

文章编号: 1000-3851(2013)01-0103-09

微米级煅烧羟基磷灰石/壳聚糖复合膜的制备及性能

李瑞欣, 张西正*, 郝庆新, 刘璐, 郭勇,
侍才洪, 李昊, 吴静, 武继民

(军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161)

摘要: 将猪松质骨脱脂脱蛋白、煅烧后再进行球磨制备羟基磷灰石(HA), 与壳聚糖(CS)共混制备成 HA/CS 复合膜。通过正交设计考察了球磨条件对 HA 粒径的影响, 在复合膜上接种 MC3T3-E1 前体成骨细胞, 采用 SEM 及四甲基偶氮唑盐(MTT)方法检测细胞在膜表面的形态及增殖, 评价了材料的细胞相容性。结果表明, 所制备 HA 为粒径较均一的微米级球形粒子, 中值粒径 D_{50} 为 $1.21 \sim 1.67 \mu\text{m}$ 。共混膜内 HA 在基质中分布均匀, 二者结合紧密, 复合膜具有较好的力学性能, MC3T3-E1 细胞能在复合膜上很好地黏附生长。细胞增殖结果表明, 复合膜制备条件煅烧温度为 1000°C , 球配比 $4:4:2$, 球磨速率为 $230 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 球磨时间为 2.5 h , HA:CS = $5:5$ (质量比)时最利于细胞增殖。

关键词: 羟基磷灰石; 煅烧; 壳聚糖; 复合膜; MC3T3-E1 成骨前体细胞

中图分类号: TB332 **文献标志码:** A

Preparation and properties of micro-hydroxyapatite/chitosan composite membrane

LI Ruixin, ZHANG Xizheng*, HAO Qingxin, LIU Lu, GUO Yong,
SHI Caihong, LI Hao, GUAN Jing, WU Jimin

(Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China)

Abstract: Hydroxyapatite(HA) was prepared using porcine trabecular bone after being degreased, deproteinized, calcined and ball milling. HA/chitosan(CS) composite membranes were prepared by blending and drying HA and CS solution. The effect of milling conditions on the HA particle size was inspected by the orthogonal design. MC3T3-E1 preosteoblasts were seeded on the surface of the composite membranes, and then cell morphology and proliferation were detected by SEM and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) methods. The results show that the prepared HA is relatively homogeneous micrometer-scale spherical particle with median diameter(D_{50}) in $1.21 \sim 1.67 \mu\text{m}$ range, and HA particles are distributed uniformly in the matrix, HA particle and CS combined closely. Composite membrane has good mechanical properties, MC3T3-E1 cells can adhere and grow well on the surface of composite membrane. The cell proliferation results show that composite membrane under the preparation conditions: calcination temperature 1000°C , the milling ball proportion $4:4:2$, milling rate $230 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, milling time 2.5 h , HA:CS = $5:5$ (mass ratio) is the most beneficial for cell proliferation.

Keywords: hydroxyapatite; calcination; chitosan; composite membrane; pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)的化学组成为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 是人骨骼的主要无机组成成分。在自然人骨中 HA 纳米晶体尺寸为 $(5 \sim 20) \text{ nm} \times 60 \text{ nm}^{[1]}$, 针状晶体沿一定方位分布在胶原网络之中^[2]。大量的研究证实, HA 具有良好的

生物相容性和生物活性, 与骨骼形成很强的化学结合, 能产生骨传导作用, 是较为理想的硬组织替代材料, 因此广泛应用于矫形外科领域^[3]、骨移植、骨骼修复的组织支架材料^[4]。

煅烧骨(sintered bone, SB)完全消除了异种生物

收到初稿日期: 2011-11-18; 收到修改稿日期: 2012-03-28; 网络出版时间: 2012-09-17 15:50:34

网络出版地址: www.cnki.net/kcms/detail/11.1801.TB.20120917.1550.015.html

基金项目: 国家自然科学基金重点项目、面上项目(10832012, 11072266)

通讯作者: 张西正, 博士, 教授, 研究方向: 组织工程、生物力学 E-mail: z56787@sohu.com

骨的免疫原性^[5]，孔隙与松质骨的结构相似，有良好的孔与孔之间的交通，有利于成骨细胞、血管的长入，具有良好的传导成骨作用^[6]。高媛^[7]采用成骨前体细胞 MC3T3-E1 与牛煅烧骨联合培养，发现成骨细胞能在材料表面良好黏附、增殖和分化，还能深入到材料内部的孔隙中生长，并且煅烧温度也对 HA 的细胞相容性有较大影响。SB 的主要成分为 HA 晶体，但是 SB 的生物吸收率要优于人工合成的 HA。Matsuda 等将 SB 植入小鼠顶骨中，同时以人工合成的 HA 作对照，研究发现，植入 SB 1~2 周后即有新生骨侵入 SB 中，5 周后 SB 即被新生骨覆盖，而植入合成 HA 的对照组，5 周后没有发现新生骨侵入 HA，HA 也没有被吸收迹象^[8]。

尽管 HA 有优良的生物相容性，但是单一 HA 在生理环境下的脆性及低疲劳强度限制了其在负荷下骨修复或骨替代的应用，将制备的煅烧骨孔隙表面复合一层高分子材料可以提高其综合性能^[9-10]。将 HA 与医用高分子材料复合从而增强韧性，并充分发挥 HA 良好的生物相容性，是 HA 复合材料的主要研究方向^[11-20]。在医用高分子材料中，壳聚糖 (chitosan, CS) 是由甲壳素经部分脱乙酰后得到的产物，因具有无毒性、无免疫原性，可以在溶菌酶的作用下生物降解，并具有良好的可加工性而广泛应用于组织工程研究中^[21]。

本实验中通过球磨将煅烧骨制备成微米级的 HA 粒子，与 CS 共混后制备成 HA/CS 共混膜，通过正交设计考察了球磨条件对 HA 粒径的影响，对复合膜的性能进行了测试，并在复合膜材料上接种 MC3T3-E1 成骨前体细胞，考察了细胞在复合膜上的形态，用四甲基偶氮唑盐 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 方法测试了细胞在复合膜上的增殖。

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

CS(0.2~0.8 Pa·s)，中等分子量，脱乙酰度 75%~85%，Sigma 公司)，α-MEM 培养基(Gibco

公司，美国)，胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)，MTT(Sigma 公司)。其他试剂均为分析纯。

1.2 煅烧松质骨的制备

市售猪骨，清除软组织，取两端松质骨，切成厚度约为 2 mm 的薄片，双氧水及乙醚循环脱脂，脱蛋白，洗净，70℃干燥。将脱脂脱蛋白骨进行热重分析，以初步确定实验用煅烧温度。采用 STA409PC 综合热分析仪(NETZSCH 公司)，升温速率 20℃/min，取样量 10~12 mg，氮气气氛 50 mL/min。

将骨块放入刚玉坩埚中，在马弗炉中以 10℃/min 的升温速率至 800、900、1000、1100℃，煅烧 3 h。维持所需时间后自然冷却至室温。将煅烧骨在研钵中初磨后在球磨机中进行球磨，正交设计因素及水平见表 1。所用研磨球为刚玉球，直径分别为 8、5、3 mm。

1.3 HA/CS 复合膜的制备

取一定量的 CS 溶解于 1% 的醋酸水溶液中，将一定量的 HA 通过超声分散于去离子水中，与 CS 溶液搅拌混合，脱泡，流延溶剂挥发法制备 HA/CS 复合膜，HA 与 CS 的比例(质量比)见表 1。

1.4 材料性能表征

采用德国 BRUKER 公司生产的 D8 DISCOVER with GADDS 型 X 射线衍射仪(XRD)分析 HA，CuK_α 辐射($\lambda=1.5418\times10^{-6}$ μm)，衍射角 2θ 从 10°~45°，管电压为 40 kV，管电流为 40 mA，扫描速度 0.02°/s。

HA 红外光谱分析(FTIR)采用 NICOLET380 FTIR 傅里叶变换红外光谱仪，测试范围 4000~400 cm⁻¹。

球磨后 HA 的粒径用激光粒度分析仪(LSPOP (6)，珠海欧美克仪器有限公司)进行分析，得到 HA 的平均粒径和比表面积。

将复合膜材料在 Instron 5865 力学试验机上进行拉伸性能测试，试样尺寸 40 mm×10 mm，拉伸速率 20 mm/min。

表 1 HA/CS 复合膜制备正交设计因素及水平

Table 1 HA/CS composite membrane preparation factors and levels of orthogonal experiment

Orthogonal level	Calcination temperature/℃	Milling ball propotion	Milling time/h	Milling rate/(r·min ⁻¹)	HA : CS (mass ratio)
1	800	4 : 4 : 2	1.0	170	6 : 4
2	900	4 : 3 : 3	1.5	200	5 : 5
3	1000	3 : 4 : 3	2.0	230	4 : 6
4	1100	3 : 3 : 4	2.5	260	3 : 7

1.5 HA/CS 复合膜细胞相容性

1.5.1 成骨前体细胞 MC3T3-E1 的培养

成骨前体细胞 MC3T3-E1 用含 10%胎牛血清的 α -MEM 完全培养液, 置于 5%CO₂、95%湿度 37℃ 孵箱中培养。每 2 天更换 1 次培养液, 用 0.25%的胰酶消化传代培养。细胞爬片, 进行 H.E 染色和 Masson 染色。

1.5.2 细胞接种及增殖

将灭菌后的复合膜($n=3$)浸入完全培养液中预湿 24 h, 吸去培养液, 滴加成骨前体细胞 MC3T3-E1 悬液, 每个六孔板内膜的细胞接种数为 1×10^5 个。4 h 后每孔加入 2 mL 培养液, 每 2 天换 1 次培养液, 培养 1、3、5、7 天后用 MTT 方法检测细胞增殖, 在 490 nm 波长下测吸光度。复合膜编号及含量见表 2。

1.5.3 SEM 分析

细胞在复合膜上培养一定时间后用含 3%戊二醛的 PBS 溶液固定, 酒精系列脱水, 临界点干燥, 金属镀膜后在扫描电镜(1530VP, 德国 LEO)下进行观察, 观察 HA 在 CS 基质内的分布情况以及细胞在材料表面的形态。

2 统计学分析

使用 SARS 8.0 软件进行统计学分析, $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

3 结果分析

3.1 脱脂脱蛋白骨 TG 和 DTG 分析

图 1 为脱脂脱蛋白骨 TG 和 DTG 分析曲线。可以看出, 在 100.2℃ 处有一峰值, 此峰为脱脂脱蛋白骨失水所致, 在 376.9℃ 和 460.5℃ 处的峰为蛋白、脂肪、糖类分解所致。在 600℃ 以后变化逐渐缩小, 在 600~800℃ 之间质量变化微小。因此, 将后期的煅烧温度确定为 800、900、1000、1100℃。

3.2 HA 的 XRD 分析

图 2 为煅烧球磨的 HA 样品 XRD 谱图。可以看出, $2\theta=25.8^\circ$ 处有 HA (002) 晶面的特征衍射峰, $2\theta=31.8^\circ$ 处有 HA (211) 晶面的特征衍射峰, $2\theta=39.6^\circ$ 处有 HA (310) 晶面的特征峰。由此可知, 实验制备的是纯 HA, 但在实验范围内, HA 的煅烧温度对其 XRD 谱图基本没有影响。

表 2 HA/CS 复合膜制备条件及含量

Table 2 Preparation condition and content of HA/CS composite membrane					
No.	Calcination temperature/℃	Milling ball propotion	Milling rate/(r·min ⁻¹)	Milling time/h	HA : CS (mass ratio)
1#	800	4 : 4 : 2	170	1.0	6 : 4
2#	800	4 : 3 : 3	200	1.5	5 : 5
3#	800	3 : 4 : 3	230	2.0	4 : 6
4#	800	3 : 3 : 4	260	2.5	3 : 7
5#	900	4 : 4 : 2	200	2.0	3 : 7
6#	900	4 : 3 : 3	170	2.5	4 : 6
7#	900	3 : 4 : 3	260	1.0	5 : 5
8#	900	3 : 3 : 4	230	1.5	6 : 4
9#	1000	4 : 4 : 2	230	2.5	5 : 5
10#	1000	4 : 3 : 3	260	2.0	6 : 4
11#	1000	3 : 4 : 3	170	1.5	3 : 7
12#	1000	3 : 3 : 4	200	1.0	4 : 6
13#	1100	4 : 4 : 2	260	1.5	4 : 6
14#	1100	4 : 3 : 3	230	1.0	3 : 7
15#	1100	3 : 4 : 3	200	2.5	6 : 4
16#	1100	3 : 3 : 4	170	2.0	5 : 5
17#					0 : 10
18#					Culture plate

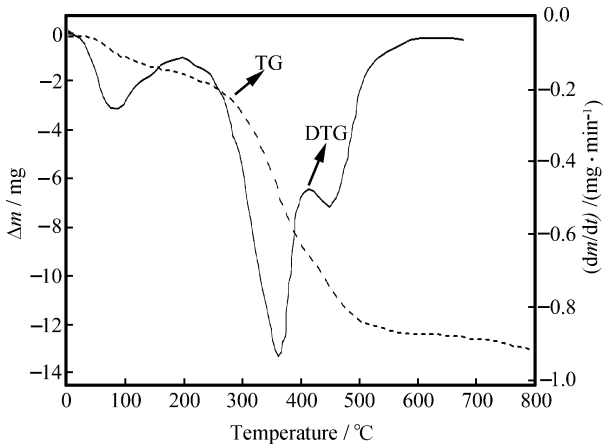


图 1 脱脂脱蛋白松质骨 TG 和 DTG 曲线
Fig. 1 TG and DTG curves of degreased, deproteinized cancellous bone

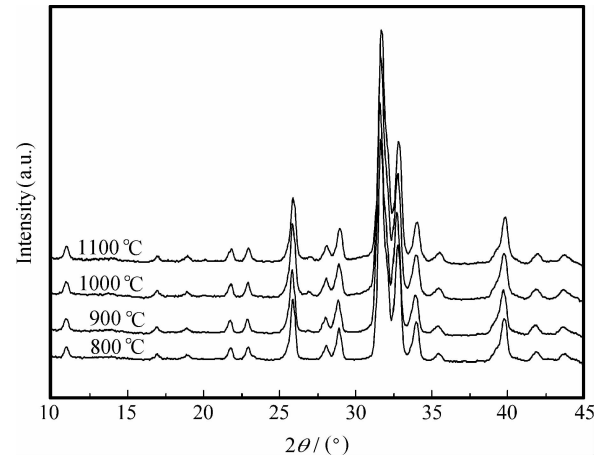


图 2 不同煅烧温度的 HA 的 XRD 谱图
Fig. 2 XRD patterns of HA with different calcination temperatures

3.3 FTIR 分析

图 3 为经过 1000 °C 煅烧、球配比 4 : 4 : 2、230 r · min⁻¹ 球磨 2.5 h 的 HA 的红外谱图。可以看出，位于 3570 cm⁻¹ 和 637 cm⁻¹ 处的峰为—OH 的特征吸收峰，1000~1100、600、570 cm⁻¹ 处的吸收峰为—PO₄³⁻ 基团吸收峰，在波数为 1460 cm⁻¹ 和 1413 cm⁻¹ 附近的两个吸收峰为—CO₃²⁻ 特征峰，在煅烧的 HA 中也存在—CO₃²⁻，可能是由于在煅烧过程中残留的蛋白、脂肪、糖类分解产生的 CO₂ 无法快速排出马弗炉，在试样的周围形成高浓度 CO₂ 氛围，导致 HA 晶体结构中的—PO₄³⁻ 被—CO₃²⁻ 取代，使得—CO₃²⁻ 进入 HA 晶体，从而在红外谱图中出现—CO₃²⁻ 吸收峰。

3.4 HA 粒径分析

图 4 为经过 1000 °C 煅烧，使用 4 : 4 : 2 的球

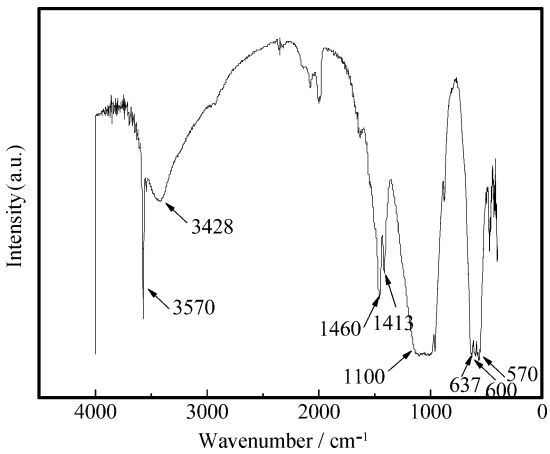


图 3 1000 °C 煅烧、球配比 4 : 4 : 2、230 r · min⁻¹ 球磨 2.5 h 的 HA 的红外谱图

Fig. 3 Infrared spectrum of HA (calcination temperature: 1000 °C, milling ball proportion: 4 : 4 : 2, milling rate: 230 r · min⁻¹, milling time: 2.5 h)

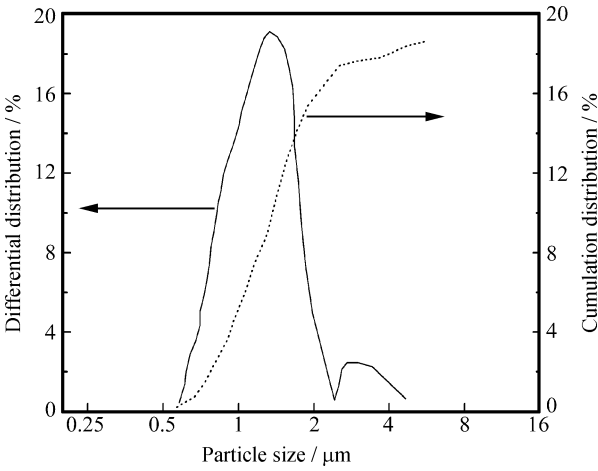


图 4 1000 °C 煅烧、球配比 4 : 4 : 2、230 r · min⁻¹ 球磨 2.5 h 的 HA 的粒径分布图

Fig. 4 Particle size distribution of HA (calcination temperature: 1000 °C, milling ball proportion: 4 : 4 : 2, milling rate: 230 r · min⁻¹, milling time: 2.5 h)

配比，以 230 r · min⁻¹ 球磨速率球磨 2.5 h 的制备的 HA 的粒径分布。表 3 为经软件计算分析得到的 HA 粒子的平均粒径和比表面积。表中 D₅₀ 称为中位径或中值粒径，表示粉体的平均粒度。由以上结果可知，1[#]~16[#] HA 的 D₅₀ 在 1.21~1.67 μm 范围内。采用极差分析方法对正交实验结果的 D₅₀ 和 SSA 进行分析，结果如表 4 所示。

由以上结果可以看出，以 HA 粒子的 D₅₀ 和 SSA 为评价指标时，球磨时间 t 的极差最大，对粒子尺寸的影响最大，其他依次为球配比、球磨速率 v。

表 3 煅烧温度、球磨参数对 HA 粒径及比表面积的影响

Table 3 Effect of calcination temperature, milling parameters on HA particle size and SSA

No.	Calcination temperature/℃	Milling ball propotion	Milling rate/(r · min ⁻¹)	Milling time/h	D ₅₀ /μm	D ₉₀ /μm	SSA/(m ² · cm ⁻³)
1 [#]	800	4 : 4 : 2	170	1.0	1.44	4.40	4.43
2 [#]	800	4 : 3 : 3	200	1.5	1.27	2.03	5.13
3 [#]	800	3 : 4 : 3	230	2.0	1.21	1.92	5.38
4 [#]	800	3 : 3 : 4	260	2.5	1.24	2.11	5.63
5 [#]	900	4 : 4 : 2	200	2.0	1.37	2.64	4.57
6 [#]	900	4 : 3 : 3	170	2.5	1.18	1.77	5.52
7 [#]	900	3 : 4 : 3	260	1.0	1.26	2.27	5.07
8 [#]	900	3 : 3 : 4	230	1.5	1.27	2.30	4.99
9 [#]	1000	4 : 4 : 2	230	2.5	1.25	2.08	5.12
10 [#]	1000	4 : 3 : 3	260	2.0	1.23	1.95	5.22
11 [#]	1000	3 : 4 : 3	170	1.5	1.28	2.20	4.94
12 [#]	1000	3 : 3 : 4	200	1.0	1.38	3.01	4.51
13 [#]	1100	4 : 4 : 2	260	1.5	1.48	3.25	4.27
14 [#]	1100	4 : 3 : 3	230	1.0	1.67	4.10	4.00
15 [#]	1100	3 : 4 : 3	200	2.5	1.29	2.13	4.93
16 [#]	1100	3 : 3 : 4	170	2.0	1.56	3.63	4.16

Note: D₅₀—Midvalue particle size; D₉₀—90 particle size; SSA—Specific surface area.

表 4 正交实验数据分析

Table 4 Data analysis of orthogonal experiment

Orthogonal level		Milling ball propotion	Milling rate/(r · min ⁻¹)	Milling time/h
Mean 1	D ₅₀ /μm	1.385	1.365	1.438
	SSA/(m ² · cm ⁻³)	4.598	4.763	4.502
Mean 2	D ₅₀ /μm	1.337	1.327	1.325
	SSA/(m ² · cm ⁻³)	4.967	4.785	4.833
Mean 3	D ₅₀ /μm	1.260	1.350	1.343
	SSA/(m ² · cm ⁻³)	5.080	4.873	4.832
Mean 1	D ₅₀ /μm	1.362	1.302	1.240
	SSA/(m ² · cm ⁻³)	4.822	5.047	5.300
Range	D ₅₀ /μm	0.125	0.063	0.198
	SSA/(m ² · cm ⁻³)	0.482	0.284	0.798

3.5 HA/CS 复合膜力学性能

图 5 为 4[#] 复合膜及纯 CS 膜的拉伸应力-应变曲线。经计算得出 4[#] 复合膜的平均应力 σ 为(5.97±1.31)MPa, 平均应变 ϵ 为(123.75±10.54)%, 同法制备的纯 CS 膜的平均应力 σ 为(5.10±1.47)MPa, 平均应变 ϵ 为(100.05±13.73)%, 表明一定粒径及含量的 HA 粒子对复合膜的力学性能具

有增强作用。

3.6 HA/CS 复合膜的细胞相容性

3.6.1 MC3T3-E1 细胞培养及染色

图 6 为成骨前体细胞 MC3T3-E1 的 H.E 及 Masson 染色结果。可以看出, MC3T3-E1 细胞贴壁生长, H.E 染色显示细胞形态正常, 呈梭形黏附于载玻片上, Masson 染色结果显示细胞分泌 I 型胶原。

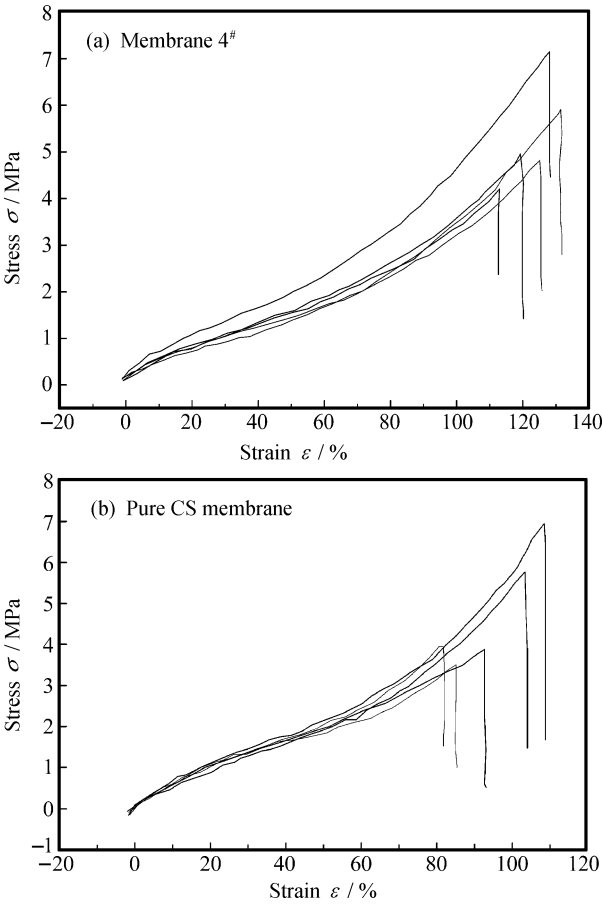


图5 4[#]膜及纯CS膜的拉伸应力-应变曲线
Fig. 5 Tensile stress-strain curves of membrane 4[#] and pure CS membrane

3.6.2 HA/CS复合膜 SEM 形貌

图 7(a)为 MC3T3 - E1 细胞在 1[#] 复合膜上的电镜照片。可以看出，材料中 HA 粒子呈球形，尺寸小于 2 μm，与粒径分析仪对 HA 粒子分析的结果相一致，HA 粒子在 CS 基质中分散均匀，但在表面张力作用下，部分颗粒发生聚集。图 7(b)为细胞在 14[#] 复合膜上培养 3 天的扫描电镜照片。可以看出，细胞黏附于材料表面，并具有良好的伸展状态，表明制备的复合膜具有良好的细胞相容性。

图 8 为对接种细胞的 14[#] 复合膜在高倍镜下进行能谱分析的结果，显示无细胞黏附的材料表面和有细胞黏附的材料表面的化学成分变化，其中碳含量从 64.78% (质量分数，下同) 增至 67.60%，磷含量从 2.03% 降至 1.69%，钙含量从 2.35% 降至 0.55%。因为在复合膜内共混了含有钙磷元素的 HA 粒子，所以能谱显示无细胞黏附的材料表面钙磷含量高于细胞内的钙磷含量，

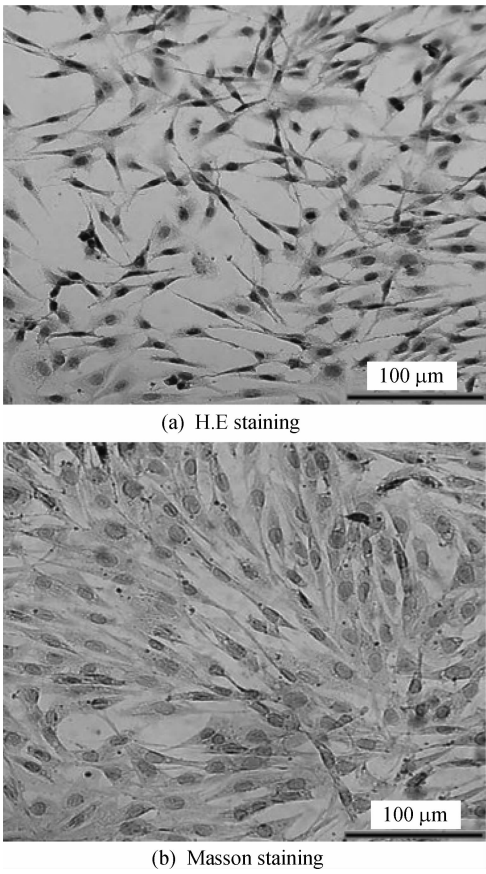
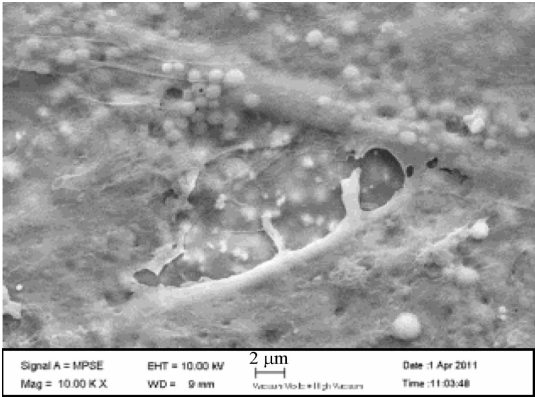


图 6 成骨前体细胞 MC3T3 - E1 的 H. E 及 Masson 染色
Fig. 6 H. E and Masson staining of MC3T3 - E1 preosteoblast

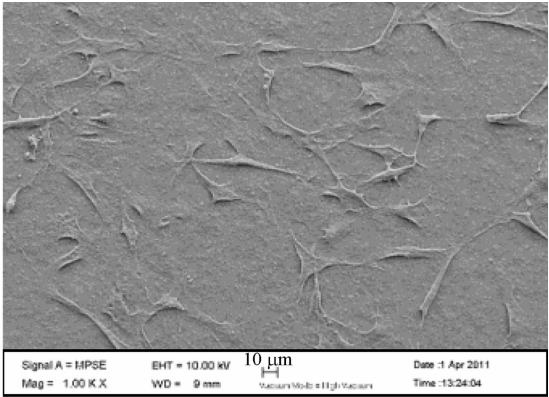
同时也证明细胞呈伸展状态黏附于材料表面，形态良好。

3.6.3 细胞相容性

图 9 为 MC3T3 - E1 细胞在 HA/CS 复合膜上培养 5 天后的增殖比较。可以看出，18[#] 细胞增殖最为显著，说明细胞在培养板中的生长好于复合膜上。比较 1[#] ~ 17[#] 膜上的细胞增殖，可以看出，9[#] 膜(制备条件：煅烧温度为 1000 ℃，球配比 4 : 4 : 2，球磨速率为 230 r · min⁻¹，球磨时间为 2.5 h，HA : CS = 5 : 5 (质量比))上的细胞增殖好于其他组的细胞，差异有显著性 ($P < 0.05$)。材料表面粗糙时，会使细胞与材料表面的接触面积增加，促进细胞在材料表面的润湿作用，提高细胞在材料表面的黏附强度。细胞在材料表面的黏附、增殖是评价材料生物相容性的重要指标之一，在膜材料上接种细胞可以较为直观地评价材料的细胞相容性，为三维支架的制备提供理论依据。因此该实验为下一步制备多孔支架材料提供了参考，优先选用 9[#] 材料的原料。



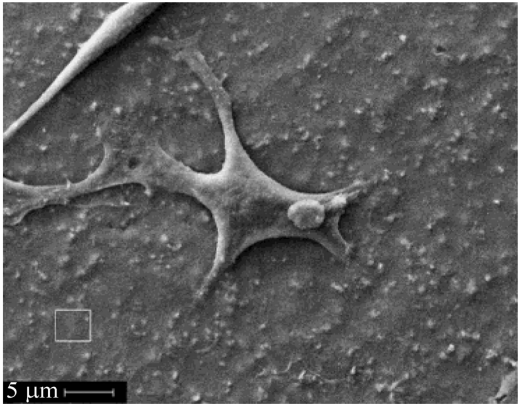
(a) Spreading on HA/CS composite membrane 1[#]



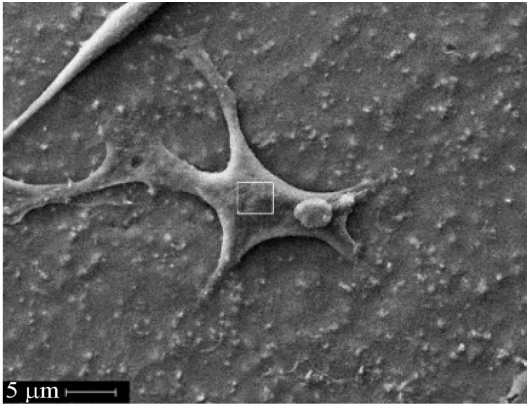
(b) Spreading on HA/CS composite membrane 14[#]

图 7 细胞在 HA/CS 复合膜上伸展的电镜照片

Fig. 7 SEM photographs of MC3T3 – E1 cell spreading on HA/CS composite membrane



(a) Membrane surface



(b) Cell surface

图 8 MC3T3 – E1 细胞/14[#] 复合膜能谱分析

Fig. 8 EDAX of MC3T3 – E1 cell/composite membrane 14[#]

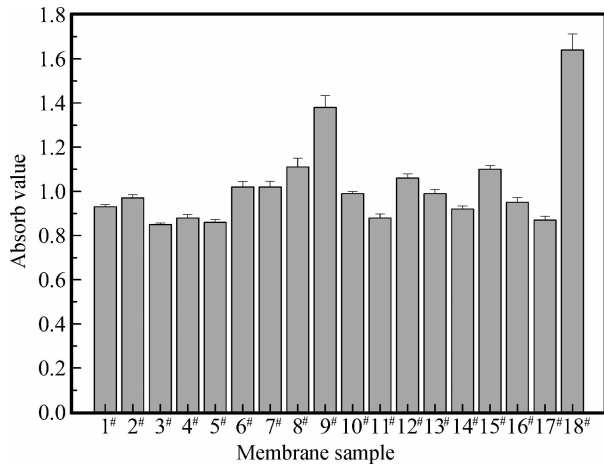


图9 MC3T3-E1 细胞于 HA/CS 复合膜培养 5 天后增殖柱状图
Fig.9 Proliferation bar graph of MC3T3-E1 cells after 5-day-culture on the HA/CS composite membrane

4 结 论

(1) 通过对松质骨脱脂脱蛋白再进行煅烧、球磨的方法,可以获得粒径较为均一的微米级天然羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)球形粒子,中值粒径 D_{50} 在 $1.21\sim 1.67\ \mu\text{m}$ 范围内。

(2) 将制备的 HA 与壳聚糖(chitosan, CS)共混后成膜,SEM 显示 HA 在基质 CS 中分布均匀,二者结合紧密,复合膜具有较好的力学性能,在 CS 中加入 HA,既可以增强 CS 的力学性能,又可以克服 HA 的颗粒流动性的缺点。

(3) 培养的 MC3T3-E1 细胞 H.E 和 Masson 染色显示细胞形态正常,将其接种于复合膜上,细胞能在复合膜上很好地黏附生长,四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)方法测试细胞增殖结果表明细胞在煅烧温度为 $1000\ ^\circ\text{C}$,球配比 $4:4:2$,球磨速率为 $230\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,球磨时间为 $2.5\ \text{h}$,HA:CS=5:5(质量比)的 HA/CS 复合膜上的增殖最佳,该结果为进一步制备微米级 HA/CS 复合多孔材料提供了理论基础。

参考文献:

[1] Li Yubao, Klein C, Wijn J, Meer S, Groot K. Shape change and phase transition of needle-like nonstochiometric apatite crystals [J]. J Mater Sci; Mater Med, 1994, 5(5): 263-267.
[2] 杨桂通. 医用生物力学 [M]. 北京: 科学出版社, 1994: 58.
Yang Guitong. Medical biomechanics [M]. Beijing: Science Press, 1994: 58.
[3] Greenwald A S, Boden S D, Goldberg V M, Khan Y,

Laurencin C T, Rosier R N. Bone-graft substitutes: Facts, fictions, and applications [J]. J Bone Joint Surg, 2001, 83 (S2): 98-103.
[4] Den Boer F C, Wippermann B W, Blokhuis T J, Patka P, Bakker F C, Haarman H J. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow [J]. J Orthopaed Res, 2003, 21(3): 521-528.
[5] 许永华, 施新猷, 胡蕴玉. 牛煅烧骨与体外培养兔骨膜成骨细胞的相容性 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(4): 512-514.
Xu Yonghua, Shi Xinyou, Hu Yunyu. The histocompatibility of true bone ceramic and cultured rabbit poriarthoum osteoblast in vitro [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2000, 21(4): 512-514.
[6] 徐小良, 汤亭亭, 楼觉人. β -TCP/HAP 双相煅烧骨的制备及其在 BMP-2 基因给药中的应用 [J]. 生物医学工程学杂志, 2003, 20(4): 630-633.
Xu Xiaoliang, Tang Tingting, Lou Jueren. Preparation of a biphasic calcined bone of β -TCP/HAP and its application in BMP-2 gene medicine [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2003, 20 (4): 630-633.
[7] 高媛, 孔丽君, 王晨. 牛煅烧骨的表征及其对成骨细胞的作用 [J]. 生物物理学报, 2004, 20(6): 483-488.
Gao Yuan, Kong Lijun, Wang Chen. Preparation and osteoblast affinity of bovine hydroxyapatite [J]. Acta Biophysica Sinica, 2004, 20(6): 483-488.
[8] Matsuda M, Kita S, Takekawa M, Ohtsubo S, Tsuyama K. Scanning electron and light microscopic observations on the healing process after sintered bone implantation in rats [J]. Histol Histopathol, 1995, 10(3): 673-679.
[9] 许永华, 施新猷, 胡蕴玉. 胶原-煅烧骨支架与成骨细胞相容性实验研究 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2000, 18(4): 358-359.
Xu Yonghua, Shi Xinyou, Hu Yunyu. Study of the histocompatibility of TBC vector with osteoblast [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2000, 18(4): 358-359.
[10] 刘曦明, 陈庄洪, 徐永年. 聚乳酸膜包裹煅烧骨修复骨缺损的实验研究 [J]. 华南国防医学杂志, 2002, 16(6): 5-7.
Liu Ximing, Chen Zhuanghong, Xu Yongnian. Experimental study of repairing bone defects by combined true bone ceramic with polylactic acid membrane [J]. Military Medical Journal of South China, 2002, 16(6): 5-7.
[11] 胡晓兰, 谢鹏辉, 王雯皓, 余荣禄, 申丙星, 董炎明. 原位增强羟基磷灰石/壳聚糖复合棒材 [J]. 复合材料学报, 2011, 28(2): 123-129.
Hu Xiaolan, Xie Penghui, Wang Wenhao, Yu Ronglu, Shen Bingxing, Dong Yanming. In-situ reinforced hydroxyapatite/chitosan composite rods [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2011, 28(2): 123-129.
[12] 卢晓英, 王秀红, 刘治, 翁杰. 反应 pH 值对原位水热沉积法制备纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料的影响 [J]. 复合材料学报, 2009, 26(4): 53-58.
Lu Xiaoying, Wang Xiuhong, Liu Zhi, Weng Jie. Effect of

- pH value on the nano-hydroxyapatite/chitosan composites via in - situ hydrothermal precipitation [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2009, 26(4): 53-58.
- [13] 王振林, 闫玉华, 万涛. 羟基磷灰石/胶原类骨生复合材料的制备及表征 [J]. *复合材料学报*, 2005, 22(2): 83-86.
Wang Zhenlin, Yan Yuhua, Wan Tao. Preparation and characterization of hydroxyapatite/collagen bone-like biomimetic composite [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2005, 22(2): 83-86.
- [14] 李波, 李立华, 赵名艳, 周长忍. Sol-gel 原位相转变矿化制备纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架材料 [J]. *复合材料学报*, 2011, 28(4): 83-88.
Li Bo, Li Lihua, Zhao Mingyan, Zhou Changren. Preparation of nano-HA/CS composite scaffolds with in situ sol-gel transformation mineralization [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2011, 28(4): 83-88.
- [15] 黄琼瑜, 余厚德, 肖秀峰, 刘榕芳. 羟基磷灰石/聚己内酯-壳聚糖复合材料的制备与表征 [J]. *复合材料学报*, 2009, 26(1): 24-30.
Huang Qiongyu, She Houde, Xiao Xiufeng, Liu Rongfang. Preparation and characterization of hydroxyapatite/polycaprolactone-chitosan composites [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2009, 26(1): 24-30.
- [16] 王海斌, 赫淑倩, 赵冬梅, 孙康宁, 刘爱红. 羧甲基壳聚糖/纳米羟基磷灰石复合支架材料的制备及生物安全性 [J]. *复合材料学报*, 2008, 25(6): 88-92.
Wang Haibin, He Shuqian, Zhao Dongmei, Sun Kangning, Liu Aihong. Preparation and biology security of the porous carboxymethyl chitosan/nano hydroxyapatite scaffold biocomposites [J]. *Acta Materiae Compositae Sinica*, 2008, 25(6): 88-92.
- [17] Kikuchi M, Matsumoto H N, Yamada T, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J. Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(1): 63-69.
- [18] Zhao F, Yin Y J, Lu W W, Leong J C, Zhang W J, Zhang J Y, Zhang M F, Yao K D. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15): 3227-3234.
- [19] Hu Q, Li B, Wang M, Shen J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture [J]. *Biomaterials*, 2004; 25(5): 779-85.
- [20] Manjubala I, Scheler S, Bossert J, Jandt K D. Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique [J]. *Acta Biomater*, 2006; 2(1): 75-84.
- [21] Malafaya P B, Silva G A, Reis R L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(4/5): 207-233.