

# Release Performance *in Vitro* of nHA/PLGA Scaffolds Contained with Protein Sustained-Release PLLA Microspheres Prepared by Means of Supercritical Fluid Foaming Technology\*

Peipei Li, Yan Bai, Guangfu Yin<sup>#</sup>

College of Materials Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu  
Email: <sup>#</sup>nic0700@scu.edu.cn

Received: Mar. 22<sup>nd</sup>, 2013; revised: Mar. 27<sup>th</sup>, 2013; accepted: Apr. 19<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2013 Peipei Li et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** In order to construct a bone regeneration system that different cell factors controlled release at proper stage, Trypsin (Try) was selected as the model protein, and the composite of sustained-release microspheres and biodegradable porous scaffolds was prepared in this study. First of all, Try loaded poly-L-lactic acid microspheres (Try-PLLA<sub>ms</sub>) were prepared, and then compounded to the nano hydroxyapatite/poly lactic-co-glycolic acid (nHA/PLGA) to build a scaffold that can release growth factors sequentially. The results showed that the Try-PLLA<sub>ms</sub> were spherical shape with diameters of 2 - 7  $\mu\text{m}$ . The encapsulation efficiency of the Try in PLLA<sub>ms</sub> was 80.5%, and the loading capacity was 0.89%. The prepared Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA scaffold possessed 150 - 300  $\mu\text{m}$  pore diameter, 50.9% - 76.8% porosity, 3.9 - 5.1 MPa compressive strength, and 19.8% degradation at 8 weeks. The cumulative releases of Try from Try-nHA/PLGA scaffolds and from Try-PLLA<sub>ms</sub> were respectively about 85% and 65.2% at 48 hours, and that from Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA scaffolds were 32.9% at 48 hours and 60.6% at 21 days. The results demonstrated that Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA scaffolds had excellent drug release performance with suitable compressive strength, which would be used as tissue engineering scaffolds with protein delivery.

**Keywords:** Poly Lactic-Co-Glycolic Acid; Poly-L-Lactic Acid; Drug Loaded Microspheres; Tissue Engineering Scaffolds; Supercritical Fluid Foaming Technique

## 超临界流体发泡技术制备含 PLLA 缓释微球 nHA/PLGA 复合支架及体外释放性能研究\*

李培培, 白 燕, 尹光福<sup>#</sup>

四川大学材料科学与工程学院, 成都  
Email: <sup>#</sup>nic0700@scu.edu.cn

收稿日期: 2013 年 3 月 22 日; 修回日期: 2013 年 3 月 27 日; 录用日期: 2013 年 4 月 19 日

**摘 要:** 本研究以胰蛋白酶(Try)为模型蛋白, 将蛋白缓释微球与可降解多孔支架相结合, 构建在骨修复不同阶段可控释放不同生长因子的组织工程支架。首先制备胰蛋白酶-聚乳酸微球(Try-PLLA<sub>ms</sub>, ms: 微球), 然后复合到纳米羟基磷灰石/聚乳酸-羟基乙酸(nHA/PLGA)中, 通过超临界流体发泡制备含蛋白缓释微球的多孔支架。结果表明, 制备的 Try-PLLA<sub>ms</sub> 形态良好, 呈规则球形, 粒径集中分布在 2~7  $\mu\text{m}$ , 蛋白包封率为 80.5%, 载药量为 0.89%。制备的 Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA 复合支架孔径为 150~300  $\mu\text{m}$ , 孔隙率为 50.9%~76.8%, 压缩强度 3.9~5.1

\*资助信息: 国家自然科学基金(51173120)。

<sup>#</sup>通讯作者。

MPa, 8 周降解率为 19.8%。Try-nHA/PLGA 支架及 Try-PLLA<sub>ms</sub> 微球 48 小时 Try 累积释放量分别为 85%和 65.2%, 而复合支架 Try 48 小时累积释放量为 32.9%, 21 天累积释放量为 60.6%。Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA 复合支架的抗压强度和释放规律合适, 对蛋白类药物具有良好的缓释作用, 有望作为具有蛋白类药物缓释功能的组织工程支架。

**关键词:** 聚乳酸-羟基乙酸; 聚乳酸; 载药微球; 组织工程支架; 超临界流体发泡技术

## 1. 引言

PLLA 和 PLGA 具有优良的生物相容性和可降解性, 降解产物是二氧化碳和水, 降解产物不会在体内聚积, 降解速率可通过相对分子量控制, 已广泛的用作细胞支架材料<sup>[1,2]</sup>。羟基磷灰石一直被认为是骨组织中重要的无机成分, 能够诱导细胞增殖和分化<sup>[3]</sup>, 同时能够增强材料的机械强度。如果将羟基磷灰石与 PLGA 进行复合, 既能提高支架材料的机械强度, 又能增加材料的骨诱导性, 且对 PLGA 的降解速度有控制作用, 以保证材料的降解速度与骨组织的再生速度一致<sup>[4]</sup>。

骨再生是一个涉及到多种细胞因子作用的复杂过程<sup>[5]</sup>。骨是一个高度血管化的组织, 血管生成对骨再生至关重要<sup>[6]</sup>。研究表明, 骨修复过程中血管生成早于骨生成<sup>[7-11]</sup>, 构建的骨修复体应首先诱导血管生成, 再诱导骨生成, 即先释放诱导血管生成的细胞因子, 再释放诱导骨生成的细胞因子。而现常用的方法以各种材料的微球或支架为缓释载体, 未考虑生长因子作用的时间依赖性。若将微球与支架复合, 将不同生长因子分别载入微球和支架, 使不同的生长因子达到不同的释放规律, 有望更好的实现骨修复。

传统制备多孔支架材料的方法有相分离法、纤维粘接及溶液浇铸-粒子沥滤法, 但涉及到有机溶剂或较高的温度, 会破坏生物分子的活性, 突释现象也较为严重。超临界流体技术无污染、无高温、产品无有机溶剂残留、绿色环保, 能将蛋白载入支架材料或微球内而不失去生物活性、对支架材料的力学性能和内部孔型有良好的控制<sup>[12-16]</sup>。

实验以胰蛋白酶(Try)为模型蛋白, 采用复乳法制备 Try-PLLA<sub>ms</sub>, 复合 nHA/PLGA 后经超临界流体发泡形成 Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA 复合支架。考察其蛋白缓释行为, 为构建具有生长因子次第释放效果的组织工程支架奠定实验基础。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

PLLA ( $M_w = 10,000$ ) (山东医疗器械研究所), PLGA (山东医疗器械研究所), nHA (国药集团化学试剂有限公司), Try (美国 Sigma 公司), BCA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 2.2. Try-PLLA<sub>ms</sub> 的制备

称取 250 mg PLLA 溶于 5 mL 二氯甲烷中组成有机相, 待其完全溶解后, 加入 250  $\mu$ L 1 mg/mL 的 Try 溶液, 至于磁力搅拌器上搅拌 2 min, 再加入 10 mL 1% PVA 磁力搅拌 5 min 形成乳浊液。将乳浊液加入 400 mL 0.1% PVA 中搅拌 2 h, 有机溶剂挥发后得到微粒的混悬液。将所得微粒的混悬液 5000 r/min 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥 24 h 得到 PLLA<sub>ms</sub>。

### 2.3. Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA 复合支架的制备

将 PLGA 与 nHA 按一定的比例研磨, 研磨时间为 4 h, 加入 10%的 PLLA<sub>ms</sub>, 将混合粉末放入直径为 5 mm 的圆柱形模具中进行压制, 置于四氟乙烯圆柱体模具内并将模具放入容积为 500 mL 的超临界 CO<sub>2</sub> 不锈钢反应釜中, 密封后用液泵将冷凝至 0℃以下的 CO<sub>2</sub> 压入反应釜内, 当反应釜内压力达到 8 MPa 时开始升温, 使反应釜内温度达到 35℃, 通过仪器内置的热电偶和放空阀调节釜内的压力和温度, 保持温度变化不超过 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ , 压力变化为 $\pm 0.1$  MPa。反应 8 h 后, 以一定的速率放气, 打开反应釜, 取出样品, 按以上方法, 不加入 PLLA<sub>ms</sub>, 直接加入 5 mg Try, 制备 Try-nHA/PLGA 支架。

### 2.4. PLLA<sub>ms</sub> 和复合支架形态观察

将空白和含 Try 的 PLLA<sub>ms</sub> 分散到导电胶上, 喷

金, 观察微球的表面形貌。取数块制备的复合支架, 喷金后观察 (JSM-5900LV, Japan) 支架内部结构形态。

## 2.5. 微球载药量和包封率测定

称取 50 mg PLLA<sub>ms</sub> 溶解在 10 mL 二次水中, 样品中附着在微球外的蛋白会溶解在二次水中, 经抽滤后, 将微粒溶解在 5 mL 二氯甲烷中, 再加入 40 mL 二次水, 经磁力搅拌使二氯甲烷溶剂挥发完毕, BSA 蛋白即被溶解在水中, 然后对蛋白溶液用 0.22 μm 的水膜过滤, 收集滤液, 按照 BCA 试剂盒测定蛋白含量。载药量和包封率的公式分别为:

$$\text{载药量} = \frac{W_1}{W_2} \times 100\%, \quad \text{包封率} = \frac{W_1}{W_3} \times 100\%$$

$W_1$  为复合微球内的药量;  $W_2$  为复合微球的总的质量。  
 $W_3$  为复合微球内药量及介质中的药量。

## 2.6. 支架孔隙率测定

称量样品的干重记为  $G_1$ , 测量样品的长度及半径, 分别记为  $L$  和  $R$ , 将样品放入二次水中抽真空, 使水充分的渗入到材料中, 直到材料表面没有气泡冒出为止。取出样品, 用滤纸吸干表面的水分, 称重, 质量记为  $G_2$ , 那么根据公式, 孔隙率为:

$$\varepsilon = (G_2 - G_1) / \rho_{\text{水}} \pi R^2 L$$

## 2.7. 支架降解试验

将直径为 5 mm, 长度为 10 mm 的样品浸泡于 pH 7.4 的磷酸缓冲液(PBS)中, 抽真空, 使样品充分润湿。将完全润湿的样品放入 50 mL 磨口瓶中, 加入一定量的 PBS 溶液, 放入 37°C 恒温水浴摇床内。分别于时间点 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 周取样, 去离子水冲洗, 冻干后称重, 计算质量损失, 公式为:

$$L = (M_0 - M_T) / M_0 \times 100\%$$

其中,  $L$  为质量损失,  $M_0$  为降解前支架的质量,  $M_T$  为降解不同时间后支架的质量。

## 2.8. 蛋白体外释放试验

精密称取一定量的复合支架、Try-PLLA<sub>ms</sub>、Try-nHA/PLGA 支架, 以 pH 7.4 的 PBS 10 mL 为释放介质, 置于 37°C 恒温摇床中摇动。每隔一定的时间取出 20 μL 上清液, 并补充等量的 PBS, 用 BCA 蛋白检测

试剂盒检测蛋白含量, 计算累积释放率。

## 3. 实验结果

### 3.1. 微球的形态及粒径

所制备的 Try-PLLA<sub>ms</sub> 形态良好, 呈规则的球形, 表面光滑, 无粘连现象, 但粒径大小不均匀, 可能是因为在搅拌过程中转速很难在长时间保持稳定造成的, 见图 1。所得微球粒径分布较窄, 为 2~7 μm, 成近似正态分布, 其中, 空白 PLLA<sub>ms</sub> 的平均粒径是 4.8 μm, Try-PLLA<sub>ms</sub> 平均粒径是 6.1 μm, 见图 2。

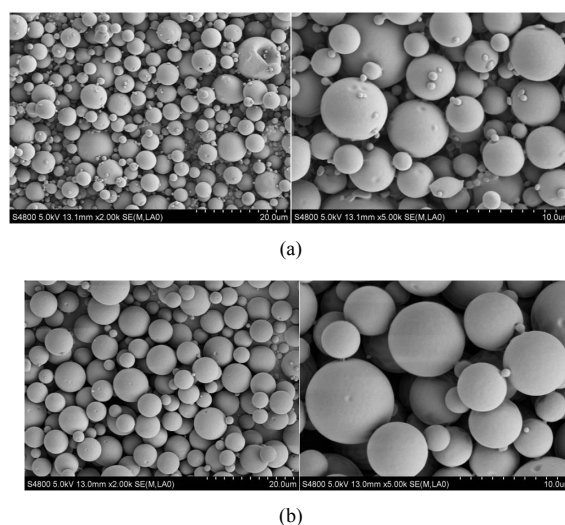


Figure 1. SEM micrographs of PLLA microspheres (a): Unloaded microspheres (b): Try loaded microspheres  
图 1. PLLA 微球的 SEM 图片 (a): 空白微球 (b): 载 Try 的微球

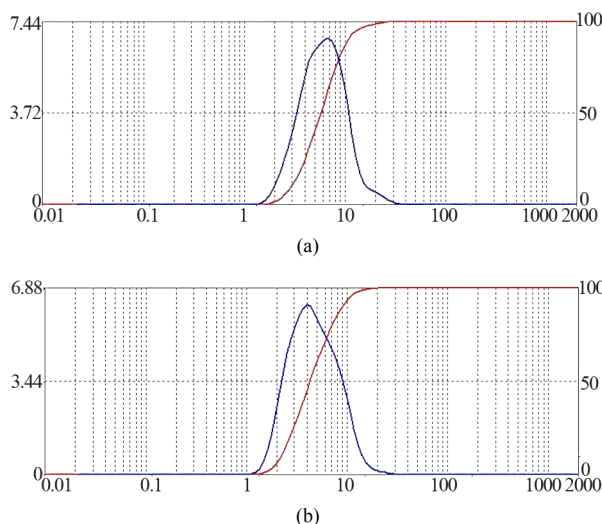


Figure 2. Size Distribution of PLLA<sub>ms</sub> (a): Unloaded microspheres (b): Try loaded microspheres  
图 2. PLLA 微球的粒径分布 (a): 空白微球 (b): 载 Try 的微球

### 3.2. 复合支架的形态、孔隙率和抗压强度

制备的复合支架孔径分布在 150~300  $\mu\text{m}$ , 孔连通性较好, 具有较高的孔隙率, PLLA<sub>ms</sub> 均匀的分布在支架上, 见图 3, 箭头所指为 PLLA<sub>ms</sub>. 复合支架孔隙率 50.9%~76.8%, 抗压强度 3.9~5.1 MPa. 不同分子量的 PLGA 孔隙率和抗压强度见表 1.

### 3.3. 聚乳酸微球的载药量和包封率

使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定 PLLA<sub>ms</sub> 的载药量和包封率, 载药量为 0.89%, 包封率为 80.5%, 表明所制备的微球具有良好的载药性能.

### 3.4. 复合支架的降解和蛋白的释放

随着降解时间的增加, 支架材料的质量逐渐减小. 降解到第 2, 4, 6, 8, 10 周时, 复合支架的质量分别减少 3.6%, 8.3%, 13.5%, 19.8%, 27.5%. Try-nHA/PLGA 支架、PLLA<sub>ms</sub> 和复合支架在前 2 天都有突释现象, 但复合支架的释放速率整体上比前两者慢, 见图 4. Try-nHA/PLGA 支架, Try 48 h 累积释放量达 85% 以上; PLLA<sub>ms</sub>, Try 48 h 累积释放率为 65.2%; 复合支架, Try 48 h 累积释放量为 32.9%, 21 d 累积释放量为 60.6%.

## 4. 讨论

### 4.1. PLGA 分子量对支架性质的影响

表 1 比较了不同分子量的 PLGA 的孔隙率和抗压

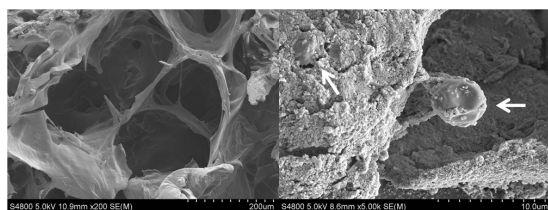


Figure 3. SEM micrographs of composite scaffolds  
图 3. 复合支架形态的扫描电镜观察

Table 1. Effect of PLGA molecular weight on scaffold properties  
表 1. 不同分子量的 PLGA 制得的支架材料的性质

分子量	孔隙率	抗压强度
40 kDa	50.9%	3.9 MPa
80 kDa	67.9%	4.7 MPa
100 kDa	76.8%	5.1 MPa

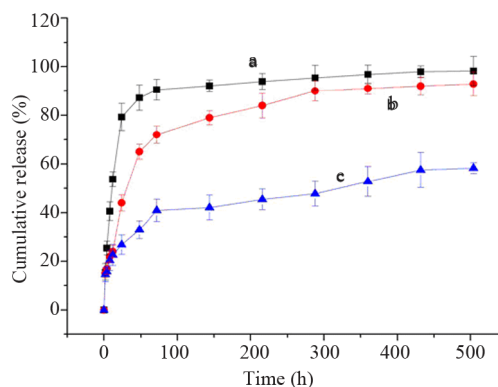


Figure 4. Cumulative release of Try (a) Try-nHA/PLGA scaffold; (b) Try-PLLA<sub>ms</sub>; (c) Try-PLLA<sub>ms</sub>-nHA/PLGA scaffold  
图 4. T 不同体系体外蛋白释放效果比较 (a) Try-nHA/PLGA 支架; (b) Try-PLLA<sub>ms</sub>; (c) Try-PLLA<sub>ms</sub>-nHA/PLGA 支架)

强度. 随着分子量的增加, PLGA 制得的支架的孔隙率和抗压强度均得到增加. 这可能是因为较大分子量的 PLGA 使聚合物的结晶性降低, 有利于超临界 CO<sub>2</sub> 的溶胀和气泡核的生长, 形成更多的孔洞结构, 所以分子量增大孔隙率也增大. 而当分子量较大时, 聚合物的分子链更长, 链段间的有序性降低, 使得聚合物链段间的反应更为激烈, 聚合物链段之间相互缠绕使它们的力学强度得到增强, 从而导致抗压强度的增强. 而事实上, 孔隙率的增大会导致抗压强度的降低, 所以此结论仅适用于特定的范围内.

### 4.2. 超临界发泡过程对孔隙率的影响

超临界 CO<sub>2</sub> ( $T_c = 31.1^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 73.8 \text{ bar}$ ) 的密度与液体密度大小相似, 具有较强的溶解能力, 粘度与气体相似, 扩散速率高<sup>[17]</sup>. CO<sub>2</sub> 溶解到无定形的聚合物后会使聚合物的玻璃化转变温度、粘性、界面张力和渗透性发生改变<sup>[18]</sup>, 同时生成多孔结构. 超临界 CO<sub>2</sub> 发泡过程分为两个阶段: 浸润阶段和减压阶段<sup>[19]</sup>. 在浸润阶段, 聚合物被超临界 CO<sub>2</sub> 所饱和, 降低了聚合物的玻璃化转变温度, 聚合物变得有弹性. 在减压阶段, 压强的降低导致了气泡核的形成, 气泡核继续生长产生孔. 随着压强的减小, CO<sub>2</sub> 的浓度也降低, 聚合物的玻璃化转变温度升高, 聚合物就定型为多孔的结构.

用于骨修复的支架材料应具有一定的形状、力学强度、合适的孔径、孔隙率和比表面积等. 一般认为支架的孔径必须大于 100  $\mu\text{m}$ , 否则细胞和组织很难长入支架的内部, 且支架内部不易得到充足的养料<sup>[20]</sup>.

实验以超临界 CO<sub>2</sub> 为发泡剂, 避免了以往方法制备支架致孔剂残留问题。对于骨组织工程支架而言, 孔隙率应当大于 80%, 因此, 为了进一步提高支架的孔隙率, 可以增加超临界 CO<sub>2</sub> 的压强, 使更多的气体浸入到聚合物中, 也可以加快放气速率, 浸入到聚合物基质中的 CO<sub>2</sub> 能更快地从基质中析出形成更为连通的孔。如果释放速率过低, 仅仅造成聚合物基质的溶胀, 孔隙率较低。

#### 4.3. 复合载体系统释放规律的应用

载体系统主要功能就是在局部保持药物缓慢释放, 以达到药物最大的生物学性能<sup>[21]</sup>。以 Try 为模型蛋白制备 PLLA<sub>ms</sub>, 对 Try 具有缓释作用, 但在组织工程应用时无法塑形, 故将 PLLA<sub>ms</sub> 复合到具有一定形态和机械强度的 nHA/PLGA 支架上, 使其形成符合要求的缓释载体系统, 进而得到理想形态的组织工程骨。孔径在 150~300 μm nHA/PLGA 复合支架, 加强了 PLLA<sub>ms</sub> 对 Try 的释放, 起到二次缓释作用, 从而使 Try 的释放更为缓慢。如果同时将另一种蛋白直接加入 nHA/PLGA 粉末中, 再与载蛋白的 PLLA<sub>ms</sub> 混合发泡, 可能会使不同的蛋白有不同的缓释效果。在骨修复中可以将诱导血管生成的细胞因子直接混入 nHA/PLGA 粉末中, 诱导骨生成的细胞因子载入 PLLA<sub>ms</sub> 中, 将微球与 nHA/PLGA 粉末混合发泡, 可以使支架优先释放诱导血管生成的细胞因子, 后释放诱导骨生成的细胞因子, 可能会达到更好的骨修复效果。Thomas 等<sup>[22]</sup>制备包裹血小板衍生生长因子的聚丙交酯-乙交酯(PLG)微球, 然后复合到混有血管内皮生长因子的 PLG 支架上, 植入到骨缺损处, 达到良好的成骨效果。

#### 4.4. 复合支架制备过程对蛋白活性的影响

保持药物活性是实验的重要环节。实验中使用 2%冰醋酸溶解 Try, 不会引起蛋白类药物变性, 冰浴机械搅拌 2 h, 有利于醋酸的充分挥发, 使其对药物的影响降到最小。采用的超临界发泡技术也是为了保持 Try 的活性, 从而制备具有良好生物学性能的缓释载体系统。

实验制备的 Try-PLLA<sub>ms</sub>/nHA/PLGA 复合支架可良好的保持 Try 的生物活性, 对 Try 具有良好的缓释作用, 有望作为组织工程支架和生长因子缓释载体。

#### 参考文献 (References)

- [1] X. F. Niu, Q. L. Feng, M. B. Wang, X. D. Guo and Q. X. Zheng. *In vitro* degradation and release behavior of porous poly(lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide. *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 94(2): 176-182.
- [2] Paul T. Thevenot, A. M. Nair, J. H. Shen, P. Lotfi, C.-Y. Ko and L. P. Tang. The effect of incorporation of SDF-1 $\alpha$  into PLGA scaffolds on stem cell recruitment and the inflammatory response. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3997-4008.
- [3] A. M. Ambrosio, J. S. Sahota and Y. Khan. A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, 58(3): 295-301.
- [4] 赵君, 蒋欣泉, 张志愿. 羟磷灰石/聚乙丙交酯生物复合材料的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2008, 35(2): 207-209.
- [5] F. Deschaseaux, L. Sensébé and D. Heymann. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends in Molecular Medicine*, 2009, 15(9): 417-429.
- [6] J. Glowack. Angiogenesis in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, 335: S82-S89.
- [7] H. P. Gerber, N. Ferrara. Angiogenesis and bone growth. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2000, 10(5): 223-228.
- [8] J. Schmid, B. Wallkamm, C. H. Hammerle, S. Gogolewski and N. P. Lang. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clinical Oral Implants Research*, 1997, 8(3): 244-248.
- [9] H. Winet. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone*, 1996, 19(1): S39-S57.
- [10] H. Winet, J. Y. Bao and R. Moffat. A control model for tibial cortex neovascularization in the bone chamber. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1990, 5(1): 19-30.
- [11] K. Sojo, Y. Sawaki, H. Hattori, H. Mizutani and M. Ueda. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2005, 33(4): 238-245.
- [12] L. D. Harris, B.-S. Kim and D. J. Mooney. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 42(3): 396-402.
- [13] W. L. Murphy, M. C. Peters, D. H. Kohn and D. J. Mooney. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2521-2527.
- [14] M. H. Sheridan, L. D. Shea, M. C. Peters and D. J. Mooney. Bioadsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *Journal of Controlled Release*, 2000, 64(1-3): 91-102.
- [15] T. P. Richardson, M. C. Peters, A. B. Ennett and D. J. Mooney. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 1029-1034.
- [16] D. J. Mooney, D. F. Baldwin, N. P. Suh, L. P. Vacanti and R. Langer. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 1996, 17(14): 1417-1422.
- [17] S. K. Goel, E. J. Beckman. Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon dioxide. I. Effect of pressure and temperature on nucleation. *Polymer Engineering & Science*, 1994, 34(14): 1137-1147.
- [18] H. Tai, M. Mather, D. Howard, W. Wang, L. White and J. Crowe. Control of pore size and structure of tissue engineering scaffolds produced by supercritical fluid processing. *European Cells and Materials*, 2007, 14: 64-77.
- [19] C. Gualandi, L. J. White, L. Chen, R. A. Gross, K. M. Shakesheff and S. M. Howdle. Scaffold for tissue engineering fabricated by non-isothermal supercritical carbon dioxide foaming of a highly crystalline polyester. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(1): 130-136.

- [20] C. J. Liao, C. F. Chen and J. H. Chen. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 59(4): 676-681.
- [21] S. S. Kim, S. J. Gwak and B. S. Kim. Orthotropic bone formation by implantation of apatite-coated poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2008, 87A(1): 245-253.