

Degradation and Cell Compatibility Study *in Vitro* of the Two n-HA/CaSO₄ Composites

Jinpeng Zhang¹, Aibin Zhao¹, Youdeng Pu², Mingyu Zhu¹, Jing Shi¹, Xun Tang³, Qinghua Chen⁴, Yong Zhang¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Qujing Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Qujing Yunnan

²Department of Orthopaedic Surgery, No. 1 Hospital of Kunming, Kunming Yunnan

³Department of Orthopaedic Surgery, 920th Hospital of PLA Logistics Support Force, Kunming Yunnan

⁴School of Materials Science and Engineering of Kunming University of Science and Technology, Kunming Yunnan

Email: yefei182@126.com

Received: Jun. 9th, 2020; accepted: Jun. 23rd, 2020; published: Jun. 30th, 2020

Abstract

Objective: Two composites were tested *in vitro* in order to study their cell compatibility. **Methods:** Composite A (10% n-HA) and composite B (20% n-HA) were shaped into 5 mm × 3.3 mm cylinders. Properties of degradation *in vitro* were studied through soaking the composites into PBS buffer solution. In order to study two composites' cell compatibility, MTT Test were carried out by culturing MG-63 cells in the extraction of the composites. Then MG-63 cells were seeded on the top surfaces of the composites, cellular morphologic studies were implemented by SEM (scanning electron microscope). **Results:** There was a rapid period and slow period of weight loss for composite A during the *in vitro* degradation experiment. Composite A degraded completely at the 40th day. Composite B had no rapid weight loss period, the point of 50% weight loss was at the 25th day and complete degradation was achieved at the 55th day. The results of two composites' MTT Test showed no cytotoxicity of them. The cytotoxicity grades for both composites were Grade 1. No statistic differences between two composites ($P > 0.05$). The SEM results showed that MG-63 cells' life activity and cellular morphology stayed in normal. **Conclusions:** 1) Composite A degraded faster than composite B *in vitro*, Composite A had a period of rapid weight loss, while composite B degraded smoothly during the experiments. 2) There was no obvious influence for both composites on the proliferation of human osteosarcoma cells MG-63, MG-63 cells perform normally on the surface of both two composites, composite A and composite B showed good cell compatibility in the study.

Keywords

Nano-Hydroxyapatite, Calcium Sulfate, Bone Graft Substitute

纳米羟基磷灰石/硫酸钙复合材料细胞相容性实验研究

张金鹏¹, 赵爱彬¹, 普有登², 朱明雨¹, 施 琛¹, 汤 逊³, 陈庆华⁴, 张 勇¹

¹昆明医科大学附属曲靖医院骨二科, 云南 曲靖

²云南省昆明市第一人民医院骨科, 云南 昆明

³解放军联勤保障部队第920医院骨科, 云南 昆明

⁴昆明理工大学材料科学与工程学院, 云南 昆明

Email: yefei182@126.com

收稿日期: 2020年6月9日; 录用日期: 2020年6月23日; 发布日期: 2020年6月30日

摘 要

目的: 探讨两种纳米羟基磷灰石/硫酸钙复合材料的体外降解特点、细胞毒性, 进而验证该种复合材料的细胞相容性; 方法: 按照n-HA在复合材料中所占质量分数不同分为复合材料A (10% n-HA)和复合材料B (20% n-HA), 以磷酸盐缓冲液PBS为溶剂检测材料体外降解性能; 通过MTT实验评定复合材料的细胞毒性; 将人成骨样细胞MG-63种植在材料表面, 然后扫描电镜观察。结果: 体外降解实验结果显示A组材料在PBS缓冲液中有较明显的快速失重期和慢速失重期, 第40天完全降解; B组材料没有明显的快速失重期, 第25天降解至50%, 第55天降解完全。MTT实验结果显示两组复合材料不同浓度的浸提液对细胞的生长、增殖没有明显影响, MTT测试得出的结果为两复合材料的细胞毒性为1级, 即无细胞毒性, 并两种材料差别无统计学意义($P > 0.05$); 两组材料与人成骨样细胞MG-63共培养的扫描电镜显示, 细胞的形态、生命活动未受明显影响。结论: 1) B组材料体外降解速度较A组材料慢, 后者降解初期有一个短暂的快速失重期, B组材料降解相对平稳; 2) A组材料与B组材料对人成骨样细胞MG-63的增殖无明显影响, 细胞毒性均为1级, 即无细胞毒性; 细胞在两组材料表面覆盖面积均在80%以上, 两复合材料均具有良好的细胞相容性。

关键词

纳米羟基磷灰石, 硫酸钙, 骨替代材料

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

由于创伤、感染、肿瘤、病理等原因造成的骨质缺损的修复是临床研究的热点, 同时也是一项挑战。Rimondini L.等[1]通过体内研究表明 $6\text{ mm} \times 6\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ 大小的骨缺损需通过骨组织移植修复, 同时还有大量的骨移植手术应用到口腔颌面外科与神经外科, 据统计全球每年进行的骨移植术超过 200 万例。骨移植的关键是骨修复材料的选择, 由于骨修复是一种复杂的再生过程, 所以对骨修复材料的要求有其特殊性[2]。目前应用于临床的骨移植材料有自体骨、同种异体骨、及各种人工合成的骨移植替代材料。

自体骨移植因能够提供成骨活性细胞、骨诱导生长因子及骨传导基质,因此依然被看作是“金标准”,然而自体骨移植有其应用的局限性,如感染、疼痛、供区血肿、供区(如髂骨)骨折等供区并发症等[3] [4],所以自体骨移植应用受到了限制。同种异体骨移植也是一种治疗骨缺损的标准方法[5] [6] [7] [8] [9]。同种异体骨具有骨传导性及较小的骨诱导能力,没有供区并发症、不增加手术时间和术中出血等优点,所以在 20 世纪中后期同种异体骨得到了较广泛的应用。据美国器官共享系统和肌肉骨骼移植基金会的统计数据表明,从 1994 年至 2000 年,美国的肌肉骨骼组织捐献的次数增长了约 320%,但进入 21 世纪后,肌肉骨骼组织捐献的次数增长减缓[10] [11],原因之一就是同种异体骨移植存在传播疾病(如 HIV、肝炎病毒等) [12] [13]、免疫排斥反应、伦理、宗教等问题,因此同种异体骨的临床应用也受到了限制。

随着现代医学的发展,用各种人工骨移植替代物已经逐步取代了传统的自体骨及同种异体骨移植[14]。理想的骨移植替代物应具有下列特点: 1) 良好的生物相容性; 2) 良好的生物降解性,降解过程中在局部形成微酸性环境; 3) 具有一定的机械强度; 4) 具有良好的材料-细胞界面; 5) 有利于血管和成骨细胞的长入; 6) 能兼顾骨诱导性和骨传导性[15] [16]。目前,用于骨移植替代物的材料主要有以下几类: i) 无机物材料,包括医用硫酸钙(calcium sulfate, CS)及生物陶瓷(Bio Cement, 磷酸钙类)类; ii) 有机物材料,包括有机高分子及提取物,如脱钙骨基质(dematerialized bonematrix, DBM), 骨胶原(collagen), 珊瑚羟基磷灰石(coral line hydroxyapatite, C-HA)等; iii) 各种复合人工骨材料[16]。生物材料种类很多,特性各异,能在一定程度上满足要求,但受材料本身理化性能的影响,一般都存在诸如强度不够、降解速率不匹配等自身难以克服的缺点,临床应用效果总是不尽如人意。

本实验研究应用昆明理工大学材料科学与工程学院提供的纳米级羟基磷灰石(n-HA)与 CSH 复合制备成复合材料,按照 n-HA 在复合材料中所占质量分数不同分为复合材料 A (10% n-HA)和复合材料 B (20% n-HA)。通过体外降解、细胞相容性实验检测 A、B 两种复合材料的体外降解性能及细胞毒性。

2. 材料和方法

2.1. 材料

n-HA/CaSO₄ 复合材料 A、B (昆明理工大学材料科学与工程学院); PBS 缓冲液(索莱宝, 中国); MTT(SIGMA, 美国); 人成骨样细胞 MG-63 (中国科学院昆明动物研究所提供); DMEM 培养基(SIGMA, 美国); 胎牛血清(Hyclone, 美国)。实验仪器: 扫描电镜(日立 S-3400N, 日本); CO₂ 恒温细胞培养箱(Binder-50, 德国); 移液枪(Dragonmed, 中国); 电子天平(Sartorius-CPA, 德国); 垂直流超净工作台(ZHJH-1214, 上海智城仪器); 550 型酶联免疫仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 复合材料体外降解实验

将制备好已消毒的 2 组材料样品称重,记为 M_0 ,于无菌条件下分别浸泡于盛有 PBS 缓冲液溶液 50 ml 的密闭容器内,置生化培养箱(37°C ± 0.5°C)。每 3 日取等份试样,50°C 烘干至恒重。以电子分析天平称重(精确至 0.001 g),记为 M_n ,更换容器中缓冲液,将试样置回。由此计算材料的失重率(%)。其计算方法如下:失重率(%) = $(M_0 - M_n)/M_0 \times 100\%$ 。比较三种样品的降解速率。

2.2.2. 复合材料体外细胞相容性的实验

1) 细胞毒性检测(MTT 法)

选择人成骨样细胞 MG-63 细胞株(图 1)检测材料细胞毒性(中国科学院昆明动物研究所提供)。所用 MTT(溴化-3-(4, 5 二甲基噻唑-2)-2, 5 二苯基四唑)购自 Sigma 公司。事先将 2 组材料置于 6 孔培养板中,每孔培养板中加入含 10% (V/V)胎牛血清的 DMEM 培养液 10 ml,在 37°C 振荡器中震荡 72 小时(70 转/分)。

浸取液按 100%、50%、25% 浓度用 10% (V/V) 小牛血清的 DMEM (dul-becco's modified eagle medium) 培养基稀释, 以纯 DMEM 细胞培养液作阴性对照。各种浓度的浸提液用吸管转移入预先培养有细胞的 24 孔培养板中, 细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{ml}$, 每孔培养液 500 μl , 加入不同浓度的浸提液 50 μl , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 72 h 后, 再于每孔加入 5 mg/ml MTT 50 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 4 h, 吸除培养液加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μl , 震荡 30 min, 用分光光度计测其吸光度值(OD 值, 实验波长 490 nm), 重复测定 3 次, 实验组 OD 值除以阴性对照组 OD 值的百分率即为细胞增殖率(RGR), 最后转化为相应的细胞毒性等级。

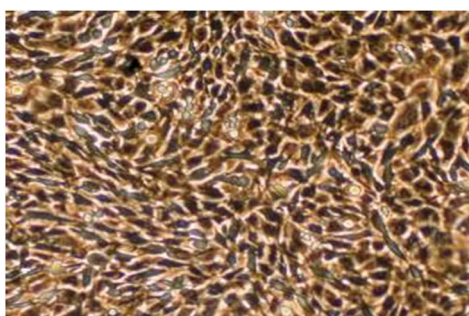


Figure 1. Inverted microscope photo of MG-63
图 1. MG-63 细胞的倒置显微镜照片

2) 细胞形态学观察

冻存的第二代 MG-63 细胞复苏后培养, 当细胞生长至 90% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 $1 \times 10^3/\text{ml}$ 接种于事先放有直径 5 mm, 高 2 mm 材料的 24 孔板中, 5 h 后, 2% 戊二醛固定, 酒精梯度脱水, 表面喷金, 扫描电镜观察材料表面细胞贴附及生长情况。

2.3. 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计学软件, MTT 实验中各组之间的比较采用完全随机设计单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $\alpha = 0.05$ 为统计学检验标准。

3. 结果

3.1. 复合材料体外降解特征

两组材料失重率变化趋势图见图 2, 两组样品于体外 PBS 缓冲液中浸泡至第一次换液时 A 组材料质量损失 20%, B 组材料质量损失 11%; 此后两组材料降解速率有所降低并基本稳定, A 组材料在第 16 天时质量损失达 50%, 当质量损失达到 90% 时降解速率降低, 并于浸泡第 40 天时降解完全; B 组材料则于第 25 天时达到 50%, 质量损失于第 37 天时达到 80%, 并此后降解速率降低, 第 55 天时达 100%。

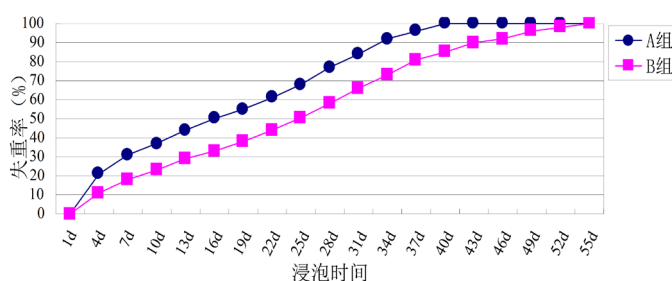


Figure 2. Trend graph of weight loss of two composites
图 2. 两复合材料失重率变化趋势图

3.2. 复合材料细胞相容性

3.2.1. 两组材料浸提液对人成骨样细胞 MG-63 细胞增殖的影响

人成骨样细胞 MG-63 在两组材料不同浓度的浸提液中培养后,吸光度(OD值)及细胞毒性分级见表 1~4。由表中可见,不同浓度的浸提液对 MG-63 细胞增殖的影响,两组材料之间的区别无统计学意义($P = 0.770 > 0.05$),并细胞毒性分级均为 1 级,即无细胞毒性;虽然浸提液浓度为 100% 和 50% 时两实验组和阴性对照组吸光度(OD)值比较有区别($P = 0 < 0.05$),但其细胞增殖率对应的细胞毒性仍为 1 级;材料浸提液浓度为 25% 时,两复合材料对细胞增殖的影响已经和阴性对照组无差别($P > 0.05$)。说明 MG-63 细胞在两种复合材料浸提液中可以相对正常的增殖。

Table 1. Extraction concentration 100%

表 1. 浸提液浓度 100%

	阴性对照	A 组材料	B 组材料
吸光度(OD)值	1.25 ± 0.04 [▲]	0.94 ± 0.08 [△]	0.97 ± 0.06
增值率(%)	100	75	78
细胞毒性(级)	1	1	1

▲: 与两实验组比较 $P < 0.05$; △: 两实验组间比较 $P = 0.770 > 0.05$ 。

Table 2. Extraction concentration 50%

表 2. 浸提液浓度 50%

	阴性对照	A 组材料	B 组材料
吸光度(OD)值	1.26 ± 0.04 [▲]	1.06 ± 0.08 [△]	1.10 ± 0.06
增值率(%)	100	84	87
细胞毒性(级)	1	1	1

▲: 与两实验组比较 $P < 0.05$; △: 两实验组间比较 $P = 0.687 > 0.05$ 。

Table 3. Extraction concentration 25%

表 3. 浸提液浓度 25%

	阴性对照	A 组材料	B 组材料
吸光度(OD)值	1.25 ± 0.08 [▲]	1.13 ± 0.08 [△]	1.15 ± 0.06
增值率(%)	100	89	92
细胞毒性(级)	1	1	1

▲: 与两实验组比较 $P > 0.05$; △: 两实验组间比较 $P = 0.921 > 0.05$ 。

Table 4. Correspondence between relative cell proliferation rate & cytotoxicity grade [17]

表 4. 细胞相对增殖率与细胞毒性分级的关系[17]

细胞相对增值率(%)	细胞毒性分级
≥100	0
99~75	1
74~50	2
49~25	3
24~1	4

3.2.2. 材料支架与细胞共培养后材料表面扫描电镜结果

细胞接种到材料上培养 5 h 后，移去培养液，2% 戊二醛固定，酒精梯度脱水，表面喷金，扫描电镜观察材料表面细胞贴附及生长情况。从图 5、图 6 中(图 3、图 4 为接种细胞前材料表面扫描电镜图)可以看出 MG-63 细胞在两种复合材料表面几乎融合成片，覆盖材料表面 80% 以上，图中可以清晰的看到细胞伪足，说明细胞生命活动无明显异常。

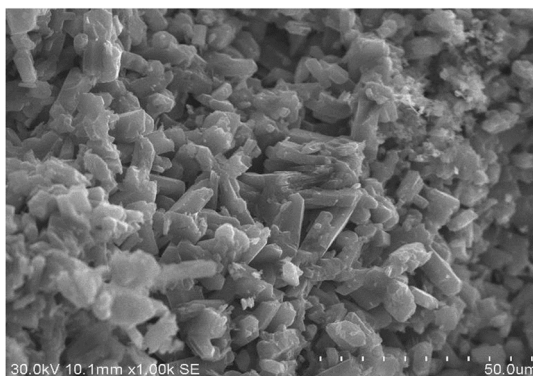


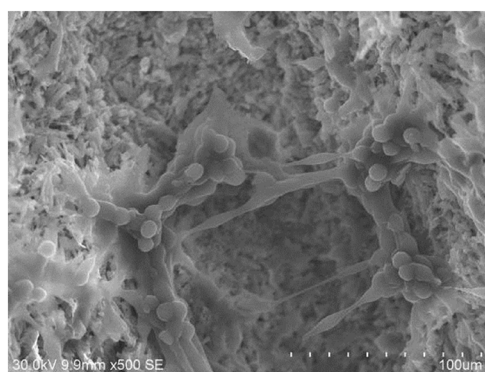
Figure 3. SEM of A composites (1000×)

图 3. A 组材料扫描电镜(1000×)

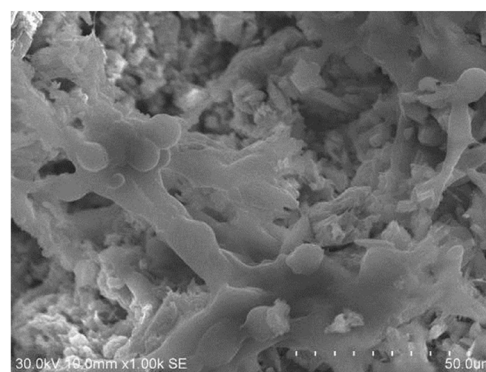


Figure 4. SEM of B composites (1000×)

图 4. B 组材料扫描电镜(1000×)



×500



×1000

Figure 5. SEM of MG-63 cells on A composites

图 5. MG-63 细胞种植在 A 组材料上的电镜扫描结果

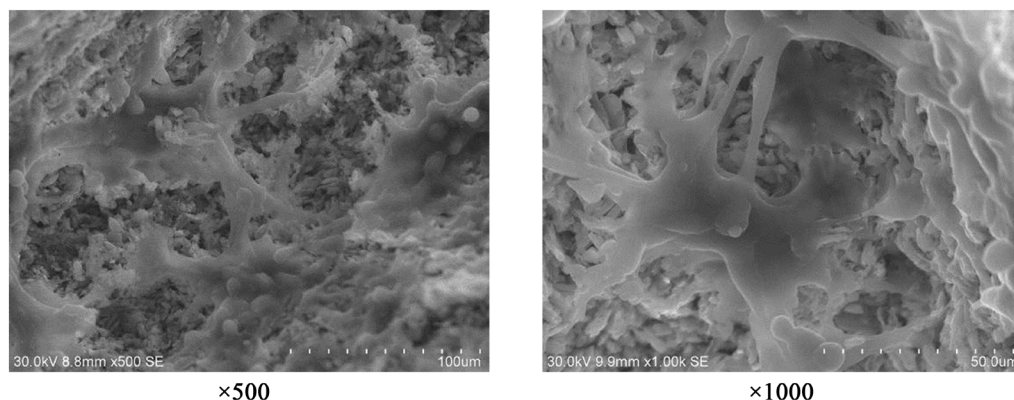


Figure 6. SEM of MG-63 cells on B composites

图 6. MG-63 细胞种植在 B 组材料上的电镜扫描结果

4. 讨论

HA 和 CSH 都是良好的骨修复材料,但前者的塑型性能很差,体内降解也比较慢,而有报道称 CSH 有在体内降解过快的不足之处,从而引发了一系列的临床并发症。本研究就是利用降解慢的 HA 的两种特殊形态,纳米羟基磷灰石(n-HA)与 CSH 复合,以期调控 CSH 复合材料的降解速率,让其具有更加的成骨性能。葛亮等[18]研究发现在模拟体液(SBF)中浸泡的 n-HA 在经过首个 24 小时的快速失重期后,质量基本不在丢失,这一现象可能与受试样品表面的光滑程度有关,材料表面粗糙,易导致降解加快,一旦浸泡后,样品表面即变得平滑,故快速降解现象不再出现,也可能与其表面吸附了浸泡液中的钙元素,从而弥补了质量的损失有关。本实验使用 PBS 缓冲液来检测两组复合材料的降解性能,由于 PBS 缓冲液中基本没有 Ca^{2+} ,所以材料降解的速率会比在 SBF 中略快。从实验结果可以看出 A 组材料也存在快速失重期,即第一个 72 小时,质量损失率为 22%,虽然 B 组材料在第一次换液时质量损失也较快,但只损失了 11%,此后两复合材料降解速度减小,并以几乎同种速率降解,第 40 天时 A 组材料完全降解,而 B 组材料用了 55 天降解完全。

具有良好的生物相容性是一种生物材料能否应用于临床的前提。生物学评价通常包括体外和体内两种测试途径。体内实验是将材料直接与动物体接触,观察植入体周围组织反映的状况,这类实验模拟了人体生理环境,与材料的最终应用状况接近[19]。目前,体内实验也有一定的缺点,如在体内环境中,只能对其最后影响结果做出大体评价,不能对特定参数进行定量分析,动物体内植入是生物材料安全性和有效性评价的主要手段。而体外实验是将材料或其浸提液在体外环境下与细胞或组织接触,观察材料对细胞数量、形态及分化的影响,优点是可以将材料对细胞增殖的影响量化,将细胞的形态变化直观化,比体内实验更加敏感、客观。

按照标准试验标准 ISO 10993-5 [20] [21]本实验两组复合材料对细胞增殖的影响即细胞毒性通过四唑盐比色试验即 MTT 试验来检测。其基本原理是线粒体琥珀酸脱氢酶能催化四甲基偶氮唑盐形成蓝紫色结晶物并沉积于细胞中,二甲基亚砜(DMSO)可使结晶物溶解显色,结晶物结晶形成数目的多寡与活细胞数目和功能状态呈正相关[22]。结晶物溶解后选择一定波长在酶标仪上测吸光度 OD 值,根据 OD 值计算出细胞相对增殖率(RGR) ($\text{RGR} = (\text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$),根据 RGR 评价材料的细胞毒性等级,RGR 与细胞毒性等级对应见表 4。本实验结果显示, MG-63 细胞在材料上接种 3 d 后,三种浓度的材料浸提液对细胞的增殖没有明显不良影响,两种复合材料之间区别无统计学意义($P > 0.05$),在浸提液为 100%和 50%两组中虽然 OD 值与空白对照组不同($P < 0.05$),但最后 RGR 对应的细胞毒性为 1,即无细胞毒性,说明两复合材料对细胞无毒性作用。

HA 是天然骨成分之一, 合成的 HA 结构和形貌图谱分析与天然骨相似, n-HA 更与细胞的微环境相似, 这样就有利于细胞的粘附、生长及分泌胶原, 促进钙化。人成骨样细胞 MG-63 与两复合材料共培养的扫描电镜观察显示细胞覆盖了材料的大部分表面积, 在材料表面细胞能够正常的伸出伪足进行生命活动, 分泌基质。

综上所述, 通过初步的体外实验研究表明 B 组材料体外降解速度较 A 组材料慢, 后者降解初期有一个短暂的快速失重期, 而 B 组材料降解平稳; 两复合材料均可以为实验细胞提供较为良好的生存环境, 均有良好的细胞相容性。为进一步的动物实验及临床应用提供了前提和理论依据。

致 谢

感谢解放军联勤保障部队 920 医院汤逊教授、昆明理工大学材料科学与工程学院陈庆华教授、昆明市第一人民医院普有登主治医师在本研究中的指导和协助!

参考文献

- [1] Rimondini, L., Nieoli, A.N., Fini, M., *et al.* (2005) *In Vivo* Experimental Study on Bone Regeneration in Critical Bone Defects Using an Injectable Biodegradable PLA/PGA Copolymer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **99**, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.05.010>
- [2] Saravanan, S., Leena, R.S. and Selvamurugan, N. (2016) Chitosan Based Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, **16**, 30115-30119.
- [3] Lee, S.J., Lee, D., Yoon, T.R., *et al.* (2016) Surface Modification of 3D-Printed Porous Scaffolds via Mussel-Inspired Polydopamine and Effective Immobilization of rhBMP-2 to Promote Osteogenic Differentiation for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, **40**, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.006>
- [4] Kai, D., Prabhakaran, M.P., *et al.* (2016) Elastic Poly(ϵ -caprolactone)-polydimethylsiloxane Copolymer Fibers with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering. *Biomedical Materials*, **11**, Article ID: 015007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/015007>
- [5] Muscolo, D.L., Ayerza, M.A., Aponte-Tinao, L.A. and Ranalletta, M. (2006) Use of Distal Femoral Osteoarticular Allografts in Limb Salvage Surgery. Surgical Technique. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, **88**, 305-321. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.00324>
- [6] Sen, M.K. and Miclau, T. (2007) Autologous Iliac Crest Bone Graft: Should It Still Be the Gold Standard for Treating Nonunions? *Injury*, **38**, S75-S80. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.012>
- [7] Ayerza, M.A., Aponte-Tinao, L.A., Abalo, E. and Muscolo, D.L. (2006) Continuity and Function of Patellar Tendon Host Donor Suture in Tibial Allograft. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **450**, 33-38. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000229291.21722.b5>
- [8] Johari, A., Shingade, V., Lobo Gajiwala, A., Shah, V., *et al.* (2007) The Use of Irradiated Allograft in a Paediatric Population: An Indian Experience. *Cell Tissue Bank*, **8**, 13-22. <https://doi.org/10.1007/s10561-006-9001-4>
- [9] Rajan, G.P., Fornaro, J., Trentz, O. and Zellweger, R. (2006) Cancellous Allograft versus Autologous Bone Grafting for Repair of Comminuted Distal Radius Fractures: A Prospective, Randomized Trial. *The Journal of Trauma*, **60**, 1322-1329. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000195977.18035.40>
- [10] Cornell, C.N. (2004) Osteobiologics. *Bulletin: Hospital for Joint Diseases*, **62**, 13-17.
- [11] Greenwald, A.S., Boden, S.D., Goldberg, V.M., *et al.* (2001) The Committee for Biological Implants: Bone-Graft Substitutes: Facts, Fiction, and Applications. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, **83**, 98-102. <https://doi.org/10.2106/00004623-200100022-00007>
- [12] Buck, B.E., Malinin, T.I. and Brown, M.D. (1989) Bone Transplantation and Human Immunodeficiency Virus. An Estimate of Risk of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **1**, 129-136. <https://doi.org/10.1097/00003086-198903000-00015>
- [13] Leads from the MMWR (1988) Transmission of HIV through Bone Transplantation: Case Report and Public Health Recommendations. *JAMA*, **260**, 2487-2488. <https://doi.org/10.1001/jama.260.17.2487>
- [14] Du, C., Cui, F.Z., Feng, Q.L., *et al.* (1998) Tissue Response to Nano-Hydroxyapatite/Collagen Composite Implants in Marrow Cavity. *Journal of Biomedical Materials Research*, **42**, 5402-5481. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19981215\)42:4<540::AID-JBM9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<540::AID-JBM9>3.0.CO;2-2)
- [15] Dastjerdi, M.M., Fallah, A. and Rashidi, S. (2019) An Iterative Method for Estimating Nonlinear Elastic Constants of

- Tumor in Soft Tissue from Approximate Displacement Measurements. *Journal of Healthcare Engineering*, **2019**, Article ID: 2374645. <https://doi.org/10.1155/2019/2374645>
- [16] 郝强, 赵丽, 关继奎, 等. 人工骨材料在骨缺损修复中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(34): 6745-6748.
- [17] Alotto, D., Ariotti, S., Graziano, S., *et al.* (2002) The Role of Quality Control in a Skin Bank; Tissue Viability Determination. *Cell and Tissue Banking*, **3**, 3-10. <https://doi.org/10.1023/A:1021846703301>
- [18] 葛亮, 杨四川, 苟三怀, 等. 纳米羟基磷灰石/硫酸钙人工骨在模拟体液浸泡环境下的行为研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2007, 26(4): 578-583.
- [19] 杨艾玲, 王欣宇. 经皮元件用生物材料的生物学评价方法[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(11): 7-9.
- [20] Mickisch, G., Fajta, S., Keilhauer, G., Schlick, E., Tschada, R. and Alken, P. (1990) Chemosensitivity Testing of Primary Human Renal Cell Carcinoma by a Tetrazolium Based Microculture Assay (MTT). *Urological Research*, **18**, 131-136. <https://doi.org/10.1007/BF00302474>
- [21] International Organization for Standardization (1999) Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5. Test for *in Vitro* Cytotoxicity ISO-10993-5:1999 (E).
- [22] Chauvel, L.D.J., Pellen, M.P., Auroy, P., *et al.* (1999) Evaluation of the *in Vitro* Biocompatibility of Various Elastomers. *Biomaterials*, **20**, 291-299. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00181-1)