

· 综 述 ·

明胶微球在骨组织工程中的应用

翟远航, 李靖, 阿布都卡哈尔·阿不都艾尼, 杨子骄, 于芷若, 陈逸轩, 刘浩, 戎鑫*

四川大学华西医院骨科, 四川 成都 610041

翟远航, 李靖, 阿布都卡哈尔·阿不都艾尼, 杨子骄, 于芷若, 陈逸轩, 刘浩, 戎鑫. 明胶微球在骨组织工程中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3724-3737.

ZHAI Yuanhang, LI Jing, Abuduaini Abudukahaer, YANG Zijiao, YU Zhiruo, CHEN Yixuan, LIU Hao, RONG Xin. Application of gelatin microspheres in bone tissue engineering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3724-3737.

摘 要: 骨组织工程通过联合利用种子细胞、生物活性因子和支架材料等要素来构建骨组织再生微环境, 从而促进骨缺损的修复重建来诱导骨再生。明胶微球具有多孔性、生物降解性、生物相容性及生物安全性等优势, 是一种极具应用潜能的骨修复材料。明胶微球用于体外培养种子细胞时可实现高效扩增。多官能团结构使其可作为促血管再生因子、促骨再生因子及抗感染因子等多种药物的递送载体, 缓释药物的同时也可实现微球的多功能化。在构建明胶微球支架时与其他生物材料复合及血管化性能的赋予可提高支架材料的综合性能, 但目前支架的设计还存在如何兼顾材料多孔结构和力学性能的问题。本文主要综述了明胶微球的常见制备技术及其近年来在骨组织工程中的应用, 并对未来的发展前景进行展望。

关键词: 明胶微球; 制备方法; 骨组织工程; 骨修复; 细胞培养; 药物递送; 支架

Application of gelatin microspheres in bone tissue engineering

ZHAI Yuanhang, LI Jing, Abuduaini Abudukahaer, YANG Zijiao, YU Zhiruo, CHEN Yixuan, LIU Hao, RONG Xin*

Department of Orthopedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: Gelatin microspheres were discussed as a scaffold material for bone tissue engineering, with the advantages of its porosity, biodegradability, biocompatibility, and biosafety highlighted. This review discusses how bone regeneration is aided by the three fundamental components of bone tissue engineering—seed cells, bioactive substances, and scaffold materials—and how

资助项目: 国家自然科学基金(81902190)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81902190).

*Corresponding author. E-mail: rongxin@scu.edu.cn

Received: 2022-11-02; Accepted: 2023-06-22; Published online: 2023-06-29

gelatin microspheres can be employed for *in vitro* seed cell cultivation to ensure efficient expansion. This review also points out that gelatin microspheres are advantageous as drug delivery systems because of their multifunctional nature, which slows drug release and improves overall effectiveness. Although gelatin microspheres are useful for bone tissue creation, the scaffolds that take into account their porous structure and mechanical characteristics might be difficult to be created. This review then discusses typical techniques for creating gelatin microspheres, their recent application in bone tissue engineering, as well as possible future research directions.

Keywords: gelatin microspheres; preparation method; bone tissue engineering; bone repair; cell culture; drug delivery; scaffold

骨是一种可再生且高度血管化的组织,具有一定的愈合能力和重塑能力,但是当创伤、骨肿瘤切除等各种因素导致的骨缺损超过骨的修复能力时,其结构和功能常无法完全恢复,对此临床上常采用骨移植来进行治疗。据统计,我国每年的骨缺损患者已超过 600 万人,其中约有 400 万人需要进行骨移植手术^[1]。自体骨(如胫骨、髂骨)具备优良的骨诱导性和骨传导性,促进骨再生能力强,但会造成取骨区疼痛等并发症,且不适用于骨量低下的老年患者等;同种异体骨具有良好的骨传导能力,但存在免疫原性、疾病传染、费用高等问题,且来源有限,难以满足临床需求;人工骨通常用于配合自体骨或异体骨进行联合移植,以金属材料(镁、锌、钛及其合金等)、无机材料(磷酸钙类生物陶瓷等)、高分子材料(壳聚糖、海藻酸盐、聚己内酯和聚乳酸等)为主,但独立成骨能力有限。在迫切临床需求的驱动下,运用组织工程技术制备具有优良骨修复能力的骨替代物成为了当下骨组织工程领域的研究热点。

骨组织工程是一种利用生物学、材料科学、工程学等交叉学科知识和技术,通过模拟骨组织微环境,利用种子细胞、生物活性因子和支架材料等 3 大要素,诱导和促进骨再生的新型技术。骨组织工程涵盖了支架材料的设计、制备和表征,种子细胞的选择、扩增和定向分化,生物活性因子的筛选以及载体的制备和释放等方面。该技术已经被广泛应用于骨缺损修复、骨折愈合加速和骨肿瘤治疗等领域,并且具有良好的应用前

景^[2]。明胶是经胶原部分水解和热变性后得到的产物,具有无毒性、价格低廉、低免疫原性、良好的生物降解性和生物相容性等优势^[3]。以其为基础材料制备的明胶微球(gelatin microspheres, GMs)是一种微纳米尺度的球形粒子,药物或其他组分可分散在明胶基质内形成均相分散体系^[4],目前它在组织工程领域广泛应用于各种组织再生、药物和细胞递送的支架系统^[5]。结构上明胶具有 RGD 氨基酸序列 Arg-Gly-Asp (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸),可促进细胞在明胶微球表面黏附^[6];明胶侧链上还含有大量的羟基、羧基、氨基等官能团,使其能通过共价或非共价的方式接枝其他活性基团进行结构修饰,这是明胶微球功能化的基础^[7]。除此之外明胶微球还具有诸多优良特性:其多孔结构便于营养物质和代谢废物的转移;比表面积大可为细胞贴附提供充足空间^[8];可注射性使其能植入患者体内填补不规则的骨缺损区域^[9];还能够负载细胞或者生物活性因子来加速骨组织的修复再生^[10]。本文就目前明胶微球在骨组织工程方面的研究进展做一综述,主要介绍明胶微球的制备方法及其在骨缺损修复再生中的应用,并展望未来的发展前景,为未来骨缺损修复研究提供新的方向。

1 明胶微球的制备方法

(1) 喷雾干燥法:首先用雾化器将明胶溶液分散成小液滴,再经热空气干燥后收集粉末即可制得(图 1A)。该技术具有成球速度快、干燥时

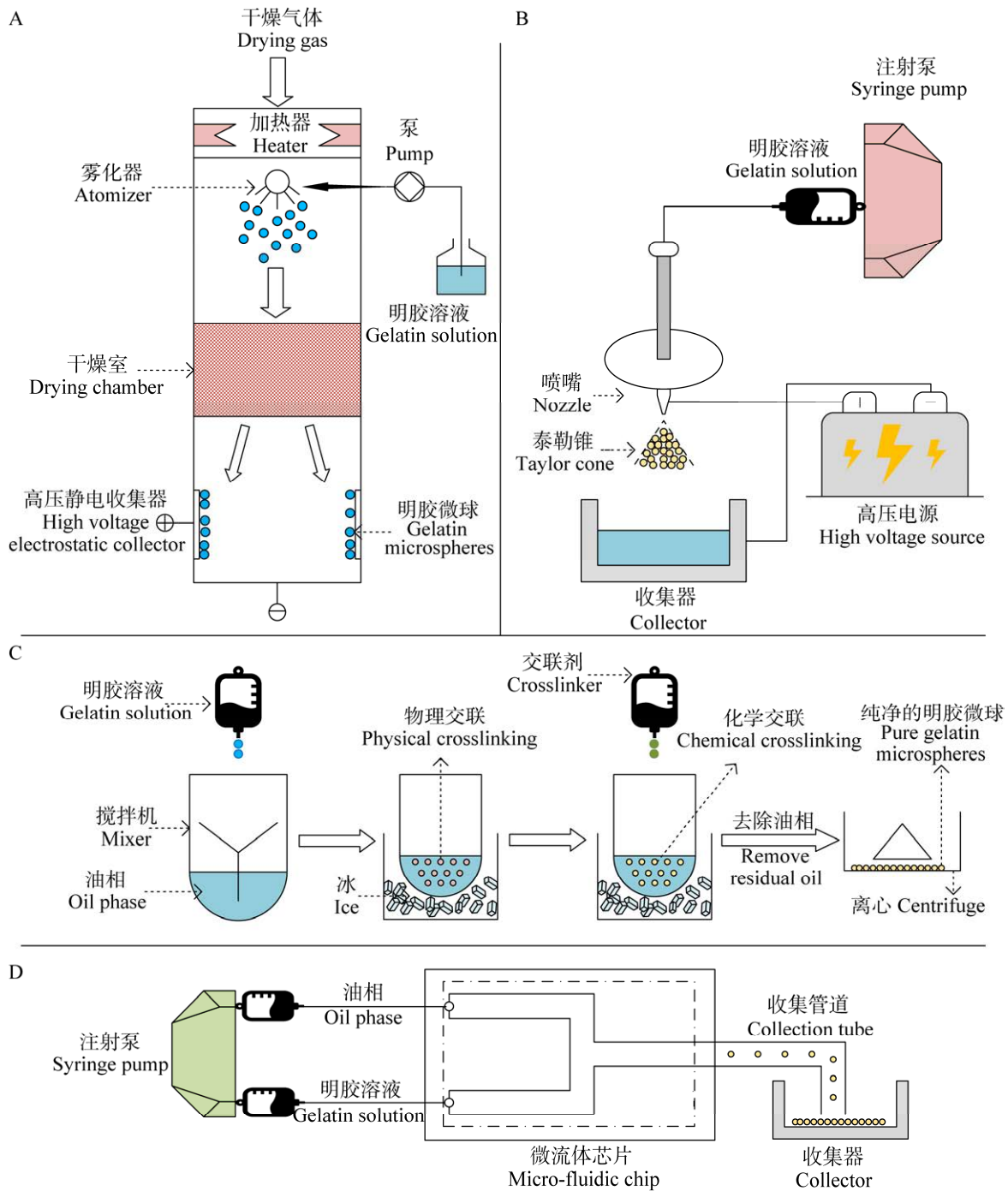


图1 明胶微球的制备方法 A: 喷雾干燥法. B: 电喷雾法. C: 油包水乳化法. D: 微流控法

Figure 1 Preparation methods of gelatin microspheres. A: Spray drying. B: Electrospray. C: Water-in-oil emulsion. D: Microfluidics fabrication.

间短、产品质量好的优点^[11]。且制备时可以同时处理大量的溶液，成本相对较低，适用于连续工业化生产^[12]。但所需设备容积大、热效率低；

且制备过程中温度较高，明胶易水解变性，也不适宜包埋温度敏感型药物^[13]。

(2) 电喷雾法：将高压电源的正极和负极分

别连接在金属喷嘴和收集器上,此时两者间可产生数千伏的电压差。药物溶液通过金属喷嘴后在强电场作用下会形成泰勒锥,之后锥体爆裂溶液射流破碎成小液滴^[14](图 1B)。该方法包封率在 80%以上,且可避免高温、高剪切速率以及过量的表面活性剂的影响^[15]。但存在微球易聚集、产率低、收集和纯化困难等不足^[16]。

(3) 油包水乳化法:将明胶溶液在搅拌下倒入含有乳化剂的油相中形成油包水型乳液,然后在冰浴中冷却(物理交联)或加入甲醛、戊二醛等化学试剂进行交联,再用异丙醇等洗涤去除油相,干燥处理后即可制得明胶微球^[17](图 1C)。物理交联往往缺乏热稳定性,而化学交联可同时提高热稳定性和机械性能^[18]。但此方法不适用于工业化生产^[19],且残留的油相、交联剂、表面活性剂若清除不净,其毒性作用会对人体造成伤害^[20]。

(4) 微流控法:在微米尺度的管道内处理微小体积流体,能连续、可控地制备分散性好、粒径均一和大小形态可调的明胶微球,直径多分布在 20–1 100 μm 的范围内^[21](图 1D)。但该技术生产效率低,难以满足工业化生产^[22]。

除上述方法外,另有研究采用冷冻干燥法^[17]、乳液-溶剂蒸发法^[23]、相分离法^[24]和反相悬浮交联法^[25]等制备粒径可控的明胶微球。制备工艺对明胶微球的形貌、孔径、孔隙率和载药量等均有较大影响,因此在实际应用中,需要根据药物的性质、作用部位和所需微球的结构特征等因素选用适宜的制备方法。

2 明胶微球的应用

2.1 种子细胞的培养

与传统的二维细胞培养方式相比,明胶微球具有诸多优点,已逐渐成为用于种子细胞培养和扩增的高效系统(图 2):(1) 多孔结构,比表面

积较大,可节约空间,便于大规模培养细胞^[26];(2) 可模仿体内细胞的 3D 生长微环境,细胞稳定性更高、存活时间更长^[27];(3) 无需胰蛋白酶消化可直接将装载细胞的微球注射到骨缺损部位,减少了消化和离心对细胞的损伤^[28];(4) 可以通过计算机自主监测和调整生物反应器中的培养条件(如罐压、温度、酸碱度、营养供应、搅拌速率及培养体积等参数^[29])。

应用于骨组织工程的种子细胞主要是从骨髓、脂肪等组织中分离出来的间充质干细胞,经体外培养扩增后移植到骨缺损部位,然后增殖分化为成骨细胞等,分泌类骨质并启动矿化,从而诱导骨再生^[30]。因此骨缺损的治疗效果在很大程度上取决于离体扩增种子细胞的质量。纳米纤维系统具有模拟细胞外基质的仿生结构,已被广泛用于构建人工干细胞龛,维持干细胞的存活、增殖、分化、形态稳定和体内外成熟^[31]。Sarviya 等^[32]结合利用相分离法和油包水乳液法制备明胶纳米纤维微球(nanofiber microspheres, NFM),在体外培养细胞 14 d 时发现 NFM 组的人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)的增殖率约是明胶固体表面微球(solid-surface microspheres, SM)组和商业微球(commercial microspheres, CM)组的 1.3 倍,而人牙囊干细胞和人牙龈成纤维细胞的增殖率则是 SM 组和 CM 组的 2–2.5 倍;且与 SM 组和 CM 组相比, NFM 组的碱性磷酸酶的表达量、成骨相关基因 *col 1* 和 *runx* 的表达量以及钙沉积量均更高,结果表明仿生 NFM 用于培养细胞时具有出色的促进黏附、增殖和成骨分化的能力,可作为体外干细胞扩增和体内干细胞移植的微载体。微囊化是一种快速发展的技术,能够实现细胞包封到微球中。Payne 等^[33]利用明胶微球包裹骨髓基质细胞,发现该微囊结构可减轻交联剂对细胞的毒性,保持细胞增殖活力。

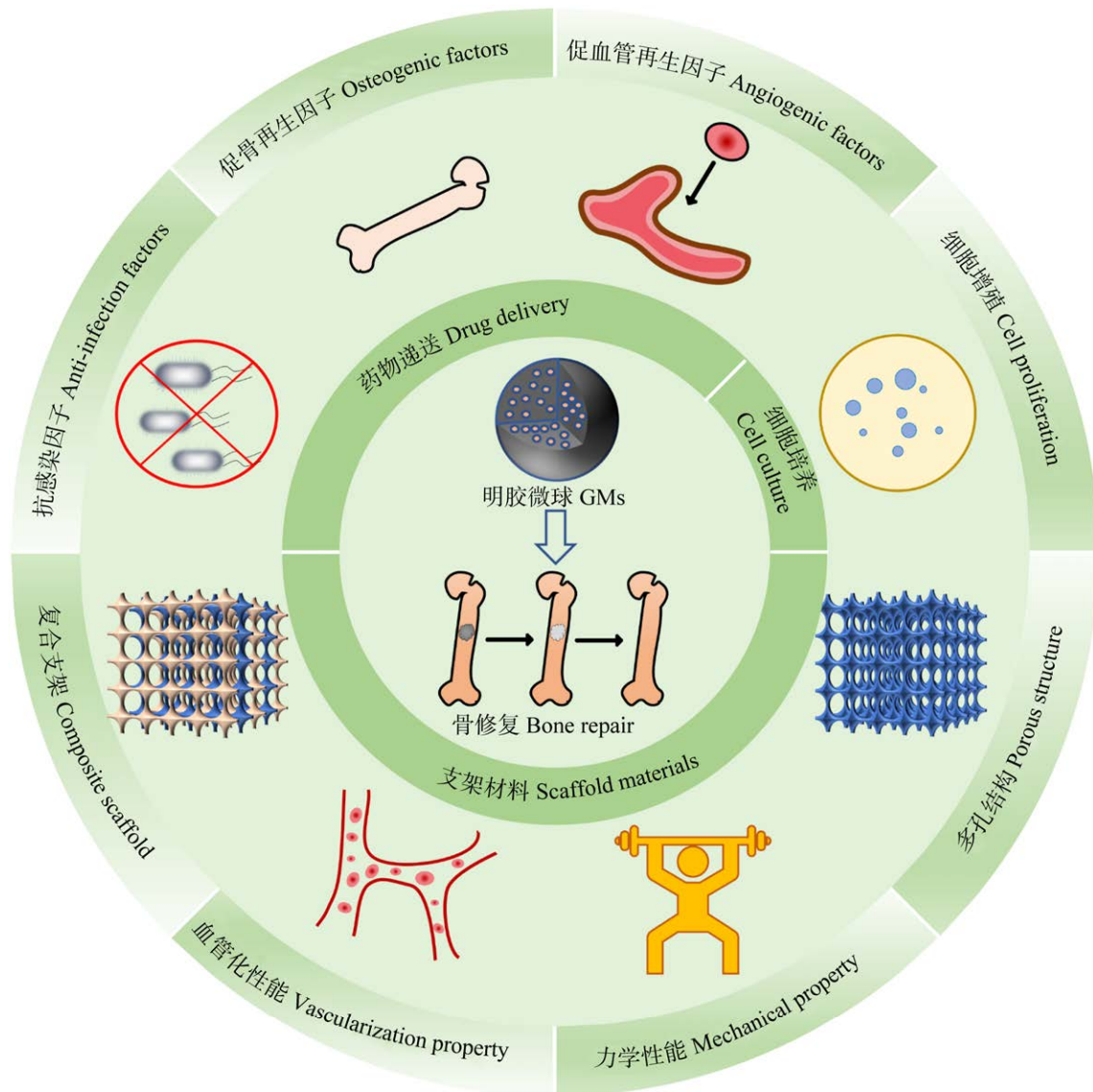


图2 明胶微球在骨组织工程中的应用

Figure 2 Applications of gelatin microspheres in bone tissue engineering.

微球培养细胞的效果受所用材料的理化性质和结构特征的影响。杨轩等^[34]在明胶微球支架上接种脂肪干细胞，体外培养 5 d 后使用共聚焦显微镜观察发现支架上细胞大量增殖且形态良好，验证了明胶材料与细胞之间良好的生物相容性。直径约 200 μm 的明胶微球往往具有较高的细胞黏附力^[35]。Yuan 等^[36]用甲基丙烯酰化明胶(gelatin methacryloyl, GelMA)结合乳液技术与

冷冻凝胶法制备了多孔的形状记忆凝胶微球(shape-memory cryogel microspheres, CMS)，体外实验发现与水凝胶微球相比，孔径为 $(15.5 \pm 6.0) \mu\text{m}$ 的 CMS 具有最佳的促进 BMSC 细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)黏附的能力，可保护细胞并使其能以高水平活性增殖 7 d，结果证明 CMS 具有良好的细胞亲和力。大孔径和高孔隙

率可增大微球的比表面积,便于细胞黏附和向内生长,而相互连接的孔道(大于 10 μm)则有利于营养素与代谢废物的交换^[37]。董作祥^[38]采用冷冻交联法制备出具有 2–70 μm 开放孔隙的多孔明胶微球(highly open porous gelatin microspheres, HOPG-MSs),接种 MC3T3-E1 小鼠胚胎成骨细胞后经 F-actin 染色发现,从第 7 天开始 HOPG-MSs 的整个空间内部充满细胞,表明其内部和表面的孔隙相互连接;体内实验发现与共价交联明胶微球相比,HOPG-MSs 内钙结节和碱性磷酸酶的含量更高,表明其相互连接的孔道可改善 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化,显著促进成骨细胞的再生。这些结果也显示出载有细胞的高度开放多孔明胶微球在修复骨缺损方面的巨大潜力。

2.2 用作缓释药物的载体

明胶微球的多官能团结构使其能通过共价或非共价的方式整合负载多种“药物”,包括离子、药物分子、生长因子等。这使其在作为多功能药物递送系统方面具有巨大潜力,相较于传统给药方式还具有以下优点:(1) 可靶向治疗特定的病变部位,减轻对正常组织的毒副作用^[39];(2) 缓释药物,通过调控释药曲线可精确控制药物释放^[40];(3) 可提高载药量和药物包封率^[41];(4) 可保护相关药物免受酶等物质的化学降解,提高药物的稳定性并延长药物的半衰期^[42]。目前明胶微球负载的药物依据功能可分为促血管再生因子、促骨再生因子和抗感染因子 3 类(图 2)。

2.2.1 促血管再生因子

研究较多的促血管生长因子包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)及血管生

成素(angiotensin, Ang)等。生长因子有两种应用方式:一是通过官能团接枝或物理混合的方式与明胶微球结合;二是在明胶微球上接种可分泌生长因子的细胞(包括基因工程改造细胞)。Luo 等^[43]将载 Li/VEGF 的明胶微球与聚磷酸钙(calcium polyphosphate, CPP)支架复合,与 Li/PPP 支架相比,在体外其可明显促进 BMSC 细胞的增殖、成骨分化与血管生成;在植入兔体内 12 周时缺损区域可见更多的血管和新生骨,表明 VEGF 具有优良的成血管和诱导骨再生的性能。超顺磁性壳聚糖质粒明胶微球(superparamagnetic chitosan plasmid gelatin microspheres, SPCPGMs)在静磁场或振荡磁场作用下,可释放出带正电的壳聚糖质粒化合物,通过与带负电的细胞膜结合促使质粒进入细胞,然后通过质粒上携带的生长因子(如 VEGF、FGF 等)基因的表达来促进血管生成^[44]。丁幸坡等^[45]制备的 SPCPGMs-FGF2 在间充质干细胞内可表达释放大量具有生物活性的 FGF-2,能够显著促进间充质干细胞增殖且无细胞毒作用,表明其是理想的基因载体和封装材料。Chen 等^[44]利用 SPCPGMs-VEGF 填充纳米羟基磷灰石/聚酰胺支架,将复合物植入兔桡骨缺损模型中 6 周后在骨缺损处发现大量新生血管。两项研究结果表明携带生长因子基因的 SPCPGMs 有望成为实现缺损区域骨替代物血管化的新策略。在骨支架内掺杂镁、锌、钪、钛和钇等金属元素也可使其表现出优良的成血管性能^[46–47]。Zhao 等^[48]在 GelMA 微球上接枝双磷酸盐使其具有优良的 Mg^{2+} 捕获性能, Mg^{2+} 可通过激活 e-NOS 和 VEGF 信号通路促进血管再生,利用该复合微球在体外培养 HUVECs 细胞 24 h 后发现 VEGF 和 e-NOS 的表达水平高,可显著刺激内皮细胞增殖,体内实验中载 Mg^{2+} 支架组的松质骨再生量大于不含 Mg^{2+} 的支架,此研究可为基于金属离子治疗骨质疏松性骨缺损提供

新思路。富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)内含有 VEGF、TGF- β 、PDGF 和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等多种细胞因子,可促进局部成骨和血管生成,因此被广泛用于骨缺损修复^[49]。Liu 等^[50]构建了一种新型聚己内酯/ β -磷酸三钙/PRP/明胶微球支架,接种 BMSC 细胞后植入大鼠股骨缺损处,结果发现钙结节生成量和新生血管数比不含 PRP 组更多,第 12 周时骨体积分数可达 41.33% \pm 11.14%,表现出优异的成骨成血管能力。

2.2.2 促骨再生因子

常用的促骨再生因子包括神经肽[P 物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)等]、生长因子(PDGF、BMP-2、TGF- β 、bFGF 和 IGF-1 等)、纳米碳材料[碳点和氧化石墨烯(graphene oxide, GO)]以及镁(Mg²⁺)和锶(Sr²⁺)等金属离子。刘伟等^[51]制备负载 CGRP 及 SP 的明胶缓释微球,发现不同浓度的 CGRP 及 SP 均能有效地促进骨质疏松性兔骨缺损的成骨,提高骨小梁数量,且在研究范围内浓度越大成骨效果越好。Tajima 等^[52]用油包水乳化法制备明胶微球并负载 BMP-2,培养 MC3T3-E1 细胞 21 d 后发现该组的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性和钙含量均高于游离 BMP-2 组,表明 GM/BMP-2 能增强细胞的成骨分化。Lu 等^[53]构建 BMP-2/GO/钛支架,植入体内 3 个月后 ALP 活性检测结果显示该支架内有 25%的骨沉积,而纯钛支架中没有骨组织沉积,表明 GO/BMP-2 具有优良的促骨再生能力。Luo 等^[23]将负载人参皂苷(ginsenoside Rg1, Rg1)的明胶微球掺入锶-硫酸钙半水合物(strontium-calcium sulfate hemihydrate, Sr- α -CaS)支架中,培养 MC3T3-E1 细胞 21 d 后发现浸出液中 ALP 活性随时间逐渐升高;将复合支架移植入大鼠颅骨缺损模型内,在 12 周时通过 micro-

CT 发现 Rg1/GM/Sr- α -CaS 组比 Sr- α -CaS 组和 Rg1/Sr- α -CaS 组形成更多的新生骨,结果表明 Rg1 和 Sr 的协同作用具有较强的骨修复和再生效果。

2.2.3 抗感染因子

明胶微球与金属纳米粒子复合后可提高其抗菌性能,大幅度避免植骨区感染的发生。Fuentes 等^[54]利用明胶、壳聚糖与铜纳米颗粒混合制备活性杂化微球,实验发现其抗菌性能比明胶/壳聚糖基质更优,在液体培养基中含有 40 mg Cu 的杂交微球对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)增殖的抑制率分别为 56%和 40%;在固体培养基中,抑制作用分别为液体培养基中的 2.5 倍和 2.6 倍,证明了铜纳米颗粒在组织再生中的抗感染潜力。

以明胶微球为载体缓释抗生素在骨缺损治疗抗感染方面也有广泛研究。Lu 等^[53]发现明胶微球可保持万古霉素(vancomycin, Van)的生物活性,且体外培养 3 d 时载 Van 骨支架组表皮链球菌悬浮液的光密度小于不含 Van 的支架,表明其可抑制表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)的增殖,为体内骨缺损修复提供良好的免疫微环境,最终载 Van 骨支架上有 25%的骨沉积。另外,实现明胶微球内生长因子的分层分布,使其均匀可控地释放,可进一步优化明胶微球的生物学性能。Chen 等^[17]将硫酸庆大霉素(gentamicin sulfate, GS)/阿仑磷酸钠(alendronate, ALN)双负载的明胶微球掺入聚甲基丙烯酸甲酯骨水泥内(该复合物简称 GAPBC),药物释放实验表明在前 24 h 以 GS 释放为主,3 周后以 ALN 释放为主;在抗菌实验中 GAPBC 对金黄色葡萄球菌(*staphylococcus aureus*)和大肠杆菌的抑制区直径也明显大于普通水泥组,表现出优良的抗菌性能。GAPBC 代表了一种极具应用潜能的药物载体,通过药物的

分级分布可实现 GS 和 ALN 的顺序递送, GS 分布在明胶微球的外层以快速释放, 迅速达到最小抑菌浓度以防止骨科感染; 而 ALN 分布在内部以持续释放, 为骨缺损提供长期修复治疗。

2.3 用于构建骨组织工程支架

理想的骨组织工程支架, 不应只采用单一材料或只考虑单一特性, 而应从微观结构、物理和化学性质等多个方面出发来使其结构和功能更接近自然骨, 如将明胶微球与金属、无机或有机材料复合, 以提升支架的综合性能。作为新生骨组织的载体, 支架还需具有出色的生物学特性, 如多孔结构、优良的力学性能和血管化性能等, 以使得其在植入缺损部位后能为种子细胞增殖、成骨分化、血管形成以及骨组织再生提供良好的环境(图 2)。

2.3.1 复合支架

明胶微球支架可与大部分有机材料和无机材料复合, 复合改性后的新支架能够兼具各组分材料的优良特性, 弥补明胶单一应用时力学性能较差、成型困难、降解过快等不足。Huda 等^[55]采用水包油乳液溶剂蒸发法制备明胶/聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 复合微球, 复合后微球的稳定性得到提高, 实验发现 PCL 与明胶的比例在 5:1 到 1:1 间时粒径分布更均匀, 还可加入聚乙烯吡咯烷酮提高微球表面的光滑度。辛宗泽^[56]制备壳聚糖-明胶微球支架, 弥补了明胶自身空间稳定性较差和细胞亲和力相对较弱等缺陷, 体外试验中成骨细胞在支架上增殖状况良好, 实时荧光定量 PCR 显示复合支架中成骨标志物 COL1 mRNA 的表达量比空白组更高, 结果表明该支架具有较强的促成骨效应。Nezafati 等^[57]通过将明胶微球与磷酸钙骨水泥复合, 赋予其促进成骨细胞矿化的功能并提升抗压强度, 实验发现该复合支架可加速纳米羟基磷灰石的形成, 有效诱导骨组织再生。Yu 等^[58]构建柚皮苷/明胶微

球/纳米羟基磷灰石/丝素蛋白(naringin/gelatin microspheres/nanohydroxyapatite/silkfibroin, NG/GMs/nHA/SF)复合支架, 其力学强度明显大于不含 nHA 的支架; 且具有良好的生物相容性, 能显著促进 BMSC 细胞的黏附、增殖和钙结节形成, 在体外表现出比 SF 组、nHA/SF 组和 NG/nHA/SF 组更强的成骨分化性能; 由于 GMs 对 NG 的持续释放该复合支架的骨诱导效应更强, 在植入大鼠椎体缺损模型 16 周后损伤部位几乎完全填充新生骨组织, 表明该复合支架具有作为骨缺损修复材料的潜力。目前由明胶微球与生物活性玻璃构建的复合骨支架材料备受关注。生物活性玻璃的加入增强了明胶微球支架的力学性能、生物活性以及再生潜力, 通过调节明胶层可以更好地控制钙、硅、磷酸根等离子的释放速率, 从而影响细胞的增殖、分化和矿化等功能^[59]。Kim 等^[60]用明胶微球封装掺锌生物活性玻璃, 利用动态光散射评估发现复合微球的粒径集中分布在 10–100 μm 之间, 可有效促进骨组织再生。

2.3.2 多孔结构与力学性能

支架的孔隙率、孔径大小和机械强度在骨组织重建方面起着至关重要的作用。支架材料内的大量孔隙可增大比表面积, 便于细胞黏附增殖; 而大孔径可以通过促进细胞迁移增殖、细胞间网络形成、血管长入、营养供应和代谢废物扩散来加速成骨^[61]。Lu 等^[62]以明胶微球为致孔剂, 构建具有相互连接的孔隙结构的蜂窝状 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)支架, 体内评估结果表明该支架骨再生能力良好, 术后 12 周时 uhTCP 组和 ihTCP 组骨缺损部位均被大量新生骨组织填充(分别为 $33.43\% \pm 3.75\%$ 和 $67.33\% \pm 5.73\%$)。该支架较高的孔隙率虽然可加快降解速率和促进骨修复, 但也会导致机械强度随之下降。正常人体内骨小梁的抗压强度为

2–12 MPa, 皮质骨的抗压强度为 100–230 MPa^[63]。骨支架的机械强度应满足骨缺损修复的临界力学要求, 保证在植入人体后能承受周围组织器官的挤压, 以及大量细胞的黏附增殖和骨基质的沉积产生的环境应力。厉孟等^[64]将明胶微球作为磷酸钙骨水泥(calcium phosphate cement, CPC)致孔剂, 在氯化钠中浸泡 3 周后发现 GM/CPC 组的孔隙率和大孔率均高于 CPC 组, 但 GM/CPC 组的最大压缩强度(7.8±1.2) MPa 低于 CPC 组(11.2±1.6) MPa。结果也表明支架的孔隙率与机械强度之间存在着一定的反比关系, 随着孔径和孔隙率的增大, 支架的机械强度会逐渐下降, 因此支架材料的大孔径和高孔隙率应有一定限度。黎开谷^[65]对多孔 GM/CPC 支架的研究同样证实这一观点, 还发现 GMs 质量分数为 7.5% 的支架最终具备较好的孔隙率(62.3%±0.72%)、大孔率(30.1%±0.56%)和力学强度(6.1±0.24) MPa, 体内实验 12 周时植入的多孔 GMs/CPCs 支架表面及内部均可见大量新生骨组织, 而 CPC 组只有支架表面可见组织生长, 内部无新骨长入。虽然 GMs 质量分数为 7.5% 的 GMs/CPC 支架的机械强度较骨皮质低, 但结果表明其已是非负重部位(如颅骨)较为理想的骨修复材料。由于孔径、孔隙率和机械强度之间的相关性, 3 个参数难以找到最佳平衡, 目前具有适当孔径、孔隙率和机械强度的支架的设计仍然是一大挑战。

2.3.3 血管化性能

骨支架内部如何快速形成功能化血管网络是骨组织工程的关键挑战之一。细胞在支架材料表面黏附生长并再生新的骨组织, 此过程需要血管中的血液来提供营养物质并清除代谢废物。而体内细胞与毛细血管网距离超过 200 μm 时就难以保证充足的氧气和营养供应^[30,66], 此时其养分的供给只能通过效果较差的物理渗透作用来实现。尤其是在修复大块骨缺损时, 支架中心部位

的组织细胞就会因缺血缺氧而坏死。

向骨缺损区域输送氧气是有望增强种子细胞在缺氧区域存活的策略之一^[67]。Paciello 等^[68]发现血红蛋白和明胶微球结合后能够在 3D 细胞培养的早期阶段作为储氧库持续释放氧气, 有效维持细胞活力; 植入体内后同样可向缺损区域输送氧气, 直至新血管网络生成。Wang 等^[69]将 CaO₂/明胶微球、海藻酸钠/明胶水凝胶、聚己内酯/纳米羟基磷灰石多孔支架复合, 体外实验发现该复合支架可以持续 19 d 释放氧气, 显著提升干细胞存活率, 适用于极端缺氧(1% O₂)环境; 且与不含 CaO₂/明胶微球的支架相比, 复合微球产氧支架在植入进兔股骨头坏死模型第 4 周时诱导产生的血管数量更多, 且在第 4 周和 12 周时均有更多的新骨组织生成, 结果表明该氧缓释复合支架是一种兼具优良的成骨成血管特性的骨修复材料。

细胞疗法在促进组织工程骨血管化方面也具有巨大的潜力。Saberianpour 等^[70]研究发现海藻酸-明胶微球和 BMSC 细胞的联合作用可增强内皮祖细胞的血管生成潜能, 证明联合应用内皮祖细胞可促进血管化。Yuan 等^[36]制备多孔的形状记忆凝胶微球(porous shape-memory cryogel microspheres, CMS), 装载 BMSCs/HUVECs 细胞后皮下注射到裸鼠中, 2 个月后可发现 BMSCs/HUVECs/CMS 组比 CMS 组有更多的新血管生成, 且具有高水平 OCN 和 CD31 的血管化骨样组织成熟度更高, 表现出较强的体内成骨成血管能力。Wang 等^[71]制备化学交联明胶微球聚集体支架(cross-linked gelatin microsphere aggregates, C-GMS), 体外共培养人主动脉内皮细胞和 MC3T3-E1 细胞 21 d 后, 通过免疫组化分析发现与不负载干细胞的明胶水凝胶组相比, C-GMS 组的 CD31 和 VEGF 的表达水平更高, 可形成内皮化的骨样结构, 裸鼠的皮下实验结果

也显示 C-GMS 组毛细血管的密度更大, 表明其可有效促进骨缺损处血管生成; 填充裸鼠股骨缺损第 50 天时, 新生骨完全覆盖 C-GMS 组的缺损区域, 且与周围宿主骨组织完美融合, 表明 C-GMS 支架具有优良的骨整合能力。这些发现均表明基于可注射明胶微球的干细胞递送策略, 在实现功能性血管再生与骨缺损修复方面具有可观的应用前景。

3 小结与展望

目前关于明胶微球及其支架的研究仍然处于初级阶段, 大多数都是在改性修饰和制备技术等方面进行探索, 通常只短期评估了其促进细胞黏附、增殖、分化和矿化等方面的性能, 以及支架的机械强度、抗感染性、血管化等各种性能的优劣, 未评估长期植入后骨支架是否依然存活, 及骨组织是否完全再生恢复, 也很少讨论不同制造技术的临床适用性。而随着材料科学与骨组织工程学的发展, 对明胶微球的结构特征、力学性能、生物活性等各方面的要求必然会越来越高, 因此还需进一步地深入研究。未来如何模仿天然骨内部结构对明胶微球进行仿生优化, 制备出骨修复性能更加优良的支架材料已成为骨组织工程发展的重要目标。在研发过程中科研人员还要注意结合多学科知识和临床实际需求, 保证骨修复材料的可行性与临床适用性, 以便尽快用于临床骨缺损的修复。

REFERENCES

- [1] 王子瑞, 朱金亮, 何志敏, 宋天喜, 崔孟龙, 崔云, 胡艳丽, 胡刚, 仇志焯. 人工合成骨修复材料的临床应用及展望[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2021, 18(4): 8-17.
WANG ZR, ZHU JL, HE ZM, SONG TX, CUI ML, CUI Y, HU YL, HU G, QIU ZY. Clinical applications and future prospects development trends of artificial bone graft substitutes[J]. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2021, 18(4): 8-17 (in Chinese).
- [2] ZHAO J, ZHOU YH, ZHAO YQ, GAO ZR, OUYANG ZY, YE Q, LIU Q, CHEN Y, TAN L, ZHANG SH, FENG Y, HU J, DUSENGE MA, FENG YZ, GUO Y. Oral cavity-derived stem cells and preclinical models of jaw-bone defects for bone tissue engineering[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2023, 14(1): 1-20.
- [3] WEI BG, WANG WR, LIU XY, XU CX, WANG YN, WANG ZQ, XU JN, GUAN JZ, ZHOU PH, MAO YJ. Gelatin methacrylate hydrogel scaffold carrying resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for enhancement of osteogenic differentiation of BMSCs and effective bone regeneration[J]. Regenerative Biomaterials, 2021, 8(5): rbab044.
- [4] KARAN S, DEBNATH S, KUOTSU K, CHATTERJEE TK. *In-vitro* and *in-vivo* evaluation of polymeric microsphere formulation for colon targeted delivery of 5-fluorouracil using biocompatible natural gum katira[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 922-936.
- [5] SABZI E, ABBASI F, GHALEH H. Interconnected porous nanofibrous gelatin scaffolds prepared via a combined thermally induced phase separation/particulate leaching method[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2021, 32(4): 488-503.
- [6] WEISS AV, FISCHER T, ITURRI J, BENITEZ R, TOCA-HERRERA JL, SCHNEIDER M. Mechanical properties of gelatin nanoparticles in dependency of crosslinking time and storage[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 175: 713-720.
- [7] SABER MM. Strategies for surface modification of gelatin-based nanoparticles[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 183: 110407.
- [8] WU L, XU YC, XI K, GU Y, TANG JC, XIN TW, YANG HL, WANG LJ, CUI WG, CHEN L. Regulation of macrophage subtype via injectable micro/nano-structured porous microsphere for reprogramming osteoimmune microenvironment[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 439: 135692.
- [9] YANG Y, HUANG CY, ZHENG HM, MENG ZQ, HENG BC, ZHOU TF, JIANG SJ, WEI Y. Superwetable and injectable GelMA-MSC microspheres promote cartilage repair in temporomandibular joints[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1026911.
- [10] KUDVA AK, DIKINA AD, LUYTEN FP, ALSBERG E,

- PATTERSON J. Gelatin microspheres releasing transforming growth factor drive *in vitro* chondrogenesis of human periosteum derived cells in micromass culture[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 90: 287-299.
- [11] ZHANG ZL, LI LJ, SUN D, WANG M, SHI JR, YANG D, WANG LH, ZOU SC. Preparation and properties of chitosan-based microspheres by spray drying[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(4): 1933-1941.
- [12] ZIAEE A, ALBADARIN AB, PADRELA L, FEMMER T, O'REILLY E, WALKER G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: critical parameters and experimental process optimization approaches[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 127: 300-318.
- [13] SALEM A, FAKHFAKH N, JRIDI M, ABDELHEDI O, NASRI M, DEBEAUFORT F, ZOUARI N. Microstructure and characteristic properties of dogfish skin gelatin gels prepared by freeze/spray-drying methods[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1-10.
- [14] LIU Z, YE WL, ZHENG JC, WANG QD, MA GW, LIU HY, WANG XM. Hierarchically electrospaying a PLGA@chitosan sphere-in-sphere composite microsphere for multi-drug-controlled release[J]. *Regenerative Biomaterials*, 2020, 7(4): 381-390.
- [15] 李远晴, 赵锋, 马银玲, 刘红星, 殷殿书. 电喷雾技术在微粒制备中的进展[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(10): 965-971.
- LI YQ, ZHAO F, MA YL, LIU HX, YIN DS. Progress in application of electrospay technology in preparation of microparticles[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2022, 31(10): 965-971 (in Chinese).
- [16] 刘红星, 赵锋, 马银玲, 王仪琛, 曹德英. 电喷雾技术在制备载药聚酯微球中的研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(6): 794-800.
- LIU HX, ZHAO F, MA YL, WANG YC, CAO DY. Research progress of electrospay technology in preparation of drug-loaded polyester microspheres[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2022, 53(6): 794-800 (in Chinese).
- [17] CHEN L, TANG YF, ZHAO K, ZHA X, WEI M, TAN QC, WU ZX. Sequential release of double drug (graded distribution) loaded gelatin microspheres/PMMA bone cement[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(2): 508-522.
- [18] DONG ZX, MENG XY, YANG W, ZHANG JF, SUN P, ZHANG HW, FANG X, WANG DA, FAN CJ. Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 122: 111949.
- [19] NOURI-FELEKORI M, KHAKBIZ M, NEZAFATI N, MOHAMMADI J, ESLAMINEJAD MB. Comparative analysis and properties evaluation of gelatin microspheres crosslinked with glutaraldehyde and 3-glycidoxypolytrimethoxysilane as drug delivery systems for the antibiotic vancomycin[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 557: 208-220.
- [20] LIU Y, CHEONG NGS, YU J, TSAI WB. Modification and crosslinking of gelatin-based biomaterials as tissue adhesives[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 174: 316-323.
- [21] XIE MJ, YU K, SUN Y, SHAO L, NIE J, GAO Q, QIU JJ, FU JZ, CHEN ZC, HE Y. Protocols of 3D bioprinting of gelatin methacryloyl hydrogel based bioinks[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(154).
- [22] RUAN L, SU MR, QIN XY, RUAN QT, LANG W, WU MH, CHEN YJ, LV QZ. Progress in the application of sustained-release drug microspheres in tissue engineering[J]. *Materials Today Bio*, 2022, 16: 100394.
- [23] LUO P, YU L, LIN Q, WANG CD, YANG DZ, TANG S. Strontium modified calcium sulfate hemihydrate scaffold incorporating ginsenoside Rg1/gelatin microspheres for bone regeneration[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 888.
- [24] BASU SK, KAVITHA K, RUPESHKUMAR M. Evaluation of ionotropic cross-linked chitosan/gelatin B microspheres of tramadol hydrochloride[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(1): 28-34.
- [25] ZHANG LP, LIU M, QI T, ZHOU HL, NI CH. Preparations and properties of drug-eluting embolization microspheres based on modified gelatin[J]. *Soft Materials*, 2018, 16(2): 117-125.
- [26] ZHANG YY, CHEN H, LI JS. Recent advances on gelatin methacrylate hydrogels with controlled microstructures for tissue engineering[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 221: 91-107.
- [27] ZHANG J, XU WJ, LI CC, MENG FQ, GUAN YJ, LIU XZ, ZHAO J, PENG J, WANG Y. Tissue engineering microtissue: construction, optimization, and application[J]. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2022, 28(2): 393-404.
- [28] JOHN JV, CHOKSI M, CHEN SX, BODA SK, SU YJ, MCCARTHY A, TEUSINK MJ, REINHARDT RA,

- XIE JW. Tethering peptides onto biomimetic and injectable nanofiber microspheres to direct cellular response[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, 22: 102081.
- [29] HE QL, ZHANG JW, LIAO YG, ALAKPA EV, BUNPETCH V, ZHANG JY, OUYANG HW. Current advances in microsphere based cell culture and tissue engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107459.
- [30] WU V, HELDER MN, BRAVENBOER N, TEN BRUGGENKATE CM, JIN JF, KLEIN-NULEND J, SCHULTEN EAJM. Bone tissue regeneration in the oral and maxillofacial region: a review on the application of stem cells and new strategies to improve vascularization[J]. *Stem Cells International*, 2019, 2019: 1-15.
- [31] WANG L, WU YB, HU TL, MA PX, GUO BL. Aligned conductive core-shell biomimetic scaffolds based on nanofiber yarns/hydrogel for enhanced 3D neurite outgrowth alignment and elongation[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 96: 175-187.
- [32] SARVIYA N, BASU SM, MANI R, CHAUHAN M, KINGSHOTT P, GIRI J. Biomimicking nanofibrous gelatin microspheres recreating the stem cell niche for their *ex-vivo* expansion and *in-vivo* like differentiation for injectable stem cell transplantation[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 139: 212981.
- [33] PAYNE RG, YASZEMSKI MJ, YASKO AW, MIKOS AG. Development of an injectable, *in situ* crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(22): 4359-4371.
- [34] 杨轩, 孟昊业, 刘伟, 鲁长风, 全琦, 孙逊, 卫光星, 杜亚楠, 彭江, 汪爱媛. 多孔明胶微球对大鼠脂肪干细胞生物相容性实验[J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39(4): 340-343, 348.
YANG X, MENG HY, LIU W, LU CF, QUAN Q, SUN X, WEI GX, DU YN, PENG J, WANG AY. Biocompatibility of a novel cell microcarrier composed of porous gelatin microspheres in ADSCs of rats[J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2018, 39(4): 340-343, 348 (in Chinese).
- [35] CHEN MQ, WANG X, YE ZY, ZHANG Y, ZHOU Y, TAN WS. A modular approach to the engineering of a centimeter-sized bone tissue construct with human amniotic mesenchymal stem cells-laden microcarriers[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(30): 7532-7542.
- [36] YUAN ZY, YUAN XJ, ZHAO YM, CAI Q, WANG Y, LUO RC, YU S, WANG YY, HAN JM, GE LH, HUANG JY, XIONG CY. Injectable GelMA cryogel microspheres for modularized cell delivery and potential vascularized bone regeneration[J]. *Small*, 2021, 17(11): 2006596.
- [37] DONG ZX, FAN CJ, DENG WS, SUN P. Porous gelatin microsphere-based scaffolds containing MC3T3-E1 cells and calcitriol for the repair of skull defect[J]. *Biomaterials Advances*, 2022, 138: 212964.
- [38] 董作祥. 具有 MC3T3-E1 细胞的高度开放的多孔明胶微球用于修复颅骨缺损研究[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文.
DONG ZX. Study on highly open porous gelatin microspheres with MC3T3-E1 cells for repairing skull defects[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University (in Chinese).
- [39] NAKAS A, DALATSI AM, KAPOURANI A, KONTOGIANNOPOULOS KN, ASSIMOPOULOU AN, BARMPALEXIS P. Quality risk management and quality by design for the development of diclofenac sodium intra-articular gelatin microspheres[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21(4): 1-17.
- [40] DATTA S, RAMESHBABU AP, BANKOTI K, JANA S, ROY S, SEN R, DHARA S. Microsphere embedded hydrogel construct-binary delivery of alendronate and BMP-2 for superior bone regeneration[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(34): 6856-6869.
- [41] SZEKALSKA M, CITKOWSKA A, WRÓBLEWSKA M, WINNICKA K. The impact of gelatin on the pharmaceutical characteristics of fucoidan microspheres with posaconazole[J]. *Materials*, 2021, 14(15): 4087.
- [42] ZENG YW, HUANG C, DUAN DM, LOU AJ, GUO Y, XIAO TH, WEI JG, LIU S, WANG Z, YANG QH, ZHOU L, WU ZH, WANG L. Injectable temperature-sensitive hydrogel system incorporating deferoxamine-loaded microspheres promotes H-type blood vessel-related bone repair of a critical size femoral defect[J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 153: 108-123.
- [43] LUO Y, LI DH, XIE XW, KANG PD. Porous, lithium-doped calcium polyphosphate composite scaffolds containing vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin microspheres for treating glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomedical Materials*, 2019, 14(3): 035013.

- [44] CHEN T, XIE LN, WANG CX, LUO C, YANG XL, HUANG T, AN H. Orthogonal test design for the optimization of superparamagnetic chitosan plasmid gelatin microspheres that promote vascularization of artificial bone[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2020, 108(4): 1439-1449.
- [45] 丁幸坡, 李明, 曹豫江, 杨琼, 何通川, 罗聪, 李海冰, 毕杨. 质粒 FGF-2 磁性壳聚糖明胶微球对间充质干细胞增殖分化的影响[J]. *生物医学工程学报*, 2015, 32(5): 1083-1089.
- DING XP, LI M, CAO YJ, YANG Q, HE TC, LUO C, LI HB, BI Y. Effect of plasmid FGF-2 magnetic chitosan gelatin microspheres on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2015, 32(5): 1083-1089 (in Chinese).
- [46] AUGUSTINE R, DALVI YB, YADU NATH VK, VARGHESE R, RAGHUVVEERAN V, HASAN A, THOMAS S, SANDHYARANI N. Yttrium oxide nanoparticle loaded scaffolds with enhanced cell adhesion and vascularization for tissue engineering applications[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 103: 109801.
- [47] AUGUSTINE R, HASAN A, PATAN NK, AUGUSTINE A, DALVI YB, VARGHESE R, UNNI RN, KALARIKKAL N, AL MOUSTAFA AE, THOMAS S. Titanium nanorods loaded PCL meshes with enhanced blood vessel formation and cell migration for wound dressing applications[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2019, 19(7): 1900058.
- [48] ZHAO ZY, LI G, RUAN HT, CHEN KY, CAI ZW, LU GH, LI RM, DENG LF, CAI M, CUI WG. Capturing magnesium ions *via* microfluidic hydrogel microspheres for promoting cancellous bone regeneration[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8): 13041-13054.
- [49] LANG S, LOIBL M, HERRMANN M. Platelet-rich plasma in tissue engineering: hype and hope[J]. *European Surgical Research*, 2018, 59(3/4): 265-275.
- [50] LIU C, PENG ZY, XU HX, GAO HL, LI JJ, JIN YL, WANG YH, WANG CQ, LIU Y, HU YT, JIANG C, GUO JS, ZHU LX. 3D printed platelet-rich plasma-loaded scaffold with sustained cytokine release for bone defect repair[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2022, 28(15/16): 700-711.
- [51] 刘伟, 陈杰, 胡开进, 张林林, 丁宇翔. 负载 CGRP 及 SP 的明胶缓释微球用于修复家兔骨质疏松模型骨缺损的研究[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(3): 228-233.
- LIU W, CHEN J, HU KJ, ZHANG LL, DING YX. Sustain-released gelatin microspheres loaded with CGRP/SP for repairing bone defect of osteoporosis rabbits[J]. *Journal of Oral Science Research*, 2016, 32(3): 228-233 (in Chinese).
- [52] TAJIMA S, TABATA Y. Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres containing bone morphogenic protein-2 with different degradabilities[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2018, 29(7/8/9): 775-792.
- [53] HAN L, SUN HL, TANG PF, LI PF, XIE CM, WANG MH, WANG KF, WENG J, TAN H, REN FZ, LU X. Mussel-inspired graphene oxide nanosheet-enwrapped Ti scaffolds with drug-encapsulated gelatin microspheres for bone regeneration[J]. *Biomaterials Science*, 2018, 6(3): 538-549.
- [54] FUENTES S, ALVIÑA R, ZEGARRA K, PÉREZ B, POZO P. Antibacterial activities of copper nanoparticles in hybrid microspheres[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2019, 19(8): 4512-4519.
- [55] HUDA MK, DAS PP, BARUAH SD, SAIKIA PJ. Polycaprolactone-blended gelatin microspheres and their morphological study[J]. *Journal of Polymer Research*, 2017, 24(5): 72.
- [56] 辛宗泽. 成骨细胞填充壳聚糖明胶微球支架在颅骨修补中的应用研究[D]. 青岛: 青岛大学硕士学位论文. XIN ZZ. Study on the application of osteoblast-filled chitosan gelatin microsphere scaffold in skull repair[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao University (in Chinese).
- [57] NEZAFATI N, FAROKHI M, HEYDARI M, HESARAKI S, NASAB NA. *In vitro* bioactivity and cytocompatibility of an injectable calcium phosphate cement/silanated gelatin microsphere composite bone cement[J]. *Composites Part B: Engineering*, 2019, 175: 107146.
- [58] YU X, SHEN GY, SHANG Q, ZHANG ZD, ZHAO WH, ZHANG P, LIANG D, REN H, JIANG XB. A naringin-loaded gelatin-microsphere/nano-hydroxyapatite/silk fibroin composite scaffold promoted healing of critical-size vertebral defects in ovariectomised rat[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 193: 510-518.
- [59] HOUAOU A, SZCZODRA A, LALLUKKA M, EL-GUERMAH L, AGNIEL R, PAUTHE E, MASSERA J, BOISSIERE M. New generation of hybrid materials based on gelatin and bioactive glass

- particles for bone tissue regeneration[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 444.
- [60] KIM D, SHIM YS, AN SY, LEE MJ. Role of zinc-doped bioactive glass encapsulated with microspherical gelatin in localized supplementation for tissue regeneration: a contemporary review[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1823.
- [61] DEB P, DEOGHARE AB, BORAH A, BARUA E, DAS LALA S. Scaffold development using biomaterials: a review[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2018, 5(5): 12909-12919.
- [62] LU TL, FENG SL, HE FP, YE JD. Enhanced osteogenesis of honeycomb β -tricalcium phosphate scaffold by construction of interconnected pore structure: an *in vivo* study[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2020, 108(3): 645-653.
- [63] RESSLER A. Chitosan-based biomaterials for bone tissue engineering applications: a short review[J]. *Polymers*, 2022, 14(16): 3430.
- [64] 厉孟, 刘旭东, 刘兴炎, 葛宝丰. 明胶微球/rhBMP-2/CPC的制备及其异位成骨效应研究[J]. *中国骨伤*, 2011, 24(5): 411-415.
LI M, LIU XD, LIU XY, GE BF. Preparation and ectopic osteoinduction study of macroporous bone substitute with calcium phosphate cements and rhBMP-2 loaded gelatin microspheres[J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2011, 24(5): 411-415 (in Chinese).
- [65] 黎开谷. 多孔明胶微球—磷酸钙骨水泥复合支架的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文.
LI KG. Experimental study on porous gelatin microspheres-calcium phosphate cement composite scaffold[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University (in Chinese).
- [66] YUE J, YU HC, LIU P, WEN PF, ZHANG HJ, GUO WS, ZHANG QD. Preliminary study of icariin indicating prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head by regulating abnormal expression of miRNA-335 and protecting the functions of bone microvascular endothelial cells in rats[J]. *Gene*, 2021, 766: 145128.
- [67] ZUO RT, KONG LC, WANG MW, WANG WB, XU J, CHAI YM, GUAN JJ, KANG QL. Exosomes derived from human CD34⁺ stem cells transfected with miR-26a prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis and osteogenesis[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 1-14.
- [68] PACIELLO A, AMALFITANO G, GARZIANO A, URCIUOLO F, NETTI PA. Hemoglobin-conjugated gelatin microsphere as a smart oxygen releasing biomaterial[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5(20): 2655-2666.
- [69] WANG CQ, XU HX, LIU C, PENG ZY, MIN RX, ZHANG ZM, LI JJ, JIN YL, WANG YH, LI ZH, GUO JS, ZHU LX. CaO₂/gelatin oxygen slow-releasing microspheres facilitate tissue engineering efficiency for the osteonecrosis of femoral head by enhancing the angiogenesis and survival of grafted bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(8): 3005-3018.
- [70] SABERIANPOUR S, RAHBARGHAZI R, AHMADI M, NOURI M, HEIDARZADEH M, KARIMI A, NEMATI S. Juxtaposition of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells promoted angiogenic potential inside alginate-gelatin microspheres[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 11(1): 163-170.
- [71] WANG PY, MENG XY, WANG RZ, YANG W, YANG LT, WANG JX, WANG DA, FAN CJ. Biomaterial scaffolds made of chemically cross-linked gelatin microsphere aggregates (C-GMSs) promote vascularized bone regeneration[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, 11(13): 2102818.

(本文责编 陈宏宇)