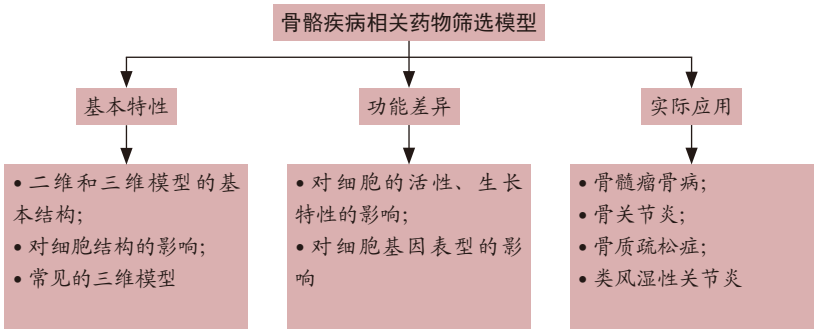
骨三维药物筛选模型的特性、功能及应用

黄 淼[1]，巫谢生[2]，黄文诗[2]，黄海纳[1]，陈龙云[1]，彭维杰[1]

https://doi.org/10.12307/2023.676
投稿日期：2022-09-09
采用日期：2022-10-18
修回日期：2022-10-24
在线日期：2022-11-16
中图分类号：
R452；R363；R364
文章编号：
2095-4344(2023)31-05071-07
文献标识码：A

文章快速阅读： 在临床前研究阶段如何应用具有高仿生性药效和毒性筛选模型



文题释义：
药物筛选： 是指测试和优化来自化学品库的化合物，再选择候选药物的过程，包括临床前和临床筛选过程。
骨三维模型： 是在传统的二维模型上进行优化升级的技术产品，可以模拟骨组织的基本结构和特征，还能模拟骨骼相关的疾病，对于研究骨骼系统相关的疾病以及相关药物的开发至关重要，可为个人和社会减少经济负担。

摘要
背景： 临床上骨骼相关疾病药物的开发是个漫长的过程，传统的二维模型药物筛选的效果已经不能满足需求，改进研发的各种三维模型均有其优缺点和相关应用，但到目前为止还没有一个理想的实验模型可以用于所有骨骼相关疾病的药物筛选。
目的： 综述近几年相关文献，总结骨二维模型和三维模型的基本特性以及对细胞功能的可能影响，重点综述目前常见的骨三维模型以及其在实际骨骼系统疾病中的药物筛选应用，以期为将来骨三维模型在药物筛选中的应用和改进提供一定帮助。
方法： 检索PubMed数据库中的相关英文文章，英文检索词为“bone，skeleton， three-dimensional models， models，drug screening， drug selection”；检索中国知网及万方数据库相关中文文献，中文检索词为“骨、骨骼、模型、三维模型、药物筛选”，并结合文献追溯法查找部分文献进行综述分析。
结果与结论： ①骨二维模型和三维模型的物理特性不同，二维模型基质一般是固定的，三维模型基质则是可调节的，二者对细胞的功能方面影响不同。②骨二维模型的构建和生产较为容易，但其缺乏典型的三维微观结构，缺少与周围细胞及细胞外基质的相互联系，因此只能适应于细胞水平研究。③骨二维模型和三维模型培养的骨组织有生物学差异，二维状态下骨细胞或者诱导成骨细胞都是扁平状的，而三维模型更接近骨组织的自然细胞外基质的结构，能更准确地表现药物反应。④目前常见的骨三维模型包括细胞球、水凝胶、生物反应器和微流体芯片等，它们的构建方法不同，在药物筛选方面各有优势。⑤目前常见的骨三维模型已经应用于骨骼相关疾病的药物筛选，不同疾病对不同三维模型的需求不同，例如在骨质疏松症的药物筛选中，支架和水凝胶的可降解和可持续性更能达到药物筛选的效果。
关键词： 干细胞；三维培养；骨骼疾病；三维模型；药物筛选；细胞球；水凝胶；生物打印；组织工程；综述

Properties, functions and applications of three-dimensional models of bone for drug screening

Huang Miao[1], Wu Xiesheng[2], Huang Wenshi[2], Huang Haina[1], Chen Longyun[1], Peng Weijie[1]
[1]Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China; [2]School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Huang Miao, Master candidate, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China
Corresponding author: Peng Weijie, PhD, Professor, Doctoral supervisor, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Abstract
BACKGROUND: The development of drugs for skeletal-related diseases in clinical settings is a lengthy process, and the effectiveness of traditional two-dimensional models for drug screening no longer meets the needs. Various modified 3D models have their advantages and disadvantages and related applications, but so far there is no ideal experimental model that can be utilized for drug screening of all bone related diseases.
OBJECTIVE: To review relevant literature in recent years, to summarize the basic characteristics of two-dimensional and three-dimensional models of bone and their possible effects on cellular function, and to focus on a review of the current common three-dimensional models of bone and their application for drug screening in actual skeletal system diseases, with a view to providing ideas for future applications and improvements of three-dimensional models of bone in drug screening.

[1] 赣南医学院，江西省赣州市 341000；[2] 南昌大学药学院，江西省南昌市 330006
第一作者： 黄淼，男，1998 年生，江西省赣州市人，汉族，赣南医学院在读硕士，主要从事干细胞与组织工程相关研究工作。
通讯作者： 彭维杰，博士，教授，博士生导师，赣南医学院，江西省赣州市 341000
https://orcid.org/0000-0002-7912-916X(黄淼)；https://orcid.org/0000-0003-0019-010X(彭维杰)
基金资助： 国家自然科学基金 (81860327)，项目负责人：彭维杰
引用本文： 黄淼，巫谢生，黄文诗，黄海纳，陈龙云，彭维杰 . 骨三维药物筛选模型的特性、功能及应用 [J]. 中国组织工程研究，2023，27(31):5071-5077.

METHODS: Relevant English articles were searched on PubMed database with English search terms of “bone, skeleton, three-dimensional models, models, drug screening, drug selection”. Related Chinese articles were searched on Wanfang and CNKI databases, and the Chinese search terms were “bone, skeleton, models, three-dimensional models, drug screening, drug selection”. Some articles were searched with literature retrospective method for review analysis.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) The physical properties of the two-dimensional model of bone are different from those of the three-dimensional model of bone; the matrix is generally fixed in the two-dimensional model, whereas the three-dimensional model matrix is adjustable, and the two have different effects on the functional aspects of the cells. (2) Two-dimensional models of bone are easier to construct and produce, but they lack the typical three-dimensional microstructure and interconnections with surrounding cells and the extracellular matrix, and are therefore only suitable for cellular level studies. (3) There are biological differences between two-dimensional and three-dimensional models of cultured bone tissue. In the two-dimensional state, osteocytes or induced osteoblasts are flattened, whereas the three-dimensional model is closer to the natural extracellular matrix of bone tissue and more accurately represents the drug response. (4) Commonly used three-dimensional models of bone include cell spheres, hydrogels, bioreactors and microfluidic chips, which are constructed in different ways and have their own advantages in drug screening. (5) Common three-dimensional models of bone have been used for drug screening in skeletal-related diseases, and the need for different three-dimensional models of bone varies from disease to disease, for example, in the case of osteoporosis, a degenerative disease, where the degradability and sustainability of scaffolds and hydrogels are more effective for drug screening.
Key words: stem cell; three-dimensional culture; skeletal disease; three-dimensional model; drug screening; cell sphere; hydrogel; bioprinting; tissue engineering; review

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 81860327 (to PWJ)*
How to cite this article: *HUANG M, WU XS, HUANG WS, HUANG HN, CHEN LY, PENG WJ. Properties, functions and applications of three-dimensional models of bone for drug screening. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(31):5071-5077.*

0 引言 Introduction

药物研发是一个漫长的过程，常基于传统细胞实验，然后发展为动物实验，再过渡到临床试验，尽管大多数情况下，新药研发都遵循类似的流程，但绝大多数药物在临床试验阶段归于失败，其主要由于临床前研究未能有效预测其临床疗效和毒性[1]。为提高新药研发成功率，在临床前阶段采用具有高仿生性药效和毒性筛选模型，已成为新药研发领域的新趋势。

传统的二维单层细胞培养模型是体外药物筛选的公认标准[2]，目前大多数细胞都是在二维状态下培养的。在不同环境中培养的细胞有不同的形态，细胞形态会影响许多细胞生长过程，包括细胞增殖、分化、凋亡、基因和蛋白质的表达。在人体内，骨骼不断受到重力、肌肉收缩和身体运动的刺激，产生复杂的流动模式，从而影响细胞的机械和化学环境[3]。虽然二维模型提供了许多有价值的观点，但细胞和细胞外基质在体内是以三维的方式存在，各种环境因素会对其产生影响。细胞在二维状态下不能准确地模拟人体的生长环境，导致细胞对药物反应的结果难以准确反映人体对药物的反应，从而可能得到一些错误的判断结果[4-5]。大量的证据表明，三维模型可以通过还原细胞与细胞的相互作用，更大程度上模拟体内的微环境，为细胞提供良好的反应空间。三维细胞培养相比二维细胞培养能更准确地预测体内药物效应，这意味着三维模型有望加快候选药从临床前研究到临床试验的过渡，提高药物研发成功率[6-7]。

目前，很多骨骼疾病都缺乏合适的体外高预测性药物筛选模型，虽然三维模型有很多种，但每种模型都具有其复杂的优缺点和不同的应用，并且在相关文献中并没有发现哪一种三维模型是骨骼疾病药物筛选的金标准。因此，建立有效的三维骨骼药物筛选模型，提高骨骼疾病药物研发成功率是目前急需解决的重要问题。文章讨论了不同三维模型的优缺点及其应用，总结了三维模型开发的最新进展，将重点放在利用组织工程原理在三维模型开发中的实际应用及他们的优缺点上，为不同骨骼疾病建立药物筛选模型的金标准提供新的思路和方向。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者在 2022 年 8 月进行检索。

1.1.2 检索文献时限 2000 年 8 月至 2022 年 8 月。

1.1.3 检索数据库 检索 PubMed、中国知网和万方数据库。

1.1.4 检索词 英文检索词为“bone，skeleton，three-dimensional models， models，drug screening， drug selection”；中文检索词为“骨、骨骼、模型、三维模型、药物筛选”。

1.1.5 检索文献类型 研究原著和综述类文章。

1.1.6 手工检索情况 阅读相关文献，手工检索文献中的参考文献。

1.1.7 检索策略 以 PubMed 和中国知网数据库检索策略为例，见**图 1**。

PubMed 数据库	中国知网数据库
#1 bone [Title/Abstract] #2 skeleton [Title/Abstract] #3 #1 OR #2 #4 three-dimensional models [Title/Abstract] #5 models [Title/Abstract] #6 #4 OR #5 #7 drug screening [Title/Abstract] #8 drug selection [Title/Abstract] #9 #7 OR #8 #10 #3 AND #6 AND #9	#1 骨或骨骼 [篇关摘] #2 三维模型 [篇关摘] #3 模型 [篇关摘) #4 药物筛选 [篇关摘] #5 #1 AND #2 AND #3 AND #4

图 1 ｜中英文数据库检索策略图

1.1.8 检索文献量 初步检索到 116 篇。

1.2 入组标准

1.2.1 纳入标准 ①入选文献内容与骨骼相关疾病、体外模型等具有高度相关性；②文章主要描述模型在药物筛选中的作用；③文章涉及的疾病类型为骨骼相关疾病；④权威杂志发表的期刊论文和学位论文。

1.2.2 排除标准 ① Meta 分析；②重复性研究。

1.3 文献质量评估和数据的提取 从计算机中检索文献，通过阅读文章的标题和摘要排除不符合纳入标准的文章，并结合文献追溯法查找遗漏文献，通读全文后确定保留的文章以进行深入研究，最终确定 62 篇文章进行总结归纳分析。文献筛选流程图，见**图 2**。

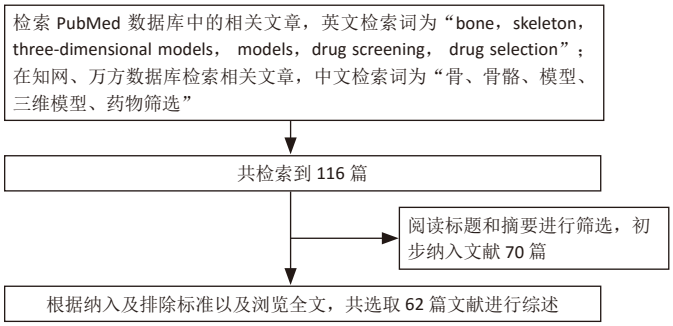


图 2 ｜文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 体外模型概括

2.1.1 二维细胞培养模型 传统的二维细胞培养模型包括烧瓶、玻璃板、聚苯乙烯培养皿或板[8-9]，细胞黏附在这些平面上可以快速生长。然而，这些二维模型大多不能很好地模拟骨细胞的生长环境，它改变了细胞骨架的自然分布和基因表达，使得骨细胞在这些二维层面上变成了扁平状[10]。后来研究者改进产生了三明治培养技术[11]，它通过构建一个上下两层的微孔结构来吸附生长因子，为细胞提供营养物质，而中间那一层通常是模仿体内的天然细胞外基质成分的结构，能够促进营养扩散和细胞浸润，这种技术在骨组织工程应用中具有出色潜力。微孔阵列通过修改基底形貌创造各种不同的微环境，为骨细胞建立合适的生长条件[12]。基质的材料、形状、宽度和粗糙度等是影响骨细胞形态、黏附和增殖的关键因素，很大程度上会影响细胞的功能[13]。然而，传统的二维模型以及这些改进的培养模型仍不足以代表真实的骨骼形态，无法反映骨细胞的微环境。因此，研究者们必须了解骨骼的生物力学特性及其生长环境的特征才能更好地开发出合适的骨三维模型。

2.1.2 三维细胞培养模型 体外骨骼发育需要三维组织来模拟自然细胞外基质的结构、机械性能（即刚度和强度）和组成成分。三维培养系统通过提供细胞和细胞相互作用的空间，来研究细胞在体内的相互作用机制。

目前，已经开发了各种各样的三维模型用于骨细胞培养，见**图 3**。主要可分为两种：一种是无支架的三维细胞模型，细胞通过沉淀法、悬滴法或搅拌法在悬浮液中形成聚集体；另外一种是有支架的三维细胞模型，它们在体外模仿细胞外基质框架，让细胞像在体内一样进行增殖分化。它们可以通过提供对生化和机械微环境线索的控制来克服当前二维模型的局限性，为研究潜在的生化和生物力学信号开辟新的可能性[14]。不同三维模型的生产方式和基本特性不同，在后期的实际应用中也各有优势。体外骨细胞三维培养模型的开发可以为实现良好的骨形成提供新的见解。除了体外应用，三维骨细胞模型还有望成为组织工程和再生医学的潜在工具。

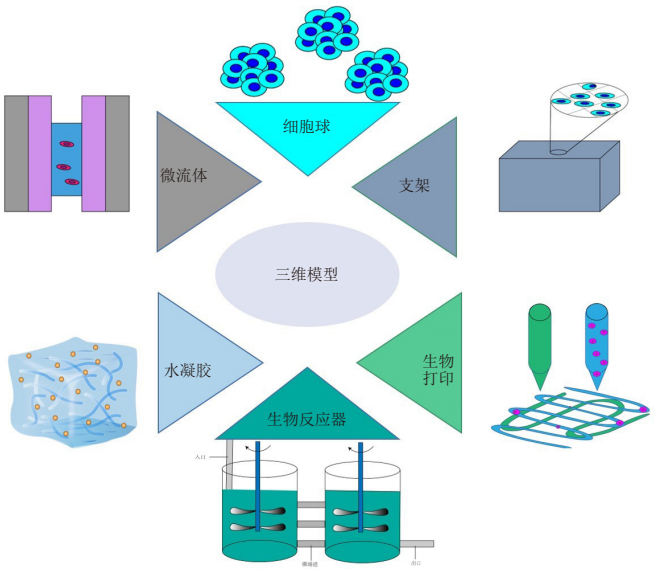


图 3 | 常见的骨细胞培养三维模型示意图

2.1.3 骨二维模型与三维模型的功能差异 两种模型的基本特性不同，产生的效应也不同，见**表 1**。

表 1 | 骨二维模型与三维模型基本特性的比较

项目	二维模型	三维模型
生产成本	低	高
机械性能	不可调节	可调节
细胞形态	单一扁平状	接近体内形态
增殖速率	快	慢
功能差异	分化效果差	分化效果好
应用	细胞水平研究	生物力学方面研究
药物筛选效果	准确性低	准确性高

很多研究已经证明，二维细胞培养体系使得所有细胞从培养基中均匀获得养分和生长因子[15]。而在三维培养体系中，细胞形状与其在体内的自然形状非常相似，具有相似的细胞骨架可以更好地模拟内部生长过程[16]。在二维基质上，细胞必须适应人造的刚性表面，这就意味着不同于在体内自然生长的特性。有研究已经证明，二维平面培养和三维球状培养的细胞整体形态是不同的，更准确地说，在三维状态下培养的细胞比在二维基质上更类似于体内形态[17]。此外，两种模型培养的细胞，增殖速率一般不同，与二维培养的细胞相比，三维培养状态下的增殖率较低[18]。

很多研究表明，细胞外基质在骨骼形成中起重要作用，细胞通过细胞外基质进行相互作用和相互通信，即三维模型通过模拟细胞外基质来增强细胞的成骨效应[19-20]。KIM 等[21]在二维和三维培养条件下对人脂肪源性干细胞的成骨分化效应进行了研究，并采用多种生物信息学方法进行分析，发现不同培养体系下人脂肪源性干细胞成骨分化相关基因表达存在显著差异，在培养 3 周时，三维培养条件下的表达水平均高于二维培养条件下的表达水平，说明三维培养对干细胞的成骨分化效应具有促进作用。此外，TORTELLI 等[22]开发了一种支架作为三维骨细胞培养模型，用于培养小鼠原代成骨细胞，相关数据表明，三维环境增强了成骨细胞的分化，从而促进了早期的破骨细胞分化，但功能性三维组织模型仍缺乏形成分层的、有序的架构和结构的能力。因此，研究者们可以发现三维模型在骨组织工程中具有很大的应用潜能，但要进一步改进技术，开发出性能更合适的三维模型。

通讯作者点评：
此部分总结了骨三维培养模型的种类，比较了传统骨二维培养以及不同三维培养的优缺点，从研究结果可以看出，新型的骨三维培养模型可以在体外模拟人类正常体内真实情况，能够反映细胞－细胞、细胞－基质之间的相互作用以及更仿生的微环境特性，作为药物筛选模型，将具有高预测性。

2.2 三维骨组织模型的构建及其药物筛选 与传统的二维药物筛选模型相比，三维模型可以根据骨细胞生长环境的特点，模拟实体组织的药敏和耐药模式，从而提高药物筛选的准确性，表明这可能是一个很好的体内药物反应的载体[23]。

2.2.1 细胞球 细胞球培养体系已经广泛用于骨细胞培养中，细胞在基质或悬浮培养基中形成聚集体，还原细胞－细胞和细胞－基质相互作用过程[24]。

当前构建细胞球的方法有很多种，最近报告了一种采用琼脂糖和聚丙烯酸模具，利用层层自组装技术构建细胞球三维培养模型的方法，通过和常规培养小鼠前体成骨细胞比较，发现此三维培养模型还原了细胞宏观及微观生理环境，成骨分化相关指标检测后表明，此模型具有明显的促进成骨分化效应的潜能，为骨组织工程进一步研究提供了依据和思路[25]。细胞成骨分化常常通过向培养基中添加诱导剂来实现[26]，诱导剂通常由抗坏血酸，β- 甘油磷酸盐和地塞米松组成。RUMINSKI 等[27]通

过将脂肪间充质干细胞培养成单层和球状体来比较它的成骨潜力，通过蛋白质印迹和免疫荧光结果表明，球状体培养的成骨细胞标志物 Runx2 和 IBSP 显著上调。最近，KIM 等 [28] 对比了诱导剂和三维结构效应对成骨分化的作用，发现化学效应的影响不如三维结构效应。他们的结果表明，前成骨细胞的分化强烈依赖于三维结构效应，使用三维球形结构的细胞聚集触发了前成骨细胞更大程度地分化。

总之，成骨细胞和干细胞的细胞球培养体系结果显示，细胞球可以显著增强成骨效应，在骨组织的形成中具有明显的促进作用。球状培养的细胞不论是基因表达，还是活性和形态均呈接触依赖性，三维结构对细胞功能有显著影响。但是，这种微球模型在基础研究中也存在一定的局限性，如缺乏结构支撑、细胞无法有效氧化、缺乏营养物质和代谢物交换系统等。这些不足之处为研究者们今后的技术改进提供了方向。

2.2.2 水凝胶 水凝胶是由胶原蛋白、明胶、纤维蛋白、海藻酸盐、琼脂糖和壳聚糖等聚合物制成的支架，水凝胶模型具有吸收大量水的能力，类似于体内组织。此外，它们具有良好的细胞封装能力，可调节的生化和机械性能，以及良好的生物相容性和低免疫原性 [29]。

用于骨组织工程的水凝胶大多通过模拟骨组织的成分与结构来实现，目前水凝胶的制备大多是采用物理交联法或化学交联法，将多种不同小分子结合形成促进成骨分化或骨再生的支架。有研究将几种骨肉瘤细胞系和原代成骨细胞培养在一种由硅化羟丙基甲基纤维素组成的新型水凝胶中，通过检测成骨细胞标志物和细胞因子的表达，发现在水凝胶中的细胞具有良好的活力和增殖能力，且成骨分化效果更好 [30]，这提示研究者们支架可以和细胞共存。有研究使用紫外线辐射将明胶与成骨生长肽交联创建了一种新型成骨多肽水凝胶，用于培养小鼠成骨前体细胞，结果表明此共培养体系促进了细胞的增殖，增强了成骨相关基因的表达 [31]。目前，很多水凝胶还可作为一个药物递送平台，通过负载药物来筛选出治疗骨骼系统疾病的有效药物。例如，LI 等 [32] 制备了一种可注射水凝胶，NAFEE 等 [33] 报道了一种温度敏感型水凝胶，他们可以根据各自的水凝胶特性长期输送阿仑膦酸盐，以促进骨质疏松症的治疗。

以上这些结果揭示了水凝胶在骨组织工程中的巨大优势。不同的水凝胶在骨组织工程中有各自的特性，但总体而言都具有促进成骨分化效应的巨大潜能。然而，尽管各种各样的水凝胶在人类成骨细胞培养中显示出了良好的结果，但大多数水凝胶在促进细胞增殖和基质生成方面仍然有限，并且逐步降解过程会改变它们的生化和机械性能，这些因素使得水凝胶的性能需要进一步提高，才能更好地应用于骨骼疾病的药物筛选中。

2.2.3 微流控芯片 微米级和纳米级制造的发展衍生出了一种新型的细胞培养系统，接近生物反应器，但规模较小，被称为微流控芯片 [34]。与其他传统培养技术相比，使用微流体装置可以开发更复杂的微环境，并具有模拟体内真实环境的可能性，从而更容易地控制机械表面和生化参数，构建骨三维药物筛选模型 [35-36]，微流控芯片也被称为芯片实验室或器官芯片，被广泛用于骨组织工程研究。

有研究者将甲基丙烯化明胶和海藻酸盐结合用于制备基于微流体的纤维体系 [37]，这是一种双层空心超细纤维，填充在里面的成骨细胞表现出良好的生存能力，且 I 型胶原蛋白和骨形态发生蛋白的水平均较高。AN 等 [38] 开发了一种基于微流体的方法，使用海藻酸盐微凝胶在单细胞水平上连续包封干细胞，相关数据显示，此体系具有明显增强体外矿化和体内骨细胞形成的能力；从该研究结果可以看出，微流体技术的出现为细胞微环境的构建提供了很大的帮助，这种培养体系不仅保留了细胞的良好活力，还在一定程度上促进了成骨分化效应，推动了干细胞在骨再生中的应用，此外，它还被广泛用于骨骼系统疾病体外药物检测以及各种骨组织工程中。最近，LIN 等 [39] 将多能干细胞封装在明胶中并在双流生物反应器中培养，该模型更紧密地概括了内源性关节环境，其中构建体底部的细胞暴露于成骨线索，而顶部的细胞暴露于软骨线索，培养 28 d 后，芯片的上部和下部区域分别观察到良好的软骨和成骨相关基因的表达，通过塞来昔布用药后的定量 RT-PCR 和组织学评估进一步证明了其作为骨关节炎药物筛选平台的潜力。

2.2.4 生物打印 三维生物打印技术通过沉积生物材料，以创建类似组织的结构，然后用于医学和组织工程。这些生物材料被称为“生物墨水”，生物打印技术中主要的生物墨水材料包括细胞聚集体、水凝胶、微载体和去细胞化基质组分 [40]。生物打印有多种模式 (例如，基于喷墨的生物打印、基于压力挤出的生物打印、激光生物打印、声学生物打印，基于立体光刻的生物打印和磁性生物打印等)。这些生物打印策略可以单独使用或组合使用，以实现不同材料和不同功能的结合。

修复骨缺损一直是一个巨大挑战。BYAMBAA 等 [41] 利用基于挤出的生物打印策略开发了由 GelMA 水凝胶制成的微观骨样组织结构，其中装载有硅酸盐纳米片来诱导成骨分化，并合成了具有血管内皮生长因子的水凝胶制剂，可以促进血管扩散，结果发现此结构能够在体外成熟期间支持细胞存活和增殖，从而为骨组织模型的构建奠定基础。也有人通过生物打印骨骼系统模型，提供了一个药物筛选平台，筛选出 4 种预测促进 (淫羊胍素和茜胂素) 或损害 (PD98059 和 U0126) 成骨的药物 [42]。这些研究结果表明，通过生物打印可以治疗部分骨损伤，同时在药物筛选中也具有巨大潜能，为骨组织工程的发展提供一个可行的方向。不仅如此，近几年，为了构建复杂功能结构，时间概念与三维生物打印结合在一起形成了新的建模体系，目前已成为组织工程的下一代解决方案，其可用于制造动态的三维生物结构，这些结构将通过采用刺激响应材料在各种刺激下改变其形状，在骨组织工程方面具有巨大的潜力 [43]。

近年来，三维药物筛选模型地构建引起了广泛关注。常见的骨三维模型包括球体、水凝胶、生物反应器、生物打印和微流控芯片等，见**表 2**。

表 2 | 骨三维模型相关研究概述表

第一作者	发表年份	类型	制作方式	应用意义
何云影 [25]	2022	细胞球	琼脂糖微孔模具	促进前成骨细胞的成骨效应
GURUMURTHY [26]	2017	细胞球	悬浮培养基中形成聚集体	促进干细胞的成骨分化
TROJANI [30]	2005	水凝胶	物理交联合成	促进骨肉瘤细胞和成骨细胞的成骨效应
QIAO [31]	2020	水凝胶	化学交联合成	促进前成骨细胞的的成骨效应
ZUO [37]	2016	微流体芯片	和水凝胶结合	促进成骨细胞的的成骨效应
AN [38]	2020	微流体芯片	和海藻酸盐结合	促进干细胞的成骨分化
LIN [39]	2019	微流体芯片	双流生物反应器	用于筛选骨关节炎药物
BYAMBAA [41]	2017	生物打印	基于挤出的生物打印	微观骨样结构，诱导成骨分化
BREATHWAITE [42]	2020	生物打印	无支架生物打印	用于筛选骨质疏松药物

通讯作者点评：
不同的三维骨培养模型经过不断发展，从较简单的细胞球到水凝胶包裹细胞，再到微流控技术以及 3D 生物打印技术构建，在此过程中研究者已将这些模型用于不同目的药物筛选，甚至药物递送研究。随着所构建骨组织三维模型复杂性的不断增加，其药效预测能力可能会不断增强，但可能会降低研究通量。

2.3 **三维骨疾病模型的构建及药物筛选** 疾病模型是理解发病的分子机制不可或缺的工具，同时也能促进新疗法的发展。目前骨骼疾病研究的模型主要有动物、组织器官、干细胞分化的骨细胞和原代成骨细胞等[44]。

2.3.1 骨髓瘤骨病 多发性骨髓瘤，世界上最普遍的血液系统癌症之一，它是一种浆细胞癌，其特征为恶性骨浸润、高钙血症、贫血和肾衰竭。多发性骨髓瘤引起的正常骨稳态失衡，可导致骨髓瘤骨病[45]。

目前研究者们已经开发了模仿多发性骨髓瘤的三维体外模型，并用它们来探索细胞－细胞相互作用对多发性骨髓瘤药物耐药性的影响。BELLONI 等[46]利用生物反应器技术在明胶支架中进行骨髓瘤细胞－骨髓细胞共培养，结果发现，生物反应器中重建的人多发性骨髓瘤微环境可能代表了药物测试和研究肿瘤－基质分子相互作用的有效平台。他们通过骨髓瘤细胞建立体外疾病模型，生物反应器重建细胞生长微环境，在二者的结合下通过药物进一步证明了此体系的可行性，展现了三维模型在体外疾病模型中进行药物筛选的巨大优势。最近，MONTEIRO 等[47]提出了一个三维骨肉瘤模型，他们将肿瘤结构和水凝胶概括为一个球体，与成骨细胞和干细胞共培养，通过阿霉素反应剂量测试来评估骨肉瘤模型在药物开发和筛选方面的潜力，这项研究结果表明，这种模型在骨肉瘤的生长速率、侵袭能力和对阿霉素治疗的耐药性方面具有积极的效应。在药物筛选方面，骨肉瘤球体被证明对阿霉素、顺铂、牛磺酸和紫杉醇等化疗药物的耐药性高于二维状态下培养的细胞，使其成为研究耐药性的有吸引力的平台[48]。

2.3.2 骨关节炎 骨关节炎是最常见的关节疾病[49]，对全球老龄化人口的健康具有重大影响，但目前的预防措施或治疗方案不够完善[50]。骨关节炎患者的关节软骨会显示出衰老的特征，软骨细胞释放的衰老相关分泌表型因子 (例如促炎症细胞因子和细胞外基质降解酶)，已被确定为促进骨关节炎进程的主要介质[51]。

微流体和水凝胶等三维模型已被广泛用于骨关节炎治疗相关研究。ROSSER 等[52]制备了一种基于营养梯度的微流体三维细胞培养模型，用于培养来自骨关节炎患者的软骨细胞，结果发现此模型可以很好地模拟软骨的生长环境，为了解细胞如何在病理生理状态下做出不同反应提供一个新的平台。近几年，也有研究报告了一种水凝胶三维共培养系统，通过在经典活化的促炎症巨噬细胞的存在下，共培养正常的和患病的软骨细胞来研究骨关节炎炎症的进展，结果发现，此三维模型可以很好地了解巨噬细胞和软骨细胞在骨关节炎疾病进展中的相互作用，在促进骨关节炎治疗药物的开发和筛选方面具有巨大的潜力[53]。此外，生物打印技术也逐渐用于仿生软骨组织的开发和软骨组织的修复中，但较低的机械性能和相对较高的成本限制了其在临床中的广泛应用。

2.3.3 骨质疏松症 骨质疏松症是一种常见的系统性骨骼疾病，可导致骨骼脆弱，增加骨折风险，在老年人和绝经妇女中发病率较高[54]。骨质疏松症是一种退行性病变，即使是药物治疗，也存在一个长期依赖性问题，目前还没有很好的应对措施，为此，现在很多研究者致力于寻找合适的方案去预防或者治疗骨质疏松症[55]。

成骨细胞与破骨细胞之间的骨稳态失衡是诱发骨质疏松的主要原因，目前已经开发出了多种可注射水凝胶系统，可以递送药物或者细胞以促进骨量增加[56]。林建立等[57]的一项科技成果指出，微流控芯片已经大量应用于骨质疏松症的临床治疗中，他们引入微流控芯片技术体系，运用片层三维细胞培养技术，通过细胞捕获、分选、裂解、细胞内涵物分析和蛋白修饰示踪等，探讨骨质疏松症的发病过程，为预防和治疗骨质疏松症提供了新的思路和方法。ZHAO 等[58]通过水热法设计并制备了锶掺入的三维羟基磷灰石晶须生物陶瓷，并在动物模型中证明了其在骨质疏松条件下成功修复骨缺损的潜力。最近，也有研究报道了一种新型三维支架，它由两种不用的环糊精制备而成，装载了盐酸雷洛昔芬，利用支架良好的孔隙率来评估其药物效果[59]。总之，三维模型的开发为骨质疏松症的治疗提供了一种可行的方案。

2.3.4 类风湿性关节炎 类风湿性关节炎是一种病因不明的全身性自身免疫性疾病，形成一种以巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞为主体的增生滑膜组织，不仅影响关节的活动和健康，还累及全身多个组织器官。类风湿性关节炎目前的药物治疗体系不够完善，是国内外研究的热点和难点，构建合适的三维药物筛选模型，提高治疗该疾病的新药研发成功率至关重要[60]。

为了进一步了解类风湿软骨损伤的过程，PECK 等[61]建立了一种由滑膜成纤维细胞、巨噬细胞和原代软骨细胞组成的球体共培养体外模型，通过免疫染色和生化分析表明，此模型能够概括类风湿性关节炎软骨的某些病理特征，用塞来昔布进一步证明，它通过逆转软骨损伤来响应药物的治疗效果，从而说明如果得到适当地验证，该模型可能可用于筛选新的治疗药物，从而有助于改善风湿的治疗效果。最近，AGOSRINI 等[62]采用电解质络合法，制备了一种递送甲氨蝶呤的水凝胶模型，此水凝胶是由聚环氧乙烷和聚环氧丙烷三嵌段组成的聚合物－泊洛沙姆在体温条件下形成的。体内动物实验表明，使用基于泊洛沙姆的热敏水凝胶可有效延长体外药物甲氨蝶呤的释放，最大限度地减少全身药物暴露，从而提高治疗依从性并减少不良反应，为类风湿性关节炎的治疗开辟了新的方法。

文章列举了几种常见的骨骼疾病以及相关三维模型在药物筛选中的运用进展，见**表 3**。

表 3 | 三维模型在骨骼疾病中的应用汇总表

第一作者	发表年份	疾病建模方法	建模成功的评估标准	应用意义
BELLONI [46]	2018	生物反应器	培养物中表达 β2-微球蛋白和生长因子	创造的微环境可以作为药物筛选的有效平台
MONTEIRO [47]	2021	水凝胶和细胞球结合	钙沉积增加	成功开发体外模型，模仿骨微环境，可用于药物筛选
ROSSER [52]	2019	微流体	软骨蛋白聚糖分泌增加	可作为骨关节炎的简单疾病模型
SAMAVEDI [53]	2017	水凝胶	金属蛋白酶和促炎细胞因子的增加	能够模拟骨关节炎的特征，作为体外骨关节炎模型
ZHAO [58]	2020	支架结合动物模型	实验组的动物骨钙素含量更高	三维模型具有修复骨质疏松情况下的骨缺损的潜力
PECK [61]	2018	生物打印	软骨基因表达下调	能够模拟类风湿性关节炎的特征，可用于药物筛选

通讯作者点评：
骨骼相关疾病为一直困扰大众的疾病之一，三维培养模型给人们提供了一种新型的治疗方案。此部分总结了几种常见的骨相关疾病中三维培养模型的运用，三维培养模型在研究疾病的病理生理学机制以及药物药效等方面有巨大的潜力，结合药物递送特点，将为高效的骨相关疾病药物筛选与开发提供平台。

3 讨论 Discussion

3.1 **既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题** 既往的研究证明了传统的二维细胞培养模型在骨组织工程及骨骼系统疾病药物筛选方面有值得称赞的结果，三维模型在肿瘤药物筛选的研究中也表现出不错的效果，但是这些模型存在一定的局限性，

如二维模型不能很好地模拟骨组织的结构特性，无法构建良好的细胞生长微环境，对细胞的功能和表型等有一定的影响，在药物筛选的准确性方面也还需提高，而三维模型在骨骼系统相关疾病的应用比较少。

3.2 作者综述区别于他人他篇的特点 目前已有文章对骨三维模型在肿瘤药物筛选方面进行综述，但未见骨三维模型的构建在骨骼相关疾病及其药物筛选方面的综述。文章阐述了骨二维和三维细胞培养模型的优缺点，总结了常见的骨三维细胞培养模型的优势及实际应用，还讨论了三维模型在骨疾病模型的构建及药物筛选方面的应用。

3.3 综述的局限性 ①文章讨论更多的是骨三维模型的相关研究，较少基于三维模型的构建和骨组织工程方法学方面的研究；②对于骨三维模型在体外骨组织再生中的作用机制有待详细描述；③对于骨三维模型在骨骼相关疾病药物筛选的具体应用缺乏统一的标准；④文章关于骨三维模型在临床中的具体应用报道较少。

3.4 综述的重要意义 文章主要综述了不同的细胞培养模型的特点和相关应用，简述了常见的骨三维细胞培养模型的优势，讨论了这些三维模型在不同骨骼疾病药物筛选方面的应用，在一定程度上促进了人们对骨三维模型及其相关应用的理解。同时可引起研究者对三维模型的不足之处的思考，更好地设计和开发合适的三维模型用于骨组织工程研究，另一方面也让大家认识到骨三维模型在药物筛选方面的优缺点，为如何提高药物筛选效率提供了一定的思路。

3.5 课题专家组对未来的建议 骨骼疾病的主要焦点在于骨修复和骨重塑，骨三维模型的研究从开始较简单的细胞聚集体，到现如今的水凝胶支架等一系列的改进，已经进行了很长一段时间，也取得了巨大的成就，但骨三维模型在模拟骨的组成成分和基本结构特性方面有必要系统化和精细化，这将有助于更好地理解骨修复和骨重塑过程的结构特性和相关机制。此外，还需要根据功能和结果对不同的骨三维模型进行分类，以确定哪种特性的三维模型更适合药物筛选，或者在针对不同骨骼疾病的药物进行筛选时，哪种骨三维模型的可行性和准确性更高。同时，也需要更多的研究去探索骨三维模型用于临床研究的具体效应。

未来可以通过和现在的先进技术融合，通过现代化技术来设计性能更好的骨三维模型，为骨组织工程的研究提供一个好的平台。同时，也可以结合需求向个性化方向发展，通过先进手段，精确地模拟骨修复和骨重塑过程的变化机制，为骨骼疾病的药物筛选开发出性能更合适的三维模型。

致谢：感谢赣南医学院彭维杰教授对文章的修改和指导。

作者贡献：文章设计者及论文撰写者为黄淼。资料收集者为巫谢生和黄文诗。数据分析者为黄海纳和陈龙云。彭维杰作者审校。

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中不存在利益冲突。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] DIMASI JA, GRABOWSKI HG. Economics of new oncology drug development. J Clin Oncol. 2007;25(2):209-216.
[2] AMELIAN A, WASILEWSKA K, MEGIAS D, et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. Pharmacol Rep. 2017;69(5):861-870.
[3] TOVAR-LOPEZ FJ, DOMINGUEZ-HERNANDEZ VM, DIEZ-GARCIA MDEL P, et al. Finite-element analysis of the effect of basic hip movements on the mechanical stimulus within a proximal femur. Rev Invest Clin. 2014;66 Suppl 1:S32-S38.
[4] WRZESINSKI K, FEY S J. From 2D to 3D--a new dimension for modelling the effect of natural products on human tissue. Cur Pharm Design. 2015;21(38):5605-5616.
[5] MALTMAN DJ, PRZYBORSKI SA. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. Biochem Soc Transact. 2010;38(4):1072-1075.
[6] LANGHANS SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Front Pharmacol. 2018;9:6.
[7] 刘劲松 . 体外构建三维肝肿瘤模型及药物筛选 [J]. 中国组织工程研究 ,2014,18(27):4389-4394.
[8] OLIVEIRA FA, MATOS AA, SANTESSO MR, et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. J Photochem Photobiol B. 2016;163:14-21.
[9] WEYTS FA, BOSMANS B, NIESING R, et al. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. Calcif Tissue Int. 2003;72(4):505-512.
[10] KNIGHT E, PRZYBORSKI S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. J Anat. 2015; 227(6):746-756.
[11] RAVICHANDRAN R, SUNDARAMURTHI D, GANDHI S, et al. Bioinspired hybrid mesoporous silica–gelatin sandwich construct for bone tissue engineering. Microporous Mesoporous Mater. 2014;187:53-62.
[12] XU X, WANG W, KRATZ K, et al. Controlling major cellular processes of human mesenchymal stem cells using microwell structures. Adv Healthc Mater. 2014;3(12):1991-2003.
[13] IHALAINEN T O, AIRES L, HERZOG F A, et al. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. Nat Mater. 2015; 14(12):1252-1261.
[14] BOUET G, MARCHAT D, CRUEL M, et al. In vitro three-dimensional bone tissue models: from cells to controlled and dynamic environment. Tissue Eng Part B Rev. 2015;21(1):133-156.
[15] BUTTERY L, BIELBY R, HOWARD D, et al. Osteogenic differentiation of embryonic stem cells in 2D and 3D culture. Methods Mol Biol. 2011; 695:281-308.
[16] RAVI M, PARAMESH V, KAVIYA SR, et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. J Cell Physiol. 2015;230(1):16-26.
[17] LIU X, SUN Q, WANG Q, et al. Epithelial cells in 2D and 3D cultures exhibit large differences in higher-order genomic interactions. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2022;20(1):101-109.
[18] SON YB, BHARTI D, KIM S B, et al. Comparison of pluripotency, differentiation, and mitochondrial metabolism capacity in three-dimensional spheroid formation of dental pulp-derived mesenchymal stem cells. BioMed Res Int. 2021;2021:5540877.
[19] HAN X, TANG S, WANG L, et al. Multicellular spheroids formation on hydrogel enhances osteogenic/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells under magnetic nanoparticles induction. Int J Nanomedicine. 2021;16:5101-5115.
[20] WHITEHEAD J, GRIFFIN K H, GIONET-GONZALES M, et al. Hydrogel mechanics are a key driver of bone formation by mesenchymal stromal cell spheroids. Biomaterials. 2021;269:120607.
[21] KIM BC, KWACK KH, CHUN J, et al. Comparative transcriptome analysis of human adipose-derived stem cells undergoing osteogenesis in 2D and 3D culture conditions. Int J Mol Sci. 2021. doi:10.3390/ ijms22157939.

[22] TORTELLI F, PUJIC N, LIU Y, et al. Osteoblast and osteoclast differentiation in an in vitro three-dimensional model of bone .Tissue engineering Part A. 2009;15(9):2373-2383.
[23] CUI X, BREITENKAMP K, LOTZ M, et al. Synergistic action of fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 enhances bioprinted human neocartilage formation. Biotechnol Bioeng. 2012; 109(9):2357-2368.
[24] LIN RZ, CHANG HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnol J. 2008;3(9-10): 1172-1184.
[25] 何云影 , 李玲婕 , 张舒淇 , 等 . 聚丙烯酸 / 琼脂糖三维培养构建细胞球的方法 [J]. 中国组织工程研究 ,2022,26(4):553-559.
[26] GURUMURTHY B, BIERDEMAN PC, JANORKAR AV. Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells. J Biomed Mater Res A. 2017;105(4):1230-1236.
[27] RUMINSKI S, KALASZCZYNSKA I, DLUGOSZ A, et al. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in 3D conditions - comparison of spheroids and polystyrene scaffolds. Eur Cell Mater. 2019;37:382-401.
[28] KIM J, ADACHI T. Cell condensation triggers the differentiation of osteoblast precursor cells to osteocyte-like cells. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7:288.
[29] MA Y, LIN M, HUANG G, et al. 3D spatiotemporal mechanical microenvironment: a hydrogel-based platform for guiding stem cell fate. Adv Mater. 2018;30(49):e1705911.
[30] TROJANI C, WEISS P, MICHIELS JF, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. Biomaterials. 2005;26(27): 5509-5517.
[31] QIAO Y, LIU X, ZHOU X, et al. Gelatin templated polypeptide co-cross-linked hydrogel for bone regeneration. Adv Healthc Mater. 2020;9(1): e1901239.
[32] LI D, ZHOU J, ZHANG M, et al. Long-term delivery of alendronate through an injectable tetra-PEG hydrogel to promote osteoporosis therapy. Biomater Sci. 2020;8(11):3138-3146.
[33] NAFEE N, ZEWAIL M, BORAIE N. Alendronate-loaded, biodegradable smart hydrogel: a promising injectable depot formulation for osteoporosis. J Drug Target. 2018;26(7):563-575.
[34] LI XJ, VALADEZ AV, ZUO P, et al. Microfluidic 3D cell culture:potential application for tissue-based bioassays. Bioanalysis. 2012;4(12):1509-1525.
[35] VAN DUINEN V, TRIETSCH SJ, JOORE J, et al. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. Curr Opin Biotechnol. 2015; 35:118-126.
[36] KNOWLTON S, YU CH, ERSOY F, et al. 3D-printed microfluidic chips with patterned, cell-laden hydrogel constructs. Biofabrication. 2016; 8(2):025019.
[37] ZUO Y, HE X, YANG Y, et al. Microfluidic-based generation of functional microfibers for biomimetic complex tissue construction. Acta Biomater. 2016;38:153-162.
[38] AN C, LIU W, ZHANG Y, et al. Continuous microfluidic encapsulation of single mesenchymal stem cells using alginate microgels as injectable fillers for bone regeneration. Acta Biomater. 2020;111:181-196.
[39] LIN Z, LI Z, LI E N, et al. Osteochondral tissue chip derived from iPSCs: modeling OA pathologies and testing drugs. Front Bioeng Biotechnol. 2019;7:411.
[40] HOSPODIUK M, DEY M, SOSNOSKI D, et al. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. Biotechnol Adv. 2017;35(2):217-239.
[41] BYAMBAA B, ANNABI N, YUE K, et al. Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue. Adv Healthc Mater. 2017. doi:10.1002/adhm. 201700015.
[42] BREATHWAITE E, WEAVER J, ODANGA J, et al. 3D bioprinted osteogenic tissue models for in vitro drug screening. Molecules. 2020. doi:10.3390/molecules25153442.
[43] LI Y C, ZHANG YS, AKPEK A, et al. 4D bioprinting:the next-generation technology for biofabrication enabled by stimuli-responsive materials. Biofabrication. 2016;9(1):012001.
[44] 高彤 , 丁冠守 , 苏萍萍 , 等 . 药物筛选模型的研究进展 [J]. 海峡药学 , 2021,33(7):1-5.
[45] HAMEED A, BRADY JJ, DOWLING P, et al. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management.Cancer Growth Metastasis. 2014;7:33-42.
[46] BELLONI D, HELTAI S, PONZONI M, et al. Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment. Haematologica. 2018;103(4):707-716.
[47] MONTEIRO CF, CUSTODIO CA, MANO JF. Bioengineering a humanized 3D tri-culture osteosarcoma model to assess tumor invasiveness and therapy response. Acta Biomater. 2021;134:204-214.
[48] RIMANN M, LATERNSER S, GVOZDENOVIC A, et al. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. J Biotechnol. 2014;189:129-135.
[49] CORTES I, MATSUI R AM, AZEVEDO MS, et al. A scaffold- and serum-free method to mimic human stable cartilage validated by secretome. Tissue Eng Part A. 2021;27(5-6):311-327.
[50] LOTZ MK, CARAMES B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7(10):579-587.
[51] DIEKMAN BO, SESSIONS GA, COLLINS J A, et al. Expression of p16(INK) (4a) is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. Aging Cell. 2018;17(4):e12771.
[52] ROSSER J, BACHMANN B, JORDAN C, et al. Microfluidic nutrient gradient-based three-dimensional chondrocyte culture-on-a-chip as an in vitro equine arthritis model. Mater Today Bio. 2019;4:100023.
[53] SAMAVEDI S, DIAZ-RODRIGUEZ P, ERNDT-MARINO JD, et al. A three-dimensional chondrocyte-macrophage coculture system to probe inflammation in experimental osteoarthritis. Tissue Eng Part A. 2017; 23(3-4):101-114.
[54] REID IR. A broader strategy for osteoporosis interventions. Nat Rev Endocrinol. 2020;16(6):333-339.
[55] CHEN LR, KO NY, CHEN KH. Medical treatment for osteoporosis: from molecular to clinical opinions. Int J Mol Sci. 2019. doi:10.3390/ ijms20092213.
[56] ZHENG Z, YU C, WEI H. Injectable hydrogels as three-dimensional network reservoirs for osteoporosis treatment. Tissue Eng Part B Rev. 2021;27(5):430-454.
[57] 林建立 , 蔡敏 , 林庆明 , 等 . 微流控芯片关键技术及其在骨质疏松症和糖尿病发病机制研究的应用 [Z]. 福建省立医院 .2017.
[58] ZHAO R, CHEN S, ZHAO W, et al. A bioceramic scaffold composed of strontium-doped three-dimensional hydroxyapatite whiskers for enhanced bone regeneration in osteoporotic defects. Theranostics. 2020;10(4):1572-1589.
[59] KAMEL R, EL-WAKIL NA, ABDELKHALEK AA, et al. Nanofibrillated cellulose/cyclodextrin based 3D scaffolds loaded with raloxifene hydrochloride for bone regeneration. Int J Biol Macromol. 2020;156: 704-716.
[60] 李利青 , 张逢 , 彭馥芝 , 等 . 类风湿关节炎实验性动物模型研究进展 [J]. 中国药理学通报 ,2021,37(11):1492-1497.
[61] PECK Y, LEOM LT, LOW PFP, et al. Establishment of an in vitro three-dimensional model for cartilage damage in rheumatoid arthritis. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(1): e237-e249.
[62] AGOSTINI SBN, MALTA IHS, RODRIGUES RF, et al. Preclinical evaluation of methotrexate-loaded polyelectrolyte complexes and thermosensitive hydrogels as treatment for rheumatoid arthritis. Eur J Pharm Sci. 2021; 163:105856.

(责任编辑：WJ，ZN，ZH)