

壳聚糖及其衍生物在软骨组织工程中的应用

徐敬, 赵建宁, 徐海栋, 张雷(南京大学医学院临床学院(解放军南京军区南京总医院)骨科, 江苏省南京市 210000)

文章亮点:

- 1 此问题已知的信息: 壳聚糖作为一种天然生物材料, 所构建的支架在软骨组织工程中得到了广泛应用, 并且取得了良好的反馈效果。
- 2 文章增加的新信息: 将近年来壳聚糖及其衍生物在设计、改性及软骨组织工程中的应用等方面的新进展作一综述。
- 3 临床应用的意义: 利用壳聚糖支架材料构建组织工程软骨为临床修复各类关节软骨损伤提供了一个新的思路与研究方向。

关键词:

生物材料; 软骨生物材料; 壳聚糖; 软骨组织工程; 生物支架

主题词:

组织工程; 壳聚糖; 软骨

基金资助:

江苏省临床医学科技专项资助(BL2012002); 南京市科研课题(201402007)

摘要

背景: 作为生物型支架, 壳聚糖因其独特的多孔三维结构、易于改性的特征及良好的生物相容性成为了软骨组织工程支架材料的研究热点。

目的: 就壳聚糖及其衍生物的设计、改性及在软骨组织工程中的应用作一综述。

方法: 应用计算机检索 PubMed 数据库和 CNKI 数据库, 中文关键词为“壳聚糖, 壳聚糖衍生物, 支架材料, 组织工程, 软骨组织”, 英文检索词为“chitosan; chitosan derivatives; scaffold; tissue engineering; cartilage”, 检索文献时间范围为 1990 年 1 月至 2015 年 1 月。

结果与结论: 壳聚糖是一种天然生物多糖, 通过化学改性、共混改性等方法可以改变壳聚糖的溶解度、机械强度、生物活性甚至生物降解性等自身特性, 从而制成更为合适的生物支架材料。进一步研究表明, 将壳聚糖与种子细胞进行共同体外培养可以获得正常形态的软骨细胞并能合成特异性的细胞外基质成分, 在动物体内, 壳聚糖支架与种子细胞所构建的组织工程软骨能够修复软骨损伤, 形成与周围正常软骨相似的组织。壳聚糖及其衍生物支架材料在软骨组织工程中有较为广阔的研究前景。

徐敬, 赵建宁, 徐海栋, 张雷. 壳聚糖及其衍生物在软骨组织工程中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(25):4081-4085.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.25.028

Application of chitosan and its derivatives in cartilage tissue engineering

Xu Jing, Zhao Jian-ning, Xu Hai-dong, Zhang Lei (Department of Orthopedics, Nanjing School of Clinical Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Chitosan and its derivatives have become one of the most active research topics in the field of tissue-engineered scaffold material substitute for cartilage owing to their porous structure, ease of chemical modification, and high affinity to *in vivo* macromolecules.

OBJECTIVE: To summarize chitosan and its derivatives in terms of design, modification and its application in tissue engineering.

METHODS: A computer-based search of CNKI and PubMed databases was performed for papers on application of chitosan and its derivatives in cartilage tissue engineering published from January 1990 to January 2015 with the key words “chitosan; chitosan derivatives; scaffold; tissue engineering; cartilage” in Chinese and English.

RESULTS AND CONCLUSION: Chitosan is a natural polymer from renewable resources, modification of chitosan has been found to be necessary for its advanced tissue engineering applications. The modification of chitosan can be divided into two categories including chemical modification and physical blending, which improve its biological properties such as biocompatibility and biodegradability. Recent studies have suggested that chondrocytes maintained round morphology and preserved synthesis of cell-specific extracellular matrix molecules on chitosan substrates *in vitro* and chitosan scaffolds seeded with chondrocytes showed partial repair of cartilage defects *in vitro*. Chitosan and its derivatives are promising candidates as a supporting material for

徐敬, 男, 1991年生, 浙江省宁波市人, 汉族, 南京大学医学院在读硕士, 主要从事组织工程进行关节软骨损伤修复研究。

通讯作者: 张雷, 博士, 主治医师, 南京大学医学院临床学院(解放军南京军区南京总医院)骨科, 江苏省南京市 210000

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)25-04081-05

稿件接受: 2015-04-23

http://www.crter.org

Xu Jing, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Nanjing School of Clinical Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhang Lei (Checking), M.D., Attending physician, Department of Orthopedics, Nanjing School of Clinical Medicine, Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Accepted: 2015-04-23

tissue engineering applications.

Subject headings: Tissue Engineering; Chitosan; Cartilage

Funding: Medical Scientific Research Foundation of Jiangsu Province of China, No. BL2012002, and a grant from Research Projects of Nanjing of China, No. 201402007

Xu J, Zhao JN, Xu HD, Zhang L. Application of chitosan and its derivatives in cartilage tissue engineering. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(25):4081-4085.

0 引言 Introduction

组织工程软骨是一项新兴的治疗关节软骨损伤的方法, 种子细胞、生物支架、合适的细胞培养环境便是组织工程软骨重要的3个要素。生物支架为细胞提供了一个三维支持结构, 为细胞生长、代谢提供环境, 所以组织工程对支架材料的要求很高, 理想的材料必须具有良好的生物相容性、可吸收性、无毒性、来源广泛等特点^[1]。目前常见的支架材料可分为天然生物材料和人工合成高分子材料两类, 天然生物材料具有良好的生物相容性和可降解性, 但也有生物力学性能差、降解速度快等局限性, 而且有潜在的传播疾病风险; 人工合成高分子材料无免疫原性且能根据需要调节降解速度, 但其吸水性差, 细胞吸附能力弱及易引起细胞毒性、炎症反应等缺点同样制约了其应用效果^[2]。在过去的几十年中, 壳聚糖构建的支架在组织工程中得到了广泛应用, 并且取得了良好的反馈效果。壳聚糖支架孔隙率高, 孔洞相互连通, 类似于软骨基质成分, 为软骨细胞提供了良好生长环境, 并具有生物相容性优良、易于获得、无毒、无刺激和能促进细胞黏附、增殖、分化的优势^[3]。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者应用计算机检索获取相关文献资料, 检索PubMed数据库和CNKI数据库, 中文关键词为“壳聚糖, 壳聚糖衍生物, 支架材料, 组织工程, 软骨组织”, 英文检索词为“chitosan; chitosan derivatives; scaffold; tissue engineering; cartilage”, 检索文献时间范围为1990年1月至2015年1月。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: 以壳聚糖或壳聚糖衍生物为支架构建组织工程软骨的相关文献; 壳聚糖材料改性研究进展的相关文献; 壳聚糖及其衍生物支架构建组织工程软骨的生物相容性分析的相关文献。

排除标准: 重复的研究及内容过于陈旧文献。

1.3 数据提取 共检索到文献377篇, 其中中文文献124篇, 英文文献253篇, 排除与研究目的相关性差及内容陈旧、重复的文献336篇, 共纳入41篇文献进行综述。

2 结果 Results

2.1 壳聚糖的理化特性和生物学活性 壳聚糖是来源于贝壳、节肢动物外壳、真菌细胞壁甲壳素最主要的衍生

物之一, 由甲壳素在碱性条件下去乙酰化形成, 壳聚糖可在酸性条件下溶于水, 具有良好的生物相容性和可吸收性。壳聚糖拥有着与糖胺聚糖相同的N-乙酰葡萄糖胺结构, 是葡萄糖胺和N-乙酰葡萄糖胺的复合聚合物, 前者占80%。糖胺聚糖的成员透明质酸钠与硫酸角质素是软骨基质的特有成分, 通过与生长因子、受体及黏附蛋白的相互作用, 调控着软骨细胞的生长、增殖, 研究发现壳聚糖也有着相似的调控作用^[4]。在体内, 壳聚糖主要通过溶菌酶水解的方式降解, 有学者发现壳聚糖的降解速度与它的结晶度呈反比, 它的去乙酰化程度越高结晶度也就越高, 降解速度就越慢, 大于85%去乙酰化的壳聚糖可以在体内持续存在几个月的时间^[5]。大量研究表明, 壳聚糖支架在植入体内后一般只会引起非常小的异物排斥反应, 仅有短暂的中性粒细胞聚积, 并在很短的时间内消失, 没有观察到慢性炎症与大量纤维组织增生^[6]。

2.2 壳聚糖的改性及其应用 壳聚糖与其他的生物多糖一样, 其自身结构、取代度和分子量决定了壳聚糖的溶解度、机械强度、生物活性甚至生物降解性等自身特性。因此目前有大量研究通过化学改性、共混改性、表面改性等方法改变壳聚糖的性状, 制成更为合适的生物支架材料, 其中化学改性又包括羧甲基化与接枝共聚反应^[7]。

2.2.1 化学改性

羧甲基化: 壳聚糖的羧甲基化是在碱性条件下将羧甲基引入到壳聚糖的化学结构之中, 从而提高了壳聚糖的水溶性, 制备过程中碱浓度越高羧甲基化程度也越高, 所获得的衍生物水溶性就越强。其中, N, O-CMCS是一种应用较为广泛的生物材料, Kamarul等^[8]将N, O-CMCS制成的支架材料植入小鼠体内检测生物相容性和毒性, 仅在术后10 d左右观察到实验组小鼠有轻微的炎症反应, 随后便逐渐恢复到与对照组相同的水平, 直到术后30 d内实验组与对照组无明显差异。Datta等^[9]合成了壳聚糖-N-亚甲基磷酸盐(NMPC)并与聚乙烯醇纳米纤维共混形成生物支架, 与普通的聚乙烯醇纳米纤维相比, 壳聚糖-N-亚甲基磷酸盐/聚乙烯醇上MG-63细胞生长的密度更高, 并且在第3天检测到了I型胶原与碱性磷酸酶高表达, Datta认为可能是引入的活性磷酸基团促进了细胞的生长与代谢。

接枝共聚: 单纯的壳聚糖凝胶支架因为在体内降解过快且力学性能不佳而限制了它的应用。接枝共聚可以

将其他的化学基团引入到壳聚糖的化学结构中, 改进它的生物性能。有学者将N-异丙基丙烯酰胺接枝到壳聚糖中, 使其变成了一种温度敏感性水凝胶, 能够在接近37℃时在液态和凝胶状态之间转换, 并且利用这个特性来制作5-羟基水杨酸的缓释系统, 测定了在不同温度和pH条件下药物的释放速度^[10]。Xie等^[11]在碳二亚胺的水溶液中制备没食子酸接枝的壳聚糖复合物, 结果显示接枝量高达209.9 mg/g, 并且发现新构成的复合物同时具有没食子酸的抗氧化性与壳聚糖的生物力学性能。

2.2.2 共混改性 在一定的条件下, 能够将壳聚糖与天然或人工合成材料进行共混, 这一过程并不涉及化学上的改变, 但能较大程度上优化壳聚糖的理化特性与机械强度, 因此应用非常广泛。羟基磷灰石能够大幅提高壳聚糖支架的机械性能及骨组织相容性, 有学者使用羟基磷灰石共混的壳聚糖-京尼平交联支架(CTS-HA-GP)与壳聚糖-京尼平交联支架(CTS-GP)对照, 分别对小鼠颅骨缺损模型进行修复, 用Micro CT与组织学染色评价骨再生情况, 结果显示, 3个月后CTS-HA-GP支架组重新生成的矿化组织区域为38%, 而CTS-GP组仅为10%^[12]。Oliveira等^[13]使用壳聚糖-聚丁二烯酸纤维支架进行组织工程修复软骨缺损的研究, 在6周的体外观察中, 发现软骨细胞在支架上的黏附、增值和分化现象令人满意, 与聚乙醇酸支架进行对比, 壳聚糖-聚丁二烯酸纤维上的软骨细胞分布更为均匀, 而聚乙醇酸支架由于酸性物质的释放在中央部位出现了细胞的稀缺部分。Li等^[14]发现i-卡拉胶/壳聚糖/明胶支架有着与细胞外基质相类似的多个功能基团, 当i-卡拉胶浓度为5%时其表面蛋白吸附能力最强, 与脂肪来源的间充质干细胞一起体外培养时细胞黏附牢固, 增殖、分化活跃。Neves等^[15]在一定条件下将壳聚糖与聚己内酯进行共混制成了壳聚糖-聚己内酯共混支架, 有效的提高了壳聚糖支架的表面粗糙度, 降低了膨胀率, 改善了力学性能, 软骨细胞在支架上的黏附、增值、分化现象令人满意, 观察发现含75%壳聚糖支架上的软骨生长情况最佳, 而含50%壳聚糖支架的生物力学性能最佳。

2.2.3 壳聚糖支架表面改性 支架材料的表面改性也是近年来研究的特点之一。在特定的条件下, 将生物相容性高的材料附于支架的表面或者对其表面就行修饰, 增加表面粗糙度, 可以提高细胞在支架上的黏附效果, 促进细胞的生长、增值。Hsu等^[16]用等离子处理壳聚糖膜的表面后, 发现水接触角由(90±1)°降低到了(19±1)°, 与未经处理的壳聚糖支架相比, 表面的粗糙度明显增加。在体外MC3T3-E1细胞培养中发现能够促进细胞在支架上的迁移、增值, 以及加快骨矿物质的沉积。张瑞林等^[17]利用聚乳酸-聚己内酯共聚物对壳聚糖三维纤维网进行表面修饰, 来提高支架的细胞亲和力, 修饰后材

料表面接种兔耳郭软骨细胞, 分别于体外1周, 体内4及8周时取样行扫描电镜、大体和组织学观察, 免疫组织化学染色, 软骨细胞技术及II型胶原含量的测定。结果表明表面修饰的壳聚糖支架上软骨细胞贴壁率高, 细胞分化与增殖好。

2.3 壳聚糖生物支架在组织工程软骨中的应用 近年来, 越来越多的研究集中于以壳聚糖及其衍生物作为支架构建组织工程软骨, 经改性后的壳聚糖支架材料具有更为优良的生物降解性、生物相容性及机械强度, 还可制成可注射型支架, 为治疗不同类型软骨损伤提供了更为合适的方案^[18-21]。

许多天然生物支架材料在体内降解速度过快而制约了它们的应用, 壳聚糖在体内的降解速度取决于它的乙酰化程度, 最长可达9个月之久^[22-23], 因此将壳聚糖与天然生物材料如明胶共同构成复合支架, 能够延缓支架的降解速度, 提高其力学强度, 同时明胶也可增加软骨细胞在支架表面的黏附能力^[24]。

也有研究表明壳聚糖支架具有较好的生物相容性, 有利于软骨细胞在支架上的黏附与生长, 并能够促进软骨细胞的增殖及细胞外基质的合成^[25-27]。Chicatur等^[28]发现使用I型胶原作为支架材料时其胶原纤维密度较低, 而且诱导细胞向软骨细胞分化的能力较差, 为弥补这种不足, 他们构建了壳聚糖/I型胶原复合支架, 利用壳聚糖来模拟软骨的细胞外基质成分, 植入RCJ3.1C5.18软骨细胞进行体外培养, 与单纯的I型胶原支架相比, 壳聚糖/I型胶原复合支架明显增加了软骨细胞的活力与代谢活性, 促进了II型胶原与细胞外基质的合成。壳聚糖支架还可作为质粒的载体, 构建具有基因激活作用的支架, 加快缺损组织的修复, Chen等^[29]设计了一种双层支架, 一层为加入了转化生长因子β1质粒的壳聚糖-明胶支架用于修复软骨层, 另一层为加入了骨形态发生蛋白2质粒的羟基磷灰石/壳聚糖-明胶支架用于软骨下骨的修复。在体外的支架-骨髓间充质干细胞复合培养中检测到了转化生长因子β1与骨形态发生蛋白2的高表达, 在修复兔膝关节骨缺损模型实验中取得了令人满意的结果, 为多种复杂组织的修复与诱导单种干细胞同时向多个方向分化的研究提供了研究方向。

壳聚糖支架机械性能优越, 并且具有相互连通的微孔结构, 有利于软骨细胞的生长和增值, 最终形成具有功能的软骨组织^[30-32]。Cloyd等^[33]利用透明质酸-壳聚糖-明胶支架构建组织工程椎间盘, 利用无侧限抗压试验比较了它与人体椎间盘机械性能, 结果表明透明质酸-壳聚糖-明胶支架能较好地代替椎间盘组织。Haaparanta等^[34]比较了分别由胶原、壳聚糖、聚乳酸中的一种或多种构成的复合支架在组织工程软骨中应用的性能, 聚乳酸可为三维支架网络提供足够的机械性能, 而胶原与壳聚糖可模拟软骨细胞的细胞外基质成分, 分成胶原/聚乳

酸、壳聚糖/聚乳酸、胶原/壳聚糖/聚乳酸复合支架组与胶原、壳聚糖、胶原/壳聚糖平行支架组, 通过扫描电镜与Micro CT评价支架的微观结构, PBS浸泡比较吸水性, Lloyd LR30K机械测试仪测试机械强度, 在支架中植入牛关节软骨细胞进行培养后, 通过电镜与免疫组化观察细胞生长状态, 结果显示所有复合支架都构成了高度多孔网状结构, 孔隙相互连通, 为软骨细胞生长提供了合适的环境; 在支架吸水性方面, 含有胶原支架的吸水性明显优于其他支架, 而单纯由胶原构成的支架吸水性最高; 在机械强度方面, 含有聚乳酸复合支架相比平行支架机械强度显著提高; 细胞培养的扫描电镜与免疫组化结果提示, 所有类型的支架都表现出了令人满意的促进软骨细胞黏附、增殖的效果。

壳聚糖还可制成可注射支架材料, 利于微创操作, 具有广阔的发展前景。Chenite等^[35]将壳聚糖与甘油磷酸二钠混合制备了温度敏感性水凝胶, 在常温条件下为液态, 能够与间充质干细胞混合形成悬浊液, 注入体内后在37℃的环境下支架弹性模量急剧增高, 变为凝胶状态。他们将温度敏感性水凝胶与骨形态发生蛋白结合进行负载蛋白异位成骨实验, 结果表明骨形态发生蛋白逐步释放并具有良好的活性, 注射部位有软骨形成。

2.4 壳聚糖构建药物缓释系统在组织工程软骨中的应用
壳聚糖分子上的-NH₂基团非常容易与负电荷的物质结合, 因此壳聚糖能够与一些具有生物活性的阴离子聚合物, 如糖氨聚糖、海藻酸钠、糖蛋白等形成电解质复合物, 植入体内后在生理环境下发生逐步解离, 释放出生物活动物质。利用这种特性不仅可以将壳聚糖制成携带药物的缓释微球^[36], 还可以包埋带有生物活性的聚阴离子如细胞因子、DNA等应用于组织工程软骨中^[37-38], 在软骨损伤处长时间释放以维持高浓度的生长因子, 达到修复软骨损伤的目的。Sukarto等^[39]将N-甲基丙烯酰胺二酯壳聚糖(MGC)制成纳米微球封装骨形态发生蛋白6、转化生长因子β3与脂肪间充质干细胞构建缓释系统, 并将RGD多肽接枝到MGC上构成RGD-g-MGC, 以增加脂肪间充质干细胞在凝胶中的生存能力, 在体外培养14 d后仍有超过90%的细胞存活。在支架上培养一段时间后, 组织学染色表明与对照组相比, 实验组脂肪间充质干细胞在局部骨形态发生蛋白6、转化生长因子β3缓释条件下向软骨细胞分化, 并促进了II型胶原与细胞外基质的合成, RT-PCR也获得了相同的结论。

部分关节软骨的损伤同时涉及软骨下骨损伤, 目前同时修复两种或两种以上复杂组织的组织工程受到越来越多学者们的关注, Han等^[40]将携带转化生长因子β1缓释微球的壳聚糖-明胶支架与携带骨形态发生蛋白2缓释微球的PLGA支架上下重叠形成分级复合药物缓释支架, 壳聚糖-明胶支架缓慢释放转化生长因子β1促进软骨形成, 而PLGA支架缓慢释放骨形态发生蛋白2促进

骨形成。研究发现, 这种复合的分级支架在修复过程中所形成的新生组织和周围正常软骨组织有着相似的光滑程度及力学性能。

3 讨论 Discussion

相比其他类型的支架材料, 壳聚糖有着更为广阔的应用前景。目前大量相关研究正致力于通过各种途径改进壳聚糖支架的性能, 使其能够更好地应用于软骨修复领域。此外, 以壳聚糖为载体微球封包的药物缓释系统与组织工程软骨的联合应用, 以及利用壳聚糖水凝胶的温度敏感性所构建的可注射组织工程软骨, 具有良好的研究前景^[41]。

致谢: 感谢南京大学医学院与解放军南京军区南京总医院骨科, 感谢导师赵建宁教授、张雷博士、徐海栋博士的宝贵意见。

作者贡献: 徐敬构思并完成本综述, 所有作者共同起草, 通讯作者张雷完成审校, 徐敬对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 文章及内容不涉及相关伦理道德冲突。

学术术语: 壳聚糖-是来源于贝壳、节肢动物外壳、真菌细胞壁甲壳素最主要的衍生物之一, 由甲壳素在碱性条件下去乙酰化形成, 壳聚糖可在酸性条件下溶于水, 具有良好的生物相容性和可吸收性。

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] Mintz BR, Cooper JA Jr. Hybrid hyaluronic acid hydrogel/poly(varepsilon-caprolactone) scaffold provides mechanically favorable platform for cartilage tissue engineering studies. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(9):2918-2926.
- [2] Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res*. 2012;347(3):613-627.
- [3] Wan AC, Tai BC. CHITIN—a promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1776-1785.
- [4] Khan F, Ahmad SR. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromol Biosci*. 2013;13(4):395-421.
- [5] Pereira P, Pedrosa SS, Correia A, et al. Biocompatibility of a self-assembled Glycol Chitosan nanogel. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(3):638-646.
- [6] Li C, Wang GX, Zhang Z, et al. Biocompatibility and in vivo osteogenic capability of novel bone tissue engineering scaffold A-W-MGC/CS. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):100.
- [7] Jiang T, Deng M, James R, et al. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomater*. 2014;10(4):1632-1645.
- [8] Kamarul T, Krishnamurthy G, Salih ND, et al. Biocompatibility and toxicity of poly(vinyl alcohol)/N,O-carboxymethyl chitosan scaffold. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:905103.

- [9] Datta P, Ghosh P, Ghosh K, et al. In vitro ALP and osteocalcin gene expression analysis and in vivo biocompatibility of N-methylene phosphonic chitosan nanofibers for bone regeneration. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(5):870-879.
- [10] Bostan MS, Senol M, Cig T, et al. Controlled release of 5-aminosalicylic acid from chitosan based pH and temperature sensitive hydrogels. *Int J Biol Macromol.* 2013; 52:177-183.
- [11] Xie M, Hu B, Wang Y, et al. Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. *J Agric Food Chem.* 2014;62(37): 9128-9136.
- [12] Frohbergh ME, Katsman A, Mondrinos MJ, et al. Osseointegrative Properties of Electrospun Hydroxyapatite-Containing Nanofibrous Chitosan Scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(5-6): 970-981.
- [13] Oliveira JT, Crawford A, Mundy JL, et al. Novel melt-processable chitosan-polybutylene succinate fibre scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011;22(4-6): 773-788.
- [14] Li J, Yang B, Qian Y, et al. Iota-carrageenan/chitosan/gelatin scaffold for the osteogenic differentiation of adipose-derived MSCs in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014. doi: 10.1002/jbm.b.33339. [Epub ahead of print]
- [15] Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, et al. Chitosan/poly(epsilon-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials.* 2011;32(4):1068-1079.
- [16] Hsu SH, Lin CH, Tseng CS. Air plasma treated chitosan fibers-stacked scaffolds. *Biofabrication.* 2012;4(1):015002.
- [17] 张瑞林, 梁传余, 秦廷武, 等. 组织工程化兔耳廓软骨的实验研究[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2002, 37(5):329-333.
- [18] Li C, Wang L, Yang Z, et al. A viscoelastic chitosan-modified three-dimensional porous poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012;23(1-4):405-424.
- [19] Yang Z, Wu Y, Li C, et al. Improved mesenchymal stem cells attachment and in vitro cartilage tissue formation on chitosan-modified poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18(3-4):242-251
- [20] Zhang K, Zhang Y, Yan S, et al. Repair of an articular cartilage defect using adipose-derived stem cells loaded on a polyelectrolyte complex scaffold based on poly(L-glutamic acid) and chitosan. *Acta Biomater.* 2013;9(7):7276-7288.
- [21] Bhat S, Lidgren L, Kumar A. In vitro neo-cartilage formation on a three-dimensional composite polymeric cryogel matrix. *Macromol Biosci.* 2013;13(7):827-837.
- [22] Hayashi Y, Yamada S, Yanagi Guchi K, et al. Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. *Adv Food Nutr Res.* 2012;65:107-120.
- [23] Li Y, Rodrigues J, Tomás H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(6):2193-2221.
- [24] Wan AC, Tai BC. CHITIN--a promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(8):1776-1785.
- [25] Mirahmadi F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, et al. Enhanced mechanical properties of thermosensitive chitosan hydrogel by silk fibers for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(8): 4786-4794.
- [26] Zhu Y, Wan Y, Zhang J, et al. Manufacture of layered collagen/chitosan-polycaprolactone scaffolds with biomimetic microarchitecture. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;113: 352-360.
- [27] Martins EA, Michelacci YM, Baccarin RY, et al. Evaluation of chitosan-GP hydrogel biocompatibility in osteochondral defects: an experimental approach. *BMC Vet Res.* 2014; 10(1):197.
- [28] Chicatun F, Pedraza CE, Muja N, et al. Effect of chitosan incorporation and scaffold geometry on chondrocyte function in dense collagen type I hydrogels. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(23-24):2553-2564.
- [29] 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(21): 4793-4805.
- [30] Wang PY, Tsai WB. Modulation of the proliferation and matrix synthesis of chondrocytes by dynamic compression on genipin-crosslinked chitosan/collagen scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24(5):507-519.
- [31] Whu SW, Hung KC, Hsieh KH, et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(5): 2855-2863
- [32] Kuo CY, Chen CH, Hsiao CY, et al. Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2015;117: 722-730.
- [33] Cloyd JM, Malhotra NR, Weng L. Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds. *Eur Spine J.* 2007;16(11):1892-1898.
- [34] Haaparanta AM, Järvinen E, Cengiz IF, 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(4):1129-1136.
- [35] Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials.* 2000;21(21):2155-2161.
- [36] Anitha A, Maya S, Deepa N, et al. Curcumin-Loaded N,O-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles for Cancer Drug Delivery. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2011 [Epub ahead of print]
- [37] Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2014;64:353-367.
- [38] Wu Q, Lin D, Yao S. Design of Chitosan and Its Water Soluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes. *Mar Drugs.* 2014;12(12):6236-6253.
- [39] Sukarto A, Yu C, Flynn LE, et al. Co-delivery of adipose-derived stem cells and growth factor-loaded microspheres in RGD-grafted N-methacrylate glycol chitosan gels for focal chondral repair. *Biomacromolecules.* 2012;13(8):2490-2502.
- [40] Han F, Zhou F, Yang X, et al. A pilot study of conically graded chitosan-gelatin hydrogel/PLGA scaffold with dual-delivery of TGF-beta1 and BMP-2 for regeneration of cartilage-bone interface[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014. doi: 10.1002/jbm.b.33314. [Epub ahead of print]
- [41] Zhou HY, Jiang LJ, Cao PP, et al. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2015;117C:524-536.