

文章编号:1004-7220(2018)03-0234-06

3D 打印 β -TCP 多孔复合支架的力学和生物学特性

杜朝, 姜浩, 曹怡, 杜子婧, 赵丹阳, 于贞成, 张素珊, 韩冬

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 整复外科, 上海 200011)

摘要:目的 研究3D打印 β 磷酸三钙 $[\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \beta\text{-TCP}]$ 多孔复合支架的力学和生物学特性,为进一步动物实验中复合支架的设计提供指导。**方法** 用新型可降解材料聚柠檬酸-1,8-辛二醇酯[poly(1,8-octanediol citrate), POC]为粘合剂,采用熔融成型(fused deposition modeling, FDM)技术实现 β -TCP支架的3D打印,并用多肽甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, GRGDS)对复合支架修饰,以改善复合支架的细胞黏附性。使用光学显微镜和扫描电镜观察复合支架的微观孔隙结构,使用材料试验机对复合支架进行压缩测试,并测量支架的水表面接触角;通过体外细胞实验检测支架的细胞黏附率和促细胞增殖能力;利用支架修复SD大鼠颅骨缺损模型,进一步研究其体内成骨能力。**结果** 多肽在复合支架上均匀分布且不失活;复合多肽后支架的微观孔隙结构发生改变,细胞黏附率提高,但支架压缩模量、水表面接触角和体内成骨能力等特性未受明显影响。**结论** 多肽修饰后的 β -TCP多孔复合支架细胞黏附能力明显改善,而力学、亲水性和体内成骨能力等未受明显影响。研究结果为临床骨缺损修复支架的构建提供新思路,也为该支架技术的进一步临床应用提供实验室依据。

关键词: 3D打印; 熔融成型; β 磷酸三钙; 多肽修饰

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.03.008

Mechanical Properties and Biological Characteristics of the Porous 3D-Printed β -TCP Composite Scaffolds

DU Chao, JIANG Hao, CAO Yi, DU Zijing, ZHAO Danyang, YU Zhencheng, ZHANG Sushan, HAN Dong

(Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To study the mechanical properties and biological characteristics of 3D-printed porous β -tricalcium phosphate $[\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2, \beta\text{-TCP}]$ scaffolds, so as to provide guidance for the design of composite scaffolds in animal experimentation. **Methods** Poly 1,8-octanediol citrate (POC), a kind of novel biodegradable materials, was used as the adhesive. The 3D-printed porous β -TCP scaffolds were fabricated by fused deposition modeling (FDM) technology, and Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS), a kind of polypeptides, was added into the scaffolds to improve the adhesive property of cells. The optical microscope and scanning electron microscope (SEM) were used to observe the micro-pore architectures of those scaffolds. The material testing machine was used to conduct compressive test on the scaffolds, and the water contact angles of the scaffolds were measured. The cell adhesion rate and proliferation rate of the scaffolds were also tested by *in vitro* cell experiment. The model of SD rat skull defects was repaired by the scaffolds, and the osteogenic ability *in vivo* was further studied.

收稿日期:2018-01-19; 修回日期:2018-03-19

基金项目:国家自然科学基金项目(81571944)

通信作者:韩冬,教授, E-mail:handong12000@163.com

Results The GRGDS, remaining active, was evenly distributed in the composite scaffolds. The micro-pore architectures of the polypeptide modified scaffolds changed, with improvement in cell adhesion rate, while the compressive modulus, water contact angle and osteogenic ability *in vivo* of the scaffolds were not obviously affected.

Conclusions The cell adhesion capacity of β -TCP composite scaffolds modified by polypeptide improved significantly, while the mechanical properties and hydrophilicity, osteogenic ability *in vivo* of the scaffolds were not affected very much. These research results provide new ideas for reconstruction of scaffolds for repairing bone defects in clinic, and a laboratory basis for further clinical application of this scaffold.

Key words: 3D printing; fused deposition modeling (FDM); β -tricalcium phosphate (β -TCP); polypeptide modification

β 磷酸三钙[β -Ca₃(PO₄)₂, β -TCP]因其优良的生物学特性,在骨缺损修复中被广泛应用。然而, β -TCP可塑性较差,临床上骨缺损往往不规则,如何实现 β -TCP的个性化定制成为研究热点。随着3D打印技术的发展,尤其是熔融沉积成型(fused deposition modeling, FDM)技术在支架制备中的广泛应用^[1-2],已经有多种材料被用做粘合剂,与 β -TCP复合后实现3D打印^[3-4]。FDM的原理是利用高温将材料融化成液态,类似喷墨打印,通过高压喷头挤出材料,在立体空间上排列形成立体实物。

聚柠檬酸-1,8-辛二醇酯[poly(1,8-octanediol citrate), POC]是近年来被合成的生物可降解材料,它是一种具有优良生物相容性的热固性弹性体,合成过程简单无毒^[5-6]。POC的预聚物与 β -TCP复合后,能够实现 β -TCP的个性化定制,同时能够改善 β -TCP的机械性能,支架孔隙率、降解速率等指标也能根据需要进行调整。但是复合POC后的 β -TCP表面粗糙度明显降低,导致支架的细胞黏附性急剧下降,不利于骨缺损的快速修复^[7]。此时需要对支架表面进行修饰,例如:细胞外基质覆盖^[8]、激光表面蚀刻^[9]、离子束辐射^[10]、等离子体表面改性^[11]、化学修饰^[12]、多肽修饰^[13]。物理方法只是改善支架表面孔隙结构,随着支架降解,促进细胞黏附的作用将急剧下降;化学修饰复杂且细胞毒性较大;细胞外基质和蛋白修饰因免疫排斥反应,实用性较差,故目前应用较为广泛的修饰方法主要是多肽修饰。内源性短肽甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, GRGDS)是一种常用的修饰多肽。GRGDS是各种基质蛋白中最常见的结构单元,也是广泛存在的细胞间识别系统的基本单位。GRGDS通过形成一个 β 转角从而形成一个亲水环,

因而能够与其他细胞发生黏连^[14]。

本文利用FDM技术,设计 β -TCP/POC/GRGDS和 β -TCP/POC两种复合支架;利用扫描电镜和光学显微镜观察复合支架的微观孔隙结构,并通过压缩测试对比其力学性能;利用CCK-8法测定支架细胞黏附率和细胞在支架上的增殖情况;通过进一步的动物实验,修复SD大鼠颅骨缺损模型,观察复合支架的体内修复效果,探讨支架的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验动物 健康1周SD大鼠(雄性)10只,2月龄SD大鼠(雄性)24只,由上海交通大学医学院附属第九人民医院中心实验室提供。

1.1.2 材料和设备 β -TCP支架(上海贝奥路生物材料有限公司); β -TCP粉末(颗粒度10 μ m)、POC(华东理工大学材料科学与工程学院提供);纯度>95%异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的GRGDS活性短肽(上海波泰生物科技有限公司);DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(HyClone公司,美国);光学显微镜(Olympus公司,日本);扫描电镜(Quanta公司,美国);3D打印机(华东理工大学材料科学与工程学院提供);万能材料试验机INSTRON 5943(INSTRON公司,美国)。

1.2 多孔支架建模

利用三维计算机辅助设计(computer aided-design, CAD)软件设计支架的三维图像。支架设计为厚约2 mm、直径8 mm的薄片,孔径0.5 mm,孔隙率约50%,孔隙连通率100%,每层纤维成90°交叉。

合成POC的预聚体,将POC预聚体采用去离子水洗涤、纯化、冻干。取纯化后的POC预聚体溶

解于相应体积的无水乙醇中,搅拌,形成一定浓度的 POC/乙醇均一溶液。制成的 POC 预聚体溶液与 β -TCP 粉末通过溶液共混的方式混匀 (POC 35wt%), 磁力搅拌, 制成可用于打印的膏状物 (实验组以直接共混的方式在混合物中加入 3wt% GRGDS-FITC, 搅拌均匀)。将设计完成的图像使用 CAD 软件转换成 STL 格式并输入 3D 打印机。调整 3D 打印机相关属性参数进行 FDM 打印。打印好的支架在 80 °C 下使 POC 预聚体交联固化 3 d, 可以酌情调节聚合温度与时间的关系, 温度越低, 所需交联时间越长。

1.3 支架力学特性测试

支架纵向压缩模量可以反映支架强度和机械性能, 利用压缩试验机测量两种支架在纵向的压缩模量以反映支架力学特性, 检测 GRGDS 对复合支架力学特性的影响。分别制备 β -TCP/POC、 β -TCP/POC/GRGDS 两种复合支架, 规格均为 10 mm × 10 mm × 4 mm。采用万能材料试验机测定材料的压缩性能, 载荷施加速度为 1 mm/min, 仪器可生成压缩模量结果。每组支架设置 3 个平行样本。

1.4 支架亲水性检测

材料亲水性是影响蛋白吸附和细胞黏附的重要因素, 由柠檬酸和 1,8-辛二醇缩聚合成的 POC 表面存在大量亲水基团——羟基和羧基, 测量两种支架表面水接触角, 以研究加入 GRGDS 后支架亲水性的变化。利用接触角测定仪测定复合支架表面的静态接触角。

1.5 支架生物学特性研究

1.5.1 支架微观孔隙结构观察 使用倒置荧光显微镜观察 3D 打印的 β -TCP/POC/GRGDS 复合支架中, FITC 标记的多肽在支架上的分布情况。扫描电镜观察两种支架表面微观孔隙结构。取 1 周龄 SD 大鼠全骨髓培养, 分离贴壁的骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。在 24 孔板中分别放 β -TCP/POC 和 β -TCP/POC/GRGDS 两种支架各 4 个, 分别加完全培养基 [含 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)] 的 DMEM 培养基) 2 mL, 37 °C、5% CO₂ 培养箱浸泡 48 h 后吸除培养基备用。10 cm 培养皿培养 P₂ 代 BMSCs 3 d (待细胞 80% ~ 90% 融合时), 胰酶消化 2 min 制成细胞悬液, 稀释 10 倍后细胞计数。每个

支架滴 100 μ L 细胞悬液 (细胞数约 10⁵ 个), 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 3 h, 缓慢加入全培养基 2 mL, 孵育 24 h 后电镜固定液 (2.5% 戊二醛) 固定 48 h, 干燥, 喷金, 扫描电镜观察支架表面细胞黏附和微观孔隙结构。

1.5.2 支架细胞黏附率测定 在 24 孔板中分别放 β -TCP、 β -TCP/POC 和 β -TCP/POC/GRGDS 两种支架各 3 个, 分别加全培养基 2 mL, 37 °C、5% CO₂ 培养箱浸泡 48 h 后吸除培养基备用。10 cm 培养皿培养 P₂ 代 BMSCs 3 d, 胰酶消化 2 min 制成细胞悬液, 稀释 10 倍后细胞计数。每个支架滴 100 μ L 细胞悬液 (细胞数约 10⁵ 个), 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 3 h, 加 2 mL 全培养基 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。分别在 4、8、12 h 移除每组支架, PBS 溶液轻轻冲洗 3 遍, 加入 450 μ L 全培养基和 50 μ L CCK-8, 测量其在 450 nm 波长处的吸光度。同样方法测出相应时间点的总吸光度, 其比值即为在相应时间点 BMSCs 在支架上的黏附率。

1.5.3 支架细胞增殖实验 支架对细胞增殖的影响是支架重要的生物学特性, 利用 CCK-8 法测定 SD 大鼠 BMSCs 与支架共培养 0、1、3、5 d 后的 OD 值, 来反映细胞在支架上的增殖情况。

1.5.4 支架体内成骨能力研究 将 24 只 2 月龄 SD 大鼠分成 a、b、c 3 组。制作 SD 大鼠颅骨缺损模型, 常规消毒铺巾, 沿颅骨矢状缝逐层分离皮肤及骨膜, 用牙科钻头在颅骨表面造直径为 5 mm 的缺损, a 组作为空白对照, 直接缝合骨膜; b 组使用 β -TCP/POC 支架修复缺损 (支架进行简单的修边处理以适应缺损大小, 下同); c 组使用 β -TCP/POC/GRGDS 支架修复缺损。12 周后以过量麻醉法处死大鼠, 取材颅骨, 多聚甲醛固定 48 h, μ CT 扫描后脱钙, 切片后进行 HE 染色, 显微镜下观察, 以对比两种支架的成骨情况。

1.5 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 所测数据比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多孔支架力学特性和亲水性的测试

β -TCP/POC/GRGDS 支架、 β -TCP/POC 支架压缩模量分别为 (70.07 \pm 2.54)、(72.07 \pm 4.63) MPa。

β -TCP/POC/GRGDS 支架、 β -TCP/POC 支架的表面接触角分别为 $72^\circ \pm 6^\circ$ 、 $70^\circ \pm 8^\circ$ 。

两种支架的压缩模量和表面接触角无明显差异 ($P < 0.05$)。复合多肽 GRGDS 后,支架的机械强度和亲水性未受明显影响。

2.2 支架表面微观孔隙结构和生物学特性

两种支架在扫描电镜下微观孔隙结构的差异显示, β -TCP/POC/GRGDS 支架由于加入多肽,导致支架脆性增大,表面更毛糙,表面的颗粒大而不均一,而 β -TCP/POC 支架表面颗粒细而均匀[见图 1(b)、(e)]。

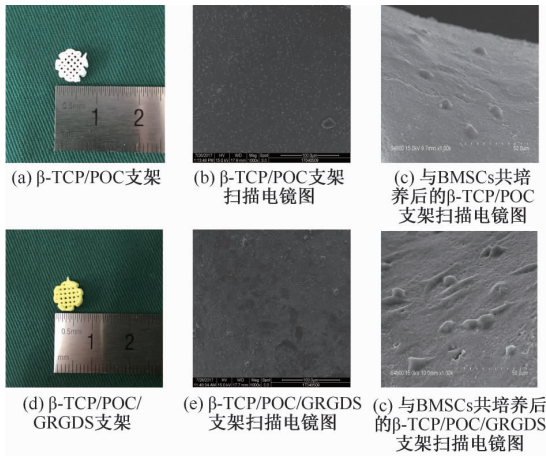


图 1 3D 打印多孔支架

Fig. 1 3D-printed porous scaffold (a) β -TCP/POC scaffold, (b) SEM images for β -TCP/POC scaffolds, (c) SEM images for β -TCP/POC scaffolds cultured with BMSCs, (d) β -TCP/POC/GRGDS scaffold, (e) SEM images for β -TCP/POC/GRGDS scaffolds, (f) SEM images for β -TCP/POC/GRGDS scaffolds cultured with BMSCs

FITC 标记的短肽 GRGDS 在 β -TCP/POC/GRGDS 支架上呈现强阳性均一分布,说明多肽活性良好,在支架中分布均匀(见图 2)。

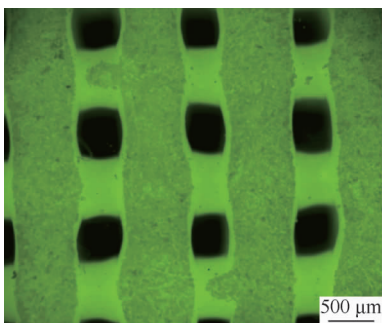


图 2 β -TCP/POC/GRGDS 支架荧光图

Fig. 2 Fluorescence picture of β -TCP/POC/GRGDS scaffolds

两组支架与细胞共培养后,可见 β -TCP/POC/GRGDS 支架表面黏附细胞密度略高,支架表面被大量细胞外基质覆盖,可见到大量隆起卵圆形的细胞核,而 β -TCP/POC 支架表面细胞较稀疏,细胞外基质尚不能完全覆盖支架表面[见图 1(e)、(f)]。

利用 CCK-8 法计算支架上活细胞数量,从而定量支架上细胞的黏附率,反映支架对细胞的亲和力。结果表明, β -TCP/POC/GRGDS 支架表面细胞黏附率明显高于 β -TCP/POC 支架 ($P < 0.05$),与常用的 β -TCP 多孔支架黏附率相比无明显差异,均达 60% 以上[见图 3(a)]。CCK-8 法测相应时间点的 OD 值反映支架对细胞增殖的影响,显示出 β -TCP 生物学特性的优势 [$P < 0.05$, 见图 3(b)]。

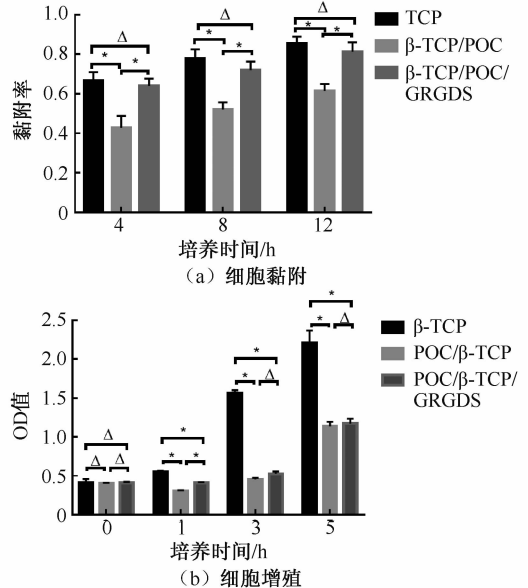
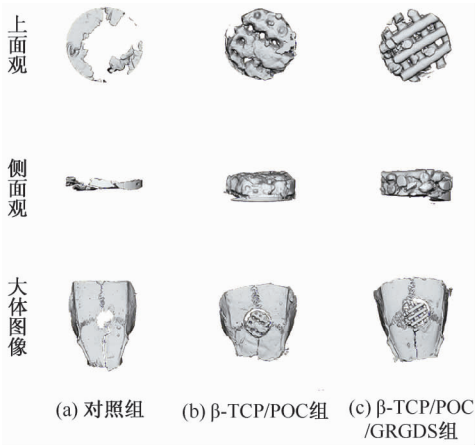
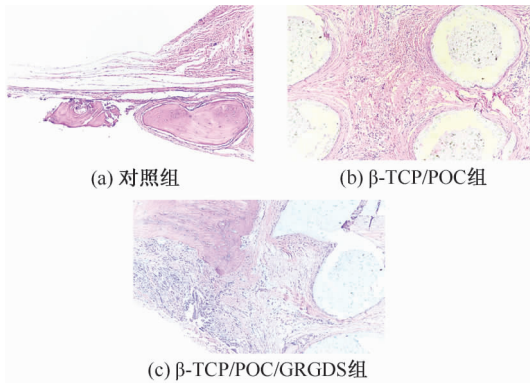


图 3 不同支架生物学特性对比 (* $P < 0.05$, $\Delta P > 0.05$)

Fig. 3 Comparison of biological characteristics for different scaffolds (a) Cell adhesion, (b) Cell proliferation

支架植入 12 周后取材,行 μ CT 扫描(见图 4),同时半定量分析骨量占缺损体积百分比(BV/TV)。对照组、 β -TCP/POC/GRGDS 组、 β -TCP/POC 组的 BV/TV 分别为 $(13.2 \pm 1.7)\%$ 、 $(45.5 \pm 2.0)\%$ 、 $(40.5 \pm 1.1)\%$ 。结果表明, β -TCP/POC/GRGDS 组 BV/TV 比 β -TCP/POC 组略低($P < 0.05$)。

从样本的 HE 染色结果可知,对照组只有一层纤维缔结组织覆盖缺损部位,而植入支架组有明显的骨组织和血管内皮形成(见图 5)。

图4 样本 μ CT图像Fig. 4 Micro-CT images of the specimens (a) Control group, (b) β -TCP/POC group, (c) β -TCP/POC/GRGDS group图5 12周取材样本的HE染色(100 \times)Fig. 5 HE images of the specimens after 12 weeks (a) Control group, (b) β -TCP/POC group, (c) β -TCP/POC/GRGDS group

3 讨论

骨缺损修复是临床上常见而棘手的问题。因为自体骨来源局限,往往不能满足修复需要,而且骨缺损的形态往往复杂多样,需要个性化设计。 β -TCP在骨传导和骨诱导性方面具有良好的生物学特性,是经典的骨缺损修复材料^[15-16],很有希望进入临床大面积应用。但是, β -TCP的机械强度和降解速率不易调整、易碎而难成型,这些特性也限制了其在临床上的应用^[7]。

随着对3D打印技术在支架制造中的应用和新材料的研究, β -TCP的个性化定制已经成为现实^[3-4,7]。POC是新型有机可降解材料,本身无毒,

降解产物可被细胞代谢利用^[7],合成简便,价格便宜,所需打印温度不高,是实现 β -TCP个性化定制的理想复合材料。但是复合POC后, β -TCP的表面粗糙度下降,导致细胞不易黏附^[7]。本研究通过分析,选用多肽修饰的方法提高支架的细胞黏附性。其中,GRGDS是研究较多的多肽,容易合成,价格便宜,性质稳定,不易失活,促进细胞黏附的特性稳定可靠,是理想的改善支架细胞黏附性的材料。本研究利用3D打印的FDM技术,将新型有机可降解材料POC作为粘合剂,复合促细胞黏附多肽GRGDS,制造出 β -TCP个性化定制的新型复合支架。通过扫描电镜观察比较加入多肽前后支架微观结构的变化,测定支架实际孔隙率、表面接触角和压缩模量,探讨多肽对复合支架力学性能的影响;利用细胞黏附率和细胞增殖的对比,反映支架在体外生物学特性的变化;最后,通过进一步的动物实验研究支架在体内的成骨能力,比较其生物学特性。

为了检测GRGDS在支架制作过程中是否失活,或者分布不均一,或者丢失过多,本研究在GRGDS末端标记细胞学研究常用的荧光物质FITC。荧光显微镜下可观察到多肽分布均匀而丰富(见图3),由于GRGDS比FITC稳定,这也间接反映了多肽活性^[17]。制作完成的支架,加入多肽组由于荧光物质的作用,为黄色,而对照组为白色[见图1(a)、(d)]。在扫描电镜下观察可见,实验组支架表面明显较对照组粗糙,颗粒大小不均一,这种形态更利于细胞的黏附[见图1(b)、(e)]。两种支架表面接触角和压缩模量比较结果说明,多肽的复合并不会对支架力学特性造成明显的影响。细胞黏附率的定量测定反映了多肽对复合支架的细胞黏附率有很大的改善[见图3(a)],细胞共培养后的电镜扫描图片也间接反映了这一结果[见图1(c)、(f)]。但是多肽促进细胞黏附的机制主要是因为信号转导还是因为改善了支架表面微观孔隙结构,并不明确,有待进一步研究。支架的体外细胞增殖实验结果表明, β -TCP显示了强大的促进细胞增殖能力,复合GRGDS并没有显示出在促进细胞增殖方面的优势[见图3(b)]。随后的动物实验中,在支架植入后12周的 μ CT图像上可以看出,复合多肽后支架的成骨能力并不比原来有多大改善(见图4),BV/TV的半定量结果证实了这一结果。通过对样本染色后在显微镜下观察可以发现,复合多肽对

于支架的体内成骨能力没有提升。这可能是由于 GRGDS 只是促进了细胞黏附,并不能很好促进细胞增殖。在动物实验的实施过程中,支架并没有事先与 BMSCs 共培养,故最终体内成骨的效果并不能体现多肽在促进细胞黏附上的优势。

综上所述,3D 打印 β -TCP/POC/GRGDS 多孔复合支架与 β -TCP/POC 支架相比,微观孔隙结构更利于细胞黏附,多肽 GRGDS 的复合并不会对支架强度造成较大影响,FDM 技术复合的 GRGDS 保持了活性,并且明显改善 β -TCP/POC 支架的细胞黏附性。然而,复合多肽后的支架细胞黏附性只是接近 β -TCP 的某些生物学特性,还有一定差距,其骨传导、骨诱导能力有待后续研究,GRGDS 促黏附作用的相关机制也有待更深入的研究。在细胞增殖和体内成骨方面,复合多肽后,支架的上述生物学特性提升不多,具体原因值得进一步研究。随着生物打印技术的发展、新材料的应用、低温 FDM 技术的实现,能够实现支架、药物或者生长因子和种子细胞同步 3D 打印的新型支架必将成为最为理想的支架修复材料。

参考文献:

- [1] 冯辰栋,夏宇,李祥,等. 3D 打印多孔钛支架微观孔隙结构和力学性能[J]. 医用生物力学, 2017, 32(3): 256-260.
FENG CD, XIA Y, LI X, et al. Micro-pore structure and mechanical properties of porous titanium scaffold using 3D print technology [J]. J Med Biomech, 2017, 32(3): 256-260.
- [2] 李宁,杨涵,黄秋悦,等. 3D 打印钛合金个性化骨盆假体静态和步态有限元分析[J]. 医用生物力学, 2017, 32(6): 487-493.
LI N, YANG H, HUANG QY, et al. Static and gait finite element analysis on individualized titanium alloy pelvic prosthesis manufactured by 3D printing [J]. J Med Biomech, 2017, 32(6): 487-493.
- [3] DIOGO GS, GASPARD VM, SERRA IR, et al. Manufacture of beta-TCP/alginate scaffolds through a Fab@home model for application in bone tissue engineering [J]. Biofabrication, 2014, 6(2): 025001.
- [4] KONOPNICKI S, SHARAF B, RESNICK C, et al. Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed beta-tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: An *in vivo* pilot study in a porcine mandible model [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2015, 73(5): 1016. e1-1016. e11.
- [5] SHIRAZI FS, MOGHADDAM E, MEHRALI M, et al. *In vitro* characterization and mechanical properties of beta-calcium silicate/POC composite as a bone fixation device [J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(11): 3973-3985.
- [6] ZHANG Y, FANG S, DAI J, et al. Experimental study of ASCs combined with POC-PLA patch for the reconstruction of full-thickness chest wall defects [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182971.
- [7] GAO L, LI C, CHEN F, et al. Fabrication and characterization of toughness-enhanced scaffolds comprising beta-TCP/POC using the freeform fabrication system with microdroplet jetting [J]. Biomed Mater, 2015, 10(3): 035009.
- [8] PATI F, SONG TH, RIJAL G, et al. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2015, 37: 230-241.
- [9] TIAW KS, GOH SW, HONG M, et al. Laser surface modification of poly(epsilon-caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications [J]. Biomaterials, 2005, 26(7): 763-769.
- [10] PIGNATARO B, CONTE E, SCANDURRA A, et al. Improved cell adhesion to ion beam-irradiated polymer surfaces [J]. Biomaterials, 1997, 18(22): 1461-1470.
- [11] MASTANAIAH N, JOHNSON JA, ROY S. Effect of dielectric and liquid on plasma sterilization using dielectric barrier discharge plasma [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70840.
- [12] CHENG Z, TEOH SH. Surface modification of ultra-thin poly(epsilon-caprolactone) films using acrylic acid and collagen [J]. Biomaterials, 2004, 25(11): 1991-2001.
- [13] QUIRK RA, CHAN WC, DAVIES MC, et al. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid) [J]. Biomaterials, 2001, 22(8): 865-872.
- [14] TAO C, HUANG J, LU Y, et al. Development and characterization of GRGDSPC-modified poly(lactide-co-glycolide acid) porous microspheres incorporated with protein-loaded chitosan microspheres for bone tissue engineering [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 122: 439-446.
- [15] DU F, WU H, LI H, et al. Bone marrow mononuclear cells combined with beta-tricalcium phosphate granules for alveolar cleft repair: A 12-month clinical study [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13773.
- [16] SAKATA M, TONOMURA H, ITSUJI T, et al. Bone regeneration of osteoporotic vertebral body defects using PRP and gelatin beta-TCP sponges [J]. Tissue Eng Part A, 2017, doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0358.
- [17] BILEM I, CHEVALLIER P, PLAWINSKI L, et al. RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells [J]. Acta Biomater, 2016, 36: 132-142.