

壳聚糖- β -磷酸三钙复合层状支架的制备与研究

陆依凡^{1,2,3}, 邹多宏^{4,5,6}, 丁如愿^{1,2,3}, 侯爱兵^{1,2,3}

摘要 目的 通过合成壳聚糖- β -磷酸三钙 (CS- β -TCP) 支架, 测试其力学性能、生物相容性和体外成骨向分化能力, 研究其作为生物支架修复骨缺损的可能性。方法 通过双向冻干技术制备 CS- β -TCP 支架, 使用扫描电子显微镜电镜 (SEM)、能量分散光谱 (EDS) 和 X 线衍射仪 (XRD) 对该支架进行结构表征、元素分布和组成成分分析, 力学万能仪测试其压缩强度。通过 CCK-8 法和活死染色探究其生物相容性, 采用荧光染色法检测复合组 (CS- β -TCP) 支架的细胞黏附生长情况。qRT-PCR 法检测成骨相关基因: 骨形态发生蛋白 (BMP2), RUNX 相关转录因子 2 (RUNX2) 和 I 型胶原 (COL1) 的表达, ALP 染色检测 BMSCs 的成骨分化效果。结果 扫描电镜结果显示 CS- β -TCP 支架呈平行排列的薄层状结构, 疏松多孔, β -TCP 颗粒均匀的分布在壳聚糖骨架上, 具有良好的机械性能, CS- β -TCP 支架的 CCK-8 结果与对照组无明显差异, 活死染色结果表明复合组支架上细胞具有较高的细胞活性。qRT-PCR 和 ALP 结果表明复合组支架体外具有一定的骨诱导能力, 能够促进间充质干细胞的成骨向分化。结论 复合组支架具备优异的机械性能和生物学性能, 能够诱导间充质干细胞成骨方向分化, 为骨缺损的修复研究提供了一种新的思路。

关键词 壳聚糖; β -磷酸三钙; CS- β -TCP 支架; 双向冻干技术; 成骨分化

中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1122-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.020

外伤、感染、肿瘤切除等原因通常会造成骨组织缺损, 小范围的缺损常可以自愈, 较大范围的缺损如临界骨缺损则无法实现自我修复。目前, 临床上常

用的方法有自体骨移植、异体骨移植, 但供源短缺或者免疫反应等限制了其应用^[1]。应用骨组织工程修复临界骨缺损近年来逐渐成为研究的热点, 其中生物支架在整个修复过程中起到至关重要的过程, 被称为组织工程的“基石”^[2]。

壳聚糖 (chitosan, CS) 是一种丰富的天然多糖, 具有良好的生物相容性、生物降解性、抗菌性、价格低廉等优点被广泛应用于组织工程研究中^[3-5]。 β -磷酸三钙 (β -TCP) 具有优异的降解性能和骨传导性, 能够较好的修复骨缺损。本实验将 CS 和 β -TCP 混合, 通过双向冻干技术制备了具有互相平行的薄层状、多孔状生物支架, 该支架具有优异的压缩强度和弹性形变能力, 良好的生物相容性以及诱导间充质干细胞成骨分化能力, 具有修复临界骨缺损的潜力。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠, 3 周龄, 体质量 (50 \pm 5) g, 购自安徽医科大学实验动物中心, 整个实验过程对动物处置均符合医学伦理学要求 (批号: LLSC20200362)。

1.2 合成材料 壳聚糖 (85% 去乙酰化程度)、 β -TCP (生物医用级, \geq 98%, β -phase basis, $<$ 0.2 μ m, 美国 aladdin 公司)。

1.3 主要试剂和仪器 DEME、胰酶消化液 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); BCIP/BNT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (上海碧云天公司); 二氧化碳孵育箱 (美国 Thermo 公司); CCK-8 试剂 (日本同仁公司); 酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 LSM880、扫描电子显微镜 (德国蔡司公司); X 线衍射仪 (荷兰帕纳科公司); 高温高压灭菌锅 (日本 Hirayama 公司)。PCR 引物 (上海生物工程股份有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Stratagene 公司); 力学万能机 (美国英斯特朗公司)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养 3 周龄雄性 SD 大鼠脱颈处死, 在超净工作台中去表皮及肌肉组织。将后肢股骨两端骨骺端剪去, 用

2022-05-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31870969)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院, 合肥 230032

³ 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032

⁴ 上海交通大学口腔医学院, 上海 200001

⁵ 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科, 上海 200001

⁶ 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200001

作者简介: 陆依凡, 男, 硕士研究生;

侯爱兵, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

houaibing1964@sohu.com

5 ml 注射器将骨髓冲出至培养皿中,加入含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% 二氧化碳条件下进行培养,3 d 后更换培养基,培养至 7 d 后对原代细胞进行传代。

1.4.2 双向冻干制备 CS-β-TCP 支架 将 CS-β-TCP 溶液倒入预制的硅胶模具中,模具的一侧浸入液氮,使得冰核在溶液底生成并且呈现平行的、长程排列的冰片。冷冻完成后将其转入真空冻干机冻干,使用 0.3 mol/L NaOH 乙醇溶液对样品进行除酸,随后用去离子水反复清洗样品。

1.4.3 力学测试 将冻干的复合组(CS-β-TCP 支架)支架制备成 10 mm × 10 mm × 10 mm 的测试样品,通过力学万能实验机对样品进行压缩循环测试,以 1 mm/s 的速度将样品压缩 40%、60%、80%,观察其回弹能力。记录压缩-回弹过程并绘制压缩循环曲线。

1.4.4 结构表征 将 CS-β-TCP 支架制备成 2 mm × 2 mm × 2 mm 的测试样品,将样品截面以导电胶固定于样品台,低真空下喷金后使用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)在 5 kV 的加速电压下拍摄样品,能量分散光谱(energy disperse spectroscopy, EDS)观察各元素分布。将复合组支架平铺于试件台上,用 X 线衍射仪分析进行扫描,分析其组成成分。

1.4.5 细胞生物相容性实验 用打孔器将复合组支架制备成直径 5 mm、厚度 2 mm 的圆形样品。每个样品接种 1×10^4 个大鼠骨髓间充质干细胞,空白对照组仅在 96 孔板底接种细胞,每组 5 个副孔。1 d、4 d、7 d 分别吸除培养基, PBS 清洗两遍后,加入 CCK-8 溶液(CCK-8 : DEME = 1 : 9) 200 μl/孔, 37 °C 孵育 2 h 后使用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.4.6 细胞活力和细胞黏附实验 ①细胞活力实验(活死染法):大鼠骨髓间充质干细胞接种在支架上于 96 孔板中培养 1、4、7 d 后弃除原有培养基, PBS 清洗 3 遍后,将 10 μl calcein-AM 和 15 μl propidium iodide 溶解于 5 ml PBS 中混匀,每孔加入 100 μl 混合液, 37 °C 孵育 15 min 后, PBS 清洗 3 遍,使用激光共聚焦检测细胞染色情况,其中活细胞为绿色荧光,死细胞为红色荧光。②细胞黏附实验:大鼠骨髓间充质干细胞接种在复合组支架上 3 d 后, PBS 清洗 3 遍,用 4% 多聚甲醛固定样品 30 min。0.1% 的 Triton-X 100 对支架上细胞破膜 10 min,随后用 1% 的 BSA 溶液封闭样品 1 h。使用 0.1% 的罗丹明

标记的鬼笔环肽染色 30 min, DAPI 对细胞核染色 5 min。随后用激光共聚焦进行检测。

1.4.7 细胞成骨分化的检测 将 5×10^5 个鼠骨髓间充质干细胞分别接种在纯壳聚糖组和复合组支架上培养,每 3 d 换液 1 次, 7 d 时用 TRIzol 提取细胞中的 RNA 并根据试剂说明书逆转录合成 cDNA。采用 qRT-PCR 检测骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)、RUNX 相关转录因子 2(RUNX family transcription factor 2, RUNX2)、一型胶原(collagen type I, COL1)的基因表达水平(引物序列见表 1)。并对支架进行碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)染色,检测 ALP 活性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS Statistics 进行统计学分析,所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别采用双因素方差分析和单因素方差分析对 CCK-8 和 qRT-PCR 结果进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
BMP2	F: ACCATGGGTTTGTGCTGGAA
	R: CCGCTGTTTGTGTTTCGCCT
RUNX2	F: CGAGGCAAACACAGGCTAAG
	R: AGTTGGGTGGGTTACTGGAC
COL1	F: AGACATCCCGCCAGTCAC
	R: AGATCAGGTCATCCGACAAG
β-actin	F: TGTCAACCACTGGGACGATA
	R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

2 结果

2.1 CS-β-TCP 支架表征 CS-β-TCP 支架的扫描电镜下呈现相互平行的薄层多孔结构,孔径大小均匀,且具有良好的贯通性。见图 1A。图 1B 为 CS-β-TCP 支架的压缩循环曲线,结果表明 CS-β-TCP 支架具有良好的压缩性能,支架压缩 80% 后仍可恢复原有形状。

2.2 CS-β-TCP 支架的成分检测 XRD 结果显示,复合组支架中含有 β-TCP 颗粒,EDS 结果表明,β-TCP 颗粒均匀的分布在复合组支架的薄层结构上。见图 2。

2.3 CS-β-TCP 支架生物相容性实验 CCK-8 结果显示,大鼠骨髓间充质干细胞与材料共培养 1、4、7 d 后,与空白对照相比,纯壳聚糖组和复合组的吸光度无明显差异,细胞增殖未受到抑制,仍保持较高的增殖活性,见图 3。

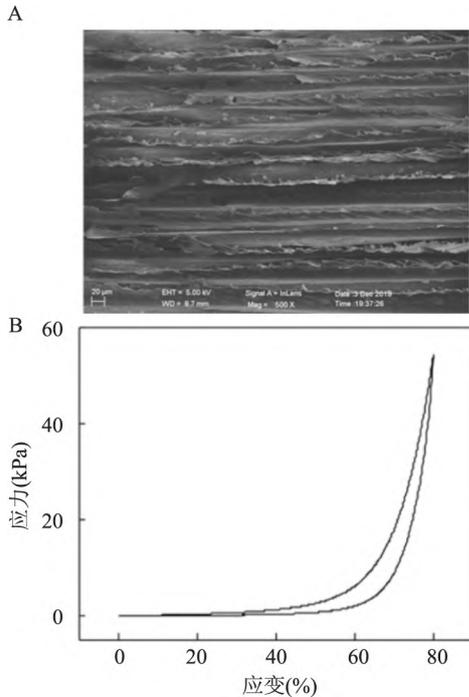


图1 CS-β-TCP 支架的力学表征

A: 复合组支架的多层状结构的扫描电镜; B: 复合组支架的压缩循环曲线

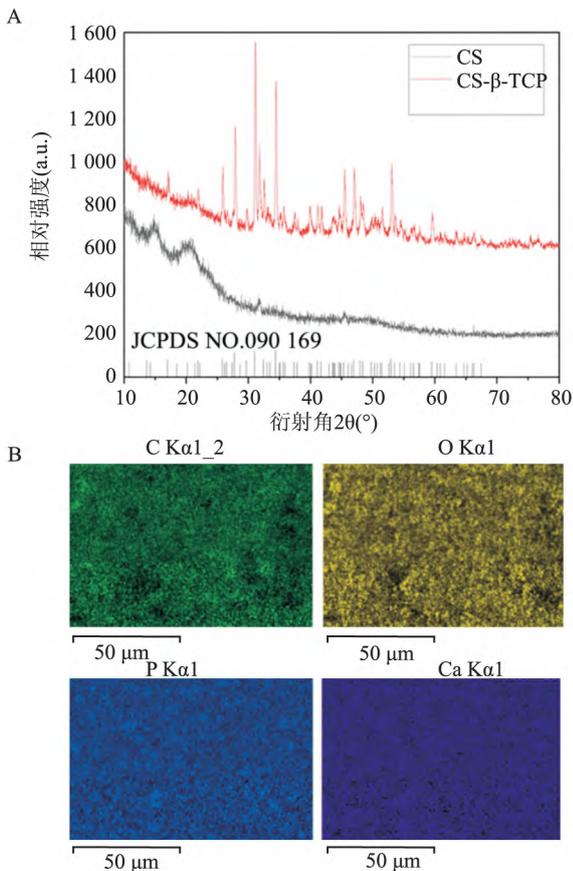


图2 CS-β-TCP 支架成分分析

A 纯壳聚糖组和复合组的 XRD 曲线; B: 复合组的元素成分分布

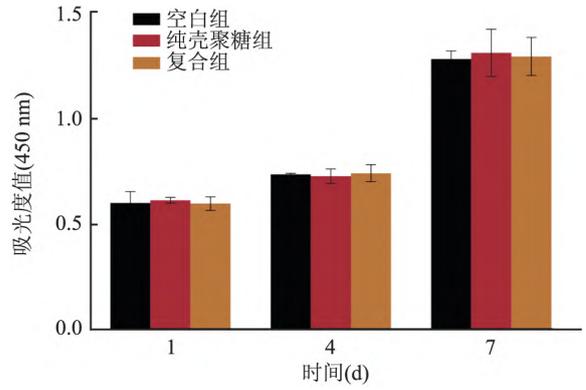


图3 支架与细胞共培养后的生物相容性

2.4 细胞活性检测 结果如图 4 所示,支架上死细胞较少,细胞活性高,同时细胞表现出良好的增殖能力。复合组支架对细胞活性无影响。

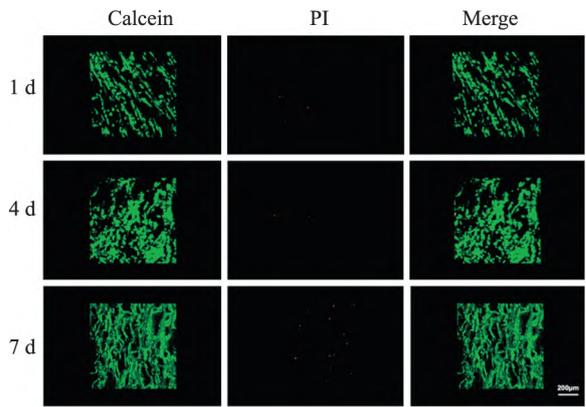


图4 CS-β-TCP 支架接种细胞后细胞活力检测

Calcein: 钙黄绿色,活细胞为绿色; PI: 碘化钾,死细胞为红色

2.5 细胞黏附能力 大鼠骨髓间充质干细胞接种在 CS-β-TCP 支架 72 h 后,荧光染色结果表明细胞可以较好的黏附在复合组支架上。此外,细胞能够较好的张入层状微孔结构中,为细胞的黏附和分化提供了良好的力学刺激,见图 5。



图5 细胞接种在 CS-β-TCP 支架 72h 后,细胞黏附的检测

DAPI: 染细胞核为蓝色; Phalloidin: 染细胞骨架为红色

2.6 支架的促成骨分化能力 qRT-PCR 结果表明,和纯壳聚糖组相比,复合组的成骨相关基因 BMP2, RUNX2 以及 COL1 的表达增强,差异有统计

学意义($P=0.0003$, $F=55.78$; $P=0.0003$, $F=38.20$; $P=0.0215$, $F=15.91$) ,且培养至第7 d、14 d时,ALP染色结果显示,复合组的ALP阳性结果更加明显,见图6。

3 讨论

β -TCP是目前临床上较为常用的骨科材料,具有良好的生物相容性,骨传导性以及降解性^[6-7],广泛应用于临床骨缺损的再生修复。然而单纯的磷酸盐生物支架脆性较高,成分较为单一,不能较好的模拟天然骨的结构。常用的骨水泥作为骨组织缺损修复策略也具有一定局限性,其较小的孔径阻碍血管的长入,导致其中间部位营养缺乏而造成组织坏死,进一步影响缺损修复的效果。壳聚糖作为天然多聚物,其结构与骨组织中的糖胺聚糖相似,在成骨细胞的附着和矿化方面具有重要的作用^[8-9],但单纯壳聚糖的机械性能较差,作为支架修复骨缺损时不能提供足够的机械支持,从而影响骨组织的修复。本实验将 β -TCP颗粒与壳聚糖溶液混匀,通过双向冻干技术制备的复合物支架,不仅能够降低 β -TCP的生物脆性,提高壳聚糖的机械强度,同时有机物和无机物的结合使得CS- β -TCP复合层状支架能够更好的模拟骨组织的结构。双向冻干技术使得支架具备较多的孔径结构以允许血管组织的长入,能够更

好的进行营养的交换和代谢物的更新,从而保证支架中心营养充足,加速骨缺损的修复。此外,平行的薄层状结构赋予支架优异的弹性性能,可以保证支架处于压缩状态而植入缺损部位,壳聚糖骨架的形状记忆能力使得支架能够自适应缺损的形状,这些特点使得CS- β -TCP复合层状支架在不规则缺损的修复和微创领域中具有一定的潜力^[10]。

CS- β -TCP复合层状支架的扫描电镜可以观察到 β -TCP颗粒均匀的分布在层状结构内,使得层状结构具有较为粗糙的表面,这种结构对于细胞的黏附可能具有一定的帮助,同时壳聚糖表面的正电荷可以吸引带负电的细胞膜,促进细胞的黏附^[11-12]。间充质干细胞黏附于支架后,同时受到机械张力和钙离子的刺激而向成骨细胞分化。此外,壳聚糖可通过募集巨噬细胞从而减少炎症反应,使得CS- β -TCP复合层状支架在修复骨缺损的同时抑制炎症的发生,更好的促进骨缺损的修复^[13]。体外细胞实验结果表明细胞可以较好的与支架共存,同时能够随培养时间的延长而增殖。这些结果证明该CS- β -TCP复合层状支架具备生物支架的基本要求,不会对机体产生毒副作用。

体外检测BMP2、RUNX2和COL1的变化可以反映间充质干细胞向成骨细胞分化的程度。qRT-PCR实验表明与阴性对照组(纯壳聚糖组)相比,复

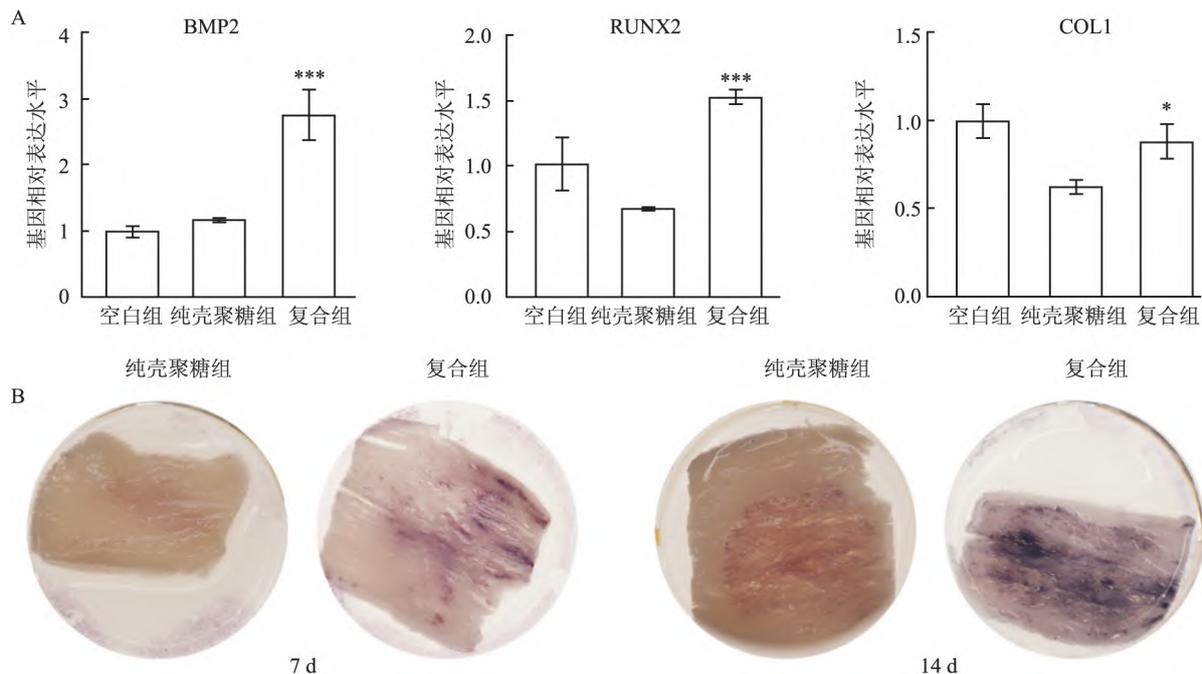


图6 CS- β -TCP支架的促成骨分化能力的检测
A: 成骨相关基因表达的检测; B: 碱性磷酸酶染色

合组支架能够促进骨髓间充质干细胞显著表达 BMP2、RUNX2 和 COL1 基因,表明该复合组支架可以促进间充质干细胞向成骨细胞分化。ALP 是成骨分化的标志性酶,在骨矿化过程中起到重要作用^[14]。对复合组支架进行 ALP 染色,与阴性对照组相比,复合组支架的阳性结果更为明显,表明该组支架上的间充质干细胞骨矿化程度更高。qRT-PCR 和 ALP 染色结果共同表明复合组支架具有明显的促进间充质干细胞成骨分化能力。但本文所研究材料结构较为单一,成分上不存在梯度变化,对于复杂的缺损和位于两种组织交界处的缺损修复效果较局限,例如关节处缺损常涉及表面的软骨和软骨下骨组织,且骨和软骨组织具有不同的硬度和矿物质含量,单一支架难以同时修复骨和软骨缺损。因此该材料需进一步改进,使其能够适应复杂缺损处的梯度变化,从而实现复杂缺损的修复。

综上所述,本实验制备的 CS- β -TCP 复合层状支架具有良好的机械性能和生物相容性,体外实验表明能够促进间充质干细胞的成骨向分化,为骨缺损的修复提供一种新的思路。

参考文献

- [1] Zhang M, Lin R, Wang X, et al. 3D printing of Haversian bone-mimicking scaffolds for multicellular delivery in bone regeneration [J]. *Sci Adv* 2020, 6(12): eaaz6725.
- [2] Balagangadharan K, Dhivya S, Selvamurugan N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104(Pt B): 1372–82.
- [3] Muxika A, Etxabide A, Uranga J, et al. Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105(Pt 2): 1358–68.
- [4] Abd El-Hack M E, El-Saadony M T, Shafi M E, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 2726–44.
- [5] Wieckiewicz M, Boening K W, Grychowska N, et al. Clinical application of chitosan in dental specialties [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17(5): 401–9.
- [6] Bohner M, Santoni B L G, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties [J]. *Acta Biomater*, 2020, 113: 23–41.
- [7] Rh Owen G, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106(6): 2493–512.
- [8] Maji K, Dasgupta S, Pramanik K, et al. Preparation and evaluation of gelatin-chitosan-nanobioglass 3d porous scaffold for bone tissue engineering [J]. *Int J Biomater*, 2016, 2016: 9825659.
- [9] Suh J K, Matthew H W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2589–98.
- [10] Correia C O, Mano J F. Chitosan scaffolds with a shape memory effect induced by hydration [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2(21): 3315–23.
- [11] Dvir T, Timko B P, Kohane D S, et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues [J]. *Nat Nanotechnol*, 2011; 6(1): 13–22.
- [12] Freier T, Koh H S, Kazazian K, et al. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation [J]. *Biomaterials*, 2005; 26(29): 5872–78.
- [13] Vasconcelos D P, de Torre-Minguela C, Gomez A I, et al. 3D chitosan scaffolds impair NLRP3 inflammasome response in macrophages [J]. *Acta Biomater*, 2019, 91: 123–34.
- [14] 许敏, 吴婷婷, 何家才. β -TCP 作用 T 淋巴细胞后调控 BMSCs 成骨分化的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1168–73.

Fabrication and research of chitosan- β -TCP composite lamellas scaffold

Lu Yifan^{1 2 3}, Zou Duohong^{4 5 6}, Ding Ruyuan^{1 2 3}, Hou Aibing^{1 2 3}

(¹Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; ⁴Stomatological College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001; ⁵Dept of Oral Surgery of Shanghai Jiao Tong University Affiliated Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai 200001; ⁶Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200001)

Abstract Objective To investigate the mechanical property, biocompatibility, and osteogenic differentiation ability of chitosan- β -TCP (CS- β -TCP) scaffold, meanwhile, to study the possibility of the composite as a scaffold to repair bone defect. **Methods** Briefly, the CS- β -TCP composite scaffold was fabricated utilizing bidirectional lyophilization technique. Then, the scaffold micro-structure was observed by scanning electron microscopy (SEM),

网络出版时间: 2022-06-28 9:49 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20220624.1741.020.html>

基于 miR-15a-5p/P53 信号通路探讨 EMT 与肺癌细胞阿霉素耐药的关系

魏东¹, 辛运超², 刘博³, 容宇¹, 李彦明¹, 郝雁冰¹

摘要 目的 探讨 miR-15a-5p 在肺癌细胞对阿霉素(DOX) 耐药中的作用,并阐明其与 DOX 耐药之间的功能和机制联系。方法 分别采用 si-miR-15a-5p、miR-15a-5p 模拟物转染 A549、A549/DOX 抗性细胞(A549/D)。采用 MTT 法测定细胞活力,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blots 检测上皮间充质转化(EMT) 相关蛋白及 P53 蛋白表达,qRT-PCR 检测 miR-15a-5p 表达。通过生物信息学预测与双荧光素酶报告子分析 miR-15a-5p 潜在靶基因。采用 A549/D 细胞构建裸鼠移植瘤模型,分析 miR-15a-5p 过表达促进 DOX 的体内抗肿瘤作用。结果 MTT 分析结果显示,miR-15a-5p 的敲低提高了 A549 细胞的细胞活力(IC_{50} 值: $8.86 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$),miR-15a-5p 的过表达降低了 A549/D 细胞的细胞活力(IC_{50} 值: $1.92 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$)。并且在 A549 细胞中阻断 miR-15a-5p 减少凋亡($P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达促进凋亡($P < 0.001$)。Western blot 分析显

示转染 si-miR-15a-5p 逆转了 DOX 调节 EMT 的作用。生物信息学预测证明 P53 和 miR-15a-5p 之间存在特异性结合位点。在 A549 细胞中阻断 miR-15a-5p 减少 P53 蛋白表达($P < 0.001$),在 A549/D 细胞中增加 miR-15a-5p 表达增加 P53 蛋白表达($P < 0.01$)。体内实验显示,miR-15a-5p agomir 联合 DOX 可降低肿瘤体积和 N-cadherin 的表达水平,同时增强了 P53、E-cadherin 蛋白的表达水平。结论 miR-15a-5p 过表达可能通过靶向 P53 抑制 EMT 过程,增强肺癌细胞对 DOX 治疗的敏感性。

关键词 miR-15a-5p; P53; 上皮间充质转化; 非小细胞性肺癌; 耐药

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1127-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.021

2022-05-14 接收

基金项目: 河北省卫健委重点科技研究计划(编号: 20200552)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 胸外科、² 耳鼻咽喉头颈外科、³ 病理科 张家口 075000

作者简介: 魏东,男,硕士,主治医师;

郝雁冰,男,本科,副主任医师,责任作者,E-mail: xx-bzx1997@163.com

非小细胞肺癌是全世界人类肿瘤相关死亡的主要原因,5 年生存率 $< 15\%$ [1]。单纯化疗或联合放疗为治疗晚期肺癌的一线治疗策略 [2]。然而,由于固有的或获得性的耐药性,化疗的疗效是短暂的,并且受到显著地限制,从而导致较差的生存率 [3]。阿霉素(doxorubicin, DOX) 已被用于肺癌的治疗。然而,DOX 耐药性限制了其临床疗效 [4]。更好地理解

X-ray diffraction (XRD) and energy disperse spectroscopy (EDS) were employed to analyze the ingredients and elements distribution of scaffold, respectively. Additionally, the compression strength of the scaffold was tested by mechanical universal testing machine. The biocompatibility of the scaffold and the cell viability research were characterized via CCK-8 assay and Live/Dead staining, respectively, and the cell adhesion was studied by DPAI/Phalloidine fluorescence staining. qRT-PCR was employed to investigate the expression level of osteogenic-related gene such as BMP2, RUNX2 and COL1. ALP staining was carried out to measure the osteogenic differentiation effect of BMSCs. **Results** The CS- β -TCP scaffold was comprised of bulk parallel, aligned and thin lamellas with many porous structures. β -TCP particles were evenly distributed over CS framework layers and the CS- β -TCP scaffold possess excellent elastic property and biocompatibility, moreover, the cell seeded on scaffold revealed high cell viability and continuous proliferation. qRT-PCR and ALP staining results demonstrated that the CS- β -TCP scaffold could induce osteogenic differentiation of BMSC. **Conclusion** To sum up, the CS- β -TCP scaffold expressed desired mechanical and biological properties, and could induce BMSC differentiate into osteoblast, the composite scaffold provided a promising strategy for bone defect regeneration.

Key words Chitosan; β -TCP; composite scaffold; bidirectional lyophilization technique; osteogenic differentiation