

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.006

大鼠半月板纤维软骨细胞的体外培养和生物学特征鉴定*

杜国庆^{1,2} 桑晓文^{1,2} 王楠^{1,2} 石瑛^{1,2} 熊轶喆^{1,2} 杨光月^{1,2} 陈元川^{1,2} 詹红生^{1,2Δ}

(1 上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心 上海 201203; 2 上海市中医药研究院骨科研究所 上海 201203)

摘要 目的: 体外分离、培养和鉴定大鼠半月板纤维软骨细胞, 为研究大鼠半月板纤维软骨细胞的损伤修复提供简单、可行的细胞培养方法。**方法:** 机械分离大鼠膝关节内外侧半月板, 0.1% II 型胶原酶消化配合机械吹打, 10% FBS 的培养基行原代和传代培养, 倒置显微镜动态观察不同时间点半月板纤维软骨细胞的形态及生长情况, 鉴定采用甲苯胺蓝染色法和 II 型胶原免疫细胞化学染色法。CCK-8 法检测大鼠纤维软骨细胞增殖。**结果:** 在不同时间点, 细胞表现出不同的生理形态, 由多角形或短梭形变为梭形, 最终呈现出三角形或椭圆形, 并随着时间延长, 细胞增殖能力逐渐增加。细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值分别明显高于培养 24 h 的 OD 值 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值相比较, 72 h 的 OD 值虽有增加, 但并无统计学差异 ($P > 0.05$)。经甲苯胺蓝染色和 II 型胶原免疫荧光染色为阳性。**结论:** 该方法培养的细胞形态稳定, 增殖能力强, 具有体内纤维软骨细胞的生物学基本特性, 可为后续实验提供简单、可靠的原代大鼠半月板纤维软骨细胞培养方法。

关键词: 半月板; 纤维软骨细胞; 体外培养; 生物学鉴定

中图分类号: Q95-3; R681.3; R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)15-2829-05

Culture and Characterization of Rat Meniscus Fibrochondrocytes *in Vitro**

DU Guo-qing^{1,2}, SANG Xiao-wen^{1,2}, WANG Nan^{1,2}, SHI Ying^{1,2}, XIONG Yi-zhe^{1,2}, YANG Guang-yue^{1,2},CHEN Yuan-chuan^{1,2}, ZHAN Hong-sheng^{1,2Δ}

(1 Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai, 201203, China;

2 Institute of Traumatology & Orthopedics, Shanghai Academy of TCM, Shanghai, 201203, China)

ABSTRACT Objective: We want to provide a simple and feasible cell culture method for the future study of injury repair of rat meniscus by isolation, culture and identification of rat meniscus fibrochondrocytes *in vitro*. **Methods:** The lateral meniscus were mechanical separation and digestion by 0.1% II collagenase, cultured in the 10% FBS medium. The morphology and growth situation of meniscal cells were observed by the inverted microscope dynamic at different time points, the identification of meniscus fibrochondrocytes by using toluidine blue staining and II type collagen immune cell chemical dyeing method. The proliferation capacity of fibrochondrocytes was detected by CCK-8 method. **Results:** At different time points, the cells showed different physiological morphology, which was transformed from polygonal or short shuttle-shaped to fusiform, and finally appeared triangular or ellipsoidal, and the proliferation capacity of the cells increased gradually with the extension of time. The OD value at 48 h and 72 h in cell culture was significantly higher than that at 24 h ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant. The OD value of cell culture at 48 h and 72 h was increased, but there was no significant difference ($P > 0.05$). By toluidine blue staining and collagen type II immunofluorescence stain is positive. **Conclusion:** Cultured cells by this method are stable in morphology, strong in proliferation, and have the basic biological characteristics of fibrochondrocytes *in vivo*, which can provide a simple and reliable method for rat meniscus fibrochondrocytes culture.

Key words: Meniscus; Fibrochondrocytes; Culture; Characterization

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R681.3; R318.08 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2829-05

前言

膝关节半月板生理状态下具有稳定膝关节, 传递膝关节负荷, 促进关节内营养的作用, 从而保证膝关节长年负重运动而

不致损伤^[1,2]。病理状态下, 半月板的损伤与退变是引起膝关节炎发生、发展的重要原因^[3]。半月板损伤退变的愈合、修复较差, 最大程度上延缓半月板的退变和加快其修复是目前临床和科研的热点、难点问题^[4,5]。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目青年科学基金项目(81704103); "上海市重中之重临床重点学科建设项目" 中医骨伤科学"(2017ZZ02024);

"工效筋骨学" 上海市中医药新兴交叉学科资助计划建设项目(沪卫计中发 2017[024]号);

上海市中西医临床协作试点项目"颈椎病"(ZXYXZ-201703)

作者简介: 杜国庆(1986-), 博士研究生, 住院医师, 研究方向: 骨与关节疾病的中医药防治研究, E-mail: 530427540@qq.com

Δ 通讯作者: 詹红生(1964-), 博士研究生, 教授, 主任医师, 博士生(后)导师, 研究方向: 骨与关节疾病的防治研究,

E-mail: zhanhongsheng2010@163.com, 电话: 021-20256519

(收稿日期: 2018-11-24 接受日期: 2018-12-18)

组织工程学修复已经成为半月板损伤后治疗的重要方法^[6,7]。选择合适的半月板“种子细胞”，是其治疗和研究的步骤之一。目前关于半月板纤维软骨细胞体外分离培养已成功构建于人^[8]、山羊^[9]、兔^[10]等大动物，而大鼠等小动物的半月板细胞培养未见报道，基于课题研究需要，本实验欲构建大鼠半月板纤维软骨细胞体外分离和培养方法，验证其生物学特性，从而为分子生物学和组织工程学研究半月板提供更可靠的纤维软骨细胞分离、培养方法。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 6 只(清洁级), 1 月龄, 雌雄不限, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 主要用于半月板纤维软骨细胞的体外分离和提取。

胎牛血清 (货号 S1580), H-DMEM 培养基 (货号 LM-D1110/500), 胰蛋白酶(货号 L0931-100) 均购自 Biowest 公司; II 型胶原酶 (货号 40508ES60), FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (货号 33107ES60), CCK-8 试剂盒 (货号 40203ES60), 4'-二脒-2-苯胺四唑染色(DAPI)染液(货号 40728ES03)均购自上海翊圣公司; 小鼠 II 型胶原一抗(abcom, 货号 ab185430)。

生物安全柜 (美国 Labconco 公司), CO₂ 培养箱(RS Biotech-Galaxys), 倒置荧光显微镜(Olympus-IX71), 酶标仪(美国基因公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠半月板纤维软骨细胞的分离、提取和培养 将 6 只一月龄 SD 大鼠颈椎脱臼处死后, 用 70%酒精喷洗两侧膝关节进行局部消毒, 然后将皮肤切开, 沿髌骨下缘打开关节囊, 分离内侧和外侧半月板, PBS 中清洗, 尽量除去半月板表面的结缔组织。用刀片将半月板切成 1 mm×1 mm 的小碎片, 弃掉 PBS, 加入 0.1%浓度的 II 型胶原酶, 放至 37℃二氧化碳培养箱中消化 6 h, 每 1 h 配合机械反复吹打, 然后加入 10%FBS 混匀终止消化, 过细胞滤器, 1500 rpm 离心 10 min, 取沉淀进行培养, 分别于 24 h、48 h 和 72 h 在显微镜下观察细胞形态, 并拍照记录。

1.2.2 大鼠半月板纤维软骨细胞甲苯胺蓝染色鉴定 a) 吸去细胞培养液。b) 固定: 固定液固定在 30 min 以上, 在 -20 冰箱内。c) 冲洗: 弃去固定液, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。d) 染色: 甲苯胺蓝工作液染色 3 min 以上。e) 冲洗: PBS 或蒸馏水冲洗 3 次, 每次 3 min。f) 最后一次水保留, 尽量加满, 以防反光。g) 倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 大鼠半月板纤维软骨细胞 II 型胶原和细胞核免疫荧光染色鉴定 将传代 24 h 后的半月板纤维软骨细胞用 PBS 冲洗 2 次, 4%多聚甲醛室温固定 5 min, PBS 冲洗 2 次, 以 PBST (含 0.1%Triton×100)室温孵育 30 min, 用含 5%牛血清蛋白的封闭液(PBST 配制)室温封闭 1 h, 移除封闭液, 加入 1:200 稀释 II 型胶原一抗 37℃作用 2 h, PBS 冲洗 3 次, 加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (1:100), 37℃避光 1 h, PBS 冲洗 3 次(避光), 接着用 DAPI 室温 5 min, PBS 冲洗 5 min, 用倒置荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 大鼠半月板纤维软骨细胞的 CCK-8 增殖检测 将培养的大鼠半月板纤维软骨细胞以 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化,

制成单细胞悬液; 1500 rpm 离心 8 min, H-DMEM 完全培养液重悬细胞团块; 将细胞以 5000 个/孔的密度均匀接种于 96 孔培养板, 置于 5% CO₂ 培养箱 37℃恒温孵育; 分别在 24 h、48 h 及 72 h 三个时间点取出细胞培养板, 进行增殖检测, 每组设置 6 个复孔; 移除每个检测孔的细胞培养液; 以不含血清的 H-DMEM 培养基 (含 10%体积分数的 CCK-8 工作液) 100 μL 加入各检测孔; 37℃恒温避光孵育 2 h; 多功能酶标仪检测并读取波长为 450 nm 处的 OD 值。

1.3 统计学分析

所有实验均重复三次以上, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS15.0 软件对所得数据进行统计分析, 细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值分别与 24 h 比较, 细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值相比较, 分别采用配对 T 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠半月板的体外分离和提取

经解剖所见, 大鼠半月板为两个半月状纤维软骨, 位于胫骨平台内侧和外侧的关节面。内侧半月板大而薄, 呈“C”形, 外侧半月板较小, 呈环形, 与人半月板形态一致。半月板整体呈现乳白色, 半透明, 周围覆有少量结缔组织(图 1)。去除半月板周围的结缔组织, 无菌刀片切碎, 可用于下一步实验。

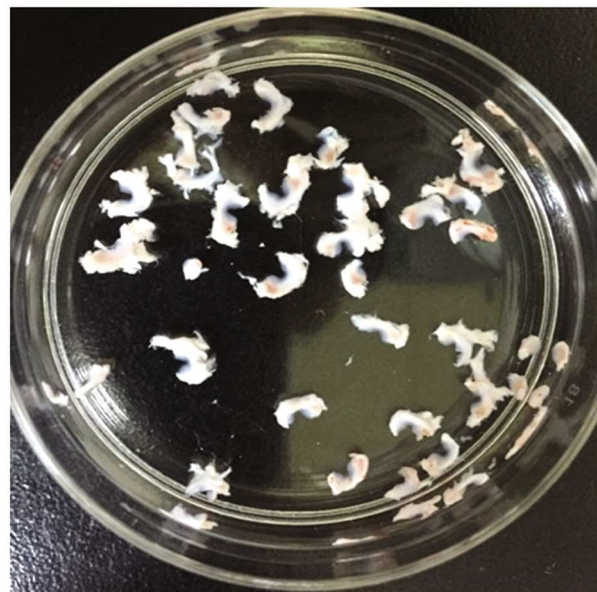


图 1 大鼠半月板的提取与分离

Fig.1 Extraction and separation of the rat meniscus

2.2 大鼠半月板纤维软骨细胞形态学特征

通过倒置显微镜我们观察到: 第 1 代大鼠半月板纤维软骨细胞在接种 10 h 后开始贴壁, 贴壁时呈点状球形, 24 h 后开始铺伸, 细胞呈三角形、多角形或短梭形, 有少量突起, 立体感强(图 2A)。培养 48 h 后, 细胞数量增加, 体积增大, 细胞形态趋于一致, 大部分细胞出现分裂相, 呈梭形, 局部细胞连接成片(图 2B)。培养 72 h 后, 细胞数量进一步增加, 细胞胞体丰满, 细胞质均匀, 铺满皿底, 互相连接, 细胞呈梭形、三角形、椭圆形(图 2C)。

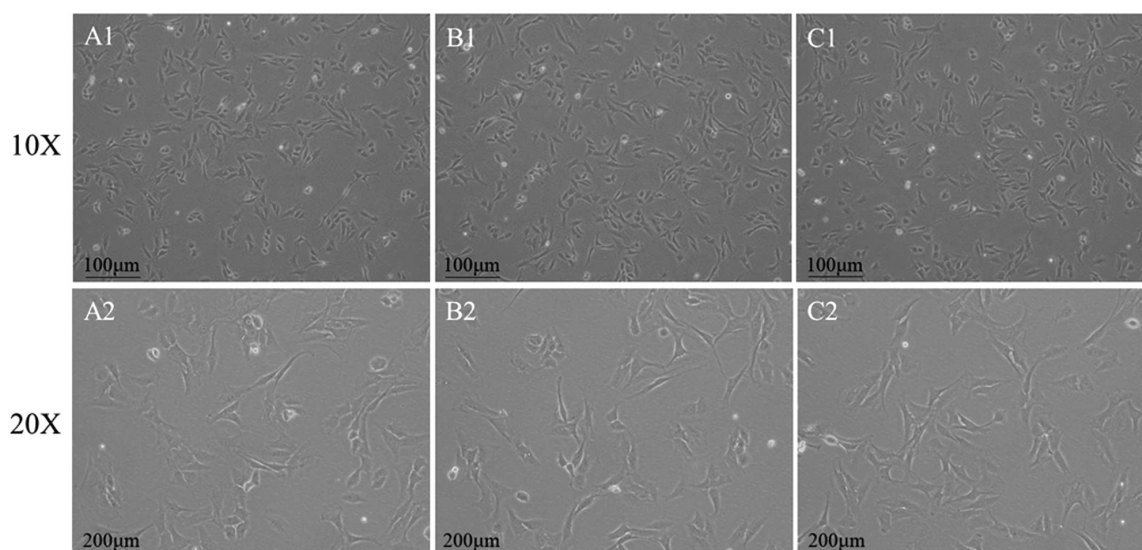


图2 不同时间点大鼠半月板纤维软骨的形态特征变化

A1, A2: 24 h; B1, B2: 48 h; C1, C2: 72 h

Fig.2 Morphological characteristics of meniscus fibrocartilage at different time points in rats

A1, A2: 24 h; B1, B2: 48 h; C1, C2: 72 h

2.3 大鼠半月板纤维软骨细胞的 CCK-8 增殖检测

CCK-8 检测结果如图 3 所示,随着培养时间的逐渐增加,细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值分别明显高于培养 24 h 的 OD 值($P<0.05$),说明细胞数量明显增加,差异具有统计学意义。细胞培养 48 h 和 72 h 的 OD 值相比较,72 h 的 OD 值虽有增加,但并无统计学差异($P>0.05$)。

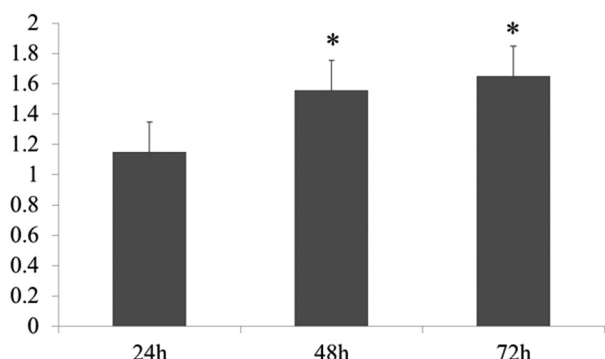


图3 不同时间点纤维软骨细胞 CCK-8 检测结果

Fig.3 CCK-8 detection results of fibrochondrocytes at different time points
注:*表示 48 h 和 72 h 的 OD 值分别与培养 24 h 的 OD 值相比较 $P<0.05$ 。

Note: Data are expressed as $\pm$ SD, $n=6$. * $P<0.05$, compared with 24 h group.

2.4 大鼠半月板纤维软骨细胞的甲苯胺蓝染色鉴定

经甲苯胺蓝染色,可见细胞核、胞浆和细胞外基质均为蓝色,但蓝色程度不同。并随着时间的延长(24 h、48 h、72 h),细胞数量逐渐增加,染色浓度越来越深,说明细胞分泌蛋白多糖的能力逐渐增加,具有纤维软骨细胞的基本功能(图 4)。

2.5 大鼠半月板纤维软骨细胞 II 型胶原免疫荧光染色和细胞核染色鉴定

大鼠半月板纤维软骨细胞经培养 48 h 后进行 II 型胶原和细胞核免疫荧光染色鉴定。经染色后结果为在细胞的细胞质中表达绿色荧光(图 5A),细胞核经 DAPI 染色后激发出蓝色荧光(图 5B),图片重合后发现蓝色荧光位于绿色荧光内(图 5C),说明 II 型胶原表达于细胞质中,符合纤维软骨细胞的生物学特征。并且 100% 细胞表达 II 型胶原,证明本实验方法能够培养纯度较高的纤维软骨细胞,可用于进一步的实验研究。

3 讨论

半月板与关节软骨不同,近年来对于半月板的研究已经为组织工程学和分子生物学等领域研究的热点^[1]。对于半月板及其细胞的鉴定早已有定论,半月板属于纤维软骨类型,半月板

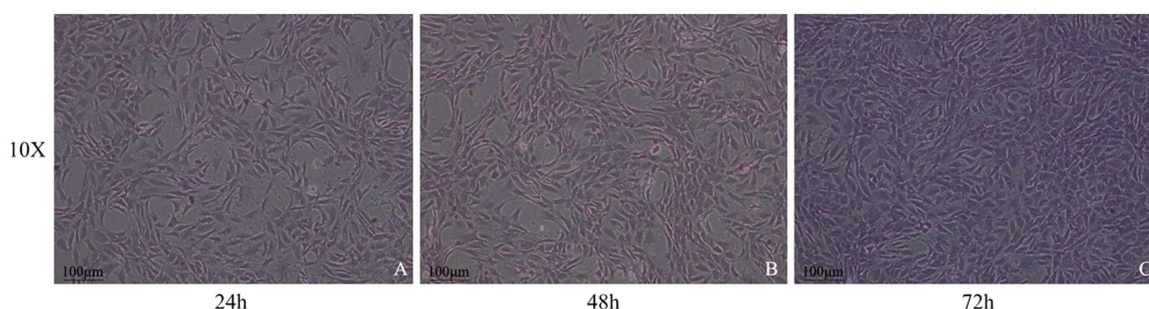


图4 不同时间点纤维软骨细胞甲苯胺蓝染色鉴定

A: 24 h B: 48 h C: 72 h

Fig.4 The toluidine blue staining of fibrochondrocytes at different time points

A: 24 h B: 48 h C: 72 h

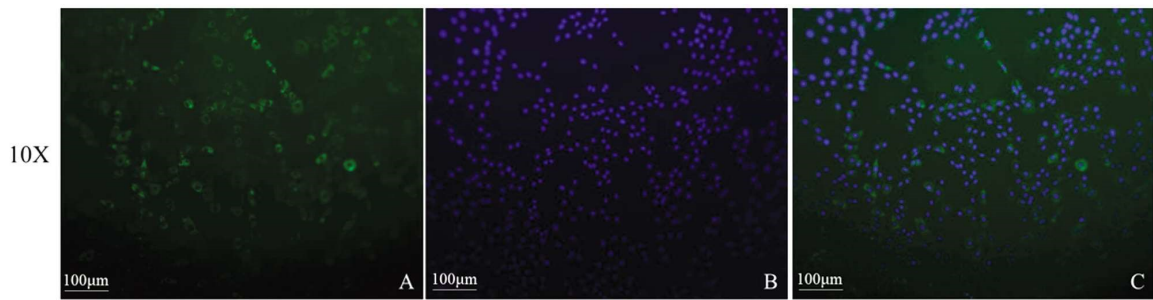


图5 II型胶原和细胞核免疫荧光染色鉴定

A: II 胶原免疫荧光, B: DAPI 染色, C: A 和 B 重合

Fig.5 The immunofluorescence staining of Collagen type II and nucleus

A: Collagen type II, B: DAPI, C: A and B merge

细胞为纤维软骨细胞^[12]。纤维软骨细胞较少,主要位于半月板内侧的 2/3 部分和深部,呈圆形或椭圆形。胶原和细胞外基质较多,胶原主要以 I 型和 II 型胶原为主,其比例为 2:3,构成细胞骨架^[8],提供半月板的抗拉伸作用。另外包括较多的蛋白多糖,具有抗压缩性作用^[13],因此半月板在膝关节中才能更好地完成力学载荷、力学传递和保护关节软骨的作用。

半月板的损伤、退变是引起关节软骨退变和关节疼痛的原因之一,因此半月板的修复和延缓退变是治疗半月板的主要方法^[14]。因此,无论组织工程学还是分子生物学选择合适的半月板种子细胞,是完成实验和临床工作的重点^[15]。目前,对于半月板研究,实验动物的选择具有多样性,从人、山羊、豚鼠,到兔子、大鼠、小鼠都有涉及。由于大动物实验条件等的限制,小动物半月板实验研究,越来越重要^[16]。

由于半月板纤维软骨细胞在组织内占的比例较少,因此分离提纯半月板纤维软骨细胞的方法尤为重要。人、山羊、兔的半月板纤维软骨细胞的体外分离培养均采用 II 型胶原酶和胰蛋白酶共同消化法,虽然都可以提取纯度较高的半月板细胞,但细胞膜很容易受到胰酶的破坏,影响细胞传代和进一步药物实验,故我们采用单纯 II 型胶原酶消化配合机械反复吹打法提取半月板纤维软骨细胞,以避免半月板细胞发生去分化现象^[17]。同样,半月板纤维软骨细胞外基质中还有其他胶原成分,如 I 型和 III 型胶原^[18],配合机械吹打法,可以更好的将细胞从细胞骨架中分离出来,也能更好的保留细胞形态,维持细胞功能,该方法已成功用于软骨细胞的分离培养,技术方法成熟可靠^[19]。经我们实验验证,我们得知透明关节软骨与半月板纤维软骨培养方法应该不同,因透明关节软骨中纤维较少,消化可只采用 II 型胶原酶消化,无需配合机械吹打,而半月板纤维软骨在采用 II 型胶原酶消化的同时,应配合机械吹打,但消化时间不能过长,尽量保持在 6 个小时左右,避免对细胞造成过大损伤,影响实验结果。

我们的实验结果证实,经半月板组织分离培养,24 h 后细胞开始铺展延伸,48 h 数量明显增加,出现分裂相,72 h 胞体丰满,呈梭形、三角形、椭圆形,具备纤维软骨细胞的典型特征^[20]。CCK-8 法证明细胞增长曲线与时间呈正相关,48 h 内增长较快,72 h 后细胞增长速度较前减慢,可能与细胞密度和细胞分化有关。相关文献报道,纤维软骨细胞在贴壁后,常呈线性增长,且无聚集现象^[21],与我们观察到的细胞增殖现象较一致,说

明我们培养细胞已初步证实符合纤维软骨细胞的生命形态。我们采用的 CCK-8 法是检测细胞增殖和药物对细胞影响的重要方法,已广泛用于基础研究,技术方法成熟可靠^[22]。

培养的细胞经甲苯胺蓝染色鉴定^[23],细胞中蓝色为强阳性,说明该细胞具有分泌硫酸糖胺多糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 的功能^[24],并随着时间延长,染色程度越深。GAGs 是半月板纤维软骨细胞重要的组成部分,可用来鉴别纤维软骨细胞^[25],进一步说明我们分离培养的细胞纯度较高。半月板纤维软骨细胞同样应该与成纤维细胞进行区分鉴定,半月板纤维软骨细胞经传代分化后逐渐丢失表型,将具有成纤维细胞表型形态,细胞变为细长,而进行两者区分鉴定的最好方法就是甲苯胺蓝染色,因成纤维细胞不合成 GAGs,甲苯胺蓝染色阴性可鉴别二者。如果我们发现甲苯胺蓝染色阴性,那么可重新进行细胞培养。

胶原蛋白是关节软骨的主要成分,其中 II 型胶原在胶原蛋白中占有的比例很高,II 型胶原表达阳性是软骨细胞特征性标志^[26],可作为纤维软骨细胞检测阳性的重要指标^[27]。尽管半月板纤维软骨细胞与透明软骨细胞主要成分具有差异性,半月板中含有部分 I 型胶原^[28],但这与半月板的组织分区有关,纤维软骨细胞主要位于半月板内侧 2/3^[29],但具体我们培养的半月板纤维软骨细胞是否具有分泌 I 型胶原的作用,是我们本次实验的不足之处,将会在我们下一步实验中去验证。在我们的实验中 II 型胶原免疫荧光染色显示,细胞呈现出绿色荧光,说明 II 型胶原染色阳性,更说明了所提取的细胞具有纤维软骨细胞表型^[30],可进一步用在下一步实验中。

综上所述,我们采用单纯 II 型胶原酶消化法和反复吹打法,可充分消化半月板纤维软骨细胞,该方法所提取的大鼠纤维软骨细胞和已经报道的人、山羊、兔等半月板纤维软骨细胞生物学特征一致,而且获得细胞方法简单,且增殖活力高,分泌的 GAGs 和 II 型胶原表达均为阳性,说明我们所培养的大鼠纤维软骨细胞可作为半月板组织工程学和分子生物学研究的种子细胞,且具有诸多优势。

参考文献 (References)

- [1] Danso EK, Oinas JMT, Saarakkala S, et al. Structure-function relationships of human meniscus[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2017, 67: 51-60
- [2] Tsujii A, Nakamura N, Horibe S. Age-related changes in the knee meniscus[J]. Knee, 2017, 24 (6): 1262-1270

- [3] Cao J, Han X, Qi X, et al. miR-204-5p inhibits the occurrence and development of osteoarthritis by targeting Runx2 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2560-2568
- [4] Nguyen JC, Allen H, Liu F, et al. Maturation-Related Changes in T2 Relaxation Times of Cartilage and Meniscus of the Pediatric Knee Joint at 3 T[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2018, 9: 1-7
- [5] 孙宇, 陈崇民, 焦军, 等. 全内缝合半月板纵裂临床研究[J]. *国际骨科学杂志*, 2016, 37(05): 337-340
- [6] 侯立刚, 杨建义. 组织工程技术修复半月板损伤: 从基础到临床的差距[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(11): 1651-1657
- [7] Xue XH, Lin J, Qi WH, et al. A technique combining "U" shape suture and shared tunneling to treat the posterior cruciate ligament rupture and posterior root tears of the medial meniscus[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018, 13(1): 265
- [8] Zhang H, Leng P, He T, et al. Comparison of hIGF-1 gene transfection to the hBMSCs and human meniscal fibrochondrocytes [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 681-688
- [9] De Mulder EL, Hannink G, Giele M, et al. Proliferation of meniscal fibrochondrocytes cultured on a new polyurethane scaffold is stimulated by TGF- β [J]. *J Biomater Appl*, 2013, 27(5): 617-626
- [10] Dai Z, Li KH, Chen ZW, et al. Relationship between the migratory, metabolic and proliferative ability of fibrochondrocytes and the meniscal fragment size: an in vivo study [J]. *J Int Med Res*, 2013, 41(3): 688-696
- [11] Verhaeghe L, Boeren K. A Rare Complication after Synthetic Meniscus Replacement[J]. *J Belg Soc Radiol*, 2018, 102(1): 63
- [12] Furumatsu T, Maehara A, Okazaki Y, et al. Intercondylar and central regions of complete discoid lateral meniscus have different cell and matrix organizations[J]. *J Orthop Sci*, 2018, 23(5): 811-818
- [13] Nakata K, Shino K, Hamada M, et al. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, (391 Suppl): S208-S218
- [14] Wang P, Balko J, Lu R, et al. Analysis of human menisci degeneration via infrared attenuated total reflection spectroscopy [J]. *Analyst*, 2018, 143(20): 5023-5029
- [15] Kremer A, Ribitsch I, Reboredo J, et al. Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix-A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(9-10): 390-402
- [16] Hashimoto K, Mori S, Oda Y, et al. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1-deficient mice show resistance to instability-induced osteoarthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2016, 45(5): 412-422
- [17] Du G, Song Y, Wei L, et al. Osthoe Inhibits Proliferation and Induces Catabolism in Rat Chondrocytes and Cartilage Tissue [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6): 2480-2493
- [18] Li Q, Qu F, Han B, et al. Micromechanical anisotropy and heterogeneity of the meniscus extracellular matrix[J]. *Acta Biomater*, 2017, 54: 356-366
- [19] 韦宋谱, 张晓钢, 丁道芳, 等. 一种获取具有旺盛增殖力的大鼠软骨细胞培养方法[J]. *上海中医药杂志*, 2012, 46(07): 8-12
- [20] Ronald S, Mills DK. Fibrochondrocyte Growth and Functionality on TiO₂ Nanothin Films[J]. *J Funct Biomater*, 2016, 7(2)
- [21] Webber RJ, Harris MG, Hough AJ, et al. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: Proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate[J]. *J Orthop Res*, 1985, 3(1): 36-42
- [22] Yao Y, Li Q, Wang W, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Modulates Cholesterol Homeostasis by Suppressing the miR-19b-Induced Downregulation of ABCA1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(2): 679-693
- [23] Wei FY, Lee JK, Wei L, et al. Correlation of insulin-like growth factor 1 and osteoarthritic cartilage degradation: a spontaneous osteoarthritis in guinea-pig [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(20): 4493-4500
- [24] Chen L, Ji Y, Hu X, et al. Cationic poly-l-lysine-encapsulated melanin nanoparticles as efficient photoacoustic agents targeting to glycosaminoglycans for the early diagnosis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(28): 13471-13484
- [25] De Mattos Pimenta Vidal C, Leme-Kraus AA, Rahman M, et al. Role of proteoglycans on the biochemical and biomechanical properties of dentin organic matrix[J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 82: 203-208
- [26] Baek D, Lee KM, Park KW, et al. Inhibition of miR-449a Promotes Cartilage Regeneration and Prevents Progression of Osteoarthritis in In Vivo Rat Models[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 322-333
- [27] Cheng H, Hao B, Sun J, et al. C-Terminal Cross-Linked Teloepitopes of Type II Collagen as Biomarker for Radiological Knee Osteoarthritis: A Meta-Analysis[J]. *Cartilage*, 2018, 15: 1947603518798884
- [28] Oda S, Otsuki S, Kurokawa Y, et al. A new method for meniscus repair using type I collagen scaffold and infrapatellar fat pad [J]. *J Biomater Appl*, 2015, 29(10): 1439-1448
- [29] Almaraz AJ, Athanasiou KA. Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues [J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1): 2-17
- [30] Shi C, Wu H, Du D, et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor APO866 Prevents IL-1 β -Induced Human Nucleus Pulposus Cell Degeneration via Autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2463-2482