

综述

骨骼肌损伤修复的组织工程技术研究进展

蒋相康, 杨婧媛, 张茂*

浙江大学医学院附属第二医院急诊医学科/浙江大学急救医学研究所/浙江省严重创伤与烧伤诊治重点实验室, 杭州 310009

[中图分类号] R318

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.04.0394

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

蒋相康, 杨婧媛, 张茂. 骨骼肌损伤修复的组织工程技术研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(4): 0394-0401.

[收稿日期] 2021-04-08

[录用日期] 2021-08-06

[上线日期] 2021-10-21

[摘要] 正常的骨骼肌组织具有一定再生能力, 损伤发生后肌源性干细胞对受损的肌纤维进行修复, 同时其他结构在血管神经网络的支持下重建。在严重损伤后或病理情况下可能出现骨骼肌的再生能力受限或相对不足, 而组织工程学方法为修复受损的骨骼肌提供了一条具有前景的途径。近年来, 组织工程技术在骨骼肌修复领域的研究成果不断涌现, 本文结合国内外最新文献, 系统地综述了组织工程技术修复骨骼肌损伤的研究进展。

[关键词] 骨骼肌损伤; 肌肉再生; 组织工程

Research status of tissue engineering techniques in repairing skeletal muscle injury

Jiang Xiang-Kang, Yang Jing-Yuan, Zhang Mao*

Department of Emergency Medicine, the Second Affiliated Hospital Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang University/Research Institute of Emergency Medicine/Key Laboratory of the Diagnosis and Treatment of Severe Trauma and Burn of Zhejiang Province, Hangzhou 310009, China

*Corresponding author, E-mail: z2jzk@zju.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82072126)

[Abstract] Healthy skeletal muscle has a certain capacity for regeneration. Muscle regenerative response mainly rely on the action of myogenic stem cells, other structures of muscle tissue are reconstructed with the support of vascular and neural networks. However, endogenous self-regeneration is severely impaired in large muscle injuries or under pathological condition. Consequently, tissue engineering approaches are a promising means to regenerate skeletal muscle. The latest domestic and international research progress of tissue engineering technology in repairing skeletal muscle injury has been reviewed in present paper.

[Key words] skeletal muscle injury; muscle regeneration; tissue engineering

骨骼肌占人体体重的40%~45%, 对机体活动至关重要。机体通过协调骨骼肌的收缩与舒张控制运动, 保护关节稳定性、维持姿势及保持身体平衡。此外, 骨骼肌在呼吸运动、代谢调节、体温调控和能量存储中也起着重要作用^[1]。在各种创伤事件中

骨骼肌组织容易发生急性损伤, 肿瘤、遗传、代谢性疾病等原因造成的骨骼肌损伤也较常见。组织工程是应用生命科学与工程学的原理和技术, 在正确认识哺乳动物正常及病理状态下组织结构与功能关系的基础上, 研究与开发用于修复、维护、促进人

[基金项目] 国家自然科学基金(82072126)

[作者简介] 蒋相康, 硕士研究生, 主要从事创伤修复与组织再生领域的研究

[通信作者] 张茂, E-mail: z2jzk@zju.edu.cn

化^[18]等。目前研究虽然发现了许多调控SCs活化的因素,但体外培养的SCs仍会逐渐失去自我更新的能力;SCs的主要来源为肌肉活检,这种方法会给患者带来一定损伤,且无法获得足够数量的SCs用于骨骼肌组织的修复。传统的酶解法获得的SCs数量少,纯度低^[11]。为解决上述问题,Garcia等^[19]发展了一系列高效纯化、保存和连续移植人体SCs的方法,为相关基础和临床研究提供了较好的解决方案。

除SCs外,具有种子细胞潜能的还有间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。在MSCs群体中,研究较多的是脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)和骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow-derived stem cells, BMSCs)。BMSCs主要从患者股骨和胫骨的骨髓中获取,数量较少,对患者危害较大。相反,ADSCs易获得、生长较快,且可表达更高水平的干细胞标志物^[20]。因此,ADSCs在MSCs中作为种子细胞的应用前景更好。虽然多项研究表明MSCs具有促进骨骼肌再生的作用,但其作用机制仍存在争议。MSCs是一种多能干细胞,可分泌生物活性因子,具有免疫调节和促进血管生成的能力^[21]。同时,MSCs可向骨骼肌细胞分化^[22]。已经证实MSCs产生的旁分泌因子,如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,在血管生成和肌源性干细胞的活化中起着重要作用^[23]。最近研究发现,MSCs产生的细胞因子IL-6可通过激活STAT通路诱导巨噬细胞向M2型极化,从而促进损伤后肌肉组织的再生^[24]。Mitchell等^[25]的研究发现,ADSCs分泌的细胞外囊泡在肌肉再生过程中起着有益的作用。但MSCs直接分化为骨骼肌细胞的效率较低。在分化培养基中,仅15%的MSCs能分化为骨骼肌细胞^[26]。虽然许多研究致力于提高MSCs的分化效率,例如在支架材料上培养细胞^[27]、施加物理或化学刺激^[28-29]等,但效果有限,尚不足以应用于临床。因此,今后应进一步探讨提升MSCs分化效率的方法,以促进MSCs作为种子细胞在组织工程中的应用。

ESCs和iPSCs都拥有向所有胚层细胞分化的潜能,但伦理问题限制了ESCs的应用,iPSCs可以用人体多数体细胞制备,具有更广阔的应用前景^[30]。目前的研究主要通过转基因或化学诱导的方法将iPSCs转化为骨骼肌细胞,转基因技术较化学

诱导稳定,可直接获得诱导成肌祖细胞(induced myogenic progenitors, iMPCs)。Rao等^[31]成功利用iMPCs构建了具备3D结构的骨骼肌束,奠定了iMPCs的应用基础。化学诱导主要通过向培养基中加入特定物质诱导iPSCs向肌细胞谱系分化,如Shelton等^[32]证实了在培养液中添加胶原酶IV和成纤维细胞生长因子2可诱导iPSCs向肌源性分化。虽然iPSCs可分化为骨骼肌细胞,但由于当前无法精准控制iPSCs的分化方向,植入体内后有产生肿瘤组织的可能,临床应用iPSCs的安全性尚须充分认证,以确保其在体内不会向肿瘤细胞转变^[33]。

2.2 支架材料 支架材料是具有3D结构的生物材料,在组织工程中起着不可或缺的作用。仿生支架能为种子细胞提供暂时的机械支撑,并对细胞的黏附、增殖与分化进行调节^[34]。理想的支架材料应满足以下标准:(1)无毒且具有良好的组织相容性,不会引起机体的免疫排斥反应;(2)具有3D空间结构和组织孔隙,以便再生组织能够与宿主组织整合;(3)具有生物可降解性、降解可调控性、可塑性;(4)具有一定的机械强度,能抵抗一定的张力;(5)可促进细胞黏附与增殖,诱导组织再生;(6)可促进骨骼肌再生,以及血管和神经肌肉接头的形成^[35]。

目前常用的支架材料主要有生物材料支架(如胶原蛋白支架、脱细胞基质支架、纤维蛋白支架、壳聚糖及其衍生物支架、透明质酸支架、角蛋白支架等)、高分子材料支架(如聚羟基乙酸支架、聚己交酯支架、聚乳酸支架、聚乳酸-乙醇酸支架等)以及各种材料制作的复合支架^[35]。单一材料构成的支架往往存在很多缺陷,通过整合各种材料的优点制作复合支架可为种子细胞提供更好的环境。骨骼肌组织能够通过神经网络传导电刺激,且电刺激在肌肉生长过程中也起着一定作用,这使得导电能力对支架十分重要,也是当前研究的热点。近年来研究证实,导电生物材料支架能通过电刺激有效促进肌源性干细胞的黏附、增殖与分化,并提高仿生肌肉的成熟度^[36-37]。目前研究人员已经开发出多种类型的导电生物材料用于支架制作,如导电聚合物^[38]、碳纳米材料及金属纳米材料^[39-40]等,未来进一步的研究可促进导电生物材料在组织工程技术修复骨骼肌损伤中的应用。

支架材料在组织工程中的主要作用是模仿细胞外基质,材料的物理结构和化学性质影响着种子细胞的命运。其中较为重要的特性包括支架对细胞的黏附作用、支架的3D空间结构及弹性。早期研究发现,移植的SCs未与细胞外基质整合可诱发凋亡,导致细胞移植的成活率较低^[41]。用细胞黏附

配体对天然或合成聚合物进行修饰,增强SCs与植入支架的黏附作用,可有效提高细胞成活率^[42]。骨骼肌组织主要由平行排列的肌纤维束组成,其毛细血管丰富,血流量大,代谢率较高,对氧的需求量也较大。因此,支架材料应包含大小与数量一定的相互连通的孔隙,以允许营养物质的有效传递和代谢废物的清除。一般情况下,支架的孔径尺寸在100~500 μm 是细胞生长的最佳条件^[43]。另外,支架材料的弹性对骨骼肌的再生也有一定影响。正常肌肉的弹性值为12 kPa,衰老、损伤和疾病可导致组织僵硬增加^[44]。体内外研究表明,不同弹性值的材料会对SCs的增殖及分化产生不同的影响^[45-46],在模拟生理弹性值的支架材料上SCs的自我更新能力最强^[47],可能更适合应用于骨骼肌组织工程。

2.3 生长因子 生长因子是调节细胞生长、增殖、迁移和分化的可溶性信号肽,可通过连接或嵌入的方式与支架材料结合输送至肌肉组织。直接肌肉内注射生长因子对组织再生的促进作用很小^[48],可能与局部注射后迅速耗尽导致浓度下降或生物活性丧失有关。因此,可通过共价键、物理包埋或表面吸附的方式将生长因子与支架结合,从而实现在局部组织中的持续性释放。目前在骨骼肌组织工程中常用的生长因子主要有VEGF、HGF、IGF-1以及成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)^[49]。VEGF可诱导新生血管形成,增加营养物质和氧气的供应,从而促进肌肉组织生长^[50]。HGF可能通过肝细胞生长因子受体c-MET促进SCs的活化^[51]。IGF-1被认为是调节肌肉修复的关键因子,体外实验表明其具有刺激成肌细胞增殖和肌纤维肥大的作用^[52],而体内实验表明其可增强肌组织的再生^[53]。

FGF与受体结合后能诱导SCs的活化与增殖^[54]。值得注意的是,细胞因子刺激肌肉再生的作用是相互协同的,如联合应用VEGF和IGF-1较单独使用可明显增强肌肉组织的再生能力,表明二者在促进血管生成、神经再支配和肌肉生成方面具有协同作用^[55]。

3 组织工程技术修复骨骼肌损伤的策略

组织工程技术修复骨骼肌损伤分为原位组织工程和体外组织工程两种策略^[56](图2)。原位组织工程技术是在植入体内的支架材料上结合细胞因子或旁分泌信号细胞,通过增强体内肌肉再生过程促进受损骨骼肌组织的修复(图2A)。体外组织工程技术是将种子细胞及其他细胞与支架材料相结合,直接植入肌肉损伤部位或在体外构建具有一定功能的骨骼肌组织后再进行植入(图2B)。与原位组织工程相比,体外组织工程的优势包括:(1)能设计特定结构的肌肉组织对受损部位进行精确修复;(2)可对植入物进行预处理,使其获得正常肌肉组织的部分功能;(3)能提供有益于SCs存活的环境,有利于植入后再生过程的继续进行^[8,57]。

体外组织工程技术经过几十年的发展,目前已能构建具备部分正常功能的仿生肌肉组织^[58]。1990年Strohman等^[59]首先在体外培育出了公认的骨骼肌组织,其由单层骨骼肌细胞排列,并能产生收缩活动。随后的研究在此基础上不断发展完善,如对培养的组织施加电和机械刺激、加强血流灌注以及促进神经-肌肉突触的形成等。适当的机械刺激可通过成肌细胞的细胞骨架蛋白传递至细胞核,从而调节多种转录因子的表达,促进肌细胞的成熟^[60]。电刺激可增加细胞外基质中的胶原沉积,促进SCs的

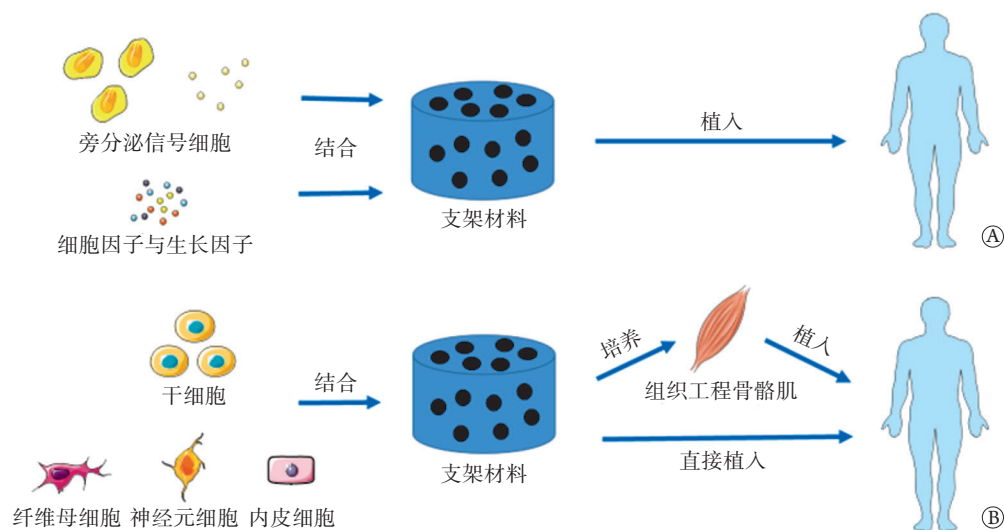


图2 组织工程技术修复骨骼肌损伤的策略(根据参考文献[56]修改)

Fig.2 Strategies for repairing skeletal muscle injury by tissue engineering techniques (modified from reference [56])

A. 原位组织工程; B. 体外组织工程

肌源性分化^[61]。另外,充分的营养物质交换对培养的组织十分重要。Levenberg等^[62]在高度多孔、可生物降解的聚合物支架上移植成肌细胞、胚胎成纤维细胞以及内皮细胞,诱导形成了类似于正常肌肉组织的血管内皮网络系统,为构建3D化的骨骼肌组织奠定了基础。许多研究发现,对体外培养的组织进行预血管化处理能够促进移植物与移植部位的整合,改善受损肌肉的功能^[63-65]。此外,肌肉的神经支配在肌细胞的发育以及肌肉功能的发挥中起着重要作用,可促进体外培养的骨骼肌组织形成;含有成熟乙酰胆碱受体的神经肌肉接头能够确保足够肌纤维的生成和电刺激传输,从而产生适当的力量收缩。目前解决的方法主要包括与神经元细胞共培养促进神经-肌肉接头的形成^[66],或在损伤的神经周围移植肌组织^[67]。

4 基因技术在组织工程修复骨骼肌损伤中的应用

基因技术与组织工程技术联合研发是骨骼肌疾病生物物理学领域的革命。基因编辑技术除可为组织工程构建合适的种子细胞来源外,还能通过构建具有分泌功能的靶细胞促进新生骨骼肌的形成以及组织工程骨骼肌的血管化。重组蛋白成本昂贵,在体内半衰期较短,作为生长因子递送的替代方法,目的基因可以通过病毒或非病毒载体(如质粒、脂质体等)递送的方式诱导相应生长因子的合成,且与外源性重组生长因子相比,局部合成生长因子经过翻译后修饰具有更高的生物活性^[68]。

目的基因递送分为体内和体外两种方式。体内法通过使用支架材料负载编码目的基因的病毒或非病毒载体至骨骼肌缺损处^[69],步骤相对简单,但对特定细胞的转染效率较低,且容易造成靶蛋白的异位表达。体外法从患者机体获取受体细胞后体外构建表达目的基因的受体细胞并进行体外扩增,再单独或结合支架材料植入骨骼肌缺损处^[70],可有效提高对特定细胞的转染效率,可控性强,但操作相对复杂,时间较长,成本也相对更高。相比体外法的成本与耗时,体内法由于具有简单和低成本的优势,具有更好的发展前景,但目前需提高转染的效率和靶向性,以为其临床应用奠定基础。

5 3D生物打印技术在组织工程修复骨骼肌损伤中的应用

在过去的10年中,3D生物打印技术在组织工程领域的应用得到了快速发展,为组织工程三大基本要素在时间和空间上的精准组合提供了有力工具。3D生物打印技术源于3D打印技术,可通过逐层打印由生物材料、种子细胞和生长因子组成的生

物墨水构建具有复杂生理结构的仿生组织,常用的打印方法包括喷墨式3D生物打印、微挤压式3D生物打印和激光辅助式3D生物打印等^[71]。在骨骼肌组织的构建中,3D生物打印技术可将水凝胶、脱细胞基质等生物材料配合种子细胞进行打印,精准还原骨骼肌组织的生理结构。如Choi等^[72]以3D生物打印的方式将C2C12成肌细胞整齐搭载于猪骨骼肌脱细胞基质中进行体外仿生骨骼肌组织的构建,发现所获骨骼肌组织的肌管成熟度较高。随后的研究也表明,与传统的体外组织工程技术相比,3D生物打印技术为种子细胞提供了一种更符合生理状态的微环境,促进了种子细胞的增殖与肌源性分化^[73],移植后的仿生骨骼肌组织与缺损部位的整合度也更高^[74]。目前研究致力于开发具有更高生物相容性和机械强度的生物墨水,以提高仿生骨骼肌组织的生物学性能。

6 外泌体在组织工程修复骨骼肌损伤中的应用

近年越来越多的研究表明,干细胞分泌的外泌体可发挥类似于干细胞的作用。外泌体是一类具有脂质双分子层的球状细胞外囊泡,直径为40~160 nm。在生理条件下,外泌体能够将蛋白质、脂质、miRNA等多种分子从亲代细胞转运到其他细胞,是细胞间重要的信号传导介质^[75]。作为一种生物活性分子,干细胞分泌的外泌体主要通过以下3种机制发挥作用:(1)调节病灶部位的炎症反应,减少骨骼肌细胞凋亡;(2)促进血管形成;(3)促进肌源性干细胞增殖分化,修复受损肌纤维^[76]。外泌体的应用可在一定程度上解决当前组织工程技术修复骨骼肌损伤时存在的一些问题,如种子细胞来源、数量及免疫排斥反应等。目前,采用外泌体的治疗方法主要有两种:一种是将外泌体定期注射于缺损部位^[77],但操作较繁琐,宿主痛苦较大,且外泌体易流失;另一种是将外泌体与组织工程支架结合后植入,如Shi等^[78]采用水凝胶支架负载MSCs分泌的外泌体,有效促进了骨骼肌肌腱损伤后的愈合。研究表明,水凝胶的网络结构能有效包封外泌体并持续性释放,可对周围细胞施加正向调节作用^[79]。但单纯的水凝胶材料难以与损伤部位高度黏附与整合,强度也难达到应用需求。因此,应进一步研发更多能有效负载外泌体的支架材料,以促进其在组织工程中的应用。

7 总结与展望

组织工程技术应用不同的细胞、生物材料以及活性分子作为原材料,整合多种技术对损伤的骨骼肌进行修复,在严重肌肉损伤的治疗中前景较

好, 临床上的初步探索也获得了较好成果^[80], 但真正大范围用于临床前仍需解决许多问题: 首先, 目前尚缺乏大量稳定来源的种子细胞用于组织工程的修复, 自体SCs的分离费时费力, 技术尚不完善, 获得的数量无法满足应用需求, 同时免疫排斥反应的存在限制了异体干细胞的应用。除了可分离干细胞分泌的外泌体替代部分干细胞的功能, 未来对于SCs分离技术的改进以及对细胞活动调控机制的进一步认识也能促进自体SCs的应用。其次, 随着基因编辑技术的发展, 自体SCs自我更新能力的限制会逐渐被打破, 同种异体来源细胞的免疫原性也可能被消除, 但其安全性仍需进一步验证。第三, 现阶段尚不能构建具有全功能的骨骼肌组织, 工程化的骨骼肌组织在三维空间结构上通常存在缺陷, 与人体正常的骨骼肌在肌纤维排列、血管以及神经网络结构上存在一定差距。3D生物打印技术可以利用生物墨水制作复杂的结构, 并将细胞更精确地定位排列于基质中^[71], 可能是解决这一问题的重要途径。随着对SCs群体及神经细胞生物学认识的加深, 新材料和新技术的研发, 以及基因工程、3D生物打印技术与组织工程技术的不断融合发展, 组织工程技术修复骨骼肌损伤必能在临床上取得更大的成就。

【参考文献】

- [1] Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2020, 12(1): e1462.
- [2] Han LJ, Sun Y, Yu XL. Application status of tissue engineering in cardiovascular diseases[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(9): 996-1000. [韩刘君, 孙尧, 于晓龙. 组织工程在心血管疾病中的应用现状[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(9): 996-1000.]
- [3] Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, et al. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries[J]. Acta Biomater, 2015, 25: 2-15.
- [4] Morgan J, Partridge T. Skeletal muscle in health and disease[J]. Dis Model Mech, 2020, 13(2): dmm042192.
- [5] Chen B, Shan T. The role of satellite and other functional cell types in muscle repair and regeneration[J]. J Muscle Res Cell Motil, 2019, 40(1): 1-8.
- [6] Tierney MT, Stec MJ, Rulands S, et al. Muscle stem cells exhibit distinct clonal dynamics in response to tissue repair and homeostatic aging[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(1): 119-127.e3.
- [7] Corona BT, Wenke JC, Ward CL. Pathophysiology of volumetric muscle loss injury[J]. Cells Tissues Organs, 2016, 202(3-4): 180-188.
- [8] Langridge B, Griffin M, Butler PE. Regenerative medicine for skeletal muscle loss: A review of current tissue engineering approaches[J]. J Mater Sci Mater Med, 2021, 32(1): 15.
- [9] Liu J, Saul D, Böker KO, et al. Current methods for skeletal muscle tissue repair and regeneration[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 1984879.
- [10] Hoffman T, Khademhosseini A, Langer R. Chasing the paradigm: Clinical translation of 25 years of tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2019, 25(9-10): 679-687.
- [11] Pantelic MN, Larkin LM. Stem cells for skeletal muscle tissue engineering[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2018, 24(5): 373-391.
- [12] Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 72: 19-32.
- [13] Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration[J]. Development, 2011, 138(17): 3639-3646.
- [14] Addicks GC, Brun CE, Sincennes MC, et al. MLL1 is required for PAX7 expression and satellite cell self-renewal in mice[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4256.
- [15] Yamamoto M, Legendre NP, Biswas AA, et al. Loss of MyoD and Myf5 in skeletal muscle stem cells results in altered myogenic programming and failed regeneration[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 956-969.
- [16] Ho ATV, Palla AR, Blake MR, et al. Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(26): 6675-6684.
- [17] Fukada S, Yamaguchi M, Kokubo H, et al. Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers[J]. Development, 2011, 138(21): 4609-4619.
- [18] Tomic M, Allen A, Willmann D, et al. Lsd1 regulates skeletal muscle regeneration and directs the fate of satellite cells[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 366.
- [19] Garcia SM, Tamaki S, Lee S, et al. High-yield purification, preservation, and serial transplantation of human satellite cells[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 1160-1174.
- [20] Torres-Torrillas M, Rubio M, Damia E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells: A promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 3105.
- [21] Wang YH, Wang DR, Guo YC, et al. The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration[J]. Regen Ther, 2020, 15: 285-294.
- [22] Jankowski M, Dompe C, Sibiak R, et al. In vitro cultures of adipose-derived stem cells: An overview of methods, molecular analyses, and clinical applications[J]. Cells, 2020, 9(8): 1783.
- [23] Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35685.
- [24] Seo E, Kang H, Lim OK, et al. Supplementation with IL-6 and muscle cell culture conditioned media enhances myogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells through STAT3 activation[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1557.
- [25] Mitchell R, Mellows B, Sheard J, et al. Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 116.
- [26] Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells[J]. Plast Reconstr Surg, 2011, 127(3): 679-687.

- 2002, 109(1): 199-209.
- [27] Witt R, Weigand A, Boos AM, *et al.* Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering[J]. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(1): 15.
- [28] Yilgor Huri P, Cook CA, Hutton DL, *et al.* Biophysical cues enhance myogenesis of human adipose derived stem/stromal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(1): 180-185.
- [29] Geng J, Liu G, Peng F, *et al.* Decorin promotes myogenic differentiation and mdx mice therapeutic effects after transplantation of rat adipose-derived stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(7): 877-886.
- [30] Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells - induction and application[J]. *World J Stem Cells*, 2017, 9(6): 89-97.
- [31] Rao L, Qian Y, Khodabukus A, *et al.* Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 126.
- [32] Shelton M, Kocharyan A, Liu J, *et al.* Robust generation and expansion of skeletal muscle progenitors and myocytes from human pluripotent stem cells[J]. *Methods*, 2016, 101: 73-84.
- [33] Del Carmen Ortuño-Costela M, García-López M, Cerrada V, *et al.* iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3784-3794.
- [34] Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh MO, *et al.* Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials[J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2017, 33(2): 144-172.
- [35] Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. Engineering biomimetic materials for skeletal muscle repair and regeneration[J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8(5): e1801168.
- [36] Yang HS, Lee B, Tsui JH, *et al.* Electroconductive nanopatterned substrates for enhanced myogenic differentiation and maturation[J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(1): 137-145.
- [37] Wang L, Wu Y, Guo B, *et al.* Nanofiber yarn/hydrogel core-shell scaffolds mimicking native skeletal muscle tissue for guiding 3D myoblast alignment, elongation, and differentiation[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(9): 9167-9179.
- [38] Guo B, Qu J, Zhao X, *et al.* Degradable conductive self-healing hydrogels based on dextran-graft-tetraaniline and N-carboxyethyl chitosan as injectable carriers for myoblast cell therapy and muscle regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2019, 84: 180-193.
- [39] Mu J, Hou C, Wang G, *et al.* An elastic transparent conductor based on hierarchically wrinkled reduced graphene oxide for artificial muscles and sensors[J]. *Adv Mater*, 2016, 28(43): 9491-9497.
- [40] Shevach M, Fleischer S, Shapira A, *et al.* Gold nanoparticle-decellularized matrix hybrids for cardiac tissue engineering[J]. *Nano Lett*, 2014, 14(10): 5792-5796.
- [41] Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, *et al.* Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells[J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 502-506.
- [42] Aurora A, Wrice N, Walters TJ, *et al.* A PEGylated platelet free plasma hydrogel based composite scaffold enables stable vascularization and targeted cell delivery for volumetric muscle loss[J]. *Acta Biomater*, 2018, 65: 150-162.
- [43] Jana S, Cooper A, Zhang M. Chitosan scaffolds with unidirectional microtubular pores for large skeletal myotube generation[J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(4): 557-561.
- [44] Zullo A, Fleckenstein J, Schleip R, *et al.* Structural and functional changes in the coupling of fascial tissue, skeletal muscle, and nerves during aging[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 592.
- [45] Narayanan N, Jia Z, Kim KH, *et al.* Biomimetic glycosaminoglycan-based scaffolds improve skeletal muscle regeneration in a Murine volumetric muscle loss model[J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(4): 1201-1213.
- [46] Silva Garcia JM, Panitch A, Calve S. Functionalization of hyaluronic acid hydrogels with ECM-derived peptides to control myoblast behavior[J]. *Acta Biomater*, 2019, 84: 169-179.
- [47] Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, *et al.* Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture[J]. *Science*, 2010, 329(5995): 1078-1081.
- [48] Seiwerth S, Rucman R, Turkovic B, *et al.* BPC 157 and standard angiogenic growth factors. Gastrointestinal tract healing, lessons from tendon, ligament, muscle and bone healing[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(18): 1972-1989.
- [49] Syverud BC, VanDusen KW, Larkin LM. Growth factors for skeletal muscle tissue engineering[J]. *Cells Tissues Organs*, 2016, 202(3-4): 169-179.
- [50] Taylor CJ, Church JE, Williams MD, *et al.* Hypoxic preconditioning of myoblasts implanted in a tissue engineering chamber significantly increases local angiogenesis *via* upregulation of myoblast vascular endothelial growth factor-A expression and downregulation of miRNA-1, miRNA-206 and angiopoietin-1[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(1): e408-e421.
- [51] Grasman JM, Page RL, Pins GD. Design of an *in vitro* model of cell recruitment for skeletal muscle regeneration using hepatocyte growth factor-loaded fibrin microthreads[J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(15-16): 773-783.
- [52] Shansky J, Creswick B, Lee P, *et al.* Paracrine release of insulin-like growth factor 1 from a bioengineered tissue stimulates skeletal muscle growth *in vitro*[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(7): 1833-1841.
- [53] Alcazar CA, Hu C, Rando TA, *et al.* Transplantation of insulin-like growth factor-1 laden scaffolds combined with exercise promotes neuroregeneration and angiogenesis in a preclinical muscle injury model[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(19): 5376-5389.
- [54] Benoit B, Meugnier E, Castelli M, *et al.* Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice[J]. *Nat Med*, 2017, 23(8): 990-996.
- [55] Raimondo TM, Li H, Kwee BJ, *et al.* Combined delivery of VEGF and IGF-1 promotes functional innervation in mice and improves muscle transplantation in rabbits[J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119246.
- [56] Kwee BJ, Mooney DJ. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 47: 16-22.
- [57] Juhas M, Bursac N. Engineering skeletal muscle repair[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(5): 880-886.
- [58] Mihaly E, Altamirano DE, Tuffaha S, *et al.* Engineering skeletal muscle: Building complexity to achieve functionality[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.04.016.
- [59] Strohman RC, Bayne E, Spector D, *et al.* Myogenesis and histogenesis of skeletal muscle on flexible membranes *in vitro*[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26(2): 201-208.
- [60] Li EW, McKee-Muir OC, Gilbert PM. Cellular biomechanics in

- skeletal muscle regeneration[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2018, 126: 125-176.
- [61] Park H, Bhalla R, Saigal R, *et al.* Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(5): 279-287.
- [62] Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7): 879-884.
- [63] Yan G, Yan R, Chen C, *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue with transcriptional factor ETV2-induced autologous endothelial cells[J]. *Protein Cell*, 2019, 10(3): 217-222.
- [64] Juhas M, Engelmayr GC Jr, Fontanella AN, *et al.* Biomimetic engineered muscle with capacity for vascular integration and functional maturation *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(15): 5508-5513.
- [65] Koffler J, Kaufman-Francis K, Shandalov Y, *et al.* Improved vascular organization enhances functional integration of engineered skeletal muscle grafts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36): 14789-14794.
- [66] Barbeau S, Tahraoui-Bories J, Legay C, *et al.* Building neuromuscular junctions *in vitro*[J]. *Development*, 2020, 147(22): dev193920.
- [67] Morimoto Y, Kato-Negishi M, Onoe H, *et al.* Three-dimensional neuron-muscle constructs with neuromuscular junctions[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9413-9419.
- [68] Rabellino A, Andreani C, Scaglioni PP. Roles of ubiquitination and SUMOylation in the regulation of angiogenesis[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2020, 35: 109-126.
- [69] Madrigal JL, Stilhano R, Silva EA. Biomaterial-guided gene delivery for musculoskeletal tissue repair[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2017, 23(4): 347-361.
- [70] Grath A, Dai G. Direct cell reprogramming for tissue engineering and regenerative medicine[J]. *J Biol Eng*, 2019, 13: 14.
- [71] Ostrovidov S, Salehi S, Costantini M, *et al.* 3D bioprinting in skeletal muscle tissue engineering[J]. *Small*, 2019, 15(24): e1805530.
- [72] Choi YJ, Kim TG, Jeong J, *et al.* 3D cell printing of functional skeletal muscle constructs using skeletal muscle-derived bioink[J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(20): 2636-2645.
- [73] Choi YJ, Jun YJ, Kim DY, *et al.* A 3D cell printed muscle construct with tissue-derived bioink for the treatment of volumetric muscle loss[J]. *Biomaterials*, 2019, 206: 160-169.
- [74] Costantini M, Testa S, Mozetic P, *et al.* Microfluidic-enhanced 3D bioprinting of aligned myoblast-laden hydrogels leads to functionally organized myofibers *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2017, 131: 98-110.
- [75] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [76] Youssef El, Baradie KB, Hamrick MW. Therapeutic application of extracellular vesicles for musculoskeletal repair & regeneration[J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(1): 99-114.
- [77] Aminzadeh MA, Rogers RG, Fournier M, *et al.* Exosome-mediated benefits of cell therapy in mouse and human models of duchenne muscular dystrophy[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 942-955.
- [78] Shi Y, Kang X, Wang Y, *et al.* Exosomes derived from bone marrow stromal cells (BMSCs) enhance tendon-bone healing by regulating macrophage polarization[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e923328.
- [79] Liu X, Yang Y, Li Y, *et al.* Integration of stem cell-derived exosomes with *in situ* hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(13): 4430-4438.
- [80] Sicari BM, Rubin JP, Dearth CL, *et al.* An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(234): 234ra258.

(责任编辑: 纪方方)