

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.002.html>

明胶复合羟基磷灰石支架材料促进大鼠骨髓干细胞增殖与分化

郭雨晴 张菁 李 颂

摘要 目的 利用共沉淀法合成的明胶复合羟基磷灰石支架材料,研究其理化性质对大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响。方法 采用不同循环次数的共沉淀法制备复合羟基磷灰石的明胶载体并对材料理化表征进行分析;采用扫描电镜、CCK-8、死活实验观察材料对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响,碱性磷酸酶定量分析材料对其分化的影响。结果 扫描电镜显示复合支架材料表面有棒状颗粒沉淀;X射线衍射显示沉淀物为羟基磷灰石。与对照组相比较,扫描电镜观察结果显示鼠骨髓间充质干细胞在1循环材料上黏附和伸展情况最良好;CCK-8实验结果显示1循环材料促进细胞增殖,ALP实验结果显示与1循环材料增强碱性磷酸酶的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 该实验制备的羟基磷灰石明胶支架材料利于大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,并促进其向成骨细胞分化,有望为临床骨缺损提供新型支架材料。

关键词 共沉淀法;羟基磷灰石;明胶;骨组织工程;细胞相容性

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0159-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.002

骨缺损是常见的临床问题或某些疾病的并发症,是指破坏骨的结构完整性。临床上修复骨缺损的方法有骨移植、骨组织工程等。骨组织工程是指将具有成骨能力的种子细胞接种在具有骨传导能力的支架材料上,经体外培养使细胞与支架材料融合,再植入人体缺损组织部位,最终达到修复或替代缺损组织的目的。

明胶是胶原蛋白的水解产物,由于其良好的生物相容性和不存在免疫原反应等特点,有望成为支架材料的理想选择^[1]。但是明胶力学性能差,生物

降解性过快,单纯明胶材料缺乏足够的生物活性来刺激骨形成能力^[2],因此单独使用难以满足组织构建的要求。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是动物及人体骨骼的主要无机成分,HA植入后能与骨组织形成很强的化学结合,是目前公认的最理想的人工骨的硬组织替代材料^[3]。从仿生学的角度看,HA与明胶复合不但可以提高生物相容性,而且从成分和结构上能更好地模拟天然骨,所以明胶/HA复合有望成为新型骨组织工程支架材料。该研究拟利用自然沉淀法将HA和明胶制备成与天然骨组织成分相似的仿生多孔支架材料,并探讨其对大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响,旨在为其在骨缺损修复领域中的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠,4周龄,购自安徽医科大学实验动物中心,动物许可证号:scxk(皖)2017-001。

1.1.2 主要试剂和仪器 无水氯化钙粉末、氯化钠粉末和无水磷酸氢二钠粉末均为上海国药集团化学试剂有限公司产品;明胶是上海晶纯实业有限公司产品;冷冻干燥机系美国Labconco公司产品;扫描电镜(Sirion200)系荷兰FEI公司产品;X射线衍射仪(XPert PRO)系荷兰飞利浦公司;CCK-8试剂为日本同仁公司产品;碱性磷酸酶试剂盒系南京建成生物工程研究所产品;酶标仪(MQX200)为美国Bio-tek公司生产。

1.2 方法

1.2.1 支架材料的制备 将1.25 g明胶粉末溶于50 ml去离子水中,加热溶解制备成2.5%的明胶水溶液,待明胶水溶液冷却至室温,将其放入4℃冰箱冷却成固态水凝胶,然后将水凝胶制成直径为8 mm、厚度为3 mm的圆形,于4℃冰箱中交联过夜,去离子水充分漂洗,制备出明胶材料。将上述制备出的明胶水凝胶材料交替放入 PO_4^{3-} 的溶液(0.13 mol/L, pH ≈ 7.0)、 Ca^{2+} 的溶液(0.26 mol/L, pH ≈

2019-11-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81400497);安徽省自然科学基金(编号:1408085QH178)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:郭雨晴,女,硕士研究生;

李 颂,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 3197053337@qq.com

7.0) 搅拌浸泡各 2 h 为一次循环(1HA), 重复浸泡分两次循环(2HA)、三次循环(3HA), 再用去离子水多次间隔浸泡材料 2~3 d, 置 -20 °C 冻存后再冷冻干燥 48 h, 制备出四组共沉淀循环次数不同的颗粒级别支架材料。

1.2.2 扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察表面结构及微形貌 将冷冻干燥后的四组支架材料修整成小块, 用导电胶粘于圆形金属板上, 喷金镀膜后用 Sirion200 环境扫描电子显微镜观察四组支架材料的微形貌、孔径大小等结构。

1.2.3 支架材料的 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 将冷冻干燥后的复合材料碾碎成粉末状, 在 X 射线衍射仪(荷兰 X'Pert PRO) 上分析粉末状支架。绘制出 HA 的 2 θ 值以及强度, 以确定复合支架材料中 HA 的存在。

1.2.4 支架材料孔隙率的测定 用改良的液体位移法进行材料孔隙率的测定。将同等大小不同配比的支架分别放入含有 20 ml 无水乙醇的量筒内, 记放入前体积为 V_1 , 支架浸泡 1 d 后, 待空气溢出记体积为 V_2 , 取出样品后剩余乙醇体积记为 V_3 , 每组测定 3 个样品, 取平均值。最后计算材料孔隙率^[4]: $P = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100\%$ 。

1.2.5 支架材料降解率的测定 将四组支架材料修整成厚度约 2 mm, 直径约 8 mm 的大小, 放置于 15 ml 的离心管中, 分析了支架的降解情况。记录每个支架材料的初始干重 W_0 , 注入 15 ml PBS, 放置在 37 °C 环境中。每周用新鲜的 PBS 溶液代替之前的 PBS。在第 1、7、14、28、42 天这 5 个时间点, 小心地将支架材料转移到一个 24 孔板中, 用去离子水振荡冲洗 5 次。然后将支架材料转移到无菌棉纱上 5 min 以吸尽多余的去离子水, 最后冷冻干燥 48 h。将支架材料完全干燥后, 记录各时间点的干重 W_1 , 并与相应支架材料的初始重量进行除法, 计算体外相对失重率: $P = (W_0 - W_1) / W_0 (n=4)$ 。

1.2.6 SD 大鼠的骨髓间充质干细胞的原代培养和传代 取 4 周龄 SD 雄性大鼠, 脱颈处死, 用 75% 酒精浸泡 15 min, 在超净台中剔除软组织, 暴露股骨和胫骨, 露出骨髓端, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液冲出骨髓, 充分混匀, 将原代细胞置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度孵箱内培养, 接种 72 h 后首次换液去除未贴壁细胞。当原代细胞汇合 90% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.7 材料浸提液的制备及细胞死活染实验检测 将消毒灭菌处理过的四组支架材料明胶/HA 复

合材料, 按质量/浸提介质 = 1 g/10 ml 的比例加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液浸泡, 置于 37 °C 环境下 72 h, 离心、过滤, 即得材料浸提液, 于 4 °C 保存备用。取生长状态良好的第 2 代鼠骨髓间充质干细胞, 按每孔 2×10^5 个细胞接种到 6 孔板中的细胞爬片上, 每孔接种细胞悬液 2 ml。在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养 24 h。细胞贴壁 24 h 后, 吸去上清液, 加入浸提液 2 ml, 阴性对照为含明胶浸提液的 DMEM 培养液、普通 DMEM 培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度环境下培养。在培养第 1、3、5 天时, 吸弃培养液, 加入吖啶橙/碘化丙啶混合染色液 1 ml, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下继续孵育 30 min, 在荧光显微镜下观察细胞的死活情况。

1.2.8 细胞增殖实验检测 取生长状态良好的第 2 代鼠骨髓间充质干细胞, 按每孔 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板中, 每孔接种细胞悬液 150 μ l。在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养 24 h。细胞贴壁 24 h 后, 吸去上清液, 加入浸提液 100 μ l, 阴性对照为含明胶浸提液的 DMEM 培养液, 每组同时设 5 个平行孔, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度环境下培养。在培养第 1、3、5、7 天时, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下继续孵育 1 h, 在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度值。

1.2.9 细胞与材料的共培养 将消毒灭菌后的材料置入 24 孔培养板中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下浸泡 3 d 后吸去大部分培养基, 待材料表面微干后准备接种细胞。取生长状态良好的第 2 代鼠骨髓间充质干细胞, 以 $2 \times 10^5 / 20 \mu$ l 个细胞高浓度的接种到支架材料上, 于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度环境下孵育 30 min 后, 加入适量的培养液, 每 2 d 换液 1 次。细胞接种第 2、5 天后各取 1 片材料, 用 2.5% 戊二醛固定 24 h, PBS 冲洗 3 次, 乙醇梯度脱水后用临界点干燥, 将干燥后的复合材料修整成小块, 粘于小圆形金属板上, 离子溅射仪喷金镀膜后用 Sirion200 环境扫描电镜观察细胞在材料上的黏附及伸展情况。

按上述方法接种细胞, 分别于细胞接种后第 1、3、5、7 天吸去孔内培养液, PBS 洗 3 次, 然后加入 1% Triton X-100 0.5 ml, 置于 4 °C 冰箱 30~40 min, 按照碱性磷酸酶检测试剂盒操作说明, 检测碱性磷酸酶活性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对每个时间点的

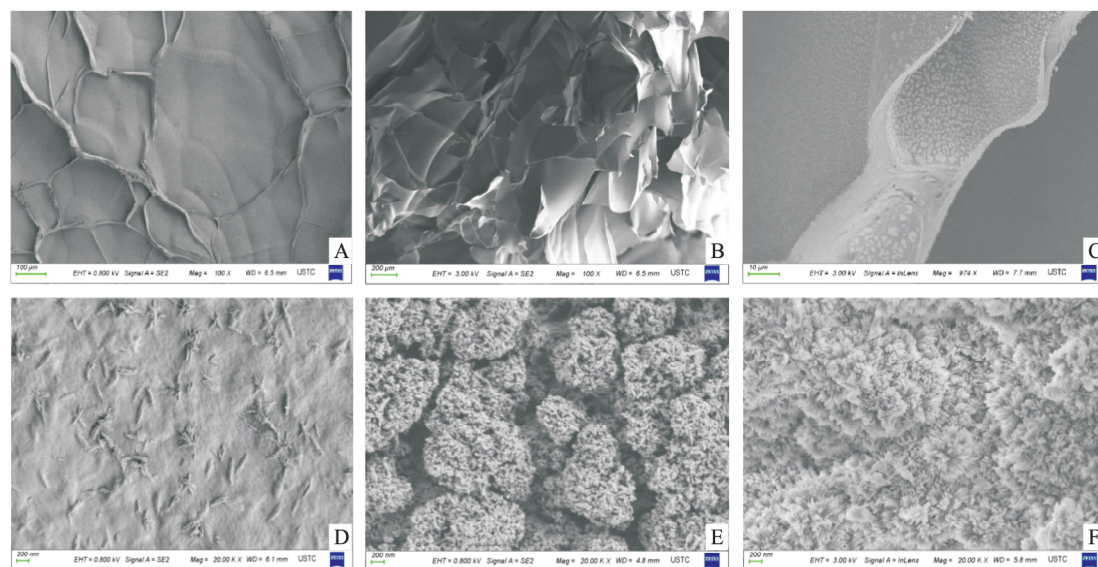


图1 明胶、1HA、2HA、3HA 组扫描电镜下的微形貌

A、B: 明胶组的表面和截面形状 $\times 100$; C: 可见 1HA 材料截面的孔洞壁上沉积着大小不一的 HA 晶体 $\times 974$; D ~ F: 明胶/HA 组表面沉积不同颗粒级别的 HA 晶体 $\times 20\,000$

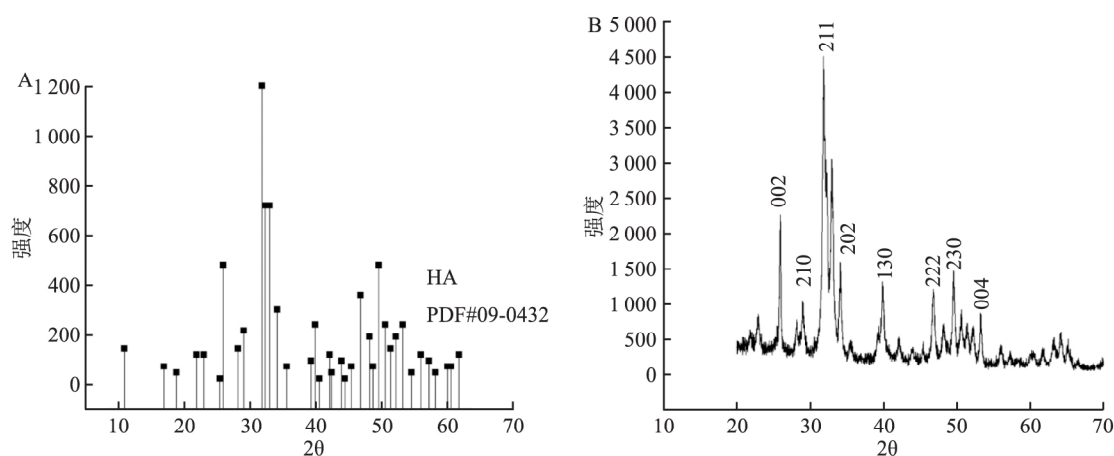


图2 样品的 XRD 图谱

A: 羟基磷灰石的标准 XRD 图谱; B: 支架材料的 XRD 图谱

实验组和对照组之间进行 t 检验, 方差不齐者采用校正 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支架材料的电镜观察 明胶支架材料明胶组表面光滑(图 1A), 其截面呈三维多孔状, 孔洞丰富, 孔径 $200 \sim 400\ \mu\text{m}$ (图 1B)。在低倍镜下, 可见 1HA 截面的孔洞壁上沉积着大小不一的类似 HA 的晶体颗粒(图 1C)。明胶/HA 支架材料三组复合材料组表面沉积的晶体颗粒数量, 随着矿化循环次数的增加而增多, 其形态类似于 HA 的晶体颗粒(图 1D、E、F)。

2.2 支架材料的 X 射线衍射 在图 2B 中, 支架材料在 2θ 为 25.94° 、 28.92° 、 31.8° 、 34.08° 、 39.84° 、 46.76° 、 49.54° 、 53.26° 处出现强度不同的衍射峰, 与图 2A 羟基磷灰石的标准卡片对比, 分别归属于羟基磷灰石晶体的 (002)、(210)、(211)、(202)、(130)、(222)、(230)、(004) 面, 可以推断出复合支架材料上沉积的晶体颗粒为羟基磷灰石晶体。

2.3 支架材料孔隙率的测定 与合成的明胶组 (74.23 ± 0.019) 孔隙率对比, 1HA、2HA、3HA 孔隙率分别为 (71.11 ± 0.077)%、(42.06 ± 0.084)%、(37.62 ± 0.157)%、(26.67 ± 0.012)%, 随着离子

共沉淀次数增加,材料的孔隙率逐渐降低,差异有统计学意义($F = 10.966$, $P < 0.05$)。

2.4 支架材料的体外降解检测 四组支架材料的质量随时间的延长均逐渐降低,前期阶段,失重率较大是由于明胶材料的降解,后期主要的羟基磷灰石的降解,虽然降解速率减慢,但仍可降解。在第42天后,应用SPSS 17.0软件对四组支架材料的重量减少率进行 χ^2 检验,两两比较,在0.05水平下,6周后四组支架材料降解率的差异有统计学意义($P < 0.05$),见图3。由图可知,复合材料中明胶的含量不同,其降解速率也不同。

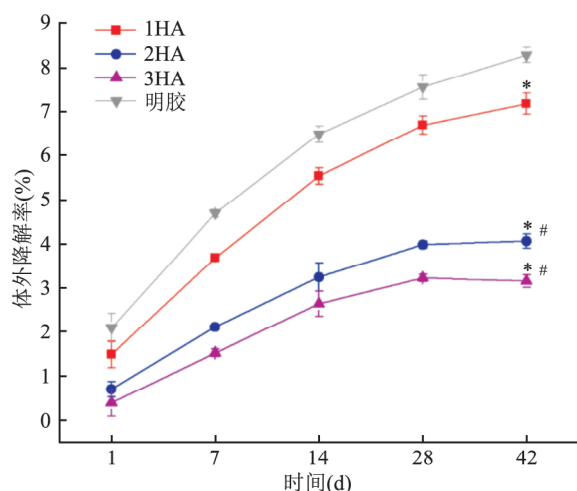


图3 四组循环支架材料的体外降解实验
与明胶组比较: * $P < 0.05$; 与1HA组比较: # $P < 0.05$

2.5 细胞在材料上的黏附、伸展情况 细胞接种后第2天,在复合支架材料上细胞呈梭形或多角形;细胞接种后第5天,与2HA、3HA和明胶支架材料对比,1HA支架材料上的细胞数量较多,细胞形态良好,聚集成片,呈多角形或三角形(图4)。

2.6 细胞的死活染色 采用AO/PI染色剂检测在浸提液中培养细胞的死活染色实验结果显示:随着培养时间的延长,在第1、3、5天这3个时间点,1HA和明胶组的活细胞数量均多于2HA、3HA组,与第1、3天明胶组比较,1HA组的活细胞数量略少,在第5天,1HA组的活细胞数量略多于明胶组,见图5。

2.7 细胞在材料上的增殖情况 CCK-8法检测细胞在支架材料浸提液中增殖的结果,材料组和明胶组吸光度值随时间延长而逐渐升高,第1天和第3天,明胶组均大于材料组,第5天和第7天时,1HA组大于2HA、3HA组,且也大于明胶组。材料组与明胶组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$),见图6。

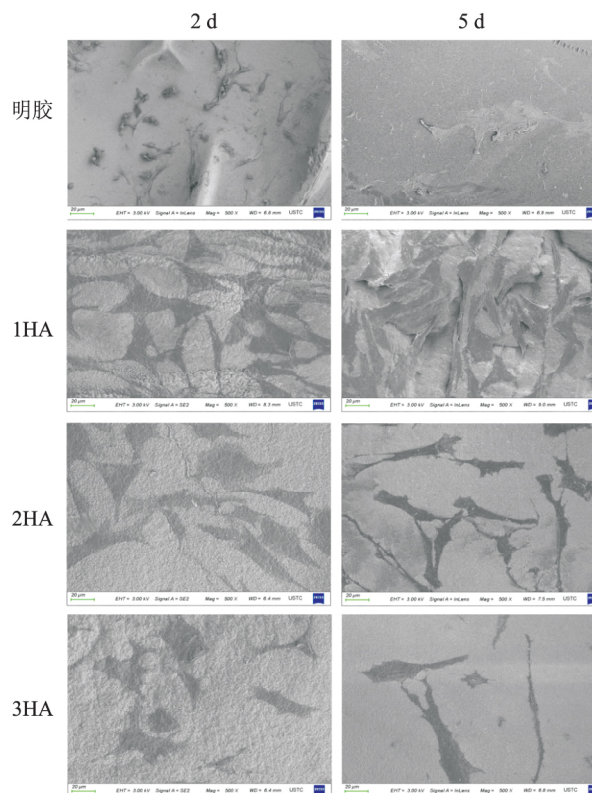


图4 扫描电镜下鼠骨髓间充质干细胞在支架材料上的黏附、伸展情况 ×500

2.8 细胞在材料上的分化 采用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞在支架材料上的碱性磷酸酶活性表达的结果显示:随着时间的延长,材料组和明胶组碱性磷酸酶活性都升高,第1、3、5、7天,1HA组活性均高于对照组;第3、5、7天对照组活性均高于2HA、3HA组,接种后四组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图7。

3 讨论

复合材料是把几种材料复合在一起使其中各个材料同时发挥它们各自的优势,可以满足人体机体多样性的要求,更好地实现其在生物体内的修复功能,成为近几年研究和应用最为广泛的一种新型修复材料。目前,文献报道中HA和明胶复合物的制备方法主要有悬浮法、共沉淀法和模拟体液SBF浸泡法。悬浮法制备支架材料易导致HA颗粒的分布不均匀;SBF浸泡法制备支架材料时HA形成缓慢且过程不可控^[5];电泳沉积制备HA涂层时存在HA涂层与基底材料结合强度低的问题。该实验是采用离子自然交替共沉淀法,将交联好的明胶材料交替放入含有高浓度的磷酸根离子溶液和钙离子溶液

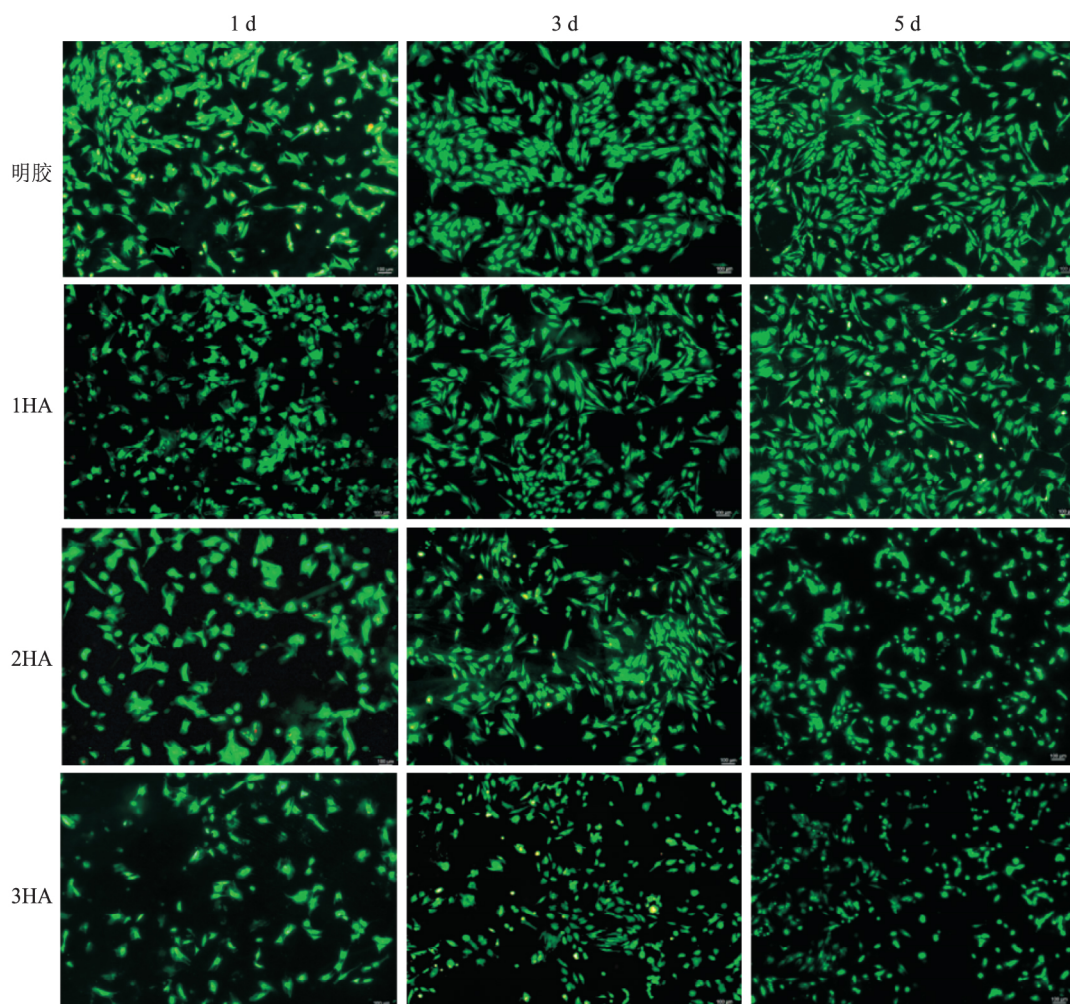


图5 细胞在支架材料浸提液中的死活染色倒置荧光显微镜下观察 ×50

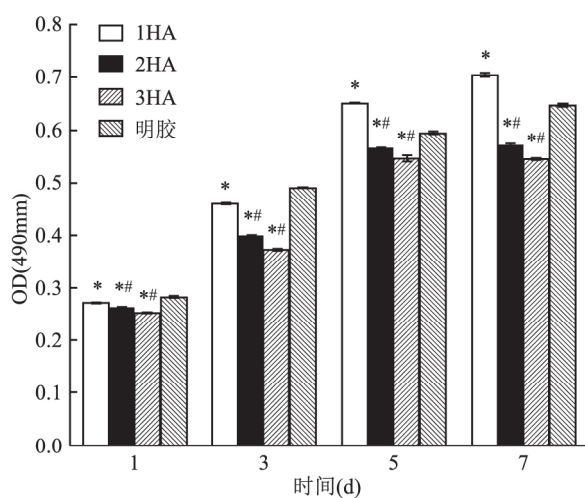


图6 细胞在浸提液中增殖情况

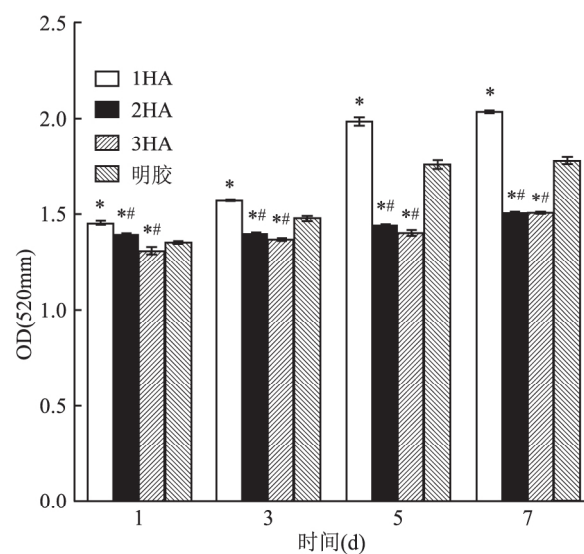
与明胶组比较: * $P < 0.05$; 与1HA组比较: # $P < 0.05$ 

图7 细胞在支架材料上的分化情况

与明胶组比较: * $P < 0.05$; 与1HA组比较: # $P < 0.05$

中,使磷酸根离子和钙离子自然沉淀在明胶材料上,更容易结合生成相对均质的HA颗粒,最后通过冷冻干燥技术制备出所需要的明胶/HA三维多孔状

结构的复合支架材料。2015年,Suzawa et al^[6]采用离子自然交替共沉淀法在琼脂糖材料上沉积HA,

并在琼脂/HA 复合材料上种植骨髓间充质干细胞,实验结果显示采用该方法制备出的支架材料与细胞结合可修复临界骨缺损。与琼脂相比,胶原具有更好的生物相容性和降解性,但其机械强度较低,诱导骨再生能力差,明胶是一种胶原蛋白的水解产物,有较低的抗原性,与 HA 的复合材料具有一定的机械强度等优点,被广泛应用于生物材料的合成。因此,该实验利用离子交替共沉淀法合成明胶/HA 支架材料。

扫描电镜结果显示,单纯明胶材料表面光滑,截面呈多孔状,实验组材料表面沉积颗粒数及大小与其矿化循环次数成正比。通过 XRD 检测,证实其沉积物是 HA 晶体颗粒。1HA 和明胶支架材料孔径约为 200 μm ,孔隙分布较均匀,但 2HA 和 3HA 支架材料的孔径随着 HA 晶体颗粒的增大而变小。Itälä et al.^[7]通过将不同孔径的钛种植体植入兔的股骨,发现孔径在 50 ~ 125 μm 范围内都适合兔新生骨组织的生长。小鼠前成骨细胞在可降解的聚乳酸支架材料上最适合生长的孔径为 70 μm ^[8],但在陶瓷材料上最适合生长的孔径为 150 μm ^[9]。由此可见,除了支架材料的孔径结构,其材料类型以及在其上培养的细胞类型也是影响细胞增殖能力的重要参数。支架材料虽然能为缺损部位提供三维结构,但其在体内仍是一种异物存在,通过体外降解实验显示,1HA 和明胶组在 6 周后的降解率分别高达 (7.18 $\pm$ 0.24) % 和 (8.29 $\pm$ 0.17) %,表明该支架材料具有生物降解性。通过与人松质骨的孔径和孔隙率比较,该实验合成的 1HA 和明胶支架材料基本符合植骨材料要求,有利于体液和营养因素的传递、间充质干细胞的长入和组织的形成。

有研究^[6]表明,除了孔径大小、孔隙率及相互连通的结构、化学组成等理化特性外,组成材料的颗粒级别也影响材料与细胞之间的相互作用。研究^[10]表明 100 nm 以上的 HA 有利于促进细胞生长,本实验制备出的明胶/HA 支架材料表面沉积不同颗粒级别的 HA 晶体,1HA 晶体成棒状,大小为 100 ~ 200 nm; 2HA 晶体成圆团状,大小为 200 ~ 600 nm; 3HA 晶体成花簇状,大小约大于 600 nm。通过比较三组 HA 不同颗粒级别的支架材料,SEM 结果显示大鼠骨髓间充质干细胞在 1HA 材料细胞分布广泛,形态均匀。死活染色和 CCK-8 结果证实,与对照组相比,1HA 材料组增强大鼠骨髓间充质细胞的增殖能力,而 3HA 明显抑制 rBMSC 的增殖能力,说明 1HA 材料组具有良好的生物相容性和促进

rBMSC 的增殖能力。

组织工程包括细胞、细胞因子和支架材料,骨髓间充质干细胞具有成血管^[11]、成软骨^[12]和成骨^[13]等多向分化潜能,本实验以 SD 大鼠骨髓间充质干细胞为种子细胞,通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活力检测实验结果证明了 1HA 支架材料在体外矿化诱导条件下,显著增强 ALP 的分泌,说明利用离子自然交替共沉淀法合成的明胶/HA 材料有良好的细胞相容性,且可促进鼠骨髓间充质细胞的增殖体外分化能力。Xia et al.^[14]利用 rBMSC 与多孔 HA 生物瓷材料修复大鼠颅骨缺损,以明胶为基质的 HA 支架材料复合生长因子,促进前成骨细胞在腹部肌肉袋囊中形成骨类似组织^[15]。结合本实验的体外结果,1HA 明胶复合支架材料有望为后续的动物体内实验提供理论依据。

该课题在前期研究基础上,利用共沉淀法,在明胶材料上交替沉淀钙磷离子,根据循环次数制备出不同颗粒级别的三维多孔结构的羟基磷灰石复合材料。实验结果表明该方法制备出的 1HA 复合支架材料具有良好的生物相容性,促进 rBMSC 的增殖和分化,其有可能成为新型的骨组织工程支架材料。

参考文献

- [1] Chai Q, Jiao Y, Yu X. Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them[J]. *Gels* 2017, 3(1): E6.
- [2] Otsuka M, Nakagawa H, Otsuka K, et al. Effect of geometrical structure on the *in vivo* quality change of a three-dimensionally perforated porous bone cell scaffold made of apatite/collagen composite[J]. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2013, 101(2): 338–45.
- [3] Yang X, Li Y, Liu X, et al. *In vitro* uptake of hydroxyapatite nanoparticles and their effect on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 2036176.
- [4] 钟红荣, 张岩, 包红, 等. 丝素/明胶/壳聚糖支架材料的构建及表征[J]. *材料导报* 2018, 32(22): 3954–60.
- [5] Zhang D, Wu X, Chen J, et al. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2017, 3(1): 129–38.
- [6] Suzawa Y, Kubo N, Iwai S, et al. Biomineral/agarose composite gels enhance proliferation of mesenchymal stem cells with osteogenic capability[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(6): 14245–58.
- [7] Itälä A I, Ylänen H O, Ekholm C, et al. Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits[J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 58(6): 679–83.
- [8] Danilevicius P, Georgiadi L, Pateman C J, et al. The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, poly-

- lactide-based 3D scaffolds [J]. *Appl Surf Sci*, 2015, 336: 2 – 10.
- [9] Hadjicharalambous C, Prymak O, Loza K, et al. Effect of porosity of alumina and zirconia ceramics toward pre-osteoblast response [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015, 3: 175.
- [10] Okada S, Ito H, Nagai A, et al. Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite [J]. *Acta Biomater*, 2010, 6 (2): 591 – 7.
- [11] Liu G, Li L, Huo D, et al. A VEGF delivery system targeting MI improves angiogenesis and cardiac function based on the tropism of MSCs and layer-by-layer self-assembly [J]. *Biomaterials*, 2017, 127: 117 – 31.
- [12] Guo P, Shi Z L, Liu A, et al. Cartilage oligomeric matrix protein gene multilayers inhibit osteogenic differentiation and promote chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20117 – 33.
- [13] Xing H, Wang X, Xiao S, et al. Osseointegration of layer-by-layer polyelectrolyte multilayers loaded with IGF1 and coated on titanium implant under osteoporotic condition [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 7709 – 20.
- [14] Xia L, Lin K, Jiang X, et al. Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bio-ceramic scaffolds *via* activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(40): 5403 – 16.
- [15] Raina D B, Larsson D, Mrkonjic F, et al. Gelatin-hydroxyapatite-calcium sulphate based biomaterial for long term sustained delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid for increased bone formation: *in-vitro* and *in-vivo* carrier properties [J]. *J Control Release*, 2018, 272: 83 – 96.

Gelatin based hydroxyapatite scaffold enhances the proliferation and differentiation of rat bone mesenchymal stem cells

Guo Yuqing, Zhang Jing, Li Song

(The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Stomatological College of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei 230032)

Abstract Objective To evaluate the physicochemical properties of hydroxyapatite (HA) /gelatin porous scaffold and its effect on the proliferation and differentiation of rat bone mesenchymal stem cells (rBMSC). **Methods** HA /gelatin scaffold was fabricated by using coprecipitation method with different cycle times. And evaluated the structural/chemical characterization of the scaffolds. Cellular proliferation of rBMSC seeded on the scaffolds were examined by scanning electron microscopy (SEM), live/dead staining and CCK8, respectively. The osteogenic differentiation of rBMSC was analyzed by alkaline phosphatase (ALP) staining analysis. **Results** SEM showed that the surface of the composite scaffold was precipitated with rod-shaped particles and X-ray diffraction (XRD) showed that the precipitate was hydroxyapatite. Compared to 2HA, 3HA and gelatin groups, SEM showed that rBMSC adhered and stretched well on the 1HA and the results of CCK8 showed that the viability and proliferation of rBMSC was enhanced in 1HA. rBMSC seeded on 1HA induced the ALP expression which was analyzed by ALP staining analysis, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The fabricated 1HA/gelatin scaffold has an excellent biocompatibility and it promotes the proliferation and differentiation of rBMSC. These results provide a promising scaffold for bone tissue engineering.

Key words coprecipitation method; hydroxyapatite; gelatin; bone tissue engineering; biocompatibility