

高仿真组织工程神经支架制备工艺的参数优化*

刘 靓¹ 胡学昱¹ 张 蕾² 尤凤健¹ 黄景辉¹ 罗卓荆^{1△}

(1 第四军医大学西京医院全军骨科研究所 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:对直接影响神经支架微观结构的关键因素进行分析,以确定制备不同孔径仿真支架的制备工艺。**方法:**用前期开发的神经支架制备工艺,应用不同浓度的醋酸浓度和冷淋速度制备仿真神经支架,以扫描电镜观察神经支架结构特征,以确定醋酸浓度和冷淋速度对神经支架内部结构的影响。**结果:**醋酸浓度和冷淋速度对神经支架内部结构具有重要影响。醋酸浓度为 0mg/ml 时,无法制备定向结构的神经支架,当醋酸浓度为 1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml 和 4 mg/ml 时,可制备轴定向仿真支架,并且神经支架的孔径随醋酸浓度增大而增大;当冷淋速度为 1×10^{-5} m/s、 2×10^{-5} m/s 和 5×10^{-5} m/s 时,所制备的仿真支架内部均呈明显的轴向微管结构,其中冷淋速度为 2×10^{-5} m/s 时,其轴向微管结构排列最为有序、规律。当速度为 1×10^{-6} m/s、 2×10^{-6} m/s、 5×10^{-6} m/s 以及 1×10^{-4} m/s 时,所制备的材料内部微管结构走向无明显规律。**结论:**醋酸浓度和冷淋速度是影响神经支架内部结构的两个关键因素,通过改变醋酸浓度和冷淋速度可制备不同孔径的仿真神经支架。

关键词:仿真神经支架;结构特征;孔径;醋酸;冷淋速度

中图分类号:R687,R318 **文章标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-624-04

Parameter Optimization of the Fabrication Technique for Highly Bionic Tissue Engineering Nerve Scaffold*

LIU Liang¹, HU Xue-yu¹, ZHANG Le², YOU Feng-jian¹, HUANG Jing-hui¹, LUO Zhuo-jing^{1△}

(1 Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi 710032, China

2 Department of Anesthesiology of Xijing Hospital the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shannxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the factors which influence the micro-structural characteristics of the highly bionic nerve scaffold, and to determine the technology for establishing bionic nerve scaffold with different micro-structural characteristics. **Methods:** Nerve scaffolds with different micro-structural characteristics were fabricated with varied doses of acetic acid and a series of freezing velocities. Scanning electron microscopy was used to detect the micro-structural characteristics. The effects of acetic acid concentration and freezing velocities on the structural appearance of the scaffolds were determined. **Results:** The concentration of the acetic acid and freezing velocities had effect on the micro-structural characteristics of the nerve scaffold. Scaffold with longitudinal pores could be fabricated in the presence of acetic acid (1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml and 4 mg/ml, except 0mg/ml), and the pore size increased with the increasing of the acetic acid concentration. In addition, highly bionic nerve scaffold could be made when the freezing velocities were maintained at 1×10^{-5} m/s, 2×10^{-5} m/s and 5×10^{-5} m/s, of which the most homogeneous longitudinal pores were achieved by velocity at 2×10^{-5} m/s. When the velocity was maintained at 1×10^{-6} m/s, 2×10^{-6} m/s, 5×10^{-6} m/s and 1×10^{-4} m/s, the scaffold showed no longitudinal pores. **Conclusion:** Acetic acid concentration and freezing velocities were two key factors determining the micro-structural characteristics of the highly bionic nerve scaffold. Scaffolds with different micro-structural appearances can be fabricated through changing the acetic acid concentration and freezing velocities.

Key words: Bionic nerve scaffold; Micro-structural characteristic; Pore size; Acetic acid; Freezing velocity

Chinese Library Classification: R687, R318 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-624-04

前言

利用组织工程学方法构建组织工程神经支架是目前长节段神经缺损修复的一个重要方向^[1]。本课题组利用自主研发的高仿真神经支架制备工艺成功制备了具有轴向微管样结构的高仿真神经支架^[2]。动物实验结果显示该仿真支架可有效引导

神经定向生长^[2,3]。高仿真神经支架的轴定向微管的管径和定向性对神经再生具有重要影响,是决定其修复效果的一个主要因素。因此,开展高仿真神经支架制备工艺的参数优化研究,确定影响仿真支架微管结构的关键因素对提高其修复效果具有重要意义。本课题在原有制备工艺的基础上,进一步优化了材料结构及相关特性,对直接影响神经支架微观结构的关键因素进

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770571 和 30973052)

作者简介:刘靓(1983-),男,硕士研究生,研究方向:神经损伤修复,电话:15029035990 Email:ll20cn@163.com

△通讯作者:罗卓荆,教授,博士生导师,电话:029-84775285 Email:zjluo@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-06 接受日期:2010-12-30)

行研究,应用扫描电镜对其结构特性进行观察,同时对其孔径等基本性能进行鉴定,以筛选出制备高仿真支架的最佳技术参数,为进一步研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 高仿真神经支架制备工艺

电子天平称取 280 mg 的 I 型胶原蛋白 (Sigma, USA) 放入浓度为 3 mg/ml 醋酸溶液 5 ml 中溶解 24 小时,在 4℃ 恒温环境中,以 15000 r/min 搅拌速度搅拌 90 min,制成悬浊液;另称取壳聚糖 (Sigma, USA) 70 mg 加入 3 mg/ml 醋酸溶液 5 ml 中充分溶解,混合两种悬浊液并保持 4℃ 恒温,再以 15000 r/min 搅拌速度搅拌 90 min,充分混合制成胶原 - 壳聚糖凝胶状混悬液,抽真空静置 12 小时,壳聚糖 - 胶原溶液注入内径为 2 mm,长 10 cm 的硅胶管,以铅丝夹住密封两端。将注模的样品顺轴向以自制微型调速仪缓慢浸入深低温冷淋剂(液氮)中,下降速度为 2×10^{-5} m/s,进行梯度冷淋(图 1)。

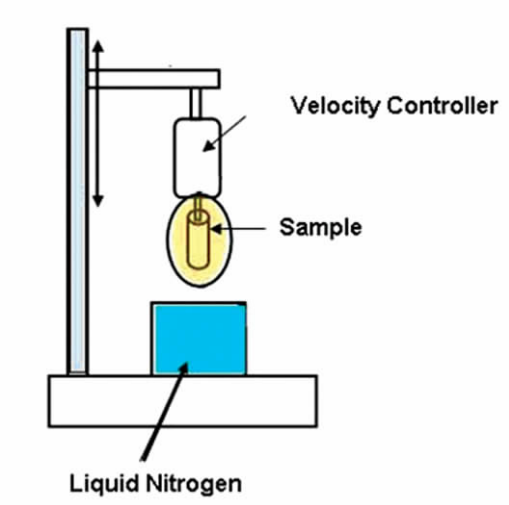


图 1 梯度冷淋模型示意图

Fig 1 The schematic diagram of the gradient freezing model

将 10 cm 长的胶原 - 壳聚糖悬浊液的硅胶管冰冻体裁剪成 2.0 cm 短节段放置于预冷的铝盘中,放入 Alpha-2 型冷冻干燥机,在 -60℃、100 mtorr 条件下冻干 24 小时。在冷冻干燥机的真空环境中,冷冻支架中的溶剂冰晶发生升华,得到具有微孔结构的支架。真空状态下升温至 0℃ 保持 6 小时,再继续

升温至 22℃ 保持 30~60 min,解除真空,升至常温,即可制得干燥成形的高仿真支架材料。

1.2 醋酸浓度对神经支架内部结构的影响

电子天平称取 5 份 280 mg 的 I 型胶原蛋白,分别放入浓度为 0~4 mg/ml (分为 0mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml、4 mg/ml 共 5 个浓度梯度)醋酸溶液 5 ml 中溶解 24 小时,在 4℃ 恒温环境中,以 15000 r/min 搅拌速度搅拌 90 分钟,制成悬浊液;另称取壳聚糖 70 mg 加入相应浓度的醋酸溶液 5 ml 中充分溶解,混合两种悬浊液并保持 4℃ 恒温,再以 15000 r/min 搅拌速度搅拌 90 分钟,充分混合制成不同醋酸浓度的胶原 - 壳聚糖凝胶状悬浊液,抽真空静置 12 小时。将上述悬浊液分别注入标准模具,顺轴向以 2×10^{-5} m/s 的速度进行梯度冷淋,常规方法进行冷冻干燥,制备胶原 - 壳聚糖支架材料。

1.3 冷淋速率对神经支架内部结构的影响

电子天平称取 280 mg 的 I 型胶原蛋白和 70 mg 壳聚糖,分别放入浓度为 3 mg/ml 醋酸溶液 5ml 中溶解 24 小时,常规方法混合制备成胶原 - 壳聚糖悬浊液。将上述悬浊液分别注入标准模具,将注模的样品顺轴向以自制微型调速仪缓慢浸入深低温冷淋剂中进行梯度冷淋,冷淋速度分别为 1×10^{-6} m/s 至 1×10^{-4} m/s (分为 1×10^{-6} m/s、 2×10^{-6} m/s、 5×10^{-6} m/s、 1×10^{-5} m/s、 2×10^{-5} m/s、 5×10^{-5} m/s、 1×10^{-4} m/s 共 7 个速度梯度)。常规方法进行冷冻干燥,制备胶原 - 壳聚糖支架材料。

1.4 扫描电镜 (SEM) 观察支架内部结构

将上述方法制备的支架材料经临界点干燥、喷金处理后,应用扫描电镜(型号:S-3400N)观察其横、纵截面的微观结构,并应用计算机图象分析技术测量计算材料孔径等指标。

2 结果

2.1 高仿真神经支架的结构特征

扫描电镜观察仿真神经支架的超微结构,纵截面可见平行排列的微管样结构(图 2A),微管内径相对均一,微管直径为 $37.41 \pm 11.0 \mu\text{m}$ (直径范围:25~55 μm);支架横截面为蜂窝样结构(图 2B),规则排列。此结构与正常神经基底膜结构具有高度的相似性。此外,平行排列的轴向微管之间有大量相互沟通的孔状结构连通(图 2A),这为神经再生过程中营养物质及代谢产物在微管间的运输奠定了结构基础,对于建立利于神经再生的内部微环境具有积极影响。

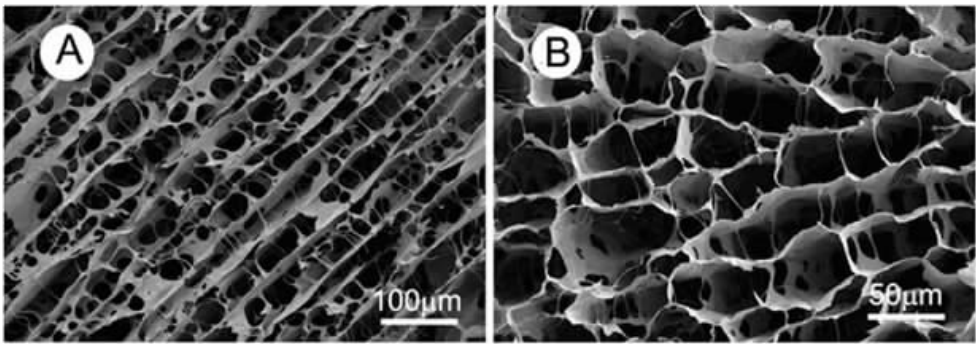


图 2 高仿真神经支架结构特征. A: 纵截面;B:横截面

Fig 2 The micro-structural characteristics of the highly bionic nerve scaffolds. A: longitudinal section; B: cross section

2.2 不同醋酸浓度对支架微管结构的影响

本研究利用不同浓度醋酸溶液配制的胶原-壳聚糖混悬液,在 2×10^{-5} m/s的冷淋速率下制备仿真神经支架。结果显示:当醋酸浓度为0mg/ml时,无法制备轴定向结构的神经支架。当醋酸浓度为1 mg/ml、2 mg/ml、3 mg/ml和4 mg/ml时,制备的支架材料在纵切面上均呈现轴向微管样结构,并且支架的孔径随着醋酸浓度的增加而逐渐增大(图3)。仿真支架的平均孔径分别为 $17.6\pm 10.2\mu\text{M}$ (醋酸浓度:1 mg/ml), $29.5\pm 9.3\mu\text{M}$ (醋酸浓度:2 mg/ml), $37.4\pm 11.3\mu\text{M}$ (醋酸浓度:3 mg/ml)和 $43.6\pm 12.7\mu\text{m}$ (醋酸浓度:4 mg/ml)。

2.3 不同冷淋速率对支架微管结构的影响

为了研究不同冷淋速度对于支架微管结构的影响,我们选用不同的冷淋速率制备高仿真神经支架。结果显示:仿真支架的内部结构特征与冷淋速度相关,但不呈线性关系。当冷淋速度为 2×10^{-5} m/s(图2A)、 1×10^{-5} m/s(图4A)、和 5×10^{-5} m/s(图4B)时,所制备的仿真支架内部均呈明显的轴向微管结构,其中,当冷淋速度为 2×10^{-5} m/s时,其轴向微管结构排列最为有序、规律(图2A)。当速度为 1×10^{-6} m/s, 2×10^{-6} m/s, 5×10^{-6} m/s

以及 1×10^{-4} m/s时,所制备的材料内部微管结构走向无明显规律,偶见轴向平行结构,但微管贯通长度十分有限(图4C, D, E, F)。不同的冷淋速度影响支架材料内部孔径的大小,冷淋速度与孔径的关系见表1。

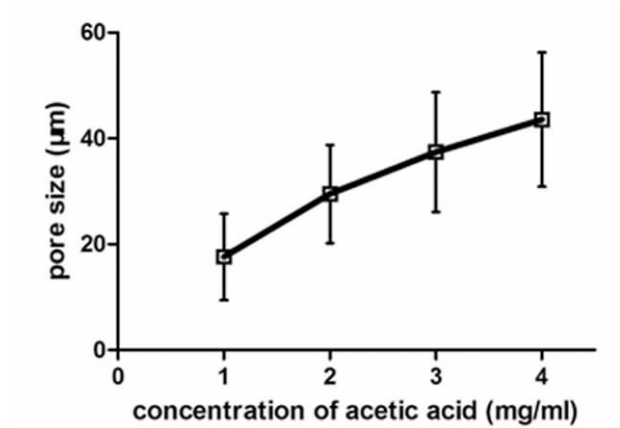


图3 支架孔径与醋酸浓度关系

Fig 3 The relationship between pore size and acetic acid concentration

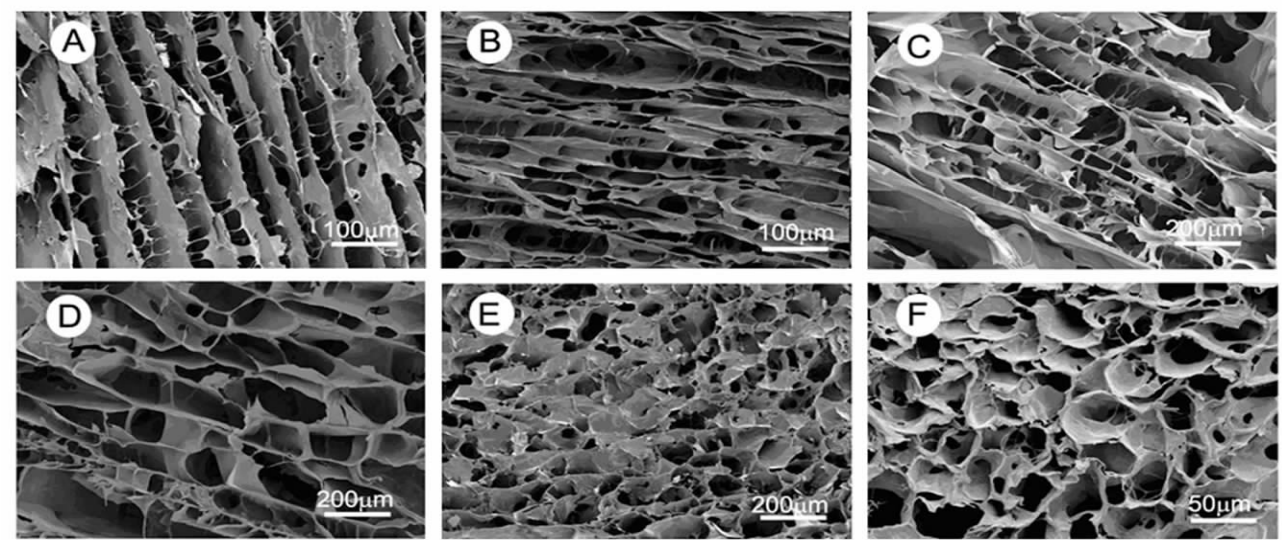


图4 不同冷淋速度制备的支架材料扫描电镜结果:A为 1×10^{-5} m/s,B为 5×10^{-5} m/s,C为 1×10^{-6} m/s,D为 2×10^{-6} m/s,E为 5×10^{-6} m/s的纵截面,F为 1×10^{-4} m/s的横切面。Scale bar:A, B=100μ m,D, E, F=200μ m,F=50μ m

Fig 4 The scanning electron microscopic observation of the scaffold prepared by different freezing velocities. The appearances of the longitudinal sections of the scaffold prepared by freezing velocities at 1×10^{-5} m/s (A), 5×10^{-5} m/s (B), 1×10^{-6} m/s (C), 2×10^{-6} m/s (D) and 5×10^{-6} m/s (E). The cross section of the scaffold prepared by freezing velocities at 1×10^{-4} m/s was also shown (F). Scale bar:A, B=100μ m,D, E, F=200μ m,F=50μ m

表1 冷淋速度与支架孔径的关系($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The relationship between freezing velocity and pore size (mean± SEM).

Freezing velocity (m/s)	Average pore size (μ m)	Direction of the pores
1×10^{-4}	25.8 ± 8.3	Randomly
5×10^{-5}	30.3 ± 9.5	Longitudianl pores
2×10^{-5}	37.4 ± 11.0	Longitudianl pores
1×10^{-5}	45.4 ± 10.2	Longitudianl pores
5×10^{-6}	78.2 ± 15.3	Randomly
2×10^{-6}	98.6 ± 11.3	Randomly
1×10^{-6}	154.3 ± 16.9	Randomly

3 讨论

周围神经损伤是目前临床上最常见的创伤之一,其中长节段的神经缺损是损伤最重、预后最差的损伤类型。目前临床上治疗长节段神经缺损主要采用自体神经移植术,即将未损伤区域的自体神经移植到损伤区域来桥接损伤的神经断端^[4-6]。然而,自体神经移植的应用受到很多因素限制:如获取供体神经需要二次手术,继发的供区神经功能丧失,供区神经来源不足,以及供受神经在组织结构和尺寸上不匹配等^[7,8]。因此,研发能够有效代替自体神经的移植替代物是目前亟待解决的难题。

大量研究表明,神经支架的内部结构是决定其修复效果的重要因素,其与正常神经基底膜的仿真程度对于受损神经的定向再生具有重要的引导作用^[9],也是影响神经缺损后神经功能恢复的一个关键要素^[3,10]。本课题组前期应用自主研发的仿真神经支架制备工艺制备出具有轴向微管样结构的仿真神经支架,动物实验表明,该仿真支架的微管样结构(孔径范围:45 μm ~75 μm)可有效引导神经定向生长,具有较好的神经损伤修复效果。以往研究表明:轴定向微管的管径(即本实验中的测量的孔径),是决定神经再生质量的一个重要因素^[10,11]。理论上讲,能够有效引导神经轴突再生的理想支架其孔径应该具备以下条件:小到能够物理性制约并有效引导再生轴突的定向生长;大到能够支持有效的血管化和再生支持细胞的渗入^[12-14]。因此,开展高仿真神经支架制备工艺的参数优化研究,确定影响仿真支架微管结构的关键因素,并最终筛选出最有利于引导神经再生的仿真神经支架结构参数具有重要意义。

醋酸浓度是影响仿真神经支架微管结构的一个重要因素。本研究结果显示,当醋酸浓度为0mg/ml,无法测量神经支架的平均孔径,主要原因在于:在未加入醋酸进行溶解制备的胶原-壳聚糖悬浊液中胶原和壳聚糖溶解十分不充分,材料中出现数量众多的大颗粒。这不但影响了支架轴向结构的形成,对于支架孔径也造成严重影响,使测量无法正常进行^[15]。此外,制备的仿真神经支架的孔径随着醋酸浓度的升高而升高,可能因为:当醋酸浓度升高时,溶液的pH值下降,在梯度冷淋过程中,随温度梯度形成的轴定向冰晶的直径随之增大,在真空干燥时,冰晶直接由固态转化为气态,制备了较大孔径的仿真神经支架^[15,16]。

冷淋速度是影响仿真神经支架微管结构的一个重要因素^[18],其中,决定孔径大小的关键因素为胶原-壳聚糖凝胶形成冰晶时的温度^[17,18]。当凝胶以较快速度逐渐经过形成冰晶的温度临界值时,凝胶中的水分子来不及形成冰晶即进入更低的温度,而在较低温度下,凝胶内水分子形成的冰晶体积小,因此冷冻干燥后制备的支架孔径较小,且微管的取向无规律性^[17,19]。当凝胶以适宜的速度经过温度梯度时,凝胶内的水分子会沿温度梯度形成轴取向的柱状冰晶结构,冷冻干燥时冰晶升华形成轴取向微管样结构,此外,冷淋速度降低,凝胶内水分子形成的柱状冰晶的临界温度升高,形成的柱状冰晶的直径增加,因此,微管的孔径增加^[17]。当冷淋速度进一步降低,凝胶经过温度梯度时,冰晶体积继续增大,并且多个冰晶相互融合,因此,制备的支架的微管直径继续增大,微管的排列又逐渐失去规律性^[17,20]。

综上所述,本实验立足于前期开发的高仿真神经支架制备

工艺,发现醋酸浓度和冷淋速度是仿真神经支架制备过程中决定内部微管结构的关键因素,通过改变醋酸浓度和冷淋速度可制备不同孔径的仿真神经支架,为下一步在体筛选可引导神经再生的最佳仿真支架结构参数奠定基础。

参考文献(References)

- [1] 矫树生, 陈建梅, 游华, 等. 嗅鞘细胞复合 PLGA 导管修复周围神经缺损的研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 494-503
Jiao Shu-sheng, Chen Jian-mei, You Hua, et al. Research on repairing of peripheral nerve defect by olfactory, ensheathing cells combined with PLGA conduit [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(4): 494-503 (In Chinese)
- [2] 屈巍, 罗卓荆. 高仿真壳聚糖支架修复神经缺损的有效性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18: 421-425
Qu Wei, Luo Zhuo-jing. The efficacy of biomimicking chitosan scaffolds in bridging large nerve defect [J]. Orthopedic Journal of China, 2010, 18: 421-425 (In Chinese)
- [3] Hu X, Huang J, Ye Z, et al. A novel scaffold with longitudinally oriented micro-channels promotes peripheral nerve regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15: 3297-3308
- [4] Lee YH, Chung MS, Gong HS, et al. Sural nerve autografts for high radial nerve injury with nine centimeter or greater defects [J]. J Hand Surg Am, 2008, 33: 83-86
- [5] Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap [J]. Prog Neurobiol, 2010, 92: 245-276
- [6] Huang J, Hu X, Lu L, et al. Electrical stimulation accelerates motor functional recovery in autograft-repaired 10 mm femoral nerve gap in rats [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(10):1805-1813.
- [7] Siemionow M, Sonmez E. Nerve allograft transplantation: a review [J]. J Reconstr Microsurg, 2007, 23: 511-20
- [8] Beris A, Lykissas M, Korompilias A, et al. End-to-side nerve repair in peripheral nerve injury[J]. J Neurotrauma, 2007,24: 909-16
- [9] 孙廓, 胡平, 张峰, 等. 人体正中神经内部显微结构的三维重建与可视化研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16 (18): 1385-1388
Suo Kuo, Hu Ping, Zhang Feng, et al. Three dimensional reconstruction and visualization of internal microstructure of median nerve [J]. Orthopedic Journal of China, 2008, 16 (18): 1385-1388 (In Chinese)
- [10] Kim YT, Haftel VK, Kumar S, et al. The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps [J]. Biomaterials, 2008,29: 3117-3127
- [11] Bozkurt A, Brook GA, Moellers S, et al. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix[J]. Tissue Eng, 2007,13: 2971-2979
- [12] Plikk P, Målberg S, Albertsson AC. Design of resorbable porous tubular copolyester scaffolds for use in nerve regeneration [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(5): 1259-1264
- [13] Jenq CB, Jenq LL, Coggeshall RE. Nerve regeneration changes with filters of different pore size [J]. Exp Neurol, 1987, 97(3): 662-671
- [14] Wong DY, Krebsbach PH, Hollister SJ. Brain cortex regeneration affected by scaffold architectures [J]. J Neurosurg, 2008, 109 (4): 715-722
- [15] Ghosh A, Azam Ali M, Walls R. Modification of microstructural morphology and physical performance of chitosan films [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(2): 179-186

(下转第 641 页)

- end-expiratory pressure on inflammatory response in oleic acid-induced lung injury and whole-lung lavage-induced lung injury [J]. J Anesth, 2007,21(1):47-54
- [9] Xing JJ, Chen X, Tu PF, Jiang Y, Zhao JY. Effects of salvianolic acids on erythrocyte deformability in oleic acid induced acute lung injury in rabbits[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2006,34(4):507-517
- [10] 龚裕强, 陈毅军, 施小燕, 孙来芳, 孔万权, 庄荣, 陈大庆, 应斌宇. 不同途径茶多酚对兔急性呼吸窘迫综合征肺保护的研究[J]. 中西医结合急救杂志, 2007,14(3):154-158
- [11] Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, et al. Antiinterleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2002,30(10):2335-2337
- [12] McClintock D, Zhuo H, Wickersham N, et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury[J]. Crit Care, 2008,12(2):R41
- [13] Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP, et al. Chemokines in lung injury [J]. Chest, 1999,116(1 Suppl):103S-110S
- [14] Bauer TT, Monton C, Torres A, et al. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls[J]. Thorax, 2000,55(1):46-52
- [15] Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2001,7(1):1-7
- [16] Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: Acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung [J]. Critical Care, 2004,8(6):453-461
- [17] Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling [J]. Curr Opin Hematol, 2000,7(3):178-182
- [18] Downey GP, Dong Q, Kruger J, et al. Regulation of neutrophil activation in acute lung injury[J]. Chest, 1999,116(1 Suppl):46S-54S
- [19] Bao Z, Ye Q, Gong W, et al. Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury [J]. Int Immunopharmacol, 2010,10(2):259-263

(上接第 627 页)

- [16] Yannas IV, Tzeranis DS, Harley BA, et al. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization [J]. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2010, 368(1917): 2123-2139
- [17] Madaghiele M, Sannino A, Yannas IV, et al. Collagen-based matrices with axially oriented pores [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(3): 757-767
- [18] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds [J]. Biomaterials, 2004, 25(6): 1077-1086
- [19] Haugh MG, Murphy CM, O'Brien FJ. Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(5): 887-894
- [20] Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds [J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 72(2): 136-145