

骨组织工程应用中基于壳聚糖水凝胶的研究进展

周昌顺

浙江理工大学生命科学与医药学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年5月20日; 录用日期: 2022年6月16日; 发布日期: 2022年6月23日

摘要

人体骨组织中包含各种细胞、蛋白和细胞外基质, 其中细胞外基质是由各种生物大分子相互交联而成的聚合网状结构。水凝胶指由聚合物或者胶体分子紧密交联从而形成的三维网状结构, 是具有较高吸水能力、亲水性能的聚合材料, 水凝胶的结构与细胞外基质高度相似而被广泛应用于生物医学领域。近年来, 已经在诱导血管生成、软骨组织重建和人工合成骨材料移植等方面取得了重大进展。壳聚糖作为一种由甲壳素经过脱乙酰化生成的聚合物分子, 是自然界中唯一存在的具有聚阳离子的弱碱性多糖。壳聚糖水凝胶材料在骨组织工程的应用中受到了广泛关注, 因为它具有良好的抗菌性、生物相容性、生物降解性, 并且能够作为小分子药物的载体, 对目标区域起到缓释作用。在最近的研究中, 通过引入其他分子或对天然壳聚糖改性从而构建温度响应、光响应和pH响应壳聚糖水凝胶。本文综述了骨组织工程应用中不同类型的壳聚糖水凝胶材料。

关键词

细胞外基质, 水凝胶, 壳聚糖, 骨组织工程

Research Progress of Chitosan-Based Hydrogels for Bone Tissue Engineering Applications

Changshun Zhou

College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou Zhejiang

Received: May 20th, 2022; accepted: Jun. 16th, 2022; published: Jun. 23rd, 2022

Abstract

Human bone tissue contains various cells, proteins and extracellular matrix, wherein the extra-

cellular matrix is a polymeric network structure formed by cross-linking of various biological macromolecules. Hydrogel refers to a three-dimensional network structure formed by the close cross-linking of polymers or colloidal molecules. It is a polymeric material with high water absorption and hydrophilic properties. The structure of hydrogel is highly similar to the extracellular matrix and is widely used in the field of biomedicine. In recent years, significant progress has been made in the induction of angiogenesis, cartilage tissue reconstruction, and implantation of synthetic bone materials. Chitosan, as a polymer molecule produced by deacetylation of chitin, is the only weakly basic polysaccharide with polycation in nature. Chitosan hydrogel materials have received extensive attention in the application of bone tissue engineering because of their good antibacterial properties, biocompatibility, and biodegradability. It can be used as a carrier of small molecule drugs and has a slow release effect on the target area. In recent studies, temperature-responsive, light-responsive and pH-responsive chitosan hydrogels were constructed by introducing other molecules or modifying natural chitosan. This article reviews different types of chitosan hydrogel materials for bone tissue engineering applications.

Keywords

Extracellular Matrix, Hydrogel, Chitosan, Bone Tissue Engineering

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在人体中由各种骨来源细胞、蛋白和细胞外基质共同构成骨组织，具有支撑、运动并且保护器官，同时也能调节矿物质和血液 pH 值等功能[1] [2]。其中骨来源细胞主要包括成骨细胞、骨细胞、破骨细胞以及骨原细胞，每种细胞在机体中所呈现的形态和所发挥的功能也不尽相同[3] [4]。蛋白主要以胶原蛋白的形式存在，约占 80%~90%，此外还有骨钙素、骨连接蛋白、骨桥蛋白和蛋白多糖等[5]。骨组织可以分为松质骨和密质骨。松质骨约占全身总骨量的 20%，与密质骨相比密度较低并且具有较好弹性，如颅骨、肋骨和脊柱骨等[6]。在密质骨中除了约 3%~5%的相互连接的管道以外，几乎是实心的，并且密度较高[7]。

伴随着由创伤、感染和人口老龄化所造成的骨缺损在临床上时常发生，机体虽然面对小范围的骨缺损具有一定修复能力，但骨组织损伤修复过程缓慢[8]。现如今，较大范围尤其是承重部位的骨缺损修复仍然是一个严峻的临床挑战。目前针对骨修复的治疗方法包括自体骨和同种异体骨移植在内的骨移植手术，往往存在机体免疫排斥、骨来源范围有限和难以获得机体所需要的合适形状移植物等缺陷，这些缺陷极大的限制了它们在骨缺损治疗中的应用[9]。作为一种新型治疗方法，骨组织工程是通过利用细胞、促骨生长因子和生物材料的两种或三种组合来修复或替代发生缺损的骨组织[10]。

水凝胶是一种具有特定空间结构的交联聚合物，在分子网络中具有高密度的亲水性基团，所以能够吸附大量的水分[11]。水凝胶表面大多呈现疏松多孔结构并且与人体细胞外基质结构高度相似，在组织工程中，常常利用水凝胶的这一特性封装小分子药物，在机体中起到缓释的作用，防止局部药物浓度过高或过低，并且达到持续性释放的效果[12]。除此以外，水凝胶还具有易于调整的物理、化学和生物特性，通过对聚合物进行调整而得到具有几种特定性质的水凝胶[13]。对温度的变化而响应发生溶液 - 凝胶化转变的水凝胶被称为温敏水凝胶，通常将溶液状态的聚合物注射进入机体，其在体温下发生凝胶化反应[14]。对光照具有响应性而发生凝胶化作用的称之为光响应水凝胶，常见的包括对紫外光和可见光等的响应。

体系中由于 pH 值的变化而发生凝胶化反应被称为 pH 响应水凝胶。这些智能响应性凝胶具有广泛的应用前景,包括携带细胞、治疗性药物和生物活性分子,并且可以填充在任何不规则形状的骨缺损中[15]。因此,迫切需要寻找合适的水凝胶材料,壳聚糖作为一种具有聚阳离子的多糖,在临床上已被证明具有抑菌性能,并且具有良好的生物相容性,制备壳聚糖水凝胶的关键过程是通过不同的化合物进行离子交联或共价交联,从而得到生物相容性和耐受性良好的水凝胶,基于壳聚糖水凝胶材料已被广泛应用于骨组织工程领域中[16]。

2. 壳聚糖水凝胶种类

2.1. 温敏壳聚糖水凝胶

利用组织工程的思路去治疗和修复骨组织是一种极具发展潜力的方法。通过可注射性水凝胶作为基础,可以填充在任意形状的骨缺损部位或者作为运输各种生物活性分子的载体从而达到骨组织修复的效果,这样可以减少临床外科手术干预[17]。壳聚糖(Chitosan, CS)是一种天然多糖,通过添加 β -甘油磷酸酯形成一种热敏可注射水凝胶。这种混合水凝胶具有许多优点,在体内具有较为良好的生物相容性以及体温下能够快速凝胶化。

Dhivya [18]等开发了一种锌(Zinc, Zn)掺杂的壳聚糖/纳米羟基磷灰石(Nanohydroxyapatite, nHAp)/ β -甘油磷酸(Beta-glycerophosphate, β -GP)水凝胶,由于 β -GP 的存在导致水凝胶在 37°C 时呈现溶液-凝胶转变,添加的 nHAp 也能在体外促进成骨细胞分化,并加速体内骨形成。生物学实验表明水凝胶对细胞无明显毒性,并且合成的可注射性水凝胶(Zn-CS/nHAp/ β -GP)在体内外的分子水平和细胞水平显示了其骨形成的潜力。

Wang [19]构建了一种壳聚糖/胶原蛋白/ β -甘油磷酸复合水凝胶封装成人骨髓干细胞(Human bone marrow-derived stem cells, hBMSC),显示出良好的生物相容性,壳聚糖和胶原蛋白都是天然来源的高分子材料,可作为细胞生存的优良载体,因为它们具有模拟细胞外环境的能力。壳聚糖-胶原复合水凝胶材料在骨组织工程中具有潜在的应用前景。

Taymouri [20]等制备了热敏壳聚糖(CS)/丝素(Silk fibroin, SF)水凝胶结合双嘧达莫(Dipyridamole, DIP)负载的聚己内酯纳米颗粒(Polycaprolactone nanoparticles, DIP-PCLNPs),用于 DIP 的局部控制传递。体外释放实验表明该体系可持续释放 DIP,细胞实验显示含有 CS/SF 水凝胶处理细胞的增殖和成骨分化均优于单纯添加纳米粒子处理的细胞,复合水凝胶的优异性能表明该体系可用于骨组织工程。

Pankongadisak [21]等制备了壳聚糖/丝胶蛋白/ β -甘油磷酸复合热敏水凝胶以负载龙眼籽提取物。水凝胶在 37°C 下能够在 10 分钟内迅速发生溶液-凝胶转变,加入丝胶蛋白使凝胶化时间缩短。水凝胶表面呈现不规则的疏松多孔形状,并且对细胞无毒性,支持细胞在水凝胶表面附着。表明水凝胶具有组织工程材料的应用潜力。

2.2. pH 响应壳聚糖水凝胶

水凝胶的结构特点与体内组织环境相似,因此它们是细胞增殖和分化的理想微环境[22]。开发一种适合骨组织工程应用的原位形成可注射水凝胶须满足几个标准:1)能够在体内生理条件下发生溶液-凝胶转变,并且凝胶化速度足够快;2)具有良好的生物相容性,在凝胶化过程中以及体内应用过程中不会释放有害副产物;3)水凝胶具有响应活性官能团,对 pH 等刺激敏感,导致凝胶化转变而不损害周围组织[23]。pH 响应壳聚糖可注射水凝胶,在骨重建过程中具有相当大的潜力。

Rogina [24]等提出了一种以碳酸氢钠作为胶凝剂的 pH 响应壳聚糖-羟基磷灰石水凝胶。碳酸氢钠的应用可以使壳聚糖-羟基磷灰石在 4 分钟快速凝胶化,并且无细胞毒性,同时也不存在过量的钠离子浓

度。交联水凝胶的流变学特性显示,它可能具有“强物理水凝胶”的特性。这种新型的 pH 响应壳聚糖水凝胶为骨组织工程领域研究提供新思路。

Zhao [25]等人设计了一种羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan, CMCh)/无定形磷酸钙(Calcium phosphate, ACP)水凝胶体系,其中葡萄糖酸 δ -内酯是一种酸化剂,用于获得 pH 响应可注射水凝胶。研究发现,水凝胶具有骨诱导性,在体外能诱导细胞成骨调节因子和骨标记物的表达,支持细胞增殖和细胞粘附。pH 敏感的 CMCh-ACP 复合水凝胶可能会进一步发展成为新型骨组织工程支架。

2.3. 光响应壳聚糖水凝胶

尽管壳聚糖良好的生物相容性、广谱抗菌性使其成为骨组织工程应用中极受欢迎的候选材料,但其本身存在的较差的溶解性以及较低的力学性能限制了其在骨组织工程领域中的应用[26]。壳聚糖作为唯一存在的碱性聚合糖类,其中性环境下溶解性能较差,往往只能在酸性条件下溶解,且溶解后的体系呈酸性,这种酸性体系会对机体造成损害[27]。最近,针对壳聚糖溶解性能较差的问题,众多学者提出了将天然壳聚糖进行改性,赋予了壳聚糖水溶性以及光响应特性。

白雪[28]提出了将甲基丙烯酸酐接枝在壳聚糖分子链的活性氨基上,将壳聚糖改性成一种甲基丙烯酸酯壳聚糖,赋予壳聚糖水溶性以及紫外响应性,同时通过仿生矿化反应在水凝胶内部形成方解石形状碳酸钙,在 3D 打印多孔钛支架表面构建水凝胶涂层。通过实验表明构建的紫外响应性水凝胶涂层具有良好的抗菌性和生物相容性,对骨组织工程发展和应用具有借鉴意义。

Li [29]等将壳聚糖改性成 N-甲基丙烯酰壳聚糖(N-methacryloyl chitosan, N-MAC),与羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)混合,原位紫外照射制备了混合水凝胶以促进颅骨缺损的骨再生。N-MAC 水凝胶封装细胞的存活率达到 80%,表明 N-MAC 具有良好的生物相容性,可以作为人工构建的细胞外基质的候选材料。将 N-MAC 水凝胶与 HA 混合植入颅骨缺损模型来评价水凝胶对骨再生的促进作用,结果表明该水凝胶可以实现颅骨组织再生。

Yoon [30]制备了包含转化生长因子- β 1 和骨形态发生蛋白-2 的可见光固化乙二醇壳聚糖可注射性水凝胶。实验表明该水凝胶体系可促进细胞的体外增殖和分化,并且水凝胶加速了大鼠胫骨缺损部位的骨形成,显示了该水凝胶在骨科和牙科领域具有临床应用潜力。

2.4. 引入其他聚合物分子的壳聚糖水凝胶

单一溶质的壳聚糖水凝胶可能存在力学性能差和成骨性能不足等缺陷,往往引入聚合物分子以改善水凝胶的性能。Maharjan [31]等将再生纤维素(Regenerated cellulose, rCL)纳米纤维引入壳聚糖(CS)水凝胶中提高水凝胶机械强度。实验表明 rCL/CS 复合水凝胶支架支持细胞的附着和增殖,碱性磷酸酶和茜素红染色结果得出该水凝胶支架具有一定成骨性能,由此可以看出该复合水凝胶是一种很有应用前景的骨组织工程三维生物支架。

Bi [32]等通过医用级聚乙烯醇(Poly vinyl alcohol, PVA)与壳聚糖混合制备了一种双网络水凝胶。研究表明制备的水凝胶具有良好的体外生物相容性,并且引入羟基磷灰石,能促使水凝胶具有诱导大鼠骨髓干细胞(Rat bone marrow stem cells, rBMSCs)分化的能力。体内骨缺损愈合实验中,双网络水凝胶能显著加速兔骨缺损模型的骨缺损再生。

Peng [33]等设计了一种新型的聚乙烯醇/壳聚糖(PVA/CS)多孔水凝胶,并将其应用于软骨缺损的修复。实验结果表明 PVA/CS 无细胞毒性,能促进细胞增殖,在大白兔体内软骨组织愈合实验中包封骨髓间充质干细胞水凝胶组软骨愈合效果最好。由此可见新型 PVA/CS 多孔复合水凝胶是一种很好的修复软骨组织工程材料。

2.5. 引入其他生物活性分子的壳聚糖水凝胶

在现如今的研究中,已经开发了基于壳聚糖水凝胶包载生物活性分子构建药物传递系统,使得生物活性分子在一定时间内能够持续性并且保持一定浓度输送至靶点。将生物活性因子封装在壳聚糖水凝胶内,已经成为组织工程和医疗领域的重点研究话题。

Meng [34]等将 E7 亲和肽修饰的脱矿质骨基质(Demineralized bone matrix, DBM)颗粒与壳聚糖(CS)水凝胶结合,构建了一种名为 DBM-E7/CS 的复合支架。该支架具有良好的生物力学性能、良好的生物相容性、高度特异性、支持细胞的增殖和粘附,以及良好的体内软骨形成能力。

Nandi [35]等通过液体硬化的方法制备高孔、大孔壳聚糖支架作为骨移植替代物。实验表明体内胰岛素样生长激素-1 和骨形态发生蛋白-2 的释放显著促进骨组织愈合以及再生。表明壳聚糖可作为支架装置的基础材料和骨愈合生长因子的载体,为临床骨科移植材料提供了可靠选择。

3. 总结与展望

近年来,基于壳聚糖的水凝胶在骨组织工程中发挥着至关重要的作用。通过对天然壳聚糖改性或与其他物质共混而获得的复合水凝胶材料具有良好的骨传导和骨诱导性能,赋予壳聚糖水凝胶温度响应性、pH 响应性以及光响应性,水凝胶本身的优异性质使其成为骨植入领域的一种极具影响力的候选材料。虽然已经提出了许多壳聚糖复合材料,但其力学性能较差的问题亟待解决。伴随着研究的不断进行,这些壳聚糖复合水凝胶将引发更广泛的兴趣,并可能进一步开发临床应用,以更好地治疗承重部位的大范围骨缺损。

参考文献

- [1] 方娟. 不同力学环境导致宏微观骨结构变化的数值模拟及多尺度实验研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [2] 王洪复. 骨的结构、功能及转换[J]. 实用妇产科杂志, 1995(5): 227-229.
- [3] 张丽丽. 浓缩生长因子对兔骨膜来源细胞增殖、成骨分化及成血管潜能的研究[D]: [博士学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [4] Teti, A. (2011) Bone Development: Overview of Bone Cells and Signaling. *Current Osteoporosis Reports*, **9**, 264-273. <https://doi.org/10.1007/s11914-011-0078-8>
- [5] 武文霞, 于同慧, 朱祎, 王庆玲, 卢士玲, 刘成江, 董娟. 骨胶原蛋白的制备及其在食品中应用的研究进展[J/OL]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 1-10. <http://www.spagykj.com/article/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2021070289>, 2021-11-03.
- [6] Wear, K.A. (2008) Ultrasonic Scattering from Cancellous Bone: A Review. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, **55**, 1432-1441. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2008.818>
- [7] 李沛雨, 许述财, 杜雯菁, 李浩, 张金换. 中国人肋骨密质骨厚度的测定与特征分析[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2017, 57(8): 815-820+831.
- [8] Teotia, A.K., Qayoom, I., Singh, P., Mishra, A., Jaiman, D., Seppälä, J., Lidgren, L. and Kumar, A. (2021) Exosome-Functionalized Ceramic Bone Substitute Promotes Critical-Sized Bone Defect Repair in Rats. *ACS Applied Bio Materials*, **4**, 3716-3726. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00311>
- [9] 杨小彬. 同种异体骨复合带血管自体骨移植修复大段骨缺损的实验研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [10] Venkatesan, J. and Kim, S.K. (2010) Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview. *Marine Drugs*, **8**, 2252-2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
- [11] 王思棋. 响应性高强度水凝胶的制备、结构及性能探究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 长春工业大学, 2021.
- [12] Zhang, Y., Yu, T., Peng, L., Sun, Q., Wei, Y. and Han, B. (2020) Advancements in Hydrogel-Based Drug Sustained Release Systems for Bone Tissue Engineering. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, Article No. 622.

- <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00622>
- [13] 夏莉. 具有大幅度双向弯曲性能的双层水凝胶柔性执行器的研究[D]: [硕士学位论文]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [14] Huang, H., Qi, X., Chen, Y. and Wu, Z. (2019) Thermo-Sensitive Hydrogels for Delivering Biotherapeutic Molecules: A Review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **27**, 990-999. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.001>
- [15] Dhand, A.P., Galarraga, J.H. and Burdick, J.A. (2021) Enhancing Biopolymer Hydrogel Functionality through Interpenetrating Networks. *Trends in Biotechnology*, **39**, 519-538. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.08.007>
- [16] 苏雨. 携载 PEG-PLA 纳米粒子的壳聚糖水凝胶局部递送 miR-146a 在变应性鼻炎中的应用[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [17] Cheng, W., Ding, Z., Zheng, X., Lu, Q., Kong, X., Zhou, X., Lu, G. and Kaplan, D.L. (2020) Injectable Hydrogel Systems with Multiple Biophysical and Biochemical Cues for Bone Regeneration. *Biomaterials Science*, **8**, 2537-2548. <https://doi.org/10.1039/D0BM00104J>
- [18] Dhivya, S., Saravanan, S., Sastry, T.P. and Selvamurugan, N. (2015) Nanohydroxyapatite-Reinforced Chitosan Composite Hydrogel for Bone Tissue Repair *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Nanobiotechnology*, **13**, 40. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0099-z>
- [19] Wang, L. and Stegemann, J.P. (2010) Thermogelling Chitosan and Collagen Composite Hydrogels Initiated with β -Glycerophosphate for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, **31**, 3976-3985. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.131>
- [20] Taymouri, S., Amirkhani, S. and Mirian, M. (2021) Fabrication and Characterization of Injectable Thermosensitive Hydrogel Containing Dipyridamole Loaded Polycaprolactone Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **64**, Article ID: 102659. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102659>
- [21] Pankongadisak, P. and Suwanton, O. (2018) The Potential Use of Thermosensitive Chitosan/Silk Sericin Hydrogels Loaded with Longan Seed Extract for Bone Tissue Engineering. *RSC Advances*, **8**, 40219-40231. <https://doi.org/10.1039/C8RA07255H>
- [22] 王笑. 新型功能修饰壳聚糖衍生化水凝胶合成制备及性能研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- [23] 金慧. 糖肽可注射水凝胶的制备及骨修复应用[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [24] Rogina, A., Ressler, A., Matić, I., Ferrer, G.G., Marijanović, I., Ivanković, M. and Ivanković, H. (2017) Cellular Hydrogels Based on pH-Responsive Chitosan-Hydroxyapatite System. *Carbohydrate Polymers*, **166**, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.105>
- [25] Zhao, C., Qazvini, N.T., Sadati, M., Zeng, Z., Huang, S., De La Lastra, A.L. and He, T.C. (2019) A pH-Triggered, Self-Assembled, and Bioprintable Hybrid Hydrogel Scaffold for Mesenchymal Stem Cell Based Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **11**, 8749-8762. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19094>
- [26] 徐飞扬. 壳聚糖基水凝胶材料的制备及其基础应用研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉纺织大学, 2021.
- [27] 熊文说. 水溶性壳聚糖衍生物的合成、表征及其作为医用材料评价的研究[D]: [博士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2011.
- [28] 白雪. 3D 打印多孔钛表面复合载药壳聚糖水凝胶涂层构建及其抑菌效果的研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江理工大学, 2020.
- [29] Li, B., Wang, L., Hao, Y., Wei, D., Li, Y., Feng, Y., Jia, D. and Zhou, Y. (2015) Ultraviolet-Crosslinkable and Injectable Chitosan/Hydroxyapatite Hybrid Hydrogel for Critical Size Calvarial Defect Repair *in Vivo*. *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine*, **6**, Article ID: 041001. <https://doi.org/10.1115/1.4032902>
- [30] Yoon, S.J., Yoo, Y., Nam, S.E., Hyun, H., Lee, D.W., Um, S., Kim, S.Y., Hong, S.Y., Yong, D.H. and Chun, H.J. (2018) The Cocktail Effect of BMP-2 and TGF- β 1 Loaded in Visible Light-Cured Glycol Chitosan Hydrogels for the Enhancement of Bone Formation in a Rat Tibial Defect Model. *Marine Drugs*, **16**, Article No. 351. <https://doi.org/10.3390/md16100351>
- [31] Maharjan, B., Park, J., Kaliannagounder, V.K., Awasthi, G.P., Joshi, M.K., Park, C.H. and Kim, C.S. (2021) Regenerated Cellulose Nanofiber Reinforced Chitosan Hydrogel Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Carbohydrate Polymers*, **251**, Article ID: 117023. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117023>
- [32] Bi, S., Wang, P., Hu, S., Li, S., Pang, J., Zhou, Z., Sun, G., Huang, L., Cheng, X., Xing, S. and Chen, X. (2019) Construction of Physical-Crosslink Chitosan/PVA Double-Network Hydrogel with Surface Mineralization for Bone Repair. *Carbohydrate Polymers*, **224**, Article ID: 115176. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115176>
- [33] Peng, L., Zhou, Y., Lu, W., Zhu, W., Li, Y., Chen, K., Zhang, G. and Wang, D. (2019) Characterization of a Novel Polyvinyl Alcohol/Chitosan Porous Hydrogel Combined with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Its Applica-

tion in Articular Cartilage Repair. *BMC Musculoskeletal Disorders*, **20**, Article No. 257.

<https://doi.org/10.1186/s12891-019-2644-7>

- [34] Meng, Q., Man, Z., Dai, L., Huang, H., Zhang, X., Hu, X., Shao, Z., Zhu, J., Zhang, J., Fu, X., Duan, X. and Ao, Y. (2015) A Composite Scaffold of MSC Affinity Peptide-Modified Demineralized Bone Matrix Particles and Chitosan Hydrogel for Cartilage Regeneration. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 17802. <https://doi.org/10.1038/srep17802>
- [35] Nandi, S.K., Kundu, B. and Basu, D. (2013) Protein Growth Factors Loaded Highly Porous Chitosan Scaffold: A Comparison of Bone Healing Properties. *Materials Science and Engineering: C*, **33**, 1267-1275. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.025>