

三维间充质干细胞微组织的制造及应用

许曼 马东洋*

(中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院口腔颌面外科, 兰州 730050)

摘要 在移植间充质干细胞的临床实验中, 由于受区存在氧和营养供应不足以及炎症反应的问题, 治疗效率通常较低。将干细胞聚集成三维微组织球体有望解决此问题。该综述阐明三维微组织制造技术和应用的相关问题, 并重点关注进一步临床转化的研究进展。

关键词 间充质干细胞; 三维微组织; 治疗效率

The Manufacture and Application of Three-Dimensional Mesenchymal Stromal Cell Microtissue

XU Man, MA Dongyang*

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050, China)

Abstract The efficiency of transplanted mesenchymal stem cell is generally low due to lack of oxygen and nutrient supply in clinical trials. This problem can be improved by aggregating stem cells into three-dimensional microtissues. This article elucidated the problems associated with the fabrication and application of three-dimensional microtissues, with particular attention to the possibility of further transferring these findings into clinical application.

Keywords mesenchymal stem cell; three-dimensional microtissue; therapeutic efficiency

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有多向分化和特异性表达的特征, 在组织和器官再生中起到重要作用。首先, 在传统组织工程中, 2D贴壁培养是MSC体外扩增的标准技术, 但2D培养条件不同于体内的3D生长环境, 细胞的表型、活性和功能易发生改变^[1]。其次, 由于缺氧、营养供应不足或靶组织内的炎症反应, 移植MSC的存活率通常很低。此外, 为获得临床所需细胞数量而进行大幅扩增可能会降低MSC的免疫调节潜力、加速衰老并降低移植后的功能。这些证据提示需要通过改进细胞处理过程或在细胞移植前进行特定的预处理, 进一步优化基于细胞的治疗方法。最近有学者发现了一种增强MSC治疗潜力的方法, 即将细胞制备为多细胞微组织进行应用^[2]。

以往的干细胞治疗机制研究大多关注其移植后向靶细胞的分化, 而最近的研究大多集中在其旁分泌活性(作为有效生物兴奋剂)。目前认为, 干细胞治疗作用的可塑性与其应对微环境和激素信号分泌分子的能力相关。为此, 这篇综述介绍了MSC微组织体外构建方法并回顾了微组织体内移植后的治疗效果, 旨在论述其进一步临床转化的可能性。

1 干细胞微组织培养基的选择

目前, 三维培养MSC的实验研究大多采用胎牛血清作为经典培养基。然而, 在临床应用中不推荐使用动物衍生物^[3]。最近, YLOSLATO等^[4]的研究表明, 细胞在3D环境中的激活主要取决于培

收稿日期: 2019-04-11

接受日期: 2019-12-02

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81670969)和中央高校研究基金(批准号: lzubjky-2017-it46)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-8994437, E-mail: doctormdy@hotmail.com

Received: April 11, 2019

Accepted: December 2, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670969) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.lzubjky-2017-it46)

*Corresponding author. Tel: +86-931-8994437, E-mail: doctormdy@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5253>

培养基, 微组织球体可以在无异种培养基配方中形成, 但是培养基的组成对干细胞基因表达有重要影响。作者表明, 在 α -最低必需培养基或几种商业化市售的悬滴培养基中, MSCs不能凝结成紧密的球状体并表达完整的治疗基因。对于不含异种配方的培养基而言, 无论添加人血液来源白蛋白还是重组白蛋白都有助于形成具有高细胞活力的致密球体, 并增强抗炎基因[肿瘤坏死因子诱导蛋白6(tumor necrosis factor alpha stimulated gene-6, *TSG-6*)、前列腺素E2(prostaglandin E-2, *PGE-2*)]和抗癌[白细胞介素-24(interleukin-24, *IL24*)]分子的表达^[4]。BAUMAN等^[5]也证实, 相对于含有胎牛血清的培养基, 无异种物质配方条件下混合培养干细胞与内皮细胞产生的球体成血管能力更强。自2005年以来, 研究人员对培养临床级干细胞的关注点逐渐转向人血小板裂解液的应用^[6]。基于人血小板裂解液的产品对干细胞的支持作用可以用生长因子[主要是血小板生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)]的复杂影响来解释。然而, 有实验表明, 采用不同批次胎牛血清培养基, 同一类细胞的生长速度都有显著差异^[7], 提示不同批次培养液具有不同浓度的促进或抑制细胞生长的蛋白因子。

无论是基于人血小板裂解液还是化学产生的介质, 干细胞的安全性和可保存性都得到了证实, 但不含异种配方的培养基对干细胞旁分泌特征的影响目前尚不清楚。ZIMMERMANN等^[8]最近的研究表明, 用胎牛血清或无异种配方培养基培养3D干细胞球体, 两者促炎细胞因子的分泌明显不同。与不含异种配方的培养基相比, 胎牛血清培养基培养的球体中PGE-2和吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)分泌更多。作者还表明, 添加胎牛血清的培养的干细胞球体细胞增殖活性降低, 而旁分泌增加。而不含异种配方培养的干细胞则表现为生长显著但是旁分泌较少^[8]。因此, 制备能增强干细胞治疗性能的培养基与不含异种配方的培养基的优化问题高度相关。

2 干细胞微组织的制备技术

2.1 低黏附培养法

使用低黏附基质处理的培养板进行细胞培养

是产生微组织球体的一种简单易行的方法^[9]。不过, 由此产生的球体的体积和形态缺乏均一性。这种技术被广泛用于干细胞聚集体进一步软骨分化研究。但因为其性价比低、劳动密集型等缺点, 该技术不适用于大规模制备干细胞球体。

2.2 悬滴法

悬滴培养是控制细胞培养液的液滴, 悬挂在专门的培养板中, 使细胞在重力作用下自组装, 形成微组织球体^[10-11]。它虽具有细胞数量和球体大小可控的优点, 但也不适用于大规模生产细胞球体, 故微球形成和获取时需要高密集劳动。

2.3 旋转培养法

这种方法是在细胞培养时不停旋转培养瓶, 从而避免细胞黏附^[12]。它易于操作但是产生的微组织体积和形态的变异性较大, 而且由于持续旋转产生的剪切力可能导致细胞生理特征的损伤。

2.4 生物材料辅助法

有几种生物材料辅助方法可以促进微组织形成, 其中以壳聚糖膜的应用最为广泛。壳聚糖是一种带正电荷、具有生物相容性的天然多糖, 其去乙酰化程度将决定细胞黏附性和进一步形成微组织球体的潜力^[13-14]。YEH等^[15]证明, 与非黏附聚乙烯醇底物相比, 在壳聚糖膜上培养的干细胞中, 包括白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, *LIF*)、白细胞介素24(interleukin-24, *IL-24*)、肿瘤蛋白53(tumor protein p53, *TP53*)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , *TGF- β*)、血小板生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor alpha, *PDGFRA*)和前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *PTGS2*)等基因的表达水平显著上调。YEH等^[16]提出, 这些基因表达上调可能是与钙相关基因的上调有关, 壳聚糖膜上的干细胞产生了更强的细胞-底物相互作用。最近, YANG等^[17]报道, 与使用低黏附培养板相比, 基于壳聚糖获得的微组织球体内干细胞的自噬增强特征更为明显, 可能提高其移植后存活率和治疗潜能。

MESSINS等^[18]报道, 使用琼脂糖和聚己内酯膜也可产生细胞微组织球体。该研究还表明, 与琼脂糖相比, 微组织球在聚己内酯膜上融合和成熟更快。WANG等^[19]的研究显示, 应用涂覆有光敏聚乙二醇的微图案基质培养微组织改善了干细胞分化潜能。

ZHANG等^[20]使用聚(L-谷氨酸)/壳聚糖支架用于在原位产生干细胞球体,这能促进软骨再生。

2.5 磁化结构应用

磁化结构应用是构建微组织球体的一个富有前景的方法。LEWIS等^[21]将具有良好生物相容性的磁性纳米颗粒加入到培养基中磁化细胞,然后采用磁力驱动器让细胞聚集呈磁悬浮状态形成微球(平均直径为259 μm),最后将多细胞微球与I型胶原凝胶复合,以保持MSC的细胞干性和表型。磁性纳米颗粒不仅能促进微组织球体的快速形成,而且可以通过光学或荧光显微镜(归因于荧光标记)进行细胞示踪并监测球体形成,具有在体内进行磁共振成像的潜力。但是,无法精确控制通过磁悬浮产生的球体的大小和形状。

2.6 自动化生产尝试

有研究对大规模高通量制备球体的方法进行改进和自动化尝试。NETO等^[22]开发了基于仿生超疏水平面基板的新型悬滴系统。通过这个平台,可以高通量产生独立球体。TUNG等^[23]在384个悬滴阵列中展示了高通量3D球体培养。ZHAO等^[24]使用模式化的非黏合性聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯水凝胶膜来引导细胞自组装,产生大量多细胞球体。这些高通量方法在大规模生产微组织方面前景喜人,但在优化细胞治疗效果、提高可重复性,简化操作、降低成本等方面仍需要进一步的研究。

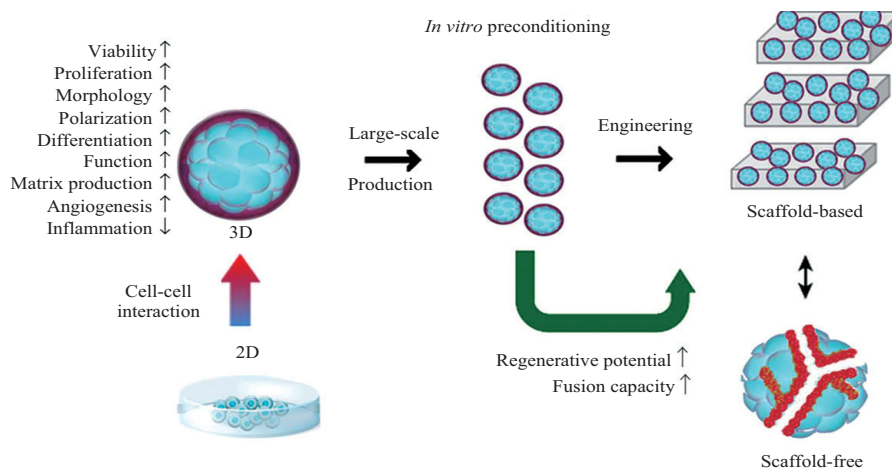
3 干细胞微组织的功能

3.1 增强细胞间相互作用

与传统的2D单层培养相比,3D细胞结构增强了细胞-细胞间相互作用并且在很大程度上模拟了组织的天然微环境。3D环境中干细胞的短期培养对干细胞特异性免疫表型标志物表达水平无显著影响。2D组织培养基质和3D球体培养物之间的差异主要表现在细胞黏附^[11,26]。同时,这种3D微组织被证明可增强干细胞的抗炎和血管生成能力^[27-29],增加干细胞干性^[30-31],促进分化成不同细胞系,并提高移植后细胞存活率^[28],如图1。

3.2 增强促血管生成特性

血管生成生长因子和细胞因子如血管生成素(angiotensin, Ang)、成纤维生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的表达在干细胞球体培养物中显著增加^[32]。学者们已经在不同的动物模型中证实了干细胞球体的增强促血管生成的特性: MURPHY等^[33]报道,纤维蛋白凝胶内的干细胞球体分泌的血管内皮生长因子是相同数量的游离细胞的100倍;有学者发现,干细胞形成3D球体后可上调E-钙黏蛋白的表达,并通过ERK/AKT信号通路增强血管内皮生长因子的分泌^[34]。有研究证明,3D多细胞球体的产生与趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)的强表达相关,其促进了球体中干细胞对内



上、下箭头分别代表增加、降低。

Up and down arrows represent increase and decrease, respectively.

图1 三维细胞球体的生物特性较二维的明显改善(根据参考文献[25]修改)

Fig.1 The biological characteristics of three-dimensional cell spheres are significantly improved compared with those of two-dimensional culture (modified from reference [25])

皮细胞的黏附^[27]; CHENG等^[30]也观察到类似的结果, 与常规2D培养相比, 球状脂肪组织干细胞中CXCR4的表达上调两倍。

3.3 改善免疫调节

有学者证实, 静脉注射的干细胞在肺中被捕获, 在滞留12~24 h后激活了肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF α)刺激TSG-6的分泌^[35], 在小鼠模型中, TSG-6的分泌减少了心脏中的炎症反应。还有研究表明, 干细胞的球体培养可以使TSG-6和斯坦糖钙-1(stanniocalcin-1, STC-1)的表达显著上调, 进而活化干细胞产生抗炎蛋白质^[4,11,36], 炎症因子如 γ 干扰素(interferon gamma, IFN- γ)、TNF α 或白细胞介素-1 β 的存在可以调节干细胞的免疫调节活性。干细胞的3D聚集激活了PGE-2和TSG-6因子的分泌, 并抑制巨噬细胞中炎症细胞因子的产生。与单层培养相比, 球体干细胞可以分泌更高水平的TGF- β 1和白细胞介素6, 增强免疫调节潜力^[8]。DOMNINA等^[29]证明, 在干细胞3D球体中, 抗炎因子的表达显著增加。不过, IDO的表达是免疫抑制的关键因素之一, 其在干细胞的2D和3D培养间没有显著差异^[37]。与单层培养物相比, 只有经IFN- γ 和TNF α 同时加入球状体后, 才能观察到球体中细胞的IDO活性的显著差异。然而, 这样的效果非常依赖于所使用的培养基。因此, 需要进一步的研究来改善3D球体环境中的IDO表达。

3.4 增强干细胞干性

干细胞聚集成3D球体对细胞的干性特征产生了重要影响, 与单层培养物相比, 3D培养的脂肪来源于干细胞中决定干性的Nanog同源盒(Nanog homeobox, *Nanog*)、SRY盒转录因子2(SRY-box transcription factor 2, *Sox2*)和八聚体结合转录因子4(organic cation/carnitine transporter 4, *Oct4*)基因的表达显著增高^[30-31]。此外, 衍生自球体的干细胞被证明具有较高的扩增和聚集活性^[38]。GUO等的研究^[31]表明, 3D环境促进了与干细胞多能性相关的miRNA的表达, 球体衍生的干细胞向神经细胞和肝细胞分化的能力增强^[39-40]。YEH等^[15]的研究展示了在球体衍生的干细胞中WNT信号相关基因的表达增强。

3.5 增加移植细胞的生存率

BHANG等^[28]报道, 受损区域的缺氧环境可能对移植后的干细胞造成不可逆的缺血性损伤。与2D扩增培养相比, 3D干细胞球体在缺血条件下更易

存活。3D球体培养后脂肪干细胞表达了更高水平的缺氧诱导因子1和锰超氧化物歧化酶, 这与氧化应激诱导的细胞凋亡的改善相关^[41]。除了改善对缺氧的耐受性之外, 干细胞微组织抗凋亡分子BCL2的表达显著上调, 而促凋亡分子Bax的表达下调, 这证实了这些细胞的促活性^[1,27]。还有研究表明^[11,42], 排除干细胞来源的因素, 球体中干细胞的体积减小(平均约为单层培养细胞体积的25%~50%)。与常规培养干细胞相比, 静脉注射后在肺中滞留的细胞较少。

与传统的2D培养相比, 3D球体中干细胞功能改善的可能机制是多细胞聚集影响细胞微环境中的各种变化^[43-44]。细胞-基质和细胞-细胞相互作用的变化导致了3D球体中作用于每个细胞的物理作用力的显著重排, 这改变了细胞的极化、细胞骨架结构和形态。基质的刚度和弹性显著影响干细胞的旁分泌性质^[44-45]。3D球体形成过程发生的应变性和刚性变化与2维下也不同^[44,46]。与此同时, ABDEEN等^[47]的研究表明, 底物刚度的变化导致了干细胞的促血管生成信号传导的变化。细胞形状也决定了干细胞谱系定向的转化, 其通过RhoA-ROCK信号通路介导^[48]。球体内增加的细胞间接触上调了钙黏蛋白(E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、钙黏蛋白11)和间隙连接蛋白(连接蛋白-43)的表达, 这证实了干细胞的谱系特异性^[49]。LEE等^[35]的研究表明, E-钙黏蛋白是形成人脐带血干细胞球体的关键调节因子, 其通过ERK/AKT信号通路调节细胞的增殖和旁分泌活性。有学者提出, 3D球体中的轻度缺氧可作为促血管生成因子和血管生成因子表达的引发剂^[50]。不过, MURPHY等^[51]最近的研究显示, 在微组织球体外径在(353 \pm 18) μ m时, 氧气张力值小于10%, 这表明3D球体内干细胞的功能增强并非氧介导的。3D球体内细胞外基质分泌的增强为局部生长因子和细胞因子富集提供了有利的环境, 支持自分泌信号传导。增加自噬可以保护细胞免受环境限制, 从而可以提高存活率并防止干细胞早期衰老^[17]。上述这些因素可能在调节干细胞分化和旁分泌活动中起重要作用; 然而, 在3D培养过程中驱动干细胞性质显著变化的确切机制仍然有待进一步阐明。

3.6 类器官

此外, 体外培养的由干细胞分化而来的多种细胞类型复合形成的具有3D结构的类器官, 代表模拟

生物整个生理过程的新型模型,具有与来源器官相类似的结构和功能^[52]。与传统的2D培养系统相比更具仿生优势,更加接近正常机体的细胞组成和生物学行为。许多类器官可以在3D培养中进行稳定扩增并保持基因组稳定性。与动物模型相比,类器官可以降低实验的复杂性,能够用于研究不易用动物模型来模拟的人类发育和疾病^[52]。

4 干细胞微组织在动物体内研究中的应用

干细胞微组织的这些性质使得学者们进行了许多临床前研究,涉及多种动物模型,主要针对骨软骨病、缺血性和心血管疾病以及伤口愈合^[53](图2)。

4.1 骨缺损治疗中的应用

与细胞悬浮液相比,把干细胞的聚集体皮下注射到裸鼠中以后,观察到了显著更大和更致密的异位骨形成^[53-54]。在聚集的干细胞中观察到软骨形成相关的抗凋亡和抗炎基因的上调,其在移植到膝关节后成功使软骨再生^[10]。SUENAGA等^[55]应用骨髓干细胞球体修复裸鼠颅骨缺损, Micro-CT扫描和免疫组织化学染色结果表明,在干细胞球体组的植入部位形成了新的全厚度骨组织。

4.2 缺血性疾病的应用

与游离悬浮液相比,脂肪干细胞3D球体肌内移植到裸鼠缺血后肢之后,增强了细胞存活及血管生成因子分泌,且改善了新生血管形成和肢体存活状况^[28],移植干细胞球体显著增加了小鼠缺血肢体

微血管数和平滑肌 α -肌动蛋白阳性血管数量,减弱了肢体损伤和坏死。LEE等^[9]研究了移植单层干细胞或干细胞球体的缺血组织中增殖标志物——增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达,结果表明移植干细胞球体的缺血组织中PCNA的表达高于移植单层干细胞的组织。

4.3 心血管疾病中的应用

3D脐带血干细胞聚集体移植到大鼠心肌梗死模型中后,移植成活率增高^[34]。有研究观察了移植后经标记的干细胞的内皮和心肌细胞分化,发现与干细胞悬浮液相比,干细胞球体注入心肌梗死区域后,心肌功能的改善更强^[56]。人体脂肪组织干细胞球体移植入猪心肌梗死模型中以后改善了88.8%的动物心脏功能^[57]。LIU等^[58]发现,与单层生长的干细胞相比,大鼠脂肪组织干细胞球状体的心脏标志物基因的表达水平[GATA结合蛋白4(GATA binding protein 4, *Gata4*)、NK2同源框5(NK2 homeobox 5, *Nkx2-5*)、肌球蛋白重链6(myosin heavy chain 6, *Myh6*)和肌钙蛋白T2(troponin T2, cardiac type, *Tnnt2*)]高20倍,并且在植入后12周的心肌功能恢复更好。AMOSMOS等^[59]使用脂肪组织干细胞球体治疗瘦素受体缺陷小鼠的全厚真皮伤口,与相等数量的悬浮干细胞相比,在3D干细胞球体组中观察到糖尿病小鼠伤口愈合显著增加。AMOSMOS等^[59]发现,球体干细胞产生了大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白: 腱生蛋白C、胶原VI α 3和纤连蛋

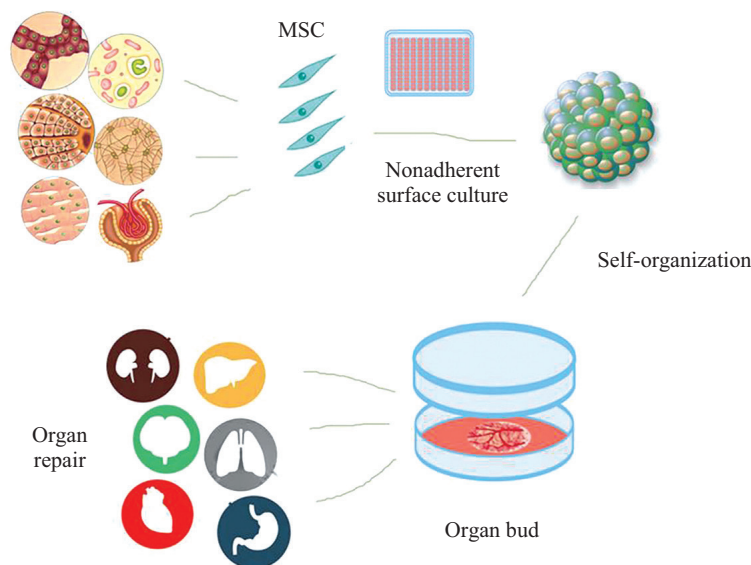


图2 干细胞器官芽的体内治疗

Fig.2 Therapeutic effect of stem cell organ-bud *in vivo*

白。ZHANG等^[41]的研究表明,与常规培养物相比,人牙龈来源的干细胞球体在化疗引起口腔黏膜炎的小鼠模型中取得更好的治疗效果,逆转了小鼠体重的减轻,并促进了黏膜上皮在肝、肾损伤治疗中的应用。

4.4 在肝再生和肾损伤模型中的应用

3D环境下培养的脐带干细胞促进了IFN- γ 和IL-6的分泌,但在趋化因子配体4(chemokine ligand 4, CCL4)诱导的急性肝衰竭小鼠模型中抑制TNF α 的分泌,同时改善了肝脏的再生情况^[60]。TALAEI等^[61]也证实了脐带干细胞球形体分化为肝谱系的潜力增加。XU等^[62]应用人体脂肪干细胞的3D球体治疗急性肾损伤,当注射到具有缺血再灌注诱导形成的肾损伤大鼠模型的肾脏中时,与2D培养细胞相比,3D球体更有利于肾脏的保护,减少细胞凋亡和组织损伤,促进血管形成从而改善肾功能。

5 结语和展望

3D微组织球体改进了人不同组织来源的干细胞的治疗潜力。3D培养环境可以增强干细胞的干性、抗炎性和免疫调节性质,增加干细胞的存活率和抗凋亡能力。这为干细胞的临床转化应用开辟了新的途径。然而,3D球体制备技术仍然需要进一步规范和优化,例如选择合适的临床级培养条件及其大规模生产策略,从而提供高效和可重复的干细胞疗法。

参考文献 (References)

- CESARZ Z, TAMAMA K. Spheroid culture of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 9176357.
- SASAI Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(5): 520-30.
- SHARMA R R, POLLOCK K, HUBEL A, et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices [J]. *Transfusion*, 2014, 54(5): 1418-37.
- YLOSTALO JH, BARTOSH TJ, TIBLOW A, et al. Unique characteristics of human mesenchymal stromal/progenitor cells pre-activated in 3-dimensional cultures under different conditions [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(11): 1486-500.
- BAUMAN E, FEIJAO T, CARVALHO D T O, et al. Xeno-free pre-vascularized spheroids for therapeutic applications [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 230.
- BURNOUF T, STRUNK D, KOH M B, et al. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation [J]. *Biomaterials*, 2016, 76: 371-87.
- ZHENG X, BAKER H, HANCOCK W S, et al. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(5): 1294-300.
- ZIMMERMANN JA, MCDEVITT T C. Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16: 331-45.
- LEE J H, HAN Y S, LEE S H. Long-duration three-dimensional spheroid culture promotes angiogenic activities of adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(3): 260-7.
- SUZUKI S, MUNETA T, TSUJI K, et al. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): R136.
- BARTOSH T J, YLOSTALO J H, MOHAMMADIPOOR A, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31): 13724-9.
- COSTA E C, DE MELO-DIOGO D, MOREIRA A F, et al. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: considerations and practical approaches [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13(1): 10.
- SEDA TIGLI R, KARAKECILI A, et al. *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2007, 18(9): 1665-74.
- CHATZIPETROS E, CHRISTOPOULOS P, DONTA C, et al. Application of nano-hydroxyapatite/chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: a pilot study [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2018, 23(5): e625-32.
- YEH H Y, LIU B H, SIEBER M, et al. Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human MSC spheroids on chitosan membranes [J]. *BMC genomics*, 2014, 15(1): 10.
- YEH H Y, LIU B H, HSU S H. The calcium-dependent regulation of spheroid formation and cardiomyogenic differentiation for MSCs on chitosan membranes [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(35): 8943-54.
- YANG C M, HUANG Y J, HSU S H. Enhanced autophagy of adipose-derived stem cells grown on chitosan substrates [J]. *Biores Open Access*, 2015, 4(1): 89-96.
- MESSINA A, MORELLI S, FORGACS G, et al. Self-assembly of tissue spheroids on polymeric membranes [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(7): 2090-103.
- WANG W, ITAKA K, OHBA S, et al. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(32): 2705-15.
- ZHANG K, YAN S, LI G, et al. In-situ birth of MSCs multicellular spheroids in poly(L-glutamic acid)/chitosan scaffold for hyaline-like cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2015, 71: 24-34.
- LEWIS E E, WHEADON H, LEWIS N, et al. A quiescent, regeneration-responsive tissue engineered mesenchymal stem cell bone marrow niche model via magnetic levitation. *ACS Nano*, 2016, 10(9): 8346-54.
- NETO A I, CORREIA C R, OLIVEIRA M B, et al. A novel hanging spherical drop system for the generation of cellular spheroids

- and high throughput combinatorial drug screening [J]. *Biomater Sci*, 2015, 3(4): 581-5.
- [23] TUNG Y C, HSIAO A Y, ALLEN S G, et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array [J]. *Analyst*, 2011, 136(3): 473-8.
- [24] ZHAO Z, GU J, ZHAO Y, et al. Hydrogel thin film with swelling-induced wrinkling patterns for high-throughput generation of multicellular spheroids [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(9): 3306-12.
- [25] LASCHKE M W, MENGER M D. Life is 3D: boosting spheroid function for tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2017, 35(2): 133-44.
- [26] PARK I S, RHIE J W, KIM S H. A novel three-dimensional adipose-derived stem cell cluster for vascular regeneration in ischemic tissue [J]. *Cytherapy*, 2014, 16(4): 508-22.
- [27] POTAPOVA I A, BRINK P R, COHEN I S, et al. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 13100-7.
- [28] BHANG S H, LEE S, SHIN J Y, et al. Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(19/20): 2138-47.
- [29] DOMNINA A, NOVIKOVA P, OBIDINA J, et al. Human mesenchymal stem cells in spheroids improve fertility in model animals with damaged endometrium [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):50
- [30] CHENG N C, WANG S, YOUNG T H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(6): 1748-58.
- [31] GUO L, ZHOU Y, WANG S, et al. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(10): 2009-19.
- [32] POTAPOVA I A, GAUDETTE G R, BRINK P R, et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells *in vitro* [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1761-8.
- [33] MURPHY K C, FANG S Y, LEACH J K. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(1): 91-9.
- [34] LEE E J, PARK S J, KANG S K, et al. Spherical bullet formation via E-cadherin promotes therapeutic potency of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood for myocardial infarction [J]. *Mol Ther*, 2012, 20(7): 1424-33.
- [35] LEE R H, PULIN A A, SELO M J, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54-63.
- [36] LI H, SHEN S, FU H, et al. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 9671206.
- [37] BARTOSH T J, YLOSTALO J H, BAZHANOV N, et al. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1) [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2443-56.
- [38] SUBBARAYAN R, MURUGAN GIRIJA D, RANGA RAO S. Gingival spheroids possess multilineage differentiation potential [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 1952-8.
- [39] HSUEH Y Y, CHIANG Y L, WU C C, et al. Spheroid formation and neural induction in human adipose-derived stem cells on a chitosan-coated surface [J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 196(2): 117-28.
- [40] CIPRIANO M, FREYER N, KNOSPEL F, et al. Self-assembled 3D spheroids and hollow-fibre bioreactors improve MSC-derived hepatocyte-like cell maturation *in vitro* [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(4): 1815-32.
- [41] ZHANG Q, NGUYEN A L, SHI S, et al. Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(6): 937-47.
- [42] TSAI A C, LIU Y, YUAN X, et al. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(9/10): 1705-19.
- [43] SART S, TSAI A C, LI Y, et al. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications [J]. *Tissue Eng Part B Revs*, 2014, 20(5): 365-80.
- [44] FOLLIN B, JUHL M, COHEN S, et al. Increased paracrine immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cells in three-dimensional culture [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016, 22(4): 322-9.
- [45] KUSUMA G D, CARTHEW J, LIM R, et al. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(9): 617-31.
- [46] BARANIAK P R, COOKE M T, SAEED R, et al. Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 11: 63-71.
- [47] ABDEEN A A, WEISS J B, LEE J, et al. Matrix composition and mechanics direct proangiogenic signaling from mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(19-20): 2737-45.
- [48] MCBEATH R, PIRONE D M, NELSON C M, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 483-95.
- [49] SHIN C S, LECANDA F, SHEIKH S, et al. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 78(4): 566-77.
- [50] BHANG S H, CHO S W, LA W G, et al. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 2734-47.
- [51] MURPHY K C, HUNG B P, BROWNE-BOURNE S, et al. Measurement of oxygen tension within mesenchymal stem cell spheroids [J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14 (127): 20160851.
- [52] MO L, JUAN C. IZPISUA Belmonte. Organoids-preclinical models of human disease [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(20): 569-79.
- [53] TAKEBE T, ENOMURO M, YOSHIKAWA E, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(5): 556-

- 65.
- [54] MA D, ZHONG C, YAO H, et al. Engineering injectable bone using bone marrow stromal cell aggregates [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(6): 989-99.
- [55] SUENAGA H, FURUKAWA K S, SUZUKI Y, et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26(11): 254.
- [56] WANG C C, CHEN C H, HWANG S M, et al. Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3): 724-32.
- [57] EMMERT M Y, WOLINT P, WICKBOLDT N, et al. Human stem cell-based three-dimensional microtissues for advanced cardiac cell therapies [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(27): 6339-54.
- [58] LIU B H, YEH H Y, LIN Y C, et al. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan [J]. *Biores Open Access*, 2013, 2(1): 28-39.
- [59] AMOS P J, KAPUR S K, STAPOR P C, et al. Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(5): 1595-606.
- [60] LI Y, GUO G, LI L, et al. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance [J]. *Cell Tissue Res*, 2015, 360(2): 297-307.
- [61] TALAEI-KHOZANI T, BORHANI-HAGHIGHI M, AYATOLLAHI M, et al. An *in vitro* model for hepatocyte-like cell differentiation from Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells by cell-base aggregates [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2015, 8(3): 188-99.
- [62] XU Y, SHI T, XU A, et al. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1203-13.