

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00095

• 综述 •

RGD 修饰的聚乳酸-羟基乙酸骨组织工程材料的研究进展

陶 春, 陈 琰*, 钟延强*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] 聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)骨组织工程支架在骨损伤修复和再造方面有着重要的应用,但由于 PLGA 亲水性差,不利于种子细胞在支架上的黏附和增殖。RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, Arg-Gly-Asp)肽修饰 PLGA 支架后,材料的细胞亲和性得到了有效改善,促进了种子细胞黏附和增殖。本文就近年来 RGD 修饰的 PLGA 骨组织工程材料的相关研究作一综述。

[关键词] 聚乳酸羟基乙酸;骨代用品;组织工程;RGD 肽

[中图分类号] R 318.17 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0095-04

RGD-modified polylactide-co-glycolic acid tissue engineering scaffolds for bone regeneration: an advance

TAO Chun, CHEN Yan*, ZHONG Yan-qiang*

Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Polylactide-co-glycolic acid (PLGA) tissue engineering scaffolds play an important role in the regeneration of bone and cartilage. Due to the poor hydrophilicity of PLGA, it is difficult for cells to attach to the scaffolds. Modification by RGD (Arg-Gly-Asp) peptides can effectively improve the cellular affinity of PLGA and adhesion and proliferation of the seed cells. This review summarizes the recent progress in PLGA tissue engineering scaffolds modified by RGD peptides.

[Key words] polylactide-co-glycolic acid; bone substitutes; tissue engineering; RGD peptide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 95-98]

组织工程学是指应用工程学、生物学和化学的原理与方法修复或重建受损的组织和器官,如皮肤、骨和软骨、周围神经、心肌和血管等^[1]。骨和软骨的损伤如骨折段间缝隙和骨质疏松在生活中较为常见。骨组织工程常用的支架材料有天然材料、人工合成材料和复合材料,天然材料包括处理过的天然骨组织、天然珊瑚及珊瑚人工骨和天然大分子物质如胶原、藻酸钙等。人工合成材料主要为陶瓷材料,如羟基磷灰石(HA)、双相钙磷陶瓷(BGC)等和有机高分子材料如聚酯类、聚酸酐、聚醚等。复合材料即结合使用天然材料和人工合成材料以提高材料性能。骨组织工程支架常采用骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)作为种子细胞种植在支架上,再将支架植入骨损伤处, BMSCs 增殖、分化后使损伤修复^[2]。

聚乳酸-羟基乙酸(poly lactide-co-glycolic acid, PLGA)是乳酸(LA)和羟基乙酸(GA)开环聚合形成的聚酯,具有较好的生物相容性和生物可降解性,植入机体后引起的炎症反应小^[3],已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于控释制剂等。PLGA 制成的骨组织工程支架在骨和软骨修复方面应用广泛,但 PLGA 亲水性差,不利于种子细胞黏附。改善 PLGA 支架亲水性的方法包括:在支架表面覆盖胶原^[4];将 PLGA 与透明质酸混合制成支架^[5];用聚乙二醇修

饰成 PLGA-PEG^[6];用等离子体修饰支架表面,等离子体通过正负电荷吸引连接蛋白^[7]、明胶^[8]等。另外,研究发现,用 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, Arg-Gly-Asp)肽修饰 PLGA 支架,对材料的细胞黏附性能有很好的促进作用。因此,本文就 RGD 修饰的 PLGA 支架材料及其在骨组织工程中的应用进行综述。

1 RGD 及其修饰方式

RGD 由 Pierschbacher 在 1984 年首次报道,它是由 3 个氨基酸(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)构成的短肽,存在于多种细胞外基质蛋白,如纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、玻璃黏连蛋白、胶原、凝血栓蛋白等,是介导整合素受体(integrin receptor)与其配体连接的最短识别序列。只有在 C 端天冬氨酸的羧基封闭时, RGD 才能保留其活性,因此人工合成的 RGD 衍生物常把羧基转变为酰胺基或在 C 端连接侧氨基,常用的有 RGDS、GRGD、GRGDS、GRGDY 和 GRGDSPC 等,它们仅在促进细胞黏附过程中的作用有所差异^[9]。RGD 应用广泛,可作为主动靶向肝肿瘤组织的靶头^[10-11],或可对多种材料进行修饰,以提高材料的亲水性和细胞黏附性能^[12-14]。

RGD 修饰 PLGA 骨组织工程支架的方式包括两种:(1) RGD 直接修饰 PLGA,即 RGD 与 PLGA 结合^[15-16];(2) RGD

[收稿日期] 2011-10-15

[接受日期] 2011-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金(81072601)。Supported by National Natural Science Foundation of China(81072601)。

[作者简介] 陶 春, 硕士生。E-mail: pleciestao@163.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81871289, E-mail: tulipcy51@sina.com; Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn

间接修饰 PLGA, 即先将 RGD 与其他材料结合, 如连接在纤维素 (CBD) 或聚赖氨酸 (PLL) 上, 得到 CBD-RGD^[17] 和 PLL-RGD^[18], 之后该材料与 PLGA 复合制成支架。

2 PLGA 支架的 RGD 修饰

由于缺少反应官能团, 可在开环聚合制备 PLGA 时加入带有活性官能团的化合物, 例如制成聚(乳酸-羟基乙酸-L-赖氨酸)^[19]、PLGA-(Asp-PEG)^[20]。另一种较常用的方法是通过改变聚合条件得到末端羧基的 PLGA, 活化羧基后接枝 RGD。

2.1 RGD 接枝方法 一般采用化学键共价固定法, 主要包括混合酸酐法^[19]、SPDP 试剂法^[20]、碳二亚胺法^[21]、光化学方法^[22]等, 其中碳二亚胺类缩合剂和 SPDP 试剂均属于双功能交联剂。

2.1.1 混合酸酐法 羰基二咪唑 (CDI) 是形成酰胺的良好试剂, 在多肽合成方面亦有应用。聚(乳酸-羟基乙酸-L-赖氨酸)的活性羟基与 CDI 在室温下反应得到酰基咪唑, 通常不需分离该中间产物, 反应液与 GRGDY 继续反应, 聚合物通过一个酰胺键连接 Gly 上的氨基, 氨基酸分析 (AAA) 结果显示, 接枝率仅为 2.5%~5%, 而水接触角和四唑盐 (MTT) 比色实验的结果均表明少量的 RGD 修饰即可使材料亲水性和细胞黏附性能得到有效改善^[19]。

2.1.2 SPDP 试剂法 SPDP 试剂是一种重要的异型双功能交联剂, 能够特异性地连接氨基和巯基^[23]。三嵌段共聚物 PLGA-(Asp-PEG) 在硫磺基羧基琥珀酰亚胺基-6-(3'-2-吡啶二硫-丙酰胺)-己酸酯 (sulfo-LC-SPDP) 的作用下, Asp 上的氨基与 N-羧基琥珀酰亚胺基团形成酰胺键, 然后 2-吡啶二硫基团与 GRGDSPC 肽羧基端半胱氨酸 (Cys) 的巯基生成二硫键, 则 GRGDSPC 与聚合物通过一段间臂连接, 接枝率达到 90%^[20], 具有非常高的反应效率。该反应特异性强, 条件温和, 副反应少, 但 sulfo-LC-SPDP 价格较高, 不常用于 RGD 接枝反应。

2.1.3 碳二亚胺法 碳二亚胺类缩合剂是最常用的 RGD 接枝试剂。包含碳二亚胺结构的交联剂有二环己基碳二亚胺 (DCC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDCI 或 EDC) 和二异丙基碳二亚胺 (DIC) 等。

Yoon 等^[15] 采用具有末端羧基的 PLGA (PLGA-COOH), 经 DCC/NHS (N-琥珀酰亚胺) 活化后, 与过量 NH₂-PEG-NH₂ 的一个氨基连接形成酰胺键, 然后将 PLGA/PLGA-NH₂ 以不同比例制成支架, 再将支架表面的氨基活化后浸入 GRGDY 的 PBS 中反应, 即可得到接枝了 GRGDY 的 PLGA 支架。但是, DCC 有一个不足, 即反应副产物二环己基脲 (DCU) 在一般的有机溶剂中溶解度很小但又都有一些微溶, 常用的纯化方法如重结晶、柱层析等都很难将其彻底清除。EDC 反应后产生的脲是水溶性的, 易于清洗纯化, 因而 EDC 更为常用。此外, 在反应的第一阶段, 羧基对碳二亚胺的加成中间体不稳定, 若不使用酰化催化剂将其转化为相应的活性酯或活性酰胺, 中间体会重排成相应的稳定副产物, 所以一般反应时需合用缩合活化剂, 如 4-N,N-二甲基吡啶 (DMAP)、1-羟基苯并三氮唑 (HOBt) 和 NHS 等,

缩合活化剂的使用对反应效率有非常大的提高。

2.1.4 光化学方法 光化学方法的原理是将带有热活性基团和光活性基团的组分在紫外或可见光区域下活化后进行接枝修饰。将 PCL-PEG 和硫磺基羧基琥珀酰亚胺基-6-(3'-2-吡啶二硫-丙酰胺)-己酸酯 [O-succinimidyl 4-(p-azidophenyl) butanoate] 溶于 CH₂Cl₂ 后, 蒸干溶剂, 将固体粉末在氩气氛围下, 在 254 nm 波长射线照射 20 min, 再浸入 GRGDSPC 的 PBS/乙腈 (1:1, V/V) 溶液室温反应 20 h^[22], 即得到接枝了 RGD 的材料。但这种方法较为繁琐, 不常用于 RGD 接枝反应。

2.2 PLGA 材料修饰后的性质

2.2.1 材料表面形态 原子力显微镜 (AFM) 可观察 2-D 膜表面的形态, PLGA 膜和 PLGA-GRGDSPC 膜的 AFM 图片显示: PLGA 膜平滑, 因 PLGA 水解而产生少量突起; PLGA-GRGDSPC 膜稍显粗糙, 但比较均匀, 有很多不连续且大小相似的突起, 高约 10 nm^[16]。这些突起可能是因 GRGDSPC 连接在 PLGA 上而形成的, 粗糙、不连续的表面更利于细胞黏附, 并且 RGD 的比例增加, 表面不均匀现象更明显^[24]。因此, RGD 修饰改变了 PLGA 材料的表面形态, 进而促进细胞在支架表面的黏附。

2.2.2 材料亲水性 根据水接触角、吸水率和细胞黏附力的改变考察材料修饰前后的亲水性变化。RGD 修饰 PLGA-NHA (聚乳酸羟基乙酸-纳米羟基磷灰石) 制备膜和支架, 结果显示, PLGA/NHA-GRGDSPC 膜、PLGA/NHA 膜、PLGA 膜的水接触角分别为 (54.02±2.39)°、(75.34±2.39)°、(79.05±2.62)°, 即接枝 RGD 后材料表面的水接触角显著减小, 证明 RGD 修饰可以改变材料的疏水性, 增加表面润湿性; 同时, 检测了支架的吸水率, PLGA/NHA-RGD 支架的吸水率是 PLGA/NHA 支架吸水率的 1.8 倍, 是 PLGA 支架的 7.5 倍^[16]。吸水率结果同样表明 RGD 修饰的材料的亲水性明显提高。细胞黏附力测定采取微吸管吸允法, 结果发现, BMSCs 在 PLGA 和多聚赖氨酸结合 GRGDSPC (K16GRGDSPC) 修饰的 PLGA-(Asp-PEG) 材料表面的黏附力分别为 (338.4±48.7)×10⁻¹⁰ N 和 (528.2±65.6)×10⁻¹⁰ N, RGD 修饰后材料的细胞黏附力是未修饰的 1.5 倍, 显著增加了 PLGA 材料的细胞黏附性能^[25]。

3 支架种类

3.1 膜型支架 通常, 将 PLGA 材料制成 2-D 膜以利于检测 RGD 修饰前后的水接触角和细胞黏附性能。将聚合物溶解后, 均匀分布到玻璃片或模具上, 挥去有机溶剂即可得到聚合物的 2-D 膜^[16-17]。Gu 等^[19] 通过静电纺纱法 (electrospinning) 制得了一种表面呈纤维状的膜。首先合成 PLGAL [聚(乳酸-羟基乙酸-赖氨酸)], 接枝 RGD 后, 将 PLGA/PLGAL-RGD 通过静电纺纱法制成表面纤维状的膜, 与人胚胎成纤维细胞 WI-38 共培养。扫描电镜观察发现, 细胞多顺着纤维的方向生长, 并且相比 PLGA 膜, PLGA/PLGAL-RGD 膜上细胞数目更多, 促进了细胞的黏附、铺展和增殖。

3.2 刚性支架 刚性支架具有一定的力学强度、适宜的孔径和孔隙率, 可以荷载各类生长因子, 促进种子细胞生长、分

化,模拟体内组织、器官修复的微环境,是骨组织工程学常用的细胞移植载体,对临床上的骨损伤修复具有重要意义。

刚性支架较多采用溶液浇铸/粒子沥滤(solvent casting/particulate leaching)或发泡法(gas foaming)制备。支架从模具中取出后,可根据骨损伤的大小切割成特定的大小和形状。Huang等^[16]制备了孔径约250 μm的PLGA/NHA-GRGDSPC多孔支架,并切成直径7.2 mm、厚2.0 mm的小圆盘,初步考察了RGD修饰的PLGA支架对骨损伤修复的影响。支架与BMSCs共培养后发现,细胞在RGD修饰的支架上生长更快,铺展广泛,与支架表面结合密切,并与周边细胞产生桥接。支架润湿后植入大小为15 mm×5 mm×3 mm的兔下颌骨损伤。12周后X射线检查发现,PLGA/NHA支架修复的下颌骨上存在黑色区域,指示骨修复不全,而植入PLGA/NHA-RGD支架的骨损伤处,呈现均一的白色,指示骨修复完全,表明PLGA/NHA-RGD骨组织工程支架更好地促进了骨损伤的修复。支架的多孔结构允许种子细胞向内生长,渗透整个支架^[18],促进了细胞增殖和物质代谢。

为促进细胞生长、分化,可在支架中混入载生长因子的微球,即能防止生长因子突释造成异位骨和重度炎症,又能缓释生长因子促进细胞生长分化。在PLGA支架制备过程中混入载模型药物白蛋白(BSA)的PLGA微球[(65±34) μm],扫描电镜下可以看到处在支架表面的微球,在荧光显微镜下观察到FITC标记的微球随机分布在支架中,证明微球成功混入支架。体外释放实验结果表明,与未植入支架的微球相比,支架中的微球突释现象不明显,BSA释放更稳定、平缓^[26-27]。Zhang等^[28]在RGD修饰的多孔支架中混入载骨形态发生蛋白2(BMP-2)的纳米粒后,种植MSCs,再嵌入到兔桡骨的损伤处,结果表明,24周后各组的损伤处均形成桥连,但RGD修饰组的新骨更大,融合界面也更好。

3.3 微球支架

3.3.1 普通微球支架 刚性支架需以手术方式植入骨伤处,手术过程会对机体造成伤害。如果能将支架以注射方式植入,就可以实现无创伤治疗,并提高操作简便性。有研究将PLGA微球作为载体种植软骨细胞^[29-30],注射植入机体,取得了不错的效果。用RGD修饰微球表面,可进一步提高微球作为细胞移植载体的性能^[31]。

以此为基础,Park等^[32]报道了一种性能更好的微球支架,将RGD修饰并表面覆盖BMP-2的PLGA微球和载体塞米松(DEX)的纳米球混合,与人骨髓间充质干细胞(HMSCs)共培养一段时间,注射到裸鼠背部皮下。对照组没有细胞黏附增殖,RGD修饰组(3%~10%,w/v)促进了接种在微球上的HMSCs黏附、增殖和分化。与对照组相比,实验组的I型胶原、核心结合因子(Cbfa-1)、骨涎蛋白(BSP)、骨钙素(OCN)水平提高,证明HMSCs已分化为成骨细胞,BMP-2和DEX的加入促进了细胞定向分化。

3.3.2 多孔微球支架 在制备微球时加入致孔剂,可得到与刚性支架相似,具有一定孔径和孔隙率的多孔微球支架。与普通微球相比,多孔微球表面的孔隙提高了支架的细胞黏附面积,3D结构为细胞生长提供更多空间,微球内部相互连通的孔道促进物质的交换,多孔微球降解产生的酸性产物

易于排出而使其PLGA降解更缓慢,并使黏附细胞周围的pH变化更小,给予细胞良好的生长环境^[33]。有研究者通过复乳溶剂挥发法制备微球,在内水相中加入0~10%的NH₄HCO₃作为发泡剂,可得到孔隙率30%~95%的多孔微球,微球粒径在200~450 μm,表面微孔孔径约4 μm,然后应用热压结技术使多孔微球在模具中互相粘连,形成具有一定形状的支架,微球之间的大孔促进血管和骨组织向内生长,而微球表面的孔洞利于物质交换^[34]。将滑膜间充质干细胞(SMSCs)与热压结后的支架共培养,与普通微球支架相比,多孔微球支架促进了细胞黏附和生存活力。但是,热压结后的微球支架与普通刚性支架一样,不能以注射方式到达骨损伤处。因此,有必要保留多孔微球作为细胞培养和移植的载体。对于多孔微球支架,增大表面孔径可允许种子细胞进入微球内部^[33,35],从而实现3D培养。虽然目前尚未有RGD肽修饰多孔微球的报道,但已有针对改善多孔微球细胞亲和性的研究。用I型胶原的类似物P-15肽修饰PLGA多孔微球,MTT检测结果显示,与普通微球相比,在7d内,肽修饰后的多孔微球具有更高的细胞黏附数量,并且孔隙率和孔径最大时,细胞黏附最多^[34]。

4 小结

骨组织工程支架的主要作用是作为荷载和移植细胞的载体,同时能缓释促进细胞生长、分化的生长因子,根据需要定向分化细胞以适应不同的骨或软骨损伤。PLGA是优良、安全的骨组织工程支架材料,而RGD修饰能改善其亲水性和细胞黏附性差的缺点。新型RGD衍生物的合成,采用不同RGD修饰的方式以适应制备各种形状的PLGA支架,使PLGA支架提供细胞增殖分化的3D多孔结构并能同时缓释生长因子,达到修复和重建骨或软骨损伤的目的,这仍然是目前研究的热点。

5 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Yarlagadda P K, Chandrasekharan M, Shyan J Y. Recent advances and current developments in tissue scaffolding[J]. *Biomater Eng*, 2005, 15: 159-177.
- [2] Kim K, Dean D, Lu A, Mikos A G, Fisher J P. Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7: 1249-1264.
- [3] Kim J, Dadsetan M, Ameenuddin S, Windebank A J, Yaszemski M J, Lu L. *In vivo* biodegradation and biocompatibility of PEG/sebacic acid-based hydrogels using a cage implant system[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95: 191-197.
- [4] Lee S J, Lim G J, Lee J W, Atala A, Yoo J J. *In vitro* evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 3466-3472.
- [5] Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M. The

- effect of composition of calciumphosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells[J]. *Biomaterials*, 2011, 32:7053-7059.
- [6] Ren J, Ren T, Zhao P, Huang Y, Pan K. Repair of mandibular defects using MSCs-seeded biodegradable polyester porous scaffolds[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2007, 18:505-517.
- [7] Shen H, Hu X X, Yang F, Bei J, Wang S. The bioactivity of rh-BMP-2 immobilized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2009, 30:3150-3157.
- [8] Shen H, Hu X, Yang F, Bei J Z, Wang S G. Combining oxygen plasma treatment with anchorage of cationized gelatin for enhancing cell affinity of poly(lactide-co-glycolide) [J]. *Biomaterials*, 2007, 28:4219-4230.
- [9] Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M, et al. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process[J]. *Biomaterials*, 2002, 23:585-596.
- [10] Danhier F, Ucakar B, Magotteaux N, Brewster M E, Pr at V. Active and passive tumor targeting of a novel poorly soluble cyclin dependent kinase inhibitor[J]. *Int J Pharm*, 2010, 392:20-28.
- [11] Wang Z, Chui W K, Ho P C. Nanoparticulate delivery system targeted to tumor neovasculature for combined anticancer and antiangiogenesis therapy[J]. *Pharm Res*, 2011, 28:585-596.
- [12] Morgan A W, Roskov K E, Lin-Gibson S, Kaplan D L, Becker M L, Simon C G Jr. Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation[J]. *Biomaterials*, 2008, 29:2556-2563.
- [13] Chua P H, Neoh K G, Kang E T, Wang W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion[J]. *Biomaterials*, 2008, 29:1412-1421.
- [14] Shi Z, Neoh K G, Kang E T, Poh C, Wang W. Bacterial adhesion and osteoblast function on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized RGD peptide[J]. *Biomed Mater Res A*, 2008, 86:865-872.
- [15] Yoon J J, Song S H, Lee D S, Park T G. Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method[J]. *Biomaterials*, 2004, 25:5613-5620.
- [16] Huang Y X, Ren J, Ren T B, Gu S Y, Tan Q G, Zhang L H. Bone marrow stromal cells cultured on poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composites with chemical immobilization of Arg-Gly-Asp peptide and preliminary bone regeneration of mandibular defect thereof[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 95:993-1003.
- [17] Hsu S H, Chang S H, Yen H J, Whu S W, Tsai C L, Chen D C. Evaluation of biodegradable polyesters modified by type II collagen and Arg-Gly-Asp as tissue engineering scaffolding materials for cartilage regeneration[J]. *Artif Organs*, 2006, 30:42-55.
- [18] Yang X B, Roach H I, Clarke N M, Howdle S M, Quirk R, Shakesheff K M, et al. Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification[J]. *Bone*, 2001, 29:523-531.
- [19] Gu S Y, Wang Z M, Zhang C Y, Ren J. Synthesis and evaluation of a biodegradable material with cell recognition motives[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74:572-578.
- [20] 宋玉林, 郑启新, 郭晓东, 郝杰. 含 Arg-Gly-Asp 肽与仿生 PLGA-(Asp-PEG)材料结合的实验研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25:860-863.
- [21] Yin J, Li Z, Yang T, Wang J, Zhang X, Zhang Q. Cyclic RGDyK conjugation facilitates intracellular drug delivery of polymeric micelles to integrin-overexpressing tumor cells and neovasculature[J]. *J Drug Target*, 2011, 19:25-36.
- [22] Danhier F, Vroman B, Lecouturier N, Crockart N, Pourcelle V, Freichels H, et al. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel[J]. *J Control Release*, 2009, 140:166-173.
- [23] Zhang B, Jiang Y, Kuang H, Yao C, Huang Q, Xu S, et al. Development of a spiral piezoelectric immunosensor based on thiol self-assembled monolayers for the detection of insulin[J]. *J Immunol Methods*, 2008, 338:7-13.
- [24] Deng C, Tian H Y, Zhang P B, Sun J, Chen X S, Jing X B. Synthesis and characterization of RGD peptide grafted poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lactide)-b-poly(L-glutamic acid) triblock copolymer[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7:590-596.
- [25] 潘海涛, 郑启新, 郭晓东. 特种肽支架材料对骨髓基质干细胞黏附、增殖及成骨分化的影响[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86:2766-2770.
- [26] Hu Y, Hollinger J O, Marra K G. Controlled release from coated polymer microparticles embedded in tissue-engineered scaffolds [J]. *J Drug Target*, 2001, 9:431-438.
- [27] Meese T M, Hu Y, Nowak R W, Marra K G. Surface studies of coated polymer microspheres and protein release from tissue-engineered scaffolds[J]. *J Biomater Sci Polymer Ed*, 2002, 13:141-151.
- [28] Zhang P, Wu H, Wu H, L u Z, Deng C, Hong Z, et al. RGD-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glycolide) and poly(L-lactide)-grafted nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12:2667-2680.
- [29] Mercier N R, Costantino H R, Tracy M A, Bonassar L J. A novel injectable approach for cartilage formation *in vivo* using PLG microspheres[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32:418-429.
- [30] Mercier N R, Costantino H R, Tracy M A, Bonassar L J. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26:1945-1952.
- [31] Tan H, Huang D, Lao L, Gao C. RGD modified PLGA/Gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 91:228-238.
- [32] Park J S, Yang H N, Jeon S Y, Woo D G, Na K, Park K H. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using RGD-modified BMP-2 coated microspheres [J]. *Biomaterials*, 2010, 31:6239-6248.
- [33] Mittal A, Negi P, Garkhal K, Verma S, Kumar N. Integration of porosity and bio-functionalization to form a 3D scaffold: cell culture studies and *in vitro* degradation [J]. *Biomed Mater*, 2010, 5:045001.
- [34] Wang Y J, Shi X T, Ren L, Wang C, Wang D A. Porous poly(lactic-co-glycolide) microsphere sintered scaffolds for tissue repair applications[J]. *Mater Sci Eng C*, 2009, 29:2502-2507.
- [35] Chung H J, Kim I K, Kim T G, Park T G. Highly open porous biodegradable microcarriers; *in vitro* cultivation of chondrocytes for injectable delivery[J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14:607-615.