

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002749

负载羟基磷灰石的 PLGA 支架材料在骨缺损修复中的研究

王 茜¹, 曹玲燕²

(1. 重庆医科大学附属口腔医院颌面外科, 重庆 401147;

2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科, 上海 200011)

【摘要】目的:通过检测大鼠骨髓干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)在负载羟基磷灰石的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)支架上的生物学行为,为进一步制备骨修复材料提供实验依据。**方法:**体外仿生矿化形成不同浓度羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)PLGA 支架材料 PLGA-HAP(0 mmol/L、4.2 mmol/L、25 mmol/L)。大鼠 BMSCs 分别接种其中,检测各组材料对细胞黏附、增殖及成骨分化的影响。**结果:**在细胞增殖实验中,对照组在 1 d、4 d、7 d 的光密度值分别为 0.361 ± 0.009 、 0.408 ± 0.005 和 0.430 ± 0.006 , PLGA-HAP(0 mmol/L) 支架在 1 d、4 d、7 d 的光密度值分别为 0.203 ± 0.003 、 0.477 ± 0.006 和 0.606 ± 0.007 , PLGA-HAP(4.2 mmol/L) 复合支架在 1 d、4 d、7 d 的光密度值分别为 0.262 ± 0.006 、 0.527 ± 0.005 和 0.635 ± 0.003 , PLGA-HAP(25 mmol/L) 复合支架在 1 d、4 d、7 d 的光密度值分别为 0.270 ± 0.002 、 0.575 ± 0.004 和 0.667 ± 0.005 , 时间因素的 F 值为 10 632.000, HAP 浓度因素的 F 值为 678.000, HAP 浓度与时间因素交互的 F 值为 732.600, P 值均为 0.000, 数据有统计学差异, 说明时间相对较长、矿化程度较高的支架更利于细胞的黏附、生长增殖, 时间因素的影响相对积极; 在碱性磷酸酶活性值测试中, 3 d 时复合支架 PLGA-HAP(0 mmol/L)、PLGA-HAP(4.2 mmol/L)、PLGA-HAP(25 mmol/L) 的活性值分别为 0.088 ± 0.015 、 0.122 ± 0.016 和 0.125 ± 0.008 , 7 d 时复合支架 PLGA-HAP(0 mmol/L)、PLGA-HAP(4.2 mmol/L)、PLGA-HAP(25 mmol/L) 的活性值分别为 0.146 ± 0.004 、 0.469 ± 0.024 和 0.573 ± 0.013 , 时间因素的 F 值为 1 653.000, HAP 浓度因素的 F 值为 400.900, HAP 浓度与时间因素交互的 F 值为 280.500, P 值均为 0.000, 数据有统计学差异, 说明在相对的一段时间内, 不同矿化程度的支架材料均能促进骨缺损修复, 随着时间的推移, HAP 浓度即矿化程度越高的支架越利于细胞的成骨分化, 其中, 时间因素的影响相对积极。**结论:**负载羟基磷灰石的 PLGA 复合支架材料能够显著促进细胞黏附、增殖及成骨分化的能力, 本研究是进一步研制相关生物活性骨修复材料的重要实验依据和基础。

【关键词】羟基磷灰石; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 支架材料; 骨缺损修复

【中图分类号】R318.08

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-05-18

On bone defect repair with PLGA-HAP composite scaffolds biomaterials

Wang Qian¹, Cao Lingyan²

(1. Department of 2nd Oral-maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Prosthodontics, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine)

【Abstract】Objective: To provide experimental basis for the further preparation of bioactive bone repair materials by detecting the biological behaviour of rat bone mesenchymal stem cells (BMSCs) in the PLGA-HAP composite scaffolds biomaterials. **Methods:** Hydroxyapatite (HAP) with different concentrations formed by biomimetic mineralization *in vitro* and deposited on poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) turned to PLGA-HAP scaffolds biomaterials (0 mmol/L, 4.2 mmol/L, 25 mmol/L). Rat BMSCs were co-cultured into them to detect the effects of each group of materials on cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. **Results:** In the cell proliferation experiment, the absorbance values of the control group on 1 d, 4 d, and 7 d were 0.361 ± 0.009 , 0.408 ± 0.005 , and 0.430 ± 0.006 , the values of PLGA-HAP(0 mmol/L) composite scaffolds on 1 d, 4 d, and 7 d were 0.203 ± 0.003 , 0.477 ± 0.006 , and 0.606 ± 0.007 , the values of PLGA-HAP(4.2 mmol/L) composite scaffolds at 1 d, 4 d, and 7 d were 0.262 ± 0.006 , 0.527 ± 0.005 , and 0.635 ± 0.003 , respectively, and PLGA-HAP(25 mmol/L) composite scaffolds at 1 d, 4 d, and 7 d values were 0.270 ± 0.002 , 0.575 ± 0.004 , and 0.667 ± 0.005 , respectively. The F value of the time factor was 10 632.000, that of the HAP concentration factor was 678.000, and that of the interaction factor was 732.600, all $P=0.000$. The data had statistical differences, indicating that

作者介绍: 王 茜, Email: flying_009@163.com,

研究方向: 颌面部组织修复重建、骨再生组织工程。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210114.0919.008.html>
(2021-01-14)

the scaffold with relatively long time and high mineralization degree was more conducive to cell adhesion, growth and proliferation, and the influence of time factor was relatively positive. In the alkaline phosphatase (ALP) activity value test, the activity values of the composite scaffolds PLGA-HAP(0 mmol/L), PLGA-HAP(4.2 mmol/L), and PLGA-HAP(25 mmol/L) at 3 days were 0.088 ± 0.015 , 0.122 ± 0.016 and 0.125 ± 0.008 , the activity values at 7 days were 0.146 ± 0.004 , 0.469 ± 0.024 and 0.573 ± 0.013 , respectively. The F value of the time factor was 1 653.000, the F value of the HAP concentration factor was 400.900, and the F value of the interaction factor was 280.500, all $P=0.000$. The statistically different data showed that scaffold materials with different mineralization degrees could promote the repair of bone defects in a relative period of time. With the passage of time, the scaffold with higher HAP concentration, i.e. higher mineralization degree, was more conducive to the osteogenic differentiation of cells, and the influence of time was relatively positive. **Conclusion:** Hydroxyapatite-loaded PLGA composite scaffold can significantly promote cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. This study is an important experimental basis and foundation for further development of related bioactive bone repair materials.

[Key words] hydroxyapatite; polylactic-co-glycolic acid; composite scaffolds; bone defect repair

随着生物材料的兴起、发展及日趋成熟,越来越多的新型材料涌现出来。仿生材料是指模仿自然界中各种生物特点或特性而开发的材料,生物材料的仿生方式既包括物理方面也包括化学方面,如在骨组织生物工程材料中,既要从物理方面模拟骨组织的多层次结构,也要从化学方面模拟骨组织的化学成分^[1]。骨组织是自然界中结构最复杂的生物矿化材料之一,由有机的胶原、羟基磷灰石和水等物质组成,可以看作一种纳米羟基磷灰石颗粒充填胶原基质的有机-无机复合材料^[2]。由于其特殊的结构和性能,单一的材料并不能够满足骨组织工程的要求,因而通常将 2 种或 2 种以上具有互补特性的生物材料相复合,以赋予其成骨活性^[1]。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (polylactic-co-glycolic acid, PLGA) 由 2 种单体即乳酸和羟基乙酸聚合而成,是一种可降解的功能高分子有机化合物。PLGA 具有良好的生物性能,生物相容性好,早已被 FDA 批准用于医药领域,是一种生物、理化性能较好的再生材料^[3]。目前这种材料已被广泛应用,且可与多种生物材料相结合^[4-5]。PLGA 虽有较好的生物和理化性能,但若单一使用则缺乏骨诱导性和骨传导性,对骨组织修复效果不理想^[5]。羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HAP) 是人体硬组织的主要无机成分,其化学成分和晶体结构与脊椎动物的骨和牙齿的矿物成分非常接近,有较好的骨诱导性和骨传导性,作为一种用于骨缺损修复的材料已在临床上得到广泛应用^[6]。PLGA 与 HAP 生物、理化特性互补,两者结合形成复合材料则从化学性能方面仿生了骨组织

的有机-无机复合成分。

生物体内的矿化形成了骨骼的有机-无机复合物,生物矿化指的是在生物体内形成无机矿物质的过程^[7]。骨骼中的羟基磷灰石是一种活“矿物”,通过羟基磷灰石不断地生长、溶解及重构,可以起到结构支撑作用和保持体内平衡储蓄钙的功能^[8]。本研究以 PLGA 多孔微球支架为有机基质,通过体外矿化的形式形成负载羟基磷灰石的 PLGA 支架材料以此仿生模拟骨组织结构,为进一步制备生物活性骨修复材料提供实验依据。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能,体内外研究均证实 BMSCs 能根据特定的环境分化为成骨细胞再生骨组织^[9],因此本研究选用大鼠 BMSCs 作为试验细胞。

1 材料与方法

1.1 大鼠 BMSCs 的培养

本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。根据相关文献采用全骨髓贴壁法分离培养细胞^[10]。取 3 周龄健康 Sprague-Dawley 大鼠,脱臼处死后用 75% 乙醇溶液浸泡 10 min,无菌条件下取出其股骨、胫骨,显露骨髓腔,用含有 200 U/mL 肝素的无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗出骨髓。通过离心除去血细胞后,用含 10% 胎牛血清的培养液混合接种至培养皿中,将细胞进行培养和传代。第 2~3 代获得的大鼠 BMSCs 用于本研究中。

1.2 负载羟基磷灰石的 PLGA 支架材料 (PLGA-HAP) 的合成

1.2.1 PLGA 多孔微球支架的制作 采用复乳-溶剂挥发法^[11]制作 PLGA 多孔微球,称量 5 g 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol,

PVA)放入装有 1 L 双蒸水的烧杯中,在 80 ℃恒温水浴锅中使其完全溶解,取出烧杯并静置至室温;称量 3 g PLGA 颗粒放入烧杯中,用移液枪取 30 mL 二氯甲烷加入烧杯中,避光条件下待其完全溶解,并加入 150 mg 碳酸氢钠(NaHCO_3)粉末混合均匀;在通风橱中,将混有 NaHCO_3 的 PLGA 溶液匀速滴入 PVA 溶液中,形成复乳;将复乳放置于恒温磁力搅拌器上,置于通风橱中匀速搅拌 6~8 h,使其中的二氯甲烷完全挥发,此时已形成多孔 PLGA 微球;将二氯甲烷完全挥发后的溶液静置,弃去上清液,双蒸水反复(2、3 次)洗涤过滤 PLGA 多孔微球,滤干后置于-80 ℃冰箱过夜,再放入真空冷冻干燥机中冻干,做成 PLGA 多孔微球支架。

1.2.2 PLGA-HAP 复合支架材料的合成

1.2.2.1 矿化液的配制 主要试剂:氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、硫酸镁(MgSO_4)、氯化镁(MgCl_2)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、氯化钙(CaCl_2)及磷酸二氢钾(KH_2PO_4)等,根据文献^[2]配制模拟体液(simulated body fluid, SBF),其中因 NaHCO_3 浓度不同配置成 2 种浓度的 SBF 以形成不同浓度(4.2 mmol/L 与 25 mmol/L)HAP 沉积。最后调节 SBF 的 pH 值。

1.2.2.2 PLGA-HAP 复合支架材料的合成 将 PLGA 多孔微球及支架分别放入 2 种不同浓度 SBF(4.2 mmol/L 与 25 mmol/L)矿化液试管中,将试管放入 37 ℃恒温摇箱中 1 周,每日更换新鲜的相应 SBF 矿化诱导液。1 周后双蒸水清洗,吸水纸吸干表层水分后置于-80 ℃冰箱过夜,再放入真空冷冻干燥机中冻干,由此形成的 PLGA-HAP 微球及支架有 4.2 mmol/L 与 25 mmol/L 2 种浓度。

本实验中,复合支架分为未矿化的复合支架组及不同浓度的矿化支架组,即 PLGA-HAP(0 mmol/L)、PLGA-HAP(4.2 mmol/L)和 PLGA-HAP(25 mmol/L)。

1.3 PLGA-HAP 复合支架材料的检测

1.3.1 场发射扫描电镜(Field emission scanning electron microscope, SEM) 使用 SEM 表征时,分别取 PLGA 多孔微球少量及 PLGA-HAP 复合支架,轻缓地平铺粘贴在专用底座的导电胶上,并用吸尘器吸走未粘牢的微球,喷金后置于场发射扫描电镜中,抽真空后观察微球、支架外貌及形态并拍摄。

1.3.2 PLGA-HAP 复合支架材料的生物相容性

1.3.2.1 细胞黏附及长入情况分析 将 3 组复合支架材料放于激光共聚焦专用培养皿中,取对数生长期的大鼠 BMSCs,经胰酶消化后轻轻吹打成单细胞悬液,计数后接种于各支架材料中,接种密度为 1×10^4 个细胞/ cm^2 。培养 36 h 后,移除培养皿中的培养基,加入 4%甲醛固定细胞 30 min,然后用 PBS 清洗 2~3 次。黏附细胞的形态观察使用异硫氰酸荧光素标记的鬼笔环肽(FITC labeled phalloidin, FITC)对细胞骨架的 F-肌动蛋白纤维进行染色,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料对细胞核染色。

1.3.2.2 细胞增殖实验和毒性分析 细胞增殖和毒性分析试剂(cell counting Kit-8, CCK-8)中的物质可被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓞染料,生成的甲瓞物数量与活细胞数量成正比,因此,可利用此特性进行细胞增殖和毒性分析。将大鼠 BMSCs 分别植入 96 孔板及 3 组复合支架材料中,在 37 ℃含 5% CO_2 培养箱中进行培养。将 96 孔板中的细胞作为对照组,隔天更换 1 次培养液。培养 1 d、4 d 和 7 d 后,加入含 CCK-8 的培养基,在 37 ℃恒温摇箱中孵育 1 h 后,为避免支架材料的干扰,将实验各组中的液体移至空白 96 孔板中,在 490 nm 处测定其溶液光密度值。细胞活性通过对照组在 490 nm 处光密度值进行均一化处理得到。

1.3.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测 ALP 是在成骨细胞分化早期出现的标志物,其活性水平可以代表成骨细胞的分化活性程度和水平,因此,ALP 活性检测是体外评价细胞早期成骨分化的常用指标之一^[13]。本实验以检测 ALP 活性来考察不同复合支架材料诱导细胞成骨分化的能力。将大鼠 BMSCs 接种到 3 组支架材料中,接种密度为 1×10^4 个细胞/ cm^2 ,培养液隔天更换 1 次,培养 3 d、7 d 后,进行 ALP 活性测定,ALP 活性结果由 405 nm 处光密度值与相应总蛋白含量的比值来表示。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7.0 统计分析软件进行处理。所得到的数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多样本均数比较采用析因设计双因素方差分析,其两两比较采用 Tukey 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PLGA 多孔微球及 PLGA-HAP 复合支架材料的形貌

图 1 是 PLGA 多孔微球及 PLGA-HAP 复合支架材料的形貌。图 1A 是单纯的 PLGA 多孔微球,其上有直径 3~20 μm 不等的孔状结构,这些孔状结构内外之间连通,图 1B 则是图 1A 中黄色方框放大的图,上下 2 个箭头显示了微球内、外孔之间良好的连通结构,图 1C、D 显示 SEM 观察的支架表面形貌,复合支架是由直径 90~200 μm 的 PLGA 多孔微球形成,经体外矿化形成的无机 HAP 沉积在支架表面及结构中,最终形成两者的有机复合体。

图 2 是细胞在各组支架上的黏附及长入情况,大鼠 BMSCs 种植于 3 种不同浓度的支架材料,采用 FITC 和 DAPI 分别对细胞骨架和细胞核进行荧光标记,并用共聚焦显微镜观察细胞的生长情况。图 2A、C、E 分别代表细胞在 3 组支架上的平面生长,图 2B、D、F 分别代表细胞在 3 组支架上的立体生长。与矿化的复合支架相比较,未经矿化的支架材料上细胞生长的数量相对较少、密度相对较低,往支架内部的生长潜力也不及经仿生矿化后的复合支架材料。

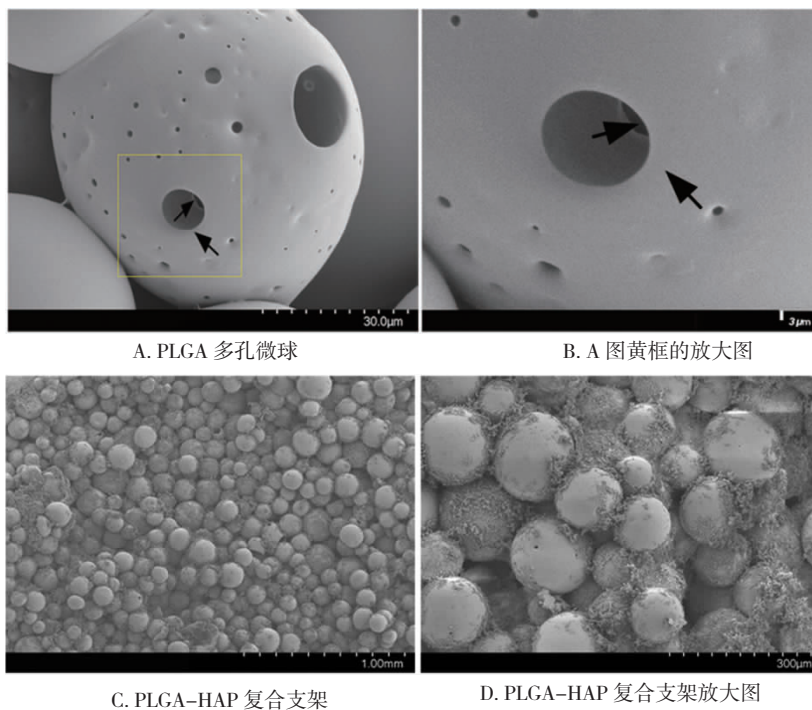


图 1 PLGA 多孔微球及 PLGA-HAP 复合支架扫描电镜图

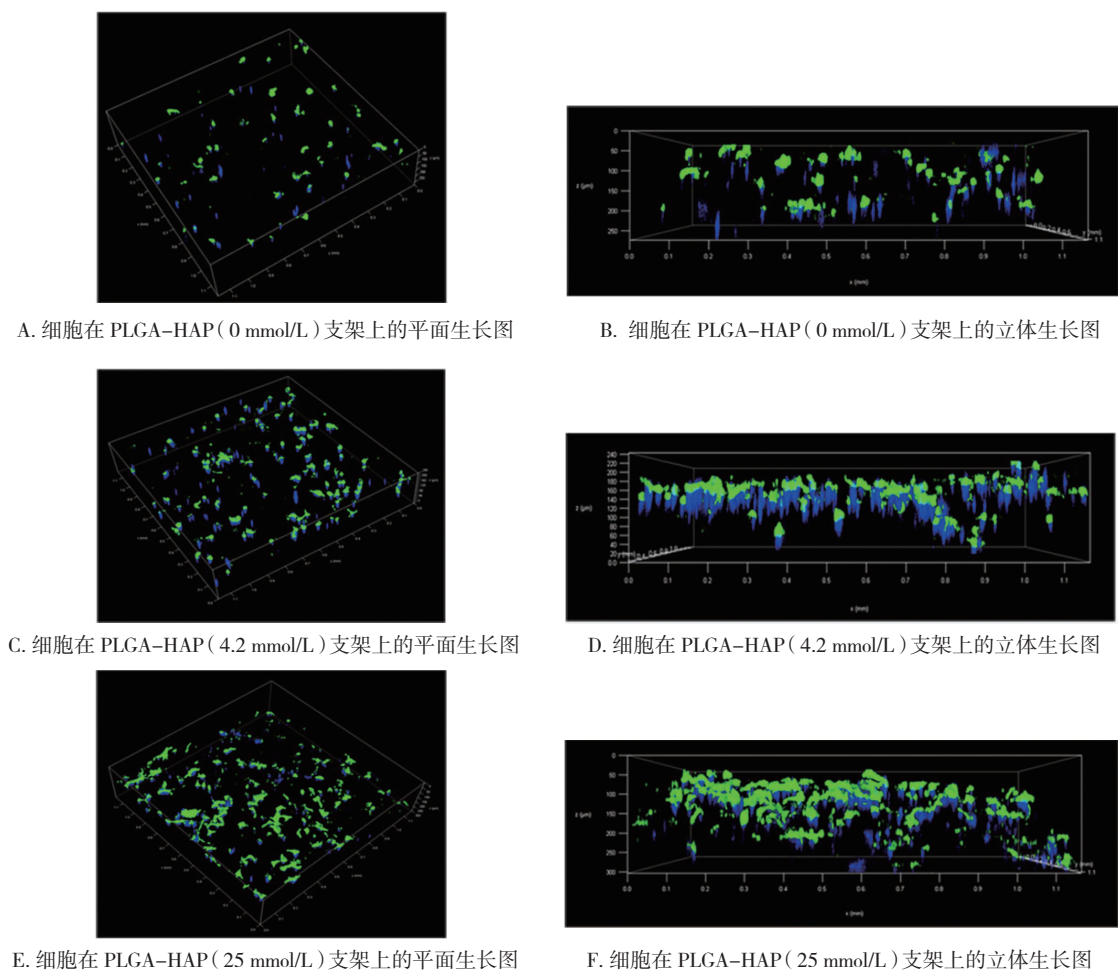


图 2 细胞在 3 组复合支架材料上的平面及立体生长图

图 3 是 BMSCs 在复合支架材料上生长黏附的情况。由 FITC 和 DAPI 分别对细胞骨架和细胞核进行荧光标记,并用共聚焦显微镜观察细胞的形态。图中可见细胞在支架上形态饱满并且伸展充分,伸出较多的伪足附着,说明支架材料对细胞的黏附和铺展有利。

2.2 细胞增殖实验和毒性分析

通过 CCK-8 实验检测了不同生物支架材料组与对照组培养孔板对细胞增殖的影响,分别于培养后 1 d、4 d、7 d 进行数据收集。从表 1 数据可知,细胞在各组支架材料上均有较好的生长,但在 7 d 的 PLGA-HAP(25 mmol/L)光密度值最高。在实验之初的 1 d,实验支架各组的细胞均相对较少,对照组光密度值相对略高,但随着时间的推移,对照孔板组大鼠 BMSCs 细胞的相对增殖率逐渐趋缓,各实验支架材料组则能够明显促进细胞的增殖与生长,且随着相对时间的增加与矿化程度的增高,细胞增殖越多,其中相对时间的增加具有更积极的意义。CCK-8 实验说明本研究中的复合支架材料具有良好的细胞相容性,能够有效地促进大鼠 BMSCs 细胞的黏附、铺展与增殖。

表 2 是各组复合支架材料的 ALP 活性检测结果。7 d 的 PLGA-HAP(25 mmol/L)ALP 活性值最高。3 d 时,各组支架材料之间无明显的 ALP 活性差异,但在 7 d 时,经矿化的 2 组复合支架材料均表现出明显的 ALP 活性增高,而未经矿化的支架材料 PLGA-HAP(0 mmol/L)仅表现出缓慢的增高,且数值明显低于 PLGA-HAP(4.2 mmol/L)及 PLGA-HAP(25 mmol/L)。在本实验中,随着时间的推移和复合支架材料中矿化程度的增加均对细胞的促成骨活性有积极作用,但在其中,相对时间的增加具有更加积极的意义。ALP 活性检测实验说明经矿化的复合支架材料具有潜在的促成骨活性,且成骨活性与矿化的程度成正比。

3 讨论

本研究构成的 PLGA-HAP 复合支架材料中,PLGA 微球上的多孔结构及支架上微球与微球之间的孔隙结构均有利于细胞在整个支架中进行有效的迁移和增殖,便于物质、细胞的传递与代谢^[1]。PLGA

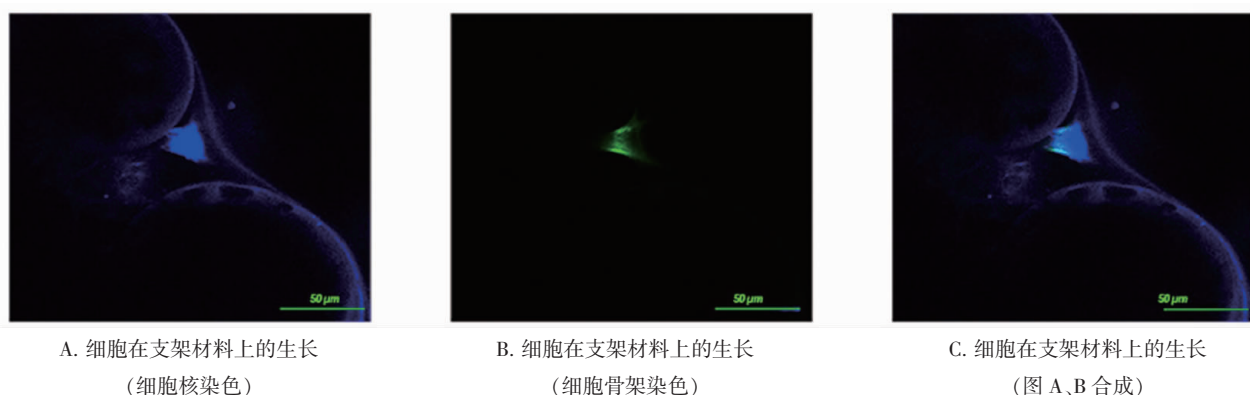


图 3 细胞在 PLGA-HAP(0 mmol/L) 支架材料上的黏附生长

表 1 CCK-8 检测细胞在对照组及实验支架各组上的增殖 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	4 d	7 d
对照组	0.361 ± 0.009	0.408 ± 0.005	0.430 ± 0.006
PLGA-HAP(0 mmol/L)组	0.203 ± 0.003	0.477 ± 0.006	0.606 ± 0.007
PLGA-HAP(4.2 mmol/L)组	0.262 ± 0.006	0.527 ± 0.005	0.635 ± 0.003
PLGA-HAP(25 mmol/L)组	0.270 ± 0.002	0.575 ± 0.004	0.667 ± 0.005
F 值	时间:10 632.000	HAP 浓度:678.000	交互因素:732.600
P 值	0.000	0.000	0.000

表 2 ALP 活性检测各组支架材料对细胞的促成骨分化活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	
PLGA-HAP(0 mmol/L)组	0.088 ± 0.015	0.146 ± 0.004	
PLGA-HAP(4.2 mmol/L)组	0.122 ± 0.016	0.469 ± 0.024	
PLGA-HAP(25 mmol/L)组	0.125 ± 0.008	0.573 ± 0.013	
<i>F</i> 值	时间:1 653.000	HAP浓度:400.900	交互因素:280.500
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

作为一种可生物降解的高分子材料,属于聚酯类化合物,表面疏水性强,降解产物可以造成周围酸性环境增高,从而影响组织细胞的生长、分化及功能发挥等^[14]。HAP 在 PLGA 微球上的沉积可以中和 PLGA 降解过程中形成的酸性环境,有助于改善材料的生物学性能,同时,HAP 有骨诱导性、骨传导性,可以增加材料与骨组织结合的能力^[6]。

从 3 组复合支架材料细胞生长的对比可以看到,细胞的生长及细胞向支架内部生长的潜力与矿化程度成正比,说明经仿生矿化的支架材料能明显提高细胞亲和性,原因可能与 HAP 能吸附培养液中的蛋白成分再次形成有机-无机界面相关,同时 HAP 的形成也增加了材料表面的粗糙度,增大了细胞可附着面积,这些都使得复合材料的生物活性增加,细胞黏附和增殖能力增强。另外,HAP 矿化成分在溶液中呈碱性,缓冲了 PLGA 降解形成的酸性环境,有利于细胞的黏附和增殖。

CCK-8 实验与 ALP 活性实验也表明,复合支架材料中矿化程度的增加对细胞的增殖、生长及成骨分化发挥着积极的作用,复合支架材料具有良好的细胞相容性,能够有效地促进大鼠 BMSCs 细胞的附着、铺展、增殖与成骨活性。

本研究经过体外仿生矿化将不同浓度的 HAP 沉积到 PLGA 多孔微球支架上,形成仿生天然骨微纳组织结构的有机-无机复合材料,说明体外仿生矿化是制备复合生物活性材料的一种有效方法。通过这种表面改性的方法能提高材料的细胞黏附、增殖性能,并促使细胞向功能化细胞转变。此研究为进一步研制具有生物活性的仿生人工骨奠定了实验依据和基础。

参 考 文 献

- [1] Yang Y, Song X, Li XJ, et al. Recent progress in biomimetic additive manufacturing technology: from materials to functional structures[J]. Adv Mater, 2018, 2018; e1706539.
- [2] Reznikov N, Bilton M, Lari L, et al. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale[J]. Science, 2018, 360(6388): 1-30.
- [3] Sheikh FA, Ju HW, Moon BM, et al. Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2016, 10(3): 209-221.
- [4] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect[J]. Biomaterials, 2019, 197: 207-219.
- [5] Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 3640-3659.
- [6] Li M, Xiong P, Yan F, et al. An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications[J]. Bioact Mater, 2018, 3(1): 1-18.
- [7] Ma L, Wang X, Zhao N, et al. Integrating 3D printing and biomimetic mineralization for personalized enhanced osteogenesis, angiogenesis, and osteointegration[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(49): 42146-42154.
- [8] Wan Y, Huang Y, Yuan C, et al. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications[J]. Mat Sci Eng C-Mater, 2007, 27(4): 855-864.
- [9] Liu J, Zhao L, Ni L, et al. The effect of synthetic α -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(9): 1588-1601.
- [10] Wu Y, Cao L, Xia L, et al. Evaluation of osteogenesis and angiogenesis of icariin in local controlled release and systemic delivery for calvarial defect in ovariectomized rats[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5077.
- [11] Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier[J]. Polymers(Basel), 2011, 3(3): 1377-1397.
- [12] Yu X, Khalil A, Dang PN, et al. Multilayered inorganic microparticles for tunable dual growth factor delivery[J]. Adv Funct Mater, 2014, 24(20): 3082-3093.
- [13] Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, et al. Mineralised collagen—an artificial, extracellular bone matrix — improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. J Mater Sci Mater Med, 2008, 19(1): 269-275.
- [14] Lu L, Peter SJ, Lyman MD, et al. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams[J]. Biomaterials, 2000, 21(18): 1837-1845.

(责任编辑:冉明会)