

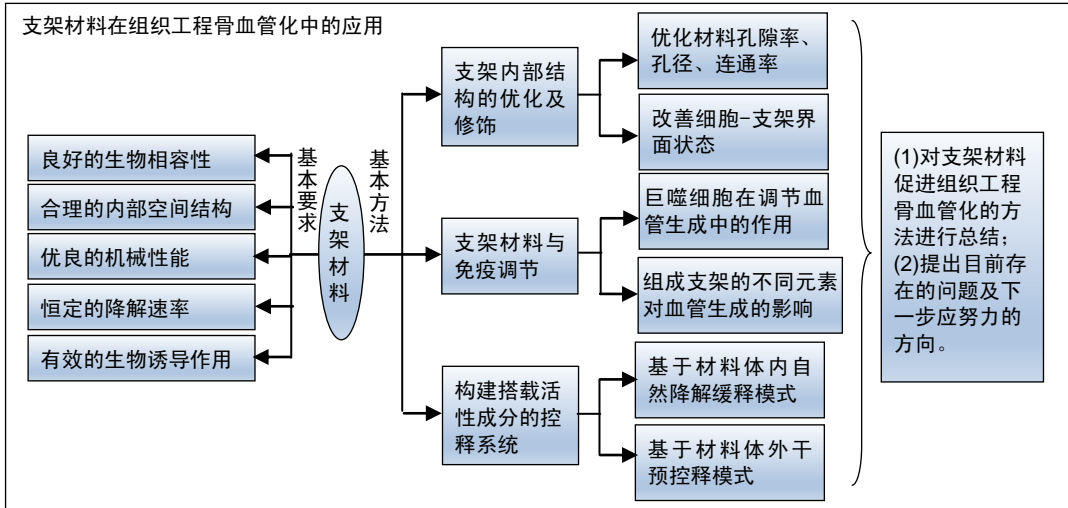
实现支架材料在修复大段骨缺损时的早期血管化

赵胜利¹, 史本超¹, 殷杰², 高浚淮¹, 于庆贺¹, 闵少雄¹ (¹南方医科大学珠江医院脊柱外科, 广东省广州市 510220; ²宁波市第六医院手外科, 浙江省宁波市 315040)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0974

ORCID: 0000-0001-9724-3356(赵胜利)

文章快速阅读:



赵胜利, 男, 1992年生, 河南省南阳市人, 汉族, 南方医科大学珠江医院在读硕士, 主要从事骨与软骨组织工程研究及脊柱外科疾病的诊治。

通讯作者: 闵少雄, 博士, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院脊柱外科, 广东省广州市 510220

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-05-06



文题释义:

组织工程骨血管化: 利用支架材料自身或搭载种子细胞、生长因子等促血管生成活性成分, 实现组织工程支架材料内部早期血管的生成。

细胞-支架界面: 细胞向支架内部迁移、黏附、分化及生存所处的环境, 良好的细胞-支架界面具有较高的生物相容性, 可诱导细胞黏附、定向迁移及分化。

摘要

背景: 传统骨填充材料因内部缺乏完善的血管网络, 致使其在修复大段骨缺损时效果欠佳。近年来研究逐渐从组织工程支架材料入手, 以期解决骨科支架材料在组织工程骨血管化中应用的关键问题。

目的: 总结近年来组织工程支架材料在修复大段骨缺损中促进支架内部早期血管化的方法和进展, 提出目前存在的问题及下一步研究的重点。

方法: 以“支架材料, 组织工程, 骨缺损修复, 血管化”为中文关键词, 以“scaffold, tissue engineering, bone defect repair, vascularization”为英文关键词检索 CNKI、万方以及 PubMed、Medline 数据库有关支架材料在促进组织工程骨血管化的相关文献, 总结支架材料在组织工程骨血管化中的应用现状, 分析存在的问题及前景。

结果与结论: 共纳入 43 篇文献进行综述。①应用于组织工程骨血管化的支架材料种类繁多, 各有优缺点; ②通过优化支架材料自身几何学参数、改善材料组成成分、利用巨噬细胞介导的免疫机制、构建活性成分控释系统等均可促进组织工程材料内部血管化进程; ③尽管目前材料学发展迅猛, 但促进组织工程骨血管化的理想支架材料尚未出现; ④细胞-支架材料相互作用及巨噬细胞在调制移植局部血管生成的分子学机制尚未明确; ⑤控释技术在实际应用过程中其有效性及安全性仍存争议, 这些问题值得今后深入研究与探索。

关键词:

支架材料; 骨组织工程; 骨缺损修复; 血管化; 细胞-支架界面; 巨噬细胞; 免疫机制; 控释; 超声

主题词:

组织支架; 组织工程; 骨与骨组织

基金资助:

广东省自然科学基金(2017A030313564, 2014A030313348); 广州市科技计划项目(201607010266)

Early vascularization of scaffold materials in the repair of large bone defects

Zhao Shengli¹, Shi Ben-chao¹, Yin Jie², Gao Junhui¹, Yu Qinghe¹, Min Shaoxiong¹ (¹Department of Spine Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China; ²Department of Hand Surgery, Ningbo City Sixth Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China)

Zhang Shengli, Master candidate, Department of Spine Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China

Corresponding author: Min Shaoxiong, MD, Doctoral supervisor, Department of Spine Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510220, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Because of the lack of perfect vascular network, traditional bone filling materials yield poor outcomes in repairing large bone defects. In recent years, there is an increasing concern on tissue engineering scaffold materials in order to achieve the early vascularization of scaffold materials in the repair of large bone defects.

OBJECTIVE: To summarize the methods and progress of tissue engineering scaffold materials in promoting early vascularization in the repair of large bone defects in recent years, and to point out the existing problems and the key points of further research.

METHODS: Using "scaffold material, tissue engineering, bone defect repair, vascularization" as the key words in Chinese and English, respectively, we searched CNKI, WanFang, PubMed and Medline databases for articles addressing the pro-vascularization of tissue-engineered bone. The application of scaffold materials in the vascularization of tissue-engineered bone was summarized and the existing problems and prospects were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 43 articles were reviewed. A variety of scaffolds with advantages and disadvantages have been used in the vascularization of tissue-engineered bone. The internal vascularization of tissue engineering materials can be promoted by optimizing the geometric parameters of scaffolds, improving the composition of scaffolds, utilizing macrophage-mediated immune mechanism and constructing active component controlled release system. Although material science is developing rapidly at present, ideal scaffold materials for promoting vascularization of tissue-engineered bone have not emerged. The molecular mechanism of cell-scaffold interaction and macrophage angiogenesis in the modulation of grafts has not been clarified. The effectiveness and safety of controlled-release technology are still controversial in the clinical practice, which is worth further explorations.

Subject headings: Tissue Scaffolds; Tissue Engineering; Bone and Bones

Funding: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2017A030313564, 2014A030313348; the Science and Technology Foundation of Guangzhou City, No. 201607010266

0 引言 Introduction

骨的微血管系统包括皮质血管系统和骨髓毛细血管系统,两者相互吻合形成庞大的血管网络,为局部组织带来可溶性因子和循环干/祖细胞,维持骨的正常代谢和修复再生。组织工程填充材料应用于骨科已有数十年历史,其在修复较小尺寸骨缺损时展现出巨大优势,但在修复大段骨缺损时常因材料内部缺乏营养物质及氧气等必需成分,导致中心部位坏死区的形成^[1]。有研究表明,为适应物质扩散,正常组织中毛细血管间最大距离不超过200 μm,而在骨组织中,骨细胞迁移仅限于管周100 μm的范围内^[2-3]。

因此,为实现支架材料对于骨缺损部位的有效修复,其内部必须尽早形成完善的血管网络。文章就目前组织工程骨填充材料内部血管化的方法及研究进展作一综述,并对存在的问题及前景进行展望。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者利用计算机检索2002年1月至2018年1月CNKI、万方以及PubMed、Medline数据库,中文检索关键词为“支架材料,组织工程,骨缺损修复,血管化”,英文检索关键词为“scaffold, tissue engineering, bone defect repair, vascularization”,语言分别设定为中文和英文。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①组织工程支架材料和应用用于促进组织工程骨血管化方面的相关文献;②近期发表或在权威期刊上发表的文献。

排除标准: ①与研究目的无关文献;②重复性研究文献。

1.3 资料提取与文献质量评估 通过阅读标题和摘要进行筛选,排除与研究目的无关文献及重复性研究文献。查阅全文,进一步判断与纳入标准一致的文献,最终保留43篇文章进行综述。

2 结果 Results

2.1 促进组织工程骨血管化的支架材料的基本要求 作为促进组织工程骨血管化的理想支架材料应具备良好的生物相容性、合理内部空间结构、优良的机械性能、恒定的降解速率及有效的生物诱导作用。据文献报道,天然松质骨的孔隙率为75%~90%,孔径为50~300 μm,抗压强度为11~24 MPa^[4]。在实际材料学的发展过程中,构建兼顾上述特点的支架材料存在一定困难,追求孔隙率的最大化将导致材料抗压强度的下降^[4-6]。磷酸三钙是骨科常用的骨填充材料,其化学组成类似天然骨组织,具有良好的生物相容性和降解速率,但其机械强度较差,无法满足机体特殊承重部位的骨缺损修复^[6],且其孔隙率、孔径、内部连通率不易控制。随着对高分子材料学的深入研究,基于聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)及聚甲基丙烯酸(PMAA)等构建的支架材料以其可控的孔隙率、孔径和内部连通率迅速成为骨科材料学研究的热门,但其也存在不足之处。例如聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)降解后生成二氧化碳和水,使周围形成弱酸性环境,不利于细胞黏附和生长。而且,材料表现出与机体正常组织替代不匹配的降解速度,也限制了其大规模应用^[7]。为克服PLGA降解过程中对微环境pH值的影响,有研究将磷酸三钙与其制成复合材料^[8],在共同降解过程中达到微环境pH的动态平衡。随着生物医学3D打印技术的发展,基于不同原料制成的支架不但能实现对内部空间结构的精确调控,也有望使不同材料优势互补,使构建促进组织工程骨血管化的理想支架材料成为可能。

2.2 支架材料促进组织工程骨血管化的一般方法

2.2.1 支架材料内部结构的优化及修饰

优化材料孔隙率、孔径、连通率: 孔隙率、孔径、连通率是评价骨修复支架材料的重要指标。高孔隙率、连通率、适宜的孔径可实现支架内部营养物质快速渗透,有利于干细胞及内皮细胞黏附及迁移。有文献报道,

多孔支架相比无孔支架, 引起机体更低的免疫反应, 可能是因为它们允许炎细胞渗透并消化支架^[9]。国外相关研究认为支架孔径 > 200 μm 有利于细胞迁入, 孔径为 300 μm 时利于血管的形成^[4, 10]。为了优化材料孔隙率和孔径, Bhuiyan等^[11]利用纳米级羟基磷灰石颗粒、PLGA及胶原制成类似于松质骨的nHAP-PLGA-COL多孔生物支架, 评估其孔径为(270 \pm 60) μm , 孔隙率达到(81 \pm 2)%。实验表明该复合材料在搭载人间充质干细胞修复骨缺损方面的综合性能优于单纯PLGA或nHAP-PLGA支架, 分析认为这种均匀且相互连接的三维多孔结构为间充质干细胞的增殖、黏附及成骨分化提供了良好的环境。为兼顾材料高孔隙率及力学抗压强度, Zhang等^[12]改良了传统3D打印技术中喷头的设计, 采用富含硅(Si)、镁(Mg)、钙(Ca)等离子体的原料打印出内径为500 μm 的中空管状复合生物陶瓷(Ca-MgSi₄O₁₆), 该陶瓷抗压强度达到26 MPa, 明显优于传统骨填充材料 β -磷酸三钙。同时发现, 陶瓷在降解的过程中可持续释放Si, Mg, Ca等离子, 诱导内皮细胞迁移, 促进血管形成; 相比传统实心打印材料, 该陶瓷明显提高了支架孔隙率, 这为实现支架内部营养物质快速渗透、血管的长入提供了有利条件。目前, 一部分多孔材料已成功投入使用, 例如Zimmer-Biomet公司生产的多孔金属钛支架应用于临床已有36年的历史, 该支架孔隙率为67%, 平均孔径300 μm , 植入动物体内2周可见材料内部血管化骨形成, 对病例的长期随访也取得了较为满意的效果^[13]。

改善细胞-支架界面状态: 支架材料合理的三维空间结构对于营养物质的渗透和细胞迁入至关重要, 但理想的支架材料内部通常需适合细胞黏附及生存。有文献报道聚多巴胺(polydopamine, PDA)具有改善细胞活性^[14], 诱导细胞定向迁移及黏附的作用。

Kao等^[15]利用3D打印技术制成直径为12 mm的聚乳酸多孔支架, 支架表面及孔壁附以PDA涂层。发现相比未涂PDA支架, PDA涂层支架可显著提高细胞向支架内部的迁移、黏附及外基质的分泌, 并能诱导人脂肪干细胞向成骨成血管方向分化。除了采用PDA涂层来改善细胞-支架界面状态, 近年来, 液晶态物质以其可流动性、有序性、快速分子自组/重组、光学各向异性等特点逐渐被应用于生物医学领域^[16]。研究发现, 构成生物体的蛋白、核酸、多糖、脂质等大多数以液晶态存在, 以液晶态生物材料修饰或直接作为组织工程支架, 可实现良好的血液相容性和细胞亲和性^[17]。Nakayama等^[18]将内皮细胞与液晶态胶原制成的纳米纤维胶原支架共培养, 发现支架上内皮细胞的数量及增殖率明显提高, 利用该支架搭载内皮细胞修复大鼠下肢缺血模型, 展现出了优良的血管生成能力。将液晶材料与3D打印技术结合, 构建既具有复杂内部结构, 又可促进干细胞及内皮细胞迁徙分化的三维支架, 对于特殊部位的骨缺损修复意义重大。

2.2.2 支架材料与免疫调节

巨噬细胞在调节血管生成中的作用: 在组织工程化

材料应用于体内的过程中, 为实现支架最大化植入率及支架中负载细胞的存活, 通常需要预先应用免疫抑制剂抑制宿主免疫应答。随着对免疫系统的深入了解, 人们发现免疫因子不仅积极地参与促/抗炎反应, 而且能触发重建组织稳态的特异性前导途径^[19-20]。免疫细胞可直接(通过细胞间接触或旁分泌)或间接(通过修饰周围环境, 如消化支架)等影响并调控干细胞募集、活化、分化和生存。当免疫系统被激活时, 作为抗原提呈细胞, 巨噬细胞通过其可塑性协调局部宿主免疫反应^[21]。巨噬细胞按类型分为M1, M2和M3型, 其中M2型又分为M2a, M2b, M2c三种亚型^[20]。在促进炎症部位血管生成的过程中, 不同类型巨噬细胞作用各异。研究表明, M1型巨噬细胞在局部可分泌高水平血管内皮细胞生长因子^[22], M2a型巨噬细胞可分泌稳定管周细胞的血小板源性衍生因子BB, M2c型巨噬细胞可分泌参与血管重塑的基质金属蛋白酶9^[23]。同时, 研究发现巨噬细胞在消化支架的过程中与其内搭载的间充质干细胞实现双向互动^[20, 24]:

①M1型巨噬细胞可释放白细胞介素1 β , 白细胞介素6, 肿瘤坏死因子 α 和干扰素 γ 等相关细胞因子抑制间充质干细胞生长, 而M2型巨噬细胞及其相关细胞因子(白细胞介素10, 转化生长因子 β 1, 转化生长因子 β 3和血管内皮细胞生长因子)可促进间充质干细胞生长; ②间充质干细胞释放的免疫调节因子如TGS-6, 前列腺素E2, 白细胞介素6和CXCL1等减弱多形核白细胞和巨噬细胞在急性损伤模型中促炎细胞因子的产生和释放, 抑制T细胞活化和分化并降低T细胞增殖和干扰素 γ 释放; ③巨噬细胞刺激间充质干细胞产生M2型诱导性细胞因子(白细胞介素4, 13), 促进自身M1型向M2型的转化。

组成支架材料的不同元素对血管生成的影响: 支架在降解过程中释放的离子同样可激活免疫反应。Mg是构成人体的常量元素, 对维持机体正常生理状态十分重要。文献报道M2型巨噬细胞有利于组织工程骨血管化^[23], Chen等^[25]通过用 β -磷酸三钙包被Mg支架成功将Raw264.7巨噬细胞(一种鼠类白血病单核-巨噬细胞系)诱导分化为M2抗炎表型。此外, 通过检测发现, 该支架中的Raw264.7巨噬细胞血管内皮细胞生长因子和骨形态发生蛋白2的表达显著上调, 表明经过Mg诱导的M2型巨噬细胞具有辅助血管生成及骨生成的特性。

Si是人体另一重要元素, 广泛参与人体骨形成及维持正常心血管功能。Sun等^[26]利用硅酸胶原支架修复大鼠颅骨3 mm骨缺损, micro-CT评价术后12周缺损部位血管生成情况发现, 硅酸胶原支架组在血管体积、连通率、管壁厚度等方面优于自体松质骨组, 两组血管各向异性程度没有统计学差异, 但均低于空白对照组。体内实验证实其可诱发机体免疫反应, 通过巨噬细胞中介, 刺激单核细胞分化以及释放多种细胞因子, 招募外周血中存在的间充质干细胞和内皮祖细胞向炎症部位迁徙, 促进缺损部位骨化及血管化。Zhang等^[12]将Si, Mg, Ca等离子混合制成多孔支架, 也得到了相似的促血管生成效果。

锶(Sr)是维持正常人体生理活动的一种微量元素,具有促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用^[27]。人体中99%的锶存在于骨骼中。锶的化合物雷尼酸锶作为首个上市(2004年获欧盟批准)的药物广泛应用于骨质疏松的治疗。近年来,锶在促血管生成方面的作用逐渐被人们所探知。其中,将锶与聚磷酸钙结合制成掺锶聚磷酸钙支架修复骨缺损的研究较多。研究证实,掺锶聚磷酸钙体外可上调成骨细胞血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞因子等促血管生成因子的表达^[28]。Fu等^[29]将掺锶聚磷酸钙多孔支架与外周血来源的内皮祖细胞和间充质干细胞共培养,实现了良好的组织工程支架预血管化。由此可见,锶作为具有成骨成血管效应的元素具有广阔的研究价值,但目前对锶元素如何影响机体免疫系统,调节成骨细胞及内皮细胞的分子学机制尚不清楚,这一点有望成为今后研究的方向。

2.2.3 构建搭载活性成分的控释系统

基于材料体内自然降解缓释模式:生理状态下,组织器官在损伤修复再生期间,生物活性分子的表达在空间和时间上都受到严格的调节。在局部缺血组织再血管化过程中,血管内皮细胞生长因子的表达需持续至少4周才能使新形成的血管成熟稳定^[30]。这要求支架材料不仅具有一定的承载率,而且能够达到对因子持续稳定的释放。当前研究的功能化的生物材料在因子递送的时间和剂量上具有一定的可控性,但有文献报道,采用纤维蛋白支架搭载碱性成纤维细胞因子构建缓释系统的过程中,由于支架对该因子具有较高的亲和力,在局部降解释放过程中一部分活性物质与支架紧密结合而无法进入周围组织^[31],导致支架局部碱性成纤维细胞因子的异常高浓度而周边组织的相对低浓度,进而诱发异常的血管生长^[32]。为寻找一种与承载物低亲和力、高释放率的材料,Gaudiello等^[33]对比胶原海绵支架与普通蛋白支架负载经基因编辑的脂肪干细胞对血管内皮细胞生长因子释放量的影响,通过酶联免疫吸附分别测定共培养后支架和培养基中血管内皮细胞生长因子含量,发现胶原海绵支架中几乎不含该因子,接近100%的生长因子被释放入培养基中,而普通蛋白支架发现尚有25%的生长因子与支架结合而无法释放入上清液,实验将此种脂肪干细胞接种入普通蛋白支架中培养14 d,发现了异常的病理血管结构。相比普通蛋白支架,胶原海绵支架与血管内皮细胞生长因子具有更低的结合率,这有效防止了因局部活性成分浓集而造成的异常血管生成。

据报道,体积大于1 cm³的工程化组织中心通常处于缺氧环境^[1],尽管材料中搭载生长因子,但是诱导血管长入的过程仍较慢,这通常造成坏死中心的形成和仅在组织周边的细胞存活^[34]。寻找一种合适的释氧材料,维持材料内部血管长入前细胞生存必需的氧浓度成为当前研究的重要方向之一。有学者将过氧化氢,过碳酸钠,过氧化钙和吡啶类过氧化物等作为产氧物质,但其本身及释氧过程中的副产物存在细胞毒性,且释氧的过程及量不受控制^[35]。为制造一种释氧稳定且无细胞毒

性的产氧材料,Seifu等^[36]将氟化沸石氧载体颗粒均匀嵌入聚氨酯支架中,该释氧材料的嵌入不影响支架孔隙率及孔径,实验观察到材料中培养的冠状动脉平滑肌细胞增殖明显,细胞浸润深度是单纯聚氨酯支架的2倍,说明该释氧体在材料深部达到了输送维持细胞正常生存氧浓度的作用。Lee等^[37]采用复乳溶剂挥发法制成直径为100-500 μm,内填充全氟辛酸乳剂的聚己酸内酯微粒,该材料平均载氧量达到23.62 mg/L,体外培养MC3T3-E1(鼠源成骨细胞)发现细胞增殖数量第6天达峰,随后出现下降,约10 d恢复初始细胞数量,而对照组(内填PBS组)细胞数量呈持续下降态势;体内实验发现移植10 d后实验组细胞均匀分布于材料内部,并在内部形成丰富的血管网络。

基于材料体外干预控释模式:除了利用材料自身降解过程释放活性成分,可选择特定技术实现对材料状态的体外精确控制。1956年,随着瑞典L Leksell教授将工业超声引入医学领域,超声波依靠其非侵入性、亚毫米级精确度、穿透力强及方向性好的优势迅速应用于疾病诊断。将超声应用于生物医学工程领域,利用超声,使包被活性成分的声敏材料暴露于特定声频下,造成材料结构的改变,从而将活性成分释放到周围环境,可达到材料内部活性成分的体外控释^[38-39]。通过对超声体外控释的研究,人们不断优化声源及声控材料相关参数,以期达到更加精确的时间和剂量控制。与未聚焦、低频(即20 kHz-1 MHz)超声相比,使用聚焦高频(即> 1 MHz)超声可提高深部组织的空间分辨率,更加高效精准地提高支架材料有效载荷的释放^[40]。Moncion等^[41]利用混入全氟化碳乳剂的蛋白水凝胶制成声学响应支架,通过超声照射(声频: 2.5 MHz,峰值舒张声压: 8 MPa,空间峰值时间平均声强: 86.4 mW/cm²)实现了体外对支架良好的时间控释调制,并且该实验在未添加任何生长因子的情况下观察到实验组血管生成量明显多于对照组,提示全氟化碳乳剂蛋白水凝胶支架在诱导血管生成方面存在的潜力。虽然采用超声控释活性物质相比传统缓释材料具有明显优势,但有文献报道,超声可影响生长因子的活性,经持续超声照射后蛋白质出现了结构性改变,这种情况下活性成分能否发挥正常生物学效能,其远期作用尚需深入研究^[42]。

3 总结与展望 Summary and expectation

组织工程的概念由Langer和Vacanti于1987年首次较为系统的提出,迄今不到半个世纪的时间里,组织工程化材料已成功应用于众多领域。文章从组织工程3要素之一的支架材料入手,整理文献并探讨了其在促进组织工程骨血管化方面的方法与研究现状,见表1。首先,组织工程技术应着眼于材料内部空间的优化,提高支架材料的孔隙率及内部连通率,应用金属粉末烧结、有机泡沫浸渍、熔模铸造和气体发泡、3D打印技术等,对材料内部几何形态及力学性能实现有效调节^[7],以达到可溶性因子渗透的最大化。使用聚多巴胺、生物液晶材料,

表 1 部分文献中促进组织工程骨血管化支架材料的制备及特点

研究	主要材料	掺杂剂	孔径	孔隙率	抗压强度	制备方法	特点
Tarafder 等 ^[6]	磷酸三钙	氧化硅、氧化镁	500 μm	-	(12.01±1.56) MPa	微波烧结	较单纯磷酸三钙抗压强度增加 37%-40%
孙猛等 ^[8]	聚乳酸-聚乙二醇/磷酸三钙共聚物	-	3-5 μm	89.6%	-	低温快速成型	多孔、低细胞毒性
Chien 等 ^[9]	大豆蛋白	甘油	150-300 μm	60%-90%	-	冷冻干燥法	可完全降解、低免疫源性
Bhuiyan 等 ^[11]	纳米级羟基磷灰石颗粒	聚乳酸-羟基乙酸共聚物/胶原	(270±60) μm	(81±2)%	-	熔融压制成型	孔隙率合理、生物相容性良好
Zhang 等 ^[12] , Chen 等 ^[25] , Sun 等 ^[26] , Fu 等 ^[29]	硅(Si)、镁(Mg)、钙(Ca)及锶(Sr)等	多种, 如: 海藻酸钠 ^[12] 、β-磷酸三钙 ^[25] 、胶原 ^[26] 、聚磷酸钙 ^[29]	500 μm ^[12] 60 μm ^[25]	-	26 MPa ^[12]	如: 3D 打印、化学合成法、激光穿孔	降解产物具有生物诱导作用、调节局部免疫反应、诱导种子细胞产生骨成血管生长因子
Winther 等 ^[13]	钛金属	-	100-600 μm	67%	30 MPa 以上	-	作为关节假体、已投入临床使用、远期效果稳定
Kao 等 ^[15]	聚乳酸	聚多巴胺	500 μm	-	-	3D 打印	可诱导内皮细胞向支架内部迁徙及增殖
Nakayama 等 ^[18]	牛 I 型胶原	-	-	-	-	控制蒸发自组装	可被胶原酶完全降解、可诱导内皮细胞迁移及增殖
Seifu 等 ^[36] , Lee 等 ^[37]	聚氨基酯 ^[36] ; 聚己酸内酯 ^[37]	氟化沸石载氧体 ^[36] ; 全氟辛酸乳剂 ^[37]	50-200 μm ^[36] 100-500 μm ^[37]	90% ^[36]	-	溶剂浇铸、颗粒过滤	早期支架内部恒定供氧, 利于细胞存活及增殖

表注: “-”表示文献未提及或未提供详细数据。

改善细胞-支架界面状态, 使其更适合于细胞的趋化、黏附、增殖与分化。其次, 优化材料的组成成分, 利用支架在降解的过程中释放离子, 调节植入物局部免疫反应, 改善巨噬细胞在调制炎症过程中的生物学行为, 使其发挥促进支架内部血管化的作用。再次, 构建基于支架材料的体内缓释系统及体外控释系统, 模拟生理条件下组织修复再生各阶段中促血管生成物质释放的量及过程, 达到细胞因子及各种活性物质释放时间窗的精确控制; 构建可产氧的释氧材料, 改善材料内部低氧状态, 以利于干细胞的迁入及生存。

综上所述, 支架材料促进组织工程骨血管化的方法众多, 其中许多已取得较为满意的效果。但在实际应用的过程中, 仍有一些问题亟待解决: ①兼顾生物相容性良好、空间结构合理、机械性能优良、降解速率恒定、具有生物诱导作用的理想支架材料仍未发现; ②细胞与支架相互作用的分子学机制尚未明确, 生物液晶作为改善细胞-支架界面状态的理想材料仍处于初步研究; ③巨噬细胞可改变局部微环境, 影响免疫细胞和干细胞的募集、分化, 但有研究报道^[43], 肿瘤组织中存在的巨噬细胞, 即肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs), 被认为是M2亚型, 具有促进肿瘤部位血管形成的作用。其是否可诱发正常组织中肿瘤的形成仍未知; ④基于材料不同的降解速率, 复合运用多种生长因子, 可达到对包被因子的序贯控释, 但是这种控释仍是大致的, 并且包被的因子在材料内储存时间有限, 生物活性面临下降; ⑤采用超声体外控释可以在最佳时机实现因子的释放, 提高了因子释放的时间精度, 但有文献报道超声可改变蛋白质分子的构象, 进而可能引发生物学作用的改变^[42]。

未来的组织工程学应是多学科的交叉合作, 通过技术革新优化支架材料的制备工艺, 设计研发新型理想化生物材料; 加大基础研究投入力度, 针对巨噬细胞在调节植入物局部免疫应答及微血管形成、液晶材料影响干细胞生物学行为的具体机制展开研究; 扩大实验规模, 深入研究支架搭载生物活性成分缓释及体外控释过程的有效性及其安全性。随着上述诸多问题的解决, 利用支架材料实现组织工程骨内部血管化有望取得突破性进展。

致谢: 感谢南方医科大学珠江医院脊柱外科和实验室各位老师提供的技术帮助。

作者贡献: 第一作者进行文献检索、资料收集及成文。第三、四、五作者对文章思路及结构进行指导。第二作者及通讯作者对文章进行审查及校阅。

经费支持: 该文章接受了“广东省自然科学基金(2017A030313564, 2014A030313348)及广州市科技计划项目(201607010266)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实施与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Wendt D, Stroebel S, Jakob M, et al. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology*. 2006;43(3-4):481-488.

- [2] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4-5):300-311.
- [3] Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(7):1541-1558.
- [4] Kapat K, Srivas PK, Rameshbabu AP, et al. Influence of Porosity and Pore-Size Distribution in Ti6Al4 V Foam on Physicomechanical Properties, Osteogenesis, and Quantitative Validation of Bone Ingrowth by Micro-Computed Tomography. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(45):39235-39248.
- [5] Sears N, Dhavalikar P, Whitely M, et al. Fabrication of biomimetic bone grafts with multi-material 3D printing. *Biofabrication*. 2017;9(2):025020.
- [6] Tarafder S, Dernel WS, Bandyopadhyay A, et al. SrO-and MgO-doped microwave sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds: Mechanical properties and in vivo osteogenesis in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(3):679-690.
- [7] Zhang XY, Fang G, Zhou J. Additively manufactured scaffolds for bone tissue engineering and the prediction of their mechanical behavior: a review. *Materials*. 2017;10(1):50.
- [8] 孙猛,郑东翔,夏扬. 支架材料聚乳酸-羟基乙酸/磷酸三钙的细胞毒性检测[J]. *解放军医学杂志*, 2011,36(12):1279-1281.
- [9] Chien KB, Aguado BA, Bryce PJ, et al. In vivo acute and humoral response to three-dimensional porous soy protein scaffolds. *Acta Biomater*. 2013;9(11):8983-8990.
- [10] de Wild M, Zimmermann S, Rüegg J, et al. Influence of Microarchitecture on Osteoconduction and Mechanics of Porous Titanium Scaffolds Generated by Selective Laser Melting. *3D Print Addit Manuf*. 2016;3(3):142-151.
- [11] Bhuiyan DB, Middleton JC, Tannenbaum R, et al. Bone regeneration from human mesenchymal stem cells on porous hydroxyapatite-PLGA-collagen bioactive polymer scaffolds. *Biomed Mater Eng*. 2017;28(6):671-685.
- [12] Zhang W, Feng C, Yang G, et al. 3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration. *Biomaterials*. 2017;135:85-95.
- [13] Winther NS, Jensen CL, Jensen CM, et al. Comparison of a novel porous titanium construct (Regenerex®) to a well proven porous coated tibial surface in cementless total knee arthroplasty-A prospective randomized RSA study with two-year follow-up. *Knee*. 2016;23(6):1002-1011.
- [14] Wu C, Han P, Liu X, et al. Mussel-inspired bioceramics with self-assembled Ca-P/polydopamine composite nanolayer: preparation, formation mechanism, improved cellular bioactivity and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Acta Biomater*. 2014;10(1):428-438.
- [15] Kao CT, Lin CC, Chen YW, et al. Poly (dopamine) coating of 3D printed poly (lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2015;56:165-173.
- [16] Sung B, Kim MH. Liquid-crystalline nanoarchitectures for tissue engineering. *Beilstein J Nanotechnol*. 2018;9(1):205-215.
- [17] 田冶,曾庆慧,田小俊,等. 液晶生物医用材料的研究进展[J]. *中国医疗器械信息*, 2016,22(23):1-5.
- [18] Nakayama KH, Hong G, Lee J C, et al. Aligned-braided nanofibrillar scaffold with endothelial cells enhances arteriogenesis. *ACS Nano*. 2015;9(7):6900-6908.
- [19] Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-361.
- [20] Crupi A, Costa A, Tarnok A, et al. Inflammation in tissue engineering: the Janus between engraftment and rejection. *Eur J Immunol*. 2015;45(12):3222-3236.
- [21] Stefater III JA, Ren S, Lang RA, et al. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med*. 2011;17(12):743-752.
- [22] Mac Gabhann F, Qutub AA, Annex BH, et al. Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):694-707.
- [23] Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35(15):4477-4488.
- [24] Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, et al. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Front Immunol*. 2014;5(556):556.
- [25] Chen Z, Mao X, Tan L, et al. Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2014;35(30):8553-8565.
- [26] Sun J, Jiao K, Niu L, et al. Intrafibrillar silicified collagen scaffold modulates monocyte to promote cell homing, angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials*. 2017;113:203-216.
- [27] Kyllönen L, D'Este M, Alini M, et al. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta Biomater*. 2015;11:412-434.
- [28] Liu F, Zhang X, Yu X, et al. In vitro study in stimulating the secretion of angiogenic growth factors of strontium-doped calcium polyphosphate for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(3):683-692.
- [29] Fu WL, Xiang Z, Huang FG, et al. Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone. *Tissue Eng Part A*. 2014;21(5-6):948-959.
- [30] Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, et al. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(4):1196-1203.
- [31] Jeon O, Ryu SH, Chung JH, et al. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release*. 2005;105(3):249-259.
- [32] Yeh TS, Fang YHD, Lu CH, et al. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials*. 2014;35(1):174-184.
- [33] Gaudiello E, Melly L, Cerino G, et al. Scaffold Composition Determines the Angiogenic Outcome of Cell-Based Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Modulating Its Microenvironmental Distribution. *Adv Healthc Mater*. 2017. doi: 10.1002/adhm.201700600.
- [34] Griffith CK, Miller C, Sainson RCA, et al. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):257-266.
- [35] Yang L, Zhu L, Dong W, et al. Oxygen-generating scaffolds: A new strategy for bone tissue engineering. *Bone*. 2013;57(1):322-323.
- [36] Seifu DG, Isimjan TT, Mequanint K. Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors. *Acta Biomater*. 2011;7(10):3670-3678.
- [37] Lee HY, Kim HW, Lee JH, et al. Controlling oxygen release from hollow microparticles for prolonged cell survival under hypoxic environment. *Biomaterials*. 2015;53:583-591.
- [38] Fabiilli ML, Wilson CG, Padilla F, et al. Acoustic droplet-hydrogel composites for spatial and temporal control of growth factor delivery and scaffold stiffness. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7399-7409.
- [39] Kripfgans OD, Zhang M, Fabiilli M L, et al. Acceleration of ultrasound thermal therapy by patterned acoustic droplet vaporization. *J Acoust Soc Am*. 2014;135(1): 537-544.
- [40] Moncion A, Arlotta KJ, Kripfgans OD, et al. Design and characterization of fibrin-based acoustically responsive scaffolds for tissue engineering applications. *Ultrasound Med Biol*. 2016;42(1):257-271.
- [41] Moncion A, Arlotta KJ, O'Neill E G, et al. In vitro and in vivo assessment of controlled release and degradation of acoustically responsive scaffolds. *Acta Biomater*. 2016;46:221-233.
- [42] Marchioni C, Riccardi E, Spinelli S, et al. Structural changes induced in proteins by therapeutic ultrasounds. *Ultrasonics*. 2009;49(6-7):569-576.
- [43] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-555.