC-5,通过观察细胞生长状态来分析缓释微球在人工软骨支架中对软骨细胞生长是否具有促进作用。旨在探索性能良好的人工软骨支架,为将来临床应用奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

TGF- $\beta$ 1 (Peprotech), 壳聚糖 (Solarbio), 溶菌酶 (北京科百奥生物科技有限公司), ELISA 试剂盒 (联科生物技术有限公司), DMEM : F12 细胞培养基 (Gibco), 胎牛血清 (Hyclone), 谷氨酰胺 (Solarbio), Hoechst 33342 (Sigma), FITC (Sigma), Span 80 (Solarbio), 胰蛋白酶 (Solarbio), DMSO (MP); 小鼠软骨细胞 ATDC-5, 购自南京科佰生物科技有限公司。

真空冷冻干燥机 (Gene),  $\text{CO}_2$  培养箱 (Thermo), 扫描电子显微镜 (Hitachi), 倒置荧光显微镜 (Olympus)。

### 1.2 壳聚糖缓释微球的制备

将 2.5 mL 壳聚糖溶液和 20  $\mu\text{L}$  TGF- $\beta$ 1 溶液加入到 5% Tween80 液体石蜡混合液中, 磁力搅拌器高速搅拌 2 h 至溶液均一。然后缓慢滴加浓度为 5%、pH 2.5 的三聚磷酸钠溶液 6.25 mL, 高速搅拌 2 h 至溶液成为均一的乳浊液。高速冷冻离心机 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$  条件下离心 15 min, 小心弃掉上层溶液, 所得微球沉淀用异丙醇洗 2 次, 每次均使用高速冷冻离心机在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\times g$  条件下离心 15 min, 再用双蒸水洗 4 次, 每次均按上述条件离心, 沉淀置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻, 最后使用真空冷冻干燥机冻干后置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 壳聚糖缓释微球参数测定

#### 1.3.1 扫描电子显微镜观察微球形貌

冷冻干燥后的微球粉末进行上机喷金, 然后进行扫描电子显微镜检测, 加速电压为 3 kV。

#### 1.3.2 吸水率测定

称量 20 mg 左右壳聚糖微球分别置于 4 个 EP 管中, 分别称重。每管加入 1 mL PBS 溶液,

将其置于培养箱中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 条件下振荡, 分别在 0.5、1.0、1.5、2.0 h 时间段取出, 3 000 r/min 离心后弃上清并弃去表面残留的水分后再次称重。试验前质量记为  $m_1$ , 试验后质量记为  $m_2$ 。按以下公式计算吸水率。

$$\text{吸水率}(\%) = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100\%$$

式中,  $m_1$  为吸水前壳聚糖微球的质量 (g);  $m_2$  为吸水后壳聚糖微球的质量 (g)。

#### 1.3.3 降解率测定

分别准确称取 20 mg 壳聚糖微球, 置于 6 个 EP 管中, 分别称重。加入含溶菌酶  $10^7$  U/L 的磷酸缓冲液 (PBS) 溶液, 于培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 条件下气浴振荡, 分别在 1、3、7、14、21、28 d 取出, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后用双蒸水漂洗沉淀 2 遍, -20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻, 然后一起冷冻干燥, 分别称重。试验前质量记为  $m_3$ , 试验后质量记为  $m_4$ 。按以下公式计算降解率。

$$\text{降解率}(\%) = (m_3 - m_4) / m_3 \times 100\%$$

式中,  $m_3$  为降解前壳聚糖微球的质量 (g);  $m_4$  为降解后壳聚糖微球的质量 (g)。

#### 1.3.4 TGF- $\beta$ 1 累积释放曲线测定

分别称取 10 mg TGF- $\beta$ 1 壳聚糖微球于 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL PBS, 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下 135 r/min 振荡, 分别于 2 h、4 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 取出后, 10 000 r/min 离心 5 min。取出 150  $\mu\text{L}$  样品, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 并补加 150  $\mu\text{L}$  PBS 溶液继续试验。7 d 后采用 ELISA 试剂盒 (Human TGF- $\beta$ 1 Sunny Elisa) 测定吸光值, 记为  $A_1$ 。同时另取 10 mg TGF- $\beta$ 1 壳聚糖微球溶于 2 mL 2% 乙酸溶液中, 制成待测样本, 测定吸光值, 记为  $A_2$ , 并计算 10 mg 微球中包裹的生长因子总量。试验重复进行 3 次。

以释放时间为横坐标,  $A_1/A_2$  为纵坐标测定

绘制累积释放率曲线、绘制标准曲线,并按照下面公式分别计算包封率和载药量。

载药量=溶液中药物含量/微球质量

包封率(%)=载药量 $\times$ 微球总量/总投药量 $\times 100\%$

#### 1.4 三维复合软骨支架的制备

称取 TGF- $\beta$ 1 壳聚糖微球 1 mg,将其分散在 100  $\mu$ L 的 90%乙醇中,然后加入到已构建的三维软骨支架中,  $-80^{\circ}\text{C}$  冷冻后利用真空冷冻干燥机冻干,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用,以上为试验组,对照组将不含有 TGF- $\beta$ 1 的壳聚糖微球按照同样的方法进行试验。

#### 1.5 细胞在三维复合软骨支架上的培养

采用 24 孔板来培养细胞,实验组在孔中加入含有 TGF- $\beta$ 1 的三维复合软骨支架,对照组中加入不含有 TGF- $\beta$ 1 的三维复合软骨支架。取生长状态良好的细胞 ATDC-5,消化后计数,调整细胞浓度至  $2.5\times 10^4/\text{mL}$ ,按照  $2.5\times 10^4/\text{孔}$  的密度接种到放有三维复合软骨支架的孔板中培养。

#### 1.6 MTT 法检测细胞活力

小心弃去孔中的培养基,实验组和对照组均加入 200  $\mu$ L 不含血清的新鲜培养基,每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu$ L,于  $\text{CO}_2$  培养箱中避光条件下  $37^{\circ}\text{C}$  培养 4 h。然后每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,振荡 10 min,在 490 nm 条件下测定吸光值。分别在 3、5、7、14 d 利用 MTT 法检测细胞活力。试验平行进行 3 次,记录数据,进行统计学分析。

#### 1.7 荧光染色法观察细胞生长状态

小心弃去孔中的培养基,加入 1 mL 浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗支架,弃去 PBS 溶液,再加入 990  $\mu$ L 浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液和 10  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 FITC 溶液,小心混匀。

置于  $\text{CO}_2$  培养箱中避光条件下  $37^{\circ}\text{C}$  染色 15 min。FITC 染色结束后,用浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗支架 2–3 次,每次 3–5 min。然后加入 990  $\mu$ L 浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液和 10  $\mu$ L 浓度为 1 mg/mL 的 Hoechst 33342 溶液,小心混匀。置于  $\text{CO}_2$  培养箱中避光条件下  $37^{\circ}\text{C}$  染色 20 min,染色结束后,使用浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液洗支架 2–3 次,每次 3–5 min。分别在第 3、5、7、14 天进行染色试验,并用倒置荧光显微镜观察支架中的细胞,拍照记录。

## 2 结果与分析

#### 2.1 扫描电子显微镜观察微球形貌

通过真空冷冻干燥机冻干的壳聚糖微球为淡黄色粉末状,粒度极细。由图 1 可以看出,所制备的微球外观为球状,球体表面光滑,分散较好,大小均匀,直径在 100 nm 左右。

#### 2.2 壳聚糖缓释微球的吸水率

经实验测定,壳聚糖缓释微球在 0.5、1.0、1.5、2.0 h 所对应的吸水率分别为  $301.21\%\pm 2.35\%$ 、 $976.32\%\pm 9.41\%$ 、 $977.67\%\pm 7.51\%$ 、 $983.73\%\pm 4.38\%$ 。

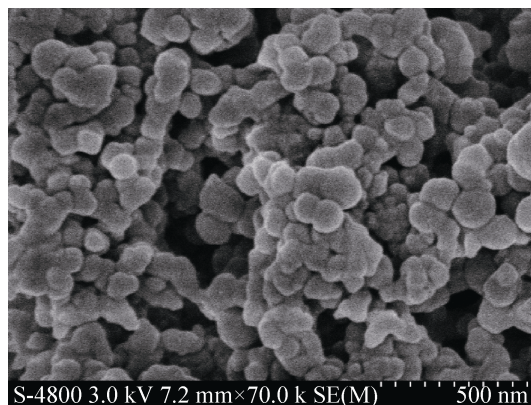


图 1 壳聚糖微球扫描电子显微镜图

Fig. 1 The scanning electron microscopy of chitosan microspheres.

可以看出,在 0.5 h 的时候壳聚糖微球的吸水率约为自身重量的 3 倍,在 1.0 h 时达到平衡,约为自身重量的 9.8 倍,吸水率较高,具有很好的吸水膨胀性能,能够增强壳聚糖微球的缓释效果。

### 2.3 壳聚糖缓释微球的降解率

经实验测定,壳聚糖缓释微球在 1、3、7、14、21、28 d 的降解率分别为  $4.5\% \pm 0.6\%$ 、 $7.0\% \pm 0.8\%$ 、 $11.0\% \pm 1.6\%$ 、 $19.5\% \pm 1.6\%$ 、 $32.0\% \pm 1.5\%$ 、 $51.0\% \pm 1.8\%$ ,如图 2 所示。随着溶菌酶对壳聚糖微球作用时间的延长,壳聚糖微球逐渐被降解,并且降解速率在增加,降解速率的变化可能是因为随着酶解时间的延长,壳聚糖微球的表面逐渐被酶解,逐渐破坏其乳化交联的结构,内部结构逐渐暴露,溶菌酶对壳聚糖的降解作用更容易发挥。但第 28 天时降解率仅达到  $51.0\% \pm 1.8\%$ ,表明所制得的壳聚糖微球就有较强的抗酶解能力。

### 2.4 TGF- $\beta$ 1 累积释放曲线、封装率和载药量

对包裹有 TGF- $\beta$ 1 壳聚糖微球缓慢释放 TGF- $\beta$ 1 体系连续监测 7 d,利用 ELISA 试剂盒检测并绘制体外累积释放曲线,如图 3 所示,在最初的 24 h 内 TGF- $\beta$ 1 的释放率最大,24–120 h 释放量还在增加,但速率较最初的 24 h 减慢,在 120 h 之后,曲线平缓,表明释放进入平台期,保持稳定。7 d 的累积释放率为  $57.57\% \pm 1.32\%$ 。结合累积释放曲线通过公式计算得壳聚糖微球载药量为  $(25.6 \pm 0.23) \mu\text{g/g}$ ,封装率为  $80.21\% \pm 0.02\%$ 。

### 2.5 MTT 法检测 ATDC-5 细胞活力

对实验组和对照组的细胞定期利用 MTT 法检测细胞活力,经统计学分析如图 4 所示。整体来看,试验组细胞的活力均高于对照组细胞的活力。第 3 天时,实验组和对照组之间的细胞活力相差较小,这是因为刚开始培养时,细胞数目均相对较少,且吸收 TGF- $\beta$ 1 后有一个短暂的适应期,在

第 3 天开始表现出差异。随培养时间的延长,细胞紧贴三维复合软骨支架生长,数目逐渐增加,且 TGF- $\beta$ 1 的释放量趋于稳定,对照组和实验组之间细胞活力的差异逐渐表现出来,并且越来越显著,在细胞培养 2 周时,差异极其显著 ( $P < 0.01$ )。以上结果充分说明,由 II 型胶原蛋白、透明质酸以及硫酸软骨素构建的三维软骨支架适合 ATDC-5

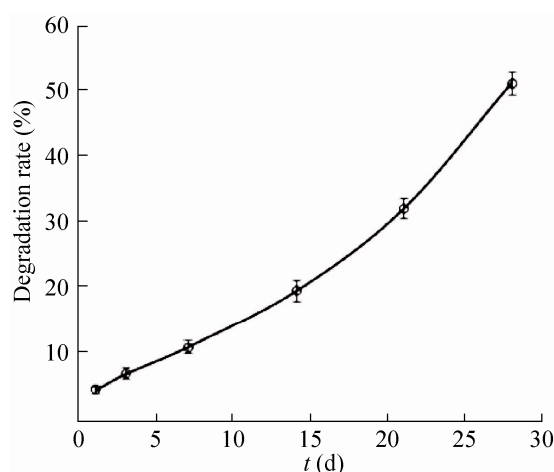


图 2 壳聚糖微球降解率统计图

Fig. 2 Degradation rate of chitosan microspheres.

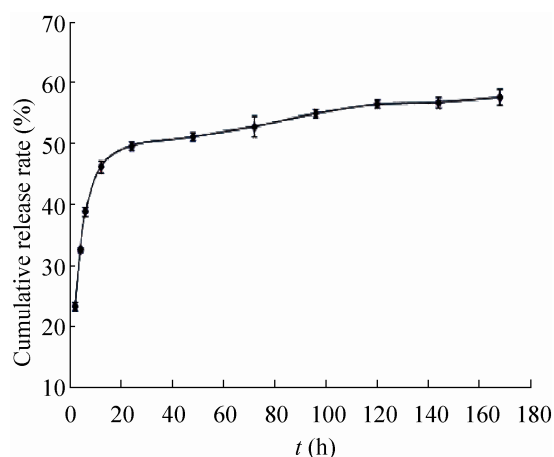


图 3 TGF- $\beta$ 1 壳聚糖微球体外累积释放曲线

Fig. 3 Cumulative release curve of TGF- $\beta$ 1 chitosan microspheres *in vitro*.

细胞的生长增殖,并且壳聚糖微球对 TGF- $\beta$ 1 的缓释能够显著促进细胞的生长。

## 2.6 荧光染色法观察细胞生长状态

将对照组和实验组的细胞定期进行荧光染色后利用倒置荧光显微镜拍照,如图 5 所示,其量化结果见表 1。支架通过荧光照射呈现绿色,细胞通过荧光照射呈现蓝色,可以清楚看出支架为三维立体状,细胞均匀吸附在三维立体支架中,生长状态良好。图 5 中分别记录了培养 3、5、7、14 d 细胞的生长过程。接种细胞后 3 d 时,对照组和试验组细胞均较少,这是因为刚开始培养时,细胞数目均相对较少且需经过一个短暂的适应期,并且在试验初期 TGF- $\beta$ 1 的释放量较小。但是可以看出试验组细胞数目多于对照组,随培养时间的延长,细胞生长速率增加,细胞在三维支架中均匀分散,且由于 TGF- $\beta$ 1 对细胞生长的促进作用,试验组细胞数目较对照组细胞数目

多,差异随培养时间的延长越来越明显。在培养 14 d 时,支架中细胞数目更多,细胞均匀分散在支架中,密度很大,且试验组尤其明显。充分说明由 II 型胶原蛋白、透明质酸以及硫酸软骨素构建的三维软骨支架适合 ATDC-5 细胞的生长增殖,并且壳聚糖微球对 TGF- $\beta$ 1 的缓释能够显著促进细胞的生长。

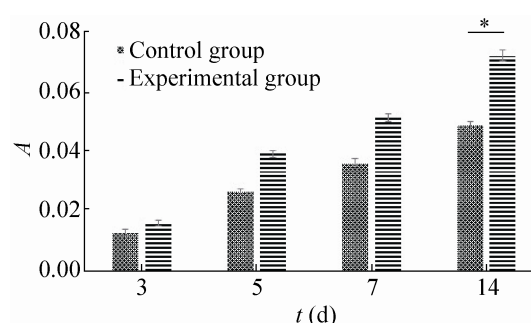


图 4 MTT 法检测 ATDC-5 细胞增殖活力统计图  
Fig. 4 ATDC-5 cells proliferation vigor by MTT. Statistically significant difference is marked (\* $P < 0.01$ ).

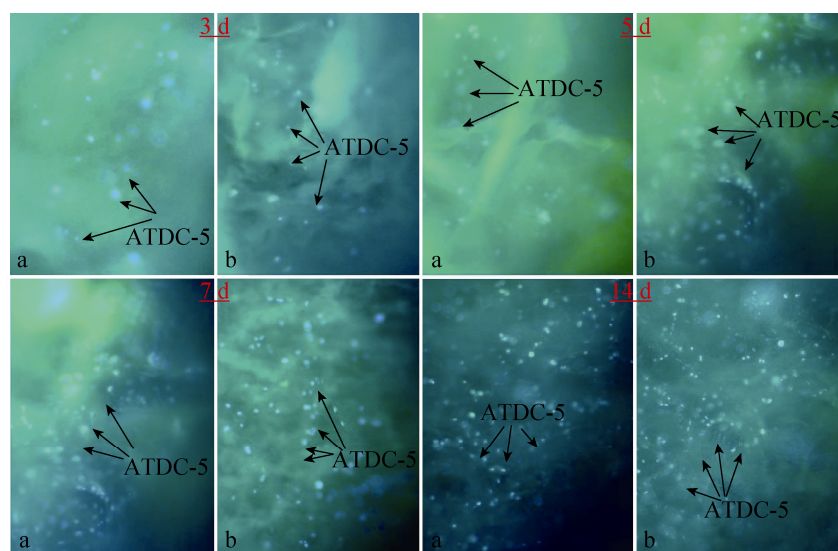


图 5 支架上培养的软骨细胞 ATDC-5 荧光染色图 ( $\times 400$ )

Fig. 5 Fluorescence staining of ATDC-5 chondrocytes cultured on scaffolds ( $\times 400$ ). Letter a showed control group; b showed experimental group; arrow showed ATDC-5 cells.



表 1 ATDC-5 荧光染色细胞数目统计表

Table 1 Number of ATDC-5 chondrocytes by fluorescence staining

| Group              | 3 d  | 5 d  | 7 d   | 14 d  |
|--------------------|------|------|-------|-------|
| Control group      | 25±3 | 45±2 | 87±5  | 133±6 |
| Experimental group | 31±2 | 78±3 | 158±5 | 314±7 |

### 3 讨论

目前,国内外对关节软骨损伤和缺损修复的研究主要集中在以下几个方面:关节镜清创术<sup>[11]</sup>、软骨细胞移植<sup>[12]</sup>、组织工程化软骨<sup>[13-15]</sup>和凝胶类关节软骨修复材料<sup>[16-18]</sup>。其中,组织工程化关节软骨被认为是最有应用前景的关节软骨修复材料。因此,组织工程化软骨中新型支架材料的开发成为一个热点研究方向。应用在组织工程的支架材料主要有胶原蛋白、透明质酸、硫酸软骨素、壳聚糖和羟基磷灰石等。许多学者纷纷致力于新型软骨支架的开发研究<sup>[19-23]</sup>。

本课题组前期实验构建了Ⅱ型胶原蛋白-透明质酸-硫酸软骨素的三维人工软骨支架,孔径为 $(83.33\pm 7.20)\mu\text{m}$ ,孔隙率为 $86.63\%\pm 0.67\%$ 。研究人员普遍认为组织工程软骨支架的孔径应为 $(60-200)\mu\text{m}$ ,孔隙率应在 $70\%-90\%$ <sup>[24-26]</sup>。因此,自制软骨支架符合上述条件,有利于支架内外营养物质的输送,对于支架内细胞的生长代谢以及软骨修复都有着重要意义。

本实验通过制备包裹生长因子 TGF- $\beta$ 1 具有缓释作用的壳聚糖微球,并将其整合到软骨支架上用以培养小鼠软骨细胞 ATDC-5。MTT 试验以及荧光染色试验结果充分证明该三维软骨支架适合 ATDC-5 细胞的生长增殖,并且壳聚糖微球对 TGF- $\beta$ 1 的缓释能够显著促进细胞的生长,随培养时间的延长,试验组细胞生长速率显著高于对照组,且在三维支架中分散均匀,培养 14 d 时,细

胞密度增殖最大,较对照组高出近 3 倍。这为将来人工软骨支架更好地应用于医学领域提供了参考依据。至于该自制人工软骨支架在动物体内的生物相容性及慢性毒性等评价待进一步研究。

### REFERENCES

- [1] 周红星, 黑晓东, 张保健, 等. 关节镜下清理术结合射频汽化技术治疗膝关节骨性关节炎. 内蒙古中医药, 2014, 33(5): 88-89.
- [2] Liu H, Xu L, Chang YN, et al. Natural biomaterials for construction of cartilage scaffold. J Hebei Univ Sci Technol, 2015, 36(5): 539-545 (in Chinese). 刘浩, 徐乐, 常亚南, 等. 构建软骨支架的天然生物材料. 河北科技大学学报, 2015, 36(5): 539-545.
- [3] Oka K, Oka S, Sasaki T, et al. The role of TGF- $\beta$  signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development. Dev Biol, 2007, 303(1): 391-404.
- [4] Lee JE, Kim KE, Kwon IC, et al. Effects of the controlled-released TGF- $\beta$ 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. Biomaterials, 2004, 25(18): 4163-4173.
- [5] 付小兵, 盛志勇. 现代高新技术与创伤以及创伤修复. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 451-453.
- [6] Yang YD, Zhang WY, Fang GJ. Preparation of chitosan sustained release microspheres encapsulated with transforming growth factor beta 1. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2009, 13(38): 7481-7484 (in Chinese). 杨亚冬, 张文元, 房国坚. 包裹转化生长因子  $\beta$ 1 壳聚糖缓释微球的研制. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(38): 7481-7484.
- [7] Liu ZQ, Liu H, Feng CB, et al. Extracting collagen type II from bovine cartilage and preliminary construction of cartilage scaffolds. J Natl Sci Heilongjiang Univ, 2016, 33(3): 386-391 (in Chinese). 刘志勤, 刘浩, 冯成宝, 等. 从牛软骨中提取Ⅱ型胶原蛋白及初步构建软骨支架. 黑龙江大学自然科学学报, 2016, 33(3): 386-391.
- [8] Luo HL, Lu ZJ. Progress in chitosan-based drug release carriers. Chin Polym Bull, 2006, (7): 25-30 (in Chinese). 罗华丽, 鲁在君. 壳聚糖作为药物缓释载体的研究进展. 高分子通报, 2006, (7): 25-30.
- [9] Delmar K, Bianco-Peled H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan

- hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydr Polym*, 2015, 127: 28–37.
- [10] Faikrua A, Wittaya-Areekul S, Oonkhanond B, et al. *In vivo* chondrocyte and transforming growth factor- $\beta$ 1 delivery using the thermosensitive chitosan/starch/ $\beta$ -glycerol phosphate hydrogel. *J Biomater Appl*, 2013, 28(2): 175–186.
- [11] Yang G, Yan SG, Feng JJ, et al. Comparison of the relativity of MRI appearance of cartilage injuries and postoperative effect of arthroscope on articular cartilage disease of knee. *China J Orthop Traumatol*, 2010, 23(2): 90–93 (in Chinese).  
杨光, 严世贵, 冯建钊, 等. 膝关节软骨病变的 MRI 表现与关节镜术后疗效相关性研究. *中国骨伤*, 2010, 23(2): 90–93.
- [12] Shi SY, Ying XZ, Hu DX, et al. Experiment on articular cartilage defect repaired with autologous cancellous bone or cancellous bone enriching bone marrow stem cell. *China J Orthop Traumatol*, 2011, 24(4): 332–335 (in Chinese).  
石仕元, 应小樟, 胡德新, 等. 含自体富集骨髓干细胞松质骨移植与自体松质骨镶嵌移植修复关节软骨缺损的对比研究. *中国骨伤*, 2011, 24(4): 332–335.
- [13] Cao Z, Hu YY, Pan WM, et al. Effect of temperature on crosslinking of collagen/chitosan scaffolds with genipin. *Orthop J China*, 2009, 17(3): 217–220 (in Chinese).  
曹峰, 胡蕴玉, 潘纬敏, 等. 交联温度对京尼平交联胶原/壳聚糖组织工程支架的影响. *中国矫形外科杂志*, 2009, 17(3): 217–220.
- [14] Ko CS, Huang JP, Huang CW, et al. Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(2): 177–182.
- [15] Gorczyca G, Tylingo R, Szweda P, et al. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan–collagen–gelatin scaffolds using chitosan–CO<sub>2</sub> solution. *Carbohydr Polym*, 2014, 102: 901–911.
- [16] Cui L, Jia JF, Guo Y, et al. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydr Polym*, 2014, 99: 31–38.
- [17] Ren KX, He CL, Xiao CS, et al. Injectable glycopolyptide hydrogels as biomimetic scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2015, 51: 238–249.
- [18] He PF, Fu JY, Wang DA. Murine pluripotent stem cells derived scaffold-free cartilage grafts from a micro-cavitary hydrogel platform. *Acta Biomater*, 2016, 35: 87–97.
- [19] Mekhail M, Jahan K, Tabrizian M. Genipin-crosslinked chitosan/poly-L-lysine gels promote fibroblast adhesion and proliferation. *Carbohydr Polym*, 2014, 108: 91–98.
- [20] Jaipaw J, Wangkulangkul P, Meesane J, et al. Mimicked cartilage scaffolds of silk fibroin/hyaluronic acid with stem cells for osteoarthritis surgery: morphological, mechanical, and physical clues. *Mater Sci Eng C*, 2016, 64: 173–182.
- [21] Wang JH, Yang Q, Cheng NM, et al. Collagen/silk fibroin composite scaffold incorporated with PLGA microsphere for cartilage repair. *Mater Sci Eng C*, 2016, 61: 705–711.
- [22] Kim IG, Ko J, Lee HR, et al. Mesenchymal cells condensation-inducible mesh scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2016, 85: 18–29.
- [23] Xiong MJ, Li XF, Huang SH, et al. Biocompatibility of sustained-releasing microspheres loading chitosan scaffolds. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2010, 14(51): 9577–9581 (in Chinese).  
熊敏剑, 李晓峰, 黄山虎, 等. 负载可降解缓释微球壳聚糖支架的生物相容性. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(51): 9577–9581.
- [24] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2529–2543.
- [25] Song Q, Yan J, Guo XQ, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells cultured on hydroxyapatite/collagen composite scaffolds. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2010, 14(47): 8795–8799 (in Chinese).  
宋芹, 颜军, 郭晓强, 等. 羟基磷灰石/胶原蛋白复合支架上骨髓间充质干细胞的增殖与分化. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(47): 8795–8799.
- [26] Thomas AC, Campbell GR, Campbell JH. Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol*, 2003, 12(5): 271–276.

(本文责编 郝丽芳)