

骨髓间充质干细胞联合3D生物打印技术治疗骨缺损的研究进展

袁宇, 徐林

滨州医学院烟台附属医院, 山东 烟台 264010

【摘要】骨缺损一直以来都是临床治疗中的难题,目前主要是行自体骨或人工骨移植治疗。但自体骨取骨的损伤和人工骨资源有限且价格昂贵使得骨移植手术在临床广泛应用受到限制。近年来国内外学者对骨髓间充质干细胞诱导分化成骨的研究愈加重视,对其分离提取和定向分化的研究取得了长足的进步。骨髓间充质干细胞可向成骨细胞、软骨细胞等分化且不存在排斥反应及伦理问题,其结合3D生物打印技术修复骨缺损具有精准化和可控性的优势,是一种极具潜力和应用前景的新型骨缺损修复技术。文章对骨髓间充质干细胞的生物学特性、成骨诱导及结合载体支架治疗骨缺损的研究进行阐述,为今后在骨缺损的临床治疗中提供理论依据。

【关键词】骨髓间充质干细胞;骨组织工程;成骨分化;3D打印;综述

【中图分类号】R35;O482.1

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)01-0110-17

Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells combined with 3D bioprinting technology in the treatment of bone defects

YUAN Yu, XU Lin

Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264010, China

Abstract: Bone defect has always been a difficult problem in clinical treatment, and autogenous bone or artificial bone transplantation is the main treatment at present. However, due to the damage caused by autologous bone graft and the limited and expensive resources of artificial bone, bone transplantation cannot be widely applied in clinical practice. In recent years, the scholars at home and abroad have paid more and more attention to the study of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) for they can induce osteogenic differentiation, and have made great progress in their isolation, extraction and directional differentiation. BMSCs can differentiate into osteoblasts, chondrocytes, etc., without rejection reaction and ethical problems. When combined with 3D bioprinting technology, it has advantages of precision and controllability in repairing bone defects and is a new bone defect repair technology with great potential and prospects. In this paper, the studies of the biological characteristics and osteogenic induction of BMSCs as well as its treatment of bone defects combined with carrier scaffolds were reviewed to provide a theoretical basis for the clinical treatment of bone defects in the future.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; bone tissue engineering; osteogenic differentiation; 3D printing; review

前言

骨缺损是一项临床常见的问题,常由创伤、感染、肿瘤或一些先天性疾病所造成^[1-2]。目前临床中骨缺损的主要手术方式是采用自体骨或异体骨移植,但手术治疗中存在着机体创伤大、移植物来源有限及其潜在的免疫应答风险,考虑到患者的营养状态及基础疾病因素且存在术后感染和并发症等缺

点,极大限制了其应用。近年来,骨髓间充质干细胞(BMSCs)在基因工程、骨组织工程中的价值在基础研究和临床中得到广泛关注及应用发现并报道^[3],因其来源丰富、易培养且增殖能力强、低免疫原性和基因转染率高并能稳定表达的特点,在特定诱导条件下可以向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等分化,通过旁分泌参与组织修复并介导免疫应答^[4-6]。目前被认为是组织工程中的理想种子细胞,为骨缺损的治疗提供新的思维方向及应用前景。利用BMSCs依附在适当的支架载体上再造组织或器官是目前临床研究的重点^[7]。2001年Mastrogiacomio等^[8]报道了以羟基磷灰石为支架结合BMSCs的方法

【收稿日期】2020-06-05

【作者简介】袁宇,硕士研究生,研究方向:骨折及骨缺损的治疗, E-mail: 624928567@qq.com

成功治疗了3例骨缺损患者。随后又有大量的实验及临床研究证实了BMSCs结合支架材料治疗骨缺损的可行性^[9-10]。目前生物3D打印技术是将种子细胞及特定的支架材料按照预设的构建模型再造出特定的组织及器官,因其建模的精确性且不存在免疫排斥反应在基础医学及临床中得到广泛关注,是一种新兴的有广泛发展前景的骨缺损治疗技术。本次研究就BMSCs的骨组织工程技术结合3D打印载体治疗骨缺损的应用研究进行综述。

1 BMSCs的分离培养及鉴定

1.1 BMSCs的分离培养

目前间充质干细胞主要来源是自体骨髓和脐带组织,分化来源于中胚层^[11],因其优秀的增殖并且具有诱导多向分化能力、低免疫原性和不存在伦理问题在干细胞组织工程中得到广泛研究和应用。因骨髓间充质细胞含量少,细胞数量和活性随着年龄的增长逐渐减少,在实验及临床应用中受限,所以要获取数量充足且有活性的BMSCs必须依赖体外分离培养及扩增技术。

BMSCs在不同个体和不同年龄段中细胞活性和数量各不相同,目前在人体中的来源提取主要是取自髂骨和腰椎弓板和棘突^[12]。目前实验室中BMSCs分离培养的主要方法有全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、表型分离法、免疫磁珠分选法和流式细胞仪分选法等^[13]。全骨髓贴壁法和密度梯度离心法操作简单经济、获取目的细胞效率较高,是目前最常用的分离方法^[14]。免疫磁珠分选法与流式细胞仪分选法分离过程较复杂且价格较高,应用并不广泛。

随着对BMSCs研究的系统化和规范化,机体本身BMSCs的获取数量有限,有研究者提出诱导多功能干细胞(induced Pluripotent Stem Cells, iPSC)替代的BMSCs概念。iPSC易获取、来源广泛,没有取材时引起的副损伤等优点,并且同样拥有多向诱导分化能力,在未来临床治疗中是BMSCs的一种优秀的替代来源,从而具有重要的应用价值^[15]。虽然目前对iPSC的诱导研究发现其分裂增殖能力优越,但增殖过程中缺乏可控性,有潜在成瘤生长的可能,在其培养和应用中还需要更深入的研究^[16-17]。

1.2 BMSCs的鉴定

分离提纯的BMSCs在外观上呈体积较小的梭形细胞、核浆比大,随着间充质干细胞的分离提取方法的多样化,国际间充质干细胞委员会也提出了BMSCs的鉴定标准,主要针对分离出的细胞进行免疫表型的筛选要求,常用的方法有免疫荧光染色法

和流式细胞术,BMSCs通常表达CD90、CD105、CD73,较少表达CD19、CD79、CD45、CD34、CD14和HLA-DR表面分子^[18-19]。虽然BMSCs的分离培养趋于多样化和标准化,但目前还没有其特异性的免疫标志物进行鉴定分离^[20],在BMSCs的筛选纯化方面还需要进一步的研究^[21]。实验室中对分离提纯的BMSCs监测其诱导成骨分化是否成熟常用其分泌产物进行分析,常用的有碱性磷酸酶(ALP)和骨涎蛋白。

1.2.1 ALP在BMSCs鉴定中的应用 ALP由成骨细胞分泌,在成骨过程中水解磷酸酯、启动钙化程序,是成熟成骨细胞最重要的标志酶,也是最常用来监测的工具酶,可以通过检测ALP的含量及活动判断成骨细胞的分解代谢水平及分化成熟程度。ALP作用于钙离子使其在骨基质上聚集沉积完成基质钙化,在钙化初始时ALP活性最高,随着钙化的进行ALP逐渐下降。ALP染色法是最常用的检测方法,通常用Von Kossa法、茜素红法染色等可显示矿化结节,目前RT-PCR技术可定性定量地检测ALP活性以帮助分析成骨细胞成骨过程中的动态变化^[22]。

1.2.1 骨涎蛋白在BMSCs鉴定中的应用 骨涎蛋白主要是由成骨细胞产生,破骨细胞和成齿细胞也有少量合成,其活性与ALP在成骨过程中的动态变化不同,在成骨细胞成熟的过程中骨涎蛋白的含量呈递增的趋势,与钙化过程呈正相关,对血清或血浆中的骨涎蛋白含量的测定可判断成骨细胞的分化阶段,结合ALP的定量检测可以较准确地分析出分化各阶段成骨细胞的活性。骨涎蛋白可与I型骨胶原的 α -2键结合,占到非胶原的骨基质的5%~10%,这种特性也使骨涎蛋白作为一种促血管形成因子,在组织修复和重建中具有重要作用^[23]。除此之外骨钙素是仅有成骨细胞可以合成分泌的酸性蛋白,在钙化初期表达较旺盛,也是检测成骨细胞分化成熟特异性较高的标志酶。

2 BMSCs分化的影响因素

目前已知有多种细胞因子、化学药物和一些物理刺激如机械应力、氧浓度、电磁场和超声波等都对BMSCs增殖分化起到调控作用。早期的研究者发现在BMSCs的体外培养中,加入富血小板血浆可以促进其分裂增殖^[24],后来人们在血浆等体液中陆续发现并提纯了许多促进BMSCs的生长因子,对BMSCs的增殖及诱导分化的研究更加系统和深入。

2.1 骨形态发生蛋白-2(BMP-2)对BMSCs分化的影响

BMP-2属于转化生长因子 β (Transforming

Growth Factor- β , TGF- β)超家族,是目前基础医学及临床中应用最广泛的成骨诱导生长因子,因其具有诱导 BMSCs 向软骨细胞和成骨细胞定向分化的能力,成骨作用效果显著且稳定,与 ALP 具有协同作用,且能独立诱导成骨过程^[25-26],成为骨组织工程中重要的成骨诱导剂^[27-28]。

BMP-2 来源广泛,在 BMSCs、成骨细胞、软骨细胞中均有表达,主要作用于间充质干细胞及成骨细胞^[29]。BMP-2 在体内环境下通过诱导 BMSCs 向骨母细胞分化成熟进而诱导成骨,修复骨折损伤部位骨组织^[30],在成骨修复过程中介导成骨细胞与破骨细胞的骨吸收重建过程,在诱导成骨及成软骨过程的同时促进血管内皮因子表达增加,进而促进损伤部位循环系统的修复重建,并介导周围炎症及免疫应答促进组织的修复,在移植排斥反应和自身免疫性疾病的治疗中具有重要作用^[31-34]。最近研究发现除了 BMP-2, BMP-6、BMP-7、BMP-9 在促进 BMSCs 成骨分化中具有协同作用,亦具有较强的诱导效果^[35]。

2.2 激素对 BMSCs 的成骨分化作用

目前雌激素在成骨分化的作用上得到广泛证实,低浓度的雌激素有促进成骨的作用,这也被应用在预防女性绝经后骨质疏松症等方面^[36-38]。地塞米松常用于抗自身免疫性疾病的治疗中,研究者在动物实验中发现地塞米松可以促进 BMSCs 的成骨及成软骨分化,并存在浓度依赖性,低浓度呈现诱导分化作用,高浓度($>10^{-8}$ M)呈抑制作用^[39-43]。

成骨生长肽(Osteogenic Growth Peptide, OGP)是一类多肽类生长因子。动物实验中发现 OGP 的 BMSCs 诱导成骨分化作用,但诱导分化的过程及结果存在不确定性,具体生化机制还需要进一步研究^[44]。

甲状旁腺激素具有促进破骨细胞活性升高血钙浓度的作用,最近体外实验发现甲状旁腺激素在与 1,25(OH) $_2$ VD $_3$ 联合作用时对 BMSCs 成骨分化有较强的促进作用,具体分子机制还需要进一步研究^[45]。

2.3 细胞因子对 BMSCs 分化的影响

TGF- β 对 BMSCs 的诱导分化存在浓度依赖性,低浓度时促进细胞分裂增殖,高浓度时增殖减少、诱导分化作用增加^[46]。血管内皮细胞生长因子(VEGF)是对骨的再生与重建具有重要的作用,能够促进成骨细胞的迁移和分化。VEGF 与 BMP-2 的表达相互调节相互影响,联合应用生长因子对骨缺损修复具有协同调控的作用^[47]。

碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast

Growth Factor, bFGF)是一种常用的促细胞分裂剂,是目前发现对 BMSCs 促分裂增殖能力最强的诱导剂,目前对 bFGF 介导细胞分裂增殖过程的分子生物学研究发现,其可能与 BMP-2 协同作用促进 BMSCs 的增殖并诱导成骨分化,有多种细胞因子共同参与,以自分泌或旁分泌形式介导胞内及胞外信号传导,促进成骨细胞成熟加快骨基质的矿化过程^[48-49]。

EPHA2 可通过增加 RUNX2 的表达促进 BMSCs 的成骨分化,如果 RT-PCR 检测 EPHA2 的动态变化显示随着 BMSCs 成骨分化数量的提高其表达水平也在提高。整合素是细胞间及细胞内信号传递的重要介质,大量的动物实验证明整合素具有促进 BMSCs 成骨分化及增殖的重要作用^[50-51]。在 BMSCs 分化研究中发现其在成骨分化与向脂肪细胞分化是竞争性调节^[52-53],在正常生理条件下两种分化处于向成骨分化的平成状态^[54-56]。三磷酸腺苷可使 BMSCs 成骨分化相关基因的表达增高,而且可抑制向脂肪分化的基因表达,可能与激活 ERK1/2 通路有关。

双膦酸盐(Bisphosphates, BPs)在临床中被用来治疗老年骨质疏松症的常用药^[57-58]。最近实验发现,药物浓度的不同对 BMSCs 的增殖与成骨分化具有较大的影响。低浓度时诱导成骨作用有所增强,但高浓度时抑制 BMSCs 的增殖及成骨分化,并展现出一定的细胞毒性促进成骨细胞凋亡,具体机制还需要进一步的研究证实^[59]。

最近的研究表明,一些他汀类药物,甘油磷酸盐、基质细胞衍生因子-1^[60](Stromal Cell-Derived Factor1, SDF-1)、Vit C 和 β -甘油磷酸钠可通过调控相关基因转录、刺激 ALP 和骨钙素的表达、调节细胞外基质成分^[61-64]。Toll 样受体激动剂、脂多糖^[65],氯化锂等锂钙复合盐也可通过旁分泌作用介导细胞间信号传导促进 BMSCs 增殖及成骨分化过程^[66]。

BMSCs 的成骨分化受多方面生长因子及蛋白质影响,在细胞间和细胞内多方面信号传导下调控其增殖及分化方向,所以对相关信号通路的研究至关重要^[67]。目前对 BMSCs 成骨作用及分化成熟相关的信号通路的研究还不成熟,已知的信号通路有骨形态发生蛋白/转化生长因子 β 通路^[68]、Notch 信号通路^[69-70]、Wnt/ β -catenin 信号通路^[71-72]等,相信随着对信号通路研究的深入,有助于对 BMSCs 的分化调节进行精准调控。

2.4 传统中药对 BMSCs 分化的影响

近年来涌现出很多中药提取物对促进 BMSCs 增殖分化的研究,并取得了大量的理论依据及实验证实。中药及提取物具有获取方便、价格低等优势,并

且作用靶点丰富,在作为BMSCs增殖及定向分化研究方面具有重要应用价值和潜在的发展前景。

淫羊藿苷是淫羊藿的提取物,是目前研究最早也是最广泛的BMSCs成骨分化诱导剂,目前大量实验研究证实了其确切的诱导成骨效果^[73]。研究发现淫羊藿苷对BMSCs的增殖与分化的调节有Wnt/ β -catenin通路、p38MAPK信号通路等多条信号通路共同调控,p38MAPK信号通路促进BMSCs的分裂增殖且保持细胞性能的稳定^[74],ER α -Wnt/ β -连环蛋白信号通路可促进其成骨分化^[75]。

麝香酮在体内环境下可促进BMSCs增殖,其诱导成骨分化能力与药物浓度呈负相关,即低浓度促进BMSCs成骨分化^[76]。骆驼蓬碱促进了BMSCs骨形成蛋白的表达而促进成骨分化^[77],鹿茸多肽使BMSCs中ALP活性增强,间接实现诱导成骨作用^[78]。除此之外,像异补骨脂素^[79]、齐墩果酸、川芎嗪^[80]、二苯乙烯苷、补肾活血汤^[81]、巴戟天及龟板及杜仲提取物^[82-87]等诸多中药成分都对BMSCs的增殖诱导成骨分化具有调节作用。

2.5 物理因素对BMSCs分化的影响

除了化学因素、细胞内或细胞间的相互作用外,研究者发现细胞所处的环境及物理因素对BMSCs自身的代谢调节和信号传导也起到重要作用。

2.5.1 培养环境中氧浓度、超声波及电磁场对BMSCs分化的影响 在对BMSCs培养时发现,培养环境氧浓度的不同对其增殖产生不同的影响,高氧浓度会促进BMSCs的成骨分化,低氧则会起抑制作用^[88-89]。目前低强度超声波在临床尤其是治疗骨折延迟愈合和骨不连领域应用越来越广泛,研究发现超声波通过在骨不连区域制造“微骨折”来影响局部溶骨及成骨代谢的机制治疗骨不连,还可通过调节c-fos及COX-2的表达来促进BMSCs成骨分化和成熟,加快骨基质钙化过程^[90]。近年来研究者在实验室对大鼠BMSCs的培养中发现电磁场性质或强度的变化对BMSCs增殖及成骨分化有不同的作用。正弦波及低频电磁波对BMSCs成骨分化有促进作用,高频电磁波则抑制细胞分裂增殖,这可能与细胞内环磷酸腺苷表达影响细胞代谢水平有关,具体机制还要进一步的研究^[91-93]。

2.5.2 培养环境中力学的变化对BMSCs分化的影响 在体内环境中骨可对外在机械应力和牵张力产生适应性变化,比如牵张力作用于骨后,成骨相关基因ALP、DcIV表达水平增高^[94]。近年来研究发现BMSCs所处环境的机械力学与其贴附生长的基底刚度对其增殖分化有着重要影响。研究者在实验中改变细胞周围力学

的性质来观察BMSCs的动态变化发现,细胞外液的剪切力与牵张力使BMSCs向成骨分化增多,而静水压力的增高会使成软骨基因的表达增高促进其向软骨分化^[95],但具体的机制尚未清晰,可能与细胞间电信号的改变和细胞因子间的相互作用有关,进而调节基因的表达与蛋白质的合成,且不同组织细胞对机械力的感受器敏感度不同所以其作用效果也有差异^[96-98]。

BMSCs根据诱导条件的不同可以向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经细胞等分化,体外培养时贴附材料基底力学的不同对其分化也可产生不同的影响,即基底支架材料的力学性能也是BMSCs定向分化的诱导因素,且各种定向分化的适宜材料的力学性能各不相同^[99-101]。目前对机械力学与BMSCs的关系研究较少,实验室中主要是通过改变BMSCs贴附的支架材料后对干细胞分化进行定性定量分析,间接得到基底的机械力学对BMSCs增殖分化的影响,也有研究者使用更先进的机械生物反应器来测量机械力学对干细胞增殖分化的影响^[102]。随着对BMSCs与机械力学相互影响的研究更加深入,为调节BMSCs的增殖分化和选择合适的支架材料有了更广阔的思路,为未来骨缺损的治疗提供强大的理论支撑和技术支持。

2.6 BMSCs增殖分化中的双向免疫调节性

研究发现在体内环境中BMSCs的活性受周围炎症因子的影响又反过来调节机体的免疫应答^[103],这种特性在体外重塑BMSCs载体中具有重要作用。

研究者发现BMSCs对炎症反应的调节具有双向性和可塑性,具有反馈式双向免疫调节性即双向免疫调节性,双向性与炎症反应的强度和性质密切相关,有NK细胞、树突状细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞等多种炎症细胞参与,一氧化氮合成酶在局部反应中起到重要调节作用。

炎症反应所产生的白细胞介素、肿瘤坏死因子 α 、干扰素- γ ^[104]等刺激BMSCs对一氧化氮合成酶的表达增高,一氧化氮合成酶在局部产生NO抑制T细胞的活性来发挥免疫抑制作用。其次BMMSCs可通过旁分泌作用,抑制B淋巴细胞活性及趋化因子的表达减低炎症反应^[105]。另一方面,BMSCs通过旁分泌表达如RANTES、CXCL-9等炎性趋化因子,招募周围的T淋巴细胞向BMSCs迁移促进炎症反应,这在体外实验中亦得到证实^[106-107]。

BMSCs对周围炎症的促进或抑制作用多与炎症反应的水平与刺激有关。目前研究发现低水平的炎症反应诱导BMSCs炎性趋化因子表达增加,并促进成熟T细胞的增殖促进炎症反应^[108]。相反,当局部

IFN- γ 、TNF- α 等炎症因子水平较高时,BMSCs对一氧化氮合成酶的表达更加活跃,使得T淋巴细胞及B淋巴细胞活性受抑制,从而起到负向免疫调节作用^[109]。目前对BMSCs免疫调节的机制尚存在许多问题,总体来说,BMSCs对免疫调节的双向性依赖于炎症反应的强度,而对免疫调节的结果在总体上是促进骨骼及软组织的再生与修复^[110-111]。

3 BMSCs的临床应用

3.1 BMSCs在骨疾病中的应用

BMSCs对于骨、软骨及肌腱等软组织修复的治疗中具有潜在的应用前景和重要的临床意义。早期有临床实验中将骨髓血引至骨缺损处或直接将分离提纯过的BMSCs通过局部注射的方法,在机体自身体液环境中诱导BMSCs成骨分化而修复缺损,目前被广泛应用在骨缺损、骨折不愈合和骨性关节炎的临床实验和治疗中^[112]。有研究者将纯化后的BMSCs经过成骨诱导与纤维蛋白联合通过局部注射的方法治疗萎缩性骨不连并取得了良好的治疗效果^[113]。许多研究结果显示BMSCs的自我增殖分化能力对降低股骨头坏死的发生具有重要意义^[114]。

目前通过BMSCs治疗骨缺损的方法有腔内局部注射、复合载体支架填充等方法,这对软骨和骨缺损具有不同的临床意义。Osugi等^[115]在体内实验发现BMSCs分泌的细胞因子与周围组织微环境的相互作用和驱化性,BMSCs可定向迁移至骨缺损处促进骨折的修复。Dogan等^[116]构建股骨缺损模型,将BMSCs移植到含硼的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)支架中,结果显示,含硼PLGA支架可提高OC、I型胶原蛋白表达水平。Wei等^[117]证实聚己内酯(PCL)支架可以促进BMSCs增殖和分化,增强骨形成与骨整合。

3.2 BMSCs在其它疾病中的应用

3.2.1 BMSCs在组织器官修复中的应用 在一些肺纤维化等肺部间质性疾病治疗中,BMSCs可通过旁分泌的方式与周围单核细胞相互作用减少炎症反应,促进炎症修复而减缓肺部纤维化进程^[118]。有一些临床实验证实,将自体BMSCs静脉注射到急性心肌梗死的患者体内,其心功能得到明显改善且没有明显并发症的发生^[119]。这种治疗方法在脑梗塞患者治疗中亦得到良好的效果,其可减少颅内局部缺血区炎性细胞的聚集,有效减轻缺血后中枢神经系统损伤,并且在神经功能恢复方面有促进作用^[120-121]。

3.2.2 BMSCs在器官移植中的应用 有学者提出由于BMSCs低免疫原性的特性,能逃避免疫监视^[122],

行同种异体BMMSCs移植依然具有优秀的治疗效果,但在获取人异体干细胞时要对供体进行病原微生物学与家族史等安全性筛查。目前将自体分离纯化后的BMSCs进行体外扩增,再定向移植到某组织和器官中,经过诱导增殖后修复重建器官已取得了明确的成效,如椎间盘、肝脏^[123-125]等。Mohamed等^[126]报告指出,BMSCs在高血压肾病中具有改善肾小球滤过功能和肾小管重吸收作用,并且可逆转病理结构,这是现有药物中所不具备的。

研究发现其对组织器官的修复不仅是细胞增殖分化作用,BMSCs分泌的多种生长因子参与调节组织微环境,促进周围血管重建与内源性细胞增殖等^[127]。在体内环境下BMSCs通过旁分泌对前列腺素E2和TGF- β 的调控作用,对自身免疫性疾病、减少免疫排斥等治疗提供一种新的思路^[128]。目前虽然发现BMSCs可以分化并修复多种不同类型的组织及器官,但对其修复的具体分子生物学机制尚未十分清晰,总体而言,BMSCs的损伤修复作用一方面是其分化替代能力,另一方面是其与周围细胞组织及免疫系统的相互作用和旁分泌功能,营造出适宜的微环境共同调节组织器官的增殖与分化过程^[129-130]。

4 BMSCs复合支架材料修复骨缺损

BMSCs结合支架材料治疗骨缺损的研究已有几十年的历史,传统的高分子材料与金属缺乏天然骨的仿生性和力学性能且易出现免疫排斥反应等并发症,不适合应用于BMSCs的载体支架。

4.1 BMSCs复合支架材料在骨缺损中的应用

磷酸钙最早在20世纪末就被作为骨缺损替代材料之一,磷酸钙广泛存在于人体的无机材料中,其具有优秀的生物相容性且能调节体内钙离子与磷离子的浓度影响骨质矿化,且具有成骨诱导特性被广泛应用于骨水泥、磷酸钙陶瓷与骨缺损支架等材料中^[131-132]。磷酸钙骨水泥是常用于骨缺损的填充物,但其脆性大、强度低,在承重方面具有很大缺陷^[133]。Boehm等^[134]对磷酸钙结合了碳纤维材料制成聚磷酸钙纤维复合材料,改善了材料的韧性和刚度进而大大提高了其作为骨填充物或支架材料的力学性能。成骨细胞是否能在骨缺损替代材料上贴附并增殖决定着支架材料的生物学活性。近年来伴随着骨组织工程的深入研究,研究者将BMSCs培养基引入磷酸钙支架中,其成骨作用提高了BMSCs的增殖与成骨分化效率亦增强了磷酸钙支架的生物相容性^[135]。

4.2 BMSCs复合支架材料在软骨缺损中的应用

近年来BMSCs复合支架材料制成的三维软骨修

复材料得到了国内外学者的广泛关注,在相关动物实验中取得了诸多成果。研究表明BMSCs在成软骨分化是以逐层分化叠加成多层复合体结构^[136-137]。Tali等^[138]将BMSCs作为种子细胞,结合诱导因子的培养基成功制作出具有生物活性的体外软骨,并植入在大鼠的骨缺损模型中取得了理想的修复效果,且没有出现明显的并发症。Caplan等^[139]在体外利用BMSCs制作成全层软骨损伤模型再将其植入兔膝关节处,经培养观察后发现损伤模型处长出新生软骨,同样达到了损伤修复的目的。

5 生物3D打印技术

生物3D打印技术是传统3D打印技术结合干细胞组织工程技术的扩展运用,是一种新型的快速成型技术。3D打印技术在上个世纪80年代逐渐开始发展运用,在近几十年的发展中3D打印技术实现了对需求的个性化、精准化和产业化,近年来3D生物打印技术蓬勃发展,在医学相关材料的设计与制备取得了重要的成果。

5.1 生物3D打印技术的优势

3D生物打印技术核心的三大构成要素为:干细胞(种子细胞)、支架材料和生长因子。目前骨缺损特别是较大体积的骨缺损是临床治疗中常需面临的困扰,最常应用于较大骨缺损的治疗方法是自体或人工骨移植,但因为二次手术对患者的损伤和材料来源的受限限制了其广泛应用,且人工骨存在造价昂贵、潜在的免疫排斥风险和构造建模缺乏特异性等弊端。近年来生物3D打印骨缺损得到了越来越多的关注,其解决了人工骨和同种异体骨在免疫排斥和伦理问题方面的缺陷,可在计算机辅助下利用CT、MRI成像技术对骨缺损部位进行精确设计,尤其对于颌面部骨缺损等复杂结构的修复中具有强大优势,并可制造出与缺损骨完全匹配的3D替代支架^[140]。

与原始骨缺损填充支架不同的是其在机械强度和微观空间结构上可与人体骨组织相似,支架材料的无毒性 and 可溶解性使BMSCs作为种子细胞在支架内三维生长后可达到与缺损骨组织的完全替代整合,是对骨缺损疾病具有广泛前景的新型治疗技术。国内学者张钰^[141]通过3D打印技术成功设计并制造出了在孔径结构和力学性能与天然骨质相似的仿生人工踝关节,在打印精度和材料设计中都取得了重要突破。He等^[142]利用3D生物打印技术制备了人膝关节仿生骨假体,具有良好的生物相容性和力学性能,在与人体关节空间结构匹配精确度方面较传统人工假体明显提高。

5.2 生物3D打印技术的打印程序

目前在结合3D打印的骨组织工程中,如何打印出具有生物活性的载体是研究的热点。打印过程中温度过高或局部压力过强都会导致细胞的失活,种子细胞周围的基质成分和各种细胞因子所构成的微环境也极其关键。

目前国际中主流的打印程序有两种:一种方式是需要2个以上不同特性的打印喷头,将BMSCs与原始支架材料同时复合打印,优势是打印完成即具有所需的生物活性,但对打印要求高,打印温度和打印速度稍有调动即可造成细胞的失活和打印的失败^[143]。另一种是根据设计的载体材料预先打印出仿生骨的原始支架,再将分离培养的BMSCs及基质液在原始支架中种植,通过传代培养和诱导成骨分化后最终形成有活性的三维骨组织修复材料,此种方式是目前最常用于生物骨的打印,优势是操作方便、技术难度低和成活率高,但缺点是培养周期相对较长^[144-146]。

5.3 生物3D打印技术的原理

生物3D打印技术的主要步骤为通过医学成像在计算机辅助设计建模后,运用适宜的打印技术将原料打印出成品的过程。目前在干细胞组织工程中应用于生物3D打印技术有喷墨打印技术、选择性激光烧结技术(Selective Laser Sintering, SLS)、光固化成型技术(Stereo Lithography Apparatus, SLA)和熔融沉积成型技术(Fused Deposition Modeling, FDM)等^[147],3D打印技术对细胞分布的可控性建模的自由选择性是应用于骨组织工程的强大优势^[148]。每种打印技术都有各自的优缺点,不同的环境温度、结构应力对生物材料的影响不同,应根据打印材料的选择选取合适的打印方法。

喷墨打印是最早被应用的打印技术,但打印精度不高、力学性能较差在仿生骨的生物活性材料中运用较局限。FDM技术操作简单、无用损耗少且成本低是目前最常用的生物3D打印技术。其将原材料加热呈熔溶态,喷头在计算机设计程序下将原料喷出,通过逐层累加的方式构建所需模型,但其温度较高,在打印过程中含药物载体和细胞中极易损伤变性,所以常先打印固态支架再在原支架上接种种子细胞进行二次培养的方法获得生物活性的载体^[149]。

Hong等^[150]将聚己内酯/聚乳酸复合材料通过FDM技术在大鼠的骨缺损模型中得到成功的实验。SLA技术在骨组织工程中应用较早,其打印精度较高,材料可在纳米级进行操作,常使用聚己内酯、聚乳酸和特殊蛋白质等光敏材料,使用的亦是逐层打

印技术,利用材料的光敏性用激光进行定点雕刻而固态成形^[151-152]。SLS技术与SLA相似,但取材广泛,不受光敏性的约束,像羟基磷灰石、PCL和明胶类蛋白均可采用,在骨和软骨构建中广泛实验和应用^[153]。

5.4 生物3D打印的载体及支架材料

在骨组织工程技术的三大要素里,合适的支架材料决定着BMSCs的成活及增殖,支架的力学性能、微观结构的空隙结构、支架材质仿生性对支架内细胞外微环境的形成、BMSCs的成骨诱导分化及其三维生长结构至关重要^[154-155]。

5.4.1 生物3D打印的骨组织支架的必备条件

3D打印的骨组织支架常需要具备以下几个生物学性能:

① 支架材料的生物相容性与骨诱导性:移植后不产生免疫排斥反应是移植物成活的基础也是移植材料发挥其生物活性的首要前提,这与支架材料的选取、纯度有关;材料可与BMSCs相互作用进而诱导分化为成骨细胞或软骨细胞^[156-158];② 支架材料的空间结构和适宜的孔隙:支架材料表面易于细胞附着,仿生骨材料的活性关键在于BMSCs在支架内的三维生长,所以材料内部孔隙的相互连接至关重要,三维孔隙结构有利于细胞外液的流通,可使生长因子和营养物质均匀作用于种子细胞并为其内血管网络的建立创造条件,还可将细胞代谢产物通过开放的细胞外微环境运输排泄。孔径、孔隙的分布和密度与支架结构的机械强度密切相关,而且生物支架的降解效率也与支架的孔隙率和表面积有关;③ 支架的力学性能和机械强度:适宜的机械强度和硬度不仅可以为人体骨骼系统做支撑作用还是对BMSCs完成成骨分化前的保护,BMSCs在增殖分化过程中对周围环境的力学刺激和不同刚度的基底产生反馈作用影响自身的增殖与分化方向,学者们常称之为机械力学微环境,是调节BMSCs增殖分化非常重要的元素^[159-161]。

除此之外,还有由于材料的选择不同可表现出一些特殊的特性,比如可降解性等。这些诸多的生物学特性与BMSCs及细胞因子共同构成了生物学支架的微环境,各因素之间的相互作用共同调整着BMSCs的增殖与分化^[162]。

5.4.2 生物3D打印骨组织载体及支架材料的选择 在骨缺损3D生物支架材料的选择中,需要根据缺损骨的生理功能和受力情况及生物相容性选取适宜的支架材料,还要将BMSCs在支架材料中黏附、增殖和分化等问题考虑在内。目前,应用于生物3D打印的支架材料主要分为两类:一类是天然高分子生物材料,如胶原蛋白、海藻酸盐、明胶、纤维蛋白和壳聚糖等^[163-165],其来源广

泛,主要由动植物体内获取;另一类是人工合成的高分子生物材料,如磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乙醇酸、聚乳酸、聚氨基酸和纳米陶瓷类等^[166-175]。

目前随着对3D打印生物支架功能要求的提高,研究从单一的材料打印技术向复合基因工程、低温技术和固液相分离技术制作与内环境契合的多功能复合材料转变。比如打印设计在支架孔隙表面可置的药物或细胞载体,细胞不但可以在支架表面贴附生长,而且可以复合生长因子、抗菌药物等制成药物缓释的载药活性支架,聚乳酸就是一种常用的人工合成的聚酯类高分子,可结合3D打印技术在支架中制作药物缓释载体结构预防植入后感染等;还可以利用磷脂双分子层的微球脂质结构将药物置入其中制作支架,来达到药物控释的目的;利用基因工程将BMP-2导入复合材料的载体细胞中,达到直接诱导BMSCs成骨分化的目的等^[176-180]。

6 常用的生物3D打印骨组织载体及支架材料

目前根据局部骨缺损的特性构建具有优秀的生物相容性、合适的力学性能和空间结构的个性化支架材料是骨组织工程研究的方向,以下是目前研究中流行的支架材料。

6.1 羟基磷灰石

骨的主要矿化无机成分是羟基磷灰石结晶^[181],目前3D生物打印材料多是以人工高分子材料与天然高分子材料相结合,如以羟基磷灰石为原料复合一些如聚乙烯醇、丝素蛋白、鹿瓜多肽等有机材料进行。羟基磷灰石具有优秀的组织相容性和骨诱导性^[182],可自行被组织吸收,但其脆性较高,单纯运用机械强度欠缺,因其性质活泼,其上化学基团易与离子或其他生物制剂发生反应,影响支架结构的稳定性^[183]。

6.2 磷酸三钙

Solaiman等^[184]以磷酸三钙为基础原料运用3D生物打印技术设计出了在力学性能和材料孔隙与天然骨相似的支架材料,并在骨缺损的治疗中取得了满意的效果。 β -磷酸三钙复合羟基磷灰石材料增加了材料的韧性和强度的缺陷且具有促进成骨细胞分化成熟的作用^[185-186]。Gronthos等^[187]成功运用 β -磷酸三钙混合材料植入干细胞制备出具有正常生物活性的牙槽骨组织。

6.3 海藻酸盐

海藻酸盐的化学性质与羟基磷灰石相似,通过对海藻酸盐的化学修饰与添加其他材料赋予了其作为仿生骨支架更优秀的生物学特性,在骨与软骨材料的支架模型中被广泛运用。将聚乙二醇与海藻酸

盐制成混合胶体原料,可增强打印材料的韧性和弹性^[188]。聚乳酸-羟基乙酸共聚物具有良好的生物相容性,在体内可降解为羟基乙酸与乳酸,材料和降解产物的生物相容性良好,其与海藻酸盐制成混合材料使干细胞对支架表面的黏附性提高并可促进软骨的分化成熟^[189]。纳米碳化羟基磷灰石海藻酸盐调节了羟基磷灰石的降解速率,使植入材料与骨组织整合加快并具有诱导神经细胞再生的能力^[190]。

6.4 丝素蛋白

体外对BMSCs进行培养时发现培养基中某些蛋白质的含量提高促进了其成软骨分化,后来人们对其分离纯化证明了丝素蛋白对促BMSCs的增殖和成软骨分化具有促进作用。目前以丝素蛋白做为软骨支架的组成成分和诱导剂得到了广泛认同和运用^[191-194]。

6.5 壳聚糖

壳聚糖是一种天然氨基多糖,其本身具有抑菌性和可降解性,经过化学修饰或加入其它材料如羟基磷灰石可以增强其机械强度在骨和软骨支架材料的研究中应用广泛,其亲水层易于细胞的黏附增殖,还具有促进骨基质矿化的作用。通过低温3D生物打印技术将海藻酸盐与壳聚糖制备出混合材料支架,综合了两种材料的优势设计出了生物活性和组织相容性极佳的支架材料^[195-196]。Chen等^[197]将壳聚糖与羟基磷灰石经过化学修饰制备出壳聚糖-P24/羟基磷灰石复合材料支架,材料对P24的释放具有控释性且可诱导BMSCs成骨分化,进而提高支架材料与骨质的整合与骨缺损修复效率。

6.6 胶原材料

胶原材料特别是I型胶原在骨组织工程中应用广泛,主要参与对软骨支架材料的构成。胶原复合其他材料在制造软骨缺损模型和营造骨外微环境中具有重要作用。将纤维蛋白等整合素加入胶原中制成材料具有促进BMSCs黏附增殖作用,复合陶瓷制成明胶-陶瓷支架植入种子细胞后促进软骨分化成熟并促进胶原的分泌合成^[198-200]。

凝胶含水量高、保水性能好、结构具有可塑性强等优点,还满足构建人工仿生骨的可降解性的要求,所以在软骨支架材料中得到关注。水凝胶培养基更适合软骨结构的生长,梯度交联水凝胶使细胞呈3D生长模式,培养基可以模拟体内环境,对细胞生长增殖和分化等过程进行监控和干预。研究者将种子细胞接种在3D打印的水凝胶基质中制作人耳软骨支架,并得到了具有生物学活性的仿生耳^[201]。透明质酸是一种天然的高分子聚合物也是细胞外基质的组

成成分,研究者将透明质酸加入水凝胶中提高了材料的力学性能和生物活性,还促进了细胞对支架材料的黏附性,促进细胞的增殖分化^[202]。

6.7 聚乙二醇

聚乙二醇具有良好的水溶性和生物相容性,由聚乙二醇制成的支架材料的韧性和机械强度与软骨相近^[203],动物实验中发现其可以促进软骨周围基质的合成分泌^[204]。国外学者将成熟的软骨细胞和聚乙二醇二甲基丙烯酸酯利用3D打印技术制备出可以直接填补修复的生物活性材料,填补材料不但在机械力学性能与自然软骨组织相似,在组织成分及内部结构上与软骨组织更加相容,这也是充分发挥了3D打印技术对材料堆积的精确控制的优势^[205]。Tay等^[206]将聚乙烯醇和聚己内酯作为原料,通过3D打印制备的支架在机械强度、微观结构的孔隙分布和连通性能均取得了较满意的性能。

6.8 人工高分子与天然高分子复合材料

有研究者将人工高分子材料与天然高分子材料相结合制成复合材料。比如将聚乳酸与羟基磷灰石粉末结合制成复合材料^[207],新材料将羟基磷灰石优秀的组织相容性和聚乳酸的材料韧性相结合,不但具有诱导BMSCs增殖分化的能力还改良了传统材料的机械性能和基底刚度,是骨组织工程材料制备的优秀尝试。与此类似的还有聚醚醚酮(PEEK),PEEK是一种熔点较高且具有良好的生物相容性的3D打印材料,因打印材料具有良好的热稳定性得到广泛关注,除此之外其支架材料的强度高、耐磨性好和良好的韧性是仿生骨材料制备的重要优势^[208-209]。赖毓霄等^[210]将镁等金属材料与PLGA、 β -磷酸三钙采用低温3D打印技术制备出的复合材料支架材料具有诱导新生血管的长入和BMSCs成骨分化的作用,并且具有生物可降解性且孔隙率佳,并增加了材料的机械强度。

6.9 生物活性玻璃材料

目前一些生物活性玻璃材料具有抗菌性等生物活性在骨组织支架的研发中得到广泛关注。在体外将干细胞中培养时发现45S5生物活性玻璃可调控基因的表达,使成骨相关基因表达增高,并在动物实验中发现其具有促进成骨分化的作用并且诱导周围血管的长入^[211-212]。但是玻璃支架有材料脆性高、机械强度较弱等缺点,有研究者对其复合磷酸钙、橡胶等材料不断探索改良其机械强度^[213]。

6.10 抗菌材料

移植物感染是移植手术后严重的并发症,骨的修复能力会因周围组织的感染、微循环障碍或机体

营养状态不佳而受抑制^[214]。移植物良好的抑菌性能是生物活性支架发挥功能的重要前提。由于仿生骨材料需要适宜的空间孔隙和易于细胞贴附的基底,这恰恰也是细菌易在支架材料表面黏附聚集的原因。

3D打印支架材料可将药品或者抑菌成分如蔡夫西林钠、硝基呋喃妥因等精确打印在支架内部结构中起到抗菌效果,并且可以预先判断预植物可能感染的菌种设计出特异性抗菌支架,取得了满意的效果^[215-216]。伍卫刚等^[217]利用生物3D打印技术制备了一种载药人工骨,可将抗菌药物精确堆积,达到药物控释性。有研究者提出可利用类固醇的脂质双分子层结构将抗菌药物注入其中,这不但可利用类固醇诱导BMSCs成骨分化,还可加强对骨缺损部位感染的控制能力^[218]。但目前3D打印抗菌材料仍处于初始研究阶段,相信其作为抗感染材料的制作技术具有广阔的应用前景。

7 生物3D打印材料的活性基础

经过3D生物打印出具有生物活性的支架材料是骨缺损修复的第一步,然而,生物活性支架能否在受体存活受多方面因素的影响,最重要的就是支架材料能否建立有效的血液循环。良好的血液循环给予BMSCs生长增殖所需要充足的营养物质并带走代谢废物,如果没有建立必须的循环微环境则支架材料中的干细胞及生物活性成分死亡或失效,最终导致移植的失败并可能出现如感染、自体免疫攻击等并发症。

目前就移植支架多通过添加生长因子如骨涎蛋白、BMP-2、VEGF等,不但具有诱导成骨分化还可诱导新生血管生成的复合材料,这种具有成骨和诱导新生血管双重作用的现像叫做成骨-血管生成耦联^[219],在骨质和软组织修复中具有重要意义,还有一些支架材料如 β -磷酸三钙、聚乙烯醇卡拉胶等材料本身也具有诱导血管生成的作用,诸多方法都为3D生物打印支架移植后的成活建立了研究思路^[220]。

随着3D生物打印技术的发展,打印精度越来越高。国内学者从恒河猴取自体干细胞,经过体外增殖分化筛选出种子细胞,利用3D生物打印技术成功制备出了血管组织,将打印的血管替换了恒河猴体内2 cm的腹主动脉,术后并无明显并发症的发生。Lee等^[221]利用活体细胞和组织打印出了直径1 mm的具有生物活性的血管组织,这一技术使3D生物打印技术在微米级材料制备中取得了重大突破,这为支架材料建立血液供应提供了有力的技术支持。3D

打印血管与传统人工血管不同,3D打印的血管管径不但更细小,而且血管壁结构与天然血管相似,都具有外膜、中膜和内膜结构,这使得血管保持良好的弹性等生物活性^[222]。一般移植传统人工血管的寿命是10年,移植后因移植物材料的原因需要终身使用抗凝药物,但3D生物打印出的血管组织具有优秀的生物相容性,仅需要在术后5 d使用抗凝药且无需更换血管^[223-224]。

8 总结与展望

目前,虽然国内外学者对生物3D打印支架材料的研发和运用取得了一些进展,但在临床运用中依然处于实验阶段,BMSCs的诱导分化及支架材料的取材依然存在许多问题。

BMSCs是骨组织工程中治疗骨缺损最理想的种子细胞,但在不同人群和不同年龄中BMSCs的活性不同,BMSCs在骨髓单核细胞的比例、增殖能力和分化潜能随着年龄的增长而不断降低,并不是所有人都具有提取适应症^[225-226]。虽然BMSCs成骨分化的诱导剂种类诸多,对其细胞间信号传导通路及作用机制的研究愈加深入和全面,但目前还没有一种诱导因子能够实现BMSCs的精确定向分化,对实现BMSCs体外增殖和分化的可控性依然是研究的热点和难题。

虽然BMSCs具有低免疫原性和免疫逃避能力,且可经自体或异体移植,一些动物实验表明异体移植后BMSCs存活率逐渐下降且活性较低^[227],使得同种异体BMSCs在临床中的研究与应用较少。目前对BMSCs的基础研究在寻找其表面特定标志物,在分离及诱导分化的基础上向移植后对机体免疫反应的调节和微环境的构建进行探索研究。虽然经3D生物打印的支架材料在组织相容性和机械力学方面取得了重要进展,但生物支架在治疗骨缺损中缺乏长期病例的随访和回顾性研究,而且目前载有BMSCs的生物活性支架在受体中如何建立有效的血液循环仍需进一步研究^[228]。

3D生物打印技术经过近几十年的发展,在打印技术和精度方面有了显著的提高,但仍存在一些技术性难题。比如如何将传统的静态打印方式向动态打印方式转换,如何在打印过程中使种子细胞免受高温、压力等外在因素的干扰依然保持生物活性,怎样维持各种打印材料之间印刷参数的兼容性与表征等^[229-230]。目前,BMSCs复合3D生物打印技术治疗骨缺损是一种拥有广阔前景的治疗方法,随着骨组织工程的发展和生物活性材料的研发进步,通过3D

生物打印技术为骨缺损患者提供精准化、个性化的治疗方案提供可行性,相信未来其在临床治疗中可以发挥更重要的作用。

【参考文献】

- [1] MAJIDINIA M, SADEGHPOUR A, YOUSEFI B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2937-2948.
- [2] LIU Z P, YUAN X, GABRIELA F, et al. The combination of nano-calcium sulfate/platelet rich plasma gel scaffold with BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat critical-sized calvarial defects [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 122.
- [3] 王建吉, 杨龙, 李靖, 等. 基于3D打印技术股骨头减压联合骨髓间充质干细胞移植专用移植器的研制及应用 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(44): 6636-6642.
WANG J J, YANG L, LI J, et al. Development and application of special-purpose grafter by femoral head decompression combined with bone marrow mesenchymal stem cells transplantation based on threedimensional printing technology [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2016, 20(44): 6636-6642.
- [4] MOBASHERI A, KALAMEGAM G, MUSUMECI G, et al. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions [J]. Maturitas, 2014, 78(3): 188-198.
- [5] BASHIR J, SHERMAN A, LEE H, et al. Mesenchymal stem cell therapies in the treatment of musculoskeletal diseases [J]. PM & R, 2014, 6(1): 61-69.
- [6] 李成, 周海斌. 骨髓间充质干细胞的旁分泌影响成骨细胞生物学功能 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(10): 1477-1483.
LI C, ZHOU H B. Paracrine of bone marrow mesenchymal stem cells can affect the biological function of osteoblasts [J]. China Tissue Engineering Research, 2014, 18(10): 1477-1483.
- [7] GJERDE C, MUSTAFA K, HELLEM S, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 213.
- [8] MASTROGIACOMO M, KUTEPOV S M, MUKHACHEV V, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells [J]. N Engl J Med, 2001, 344(5): 385-386.
- [9] ELIZAVETA K, GIUSEPPE F, ALICE R, et al. Bone regeneration with mesenchymal stem cells [J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2012, 9: 24-27.
- [10] VAN DER STOK J, KOOLEN M K, JAHR H, et al. Chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects [J]. Eur Cell Mater, 2014, 27(1): 137-148.
- [11] KANG J G, PARK S B, SEO M S, et al. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood [J]. J Vet Sci, 2013, 14(3): 367-371.
- [12] GIOVANNI B B, SILVIA T, LUISA T, et al. Mesenchymal stem cells derived from vertebrae (vMSCs) show best biological properties [J]. Eur Spine J, 2013, 22(6): S979-S984.
- [13] ANDREAS N, LUBOS D. Mesenchymal stromal/stem cell separation methods: concise review [J]. Cell Tissue Bank, 2017, 18: 443-460.
- [14] 李鲁生, 张涵, 王成俊, 等. 骨髓间充质干细胞的分离方法和生物学特性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10): 1869-1870.
LI L S, ZHANG H, WANG C J, et al. Isolation method and biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research and Clinical Rehabilitation, 2010, 14(10): 1869-1870.
- [15] WANG P, LIU X, ZHAO L, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium [J]. Acta Biomater, 2015, 18: 236-248.
- [16] LU X, ZHAO T. Clinical therapy using iPSCs: hopes and challenges [J]. Genom Proteom Bioinf, 2013, 11(5): 294-298.
- [17] SIMONSON O E, DOMOGATSKAYA A, VOLCHKOV P, et al. The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment [J]. Ann Med, 2015, 47(5): 370-380.
- [18] WULF G G, JACKSON K A, GOODELL M A. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts [J]. Exp Hematol, 2001, 9(12): 1361-1370.
- [19] BAKER N, BOYETTE L B, TUAN R S. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging [J]. Bone, 2015, 70: 37-47.
- [20] 房君, 魏奥, 刘乐, 等. 马的骨髓间充质干细胞诱导为软骨细胞和成骨细胞及其鉴定 [J]. 动物学杂志, 2020, 55(3): 353-362.
FANG J, WEI A, LIU L, et al. Induction of horse bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocytes and osteoblasts [J]. Chinese Journal of Zoology, 2020, 55(3): 353-362.
- [21] BARA J J, RICHARDS R G, ALINI M, et al. Concise review: bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following *in vitro* culture: implications for basic research and the clinic [J]. Stem Cells, 2014, 32(7): 1713-1723.
- [22] JAISWAL S E, CAPLAN A I. Osteogenic differentiation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. Cell Biochem, 1997, 64(2): 295.
- [23] 董雪, 侯佳琪, 梁旭月, 等. 骨钙素的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37(1): 67-69.
DONG X, HOU J Q, LIANG X Y, et al. Research progress of osteocalcin [J]. Journal of Jilin Medical University, 2016, 37(1): 67-69.
- [24] ZOU J, YUAN C X, WU C S, et al. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Connect Tissue Res, 2014, 55: 304-309.
- [25] HERNIGOU P, TROUSSELIER M, ROUBINEAU F, et al. Stem cell therapy for the treatment of hip osteonecrosis: a 30-year review of progress [J]. Clin Orthop Surg, 2016, 8(1): 1-8.
- [26] 李民, 李书奎, 陈汉文, 等. 髓芯减压后自体MCS移植治疗早期股骨头坏死效果 [J]. 齐鲁医学杂志, 2016, 31(3): 340-341.
LI M, LI S K, CHEN H W, et al. Effect of autologous MCS transplantation after core decompression in the treatment of early femoral head necrosis [J]. Qilu Medical Journal, 2016, 31(3): 340-341.
- [27] SEO B B, CHOI H, KOH J T, et al. Sustained BMP-2 delivery and injectable bone regeneration using thermosensitive polymeric nanoparticle hydrogel bearing dual interactions with BMP-2 [J]. J Control Release, 2015, 209: 67-76.
- [28] 徐世旭, 阳富春. 骨形态发生蛋白的成骨作用及其在骨组织工程中的应用 [J]. 医学综述, 2008, 14(2): 193-195.
XU S X, YANG F C. Osteogenesis of bone morphogenetic protein and its application in bone tissue engineering [J]. Medical Review, 2008, 14(2): 193-195.
- [29] PARK D, SPENCER J A, KOH B I, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(3): 259-272.
- [30] 安新玲, 韩金祥, 王世力. 骨形态发生蛋白的研究进展 [J]. 食品与药品, 2009, 11(11): 69-73.
AN X L, HAN J X, WANG S L. Research progress of bone morphogenetic protein [J]. Food and Drug, 2009, 11(11): 69-73.
- [31] WANG T S, TENG S F, ZHANG Y X, et al. Role of mesenchymal stem

- cells on differentiation in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13: 669-675.
- [32] TIAN L, WEN Q, DANG O, et al. Immune response associated with Toll-like receptor 4 signaling pathway leads to steroid-induced femoral head osteonecrosis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15: 18.
- [33] 杨丽, 张荣华, 朱晓峰, 等. 骨代谢与 TGF- β 1、BMP-2 的关系[J]. *山东医药*, 2004, 44(15): 57-58.
- YANG L, ZHANG R H, ZHU X F, et al. The relationship between bone metabolism and TGF- β 1, BMP-2[J]. *Shandong Medical Journal*, 2004, 44(15): 57-58.
- [34] CUI L, YIN S, LIU W, et al. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2 [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(6): 1185-1195.
- [35] LU H H, SONG W X, LUO X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(5): 665-677.
- [36] ROZENBERG S, VANDROMME J, ANTOINE C. ostenopausal hormone therapy: risks and benefits[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(4): 216-227.
- [37] WANG Y, YAN M, YU Y. Estrogen deficiency inhibits the odonto/osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via activation of the NF- κ B pathway[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(3): 551-559.
- [38] CAI C, YUAN G J, HUANG Y, et al. strogen-related receptor α is involved in the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligaments[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5): 1195-1201.
- [39] SONG I H, CAPLAN A I, DENNIS J E. *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells *in vivo*[J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(7): 916-921.
- [40] OSHINA H, SOTOME S, YOSHII T, et al. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells[J]. *Bone*, 2007, 41(4): 575-583.
- [41] DERFOUL A, PERKINS G L, HALL D J, et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(6): 1487-1495.
- [42] TANGTRONGSUP S, KISIDAY J D. Effects of dexamethasone concentration and timing of exposure on chondrogenesis of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cartilage*, 2016, 7(1): 92-103.
- [43] FAN Q, ZHAN X, LI X, et al. Vanadate inhibits dexamethasone-induced apoptosis of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(2): 173-180.
- [44] ROBINSON D, BAB I, NEVO Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(5): 690-696.
- [45] SAMMONS J, AHMED N, ELSHEEMY M, et al. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3)[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(3): 273-280.
- [46] BONEWALD L F, MUNDY G R. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1990 (250): 261-276.
- [47] BAI Y, YIN G F, HUANG Z B, et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and osteogenesis in tissue engineering[J]. *Int Immunol*, 2013, 2(16): 214-223.
- [48] BANFI A, MURAGLIA A, DOZIN B, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(6): 707-715.
- [49] BIANCHI G, BANFI A, MASTROGIACOMO M, et al. *Ex vivo* enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 287(1): 98-105.
- [50] MARIE P J, HAY E, SAIDAK Z. Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(11): 567-575.
- [51] HU H, YANG L, WANG Z, et al. Overexpression of integrin α 2 promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(5): 841.
- [52] FATEMEH A, ALI M, MICHAEL P S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(10): 1150-1163.
- [53] 王皓沿, 海鑫. 白藜芦醇对小鼠骨髓间充质干细胞成骨/成脂分化的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2018, 52(2): 99-104.
- WANG H Y, HAI X. Effect of resveratrol on osteogenic/adipogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2018, 52(2): 99-104.
- [54] MASAYOSHI Y, ZHU S J, NEALE W M, et al. Curcumin analog UBS109 prevents bone marrow osteoblastogenesis and osteoclastogenesis disordered by coculture with breast cancer MDA-MB-231 bone metastatic cells *in vitro*[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 401: 1-10.
- [55] AZUMA K, ZHOU Q, KUBO K Y. Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6(SAMP6)[J]. *Med Mol Morphol*, 2018, 51(3): 139-146.
- [56] FLORES A R, TAMI S G, PIMENTEL F L, et al. Aging impairs osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells grown on titanium by favoring adipogenesis[J]. *J Appl Oral Sci*, 2016, 24: 376-382.
- [57] RODAN G A. Therapeutic approaches to bone diseases[J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [58] HAMADEH I S, NGWA B A, GONG Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw[J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(5): 455-464.
- [59] KAISER T, TEUFEL I, GEIGER K, et al. Bisphosphonates modulate vital functions of human osteoblasts and affect their interactions with breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 140(1): 35-48.
- [60] ITO H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources[J]. *Mod Rheumatol*, 2011, 21(2): 113-121.
- [61] CRISTINA D A, FEDERICA C, JORGE P E, et al. Vitamin C in stem cell biology: impact on extracellular matrix homeostasis and epigenetics[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 8936156.
- [62] 孙博, 张强, 杨龙, 等. EPHA2 在人骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(5): 433-437.
- SUN B, ZHANG Z, YANG T, et al. The role of EPHA2 in osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Guiyang Medical College*, 2015, 40(5): 433-437.
- [63] SONG M, ZHAO D, WEI S, et al. The effect of electromagnetic fields on the proliferation and the osteogenic or adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells modulated by examethasone [J]. *Bioelectromagnetics*, 2014, 35(7): 479-490.
- [64] YUASA M, YAMADA T, TANIYAMA T, et al. Dexamethasone enhances osteogenic differentiation of bone marrow-and muscle-derived stromal cells and augments ectopic bone formation induced by bone morphogenetic rotein-2 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116462.
- [65] GROTE K, PETRI M, LIU C, et al. Toll-like receptor 2/6-dependent stimulation of mesenchymal stem cells promotes angiogenesis by

- paracrine factors[J]. *Eur Cell Mater*, 2013, 26: 66-79.
- [66] 李理. 新型氯化锂复合磷酸钙骨水泥对成骨细胞增殖及分化的影响[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- LI L. Effects of new lithium chloride compound calcium phosphate bone cement on proliferation and differentiation of osteoblasts[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2016.
- [67] LIU H, WEI L K, JIAN X F, et al. Isolation, culture and induced differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into osteoblasts[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15: 3715-3724.
- [68] CARREIRA A C, LOJUDICE F H, HALCSIK E, et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives[J]. *J Dent Res*, 2014, 93(4): 335-345.
- [69] MAJIDINIA M, ALIZADEH E, YOUSEFI B, et al. Downregulation of notch signaling pathway as an effective chemosensitizer for cancer treatment[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2016, 66(11): 571-579.
- [70] MAJIDINIA M, ALIZADEH E, YOUSEFI B, et al. Co-inhibition of notch and NF- κ B signaling pathway decreases proliferation through downregulating I κ B- α and Hes-1 expression in human ovarian cancer oVCAR-3 cells[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2017, 67(1): 13-19.
- [71] JAN G, ZHUANGLI Y, NICHOLAS T. Developmental drift and the role of wnt signaling in aging[J]. *Cancers*, 2016, 8(8): 73.
- [72] SHI J, CHI S H, XUE J, et al. Emerging role and therapeutic implication of wnt signaling pathways in autoimmune diseases[J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 9392132.
- [73] 梁广胜, 陈伟才, 殷婷婷, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程BMP-2/RUNX2/OSX通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(5): 614-618.
- LIANG G S, CHEN W C, YIN C C, et al. effect of total flavonoids of herba epimedium on BMP-2/RUNX2/OSX signaling pathway during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2016, 36(5): 614-618.
- [74] QIN S, ZHOU W, LIU S, et al. Icaritin stimulates the proliferation of rat bone mesenchymal stem cells via ERK and p38 MAPK signaling[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 7125-7133.
- [75] WEI Q, ZHANG J, HONG G, et al. Icaritin promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by activating the ER α -Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 931-939.
- [76] 侯费祎, 谢兴文, 席芳琴, 等. 麝香酮含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖、分化的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013, 34(1): 110-114.
- HOU F Y, XIE X W, XI F Q, et al. Effects of muscone-containing serum on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2013, 34(1): 110-114.
- [77] 张洪长, 张莹, 刘明昕, 等. 鹿茸多肽对人骨髓间充质干细胞BMP-2和RUNX2表达的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3): 491-495.
- ZHANG H C, ZHANG Y, LIU M X, et al. Influence of velvet antler polypeptides in expressions of BMP-2 and Runx2 in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Jilin University (Medical Edition)*, 2015, 41(3): 491-495.
- [78] 李文凯, 张英弛, 韦盛, 等. 三磷酸腺苷对骨髓间充质干细胞成骨和成脂分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5085-5091.
- LI W K, ZHANG Y C, WEI S, et al. Regulating osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by extracellular adenosine triphosphate [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2015, 19(32): 5085-5091.
- [79] ZHANG J F, LI G, MENG C L, et al. Total flavonoids of Herba Epimedium improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16: 521-529.
- [80] 王俊, 曲铁兵, 储利胜, 等. 川芎嗪上调 MMP-2、MMP-9 表达促进骨髓间充质干细胞迁移[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(6): 718-723.
- WANG J, QU T B, CHU L S, et al. Ligustrazine promoted the migration of bone marrow mesenchymal stem cells by up-regulating MMP-2, and MMP-9 expressions[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2016, 36(6): 718-723.
- [81] 熊光谱, 王斌, 刘亚梅, 等. 补肾活血汤含药血清对骨髓间充质干细胞迁移及CXCR4表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(1): 76-91.
- XIONG Y P, WANG B, LIU Y M, et al. Effect of serum containing bushen huoxue decoction on bone marrow mesenchymal stem cells migration and CXCR4 expression [J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 34(1): 76-91.
- [82] 高璐, 郑洪新, 陈谊敬, 等. 淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷正交配伍调控Bmp2、Smad1、4诱导BMSCs成骨分化的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 5(5): 1108-1116.
- GAO L, ZHENG H X, CHEN Y J, et al. Orthogonal compatibility of icaritin, psoralen, oleanolic acid, stilbene glucoside on regulation of Bmp2, Smad1, and Smad 4 induced osteogenic differentiation of BMSCs [J]. *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 5(5): 1108-1116.
- [83] 刘国岩, 徐展望, 徐琬梨. 骨碎补提取物对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化及CXCL12表达的影响及意义[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1484-1487.
- LIU G Y, XU Z W, XU W L. Effects and significance of drynaria extract on expressions of CXCL12 and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2013, 28(5): 1484-1487.
- [84] 黄小兵, 李靖, 梁平, 等. 龟板含药血清对骨髓间充质干细胞c-met表达及迁移的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(11): 569-571.
- HUANG X B, LI J, LIANG P, et al. Effects of seropharmacological plastrum testudinis on c-met expression and migration of mesenchymal stem cells[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion*, 2013, 21(11): 569-571.
- [85] 张艳红, 谢焕松, 夏树林, 等. 杜仲对大鼠骨髓基质细胞骨桥蛋白和骨保护素表达的影响 水提液与醇提液有区别吗?[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(2): 262-266.
- ZHANG Y H, XIE H S, XIA S L, et al. Effect of eucommia bark on osteopontin and osteoprotegerin expressions in rat bone marrow stem cells: is there any difference between water extract and methanol extract? [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010, 14(2): 262-266.
- [86] 张坤, 牛良晨, 袁福杰, 等. 中药促进骨折愈合在细胞分子水平的研究进展[J]. 中国骨伤, 2017, 30(8): 777-782.
- ZHANG K, NIU L C, YUAN F J, et al. Research on promotory effect of traditional Chinese medicine on fracture healing in cell and molecular level[J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2017, 30(8): 777-782.
- [87] 王建华, 王艳, 潘永梅. 补骨脂素对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(5): 844-846.
- WANG J H, WANG Y, PAN Y M. Effects of psoralen on proliferation and differentiation of cultured osteoblasts *in vitro* [J]. *Natural Product Research and Development*, 2007, 19(5): 844-846.
- [88] SALIM A, NACAMULI R P, MORGAN E F, et al. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2

- expression in osteoblasts[J]. J Biol Chem, 2004, 279(38): 40007-40016.
- [89] 李宁, 吴桂英, 李启明, 等. 不同氧浓度微环境对大鼠骨髓间充质干细胞成骨及成脂肪分化的影响[J]. 重庆医学, 2009, 38(19): 2448-2450.
- LI N, WU G Y, LI Q M, et al. Effects of different oxygen concentration microenvironment on the osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells[J]. Chongqing Medical Journal, 2009, 38(19): 2448-2450.
- [90] WATANUKI M, KISHIMOTO K N, KOTAJIMA S, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on scaffold-free ectopic bone formation in skeletal muscle[J]. Ups J Med Sci, 2009, 114(4): 242-248.
- [91] YONG Y, MING Z D, FENG L, et al. Electromagnetic fields promote osteogenesis of rat mesenchymal stem cells through the PKA and ERK1/2 pathways[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2016, 10(10): E537-E545.
- [92] 李文凯, 张英驰, 杨勇, 等. 嘌呤受体 P2X7 在电磁场调节骨髓间充质干细胞成骨分化中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(7): 1240-1242.
- LI W K, ZHANG Y C, YANG Y, et al. Role of P2X7 receptor in the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells induced by electromagnetic fields[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2019, 36(7): 1240-1242.
- [93] 周建, 陈克明, 葛宝丰, 等. 不同强度静电磁场对外培养骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 650-657.
- ZHOU J, CHEN K M, GE B F, et al. Proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in static electromagnetic fields of different intensities *in vitro* [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(7): 650-657.
- [94] 薛令法, 张岱尊, 肖文林, 等. 机械牵张力促进小鼠骨髓间充质干细胞的成骨向分化[J]. 国际口腔医学杂志, 2017, 44(6): 679-685.
- XUE L F, ZHANG D Z, XIAO W L, et al. Mechanical strain induces mouse bone mesenchymal stem cells osteogenic differentiation[J]. International Journal of Stomatology, 2017, 44(6): 679-685.
- [95] ELDER S H, SANDERS S W, MCCULLEY W R, et al. Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture [J]. J Orthop Res, 2006, 24(4): 740-747.
- [96] YIM E K, SHEETZ M P. Force-dependent cell signaling in stem cell differentiation[J]. Stem Cell Res Ther, 2012, 3(5): 41.
- [97] ELLEGAARD M, KRINGELBACH Y, SYBERG S, et al. The effect of PTH(1-34) on fracture healing during different loading conditions [J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(10): 2145-2155.
- [98] RACHMIEL A, EMODI O, GUTMACHER Z, et al. Oral and dental restoration of wide alveolar cleft using distraction osteogenesis and temporary anchorage devices[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2013, 41(8): 728-734.
- [99] 孙彬, 段浩, 钟宗雨, 等. 骨髓间充质干细胞对机械力学微环境的响应: 观点、现状、思考与未来[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(25): 4075-4081.
- SUN B, DUAN H, ZHONG Z Y, et al. Response of bone marrow mesenchymal stem cells to mechanical microenvironment: viewpoint, actuality, thinking and future [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2019, 23(25): 4075-4081.
- [100] HE X T, WU R X, XU X Y, et al. Macrophage involvement affects matrix stiffness-related influences on cell osteogenesis under three-dimensional culture conditions[J]. Acta Biomater, 2018, 71: 132-147.
- [101] OH S H, AN D B, KIM T H, et al. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior[J]. Acta Biomater, 2016, 35: 23-31.
- [102] RAVELING A R, THEODOSSIOU S K, SCHIELE N R. A 3D printed mechanical bioreactor for investigating mechanobiology and soft tissue mechanics[J]. MethodsX, 2018, 5: 924-932.
- [103] PROCKOP D J, OH J Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation[J]. Mol Ther, 2012, 20(1): 14-20.
- [104] LI W, REN G, HUANG Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(9): 1505-1513.
- [105] 边培育, 雷迎峰. 间充质干细胞免疫调控作用可塑性的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 44(6): 89-92.
- BIAN P Y, LEI Y F. Advances on immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2016, 44(6): 89-92.
- [106] HEMEDA H, JAKOB M, LUDWIG A K, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19: 693-706.
- [107] MISHIMA Y, LOTZ M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2008, 26(10): 1407-1412.
- [108] LI W, REN G, HUANG Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune response[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(9): 1505-1513.
- [109] SELMANI Z, NAJI A, ZIDI I, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25 high FOXP3+regulatory T cells[J]. Stem Cells, 2008, 26(1): 212-222.
- [110] REN G, ZHANG L, ZHAO X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs *via* concerted action of chemokines and nitric oxide[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 141-150.
- [111] ORTIZ L A, GAMBELLI F, MCBRIDE C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [112] OROZCO L, MUNAR A, SOLER R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study[J]. Transplantation, 2013, 95(12): 1535-1541.
- [113] MAKINO T, HAK D J, HMLWOOD S J, et al. Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7[J]. J Orthop Res, 2005, 23(3): 632-638.
- [114] 赵传勇, 丁艳芳, 张文志, 等. 骨髓间充质干细胞联合茶黄素修复激素性股骨头坏死[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(32): 5210-5214.
- ZHAO C Y, DING Y F, ZHANG W Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with theaflavin for steroid-induced avascular necrosis of femoral head [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2015, 19(32): 5210-5214.
- [115] OSUGI M, KATAGIRI W, YOSHIMI R, et al. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(13-14): 1479-1489.
- [116] DOGAN A, DEMIRCI S, BAYIR Y, et al. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 44: 246-253.
- [117] WEI B, YAO Q, GUO Y, et al. Three-dimensional polycaprolactone hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow cells for cartilage tissue engineering[J]. J Biomater Appl, 2015, 30(2): 160-170.
- [118] LI X, WANG Y, AN G, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells attenuate silica-induced pulmonary fibrosis *via* paracrine mechanisms

- [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 270: 96.
- [119] HARE J M, TRAVERSE J H, HENRRY T D, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells(prochymal) after acute myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(24): 2277-2286.
- [120] BANG O Y, LEE J S, LEE P H, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients[J]. *Ann Neurol*, 2005, 57(6): 874-882.
- [121] TSAI M, TSAI S, HU B, et al. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats[J]. *Biomed Sci*, 2014, 21(1): 5.
- [122] XU L, WANG S, SUI X, et al. Mesenchymal stem cell-seeded regenerated silk fibroin complex matrices for liver regeneration in an animal model of acute liver failure[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(17): 14716-14723.
- [124] OROZCO L, SOLER R, MORREA C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study[J]. *Transplantation*, 2011, 92(7): 822-828.
- [125] PENG L, XIE D Y, LIN B L, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: shortterm and long-term outcomes[J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 820-828.
- [126] MOHAMED E M, SAMAK M A. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells on the renal cortex of experimentally induced hypertensive albino rats: relevant role of Nrf2[J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(2): 358.
- [127] HANG H L, XIA Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 126-132.
- [128] MADEC A M, MALLONE R, AFONSO G, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(7): 1391-1399.
- [129] VERONESI F, TORRICELLI P, DELLA B E, et al. In vitro mutual interaction between tenocytes and adipose-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Cytherapy*, 2015, 17(2): 215-223.
- [130] SCHLEGEL F, APPLER M, HALLING M, et al. Reprogramming bone marrow stem cells to functional endothelial cells in a mini pig animal model[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23: 285-294.
- [131] BARBA A, MAAZOUZ Y, DIEZ-ESCUADERO A, et al. Osteogenesis by foamed and 3D-printed nanostructured calcium phosphate scaffolds: effect of pore architecture[J]. *Acta Biomater*, 2018, 79: 135-147.
- [132] WANG P, ZHAO L, CHEN W, et al. Stem cells and calcium phosphate cement scaffolds for bone regeneration[J]. *J Dent Res*, 2014, 93(7): 618-625.
- [133] KAGAMI H, AGATA H, INOUE M, et al. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20: 229-320.
- [134] BOEHM A V, MEININGER S, TESCH A, et al. The mechanical properties of biocompatible apatite bone cement reinforced with chemically activated carbon fibers[J]. *Materials (Basel)*, 2018, 11(2): 192.
- [135] GUO H, SU J, WEI J. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(1): 268-278.
- [136] BEARDEN R N, HUGGINS S S, CUMMINGS K J, et al. *In-vitro* characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 218.
- [137] OLVERA D, SATHY B N, CARROLL S F, et al. Modulating microfibrillar alignment and growth factor stimulation to regulate mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Acta Biomater*, 2017, 64: 148-160.
- [138] TAL I, YAEEL K I, EMIL R, et al. Chondrogenesis of hMSC in affinitybound TGF-beta scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2013, 33(3): 751-761.
- [139] CAPLAN A J, ELYADERANI M, MOCHUZYKI Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration[J]. *Clin Orthop*, 1997, 12(342): 254-269.
- [140] JAMMALAMADAKA U, TAPPA K. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering[J]. *J Funct Biomater*, 2018, 9(1): e22.
- [141] 张钰. 聚醚醚酮仿生人工骨3D打印热力学仿真及实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- ZHANG Y. Thermodynamic simulation and experiment of 3D printing of bionic artificial bone with Polyetheretherketone (PEEK) [D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [142] HE J K, LI D C, LU B H, et al. Custom fabrication of a composite hemi-knee joint based on rapid prototyping[J]. *Rapid Prototyping J*, 2006, 12(4): 198-205.
- [143] VENTOLA C L. Medical applications for 3D printing: current and projected uses[J]. *PM & T*, 2014, 39(10): 704-711.
- [144] HUH D, TORISAWA Y S, HAMILTON G A, et al. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips[J]. *Lab Chip*, 2012, 12: 2156-2164.
- [145] INGBER D E, MOW V C, BUTLER D, et al. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12: 3265-3283.
- [146] INZANA J A, OLVERA D, FULLER S M, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 4026-4034.
- [147] SEOL Y J, KANG T Y, CHO D W. Solid freeform fabrication technology applied to tissue engineering with various biomaterials[J]. *Soft Matter*, 2012, 8(6): 1730-1735.
- [148] OZBOLAT I T, YU Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2013, 60(3): 691-699.
- [149] CHAREST K, MAK-JURKAUSKAS M L, CINICOLA D, et al. Fused deposition modeling provides solution for magnetic resonance imaging of solid dosage form by advancing design quickly from prototype to final product[J]. *J Lab Autom*, 2013, 18(1): 63-68.
- [150] HONG J M, KIM B J, SHIM J H, et al. Enhancement of bone regeneration through facile surface functionalization of solid freeform fabrication-based three-dimensional scaffolds using mussel adhesive proteins[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(7): 2578-2586.
- [151] MATSUO A, CHIBA H, TAKAHASHI H, et al. Clinical application of a custom-made bioresorbable raw particulate hydroxyapatite/poly-L-lactide mesh tray for mandibular reconstruction[J]. *Odontology*, 2010, 98(1): 85-88.
- [152] MELCHELS F P, FEIJEN J, GRIJPMAN D W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(24): 6121-6130.
- [153] GITTARD S D, NARAYAN R J. Laser direct writing of micro-and nano-scale medical devices[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2010, 7(3): 343-356.
- [154] 赵静一, 禹娜娜, 邓平平. 骨组织工程支架内微管孔结构的研究现

- 状[C]//第六届全国流体传动与控制学术会议论文集. 中国机械工程学会, 2010: 1-5.
- ZHAO J Y, YU N N, DENG P P. Research status of microtubule pore structure in bone tissue engineering scaffolds[C]//Proceedings of the 6th National Conference on Fluid Transmission and Control. Chinese Society of Mechanical Engineering, 2010: 1-5.
- [155] 李祥, 李涤尘, 王林, 等. 可控多孔结构支架制备及灌注式体外培养[J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 579-583.
- LI X, LI D C, WANG L, et al. Fabrication of scaffold with controlled porous structure and flow perfusion culture *in vitro* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(4): 579-583.
- [156] HOLLISTER S J. Scaffold design and manufacturing: from concept to clinic[J]. Adv Mater Weinheim, 2009, 21(32-33): 3330-3342.
- [157] PANETTA N J, GUPTA D M, LONGAKER M T. Bone tissue engineering scaffolds of today and tomorrow[J]. J Craniofac Surg, 2009, 20(5): 1531-1532.
- [158] LACROIX D, CHATEAU A, GINEBRA M P, et al. Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds[J]. Biomaterials, 2006, 27(30): 5326-5334.
- [159] 张伟忠, 李磊, 何贺, 等. 纳米纤维大孔支架制备技术在骨组织工程研究中的应用与意义[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(28): 4437-4444.
- ZHANG W Z, LI L, HE H, et al. Application and significance of nanofibrous macroporous scaffold preparation technology for bone tissue engineering [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2020, 24(28): 4437-4444.
- [160] 徐鸿玮, 韩冰. 颌骨组织工程支架材料机械强度增强方法研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(9): 600-606.
- XU H W, HAN B. Research progress in mechanical strength enhancement methods of jaw tissue engineering scaffolds[J]. Journal of Dental Prevention & Treatment, 2020, 28(9): 600-606.
- [161] SABREE I, GOUGH J E, DERBY B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: influence of internal dimensions[J]. Ceram Int, 2015, 41(7): 8425-8432.
- [162] 石正松, 李强, 宁寅宽, 等. hBMP-2 基因转染兔骨髓间充质干细胞体内移植后 hBMP-2 的活性检测[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(11): 1333-1337.
- SHI Z S, LI Q, NING Y K, et al. Detection of hBMP-2 activity after transplantation of hBMP-2 gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015, 21(11): 1333-1337.
- [163] YEO M, LEE J S, CHUN W, et al. An innovative collagen-based cell-printing method for obtaining human adipose stem cell-laden structures consisting of core-sheath structures for tissue engineering [J]. Biomacromolecules, 2016, 17(4): 1365-1375.
- [164] JOSE R R, BROWN J E, POLIDO K E, et al. Polyol-silk bioink formulations as two-part room-temperature curable materials for 3D printing[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2015, 1(9): 780-788.
- [165] DANIEL DM, HABIBOVIC P. Biomineralization-inspired material design for bone regeneration [J]. Adv Healthc Mater, 2018, 7: e1800700.
- [166] PARK S Y, CHOI J W, PARK J K, et al. Tissueengineered artificial oesophagus patch using threedimensionally printed polycaprolactone with mesenchymal stem cells: a preliminary report [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016, 22(6): 712-717.
- [167] SIDDIQUI H A, PICKERING K L, MUCALO M R. A Review on the use of hydroxyapatite-carbonaceous structure composites in bone replacement materials for strengthening purposes [J]. Materials (Basel), 2018, 11(10): 1813.
- [168] ANTALYA H S, JOHANNA B, RUSTOM L E, et al. Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives [J]. Biomaterials, 2018, 180: 143-162.
- [169] WANG W, YEUNG K W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review[J]. Bioact Mater, 2017, 2(4): 224-247.
- [170] DHIVYA S, KESHAV N A, LOGITH K R, et al. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds containing chitosan, calcium polyphosphate and pigeonite for bone tissue engineering[J]. Cell Prolif, 2018, 51(1): e12408.
- [171] KE X, ZHUANG C, YANG X, et al. Enhancing the osteogenic capability of core-shell bilayered bioceramic microspheres with adjustable biodegradation[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(29): 24497-24510.
- [172] ZHU Y, ZHANG K, ZHAO R, et al. Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs [J]. Biomaterials, 2017, 147: 133-144.
- [173] WANG D, LIN Y, CHEN L, et al. Guided bone regeneration using a bone tissue engineering complex consisting of a poly-dl-lactide membrane and bone mesenchymal stem cells[J]. Oncotarget, 2017, 9(23): 16380-16388.
- [174] KIM I G, HWANG M P, DU P, et al. Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing[J]. Biomaterials, 2015, 50: 75-86.
- [175] 刘相杰, 宋科官. 生物支架材料及间充质干细胞在骨组织工程中的研究与应用[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(10): 1618-1624.
- LIU X J, SONG K G. Biological scaffolds and mesenchymal stem cells in bone tissue engineering[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2018, 22(10): 1618-1624.
- [176] WANG Y, WANG K, LI X, et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60: 40 for bone tissue engineering applications [J]. PLoS One, 2017, 12: e0174870.
- [177] KUTIKOV A B, SKELLY J D, AYERS D C, et al. Templated repair of long bone defects in rats with bioactive spiral-wrapped electrospun amphiphilic polymer/hydroxyapatite scaffolds[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(8): 4890-4901.
- [178] INZANA J A, OLVERA D, FULLER S M, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration[J]. Biomaterials, 2014, 35(13): 4026-4034.
- [179] RAFTERY R M, MENCÍA CASTAÑO I, CHEN G, et al. Translating the role of osteogenic-angiogenic coupling in bone formation: highly efficient chitosan-pDNA activated scaffolds can accelerate bone regeneration in critical-sized bone defects[J]. Biomaterials, 2017, 149: 116-127.
- [180] RAFTERY R M, MENCÍA-CASTAÑO I, SPERGER S, et al. Delivery of the improved BMP-2-Advanced plasmid DNA within a gene-activated scaffold accelerates mesenchymal stem cell osteogenesis and critical size defect repair[J]. J Control Release, 2018, 283: 20-31.
- [181] ANAND S, REJULA F, SAM J V, et al. Comparative evaluation of effect of nano-hydroxyapatite and 8% arginine containing toothpastes in managing dentin hypersensitivity: double blind randomized clinical trial[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2017, 60: 114-119.
- [182] KHOROUSHI M, FOROUGH M R, KARBASI S, et al. Effect of Polyhydroxybutyrate/Chitosan/Bioglass nanofiber scaffold on proliferation and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth into odontoblast-like cells[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018(89): 128-139.
- [183] BRANDT J, HENNING S, MICHLER G, et al. Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study[J]. J Mater Sci Mater

- Med, 2010, 21(1): 283-294.
- [184] SOLAIMAN T, NEAL M, DAVIES A B, et al. 3D printed tricalcium phosphate scaffolds: effect of SrO and MgO doping on *in vivo* osteogenesis in a rat distal femoral defect model[J]. Biomater Sci, 2014, 1(12): 1250-1259.
- [185] 刘琳, 包广洁. 牙髓牙本质组织工程生物支架材料的研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(8): 1455-1460.
- LIU L, BAO G J. Biological scaffolds for pulp-dentin tissue engineering[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2013, 17(8): 1455-1460.
- [186] YUAN H, FERNANDES H, HABIBOVIC P, et al. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(31): 13614-13619.
- [187] GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 97(25): 13625-13630.
- [188] HONG S, SYCKS D, CHAN H F, et al. 3D printing: 3D printing of highly stretchable and tough hydrogels into complex, cellularized structures[J]. Adv Mater, 2015, 27(27): 4034.
- [189] HSU S H, HUANG T B, CHENG S J, et al. Chondrogenesis from human placental derived mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(11-12): 1549-1560.
- [190] CALASANS-MAIA M D, MELO B R, ALVES A T, et al. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair[J]. J Appl Oral Sci, 2015, 23(6): 599-608.
- [191] MARKSTEDT K, MANTAS A, TOURNIER I, et al. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering application[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(5): 1489-1496.
- [192] MEINEL L I, HOFMANN S, KARAGEORGIOU V, et al. The inflammatory responses to silk films *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomaterials, 2005, 26(2): 147-155.
- [193] TAO H, MARELLI B, YANG M, et al. Inkjet printing of regenerated silk fibroin: from printable forms to printable functions[J]. Adv Mater, 2015, 27(29): 4273-4279.
- [194] 孙凯, 年争好, 徐成, 等. 丝素蛋白复合胶原蛋白支架的制备及性能研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(7): 903-908.
- SUN K, NIAN Z H, XU C, et al. Preparation and performance research of silk fibroin collagen blend scaffold [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2014, 28(7): 903-908.
- [195] SEOL Y J, LEE J Y, PARK Y J, et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(13): 1037-1041.
- [196] REED S, LAU G, DELATTRE B, et al. Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing[J]. Biofabrication, 2016, 8(1): 015003.
- [197] CHEN Y, LIU X, LIU R, et al. Zero-order controlled release of BMP2-derived peptide P24 from the chitosan scaffold by chemical grafting modification technique for promotion of osteogenesis *in vitro* and enhancement of bone repair *in vivo*[J]. Theranostics, 2017, 7(5): 1072-1087.
- [198] LEE J H, EL-FIQI A, HAN C M, et al. Physically-strengthened collagen bioactive nanocomposite gels for bone: a feasibility study[J]. Tissue Eng Regen Med, 2015, 12(2): 90-97.
- [199] LIEN S M, CHIEN C H, HUANG T J. A novel osteochondral scaffold of ceramic-gelatin assembly for articular cartilage repair[J]. Mater Sci Eng C, 2009, 29(1): 315-321.
- [200] SHI W L, SUN M Y, HU X Q, et al. Structurally and functionally optimized silk-fibroin-gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury *in vitro* and *in vivo* [J]. Adv Mater, 2017, 29(29): 1701089.
- [201] MANNOOR M S, JIANG Z, JAMES T, et al. 3D printed bionic ears [J]. Nano Lett, 2013, 13(6): 2634-2639.
- [202] POLDERVAART M T, GOVERSEN B, DE R M, et al. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity[J]. PLoS One, 2017, 12: e0177628.
- [203] SOMAN P, FOZDAR D Y, LEE J W, et al. A Three-dimensional polymer scaffolding material exhibiting a zero poisson's ratio[J]. Soft Matter, 2012, 8: 4946-4951.
- [204] BRYANT S J, ANSETH K S. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol)hydrogels[J]. J Biomed Mater Res, 2002(59): 63-72.
- [205] GAO G, HUBBELL K, SCHILLING A F, et al. Bioprinting cartilage tissue from mesenchymal stem cells and PEG hydrogel[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1612: 391-398.
- [206] TAY B Y, ZHANG S X, MYINT M H, et al. Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development[J]. J Mater Process Technol, 2007, 182(1-3): 117-121.
- [207] 张海峰, 杜子婧, 姜闻博. 3D打印PLA-HA复合材料与骨髓基质细胞的相容性研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11(6): 349-353.
- ZHANG H F, DU Z J, JIANG W B. Biocompatibility research of three-dimensional printed polylactic acid/hydroxyapatite composite with bone marrow stromal cells *in vitro* [J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2015, 11(6): 349-353.
- [208] 许文慧, 于颖, 杨婷, 等. 新型可3D打印聚酰胺的制备及其性能研究[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2018, 2(4): 405-410.
- XU W H, YU Y, YANG T, et al. The synthesis and properties of new 3D-printable polyimide [J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Sciences Edition), 2018, 2(4): 405-410.
- [209] 陈彩珠, 潘汉军. 3D打印高分子材料研究进展[J]. 工程塑料应用, 2016, 44(9): 137-140.
- CHEN C Z, PAN H J. Research progress of 3D printing polymer materials[J]. Engineering Plastics Application, 2016, 44(9): 137-140.
- [210] 赖毓霄, 李龙, 李烨, 等. 基于新型3D打印技术的复合活性多孔骨修复支架的研发[C]//2015年全国高分子学术论文报告会论文集. 中国化学会, 2015: 759.
- LAI Y X, LI L, LI Y, et al. Research and development of composite bioactive porous bone repair scaffold based on new 3D printing technology [C]// Proceedings of 2015 national polymer academic papers conference. Chinese Chemical Society, 2015: 759.
- [211] MORTAZAVI V, NAHRKHALAJI M M, FATHI M H, et al. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 94A(1): 160-168.
- [212] RIZWAN M, HAMDY M, BASIRUN W J. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105: 3197-3223.
- [213] 邵惠锋. 3D打印活性陶瓷骨修复支架研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- SHAO H F. Research on 3D printed bioactive ceramic bone repair scaffold[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [214] DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. BMC Med, 2011, 9: 66.
- [215] AL-AHMAD A, WIEDMANN AL-AHMAD M, FACKLER A, et al. *In vivo* study of the initial bacterial adhesion on different implant materials[J]. Arch Oral Biol, 2013, 58(9): 1139-1147.
- [216] CHUNG K K, SCHUMACHER J F, SAMPSON E M, et al. Impact

- of engineered surface microtopography on biofilm formation of staphylococcus aureus[J]. *Biointerphases*, 2007, 2(2): 89-94.
- [217] 伍卫刚, 郑启新, 郭晓东. 基于三维打印技术的多药控释型载药人工骨生物学评价[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2009, 32(5): 262-266.
- WU W G, ZHENG Q X, GUO X D. Biocompatibility of porous drug implant scaffolds based on 3D printing technology[J]. *International Journal of Biomedical Engineering*, 2009, 32(5): 262-266.
- [218] CUI Z K, KIM S, BALJON J J, et al. Design and characterization of a therapeutic non-phospholipid liposomal nanocarrier with osteoinductive characteristics to promote bone formation[J]. *ACS Nano*, 2017, 11: 8055-8063.
- [219] 申震, 姜自伟, 陈国茜, 等. 成血管-成骨耦联相关因子、细胞在骨中作用机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 458-463.
- SHEN Z, JIANG Z W, CHEN G Q, et al. Research progress in the mechanism of angiogenic-osteogenic coupling-related factors and cells in the bone[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(3): 458-463.
- [220] 车鹏程, 车轩, 李硕峰, 等. PVA/t-CA 软骨组织工程支架对 ATDC-5 细胞生物学行为和组织相容性的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(6): 1092-1097.
- CHE P C, CHE X, LI S F, et al. Effect of cartilage tissue engineering scaffolds PVA/t-CA on biological behavior and biocompatibility of ATDC-5 cells[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2017, 43(6): 1092-1097.
- [221] LEE V K, KIM D Y, NGO H, et al. Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(28): 8092-8102.
- [222] GARG T, SINGH O, ARORA S, et al. Scaffold, a novel carrier for cell and drug delivery[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2012, 29(1): 1-63.
- [223] KANG Y J. Vascular tissue regeneration from implantation of 3D bio-printed stem cell grafts in rhesus monkeys[J]. *J Stem Cell Res Ther*, 2017, 7(8): 32.
- [224] LUEDERS C, JASTRAM B, HETZER R, et al. Rapid manufacturing techniques for the tissue engineering of human heart valves[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46(4): 593-601.
- [225] HOCH A I, LEACH J K. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4: 412.
- [226] VISHNUBALAJI R, AL-NBAHEEN M, KADALMANI B, et al. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow-and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(2): 419-427.
- [227] HAQUE N, KASIM N H, RAHMAN M T. Optimization of pretransplantation conditions to enhance the efficacy of esenchymal stem cells[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(3): 324-334.
- [228] 陈凯, 张超, 王路, 等. 骨组织工程中促进血管化策略的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(4): 383-388.
- CHEN K, ZHANG C, WANG L, et al. Progress on strategies to promote vascularization in bone tissue engineering[J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2015, 28(4): 383-388.
- [229] NAKAYAMA Y, TAKEWA Y, SUMIKURA H, et al. In-body tissue-engineered aortic valve (Biovalve type VII) architecture based on 3D printer molding[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103: 1-11.
- [230] KFIR A, TELISHEVSKY-STRAUSS Y, LEITNER A, et al. The diagnosis and conservative treatment of a complex type 3 dens invaginated using cone beam computed tomography (CBCT) and 3D plastic models[J]. *Int Endod J*, 2013, 46: 275-288.

(编辑:陈丽霞)