

微载体技术在软骨损伤修复中的应用与展望

陈语嫣¹, 史廷春¹, 岳秀艳²

1 杭州电子科技大学 自动化学院, 浙江 杭州 310018

2 杭州电子科技大学 图书馆, 浙江 杭州 310018

陈语嫣, 史廷春, 岳秀艳. 微载体技术在软骨损伤修复中的应用与展望. 生物工程学报, 2022, 38(3): 925-942.

CHEN YY, SHI TC, YUE XY. Application of microcarrier technology in cartilage repairing: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 925-942.

摘 要: 软骨内部无血管结构、细胞外基质含量高的特点, 使软骨组织的自我恢复能力很差。在临床治疗中, 轻度的软骨缺损通常采用物理治疗或药物治疗方式, 严重者需进行手术治疗。近年来, 软骨组织工程技术为治疗软骨缺损提供了新的思路, 与传统的手术治疗方式相比, 结合软骨组织工程技术进行治疗具有创口小、恢复佳的优点。将微载体技术融入组织工程支架的设计中, 可以利用微载体直径小、能够负载多种生长因子的特点, 进一步扩展支架功能、促进软骨组织再生。文中首先对微载体技术进行介绍, 对近年来微载体的主要制备方式和创新内容进行了概括总结, 作为后续介绍的基础内容。然后对应用于软骨修复中的微载体进行了材料和功能上的划分, 介绍了不同材料、不同功能微载体的属性特征和在软骨修复方面的具体应用, 最后结合该领域发展历程对其今后发展趋势及方向进行展望, 并基于笔者团队关于骨软骨一体化层状支架的研究, 提出了通过微载体优化层状支架性能的思路, 有望制备出更贴合天然软骨结构特征的仿生支架。

关键词: 微载体; 增材制造; 骨关节炎; 再生医学; 细胞增殖; 梯度支架

Received: April 9, 2021; Accepted: August 12, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (61873078)

Corresponding author: SHI Tingchun. Tel/Fax: +86-571-86919107; E-mail: stc@hdu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (61873078)

Application of microcarrier technology in cartilage repairing: a review

CHEN Yuyan¹, SHI Tingchun¹, YUE Xiuyan²

1 College of Automation, Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2 Library of Hangzhou Dianzi University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: Cartilage has poor self-recovery because of its characteristics of no blood vessels and high extracellular matrix. In clinical treatment, physical therapy or drug therapy is usually used for mild cartilage defects, and surgical treatment is needed for severe ones. In recent years, cartilage tissue engineering technology provides a new way for the treatment of cartilage defects. Compared with the traditional surgical treatment, cartilage tissue engineering technology has the advantages of small wound and good recovery. The application of microcarrier technology in the design of tissue engineering scaffolds further expands the function of scaffolds and promotes cartilage regeneration. This review summarized the main preparation methods and development of microcarrier technology in recent years. Subsequently, the properties and specific application scenarios of microcarriers with different materials and functions were introduced according to the materials and functions of microcarriers used in cartilage repair. Based on our research on osteochondral integrated layered scaffolds, we proposed an idea of optimizing the performance of layered scaffolds through microcarriers, which is expected to prepare bionic scaffolds that are more suitable for the structural characteristics of natural cartilage.

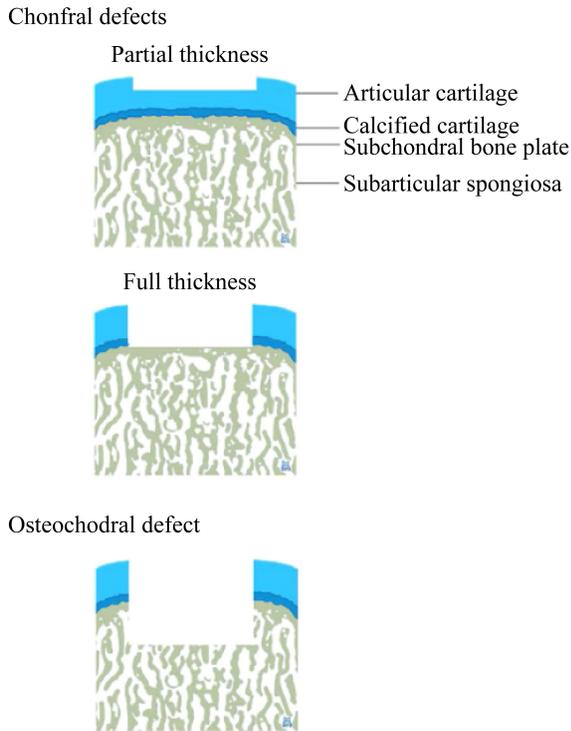
Keywords: microcarrier; additive manufacturing; osteoarthritis; regenerative medicine; cell proliferation; gradient scaffold

近年来, 软骨缺损患者数量日益增多, 其中大部分患者为老年群体和运动量大的青年群体。现有医疗方法在临床方面, 针对轻度患者多采用物理治疗、行动辅助治疗方式, 中度患者多采用药物治疗方式来抑制炎症、缓解疼痛, 情况较为严重的患者则采取手术治疗方式。关节软骨与人体其他组织不同, 其内部无血管结构, 且存在高比例的细胞外基质, 导致其自我修复能力差。传统治疗方式存在一定局限性, 比如一些口服类药物对肠胃有一定刺激, 手术治疗可能产生并发症, 增加患者的痛苦等。

从结构方面分析, 软骨的损伤程度可以简单地分为 3 类: 软骨层的部分缺失、软骨层全

层缺失和骨软骨的联合缺损^[1] (图 1)。

在针对软骨组织再生的讨论中, Mouser 等^[2]认为, 研究人员应着眼于重建基础骨骼和关节稳态。从这方面来说, 利用组织工程技术进行治疗可以针对不同患者、不同软骨缺损类型和程度构建个性化软骨支架, 比如, 针对单纯软骨损伤的患者定制适合不同缺损深度的软骨组织工程支架, 针对骨软骨联合缺损患者定制骨软骨一体化支架等, 为软骨修复提供了新的治疗方案。软骨无血管的特性也使软骨与其他血管结构复杂的器官相比, 更适合构建组织工程支架。且有研究表明, 在动物实验阶段使用组织工程支架的治疗效果优于常规手术治疗^[3]。

图 1 软骨缺损的分类^[1]Figure 1 Classification of cartilage defects^[1].

在过去的 20 年中, 研究人员已将多种不同生物材料运用于软骨组织工程领域, 并在支架的结构、功能等方面实现了进一步突破创新。但仍存在一些需要深入思考的问题, 比如, 如何获得足够数量的种子细胞并维持其细胞表型, 如何将生长因子等以可控的方式置入支架内部等。微载体技术为解决这些问题提供了新的思路。

下文首先对微载体技术进行基础介绍, 然后从制备方式入手, 重点介绍了现今使用较多的方法和近年来制备方法上的创新, 再从材料和功能两个方面叙述了微载体在软骨修复中的具体应用 (图 2), 并对这一领域仍存在的问题进行讨论和展望, 提出了针对骨软骨联合损伤新的治疗策略, 期待为该领域后续研究创新提供参考。

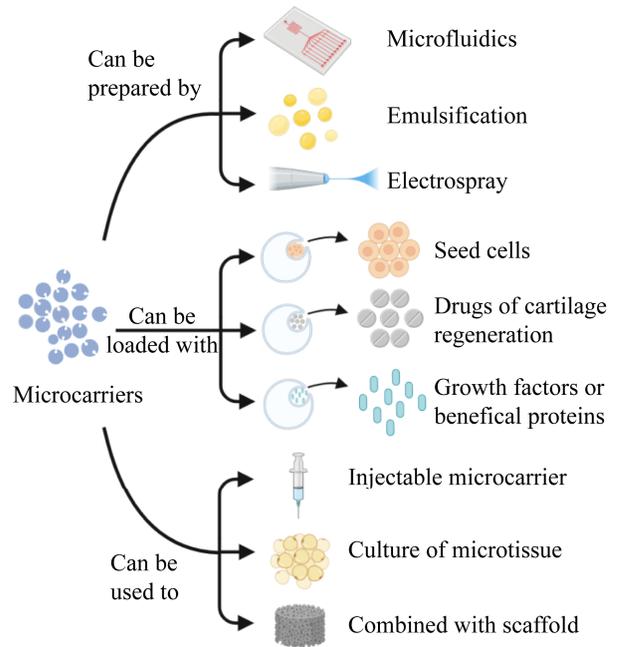


图 2 微载体的制备及应用

Figure 2 Preparation and application of microcarriers.

1 微载体技术介绍

微载体通常为直径 90–350 μm 的微粒^[4], 从外观形态上可分为有孔微载体和无孔微载体, 其中与药物共混制成的微载体如常见的壳聚糖微载体 (图 3) 多为无孔形态^[5], 负载细胞的微载体若为无孔微载体则细胞黏附在微载体表面, 若为有孔微载体 (图 4) 则负载在孔隙内部^[6]。微载体通常由多糖、蛋白质或高分子材料制备而成, 作为药物、细胞或生长因子的载体广泛应用于组织工程中。作为软骨细胞载体时, 微载体可以通过定点注射的方式填充软骨不规则缺损部位进行原位修复, 形成微组织, 促进软骨再生^[7]。微载体还可以配合生物反应器用于细胞扩增, 早在 1996 年就有研究将微载体与悬浮培养系统结合^[8], 用于软骨细胞的培养和增殖, 并证明了这种三维培养方式有利于维持软骨细胞表型, 并提高了软骨细胞这类贴

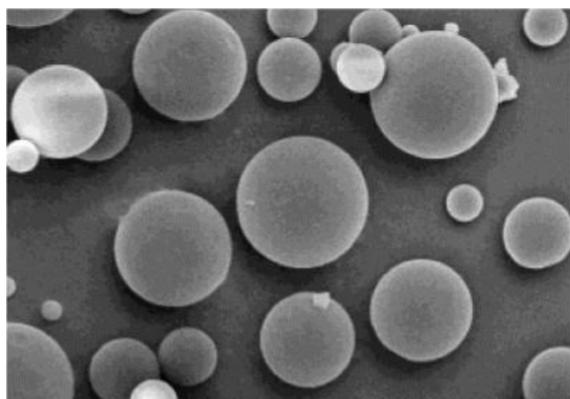


图3 扫描电镜下壳聚糖无孔微载体^[5]
Figure 3 SEM of microparticles prepared by chitosan with different molecular weight^[5].

壁细胞的培养效率^[9]。另外，微载体还可以作为缓释药物的载体，避免了部分药物口服或反复注射带来的副作用。

近年来，研究人员对于微载体的开发和应用达到了新的高度。在如何调节载细胞微载体中的细胞黏附率，如何控制载药微载体中的药物缓释速率，以及微载体本身在体内的降解速率等问题上，都有了更好的思路和研究成果。研究发现^[10]，微载体的细胞黏附率、药物缓释速率以及自身的降解速率，都与微载体的材料和制备方法有着密切的关系。近年来，许多研

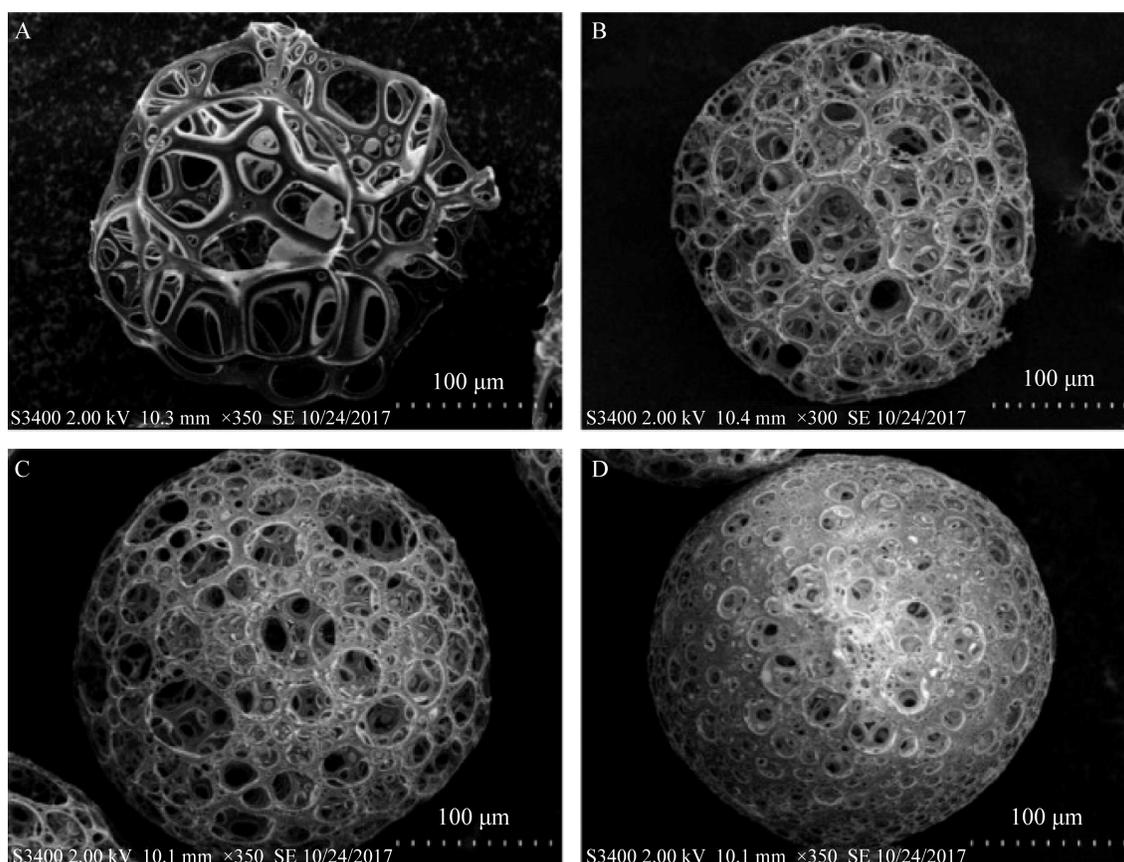


图4 不同聚乳酸-乙醇酸 (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA) 浓度制备的多孔 PLGA 微球的扫描电镜图像^[6]

Figure 4 SEM images of porous PLGA microspheres fabricated at different PLGA concentrations of 3% (A), 5% (B), 7% (C) and 10% (D)^[6].

究在微载体传统制备方法上进行了优化和创新,制备出直径分布范围更窄、性能更可控的微载体,下面首先对近年来在制备方式的创新和突破进行举例分析,在 3.1 中再对不同材料制备而成的微载体在软骨修复领域的应用实例进行归纳总结。

2 微载体制备方法介绍

2.1 注滴法

注滴法^[11]是微载体最常见的制备方法之一,其原理是在压力作用下将微载体制备材料从喷嘴中挤出,使材料液滴在表面张力作用下形成球体,落入凝固浴中固化成型。注滴法多用于实验室中的微球制备,其制备效率较低、球体成型状态不佳,无法调控成球质量。早期有许多研究对传统注滴方法进行了改进,并取得了不错的成效。比如利用特殊设置的枪头、针头^[12]配合具有超疏水表面的培养皿等工具制备微载体,通过控制挤出液滴的大小,在超疏水表面上形成质量相近直径相仿的液滴球体,再通过交联等手段进行固化,或直接通过枪头将小直径液滴直接挤入固化浴内^[13]使其交联固化,达到使微载体直径均一的效果。

2.2 乳化法

乳化法是将两种或两种以上不互溶的溶液混合后,进行机械搅拌形成乳液,再通过外力作用使内分散相中的溶剂从外水相中穿过,使液滴外表面固化形成微球^[14]。

1988 年 Yurtov 等^[15]首次提出膜乳化技术,与传统乳化方法相比,膜乳化法制备出的微球颗粒直径分布范围更窄,形状更均匀。其原理是通过制造成型膜两侧两相间压力差,使分散相从成型膜孔隙中挤出,与外部连续相接触,形成微球^[5]。

2.3 基于微流控技术的制备方法

微流控技术^[16]是关于流体在微纳米尺寸上行为的研究,利用它可以将大型实验缩小至不到几英寸的微流控芯片上进行。液滴微流控技术(图 5)可以基于微流控芯片,对微米直径的微液滴进行制备和操作。其原理在本质上与乳液法相似,是通过两相的界面张力以及内通道压力,使得分散相断裂成为单分散的微球。但与乳液法相比,液滴微流控技术形成的微球直径更为可控,且效率更高,每秒可以产生上千个液滴微球,凸显了微流控芯片低消耗、高通量的特点。2001 年 Cho 等^[17]首次提出利用通道内压力对连续流进行剪切,20 年来液滴微流控技术广泛应用于药物传输、细胞研究和材料合成制备等领域。De Carvalho 等^[18]利用微流控技术通过竞争性配体交换交联,制备了杂化水凝胶微球,并在微球内包裹纳米直径颗粒,制备

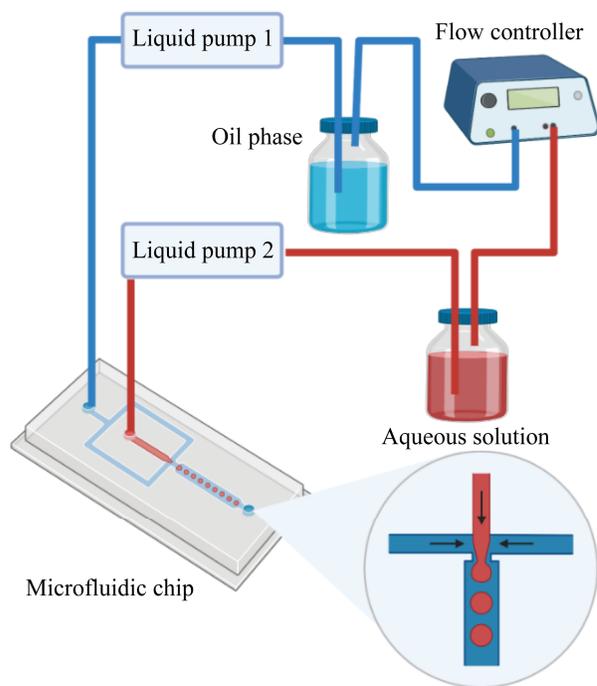


图 5 微流控技术原理

Figure 5 Principle of microfluidics.

出具有疏水-亲水特性的离散兼容杂化微凝胶。Langer 等^[16]利用自动化的液滴微流体平台制备了无支架的细胞球体。实验结果显示, 孵育 16 h 后, 这些细胞球体仍保持了良好的细胞活性, 且该平台具备高生产量和低生产成本, 制备过程自动化, 可通过进一步研究实现无支架细胞球体的自动化生产。

基于液滴微流控技术的双乳液法^[19]是对液滴微流控技术的延伸。双乳液法所制备的液滴具有更小的直径, 其内部可以进行多种化学反应, 且内部环境相对封闭, 可以减少不同反应材料之间的干扰和污染。制备过程中, 分散相液滴包裹着内部直径更小的液滴, 外液滴将内液滴与连续相有效隔离, 形成包裹性液滴。包

裹性液滴主要分为 W/O/W 型和 O/W/O 型, 其中 W 代表水相, O 代表油相, 字母顺序代表其由外向内的包裹结构。Wu 等^[19]将圆形玻璃毛细管的一端和方形玻璃毛细管的两端进行粘合, 分别作为 W/O/W 三相的连接器 (图 6), 利用该装置制作聚乳酸-乙醇酸 (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 双乳液液滴, 并使用聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 水溶液收集液滴, 经过恒速搅拌、蒸发、离心、洗涤等步骤后制备出 PLGA 微球。制备出的微球在核心和壳内同时负载软骨内容分子 (kartogenin, KGN) 和基质细胞衍生因子 (stromal cell derived factor-1, SDF-1), 其缓释曲线超过八周, 且负载效率高。研究还将微球与透明质酸水凝胶复合, 制成可注

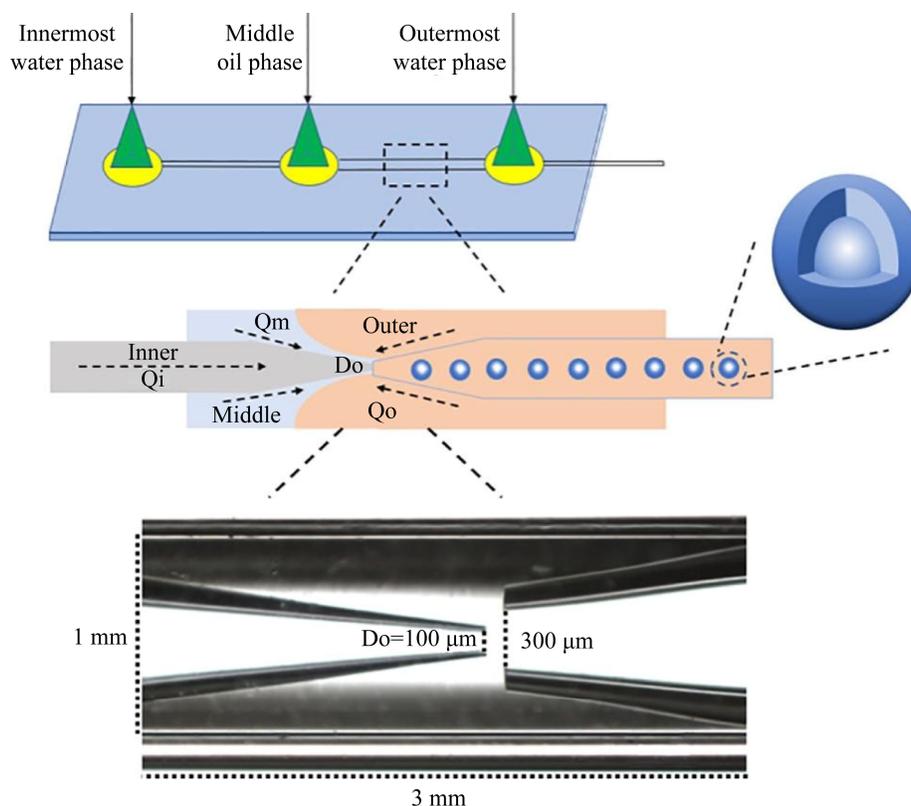


图 6 用于产生水包油 (W/O/W) 乳状液滴的玻璃毛细管微流控装置的示意图^[19]

Figure 6 Schematic illustration of glass-capillary microfluidic device for generating water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion droplets^[19].

射水凝胶用于软骨缺损治疗。液滴微流控技术不仅在球体制备方面优点突出,其均匀的球体形貌特征使其在微球回收方面也表现优异,是近年来实验室微球制备的主流方法。

2.4 电喷雾法

电喷雾法^[20]是在装置内利用高电位针头和零势能面之间的电位差,使针头处喷出的载药电解质溶液形成泰勒圆锥,这些微液滴喷雾在电场力的作用下向零势能面加速迁移,最终落入成型池内形成微球(图7)。Xu等^[21]利用带有气压控制器的电喷雾装置,配合连接到计算机的相机和耦合腔半导体激光器,实现了羽流和泰勒圆锥的可视化,利用电喷雾技术优化了包裹人骨髓基质干细胞的海藻酸钠凝胶微球的制备方法。研究发现,增加电压并降低流速会使微球直径减小,而电压减小流速增加则会导致微球的直径分布范围更宽。Liu等^[22]则开发出一种分层电喷雾方法,利用电喷雾法先制作内

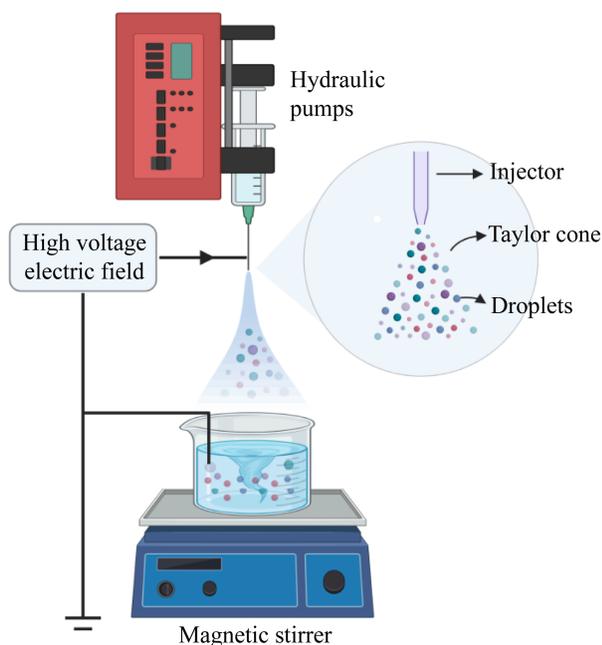


图7 电喷雾技术原理

Figure 7 Principle of electrospray.

部负载药物的 PLGA 微球,然后将 PLGA 微球与混入药物的壳聚糖溶液混合,再一次通过电喷雾法制备出内部含有 PLGA 微球和药物的壳聚糖(chitosan, CS)微球,实现壳聚糖微球中负载多个 PLGA 载药微球的分层结构(图8),这种分层电喷雾技术与上文提到的传统的 W/O/W 型和 O/W/O 型的双乳液法在原理上相似,但在保留双乳液法优点的同时进一步优化了包裹效率和载药稳定性,对传统双乳液方法进行了创新,值得进一步的研究。

3 微载体在软骨修复中的应用

3.1 不同材料制成的微载体在软骨修复中的应用

对微载体而言,制备材料的选择是非常重要的。不同材料的降解速率与所制成微载体在体内的降解速率息息相关。根据微载体的不同功能,对材料也有不同的要求和限制,比如载药微载体对材料的药物缓释速率有一定要求,载细胞微载体对材料的细胞黏附性有一定要求等,下面将对不同材料的微载体在软骨修复方面的最新应用进行分类分析。

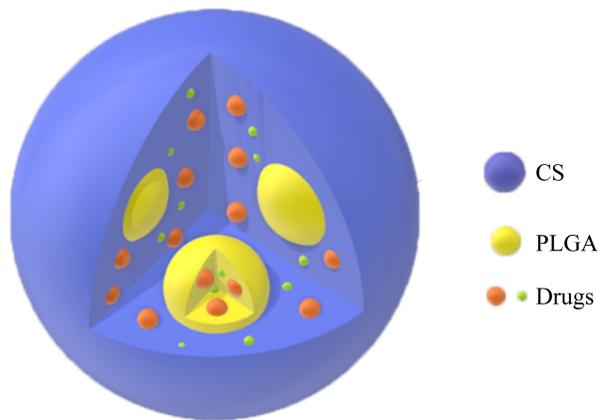


图8 壳聚糖微球的分层结构^[22]

Figure 8 Internal structure of chitosan microspheres^[22].

3.1.1 天然复合微载体在软骨修复方面的应用

(1) 多糖复合微载体

多糖是构成生命组织的四大基本物质之一,广泛存在于动植物组织内,种类繁多,且生物相容性、降解性好,具有免疫调节特性,是良好的组织工程材料,如壳聚糖、纤维素等,广泛应用于软骨组织工程中。

壳聚糖因其出色的抗菌活性和低免疫原性而广受关注。但较强的氢键作用使壳聚糖的水溶性较差,常与其他材料复合使用^[23]。比如, Sivandzade 等^[24]利用电喷雾法制作了脱细胞基质/壳聚糖多孔隙可注射复合微载体,实验结果表明,所制备出的微载体具有良好的机械强度、孔隙率以及生物降解率,且细胞附着力佳。壳聚糖同样也是载药微载体的常用材料。Zhang 等^[25]基于细菌纤维素和胶原蛋白制备了生物相容性良好的载药多孔微载体,该研究通过制作药物吸附和释放模型,模拟了药物释放的动力学过程,证明了细菌纤维素/胶原蛋白微载体具备药物递送系统所需的动力学特征。Zykwinska 等^[26]使用海洋胞外多糖制备了负载转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 的微载体。海洋胞外多糖天然微硫酸化,可以增强生长因子和软骨基质的结合,并且不会对脂肪来源干细胞向软骨细胞的分化产生影响,是有潜力的微载体材料。

除上述微载体外,商用微载体 Cytodex1 和 Cytodex3 也是基于多糖的微载体,这两种商用微载体以葡聚糖为基础材料,形态及密度设计有利于均匀悬浮。其中, Cytodex3 表面包被胶原蛋白,有利于增强碱性磷酸酶的活性,被广泛应用于软骨及成骨再生领域。比如, 苟鸿蒙^[27]使用 Cytodex3 微载体配合微重力环境对髌突软骨细胞进行三维培养,基因检测结果显

示,这种三维培养方式使髌突软骨细胞去分化速度得到了缓解,对维持软骨细胞表型有一定意义。

(2) 蛋白质复合微载体

在软骨组织工程方面应用最广泛的蛋白质类物质有胶原蛋白、丝素蛋白等。胶原是哺乳动物体内含量最丰富的蛋白质,也是细胞外基质的主要组成成分。胶原类物质由于具有良好的机械性能和生物学性能^[28],常用于软骨和成骨的修复再生,也可用作皮肤敷料。

明胶作为胶原蛋白的水解产物之一,其功能特性受 pH 和温度影响较大。明胶的侧链具有烷基、氨基、羟基等基团,是其多功能性的基础^[29]。基于明胶的微载体能够满足药物缓释的需求,明胶作为天然聚合物在体内外均具有高稳定性,明胶本身的多官能团结构也为明胶微载体的表面功能化提供了更多可能^[30]。Yang 等^[31]制作了甲基丙烯酸酯化的明胶微球,并采用接枝策略,使用聚甲基磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯和多巴胺新型共聚物对其进行改性。它的改性提高了微球的表面润滑性,有效减少了注射后的关节软骨磨损,并且在微球负载双氯芬酸钠时,还可以对软骨组织降解起到抑制作用。

在载药方面,改性明胶微载体表现突出,但在负载生长因子方面,明胶微载体的降解速率与软骨细胞在生长因子诱导下的再生速率并不匹配^[32]。所以需要通过化学改性等方式,对明胶微载体的降解速率进行调整,使微载体降解速率适应不同组织的再生速率。研究人员将丝素蛋白与明胶结合^[32],减缓了明胶微载体的降解速率,并且通过调整材料的配比,对复合微载体的降解速率进行了进一步调控。此外复合微载体还具有良好的机械性能,这也与丝素蛋白的引入有关。丝素蛋白是来源于蚕丝的天

然高分子纤维蛋白，是组织工程的重要材料。吴昊宇^[33]利用高压电喷雾法制作了纳米级别的丝素蛋白微载体，负载软骨细胞对缺损部位进行修复，效果显著，图 9 是小鼠脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 与丝素蛋白微球共培养时，丝素蛋白微球上黏附的 ADSCs 增殖情况，证明了丝素蛋白微球具有良好的生物相容性，对细胞生长并无抑制作用。

在负载细胞方面，有研究将明胶微载体与藻酸盐结合^[34]，利用电喷雾法对包埋人骨髓间充质干细胞的微载体形态和性质进行优化。结果表明，与纯藻酸盐微载体相比，明胶的加入在提高微载体的细胞黏附率的同时，并未对细胞活性和干细胞向软骨细胞的分化能力有所干扰，优化了复合微载体的生物学性能。

除此之外，以交联明胶为材料的商业化大孔微载体 Cultispher-S 也受到广泛关注，它在结构方面的特殊设计使它具有更高的比表面积和细胞因子扩散效率^[35]。Cultispher-S 常作为细胞载体与干细胞结合使用，对促进骨髓间充质干细胞成软骨分化以及软骨细胞生长有积极作用^[36]。

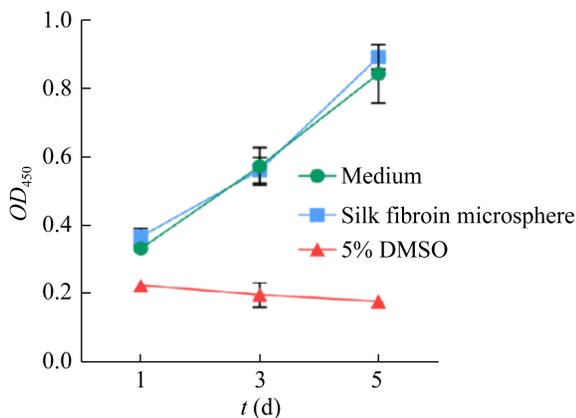


图 9 ADSCs 在丝素蛋白微球上的增殖情况^[33]
Figure 9 Proliferation of ADSCs on silk fibroin microspheres^[33].

天然生物材料种类繁多，除了上述以蛋白质和多糖为主题的生物材料外，脱细胞基质^[25]、多肽^[34]等也常被用于软骨组织工程领域的微载体制备。

3.1.2 陶瓷复合微载体在软骨修复方面的应用

生物活性陶瓷是一类具有特定生物学功能的陶瓷基生物材料，多应用于软骨、成骨或牙组织工程中^[37]。应用于软骨组织工程领域的生物活性陶瓷有羟基磷灰石、生物玻璃和磷酸三钙^[38]等。活性陶瓷通常含有羟基，具有多孔性、生物相容性、机械强度较好，多用于骨、软骨以及牙齿等组织的缺损修复^[39]，由于其优秀的机械性能，生物陶瓷可作为骨软骨支架中的软骨下骨层部分材料，对骨软骨联合缺损进行修复。

生物陶瓷在组织工程的应用中常与高分子材料复合，用来制作出更易于成型的微载体。比如，Liu 等^[40]制备了负载胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF-1) 的聚乳酸/羟基磷灰石核壳双层结构微载体，其结构有助于减缓释放速度，适用于长期缓释系统。高龙等^[41]将生物玻璃与聚乳酸复合，制作多孔细胞微载体，利用生物玻璃的碱性对聚乳酸降解可能产生的酸性环境进行中和，降低了对细胞的损害。除此之外，生物陶瓷复合微载体也可作为诱导干细胞分化搭建桥梁。如，王哲^[42]制备了负载转化生长因子 β 的羟基磷灰石微球复合明胶海绵支架与脂肪干细胞结合，将 ADSCs 向成软骨方向诱导，促进软骨再生。

3.1.3 合成高分子复合微载体在软骨修复方面的应用

20 世纪 70 年代以来，可降解合成聚合物在临床医学中的应用和研究越来越广泛。以合成高分子材料聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 为例，PLA 拥有优秀的力学性能和机械强度，具有一定的抗菌性和优良的生物降解性能^[43]，但

是细胞黏附率低、亲水性差等特点限制了 PLA 在组织工程中的应用, 研究中常通过其他亲水类材料复合制备支架来改善支架性能。PLA 与聚乙醇酸 (polyglycolic acid, PGA) 的共聚物聚乳酸-乙醇酸 (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA) 常作为药物递送系统的载体。PLGA 通过在制备时调整其聚合物分子量等参数, 可以实现对药物缓释速率以及微载体降解速率的有效控制^[44]。这一类机械强度优良的高分子材料制备的微球与水凝胶支架复合, 有增强其支架形状保真度和维持体内稳定性的作用^[7,45]。作为载药微载体, 有研究显示 PLGA 微载体的载药量和缓释速度与其制备方法相关^[46], 图 10 是通过双乳液和溶剂蒸发方法制备的 PLGA 微球的烯羟体外释放曲线, 在负载小分子亲水药物时, 采用双乳化溶剂蒸发法制备微载体, 与喷雾干燥法相比载药效率更低, 释放速度更快。Stefani 等^[47]利用载有 PLGA 微载体的无细胞琼脂糖水凝胶, 将地塞米松对患处进行持续性、低剂量地递送。实验结果表明, 在体外实验中,

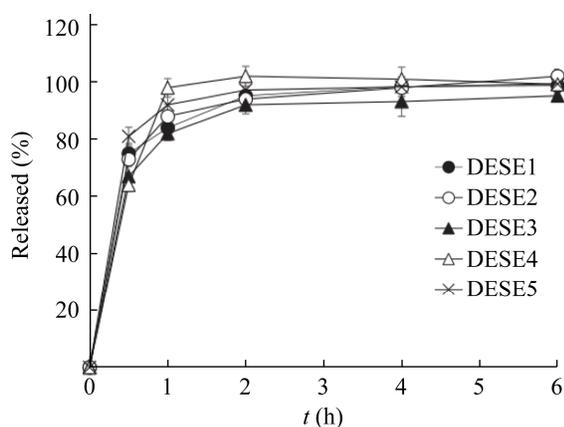


图 10 通过双乳液和溶剂蒸发方法制备的聚(乳酸二乙醇酸)微粒的烯羟体外释放曲线^[46]

Figure 10 *In vitro* release profile of ETV from the MPs prepared by double emulsion and solvent evaporation method^[46].

载药微载体可以提供至少 99 d 的地塞米松连续释放。

在人为制造软骨缺损的犬模型中, 注入载药微载体水凝胶的模型与空白对照组相比, 软骨细胞和胶原蛋白的病理学评分更高, 在减少犬模型的软骨降解方面得到了优异的结果。除 PLGA 外, Park 等^[48]制备了生物可降解的聚氨酯负载地塞米松作为可注射微载体, 通过控制异氰酸酯比例, 对聚氨酯的平均分子量、机械强度以及药物释放速率等参数进行调节, 为其临床应用提供了实验基础。

作为细胞载体, Lin 等^[7]制备了可注射的壳聚糖/聚乙二醇二丙烯酸酯的双交联网络水凝胶微载体, 采用微流控技术制备微球, 规避了传统固化微球制备过程中易发生的凝聚和尺寸不均匀等问题。双交联网络提高了水凝胶微载体的机械性能, 壳聚糖的加入提高了合成高分子微载体的生物相容性。体外培养实验表明, 水凝胶微载体负载的软骨细胞具有良好的生长状态和增殖效率, 并且观察到, 水凝胶微载体在承受针头所施加的机械挤压后, 微载体表面依然保持较高的细胞活性。

下面对文中微载体实例进行了总结归纳, 如表 1 所示。

3.2 具有不同功能的微载体在软骨修复中的应用

3.2.1 载药功能

由于关节结构相对封闭, 与口服药物相比, 利用微载体结构对药物进行定点传输可以有效减少口服药物带来的副作用。例如, 双醋瑞因 (diacerein, DIA) 和鳄梨大豆未皂化物 (avocado soybean unsaponifiable, ASU) 都对缓解软骨层炎症有一定效果。但口服 DIA 会产生腹泻、尿液变色和头晕等症状, 口服 ASU 会对肠胃造成

表 1 应用于软骨修复的微载体实例

Table 1 Examples of microcarriers for cartilage repair

Materials	Drugs/factors/proteins/others	Methods	Types	References
Chitosan/poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA)	Chondrocyte	Microfluidics	Injectable	[44]
PLGA	Diacerein	Emulsification	Injectable	[49]
PEA	TAA	Emulsification	Injectable	[50]
β -tricalcium phosphate	Chondroitin sulfate	Emulsification	Combined with scaffolds	[51]
PLGA	Fluvastatin	Emulsification	Injectable	[52]
Chitosan (CH)-polylactide (PLA)/hyaluronic acid (HA)	TGF- β 1	Emulsification	Injectable	[53]
PLA/hydroxyapatite	IGF-1	Emulsification	Injectable	[40]
Gelatin	TGF- β 1	Emulsification	Injectable	[54]
PLGA	Chondrocyte	Emulsification	Injectable	[55]
Chondrocyte extracellular matrix (CECM)/poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	Kartogenin (KGN)	Emulsification	Injectable	[56]
Cytodex 1	Human early mesenchymal stromal cell (heMSC)	/	Injectable	[57]
Natural bionic nanofibrous	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs)	Emulsification	Injectable	[58]
Marine exopolysaccharide (EPS)	TGF- β 1	Microfluidics	Injectable	[27]
Silk fibroin	Adipose derived stem cells (ADSCs)	Electrospray ionization	Injectable	[21]
Alginate/gelatin	Human bone marrow stromal cell (hBMSCs)	Electrospray ionization	Combined with scaffolds	[35]
Bioglass/PLA	Human bone marrow stromal cell (hBMSCs)	Emulsification	/	[42]
PLGA	Dexamethasone	Emulsification	Injectable	[47]
Polyurethane	Dexamethasone	Emulsification	Injectable	[48]

影响，这些问题都可以利用微载体进行定点药物传输解决^[49,59]。

另一方面，微载体的缓释功能可以有效避免药物的多次注射。比如，皮质类固醇可作为止痛剂缓解轻度骨关节炎患者的疼痛，但多次重复注射会增加伤口感染以及肌肉衰弱的几率。Rudnik-Jansen 等^[50]制作了具有药物缓释功能的聚酯酰胺 (polyester amide, PEA) 微球装载曲安奈德 (triamcinolone acetonide, TAA)，探究载药微球的缓释功能及对软骨层炎症的改善

效果。在该研究的体外缓释实验中，微球在磷酸缓冲盐溶液中持续释放 TAA 超过 60 d。在将微球注射入小鼠软骨缺损模型后，实验数据显示，直至注射 70 d 后微球依然存在，小鼠关节处滑膜炎症在注射微球后一段时间内明显降低，且未发现注射液对软骨病理产生影响。

除了对止痛类药物进行持续释放外，微载体还能够负载抑制软骨降解的药物，实现对关节炎的缓解。例如，Mohan 等^[51]在动物实验中，在绵羊右膝关节处人为制造软骨缺损，将

载硫酸软骨素微载体复合 PLGA 梯度支架对软骨损伤的修复效果,与微骨折法的术后效果进行对比,发现经过为期一年的修复研究,前者的修复效果更优,出现了透明状软骨等稳定基质,而微骨折组的再生组织中则出现了纤维状软骨和细微裂缝。

他汀类药物同样具有抗炎功效,但需频繁注射给药才能达到治疗效果。Goto 等^[52]利用 PLGA 微球负载他汀类药物进行了动物实验。实验结果显示,与频繁注射相比,载药微球的治疗效果更佳,也避免了高剂量直接注射时可能引起的横纹肌溶解等副作用^[60],实现了治疗所需的低剂量的、局部的、长期安全的给药。

3.2.2 载生长因子功能

生长因子是体内自然产生的一种可以调节细胞生长及行为功能的多肽类物质。其通过与周围的细胞外基质相互作用,将自身呈递给有特异性受体的细胞^[59]。软骨关节在多种生长因子的共同调节作用下,得以维持其内部稳态和正常生长发育。各生长因子功能不同,其中一部分可以起到抑制软骨组织炎症、减少软骨组织降解的功效^[61],也有部分可以抑制软骨组织肥大和纤维化^[62]。但生长因子在无载体保护时,在体内环境下生存的时间短,将生长因子与微载体结合,可以有效保护生长因子在体内不受蛋白水解酶的影响,并能够以可控的速率和浓度进行生长因子的体内局部递送^[53]。

当软骨组织出现损伤时,关节腔内的致炎性细胞因子数量增加,会加重软骨缺损处的炎症反应,也会影响周围健康的组织环境。常见的致炎性细胞因子包括白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[63]、肿瘤因子坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[64]等。有研究证明,通过抑制致炎性细胞因子的表达可以达到缓解关节炎的目的。Jiang 等^[65]将大鼠软骨细胞用白介

素 1 β 处理后,发现软骨细胞活力明显降低。再将样本用不同浓度的 nesfatin-1 (核组蛋白被激素原转化酶 1/3 剪接后产生的内分泌因子) 处理,其实验结果显示,与仅加入白介素 1 β 的对照组相比,后续加入 nesfatin-1 的实验组中细胞凋亡速率更为缓慢,证明 nesfatin-1 对由白介素 1 β 引起的软骨组织降解具有缓解功效。已有研究将这些抑制致炎性因子表达的生长因子与微载体结合构成长期给药系统。Liu 等^[40]开发了用于长期递送胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 的微载体,并使用成年小鼠模型进行体外释放实验。结果显示,长期递送 IGF-1 的小鼠模型骨量增加,且与对照组相比,进行了微载体注射的实验组由白介素 1 β 诱导的蛋白聚糖降解明显减少,证明了基于微载体的 IGF-1 长期给药系统对抑制软骨变性有一定效果。

另外,部分生长因子还具有促进细胞增殖分化的功能。比如, Kudva 等^[54]的实验证明,载有转化生长因子 β 1 的明胶微载体能够增强人骨膜衍生细胞微团的成软骨能力; Sun 等^[66]将结合人脂肪衍生干细胞和负载转化生长因子 β 3 (transforming growth factor- β 3, TGF- β 3) 的微载体植入人工制造软骨缺损的新西兰兔模型体内,并将对照组注入同等体积的生理盐水。结果表明,注入含生长因子微载体的兔模型中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖的基因表达明显上调,关节软骨再生情况也较对照组更优,证明载有 TGF- β 3 的微球有促进软骨组织再生的作用。

3.2.3 载细胞功能

(1) 提高细胞扩增效率

微骨折和自体细胞修复是骨关节炎的常见治疗手段^[67],但这两种方式所需的供体细胞来源都非常有限。微载体技术利用直径 100–300 μ m 的微小颗粒装载种子细胞,能够实现细胞在体

外快速扩增。部分研究将微载体与生物反应器相结合,更好地模拟了细胞在体内的生长微环境,更高效地得到优质种子细胞,其过程如图 11 所示。例如 Li 等^[68]利用微载体结合转瓶组建了 3D 悬浮培养系统,为贴壁细胞提供了更大的生长面积,并通过优化转瓶的转速和接种密度,提高了所得细胞质量;孙恒^[55]利用臂式生物反应器结合丝素蛋白修饰的左旋聚乳酸微载体进行软骨细胞的扩增,在保证软骨细胞大量扩增的同时,维持了良好的细胞表型。相比基于烧杯和培养瓶的二维培养方法,基于微载体的三维培养方法可以有效提升单位空间的细胞扩增数量^[23],微载体的类球状结构为细胞的黏附和增殖提供了更大的培养面积。而通过实现微载体更高的比表面积(单位质量物料所具有的总面积,单位为 m^2/g)可以进一步提高细胞的扩增效率^[10]。例如,Confalonieri 等^[69]制作了基于 I 型胶原重组肽的新型大孔微载体,增大了微载体的比表面积,避免了微载体内部因孔径过小

而限制细胞向内生长。实验结果表明,新型大孔微载体与市售商业微载体相比,细胞增殖效率更高,细胞产量更大。Zhang 等^[25]利用胶原和细菌纤维素制作了表面粗糙的多孔微球,结果显示其有利于小鼠软骨细胞黏附和增殖。

另外,单层培养易导致软骨细胞向成纤维化软骨方向生长,高密度培养与外部生物反应器施加的机械应力相结合,有助于维持软骨细胞表型,使细胞生长为治疗所需的软骨组织结构。微载体与细胞经过一段时间共培养所形成的微组织结构,也可以直接作为软骨缺损部位的填充部分^[70-71],省略了二维培养中将贴壁的软骨细胞进行消化的步骤,减少了过度消化可能对细胞带来的损害。

(2) 促进干细胞成软骨分化

基于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MCSs)的细胞疗法也是修复软骨组织缺损的重要方法之一^[72],MCSs 作为多能干细胞具有谱系特异性,在临床研究中具有免疫调节特性,

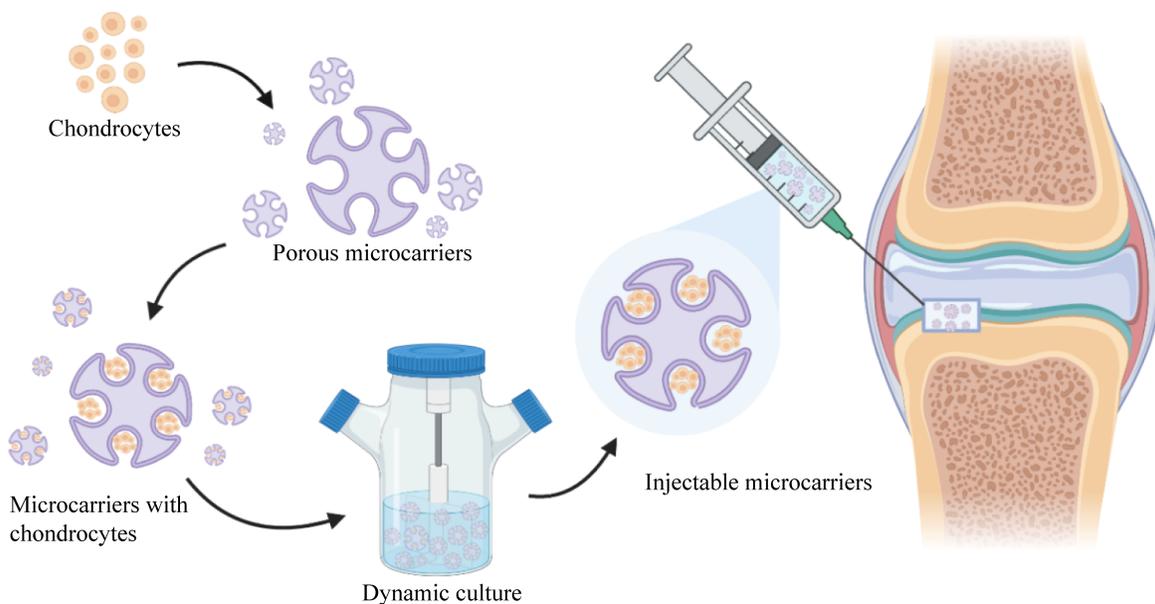


图 11 载细胞微载体的使用过程

Figure 11 The use of cell-seeded microcarrier.

是组织工程有潜力的细胞来源^[73]。有研究证明,将 MSCs 注入有炎症反应的膝关节软骨处对软骨再生有积极效果^[74]。但 MCSs 在细胞疗法方面的应用所需细胞数目较多,传统体外增殖分化的效率太低,存在细胞疗法的固有弊端。将其与微载体技术结合可以有效地解决这一问题。除此之外,微载体还可用于增强干细胞向软骨细胞分化的潜能^[58]。将干细胞与可降解微载体、组织工程支架结合,用于填补软骨组织缺损,可促进软骨组织再生。这种方式省略了从体外细胞增殖到将细胞附着到支架上的过程,避免了消化和离心可能对细胞的损伤,是值得关注的方向。

Lin 等^[57]证明了在整个干细胞分化过程中,微载体对于细胞的黏附对干细胞的成软骨细胞分化有积极作用;并确定了细胞融合率、细胞接种数量和单位构建体的微载体数量是影响干细胞向软骨细胞分化的重要参数,且这些关键参数可以应用于多种微载体类型,为以后的实验研究奠定了坚实的理论基础。Wang 等^[58]通过天然仿生纳米纤维微载体培养骨髓间充质干细胞,并进一步将其培养成为微组织结构,结果表明,这种方式为细胞提供的生长微环境以及对细胞外基质的模仿,有效促进了细胞增殖和诱导干细胞成软骨细胞分化。该研究的动物实验结果表明,微组织的植入对小鼠的膝关节软骨缺损表现出了优秀的修复能力,天然仿生纳米纤维微载体是细胞增殖和分化的有效载体。

也有许多研究对微载体的形态特征进行了优化创新,让微载体的形态不仅仅局限于有孔或无孔的微球形状,使其更适宜于向软骨细胞分化。例如, Kim 等^[75]制作 30 μm 孔径的袋状微载体,与间充质干细胞大小匹配。将含有地塞米松纳米颗粒的微载体与干细胞混合进行原

位培养,并进行动物实验。实验结果表明,该袋状微载体可以安全地进行干细胞传输,提供了有利于向软骨细胞分化的微环境。

4 总结与展望

在软骨缺损的治疗中,微载体为软骨组织工程“如何更高效地获得种子细胞”提供了方法,并且在负载治疗软骨缺损相关药物方面表现突出。

目前,基于“有支架”的微载体研究较少,多数研究侧重于将微载体与“无支架”水凝胶结合,制备可注射微载体。将微载体技术应用到仿生支架的制作中,模仿天然软骨随深度变化的内部组成和组织结构,是一种切实可行的优化方法,但也存在一些待研究讨论的问题,如微载体的加入是否会对部分水凝胶的可打印性造成影响,微载体密度是否会对支架打印时的挤出速率或挤出针头的直径有一定要求等,需要进一步的实验验证和讨论,下面提出一些基于笔者团队自身研究的优化思路和讨论。

(1) 通过微载体模仿天然软骨的梯度力学性能。

笔者团队对于骨软骨一体化支架的研究中,通常通过不同层选取不同力学性能的材料实现对天然软骨梯度力学性能的模仿,前文提到部分微载体能够起到提升支架力学性能的作用^[46],从这方面考虑,可以通过控制微载体的数量以及疏密程度,对不同层骨软骨复合支架的力学性能进行调控。这为笔者团队研究提供了新的思路,我们认为,微载体在支架中的浓度、微载体的直径,以及微载体在制备过程中材料浓度都可能对支架的力学性能造成一定影响。

现今骨软骨支架的研究中,大多通过层与层之间材料性质的不同,实现仿生支架不同深度对于力学性能的要求。但层与层之间的复合

和连接方式仍是该方向需进一步研究的问题。采用微载体对力学性能进行调控是否能够避开层与层之间的复合问题；构造不同力学强度要求的微载体层之间是否需要特殊的膜结构进行分区阻隔，这些问题还需在接下来的具体实验中寻找答案。

(2) 通过微载体实现不同层的生长因子负载。

在最新发表的研究中, Dorcemus 等^[76]开发了一种分区域负载双生长因子的骨软骨支架, 使成骨生长因子(骨形态发生蛋白)吸附在 PLGA/羟基磷灰石模板表面, 软骨生长因子(TGF- β 1) 加载在透明质酸水凝胶相中, 实现了骨软骨复合支架中骨层及软骨层的分区域生长因子负载。但仅将成骨生长因子吸附在成骨层支架表面并不能模仿天然骨软骨中生长因子均匀分布的特点, 从这方面来说, 通过微载体实现生长因子在骨软骨支架中各层间的均匀分布也是可行的思路之一, 与上述研究相比, 通过微载体负载生长因子, 可以更均匀地、更可控地在层状结构中释放生长因子, 这一思路可以更好地优化骨软骨复合支架的生物学性能。

总而言之, 与微载体技术的结合为支架性能的优化和功能的提升都提供了广阔的思路, 是实现更贴近天然软骨内部组成结构的组织工程仿生支架的有力工具, 在未来的实验研究中, 也应更加注重提高微载体复合支架的综合性性能, 使其更好地应用到临床中去, 成为治疗骨关节炎、缓解患者病痛的良方。

REFERENCES

- [1] Cucchiaroni M, Madry H, Guilak F, et al. A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*, 2014, 27: 12-16.
- [2] Mouser VHM, Levato R, Bonassar LJ, et al. Three-dimensional bioprinting and its potential in the field of articular cartilage regeneration. *Cartilage*, 2017, 8(4): 327-340.
- [3] Zhang Y, Liu S, Guo W, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(7): 954-965.
- [4] Alfred R, Radford J, Fan J, et al. Efficient suspension bioreactor expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers in serum-free medium. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(3): 811-823.
- [5] Niu R, Yang Y, Wang S, et al. Chitosan microparticle-based immunoaffinity chromatography supports prepared by membrane emulsification technique: characterization and application. *Int J Biol Macromol*, 2019, 131: 1147-1154.
- [6] Kim H, Kim BR, Shin YJ, et al. Controlled formation of polylysinated inner pores in injectable microspheres of low molecular weight poly(lactide-co-glycolide) designed for efficient loading of therapeutic cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup3): S233-S246.
- [7] Lin L, Wang YF, Wang L, et al. Injectable microfluidic hydrogel microspheres based on chitosan and poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) as chondrocyte carriers. *RSC Adv*, 2020, 10(65): 39662-39672.
- [8] Frondoza C, Sohrabi A, Hungerford D. Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. *Biomaterials*, 1996, 17(9): 879-888.
- [9] Hu JC, Athanasiou KA. A self-assembling process in articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng*, 2006, 12(4): 969-979.
- [10] Derakhti S, Safiabadi-Tali SH, Amoabediny G, et al. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: a comprehensive review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109782.
- [11] Chandy T, Mooradian DL, Rao GHR. Chitosan/polyethylene glycol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin. *J Appl Polym Sci*, 1998, 70(11): 2143-2153.
- [12] Wu CT, Zhu YF, Chang J, et al. Bioactive inorganic-materials/alginate composite microspheres with controllable drug-delivery ability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 94(1): 32-43.
- [13] 庞懿, 罗江明, 黄杨, 等. 软骨细胞-海藻酸钠水凝胶微球修复大鼠颅骨缺损. *第三军医大学学报*, 2017, 39(20): 1993-1997.

- Pang Y, Luo JM, Huang Y, et al. Effect of articular chondrocytes combined with sodium alginate hydrogel sphere on rat calvarial defects. *J Third Mil Med Univ*, 2017, 39(20): 1993-1997 (in Chinese).
- [14] 阎观琼. 缓释微球的研究现状. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(93): 39, 43.
Yan GQ. Research status of sustained release microspheres. *World Latest Med Inf*, 2019, 19(93): 39, 43 (in Chinese).
- [15] Yurtov EV, Koroleva MY, Golubkov AS, et al. Structural-mechanical barrier in membrane extraction in a multiple emulsion. 1988.
- [16] Langer K, Joensson HN. Rapid production and recovery of cell spheroids by automated droplet microfluidics. *SLAS Technol*, 2020, 25(2): 111-122.
- [17] Cho SK, Moon H, Fowler J, et al. Splitting a liquid droplet for electrowetting-based microfluidics. In *American Society of Mechanical Engineers, Micro-Electromechanical Systems Division Publication (MEMS)*, 2001, 3(1): 207-213.
- [18] De Carvalho BG, Taketa TB, Garcia BBM, et al. Hybrid microgels produced via droplet microfluidics for sustainable delivery of hydrophobic and hydrophilic model nanocarriers. *Mater Sci Eng: C*, 2021, 118: 111467.
- [19] Wu HC, Shen L, Zhu Z, et al. A cell-free therapy for articular cartilage repair based on synergistic delivery of SDF-1 & KGN with HA injectable scaffold. *Chem Eng J*, 2020, 393: 124649.
- [20] 吴颖, 马敏先. 电喷雾法制备纳米粒子的研究进展. *生物医学工程与临床*, 2020, 24(1): 114-117.
Wu Y, Ma MX. Research progress in preparation of nanoparticles by electrospray. *Biomed Eng Clin Med*, 2020, 24(1): 114-117 (in Chinese).
- [21] Xu Y, Peng J, Richards G, et al. Optimization of electrospray fabrication of stem cell-embedded alginate-gelatin microspheres and their assembly in 3D-printed poly(ϵ -caprolactone) scaffold for cartilage tissue engineering. *J Orthop Translat*, 2019, 18: 128-141.
- [22] Liu Z, Ye W, Zheng J, et al. Hierarchically electrospinning a PLGA@chitosan sphere-in-sphere composite microsphere for multi-drug-controlled release. *Regen Biomater*, 2020, 7(4): 381-390.
- [23] Fan M, Ma Y, Tan H, et al. Covalent and injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogels embedded with chitosan microspheres for drug delivery and tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 67-74.
- [24] Sivandzade F, Mashayekhan S. Design and fabrication of injectable microcarriers composed of acellular cartilage matrix and chitosan. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2018, 29(6): 683-700.
- [25] Zhang W, Wang XC, Wang JJ, et al. Drugs adsorption and release behavior of collagen/bacterial cellulose porous microspheres. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 196-205.
- [26] Zykwinska A, Marquis M, Godin M, et al. Microcarriers based on glycosaminoglycan-like marine exopolysaccharide for TGF- β 1 long-term protection. *Mar Drugs*, 2019, 17(1): 65.
- [27] 苟鸿蒙. 模拟微重力对SD大鼠髌突软骨细胞去分化影响的实验研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
Gou HM. Experimental study on the effect of simulated microgravity on dedifferentiation of condylar chondrocytes in SD rats[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2018 (in Chinese).
- [28] 邢飞, 李浪, 刘明, 等. 原位组织工程技术在骨与软骨修复领域的应用进展. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(10): 1358-1363.
Xing F, Li L, Liu M, et al. The application and research progress of *in situ* tissue engineering technology in bone and cartilage repair. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2018, 32(10): 1358-1363 (in Chinese).
- [29] Lin J, Pan D, Sun Y, et al. The modification of gelatin films: based on various cross-linking mechanism of glutaraldehyde at acidic and alkaline conditions. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(12): 4140-4146.
- [30] Mahmoudi Saber M. Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 183: 110407.
- [31] Yang J, Han Y, Lin J, et al. Ball-bearing-inspired polyampholyte-modified microspheres as bio-lubricants attenuate osteoarthritis. *Small*, 2020, 16(44): e2004519.
- [32] Ratanavaraporn J, Soontornvipart K, Shuangshoti S, et al. Localized delivery of curcumin from injectable gelatin/Thai silk fibroin microspheres for anti-inflammatory treatment of osteoarthritis in a rat model. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(2): 211-221.
- [33] 吴昊宇. 丝素蛋白微球复合化学修饰 IGF-1 mRNA 转染的脂肪干细胞促进软骨修复的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
Wu HY. Silk fibroin microsphere with chemically modified IGF-1 mRNA transfected adiposederived stem cells for the treatment of cartilage injury[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [34] Wang J, Sun X, Zhang Z, et al. Silk fibroin/

- collagen/hyaluronic acid scaffold incorporating pilose antler polypeptides microspheres for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 94: 35-44.
- [35] De Sá Da Silva J, Severino P, Wodewotzky TI, et al. Mesenchymal stromal cells maintain the major quality attributes when expanded in different bioreactor systems. *Biochem Eng J*, 2020, 161: 107693.
- [36] 高迪晶. 微载体培养法在人脐带间充质干细胞体外扩增中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
Gao DJ. *Ex vivo* expansion of human umbilical cord mesenchymal stem cells using microcarrier culture systems[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2012 (in Chinese).
- [37] 郭立英. 生物陶瓷纤维支架的制备与性能研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2020.
Guo LY. Preparation and characterization of scaffolds based on bioceramic nanofibers[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2020 (in Chinese).
- [38] Bunpetch V, Zhang X, Li T, et al. Silicate-based bioceramic scaffolds for dual-lineage regeneration of osteochondral defect. *Biomaterials*, 2019, 192: 323-333.
- [39] 刘宸希, 康红军, 吴金珠, 等. 3D 打印技术及其在医疗领域的应用. *材料工程*, 2021, 49(6): 66-76.
Liu CX, Kang HJ, Wu JZ, et al. 3D printing and its application in the field of medicine. *J Mater Eng*, 2021, 49(6): 66-76 (in Chinese).
- [40] Liu R, Chen Y, Liu LL, et al. Long-term delivery of rhIGF-1 from biodegradable poly(lactic acid)/hydroxyapatite@Eudragit double-layer microspheres for prevention of bone loss and articular degeneration in C57BL/6 mice. *J Mater Chem B*, 2018, 6(19): 3085-3095.
- [41] 高龙, 张赵文斌, 常江. 生物玻璃/聚乳酸多孔微球的制备及其作为细胞载体的研究. *无机材料学报*, 2020, 35(10): 1163-1168.
Gao L, Zhang ZWB, Chang J. Bioglass/poly(lactic acid) porous microspheres: preparation and their application as cell microcarriers. *J Inorg Mater*, 2020, 35(10): 1163-1168 (in Chinese).
- [42] 王哲. ADSCs-HA 纳米微球复合物治疗兔膝关节创伤性软骨缺损的实验研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
Wang Z. Experimental study of ADSCs-HA nano-microsphere complex in treating traumatic cartilage defect in rabbit knee joint[D]. Zunyi: Zunyi Medical University, 2020 (in Chinese).
- [43] Hastings GW. Polymers in medicine[J]. *Chem Br*, 1971, 7(3): 119-120.
- [44] Kim BJ, Arai Y, Choi B, et al. Restoration of articular osteochondral defects in rat by a bi-layered hyaluronic acid hydrogel plug with TUDCA-PLGA microsphere. *J Ind Eng Chem*, 2018, 61: 295-303.
- [45] Li T, Liu BZ, Jiang YH, et al. L-poly(lactic acid) porous microspheres enhance the mechanical properties and *in vivo* stability of degummed silk/silk fibroin/gelatin scaffold. *Biomed Mater*, 2020, 16(1): 015025.
- [46] Kim SR, Ho MJ, Choi YW, et al. Improved drug loading and sustained release of entecavir-loaded PLGA microsphere prepared by spray drying technique. *Bull Korean Chem Soc*, 2019, 40(4): 306-312.
- [47] Stefani RM, Lee AJ, Tan AR, et al. Sustained low-dose dexamethasone delivery via a PLGA microsphere-embedded agarose implant for enhanced osteochondral repair. *Acta Biomater*, 2020, 102: 326-340.
- [48] Park J, Lee MJ, Ahn GY, et al. Synthesis and characterizations of biodegradable polyurethane microspheres with dexamethasone for drug delivery. *Macromol Res*, 2019, 27(9): 839-842.
- [49] Jung JH, Kim SE, Kim HJ, et al. A comparative pilot study of oral diacerein and locally treated diacerein-loaded nanoparticles in a model of osteoarthritis. *Int J Pharm*, 2020, 581: 119249.
- [50] Rudnik-Jansen I, Colen S, Berard J, et al. Prolonged inhibition of inflammation in osteoarthritis by triamcinolone acetonide released from a polyester amide microsphere platform. *J Control Release*, 2017, 253: 64-72.
- [51] Mohan N, Gupta V, Sridharan BP, et al. Microsphere-based gradient implants for osteochondral regeneration: a long-term study in sheep. *Regen Med*, 2015, 10(6): 709-728.
- [52] Goto N, Okazaki K, Akasaki Y, et al. Single intra-articular injection of fluvastatin-PLGA microspheres reduces cartilage degradation in rabbits with experimental osteoarthritis. *J Orthop Res*, 2017, 35(11): 2465-2475.
- [53] Min Q, Liu JY, Li J, et al. Chitosan-poly(lactide)/hyaluronic acid complex microspheres as carriers for controlled release of bioactive transforming growth factor- β 1. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): E239.
- [54] Kudva AK, Dikina AD, Luyten FP, et al. Gelatin microspheres releasing transforming growth factor drive *in vitro* chondrogenesis of human periosteum derived cells in micromass culture. *Acta Biomater*, 2019, 90: 287-299.
- [55] 孙恒. 丝素修饰左旋聚乳酸多孔微球构建可注射组织

- 工程软骨的研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- Sun H. Construction of injectable tissue engineered cartilage with silk fibroin modified poly-L-lactic acid porous microspheres[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2019 (in Chinese).
- [56] Zhao YH, Zhao XG, Zhang R, et al. Cartilage extracellular matrix scaffold with kartogenin-encapsulated PLGA microspheres for cartilage regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 600103.
- [57] Lin YM, Lee J, Lim JFY, et al. Critical attributes of human early mesenchymal stromal cell-laden microcarrier constructs for improved chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 93.
- [58] Wang Y, Yuan X, Yu K, et al. Fabrication of nanofibrous microcarriers mimicking extracellular matrix for functional microtissue formation and cartilage regeneration. *Biomaterials*, 2018, 171: 118-132.
- [59] Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, et al. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater*, 2016, 30: 1-12.
- [60] Thompson PD. Statin-associated myopathy. *JAMA*, 2003, 289(13): 1681.
- [61] Deng ZH, Li YS, Gao X, et al. Bone morphogenetic proteins for articular cartilage regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(9): 1153-1161.
- [62] Fadda SMH, Bassyouni IH, Khalifa RH, et al. Pleiotrophin, the angiogenic and mitogenic growth factor: levels in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: and correlation with clinical, laboratory and radiological indices. *Z Rheumatol*, 2018, 77(4): 322-329.
- [63] Löfgren M, Svala E, Lindahl A, et al. Time-dependent changes in gene expression induced *in vitro* by interleukin-1 β in equine articular cartilage. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 466-476.
- [64] Ye ZC, Wang CF, Han L, et al. Chondroprotective effect of wufu decoction on tumor necrosis factor- α -induced chondrocytes via the extracellular signal regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Orthop Surg*, 2020, 12(4): 1319-1326.
- [65] Jiang LF, Xu K, Li J, et al. Nesfatin-1 suppresses interleukin-1 β -induced inflammation, apoptosis, and cartilage matrix destruction in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis in rats. *Aging*, 2020, 12(2): 1760-1777.
- [66] Sun Q, Zhang L, Xu T, et al. Combined use of adipose derived stem cells and TGF- β 3 microspheres promotes articular cartilage regeneration *in vivo*. *Biotech Histochem*, 2018, 93(3): 168-176.
- [67] Tee CA, Yang Z, Yin L, et al. Improved zonal chondrocyte production protocol integrating size-based inertial spiral microchannel separation and dynamic microcarrier culture for clinical application. *Biomaterials*, 2019, 220: 119409.
- [68] Li X, Hua HJ, Hao J, et al. Culturing of human umbilical cord mesenchymal stem cells via a 3D suspension culture system using the microcarrier. *Hereditas*, 2018, 40(12): 1120-1128.
- [69] Confalonieri D, La Marca M, Van Dongen EMWM, et al. An injectable recombinant collagen I peptide-based macroporous microcarrier allows superior expansion of C2C12 and human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and supports deposition of mineralized matrix. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(17/18): 946-957.
- [70] Liu J, Lu Y, Xing F, et al. Cell-free scaffolds functionalized with bionic cartilage acellular matrix microspheres to enhance the microfracture treatment of articular cartilage defects. *J Mater Chem B*, 2021, 9(6): 1686-1697.
- [71] Liu J, Yu C, Chen YF, et al. Fast fabrication of stable cartilage-like tissue using collagen hydrogel microsphere culture. *J Mater Chem B*, 2017, 5(46): 9130-9140.
- [72] Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(10): 584-594.
- [73] Choi SM, Lee KM, Ryu SB, et al. Enhanced articular cartilage regeneration with SIRT1-activated MSCs using gelatin-based hydrogel. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 866.
- [74] Chen AKL, Reuveny S, Oh SKW. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(7): 1032-1046.
- [75] Kim HJ, Park JM, Lee S, et al. *In situ* pocket-type microcarrier (PMc) as a therapeutic composite: regeneration of cartilage with stem cells, genes, and drugs. *J Control Release*, 2021, 332: 337-345.
- [76] Dorceumus DL, Kim HS, Nukavarapu SP. Gradient scaffold with spatial growth factor profile for osteochondral interface engineering. *Biomed Mater*, 2021, 16(3): 035021.

(本文责编 郝丽芳)