

## II 型胶原酶消化时间对兔软骨细胞生物学特性的影响\*

袁德超<sup>1,2</sup>, 陈竹<sup>2</sup>, 邓尚<sup>1,2</sup>, 冯刚<sup>2△</sup>(1. 泸州医学院, 四川泸州 646000; 2. 四川省南充市中心医院/川北医学院  
第二临床医学院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000)

**[摘要]** **目的** 探索 II 型胶原酶消化法分离兔肋软骨细胞的最佳消化时间。**方法** 取 3 月龄新西兰大白兔肋软骨组织, 采用 0.2% II 型胶原酶分别消化 4、8、12、16、20 h, 对应为 A、B、C、D、E 组, 获取细胞后进行培养。通过比较 5 组 P2 代软骨细胞在形态、增殖速度、细胞内基质分泌等方面的差异, 选择合适的消化时间。**结果** C、D、E 组获取的原代软骨细胞数量比 A、B 组多; C、D 组 P2 代软骨细胞增殖能力强于其他 3 组; C、D 组 P2 代细胞内基质分泌情况最佳。**结论** II 型胶原酶最佳消化时间为 12~16 h, 获取的原代软骨细胞数量多, 活性率较高, 增殖能力强, P2 代软骨细胞表型良好。

**[关键词]** 胶原酶类; 软骨细胞; 生物学特性; 细胞培养技术**[中图分类号]** R331**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4553-03

## The impact of collagenase II digestion time on the biological characteristics of rabbit chondrocytes\*

Yuan Dechao<sup>1,2</sup>, Chen Zhu<sup>2</sup>, Deng Shang<sup>1,2</sup>, Feng Gang<sup>2△</sup>(1. Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Institute of Tissue Engineering and  
Stem Cells, Nanchong Central Hospital/the Second Clinical Institute of North Sichuan  
Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the best digestion time for rabbit rib cartilage cells separation by collagenase II digestion method. **Methods** Rabbit cartilage tissue was taken from 3-month-old New Zealand white rabbits, and then digested in 0.2% collagenase II solution for 4, 8, 12, 16 and 20 h under vibration at 37 °C, respectively. The corresponding experiments were named as group A, B, C, D, and E. The obtained primary cells were cultured and passaged after counting. The cell morphology, proliferation rate, secretion of extracellular matrix of passage 2 cells were compared to chose the best digestion time. **Results** The primary chondrocytes obtained in group C, D and E were more than the other two group A and B. The chondrocytes cytoactive in group C and D were better than the other three group A, B and E. The passage 2 chondrocytes in group C, D had better secretion of extracellular matrix capability than the other three groups. **Conclusion** The best collagenase II digestion time is 12 to 16 h, at this digestion time period, more primary chondrocytes with high cytoactive and strong proliferation capability can be obtained, and the phenotype of their passage 2 cells is quite good.

**[Key words]** collagenase; chondrocytes; biological characteristics; cell culture techniques

目前, 软骨细胞在临床研究和基础实验方面均应用广泛, 如软骨类疾病的基础研究<sup>[1]</sup>、软骨和气管组织工程的构建<sup>[2]</sup>, 缺损关节软骨的修复、美容整形<sup>[3]</sup>等方面。软骨细胞的分离培养技术已经比较成熟, 主要采用胰蛋白酶和 II 型胶原酶序贯消化法或单纯 II 型胶原酶消化法, 但对于获得软骨细胞最重要的胶原酶消化时间仍具有较大争议, 本文旨在探讨获取原代软骨细胞的最佳消化时间, 优化软骨细胞体外分离培养技术。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 3 月龄新西兰大白兔 25 只(川北医学院实验动物中心提供), 雌雄不限, 体质量 1.5~2.5 kg; CO<sub>2</sub> 孵箱采自美国 Thermo 公司; 甲苯胺蓝染液、番红-O 染液、II 型胶原酶购自美国 sigma 公司; 蛋白多糖 (aggrecan) 一抗 (小鼠抗兔)、二抗 (山羊抗小鼠) 购自美国 Thermo 公司; II 型胶原免疫组织化学试剂盒购自美国 Chondrex 公司; 其他试剂均为市售分析纯。

**1.2 软骨细胞的消化分离和培养** 将新西兰大白兔分为 A、B、C、D、E 组, 每组 5 只。用 1% 戊巴比妥钠过量麻醉处死。取肋软骨浸泡于含双抗 (1% 青霉素和链霉素) PBS 中, 转入超净工作台, 去除软骨周围肌肉和筋膜, 用手术刀把软骨块切碎成 1 mm<sup>3</sup> (甚至更小)。将软骨块收集入 50 mL 离心管中, 加

0.2% II 型胶原酶 5 mL, 37 °C 恒温摇床中震荡。A、B、C、D、E 组分别连续消化 4、8、12、16、20 h, 各组在中位时间点更新 1 次 II 型胶原酶。消化相应的时间后离心, 弃上清液, 加入 DMEM 培养基 (含 10% FBS, 1% 双抗) 8 mL, 接种于 T75 的培养瓶中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

## 1.3 检测指标

**1.3.1 原代软骨细胞的计数和活性检测** 将细胞悬液吸出少许, 滴加在盖玻片边缘, 使悬液充满盖玻片和计数板之间。镜下计算计数板 4 大格细胞总数, 压线细胞只计左侧和上方的。然后按下式计算: 每毫升细胞数 = (4 大格细胞总数/4) × 10<sup>4</sup>。用台盼蓝染液检测细胞活性, 吸取 90 μL 细胞悬液到离心管中, 加入 10 μL 染液轻轻混匀, 染色 1 min, 细胞活性率 = (细胞总数 - 蓝色细胞数) / 细胞总数 × 100%。

**1.3.2 细胞形态观察** (1) 原代细胞贴壁情况: 原代细胞装瓶 48 h 后光镜下观察细胞贴壁情况。(2) P2 代细胞番红-O 染色: 取各组 P1 代软骨细胞行细胞爬片, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.2% 快绿染色 1 min; 0.5% 番红-O 染色 5 min, 中性树胶封片。(3) P2 代细胞甲苯胺蓝染色: 取各组 P1 代软骨细胞行细胞爬片, 多聚甲醛室温固定 30 min, 甲苯胺蓝染色 4 h, 中

性树脂胶封片。

**1.3.3 细胞免疫组织学染色** (1)P2 代细胞蛋白多糖 (aggrecan) 免疫荧光染色: 取各组 P1 代软骨细胞行细胞爬片, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 0.3% Triton-100 孵育 10 min, 添加一抗 4℃ 过夜, 添加二抗室温下孵育 1 h, 抗荧光淬灭剂封片。(2)P2 代细胞 II 型胶原免疫组化染色: 取各组 P1 代软骨细胞行细胞爬片, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 2% 牛透明质酸酶 30 min, 3% 过氧化氢 10 min, 0.3% Triton-100 孵育 10 min; II 型胶原一抗 4℃ 过夜, 添加二抗在室温下孵育 1 h; DAB 显色 5~10 min, 苏木素复染 1 min, 75% 盐酸酒精 1 s, 中性树脂胶封片。

**1.3.4 CCK-8 法测定 P2 代软骨细胞生长增殖曲线** 取 P1 代软骨细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基配成单个细胞悬液, 细胞计数  $1 \times 10^4$  个/mL, 以每孔体积 100  $\mu$ L 加入 96 孔培养板中。每组接种 1 板, 每板接种 5 列, 共接种 40 板。CCK-8 检测液用 DMEM 培养液按 1:10 (体积比) 稀释成工作液, 分别于培养 1、2、3、4、5、6、7、8 d, 每孔加入 200  $\mu$ L 工作液, 置于细胞培养箱孵化 4 h, 终止培养, 酶标仪上 450 nm 处测 OD 值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料正态分布用  $\bar{x} \pm s$ , 每组间均数比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 原代软骨细胞的计数和活性检测** 见表 1。

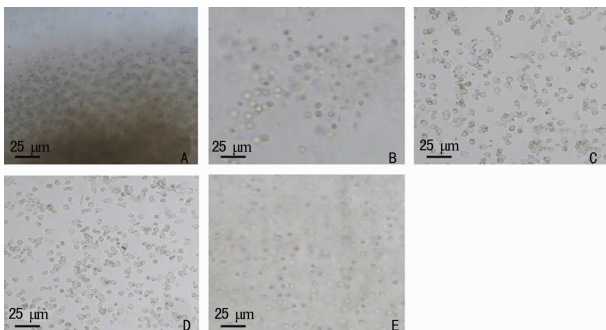
表 1 原代软骨细胞的计数和活性率

组别	<i>n</i>	细胞计数( $\times 10^6$ )	细胞活性率(%)
A 组	5	0.40 $\pm$ 0.06	99.1
B 组	5	1.30 $\pm$ 0.13	98.8
C 组	5	2.20 $\pm$ 0.20 <sup>#</sup>	94.2 <sup>*</sup>
D 组	5	2.40 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>	92.4
E 组	5	2.50 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>	87.2 <sup>**</sup>

<sup>#</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A、B、E 组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A、B 组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A、B、C 组比较; <sup>\*</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A、B、E 组比较; <sup>\*\*</sup>:  $P < 0.01$ , 与 A、B、C、D 组比较。

## 2.2 细胞形态观察

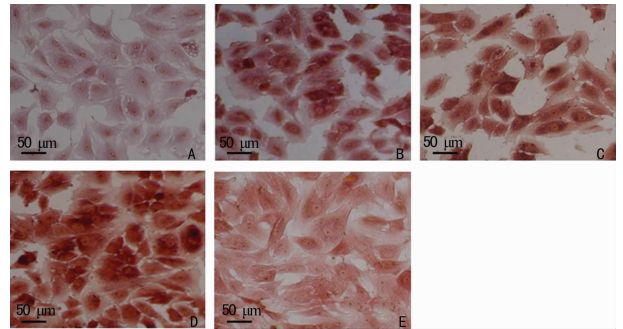
**2.2.1 原代细胞贴壁情况** 待原代软骨细胞装瓶 48 h 后: A 组培养瓶内可见大量组织块, 组织块周围见大量未消化出来的软骨细胞, 贴壁细胞少; B 组培养瓶内见少量组织块, 大量胶原纤维缠绕软骨细胞, 贴壁细胞较少; C、D 组培养瓶内未见组织块和胶原纤维, 细胞基本上贴壁; E 组培养瓶内未见组织块和胶原纤维, 可见大量悬浮未贴壁的细胞, 见图 1。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。

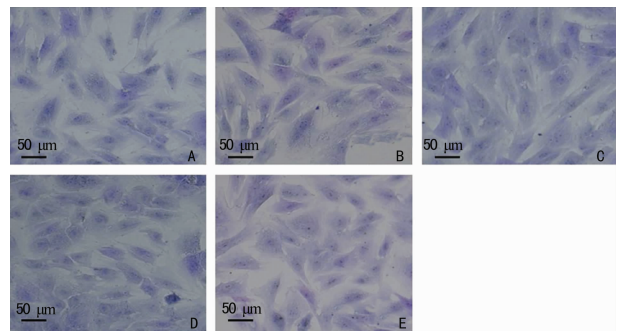
图 1 各组原代软骨细胞装瓶 48 h 后镜下观察细胞贴壁情况 ( $\times 100$ )

**2.2.2 P2 代软骨细胞的番红-O 染色和甲苯胺蓝染色** 5 组细胞番红染色均呈阳性, 细胞形态呈多边形, 胞质呈深红色, 胞核浅红色, 核周可见棕红色颗粒, C、D 组细胞染色更深, 见图 2。5 组 P2 代细胞甲苯胺蓝染色均呈阳性, 细胞形态呈多边形, 胞质蓝染, 核周及胞质内可见异染颗粒, 见图 3。



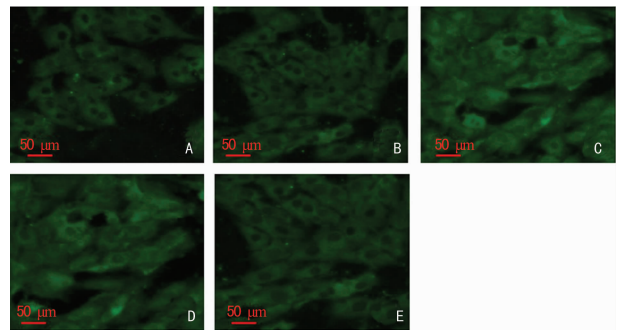
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。

图 2 各组 P2 代软骨细胞番红-O 染色 ( $\times 200$ )



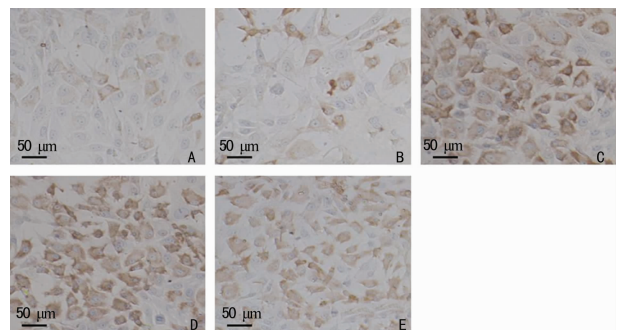
A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。

图 3 各组 P2 代软骨细胞甲苯胺蓝染色 ( $\times 200$ )



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。

图 4 各组 P2 代软骨细胞蛋白聚糖免疫荧光染色 ( $\times 200$ )



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组; E: E 组。

图 5 各组 P2 代软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色 ( $\times 200$ )

**2.3 P2 代软骨细胞蛋白多糖免疫荧光和 II 型胶原免疫组织化学染色** 5 组 P2 代细胞蛋白多糖免疫荧光染色均呈阳性,

镜下可见胞质发绿色荧光,胞核不发荧光,C、D 组细胞胞质绿色荧光最强,见图 4。5 组 P2 代细胞 II 型胶原免疫组织化学染色均显示阳性,部分细胞胞质着黄褐色,胞核为苏木素淡染的蓝色,核周可见颗粒状物质沉着,C、D 组阳性细胞较其余 3 组的多,见图 5。

**2.4 P2 代软骨细胞生长增殖曲线** 培养第 1~2 天为潜伏期,第 2~6 天为指数增生期,以后进入平台期,见图 6。培养第 3~8 天时,C、D 组与其余 3 组的 OD 值差异有统计学意义( $P < 0.01$ );培养第 1~8 天时,C、D 组间 OD 值差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

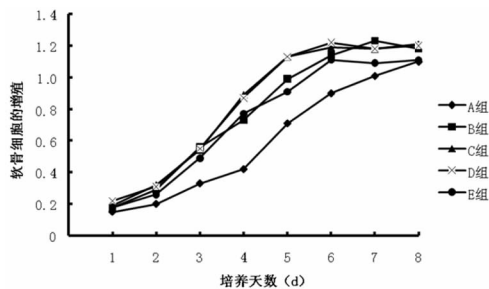


图 6 各组 P2 代软骨细胞生长增殖曲线

### 3 讨论

软骨细胞被广泛应用于骨关节炎退变机制的研究<sup>[1]</sup>、构建软骨组织工程<sup>[4]</sup>、软骨组织的修复<sup>[5]</sup>。软骨细胞的获取主要是通过切取自身软骨组织,经酶消化体外培养获得的。目前,软骨细胞的分离培养技术已比较成熟,主要采用胰蛋白酶和 II 型胶原酶序贯消化法或单纯 II 型胶原酶消化法。无论哪种方法,均需要用到 II 型胶原酶,因为软骨组织中的细胞外基质主要为胶原纤维蛋白和蛋白多糖,其中胶原占软骨总质量的 50%~70%,II 型胶原占有所有胶原的 90%以上,蛋白多糖占软骨总质量的 20%~40%<sup>[6]</sup>。所以要获得游离的软骨细胞,必须充分消化分解软骨组织中的 II 型胶原。

总的来说随着 II 型胶原酶消化时间的延长,获得的游离的软骨细胞越多,活性率越低。过长的消化时间将破坏软骨细胞的细胞活性,从而影响细胞的生长和细胞外基质的分泌。因此,合理的消化时间是获得具有良好细胞活性的软骨细胞的一个重要参数。根据文献报道,II 型胶原酶的浓度一般是 0.1%~0.3%<sup>[7-8]</sup>,但关于消化时间的报道却具有较大的差异。Little 等<sup>[9]</sup>将 0.2% II 型胶原酶在 37 °C 恒温水浴条件下消化软骨组织 4 h 获取软骨细胞,Heywood 等<sup>[10]</sup>用 0.2% II 型胶原酶消化软骨组织 12 h 获得软骨细胞;Ingavle 等<sup>[11]</sup>将软骨组织用 0.2% II 型胶原酶消化 18~20 h 亦能获得大量活性良好的软骨细胞。

针对该问题,本实验采用单纯 II 型胶原酶消化法分离软骨细胞,通过固定胶原酶浓度为 0.2%,改变消化时间,比较不同消化时间获得的软骨细胞的生物学特性,探讨 II 型胶原酶的最佳消化时间。本实验对软骨细胞生物学特性的鉴定主要从细胞形态和分泌功能方面来判断,表型良好的软骨细胞在形态上为多边形,在功能上为分泌蛋白多糖和 II 型胶原。蛋白多糖和 II 型胶原是鉴别软骨细胞的特异性标志物,其减少或丧失标志着软骨细胞的去分化,软骨细胞在 P2 代之前能维持正常细胞表型<sup>[12]</sup>,故通过对 P2 代细胞行番红-O 染色、甲苯胺蓝染色、蛋白多糖免疫荧光和 II 型胶原免疫组织化学染色观察细胞形态和分泌功能。

实验发现,C、D 组连续消化 12~16 h 获得的细胞量多,细胞活性率较高,原代细胞贴壁良好,P2 代细胞能保持软骨细胞

生物学特性,增殖能力强。消化时间不足会使组织块消化不全,大量的软骨细胞得不到分离。如实验中 A、B 组,接种的原代细胞贴壁 24 h 后,镜下可见大量未分离的细胞,消化不全的胶原纤维缠绕软骨细胞,阻碍细胞贴壁。延长消化时间可将胶原纤维充分消化,但同时会对细胞膜造成伤害,细胞活性率降低。实验中 E 组有较多原代细胞不能贴壁,消化时间过长,细胞活性率降低;C、D 组中原代细胞贴壁良好,消化时间适当,细胞活性率较高。

5 组体外培养后的 P2 代细胞在形态和功能方面均能维持软骨细胞表型,相比较而言,C、D 组细胞表型最好,E 组其次,A、B 组最差,这与原代细胞接种密度有关。软骨细胞在体外培养时,随着传代次数的增加极易发生去分化表现,特别是在低细胞密度培养时;软骨细胞在一定范围的高密度培养有利于维持细胞表型,细胞之间相互促进生长增殖<sup>[13]</sup>。C、D 组 P2 代细胞形态和分泌功能均良好,在番红-O 染色、甲苯胺蓝染色、蛋白多糖免疫荧光染色、细胞生长增殖速度方面均优于其他 3 组,II 型胶原免疫组织化学染色阳性数多于其余 3 组。说明以 C、D 组的高细胞密度接种原代细胞更有利于维持细胞表型,这与文献报道相符。E 组细胞由于 II 型胶原酶消化时间太长,虽然细胞数量多,但是细胞活性低,原代细胞贴壁少;A、B 组 II 型胶原酶消化时间不足,大量软骨细胞未得到分离,原代细胞贴壁少,都不利于细胞表型的维持和细胞生长增殖。可见通过适当延长 II 型胶原酶消化时间,提高软骨细胞接种密度是维持细胞表型和活性的良好方法。

在兔软骨细胞分离培养中,II 型胶原酶最佳消化时间为 12~16 h,能获得大量活性率较高、贴壁良好、增殖能力强的软骨细胞,P2 代软骨细胞表型稳定。探索 II 型胶原酶的最佳消化时间,有助于获取大量活性良好的原代软骨细胞,为基础实验和临床研究提供大量优质的软骨细胞。

### 参考文献

- [1] Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3d cartilage-inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(24): 5581-5589.
- [2] Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y, et al. Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model[J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(9): 2195-2201.
- [3] Watson D, Reuther MS. Tissue-engineered cartilage for facial plastic surgery[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2014, 22(4): 300-306.
- [4] Ohgushi H. Current status of bone/cartilage tissue engineering towards clinical applications[J]. *Nihon Rinsho*, 2014, 72(10): 1855-1860.
- [5] Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, et al. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration[J]. *Trends Biotechnol*, 2014, 20(5): 437-446.
- [6] Hosseini SM, Wu Y, Ito K, et al. The importance of superficial collagen fibrils for the function of articular cartilage[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2014, 13(1): 41-51.
- [7] Xu F, Xu L, Wang Q, et al. 3d dynamic culture of rabbit articular chondrocytes encapsulated in alginate gel beads using spinner flasks for cartilage tissue regeneration[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 15(210): 539789.
- [8] Yanaga H, Imai K, Koga M, et al. Cell- (下转第 4559 页)

10 周的药物,给患者增加了身体的负担(如肝脏负担、血栓性疾病风险等);此外,降调后激素替代方案中患者还可能出现低雌激素症状。因此对于部分不适合自然周期、降调或非降调激素替代的患者,如:排卵障碍、高龄患者,本中心采用促排卵方案准备子宫内膜共 152 周期,也取得了较好的临床效果,临床妊娠率和种植率虽然低于激素替代方案组,但患者经促排卵后具有健全的黄体,因此无需长期使用雌孕激素支持黄体,减轻了患者经济和身体负担。因此,促排卵方案对于排卵障碍且具有激素替代禁忌证的患者来说,无疑是一项不错的选择。其缺点在于部分患者,尤其是多囊卵巢综合征患者,促排卵治疗具有发生卵巢过度刺激综合征及诱导排卵失败而导致周期取消的风险,治疗过程中应严格监测。

本研究通过对 320 个 FET 周期进行回顾性分析得出,与自然周期方案相比较,促排卵、降调或非降调激素替代方案均可获得更高的临床妊娠率和种植率,其中降调后激素替代方案在既往移植失败患者中仍具有较好的临床效果,值得临床借鉴。

#### 参考文献

- [1] Groenewoud ER, Cantineau AE, Kollen BJ, et al. What is the optimal means of preparing the endometrium in frozen-thawed embryo transfer cycles? A systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod Update*, 2013, 19(5): 458-470.
- [2] 康艳,匡延平. 冻融胚胎移植周期内膜准备方案的进展[J]. *生殖与避孕*, 2012, 32(7): 478-481.
- [3] Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, et al. Spontaneous ovulation versus HCG triggering for timing natural-cycle frozen-thawed embryo transfer: a randomized study[J]. *Reprod Biomed Online*, 2011, 23(4): 484-489.
- [4] Tomas C, Alsbjerg B, Martikainen H, et al. Pregnancy loss after frozen-embryo transfer—a comparison of three protocols[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(5): 1165-1169.
- [5] Chang EM, Han JE, Kim YS, et al. Use of the natural cycle and vitrification thawed blastocyst transfer results in better in-vitro fertilization outcomes: cycle regimens of vitrification thawed blastocyst transfer[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2011, 28(4): 369-374.
- [6] 刘景瑜,王玢,孔娜,等. 自然周期使用 hCG 诱导排卵对

冻融胚胎移植临床结局的影响[J]. *生殖与避孕*, 2014, 34(10): 871-874.

- [7] 王青丽,巩晓芸,田海清,等. 自然周期和人工周期方案对解冻胚胎移植妊娠结局的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2014, 27(4): 389-391.
- [8] Krotz S, McKenzie LJ, Cisneros P, et al. Prevalence of premature urinary luteinizing hormone surges in women with regular menstrual cycles and its effect on implantation of frozen-thawed embryos[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(6): 1742-1744.
- [9] Sathanandan M, Macnamee MC, Rainsbury P, et al. Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study[J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(5): 685-687.
- [10] Younis JS, Simon A, Laufer N. Endometrial preparation: Lessons from oocyte donation[J]. *Fertil Steril*, 1996, 66(6): 873-884.
- [11] Hill MJ, Miller KA, Frattarelli JL. A GnRH agonist and exogenous hormone stimulation protocol has a higher live-birth rate than a natural endogenous hormone protocol for frozen-thawed blastocyst-stage embryo transfer cycles: an analysis of 1 391 cycles[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(2): 416-422.
- [12] Azimi Nekoo E, Chamani M, Shahrokh Tehrani E, et al. Artificial endometrial preparation for Frozen-Thawed embryo transfer with or without pretreatment with depot gonadotropin releasing hormone agonist in women with regular menses[J]. *J Family Reprod Health*, 2015, 9(1): 1-4.
- [13] 吴晓燕,李志凌,林虹,等. 多次胚胎移植失败患者采用冻融胚胎移植 3 种内膜准备方案结局分析[J]. *中国计划生育学杂志*, 2014, 22(4): 248-251, 254.
- [14] Zheng Y, Li Z, Xiong M, et al. Hormonal replacement treatment improves clinical pregnancy in frozen-thawed embryos transfer cycles: a retrospective cohort study[J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(1): 85-90.

(收稿日期: 2015-06-08 修回日期: 2015-08-15)

(上接第 4555 页)

- engineered human elastic chondrocytes regenerate natural scaffold in vitro and neocartilage with neoperichondrium in the human body post-transplantation[J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(19/20): 2020-2029.
- [9] Little CJ, Kulyk WM, Chen X. The effect of chondroitin sulphate and hyaluronic acid on chondrocytes cultured within a fibrin-alginate hydrogel[J]. *J Funct Biomater*, 2014, 5(3): 197-210.
  - [10] Heywood HK, Nalesso G, Lee DA, et al. Culture expansion in low-glucose conditions preserves chondrocyte differentiation and enhances their subsequent capacity to form cartilage tissue in three-dimensional culture[J]. *Biores Open Access*, 2014, 3(1): 9-18.

- [11] Ingavle GC, Frei AW, Gehrke SH, et al. Incorporation of aggrecan in interpenetrating network hydrogels to improve cellular performance for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(11/12): 1349-1359.
- [12] Miranda AJ, Dong Y, Kim J, et al. Isolation and culture of murine primary chondrocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 11(30): 267-277.
- [13] Dang PN, Solorio LD, Alsbjerg E. Driving cartilage formation in high-density human adipose-derived stem cell aggregate and sheet constructs without exogenous growth factor delivery[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(23/24): 3163-3175.

(收稿日期: 2015-07-11 修回日期: 2015-08-20)