

## 3D 打印明胶 / 海藻酸钠 / 58S 生物玻璃骨缺损修复支架的生物安全性评价

<https://doi.org/10.12307/2022.086>谭国忠<sup>1</sup>, 涂欣冉<sup>1</sup>, 郭黎洋<sup>1</sup>, 钟嘉琳<sup>1</sup>, 张阳<sup>2</sup>, 江千舟<sup>1</sup>

投稿日期: 2020-10-20

送审日期: 2020-10-22

采用日期: 2021-01-07

在线日期: 2021-05-18

中图分类号:

R459.9; R318.08; R-331

文章编号:

2095-4344(2022)04-00521-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

## 文章特点一

△通过3D打印方式制备出与骨缺损相匹配的组织工程支架,利用体外细胞实验和体内骨缺损植入实验验证该支架的细胞相容性和生物安全性。

## 材料及方法:

将含明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃的浆料混匀,通过3D打印技术制备骨缺损修复支架。

## 体内、体外实验:

(1) 支架结构观测、抗压强度及体外降解检测;  
(2) 细胞毒性实验和细胞增殖实验;  
(3) 细胞在支架表面的种植;  
(4) 大鼠下颌骨骨缺损模型的建立和支架的植入,大鼠肝、肾功能检测和肝肾脑组织学分析。

## 结果:

(1) 3D打印骨缺损修复支架具有网状多孔结构,抗压强度良好,降解速率均一、稳定,体外细胞相容性良好,无细胞毒性;  
(2) 体内植入未对大鼠重要脏器产生病理损害。

## 文题释义:

**3D打印骨缺损修复支架:**以生物活性材料为墨水,利用3D打印技术针对下颌骨骨缺损设计的可降解组织工程支架,其特异性成型的特点可与骨缺损部位精准匹配,支架的降解为新骨的长入提供空间,同时释放活性离子诱导细胞的黏附、迁徙,为新骨的形成提供条件。

**L929细胞:**是小鼠皮下组织分离出的一种成纤维细胞,为国标上细胞毒性实验的标准细胞系之一,材料与L929细胞体外培养能直观地表现出细胞与目标材料的复合生长状况,可验证体内植入材料在临床应用前是否存在细胞毒性。

## 摘要

**背景:**在组织工程开发的多种生物材料中,明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃在骨缺损修复中具有良好的生物相容性、适宜的降解性及较佳的成骨诱导性。

**目的:**通过3D打印技术制备明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃支架,研究其体外性能及生物安全性。

**方法:**将明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃与去离子水混合并搅拌均匀作为打印墨水,通过3D打印技术完成支架的制备,交联后冻干。

**①体外实验:**采用扫描电镜和万能材料试验机检测支架的形态特征和抗压强度;将支架浸入模拟体液中16周,观察其降解速率;采用支架浸提液培养L929细胞3 d,观察细胞形态与生长状况;将支架与大鼠骨髓间充质干细胞共培养0, 7, 14, 21 d,利用CCK-8法检测细胞增殖,DAPI染色观察细胞的黏附与存活,RT-PCR检测成骨相关基因的表达;**②体内实验:**在10只SD大鼠右下颌骨制备直径5 mm的全层骨缺损,实验组5只植入支架,空白组5只未植入支架,术后4周进行肝、肾功能检测、肝肾脑组织学与骨缺损区组织学观察。

**结果与结论:****①体外实验:**扫描电镜显示支架表面粗糙,呈蜂窝状结构;支架的平均杨氏模量为272.33 MPa;浸泡于模拟体液中前6周时,支架降解较快且速度均匀,第6周后降解速率减慢,仍大致保持均一的降解速率,在16周时降解率达18%;倒置显微镜显示,L929细胞在支架浸提液中生长良好,形态结构完好;随着培养时间的延长,骨髓间充质干细胞的增殖率增加;DAPI染色显示,骨髓间充质干细胞黏附于支架表面生长,由开始的堆积生长逐渐爬行及向四周扩展;RT-PCR检测显示,支架可促进骨髓间充质干细胞骨形态发生蛋白2、骨钙素、RUNX2 mRNA的表达;**②体内实验:**实验组支架植入后未影响大鼠肝、肾功能,未造成肝、肾和脑组织的病理损害;下颌骨骨缺损标本苏木精-伊红染色显示,实验组支架未完全降解,新生骨连接宿主骨与残留支架,新生骨组织周围可见少量成骨细胞浸润及炎症细胞浸润,空白组宿主骨边缘见少量新生骨及大量纤维组织;**③结果表明,**3D打印明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃骨缺损修复支架的细胞相容性良好,无明显细胞毒性及组织毒性,具有良好的生物安全性。

**关键词:**3D打印;明胶;海藻酸钠;58S生物活性玻璃;骨缺损;支架;细胞毒性;生物安全性

## Biosafety evaluation of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds for bone defect repair

Tan Guozhong<sup>1</sup>, Tu Xinran<sup>1</sup>, Guo Liyang<sup>1</sup>, Zhong Jialin<sup>1</sup>, Zhang Yang<sup>2</sup>, Jiang Qianzhou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Guangzhou ZhongDa Medical Equipment Company Limited, Guangzhou 510300, Guangdong Province, China

Tan Guozhong, Master candidate, Physician, Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

**Corresponding author:** Jiang Qianzhou, Chief physician, Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

<sup>1</sup>广州医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室,广东省广州市 510182; <sup>2</sup>广州中大医疗器械有限公司,广东省广州市 510300

**第一作者:**谭国忠,男,1993年生,广东省阳江市人,汉族,广州医科大学附属口腔医院在读硕士,医师,主要从事3D打印支架骨缺损修复研究。

**通讯作者:**江千舟,主任医师,广州医科大学附属口腔医院牙体牙髓科,广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室,广东省广州市 510182

<https://orcid.org/0000-0002-4635-2605> (谭国忠)

**基金资助:**广东省科技计划项目(2018B050502012),项目负责人:江千舟

**引用本文:**谭国忠,涂欣冉,郭黎洋,钟嘉琳,张阳,江千舟.3D打印明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃骨缺损修复支架的生物安全性评价[J].中国组织工程研究,2022,26(4):521-527.



## Abstract

**BACKGROUND:** Among the biological materials developed by tissue engineering, gelatin, sodium alginate and 58S bioactive glass have good biocompatibility, suitable degradability and better osteogenic induction in bone defect repair.

**OBJECTIVE:** To prepare gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds with three-dimensional printing technology and investigate their performance *in vitro* and biosafety.

**METHODS:** Gelatin, sodium alginate and 58S bioactive glass were mixed with deionized water and stirred uniformly as printing ink. The scaffolds were prepared by three-dimensional printing technology and then lyophilized after cross-linking. (1) *In vitro* experiment: The morphological characteristics and compressive strength of the scaffolds were detected by scanning electron microscopy and universal material testing machine, respectively. The scaffolds were immersed into simulated body fluid for 16 weeks to observe the degradation rate. L929 cells were cultured with scaffold extract for 3 days, and the morphology and growth of cells were observed. The scaffolds were co-cultured with rat bone marrow mesenchymal stem cells for 0, 7, 14 and 21 days. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The cell adhesion and survival were observed by DAPI staining. The expression of osteogenic related genes was detected by RT-PCR. (2) *In vivo* experiment: Full thickness bone defects with a diameter of 5 mm were made in the right mandibles of 10 SD rats; 5 in the experimental group were implanted with scaffolds, and 5 in the blank control group were not implanted with scaffolds. Liver and kidney function tests and histological staining of the liver, kidney, brain and bone defects were performed 4 weeks after surgery.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) *In vitro* experiment: Scanning electron microscopy showed that the surfaces of the scaffolds were rough and honeycombed. The average Young's modulus of the scaffolds was 272.33 MPa. In the first 6 weeks, the scaffolds degraded rapidly and uniformly after soaking in the simulated body fluids. After the week 6, the degradation rate slowed down and remained roughly uniform, and the degradation rate reached 18% at the week 16. Inverted microscope showed that L929 cells grew well in the scaffold extract, and the morphology and structure of L929 cells were intact. With the extension of culture time, the proliferation rate of rat bone marrow mesenchymal stem cells increased. DAPI staining showed that the rat bone marrow mesenchymal stem cells adhered to the surfaces of the scaffolds and gradually crawled and expanded from initial accumulation to peripheral growth. RT-PCR assay revealed that the scaffolds could promote the mRNA expression of bone morphogenetic protein-2, osteocalcin and RUNX2 in rat bone marrow mesenchymal stem cells. (2) *In vivo* experiment: In the experimental group, the function of liver and kidney was not affected, and pathological damage of liver, kidney and brain tissue was not caused after implantation of scaffolds. Hematoxylin-eosin staining of the mandibular bone defect specimens indicated that the scaffolds of the experimental group were not completely degraded, and the new bone connected the host bone with the remaining scaffolds. A small amount of osteoblasts and inflammatory cells were observed around the new bone tissue, while a small amount of new bone and a large amount of fibrous tissue were seen at the edge of the host bone in the blank control group. (3) These results suggested that the three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds for bone defect repair possess favorable cytocompatibility, no obvious cytotoxicity or tissue toxicity, and have admirable biosafety.

**Key words:** three-dimensional printing; gelatin; sodium alginate; 58S bioactive glass; bone defect; scaffolds; cytotoxicity; biosafety

**Funding:** Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2018B050502012 (to JQZ)

**How to cite this article:** TAN GZ, TU XR, GUO LY, ZHONG JL, ZHANG Y, JIANG QZ. Biosafety evaluation of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds for bone defect repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(4):521-527.

## 0 引言 Introduction

因先天畸形、创伤、感染或手术切除导致的口腔颌面部大面积骨缺损，由于超出自我修复限度引起愈合不全或延期愈合，通常需要外部干预来促进骨修复。传统的骨缺损修复方式是骨移植，根据供体组织和材料的不同，骨移植可分为自体骨移植、同种异体骨移植、异种骨移植和合成骨移植<sup>[1]</sup>。自体骨移植来源有限，并且会导致供体部位的损伤；异体骨移植缺乏自体骨的成骨特性，并且存在免疫排斥和病原体传播的风险<sup>[2-4]</sup>，在实际应用中均存在一定的局限性。因此，合成骨替代品一直是人们关注的焦点，其不仅可以大规模生产，而且可在保证生物安全性的前提下在临床上加以利用。目前，合成骨替代品的常见形式是组织工程支架，其中选择适宜的制备方法和材料是支架研发的两个关键因素。传统支架制作方法精度不足，而且难以构建复杂结构及形状，制作工艺亟需改善。近年来3D打印技术迅速发展，在骨缺损修复领域的应用中展现出了独特的优势。3D打印又称增材制造或快速成型，是一种以三维数字模型为基础，通过逐层叠加的方式将材料结合起来的技术<sup>[5]</sup>。作为一种新兴技术，3D打印不仅可制备出与骨缺损外形完美匹配的支架，其内部孔隙还能对新生组织生长修复提供空间，有利于新生血管和骨组织的长入<sup>[6-8]</sup>。

支架材料植入体内必须满足良好的生物学和结构特性要求，同时其良好的生物安全性也是骨缺损修复的前提。一方面，材料良好的生物相容性是细胞黏附、增殖和迁移的基本

要求之一，其在不影响缺损区新生细胞正常生物学行为的基础上，为成骨和成血管细胞的趋化提供可能；另一方面，支架材料降解代谢的同时，对机体本身也不会产生生物毒性。常见的支架制作材料包括金属、生物陶瓷及高分子聚合材料，这些材料在结构支撑、骨诱导性能和可控性生物降解等方面存在不同程度缺陷，往往不能满足临床的要求，因此，探索合适的组织工程支架材料是目前的研究热点<sup>[9]</sup>。在组织工程开发的多种生物材料中，明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃因其良好的生物相容性、适宜的降解性及较佳的成骨诱导性，被认为在骨缺损修复中具有广阔的应用前景。课题组尝试将明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃结合，通过3D打印技术制备三维支架并通过体内外实验评价其生物安全性，为后期临床的应用奠定基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料学及对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年12月至2020年6月在广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室和广州中医药大学实验动物中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验用主要试剂 正硅酸乙酯、四水硝酸钙[Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O]和柠檬酸(光华化工有限公司,中国);磷酸三乙酯、明胶和海藻酸钠(阿拉丁实业有限公司,中国上海);盐酸、无水乙醇(大茂化学试剂厂,中国天津);PBS、胎牛

血清、DMEM(Gibco, 美国); 模拟体液(雷根生物, 北京); CCK-8 试剂(Dojindo, 日本); Prime Script RT 试剂盒(TaKaRa, 日本); DAPI(碧云天生物, 上海)。

1.3.2 实验用主要仪器 3D 打印机(Regenovo 系列, 中国杭州); 冷冻干燥机(CHRIST 系列, 德国); 扫描电镜(Hitachi S-3400N II, 日本); 倒置/荧光显微镜(LEICA DMI3000 B, 德国); 万能材料试验机(Instron 3366, 美国); 石蜡切片机(LEICA, 德国); 正置显微镜(LEICA DM2000, 德国)。

1.3.3 实验动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量 280–320 g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2016-0041。实验单位使用许可证编号: SYXK(粤)2018-0001。按随机数字表法将 10 只大鼠分成实验组和对照组, 每组 5 只。实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审议批准。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 3D 打印支架的制备 在无水乙醇中先后加入适量的柠檬酸、正硅酸乙酯、磷酸三乙酯和四水硝酸钙并搅拌均匀, 将所得混合液于 720 °C 马弗炉中烧结 24 h, 球磨机研磨 6 h 后得到了由 80%SiO<sub>2</sub>、16%CaO 和 4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 组成的 58S 生物活性玻璃。

取适量的 58S 生物活性玻璃、明胶和海藻酸钠加入去离子水中, 在 37 °C 恒温条件下进行磁力搅拌(1 000 r/min)和机械搅拌(1 200 r/min), 将搅拌均匀的混合物转移至 3D 打印机料筒中, 作为打印墨水备用。设定打印参数: 注射枪头孔径为 0.4 mm, 挤出压力为 0.38 MPa, 打印速度为 15 mm/s, 间隙为 1.2 mm, 挤出温度为 28 °C。通过层层叠加的方式完成支架的制备, 将支架浸泡在 10%CaCl<sub>2</sub> 溶液中交联 10 min, 随后在 0.25% 戊二醛溶液中交联 30 min。用蒸馏水冲洗支架 5 次, 然后在蒸馏水浸泡 8 h 去除余留戊二醛。将支架放入冷冻干燥机中, 在 -80 °C 条件下冻干 24 h, 成品备用, 扫描电镜下观测支架表面形态。

1.4.2 支架的抗压强度 将支架(10 mm×10 mm×4.5 mm)充分溶胀后( $m_0$ )置于万能材料试验机上, 调整试验机压板中心与支架中心重合。开启试验机, 当上压板与支架恰好接触时停止。调试试验机参数, 以 1 mm/min 的速度进行加荷, 负载为 1 kN 时停止负载, 通过软件计算杨氏模量, 绘制载荷曲线。实验 3 次, 取平均值。

1.4.3 支架的体外降解 支架称质量后浸泡在模拟体液中, 每周将支架从模拟体液中取出并用滤纸吸干, 称质量并记录, 再浸泡在模拟体液中, 直至 16 周, 每周取 3 个样本。质量损失率(%) =  $(m_0 - m_t)/m_0 \times 100\%$ , 其中  $m_0$  为支架原始质量,  $m_t$  为支架在一个时间点的质量。

1.4.4 支架的细胞毒性实验 将支架浸泡在含体积分数 2% 胎牛血清的 DMEM 中 24 h 制备浸提液, 支架表面积与浸提介质体积比为 3 cm<sup>2</sup>/mL、浸提温度为 37 °C。将 L929 细胞(赛百慷, 上海)以 10<sup>5</sup>/孔的密度接种于 6 孔板中, 分别用 2 mL 的普通培养基和支架浸提液培养 3 d, 倒置显微镜下观察

L929 细胞形态和生长状况。

1.4.5 支架的细胞增殖实验 将支架用无菌手术刀片剪切成 5 mm×5 mm×2 mm 的立方体, 经体积分数 75% 乙醇及紫外线消毒 30 min。将大鼠骨髓间充质干细胞(普诺赛, 武汉)以 2×10<sup>4</sup>/孔的密度接种至支架中, 孵育 0, 7, 14 和 21 d 后, 更换为含 10% CCK-8 试剂的培养基 100 μL, 37 °C 孵育 30 min, 使用酶标仪在 490 nm 处读取吸光度值, 计算细胞相对增殖率。细胞增殖率 =  $(A_x - A_0)/(A_1 - A_0) \times 100\%$ , 其中  $A_x$  为每个时间点的吸光度值,  $A_1$  为接种后即刻的吸光度值,  $A_0$  为 CCK-8 溶液加培养基后无细胞状态的吸光度值。

1.4.6 细胞在支架表面的种植及成骨相关基因表达 将支架经体积分数 75% 乙醇及紫外线消毒 30 min 后, 置于 12 孔板中; 将大鼠骨髓间充质干细胞以 10<sup>5</sup>/孔的密度接种于 12 孔板的孔中, 37 °C 孵育 4 h; 采用无菌镊将支架转移至新的 12 孔板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基。培养 7, 14, 21 d 后, 将支架在含体积分数 3.7% 甲醛的 PBS 溶液中固定 30 min, 4 °C 的 PBS 洗涤 3 次; 将支架在冷冻的 0.25% triton X-100 中通透化处理 5 min, 再返回 4 °C 的 PBS; 与 DAPI 孵育 10 min, 再用 4 °C 的 PBS 洗涤。最后, 荧光显微镜下观察细胞在支架上的定植状态。

支架与大鼠骨髓间充质干细胞共培养 7, 14, 21 d 后, 0.25% 胰酶消化细胞, 提取总 RNA, 按程序进行 RT-PCR 分析; 以普通培养基平面培养的细胞为对照。利用 Prime Script RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 并以 cDNA 为模板设计相关基因引物序列, 以 GAPDH 为内参, 进行实时定量 PCR 检测成骨相关基因骨形态发生蛋白 2、骨钙素和 RUNX2 mRNA 的表达, 实验使用的相关引物序列见表 1。

表 1 | RT-PCR 引物列表  
Table 1 | RT-PCR primer list

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
GAPDH	TCT CTG CTC CTC CCT GTT C	ACA CCG ACC TTC ACC ATT C
RUNX2	GAA ATG CCT CTG CTG TTA TGA	AAG TGA AAC TCT TGC CTC GTC
骨形态发生蛋白 2	GAG AAA AGC GTC AAG CCA AAC	GTC ATT CCA CCC CAC ATC ACT
骨钙素	AGG GCA GCG AGG TAG TGA AG	CTC CTG AAA GCC GAT GTG GT

1.4.7 支架的动物体内植入实验 无菌状态下采用 5% 戊巴比妥(35 mg/kg)腹腔注射麻醉 10 只大鼠, 麻醉生效后于大鼠右侧下颌区备皮, 碘伏消毒、铺巾, 术区皮下注射含 1 : 100 000 肾上腺素的 2% 利多卡因; 在平行下颌骨下缘上作 1.0–1.5 cm 切口, 皮下组织分层切开后钝性分离暴露出下颌骨, 在生理盐水灌注配合下, 使用直径 5 mm 的环骨钻制备直径为 5 mm 的圆形全层骨缺损, 生理盐水冲洗术区, 实验组植入支架, 空白组不放置任何材料, 组织内伤口采用 5-0 缝合线分层缝合。术后连续 3 d 使用青霉素钠(40×10<sup>4</sup> U/kg)肌肉注射抗感染, 并密切观察大鼠生命状态。

大鼠肝、肾功能检测和肝肾脑组织学分析: 术后第 4 周固定大鼠, 在非麻醉状态下行尾静脉采血, 收集血液样本分别检测以下指标: 血清白蛋白、血清球蛋白、谷丙转氨酶、

谷草转氨酶、肌酐、尿素氮。大鼠采血后采用二氧化碳窒息法行安乐死，分别回收两组动物肝、肾、脑组织，于多聚甲醛中固定 24 h，标本经梯度乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋后，使用石蜡切片机制作厚度为 5 μm 的组织切片，进行苏木精-伊红染色，正置显微镜下观察组织学变化。

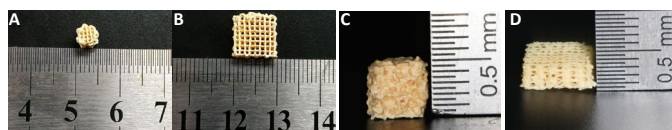
**大鼠下颌骨苏木精-伊红染色：**术后第 4 周大鼠安乐死后，剔除下颌区相关软组织后暴露支架植入缺损区，观察支架植入后缺损愈合情况；下颌骨后经多聚甲醛固定 24 h 后，通过 10%EDTA 进行脱钙，常规制作厚度为 5 μm 的切片，进行苏木精-伊红染色，正置显微镜下观察缺损区新生骨组织形成。

**1.5 主要观察指标** 3D 打印明胶/海藻酸钠/58S 生物活性玻璃支架的细胞相容性和组织相容性。

**1.6 统计学分析** 应用 SPSS 25.0 统计软件分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表达，组间比较采用 *t* 检验，以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

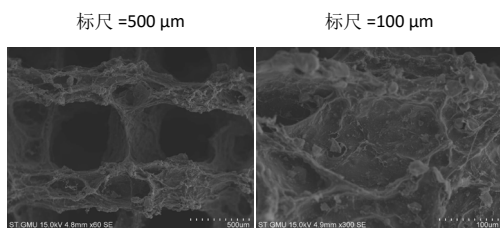
**2.1 3D 打印支架的表征** 根据需求可设计不同类型支架，实验打印出圆柱状及立方形的 3D 支架，支架内部可见三维网状多孔结构，各孔大小均匀、相互贯通，见图 1。扫描电镜显示支架表面粗糙，呈蜂窝状结构，见图 2，为细胞的黏附、增殖及新陈代谢提供空间。



图注：A、B 为圆柱状与立方形支架的俯视图，C、D 为圆柱状与立方形支架的侧视图。支架内部可见三维网状多孔结构，各孔大小均匀、相互贯通

图 1 | 3D 打印明胶/海藻酸钠/58S 生物活性玻璃支架的大体形态

Figure 1 | General morphology of three-dimensional printing gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds

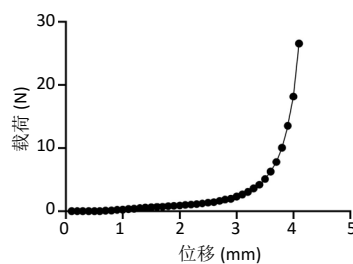


图注：支架表面粗糙，呈蜂窝状结构

图 2 | 3D 打印明胶/海藻酸钠/58S 生物活性玻璃支架的表面形貌(扫描电镜)

Figure 2 | Surface morphology of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds (scanning electron microscope)

将支架置于万能材料试验机行抗压强度测试，结果显示平均杨氏模量为 272.33 MPa，见图 3，提示该支架具有良好的抗压性能，符合体内骨缺损修复支架的基本要求。



图注：支架的平均杨氏模量为 272.33 MPa

图 3 | 3D 打印明胶/海藻酸钠/58S 生物活性玻璃支架的抗压强度测试

Figure 3 | Compressive strength test of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds

支架的质量损失率随时间的变化，见图 4，前 6 周降解较快且速度均匀，第 6 周后降解速率减慢，仍大致保持均一的降解速率，在 16 周时降解率达 18%，显示支架在 16 周内连续均匀降解，具有一定的生物稳定性。

**2.2 3D 打印支架的细胞相容性** 分别观察 L929 细胞在普通培养基和支架浸提液中培养 3 d 后的生长情况，倒置显微镜下可见细胞在浸提液中生长良好，形态结构完好且清晰可见，与普通培养基下的细胞状态无明显差异，见图 5。

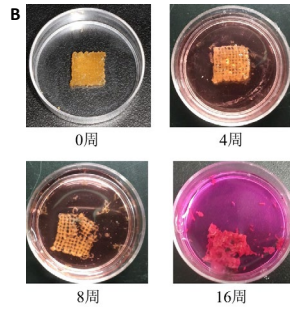
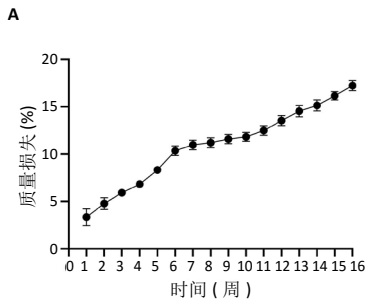
将大鼠骨髓间充质干细胞接种于支架后，CCK-8 检测显示随着培养时间的增加，细胞增殖率逐渐增加，证明该支架无明显细胞毒性且利于细胞增殖，见图 6。DAPI 染色显示在细胞黏附于支架表面上生长，细胞核呈高亮蓝色荧光，细胞由开始的堆积生长逐渐爬行及向四周扩展，在培养 21 d 后细胞形态饱满，边界清晰，数量有所增加，见图 7，证明支架具有良好的细胞相容性，利于大鼠骨髓间充质干细胞的生长、增殖。RT-PCR 检测显示，支架组培养 14、21 d 的骨形态发生蛋白 2、骨钙素、RUNX2 mRNA 表达量均高于对照组 ( $P < 0.05$ )，见图 8。

**2.3 3D 打印支架的体内修复实验结果** 体内实验 4 周后，实验组与空白组的大鼠肝肾功能指标均在正常范围内，两组间比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )，见表 2。

表 2 | 实验组与对照组肝肾功能相关指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )  
Table 2 | Comparison of liver and kidney function related indexes of experimental and control groups

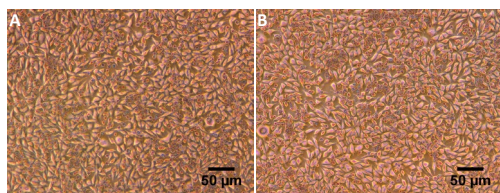
组别	血清白蛋白 (g/L)	血清球蛋白 (g/L)	谷草转氨酶 (U/L)	谷丙转氨酶 (U/L)	肌酐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	尿素氮 (mmol/L)
实验组	41.14±0.85	38.56±4.54	281.12±45.58	75.94±24.38	42.40±21.24	8.78±1.51
对照组	40.54±1.37	35.86±3.85	328.78±40.12	85.34±34.13	39.60±9.26	7.36±0.85
<i>t</i> 值	2.216	1.015	-1.718	-0.050	0.027	1.836
<i>P</i> 值	0.058	0.340	0.124	0.630	0.794	0.104

大鼠肝、肾和脑组织的苏木精-伊红染色观察，见图 9，正常结构单位清晰可见，细胞形态正常，均未见病理性改变。术后 4 周，两组骨缺损区颊舌侧愈合良好，无红肿、感染和坏死情况发生，空白组缺损区见纤维结缔组织长入填充，实验组部分材料发生降解，余留材料与周围组织有机结合，表面见大量纤维组织包绕，见图 10，表明支架材料具有良好的组织相容性。大鼠下颌骨骨缺损标本苏木精-伊红染色显示，实验组支架材料未完全降解，可见内部孔隙轮廓，新生骨连接宿主骨与余留支架材料，新生骨组织周围可见少量成骨细胞浸润及炎性细胞浸润；空白组宿主骨边缘见少量新生骨及大量纤维组织，见图 11。



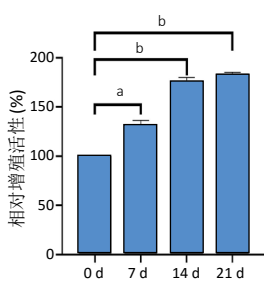
图注: A 为支架在 16 周内的质量损失, 前 6 周降解较快且速度均匀, 第 6 周后降解速率减慢, 仍大致保持均一的降解速率, 在 16 周时降解率达 18%; B 为支架降解后的形态

图 4 | 3D 打印明胶 / 海藻酸钠 / 58S 生物活性玻璃支架的体外降解  
Figure 4 | Degradation *in vitro* of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds

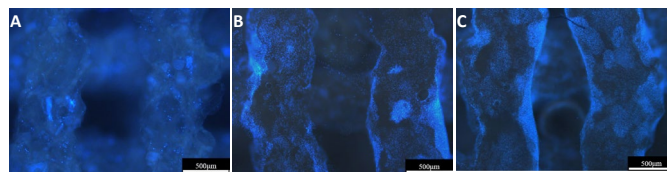


图注: A 为普通培养基培养 3 d 的细胞; B 为支架浸提液培养 3 d 的细胞, 细胞形态结构完好且清晰可见, 与普通培养基下的细胞状态无明显差异  
图 5 | 3D 打印明胶 / 海藻酸钠 / 58S 生物活性玻璃支架对 L929 细胞生长的影响 (倒置显微镜)

Figure 5 | Effect of three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds on L929 cell growth (inverted microscope)

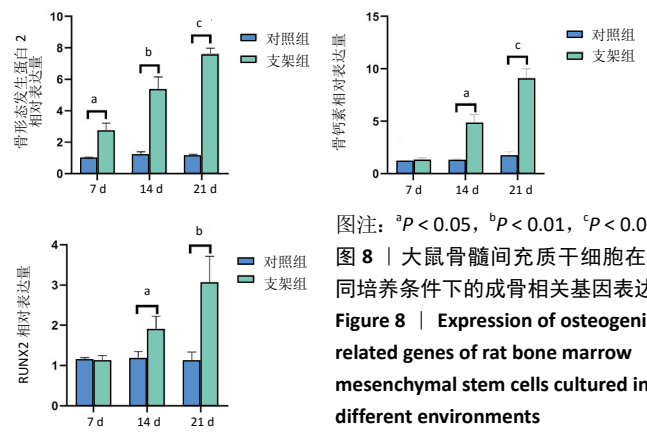


图注: <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$   
图 6 | 骨髓间充质干细胞在 3D 打印明胶 / 海藻酸钠 / 58S 生物活性玻璃支架上的增殖活性  
Figure 6 | Proliferative activity of rat bone marrow mesenchymal stem cells on three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds

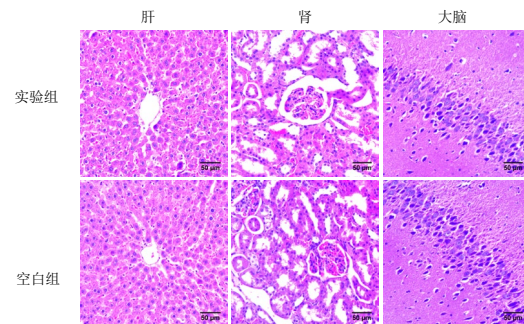


图注: A-C 分别为培养 7, 14, 21 d 的细胞形态。细胞黏附于支架表面上生长, 细胞核呈高亮蓝色荧光, 细胞由开始的堆积生长逐渐爬行及向四周扩展, 在培养 21 d 后细胞形态饱满, 边界清晰, 数量有所增加。标尺 = 500  $\mu\text{m}$

图 7 | 骨髓间充质干细胞在 3D 打印明胶 / 海藻酸钠 / 58S 生物活性玻璃支架上的形态 (DAPI 染色)  
Figure 7 | Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells on three-dimensional printed gelatin/sodium alginate/58S bioactive glass scaffolds (DAPI staining)

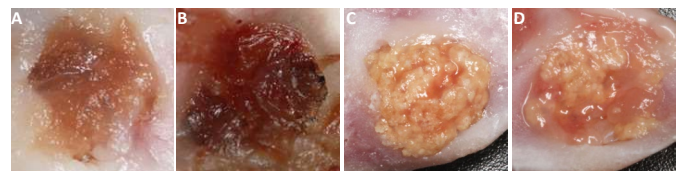


图注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$   
图 8 | 大鼠骨髓间充质干细胞在不同培养条件下的成骨相关基因表达  
Figure 8 | Expression of osteogenic related genes of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different environments



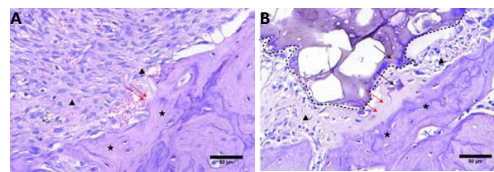
图注: 两组大鼠的肝、肾、脑组织结构正常, 均未见明显病理改变。标尺 = 50  $\mu\text{m}$

图 9 | 术后第 4 周实验组和空白组大鼠的主要脏器组织学变化  
Figure 9 | Histological changes of main organs of rats in the experimental group and the blank group at 4 weeks after operation



图注: A、B 为空白组颊部与舌部观察角度, 缺损区见大量纤维结缔组织长入; C、D 为实验组颊部与舌部观察角度, 缺损处见支架与周围骨组织紧密结合, 周围未见炎症及感染, 支架部分降解的同时可见大量新生组织长入

图 10 | 术后第 4 周实验组与空白组骨缺损部位大体观察  
Figure 10 | Gross observation of bone defects in the experimental group and the blank group at 4 weeks after operation



图注: A 为空白组, 可见大量纤维组织, 在宿主骨边缘有微量新生骨形成; B 为实验组, 除了缺损边缘可见新生骨生成外, 部分支架降解的同时边缘可见新生骨组织, 余留支架材料在缺损区仍可见。三角形标志指示纤维组织, 星形标志指示宿主骨, 红色箭头指示新生骨, 黑色箭头指示支架材料, 虚线为支架材料与周围组织交界。标尺 = 50  $\mu\text{m}$

图 11 | 术后第 4 周实验组与空白组下颌骨缺损标本组织学观察 (苏木精 - 伊红染色)  
Figure 11 | Histological observation of mandibular bone defect specimens in the experimental group and the blank group at 4 weeks after surgery (hematoxylin-eosin staining)

2.4 支架材料的生物相容性 体外细胞毒性实验、增殖实验与体内骨缺损修复实验显示,3D打印明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃支架具有良好的细胞相容性与组织相容性。

### 3 讨论 Discussion

无法完全实现自我修复和再生的口腔颌面部大面积骨缺损一直是临床上的治疗难点,通常需要骨移植或骨替代材料修复。由于自体 and 异体骨移植存在来源不足、二次创伤及免疫排斥等一系列问题,由此衍生了多种人工合成骨替代品,其中以组织工程支架的研究最为热门。传统的支架制造方法包括溶剂浇铸、微粒浸出、气体发泡、纤维网格和黏结等,最终成型支架的孔隙尺寸、几何形状和机械强度等在口腔颌面部骨缺损修复研究中有待提高<sup>[10]</sup>。与传统骨缺损修复支架不同,3D打印多孔支架的开发在骨缺损修复领域中彰显出独特优势,通过3D打印制备的组织工程支架在空间上可控制材料的分布和形成特定的形状,从而实现个性化支架与骨缺损区域的完美匹配,达到精准修复的治疗目的。目前,许多天然高分子材料已被用于3D打印组织工程支架,天然来源的材料一般不存在生物安全隐患,在细胞增殖和分化方面亦可表现出较好的生物性能,但其机械强度和可加工性较差,降解速率存在不可控性。生物陶瓷类材料由于其良好的生物相容性、较高的机械强度、稳定的生物降解性和固有的骨诱导能力,已被广泛应用于3D打印。因此,将天然高分子材料与生物陶瓷材料结合,希望可创造出集合两种材料优点的新型组织工程支架。明胶是水溶性蛋白质,其化学成分与胶原类似,具有很高的生物相容性,有助于细胞的黏附、增殖和分化,在体内植入后可随时间降解<sup>[11-12]</sup>。源于褐藻的海藻酸钠已被证明可以形成稳定的水凝胶和具有良好的细胞相容性,能有效改善支架的内部结构和引导细胞生长<sup>[13]</sup>。作为天然高分子材料,海藻酸钠和明胶结合后可增强材料的强度和可打印性,通过3D打印技术制备的生物支架有利于细胞在支架上黏附和生长<sup>[14-15]</sup>。58S生物活性玻璃具有较好的机械性能,同时具备良好的生物活性和生物降解性、骨结合和骨诱导能力<sup>[16-18]</sup>。WU等<sup>[19]</sup>将含有明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃的复合材料作为打印墨水制备3D支架,体外实验展示出了支架可观的细胞相容性及成骨诱导性。虽然3D打印支架作为骨移植替代物的研究有很大的前景,但仍存在一些困难需要考虑和解决,其中包括支架的生物安全性。

此次课题针对颌骨缺损修复研发3D打印明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃支架,将明胶、海藻酸钠和58S生物活性玻璃与去离子水混合并搅拌均匀作为打印墨水,通过3D打印技术制备支架,交联、冻干成型。3D支架成型后,扫描电镜显示支架表面粗糙、可见多层微孔蜂窝状结构和三维互通的内部结构,体现了3D打印技术具有能灵活控制支架的孔隙率、孔径大小和外部形状的优势。支架的多孔结构能促进细胞的黏附和增殖,相互连接的孔状结构有利于体内外的营养物质渗透到支架中<sup>[20-21]</sup>。抗压强度测试显示支架的

平均杨氏模量为272.33 MPa,而人体松质骨的抗压强度范围为2-180 MPa,其强度足以满足骨充填材料的需求。体外降解实验显示支架在模拟体液中表现出均匀的生物降解,在16周内均匀降解,不会因降解速率过快、降解不均匀导致机械力学性能过早丢失。此外,3D打印支架材料的匀速降解不会导致短时间内局部某些元素大量蓄积,引发生物危害。

利用3D打印技术制备由明胶组成的三维多孔结构支架,通常需要化学交联来增强机械强度,一方面有利于维持支架结构的完整性,另一方面也能引导细胞的生长和黏附。目前使用的化学交联剂种类较多,京尼平和戊二醛在胶原或明胶等生物医学材料的交联中应用最广泛<sup>[22]</sup>。京尼平的成本较高,交联后会导致材料呈蓝绿色,在一定程度上限制其使用。戊二醛是一种高效且廉价的交联试剂,可用于交联和稳定胶原与其他以蛋白质为基础的材料,其主要是与胶原纤维形成共价键后构成聚合物网络来扩展纤维之间的交联,进而增强纤维的机械强度,而且经戊二醛交联的明胶基支架可利于成纤维细胞的黏附及增殖<sup>[23-25]</sup>。虽然戊二醛交联时间短且价格低廉,但材料内残留的戊二醛未去除干净可产生明显的细胞毒性,所以经戊二醛交联后的支架需反复冲洗浸泡以去除未反应的戊二醛<sup>[26]</sup>。实验以戊二醛作为交联剂,需要探讨支架的细胞毒性及对机体重要脏器有无毒性损害。有研究报告,经NaBH<sub>4</sub>缓冲液和去离子水冲洗交联后的残余戊二醛,支架不会存在细胞毒性,仍可表现出较好的生物相容性<sup>[27]</sup>。SIVASHANKARI等<sup>[28]</sup>用大量双蒸馏水清洗支架除去未反应的戊二醛,结果表明与支架共培养的细胞仍可表现出良好的活性。此次实验用蒸馏水冲洗和长时间浸泡的方式去除支架中残留的戊二醛,通过体内外实验验证支架的生物安全性。体外实验包括检测支架的细胞毒性和细胞相容性,细胞毒性实验是将L929细胞培养于支架浸提液和采用CCK-8法来检测大鼠骨髓间充质干细胞在支架上的增殖活性,结果显示L929细胞形态结构良好,数量无明显减少,大鼠骨髓间充质干细胞在0-21 d内的增殖率呈逐渐上升趋势,验证了支架材料无明显细胞毒性;将细胞接种于支架表面并通过DAPI染色观察支架的细胞相容性,结果显示大量细胞可黏附支架表面,并在21 d生长周期内数量有所增加,证实了该支架材料具备良好的细胞相容性,利于细胞在其表面的黏附增殖。大鼠骨髓间充质干细胞在支架内培养21 d后的成骨相关基因呈显著上升趋势,说明该支架在体外促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨相关基因的表达。体内植入实验是在大鼠下颌骨骨缺损中植入支架,最大限度模拟了临床骨缺损修复的应用,支架植入4周后,大鼠肝、肾功能血液生化指标与空白组相比无统计学差异,组织学分析未见肝、肾、脑等脏器的病理损害,提示降解的材料未对大鼠肝肾脑等脏器造成毒性损害,支架具备基本的生物安全性。

体内植入实验同时显示了材料与缺损区域生物相容性良好,4周后支架部分降解的同时,周围组织长入支架表面和内部并形成有机结合,没有感染和坏死现象发生。植入材料

和新生组织形成有效的结合界面,说明支架材料与机体组织具有良好的组织亲和性,遵循正常的组织再生的规律,这是植入材料理想的反应和状态<sup>[29-30]</sup>。此外,下颌骨骨缺损区苏木精-伊红染色显示,空白组宿主骨边缘见微量新生骨及大量纤维组织,而实验组可见较多的新生骨组织桥接宿主骨与残余材料,推测其与58S生物活性玻璃有关,支架材料降解时从58S生物活性玻璃中释放出可溶性的Si、Ca和P离子,这些离子可激活相关基因表达,促进成骨细胞增殖,诱导新骨形成<sup>[31-32]</sup>。支架植入下颌骨骨缺损内4周,部分材料降解的同时可见新生骨组织形成,说明支架材料的降解速率与成骨速率相当,余留的部分支架材料也为新生骨的长入提供支撑及适宜的微环境,从而高效地实现骨缺损修复。但支架具体的诱导成骨能力和长期在体内生物安全性问题,还需进一步实验进行研究。

综上所述,3D打印明胶/海藻酸钠/58S生物活性玻璃支架具备良好的生物安全性,后期可利用更长期的下颌骨骨缺损植入实验来更加具体、准确地探讨该支架的生物安全性及成骨特性。

**作者贡献:** 第一、二作者进行实验设计,实验实施及资料收集,第一作者成文,通讯作者审核。

**经费支持:** 该文章接受了“广东省科技计划项目(2018B050502012)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审议批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南:** 研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经广州医科大学统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] HWANG KS, CHOI JW, KIM JH, et al. Comparative Efficacies of Collagen-Based 3D Printed PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP Composite Block Bone Grafts and Biphasic Calcium Phosphate Bone Substitute for Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. 2017;10(4):421.
- [2] MANO T, AKITA K, FUKUDA N, et al. Histological comparison of three apatitic bone substitutes with different carbonate contents in alveolar bone defects in a beagle mandible with simultaneous implant installation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(4):1450-1459.
- [3] LEE Y, CHAN Y, HSIEH S, et al. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20):5015.
- [4] ZHU T, CUI Y, ZHANG M, et al. Engineered three-dimensional scaffolds for enhanced bone regeneration in osteonecrosis. *Bioact Mater*. 2020;5:584-601.
- [5] WANG C, HUANG W, ZHOU Y, et al. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater*. 2020;5: 82-91.
- [6] 刘洋,王欢,朱晔,等.骨组织工程支架材料研究进展[J]. *临床口腔医学杂志*,2019,35(10):637-639.

- [7] 范海霞,王宏,程煥芝,等.3D打印HAP-GEL支架复合BMSCs和HUVECs细胞修复兔颅骨缺损[J]. *临床口腔医学杂志*,2020,36(4):199-202.
- [8] ASHAMMAKHI N, HASAN A, KAARELA O, et al. Advancing Frontiers in Bone Bioprinting. *Adv Healthc Mater*. 2019;8:e1801048.
- [9] ZHANG L, YANG G, JOHNSON B, et al. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2019;84:16-33.
- [10] SOORIYAARACHCHI D, MINIÈRE H, MAHARUBIN S, et al. Hybrid Additive Microfabrication Scaffold Incorporated with Highly Aligned Nanofibers for Musculoskeletal Tissues. *Tissue Eng Regen Med*. 2019;16:29-38.
- [11] GU Q, HAO J, LU Y, et al. Three-dimensional bio-printing. *Sci China Life Sci*. 2015;58:411-419.
- [12] PUROHIT S, SINGH H, BHASKAR R, et al. Gelatin-alginate-cerium oxide nanocomposite scaffold for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;116:111111.
- [13] ZHENG A, CAO L, LIU Y, et al. Biocompatible silk/calcium silicate/sodium alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2018;199:244-255.
- [14] YU H, ZHANG X, SONG W, et al. Effects of 3-dimensional Bioprinting Alginate/Gelatin Hydrogel Scaffold Extract on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*. 2019;45:706-715.
- [15] YE Q, ZHANG Y, DAI K, et al. Three dimensional printed bioglass/gelatin/alginate composite scaffolds with promoted mechanical strength, biomineralization, cell responses and osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31(9):77.
- [16] 吕孝帅,李正茂,杨雪超.生物活性玻璃58S/丝素蛋白膜促进人牙髓干细胞增殖与分化[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*,2015(10):577-583.
- [17] YAO Q, LIU H, LIN X, et al. 3D Interpenetrated Graphene Foam/58S Bioactive Glass Scaffolds for Electrical-Stimulation-Assisted Differentiation of Rabbit Mesenchymal Stem Cells to Enhance Bone Regeneration. *J Biomed Nanotechnol*. 2019;15:602-611.
- [18] DING Y, LI W, MÜLLER T, et al. Electrospun Polyhydroxybutyrate/Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/58S Sol-Gel Bioactive Glass Hybrid Scaffolds with Highly Improved Osteogenic Potential for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8:17098-17108.
- [19] WU J, MIAO G, ZHENG Z, et al. 3D printing mesoporous bioactive glass/sodium alginate/gelatin sustained release scaffolds for bone repair. *J Biomater Appl*. 2019;33:755-765.
- [20] YANG S, XU S, ZHOU P, et al. Siliceous mesostructured cellular foams/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite biomaterials for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4795-4807.
- [21] KIM J, PARK J, MUTHUKUMAR T, et al. Accelerating bone defects healing in calvarial defect model using 3D cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells on demineralized bone particle scaffold. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14:563-574.
- [22] 潘朝晖,栾兆新,高朋.两种交联剂对 $\beta$ -磷酸三钙明胶复合骨支架理化及生物学性能影响的比较[J]. *中国组织工程研究*,2018,22(6):833-839.
- [23] KIKUCHI M, MATSUMOTO H, YAMADA T, et al. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*. 2004;25:63-69.
- [24] PENG Y, GLATTAUER V, RAMSHAW J. Stabilisation of Collagen Sponges by Glutaraldehyde Vapour Crosslinking. *Int J Biomater*. 2017;2017:8947823.
- [25] SUESCA E, DIAS A, BRAGA M, et al. Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;77:333-341.
- [26] SUN X, MA C, GONG W, et al. Biological properties of sulfanilamide-loaded alginate hydrogel fibers based on ionic and chemical crosslinking for wound dressings. *Int J Biol Macromol*. 2020;157:522-529.
- [27] GHADERI G, SAHEBGHADAM L, KORDI T, et al. The enhancement of differentiating adipose derived mesenchymal stem cells toward hepatocyte like cells using gelatin cryogel scaffold. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491:1000-1006.
- [28] SIVASHANKARI P, MOORTHY A, ABUDHAHIR K, et al. Preparation and characterization of three-dimensional scaffolds based on hydroxypropyl chitosan-graft-graphene oxide. *Int J Biol Macromol*. 2018;110:522-530.
- [29] 王闯建,刘宏建,张春霖,等.喷墨全包芯骨支架材料的制备及生物安全性研究[J]. *中华实验外科杂志*,2019,36(5):915-918.
- [30] CHEN Y, KAWAZOE N, CHEN G. Preparation of dexamethasone-loaded biphasic calcium phosphate nanoparticles/collagen porous composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2018;67:341-353.
- [31] HOPPE A, GÜLDAL N, BOCCACCINI A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32:2757-2774.
- [32] GERHARDT L, BOCCACCINI A. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2010;3(7):3867-3910.