

小鼠关节软骨表层细胞分离培养及鉴定

谭乔燕 王权 旷梁 谢杨丽 李灿 罗凤涛 杜晓兰 陈林

【摘要】 目的 分离培养小鼠关节软骨表层细胞(ACSC)并鉴定其干细胞特性。**方法** 运用纤连蛋白黏附法从3~5 d新生小鼠膝关节软骨表层分离细胞及培养,对分离细胞以流式细胞仪检测干细胞表面阳性标志物(CD44与CD90)和阴性标志物(CD45、CD31与CD34)的表达;实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测相关基因表达;单克隆形成实验检测克隆形成能力。三系诱导分化(成软骨、成骨与成脂分化)检测分离培养细胞的多向分化潜能。取第6代分离培养细胞做裸鼠皮下移植实验,检测其体内成软骨能力。**结果** 纤连蛋白可以特异性地黏附ACSC,ACSC形态偏长,类似成纤维细胞。ACSC高表达CD44和CD90,但几乎不表达CD31、CD34和CD45。qRT-PCR检测结果显示,以ACSC表达的mRNA水平为1,则软骨细胞显著性低水平表达间充质干细胞标志物CD73 (0.08 ± 0.07 , $P < 0.001$)、CD90 (0.07 ± 0.01 , $P < 0.001$)、CD105 (0.37 ± 0.02 , $P < 0.001$)和软骨表层细胞标志物Prg4 (0.42 ± 0.01 , $P < 0.001$)、Erg (0.61 ± 0.02 , $P < 0.001$)、Ten C (0.64 ± 0.07 , $P < 0.001$),但显著性高水平表达软骨细胞标志物Col2 (6.89 ± 0.06 , $P < 0.001$)、Acan (6.51 ± 0.04 , $P < 0.001$)、MATN1 (14.57 ± 4.21 , $P < 0.01$)。经过14 d培养,单个ACSC可以形成大于50个细胞的单克隆细胞团。体外诱导ACSC具备很强的成软骨、成骨与成脂分化能力,裸鼠体内ACSC具有成软骨能力。**结论** 小鼠ACSC具有典型的干细胞特征。

【关键词】 纤连蛋白类;关节软骨;干细胞;细胞分化;再生

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2018.05.014

Isolation, culture and identification of cells in the superficial zone of mouse articular cartilage TAN Qiaoyan¹, WANG Quan¹, KUANG Liang¹, XIE Yangli^{1,3}, LI Can¹, LUO Fengtao¹, DU Xiaolan^{1,3}, CHEN Lin^{1,2,3}. Trauma Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Army Medical University¹, Chongqing 400042, China; Center of Bone Metabolism and Repair², Chongqing 400042, China; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury³, Chongqing 400042, China

Corresponding author: CHEN Lin E-mail: linchen70@163.com

【Abstract】 Objective To isolate and culture mouse articular cartilage superficial zone cell (ACSC), and identify their characteristics. **Methods** Cells were isolated from mouse articular cartilage superficial zone by fibronectin-conglutination assay. The expression of positive markers (CD44 and CD90) and negative markers (CD31, CD34 and CD45) at the surface of ACSC were detected by flow cytometry. Real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect related gene expression. The colony forming ability of ACSC was determined by single-cell colony forming unit assay. The multilineage differentiation potential of ACSC was identified through chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis induction experiment. The chondrogenesis potential of ACSC were identified by subcutaneously transplantation into athymic mice. **Results** Fibronectin could specifically adhere to ACSC, which displayed an elongated, fibroblastic cytoarchitecture. ACSC showed high expression of CD44 and CD90, while hardly express CD31, CD34 and CD45. Defining the amount of mRNA expressed by ACSC as 1, we detected the low expression of stem cell marker [CD73 (0.08 ± 0.07 , $P < 0.001$), CD90 (0.07 ± 0.01 , $P < 0.001$), CD105 (0.37 ± 0.02 , $P < 0.001$)] and cartilage superficial zone marker [Prg4 (0.42 ± 0.01 , $P < 0.001$), Erg (0.61 ± 0.02 , $P < 0.001$), Ten C (0.64 ± 0.07 , $P < 0.001$)], but high expression of Col2 (6.89 ± 0.06 , $P < 0.001$), Acan (6.51 ± 0.04 , $P < 0.001$) and MATN1 (14.57 ± 4.21 , $P < 0.01$). After culturing for 14 days, single ACSC formed colony containing more than 50 cells.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2014CB942904)、国家自然科学基金(81530071)、国家自然科学基金(81472074)

作者单位: 400042 重庆, 陆军军医大学大坪医院全军战创伤中心创伤实验室(谭乔燕、王权、旷梁、谢杨丽、李灿、罗凤涛、杜晓兰、陈林)、骨代谢与修复中心(陈林)、创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室(谢杨丽、杜晓兰、陈林)

通信作者: 陈林 E-mail: linchen70@163.com

ACSC were capable of chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis differentiation in vitro, and have high chondrogenesis potential in vivo.

Conclusion Fibronectin-conglutination assay may be applied to obtain ACSC with characteristics of stem cells.

【Key words】 Fibronectins; Cartilage, articular; Stem cells; Cell differentiation; Regeneration

软骨细胞是关节软骨的主要细胞类型之一,主要通过细胞外基质分泌及蛋白酶类促进软骨基质降解,参与关节软骨稳态的维持。关节软骨组织内无神经、血管,因此软骨细胞的增殖能力有限,其损伤后自我修复能力极差。

早期研究认为,关节软骨干/祖细胞在 Ranvier 环、髌骨下脂肪垫、滑膜及软骨膜处以不同的形式存在^[1-6]。干细胞是一类具有自我复制和自我更新能力的多潜能细胞,激活内源性关节软骨干/祖细胞可促进缺损部位自我修复或形成干细胞组织工程化软骨,为软骨再生提供可能性。有学者利用溴脱氧尿苷长时程标记方法发现,在小鼠关节软骨表层确实存在一群增殖缓慢的细胞,提示关节软骨表层可能存在关节软骨干/祖细胞^[7]。一般认为,关节软骨损伤首先发生在关节软骨表面,导致关节软骨浅表层细胞外基质丢失和细胞死亡。因此,关节软骨极差的自我修复能力可能跟浅表层关节软骨干/祖细胞丢失有关^[8-9]。

由于干细胞表面高表达纤连蛋白受体-整联蛋白($\alpha 5$ 亚基和 $\beta 1$ 亚基),纤连蛋白黏附法已广泛应用于羊毛囊干细胞、人表皮干细胞、鸡关节软骨干细胞等的分离^[10-12]。本研究利用干细胞易于结合纤连蛋白的特性,从新生3~5 d小鼠的关节软骨表层分离关节软骨表层细胞(ACSC),并鉴定其干细胞特征,探索为软骨损伤修复提供新种子细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

5周龄裸鼠(雄性,15~20 g,5只),8周龄C57小鼠(雌性,20~25 g,10只;雄性,25~30 g,5只)均购自北京华阜康生物技术有限公司,并饲养在第三军医大学第三附属医院 SPF级动物中心,经第三军医大学实验动物管理委员会许可进行相关实验。

1.2 主要试剂及仪器

纤连蛋白、I型胶原酶、II型胶原酶均购自美国Gibco公司;0.25%胰蛋白酶、双抗、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、胎牛血清(FBS)、DMEM高糖培养基、DMEM低糖培养基、DMEM-F12培养基、 α -MEM培养基均购自美国Hyclone公司;Trizol试剂购自美国Invitrogen公司;CD31单克隆抗体、CD34单

克隆抗体、CD44单克隆抗体、CD45单克隆抗体、CD90单克隆抗体、基质胶均购自美国BD公司;牛血清白蛋白(BSA)、胰岛素-转铁蛋白(ITS)、碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒均购自美国Sigma公司;成脂诱导检测试剂盒购自美国Chemicon公司;实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒、PCR反转录试剂盒均购自日本Takara Biotechnology公司。

Accuri C6 Flow Cytometer流式细胞仪购自美国BD公司、MX 3000 P定量PCR仪购自美国Stratagene公司。

1.3 软骨细胞的分离培养

取新生3~5 d小鼠,75%酒精浸泡消毒,灭菌器械剪开小鼠皮肤,暴露并打开髋关节,游离股骨头,用平头镊小心将股骨头末端的软骨帽(股骨头软骨)取下。软骨帽进一步剪碎至1 mm³大小,加入0.1% II型胶原酶消化过夜;次日,观察软骨组织消化情况,用DMEM-F12培养基(含10% FBS)终止消化,重悬细胞计数后接种于12孔板用于后续实验。

1.4 ACSC的分离培养及其表面抗原鉴定

ACSC的分离培养:取新生3~5 d小鼠,75%酒精浸泡消毒,剪取膝关节,体式显微镜下分离肌腱和韧带。0.25%胰蛋白酶消化1 h,再用173 U/mL的I型胶原酶消化1.5 h,收集细胞离心并计数,按 5×10^5 个细胞接种到预先包被的10 cm培养皿中(0.1%纤维蛋白包被2 h,3% BSA封闭30 min),20 min后DMEM高糖培养基洗去未黏附的细胞,洗2次,黏附的细胞用DMEM高糖培养基培养,待细胞融合后按体积1:10传到未包被的培养皿。

ACSC表面抗原的流式细胞术鉴定:生长至融合的细胞经0.25%胰蛋白酶消化,1 000 r/min离心10 min,PBS洗涤2次,重悬至单个细胞,分装至1.5 mL EP管。2 000 r/min离心5 min,再次重悬至单个细胞,1:1 000稀释加入干细胞表面标志物抗体(CD31、CD34、CD44、CD45与CD90)。4℃避光孵育30 min,PBS洗涤2次,1 500 r/min离心5 min,除去未结合的抗体,流式细胞仪检测干细胞表面标志物在ACSC中的表达。

1.5 qRT-PCR 方法检测 ACSC 和软骨细胞的相关基因表达

按照说明书采用 Trizol 法提取 ACSC 和软骨细胞的 RNA,用 qRT-PCR 试剂盒检测间充质干细

胞(MSC)标志分子(*CD73*、*CD90*、*CD105*)、软骨表层特异标志基因(*Prg4*、*Erg*、*Ten C*) 和软骨细胞相关基因(*Col2*、*Acan*、*MATN1*) 的表达,定量引物序列见表 1。

表 1 定量引物序列

| 基因 | 引物序列(5'-3') | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>CD73</i> | 正向:CCTGCACACAAACGACGTG | 反向:CTGGTCTCCGGCATCCAAAA |
| <i>CD90</i> | 正向:GCTCTCAGTCTTGCAGGTGT | 反向:CAGGCGAAGGTTTTGGTTCA |
| <i>CD105</i> | 正向:CCCTCTGCCATTACCTG | 反向:GTAAACGTCACCTCACCCCTT |
| <i>Prg4</i> | 正向:GAAAATACTTCCCGTCTGCTTGT | 反向:ACTCCATGTAGTGCTGACAGTTA |
| <i>Erg</i> | 正向:AGCGTCCTCAGTTAGATCCTTAC | 反向:TCATGTTGGGCTTGCTCTTCC |
| <i>Ten C</i> | 正向:TTTGCCCTCACTCCCGAAG | 反向:AGGGTCATGTTTAGCCCACTC |
| <i>Col2</i> | 正向:CTGGTGGAGCAGCAAGAGCAA | 反向:CAGTGGACAGTAGACGGAGGAAAG |
| <i>Acan</i> | 正向:CCTGCTACTTCATCGACCCC | 反向:AGATGCTGTTGACTCGAACCT |
| <i>MATN1</i> | 正向:CAGGTCCCTGATAGCCTCAGT | 反向:CCACGGGTCTCACACTTCG |
| <i>Cyclophilin A</i> | 正向:CGAGCTCTGAGCACTGGAGA | 反向:TGGCGTGTAAGTCACCACC |

1.6 ACSC 单克隆形成能力检测

ACSC 以 50 个/cm² 接种于 6 孔板;用 DMEM 高糖培养基培养,每 3~4 d 换液 1 次;根据细胞生长状况,在培养 7~14 d 时对克隆进行拍照;以 50 个细胞以上的群体为 1 个克隆(单细胞进行有丝分裂 5 次)。

1.7 ACSC 的诱导分化及检测

1.7.1 成软骨诱导分化及染色

ACSC 以每孔 1×10⁵ 个细胞种于 12 孔板,用 DMEM-F12 培养基培养细胞。待细胞 90% 融合,将其分为空白组和诱导组,空白组用普通培养基(含 10% FBS+双抗的 DMEM-F12 培养基)进行培养,诱导组换软骨诱导培养液(含 10% FBS+双抗+ITS 的 DMEM-F12 培养基)进行软骨诱导,每 2 d 换液 1 次。诱导开始记为 0 d,诱导至 7 d。

弃去培养基,PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 无水甲醇室温固定 30 min,再予 PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 1%阿尔新蓝染液置于 4℃ 冰箱过夜;第 2 天弃去染液,以含 0.1 mol/L 的盐酸洗涤 2 次,充分清洗去除非特异染色。

1.7.2 成骨诱导分化及染色

ACSC 以每孔 1×10⁵ 个细胞种于 12 孔板,用 DMEM 高糖培养基培养细胞。待细胞生长达到 80% 融合,将其分为空白组和诱导组,空白组用普通培养基(含 10% FBS+双抗的 α-MEM 培养基)进行培养,诱导组换用成骨诱导培养液(含 10% FBS+双

抗+0.01 mol/L β-磷酸甘油钠+50 μg/mL 抗坏血酸+0.01 μmol/L 地塞米松的 α-MEM 培养基)进行成骨诱导,每 3 d 换液 1 次。诱导培养 14 d 后对 12 孔板培养的细胞进行 ALP 染色和茜素红染色,观察其成骨及矿化情况。

弃去培养基,PBS 洗涤 2 次,4% 多聚甲醛 4℃ 固定 15 min,再以 PBS 洗涤 2 次,加入 ALP 染色液(根据说明书现配现用),37℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次。

弃去培养基,PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛,4℃ 固定 1 h;弃去固定液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 500 μL 含 1% 茜素红和 2% 乙醇的混合染色工作液,于室温染色 15 min;吸弃染色液,在摇床上用去离子水洗涤染过的细胞 5 次,每次 3 min;37℃ 保温箱中过夜。

1.7.3 成脂诱导分化及染色

ACSC 以每孔 1×10⁵ 个细胞种于 12 孔板,生长至 100% 融合,将其分为空白组和诱导组。空白组用普通培养基(含 10% FBS+双抗的 DMEM 低糖培养基)进行培养。诱导组换用诱导培养液(含 10% FBS+双抗+1 μmol/L 地塞米松+0.5 mmol/L 磷酸二酯酶抑制剂+100 μmol/L 吡啶美辛+10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 低糖培养基)进行成脂诱导,诱导 3 d,换维持培养液(含 10% FBS+双抗+10 μg/mL 胰岛素的 DMEM 低糖培养基)培养 3 d,如此循环至成脂诱导 21 d,用 4% 多聚甲醛固定,油红 O 染

色,观察脂肪积聚。

弃去培养基,PBS洗涤2次;4%多聚甲醛室温固定20 min;PBS洗涤2次,空气中干燥;加入0.5%的油红O液室温孵育1 h;PBS洗涤2次。

1.8 ACSC裸鼠移植成软骨实验

取未经诱导的第6代ACSC,经胰酶消化后以细胞数 $6\times10^6\sim8\times10^6$ 个/mL与基质胶按体积1:1混匀,每只裸鼠以250 μ L混合液皮下注射于背腹部。10 d后裸鼠予吸入CO₂处死,取下背腹部组织块,予4%多聚甲醛固定、梯度脱水、石蜡包埋、连续切片,苏木素-伊红(HE)和阿尔新蓝染色。

1.9 统计学分析

采用SPSS 10.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACSC与软骨细胞的形态学及基因表达比较

相比软骨细胞在低密度培养时呈规则的多边形及融合时呈铺路石样的形态特性,经纤维蛋白黏附法分选出的ACSC形态偏长,类似成纤维细胞,见图1。

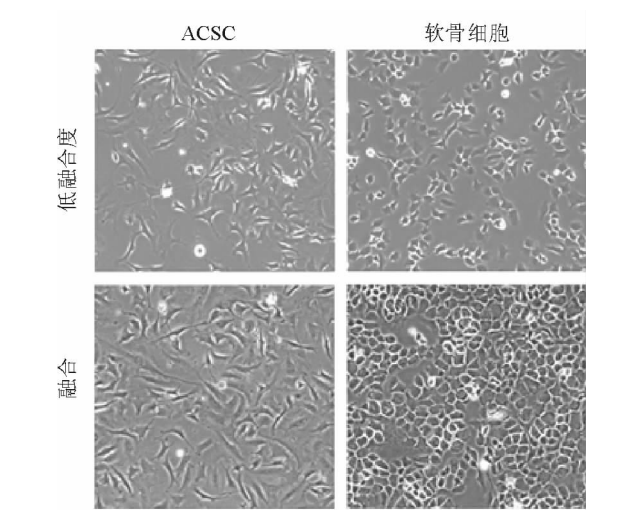


图1 ACSC与软骨细胞在光学显微镜下形态比较($\times100$)

基因检测分析发现:以ACSC表达的MSC、软骨表层细胞及软骨细胞标志物的mRNA水平为1,则软骨细胞显著性低水平表达MSC标志物CD73 (0.08 ± 0.07 , $P<0.001$)、CD90 (0.07 ± 0.01 , $P<$

0.001)、CD105 (0.37 ± 0.02 , $P<0.001$)和软骨表层细胞标志物Prg4 (0.42 ± 0.01 , $P<0.001$)、Erg (0.61 ± 0.02 , $P<0.001$)、Ten C (0.64 ± 0.07 , $P<0.001$),但显著性高水平表达软骨细胞标志物Col2 (6.89 ± 0.06 , $P<0.001$)、Acan (6.51 ± 0.04 , $P<0.001$)、MATN1 (14.57 ± 4.21 , $P<0.01$)。见图2。

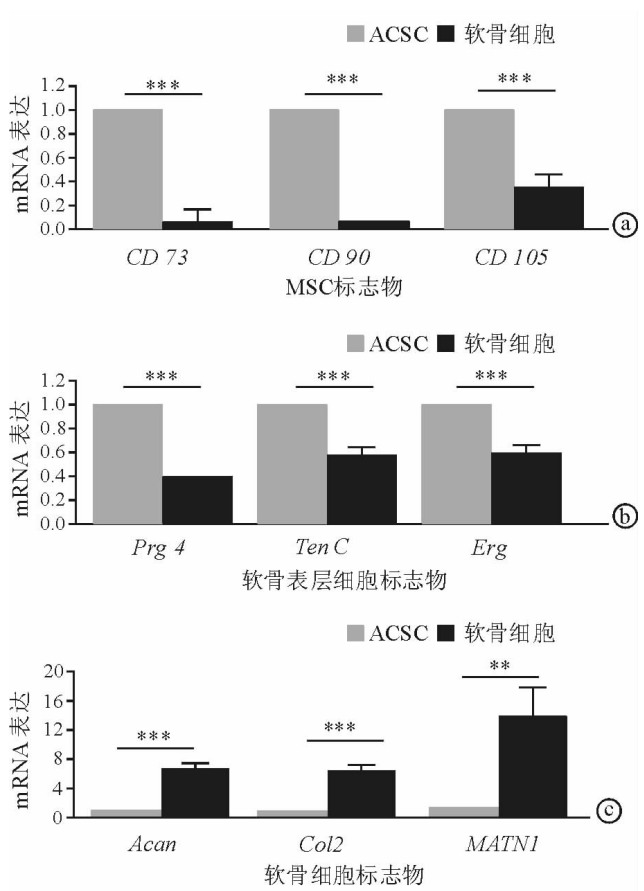


图2 ACSC与软骨细胞相关基因表达比较 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$,对ASCs的mRNA水平

2.2 ACSC表面干细胞抗原的表达

流式细胞仪检测结果显示:ACSC高表达干细胞表面阳性标志物CD44和CD90,分别为96.6%和68.3%;但几乎不表达干细胞表面阴性标志物CD31、CD34和CD45,分别为0.072%、0.144%和0.076%(下页图3)。

2.3 ACSC单克隆形成能力

单克隆形成实验显示:经14 d培养,单个ACSC可以形成大于50个细胞的单克隆细胞群,见下页图4。

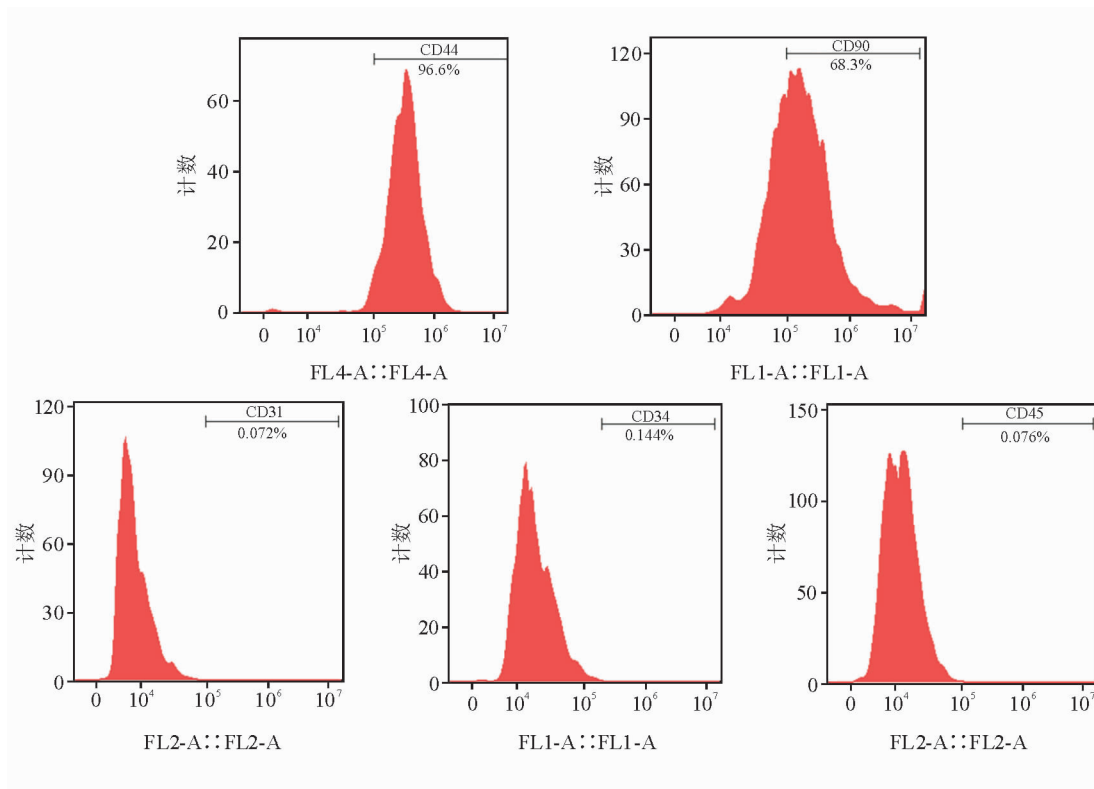


图 3 ACSC 表面干细胞抗原的表达

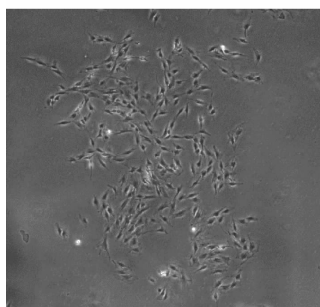


图 4 光学显微镜下 ACSC 单克隆形成情况(×40)

2.4 ACSC 多系诱导分化情况

经过 7 d 连续成软骨诱导,ACSC 阿尔新蓝染色可见明显着色,即分泌较多软骨细胞的细胞外基质和蛋白多糖(图 5a);经过 14 d 连续成骨诱导,ACSC 的 ALP 表达量显著高于空白组(图 5b),茜素红染色明显比空白组着色深,形成的矿化结节数量也明显多于空白组(图 5c);经过 21 d 连续成脂诱导,ACSC 油红 O 染色呈显著的阳性,大量脂肪滴着红色(图 5d)。

2.5 ACSC 裸鼠移植成软骨能力检测

裸鼠皮下移植 ACSC 后 10 d 取材,经石蜡包埋切片及 HE 和阿尔新蓝染色显示:细胞呈软骨细胞样,并大量分泌软骨细胞的细胞外基质和蛋白多糖,阿尔新蓝染色可见明显着色(图 6)。

3 讨论

组织特异性干细胞的募集、增殖和分化是组织损伤后最高效的修复途径。随着研究手段的更新,近年来大量研究显示,在关节软骨表层存在一群具有干细胞特性的细胞。

本研究利用纤连蛋白黏附法从新生 3~5 d 小鼠的关节软骨表层成功分离出 ACSC。此类细胞高表达软骨表层细胞特异标志基因(*Prg4*、*Erg*、*Ten C*)和低表达软骨细胞相关基因(*Col2*、*Acan*、*MATN1*),与文献^[13-16]报道一致。此外,ACSC 与关节的软骨细胞在形态学上也存在显著差异。ACSC 类似成纤维细胞,无原代关节软骨细胞在低密度培养时呈规则的多边形及融合时呈铺路石样的形态特性。

干细胞表面标志物的表达水平在判断细胞特性中起决定作用,但目前没有公认的单一性标志物,主要采用几种标志物的组合。本研究通过流式细胞仪分别检测 2 种干细胞阳性标志物(CD44、CD90)和 3 种阴性标志物(CD31、CD34、CD45),结果表明,通过纤连蛋白黏附法分离的 ACSC 具有明显的干细胞特性。自我更新和多系诱导分化能力是干细胞的基本特征。克隆形成实验发现,单个 ACSC 可以形成大于 50 个细胞的单克隆细胞群(发生大于 5 次

的有丝分裂);诱导培养条件下,ACSC 分泌大量软骨细胞的细胞外基质和 ALP,并生成矿化结节及发生脂肪积聚,表现出很强的单克隆形成能力和三系诱导分化能力(成软骨、成骨和成脂分化),说明

ACSC 具有明显的干细胞特性;未经诱导的第 6 代 ACSC 的裸鼠移植实验发现,细胞呈软骨细胞样并大量分泌细胞外基质和蛋白多糖,进一步说明 ACSC 具备体内自行向软骨细胞分化的能力。

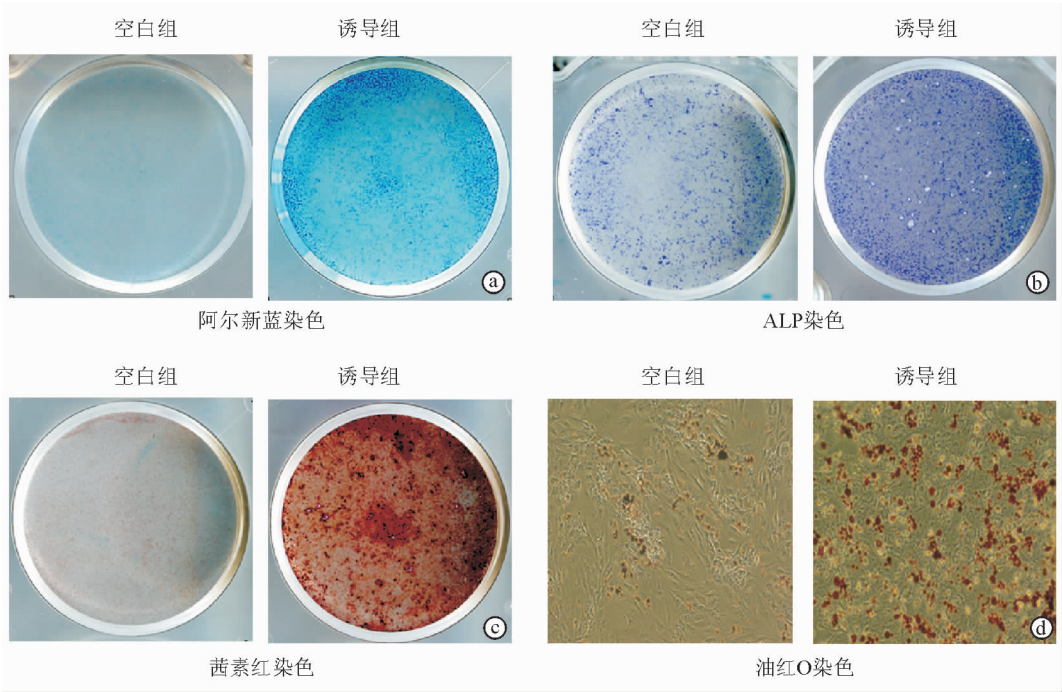


图 5 ACSC 多系诱导分化能力检测

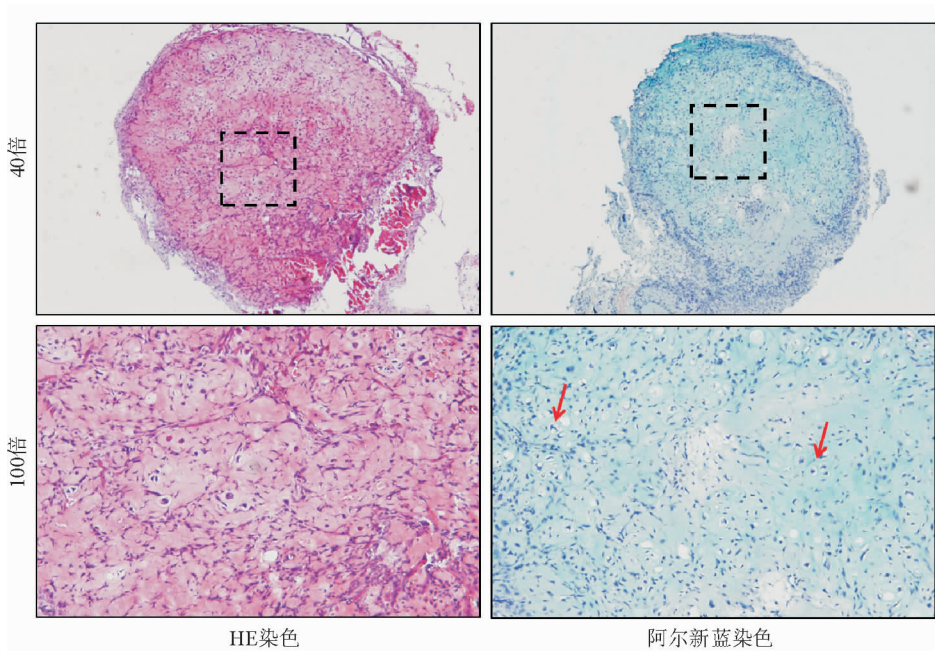


图 6 ACSC 裸鼠移植成软骨能力检测光学显微镜下所见(红色箭头所示为软骨细胞样细胞)

目前,软骨损伤修复主要采用其他组织来源的 MSC(主要为骨髓 MSC)体外大量扩增,或自体软骨细胞移植。MSC 扩增培养过程中,由于自身有限的增殖能力和容易去分化的特性,扩增后的软骨细胞丢失软骨表型,导致移植区新形成的软骨最终变为

纤维软骨,无法达到透明软骨所具有的耐磨损和耐压力的生物特性,严重影响后期临床效果。此外,自体软骨细胞移植需要 2 次手术,带来的风险和痛苦不为大多数患者所接受^[17-19]。理想的关节软骨修复要求新生软骨具有与原关节软骨相同的分层结构、

生物学特性及基质组分,并实现功能学恢复,而非仅仅是填充缺损部位。Jiang 等^[20]和 Seol 等^[21]发现,关节软骨表层来源的关节软骨干/祖细胞能够分化为软骨细胞,并且可以迁移至软骨损伤部位进行软骨修复,但具体机制不清。激活内源性的关节软骨干/祖细胞促进缺损部位自我修复为软骨再生提供了可能性。因此,随着对 ACSC 研究的深入,有望实现依靠软骨损伤部位自有的表层干细胞形成种子细胞,达到促进软骨损伤修复的目的。分离培养 ACSC 是了解该细胞特性的第一步,本研究提供了一种经济、有效的实验方法,可望促进生理和病理情况下 ACSC 生物学行为的研究。

参 考 文 献

- [1] Karlsson C, Thornemo M, Henriksson HB, et al. Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint[J]. J Anat, 2009, 215(3): 355-363.
- [2] Xue K, Zhang X, Qi L, et al. Isolation, identification, and comparison of cartilage stem progenitor/cells from auricular cartilage and perichondrium[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 732-741.
- [3] Derks M, Sturm T, Haverich A, et al. Isolation and chondrogenic differentiation of porcine perichondrial progenitor cells for the purpose of cartilage tissue engineering [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 198(3): 179-189.
- [4] Kobayashi S, Takebe T, Inui M, et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(35): 14479-14484.
- [5] Kobayashi S, Takebe T, Zheng YW, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26393.
- [6] Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair[J]. Front Genet, 2016, 7: 213.
- [7] Candela ME, Yasuhara R, Iwamoto M, et al. Resident mesenchymal progenitors of articular cartilage[J]. Matrix Biol, 2014, 39: 44-49.
- [8] Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis[J]. Bone, 2012, 51(2): 241-248.
- [9] Caramés B, Taniguchi N, Seino D, et al. Mechanical injury suppresses autophagy regulators and pharmacologic activation of autophagy results in chondroprotection [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(4): 1182-1192.
- [10] Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713-724.
- [11] He N, Dong Z, Tao L, et al. Isolation and characterization of hair follicle stem cells from Arbas Cashmere goat [J]. Cytotechnology, 2016, 68(6): 2579-2588.
- [12] Li L, Ma Y, Li X, et al. Isolation, culture, and characterization of chicken cartilage stem/progenitor cells[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 586290.
- [13] Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, et al. Roles of beta-catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells[J]. Lab Invest, 2011, 91(12): 1739-1752.
- [14] Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, et al. A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis [J]. Dev Biol, 2008, 316(1): 62-73.
- [15] Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 6): 889-897.
- [16] Iwamoto M, Tamamura Y, Koyama E, et al. Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis[J]. Dev Biol, 2007, 305(1): 40-51.
- [17] Burke J, Hunter M, Kolhe R, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis[J]. Clin Transl Med, 2016, 5(1): 27.
- [18] Freitag J, Bates D, Boyd R, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy. A review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2016, 17: 230.
- [19] Zhang W, Ouyang H, Dass CR, et al. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis [J]. Bone Res, 2016, 4: 15040.
- [20] Jiang Y, Cai Y, Zhang W, et al. Human cartilage-derived progenitor cells from committed chondrocytes for efficient cartilage repair and regeneration[J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(6): 733-744.
- [21] Seol D, McCabe DJ, Choe H, et al. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(11): 3626-3637.

(收稿:2018-02-05)

(本文编辑:杨晓娟)