

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.03.03

❖ 基础研究 ❖

BMP-7 联合 TGF-β3 在诱导间充质干细胞分化中的作用

左后东

(医学影像四川省重点实验室,川北医学院附属医院放射科,四川南充 637000)

【摘要】目的:探讨体外骨形态发生蛋白-7(BMP-7)联合转化生长因子β3(TGF-β3)在诱导骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞及软骨中的作用。**方法:**在完全培养基中加入不同浓度的 BMP-7 和 TGF-β3(10 ng/mL:10 ng/mL,25 ng/mL:25 ng/mL,50 ng/mL:50 ng/mL,100 ng/mL:100 ng/mL)制成分化培养基,分别记为低浓度、中低浓度、中浓度和高浓度组,完全培养基作为对照组。每组分别用上述不同浓度分化培养基培养 4×10^4 个比格犬股骨骨髓间充质干细胞,悬浮沉淀细胞团,并定期更换分化培养基。分别于 7、14、21、28、35、42 d 观察细胞团分化及聚集成团情况。随后多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片后行 HE 染色,阿利辛蓝染色,免疫荧光染色。**结果:**比格犬骨髓间充质干细胞生长情况良好,对照组及不同浓度分化培养基的干细胞在第 7 天均未见细胞聚集,在第 14 天,中浓度和高浓度组干细胞聚集成团,而对照组、低浓度组和中低浓度组干细胞呈散在点状结构,未见明显聚集成团;在第 21、28、35、42 天,中浓度和高浓度组聚集成团的结构大小未见明显变化,呈乳白色胶状,结构更为紧密,且富有弹性,高浓度组聚集成团结构直径大于中浓度组(1.2 mm vs. 0.6 mm),而对照组、低浓度组和中低浓度组干细胞仍呈分散状态,未见聚集成团。经 HE 染色、阿利辛蓝染色、免疫荧光反应证实聚集成团的结构表达丰富的酸性粘多糖和 II 型胶原蛋白。免疫荧光反应定量结果显示干细胞的值为 (1.126 ± 0.030) ,诱导细胞的值为 (23.211 ± 0.816) ,软骨细胞的值为 (9.669 ± 0.278) ,各组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**BMP-7 和 TGF-β3 联合作用能有效诱导骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞及软骨。

【关键词】骨形态发生蛋白-7;转化生长因子β3;间充质干细胞;软骨

【中图分类号】R336 **【文献标志码】**A

The role of BMP-7 combined with TGF-3 in inducing mesenchymal stem cell differentiation

ZUO Hou-dong

(Medical Imaging Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Radiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective:To investigate the role of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) combined with transforming growth factor 3 (TGF-3) in inducing the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into chondrocytes and cartilage. **Methods:**BMP-7 and TGF-3 (10ng/ml:10ng/ml,25 ng/ml:25 ng/ml,50 ng/ml:50 ng/ml,100ng/ml:100ng/ml) were added to the complete mediums to prepare differential mediums with different concentrations,which were marked as low,medium-low,medium and high concentration groups respectively,complete medium was used as control group. Beagle dog femur bone marrow MSCs were cultivated under standard conditions and approximate 4×10^4 cells were counted,incubated and centrifuged with the above-mentioned different concentrations of differential medium respectively. The complete medium was used as the control group. And the differential mediums were changed regularly. The differentiation and aggregation of cells were observed at different time (7,14,21,28,35 and 42 day respectively). When there was no significant change in cell agglomeration,cell agglomeration was fixed with paraformaldehyde,paraffin-embedded,sectioned and performed with HE staining,Alcian blue staining and immunofluorescence staining. **Results:**The bone marrow MSCs grew well,the gathered stem cells were not seen on the 7th day in the control group and different concentrations of differential mediums. On 14th day,the stem cells of the medium and high concentration group aggregate,the stem cells of the control group,the low concentration group and the medium-low concentration scattered in the dot structure. On the days of 21,28,35,42,there were no obvious changes of the structure size in the medium concentration and high concentration group,which showed as the milky white,more dense,and elastic structure. The diameter of the high concentration group was larger than that of the medium concentration group (1.2mm vs. 0.6mm). The stem cells of the control group,the low concentration group and the medium-low concentration group were still dispersed and there were no clusters. HE staining,Alcian blue staining and immunofluorescence staining confirmed that the aggregation structure ex-

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81701756);四川省教育厅课题(18ZB0215);南充市川北医学院市校合作项目(18SXHZ0389);国家留学基金委留学项目(CSC201908510078)

作者简介:左后东(1984-),博士,副主任医师。E-mail:zuohoud@163.com

pressed abundant acidic mucopolysaccharide and type II collagen. The quantitative results of immunofluorescence staining showed that the values of stem cells, induced cells and chondrocytes were 1.126 ± 0.03 , 23.211 ± 0.816 and 9.669 ± 0.278 , respectively, and there were significant differences among the groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** BMP-7 combined with TGF- β 3 can effectively induce bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into chondrocytes and cartilage.

[Key words] Bone morphogenetic protein-7; Transforming growth factor β 3; Mesenchymal stem cells; Cartilage

软骨损伤是一种多病因、多机制导致的慢性关节疾病,以关节疼痛、变形及功能障碍为主要表现,治疗不及时或治疗效果不理想,最终会发展为骨关节炎,严重影响患者的生活质量。研究^[1]表明,关节软骨损伤是关节退变及骨性关节炎的始动环节。多种因素可导致关节软骨损伤,如年龄、肥胖、生活环境、不合理或过量运动等。值得注意的是,由于缺乏血管和神经,关节软骨一旦损伤则很难自行修复。目前软骨损伤治疗方法包括关节置换、软骨移植等^[2],但这些治疗方法远期效果不甚理想,甚至会加重患者的痛苦。因此实现安全、可持续软骨修复的同时又能保持良好软骨功能特性就显得意义重大,这也是目前临床和患者的迫切需求。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有向多种细胞分化的潜能,其中包括软骨细胞转化^[3]。研究^[4-5]表明,骨形态生成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)及转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)在软骨发生、成熟、再生、结构完整性、软骨内平衡等方面发挥关键作用。本研究拟通过 BMP 和 TGF- β 家族成员中的 BMP-7 和 TGF- β 3 联合作用,探索其在体外诱导干细胞分化为软骨细胞和组织的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

比格犬干细胞(Cat. No. CAXMX-01001, 苏州赛业生物科技公司),完全培养基(Cat. No. CAXMX-90011, 苏州赛业生物科技公司),BMP-7(Cat. No. HEOPP-02102, 苏州赛业生物),TGF- β 3(ab217402, abcam, UK),兔抗 II 型胶原蛋白抗体(15943-1-AP, Proteintech),CL594 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(SA00006-4, Proteintech)和比格犬软骨细胞(Cat No: DOG-iCell-s003, 上海赛柏康)。

1.2 方法

1.2.1 干细胞的分化培养 在 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的条件下用购买比格犬干细胞提供的完全培养基培养比格犬干细胞。每 2~3 d 更换培养基,当细胞融合度达到 80% 左右进行传代。收集第四代干细胞,计数干细胞(约 4×10^4 个)并移到 15 mL 离心管。250 g(1 200 rpm)离心 4 min,之后弃上清液,用 0.5 mL 完全培养基清洗沉淀细胞团 2 次。提前准备分化培养基,在完全培养基中按照比例分别加入 10 ng/mL: 10 ng/mL、25 ng/mL: 25 ng/mL、50 ng/mL: 50 ng/mL、100 ng/mL: 100 ng/mL 的 BMP-7 和 TGF- β 3 制成低、中、高浓度的分化培养基,分别记为

低浓度组、中低浓度组、中浓度组和高浓度组;未加入 BMP-7 和 TGF- β 3 的培养基作为对照组。用 0.5 mL 新配置的分化培养基悬起沉淀细胞团,随后 150 g(800 rpm)离心 5 min,松开一圈离心管盖,放入 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中培养。48 h 后,轻轻弹动离心管底部,使细胞团重悬到培养基中,每 2~3 d 更换分化培养基。分别于 7、14、21、28、35、42 d 观察细胞团分化及成团情况。随后拍照、4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片后检测。

1.2.2 HE 染色 将组织切片置于 63 °C 烤箱中烤片 2 h,二甲苯脱蜡 10 min \times 2 次,梯度酒精(100%、95%、80%、70%)依次浸泡 2 min,蒸馏水洗 1 min,苏木精染色 1 min,自来水洗 1 min,1% 盐酸酒精分化 10 s,自来水洗 1 min,1% 氨水返蓝 30 s,自来水洗 1 min,伊红染色 50 s,自来水洗 1 min,梯度酒精(70%、80%、95%、100%)依次浸泡 1 min,吹干,中性树胶封片。

1.2.3 阿利辛蓝色染色 诱导后的细胞切片经二甲苯脱蜡 10 min \times 2 次后,再经梯度酒精(100%、95%、80%、70%)依次浸泡 2 min,蒸馏水洗 1 min,吸去蒸馏水,滴加阿利辛蓝染液室温染色 30 min。之后用蒸馏水清洗 3 次,镜下观察,内酸性粘多糖会被染成蓝色。

1.2.4 免疫荧光反应 诱导后的细胞切片脱水和脱蜡后,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。随后用 10% FBS,0.25% Triton X-100 的 PBS 封闭 2 h,弃封闭液后用 1/100 一抗(兔抗 II 型胶原蛋白抗体)孵育,4 °C,过夜。弃一抗并用 PBS 清洗 5 min。再加入 1/500 二抗(CL594 标记的山羊抗兔 IgG 抗体),室温避光孵育 2 h。采用购买比格犬软骨细胞提供的培养基和方法培养比格犬软骨细胞,在 24 孔板底部放置盖玻片,每孔种植 2×10^4 个细胞,随后在 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中培养 6 h,制作成细胞爬片。细胞爬片按上述方法进行免疫荧光染色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。定量资料均以($\bar{x} \pm s$)表示。对 CL5949 通道的相对荧光强度,采用两样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长及聚集情况

显微镜下所有干细胞生长情况良好,形态正常(图 1)。对照组及不同浓度分化培养基培养的干细

胞在第 7 天均未见细胞明显变化,在第 14 天,中浓度和高浓度组干细胞聚集成团,而对照组、低浓度组和中低浓度组干细胞分散在培养基中,未见聚集成团,在第 21、28、35、42 天,中浓度和高浓度组聚集成团的结构大小未见明显变化,呈乳白色胶状,结构更为紧密,且富有弹性,三组重复实验的结果显示高浓度组聚集成团结构的平均直径为 (1.2 ± 0.1) mm,大于中浓度组的 (0.6 ± 0.2) mm,而对照组、低浓度组和中低浓度组干细胞仍呈分散状态,未见成团

(图 2)。

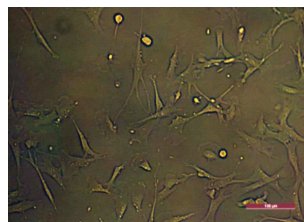


图 1 显微镜下干细胞的形态($\times 200$)

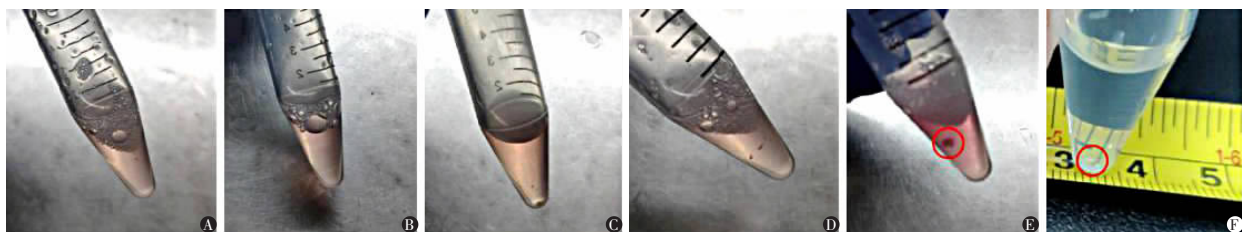


图 2 干细胞经诱导分化后的形态

A. 对照组干细胞,14 d 后细胞未见明显聚集;B. 低浓度组,14 d 后细胞未见聚集;C. 中低浓度组,14 d 后细胞未见明显聚集,呈散在点状结构;D. 中浓度组,14 d 后细胞局部聚集,至 42 d 聚集成团结构未见明显变化,直径约 (0.6 ± 0.2) mm;E. 高浓度组,14 d 后细胞聚集成团;F. 至 42 d,成团结构大小未见明显变化,成乳白色胶状,直径约 (1.2 ± 0.1) mm(管中液体为多聚甲醛)。

2.2 HE 染色结果

比较 3 种细胞的 HE 染色结果,可以发现诱导细胞的细胞尺寸更小,并且细胞的间隙变得更加紧密,说明细胞朝着形成致密组织的方向发生分化。而干细胞和软骨细胞,表现出离体培养细胞的特征,即单个细胞呈长条状,细胞之间联系松散。见图 3。

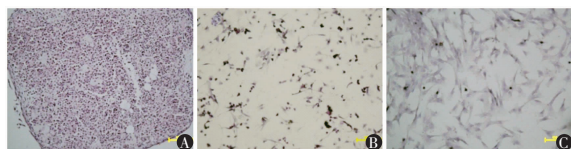


图 3 显微镜下各组细胞 HE 染色结果($\times 200$)

A. 诱导细胞;B. 干细胞;C. 软骨细胞。

2.3 阿利辛蓝染色结果

阿利辛蓝染色证明了诱导细胞的团状结构表达丰富的酸性粘多糖(图 4)。阿利辛蓝染料能将细胞表达的酸性粘多糖染成蓝色。酸性粘多糖一般黏附在细胞膜上或者分泌于细胞间质,参与组织内微环境的构建。干细胞通常不表达酸性粘多糖,而软骨细胞的表达量较高。干细胞结果为阴性,软骨细胞和诱导细胞为阳性,且诱导细胞的蓝色更深一些。可能是因为软骨细胞分泌到细胞间隙的酸性粘多糖,在染色的过程中可能会被清洗掉。

2.4 免疫荧光染色反应

免疫荧光反应证实聚集成团的诱导细胞表达丰富 II 型胶原蛋白(图 5)。II 型胶原蛋白的免疫荧光,干细胞亮度很弱,说明 II 型胶原蛋白表达很低;诱导细胞很亮,说明表达很高;软骨细胞荧光亮度居中。推测干细胞诱导分化成的组织具有软骨细胞表达 II 型胶原蛋白的特征。imageJ 软件对各组细胞

的 CL594 通道进行定量结果显示,诱导细胞的值为 (23.211 ± 0.816) ,干细胞的值为 (1.126 ± 0.03) ,软骨细胞的值为 (9.669 ± 0.278) ,各组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

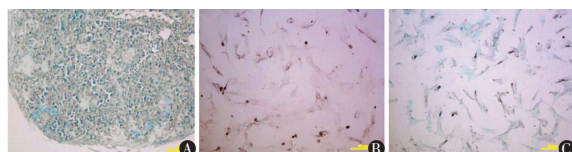


图 4 显微镜下各组细胞阿利辛蓝染色结果($\times 200$)

A. 诱导细胞聚集成团结构切片阿利辛蓝色染色,酸性粘多糖被染成蓝色,说明诱导分化的组织表达酸性粘多糖,干细胞经诱导后形成软骨组织;B. 干细胞经阿利辛蓝染色后,结果为阴性;C. 软骨细胞经染色后有明显的蓝色。

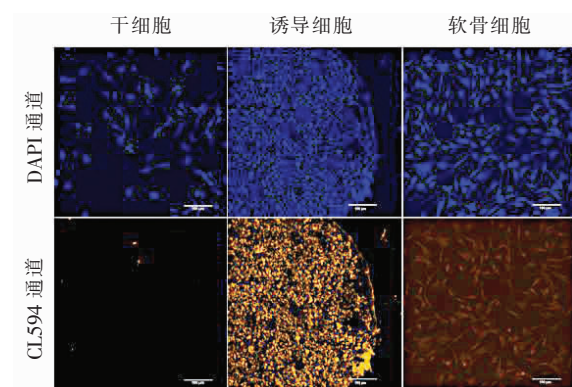


图 5 免疫荧光染色后激光共聚焦检测($\times 200$)

DAPI 通道定位细胞核的位置,CL594 通道定位 II 型胶原蛋白的表达。干细胞基本不表达,软骨细胞表达较低,诱导细胞表达最高,有细胞核的地方基本都表达了。软骨细胞荧光强度不如诱导分化组织,这可能是由于软骨细胞间隙疏松,II 型胶原蛋白分泌到细胞外,在染色的过程中被洗掉了。

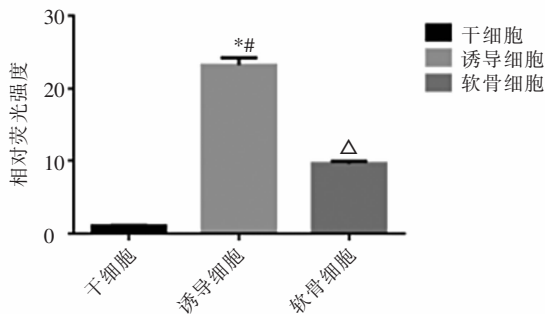


图 6 各组细胞的相对荧光强度

* $P < 0.05$, 与干细胞组比较; # $P < 0.05$, 与软骨细胞组比较;

Δ $P < 0.05$, 与干细胞组比较。

3 讨论

软骨主要是由软骨细胞和大量细胞外基质构成,其中细胞外基质包括水和富含蛋白聚糖和胶原纤维,其中以 II 型胶原蛋白纤维为主。软骨内 II 型胶原蛋白纤维交联排列成网,粘多糖和水镶嵌其中,构成了软骨的基本骨架。软骨损伤在日常生活中较为常见,多种原因可导致关节软骨损伤,如年龄、肥胖及不合理运动等。关节软骨损伤进一步会导致关节退变和关节炎的发生^[1]。而软骨自身由于缺乏神经和血管,一旦损伤很难自行修复。

近年来,新兴的软骨组织工程研究为软骨的修复和再生带来了希望。许多研究^[6-8]表明,骨髓间充质干细胞具有多分化潜能,可以向软骨细胞分化并可形成软骨组织;并且干细胞在某些因素作用和诱导下能有效的促进软骨的再生和修复,如来自软骨基质的水凝胶^[9],卡托原蛋白(Kartogenin)和 TGF- β ^[10]等。研究表明,TGF- β 信号通路可能在干细胞分化^[11-12]及软骨发生、形成、结构完整性、软骨内平衡及软骨修复方面发挥关键作用^[13],这些都为软骨修复提供了极大理论和技术支持。TGF- β 信号通路是高分化、多功能性和高效性的信号网络。TGF- β 超大家族包括 TGF- β s、骨形态生成蛋白(BMPs)、生长分化因子(GDFs)、Nodal、活化素(Activin)和抑制素(Inhibin)等成员,大致可分为 TGF- β /Activin/Nodal 和 BMP/GDF/MIS 两个亚家族。目前研究表明,后者信号通路在软骨发生、生成及骨形成方面发挥重要作用^[4,11,14],而关于前者通路,目前研究较多的是 TGF- β s 因子的作用。TGF- β s 因子单独或者与其他配体或多聚体共同作用后,能诱导和促进干细胞向软骨细胞转化,促进软骨细胞的增殖,诱导细胞基质的合成及维持软骨内环境的稳定,对软骨损伤修复起到正调节作用^[15-16]。在 TGF- β 亚家族中,BMP/GDF/MIS 信号通路参与诱导软骨与骨的发育形成,其中骨形态生成蛋白可以增加正常和损伤软骨细胞基质的代谢,而细胞基质代谢的增

强会替代受损软骨细胞基质分子,从而使得 BMP 能够在增强受损软骨内在修复能力方面发挥重要作用^[14]。BMP 还能够促进间充质干细胞向软骨细胞分化及软骨细胞的成熟和再生^[17]。这种促进作用的关键在于其能够促进蛋白多糖及 II 型胶原的合成^[18-19],而这正是软骨最主要的组成成分和软骨的基本骨架。

干细胞在经过含 TGF- β 3 的培养基培养后能展现出具有更好性能的基质产物和优于正常软骨细胞的修复能力,这可能与 II 型胶原沉积明显增多有关^[20-21]。TGF- β 3 的量和培养时间也决定了修复软骨的优良软骨功能及生物学特性,浓度越高培养时间越长,则得到的软骨性能更优^[16]。重要的是通过 TGF- β 3 作用再生出的软骨内聚糖含量与正常软骨相当,这也预示着 TGF- β 3 可能通过调节软骨内软骨内聚糖生成参与软骨修复,同时 Huang 等^[22]的研究也支持这一观点,他们发现 TGF- β 3 能极大的促进软骨形成。此外,Chung 等^[23]发现,TGF- β 3 能进一步增强 II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖基因的上调和表达,使得诱导的软骨具有更优越的生物学性能。而在后者的通路中,研究比较多的是 BMP 蛋白,其中包括 BMP-2、BMP-3、BMP-7 等。研究^[24-25]表明,BMP-7 参与并促进软骨的修复。Kuo 等^[25]采用微骨折法与 BMP-7 向联合干预方式得到了基质更丰富、细胞分布更好的修复软骨组织。此种修复组织具有正常比例活力细胞、软骨下骨及软骨矿化层,同时该组织的表面特性又得到了极大的优化,因为微骨折能大大增加修复组织的量,而 BMP-7 又能极大提高修复软骨组织的质,这也正是 BMP-7 和微骨折法相互协同作用的结果,说明 BMP-7 在软骨修复中具有很大的潜能。同时 Kim 等^[26]还发现,BMP-7 还能与软化的骨基质结合可刺激犬临界大小的骨缺损中新的骨骼和血管形成,因为 BMP-7 不仅促进成骨还能促进产生血管营养因子。因此,干细胞能在 BMP-7 和 TGF- β 3 作用下分化为软骨组织,并可作为 TGF- β 信号通路中调节干细胞转化及软骨细胞生成、软骨修复的潜在靶点。

本研究发现 BMP-7 和 TGF- β 3 能成功诱导干细胞向软骨细胞分化并形成软骨组织,并通过 HE 染色、阿利辛蓝染色和免疫荧光证实了由骨髓干细胞分化形成的软骨样结构内具有丰富的聚糖和 II 型胶原蛋白,这与 Rackwitz 等^[15]研究结果相一致。同时说明 BMP 和 TGF- β s 联合作用可以更有效地诱导软骨形成,因此 BMP 和 TGF- β s 组合可能是体外诱导软骨形成的重要关键,与 Indrawattana 等^[27]研究结果相一致。

本研究还存在一些不足:(1) BMP-7 和 TGF- β 3 的浓度最大为 100 ng/mL,未设置更高的标准;(2) 由于诱导分化出的软骨组织太小,未提取出足够的

RNA,因此没有 qRT-PCR 进一步验证;(3)缺少体内实验验证。针对上述不足,课题组将在后续的研究中继续完善。

总之,BMP-7 和 TGF- β 3 联合作用能有效的诱导骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞并形成软骨组织,且浓度 BMP-7 和 TGF- β 3 越高,产生的诱导效果和软骨组织越好。

参考文献

- [1] Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, *et al.* Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(8): 1134 – 1141.
- [2] Thienpont E, Vanden BA, Schwab PE, *et al.* Joint awareness in osteoarthritis of the hip and knee evaluated with the ‘Forgotten Joint’ Score before and after joint replacement[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016, 24(10): 3346 – 3351.
- [3] Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, *et al.* Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote human cartilage regeneration in vitro[J]. *Theranostics*, 2018, 8(4): 906 – 920.
- [4] Cigan AD, Nims RJ, Vunjak-Novakovic G, *et al.* Optimizing nutrient channel spacing and revisiting TGF-beta in large engineered cartilage constructs[J]. *J Biomech*, 2016, 49(10): 2089 – 2094.
- [5] Gibson JD, O’Sullivan MB, Alaei F, *et al.* Regeneration of articular cartilage by human ESC-derived mesenchymal progenitors treated sequentially with BMP-2 and Wnt5a[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(1): 40 – 50.
- [6] Tang C, Jin C, Li X, *et al.* Evaluation of an autologous bone mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffold in a rabbit and minipig model of cartilage repair[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7342 – 7350.
- [7] Zwolanek D, Satué M, Proell V, *et al.* Tracking mesenchymal stem cell contributions to regeneration in an immunocompetent cartilage regeneration model[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(20): e87322.
- [8] You Q, Liu Z, Zhang J, *et al.* Human Amniotic Mesenchymal Stem Cell Sheets Encapsulating Cartilage Particles Facilitate Repair of Rabbit Osteochondral Defects[J]. *Am J Sports Med*, 2020, 48(3): 599 – 611.
- [9] Burns OA, Schwartz Z, Marchand KO, *et al.* Hydrogels derived from cartilage matrices promote induction of human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation[J]. *Acta Biomater*, 2016, 43: 139 – 149.
- [10] Jia Z, Wang S, Liang Y, *et al.* Combination of kartogenin and transforming growth factor- β 3 supports synovial fluid-derived mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2056 – 2069.
- [11] Mueller MB, Fischer M, Zellner J, *et al.* Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis; effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning[J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 192(3): 158 – 166.
- [12] Zhang T, Wen F, Wu Y, *et al.* Cross-talk between TGF-beta/SMAD and integrin signaling pathways in regulating hypertrophy of mesenchymal stem cell chondrogenesis under deferral dynamic compression[J]. *Biomaterials*, 2015, 38: 72 – 85.
- [13] Blaney DEN, Scharstuhl A, Vitters EL, *et al.* Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice; role in impaired repair capacity[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): R1338 – R1347.
- [14] Blaney DEN, Vitters EL, van Lent PL, *et al.* Elevated extracellular matrix production and degradation upon bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) stimulation point toward a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(5): R102.
- [15] Rackwitz L, Djouad F, Janjanin S, *et al.* Functional cartilage repair capacity of de-differentiated, chondrocyte-and mesenchymal stem cell-laden hydrogels in vitro[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(8): 1148 – 1157.
- [16] Kim M, Erickson IE, Choudhury M, *et al.* Transient exposure to TGF- β 3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 11: 92 – 101.
- [17] Han F, Zhou F, Yang X, *et al.* A pilot study of conically graded chitosan – gelatin hydrogel/PLGA scaffold with dual-delivery of TGF- β 1 and BMP-2 for regeneration of cartilage-bone interface[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103(7): 1344 – 1353.
- [18] Abula K, Muneta T, Miyatake K, *et al.* Elimination of BMP7 from the developing limb mesenchyme leads to articular cartilage degeneration and synovial inflammation with increased age[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(11): 1240 – 1248.
- [19] Liu C, Ma X, Li T, *et al.* Kartogenin, transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-7 coordinately enhance lubricin accumulation in bone-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(9): 1026 – 1035.
- [20] Fisher MB, Belkin NS, Milby AH, *et al.* Effects of Mesenchymal Stem Cell and Growth Factor Delivery on Cartilage Repair in a Mini-Pig Model[J]. *Cartilage*, 2016, 7(2): 174 – 184.
- [21] Mathieu M, Vigier S, Labour MN, *et al.* Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 82 – 97.
- [22] Huang AH, Motlekar NA, Stein A, *et al.* High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis[J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(11): 1909 – 1921.
- [23] Chung C, Burdick JA. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 243 – 254.
- [24] Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, *et al.* Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(4): 573 – 583.
- [25] Kuo AC, Rodrigo JJ, Reddi AH, *et al.* Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 14(11): 1126 – 1135.
- [26] Kim Y, Kang BJ, Kim WH, *et al.* Evaluation of Mesenchymal Stem Cell Sheets Overexpressing BMP-7 in Canine Critical-Sized Bone Defects[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2073.
- [27] Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, *et al.* Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3): 914 – 919.

(收稿日期:2020-08-15

修回日期:2020-10-25)