体积较大的多孔聚酯支架中的骨髓基质干细胞的分布

王桢, 张正, 张俊川, 余振琬, 丁建东*

聚合物分子工程教育部重点实验室, 复旦大学高分子科学系, 上海 200433;

复旦大学上海医学院解剖与组织胚胎学系, 上海 200032

* 联系人, E-mail: jdding1@fudan.edu.cn

2008-11-30 收稿, 2009-01-18 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2009CB930000)和国家自然科学基金(批准号: 20774020)资助项目

摘要 考察了在圆柱状聚乙交酯-丙交酯(PLGA)多孔支架上接种细胞时, 如何通过将细胞悬液接种在支架的合适深度来快速实现细胞在支架中的均匀分布. 支架利用常温模压-粒子滤出的方法制备, 致孔剂为球形石蜡粒子, 支架的高度和直径均为 10 mm. 通过体外唑溴盐染色和定量测定支架不同层面上细胞数量的方法, 考察了细胞在支架上的分布情况. 发现当细胞被接种在支架的中上部时, 细胞在支架上培养一定的时间之后可以在整个支架中基本实现均匀分布, 而其他的接种部位则难以达到细胞的均匀分布. 同时证实, 骨髓基质干细胞在球形孔 PLGA 支架上经成骨诱导后也可以分化为成骨细胞.

关键词

生物材料
医用高分子
组织工程支架
可降解聚酯
细胞接种位置

多孔支架在组织工程^[1~7]和组织诱导^[8]中具有十分重要的地位. 理想的组织工程支架要求较高的孔隙率和良好的孔连通性, 以确保良好的物质传输、细胞迁移和细胞间液的流动^[3,9~11]. 由于拥有良好的生物相容性、可调控的降解速率和良好的加工性能, 聚乙交酯-丙交酯(PLGA)成为一种被广泛应用的可降解生物医用材料, 且已有深入研究^[12~20]. 在本课题组先前的工作中, 我们曾经利用球形石蜡粒子作为致孔剂^[21,22]制作了一种具有高孔隙率的 PLGA 支架^[10,23,24]. 这种制作工艺的优点在于对 PLGA/石蜡粒子复合物施加一定的压力能够使得石蜡粒子产生轻微的形变, 可以良好地控制孔的连通性.

在组织构建中的一个重要的问题就是在体外如何将细胞均匀地接种到大尺寸的多孔支架上. 在本文中, 我们采用了两种手段表征细胞在支架中的分布: 对接种细胞后的支架整体用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)染色的方法以及将接种细胞后的支架切片、然后分层统计细胞数量的方法. 为了找到体外细胞接种的最佳位置, 我们设计了如

图 1 所示的实验方案. 将细胞悬液滴加在支架的表面或注射到支架内部的方法是比较常见的接种方式^[12,25,26]. 本文的目的是为了找到骨髓基质干细胞(BMSCs)在大尺寸多孔支架中均匀分布的最佳接种位置. BMSCs 在组织修复中已经得到了大量的研究和应用^[27~30]. 本文中我们还将验证 BMSCs 在这种球形孔的 PLGA 支架中的成骨细胞分化能力.

1 材料和方法

() 支架的制备. 丙交酯和乙交酯摩尔比为 85:15 的聚乙交酯丙交酯(PLGA85/15)购自 Purac 公司(荷兰). 以四氢呋喃为流动相, 通过凝胶色谱仪(GPC, Agilent 1100, Agilent 公司, 美国)测定其数均分子量为 3.59×10^5 , 多分散指数为 1.72. 球形石蜡致孔剂通过乳液固化的方法得到^[22], 石蜡微球用标准筛筛分, 收集粒径分布在 355~450 μm 的组分作为致孔剂. 采用室温模压和粒子脱除技术, 以 90% (质量比)致孔剂含量制备球形孔结构的 PLGA 多孔支架^[21]. PLGA 溶解在二氯甲烷中, 加入石蜡微球, 搅

引用格式: 王桢, 张正, 张俊川, 等. 体积较大的多孔聚酯支架中的骨髓基质干细胞的分布. 科学通报, 2009, 54(9): 1207~1213

Wang Z, Zhang Z, Zhang J C, et al. Distribution of bone marrow stem cells in large porous polyester scaffolds. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0181-8

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2009-54-9-1207>

图 1 细胞在大尺寸多孔支架上的接种方式和分层示意图

骨髓基质干细胞接种在高度 10 mm 支架的上表面(0 mm)及距表面 1, 3 和 5 mm 处的部位(a); 培养一定时间后支架被均匀地分成 5 层(b), 然后测定各层的细胞数量

拌均匀成浆糊状混合物。将混合物填入模具中压紧, 放在常温下过夜。将样品从模具中取出, 在通风橱和真空烘箱中各放置 24 h, 去掉样品中残留的溶剂二氯甲烷。样品放入脂肪提取器中, 用正戊烷作为溶剂, 抽提 24 h 将石蜡粒子溶出。取出 PLGA 多孔支架, 放在干燥器内备用。

() 大鼠骨髓基质干细胞的分离。骨髓取自 10 天内新生 Sprague Dwley (SD) 大鼠的股骨和胫骨的骨髓腔。颈椎脱臼处死大鼠后, 将其在 70% 的乙醇溶液中放置 10 min, 为大鼠的皮肤消毒。然后将大鼠的股骨和胫骨剪下, 将软组织清除干净。用含有青链霉素的 DMEM 培养基冲洗并浸泡, 以避免细菌污染。将股骨和胫骨的干骺端去掉, 暴露骨髓腔。用含有双抗的 DMEM 培养基冲洗骨髓腔, 收集含有骨髓组织的培养基至离心管中, 以 800 r/min 的速度离心 10 min。用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬离心所得到的细胞团, 按每两只大鼠得到的细胞接种一个培养瓶的密度接种至 25 cm² 的培养瓶。放置在 37 的 CO₂ 培养箱中静置培养。4 d 后, 用 PBS 溶液轻轻冲洗培养瓶的底部, 去掉不黏附的细胞, 然后加入新鲜的 DMEM 培养液。每周两次更换培养液。大约经过 10 天的培养, 细胞基本铺满瓶底。用胰酶和乙二胺四甲基(Trysin-EDTA)溶液消化细胞并传代, 密度是传代前的 1/3。

() 骨髓基质干细胞支架接种及培养。第二代的骨髓基质干细胞用来进行支架的接种及培养。细胞用胰酶消化后, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基配制 8×10⁶ 的细胞悬液。每个支架接种 100 μL 的细胞悬液, 接种方法如图 1(a)所示。PLGA 支架在接种前需要进行预处理、以提高支架的亲水性及消毒

支架。预处理步骤如下: 支架在 70% 乙醇中浸泡 1 h, 用 pH 7.2 的 PBS 置换乙醇 6 次, 每次 30 min。DMEM 培养基浸泡支架 2 次, 每次 2 h。

将预处理好的支架放在空的 24 孔培养板内, 不加培养基。将细胞悬液缓慢滴加在支架表面, 作为对照组。在实验组中, 将细胞悬液分别接种至距表面 1, 3 和 5 mm 的层面。将所有样品放置培养箱中静置 3 h 后, 每孔加入 1.5 mL 培养基, 分别培养 16 h, 然后将支架均匀地分成 5 片, 考察每个片层上的细胞的分布和生长情况。

为了考察骨髓基质干细胞在支架上的分化, 将细胞悬液接种在距支架表面 1 mm 的层面, 然后用成骨诱导培养基(DMEM 中加入 10% 胎牛血清, 100 nmol/L 地塞米松 (Sigma), 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 (Sigma) 及 50 μg/mL 抗坏血酸-2-磷酸盐 (Sigma)) 分别培养 7 和 14 d 后, 检测细胞的成骨分化情况, 以碱性磷酸酶(ALP)活性和钙沉积量作为指标。

() 扫描电子显微镜观察。细胞接种至支架、并静置培养 16 h 后, 将支架从培养箱中取出。取支架表层的部分, 用 PBS 冲洗后去掉支架中残存的培养基。用 1% 的戊二醛缓冲液固定 30 min, 用乙醇逐级脱水, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% 各一次, 每次 30 min。以无细胞接种的支架作为空白对照, 将无细胞和接种了细胞的支架同时进行表面喷金处理, 然后进行扫描电子显微镜观察, 加速电压为 15 kV。

() 支架上细胞的 MTT 染色。细胞悬液接种至支架的不同层面。培养 16 h 后, 进行 MTT 染色。无细胞的空白支架与接种细胞的支架处理过程完全相同。

() 细胞数量。骨髓基质干细胞接种至支架表

面 16 h, 7 d 或 14 d 后, 将其从培养箱中取出, 用 PBS 轻轻冲洗支架, 直至支架上没有残存的培养基, 放入 -24 ℃ 中冷冻支架。测试时, 将支架从冷冻室内取出, 从上至下切成均匀的 5 片, 每片厚度为 2 mm, 分别进行测定。

利用荧光染料 Hoechst 33258 和双链 DNA 结合后在一定的激发光下可以发射特征荧光的方法, 测定细胞的 DNA 含量来得到支架上细胞的数量。50 μg/mL 的小牛胸腺 DNA 的水溶液作为 DNA 的标准溶液, 取出一系列不同体积的标准溶液(0~160 μL)做标准曲线。首先, 加 1.4 mL 的 EDTA 溶液(pH 12.3)到所有支架和不同体积的标准溶液中, 放置在 37 ℃ 水浴中 20 min, 然后立即放于冰上。此时, 细胞膜被破坏, DNA 释放到 EDTA 溶液中, 溶液依然澄清透明。随后, 将 200 μL 的 KH_2PO_4 和 1.5 mL 的荧光染料先后加入 DNA 溶液中, 放置 4 h 过夜。在 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris 缓冲液中配制 200 ng/mL 的 Hoechst 33258 荧光染料, pH 调至 7.0。取 2.5 mL 的终溶液, 在荧光光度计下测定在 350 nm 的激发光时 455 nm 的发射光强度。和 DNA 标准溶液的荧光强度相比较, 即可得到支架上细胞的 DNA 量。有实验已经测得, 单个 MSC 中的 DNA 含量为 10.4 pg^[31], 据此可以计算得到每个支架上的细胞数目。

() ALP 活性及钙沉积量的测定。无色的磷酸对硝基苯(PNPP)在 ALP 的作用下会水解成对硝基苯(PNP)和磷酸, 对硝基苯在波长 405 nm 处有特异吸收峰, 其光密度与 ALP 的活性成正比^[32]。本实验中利用 PNPP 作为 ALP 的底物, 检测产物 PNP 的浓度, 得到 ALP 的活性。支架成骨诱导 7 或 14 d 后, 将支架分成均匀的 5 个薄片, 用 PBS 缓冲液轻轻冲洗支架, 去除培养基和诱导剂对实验的影响。然后用细胞裂解液(pH 10.5, 50 mmol/L Tris, 100 mmol/L 甘油, 0.1% Triton X-100)处理细胞。将 500 μL 的细胞裂解液加入培养板的孔中, 在冰水混合物中超声波处理 15 s 两次, 期间的间隔为 15 s。然后取出 200 μL 的细胞裂解液立即与 100 μL 新鲜配制的 PNPP 溶液混合, 放在 37 ℃ 水浴中孵育 30 min。用 3 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液终止酶反应, 在 405 nm 波长下测定 PNP 的吸收强度。PNP 的标准溶液梯度稀释后做标准曲线, 然后可计算得到支架上细胞的 ALP 活性。

成骨诱导 7 或 14 d 后, 将支架均匀地分成 5 个薄片, 用 PBS 缓冲液轻轻冲洗支架, 去除残存的培养基

和诱导因子。然后每个培养板的孔内加入 1 mL 0.5 mol/L 的乙酸, 放在摇床上过夜溶出钙质。使用钙测定试剂盒, 按照操作说明测定支架薄片上的钙含量。

() 统计分析。所有的数据采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 作为具有显著性差异的判据。实验数据采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。若支架每一层中细胞的总 ALP 活力和细胞数量分别为 x_1 和 x_2 , 则, $\bar{x}_1/\bar{x}_2$ 表示平均每个细胞的 ALP 活性, 相应的标准差通过 $s_{(x_1/x_2)} = \sqrt{s_{x_1}^2/\bar{x}_2^2 + s_{x_2}^2/\bar{x}_1^2}$ 来计算。

2 实验结果

2.1 PLGA 支架和支架上细胞的形貌

采用 PLGA85/15 为原料、球形石蜡粒子为致孔剂, 通过室温模压和粒子脱除法制备了 PLGA 多孔支架。石蜡球的直径为 355~450 μm, 致孔剂含量为 90% (质量比)。图 2 中的扫描电子显微镜图片显示了支架内的孔形貌。孔与孔之间有良好的连通性, 连通孔的直径约为 100 μm (图 2(a)和(b)), 这对于细胞接种和迁移十分有利。在接种 16 h 后, 可以观察到细胞在支架孔内表面良好地黏附和铺展, 许多细胞相互接触形成细胞层(图 2(c)和(d))。

2.2 MTT 染色

图 3 在一定程度上显示了 BMSCs 接种至支架的不同深度并培养 16 h 以后细胞在支架上的分布。(a)为空白支架, 经同样的细胞培养程序处理(但是不加入细胞)和 MTT 染色后, 支架为粉红色, 为支架中的 DMEM 培养基的颜色。(b)~(e)为接种细胞的支架, 支架上的蓝紫色部位反映了其中的细胞。(b)显示的是细胞接种在支架表面并培养 16 h 后的细胞分布情况, 细胞在支架的上中部都有分布, 但在底部无蓝紫色, 表明细胞尚不能到达支架的最底部。(c)为细胞接种至距离上表面 1 mm 处, 染色结果显示, 在整个支架的全程均有细胞的分布, 表明从 1 mm 深度的层面接种细胞, 有利于细胞在整个支架上实现快速的均匀分布。(d), (e)为细胞接种至支架表面 3 和 5 mm 的层面, 在支架的中下部 MTT 染色阳性, 表明从更深的层面接种细胞, 细胞可到达支架的底层, 但在支架的表层基本没有细胞的分布, 说明细胞的接种部位过深, 也不利于细胞在整个支架上的均匀分布。

2.3 细胞在支架上的分布

骨髓基质干细胞接种至支架的不同层面并培养

图 2 PLGA 球形孔多孔支架的内表面形貌

(a)和(b)是支架的形貌,表明孔之间具有良好的连通性;(c)和(d)是 BMSCs 接种支架后并培养了 16 h 以后的形貌

图 3 接种不同部位并培养 16 h 后经 MTT 染色的细胞支架复合物

(a) 为空白对照,为采用 MTT 染色步骤处理不含细胞的多孔支架的结果。(b)~(e) 显示通过不同接种深度将细胞悬液在如图 1 所示不同位置接种的支架。(b) 0 mm; (c) 1 mm; (d) 3 mm; (e) 5 mm

16 h 后,考察细胞在支架不同层面上的定量分布情况,如图 4 所示。从图中可以明显地看到(图 4(a)),直接将细胞悬液滴加至支架表面,细胞的分布从上至下并不均匀,大部分细胞分布在支架的第一和第二层,底层细胞分布较少,出现细胞分布的梯度。细胞接种

至距离支架表面 1 mm 深的层面时,细胞在整个支架上的分布比较均匀(图 4(b))。而当细胞接种在距离支架上表面 3 和 5 mm 的层面时,细胞主要集中在支架的中下部,上部的细胞分布较少,与接种在支架表面的细胞分布情况相反(图 4(c)和(d))。不同接种层面的细胞数量测定结果与 MTT 染色的结果一致,表明不同的接种层面确实可以对细胞在支架上的分布产生影响,如果选择了合适的接种层面,细胞在支架上可以快速达到均匀的分布。

2.4 骨髓基质干细胞在支架上的成骨分化

我们将细胞接种在直径和高度为 10 mm 的球形多孔支架上,接种深度为距离支架表面 1 mm 的层面。经成骨诱导 7 和 14 d 后,细胞在支架各层分布均匀,细胞数量没有明显的差别(图 5(a))。图 5(b)显示细胞在支架上的碱性磷酸酶的表达。在成骨诱导 7 d 后,

图4 经过16 h培养后的BMSCs在支架各层中的细胞数量($n=3$)

细胞通过接种在如图1(a)所示的大尺寸支架上,“0 mm”表示直接将细胞悬液滴在支架上表面。接种了细胞的支架按图1(b)所示的方式均匀地切成5片。(a)中,层1和3,层1和4,层1和5,层2和3,层2和4均具有显著性差异($P<0.05$);只有在(b)中,各层间均无显著性差异;在(c)中,层1和3,层1和5具有显著性差异;在(d)中,层1和3,层1和4,层1和5,层2和3,层2和4,层2和5间具有显著性差异

图5 支架各层中BMSCs细胞的量数(a)以及各层ALP活性(b)和单个细胞的ALP活性(c)

BMSCs细胞在支架中诱导7和14 d后均匀分成5层。在10 mm厚的支架上采用在1 mm位置接种细胞。 $n=3$ 。通过7和14 d诱导结果的对比,层3中细胞数量有显著性差异(a),层3的ALP活性有显著性差异(b),层3的单细胞ALP活性有显著性差异(c)。通过对同一时间培养的支架各层相互比较,培养7 d后在层1和层3中单细胞ALP活性有显著性差异(c);培养14 d后,各层间的细胞数量(a)、ALP活性(b)、单个细胞ALP活性均无显著性差异(c)

在支架的各层即可看到细胞有明显的碱性磷酸酶的表达,且各层碱性磷酸酶的活性没有显著性的差别。诱导14 d后,碱性磷酸酶的活性较诱导7 d有明显的降低。已有实验证明,碱性磷酸酶的表达在骨髓基质干细胞的成骨诱导的早期达到峰值,随着诱导的进行,碱性磷酸酶的表达将逐渐降低,随后骨钙素开始

表达,细胞外钙质沉积增多。实验结果显示诱导14 d后,碱性磷酸酶的表达降低与其他人的结果是一致的^[33]。图6显示的是诱导7和14 d后,支架各层上的钙沉积量。诱导7 d后,支架上有钙质沉积,14 d后钙沉积量明显增加。同样,各层之间的钙沉积量没有显著性差异。

图6 细胞接种至支架1 mm位置处,且成骨分化诱导7和14 d后各层中钙沉积量($n=3$)

通过7和14 d诱导的结果比较,层2、层3及层5各自在不同时间具有显著性差异;经过7和14 d诱导,同时间段不同层之间没有显著性差异

3 讨论

本文的研究主要为了回答以下几个问题:细胞悬液初始接种位置是否会显著影响细胞分布?什么位置接种细胞能够达到最佳的均匀分布?然后通过实验设计,将细胞悬液在不同深度处注射接种于厚支架的内部,以寻找在体外实现细胞快速均匀分布的合适接种位置.在骨组织工程中,很多场合需要使用大尺寸的支架.然而,细胞悬液直接滴在支架表面的方法很容易造成支架下层细胞数量显著少于支架上表面的细胞数,如MTT染色(图3(b))和细胞数量统计(图4(a))所示.尽管支架孔隙率达到将近90%,细胞要达到支架底部仍然是很困难的,这也导致最后细胞的分布往往是非均匀的.实验结果显示:在10 mm的支架上,距支架表面1 mm接种细胞,分布要比直接在表面滴加细胞悬液和在支架中部接种效果好,如图3(c),4(b)和5(a)所示.细胞在支架内的均匀分布也直接证实了室温模压粒子脱出法能够制作出具有良好孔连通性的大尺寸PLGA多孔支架.

具有细胞均匀分布的多孔支架有利于组织的重建.在数学模型上,显示细胞在空间上的不均匀分布

可以导致支架内营养和代谢物质浓度的不均匀分布^[34].各种生物材料体内构建各种组织的实例中表明,新生组织的均匀性与最初支架中细胞分布的均匀性密切相关^[25,26].本研究利用了一种便捷的静态接种方法,这对提高组织工程实验的可重复性可能会有帮助.

虽然BMSCs能够向成骨分化已经有许多报道,但是,我们仍然需要通过在支架上诱导分化的实验证明:在制备这类球形孔支架的制备过程中未引入影响生物相容性的物质.上述实验证明了我们的这种以石蜡为致孔剂制备的大尺寸的PLGA多孔支架对骨髓基质干细胞有良好的细胞相容性,可以作为一种细胞外基质的替代材料用于组织工程.同时,我们初步考察了BMSCs能否在支架的不同层得到相类似的成骨分化.采用ALP活力和钙质沉积量来表征BMSCs在大尺寸支架中的成骨分化能力.经过7和14 d的培养,分别能观察到显著的ALP活力和钙沉积现象,这进一步说明了这种球形孔PLGA支架在组织工程上的应用潜力.此外,选用恰当细胞接种位置,尽管不同层内营养物质和代谢产物的交换速率有细微的差别,支架上不同层的细胞ALP活性和钙沉积差别不大的.实验结果显示BMSCs能够在大尺寸的球形孔聚合物支架内部均匀地诱导分化.

即使在连通性很好的支架上,直接滴加的办法仍然很难获得细胞的均匀分布.另一方面,接种位置过深,例如在支架的中心位置,可能导致细胞在高孔隙率支架底部位置过度聚集.合适的接种部位应在支架中心和上表面之间.如果在一个孔连通性良好的支架上选择合适的接种位置,在大尺寸支架上也有可能使各层细胞同步地分化.实验者需要对孔的连通性和支架的细胞负载能力及其均匀分布全面地进行考虑.由于在实际的应用过程中,合适的接种位置和接种方法可能还与细胞和支架类型等其他因素相关,因此这部分研究工作还有待于进一步拓展.

参考文献

- Crane G M, Ishaug S L, Mikos A G. Bone tissue engineering. *Nat Med*, 1995, 1(12): 1322—1324[doi]
- Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260(5110): 920—926[doi]
- Hutmacher D W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2529—2543[doi]
- Nair L S, Laurencin C T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*, 2007, 32(8-9): 762—798[doi]
- Zhang J Y, Doll B A, Beckman E J, et al. Three-dimensional biocompatible ascorbic acid-containing scaffold for bone tissue engi-

- neering. *Tissue Eng*, 2003, 9(6): 1143—1157[[doi](#)]
- 6 Jiao Y P, Cui F Z. Surface modification of polyester biomaterials for tissue engineering. *Biomed Mater*, 2007, 2(4): R24—R37[[doi](#)]
- 7 Zhu H G, Ji J, Barbosa M A, et al. Protein electrostatic self-assembly on poly(DL-Lactide) scaffold to promote osteoblast growth. *J Biomed Mater Res Part B*, 2004, 71B(1): 159—165[[doi](#)]
- 8 Yang Z J, Yuan H P, Tong W D, et al. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: Variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, 1996, 17(22): 2131—2137[[doi](#)]
- 9 Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, 2007, 28(29): 4240—4250[[doi](#)]
- 10 Ma Z W, Gao C Y, Gong Y H, et al. Paraffin spheres as porogen to fabricate poly(L-lactic acid) scaffolds with improved cytocompatibility for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B*, 2003, 67B(1): 610—617[[doi](#)]
- 11 Wang M, Chen W, Zhang H, et al. Synthesis and characterization of PLLA-PLGA-PEG multiblock copolymers and their applications in modifying PLLA porous scaffolds. *Euro Polym J*, 2007, 43(11): 4683—4694[[doi](#)]
- 12 Ishaug S L, Crane G M, Miller M J, et al. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res*, 1997, 36(1): 17—28[[doi](#)]
- 13 Wu L B, Zhang H, Zhang J C, et al. Fabrication of three-dimensional porous scaffolds with complicated shape for tissue engineering. I. Compression molding based on flexible-rigid combined mould. *Tissue Eng*, 2005, 11(7/8): 1105—1114[[doi](#)]
- 14 Wu L B, Jing D Y, Ding J D. A “room-temperature” injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds. *Biomaterials*, 2006, 27(2): 185—191[[doi](#)]
- 15 Wu L B, Zhang J C, Jing D Y, et al. “Wet-state” mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A*, 2006, 76A(2): 264—271[[doi](#)]
- 16 Wu L B, Ding J D. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2004, 25(27): 5821—5830[[doi](#)]
- 17 Chen J W, Wang C Y, Lu S H, et al. *In vivo* chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(3): 429—438[[doi](#)]
- 18 Leung L, Chan C, Baek S, et al. Comparison of morphology and mechanical properties of PLGA bioscaffolds. *Biomed Mater*, 2008, 3,[[doi](#)]
- 19 Yang Y F, Zhao J, Zhao Y H, et al. Formation of porous PLGA scaffolds by a combining method of thermally induced phase separation and porogen leaching. *J Appl Polym Sci*, 2008, 109(2): 1232—1241[[doi](#)]
- 20 Hu X X, Shen H, Yang F, et al. Preparation and cell affinity of microtubular orientation-structured PLGA(70/30) blood vessel scaffold. *Biomaterials*, 2008, 29(21): 3128—3136[[doi](#)]
- 21 Zhang J C, Zhang H, Wu L B, et al. Fabrication of three dimensional polymeric scaffolds with spherical pores. *J Mater Sci*, 2006, 41(6): 1725—1731[[doi](#)]
- 22 Zhang J C, Wu L B, Jing D Y, et al. A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores. *Polymer*, 2005, 46(13): 4979—4985
- 23 Ma P X, Choi J W. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng*, 2001, 7(1): 23—33[[doi](#)]
- 24 Chen V J, Ma P X. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials*, 2004, 25(11): 2065—2073[[doi](#)]
- 25 Holy C E, Shoichet M S, Davies J E. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3): 376—382[[doi](#)]
- 26 Kim B S, Putnam A J, Kulik T J, et al. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57(1): 46—54[[doi](#)]
- 27 Reilly G C, Radin S, Chen A T, et al. Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass. *Biomaterials*, 2007, 28(28): 4091—4097[[doi](#)]
- 28 Ciapetti G, Ambrosio L, Marletta G, et al. Human bone marrow stromal cells: *In vitro* expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials*, 2006, 27(36): 6150—6160[[doi](#)]
- 29 Wang Z, Peng R, Ding J D. Periodically discontinuous induction of bone marrow stem cells toward osteogenic differentiation *in vitro*. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(3): 766—772[[doi](#)]
- 30 Liu G P, Zhao L, Cui L, et al. Tissue-engineered bone formation using human bone marrow stromal cells and novel ss-tricalcium phosphate. *Biomed Mater* 2007, 2(2): 78—86[[doi](#)]
- 31 Goldstein A S, Juarez T M, Helmke C D, et al. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 2001, 22(11): 1279—1288[[doi](#)]
- 32 Huang W B, Carlsen B, Wulur I, et al. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for *in vitro* bone formation in a PLGA scaffold. *Exp Cell Res*, 2004, 299(2): 325—334[[doi](#)]
- 33 Aubin J E. Bone stem cells. *J Cell Biochem*, 1998, 30/31(Suppl): 73—82
- 34 Galban C J, Locke B R. Effects of spatial variation of cells and nutrient and product concentrations coupled with product inhibition on cell growth in a polymer scaffold. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64(6): 633—643[[doi](#)]