论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2028-05

透明软骨材料经脱细胞处理后细胞外基质成分变化的比较

谭洪波[1*],段小军[1*],杨 柳[1],徐永清[2],丁 晶[2],杨 军[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科[1];650032 昆明,解放军昆明总医院全军骨科研究所[2])

[摘要] **目的** 比较Triton X-100和十二烷基硫酸钠(SDS)试剂对人关节软骨脱细胞处理后细胞外基质成分的变化,指导筛选适宜的制备。**方法** 首先制备人关节软骨微粒,再采用两种不同试剂分别作用于软骨细胞微粒,清洗和消化步骤相同,脱细胞完成后分别进行DNA、总氨基酸及总胶原和葡萄糖胺聚糖(GAG)含量检测,分为Triton X-100组和SDS组,并与对照组(正常软骨组织)进行基质成分的比较分析。**结果** Triton X-100组、SDS组和对照组经脱细胞处理后其GAG含量分别为(84.71±3.72)、(122.63±6.05)、(232.78±75.33)μg/mg,羟脯氨酸含量分别为(24.92±1.74)、(24.23±1.68)、(24.54±2.99)μg/mg,DNA含量分别为(0.242±0.065)、(0.225±0.057)、(5.679±1.873)μg/mg。**结论** Triton X-100和SDS两种试剂均能将软骨微粒中软骨细胞成分有效去除,胶原成分保留量在两组中无明显差异;但是应用SDS行脱细胞处理后能保留更多的GAG成分,更有利于维持软骨细胞功能,是较好的材料制备技术。

[关键词] 组织工程;软骨;软骨细胞;支架材料
[中图法分类号] R322.72; R329-33 [文献标志码] A

Alteration of extracellular matrix in decellularized articular cartilage treated by different technologies

Tan Hongbo[1], Duan Xiaojun[1], Yang Liu[1], Xu Yongqing[2], Ding Jing[2], Yang Jun[2] ([1]Center for Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Institute of Orthopaedics, General Hospital of Kunming Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the changes of extracellular matrix in decellularized articular cartilage treated by Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate(SDS) to optimize the suitable preparation. **Methods** First, cartilage particles were prepared, then the two reagents was used to treat the cells of cartilage particles respectively, with the same experimental procedures of rinsing and digestion. After decellularization, the contents of DNA, amino acid, collagen and glycosaminoglycan (GAG) were measured, and the results were compared with those of the normal cartilaginous tissue. **Results** After decellularization, the GAG contents were 84.71±3.72 and 122.63±6.05 μg/mg respectively in the extracellular matrix of articular cartilages treated by Triton X-100 and SDS, while that was 232.78±75.33 μg/mg in the extracellular matrix of normal cartilaginous cells. Hydroxyproline content was 24.92±1.74 and 24.23±1.68 μg/mg respectively after the decellularization, and that in the normal matrix was 24.54±2.99 μg/mg. DNA content was 0.242±0.065 and 0.225±0.057 μg/mg respectively, and that in the normal one was 5.679±1.873 μg/mg. **Conclusion** Cell components are removed effectively from cartilage particles by both Triton X-100 and SDS without obvious difference of collagen remains. While SDS reserves more GAG components and is more helpful to maintain the cartilage cells' function. So SDS decellularization is a better preparative technique for tissue engineering.

[**Key words**] tissue engineering; cartilage; chondrocyte; scaffold

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071484), the Starting Fund for Scholars Returning From Overseas of Chongqing (CSTC2011BB5042) and the Project of General Hospital of Kunming Military Command (201303013). Tan Hongbo and Duan Xiaojun are the first authors who contributed equally to this work. Corresponding author: Yang Liu, Tel:86-23-68765280, E-mail:jointsurgery@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071484);重庆市回国人员启动基金(CSTC2011BB5042);解放军昆明总医院院管课题(201303013)
* 同等贡献者
[通信作者] 杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1558.020.html(2013-06-19)

目前软骨组织工程支架构建主要是采用合成材料或天然材料[1-2]。合成材料具有可以任意剪裁和无限量供应的优势,并且不存在免疫问题,但合成材料细胞亲和力差,其疏水特性和酸性降解产物在体内易引起炎症反应,不利于细胞的粘附和生长[3]。天然材料生物相容性好,结构成分为细胞自身的细胞外基质,有利于种子细胞的生长、增殖及分化,对细胞的形态、表型和细胞的运动具备生理作用[4]。理想的软骨组织工程材料研制是尽量满足仿生设计,即模拟天然软骨细胞外基质的成分和结构,为接种的软骨细胞提供仿生的细胞外环境,以及软骨细胞最适宜的生长分化再生环境[5]。目前对脱细胞基质的研究表明,脱细胞基质去除了抗原性的细胞成分,保留了细胞外基质的大部分成分及结构,可能具备更好的应用前景。本研究基于前人对软骨的脱细胞处理[6],分别采用两种脱细胞试剂对粉碎的软骨进行脱细胞处理,并对制备材料进行相关检测,旨在为探索制备骨软骨脱细胞基质支架创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Triton X-100、Na_2HPO_4、EDTA、PMSF、十二烷基硫酸钠(SDS)、Hochest33258、DAPI、硫酸软骨素牛胸腺DNA、二甲基亚甲蓝、木瓜蛋白酶、番红O、固绿、甲苯胺蓝(Sigma公司,美国),Tris(Novon, 美国),DNase、RNase(Worthington,美国),Ⅱ型胶原鼠抗人单克隆抗体、免疫组织化学试剂盒(博士德公司,中国)。

1.1.2 配制试剂 ①配制10 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)。②配制Triton X-100液:取Triton X-100 1 mL,加入10 mmol/L Tris-HCl缓冲液99 mL中,搅拌充分溶解,滤器除菌后4 ℃保存备用。③配制2% SDS液:取2% SDS 2 mL,加入10 mmol/L Tris-HCl缓冲液99 mL中,充分溶解,除菌后备用。④配制DNase和RNase混合液:分别称取0.2 mol/L氯化镁9 mL、0.2 mol/L氯化钙1 mL和0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液22 mL混合后加水至40 mL,配制缓冲液;然后分别取2 000 U DNase和40 U RNase溶于前述缓冲液。⑤配制木瓜蛋白酶消化液:取12.5 mg木瓜蛋白酶、0.878 g左旋半胱氨酸盐酸、3.58 g Na_2HPO_4及0.186 g Na_2EDTA,混合后加蒸馏水至100 mL,调整pH值为7.5。配成消化液终含量:5 mmol/L盐酸半胱氨,100 mmol/L磷酸钠,5 mmol/L Na_2EDTA,125 U/mL木瓜蛋白酶。⑥配制Hochest33258液体:称取10 mg Hochest33258粉剂溶于1 mL PBS 0.01 mol/L溶液中,制备成10 mg/mL的母液。放置于4 ℃冰箱避光保存,使用时用0.01 mol/L PBS稀释成10 μg/mL使用。⑦配制DAPI液:用0.01 mol/L PBS配制成10 μg/mL DAPI染液于4 ℃避光保存。⑧配制蛋白酶抑制剂:348.4 mg PMSF溶于20 mL异丙醇中配制成0.1 mol/mL PMSF溶液,将100 μL 0.1 mol/mL的PMSF液及10 mg EDTA加入0.01 mmol/L Tris-HCl液中,4 ℃保存。⑨配制三羟甲基氨基甲烷氯化钠EDTA缓冲液(10TNE):取12.11 g Trisbase,116.89 g NaCl及3.72 g Na_2EDTA溶于800 mL蒸馏水,用盐酸调整pH值为7.4,再加蒸馏水稀释至1 000 mL。⑩配制小牛胸腺DNA标准:以1 mg/mL的浓度把标准DNA试剂溶于TNE缓冲液,4 ℃存放,3个月内使用。

1.2 方法

1.2.1 关节透明软骨准备 在超净台条件下用手术刀片切取新鲜尸体膝关节透明软骨,以4 ℃冰PBS液冲洗3次,将软骨组织置于含蛋白酶抑制剂的10 mmol/L Tris-HCl液中,3 000 r/min离心机清洗3遍后置于含蛋白酶抑制剂的10 mmol/L Tris-HCl液中备用。

1.2.2 软骨微粒脱细胞 参照文献[7]方法并进行改进,将清洗后备用的软骨组织置于含蛋白酶抑制剂的冰Tris-HCl(10 mmol/L)液中,低温组织粉碎机粉碎组织,经100目滤网筛选软骨微粒,取滤网滤过的微粒7 000 r/min离心,弃去上清液,余下的沉渣为实验需要微粒。其直径小于10 μm。将制备的软骨微粒随机选出10等份,设为1~10组,分别作为Triton X-100组和SDS组,而未脱细胞的软骨微粒设为对照组。将第1~5组软骨微粒,离心后加入1% Triton X-100 Tris-HCl缓冲液(pH 7.5),第6~10组加入含2% SDS Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)。缓冲液内含蛋白酶抑制剂,于恒温震荡机上震荡8 h,去除细胞成分,7 000 r/min,4 ℃,7 min,离心后PBS液冲洗3遍。冲洗后软骨微粒在消化酶(1 U/mL RNase A,50 U/mL DNase Ⅰ)液中消化12 h,37 ℃,轻微搅拌,离心后0.01 mol/L PBS液反复冲洗,称量软骨微粒湿质量,将沉淀配成5%(质量体积比)软骨脱细胞基质浆。

1.2.3 软骨脱细胞微粒组织学评估 (1)光镜观察:将软骨脱细胞基质浆均匀涂抹于载玻片上,在显微镜下观察脱细胞软骨微粒微观结构。(2)组织学评估:①切片准备:软骨脱细胞微粒离心沉淀,置于20 mL 10%中性福尔马林溶液固定12 h,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片。抹片制备:将软骨脱细胞浆300 μL涂抹在载玻片上,自然风干。②常规HE染色。③甲苯胺蓝染色:切片晾干后,1%甲苯胺蓝醋酸溶液染色10 min,水洗,逐级酒精脱水,二甲苯透明,封片观察。④番红O染色:0.01 mmol PBS液漂洗切片3遍,置于苏木精染液染色3 min,分化、水洗返蓝,浸入3%亮绿染液染色5 min,水洗,0.1%番红O染色5 min,水洗,常规酒精脱水、透明、封片观察。⑤Hochest33258染色:PBS漂洗已固定的切片3遍,点加Hochest33258染色液染色5 min,吸出染液,0.01 mmol PBS洗涤3次,每次5 min,荧光显微镜下观察照相。⑥DAPI染色:PBS漂洗已固定的切片3遍,点加DAPI染色液染色5 min,吸出染液,0.01 mmol PBS洗涤3次,每次各5 min,荧光显微镜下观察照相。

1.2.4 软骨脱细胞成分定量检测 (1)葡萄糖胺聚糖(glycosaminoglycans, GAG)含量测定:称取冻干后支架组织3~5 mg,加入125 μg/mL木瓜蛋白酶1 mL置入Eppendorf管中水浴中裂解24 h,60 ℃。正常关节透明软骨冻干组织做对照。采用二甲基亚甲蓝(dimethylmethylene blue, DMMB)法测量,GAG中的硫酸软骨素与二甲基亚甲蓝染料结合后,紫外分光光度计检测计数。绘制标准曲线:试管中各加入100 μL含10、20、40、60、80 μg硫酸软骨素的标准液,空白对照中加入去离子水

100 μL。试管中各加入二甲基亚甲蓝3 mL,然后将每份标准液加入干净的石英杯内,分别紫外分光光度计480 nm比色,制作标准曲线。同法逐一检测待测样品。标本处理及检测:取裂解液100 μL加入3 mL DMMB,480 nm波长紫外分光光度计下测量吸光度值[D(480)],与标准比较后,得出单位质量支架中GAG含量。(2)总氨基酸测定及总胶原(Col Ⅱ)含量测定:氨基酸含量分析[4]:将各层组织低温冻干后,准确称取2.0 mg于水解管内,加入5 mL 6 mol/L HCl,充氮气2 min,抽真空封管,置于烤箱内,110 ℃水解22 h,将水解液置于水浴锅上使盐酸充分挥发,加超纯水洗涤3次,蒸干,用Na_2S稀释液定容至2 mL,再用0.22 μm微孔滤膜过滤,121MB型氨基酸分析仪进行检测。(3)DNA含量测定:冻干的0.4 mm厚的软骨片和冻干的脱细胞软骨粉分别称质量,按150 mg/mL浓度置于木瓜蛋白酶消化液冻存管中,60 ℃,消化24 h,消化后用PBS将其稀释成10 mg/mL浓度。分别将2 mL荧光染料加入PBS液、冻干的新鲜软骨片、1~5号脱细胞软骨粉、6~10号脱细胞软骨粉。1 h后在荧光分光光度计上测荧光值。

1.3 统计学方法

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,独立样本进行t检验。

2 结果

2.1 关节透明软骨脱细胞微粒的组织形态学观察

低温组织粉碎机可将关节透明软骨组织制备成软骨细胞基质浆,经脱细胞处理后在容器中呈乳白色,保持匀浆状态,沉淀时间慢。软骨脱细胞微粒在显微镜下观察直径小于10 μm,显示特有的软骨细胞外基质羽毛状结构;软骨脱细胞微粒抹片进行番红O染色可见微粒结构染色阳性,显示软骨脱细胞后仍然保存胶原成分,抹片甲苯胺蓝染色可见软骨脱细胞微粒结构蓝染,显示脱细胞后仍然有部分GAG成分存留。Triton X-100组、SDS组的软骨脱细胞微粒HE染色观察见基质中细胞成分基本去除,未见蓝染的细胞核成分;未脱细胞处理的对照组可见蓝染的细胞成分。2个实验组的软骨脱细胞微粒甲苯胺蓝染色均显示基质中细胞成分基本完全去除,软骨细胞外基质GAG成分蓝染;对照组可见蓝染更深,说明脱细胞处理对可溶性GAG成分有部分损失。2个实验组的软骨粉脱细胞番红O染色均显示基质中细胞成分基本去除,软骨脱细胞基质红染;对照组可见胶原成分红染程度相似,说明脱细胞处理对胶原成分损失不明显。2个实验组的软骨脱细胞基质粉Hochest染色在荧光显微镜下均显示:经脱细胞处理,软骨脱细胞基质中细胞DNA成分无法被荧光染料染色,说明DNA成分基本被去除;对照组(为未脱细胞软骨粉)可见Hochest染色阳性,提示其间有细胞DNA成分存在。2个实验组的软骨脱细胞基质粉DAPI染色在荧光显微镜下观察结果显示:经脱细胞处理,软骨脱细胞基质中细胞DNA成分无法被荧光染料染色,说明DNA成分基本被去除;对照组DAPI染色可见阳性,提示其间有DNA成分存在。见图1~3。

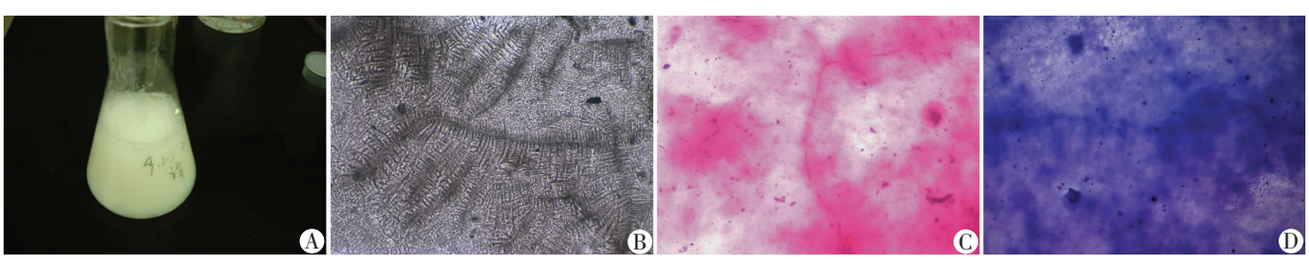
2.2 软骨脱细胞微粒的成分定量检测

经脱细胞处理后,Triton X-100组和SDS组GAG含量分别为(84.71 ± 3.72)、(122.63 ± 6.05) μg/mg,对照组为(232.78 ± 75.33) μg/mg。Triton X-100组和SDS组羟脯氨酸含量为(24.92 ± 1.74)、(24.23 ± 1.68) μg/mg,对照组为(24.54 ± 2.99) μg/mg。按照羟脯氨酸占总胶原含量的13.4%换算[8],其总胶原含量:经脱细胞处理后Triton X-100组和SDS组总胶原含量为(183.10 ± 22.35)、(181.70 ± 18.71) μg/mg,对照组总胶原含量为(185.90 ± 12.95) μg/mg。经脱细胞处理后Triton X-100组和SDS组其DNA含量为(0.242 ± 0.065)、(0.225 ± 0.057) μg/mg,与对照组[(5.679 ± 1.873) μg/mg]比较有统计学差异($P<0.05$),但Triton X-100组与SDS组比较无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

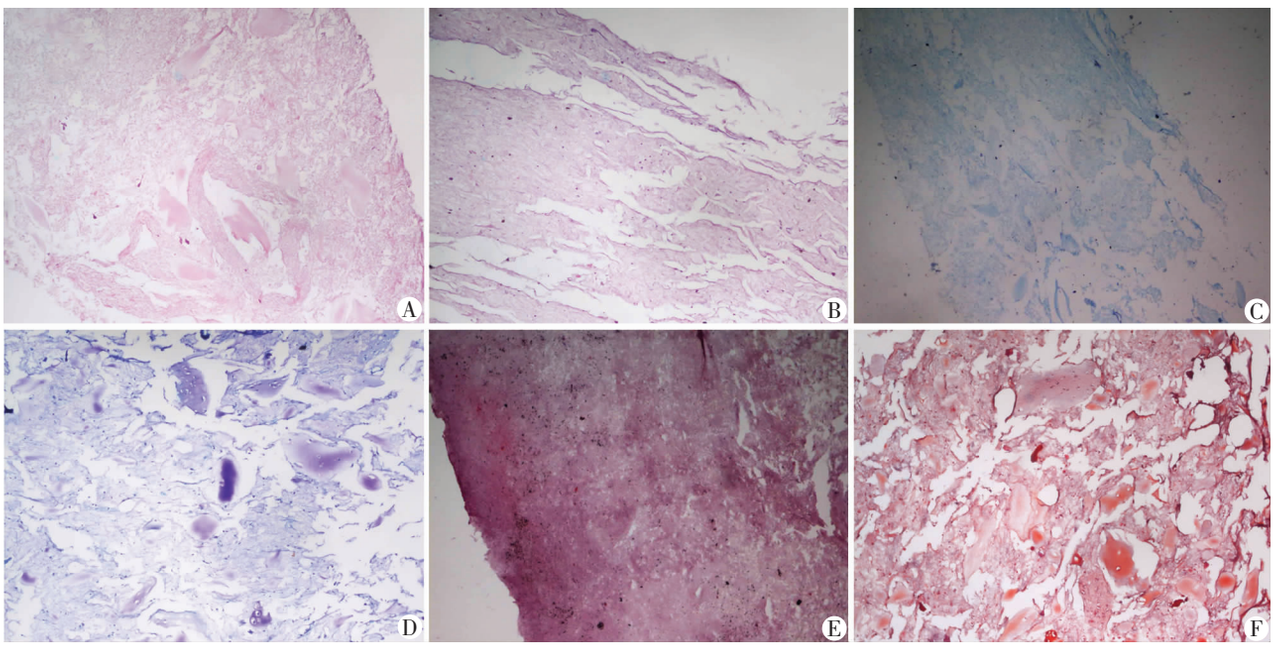
脱细胞处理能够较彻底地去除细胞成分、可溶性蛋白及核酸等可以引起免疫排斥反应的成分,同时保留大部分具备生理活性的细胞外基质成分,目前已经在心瓣膜、血管、皮肤、神经、骨骼肌、肌腱、韧带、膀胱、肝等组织再生制备方面获得应用,预示着较好的临床应用前景[9-11]。尽管目前尚无公认的理想软骨支架材料[5,12],但是生物来源的脱细胞基质材料由于仅去除抗原性成分而保留生理结构蛋白,尽可能地模拟了组织的细胞外基质的成分和微观结构,具有一定的理论优势,但是目前软骨组织因其致密结构,脱细胞试剂难以渗入,导致对其脱细胞的研究困难。

目前组织脱细胞的方法较多,主要包含物理、化学及酶法[13]。物理方法包括:震荡、超声处理、机械按压及冻融等,干扰细胞膜,释放细胞内容物,有利于随后将细胞内容物浸洗清除。物理方法通常需要结合化学及酶消化的方法才能将细胞外基质完全脱细胞。酶法包括胰酶、核酸内切酶及核酸外切酶等,化学试剂包括酸、碱、离子去污剂、非离子去污剂、双性离子去污剂、去氧胆酸钠等。酶及化学试剂能干扰细胞内及细胞间的连接结构,从而产生脱细胞作用[10,14]。组织由细胞



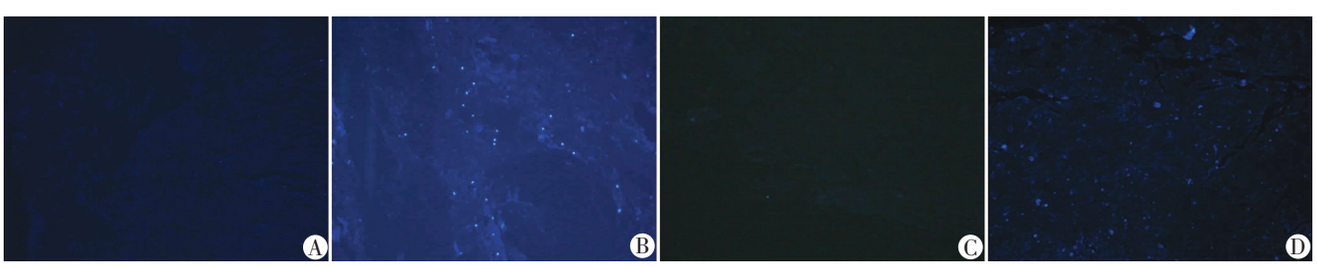
A:大体观察;B:显微镜下观察(×100);C:番红O染色(×100);D:甲苯胺蓝染色(×100)

图1 软骨脱细胞微粒组织形态学检测



A、C、E:SDS 组;B、D、F:对照组;A、B:HE 染色;C、D:甲苯胺蓝染色;E、F:番红 O 染色

图 2　软骨微粒脱细胞处理与对照组的组织形态学检测结果　(×100)



A、C:SDS 组;B、D:对照组;A、B:Hochest 染色;C、D:DAPI 染色

图 3　软骨微粒脱细胞处理与对照组的荧光显微镜观察　(×100)

和细胞外基质构成,其构成紧密度却依赖于组织来源,而脱细胞过程需要将组织进行一定处理,把细胞暴露在试剂中。国内有学者将一定厚度的软骨进行脱细胞处理制备脱细胞软骨支架,由于软骨细胞难以接触到脱细胞试剂,脱细胞时间较长,并且形成的脱细胞软骨难以形成组织工程支架要求的多孔网状结构,细胞接种相对困难[15]。韩雪峰等[16]将软骨粉碎制备成 100 ~154 μm 微粒,然后与软骨细胞混合培养构建组织工程软骨,结果发现微粒与软骨细胞不能均匀混合,并且构建的软骨由于生物力学强度较低,不利于手术植入。有学者将软骨组织粉碎成 500 nm 至 5 μm 的微丝,通过化学及酶消化的方法进行脱细胞处理后,采用基本不损伤细胞外基质的冷冻-冻干法制备三维多孔海绵细胞外基质支架,其孔径和空隙率和其具备的软骨细胞外基质成分和天然的细微结构,相对有利于细胞的种植、粘附以及营养物质的供应和代谢废物的排出,但因采用 Triton X-100 处理时间较长,细胞外基质中 GAG 等可溶性蛋白损失过多[17]。

本实验首先在低渗条件下粉碎处理新鲜软骨,低渗液可以同时裂解部分细胞,然后利用较弱的去污剂破坏脂蛋白和细胞膜,其次使用 DNA 酶和 RNA 酶将细胞裂解后的核酸物质水解,再用大量清水清洗,较有效地去除软骨组织中的细胞成分又保留软骨细胞外基质有用的成分,然后进行常规反复冻干处理,进一步降低软骨组织的抗原性。本实验在脱细胞过程中还运用了蛋白酶阻断剂,可以较有效地防止细胞释放的大量蛋白水解酶水解软骨细胞外基质,从而保护软骨细胞外基质成分的量和活性,进一步防止软骨基质成分的损伤。Triton X-100 是一种较柔和的除垢剂,使用这种试剂洗脱细胞,细胞外组织的天然结构和成分可以较少地受到侵犯,但是由于其溶解洗脱特性,细胞外组织的 GAG 含量可能会由于 Triton X-100 的使用而降低,因此在实际操作时,要尽量缩短除垢剂的使用时间,而本研究初步提示洗脱剂 SDS 似乎能够更有效地保留 GAG 含量,机制尚待进一步研究。

脱细胞方法的有效性依赖于脱细胞组织本身的特征。Grauss 等[18]采用同样的处理时间并且使用了更大的胰酶浓度,发现一种基于胰酶的脱细胞策略对去

除鼠动脉瓣细胞成分无效；而 Schenke-Layland 等[19]采用一种三维震荡的方法完全去除了猪肺动脉瓣内的细胞，表明应用这些方案时的细微区别，是否对去除细胞成分有效尚不清楚。Cartmell 等[20]分别对鼠尾肌腱和猪膝关节前交叉韧带进行了脱细胞处理，发现脱细胞结果的不同不能简单地用脱细胞方案的不同来解释，脱细胞的效果和细胞外基质成分的改变依赖于组织的来源、构成、密度及其他尚不明确的因素。对单种组织选用其适合的脱细胞策略才能有效地进行脱细胞。我们使用低渗液裂解细胞，Triton X-100 洗脱细胞，DNA 酶和 RNA 酶水解细胞内的核酸物质，较全面地去除了软骨组织中的细胞和抗原成分。脱细胞后软骨基质番红 O 染色阳性，甲苯胺蓝染色阳性，说明脱细胞后糖胺多糖和软骨蛋白聚糖仍然部分存在。软骨脱细胞基质在显微镜下仍然可见透明软骨的羽毛状结构，提示本方法不但可以将软骨细胞成分去除，而且保留了相对完整的微观状态下的细胞外基质构架，可能会有利于软骨细胞在支架上生长和干细胞在支架上诱导生长。Ⅱ型胶原是软骨基质的主要大分子，固定基质中的蛋白多糖，它使软骨组织具有张力和剪切特性。蛋白聚糖是大分子蛋白多糖，包埋于Ⅱ型胶原网中，在软骨组织中与透明质酸和连接蛋白形成聚集物，它的作用是构成透明软骨的耐压特性。这两种物质是软骨细胞外基质中的重要物质，组织学结果显示本实验脱细胞处理后支架番红 O 染色、甲苯胺蓝及Ⅱ型胶原免疫组化染色均阳性，表明这种方法能保留软骨细胞外基质的Ⅱ型胶原和糖胺多糖成分。定量分析也提示支架主要由胶原和 GAG 成分组成，但是由于在脱细胞过程中可能存在部分可溶性 GAG 的丢失，本实验支架中 GAG 含量低于正常软骨组织，提示可能在仿生构建支架时需要补充 GAG 成分。在软骨粉脱细胞处理后 GAG 含量的测定中，因 GAG 成分属于可溶性大分子，在洗脱过程中 GAG 仍然有较大的损失。经脱细胞处理后总胶原含量测定显示，胶原含量差异不明显，说明脱细胞过程对胶原没大的丢失。经脱细胞处理后其 DNA 含量测定提示采用本实验方案能将细胞成分较完全地去除。

本实验对粉碎软骨及片状软骨进行了脱细胞处理，证实细胞成分可以基本被去除，但是同时也部分损失 GAG 等细胞外基质成分，未来需要将细胞与该材料复合植入体内观察对软骨缺损的修复作用。

参考文献：

[1] Rodriguez-Merchan E C. Regeneration of articular cartilage of the knee [J]. Rheumatol Int, 2013, 33(4): 837 - 845.

[2] 杨柳. 加强软骨与骨组织工程中关键技术的应用[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(3) 263 - 265.

[3] Bostman O M, Pihlajamaki H K. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices[J]. Clin Orthop Relat Res, 2000(371): 216 - 227.

[4] Flynn L, Prestwich G D, Semple J L, *et al*. Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose-derived stem cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(26): 3834 - 3842.

[5] 杨柳, 段小军. 组织工程及其研究[M]//王正国. 外科学与野战外科学. 北京: 人民军医出版社, 2007: 354 - 362.

[6] Mano J F, Reis R L. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1(4): 261 - 273.

[7] Jackson D W, Grood E S, Cohn B T, *et al*. The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats [J]. J Bone Joint Surg Am, 1991, 73(2): 201 - 213.

[8] Pieper J S, van-der-Kraan P M, Hafmans T, *et al*. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering [J]. Biomaterials, 2002, 23(15): 3183 - 3192.

[9] Zheng M H, Willers C, Kirilak L, *et al*. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment [J]. Tissue Eng, 2007, 13(4): 737 - 746.

[10] Stoddart M J, Grad S, Eglin D, *et al*. Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering[J]. Regen Med, 2009, 4(1): 81 - 98.

[11] Cole B J, Pascual-Garrido C, Grumet R C. Surgical management of articular cartilage defects in the knee [J]. J Bone Joint Surg Am, 2009, 91(7): 1778 - 1790.

[12] 段小军, 王富友, 杨柳, 等. 应用凝胶接种技术体外分层构建工程化骨软骨复合组织的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20): 1969 - 1972.

[13] Gilbert T W, Stolz D B, Biancaniello F, *et al*. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications[J]. Biomaterials, 2005, 26(12): 1431 - 1435.

[14] Woods T, Gratzer P F. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft[J]. Biomaterials, 2005, 26(35): 7339 - 7349.

[15] 张建党, 卢世璧, 黄靖香, 等. 人关节软骨脱细胞基质的制备[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(4): 276 - 277.

[16] 韩雪峰, 杨大平, 郭铁芳, 等. 软骨细胞与异体软骨微粒脱细胞基质体外相容性的研究 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85(27): 1895 - 1898.

[17] 杨强, 彭江, 卢世璧, 等. 新型脱细胞软骨基质三维多孔支架的制备[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(3): 359 - 363.

[18] Grauss R W, Hazekamp M G, Oppenhuizen F, *et al*. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 27(4): 566 - 571.

[19] Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, *et al*. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves[J]. J Struct Biol, 2003, 143(3): 201 - 208.

[20] Cartmell J S, Dunn M G. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 49(1): 134 - 140.

（**收稿**:2013-04-22;**修回**:2013-05-02）

（编辑 龙 亮）