

3D 打印制备聚己内酯/ I 型胶原组织工程半月板支架及其理化特性的研究



沈师^{1,2}, 陈明学², 高爽², 郭维民², 王振勇², 李浩江², 李旭², 张彬^{1,2}, 鲜海^{1,2}, 张学亮², 刘舒云², 郝立波², 卓乃强¹, 郭全义²

1. 西南医科大学附属医院骨与关节外科(四川泸州 646000)

2. 中国人民解放军总医院骨科研究所 骨科再生医学北京市重点实验室 全军骨科战创伤重点实验室(北京 100853)

【摘要】 目的 采用低温沉积技术 3D 打印制备聚己内酯(polycaprolactone, PCL)/I 型胶原组织工程半月板支架(以下简称 PCL/I 型胶原半月板支架), 探讨其理化特性。方法 制备 15%PCL/4% I 型胶原溶液及 15%PCL 溶液, 利用低温沉积技术 3D 打印制备 PCL/I 型胶原半月板支架及 PCL 半月板支架。大体及扫描电镜观察支架形态及微观结构, 生物力学试验测量支架压缩模量及拉伸模量, 红外光谱分析支架成分, 测量支架表面接触角; 将两种支架及其浸提液分别与兔半月板细胞复合培养, 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8) 检测细胞增殖, 并以正常培养细胞作对照; 扫描电镜观察支架-细胞复合物中细胞黏附及生长情况。结果 大体及扫描电镜观察显示, 两种支架均具有取向的三维微观结构及孔隙, 但 PCL/I 型胶原半月板支架表面更粗糙。生物力学测试, 两种支架压缩模量及拉伸模量比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。红外光谱分析提示, PCL/I 型胶原半月板支架中 PCL 和 I 型胶原成功混合。PCL/I 型胶原半月板支架表面接触角为 $(83.19\pm 7.49)^\circ$, 较 PCL 半月板支架 $(111.13\pm 5.70)^\circ$ 显著减小($t=6.638, P=0.000$)。CCK-8 检测显示, 随培养时间延长, 两种支架浸提液培养的细胞数量呈递增趋势, 与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。支架-细胞复合物扫描电镜观察示, PCL/I 型胶原半月板支架表面黏附细胞多于 PCL 半月板支架。结论 低温沉积技术 3D 打印制备的 PCL/I 型胶原半月板支架具有优良的理化性能, 无细胞毒性, 有望作为半月板组织工程支架材料。

【关键词】 半月板组织工程; 低温沉积技术; 3D 打印技术; 支架材料; 理化特性

Study on the preparation of polycaprolactone/type I collagen tissue engineered meniscus scaffold by three-dimensional printing and its physicochemical properties

SHEN Shi^{1,2}, CHEN Mingxue², GAO Shuang², GUO Weimin², WANG Zhenyong², LI Haojiang², LI Xu², ZHANG Bin^{1,2}, XIAN Hai^{1,2}, ZHANG Xueliang², LIU Shuyun², HAO Libo², ZHUO Naiqiang¹, GUO Quanyi²

1. Department of Orthopedics and Joint Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan, 646000, P.R.China

2. Institute of Orthopedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing Key Laboratory of Regenerative Medicine in Orthopedics, Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries, PLA, Beijing, 100853, P.R.China

Corresponding authors: ZHUO Naiqiang, Email: znq0101@163.com; GUO Quanyi, Email: doctorguo_301@163.com

【Abstract】 Objective To manufacture a polycaprolactone (PCL)/type I collagen (COL I) tissue engineered meniscus scaffold (hereinafter referred to as PCL/COL I meniscus scaffold) by three-dimensional (3D) printing with low temperature deposition technique and to study its physicochemical properties. **Methods** First, the 15% PCL/4% COL I composite solution and 15% PCL simple solution were prepared. Then, 15% PCL/4% COL I meniscus scaffold and 15% PCL meniscal scaffold were prepared by using 3D printing with low temperature deposition techniques. The morphology and microstructure of the scaffolds were observed by gross observation and scanning electron microscope. The compression modulus and tensile modulus of the scaffolds were measured by biomechanical test. The components of the scaffolds were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The contact angle of the scaffold surface

DOI: 10.7507/1002-1892.201803074

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1103404); 国家自然科学基金面上项目(81772319); 国家自然科学基金重点项目(21134004); 北京市自然科学基金面上项目(7172203)

通信作者: 卓乃强, Email: znq0101@163.com; 郭全义, Email: doctorguo_301@163.com

was measured. The meniscus cells of rabbits were cultured with the two scaffold extracts and scaffolds, respectively. After cultured, the cell proliferations were detected by cell counting kit 8 (CCK-8), and the normal cultured cells were used as controls. Cell adhesion and growth of scaffold-cell complex were observed by scanning electron microscope.

Results According to the gross and scanning electron microscope observations, two scaffolds had orientated 3D microstructures and pores, but the surface of the PCL/COL I meniscus scaffold was rougher than the PCL meniscus scaffold. Biomechanical analysis showed that the tensile modulus and compression modulus of the PCL/COL I meniscus scaffold were not significantly different from those of the PCL meniscus scaffold ($P>0.05$). FTIR analysis results showed that COL I and PCL were successful mixed in PCL/ COL I meniscus scaffolds. The contact angle of PCL/COL I meniscus scaffold $[(83.19\pm 7.49)^\circ]$ was significantly lower than that of PCL meniscus scaffold $[(111.13\pm 5.70)^\circ]$ ($t=6.638$, $P=0.000$). The results of the CCK-8 assay indicated that with time, the number of cells cultured in two scaffold extracts showed an increasing trend, and there was no significant difference when compared with the control group ($P>0.05$). Scanning electron microscope observation showed that the cells attached on the PCL/ COL I meniscus scaffold more than that on the PCL scaffold. **Conclusion** PCL/COL I meniscus scaffolds are prepared by 3D printing with low temperature deposition technique, which has excellent physicochemical properties without cytotoxicity. PCL/COL I meniscus scaffold is expected to be used as the material for meniscus tissue engineering.

【Key words】 Meniscus tissue engineering; low temperature deposition technique; Three-dimensional printing technology; scaffold material; physicochemical property

Foundation items: National Key Research and Development Plan of China (2017YFC1103404); National Natural Science Foundation of China (81772319, 21134004); Natural Science Foundation of Beijing (7172203)

半月板损伤是一种常见的运动损伤,随着参与体育锻炼的人越来越多,半月板损伤发病率呈逐年上升趋势。由于半月板特殊的解剖学结构^[1],临床治疗半月板损伤以部分或全部切除为主^[2]。半月板切除能短暂恢复功能和缓解症状,但明显增加骨关节炎的患病风险^[3-5]。组织工程的发展为半月板损伤的再生修复提供了新希望。组织工程的关键要素包括支架材料、种子细胞及生物因子^[6-7],因此选择合适的支架材料非常重要。大量研究表明,I型胶原有利于软骨细胞黏附、增殖和分化,且有利于软骨细胞最终形成纤维软骨^[8-9]。聚己内酯(poly-caprolactone, PCL)具有较好的力学特性,但生物相容性较差,细胞亲和力较低。

与传统支架制造技术相比,3D打印技术具有良好的重复性和对支架微观结构和形状的控制^[10]。此外,低温沉积技术3D打印可以实现PCL、I型胶原溶液一体化打印,并且不会破坏I型胶原蛋白。为此,本课题组提出采用低温沉积技术3D打印构建PCL/I型胶原组织工程半月板支架(以下简称PCL/I型胶原半月板支架),以期提供既具有良好力学支撑,又有利于半月板细胞黏附、增殖及维持表型的支架材料。我们前期预实验发现15%PCL/4%I型胶原溶液黏性最佳,本次实验在此基础上通过低温沉积技术3D打印制备PCL/I型胶原半月板支架,观察支架形态、微观结构、理化性能以及细胞毒性,为其体内研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

成年新西兰大白兔1只,体质量2.5 kg;3~4周龄新西兰大白兔3只,体质量0.5~0.6 kg,均购自中国人民解放军总医院实验动物中心。PCL、牛跟腱I型胶原、胶原酶、0.25%胰蛋白酶(Sigma公司,美国);六氟异丙醇、1,4-二氧六环[阿拉丁试剂(中国)有限公司];FBS(HyClone公司,美国);DMEM培养基(Corning公司,美国);细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8)试剂盒(同仁公司,日本);链霉素-青霉素双抗(GIBCO公司,美国)。

冷冻干燥机(北京博医康技术有限公司);计算机辅助设计软件UG(Siemens公司,德国);3D生物打印机(青岛尤尼科技有限公司);S-4800型扫描电镜(Hitachi公司,日本);BOSE 5100生物力学试验机(BOSE公司,美国);傅氏转换红外光谱分析仪(Ettlingen公司,德国);Nuona SL-200B滴状分析系统(美国科诺工业有限公司);CO₂培养箱(Heraeus公司,德国);Micro-CT(GE Healthcare公司,英国)。

1.2 实验方法

1.2.1 PCL/I型胶原溶液以及PCL溶液的制备
根据预实验结果,称取1.5 g PCL,分别加入10 mL含不同浓度(0、4%)I型胶原的1,4-二氧六环与六

氟异丙醇(比例为 9:1)溶液中,制备 15%PCL 溶液和 15% PCL/4% I 型胶原溶液。

1.2.2 PCL/I 型胶原半月板支架及 PCL 半月板支架的制备 取 1 只成年新西兰大白兔,空气栓塞处死后,取出内侧半月板并行 CT 扫描,将获得的半月板数据导入计算机辅助设计软件中,设计放射状与环形交叉的楔形取向性的半月板支架模型。然后,将半月板支架模型数据以 STL 格式导入 3D 打印控制软件中;打印参数:平台成型温度 -20°C ,打印层厚 0.1 mm,打印速度 10 mm/s。

将 1.2.1 中制备的两种溶液分别加入 3D 生物打印机料筒中进行打印,半月板支架初步成型后,依次行以下处理: -20°C 冰柜保存 4 h,冷冻干燥,乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺交联,再次冷冻干燥,75%乙醇浸泡 24 h,去离子水浸泡 10 次、每次 5 min, ^{60}Co 灭菌。PCL/I 型胶原半月板支架及 PCL 半月板支架均常温下保存备用。

1.3 观测指标

1.3.1 支架形态及微观结构观测 取两种支架大体观察其形态,然后冷冻干燥、喷金后,扫描电镜观察支架微观结构(大孔直径 $>200\ \mu\text{m}$ 、微孔直径 $<100\ \mu\text{m}$)。

1.3.2 支架力学性能检测 采用 BOSE 5100 生物力学试验机进行力学测试。① 压缩力学测试:将两种支架样本制备为 $10\ \text{mm}\times 10\ \text{mm}\times 5\ \text{mm}$ 柱状体,PBS 缓冲液浸润后进行压缩力学测试。预压缩 5%,压缩速率为 5 mm/min,压缩 20 个循环后进行正式测试,最大压缩 20%,获得应力-应变曲线,计算压缩模量。② 拉伸力学测试:将两种支架制备为 $16\ \text{mm}\times 10\ \text{mm}\times 2\ \text{mm}$ 的长方体,PBS 缓冲液浸润后进行拉伸力学测试。预拉伸 5%,拉伸 20 个循环后进行正式测试,获得应力-应变曲线,计算拉伸模量。

1.3.3 红外光谱分析 取 1.2.1 中制备的 PCL 溶液、PCL/I 型胶原溶液,冷冻干燥后获得与两种支架成分相同的样品。将样品切成 $10\ \text{mm}\times 10\ \text{mm}$ 的正方形片,以反射模式进行红外光谱分析,扫描范围为 $650\sim 4\ 000\ \text{cm}^{-1}$,鉴定支架的官能团。

1.3.4 表面接触角检测 取 1.2.1 中制备的 PCL 溶液、PCL/I 型胶原溶液,冷冻干燥后获得与两种支架成分相同的样品。用 27G 钝针微注射器将去离子水滴至样品表面,滴状分析系统捕获去离子水下落图像。根据水滴形状计算表面接触角,实验重复 5 次。

1.3.5 支架体外细胞毒性评估 ① 兔半月板细胞分离培养:取 3~4 周龄新西兰大白兔半月板组

织,参照本课题组前期研究方法^[11]分离培养半月板细胞,并传代。取第 3 代细胞进行实验。② 支架浸提液制备及 CCK-8 细胞毒性实验:根据 ISO 10993-12:2009 标准,将两种支架样品分别浸入 DMEM 培养基中,支架浸提比为 $3\ \text{cm}^2/\text{mL}$,于 $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 72 h。然后取浸提液用 $100\ \mu\text{m}$ 膜过滤,于浸提液中加入 FBS 至浓度为 10% (V/V)、双抗至浓度为 1% (V/V),获得两种支架的浸提液培养基。将半月板细胞接种至 96 孔板,每孔含 3×10^3 个细胞。每组有 5 个平行样本,对应加入 $100\ \mu\text{L}$ 浸提液培养基,于 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养 1、3、5 d 后,分别加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,继续孵育 2.5 h 后,用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(A)值。以正常培养基培养细胞作为对照。

③ 支架-细胞复合物制备及扫描电镜观察:将 1.3.2 中两种支架的力学标准件剪裁成 $5\ \text{mm}\times 5\ \text{mm}\times 2\ \text{mm}$ 大小, ^{60}Co 灭菌消毒。于半月板细胞中加入 DMEM 培养基,制备成浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液后,分别接种至两种支架上,每个支架 $100\ \mu\text{L}$ 。置于 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育 3 h 后,加入 DMEM 培养液,继续培养 1 d 后取出支架-细胞复合物,置于 2.5% 戊二醛固定 3 d,梯度乙醇脱水后,临界点干燥,样品喷金后,扫描电镜观察细胞在支架表面黏附及生长情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 支架形态及微观结构观测

大体观察,两种支架形态呈环向与径向交叉的楔形形状。见图 1。扫描电镜观察,两种半月板支架表面均可见大孔及棱径上的微孔,PCL/I 型胶原半月板支架表面较粗糙,而 PCL 半月板支架表面较光滑;PCL 半月板支架棱径上的微孔中无纤维连接,而 PCL/I 型胶原半月板支架棱径的微孔中有一些纤维连接。见图 2。

2.2 支架力学性能检测

PCL 半月板支架、PCL/I 型胶原半月板支架压缩模量分别为 $(2\ 830.04\pm 734.83)$ 、 $(2\ 531.61\pm 497.88)$ kPa,拉伸模量分别为 $(2\ 057.17\pm 250.30)$ 、 $(1\ 937.27\pm 200.45)$ kPa,比较差异无统计学意义($t=0.752$, $P=0.474$; $t=0.836$, $P=0.427$)。

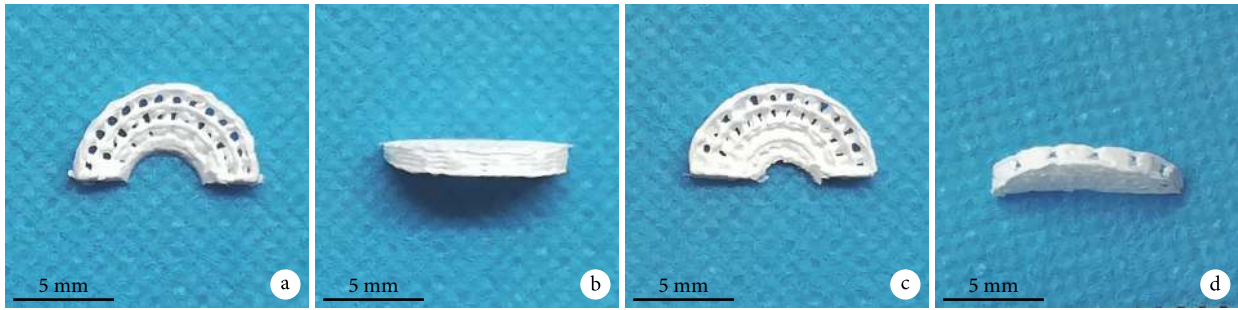


图1 半月板支架大体观察 a、b. PCL半月板支架；c、d. PCL/ I型胶原半月板支架

Fig.1 Gross observation of the meniscus scaffolds a, b. PCL meniscus scaffolds; c, d. PCL/COL I meniscus scaffolds

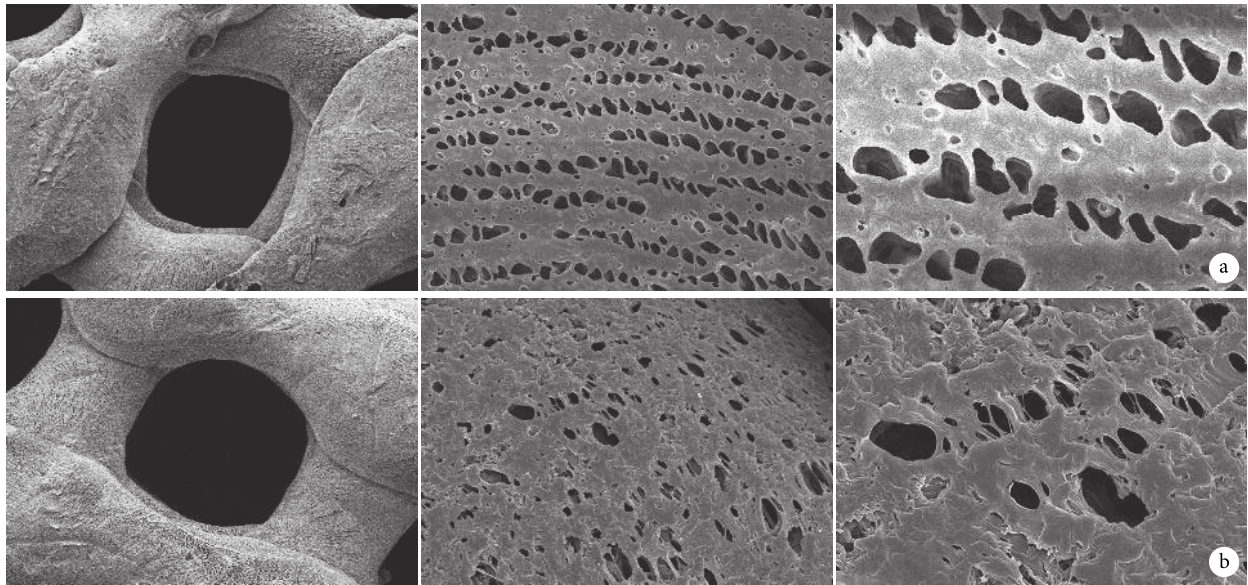


图2 半月板支架扫描电镜观察 从左至右分别为放大100、2000、5000倍 a. PCL半月板支架；b. PCL/ I型胶原半月板支架

Fig.2 Scanning electron microscope observation of the meniscus scaffolds From left to right for the magnifications of 100, 2000, and 5000 times, respectively a. PCL meniscus scaffold; b. PCL/COL I meniscus scaffold

2.3 红外光谱分析

PCL半月板支架光谱图示,在约 1722 cm^{-1} 处存在羰基特征峰,在约 1165 cm^{-1} 处特征峰对应于PCL中的C-O键。PCL/ I型胶原半月板支架光谱图示,约 1165 cm^{-1} 处特征峰对应的C-O键较PCL半月板支架减少;而约 1722 cm^{-1} 处特征峰增加。提示PCL/ I型胶原半月板支架中PCL和I型胶原成功混合。见图3。

2.4 表面接触角检测

PCL/ I型胶原半月板支架表面接触角为 $(83.19\pm 7.49)^\circ$,较PCL半月板支架的 $(111.13\pm 5.70)^\circ$ 显著减小,差异有统计学意义($t=6.638, P=0.000$);而且,水滴可以被PCL/ I型胶原半月板支架吸收。

2.5 支架体外细胞毒性评估

CCK-8检测显示,随时间推移,两种支架浸提液培养的细胞数量呈递增趋势;各时间点与对照

组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),提示两种支架均无细胞毒性。见图4。

支架-细胞复合物扫描电镜观察半月板细胞均可在两种支架表面黏附、生长,其中PCL/ I型胶原半月板支架表面黏附的细胞多于PCL半月板支架。见图5。

3 讨论

研究发现,半月板大多数胶原纤维束呈环周形排列,少量胶原纤维呈放射状排列^[12]。本研究以成年新西兰大白兔半月板为支架模型,采用低温沉积3D打印技术成功制备了具有环向与径向交叉的楔形形态的半月板支架,与天然半月板的微观结构一致。多孔孔径支架有利于细胞增殖、分化^[13-14],而且粗糙度高的材料比表面积大,可以增大细胞与材料的接触面积,从而利于细胞黏附、生长^[15-16]。本研究扫描电镜结果显示,两种半月板支架均具有大孔

及微孔,有利于营养的供给和代谢废物的排出,而且 PCL/I 型胶原半月板支架表面比 PCL 半月板支架更粗糙,提示前者更有利于细胞黏附、生长。生物力学测试提示,PCL/I 型胶原半月板支架拉伸模量及压缩模量与 PCL 半月板支架相比,差异均无统计学意义,但前者两指标实际测量值小于后者,分析可能与单位体积内 PCL 含量降低有关。红外光谱分析结果显示,PCL/I 型胶原支架材料特征峰与 PCL 支架材料相比发生了变化,证明 I 型胶原蛋白和 PCL 成功混合。因为 I 型胶原蛋白有益于软骨细胞的黏附、增殖和分化,且有利于软骨细胞最终形成纤维软骨^[18,17],所以我们认为 PCL/I 型胶原半月板支架比单纯 PCL 半月板支架更适合半月板损伤的再生修复。

Ghosal 等^[18]研究发现 PCL 和胶原蛋白结合后,其表面接触角减小。本研究表面接触角检测结果显示,当水滴滴向支架时,PCL/I 型胶原半月板支架表面接触角显著小于单纯 PCL 半月板支架表面接触角,提示 I 型胶原的加入明显增加了半月板支架的亲水性,这与 I 型胶原蛋白中存在亲水基团密切相关。Kirchhof 等^[19]提出通常情况下,亲水性材料表面更益于细胞的黏附、生长。亲水性分析结果也从一方面提示了 PCL/I 型胶原半月板支架的生物相容性优于 PCL 半月板支架。体外 CCK-8 细胞毒性实验进一步表明,低温沉积技术 3D 打印制备的

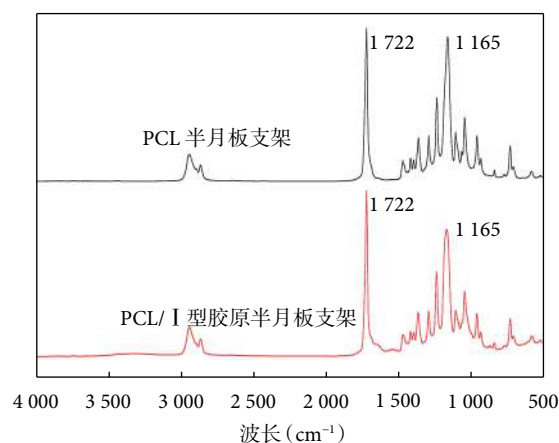


图 3 半月板支架红外光谱图

Fig.3 FTIR of the meniscus scaffolds

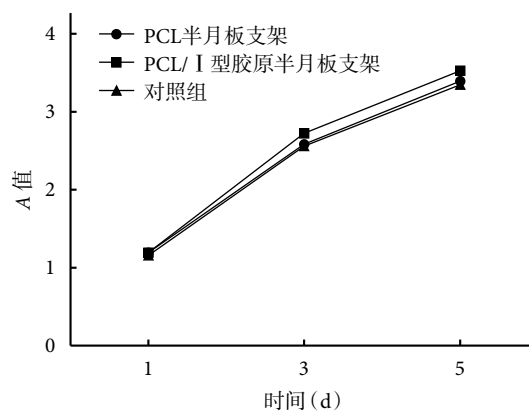


图 4 CCK-8 检测半月板支架细胞毒性

Fig.4 The cytotoxicity of the meniscus scaffolds by CCK-8

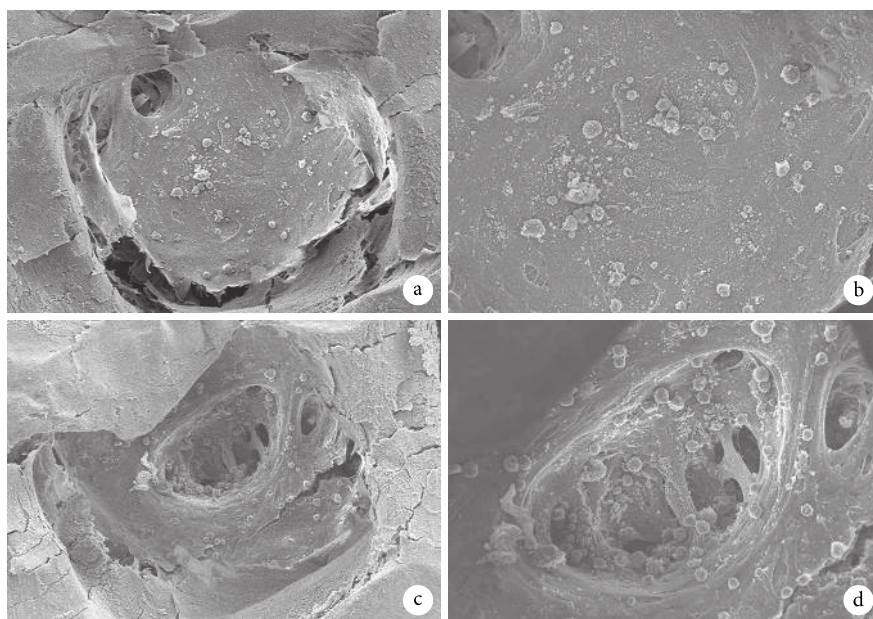


图 5 支架-细胞复合物扫描电镜观察 a、b. 放大 150、300 倍下 PCL 半月板支架-细胞复合物; c、d. 放大 150、300 倍下 PCL/I 型胶原半月板支架-细胞复合物

Fig.5 Scanning electron microscope observation of scaffold-cell complex a, b. PCL meniscus scaffold-cell complex at the magnifications of 150 and 300 times; c, d. PCL/COL I meniscus scaffold-cell complex at the magnifications of 150 and 300 times

PCL/ I 型胶原半月板支架及 PCL 半月板支架均无细胞毒性。体外支架-细胞复合物扫描电镜观察结果也验证了 PCL/ I 型胶原半月板支架材料较单纯 PCL 半月板支架材料有利于细胞黏附、生长。

由于半月板整体及微观结构和细胞外基质成分呈区域性变化,所以半月板是各向异性及不均一的组织,导致其生物力学也呈各向异性。本实验利用低温沉积 3D 打印技术制备的 PCL/ I 型胶原半月板支架呈环向与径向交叉的楔形形态,基本实现了半月板整体及微观结构的仿生,一定程度实现了半月板生物力学的各向异性。但是构建结构和成分双仿生的组织工程半月板,达到完全生物力学各向异性还需要进一步研究。此外,本研究结果提示该支架具有优良的理化性能及细胞黏性能,无细胞毒性,下一步我们将继续完善该支架材料的生物相容性评估及动物体内修复半月板的评价。

参考文献

- Pereira H, Caridade SG, Frias AM, *et al.* Biomechanical and cellular segmental characterization of human meniscus: building the basis for Tissue Engineering therapies. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(9): 1271-1281.
- Abrams GD, Frank RM, Gupta AK, *et al.* Trends in meniscus repair and meniscectomy in the United States, 2005-2011. *Am J Sports Med*, 2013, 41(10): 2333-2339.
- Hasan J, Fisher J, Ingham E. Current strategies in meniscal regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014, 102(3): 619-634.
- Howell R, Kumar NS, Patel N, *et al.* Degenerative meniscus: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *World J Orthop*, 2014, 5(5): 597-602.
- Mordecai SC, Al-Hadithy N, Ware HE, *et al.* Treatment of meniscal tears: An evidence based approach. *World J Orthop*, 2014, 5(3): 233-241.
- Pereira H, Frias AM, Oliveira JM, *et al.* Tissue engineering and regenerative medicine strategies in meniscus lesions. *Arthroscopy*, 2011, 27(12): 1706-1719.
- Guo W, Liu S, Zhu Y, *et al.* Advances and prospects in tissue-engineered meniscal scaffolds for meniscus regeneration. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 517520.
- Ohno T, Tanisaka K, Hiraoka Y, *et al.* Effect of type I and type II collagen sponges as 3D scaffolds for hyaline cartilage-like tissue regeneration on phenotypic control of seeded chondrocytes *in vitro*. *Materials Science and Engineering: C*, 2004, 24(3): 407-411.
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, *et al.* Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro*. *J Biomed Mater Res*, 1997, 38(2): 95-104.
- Mota C, Puppi D, Chiellini F, *et al.* Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 2015, 9(3): 174-190.
- 陈明学, 郭维民, 沈师, 等. 半月板细胞外基质-海藻酸水凝胶的制备及其对半月板细胞的影响. *中国医药生物技术*, 2017, 12(6): 505-512.
- Niu W, Guo W, Han S, *et al.* Cell-based strategies for meniscus tissue engineering. *Stem Cells International*, 2016, 2016: 4717184.
- Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(11): 3813-3828.
- Zhao C, Tan A, Pastorin G, *et al.* Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(5): 654-668.
- Wang YQ, Cai JY. Enhanced cell affinity of poly(l-lactic acid) modified by base hydrolysis: Wettability and surface roughness at nanometer scale. *Current Applied Physics*, 2007, 7: e108-e111.
- Chung TW, Liu DZ, Wang SY, *et al.* Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials*, 2003, 24(25): 4655-4661.
- Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, *et al.* Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. *Joint Bone Spine*, 2005, 72(3): 235-240.
- Ghosal K, Thomas S, Kalarikkal N, *et al.* Collagen coated electrospun polycaprolactone (PCL) with titanium dioxide (TiO₂) from an environmentally benign solvent: preliminary physico-chemical studies for skin substitute. *Journal of Polymer Research*, 2014, 21(5): 1-5.
- Kirchhof K, Groth T. Surface modification of biomaterials to control adhesion of cells. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2008, 39(1-4): 247-251.

收稿日期: 2018-03-20 修回日期: 2018-07-20

本文编辑: 刘丹