

以改良方法制作软骨细胞外基质构建高质量组织工程软骨

费 毫,翟晨骏,王 振,张 啸,范卫民*

南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029

[摘 要] **目的:**探讨应用改良方法制作的软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)能否构建高质量组织工程软骨。**方法:**应用传统匀浆-脱细胞方法制作软骨ECM粉末,在此基础上通过物理研磨颗粒筛选获得细腻的软骨细胞外基质粉末(fine extracellular matrix, FECM)。将两种粉末通过冷冻干燥法制成ECM支架和FECM支架作为对照组和实验组。以软骨组织工程中成熟应用的聚乳酸聚羟基乙酸聚合物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]支架为阳性对照组。取等量大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)种植于ECM支架和FECM支架,同时将BMSCs诱导分化为软骨细胞后种植于PLGA支架,然后将3种细胞-支架复合物移植入裸鼠皮下,28 d后取出样本并进行相关检测。**结果:**FECM支架孔径均一,结构规整,其构建的组织工程软骨在大小、色泽、糖胺多糖(sGAG)分泌以及胶原沉积等方面均远优于对照组构建的组织工程软骨,与阳性对照组无明显差异。**结论:**由改良方法制作的FECM支架在无外源性转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)情况下可构建出高质量的组织工程软骨,具有潜在的临床应用价值。

[关键词] 组织工程;软骨细胞外基质;细胞-支架复合物

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-934-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180712

Utilizing cartilage extracellular matrix-derived scaffolds prepared by a modified method for constructing tissue engineered cartilage

Fei Hao, Zhai Chenjun, Wang Zhen, Zhang Xiao, Fan Weimin*

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the capacity of cartilage extracellular matrix-derived scaffolds prepared by a modified method for constructing tissue engineered cartilage. **Methods:** The cartilage pieces were fragmented using two different methods to produce extracellular matrix (ECM) powder and fine extracellular matrix (FECM) powder. ECM scaffold and FECM scaffold were fabricated with ECM powder and FECM powder through freeing and lyophilization technique. Both of ECM and FECM scaffolds were seeded with bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) as the control group and the experimental group. The poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) scaffold were seeded with BMSCs induced to differentiate into chondrocytes as the positive control group. After cultured *in vitro* for 12 h, the cell-scaffold constructs were implanted in the nude mice subcutaneously. The cell-scaffold constructs were harvested and detected on histology and immunohistochemistry at day 28. **Results:** Cell-scaffold constructs of the experimental group grew much better than that of the control group, and similar to the positive control group. More cartilage-like tissues were generated using FECM scaffold and stained strongly for sGAGs and type II collagen. **Conclusion:** FECM scaffold can promote the differentiation of BMSCs into chondrocytes without exogenous transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and have potential of application in tissue engineering cartilage.

[Key words] tissue engineering; cartilage extra matrix; cell-scaffold construct

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):934-939, 987]

[基金项目] 国家自然科学基金(81472079, 81672169)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fanweimin@vip.sina.com

关节软骨缺损的修复一直是临床上亟待解决的难题。利用组织工程技术对软骨组织进行生理性修复是目前较为理想的修复方法之一^[1]。生物材料的选择是软骨组织工程中的一项重要内容,目前

软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)作为组织工程材料已成为研究热点之一。正常关节软骨细胞外基质呈网格状结构^[2-3],主要由Ⅱ型胶原和糖胺多糖构成且包含多种生长因子如转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)等,所以软骨ECM支架可以模拟天然健康组织,适合细胞黏附、迁移和增殖,并提供多种细胞因子^[4]。目前处理软骨ECM的方式主要有匀浆法^[5]、研磨梯度离心法^[6]和胰蛋白酶消化法^[7]等。由这几种方法加工软骨ECM制备成的支架在一定程度上模拟了天然软骨细胞外基质的微环境,但是由于前两种方法加工的ECM颗粒粗糙、粒径较大,内源性生长因子无法充分释放,需要加入外源性生长因子,并且支架微结构杂乱无序、孔径较大,而胰蛋白酶消化法处理要求高,效率低下。因此本实验借鉴上述几种方法并加以改良,应用匀浆-脱细胞-6次冷冻研磨-筛选方法制作出粒径更小更细腻的软骨细胞外基质材料(fine extracellular matrix, FECM),并探讨在无外源性TGF- β 1的作用下,该材料制作的生物支架能否促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向软骨细胞分化构建出高质量组织工程软骨。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雄性裸鼠9只,6周龄,体重18~20 g。雄性SD大鼠4只,2周龄,体重40~45 g(南京医科大学实验动物中心)。雄性山羊12只,8月龄,体重35 kg(南京青龙山实验动物基地)。

苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA、Triton X-100、Tris-HCl、DNA酶I、RNA酶A、碳二亚胺(EDAC)、羧基琥珀酰亚胺(NHS)、戊巴比妥钠、氯胺酮、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、TGF- β 1(Sigma公司,美国);胎牛血清(FBS)、DMEM/F12 1:1培养基、左旋谷氨酰胺、抗坏血酸(Vc)、青霉素、链霉素(Gibco公司,美国);Collagen I和II抗体(Abcam公司,美国);番红O染色试剂盒、DAB显色液、HE染色试剂盒、二甲基亚砜(DMSO,上海碧云天公司)、PLGA(济南岱罡生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 支架的制作

1.2.1.1 软骨的粉碎和脱细胞

支架所用的软骨均在无菌条件下取自8月龄雄性山羊的股骨和髌间沟($n=12$)。首先,使用眼科剪将软骨剪成1 mm×1 mm×1 mm的小软骨块,然后将

小软骨块浸泡入含有3.5%(W/V)PMSF和0.1%(W/V)EDTA的PBS中以抑制蛋白酶的活性,而且其后的所有操作除非特别说明都必须保证在无酶条件下进行。用组织匀浆器将上述混合液匀浆形成软骨悬浊液,离心后弃上清,将沉淀冻干得到软骨细胞基质粉末。随后将上述粉末进行如下脱细胞处理:在含1%Triton X-100的低张Tris-HCl中4℃下振荡12 h,用PBS冲洗后在含有50 U/mL DNA酶I和1 U/mL RNA酶A的10 mmol/L Tris-HCl中继续振荡48 h, pH 7.5, 温度37℃。最后将脱细胞处理的粉末用PBS漂洗,冻干成粉末,此时得到的就是使用传统方法制备的软骨ECM粉末。再将ECM粉末分成两份,取出其中1份置于液氮中冷却20 s,使用组织研磨仪在60 Hz频率下研磨1 min,反复操作6次后经100 μ m细胞筛网筛选即收集到软骨FECM粉末。

1.2.1.2 支架的构建和交联

无论是ECM还是FECM,其支架构建和交联的方法相同。将两种粉末分别使用去离子水制成10%(W/V)悬液,并将悬液加入高2 mm,直径6 mm的模具中,通过单次冻干法制得ECM支架及FECM支架。冻干法制作以及交联过程简述如下,首先将悬液在-20℃下预冻1 h, -80℃下预冻1 h,然后放入冷冻干燥机冻干48 h。将冻干后的支架放入含14 mmol/L EDAC和5.5 mmol/L NHS的化学交联剂中4℃交联48 h, PBS冲洗掉过量的交联剂。随后将支架放于-80℃预冻20 min再次冻干脱水,最后得到高2 mm、直径6 mm的ECM支架和FECM支架。聚乳酸聚羟基乙酸聚合物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]支架目前已经商品化,是目前应用研究最广泛、最具成果之一的一种生物相容性良好的可降解材料,安全无毒,已被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于医用支架和药物缓释体。目前已经有很多研究将PLGA应用于软骨组织工程技术中,得到的结果也较为理想,所以PLGA是一种被广泛认可的软骨组织工程材料。因此,本研究将PLGA支架设为阳性对照组。本研究所使用的PLGA支架,其聚乳酸和聚羟基乙酸的比例为3:1,纤维直径为15 μ m,孔径大小为(150 \pm 35) μ m,孔隙率为(85 \pm 10)%。在使用前将PLGA支架裁剪为大小为6 mm×6 mm×2 mm的立方体。将制作好的ECM支架、FECM支架和PLGA支架用环氧乙烷消毒备用。

1.2.2 细胞外基质支架的特性

1.2.2.1 形态学观察

用锋利的刀片将ECM支架和FECM支架从正

中切开,以观察支架的内部结构。将切出的支架横截面朝上置于铜台上,喷金,使用扫描电镜(SEM)观察。测量支架上小孔的孔径,每种支架至少测量3个样品,每个样品至少测量15个孔。

1.2.2.2 孔隙率及吸水率

孔隙率测定:选用一带有刻度的试管,装入无水乙醇,得初始乙醇体积 V_1 ;将两种支架各8个样本切成相同大小浸入其中5 min,接负压吸引脱气,使乙醇充盈于多孔支架的孔中,至无气泡逸出,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 。按公式孔隙率 $E=(V_3-V_1)/(V_2-V_1)$ 计算,每个样本测试3次,取平均值。吸水率测定:两种支架各8个,浸于去离子水中室温下放置10 min取出,悬挂在桌面上1 min至没有水滴滴落,称质量 m ,然后将支架在50℃的真空干燥箱内干燥12 h,取出后称质量 m_1 ,吸水率 $X=(m-m_1)/m$,每个样本测3次,取平均值。

1.2.2.3 细胞毒性检测

为检测在支架制作过程中残留的试剂是否会产生细胞毒性,选取FECM支架采用CCK-8法细胞毒性进行检测(因为ECM支架和FECM支架脱细胞过程完全相同,故在此选用FECM支架)。过程简述如下,在96孔板中加入BMSCs(3×10^3 个,200 μ L),然后分别予不同浓度的支架浸出液(0%、25%、50%、100%)进行培养,1~6 d后每孔加入10 μ L CCK-8溶液。经过1 h的孵育,使用酶标仪在450 nm处测定吸光度,每个浓度设5个复孔。支架浸出物的制作如文献^[8]所示。

1.2.3 体外细胞实验

1.2.3.1 BMSCs的提取

取4只雄性SD大鼠(2周龄),断髓法处死,在无菌条件下分离并完整剪下双侧股骨和胫骨,用1 mL注射器吸入含肝素的生理盐水反复冲洗髓腔采集骨髓液,经细胞过滤筛滤后接种于细胞培养皿,在环境为5% CO₂、37℃的细胞培养箱中培养。待原代细胞贴壁后24、48、72 h各全量更换培养液1次,以后每2~3 d换液1次。取第3代BMSCs,通过流式细胞学分析鉴定BMSCs纯度>95%。

1.2.3.2 BMSCs的诱导分化

采用化学软骨诱导培养基对第3代BMSCs进行诱导分化。此培养基主要包含:DMEM/F12(1:1)、100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素、20% FBS、0.1 mmol/L磷酸抗坏血酸酯、40 mg/mL羟脯氨酸、0.1 μ mol/L地塞米松、10 ng/mL TGF- β 1、25 ng/mL碱

性成纤维细胞生长因子(bFGF)、ITS+1(10 mg/mL胰岛素、5.5 mg/mL转铁蛋白、5 ng/mL硒、0.5 mg/mL牛血清白蛋白、4.7 mg/mL亚油酸)。诱导过程为21 d,每7 d换液2次。

1.2.3.3 细胞种植

首先将消毒备用的ECM支架和FECM支架及阳性对照PLGA支架于DMEM/F12培养液浸泡1 h,取出支架并用无菌纱布将支架中培养液吸出。然后将50 μ L BMSCs细胞悬液(1×10^6 个)用微量上样器分别缓慢滴入支架,并将细胞-支架复合物放置于24孔板中,每孔缓慢加入1.5 mL完全培养液(DMEM/F12,含10% FBS)并转移入细胞培养箱培养,使细胞黏附于支架上。12 h后,将细胞-支架复合物后植入裸鼠皮下。PLGA支架所加细胞为诱导分化的BMSCs,培养液为化学软骨诱导培养基。

1.2.4 皮下支架植入和形态学观察

根据移植物的不同,将体内实验分为3组:①实验组:未经诱导的BMSCs+FECM支架;②对照组:未经诱导的BMSCs+ECM支架;③阳性对照组:经过诱导(外源性TGF- β 1)21 d的BMSCs+PLGA支架。每组随机分配3只裸鼠(雄性,6周龄),每只裸鼠皮下植入4个细胞支架复合物。

操作过程简述如下:用戊巴比妥钠将裸鼠麻醉后,碘伏消毒裸鼠背部,并于中央处将背部皮肤切开一长约2 cm的切口。将细胞-支架复合物小心移植入裸鼠背部皮下后将背部皮肤缝合。术后无并发症以及不良反应发生。在术后第28天通过过量麻醉处死裸鼠,分别取出每组裸鼠皮下样本,观察样本的形状、色泽、表面光滑度等情况。

取出部分组织和支架样品放入0.5 mol/L EDTA中脱钙。用10%多聚甲醛固定,经过乙醇梯度脱水后用石蜡包埋,切4 μ m薄片。HE染色观察细胞的分布和形态,番红O染色观察糖胺多糖(sGAG)的分泌。为了进一步确认组织工程软骨中特异性蛋白的表达,对样本进行I型胶原和II型胶原免疫组织化学分析。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS11.0软件进行处理,统计方法采用成组设计的 t 检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

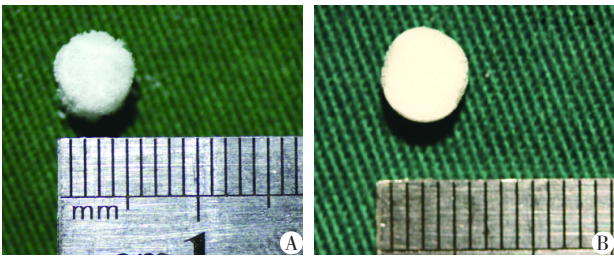
2 结果

2.1 两种ECM支架各项指标检测

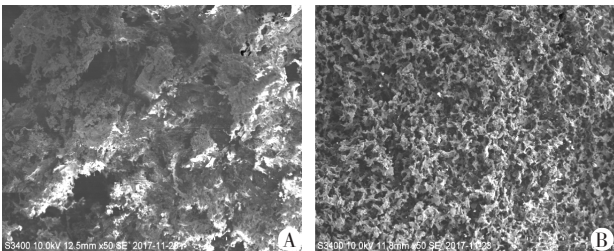
2.1.1 支架材料的形态学观察

肉眼观察发现ECM支架表面比较粗糙,间隙较

大,支架边缘毛糙,而FECM支架表面比较细腻,间隙较小,支架边缘也更加光滑(图1)。电子扫描显微镜观察可见,ECM支架(图2A)的孔径较大,分布杂乱,每个孔多呈不规则形状,大小差异大,边缘粗糙杂乱,丝状物较多,孔与孔之间的连接较少。而FECM支架(图2B)的孔径相对较小,整齐规则,孔隙近似圆形,差异小,边缘光滑平整,无丝状物或絮状物,大孔与大孔之间存在许多小孔相互连接。Image J的测量结果显示ECM支架的孔径为 $(239.082 \pm 76.703) \mu\text{m}$, FECM支架的孔径为 $(69.492 \pm 17.316) \mu\text{m}$,两者差异有统计学意义(表1)。



A:ECM 支架;B:FECM 支架。
图1 ECM 支架和FECM 支架的大体观察
Figure 1 Observation of ECM scaffold and FECM scaffold



A:ECM 支架;B:FECM 支架。
图2 ECM 支架和FECM 支架的电镜观察(×50)
Figure 2 SEM of ECM scaffold and FECM scaffold(×50)

2.1.2 支架的孔隙率、吸水率

FECM 支架的孔隙率为 $(83.63 \pm 0.27)\%$,吸水率为 $(1\,763.2 \pm 103.1)\%$,而ECM 支架的孔隙率为 $(92.11 \pm 0.92)\%$,吸水率为 $(2\,156.3 \pm 276.9)\%$ (表1)。两种支架的孔隙率和吸水率均在正常范围内,适合细胞的黏附生长。

表1 两种支架的孔径大小、吸水率以及孔隙率

Table 1 The pore size, water absorption and porosity of ECM scaffolds and FECM scaffolds (n=8)

支架	孔径(μm)	吸水率(%)	孔隙率(%)
ECM	239.082 ± 76.703	2 156.3 ± 276.9	92.11 ± 0.92
FECM	69.492 ± 17.316*	1 763.2 ± 103.1	83.63 ± 0.27

与ECM组比较,*P<0.05。

2.1.3 支架的细胞毒性检测

因为两种支架脱细胞过程完全一致,故选用FECM 支架作为研究对象,使用CCK-8法检测细胞毒性,如图3显示,FECM 支架对BMSCs无细胞毒性。

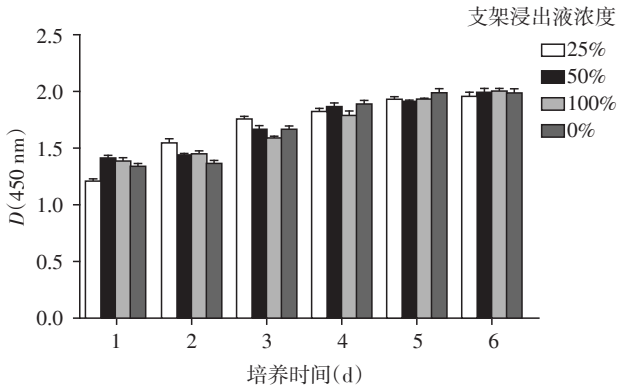


图3 FECM 支架的细胞毒性检测
Figure 3 Cytotoxicity of FECM scaffold

2.2 体内实验

2.2.1 大体观察

实验组样本更加圆润规则,形态饱满,无萎缩塌陷现象发生,而且色泽均匀呈类似正常软骨的瓷白色(图4A)。但是对照组样本形状不规则,出现了萎缩塌陷,其色泽与正常软骨组织也有较大差异(图4B)。说明FECM 支架构建的组织工程软骨质量更高。实验组和阳性对照组(图4C)对比发现二者外形比较饱满,表面光滑,色泽均一。

2.2.2 组织学检测和免疫组化分析

HE 染色以及番红 O 染色组织学观察:实验组(图5A、D)和阳性对照组(图5C、F)软骨细胞增殖旺盛,排列紧密,分布均匀,细胞周围有大量细胞基质,有软骨陷窝形成,细胞基质中含有大量糖胺多糖,分布同样均匀致密;而对照组(图5B、E)细胞密度低,排列分散,基质分布不均匀,成碎片状,也无软骨陷窝形成,同时其细胞基质中糖胺多糖含量稀少。

免疫组织化学染色结果显示:实验组(图6A、D)和阳性对照组(图6C、F)Ⅱ型胶原免疫组化均呈阳性,且实验组染色较深,分布广阔均匀,而两组中Ⅰ型胶原染色浅,分布较少。对照组(图6B、E)中Ⅱ型胶原染色浅,Ⅰ型胶原染色较深。

3 讨论

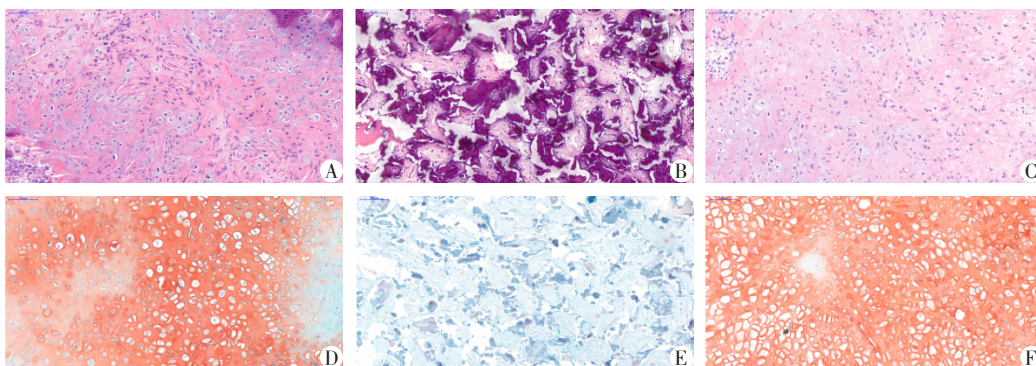
各种原因引起的关节软骨损伤是临床常见疾病。由于软骨组织中缺少神经、血管等,一旦损伤很难自我修复。目前常用的治疗手段包括自体骨



A: 实验组; B: 对照组; C: 阳性对照组。

图4 皮下种植28 d后细胞-支架复合物的大体观察

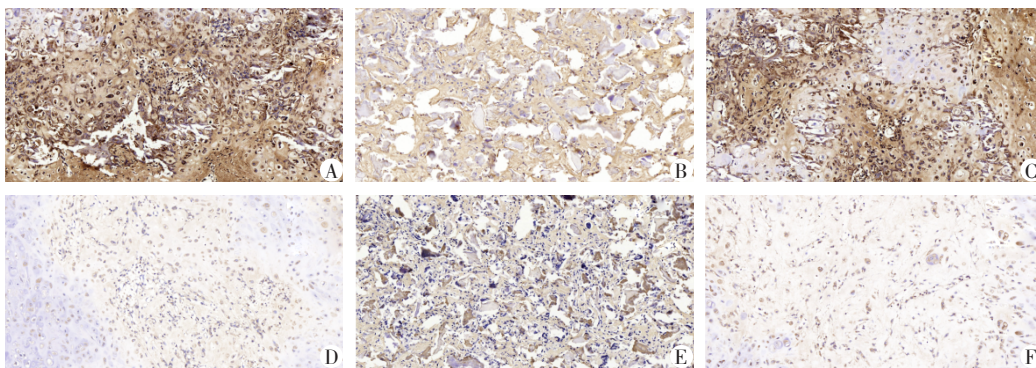
Figure 4 Observation of cell-scaffold constructs at day 28 after implanted in the nude mice subcutaneously



A、B、C: HE 染色; D、E、F: 番红 O 染色。A、D: 实验组; B、E: 对照组; C、F: 阳性对照组。

图5 细胞-支架复合物的组织学检测(×200)

Figure 5 Histology of cell-scaffold constructs(×200)



A、B、C: II 型胶原免疫组织化学染色; D、E、F: I 型胶原免疫组织化学染色。A、D: 实验组; B、E: 对照组; C、F: 阳性对照组。

图6 细胞-支架复合物的免疫组织化学检测(×200)

Figure 6 Immunohistochemistry of cell-scaffold constructs(×200)

软骨移植、自体软骨细胞移植、微骨折术等。这些方法在短期内具有一定的效果,但从长远来看疗效不理想。组织工程技术作为治疗手段之一,有着非常广阔的应用前景^[1]。早期人们使用传统天然(如海藻酸盐^[9]、壳聚糖等^[10])或人工合成[如 PLGA^[11]、聚乳酸(poly lactic acid, PLA)^[12]等]的高分子材料制作软骨支架,虽然其生物相容性和力学性能较好,但是由于这一类支架降解速率不均一,降解过程中容易产生弱酸性环境^[13],而且不含任何细胞生长因

子,使其应用受到了限制。本研究中 PLGA 为应用比较成熟的一种人工合成高分子材料,然而其必须依靠外源性 TGF- β 1 诱导 BMSCs 向软骨细胞分化^[14]。

随着组织工程技术的发展,支架材料的选择不断更替。ECM 作为材料制作支架也已成为主要方式之一。有不同研究团队分别应用匀浆法、研磨梯度离心法或者胰蛋白酶消化法加工 ECM,但是这些方法都存在一定缺陷,比如匀浆法中无脱细胞过程,无法解决免疫排斥问题;单独使用匀浆法或者

研磨梯度离心法得到的ECM颗粒精细度较差,颗粒粒径过大而且大小不一,最高可达400 μm ^[15],用该ECM颗粒制作的支架内部结构松散紊乱,并影响内源性细胞因子的释放。而胰蛋白酶消化法通常用于制作凝胶支架^[16],其设计要求较高,需要注意维持凝胶状态下支架的各种物理化学性质,应用过程相对繁琐复杂,效率有待提高,而且ECM中的各种生长因子容易被胰蛋白酶水解而失去作用。

通过借鉴国内外的研究方法,本研究团队加以改良,应用匀浆-脱细胞-6次冷冻研磨-筛选方法制作出了颗粒更加微小细腻的FECM,并应用FECM支架构建了组织工程软骨。结果显示实验组组织工程软骨内细胞密度与阳性对照组相仿,并明显高于对照组,细胞分布均匀,被大量细胞外基质包围,融合成片,可见软骨陷窝。说明在无外源性TGF- β 1刺激诱导下,FECM支架促进BMSCs分化速度、增殖数量可达到阳性对照组中经过外源性TGF- β 1刺激诱导的同一水平,明显高于对照组,即FECM支架可以有效促进BMSCs向软骨细胞分化,并促进其生长增殖。本实验结果还表明实验组组织工程软骨中糖胺多糖和Ⅱ型胶原染色较深,含量较多,明显高于对照组,甚至超过阳性对照组。糖胺多糖和Ⅱ型胶原是关节软骨基质的主要成分,其含量高低代表软骨质量好坏。上述实验结果证明FECM支架能够促进软骨细胞分泌基质,从而提高软骨质量。

FECM支架在构建组织工程软骨方面表现出了较好性能,主要原因如下:① FECM颗粒细腻,粒径小于100 μm ,增加了材料和细胞的接触面积,有利于材料中内源性TGF- β 1以及其他细胞因子的充分释放,有效促进了BMSCs向软骨细胞的分化;② FECM颗粒均匀,大小统一,由其制备而成的支架微结构更加规则,孔隙排列整齐均一呈网格状,更好地模拟了天然软骨细胞外微环境,有利于细胞的黏附、生长以及增殖,其构建的组织工程软骨质地密实,不会产生基质碎片化现象;③ 由于FECM完全不含有细胞成分,成功解决了免疫排斥问题^[17],而且FECM来源于天然软骨,可以直接成为构建组织工程软骨基质的原材料,避免了支架降解性这一问题。另外,采用FECM支架无需额外添加含有TGF- β 1的化学软骨诱导培养基对BMSCs进行体外长时间诱导,大大节省了人力物力财力。

机械力学性能是软骨组织工程支架的一项重要内容,良好的力学性能有利于维持支架内部微结构,从而有利于细胞的黏附、生长和增殖。而且在

负重关节内,支架力学性能对组织再生起到至关重要的作用。但本研究中不论是ECM支架还是FECM支架,其机械力学性能仍有不足,是否能够通过添加其他材料或改变制作方法解决此问题还需在今后的研究中探讨。

[参考文献]

- [1] Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage[J]. *Biomaterials*, 2016, 98(1): 1-22
- [2] Coburn J, Gibson M, Bandalini PA, et al. Biomimetics of the extracellular matrix: An integrated three-dimensional fiber-hydrogel composite for cartilage tissue engineering [J]. *Smart Struct Syst*, 2011, 7(3): 213-222
- [3] Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, et al. Basic science of articular cartilage [J]. *Clin Sports Med*, 2017, 36(3): 413-425
- [4] Han EH, Chen SS, Klisch SM, et al. Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage [J]. *Biophys J*, 2011, 101(4): 916-924
- [5] Almeida HV, Liu Y, Cunniffe GM, et al. Controlled release of transforming growth factor-beta3 from cartilage-extra-cellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(10): 4400-4409
- [6] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for *in vivo* cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(15): 2378-2387
- [7] Liu M, Zeng X, Ma C, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 17014
- [8] 郭宏磊,孙静雅,蔡梁婧,等.壳聚糖/明胶/卡拉胶支架材料的细胞毒性检测研究[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2014, 23(9): 725-728
- [9] Beigi MH, Atefi A, Ghanaei HR, et al. Activated platelet-rich plasma improves cartilage regeneration using adipose stem cells encapsulated in a 3D alginate scaffold [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, doi: 10.1002/term.2663
- [10] Rodriguez-Vazquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zuniga R, et al. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 821279
- [11] Zhang Y, Zhang J, Chang F, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defect using stem cell-encapsulated thermogel [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 88 (下转第987页)

种类还很有限,还不能完全代替传统的药物敏感性试验方法,但基因芯片技术与传统药敏方法相比明显缩短检测时间,仅需5~6 h,且自动化程度高,易于标准化。2017年以来江苏省全面实施结核病分级诊疗综合防治服务模式,全面推广应用耐药结核病新诊断技术,对于地市级基因芯片技术检测结果为利福平敏感时,不再进行传统(或液体)药敏试验;对于基因芯片检测为利福平耐药或耐多药时,及时给予二线药物治疗,同时取这些患者痰标本进行二线传统(或液体)药敏试验,检测对其他二线药物的敏感性,及时调整患者治疗方案。

[参考文献]

- [1] WHO. Global tuberculosis report[R]. 2016
- [2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室.2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志,2012,34(8):485-508
- [3] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23):2161-2170
- [4] 李桂莲,张敬蕊,赵秀芹,等. 结核分枝杆菌对异烟肼和利福平的耐药水平与其耐药基因突变的相关性研究[J]. 中国防痨杂志,2012,34(6):354-359
- [5] Van Soolingen D, De Haas PE, Van Doorn HR, et al. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands[J]. J Infect Dis, 2000, 182(6):1788-1790
- [6] Niehaus AJ, Mlisana K, Gandhi NR, et al. High prevalence of *inhA* promoter mutations among patients with drug-resistant tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0135003
- [7] Abate D, Tedla Y, Meressa D, et al. Isoniazid and rifampicin resistance mutations and their effect on second-line anti-tuberculosis treatment [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2014, 18(8):946-951
- [8] Müller B, Streicher EM, Hoek KG, et al. *inhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(3):344-351
- [9] 陈明亭,李仁忠,阮云洲. 耐多药结核病防治标准化培训教程[M]. 北京:人民卫生出版社,2015:53-54
- [10] 羊海涛,陆伟,竺丽梅. 耐药结核病的治疗与控制[M]. 北京:军事医学科学出版社,2014:88-89
- [11] WHO. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis[Z]. 2016
- [12] 肖和平. 耐药结核病化学治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:101-102
- [13] Katiyar SK, Bihari S, Prakash S, et al. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multidrug-resistant tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2008, 12(2):139-145
- [14] Herrera L, Valverde A, Saiz P, et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 23(6):572-576
- [15] Wade MM, Volokhov D, Peredelchuk M, et al. Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 49(2):89-97
- [16] Chihota VN, Müller B, Mlambo CK, et al. Population structure of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in South Africa [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3):995-1002

[收稿日期] 2017-11-22

(上接第939页)

- (1):79-87
- [12] Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, et al. Poly(lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 107:247-276
- [13] 杨亮亮. 赖氨酸对电纺 PLGA 超细纤维降解的 pH 调控及生物相容性研究[D]. 湖南:东华大学,2015
- [14] Yamagata K, Nakayamada S, Tanaka Y. Use of mesenchymal stem cells seeded on the scaffold in articular cartilage repair[J]. Inflamm Regen, 2018, 38(1):4
- [15] Almeida HV, Cunniffe GM, Vinardell T, et al. Coupling freshly isolated CD44 (+) infrapatellar fat pad-derived stromal cells with a TGF-beta3 eluting cartilage ECM-derived scaffold as a single-stage strategy for promoting chondrogenesis [J]. Adv Healthc Mater, 2015, 4(7):1043-1053
- [16] El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges [J]. Glob Cardiol Sci Pract, 2013, 2013(3):316-342
- [17] 鹿亮,郭全义,杨启友,等. 异种关节软骨脱细胞基质支架的免疫反应研究[J]. 中国矫形外科杂志,2010,18(1):58-62

[收稿日期] 2018-04-03