

高分子水凝胶修复关节软骨损伤：安全与有效性评价

赵文^{1,2}, 刘玉英³, 刘子豪⁴, 王美⁴ (1解放军总医院(301医院)骨外科, 北京市 100853; 2北京航天总医院骨外科, 北京市 100076; 3美国南卡罗来纳州医科大学细胞治疗和分子药理系, 美国南卡罗来纳州, 查尔斯顿 29403; 4遵义医学院, 贵州省遵义市 563000)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 已有研究证实水凝胶在骨软骨组织修复工程中可作为一个具有研究前景的支架材料。
- 2 文章增加的新信息: 阐述了几种天然高分子水凝胶材料的理化特性及生物学特性, 以及改性方式。
- 3 临床应用的意义: 随着对天然高分子水凝胶机械性能与生物功能的优化, 其将从根本上减轻或治愈关节软骨的损伤及缺失或延缓关节退变, 因而在关节软骨的再生及修复领域有着可观的应用前景。

关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 天然聚合物; 生物可降解聚合物; 水凝胶; 关节软骨; 组织工程

主题词:

软骨, 关节; 水凝胶; 组织工程

基金资助:

航天总院科技基金资助项目: 高分子聚合水凝胶在骨组织工程中的应用

摘要

背景: 高分子水凝胶与关节软骨的细胞外基质组成相似, 可促进软骨细胞增殖、分化, 形成软骨板, 促进关节软骨的再生和修复。

目的: 阐述几种可降解天然高分子水凝胶及其在关节软骨修复组织工程中的最新研究进程及成果。

方法: 以“natural polymers, biodegradable polymers, hydrogel scaffold, articular cartilage, regeneration; 关节软骨, 水凝胶, 天然聚合物, 组织工程”为检索词, 应用计算机检索从 1994 年 1 月至 2013 年 7 月 PubMed 数据库、Springer 数据库、Scencedirect 数据库、Ovid 数据库及 CNKI 数据库发表天然高分子水凝胶材料相关文献。

结果与结论: 天然高分子水凝胶材料包括蛋白质类(胶原蛋白、明胶)及多糖类(壳聚糖、透明质酸)等。改性后天然高分子水凝胶不但具备关节软骨再生的理化特性, 而且具有良好的生物特性, 即组织相容性、低免疫原性、低细胞毒性、自身可降解性, 同时可促进细胞黏附、增殖与分化, 具备推动新组织再生的能力, 甚至能够作为药物、生长因子等的缓释载体, 在关节软骨再生及修复领域有着可观的应用前景。

赵文, 刘玉英, 刘子豪, 王美. 高分子水凝胶修复关节软骨损伤: 安全与有效性评价[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(34):5540-5547.

Degradable natural polymer hydrogels in articular cartilage repair: safety and effectiveness assessment

Zhao Wen^{1,2}, Liu Yu-ying³, Liu Zi-hao⁴, Wang Mei⁴ (1Department of Orthopedic Surgery, the General Hospital of Chinese PLA (301 Hospital), Beijing 100853, China; 2Department of Orthopedic Surgery, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China; 3Department of Cell and Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, 29425, USA; 4Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Polymer hydrogels composed of highly hydrated crosslinked network mimic the composites of the cartilage extracellular matrix and are embedded with articular chondrocytes not only to support chondrocytes growth but also to promote chondrocytes proliferation and division which will induce the cartilage regeneration and repair.

OBJECTIVE: To review several kinds of natural polymer hydrogels and their newest progress and achievements.

METHODS: Relative literatures from January 1994 to July 2013 were classified and analyzed by searching the databases through PubMed, Springer, Scencedirect and Ovid databases using the keywords of “natural polymers, biodegradable polymers, hydrogel scaffold, articular cartilage, regeneration”.

RESULTS AND CONCLUSION: Natural proteins (collagen, gelatin) and polysaccharides (chitosan, hyaluronic acid) are widely used as natural polymer hydrogels. The natural polymer hydrogels have not only the physical characters beneficial to articular cartilage regeneration, but also the important biological parameters, such as biocompatibility, low immunological response, low cytotoxicity and degradation. Meanwhile, the polymer hydrogels with natural origin can promote cell adhesion, proliferation and division, and enhance the regeneration of new tissue. Moreover, they also can serve as carriers to sustain the release of drugs and growth factors. All in all, natural polymer hydrogels have a potential application in articular cartilage regeneration and repair.

赵文, 男, 1968 年生, 四川省绵阳市人, 汉族, 华中科技大学同济医学院毕业, 硕士, 教授, 主任医师, 主要从事骨与关节损伤研究。

通讯作者: 赵文, 解放军总医院(301 医院)骨外科, 北京市 100853; 北京航天总医院骨外科, 北京市 100076

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.34.023
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)34-05540-08
稿件接受: 2014-07-02

Zhao Wen, Master, Professor, Chief physician, Department of Orthopedic Surgery, the General Hospital of Chinese PLA (301 Hospital), Beijing 100853, China; Department of Orthopedic Surgery, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China

Corresponding author: Zhao Wen, Department of Orthopedic Surgery, the General Hospital of Chinese PLA (301 Hospital), Beijing 100853, China; Department of Orthopedic Surgery, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China

Accepted: 2014-07-02

Subject headings: cartilage, articular; hydrogel; tissue engineering
Funding: the Science and Technology Fund of Beijing Aerospace General Hospital

Zhao W, Liu YY, Liu ZH, Wang M. Degradable natural polymer hydrogels in articular cartilage repair: safety and effectiveness assessment. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(34):5540-5547.

0 引言 Introduction

关节软骨是滑膜关节中一个关键的结缔组织, 在承受强大机械应力的同时为关节提供润滑, 由软骨细胞及细胞外基质构成。关节软骨组织在疾病、创伤或自然退变损伤关节后, 由于血运缺乏、细胞密度低等原因很难自愈。为了缓解疼痛、恢复关节正常生理功能常需行切除、修复受损软骨组织等手术治疗。尽管在临床中已有自体或异体组织细胞移植用于软骨修复或替换, 但这两种方法有许多操作方面的局限性且临床治疗效果欠佳^[1]。水凝胶在组织工程中作为一个具有研究前景的理想支架材料被用于关节软骨组织修复, 支架内含软骨细胞^[2-3]、生长因子^[4]、相关基因及药物和生物基质^[5-7], 希望被种植至病变部位, 诱导原位细胞增殖、分化并形成软骨。

天然壳聚糖支架与软骨细胞外基质的结构与功能有相似之处^[8]。基础研究已证实, 成熟软骨细胞外基质由水(70%)、可溶性胶原蛋白纤维的三维交联网及其他可溶性成分(如蛋白多糖及糖蛋白)组成, 其中交联网状结构主要由II型胶原组成, 在关节运动中, 它提供足够的机械强度以维持关节软骨的体积和形状。然而细胞外基质的机械强度不仅取决于胶原蛋白、蛋白多糖及其他蛋白等大分子本身, 还有赖于这些大分子高度有序排列组合而成的支架结构。高分子水凝胶(交联聚合网含水量60%-90%)之所以能作为一种良好的支架材料应用于软骨组织工程研究中, 不仅仅取决于它的化学结构, 更重要的是它的组成成分、生物功能、可降解性、物理特性等几个重要特性, 而且这些特性可以被反复重新设计及改造, 因此优于普通水凝胶^[9-10]。目前研究证实, 天然可降解高分子水凝胶及其衍生物已可以成功将细胞植入其中, 为细胞增殖及组织再生提供生长条件^[11]。天然水凝胶的突出优点在于其分子结构与细胞外基质相似, 低毒, 低免疫原性, 能提供利于细胞黏附、增殖、分化及分泌细胞外基质的良好条件, 其自身可在人体内通过水解和细胞吞噬等途径自然降解、排出。但天然水凝胶缺乏足够的机械强度, 使其在关节软骨修复应用中受到限制。对此, 诸多研究者希望通过改变交联剂、交联方式等共聚合反应对胶体改性, 提高天然水凝胶材料的强度及韧性^[12-14]。

文章阐述了几种可降解天然高分子水凝胶及其在关节软骨修复组织工程中的最新研究进程及成果, 其中包括蛋白质类(胶原蛋白、明胶、丝蛋白)及多糖类(壳聚糖、透明质酸、藻酸盐、琼脂糖), 由于这些高分子水凝胶材料的化学结构、促细胞生长能力、支架机械强度、降解时间特性各异, 导致其在软骨组织修复应用中优缺点并存。能

否通过两个或更多高分子水凝胶材料的交联重组对水凝胶聚合物进行改性, 寻找一种理化及生物学性能更优的高分子水凝胶材料, 更好地满足组织工程在软骨再生方面研究的应用需求, 正是文章的目的。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一、二作者检索1994年1月至2013年7月PubMed数据库、Springer数据库、Scimedirect数据库、Ovid数据库及CNKI数据库, 检索词为“natural polymers, hydrogel, articular cartilage, tissue engineering; 关节软骨, 水凝胶, 天然聚合物, 组织工程”。检索文献类型包括研究原著、综述、述评、经验交流及荟萃分析等。

1.2 检索方法

纳入标准: ①与水凝胶、天然聚合物有关的文献。②与关节软骨有关的文献。

排除标准: 与纳入标准无关及重复的文献。

1.3 质量评估 计算机初检得到468篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除研究目的与本文无关及内容重复的研究383篇, 最后保留其中85篇。

2 结果 Results

2.1 天然水凝胶 天然生物水凝胶材料的生物相容性好, 免疫原性低, 在原位组织中产生免疫应答率低。研究显示, 天然水凝胶是组织工程和修复医学中具有较高应用价值的生物材料。以天然水凝胶为材料制成的软骨细胞+水凝胶合成体, 可为机体提供促进软骨细胞增殖分化的细胞及生长因子等。另一方面, 如果植入物具备良好的机械性能对手术操作及机体应力环境具有至关重要的作用。然而, 许多天然水凝胶缺乏强度及韧性, 故为了提高水凝胶材料的生物学活性、强度及韧性, 常需要对其进行理化性质的功能化修饰, 即水凝胶材料的物理、化学改性(如氢键、静电作用), 使其获得特定功能。

2.2 蛋白质类

2.2.1 胶原蛋白 人体胶原蛋白是人体细胞外基质内含量最高的结构蛋白, 其中关节软骨内II型胶原的质量占固体质量的90%。然而其余几种胶原蛋白也参与构成胶原蛋白网或软骨细胞间生物大分子间的反应过程。胶原蛋白网中尽管含有70%的水, 但足以提供关节的机械强度, 塑造软骨形态。现有的人造异体胶原蛋白组织网或海绵主要通过酶促反应、盐/酸提纯等方法从动物组织中分离提取而来, 所以此种类型的胶原蛋白结构必须经过纯化以降低其

免疫原性后才能植入人体。研究证实 I、II 型胶原纤维蛋白均可以促进软骨细胞增殖、分化, 诱导软骨组织的生成, 但 I 型胶原纤维同时可诱导软骨细胞的去分化^[15-17]。I 型胶原凝胶的三维网状基质结构是其产生、分泌及储存 II 型胶原蛋白, 以及新生软骨细胞外基质内矿物沉积的关键^[18]。Yamaoka 等^[19]还报道了将软骨细胞在胎牛血清中嵌入到 I 型胶原凝胶中可迅速增殖, 并产生出大量的 II 型胶原及黏多糖。在研究骨形态发生蛋白 2 对 I 型胶原凝胶调节控制作用过程的兔模型中, 证实了软骨细胞的分化起源于骨髓间充质干细胞, 并得出结论: 合适的 I 型胶原凝胶三维环境及与软骨细胞之间良好的相互作用, 能够促进软骨细胞的增殖、软骨基质的储存^[20-21]。然而随着时间的推移, 新生组织形成, 人工合成的 I 型胶原凝胶会逐渐失去作用, 被机械稳定性更好的新生组织替代^[22]。

影响胶原蛋白凝胶在软骨再生组织工程应用中的最大障碍是其缺乏机械强度, 难以应用于原位关节软骨的修复, 有报道表明 I 型胶原凝胶的杨氏模量为 65.5 kPa^[19], 远低于人体关节软骨的杨氏模量。为解决该问题, 有学者将胶原蛋白与强度较高的可降解聚合支架材料相结合。在组织工程中理想的具体做法是: 在多聚材料的小孔中植入胶原蛋白微海绵, 再将软骨细胞接种到这些胶原蛋白微海绵中, 由多聚材料充当组织的外形骨架, 胶原蛋白微海绵则模拟细胞生长的微环境, 促进软骨细胞增殖、分化及新组织再生。其中一项动物对照实验显示, 分别在裸鼠皮下直接植入乳酸乙醇酸共聚物胶原蛋白海绵或乳酸乙醇酸共聚物海绵后, 发现乳酸乙醇酸共聚物胶原蛋白海绵中比乳酸乙醇酸共聚物海绵中有更多的均质物质生成, 并且新生成的物质还保持着乳酸乙醇酸共聚物胶原蛋白海绵原有的形态。但在最初 10 周的新生组织形成过程中, 由于降解作用, 乳酸乙醇酸共聚物混合胶原蛋白海绵和乳酸乙醇酸共聚物海绵的质量均减少了约 36.9%^[23]。合成的乳酸乙醇酸共聚物海绵可以充当支架, 并且该支架容易改造成任何想要的形状, 提供相应的机械强度以此来限定最终制备的工程组织形态。掺入的胶原微海绵则有助于细胞的种植、均质性细胞的分布, 创造一个适合细胞分化、增殖的环境。因此, 混合应用生物材料和合成材料制备三维支架对于软骨组织工程是未来发展的趋向。在另外一项研究中, 使用合成材料聚乳酸和天然生物材料胶原制备一种新型的三维支架用于治疗关节软骨损伤修复^[24]。在此项研究中, 三维聚乳酸网络提供机械强度, 而天然聚合物胶原则模拟软骨组织内软骨细胞生长的微环境。结果显示, 聚乳酸胶原混合支架显示出高度孔性结构, 支架的硬度明显增强, 细胞的活力、黏附性增强。研究者还发现, 使用 PLCL 和胶原制备一种膜式支架并将软骨细胞种植其上, 体外培养一段时间后将植入体内软骨缺损的地方^[25]。术后 8 周植入物出现软骨类组织, 并且随时间推移, 类软骨组织越来越多。除此之外, 还可将胶原与其他材料混合制备各种

支架, 如透明质酸和硫酸软骨素^[26]。另外, 研究人员还发现支架内孔的大小虽然不影响细胞的增殖但却影响体内组织再生的效率^[27]。在所观察的 4 种具有不同大小孔的支架中, 孔径为 150–250 μm 的支架能促进软骨形成, 使其具有一定的机械特性。这些研究表明胶原确实是一种合适的软骨组织工程生物材料, 但为了提高其机械强度及便于改变其形状, 最好与其他材料混合应用。

2.2.2 明胶 明胶是胶原蛋白部分水解变性的衍生物, 它保留了胶原蛋白的一些氨基酸序列, 如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列, 能促进软骨细胞黏附、增生及分化。相比其前体胶原蛋白, 明胶的抗原性更低。但由于其机械强度过低, 故很少单独用作关节软骨组织支架材料。文章前述的适于胶原蛋白的化学交联剂同样适用于明胶。通过在明胶胶体上接种及培养大鼠软骨细胞, 发现与京尼平交联形成的水凝胶在促进软骨细胞黏附及生长方面, 比戊二醛交联的水凝胶更好, 而且在细胞接种后 9 d 可以观察到胶原蛋白和黏多糖的生成^[28]。另外通过化学功能化也可以得到新的二硫化明胶及光交联型明胶^[29-30]。其中光交联明胶的双网络结构, 使此种交联后的明胶胶体获得了满意的机械强度, 使其有可能成为一种具有研究前景的软骨细胞胶原蛋白支架。

由于已知的凝胶法对于明胶水凝胶胶体的强度及其多孔结构的形成起着关键作用, 而多孔结构及孔径大小直接影响软骨细胞的黏附、分化, 所以为了提高明胶复合结构与功能, 纳米纤维-明胶复合体形成的三维多孔支架结构也进入实验研究阶段^[31]。初步实验表明此种水凝胶复合体可为人骨髓间充质干细胞来源软骨细胞的增殖、分化及细胞外基质的形成提供更好的机械支撑和生长环境^[32]。目前以明胶为基础的多种复合仿生多相支架已研制成功, 不同支架主要包含有三磷酸钙^[33]、羟磷灰石和多磷酸钙等成分^[34-36], 这类仿生多相支架对于骨软骨组织工程研究具有较高价值, 其中部分研究者认为双相支架可用于模拟机体软骨及软骨下成分, 明胶层及碳酸钙/磷酸复合层有助于软骨细胞的黏附与增殖, 促进软骨组织的再生和软骨板的形成, 同时加强再生软骨与软骨下骨的紧密结合^[33]。另外研究者为了增强明胶水凝胶的机械强度及各种材料间的协同作用, 通过光聚合制备了 pMHMGCL/PCL/明胶甲基丙烯酸酯混合水凝胶, 该水凝胶机械强度相比明胶水凝胶至少增强了 5 倍, 此支架内两种材料间通过共价键结合, 更耐反复轴向和旋转力^[37]。并且体内外实验证实, 种植于此支架内的软骨细胞能够形成软骨特异性基质。因此, 用明胶制备水凝胶支架为了达到需要的机械强度应该与其他材料混合应用, 并且应用时需要考虑材料间的协同作用。

介于明胶的理化特性, 明胶微粒也被广泛地用作载体来转运细胞或生长因子, 以促进局部特殊细胞高浓度及同时释放相关生长因子, 增强软骨细胞的附着、增殖、分化,

同时增强间充质干细胞的软骨分化及新生软骨组织的再生能力^[38]。研究证实以明胶微粒为载体运输及释放的转化生长因子 β 和胰岛素样生长因子1, 能明显促进软骨细胞的形成与分化^[39]。兔模型体内实验表明, 在软骨再生不良的情况下, 载有转化生长因子 β 1的明胶微粒寡聚乙二醇富马酸盐水凝胶复合材料比单纯寡聚乙二醇富马酸盐水凝胶复合材料能更好地促进软骨下骨的形成^[40]。另一实验证实, 由一层软骨层及一层成骨层构成的双层水凝胶复合材料, 两层均载有转化生长因子 β 3明胶微粒的寡聚乙二醇富马酸盐水凝胶, 在软骨层, 转化生长因子 β 3主要刺激骨髓基质细胞向软骨细胞分化, 而另一层骨髓基质细胞则可向成骨分化^[41]。

2.3 多糖 多糖是一类可降解天然高分子, 在组织工程中应用广泛。这些天然聚合物具有非常丰富的资源, 广泛存在于微生物、植物、动物中。多糖不是一种纯粹的化学物质, 而是聚合程度不同物质的混合物, 是一类分子机构复杂且庞大的糖类物质。尽管来源不同, 但所有多糖都是由多个单糖分子缩合、失水而成, 糖单位由糖苷键、共价键结合而成。各种多糖因糖单元的取代基、结合位点、类型及分子量不同可导致多糖特性的差异^[42-43]。仅仅化学结构上的差异, 足以使不同的多糖具有不同的理化特性, 比如机械强度、溶解度、静电特性、黏度、胶凝作用及在表层、界面的特性。多糖可以与生物大分子、蛋白质或其他多糖通过氢键和静电引力进行络合, 化学修饰亦可以引入功能化结构团来与这些多糖结合, 以赋予其更多功能, 如生物相容性、胶凝潜能、交联能力、形成多糖凝胶支架或进行结构降解动力学的调控^[44-46]。

2.3.1 壳聚糖 壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物, 由是 β 1, 4连接的二氨基二脱氧基葡萄糖(GlcNH₂)残基和随机分布的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)基团组成的线性多糖。它分子质量介于(50-1 000) ku之间。在弱酸性溶液中, 胺基去乙酰后质子化, 使得壳聚糖成为聚阳离子, 此时壳聚糖的结晶度和电荷密度, 以及许多其他重要的物理化学特性都决定于脱乙酰度。市售壳聚糖产品有度脱乙酰范围从50%到90%的, 目前市面上壳聚糖产品的脱乙酰度在50%-90%。由于壳聚糖具有良好的生物相容性、生物可降解性, 病理性炎症反应率和诱发感染及内毒素率低, 同时固有的抗菌能力好, 使其成为最重要的生物材料之一, 胺基化学修饰为其获得更优的生物活性和生物功能^[47], 例如通过N-乙酰化来调控细胞黏附功能和壳聚糖膜降解^[48]。

作为氨基葡萄糖类似物, 壳聚糖是一种在软骨组织工程及软骨修复中格外受关注的生物材料。壳聚糖及其降解产物参与了关节软骨中多种物质(包括硫酸软骨素、透明质酸、II型胶原蛋白)的合成。尽管壳聚糖的主要缺点是不溶于中性溶剂, 但酸性溶液能使聚合物链中的-NH₂基被部分质子化, 故壳聚糖能溶于酸性溶液中, 所以通常用

醋酸来制造壳聚糖溶液, 所需要的酸浓度取决于壳聚糖的量、氨基的数目和离子的量^[49]。另外, 通过化学修饰方法可以制成许多水溶性壳聚糖衍生物, 并且这些衍生物能被加工成理想的支架材料应用于软骨组织工程, 代表性的例子是通过乙酸将氨基嵌合入壳聚糖中形成水溶性的脱乙酰壳多糖。目前, 市面上出售的可注射、可交联二硫键^[50-51], 具有光交联性的壳聚糖水凝胶, 都是利用壳聚糖的化学改性形成的水溶性壳聚糖。

壳聚糖水凝胶已被广泛应用于骨组织工程中, 作为支架材料, 壳聚糖水凝胶能够模拟原位关节软骨水合胶原网, 持软骨细胞的增殖、生长及新软骨组织的再生^[52]。Gupta等^[53]制备了壳聚糖-琼脂糖-明胶支架, 将其植入兔膝关节软骨缺损处, 发现植入后4周即出现显著的软骨再生, 并且持续到术后8周, 而未植入支架的对照组则没有出现软骨再生。另有研究者利用壳聚糖和聚乙烯醇制备一种具有热敏感性、可注射的壳聚糖-聚乙烯醇水凝胶, 该水凝胶能够携带经转化生长因子 β 1转化的骨髓基质细胞, 将该水凝胶注射到免受损伤部位能够显著修复关节软骨缺损^[54]。通常可将聚阳离子壳聚糖与阴离子聚电解质或硫酸氨基葡萄糖混合而生成离子水凝胶, 形成不溶于水的复合物^[55], 壳聚糖也能在带多价阴离子小分子存在的条件下形成物理凝胶, 如甘油磷酸酯^[56]。Naderi-Meshkin等^[57]利用甘油磷酸酯制备了壳聚糖-甘油磷酸钠羟乙基纤维水凝胶(CH-GP-HEC), 该水凝胶具有生物相容性以及可降解性, 在37 °C条件下呈固态, 并且此凝胶能够携带软骨生长因子或者骨髓基质细胞。将携带胰岛素样生长因子1的壳聚糖-甘油磷酸钠羟乙基纤维水凝胶注射到软骨损伤部位, 发现其能持续释放胰岛素样生长因子1至少8 d, 并且适合骨髓基质细胞的分化和生长。除了物理交联外, 壳聚糖还可通过化学交联形成凝胶。化学交联剂包括醛、京尼平, 可以通过酶促反应与壳聚糖的胺基团作用^[58]。近期1篇综述集中讲述了如何将氨基酸通过化学反应交联到壳聚糖中^[59]。

为了使壳聚糖水凝胶用于软骨组织工程, 需要解决的关键问题是提高细胞黏附力, 实验证实, 含有硫酸软骨素质酸凝胶, 通过与促软骨细胞黏附、增殖和软骨分化的生物活性物质偶联, 可更好地支持细胞生命活动和软骨分化。另一实验, 将牛关节软骨细胞植入一层薄硫酸软骨素-壳聚糖水凝胶复合支架中, 可观察到细胞呈圆形外观、限制性有丝分裂, II型胶原蛋白及蛋白多糖的生成^[55]。此外尚有其他天然来源的生物材料也可制作成复合水凝胶支架, 如海藻酸钠^[60]、明胶^[61]、半乳糖和乳糖等^[62-63]。有研究者将生长因子通过辛二酸及活化的N-羧基琥珀酰亚胺嵌入到冻干壳聚糖支架中, 并将ATDC5小鼠软骨细胞接种于该支架上, 再根据MTT测定法及产生出GAG和DNA评估细胞增殖情况, 发现表皮生长因子较精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸有更好的促细胞增殖效果^[64]。对此近期有

篇综述介绍了有关生长因子共价固定在组织工程的应用进展^[65]。

2.3.2 透明质酸 透明质酸是由250-25 000个由N-乙酰基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸的二糖单元组合成的线性多糖结构, 广泛存在于机体软骨、滑液和眼的玻璃体液中, 它通过组装、聚集蛋白聚糖、大软骨蛋白多糖使关节软骨细胞外基质成为弹性结构, 故透明质酸是糖胺聚糖的重要成分。该蛋白聚糖/透明质酸可为细胞外基质蓄积大量的水分, 对软骨的黏弹性能和润滑起着重要作用。关节腔内注射透明质酸是目前骨关节炎早期治疗中一种行之有效的治疗方法, 但透明质酸分子量的高低对治疗效果具有决定性作用, 低分子量使其具有致炎作用, 而高分子量使其具有抗炎保护作用^[66]。

透明质酸对蛋白质的黏附及提供软骨细胞和细胞外基质之间附着位点都具有关键作用。已有研究者将透明质酸复合材料作为支架用于软骨再生。Solchaga等^[67]把透明质酸制成海绵支架, 用于治疗骨软骨缺损, 达到促进受损细胞的软骨分化及透明软骨细胞再生的目的。另外透明质酸可通过羧基反应而进行化学改性, 透明质酸的羧基基团与不同的醇类进行酯化反应可以产生出不同降解度具备生物相容性的衍生物。如交联二硫化物^[68]、二胺和酪胺等^[69], 可使透明质酸化学改性成为许多不同功能的可交联透明质酸衍生物, 这些衍生物则可以用来生产不同的透明质酸水凝胶。目前光聚合或光交联已成为在可注射透明质酸内整合入软骨细胞最重要的方法, 其中透明质酸分子改性的部分称光交联功能团, 例如甲基丙烯酸甲酯^[70-72]、甲基丙烯酸缩水甘油酯^[73-74], 光交联反应可通过可见光或低能量的紫外线照射激活, 多种光交联系统具有低度的黏性, 因而方便注射和填充成不规则软骨缺损。

尽管透明质酸水凝胶具有颇多促进软骨再生的优势, 但因透明质酸材料中的交联密度不够导致其在体内不能提供足够的机械性能, 使透明质酸水凝胶作为软骨修复支架材料受到一定限制^[72-75]。如何控制透明质酸材料中的交联密度, 以便能够提高其机械性能和可降解性, Nettles等^[72]利用含伯醇甲基丙烯酸对透明质酸进行改性, 光交联后, 透明质酸-含甲基丙烯酸复合体表现出0.63 kPa的压缩模量和0.3 kPa的剪切模量, 合成的透明质酸网络结构交联密度可以通过控制甲基丙烯酸酯的程度、大分子单体的分子量和单体浓度来调整。不同条件控制下, 透明质酸-含甲基丙烯酸复合体表现出大体情况是: 根据大单体浓度(2%-20%)的不同, 凝胶网的抗压模量可从2-100 kPa。在100 U/mL透明质酸酶存在的条件下, 水凝胶网的降解时间可以从少于1 h改变为超过38 d, 但随着大单体浓度增加, 可植入细胞数减少。实验中还发现, 含有少量烷基(如十二烷基)侧链的透明质酸, 可形成具有可逆性分子间疏水作用的可注射水凝胶, 并且这种水凝胶的化学交联得到进一步增强^[76]。

综上所述, 虽然透明质酸水凝胶在动物模型研究中表现出很高的促细胞增值及软骨再生作用, 但由于其无法提供足够要求的机械力学性能使其在应用中仍面临许多问题。

2.4 天然高聚物混合水凝胶 大多数天然高聚物是聚合高分子电解质, 含有丰富的氨基、羟基、羧基、硫酸根或磷酸基团, 故可根据静电作用、氢键或酯化作用将几种天然高聚物结合起来, 这样可以避免一些有毒物质的引入。许多多糖能在适当pH值环境下形成聚电解质, 例如脱乙酰壳多糖在pH<6的环境下可携带正电荷, 而透明质酸是聚阴离子, 由于聚阴离子存在, 使其具有更佳的机械性能及软骨细胞依附能力, 且这类支架材料对pH、温度、离子键强度敏感, 故适合于药物、基因及细胞的传导。

将明胶与壳聚糖^[77-79]、透明质酸等混合也能促进其机械性能的提升及降解性的控制^[79]。冻干技术制造的壳聚糖-明胶复合支架材料有利于软骨细胞的黏附、分化和增殖。将种植软骨细胞的复合支架植入皮下以支持透明软骨细胞生长, 9周后观察到新生软骨组织的结构与强度类似于16周的原生软骨组织。另一项研究显示, 壳聚糖基明胶混合溶液经过冷冻、交联戊二醛、解冻、冻干等步骤得到大孔冷冻凝胶, 这种凝胶具有良好的促细胞黏附、增殖及产生分泌细胞外基质的功能^[78]。另外, 可将壳聚糖与丝蛋白混合产生丝蛋白基生物材料。Bhardwaj等^[80]开发了一种由丝蛋白与壳聚糖混合组成的三维多孔聚电解质复合支架, 这种复合支架较单一高聚物生成的支架具有更高的抗压强度和弹性模量。此外, 该支架材料与壳聚糖支架相比酶降解性更低, 且壳聚糖的存在又使其抗菌能力得到提升。丝蛋白壳聚糖共混支架有利于软骨细胞的黏附和生长^[81], 以及大鼠间充质干细胞向软骨分化^[82]。Garcia-Fuentes等^[83]用透明质酸作为制孔剂, 将丝蛋白与透明质酸混合水溶液冻干处理后制备出多孔支架, 并植入间充质干细胞, 发现该复合支架兼备丝蛋白的强度及透明质酸的生物性能, 其促进细胞及软组织生成的作用较单纯丝蛋白支架更佳。

2.5 水凝胶复合支架在软骨组织工程研究中的设计原则 合成聚合物水凝胶旨在促进及支持软骨细胞表型、生长、增殖和新软骨组织的再生、水凝胶的物质营养传输功能。多孔结构有助于支架材料和周围环境之间的物质传递, 能使植入其中的软骨细胞获得类似于原生软骨的内环境。此外, 周围组织能长入支架的多孔结构, 使支架与原位组织融合一体。冷冻-解冻是最重要的制备多孔水凝胶方法之一, 在冷冻过程中凝胶形成实体材料与冰分离的结构, 解冻后, 由于冰的融化而制备出多孔结构。另一种制备方法是水凝胶与大小不同的微粒相混合, 在选择性地除去这些粒子后可以获得多孔材料。同时这些微粒能作为药物、基因或细胞的载体, 随着培养过程中降解而释放出生物学活性物质。

目前, 多孔水凝胶用于软骨组织工程最主要的问题是其较低的机械力学性能, 混合糖胺聚糖后其机械力学性能得以改善, 但要在其结构与机械性能之间求得平衡尚需进一步研究。因为随着深度的变化, 关节软骨的基质结构、软骨细胞类型及密度具有差异^[84-85], 所以良好的水凝胶材料应模拟这种基于深度的差异性, 由此在软骨组织工程中应制备出以分层水凝胶为基础的复合支架结构。

3 总结与展望 Conclusion and prospect

天然高分子水凝胶材料能模拟软骨基质的高度水合胶原蛋白结构, 具有生物相容性、低炎症刺激、低免疫原性的特点, 将这些高分子材料适当改性可以极大提高其物理化学、生物和机械性能。生物分子的化学改性提高了蛋白质或细胞的黏附功能, 促进细胞扩散和增长, 以及细胞外基质的生物合成, 因此有利于软骨组织的再生。

光交联基团能使植入细胞和生物活性物质的水凝胶材料与原位组织相融合。光交联水凝胶的生物活性和机械性能, 可以通过适当控制交联试剂的交联密度和结构来得到提高。将两个或多个天然生物高分子聚合物络合于水凝胶之中, 可使不同高分子的优势有效结合, 从而形成复合结构体。事实上, 自然界已将这些天然大分子整合入复杂的结构中, 生成具有高强度及卓越功能的组织, 因此除了目前制备出的多孔交联结构外, 通过类似方式模拟天然生物高聚物的结构亦具有极大价值。目前, 尽管实验室研究已证实天然高分子水凝胶在软骨组织工程中的应用有良好成效, 但尚不能成功应用于临床, 就高分子材料而言, 机械性能的优化和生物功能化依旧是该领域研究者的挑战。

作者贡献: 第一、二作者检索、分析文献, 并完成本综述, 第一作者对文章负责, 全体作者参与文献筛选和质量评估, 通讯作者对论文构架、审核论文并提出了重要修改意见。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 水凝胶—是以水为分散介质的凝胶, 具有网状交联结构的水溶性高分子中引入一部分疏水基团和亲水残基, 亲水残基与水分子结合, 将水分子连接在网状内部, 而疏水残基遇水膨胀的交联聚合物。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Ye K, Di Bella C, Myers DE, et al. The osteochondral dilemma: review of current management and future trends. ANZ J Surg. 2014;84:211-217.
- [2] Zeng L, Yao Y, Wang D, et al. Effect of microcavitary alginate hydrogel with different pore sizes on chondrocyte culture for cartilage tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014;34:168-175.
- [3] Dahlin RL, Kinard LA, et al. Articular chondrocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds for the repair of cartilage in a rat osteochondral defect model. Biomaterials. 2014;35:7460-7469.
- [4] Hu X, Ma L, Wang C, et al. Gelatin Hydrogel Prepared by Photo-initiated Polymerization and Loaded with TGF- β 1 for Cartilage Tissue Engineering. Macromol Biosci. 2009;9(12): 1194-1201.
- [5] Zhu S, Zhang B, Man C, et al. Combined Effects of Connective Tissue Growth Factor-Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and NaOH-Treated PLGA Scaffolds on the Repair of Articular Cartilage Defect in Rabbits. Cell Transplant. 2014;23:715-727.
- [6] Fan W, Wu C, Miao X, et al. Biomaterial scaffolds in cartilage-subchondral bone defects influencing the repair of autologous articular cartilage transplants. J Biomater Appl. 2013;27:979-989.
- [7] Zhao Q, Wang S, Tian J, et al. Combination of bone marrow concentrate and PGA scaffolds enhance bone marrow stimulation in rabbit articular cartilage repair. J Mater Sci Mater Med. 2013;24:793-801.
- [8] Griffith LG. Emerging Design Principles in Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering. Ann N Y Acad Sci. 2002;961: 83-95.
- [9] Balakrishnan B, Banerjee R. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. Chem Rev. 2011;111:4453-4474.
- [10] Shapira A, Kim DH, Dvir T. Advanced micro- and nanofabrication technologies for tissue engineering. Biofabrication. 2014;6:020301.
- [11] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. J R Soc Interface. 2007;4:999-1030.
- [12] Chung J, Song M, Ha CW, et al. Comparison of articular cartilage repair with different hydrogel-human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell composites in a rat model. Stem Cell Res Ther. 2014;5(2):39.
- [13] Wang LS, Du C, Toh WS, et al. Modulation of chondrocyte functions and stiffness-dependent cartilage repair using an injectable enzymatically crosslinked hydrogel with tunable mechanical properties. Biomaterials. 2014;35:2207-2217.
- [14] Seol D, Magnetta MJ, Ramakrishnan PS, et al. Biocompatibility and preclinical feasibility tests of a temperature-sensitive hydrogel for the purpose of surgical wound pain control and cartilage repair. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013; 101(8):1508-1515.
- [15] Fukui N, Sato T, Kuboki Y, et al. Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation. Bio-Medical Materials and Engineering. 2008;18: 25-33.
- [16] Zhang L, Yuan T, Guo L, et al. An in vitro study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J Biomed Mater Res A. 2012;100 (10): 2717-2725.
- [17] Freyria AM, Ronzière MC, Cortial D, et al. Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type I or type II collagen scaffolds. Tissue Eng Part A. 2009; 15: 1233-1245.
- [18] Rutherford RB, Gu K, Racenis P, et al. Early events: the in vitro conversion of BMP transduced fibroblasts to chondroblasts. Connect Tissue Res. 2003;44:117-123.

- [19] Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 78(1):1-11.
- [20] Mimura T, Imai S, Okumura N, et al. Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells recruited using collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011;98B: 360-368.
- [21] Reichert JC, Heymer A, Berner A, et al. Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Biomed Mater*. 2009;4:065001.
- [22] Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, et al. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone*. 2006;38:555-563.
- [23] Chen G, Sato T, Ushida T, et al. Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng* 2004;10:323-330.
- [24] Haaparanta AM, Järvinen E, Cengiz I, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:1129-1136.
- [25] He X, Fu W, Feng B, et al. Electrospun collagen-poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) membranes for cartilage tissue engineering. *Regen Med*. 2013;8:425-436.
- [26] Dinescu S, Gălățeanu B, Albu M, et al. Biocompatibility Assessment of Novel Collagen-Sericin Scaffolds Improved with Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate for Cartilage Regeneration. *Biomed Res Int*. 2013;2013:598056.
- [27] Zhang Q, Lu H, Kawazoe N, et al. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10:2005-2013.
- [28] Su Y, Mo X. Genipin crosslinked gelatin nanofibers for tissue engineering. *J Controlled Release*. 2011;152 Supplement 1: e230-e232.
- [29] Shu XZ, Ahmad S, Liu Y, et al. Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79A: 902-912.
- [30] Shin H, Olsen BD, Khademhosseini A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials*. 2012;33:3143-3152.
- [31] Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009;5: 670-679.
- [32] Xing Q, Zhao F, Chen S, et al. Porous biocompatible three-dimensional scaffolds of cellulose microfibril/gelatin composites for cell culture. *Acta Biomaterialia*. 2010;6: 2132-2139.
- [33] Chang CH, Lin FH, Lin CC, et al. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;71(2):313-321.
- [34] Gonzalez JS, Alvarez VA. Mechanical properties of polyvinylalcohol/hydroxyapatite cryogel as potential artificial cartilage. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;34:47-56.
- [35] Pan Y, Xiong D, Gao F. Viscoelastic behavior of nano-hydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel biocomposites as an articular cartilage. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19:1963-1969.
- [36] St-Pierre JP, Pilliar RM, Grynblas MD, et al. Calcification of cartilage formed in vitro on calcium polyphosphate bone substitutes is regulated by inorganic polyphosphate. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:3302-3309.
- [37] Boere KWM, Visser J, Seyednejad H, et al. Covalent attachment of a three-dimensionally printed thermoplastic to a gelatin hydrogel for mechanically enhanced cartilage constructs. *Acta Biomaterialia*. 2014;10:2602-2611.
- [38] Tsuzuki N, Seo JP, Yamada K, et al. The effect of a gelatin β-tricalcium phosphate sponge loaded with mesenchymal stem cells (MSC), bone morphogenetic protein-2, and platelet-rich plasma (PRP) on equine articular cartilage defect. *Can Vet J*. 2013;54:573-580.
- [39] Park H, Temenoff JS, Tabata Y, et al. Effect of dual growth factor delivery on chondrogenic differentiation of rabbit marrow mesenchymal stem cells encapsulated in injectable hydrogel composites. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88A: 889-897.
- [40] Guo X, Park H, Young S, et al. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Acta Biomaterialia*. 2010;6:39-47.
- [41] Guo X, Liao J, Park H, et al. Effects of TGF-β3 and preculture period of osteogenic cells on the chondrogenic differentiation of rabbit marrow mesenchymal stem cells encapsulated in a bilayered hydrogel composite. *Acta Biomaterialia*. 2010;6: 2920-2931.
- [42] Khan F, Ahmad SR. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. *Macromol Biosci*. 2013; 13:395-421.
- [43] Oliveira JT, Reis RL. Polysaccharide-based materials for cartilage tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5:421-436.
- [44] Hu J, Hou Y, Park H, et al. Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2012;8: 1730-1738.
- [45] Zawko SA, Suri S, Truong Q, et al. Photopatterned anisotropic swelling of dual-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:14-22.
- [46] Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, et al. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*. 2009;30:2724-2734.
- [47] Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, et al. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem Rev*. 2004; 104:6017-6084.
- [48] Freier T, Koh HS, Kazazian K, et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials*. 2005;26:5872-5878.
- [49] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. 1999; 40(25):7029-7032.
- [50] Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, et al. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:2544-2551.
- [51] Bernkop-Schnürch A, Hornof M, Guggi D. Thiolated chitosans. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;57:9-17.

- [52] Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005;26:5983-5990.
- [53] Gupta A, Bhat S, Jagdale PR, et al. Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: an in vivo study in a rabbit model. *Tissue Eng Part A*. 2014[Epub ahead of print]
- [54] Qi B, Yu A, Zhu S, et al. Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel combined with Ad-hTGF- β 1 transfected mesenchymal stem cells to repair rabbit articular cartilage defects. *Exp Biol Med*. 2013;238:23-30.
- [55] Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:534-541.
- [56] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials*. 2008;29:85-93.
- [57] Naderi-Meshkin H, Andreas K, Matin MM, et al. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biol Int*. 2014;38(1):72-84.
- [58] Berger J, Reist M, Mayer JM, et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;57(1):19-34.
- [59] Casettari L, Villasaliu D, Lam JKW, et al. Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: A review. *Biomaterials*. 2012; 33:7565-7683.
- [60] Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-Engineered Osteochondral Constructs in the Shape of an Articular Condyle. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(5):936-944.
- [61] Zhao P, Deng C, Xu H, et al. Fabrication of Photo-crosslinked Chitosan- Gelatin Scaffold in Sodium Alginate Hydrogel for Chondrocyte Culture. *Bimed Med Mater Eng*. 2014;24:633-641.
- [62] Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Controlled Release*. 2007;119:5-24.
- [63] Marsich E, Borgogna M, Donati I, et al. Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 84A:364-376.
- [64] Tiğli RS, Gümüşderelioğlu M. Evaluation of RGD- or EGF-immobilized chitosan scaffolds for chondrogenic activity. *Int J Biol Macromol*. 2008;43:121-128.
- [65] Masters KS. Covalent Growth Factor Immobilization Strategies for Tissue Repair and Regeneration. *Macromol Biosci*. 2011;11:1149-1163.
- [66] Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(9):1170-1181.
- [67] Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, et al. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000;18:773-780.
- [68] Shu XZ, Liu Y, Luo Y, et al. Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2002;3:1304-1311.
- [69] Barbucci R, Fini M, Giavaresi G, et al. Hyaluronic acid hydrogel added with ibuprofen-lysine for the local treatment of chondral lesions in the knee: In vitro and in vivo investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;75B:42-48.
- [70] Chung C, Mesa J, Miller GJ, et al. Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in photocrosslinked hyaluronic acid networks. *Tissue Eng*. 2006;12:2665-2673.
- [71] Chung C, Mesa J, Randolph MA, et al. Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77A:518-525.
- [72] Nettles DL, Vail TP, Morgan MT, et al. Photocrosslinkable hyaluronan as a scaffold for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng*. 2004;32:391-397.
- [73] Leach JB, Bivens KA, Collins CN, et al. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70A:74-82.
- [74] Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:125-135.
- [75] Burdick JA, Chung C, Jia X, et al. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules*. 2004;6:386-391.
- [76] Huin-Amargier C, Marchal P, Payan E, et al. New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair. *J Biomed Mater Res A*. 2006;76A:416-424.
- [77] Mao JS, Zhao LG, Yin YJ, et al. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*. 2003;24:1067-1074.
- [78] Kathuria N, Tripathi A, Kar KK, et al. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:406-418.
- [79] Tan H, Wu J, Lao L, et al. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009;5:328-337.
- [80] Bhardwaj N, Kundu SC. Silk fibroin protein and chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polym*. 2011;85:325-333.
- [81] Bhardwaj N, Kundu SC. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials*. 2012;33(10):2848-2857.
- [82] Zhao Y, Zhang Z, Wang J, et al. Abdominal hernia repair with a decellularized dermal scaffold seeded with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 2012; 36(3):247-255.
- [83] Garcia-Fuentes M, Meinel AJ, Hilbe M, et al. Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30:5068-5076.
- [84] Lu HH, Subramony SD, Boushell MK, et al. Tissue engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces. *Ann Biomed Eng*. 2010;38:2142-2154.
- [85] Chen J, Chen H, Li P, et al. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials*. 2011;32:4793-4805.