



Research
Tissue Engineering—Review

软骨组织工程研究进展——我们的经验与未来展望

刘豫^{a,b,c}, 周广东^{a,b,c}, 曹谊林^{a,b,d,*}

^a Shanghai Key Laboratory of Tissue Engineering, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

^b National Tissue Engineering Research Center of China, Shanghai 200241, China

^c Research Institute of Plastic Surgery, Plastic Surgery Hospital, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261041, China

^d Plastic Surgery Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100144, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2016

Revised 12 January 2017

Accepted 13 January 2017

Available online 21 February 2017

关键词

软骨组织工程

临床前大动物实验

临床转化

骨科

整形外科

摘要

软骨缺损难以自行修复,组织工程是实现软骨再生的理想途径。目前,组织工程软骨主要有两类用途:一是用于骨科或关节外科,修复关节表面或半月板部位的软骨缺损,实现关节运动功能的重建;二是用于整形或头颈外科,修复耳廓、气管、睑板、鼻、喉等具有特殊形态及功能的软骨缺损。不同应用目标的组织工程软骨,其构建方法和所面临的挑战,以及临床转化进程均会有很大差别。本文旨在针对上述两大应用目标,结合我们团队在研究过程中所建立的观点及积累的经验,对组织工程软骨目前的主要研究进展和所面临的挑战,以及未来的发展方向做一简要总结。

© 2017 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of the Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

因创伤、肿瘤切除、人口老龄化以及先天性疾病等原因导致的软骨缺损,临床非常常见。软骨内部缺乏血管、神经、淋巴等滋养途径,仅由单一种类、低数量、低增殖活性的细胞(软骨细胞)构成,因此,一旦损伤,极难自行修复[1,2]。目前治疗软骨缺损的传统方法主要包括微骨折(骨髓刺激)[3]、自体软骨移植[4]以及自体软骨细胞移植术(ACI)[5]。这些方法虽具有一定疗效,但却存在供区损伤大、修复区与周围软骨特征不一致、界面愈合不佳等固有缺陷[6–8]。

组织工程通过将少量种子细胞大规模扩增后接种于

可降解支架材料,随着材料逐渐降解,种子细胞不断增殖并分泌基质,最终再生出具有生物功能的活体组织,是组织缺损的理想修复途径[9]。在骨科或关节外科领域,组织工程软骨主要用于修复位于关节表面或半月板的软骨缺损,从而重建关节的运动功能并缓解损伤造成的疼痛。在整形或头颈外科领域,组织工程软骨主要用于修复或重建耳廓、气管、鼻、喉、睑板等部位软骨的缺损或缺失,以实现整形目标(如耳再造、鼻整形)或恢复原有功能(如气管缺损修复)。组织工程软骨在上述两个领域面临着不同的挑战。在骨科或关节外科,为保证植入缺损部位的组织工程软骨能够经受住关节环境中严峻的力学考验(长期、持续的高负荷动态力学刺激),其与周围正常组织以及软

* Corresponding author.

E-mail address: yilincao@yahoo.com

骨下骨的有效整合至关重要,其力学性能也需要达到与周围正常软骨一致的水平[8]。此外,用于骨科或关节外科的组织工程软骨还常常需要对抗风湿等病理因素所引发的退行性侵蚀。而在整形或头颈外科领域,组织工程软骨往往需要被移植到缺乏软骨再生调控信号且免疫反应激烈的皮下或肌肉环境中。因此,用于移植的组织工程软骨需要具备稳定的软骨表型(不易在非软骨微环境发生骨化或纤维化)以及极佳的生物相容性(克服免疫功能活跃的移植部位对植入物产生的排斥反应)。此外,上述组织工程软骨往往还需具备较大体积、特定功能(如气管的呼吸功能)以及精确、复杂的个性化特殊形态(如耳廓)。由此可见,不同用途的组织工程软骨,因面临不同挑战,其研发的侧重点也将有较大区别,相应的临床前大动物研究现状以及最终的临床转化进程也将处于不同阶段。

我们团队长年从事软骨组织工程研究,主要专注于应用不同来源的种子细胞体外再生各类软骨,开展临床前大动物有效性验证,并推动相应的成熟技术实现临床转化。本文将针对组织工程软骨的不同用途,总结我们在种子细胞应用方案、支架材料设计、临床前大动物模型研究和临床转化过程中遇到的挑战、所积累的经验,以及所建立的观点。

2. 面向骨科或关节外科领域的组织工程软骨

随着预期寿命的延长以及年轻人口肥胖率的攀升,关节炎的发病趋势已呈现稳定的增长势头[10,11]。与此同时,运动损伤的发生率也在持续增长。这些原因推动了面向骨科或关节外科领域的软骨组织工程研究。应用于这些领域的组织工程软骨在植入缺损部位后,理想状态下应当具备以下特征:①不仅能够与软骨下骨有机整合,而且还能与周围正常的软骨充分融合,从而保障整个关节均衡的载荷分布以及稳定的力学传导;②具有与周围正常软骨相匹配的力学性能,以避免修复区与正常区应力不一致引发的组织损伤;③在大幅度形变及运动过程中仍能像天然软骨一样发挥负重功能;④通过具备天然关节的梯度结构特征,来重建天然关节的力学功能。满足上述要求所需面临的技术挑战可参考文献[8]。此外,用于骨科或关节外科的组织工程软骨往往还需要面对病理性炎症环境(如风湿性关节炎等)中退行性因子的破坏作用。

为满足上述要求,研究人员一直在努力改进组织工程软骨的构建技术,不断提出并优化种子细胞和支架材料的应用方案,建立了能够模拟骨科或关节外科临床需求的大

动物软骨缺损模型,并以组织工程软骨对其进行修复,以期实现组织工程新技术的有效性及其临床应用前景的客观评估。组织工程软骨的许多相关技术也已进入临床甚至获得了市场准入。但目前再生出来的组织工程软骨还不能完全模拟天然关节软骨的精细结构和微观特征。

2.1. 用于骨科或关节外科的组织工程软骨种子细胞选择方案

用于骨科或关节外科的组织工程软骨,其主要的植入部位为关节腔。由于关节腔内含有丰富的成软骨诱导信号(包括细胞因子、力学刺激等),植入的种子细胞可在这些信号的作用下自发形成成熟的软骨样组织,并且它们的软骨表型和功能也能被很好地维持。因此,这些种子细胞来源的选择范围相对较广,目前已被报道过的种子细胞来源有软骨细胞[12]、不同组织来源的间充质干细胞(MSCs)[13,14]、诱导多能干细胞(iPSCs)[15]、胚胎干细胞[15]和成纤维细胞[16]。我们团队主要研究两类目前看来最适合临床应用的种子细胞:软骨细胞和MSCs。

2.1.1. 软骨细胞

软骨细胞作为软骨的天然宿主细胞,能自发分泌软骨特异基质,是组织工程软骨种子细胞的理论首选。但是从关节获取软骨细胞的过程复杂,并且取材造成的创伤还会引起继发性关节炎。相较之下,鼻中隔、耳廓等非关节部位来源的“异位”软骨细胞则更容易获取,取材造成的损伤也相对较低,并且它们还具有更强的增殖活性,因此,许多学者试图采用它们作为关节软骨细胞的替代品[17–20]。然而,目前还不确定这些异位来源的软骨细胞能否再生出特定类型的软骨并实现功能重建(如能否利用耳廓来源的弹性软骨细胞再生透明软骨并修复关节缺损)。也有人试图证实采用关节炎病灶区域获取的软骨细胞作为种子细胞的可行性[21–23]。以软骨细胞作为种子细胞就必须解决它们经历大规模扩增后极易丧失软骨表型的问题(去分化)。目前人们主要通过3D微载体悬浮培养[24,25]、软骨细胞分选[26]、细胞因子刺激[27]或者低氧培养[28]等方法来重建扩增后软骨细胞的软骨再生能力(重分化)。然而,过度扩增后的软骨细胞还存在永久丧失重分化的可能性[29]。此外,作为终末分化的成体细胞,软骨细胞难以再生软骨以外的其他组织,因此在复合缺损中难以实现不同组织的特异性修复。例如,我们的前期研究曾证实,对于关节骨软骨复合缺损,以软骨细胞构建的组织工程软

骨能够实现软骨层的特异性修复,却无法实现软骨下骨的骨性修复(图1)[12,30]。

2.1.2. 间充质干细胞

为克服软骨细胞取材创伤大、扩增后易去分化且难以特异性修复骨软骨复合缺损等固有缺陷, MSCs逐渐成为研究焦点[31]。与软骨细胞相比, MSCs作为种子细胞具有许多优势。首先, MSCs可以从多种成体组织中获得,其取材过程不会对软骨造成损伤,多次扩增后仍能保持多向分化潜能,并且可经诱导同时形成软骨和骨,从而实现关节复合缺损的组织特异性修复(图1)[30,32]。此外, MSCs还具有免疫抑制特性,并且有研究证实这种特性在MSCs成软骨分化后仍被保留,使得通用化同种异体应用成为可能[33,34]。然而,以MSCs作种子细胞修复关节缺损仍然面临一些问题:首先,在骨髓或其他成体组织存在着具有不同干性的细胞群,其中,真正的MSCs含量极低且难以被界定,因此我们分离获得的细胞中极有可能混有其他干性较低的亚群甚至是已分化的细胞;并且, MSCs成软骨耗时长、软骨表型不稳定,在充满了炎性介质的损伤区域还有可能发生非特异分化[18]。此外,有学者研究了MSCs以及原代软骨细胞分别再生的组织工程软骨,发现前者在表观遗传学上与天然软骨差异更大[35]。

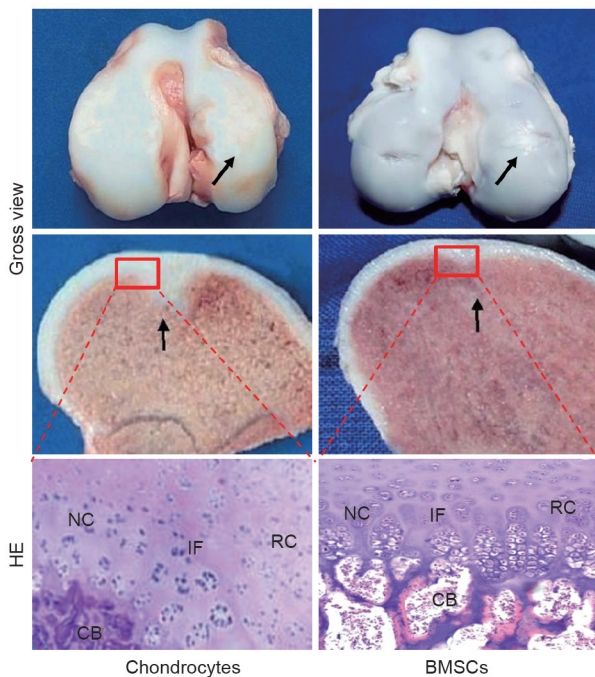


图1. 应用接种了软骨细胞或骨髓间充质干细胞(BMSC)的聚羟基乙酸(PGA)支架材料修复猪自体关节骨软骨复合缺损。两种细胞均能实现复合缺损中软骨层的特异性修复。软骨细胞无法实现软骨下骨缺损的骨性修复。NC: 天然软骨; IF: 交界面; RC: 再生软骨; CB: 软骨下骨。部分数据已发表于文献[12,30]。

正是基于这些原因,目前很难制定出通用的安全性操作规程及质控标准来规范MSCs的规模化临床应用。

2.2. 用于骨科或关节外科的组织工程软骨支架材料选择方案

2.2.1. 凝胶类支架

骨科或关节外科最早应用水凝胶作为细胞载体,通过注射或关节镜等方式,对局灶性软骨缺损进行微创修复。水凝胶作为软骨组织工程支架材料具有诸多优势:水凝胶有着类似于天然关节软骨的力学、膨胀以及润滑性能[6];并且细胞在凝胶内能够像在机体内一样呈现球状(而不是铺展开呈扁平状),有利于软骨表型的维持或表达[36,37]。混合了细胞的水凝胶还可被广泛用作生物墨水,通过3D生物打印,仿生制备具有天然软骨结构及功能的组织工程软骨[38,39]。过去10年间,还涌现出了大量具有光敏[40-42]、温敏[43,44]、自主装[45,46]或者因子缓释[47-49]功能的新型水凝胶材料。并且将水凝胶与其他类型的支架材料复合使用也逐渐成为一种趋势[50]。然而,目前的水凝胶设计大多仅关注某个单一的材料特征,无法很好地模拟天然软骨微环境中多因素的调控功能。因此,需要进一步加强材料学家与组织工程相关其他领域专家的密切合作,从而共同研制出具有平衡的力学性能、导电性能、降解速率、生物相容性以及软骨诱导功能的复合型水凝胶。将水凝胶的研发融入目前新兴的3D生物打印技术也是今后的一大研究趋势[51]。

2.2.2. 固态材料

由于水凝胶是液态或凝胶状的,对于面积较大的缺损,许多研究人员(包括我们团队)更倾向于采用固态支架材料来构建组织工程软骨对其进行修复。固态支架材料也有天然与合成之分。以胶原海绵、脱细胞软骨以及脱细胞小肠黏膜下层(SIS)等为代表的天然支架材料本身就具有一定的生物活性及调控功能。这些材料中,胶原海绵作为组织工程支架材料在临床上应用最广。合成材料比较容易批量生产,各批次间差别不大,且它们的力学性能和化学特性也能被轻易调控。由于关节腔对免疫细胞具有一定屏障作用,许多原本在皮下会引发明显排斥反应的合成材料,可被用于构建组织工程软骨修复关节腔内的软骨缺损[52]。聚羟基乙酸(PGA)就是一个很好的例子。这种经典的早期组织工程支架材料非常利于接种细胞,但在其降解过程中会产生大量酸性物质,在皮下环境中极易引发炎症反应。然而这种材料在关节腔内引发的反应却没那么明

显, 因此我们团队曾大量使用这种材料复合不同类型的种子细胞, 于体外和体内构建出了组织工程软骨, 成功实现了大动物关节表面和半月板的软骨缺损修复[12,16,30]。将天然与合成材料复合使用也是一种整合不同优势的有效途径。目前面向软骨-骨复合缺损的多相支架材料也在不断涌现[53-55]。然而, 临床转化前, 还需通过长期的大动物缺损修复实验来证实基于这些支架材料构建的组织工程软骨是否具有有效性和临床应用前景。

2.3. 用于骨科或关节外科的组织工程软骨临床前大动物有效性评估

临床前大动物缺损修复实验是评估组织工程新技术是否具备临床有效性的关键步骤, 因此我们团队极为重视这项工作。在过去的20年间, 我们已经应用组织工程软骨成功修复了猪关节软骨缺损或软骨-骨复合缺损[12,30]。同

理, 我们也成功修复了犬半月板缺损(图2, 数据尚未发表)。上述研究中, 我们主要通过动物的关节解剖结构、目标软骨体积(面积和厚度)等标准来选择用作手术模型的大动物。Ahern等[56]还推荐了其他考量范畴, 包括动物的顺从性、养殖要求、花费、体型以及骨骼成熟时间等。

除了组织工程软骨本身的品质以外, 还有许多其他因素会影响到大动物实验的最终结果。例如, 我们近期曾尝试应用体外构建的组织工程软骨修复猪关节软骨-骨复合缺损, 但并未获得理想的修复效果, 原因在于我们在同一动物体内制造的缺损数量过多, 破坏了关节原本应有的承重能力。此外, 在不增加额外影响因素的前提下, 如何有效地将组织工程软骨固定于缺损区域也是至关重要的。

实际上, 由于影响大动物实验最终结果的因素非常多, 如何比较不同团队的研究成果成为了一件难事。针对这一问题, 有必要将组织学、生物力学、生化指标等结果

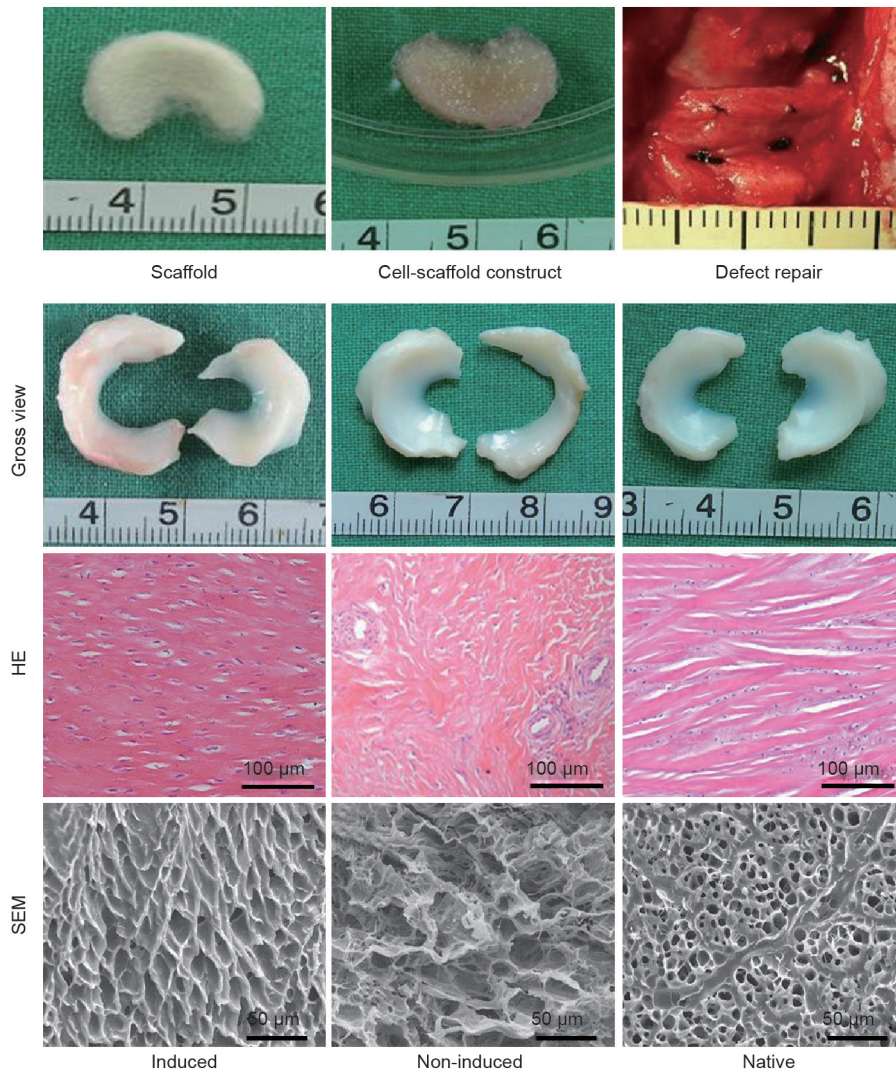


图2. 以成纤维细胞及PGA支架材料修复犬半月板缺损。通过软骨形态发生蛋白1(CDMP1)诱导成纤维细胞, 并将其接种于半月板形态的PGA支架, 以未经诱导的成纤维细胞作为对照。术后3个月, 诱导组再生的半月板呈现了类似天然半月板的大体外观、组织学以及微观结构特征(扫描电镜观察)。

参数进行适当的标准化[56]。此外,虽然大动物研究一般被用作评价一项组织工程新技术是否具有临床应用前景的重要依据,但仍需铭记,没有一项临床试验可以直接照搬其临床前动物实验的模式[52]。例如,大部分临床前大动物实验中制造的软骨缺损都是新鲜损伤,然而在临床应用中,我们常常需要面对的是与新鲜损伤完全不同的长久性损伤,以及它带来的病理局部微环境[57]。

2.4. 组织工程软骨在骨科或关节外科的临床转化

目前用于修复骨科或关节外科软骨缺损的组织工程相关技术主要是自体软骨细胞移植(ACI)及其衍生治疗手段[58]。相关产品包括Carticel[®]和Hyalograft-C[®]等,已经打入医疗市场。文献[59]对上述类似的组织工程软骨产品进行了详尽的总结。然而,虽然ACI类技术经历了不断的改良,但它除了对较大面积软骨缺损可能具有一定治疗优势以外,通常情况下它并没有明显优于微骨折等传统治疗方法[58]。此外,ACI类技术对关节炎、风湿等正在进展中的疾病造成的缺损疗效并不理想[60]。对于股骨头或半月板置换等整个结构单元的重建更是无法实现。因此,研究人员仍在不断探索更加先进的组织工程软骨临床治疗新技术,以期早日将安全、经济并且满足良好操作规范(good manufacturing practice, GMP)等要求的大型软骨移植术推向临床[60]。尽管如此,由于难以对组织工程软骨进行有效的质量和安全性评估,再加上成本花销和操作的复杂性方面的考虑,新研发出来的组织工程软骨并不能马上转化到临床[58]。

3. 用于整形或头颈外科的组织工程软骨

除了骨科或关节外科,组织工程软骨还可用于修复或重建耳廓、气管、鼻、睑板等部位的软骨缺损或缺失,因此在整形或头颈外科的应用需求也非常大。我们团队主要致力于外耳缺失和长节段性气管缺损的组织工程修复与重建。这两项工作非常具有挑战性,一旦获得成功,有望成为组织工程技术在整形或头颈外科的应用典范,并为其他工作提供参考依据。

用于整形或头颈外科的组织工程软骨也面临着特殊的挑战:它们往往需要有较大体积,并且具备患者个性化的特殊形态;它们将被植入的区域(皮下或肌肉间)免疫机能非常活跃,并且还缺乏能够促进软骨再生的诱导信号,使得植入的组织工程软骨极易受到免疫系统猛烈攻击而无法形成软骨,或者逐渐丧失原有的软骨表型,

发生骨化或纤维化。这些因素极大限制了构建这些组织工程软骨所需的种子细胞和支架材料的选择范围。进而临床前大动物实验的成功报道以及初步的临床应用也相应受到了影响,规模化临床应用的目标则还需一定时日才能够被实现。

3.1. 用于整形或头颈外科的组织工程软骨种子细胞选择方案

在整形或头颈外科领域,软骨细胞是构建组织工程软骨最受欢迎的种子细胞。一大原因在从耳廓或鼻中隔部位很容易分离获得大量增殖活性较强的原位软骨细胞,并且对以上部位取材并不会像对关节表面取材那样造成严重的功能性损伤[61]。另一个重要原因在于干细胞构建的组织工程软骨表型不够稳定,在整形或头颈外科要求的植入部位(皮下或肌肉间)容易因软骨诱导信号的缺失而发生纤维化或终末骨化[62,63]。这种情况下,将软骨细胞与MSCs共培养可能是更加可行的种子细胞方案。

3.1.1. 软骨细胞

对于面向整形或头颈外科的组织工程软骨,采用软骨细胞作为其种子细胞具有突出优势。首先,相应种类的软骨细胞可以很方便地从鼻中隔(透明软骨)或耳廓(弹性软骨)等部位直接获取。特别是对于患有先天性小耳畸形,需要进行外耳再造的患者,大量的软骨细胞可以从患者已经废弃的畸形耳中获得,完全不会对正常软骨造成任何损伤[64,65]。此外,以往一直认为软骨细胞增殖活性很低,但有研究证实,从鼻中隔或耳廓部位获得的软骨细胞具有较强的增殖活性[66,67]。更重要的是,这些细胞再生的组织工程软骨表型和功能均非常稳定,在皮下或肌肉间不易发生收缩变形或骨化。然而,虽然这些细胞具有较强的增殖活性,但它们经历大规模扩增后仍不可避免地会发生去分化。我们研究发现,经历了仅两个代次平面扩增的残耳软骨细胞,其所形成的pellet就几乎完全不表达II型胶原(软骨表型的特异标志)[66]。因此,有必要将大规模扩增后的软骨细胞进行重分化,但这个过程所引入的细胞因子或化合物有可能对未来的临床安全性评估带来一些不便。

3.1.2. 间充质干细胞

由于整形或头颈外科常见的软骨移植区域(皮下或肌肉间)缺乏成软骨诱导信号,不利于干细胞稳定再生软骨,因此鲜有在皮下或肌肉间单纯利用MSCs构建组织工程软骨的成功报道[62,68]。针对这一问题,有学者提出可将少

量软骨细胞与MSCs混合,通过软骨细胞模拟软骨再生微环境,从而在皮下或肌肉间实现干细胞稳定再生软骨[69–71]。这一基于共培养的种子细胞应用方案已被证实是有效且可行的。我们团队已将少量人残耳软骨细胞与MSCs共培养,成功在裸鼠皮下构建出了具有稳定表型的人耳形态软骨[66]。共培养还能显著降低软骨细胞的数量需求,进而减轻软骨取材带来的供区损伤或者减少软骨细胞的扩增次数。此外, MSCs还有可能调控植入部位的局部免疫微环境,从而降低再生软骨植入后遭受免疫系统攻击的风险。然而,共培养的具体作用机制目前尚不明确。一方面,我们团队通过将标记有绿色荧光蛋白(GFP)的MSCs与软骨细胞混合共培养,观察到了MSCs向软骨样细胞的直接转变,并通过隔离共培养和条件培养液,阐明了软骨细胞分泌的可溶性因子对MSCs成软骨起了关键诱导作用[70]。另一方面,也有诸多有力证据表明MSCs产生的营养因子可显著促进软骨细胞增殖并分泌软骨基质[72,73]。此外,最近还有学者证实共培养过程中细胞间的直接接触以及通过缝隙连接的信号传导也起到了重要作用[74]。然而,哪一种机制起主导作用目前尚无定论。

3.2. 用于整形或头颈外科的组织工程软骨支架材料选择方案

用于整形或头颈外科的组织工程软骨,其常见的移植部位(皮下或肌肉间)免疫机能非常活跃。因此,对于无特殊形态要求的目标软骨,可采用不依赖支架材料的软骨细胞悬液[75,76]或软骨膜片[77,78]进行构建,或者采用具有极佳生物相容性的天然材料作为支架,如胶原[79,80]或脱细胞软骨等[81],后者还能为干细胞提供利于软骨稳定再生的诱导信号。然而,大多数整形或头颈外科所需的组织工程软骨均有较高的形态需求,如耳廓、气管、鼻等。针对这一需求,力学性能强、容易被加工为不同形态且该形态在培养过程中还能得到维持的合成材料受到了广泛青睐。我们团队在过去20年间采用PGA复合聚乳酸(PLA)作为支架,成功构建了大量耳廓或气管等具有特殊形态的组织工程软骨。为克服PGA引发的炎症反应,我们还建立了体外再生活体组织的技术平台,使PGA得以在植入体内前充分降解,从而有效避免了皮下或肌肉间的剧烈炎症反应对软骨再生的干扰[82,83]。但由于体外构建有耗时长、成本高等缺陷,研究人员还尝试研制了一类复合支架材料,以力学性能强、降解非常缓慢或不降解的合成材料或金属作为内核,外围包裹生物相容性极佳的天然材料作为细胞载体,来同时满足力学性能和生物相容性的严苛要

求[80,84]。然而,慢降解或不降解材料的引入,使人们难以界定植入后最终发挥作用的到底是有生物活性的组织工程软骨还是单纯的内核。不降解的内核还存在外露风险。因此,目前迫切需要能同时具有极佳的力学性能和生物相容性的新型支架材料。这种支架材料的问世可能仅需在目前现有材料的基础上进行改良,如加载药物缓释功能等[48,85];或者借助当前正蓬勃发展的3D生物打印等新技术,涌现出全新的支架材料应用方式[86]。

3.3. 用于整形或头颈外科的组织工程软骨临床前大动物有效性评估

目前针对整形或头颈外科的组织工程软骨主要处于裸鼠体内研究阶段,在大动物体内取得的成功还非常少[80,82,87]。一大原因在于,在大动物免疫机能极为活跃的移植部位构建具有特殊形态和功能的软骨,难度巨大[83,88]。以耳再造为例,早在1997年就已经成功报道了裸鼠体内再生人耳形态软骨[89],但直到最近,经历了20年的不断努力,才有学者在羊体内重复出类似结果[80]。形态塑造只是一方面,许多应用还有着严苛的功能要求。以气管重建为例,我们团队早在2009年就已在兔皮下构建出了管状软骨[82],但当我们尝试应用该软骨修复兔自体长节段性气管缺损时却遇到了诸多问题,包括肉芽增生导致的气道狭窄、再生软骨营养不良导致的气道萎陷以及缺乏气道上皮造成的黏液嵌塞等。我们经过不断摸索,直到2013年才找到了解决这些问题的方法,包括采用硅胶管抑制肉芽增生防止气道狭窄,采用带血管蒂的肌肉瓣包裹管状软骨进行预血管化、促进营养供给和黏膜长入等,最终才实现了兔长节段性气管缺损的功能重建(图3)[87]。然而,上述在兔体内获得的成功却未能在羊体内重现,原因是羊具有更敏锐的免疫系统并且术后护理难度更大[83]。由此可见,在整形或头颈外科领域,要真正实现组织工程软骨从裸鼠到大动物的飞跃,还需要进一步完善组织工程软骨构建与缺损修复的核心技术。在此过程中,与外科医生紧密合作至关重要,以确保研究人员从一开始就明确所构建软骨的应用需求,在研究过程中获得有临床参考价值的反馈意见,并且在修复过程中确保手术的成功率。

3.4. 组织工程软骨在整形或头颈外科的临床转化

在整形或头颈外科领域受到关注的组织工程软骨临床转化的报道主要包括:

(1) 组织工程气管。2008年, Macchiarini等[90]报道了第一例基于干细胞和脱细胞气管支架构建的组织工程气

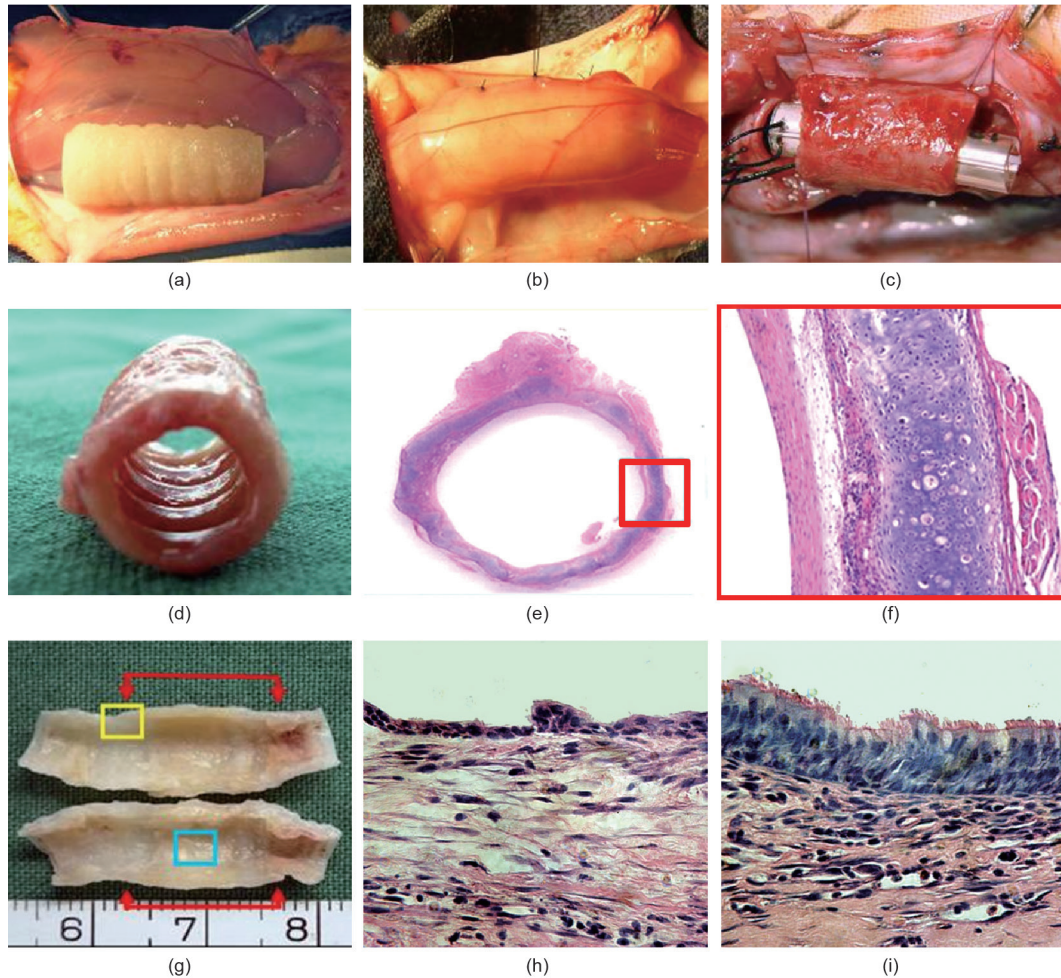


图3. 通过带血管蒂的组织工程气管实现兔自体长节段性气管缺损的功能性重建。(a) 组织工程气管；(b) 包裹了胸骨舌骨肌进行预血管化的组织工程气管；(c) 以硅胶管支撑，用带肌肉蒂的组织工程气管修复节段性气管缺损；(d) 术后4周的组织工程气管；(e) (d)的组织学(HE)染色；(f) (e)中红框的高倍放大；(g) 术后6周组织工程气管的截面，显示了与天然气管良好的界面愈合(黄框：交界面，蓝框：组织工程气管)；(h) HE染色显示术后2周气道上皮长入情况；(i) HE染色显示术后8周气道上皮长入情况；部分数据已发表于文献[87]。

管，并通过一位30岁的女性患者实现了临床转化。该临床试验的5年随访结果已于2014年获得了报道[91]。为避免同种异体脱细胞气管的使用，研究人员又采用了纳米复合材料作为支架，结合干细胞构建了组织工程气管，并用于临床[92,93]。然而，该研究的有效性和研究方法的真实性目前正受到质疑。

(2) 组织工程软骨修复鼻翼瓣缺损。2015年，Fulco等[94]报道了第一组基于组织工程方法再生软骨修复鼻翼瓣缺损的临床试验。该试验将鼻中隔软骨细胞接种于纤维状胶原支架，构建出片状组织工程软骨，修复了5例患者的鼻翼瓣缺损。基于组织工程方法的全鼻再造临床应用目前尚无报道。

(3) 组织工程在外耳重建中的应用。2009年，Yanaga等[75]报道了一种采用两步法的ACI类技术再生软骨，对先天性小耳畸形患者进行耳再造。该技术将大规模扩增后的残耳软骨细胞注射于患者下腹部，待成熟的软骨组织块

形成之后，再将其手工雕刻为耳形态，用于对患者进行耳再造。目前尚无直接采用具有耳形态的组织工程软骨进行耳再造的临床报道。

上述报道仅为组织工程软骨临床转化的概念性验证，规模化临床应用仍有很长的路要跋涉。

4. 结语

经过20年的不断努力，软骨组织工程取得了许多令人瞩目的研究进展。现阶段，临床转化的大门已经开启。然而，理念研究转化到临床实践这一过程，也必将迎来新一轮挑战。针对骨科或关节外科领域的软骨组织工程研究可能更接近规模化临床应用，但目前仍面临诸多问题，包括：如何精确模拟天然软骨的精细微观结构；如何真正实现组织工程软骨与周围组织的有机整合；如何提高组织工程软骨的力学性能，使其植入后不仅能提供

即时的力学支撑，而且还能确保长期承重；如何克服关节炎等病理创伤对组织工程软骨的退行性影响等。对于整形或头颈外科领域，目前小规模尝试性临床转化正在逐步涌现，但要真正实现规模化临床应用，还需克服植入部位的免疫反应问题、特殊形态控制和维持问题，以及复杂的功能性修复问题等。由此可见，现阶段需充分发挥组织工程的学科交叉优势，在相关领域临床医生的密切配合下，深入了解临床应用的特定需求，并联合发育生物学、细胞生物学、材料学、新技术准入法规制定部门以及医疗市场监管部门等，共同推进组织工程软骨真正进入常规临床实践。

Compliance with ethics guidelines

Yu Liu, Guangdong Zhou, and Yilin Cao declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther* 2016;7(1):56.
- Reinholz GG, Lu L, Saris DBF, Yaszemski MJO, O'Driscoll SW. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 2004;25(9):1511–21.
- Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391(391 Suppl):S362–9.
- Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85(Suppl 2):25–32.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889–95.
- Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17(4):281–99.
- Moran CJ, Pascual-Garrido C, Chubinskaya S, Potter HG, Warren RF, Cole BJ, et al. Restoration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96(4):336–44.
- Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science* 2012;338(6109):917–21.
- Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science 1993;260(5110):920–6.
- Chaganti RK, Lane NE. Risk factors for incident osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2011;4(3):99–104.
- Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJ, Shintani N. An educational review of cartilage repair: precepts & practices—myths & misconceptions—progress & prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23(3):334–50.
- Liu Y, Chen F, Liu W, Cui L, Shang Q, Xia W, et al. Repairing large porcine full-thickness defects of articular cartilage using autologous chondrocyte-engineered cartilage. *Tissue Eng* 2002;8(4):709–21.
- Danišović L, Boháč M, Zamborský R, Oravcová L, Provazníková Z, Csöbönyeiová M, et al. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from different tissue sources in respect to articular cartilage tissue engineering. *Gen Physiol Biophys* 2016;35(2):207–14.
- Caminal M, Peris D, Fonseca C, Barrachina J, Codina D, Rabanal RM, et al. Cartilage resurfacing potential of PLGA scaffolds loaded with autologous cells from cartilage, fat, and bone marrow in an ovine model of osteochondral focal defect. *Cytotechnology* 2016;68(4):907–19.
- Lietman SA. Induced pluripotent stem cells in cartilage repair. *World J Orthop* 2016;7(3):149–55.
- Zhao G, Yin S, Liu G, Cen L, Sun J, Zhou H, et al. *In vitro* engineering of fibrocartilage using CDMP1 induced dermal fibroblasts and polyglycolide. *Biomaterials* 2009;30(19):3241–50.
- El Sayed K, Haisch A, John T, Marzahn U, Lohan A, Müller RD, et al. Heterotopic autologous chondrocyte transplantation—a realistic approach to support articular cartilage repair? *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(6):603–16.
- Lohan A, Marzahn U, El Sayed K, Haisch A, Müller RD, Kohl B, et al. Osteochondral articular defect repair using auricle-derived autologous chondrocytes in a rabbit model. *Ann Anat* 2014;196(5):317–26.
- Van Osch GJ, Mandl EW, Jahr H, Koevoet W, Nolst-Trenité G, Verhaar JA. Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 2004;41(3–4):411–21.
- El Sayed K, Marzahn U, John T, Hoyer M, Zreiqat H, Witthuhn A, et al. PGA-associated heterotopic chondrocyte cocultures: implications of nasoseptal and auricular chondrocytes in articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7(1):61–72.
- Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittlinger M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther* 2009;11(5):R133.
- Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. Effects of oxygen and culture system on *in vitro* propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2012;347(3):649–63.
- Oda T, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T, Ono Y, Nakashima M, et al. Osteoarthritis-derived chondrocytes are a potential source of multipotent progenitor cells for cartilage tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;479(3):469–75.
- Fronzoza C, Sohrabi A, Hungerford D. Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. *Biomaterials* 1996;17(9):879–88.
- Çetinkaya G, Kahraman AS, Gümüşdereliolu M, Arat S, Onur MA. Derivation, characterization and expansion of fetal chondrocytes on different microcarriers. *Cytotechnology* 2011;63(6):633–43.
- Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, et al. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced *in vitro* chondrogenic capacity. *Arthritis Rheum* 2007;56(2):586–95.
- Appel B, Baumer J, Eyrich D, Sarhan H, Toso S, Englert C, et al. Synergistic effects of growth and differentiation factor-5 (GDF-5) and insulin on expanded chondrocytes in a 3-D environment. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(11):1503–12.
- Egli RJ, Bastian JD, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Hypoxic expansion promotes the chondrogenic potential of articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2008;26(7):977–85.
- Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Effects of passage number and post-expansion aggregate culture on tissue engineered, self-assembled neocartilage. *Acta Biomater* 2016;43:150–9.
- Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2006;12(11):3209–21.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143–7.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosseum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327(3):449–62.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007;28(5):219–26.
- Du W, Reppel L, Leger L, Schenowitz C, Huselstein C, Bensoussan D, et al. Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue maintain their immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation: role of HLA-G. *Stem Cells Dev* 2016;25(19):1454–69.
- Bomer N, den Hollander W, Suchiman H, Houtman E, Sliker RC, Heijmans BT, et al. Neo-cartilage engineered from primary chondrocytes is epigenetically similar to autologous cartilage, in contrast to using mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2016;24(8):1423–30.
- Cushing MC, Anseth KS. Hydrogel cell cultures. *Science* 2007;316(5828):1133–4.
- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30(1):215–24.
- Kesti M, Müller M, Becher J, Schnabelrauch M, D'Este M, Eglin D, et al. A versatile bioink for three-dimensional printing of cellular scaffolds based on thermally and photo-triggered tandem gelation. *Acta Biomater* 2015;11:162–72.
- Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez Ávila H, Hägg D, Gatenholm P. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2015;16(5):1489–96.
- Abbadessa A, Blokzijl MM, Mouser VH, Marica P, Malda J, Hennink WE, et al. A thermo-responsive and photo-polymerizable chondroitin sulfate-based hydrogel for 3D printing applications. *Carbohydr Polym* 2016;149:163–74.
- Lee H, Park TG. Photo-crosslinkable, biomimetic, and thermo-sensitive Pluronic grafted hyaluronic acid copolymers for injectable delivery of chondrocytes. *J Biomed Mater Res A* 2009;88A(3):797–806.
- Fedorovich NE, Oudshoorn MH, van Geemen D, Hennink WE, Alblas J, Dhert WJ. The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials* 2009;30(3):344–53.
- Mellati A, Fan CM, Tamayol A, Annabi N, Dai S, Bi J, et al. Microengineered 3D cell-laden thermoresponsive hydrogels for mimicking cell morphology and orientation in cartilage tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2017;114(1):217–31.

- [44] Liu H, Liu J, Qi C, Fang Y, Zhang L, Zhuo R, et al. Thermosensitive injectable *in-situ* forming carboxymethyl chitin hydrogel for three-dimensional cell culture. *Acta Biomater* 2016;35:228–37.
- [45] Kopesky PW, Vanderploeg EJ, Sandy JS, Kurz B, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogels modulate *in vitro* chondrogenesis of bovine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16(2):465–77.
- [46] Mendes AC, Baran ET, Reis RL, Azevedo HS. Self-assembly in nature: using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2013;5(6):582–612.
- [47] Florine EM, Miller RE, Liebesny PH, Mroszczyk KA, Lee RT, Patwari P, et al. Delivering heparin-binding insulin-like growth factor 1 with self-assembling peptide hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2015;21(3–4):637–46.
- [48] Roach BL, Kelmendi-Doko A, Balutis EC, Marra KG, Ateshian GA, Hung CT. Dexamethasone release from within engineered cartilage as a chondroprotective strategy against interleukin-1 α . *Tissue Eng Part A* 2016;22(7–8):621–32.
- [49] Florine EM, Miller RE, Porter RM, Evans CH, Kurz B, Grodzinsky AJ. Effects of dexamethasone on mesenchymal stromal cell chondrogenesis and aggrecanase activity: comparison of agarose and self-assembling peptide scaffolds. *Cartilage* 2013;4(1):63–74.
- [50] Chu J, Zeng S, Gao L, Groth T, Li Z, Kong J, et al. Poly(L-lactic acid) porous scaffold-supported alginate hydrogel with improved mechanical properties and biocompatibility. *Int J Artif Organs* 2016;39(8):435–43.
- [51] Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th anniversary article: rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater* 2014;26(1):85–124.
- [52] Liu W, Cao Y. Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immunocompetent mammals: our experience and future requirements. *Biomaterials* 2007;28(34):5078–86.
- [53] Kon E, Filardo G, Perdisa F, Venieri G, Marcacci M. Clinical results of multilayered biomaterials for osteochondral regeneration. *J Exp Orthop* 2014;1:10.
- [54] Huang H, Zhang X, Hu X, Shao Z, Zhu J, Dai L, et al. A functional biphasic biomaterial homing mesenchymal stem cells for *in vivo* cartilage regeneration. *Biomaterials* 2014;35(36):9608–19.
- [55] Ding C, Qiao Z, Jiang W, Li H, Wei J, Zhou G, et al. Regeneration of a goat femoral head using a tissue-specific, biphasic scaffold fabricated with CAD/CAM technology. *Biomaterials* 2013;34(28):6706–16.
- [56] Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaefer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(6):705–13.
- [57] Malfait AM, Little CB. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:225.
- [58] Mollon B, Kandel R, Chahal J, Theodoropoulos J. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21(12):1824–33.
- [59] Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 2016;98:1–22.
- [60] Santoro R, Olivares AL, Brans G, Wirz D, Longinotti C, Lacroix D, et al. Bioreactor based engineering of large-scale human cartilage grafts for joint resurfacing. *Biomaterials* 2010;31(34):8946–52.
- [61] Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials *in vitro* and *in vivo*. *Front Biosci* 2008;13:4517–28.
- [62] De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of *in vitro*-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage *in vivo*. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):142–50.
- [63] Liu K, Zhou G, Liu W, Zhang W, Cui L, Liu X, et al. The dependence of *in vivo* stable ectopic chondrogenesis by human mesenchymal stem cells on chondrogenic differentiation *in vitro*. *Biomaterials* 2008;29(14):2183–92.
- [64] Kamil SH, Vacanti MP, Vacanti CA, Eavey RD. Microtia chondrocytes as a donor source for tissue-engineered cartilage. *Laryngoscope* 2004;114(12):2187–90.
- [65] Melgarejo-Ramírez Y, Sánchez-Sánchez R, García-López J, Brena-Molina AM, Gutiérrez-Gómez C, Ibarra C, et al. Characterization of pediatric microtia cartilage: a reservoir of chondrocytes for auricular reconstruction using tissue engineering strategies. *Cell Tissue Bank* 2016;17(3):481–9.
- [66] Zhang L, He A, Yin Z, Yu Z, Luo X, Liu W, et al. Regeneration of human-ear-shaped cartilage by co-culturing human microtia chondrocytes with BMSCs. *Biomaterials* 2014;35(18):4878–87.
- [67] Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 2004;10(5–6):762–70.
- [68] Dickhut A, Pelttari K, Janicki P, Wagner W, Eckstein V, Egermann M, et al. Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage. *J Cell Physiol* 2009;219(1):219–26.
- [69] Ko CY, Ku KL, Yang SR, Lin TY, Peng S, Peng YS, et al. *In vitro* and *in vivo* co-culture of chondrocytes and bone marrow stem cells in photocrosslinked PCL-PEG-PCL hydrogels enhances cartilage formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;10(10):E485–96.
- [70] Liu X, Sun H, Yan D, Zhang L, Lv X, Liu T, et al. *In vivo* ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials* 2010;31(36):9406–14.
- [71] Kang N, Liu X, Yan L, Wang Q, Cao Y, Xiao R. Different ratios of bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes used in tissue-engineered cartilage and its application for human ear-shaped substitutes *in vitro*. *Cells Tissues Organs* 2013;198(5):357–66.
- [72] Wu L, Leijten JC, Georgi N, Post JN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng Part A* 2011;17(9–10):1425–36.
- [73] Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A* 2012;18(15–16):1542–51.
- [74] de Windt TS, Saris DB, Slaper-Cortenbach IC, van Rijen MH, Gawlitta D, Creemers LB, et al. Direct cell-cell contact with chondrocytes is a key mechanism in multipotent mesenchymal stromal cell-mediated chondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 2015;21(19–20):2536–47.
- [75] Yanaga H, Imai K, Fujimoto T, Yanaga K. Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia. *Plast Reconstr Surg* 2009;124(3):817–25.
- [76] Yanaga H, Imai K, Tanaka Y, Yanaga K. Two-stage transplantation of cell-engineered autologous auricular chondrocytes to regenerate chondrofacial composite tissue: clinical application in regenerative surgery. *Plast Reconstr Surg* 2013;132(6):1467–77.
- [77] Weidenbecher M, Tucker HM, Awadallah A, Dennis JE. Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope* 2008;118(4):593–8.
- [78] Weidenbecher M, Tucker HM, Gilpin DA, Dennis JE. Tissue-engineered trachea for airway reconstruction. *Laryngoscope* 2009;119(11):2118–23.
- [79] Bichara DA, Pomerantseva I, Zhao X, Zhou L, Kulig KM, Tseng A, et al. Successful creation of tissue-engineered autologous auricular cartilage in an immunocompetent large animal model. *Tissue Eng Part A* 2014;20(1–2):303–12.
- [80] Pomerantseva I, Bichara DA, Tseng A, Cronce MJ, Cervantes TM, Kimura AM, et al. Ear-shaped stable auricular cartilage engineered from extensively expanded chondrocytes in an immunocompetent experimental animal model. *Tissue Eng Part A* 2016;22(3–4):197–207.
- [81] Schwarz S, Koerber L, Elsaesser AF, Goldberg-Bockhorn E, Seitz AM, Dürselen L, et al. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part A* 2012;18(21–22):2195–209.
- [82] Luo X, Zhou G, Liu W, Zhang WJ, Cen L, Cui L, et al. *In vitro* precultivation alleviates post-implantation inflammation and enhances development of tissue-engineered tubular cartilage. *Biomed Mater* 2009;4(2):025006.
- [83] Liu Y, Li D, Yin Z, Luo X, Liu W, Zhang W, et al. Prolonged *in vitro* precultivation alleviates post-implantation inflammation and promotes stable subcutaneous cartilage formation in a goat model. *Biomed Mater* 2016;12(1):015006.
- [84] Zhou L, Pomerantseva I, Bassett EK, Bowley CM, Zhao X, Bichara DA, et al. Engineering ear constructs with a composite scaffold to maintain dimensions. *Tissue Eng Part A* 2011;17(11–12):1573–81.
- [85] Centola M, Abbruzzese F, Scotti C, Barbero A, Vadalà G, Denaro V, et al. Scaffold-based delivery of a clinically relevant anti-angiogenic drug promotes the formation of *in vivo* stable cartilage. *Tissue Eng Part A* 2013;19(17–18):1960–71.
- [86] Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol* 2016;34(3):312–9.
- [87] Luo X, Liu Y, Zhang Z, Tao R, Liu Y, He A, et al. Long-term functional reconstruction of segmental tracheal defect by pedicled tissue-engineered trachea in rabbits. *Biomaterials* 2013;34(13):3336–44.
- [88] Haisch A. Ear reconstruction through tissue engineering. *Adv Otorhinolaryngol* 2010;68:108–19.
- [89] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100(2):297–302; discussion 303–4.
- [90] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnagli MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008;372(9655):2023–30.
- [91] Gonfiotti A, Jaus MO, Barale D, Baiguera S, Comin C, Lavorini F, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet* 2014;383(9913):238–44.
- [92] Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, Blomberg P, Bozóky B, Crowley C, et al. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet* 2011;378(9808):1997–2004. Erratum in: *Lancet* 2016;387(10022):944; *Lancet* 2016;387(10025):1276.
- [93] Elliott MJ, De Coppi P, Spegginorin S, Roebuck D, Butler CR, Samuel E, et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012;380(9846):994–1000.
- [94] Fulco I, Miot S, Haug MD, Barbero A, Wixmerten A, Feliciano S, et al. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet* 2014;384(9940):337–46.