

超声增强藻酸钙凝胶支架材料孔隙率的研究

卢璐 吉鸿飞 郭各朴 郭霞生 屠娟 邱媛媛 章东

Ultrasonic enhancement of the porosity of alginate scaffold

Lu Lu Ji Hong-Fei Guo Ge-Pu Guo Xia-Sheng Tu Juan Qiu Yuan-Yuan Zhang Dong

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 64, 024301 (2015) DOI: 10.7498/aps.64.024301

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.64.024301>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2015/V64/I2>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于迟滞应力应变关系的非线性声学检测理论与方法研究

Theory and method for nonlinear acoustics detection based on hysteretic stress-strain relation

物理学报.2014, 63(19): 194302 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.194302>

弹性管中泡群内气泡的非线性声响应

Nonlinear acoustical response of multibubbles in elastic tube

物理学报.2014, 63(13): 134301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.134301>

球形集声器在生物组织中形成的组织损伤

Tissue lesion induced by a spherical cavity transducer

物理学报.2014, 63(4): 044301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.044301>

含气泡液体中的非线性声传播

Propagation of nonlinear waves in the bubbly liquids

物理学报.2014, 63(3): 034301 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.034301>

基于倒谱分析的单水听器目标运动参数估计

Estimation of single hydrophone target motion parameter based on cepstrum analysis

物理学报.2014, 63(3): 034302 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.034302>

超声增强藻酸钙凝胶支架材料孔隙率的研究*

卢璐¹⁾ 吉鸿飞¹⁾ 郭各朴¹⁾ 郭霞生¹⁾ 屠娟¹⁾ 邱媛媛²⁾ 章东^{1)3)†}

1)(南京大学声学研究所, 近代声学教育部重点实验室, 南京 210093)

2)(南通大学电子信息学院, 南通 226019)

3)(中国科学院声学研究所, 声场声信息国家重点实验室, 北京 100080)

(2014年6月17日收到; 2014年7月24日收到修改稿)

藻酸钙凝胶具有三维立体多孔结构, 能为细胞生长提供充分的附着空间, 且具有良好的生物相容性和一定的机械强度, 是一种理想的细胞支架材料. 本文研究了藻酸钙三维支架材料的力学特性与氯化钙/藻酸钠的配比的关系, 并提出采用低强度脉冲超声处理藻酸钙凝胶、基于超声空化效应增强藻酸钙凝胶孔隙率的新方法. 实验采用交联合成方法制备藻酸钙凝胶支架材料, 测量力学特性、孔洞的联通性与孔隙率, 并利用绿色荧光蛋白的表达评价细胞的增殖能力. 结果表明, 当氯化钙/藻酸钠的配比为3:5时, 凝胶的机械强度和弹性较好, 力学性能稳定, 为最佳配比参数. 采用声压0.055 MPa的脉冲超声作用20 min, 可以有效提高凝胶支架的孔隙率; 且细胞在该支架中生长状态良好, 呈现团簇状生长趋势.

关键词: 低强度超声, 空化效应, 组织工程支架材料, 孔隙率

PACS: 43.25.+y, 43.80.+p

DOI: 10.7498/aps.64.024301

1 引言

为了更好地模拟细胞三维培养环境, 三维支架材料的研究受到广泛关注. 传统二维细胞培养系统与体内情况相异, 细胞会逐渐失去原有的性状. 目前, 细胞培养的支架分为多微孔支架、纳米纤维支架及水凝胶支架三种. 多微孔支架使用方便, 但其孔径(约100 μm)远大于细胞平均直径(约10—20 μm), 与二维培养系统相近. 纳米纤维支架使用纤维状的细胞外基质蛋白能够更好地模拟三维结构, 但其力学性能较差, 难以实际应用. 而水凝胶支架由于特殊的制备过程, 在液态时包裹细胞, 固态时形成交联网络并将大量细胞分散黏附于其中, 使细胞能接触基质, 更接近于三维培养系统^[1,2]. 藻酸钙凝胶是一种水凝胶支架, 由藻酸钠

和氯化钙合成获得. 由于在液态时合成, 易于添加各种生长因子及药物, 可对细胞生长及分化起到重要作用^[3].

多孔支架材料的通透性是细胞三维培养支架的重要指标. 为确保细胞均匀输送和组织生长, 三维支架的结构需要具备较高的通透性. 研究表明, 藻酸钙凝胶支架的通透性正比于它的孔隙率^[4]. 改变支架的孔隙率可以通过盐浸法、快速原型法和改变聚合物的比率法等来实现^[5]. 然而, 这些方法需要使用有机溶剂及微粒滤取, 从而降低生物相容性. 机械刺激是另一种提升孔隙率的方法. 低强度脉冲超声(LIPUS)作为一种机械刺激, 在提高藻酸盐支架的孔隙率的同时, 能够保持生物降解的稳定性和支架的结构^[6]. 为了进一步提升孔隙率, 还可利用超声空化效应^[7]. 超声空化指的是当液体媒质中含有微小气核或空穴时, 若超声波声压超过一

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB707900)、国家自然科学基金(批准号: 81127901, 81227004, 81473692, 11374155, 11174141, 11104140, 11204144, 11274170, 11474001, 11474161)和江苏省自然科学基金(批准号: BE2011110, BK2012226)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: dzhang@nju.edu.cn

定阈值, 在声波的负声压相, 这些气核会发生膨胀进而生成空化泡. 这些空化泡在超声波作用下将随之发生振荡、生长、收缩、崩溃等一系列动力学过程^[8-11].

本文提出基于超声空化效应增强藻酸钙三维凝胶支架孔隙率的新方法. 采用交联合成方法制备藻酸钙水凝胶, 测量凝胶的杨氏模量; 采用扫描电子显微镜(SEM)观察水凝胶的微结构, 讨论超声参数(强度、辐照时间)以及微泡空化效应对孔隙率的影响. 孔隙率的计算通过MATLAB图像处理完成. 并通过观察人宫颈上皮腺癌细胞(HeLa)的绿色荧光特性和细胞增殖率来探索能够适度提升结构的孔隙率而不影响细胞生长的超声作用的优化参数.

2 材料和方法

2.1 藻酸钙三维凝胶支架的制备

将1.132 g氯化钙(CaCl_2)纯品溶解在100 mL去离子纯水中, 搅拌均匀, 得到 $102 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙溶液, 置 4°C 保存. 将藻酸钠纯品溶于去离子纯水中, 得到1.2% w/v溶液, 置 4°C 保存. 将氯化钙溶液(100, 200, 300, 400, 500 μL)与500 μL 1.2%藻酸钠溶液通过涡旋混合器(STUART SA8, 英国)搅拌, 在15 mL离心管中快速充分混合20 s ($1800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$). 将混合溶液放置于圆柱形定制模具(直径10 mm, 高10 mm)中塑型5 min. 然后将该支架转移到含有15 mL氯化钙溶液的培养皿中静置10 min, 最后用磷酸缓冲液(PBS)清洗两次即制备成水凝胶三维支架.

细胞-凝胶复合支架的制备时, 先将HeLa细胞(绿色荧光蛋白标记的HeLa细胞株由南京大学医学院提供)重悬于500 μL 藻酸钠溶液中(细胞浓度为 $2 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$), 然后按照上述步骤制备三维细胞-凝胶支架. 最后将复合支架放在培养皿中, 保存于含89%的细胞培养基(DMEM), 10%的胎牛血清(FBS)和1%双抗(盘尼西林 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)的全培养基中, 并放置在含有5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养.

2.2 杨氏模量测量

将样品置于电子万能材料试验机(CMT7000, 深圳新三思材料检测有限公司)的承压板上, 在室

温下加压并测试凝胶的杨氏模量, 每种试样取5个平行样品. 压缩速率为 $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$, 形变量为16%^[12,13].

2.3 超声辐照增强材料的通透性

图1为超声增强三维细胞-凝胶复合支架材料的孔隙率和通透性的实验示意图. 三维细胞复合支架置于特定的培养皿中, 用封口膜将其密封, 放置在样品台上进行超声辐照. Agilent 33250A信号发生器产生1 MHz的脉冲超声波, 其中脉冲个数为50, 脉冲重复频率(PRF)为1 kHz, 绝对声压分别为0, 0.055, 0.085和0.11 MPa, 辐照时间分别为0, 5, 10和20 min; 信号经过功率放大器E&I 2200L放大然后驱动1 MHz平面超声换能器(直径4 cm). 距离样品支架上方12 cm处放置一个吸声板用来减少超声反射对复合支架产生的影响. 绝对声压通过宽带水听器(UNP1000, NTR, 美国)校准.

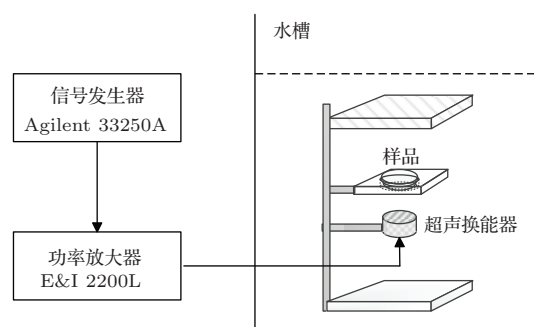


图1 超声增强三维细胞-凝胶复合支架材料的孔隙率的系统框图

2.4 藻酸钙凝胶支架结构孔隙率测量

经过不同超声参数辐照后的支架材料, 在 4°C 下由2.5%的戊二醛固定2 h, 用PBS缓冲液清洗两遍, 然后用酒精进行两轮梯度脱水(33%, 50%, 60%, 80%, 90%和100%), 最后采用环境扫描电镜(QUANTA200, FEI, Hillsboro, Oregon, 美国)拍摄该支架材料的切面结构, 加速电压为20 kV^[14].

利用MATLAB软件进行图像处理, 从而定量分析支架的孔隙率. 首先将图像转化为灰度图像, 然后采用最佳阈值迭代法确定阈值, 将图像转化为二值图. 图2给出了典型的原始灰度图像及二值化图像. 假设初始阈值 $T^0 = (g_l + g_u)/2$, 其中 g_l 和 g_u 分别为灰度图像的最大和最小灰度值. 通过初始阈值 T^0 , 将图像分为大于 T^0 和小于 T^0 的两部分, 各

个部分的平均灰度 A_b 和 A_f 可由以下公式得到:

$$A_b = \sum_{g=g_l}^{T^0} g \times h(g) / \sum_{g=g_l}^{T^0} h(g), \quad (1)$$

$$A_f = \sum_{g=T^0+1}^{g_u} g \times h(g) / \sum_{g=T^0+1}^{g_u} h(g). \quad (2)$$

假设 $T^k = (A_b + A_f) / 2$, 若 $T^k = T^{k-1}$, 则 T^k 即为阈值, 否则返回前一步. 最后, 将图像转为二值图像, 孔隙率可通过如下公式得到.

$$\text{孔隙率} = [S_p / (255 \times 220)] \times 100\%, \quad (3)$$

其中 S_p 代表孔隙的像素点总和, 分母是图像的总像素点个数.

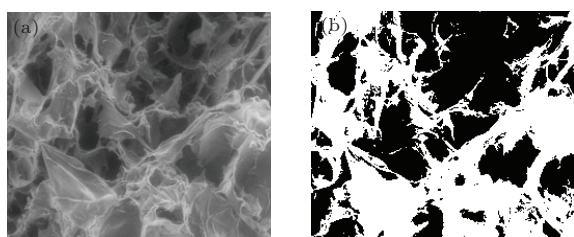


图2 典型支架材料的截面扫描电镜图 (a) 灰度图像; (b) 二值图像

2.5 HeLa 细胞绿色荧光蛋白表达

HeLa 细胞的绿色荧光蛋白表达可通过倒置荧光显微镜 (IX-71, 奥林巴斯, 日本) 进行评价, 以定性得出三维藻酸钙凝胶支架中细胞增殖的情况 [15]. 在绿色荧光蛋白的表达评估前, 将 HeLa 细胞-凝胶支架培养在定制的培养皿中, 保存于含 89% DMEM, 10% FBS 和 1% 双抗的全培中, 并放置在含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养. 细胞-凝胶结构经连续 3 天的 LIPUS 辐照处理, 用荧光显微镜观察细胞-凝胶结构中的绿色荧光蛋白表达.

2.6 CCK-8 法检测细胞活性

为了定量研究不同 LIPUS 参数下三维藻酸钙支架中细胞生长情况, 采用细胞计数试剂盒 (CCK-8, 同仁化学研究所, 日本) 检测细胞活性. 将超声处理后的细胞-凝胶支架浸没于螯合剂 (乙二胺四乙酸) 中, 待凝胶支架溶解后将该混合液移入 15 mL 离心管进行离心 (转速为 1000 r·min⁻¹, 离心时间为 5 min). 加入 3 mL 培养液制成细胞悬液, 向 96 孔板中连续的 5 孔中加入 100 μL 细胞悬液, 并在每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液. 然后将培养板放入

含有 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中孵育 3 h. 取出培养板, 测定其在 450 nm 处的吸光度.

2.7 统计学分析

所有的实验结果来自五次重复测量, 以平均值 ± 标准差表示. 使用单边 t 检验比较结果, 当 $P < 0.05$ 时认为存在统计学上的显著差异. 采用 Origin 软件 (OriginLab 公司, 美国) 对数据进行分析.

3 结果与讨论

3.1 杨氏模量

制备三维水凝胶支架时, 采用了不同的氯化钙/藻酸钠的体积比 (1 : 5, 2 : 5, 3 : 5, 4 : 5 及 5 : 5). 在氯化钙与藻酸钠体积比为 1 : 5 时, 凝胶为液态不能成形 (图 3 (a)), 在体积比为 2 : 5 时, 凝胶呈现半液半固状态 (图 3 (b)). 以上两种比例都无法为细胞提供基本的支撑功能. 在体积比达到 3 : 5 时, 凝胶能成形 (图 3 (c)—3 (e)), 且此时凝胶的机械强度和弹性都较好, 力学性能稳定. 由图 4 的杨氏模量数值可看出, 当氯化钙与藻酸钠体积比大于

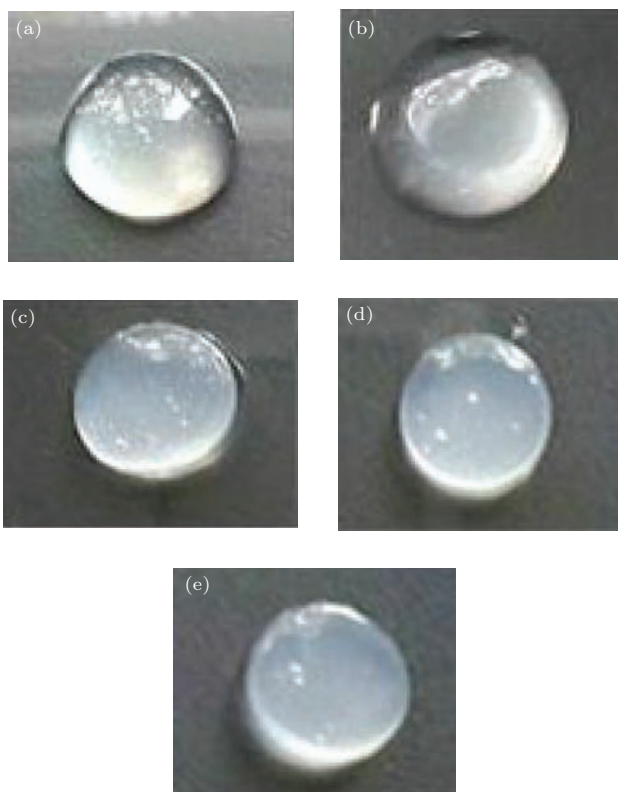


图3 氯化钙与藻酸钠不同配比时的凝胶形态 (a) 1 : 5; (b) 2 : 5; (c) 3 : 5; (d) 4 : 5; (e) 5 : 5

3:5 时, 杨氏模量的值无统计学差异, 表明过量的氯化钙在与藻酸钠交联的过程中不参与反应, 交联所得的聚合物凝胶力学性能稳定. 因此, 制备样品时氯化钙与藻酸钠的最佳体积比为 3:5.

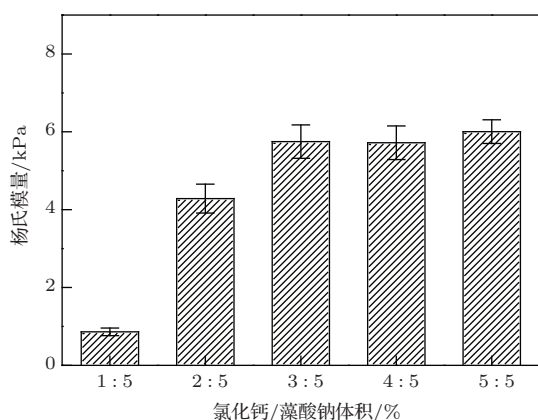


图4 不同配比的凝胶的杨氏模量

3.2 超声增强水凝胶支架的孔隙率

采用低强度超声作用于水凝胶支架, 以增强其孔隙率. 图5为不同强度超声(声压 $P = 0, 0.055, 0.085$ 和 0.11 MPa)作用 20 min 后三维水凝胶支架材料的截面图. 从图5(a)中可以看出, 无超声作用

时, 水凝胶支架材料的孔洞密度较大且孔径较小, 直观连通性和通透性较差. 经过 0.055 MPa 超声作用后(图5(b)), 水凝胶中出现了比较蓬松的结构, 而且出现了部分大孔径孔洞. 随着超声继续增强至 0.085 MPa (图5(c)), 大孔洞的比例也随之增大(黑色箭头所示), 而且出现了少量撕裂状的层状结构(白色箭头所示). 声压增大至 0.11 MPa (图5(d)), 孔洞直径进一步增大, 且出现更多的撕裂层. 实验结果表明, 经过低强度超声作用后, 水凝胶支架材料的微观结构明显改变, 孔隙率增加, 而且孔洞通透性和通透性也得到增强.

图6为当声压保持为 0.055 MPa 时, 不同辐照时间($t = 0, 5, 10, 20$ min)作用下的凝胶支架的截面图. 与图6(a)空白组相比, 辐照 5 min 后(图6(b))能够明显观察到增大的孔洞. 增加辐照时间到 10 min 时(图6(c)), 可观察到一些密集出现的较大孔洞(黑色箭头所示)和撕裂层(白色箭头所示). 在辐照 20 min 后(图6(d)), 孔洞体积更大更多并且分布更加均匀. 结果表明, 通过增加 LIPUS 辐照时间也可以明显地增强水凝胶支架材料的孔隙率并进而提高其通透性.

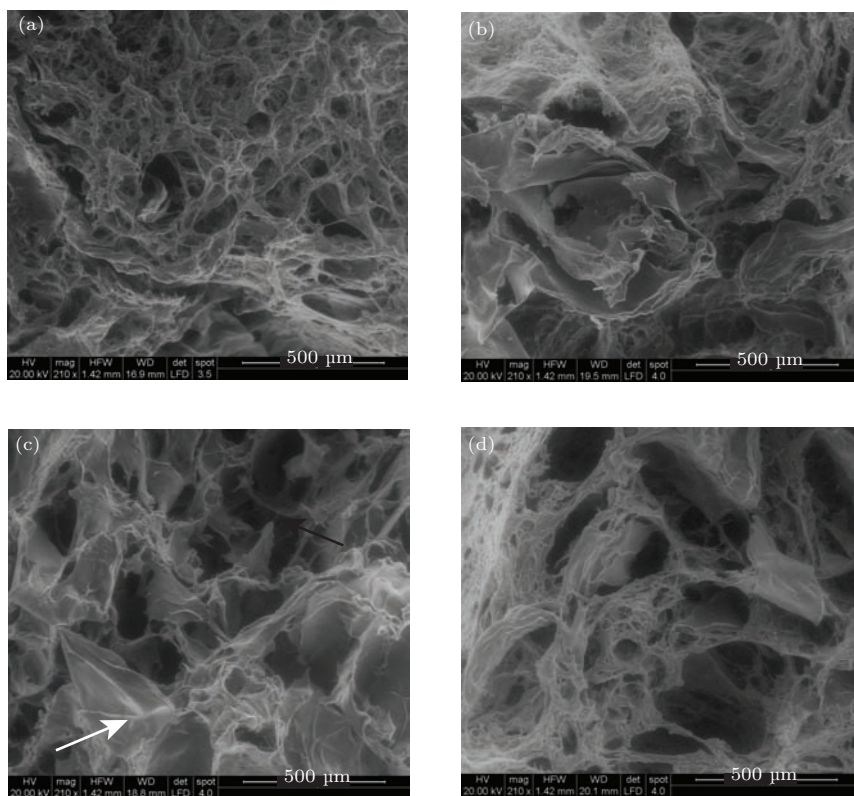


图5 不同强度超声作用 20 min 后凝胶支架材料的截面图 (a) 声压 $P = 0$; (b) 声压 $P = 0.055$ MPa; (c) 声压 $P = 0.085$ MPa; (d) 声压 $P = 0.11$ MPa

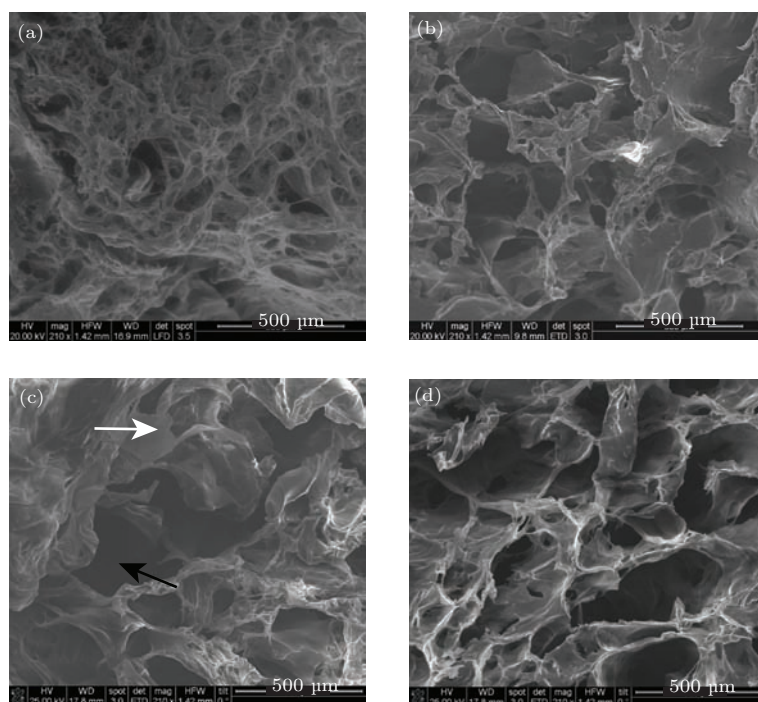


图6 声压为0.055 MPa时不同超声辐照时间激励后凝胶支架的截面图 (a) 0 min; (b) 5 min; (c) 10 min; (d) 20 min

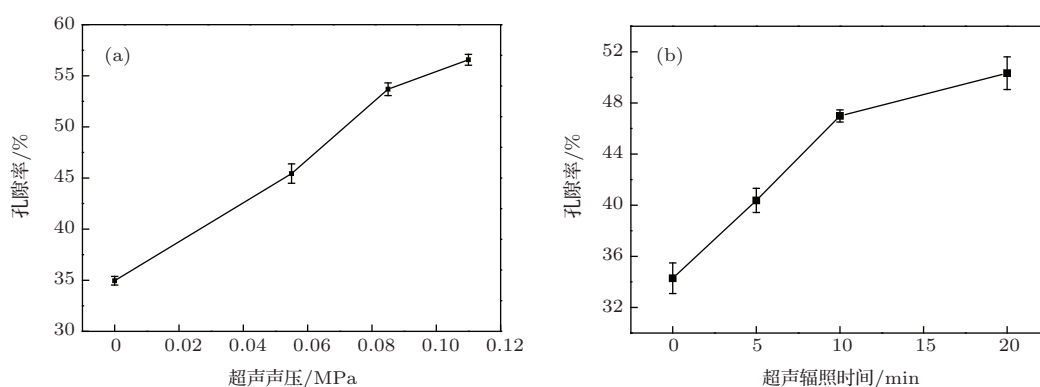


图7 水凝胶支架材料的孔隙率与声压(a)及作用时间(b)的关系

为定量分析低强度超声对凝胶支架材料孔隙率的增强, 本文通过数字图像处理的方法及(3)式计算孔隙率. 图7为凝胶孔隙率随超声声压及作用时间的关系. 由图7(a)可见, 当声压低于0.085 MPa时, 三维水凝胶支架的孔隙率随声压近似线性增加; 当声压继续增大(0.085—0.11 MPa), 孔隙率的增加变缓, 孔隙率的值趋于饱和. 藻酸钙凝胶在声压高于0.085 MPa时其结构受到了破坏, 出现不可逆转的裂痕, 限制了孔隙率的继续增加. 而当改变LIPUS辐照时间时, 从图7(b)可以看出, 在10 min以内孔隙率随时间的增加非常明显, 而随后增加作用时间后, 孔隙率的增加率趋向饱和.

3.3 孔隙率对细胞生长的影响

许多研究指出, 适度的机械刺激能够对细胞生长产生积极的影响. Raimondi等^[16]指出: 机械刺激如超声驱动下空化微泡周围产生的微射流所引发的剪切力和循环静水压力能够分别增强人软骨细胞和骨髓间充质细胞的增殖. 三维藻酸钙凝胶支架的制备过程中, 由于涡旋作用会产生大量微气泡^[17], 在LIPUS作用下, 这些微泡会产生微射流现象. 微射流产生的剪切应力作用于藻酸盐支架可破坏其交联结构并提高其孔隙率. 研究表明, 藻酸钙凝胶的剪切模量大约为1 kPa, 其弹性模量大约为3—12 kPa. 在本文的超声辐照系统中, 当

超声强度为 0.055 MPa 时, 微泡产生的剪切力约为 2 kPa^[18,19], 足以改变藻酸钙的凝胶结构, 增强其孔隙率和通透性.

为了验证细胞在三维水凝胶支架材料中的增殖, 采用倒置荧光显微镜对不同孔隙结构中的细胞荧光蛋白进行定性观察. 由于经过 20 min 超声辐照的样品(图 6(d))与 10 min 超声辐照的样品(图 6(c))相比, 孔洞体积更大且孔隙分布更加均匀, 因此 20 min 是相对优化的超声辐照时间. 我们设计四组样品, 超声声压分别为 0, 0.055, 0.085,

0.11 MPa, 每次辐照 20 min. 经过连续 3 天超声辐照后, 其荧光表达情况如图 8 所示. 图 8(a) 和 (b) 相对照可以看出, 当超声声压在 0.055 MPa 和 0.085 MPa 时, 其绿色荧光表达明显增强, 而且经过 0.055 MPa 的 LIPUS 作用后的凝胶支架中的细胞具有成团簇状生长的趋势; 当超声强度增强到 0.11 MPa 时, 绿色荧光表达与对照组相比明显减弱, 这主要是因为此时过度的超声能量对细胞造成了不可恢复的伤害. 因此, 可以得出适当的超声刺激可以促进该支架材料中的细胞生长的结论.

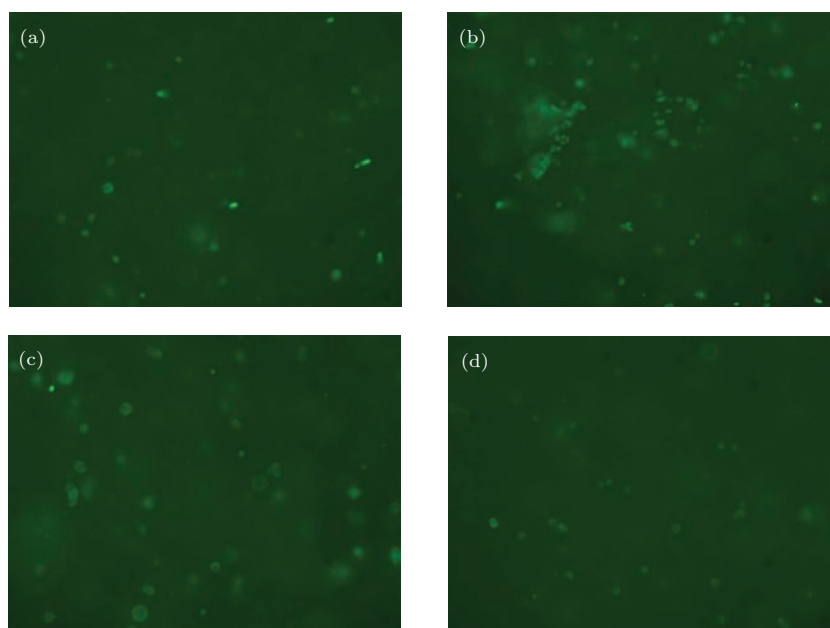


图 8 不同超声声压作用 20 min 后 HeLa 细胞在三维水凝胶支架中的绿色荧光表达 (a) 声压 $P = 0$; (b) 声压 $P = 0.055$ MPa; (c) 声压 $P = 0.085$ MPa; (d) 声压 $P = 0.11$ MPa

为了更加准确地研究 LIPUS 对细胞在三维支架中的生长的影响, 我们采用 CCK-8 对细胞增殖进行定量研究. 在 CCK-8 检测方法中, 细胞活性是通过测量到的吸光密度 (OD 值) 来反映的. 四组实验超声声压值分别为 0, 0.055, 0.085 和 0.11 MPa. 从图 9 可以看出, 0.055 MPa 超声组中细胞数量与对照组相比增殖了 13% 以上; 0.085 MPa 超声组中细胞数量与对照组相比无统计学意义, 但就其 OD 值看, 细胞活性仍然得到一定增强; 0.11 MPa 超声组中细胞数量与对照组相比减少了 7% 以上, 与对照组有显著差异.

荧光观察和细胞增殖测量结果表明, 一定强度的超声辐照能够明显提高三维藻酸钙凝胶支架的孔隙率, 而且促进了细胞的生长; 但高强度的超声在提高孔隙率的同时也对凝胶内的细胞造成损

害, 反而降低了细胞的存活率. 而基于本实验系统, 0.055 MPa 超声作用 20 min 对凝胶内细胞的增殖效果最明显, 是促进细胞在三维支架中生长的最佳超声参数.

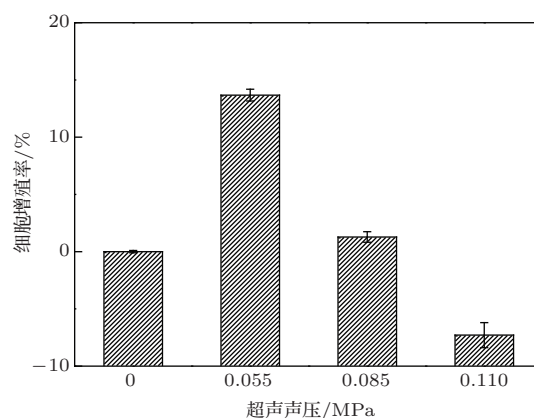


图 9 不同超声声压作用后细胞的增殖率

4 结 论

本文研究了藻酸钙三维支架材料的力学特性与氯化钙/藻酸钠的配比的关系, 确定了制备藻酸钙三维支架材料的最佳参数. 本文还提出了采用低强度脉冲超声来增强三维藻酸钙凝胶支架通透性的新方法, 采用数字图像处理技术对支架材料的通透性进行了评估, 并且通过荧光蛋白表达和细胞活性检测验证了该支架材料的实用性. 实验结果表明, 当氯化钙/藻酸钠的配比为3:5时, 凝胶的机械强度和弹性较好, 力学性能稳定, 为最佳配比参数; 三维凝胶支架的连通性和通透性随着辐照超声强度的增强而增强, 其孔隙分布随着超声作用时间的延长变得更加均匀. 当超声声压为0.055 MPa, 辐照时间为20 min时, 三维凝胶支架的孔隙率得到提升, 孔隙分布较均匀, 细胞在该支架中生长状态良好, 呈团簇状生长趋势; 而当超声强度增强到一定程度, 在提高三维支架材料的孔隙率和通透性的同时, 多余的能量对细胞造成了不可逆转的伤害. 因此, 适当的超声辐照可以提高材料的孔隙率和连通性, 为细胞生长提供更大的空间, 对细胞营养运输、废物代谢及细胞增殖有着重要意义. 进一步的研究工作中, 将采用微粒子速度成像系统, 实验观察稳态空化引起的微声流现象.

参考文献

- [1] Chen J, Irianto J, Inamdar S, Pravincumar P, Lee D A, Bader D L, Knight M M 2012 *Biophys. J.* **103** 1188
- [2] Caron M M J, Emans P J, Coolsen M M E, Voss L, Surtel D A M, Cremers A, van Rhijn L W, Welting T J M 2012 *Osteoarthritis Cartilage* **20** 1170
- [3] Avitabile T, Marano F, Castiglinone F 2001 *Biomaterials* **22** 195
- [4] Karande T S, Ong J L, Agrawal C M 2004 *Ann. Biomed. Eng.* **32** 1728
- [5] Guo G P, Ma Q Y, Zhao B, Zhang D 2013 *Ultrason. Sonochem.* **20** 137
- [6] Guo Y, Ma Y, Dong R, Liu S L, Tu J 2013 *Chin. J. Reparative and Reconstructive Surgery* **27** 928 (in Chinese) [郭杨, 马勇, 董睿, 刘尚仑, 屠娟 2013 中国修复重建外科杂志 **27** 928]
- [7] Wang X X, Li W, Kumar V 2006 *Biomaterials* **27** 1924
- [8] Chen Q, Zou X Y, Cheng J C 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 6476 (in Chinese) [陈谦, 邹欣晔, 程建春 2006 物理学报 **55** 6476]
- [9] Li J L, Liu X Z, Zhang D, Gong X F 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 2809 (in Chinese) [李俊伦, 刘晓宙, 章东, 龚秀芬 2006 物理学报 **55** 2809]
- [10] Xue H H, Liu X Z, Gong X F, Zhang D 2005 *Acta Phys. Sin.* **54** 5233 (in Chinese) [薛洪惠, 刘晓宙, 龚秀芬, 章东 2005 物理学报 **54** 5233]
- [11] Zhang C B, Liu Z, Guo X S, Zhang D 2011 *Chin. Phys. B* **20** 024301
- [12] Schinagl R M, Gurskis D, Chen A C 1997 *J. Orthop. Res.* **15** 499
- [13] Li K F, Guo L K, Yu F J, Zhang X D 2012 *Chin. J. Reparative and Reconstructive Surgery* **26** 11
- [14] Oliveira S M, Ringshia R A, LeGeros R Z, Clark E, Yost M J, Terracio L, Teixeira C C 2010 *J. Biomed. Mater. Res. A* **94** 371
- [15] Shui W, Yin L, Luo J, Zhang W, Zhang J, Huang W, Hu N, Liang X, Deng Z L, Hu Z Shi L L, Lu H H, Haydon R C, He T C, Ho S H 2013 *J. Biomed. Mater. Res. A* **191A** 3542
- [16] Raimondi M T, Boschetti F, Falcone L, Fiore G B, Remuzzi A, Marinoni E, Marazzi M, Pietrabissa R 2002 *Biomech. Model. Mechanobiol.* **1** 69
- [17] Xu Q, Nakajima M, Ichikawa S, Nakamura N, Shiina T 2008 *Food Sci. Emerg. Technol.* **9** 489
- [18] Wu J R 2007 *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93** 363
- [19] Huang B, Zhang Y L, Zhang D, Gong X F 2010 *Chin. Phys. B* **19** 054302

Ultrasonic enhancement of the porosity of alginate scaffold*

Lu Lu¹⁾ Ji Hong-Fei¹⁾ Guo Ge-Pu¹⁾ Guo Xia-Sheng¹⁾ Tu Juan¹⁾
Qiu Yuan-Yuan²⁾ Zhang Dong^{1)3)†}

1) (Key Laboratory of Modern Acoustics (Nanjing University), Ministry of Education, Institute of Acoustics, Nanjing 210093, China)

2) (Department of Electronic Information, Nantong University, Nantong 226019, China)

3) (State Key Laboratory of Acoustics, Institute of Acoustics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(Received 17 June 2014; revised manuscript received 24 July 2014)

Abstract

Alginate scaffold with a three-dimensional (3D) porous structure can provide sufficient space for the cell to adhere, and has a good biocompatibility and mechanical strength. In this work, low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) is used to enhance the porosity of alginate scaffold based on acoustic cavitation. In the experiment, the alginate-calcium-based 3D scaffold culture system is fabricated with an optimum CaCl_2 /sodium alginate ratio of 3 : 5. The mechanical properties of alginate scaffold are measured and scanning electron microscopy is used to analyze the porosity of the scaffold. In addition, the microscopy observation of green fluorescent protein expression and the CCK-8 assessment are adapted to analyze the cell proliferation effect. Experimental results show that with LIPUS treatment under appropriate driving parameters (acoustic pressure 0.055 MPa and treatment time 20 min), the porosity of the 3D scaffold can be significantly improved, which would benefit the cell growth in the scaffold.

Keywords: LIPUS, cavitation, tissue engineering scaffold materials, porosity

PACS: 43.25.+y, 43.80.+p

DOI: 10.7498/aps.64.024301

* Projects supported by the National Basic Research Program of China (Grant No. 2011CB707900), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 81127901, 81227004, 81473692, 11374155, 11174141, 11104140, 11204144, 11274170, 11474001, 11474161), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (Grant Nos. BE2011110, BK2012226).

† Corresponding author. E-mail: dzhang@nju.edu.cn