

• 综 述 •

骨软骨组织工程研究进展



兰伟伟¹, 陈维毅^{1,2} 综述 黄隽^{1,2} 审校

1. 太原理工大学 生物医学工程学院 生物医学工程系 (太原 030024)

2. 太原理工大学 生物医学工程研究所 材料强度与结构冲击山西省重点实验室 (太原 030024)

【摘要】 骨软骨损伤是临床上常见的关节疾病。由于骨软骨界面的复杂性和软骨自我修复能力匮乏等因素, 针对骨软骨损伤的临床治疗局限性较大。组织工程的提出, 为骨软骨损伤同步修复提供了新的治疗方式。本文就骨软骨组织工程的三个方面进行综述介绍, 它们分别是: 种子细胞来源以及培养方式、生长因子的调控以及协同作用、细胞支架的组成类型, 文中着重探讨骨软骨修复支架的现状和研究进展, 最终期待通过本文综述, 可为骨软骨组织工程的进一步发展提供参考。

【关键词】 骨软骨缺损; 组织工程; 种子细胞; 细胞因子; 支架

Research progress on osteochondral tissue engineering

LAN Weiwei¹, CHEN Weiyi^{1,2}, HUANG Di^{1,2}

1. Department of Biomedical Engineering, College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, P.R.China

2. Shanxi Key Laboratory of Material Strength & Structural Impact, Institute of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, P.R.China

Corresponding author: CHEN Weiyi, Email: chenweiyi211@163.com

【Abstract】 Osteochondral defects is a common clinical joint disease. The complexity of cartilage-bone interface and the poor self-repair capacity of cartilage are both reasons for current relatively limited clinical treatments. The introduction of tissue engineering provides a new treatment method for osteochondral repair. This paper reviews three main elements of cartilage-bone tissue engineering: seed cell source and culture method, cytokines regulation and synergistic effect, and scaffold components and type. We mainly focused on current status quo and future progress of cartilage-bone repair scaffolds. This paper provides some reference for the further development of osteochondral tissue engineering.

【Key words】 osteochondral defects; tissue-engineering; seeding cells; cytokines; scaffolds

引言

关节软骨在关节的运动中发挥着重要的作用。由机体老化所带来关节软骨退化以及不健康的运动方式和创伤所带来的骨软骨受损等相关疾病已经严重威胁患者的健康, 但由于关节软骨内部缺少神经和血管, 且内部软骨细胞数目较少, 因而关节软骨几乎不具有自我损伤修复的能力^[1]。常见的关节损伤按照其受损程度可以分为: 部分软骨损伤、全层软骨损伤、骨软骨损伤^[2], 如图 1 所示。目前针对关节损伤的治疗, 临床多以手术治疗为

主, 包括有: 关节镜清创术、微骨折术、自体移植术与异体移植术等^[1-4], 如表 1 所示, 这些手术均具有一定的局限性。

近年来, 组织工程的发展与进步为骨软骨损伤修复带来了新的希望。组织工程主要包括三个方面: 种子细胞、生长因子和细胞支架^[5], 其中细胞支架作为细胞生存的载体, 不仅需要提供适合细胞生长、增殖和分化的环境, 在移植后还需不断适应生理环境变化, 满足体内生长需求。

相关研究表明, 软骨损伤和修复均受到软骨下骨的影响, 软骨下骨为软骨修复提供固定支撑和营

DOI: 10.7507/1001-5515.201810001

基金项目: 国家自然科学基金 (11632013); 国家自然科学基金青年科学基金 (11502158); 山西省重点研发计划国际合作项目 (201803D421060)

通信作者: 陈维毅, Email: chenweiyi211@163.com



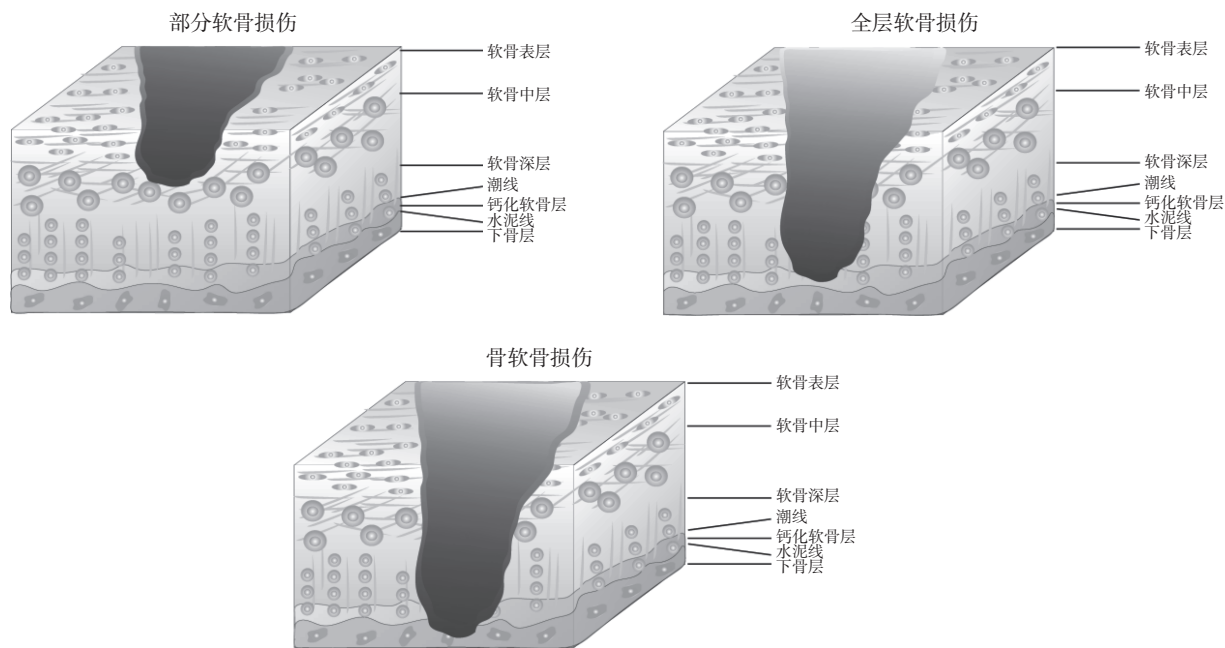


图 1 关节软骨损伤类型

Fig.1 Types of articular cartilage injury

表 1 目前骨软骨缺损的手术治疗方法

Tab.1 Current surgical treatment of osteochondral defects

手术方式	优点	缺点
关节镜微创术	创伤面小、费用低、治疗面较小	修复能力较差
微骨折术	创伤面小、短期修复效果较好、治疗面较小	易生成纤维软骨、几乎不具备长期修复能力
自体移植术	修复效果良好、能够形成透明软骨层、不具备免疫原性、治疗面较大	取材困难、易引发取材部位病灶
异体移植术	修复效果良好、能够形成透明软骨层、治疗面较大、不会引发取材处病灶	易引发免疫排斥反应、手术费用较高

养输送等作用^[6-9]。骨软骨界面构造精细且复杂，两者在解剖结构上相互连接，在生物学功能上彼此影响。骨软骨界面整体呈现连续性，但不同的位置却具有不同结构、力学特性以及生物学特征等，软骨和骨中任一组织的变化都会对彼此产生影响^[8-9]。作为体内植入体的细胞支架应该在设计上考虑到这种复杂性，以期更好地模拟在体结构。现就骨软骨组织工程三个方面：种子细胞、生长因子和细胞支架进行综述，着重介绍骨软骨修复支架的现状和研究进展，以期为骨软骨组织工程的进一步发展提供参考。

1 种子细胞

组织工程选用的种子细胞应满足相关要求，例如：来源广泛、取材方便；细胞活性和增殖能力强；能够与支架良好融合以及免疫原性较低等。目前骨软骨修复所采用的种子细胞有：自体细胞、同种异体细胞和异种细胞等。自体细胞来源于患者自身，不具备免疫原性，但由于存在取材不便、

易引起取材部位的不适和创伤等潜在风险限制了其应用。相较于自体细胞，同种异体和异种细胞的取材来源更为广泛，但是具有一定的免疫风险性^[10]。其中，软骨细胞、成骨细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞和胚胎干细胞等是骨软骨组织工程修复中常选用的种子细胞。

骨软骨受损涉及多种组织和细胞，细胞共培养技术的提出为骨软骨修复提供了一种新的思路。Radhakrishnan 等^[11]制备了双相骨软骨支架，将小鼠软骨细胞和成骨细胞植入该支架，结果表明软骨细胞和成骨细胞分别在对应的支架层中具有良好的分布，且在双相支架的过渡面实现了软骨细胞和成骨细胞共存。研究证实了该培养体系具有较好的软骨细胞分化能力，同时能够降低软骨细胞的凋亡^[12-13]。

相对于体内含量较少、分化成熟的软骨细胞来说，干细胞具有多向分化和较长时间自我更新的能力，因而在骨软骨组织工程领域应用广泛。其中，骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、滑膜间

充质干细胞和胚胎干细胞均为重点研究的种子细胞^[14-15]。Sartori 等^[16]制备了 I 型胶原/镁—羟基磷灰石/I 型胶原的双相骨软骨一体修复支架。结果表明,在 I 型胶原水凝胶层,人类间充质干细胞实现了向软骨细胞分化;而在下层矿化层则向成骨细胞分化。他们进一步将此载有干细胞的复合支架植入小鼠体内,也得到了与体外实验一致的结果,同时支架与组织能够较好地融合,表明该复合支架具有一定的骨软骨修复实用性。

总之,种子细胞的选取在骨软骨修复中起着至关重要的影响。现有技术中,以骨软骨细胞作为种子细胞具有取材不便、含量较少的缺点;而以干细胞作为种子细胞,则存在体外诱导分化、增殖价格昂贵且效率较低的缺陷;而细胞共培养技术则具有成本较低、效率较高的优势,因此也有很多相关实验采用多种细胞共培养的方式,包括有:成骨细胞和软骨细胞共培养体系、成骨细胞与干细胞共培养体系以及软骨细胞与干细胞共培养体系等^[12-13, 17-18]。相关实验证实,共培养体系能够解决种子细胞来源单一的问题,但是由于共培养体系中细胞种植比例以及生长因子的添加均会对研究结果产生各种的影响,仍需要进一步的深入研究。

2 生长因子

生长因子在骨软骨修复中发挥着重要的作用,如骨形态蛋白、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子、血管内皮生长因子、胰岛素生长因子、血小板衍生生长因子等均对成骨细胞、软骨细胞和干细胞的生长和增殖等相关生物学行为具有一定的调控作用^[19-20]。例如:转化生长因子能够诱导骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化,但相关实验证实,只使用转化生长因子并不能够诱导形成与在体相仿的软骨组织,反而会诱导纤维化软骨的形成^[9]。骨形态蛋白能够促进骨生成^[21],但是目前尚不明确其合理使用的剂量范围以及半衰期等。同时,相关研究也报道,骨形态蛋白可能会导致异位成骨以及相关炎症反应等,以上因素在一定程度上限制了生长因子的使用^[22-23]。

为提高生长因子的使用效率,研究者们通常会考虑将其与其它材料复合,制成载生长因子复合材料。Yao 等^[24]利用电泳沉积技术制备了载有骨形态蛋白的石墨烯、聚乳酸—羟基乙酸复合支架。实验结果表明,该载骨形态蛋白复合支架经石墨烯修饰后,复合支架的力学性能明显改善,拉伸强度由原来的 (47.2 ± 8) kPa 提升至 (126.1 ± 6) kPa;体外

释放结果表明,骨形态蛋白可稳定释放,同时释放浓度可通过电压调控,随着电压升高,复合支架释放能力有所提升;细胞实验表明,该复合支架能够诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

Han 等^[25]制备了骨软骨修复支架,在软骨层中添加转化生长因子,其浓度从上至下呈递减趋势,在下骨层中添加骨形态蛋白因子,其浓度从上至下呈递增趋势。体外细胞实验证实,该支架成功诱导骨髓间充质干细胞在软骨层中向软骨细胞分化,在下骨层中向成骨细胞分化。动物实验也证实支架能够较好地与周围组织融合,光镜下可见新生软骨和骨的生成,证实这种复合支架具有良好的骨软骨修复能力。

上述生长因子对骨软骨缺损修复均具有一定的影响,特定条件下能促进骨软骨损伤修复,但生长因子作为一种外源性添加剂,其自身具有多向调控性,这种调控性与其来源、纯度、剂量大小以及种子细胞的种类、分化状态、培养条件及有无其它生长因子等多种因素有关。目前相关实验多采用单一生长因子用于骨软骨修复,实际生理环境是多种生长因子协同调控,此外当前对于生长因子以体外研究居多,缺少在体实验数据等,以上问题均需通过相关实验以确定使生长因子发挥最佳效应的各项条件。

3 细胞支架

理想的细胞支架应具有良好的细胞相容性、合适的降解速率且其降解产物无细胞毒性、适宜的孔隙率和孔径结构、良好的力学性能和三维网络结构以及能够促进细胞生长等优势,并可作为药物和生长因子的载体^[7]。

随着生物材料的不断发展,各种能够更好地满足骨软骨修复的新型材料不断涌现。依照来源的不同,可以分为天然材料和人工合成材料。常用天然材料有:胶原、壳聚糖、丝素蛋白、海藻酸盐、透明质酸、硫酸软骨素、羟基磷灰石、 β -磷酸钙等。天然材料具有良好的生物相容性、低免疫原性、较好的细胞结合能力和生物降解性等,因而受到更多关注,但是天然材料较弱的力学性能限制了其在临床上的应用。

为了较好地模拟骨软骨在体组成和内在结构特点,Levingstone 等^[4]利用迭代分层冷冻干燥技术制备了三层一体化骨软骨修复支架,软骨层采用 I、II 型胶原和透明质酸;中间过渡层采用 I、II 型胶原和羟基磷灰石;软骨下骨层采用 I 型胶

原和羟基磷灰石。实验结果表明,该支架具有较好的孔隙率,且支架孔径整体呈现上大下小,相互贯通,能够较好地模拟在体环境。细胞实验进一步证实,该研究中采用的细胞贯穿生长于整个支架,且实现了细胞增殖,结果证实了该支架能够较好地满足骨软骨一体化修复。然而,该支架的压缩模量远低于正常人体实际情况,具体对比参数为:支架软骨层为 0.3 kPa、中间层为 0.35 kPa、软骨下骨层约为 0.95 kPa;正常人体的软骨浅层、软骨深层、钙化软骨层和软骨下骨的压缩模量分别约为 0.079 MPa、2.1 MPa、320 MPa 和 5.7 GPa^[9],提示该支架的力学性能仍需要进一步加强。

常用于骨软骨修复的人工合成高分子材料包括有:聚乳酸-羟基乙酸、聚乙烯醇、聚乳酸、聚醚醚酮、聚己内酯、聚乙二醇等。人工合成高分子材料能够人为调控材料聚合度,从而控制其力学性能、内在结构等,进而可更好地满足骨软骨修复的实际需求。但是高分子材料大多具有细胞毒性或者其降解产物具有细胞毒性、酸碱性等,以上因素在一定程度上限制了其应用。Du 等^[26]利用选择性激光烧结技术制备了具有分层结构的聚己内酯-羟基磷灰石骨软骨一体修复支架。该支架的整体压缩模量为 8.7 MPa,能够较好地满足骨软骨修复力学要求,细胞实验和体内实验证实该支架具备一定的骨软骨修复应用价值。

作为常见的高分子修复材料之一,聚己内酯具有优异的生物相容性、降解产物不具有细胞毒性以及易加工成形等优点,但是也存在熔点较低、降解速率较慢等问题。为解决单一材料性能的相关弊端,可采用两种或多种材料进行复合,依据其性能互补的特点进行新型复合材料的研究和相关性能探索,以研发更加理想的骨软骨修复材料。

从支架的整体结构和性能进行分类,可以将骨软骨修复支架大致分为三大类:单相支架、双相支架和多相支架。其中的“相”代表其结构、成分、力学性能等,现就这三种支架分别进行相关的综述。

3.1 单相支架

单相支架是用一种或多种材料制备而成,是具有相同结构、成分、力学属性的支架,并最早用于骨软骨修复。单相支架由于整体结构和成分的统一性,通常并不满足骨软骨一体修复的需求,仅单独用于软骨修复或骨修复。

羟基磷灰石作为骨中无机成分的重要组成部分,具有较好的生物活性、骨诱导性和生物相容性,是较早用于骨修复的医用材料之一。但纯羟基

磷灰石支架力学性能较脆、分散性差、生物降解能力相比 β -磷酸钙较弱,很难满足骨修复要求。因而大量研究着重于对其晶体进行改性或者添加相关聚合物使其具有较好的分散能力,同时增强其力学稳定性。实验研究中多用羟基磷灰石与 β -磷酸钙复合形成双相磷酸钙来满足骨修复的需求^[3,27]。

Effendi 等^[28]研究了制备的纯羟基磷灰石经明胶和壳聚糖修饰的羟基磷灰石骨修复单相支架的相关性能,结果表明纯羟基磷灰石支架具有较高的孔隙率以及相互贯通的孔径结构,但其力学性能较差;经壳聚糖和明胶修饰后,支架力学性能具有一定的提升。

胶原是骨、软骨组织主要的有机组分,软骨中 II 型胶原和骨中 I 型胶原含量丰富。实验证实,软骨细胞和成骨细胞在胶原支架上具有较好的细胞相容性以及增殖能力,胶原的存在还能够诱导干细胞向成骨细胞或软骨细胞分化,此外胶原在组织修复过程中也起着重要的作用^[29-30]。但是,纯胶原支架力学性能较差且降解速度较快,不具备支架修复的稳定性,有研究证实可通过添加羟基磷灰石在一定程度上改善胶原支架的稳定性^[31]。

Lin 等^[32]采用低温三维打印技术制备了具有不同结构的胶原-羟基磷灰石复合单相骨修复支架。结果表明,相较于对照组,采用低温三维打印技术所制备的支架能更好地促进骨髓间充质干细胞的增殖能力,同时促进其向成骨细胞分化;在体实验也证实,实验组能够更好地促进新生骨的形成。

综上所述,单相支架可为成骨、软骨细胞的生长提供良好的条件,且能够诱导干细胞定向分化为软骨或成骨细胞,但是骨软骨损伤体系中涉及到不同结构、不同组织,软骨细胞和成骨细胞增殖所需要的生长环境不同,单相支架往往不能同时提供成骨细胞与软骨细胞生长所需的环境,在一定程度上降低了其在治疗关节骨软骨缺损时的效果。

3.2 双相支架

双相支架是用一种或多种材料制备而成,具有两相分层结构,且通常各分层在成分、内在结构以及力学属性等方面均有差异。相较于单相支架,双相支架能够同时满足软骨和软骨下骨的植入和修复要求。双相支架既可以植入成骨、软骨两种细胞,也可以植入同种干细胞,以构建骨软骨修复共同体。

Seong 等^[33]利用定向冷冻干燥法,制备了具有定向对齐孔径结构的胶原和双相磷酸钙复合支架。实验结果表明,具有定向对齐结构的双相支架

其压缩强度和拉伸强度均优于随机结构对照组,同时定向对齐支架的力学性能随着孔径的缩小而提升。值得注意的是,双相磷酸钙的加入提升了复合支架的压缩力学性能,但是其拉伸性能却小于纯胶原对照组。细胞实验证实,定向对齐结构的双向支架中细胞增殖较快、迁移能力较强且细胞铺展较好;在体动物实验证实,与随机结构对照组比较,实验组具有较好的骨软骨修复能力,其中孔径在270 μm 时修复效果最好。以上实验证实,骨软骨修复支架的孔径大小以及结构分布均会对其修复效果产生影响。

Yao 等^[15]通过在聚乙烯醇中加入改性 β -磷酸钙制备骨软骨修复双相支架。力学性能测试结果表明,随着 β -磷酸钙浓度的增加,支架整体力学性能得到了改善;支架的内部结构也能够较好地模拟在体骨软骨结构特点。细胞实验证实,上层支架能够较好地促进软骨细胞的黏附、增殖,下层支架能够较好地诱导滑膜间充质干细胞向成骨细胞的分化。整体实验证实该种双相支架具有一定的骨软骨修复潜在可能性。

Ruan 等^[34]制备了壳聚糖、丝素蛋白、羟基磷灰石双相复合支架,支架相关性分析表明,支架的孔隙率达到90%、吸水性高达822%,能够较好地满足骨软骨支架结构特点,将骨髓间充质干细胞植入支架,相关结果表明干细胞能够定向分化为软骨和成骨细胞,在体动物实验也证实该种支架具有良好的骨软骨修复效果。

综上所述,双相支架能够较好地满足骨软骨修复需求,但一些弊端也不容忽视,如骨软骨界面结合力较差、力学稳定性较弱、骨软骨界面缺失等。大量研究对于潮线以及钙化软骨层的生理作用进行了阐述^[9,35]。双相支架中往往忽视了潮线以及钙化软骨层制备,而钙化软骨层以及潮线是连接软骨和软骨下骨的重要界面结构。潮线以及钙化软骨层的缺失可能会引起支架生物力学分布不均衡以及组织液循环障碍,不利于骨软骨缺损的修复,因此如果采用三相或者多相支架作为骨软骨修复支架,或许可以更好地模拟在体骨软骨界面。

3.3 多相支架

为了更好地模拟在体环境的结构特点,骨软骨一体化修复支架更加倾向于三相以及多相支架的设计。三相以及多相支架通常采用多种材料制备而成,具有三相及以上分层结构,或者支架结构呈整体连续变化,且通常各分层在成分、内在结构以及力学属性等方面均有差异。

为了解决支架界面黏合问题,Su 等^[36]通过定向电泳的方式制备了一体化聚乙烯醇、羟基磷灰石支架。实验表明,羟基磷灰石分散良好,支架的力学性能随着羟基磷灰石的浓度增加有所提升,支架结构呈连续变化,具有整体性,并不存在明显的分层结构。

多相支架的制备和复合方式包括有:迭代冷冻法^[3,37]、力学挤压法^[8]、三维打印^[32,38-39]以及上述的电泳法等。骨软骨修复过程不仅仅与支架的相关结构性能相关,同时也与支架的化学成分以及药物释放相关。Algul 等^[7]利用海藻酸盐、壳聚糖、 β -磷酸钙制备了三层结构的骨软骨修复支架,利用溶剂吸附方式将地塞米松钠磷酸吸附于支架表面,动物实验结果表明,该种支架能够有效地控制药物的释放速率,同时有效地促进骨软骨再生。

现阶段大量骨软骨修复实验均处于体外细胞实验以及动物体内实验阶段,临床实验样本量较少。Perdisa 等^[40-41]利用 I 型胶原和羟基磷灰石制备了三相复合支架,上层支架为 100% 的 I 型胶原;中间支架为 40% 的羟基磷灰石和 60% 的 I 型胶原;下层支架为 70% 的羟基磷灰石和 30% 的 I 型胶原。其临床实验证实,该支架具有良好的骨软骨修复能力。该实验或可为人在体骨软骨修复做出一定的参考。

三相或多相骨软骨修复支架能够较好地模拟正常组织结构分布,更符合组织工程骨软骨复合支架的要求。需要值得关注的是,支架相邻界面的结合强度有待加强,同时对于潮线以及钙化软骨层的设计模拟尚不成熟。

4 总结和展望

近年来,针对骨软骨受损作为临床广泛可见且较为严重的关节疾病这一事实,骨软骨的有效修复和再生一直受到组织工程领域的密切关注。本文系统地阐述了当前骨软骨缺损的治疗方式以及面临的问题,同时着重从组织工程的角度来叙述了骨软骨修复的研究进展以及存在的问题。随着对于骨软骨结构认识的不断深入,组织工程领域已经能够较好地从事种子细胞、生长因子以及支架三个方面模拟体内的生理状态以制备骨软骨支架。但是,由于正常人体骨软骨解剖界面、组分含量的复杂性,目前组织工程尚不能做到成分以及结构的双重仿生。

随着材料与技术的不断发展,新的制备技术如:三维打印技术、静电纺丝技术等,可结合新的支架材料,多学科、多领域合作,综合利用材料学、

生物力学、生理学等相关专业知识跨专业相结合,未来终将解决骨软骨缺损这一临床科学难题。

参考文献

- Huey D J, Hu J C, Athanasiou K A. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*, 2012, 338(6109): 917-921.
- 张学亮, 刘舒云, 郭维民, 等. 骨软骨一体化仿生支架的研究现状与展望. *中国医药生物技术*, 2017, 12(4): 350-355.
- Algul D, Sipahi H, Aydin A, *et al.* Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 79: 363-369.
- Levingstone T J, Matsiko A, Dickson G R, *et al.* A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomater*, 2014, 10(5): 1996-2004.
- Ji Wenchen, Zhang Xiaowei, Qiu Yusheng. Selected suitable seed cell, scaffold and growth factor could maximize the repair effect using tissue engineering method in spinal cord injury. *World Journal of Experimental Medicine*, 2016, 6(3): 58-62.
- Yan Leping, Silva-Correia J, Oliveira M B, *et al.* Bilayered silk/silk-nanoCaP scaffolds for osteochondral tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* assessment of biological performance. *Acta Biomater*, 2015, 12(1): 227-241.
- Algul D, Gokce A, Onal A, *et al.* *In vitro* release and *in vivo* biocompatibility studies of biomimetic multilayered alginate-chitosan/ β -TCP scaffold for osteochondral tissue. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2016, 27(5): 431-440.
- You Baihao, Li Qingtao, Dong Hua, *et al.* Bilayered HA/CS/PEGDA hydrogel with good biocompatibility and self-healing property for potential application in osteochondral defect repair. *Journal of Materials Science & Technology*, 2018, 34(6): 1016-1025.
- 王永成. 一体化关节软骨细胞外基质/羟基磷灰石双相支架构建与骨软骨界面组织工程应用, 北京: 中国人民解放军医学院, 2014
- 张冶金, 全仁夫, 岳振双, 等. 软骨组织工程中种子细胞的研究进展. *中国医药导报*, 2017, 14(23): 36-39.
- Radhakrishnan J, Manigandan A, Chinnaswamy P, *et al.* Gradient nano-engineered *in situ* forming composite hydrogel for osteochondral regeneration. *Biomaterials*, 2018, 162: 82-98.
- Zhang T, Xie J, Sun K, *et al.* Physiological oxygen tension modulates soluble growth factor profile after crosstalk between chondrocytes and osteoblasts. *Cell Prolif*, 2016, 49(1): 122-133.
- Nakaoka R, Hsiong S X, Mooney D J. Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts. *Tissue Eng*, 2006, 12(9): 2425-2433.
- Ng J, Bernhard J, Vunjak-Novakovic G. Mesenchymal stem cells for osteochondral tissue engineering. *Methods Mol Biol*, 2016, 1416: 35-54.
- Yao Hang, Kang Junpei, Li Weichang, *et al.* Novel β -TCP/PVA bilayered hydrogels with considerable physical and bio-functional properties for osteochondral repair. *Biomedical Materials*, 2018, 13(1): 015012.
- Sartori M, Pagani S, Ferrari A, *et al.* A new bi-layered scaffold for osteochondral tissue regeneration: *in vitro* and *in vivo* preclinical investigations. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 70(1): 101-111.
- Chiu L L Y, Bianco J, Giardini-Rosa R, *et al.* Direct and indirect co-culture of bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells with chondrocytes in 3D scaffold-free culture. *Journal of Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, 2016, 5: 1.
- Ehnert S, van Griensven M, Unger M A, *et al.* Co-culture with human osteoblasts and exposure to extremely low frequency pulsed electromagnetic fields improve osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 994-1008.
- Mendes L F, Katagiri H, Tam W L, *et al.* Advancing osteochondral tissue engineering: bone morphogenetic protein, transforming growth factor, and fibroblast growth factor signaling drive ordered differentiation of periosteal cells resulting in stable cartilage and bone formation *in vivo*. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 42-56.
- Khorshidi S, Karkhaneh A. A review on gradient hydrogel/fiber scaffolds for osteochondral regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12(4): e1974-e1990.
- Krishnakumar G S, Roffi A, Reale D, *et al.* Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop*, 2017, 41(6): 1073-1083.
- Brigaud I, Agniel R, Leroy-Dudal J A, *et al.* Synergistic effects of BMP-2, BMP-6 or BMP-7 with human plasma fibronectin onto hydroxyapatite coatings: a comparative study. *Acta Biomater*, 2017, 55: 481-492.
- Sheikh Z, Javaid M A, Hamdan N, *et al.* Bone regeneration using bone morphogenetic proteins and various biomaterial carriers. *Materials*, 2015, 8(4): 1778-1816.
- Yao Q, Jing J, Zeng Q, *et al.* Bilayered BMP2 eluting coatings on graphene foam by electrophoretic deposition: electro-responsive BMP2 release and enhancement of osteogenic differentiation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(46): 39962-39970.
- Han Fengxuan, Li Bin, Yang Huilin, *et al.* Chitosan-gelatin hydrogel/PLGA scaffold with dual-delivery of TGF- β 1 and BMP-2 for osteochondral defect repair. *Journal of Controlled Release*, 2017, 259: e34-e35.
- Du Y, Liu H, Yang Q, *et al.* Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits. *Biomaterials*, 2017, 137: 37-48.
- Wang Yanen, Wang Kai, Li Xinpei, *et al.* 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60: 40 for bone tissue engineering applications. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174870.
- Effendi M D, Gustiono D, Lukmana, *et al.* Comparison on mechanical properties of single layered and bilayered chitosan-gelatin coated porous hydroxyapatite scaffold prepared through freeze drying method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2017, 172(1): 012031.
- Li Ang, Wei Yiyong, Hung C, *et al.* Chondrogenic properties of collagen type XI, a component of cartilage extracellular matrix. *Biomaterials*, 2018, 173: 47-57.
- Tamaddon M, Burrows M, Ferreira S A, *et al.* Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43519-43529.
- Cholas R, Padmanabhan S K, Gervaso F, *et al.* Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 63: 499-505.
- Lin Kaifeng, He Shu, Song Yue, *et al.* Low-temperature additive

- manufacturing of biomimic three-dimensional hydroxyapatite/collagen scaffolds for bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(11): 6905-6916.
- 33 Seong Y J, Kang I G, Song E H, *et al.* Calcium phosphate-collagen scaffold with aligned pore channels for enhanced osteochondral regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(24): 1700966.
- 34 Ruan Shiqiang, Yan Ling, Deng Jiang, *et al.* Preparation of a biphasic composite scaffold and its application in tissue engineering for femoral osteochondral defects in rabbits. *Int Orthop*, 2017, 41(9): 1899-1908.
- 35 Deng B, Wang F, Yin L, *et al.* Quantitative study on morphology of calcified cartilage zone in OARSI 0-4 cartilage from osteoarthritic knees. *Current Research in Translational Medicine*, 2016, 64(3): 149-154.
- 36 Su Cui, Su Yunlan, Li Zhiyong, *et al.* *In situ* synthesis of bilayered gradient poly(vinylalcohol)/hydroxyapatite composite hydrogel by directional freezing-thawing and electrophoresis method. *Materials Science and Engineering: C*, 2017: 76-83.
- 37 Chen Li, Wu Zhenxu, Zhou Yulai, *et al.* Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 2017, 134(37): 45271.
- 38 Nowicki M A, Castro N J, Plesniak M W. 3D printing of novel osteochondral scaffolds with graded microstructure. *Nanotechnology*, 2016, 27(41): 414001.
- 39 Deng C, Zhu H, Li J, *et al.* Bioactive scaffolds for regeneration of cartilage and subchondral bone interface. *Theranostics*, 2018, 8(7): 1940-1955.
- 40 Perdisa F, Filardo G, Sessa A, *et al.* One-step treatment for patellar cartilage defects with a cell-free osteochondral scaffold. *American Journal of Sports Medicine*, 2017, 45(1): 1581-1588.
- 41 Perdisa F, Kon E, Sessa A, *et al.* Treatment of knee osteochondritis dissecans with a cell-free biomimetic osteochondral scaffold clinical and imaging findings at midterm follow-up. *American Journal of Sports Medicine*, 2018, 46(2): 314-321.

收稿日期: 2018-10-04 修回日期: 2019-03-13

本文编辑: 陈咏竹