

综述

三维支架培养系统及其模拟骨髓微环境 体外扩增造血干细胞的研究进展[▲]

朱晓宇 石 军

(上海交通大学附属第六人民医院血液科,上海市 200233,电子邮箱:homolmono@163.com)

【摘要】 造血干细胞移植是治疗多种血液系统疾病的有效方法,但造血干细胞数量不足的问题限制了其在临床中的应用。体外扩增可提供大量的造血干细胞,而三维培养在造血干细胞的扩增和干性维持上优势明显,具有重要的临床意义。三维支架培养是目前造血干细胞体外扩增的主要方法,本文就三维支架培养系统及其扩增造血干细胞的研究进展、存在的问题和前景做一综述。

【关键词】 造血干细胞;三维支架培养;体外扩增;骨髓微环境;综述

【中图分类号】 R 329.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2018)09-1077-06

DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2018.09.21

造血干细胞移植是治疗白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血等血液系统疾病和某些实体肿瘤、自身免疫性疾病、遗传性疾病的有效方法。在体内,造血干细胞存在于独特的三维骨髓微环境中,包含基质细胞及其分泌的细胞外基质和细胞因子,这些特定的结构和成分提供了复杂的生物化学及物理信号,共同调控并维持造血干细胞的自我更新和多向分化的潜能。传统的二维造血干细胞培养在相对静态封闭的小空间里进行,与骨髓微环境有很大差异,其缺乏良好的营养物质和氧分布,不利于细胞生长,难以短期内快速扩增造血干细胞,也容易使细胞的生物学特性发生改变,难以维持细胞自我更新和多向分化的潜能,造成细胞过度分化和死亡。因此模拟骨髓微环境的三维培养系统成为扩增造血干细胞的主要方法,而其中三维支架培养系统的应用最为广泛。本文就近年三维支架培养系统及其模拟骨髓微环境体外扩增造血干细胞的研究进展、存在的问题及其前景做一综述。

1 三维支架培养系统及其材料分类

三维支架细胞培养是将由不同生物材料构成的具有三维结构的载体与不同种类的细胞在体外共培养,使细胞在载体的立体空间结构中附着、迁移、生长,构成三维细胞-载体复合物。三维支架细胞培养系统能够在体外重建细胞微环境的空间结构、细胞外基质、细胞因子等成分,最大限度地模拟体内环境^[1];可及时清除代

谢产物,为细胞提供更好的营养支持;并稳定调节细胞因子和小分子化合物的浓度,实现造血干细胞的长期扩增。三维支架培养系统在保持干细胞活性、促进干细胞扩增、维持细胞原有形态及功能上均较传统二维培养系统更具优势,且其具有更大的容积,能够支持更多的细胞培养,因此具有广阔的应用前景。目前,三维支架培养系统的材料主要有天然材料和合成材料两大类。

1.1 天然材料 天然材料主要有胶原蛋白、壳聚糖、葡聚糖、透明质酸等细胞外基质成分及去细胞基质、脱钙骨基质等,其中胶原蛋白是最常用的天然材料。天然材料具有良好的生物相容性和亲水性,但其机械强度和硬度较低^[2]。

1.2 合成材料

1.2.1 可降解聚合物:近年来,多种合成可降解聚合物如聚乳酸、聚羟基乙酸、聚己酸内酯、聚乙烯对苯二甲酸酯和聚二甲硅氧烷等在组织工程领域被广泛应用,其具有良好的生物相容性,而且与天然材料相比,其物理学和生物化学特性更易于控制^[3]。

1.2.2 自组装肽:自组装肽在生理 pH 和离子强度下可自行组装形成纳米纤维,具有纯度高、可降解及低免疫源性等优势,能在物理结构上高度模拟细胞外基质。目前应用较多的是 β 折叠多肽和两亲多肽。其另一优势是在合成过程中能连接功能性短肽片段,从而赋予生物材料特定的生物学特性,为细胞提供特定的生物学信号^[4]。

▲基金项目:国家自然科学基金(81570135)

作者简介:朱晓宇(1990~),男,硕士,住院医师,研究方向:造血干细胞移植与骨髓微环境。

通信作者:石军(1967~),女,博士,主任医师,教授,研究方向:造血干细胞移植与骨髓微环境,电子邮箱:junshi@sju.edu.cn。

1.2.3 复合型材料:上述几种生物材料的复合应用可以弥补单一成分的不足,集合各种材料的优势,更好地模拟细胞微环境。

2 三维支架培养系统在扩增造血干细胞中的应用

2.1 单一材料的三维支架培养系统的应用 早期的三维支架培养系统由单纯的天然材料或合成材料构成,与二维培养系统相比能显著促进造血干细胞扩增。研究显示,在不添加细胞因子的情况下用三维多孔钽支架培养脐血造血祖细胞 2 周,总细胞数、CD34⁺ 细胞数及集落形成单位数均高于二维培养方法^[5]。用小鼠骨髓基质细胞系衍生去细胞基质作为支架扩增脐血造血干祖细胞,在添加细胞因子的条件下培养 8 d 后,造血干祖细胞扩增了 80 倍^[6]。一些合成材料支架已经商品化,如基质胶支架和片状载体支架。但这些单纯由生物材料构成的三维支架培养系统扩增造血干细胞的倍数未能达到临床应用所需的数量,可能与它们所提供的细胞培养环境与体内微环境仍有较大差异有关。

2.2 含基质细胞的三维支架培养系统的应用 基质细胞是骨髓微环境的重要组成部分,其分泌的细胞外基质和细胞因子对调节造血干细胞的增殖、分化等具有重要作用,因此一些研究在三维支架培养系统里引入基质细胞作为滋养层进行造血干细胞的扩增培养。Hashemi 等^[7]将非限制性体干细胞接种于脱钙骨基质支架上共培养脐血 CD34⁺ 细胞 3 周后,CD34⁺ 细胞扩增了 29.22 倍,第 14 天集落数目达到高峰(73%),较好地维持了细胞干性。此外,其他学者将人羊膜间充质干细胞^[8]、骨髓间充质干细胞和间充质干细胞分化的成骨细胞^[9]应用于细胞的研究中,证实这些基质细胞作为滋养层能有效促进造血干细胞的扩增。Huang 等^[9]的研究结果还显示,将造血干细胞与骨髓间充质干细胞和间充质干细胞分化的成骨细胞共培养,能维持造血干细胞原始细胞亚群的数量。

但其他一些学者发现,基质细胞也分泌一些抑制性细胞因子抑制造血干细胞的增殖^[10-11]。因此 Miyoshi 等^[11]创新性地使用了冻融基质层技术,先将基质细胞接种于多孔聚乙烯缩甲醛树脂支架上形成基质层后冻存,以减少基质细胞分泌的抑制原始造血细胞扩增的因子,解冻后再将来源于小鼠胎肝的造血细胞接种于基质层表面,在不添加细胞因子的条件下共培养 2 周,结果显示,与未冻存基质层相比,原始造血细胞在三维冻融基质层上的培养中扩增明显提高。因此,与其他抑制基质细胞生长的方法相比,冻融方法更易于操作且不需要

特殊的仪器或试剂,适合处理大批量基质细胞。

2.3 经修饰的三维支架培养系统的应用

2.3.1 细胞外基质分子的修饰:为了更好地模拟骨髓微环境,一些学者开始对生物支架进行修饰以提高造血干细胞的生存和扩增能力。最常见的修饰是用能够支持细胞黏附的细胞外基质分子在支架内部分还原骨髓微环境结构,如纤维黏连蛋白、硫酸肝素、透明质酸、胶原蛋白等。在无血清条件下,用纤维黏连蛋白修饰的三维聚对苯二甲酸乙二酯支架培养脐血造血干细胞,10 d 后 CD34⁺ 细胞可扩增 100 倍^[12]。此外,在透明质酸支架表面共价结合含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸模序的多肽,然后用于脐血 CD34⁺ 造血干祖细胞的培养,由于该多肽可模拟细胞外基质的纤维黏连蛋白域以提供更多的细胞结合位点,因此在只添加干细胞因子的条件下,经过 28 d 培养,造血干祖细胞集落的形成比传统液体培养增加了 280 倍^[13]。

造血干细胞在骨髓微环境中存在 3 种不同的黏附方式:(1)在纤维黏连蛋白上由整合素介导的黏附,能提供最强的黏附;(2)在肝素上由选择素介导的黏附,能提供轻微的黏附;(3)在原胶原上没有明显的黏附。有学者发现,前两种黏附方式在黏附细胞比例上没有明显差异,但纤维黏连蛋白能提供更大的接触面积,整合素占据和群集能引发多种早期有丝分裂事件而使细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期^[14]。整合素介导的细胞黏附能激活丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶信号通路,促进细胞生长,提高黏附细胞的生存能力。因此纤维黏连蛋白可能是进行生物支架修饰的最佳选择^[15]。

2.3.2 干细胞因子的修饰:干细胞因子是造血干细胞微环境中的一种关键生物分子,在体外培养中被大量用于造血干细胞的扩增。在体内干细胞因子以可溶型和膜结合型两种形式存在,这两种形式都能连接并激活酪氨酸蛋白激酶受体激活酪氨酸蛋白激酶。可溶型干细胞因子会被细胞吞噬和降解,而膜结合型干细胞因子能持续激活酪氨酸蛋白激酶并促进细胞黏附。为了更好地模拟骨髓微环境的生物学特性,一些学者尝试将干细胞因子结合到生物支架表面进行造血干细胞扩增。Mahalik 等^[16]用光化学方法将干细胞因子共价结合于甲基丙烯酸酯功能化明胶水凝胶里培养鼠造血干细胞,发现共价结合的干细胞因子保留了原始生物活性,能够稳定地结合并保持于水凝胶里长达 7 d,且结合型干细胞因子维持原始造血干细胞的能力更强,而可溶型干细胞因子增加了分化的造血细胞的增殖。Cuchiara 等^[17]将干细胞因子共价固定于聚乙二醇水凝胶表面培养造血干祖细胞 14 d 后,造血干祖细胞扩增了 97 倍,并且保持

了 c-kit⁺ lin⁻ 和 c-kit⁺ Sca1⁺ lin⁻ (KSL) 细胞亚群及其形成多系集落的能力。以上研究表明,将干细胞因子结合于支架表面可促进造血干细胞扩增并维持其干性。

2.3.3 纳米纤维材料的修饰:纳米纤维材料技术是近年三维支架培养系统研究的一个热点。纳米纤维具有很高的表面/容积比、孔隙率及较好的柔韧性,表面用细胞外基质修饰模拟细胞微环境后能更有效地提升造血干细胞的扩增效果。Kang 等^[18]用纤维黏连蛋白包被的三维分层支架扩增脐血造血干祖细胞,其中分层支架由含质量/体积浓度为 10% 羟磷灰石的聚己内酯、聚氨酯和纳米纤维三层电纺而成;用含细胞因子的培养基培养 7 d 后获得了较高的有核细胞扩增倍数和 CD34⁺ CD45⁺ 细胞、CD34⁺ CD38⁻ 细胞比率。

2.3.4 其他表面修饰:其他表面修饰如羟基化、羧基化和氨基化也同样用于纳米纤维支架的研究中。Bari 等^[19]用羧酸功能化单层碳纳米管扩增脐血造血干祖细胞,在没有细胞因子刺激的情况下,其降低了造血干祖细胞致死性的线粒体超氧化物水平,提供了最佳的细胞生存支持,使造血干祖细胞相关细胞因子维持更高水平而促分化因子维持更低水平。扫描电镜发现表面修饰的纳米纤维能提供更好的细胞黏附,但黏附的具体机制和作用仍未完全明确,纳米纤维表面的形态结构可能是一个关键因素。该研究的扩增细胞小鼠移植实验也取得了更高的骨髓植入水平和更低的移植物抗宿主病发生率。有学者研究发现,纳米纤维的空间结构和整合素群集相关,可能会导致细胞骨架相关信号通路介导的细胞特性改变^[20]。

2.4 三维支架培养系统的优化 由于在临床前期或临床应用之前需要在体外综合评估扩增造血干细胞的生物学特性,因此三维支架的应用不再单纯追求提高细胞扩增倍数,也开始关注扩增细胞干性及其移植和造血重建能力的维持。一些学者用体外集落形成实验、长期培养起始细胞实验或动物移植实验等方法评估扩增造血干细胞,以进一步优化培养条件。Yuan 等^[21]用三维藻酸盐微球培养系统扩增脐血造血干细胞后,用细胞流式检测、集落形成实验和非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷。小鼠移植实验证实了扩增的造血干细胞较好地保持了干性,具有较强的造血重建能力。Huang 等^[22]以股骨干骺端来源的生物衍生骨作为支架,以人骨髓间充质干细胞和脐静脉内皮细胞作为滋养层培养造血干祖细胞,流式细胞检测和定量 PCR 检测结果显示,该培养系统能促进造血干祖细胞的体外扩增和自我更新,而长期培养起始细胞的实验证实了其具有很强的维持造血干细胞多向分化潜能的能力,非肥胖糖尿病/重症联合免

疫缺陷小鼠移植实验结果显示扩增造血干细胞能成功植入并具有良好的造血重建能力。

此外,一些新技术的出现也为进一步优化造血干细胞培养条件提供了新的可能。2014 年哈佛大学 Wyss 生物工程研究所的研究人员制备出一种最新的器官芯片,可复制骨髓的结构、功能和细胞构成,该装置被称为“骨髓芯片”,可以进行造血干细胞培养并用来检测新药和毒性药物对骨髓的影响^[23]。“骨髓芯片”的创新之处在于研究人员并不是设法构建一种复杂的模拟骨髓微环境的结构,而是将干骨粉末装入一个开放的环形模具,然后将其植入小鼠背部皮肤下,8 周后手术切除已经在模具中形成的盘状骨,扫描显示这个盘状骨具有与骨小梁相似的蜂窝状结构,对其进行染色后发现里面挤满了血细胞。当研究人员通过骨髓细胞的类型和数量对它们进行分类时发现,人工骨髓中不同类型血细胞和免疫细胞的混合物与小鼠股骨中的一样。该装置能够在在一个模拟身体组织循环的微流体装置中保持健康状态长达 1 周。

随后的一些研究探究了类似的一些骨髓芯片扩增造血干细胞的效能。Wuchter 等^[24]基于定制芯片构建了一个模拟造血干细胞微环境的三维共培养系统;在定制芯片的微腔结构里植入人骨髓间充质干细胞与脐血造血祖细胞;间充质干细胞将微腔结构作为支架构建了一个复杂的三维网状结构,造血祖细胞在其间分布并在间充质干细胞周围形成了基于 β -连环蛋白和 N-钙黏蛋白的细胞间连接,逆转录 PCR 和蛋白质免疫印迹试验证实一部分造血祖细胞在 14 d 的培养过程中可持续表达 CD34⁺,集落形成实验结果显示造血干细胞培养 14 d 后可塑性仍然可以保持。Sieber 等^[25]在微流体多器官芯片中共培养人间充质干细胞和脐血造血干祖细胞,最终形成了一个与体内骨髓微环境具有分子和结构相似性的微环境,并能培养造血干祖细胞 28 d,且造血干祖细胞维持在初始状态(CD34⁺ CD38⁻),并能够形成多能造血祖细胞集落。因此,骨髓芯片能更天然地模拟骨髓微环境,但其扩增造血干细胞的效果是否优于上述人工构建的三维支架培养系统仍需进一步研究。

3 三维支架培养系统扩增造血干细胞存在的问题

上述研究明确了许多与造血干细胞体外扩增相关的生物学问题,并通过优化培养系统提高了造血干细胞的扩增效果,但距离成熟的临床应用还有一定差距,三维支架培养系统扩增造血干细胞尚存在以下问题。

3.1 生物支架的结构及特性 大部分的生物支架由多孔物质(主要是聚合物)组成,经过适当的制备如电纺后可形成包含不同尺寸孔径($10^{-7} \sim 10^{-4}$ m)的三维结构。但目前并未明确多大的孔径与体内结构最为相近。更大的孔径有利于培养基灌注,但相对于细胞大小而言它们提供的是二维环境。最适于造血干细胞扩增的支架孔径仍需要进一步探究,目前最佳的方案可能是构建含有不同大小孔隙的生物支架以提供多样化的微环境。此外,生物支架的机械强度和硬度也是影响造血干细胞扩增的因素^[26]。目前也并未明确多大的机械强度和硬度与骨髓微环境最为相近,还需要进一步探究。

3.2 生物支架的材料选择 目前大多数用于实验性细胞扩增的生物支架具有良好的生物相容性,但由于存在动物病毒感染的风险和移植受体严重的免疫反应,必须排除动物源性支架和动物蛋白,以保障扩增细胞的临床应用生物安全性。有研究表明,某些生物材料可能会释放毒性物质并吸附血浆蛋白从而破坏其生物可用性^[27]。相比于天然材料,合成生物支架能更好地控制其物理学和生物化学特性。因此生物支架材料的选择还必须考虑到后期临床应用的可行性。

3.3 基质细胞的应用 应用于三维支架培养系统的基质细胞有多种,如骨髓或脐带血来源的间充质干细胞、非限制性体干细胞、成骨细胞等。不同的基质细胞分泌不同的细胞外基质和细胞因子,对造血干/祖细胞扩增和分化的作用也有差异。同时基质细胞的培养条件(如氧浓度、有无成骨诱导培养基等)也影响其支持造血干细胞的能力。至今还没有研究比较不同的基质细胞支持造血干细胞扩增的效能,因此基质细胞的选择仍缺乏足够的依据。此外,是否需要在三维支架里完全还原骨髓微环境中的基质细胞成分,或可用特定的基质细胞替代尚需进一步研究明确。

3.4 外源性因子的应用 由于外源性细胞因子能促进造血干细胞的扩增,大多数的三维支架培养系统都添加了此类因子,然而实验室^[28-29]和临床^[30-31]研究均表明,上述因子也可能导致造血干细胞过度分化,使其在初期快速、剧烈扩增后数量急剧减少,并降低造血干细胞移植效率和造血重建能力,而且额外增加了临床应用成本。Ehring等^[5]在不添加细胞因子的基础上,使用纤维黏连蛋白修饰的细胞基质支架中培养脐血CD34⁺细胞2周后,获得了3倍的有核细胞、CD34⁺细胞、CD45⁺细胞数和2.6倍的集落形成单位细胞数,而且这些细胞能够成功移植到免疫功能不全的实验动物中。但并没有研究表明在缺乏细胞因子的条件下可以实现造血干细胞的长期扩增。因此有必要研究外源性细胞因子的优

化使用或替代方法,在不诱导过度分化的情况下实现造血干细胞的最大化扩增。

3.5 生物反应器的应用 三维支架培养系统是静态的,这会导致细胞接种效率低和细胞分布不均匀等问题^[32],而且由于不能很好地复制骨髓微环境中的营养物质、氧浓度、信号分子的梯度分布特性,加上培养空间有限,无法长期大规模扩增造血干细胞而影响造血干细胞的增殖和自我更新。生物反应器可通过搅拌、旋转、灌注等方式实现细胞的动态培养,提高细胞接种效率^[33],还可模拟细胞所处的生理力学环境,并能稳定地维持营养物质、细胞因子和信号分子的有效浓度,有效促进造血干细胞的扩增和维持干性。但目前还没有关注生物反应器和三维支架培养系统联合应用的研究,而且从上述的小规模培养系统过渡到生物反应器可能会出现一些新问题,如如何确定适宜的细胞培养密度,如何通过控制生物反应器参数(温度、pH、气体条件、流体速度等)创建相似的细胞培养环境等。

3.6 造血干细胞的分离 扩增后从培养系统中分离造血干细胞也是一大挑战。在大多数三维培养系统中收集扩增的造血干细胞时需除去基质细胞,而这增加了收集的难度,并可能损伤造血干细胞。使用可降解支架可能有助于提高细胞收集效率,但目前还没有这方面的研究报道。

3.7 其他 扩增造血干细胞的移植和长期造血重建能力仍需大量动物模型移植实验及更进一步的临床研究来明确。此外还需要在临床前期实验中确保扩增造血干细胞的生物安全性,尽量降低其引起移植受体感染和严重免疫反应的风险。

4 三维支架培养系统扩增造血干细胞的前景

目前的研究多关注几个单一因素对造血干细胞扩增的影响,进一步的研究应最大限度地目前构建造血干细胞三维培养系统所需的基本成分(支架、造血干细胞、各种髓细胞、细胞因子等)有机整合,探索各因素(支架成分、微结构和功能化修饰,细胞种类和接种密度,细胞因子种类和浓度,氧浓度,基质弹性,剪切应力等)的最佳参数,并在培养过程中精确地控制这些因素,从而最大限度地模拟体内骨髓微环境,实现体外造血干细胞长期扩增。这一目标的实现依赖于对造血干细胞在骨髓微环境中生长和分化机制的进一步阐明。最终构建的培养体系应尽可能简单,便于标准化复制和随后培养的检测及细胞收集,同时又在具有与真实骨髓微环境相当的复杂性。

借助生物反应器有望将三维支架培养系统进行有效扩大。生物反应器能持续更换培养基,稳定地维持营养物质、细胞因子和信号分子的有效浓度,降低代谢产物水平,并便于控制培养条件(氧浓度和 pH 值等);而且能提供更大的培养空间,具有高营养物质/代谢废物交换率,能够支持高密度的细胞生长,实现造血干细胞的大规模扩增;此外,生物反应器培养系统易于操作,可以节省劳力,而且细胞密封在生物反应器里,减少了与外界环境的接触,有助于降低周期性更换培养基过程中可能发生的污染风险。

一些新技术的出现也将有力地推进造血干细胞体外扩增技术的发展。目前已经有学者利用计算机数学模型,通过模拟体内生理造血微环境来设定体外三维培养系统各种因素的最佳参数,实现三维培养系统的设计和优化^[34-35]。这些计算机数学模型的发展将促进造血干细胞体外扩增技术的不断完善。设计适合造血干细胞扩增的生物材料支架是一项非常精细的工作,目前可以借助计算机设计理想的支架并利用全控生产工艺进行制造。在支架表面印刻适宜的图形,例如用飞秒激光烧蚀技术在胶原支架上产生如骨髓微环境样树丛结构的微图形,能够网罗造血干细胞并支持其生长^[36]。同时,三维生物打印技术正在飞速发展,并越来越多地应用于医学领域尤其是组织工程学三维模型的构建中。一些研究者已成功利用该技术构建了肿瘤的微环境模型^[37]、组织工程三维支架^[38]、人工器官^[39]等。随着该技术的不断成熟,有望批量、标准化地生产三维支架培养系统。

5 结 语

随着对骨髓微环境认识的不断加深和生物学材料的发展,近年用三维培养系统模拟骨髓微环境扩增造血干细胞的研究已取得了进步。目前,已经实现了用三维培养系统进行有效的造血干细胞体外扩增,但同时也还存在一些问题,今后需进一步优化三维培养系统,更有效地扩增造血干细胞并最大程度保持其干性。目前关于全面评估扩增造血干细胞的生物学特性的研究较少,今后需要更多的动物模型移植实验评价其长期造血重建能力,以及进一步的临床前期研究明确其临床转化应用的效率和可行性。

参 考 文 献

[1] Alavi A, Stupack DG. Cell survival in a three-dimensional matrix[J]. *Methods Enzymol*, 2007, 426: 85 - 101.

[2] Yan XZ, Van Den Beucken JJ, Both SK, et al. Biomaterial strategies for stem cell maintenance during *in vitro* expansion [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(4): 340 - 354.

[3] Hu J, Ma PX. Nano-Fibrous tissue engineering scaffolds capable of growth factor delivery [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(6): 1 273 - 1 281.

[4] Silva GA, Czeisler C, Niece KL, et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers [J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1 352 - 1 355.

[5] Ehring B, Biber K, Upton TM, et al. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix [J]. *Cytotherapy*, 2003, 5(6): 490 - 499.

[6] Tiwari A, Tursky ML, Mushahary DA, et al. Ex vivo expansion of haematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood on acellular scaffolds prepared from MS-5 stromal cell line [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(11): 871 - 883.

[7] Hashemi ZS, Moghadam MF, Soleimani M. Comparison of the Ex vivo expansion of UCB-Derived CD34⁺ in 3D DBM/MBA scaffolds with USSC as a feeder layer [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(10): 1 075 - 1 087.

[8] Pan X, Sun Q, Zhang Y, et al. Biomimetic macroporous PCL scaffolds for ex vivo expansion of cord blood-derived CD34⁺ cells with feeder cells support [J]. *Macromol Biosci*, 2017, 17(8): 1700054.

[9] Huang XB, Zhu B, Wang XD, et al. Three-dimensional co-culture of mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis *in vitro*: functional implication of the biomimetic HSC niche [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1 141 - 1 151.

[10] Miyoshi H, Ohshima N, Sato C. Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells on stroma formed within a porous scaffold: influence of scaffold shape and cryopreservation of the stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(1): 32 - 38.

[11] Miyoshi H, Morita M, Ohshima N, et al. Expansion of mouse hematopoietic progenitor cells in three-dimensional cocultures on frozen-thawed stromal cell layers formed within porous scaffolds [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(2): 115 - 124.

[12] Feng Q, Chai C, Jiang XS, et al. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 78(4): 781 - 791.

[13] Demange E, Kassim Y, Petit C, et al. Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for *ex vivo* biomimicry [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(11): 901 - 910.

[14] Franke K, Pompe T, Bornhäuser M, et al. Engineered matrix

- coatings to modulate the adhesion of CD133⁺ human hematopoietic progenitor cells [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (5) : 836 – 843.
- [15] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1 (5) : E131 – E138.
- [16] Mahadik BP, Pedron Haba S, Skertich LJ, et al. The use of covalently immobilized stem cell factor to selectively affect hematopoietic stem cell activity within a gelatin hydrogel [J]. *Biomaterials*, 2015, 67 : 297 – 307.
- [17] Cuchiara ML, Coşkun S, Banda OA, et al. Bioactive poly (ethylene glycol) hydrogels to recapitulate the HSC niche and facilitate HSC expansion in culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113 (4) : 870 – 881.
- [18] Kang YG, Shin JW, Park SH, et al. A three-dimensional hierarchical scaffold fabricated by a combined rapid prototyping technique and electrospinning process to expand hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38 (1) : 175 – 181.
- [19] Bari S, Chu PP, Lim A, et al. Mitochondrial superoxide reduction and cytokine secretion skewing by carbon nanotube scaffolds enhance *ex vivo* expansion of human cord blood hematopoietic progenitors [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11 (7) : 1 643 – 1 656.
- [20] Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, et al. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces [J]. *Chemphyschem*, 2004, 5 (3) : 383 – 388.
- [21] Yuan Y, Sin WY, Xue B, et al. Novel alginate three-dimensional static and rotating culture systems for effective *ex vivo* amplification of human cord blood hematopoietic stem cells and *in vivo* functional analysis of amplified cells in NOD/SCID mice [J]. *Transfusion*, 2013, 53 (9) : 2 001 – 2 011.
- [22] Huang XB, Li CL, Zhu B, et al. Co-cultured hBMSCs and HUVECs on human bio-derived bone scaffolds provide support for the long-term *ex vivo* culture of HSC/HPCs [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104 (5) : 1 221 – 1 230.
- [23] Torisawa YS, Spina CS, Mammoto T, et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology *in vitro* [J]. *Nat Methods*, 2014, 11 (6) : 663 – 669.
- [24] Wuchter P, Saffrich R, Gisellbrecht S, et al. Microcavity arrays as an *in vitro* model system of the bone marrow niche for hematopoietic stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 364 (3) : 573 – 584.
- [25] Sieber S, Wirth L, Cavak N, et al. Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12 (2) : 479 – 489.
- [26] Hosseinizand H, Ebrahimi M, Abdekhodaie MJ. Agitation increases expansion of cord blood hematopoietic cells and promotes their differentiation into myeloid lineage [J]. *Cytotechnology*, 2015, 68 (4) : 969 – 978.
- [27] Laluppa JA, McAdams TA, Papoutsakis ET, et al. Culture materials affect *ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells [J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36 (3) : 347 – 359.
- [28] Shimizu Y, Ogawa M, Kobayashi M, et al. Engraftment of cultured human hematopoietic cells in sheep [J]. *Blood*, 1998, 91 (10) : 3 688 – 3 692.
- [29] Nolta JA, Smogorzewska EM, Kohn DB. Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction of primitive human hematopoietic cells [J]. *Blood*, 1995, 86 (1) : 101 – 110.
- [30] Jarosca J, Goltry K, Smith A, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo*-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the Aastrom Replicell System [J]. *Blood*, 2003, 101 (12) : 5 061 – 5 067.
- [31] Shpall EJ, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002, 8 (7) : 368 – 376.
- [32] Morales-Hernandez DG, Genetos DC, Working DM, et al. Ceramic identity contributes to mechanical properties and osteoblast behavior on macroporous composite scaffolds [J]. *J Funct Biomater*, 2012, 3 (2) : 382 – 397.
- [33] Wendt D, Marsano A, Jakob M, et al. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84 (2) : 205 – 214.
- [34] Safarishahrjari A, Gaffari A. Parameter identification of hematopoiesis mathematical model-periodic chronic myelogenous leukemia [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2013, 17 (1) : 73 – 77.
- [35] Gullo F, Van Der Garde M, Russo G, et al. Computational modeling of the expansion of human cord blood CD133⁺ hematopoietic stem/progenitor cells with different cytokine combinations [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31 (15) : 2 514 – 2 522.
- [36] Liu Y, Sun S, Singha S, et al. 3D femtosecond laser patterning of collagen for directed cell attachment [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (22) : 4 597 – 4 605.
- [37] Zhao Y, Yao R, Ouyang L, et al. Three-dimensional printing of HeLa cells for cervical tumor model *in vitro* [J]. *Biofabrication*, 2014, 6 (3) : 035001.
- [38] Di Luca A, Ostrowska B, Lorenzo-Moldero I, et al. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 22 898.
- [39] Yoo SS. 3D-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25 (5) : 507 – 511.