

文章编号: 1000-3851(2009)02-0131-07

纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合材料 屏障膜的体外生物相容性

李吉东^{1,2}, 左 奕¹, 邹 琴¹, 李小玉³, 刘豫蓉³, 李玉宝^{*1}(1. 四川大学 纳米生物材料研究中心, 分析测试中心, 成都 610064; 2. 四川大学 化学学院,
成都 610064; 3. 四川大学 口腔疾病研究国家重点实验室, 成都 610041)

摘要: 用相转移法制备了用于引导骨再生的纳米磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)和载银纳米羟基磷灰石/二氧化钛/聚酰胺 66(Ag-HA-TiO₂/PA66)复合生物材料屏障膜, 并通过与骨髓基质干细胞(BMSC)共培养评价了其体外生物相容性。扫描电子显微镜(SEM)观察显示, 制备的复合材料膜为不对称多孔膜, 一面是孔径小于 10 μm 的微孔层, 另一面是孔径在 30~200 μm 的大孔结构。四唑盐比色(MTT)和流式细胞术(FCM)试验结果表明: n-HA/PA66 膜具有良好的细胞亲和力, 有利于 BMSC 的黏附、生长和减少凋亡; Ag-HA-TiO₂/PA66 膜也具有良好的生物相容性, 但加速了 BMSC 的凋亡。2 种膜的结构和生物相容性能够满足引导骨组织再生膜材料的要求。

关键词: 屏障膜; 引导骨再生; 纳米羟基磷灰石/聚酰胺; 生物相容性; 流式细胞术

中图分类号: TB332 文献标志码: A

In vitro biocompatibility of nano-hydroxyapatite/polyamide composite barrier membranes

LI Jidong^{1,2}, ZUO Yi¹, ZOU Qin¹, LI Xiaoyu³, LIU Yurong³, LI Yubao^{*1}

(1. Research Center for Nano-Biomaterials, Analytical and Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (n-HA/PA66) and Ag⁺ loaded hydroxyapatite/titania/polyamide 66 (Ag-HA-TiO₂/PA66) composite membranes for guided bone regeneration (GBR) were prepared by the phase inversion method. Biocompatibility of the two kinds membranes was assessed via 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium-bromide assay (MTT) and flow cytometry (FCM) test. The fabricated membranes have asymmetric porous structure. SEM analysis reveals that pores less than 10 μm and pores with a size ranging from 30 μm to 200 μm distribute in the micropore layer and the spongy structure layer, respectively. MTT and FCM results indicate that the two kinds membranes have good cell affinity, while Ag-HA-TiO₂/PA66 membrane can promote cell apoptosis to some extent. The structure and biocompatibility of the fabricated membranes can meet the requirements of GBR.

Keywords: barrier membrane; guided bone regeneration; nano-hydroxyapatite/polyamide; biocompatibility; flow cytometry

引导骨组织再生(Guided bone regeneration, GBR)技术是目前解决种植体周围骨缺损的有效方法, 已成功地应用在种植体植入同时纠正种植体周围骨缺损或在种植前先纠正骨缺损的延期病例中^[1-4]。引导骨组织再生术的原理是利用屏障膜的

物理屏障功能将骨缺损区与周围组织隔离, 创造一个相对封闭的组织环境, 防止纤维结缔组织长入骨缺损区, 对创区起到保护作用, 充分调动组织自身的修复、愈合潜力, 从而使骨组织的再生功能得到最大程度的发挥。它的应用为牙周病的治疗、牙种

收稿日期: 2008-03-24; 收修改稿日期: 2008-07-25

基金项目: 国家“973”计划项目(2007CB936102)

通讯作者: 李玉宝, 教授, 主要从事生物材料研究 E-mail: nic7504@scu.edu.cn

植区骨量不足及其它骨缺损、骨不连的修复治疗、骨折的愈合等提供了一个新的有效途径^[5-6]。

屏障膜的结构和性能在引导骨再生过程中发挥着重要作用。作为引导骨再生的屏障膜需具有良好的生物相容性、适宜的力学性能和稳定性、适当的空隙结构和临床可操作性等^[7-8]。多孔结构膜有利于细胞的黏附和营养物质的渗透传输^[9]。不对称结构的多孔引导组织再生膜具有其独特的优点^[6, 10]。外层致密或相对致密的结构能防止纤维结缔组织、上皮组织等长入骨缺损区，内部的多孔面能促进细胞(如成骨细胞、骨髓基质细胞)在其表面黏附、生长和分化。

目前研究和应用的屏障膜分为可吸收性膜和不可吸收性膜两类。可降解吸收的屏障膜的研究与应用主要集中在胶原膜^[11-12]、壳聚糖膜^[6]、聚乳酸膜^[13]、聚羟基乙酸膜和丝蛋白纳米纤维膜^[8]等。这类可降解性屏障膜在体内由于发生水合作用、水解或酶解反应，使其结构和力学性能等会发生改变，而且降解吸收速率难以控制，易造成手术失败。不可吸收性屏障膜目前研究和应用较多的是膨化聚四氟乙烯膜^[11, 14-15]、钛膜^[4]和乙基纤维素膜^[16]等。由于其具有稳定的理化与力学性能，与可吸收膜相比能起到更好的屏障作用，有利于缺损区的骨再生。但由于其在体内不能降解，需二次手术去除，且易导致软组织瓣裂开、膜早期暴露、细菌感染等并发症而影响新骨生成量。

上述两类屏障膜的共同不足之处还在于只能起到机械阻挡和隔离作用，而不具备骨传导和诱导分化作用，通常还需与自体骨或其他骨替代品联用，容易引起感染，从而影响和限制了其应用。研究结果表明，生物材料促进骨缺损区的骨再生由其骨传导机制决定^[17-19]。因此临床急需寻找更理想的多功能屏障膜，起到屏障作用的同时，能够充当骨引导或诱导间质，并且具有抗感染能力，减少和避免由细菌感染而导致手术失败，推动种植体和骨科临床修复的应用和发展。

李玉宝等成功研制出类骨磷灰石晶体与分子结构中带有极性键的聚酰胺高分子纳米复合仿生材料，具有良好的力学性能、生物活性和骨传导性^[20-22]。本研究根据材料特性和临床需要，开发了用于引导骨再生修复的不对称多孔纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(n-HA/PA66)复合生物材料屏障膜和载银纳米羟基磷灰石/二氧化钛/聚酰胺 66(Ag-

HA-TiO₂/PA66)复合材料抗菌屏障膜。前期研究表明，Ag-HA-TiO₂/PA66 膜对口腔细菌有良好的抗菌效果^[23]。本文中研究了所制备的屏障膜对骨髓基质干细胞(BMSC)生长和细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜的制备

聚酰胺 66 从德国 BASF 公司购得。n-HA 和载银纳米磷灰石/二氧化钛(Ag-HA-TiO₂)浆料由实验室自制^[24]。n-HA/PA66 复合材料浆料根据文献方法制备^[25]。70℃、搅拌条件下，将一定量的 PA66 完全溶于乙醇中，然后缓慢加入一定量的 n-HA 浆料，恒温并继续搅拌 2 h，得到 n-HA/PA66 复合材料浆料。复合材料中加入无机相(n-HA)与有机相(PA66)的质量比为 4:6，浆料中复合材料的质量分数约为 20%。复合材料浆料在室温下放置至少 4 h 除去气泡，浇铸在平板上成膜，室温下挥发溶剂 48 h，用去离子水反复洗涤，即得到 n-HA/PA66 复合材料多孔膜，厚度约为 0.3 mm。

按相同的方法制备 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料抗菌多孔膜，厚度约为 0.3 mm。

1.2 膜结构表征

干燥的 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜喷金，用 Hitachi S-450 扫描电子显微镜(SEM)观察膜两面的形貌和结构。

1.3 膜体外生物相容性评价

1.3.1 BMSC 细胞培养

采用密度梯度离心法取 8 周的 SD 大鼠的胫骨和股骨的骨髓基质干细胞。用含 20 vol% 小牛血清、48 mg/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 α-MEM 培养基(Gibco, USA)在 37℃、5% CO₂、95% 空气的培养箱中进行 BMSC 原代培养。待细胞融合后进行传代培养，取第 4 代的 BMSC 用于材料体外生物相容性评价。

1.3.2 膜与 BMSC 共培养的相差显微镜观察

将 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜裁剪成 10 mm×10 mm 方块，各取 3 块灭菌后用 PBS 冲洗 3 次，粗糙大孔面向上置于 24 孔培养板中，同时设空白对照。1 mL α-MEM 培养液浸 12 h，使膜贴附于孔板底部，吸净培养液。将 BMSC 以 3×10⁴/mL 的浓度接种于 24 孔板中，每孔 1 mL，标准环境下孵育(37℃、5% CO₂、95% 空气)，

培养基每 2 天更换 1 次, 用倒置相差显微镜(O-LYMPUS IX70, 日本)观察并拍照。

1.3.3 四唑盐比色(MTT)试验

10 mm × 10 mm 的 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜各取 12 块, 灭菌后用 PBS 冲洗 3 次, 粗糙大孔面向上置于 24 孔培养板中, 同时设空白对照(不放任何材料)。1 mL α-MEM 培养液浸 12 h, 使膜贴附于孔板底部, 吸净培养液。将 BMSC 以 $3 \times 10^4 / \text{mL}$ 的浓度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 标准环境下孵育(37°C、5%CO₂、95% 空气)。分别于 1、4、7、11 天每组各取 3 孔, 每孔加 40 μL 的 MTT (2.5%), 37°C 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养基和 MTT 混合液, 每孔加入 450 μL 二甲基亚砜(DMSO), 振摇 10 min 后再置于 37°C 孵箱内 30 min。然后用 200 μL 的加样枪每孔每次取 150 μL 反应液转移到 96 孔板中, 分别取 2 次。在 570 nm 波长下测定吸光度(OD), 每组每次取得 6 孔的数值。分别求出实验组、对照组和空白组 OD 的平均值。将数据结果用 Spss12.0 软件作单因素方差分析。

1.3.4 屏障膜对 BMSC 细胞周期的影响

20 mm × 30 mm 的 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜各取 12 块, 灭菌后用 PBS 冲洗 3 次, 粗糙大孔面向上置于 6 孔培养板中, 同时设空白对照(不放任何材料)。1 mL α-MEM 培养液浸 12 h, 使膜贴附于孔板底部, 吸净培养液。将用血清饥饿法同步化的 BMSC 以 $5 \times 10^5 / \text{mL}$ 的浓度接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 再补加 1 mL α-MEM 培养基, 标准环境下孵育(37°C、5%CO₂、95% 空气), 3 天换液 1 次。分别于 1、4、7、11 天每组各取 3 孔, 用 0.25% 胰酶消化, 离心收集细胞(1000 r/min、8 min), 用 PBS 洗 1 次, 70% 酒精固定 24 h。制成细胞悬液, 用美国 Coulter 公司 Pics-Elite Esp 型流式细胞仪(Flow cytometry, FCM)进行检测。流式细胞仪测定 DNA 荧光强度及散光参数, Multicycle 分析软件测细胞凋亡及细胞周期分布。

2 结果与讨论

2.1 复合材料膜的 SEM 分析

GBR 膜的功能是将骨缺损区与周围组织隔离, 创造一个相对封闭的组织环境, 防止纤维结缔组织长入骨缺损区, 保护缺损区血凝块、聚积生长因子、引导或诱导细胞生长, 充分调动组织自身的修

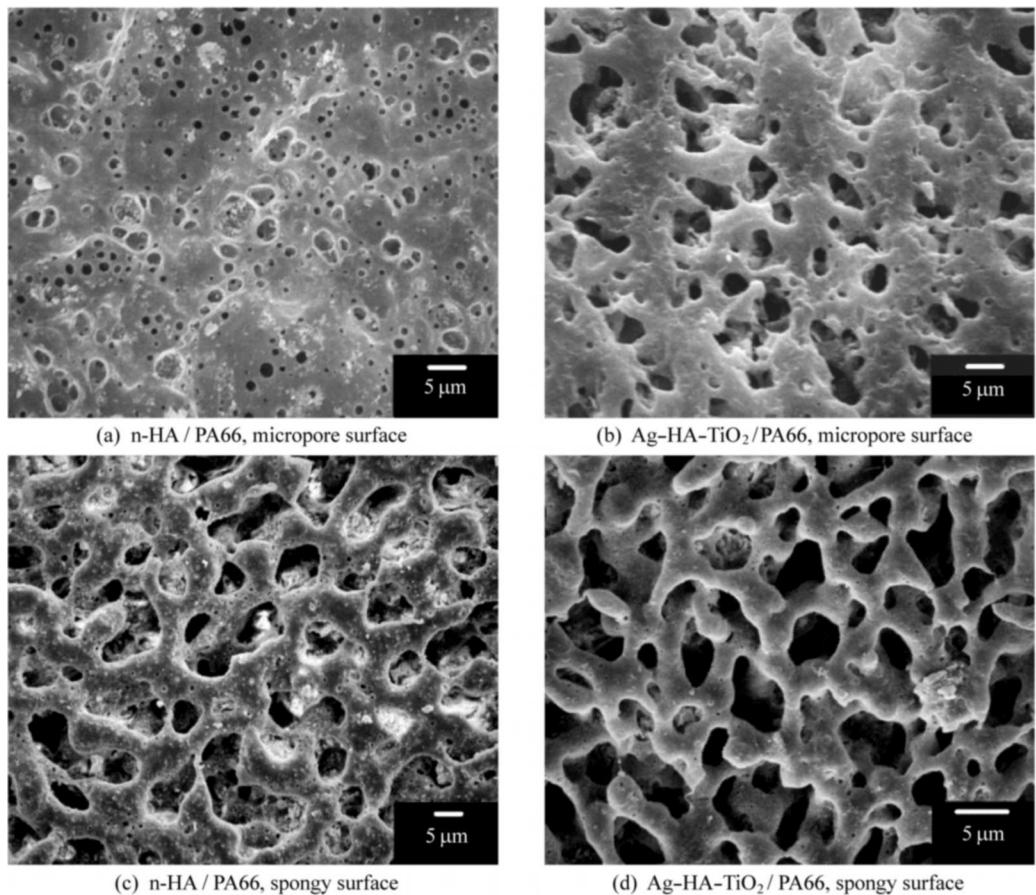
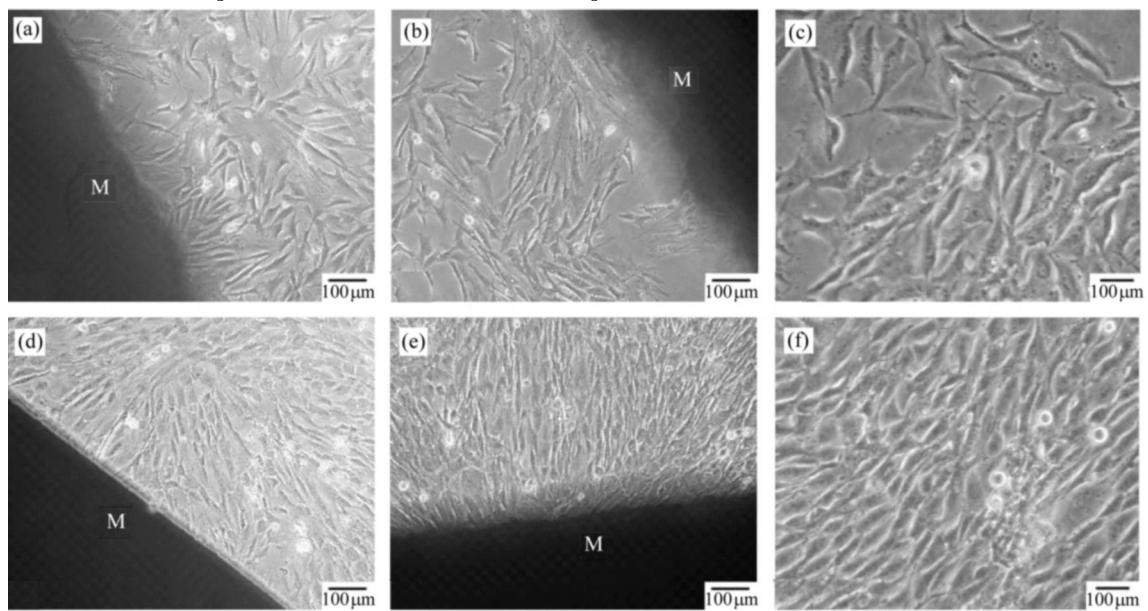
复、愈合潜力, 从而使骨组织的再生功能得到最大程度的发挥。无论是膜表层和亚层的空隙结构都有利于细胞的黏附和营养物质的传输, 促进组织再生^[6]。具有双层结构 Bio-Gide[®] 胶原膜外层是相对致密层, 在体内能有效防止纤维结缔组织长入, 内层的多孔结构有利于骨细胞、成骨细胞的黏附^[10]。

从图 1 中可以看出, 所制备的 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜均具有不对称的多孔结构, 该结构是在溶剂相转移过程中形成的。膜的一面是孔径小于 10 μm 的微孔层, 而另一面是孔径在 30~200 μm 的大孔结构。相对致密的微孔层能起到屏障作用, 有效防止软组织和纤维结缔组织长入骨缺损区, 同时有利于营养的输送; 大孔粗糙面有利于血液中间质细胞的迁移, 成骨细胞、骨细胞的黏附和生长, 以及与宿主组织形成直接的结合。纳米磷灰石(n-HA)的加入使屏障膜具有良好的生物相容性、生物活性和骨传导性, 促进骨再生的同时能与骨形成骨性结合, 无须二次手术去除。同时抗菌复合材料膜具有缓释抗菌作用, 减少和避免因细菌感染而造成手术的失败(特别是处于细菌种类繁多的口腔环境中的牙科疾病治疗), 从而取得理想的引导骨再生修复效果。

2.2 复合材料膜的生物相容性

从图 2 中可以看出, 实验组(2(a)、2(b)、2(d)、2(e))和对照组(2(c)、2(f))的细胞均成梭形或多边形贴壁生长, 2 种膜边沿的细胞生长良好, 有向膜上生长的趋势。培养 7 天时, 细胞铺满了培养板壁。与对照组相比, n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜对 BMSC 的形态和增殖无不良影响。表明 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜的浸出物和膜本身对 BMSC 具有良好的生物相容性。

图 3 是 BMSC 与 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜共培养在不同培养时间段的 MTT 测试结果。在不同的培养时间段, 实验组和对照组的细胞数目都随着培养时间的增加而增多。1、4、7 天时, BMSC 在 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜上培养的增殖能力大于对照组, 表明 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜细胞亲和力强, 适于细胞的黏附和生长。PA66 是一种极性化合物, 包含大量-COOH、-NH₂ 和-OH 团队, 能促进培养基中

图 1 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜的 SEM 照片Fig. 1 SEM photos of n-HA/PA66 and Ag-HA-TiO₂/PA66 composite membranes图 2 BMSC ((c)、(f))、BMSC 与 n-HA/PA66 ((a)、(d)) 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 ((b)、(e)) 复合材料膜共培养的相差显微镜照片((a)、(b)、(c) 培养时间为 4 d; (d)、(e)、(f) 培养时间为 7 d; 图中 M 代表膜材料)Fig. 2 Phase contrast microscope photos of BMSC ((c), (f)) and BMSC culture with n-HA/PA66 ((a), (d)) or Ag-HA-TiO₂/PA66 ((b), (e)) composite membranes ((a), (b), (c) for 4 d; (d), (e), (f) for 7 d; M represents membrane)

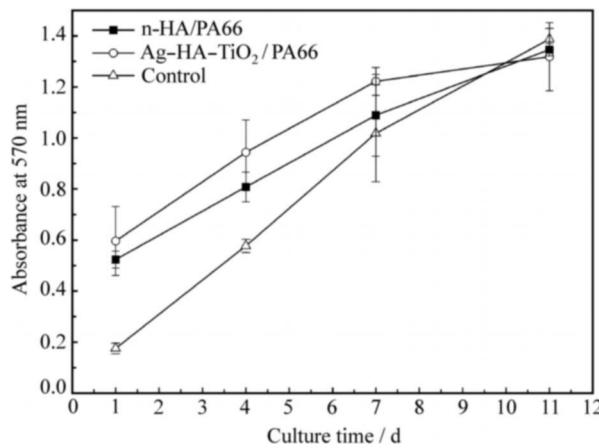


图 3 BMSC、BMSC 与 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜共培养的生长曲线

Fig. 3 The proliferation of BMSC cells cultured with n-HA/PA66 and Ag-HA-TiO₂/PA66 membranes at various incubation periods

的纤连蛋白等蛋白质在膜材料表面吸附, 从而有利于细胞在材料表面的黏附和生长^[26-27]。膜中的 n-HA 也能够通过增加蛋白在材料表面的吸附来促进细胞的黏附^[28]。n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 复合材料膜较高的亲水性和具有粗糙表面的多孔结构也有利于细胞在培养早期的黏附和生长。11 天时, 与 n-HA/PA66 膜组和对照组相比, Ag-HA-TiO₂/PA66 膜组细胞的增殖活性减弱, 可能是 Ag-HA-TiO₂/PA66 膜中的抗生素成分 (Ag⁺ 和 TiO₂) 对细胞的增殖有轻微的抑制作用。

由图 4 可知, 在第 1 天时, n-HA/PA66、Ag-HA-TiO₂/PA66 和对照组的细胞处于 DNA 合成前期(G₀G₁)的较少, 处于 DNA 合成期(S)和 DNA 合成后期及分裂期(G₂M)的较多。3 组间处于 G₀G₁ 的细胞数目百分比无明显差异, 而 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 组的 S 期细胞数目百分比高于对照组, 对照组的 G₂M 细胞数目百分比高于 n-HA/PA66 和 Ag-HA-TiO₂/PA66 组。随着培养时间的增加, G₀G₁ 期的细胞数目百分比迅速增加, 主要是由于细胞初始接种量较大, 随着细胞的增殖, 发生了接触抑制作用。4 天时, n-HA/PA66 的 G₀G₁ 期的细胞数目百分比最少, G₂M 期最多, 其他 2 组无明显差别。7 天时, n-HA/PA66 的 G₀G₁ 期的细胞数目百分比低于其他 2 组, 而 G₂M 细胞数目百分比高于其他 2 组。11 天时, 对照组的 G₀G₁ 期的细胞数

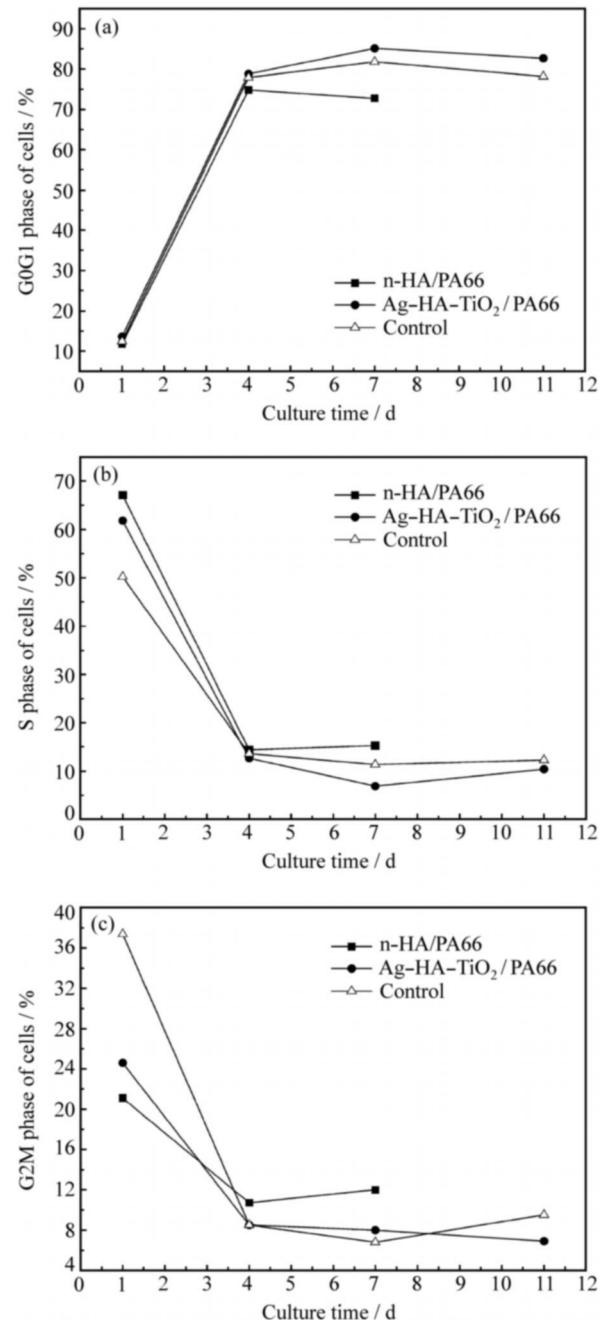


图 4 n-HA/PA66 (a)、Ag-HA-TiO₂/PA66 (b) 和对照组(c)在不同培养时间的细胞周期分布

Fig. 4 The cell cycle of BMSC cells co-cultured with n-HA/PA66 (a) and Ag-HA-TiO₂/PA66 (b) membranes and the control groups (c) at various incubation periods

目百分比低于 Ag-HA-TiO₂/PA66 组, G₂M 细胞数目百分比高于 Ag-HA-TiO₂/PA66 组。细胞的增殖活性可由增殖指数 (Proliferous index, PI) 表示, 计算公式为

$$PI = \frac{S + G2M}{G0G1 + S + G2M} \times 100\%$$

图5(a)结果表明：培养1天时，3组细胞的增殖活性均较高，组间无显著差异。随着培养时间的延长，由于发生接触抑制作用，增殖活性降低。培养7天时，n-HA/PA66组的细胞增殖活性高于Ag-HA-TiO₂/PA66组和对照组，表明n-HA/PA66膜能促进BMSC的生长；而Ag-HA-TiO₂/PA66组的细胞增殖活性在整个培养过程中与对照组相当，说明Ag-HA-TiO₂/PA66膜对BMSC的增殖无不良影响。

从图5(b)的凋亡曲线可以看出，培养1天时，n-HA/PA66组的凋亡率明显低于对照组和Ag-HA-TiO₂/PA66组。培养4和7天时，n-HA/PA66组的凋亡率与对照组无明显区别，而4、7和11天时，Ag-HA-TiO₂/PA66组的细胞凋亡率显著高于对照组。表明n-HA/PA66复合材料多孔膜适于细胞的黏附和生长，在培养早期降低了BMSC的

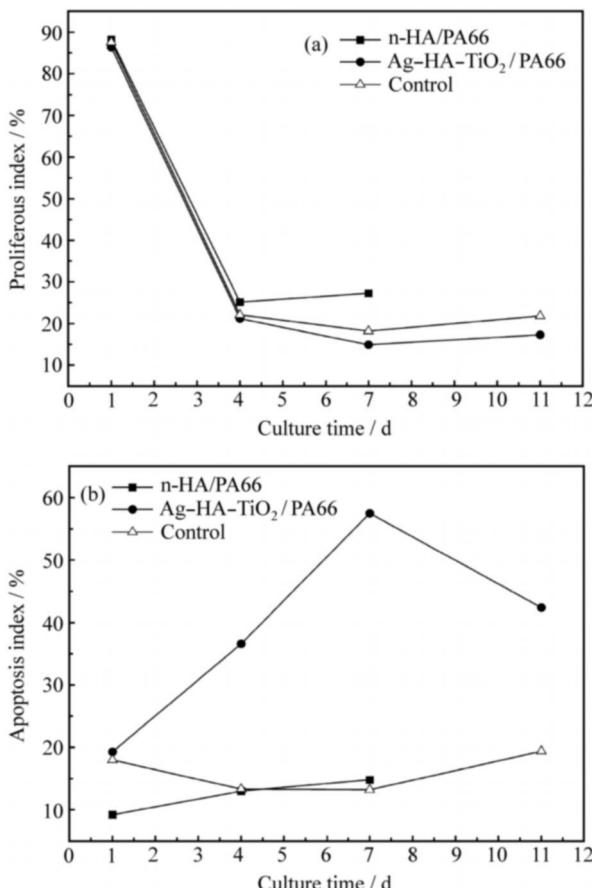


图5 n-HA/PA66膜组、Ag-HA-TiO₂/PA66膜组和对照组在不同培养时间的细胞增殖指数和凋亡指数

Fig.5 Proliferous index and apoptosis index of BMSC cells cultured with n-HA/PA66 and Ag-HA-TiO₂/PA66 membranes and the control group at various incubation periods

凋亡率。Ag-HA-TiO₂/PA66复合材料多孔膜加速了BMSC的凋亡，可能是由于膜中的Ag⁺和TiO₂成分对BMSC凋亡有促进作用。

尽管Ag-HA-TiO₂/PA66多孔膜对BMSC细胞周期和凋亡有一定的影响，但与膜共培养的BMSC仍然具有较强的增殖能力，说明Ag-HA-TiO₂/PA66多孔膜体外生物相容性较好。由于体外培养细胞是模拟的静态环境，而体内是动态的生理环境，体外培养的细胞对外界环境敏感度高于生物体内细胞，n-HA/PA66和Ag-HA-TiO₂/PA66复合材料多孔膜的体内生物相容性和引导骨再生性能有待进一步研究。

3 结论

(1) 本研究所制备的用于引导骨再生的n-HA/PA66和Ag-HA-TiO₂/PA66复合生物材料屏障膜具有不对称多孔结构，一面是孔径小于10 μm的微孔层，能起到屏障隔离作用，有效防止纤维结缔组织长入骨缺损区，同时有利于营养的输送；而另一面是孔径在30~200 μm的大孔结构，有利于血液中间质细胞的迁移，成骨细胞、骨细胞的黏附和生长，以及与宿主组织形成直接的健合。

(2) MTT和流式细胞试验结果表明，n-HA/PA66膜具有良好的细胞亲和力，有利于BMSC的黏附、生长和减少凋亡；Ag-HA-TiO₂/PA66膜对BMSC的增殖无不良影响，具有良好的生物相容性，但促进了BMSC的凋亡。

(3) 该2种膜的结构和生物相容性能够满足引导骨组织再生膜材料的要求，具有良好的应用前景。

参考文献：

- [1] Kostopoulos L, Karring T. Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration [J]. Clin Oral Implants Res, 1994, 5(2): 75-82.
- [2] Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioabsorbable polymer [J]. Clin Oral Implants Res, 1994, 5(2): 66-74.
- [3] Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E. Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyratehydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910: An experimental study in dogs [J]. Clin Oral Implants Res, 1994, 5(2): 83-91.
- [4] 费伟, 尹明平, 李铮, 沈志浩, 廖楚航. 纯钛膜结合自体骨修复种植牙美观区骨缺损的临床研究 [J]. 中国口腔种植学报, 1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- 杂志, 2005, 10(3): 135-138.
- Fei Wei, Yin Mingping, Li Zheng, Shen Zhihao, Liao Chuhang. Clinical research about regeneration of bone defect in dental implant of the aesthetic zone with pure titanium membrane combining autograft bone [J]. Chinese Journal of Oral Implantology, 2005, 10(3): 135-137.
- [5] 黄盛兴, Eren-Hard R, Elmar K. Gore-Tex 膜引导骨再生技术在种植体周围炎治疗中的应用 [J]. 中国口腔种植学杂志, 2000, 5(4): 177-179.
- Huang Shengxing, Eren - Hard R, Elmar K. The clinical application of Gore-Tex membrane guided bone regeneration in treatment of perimplantitis [J]. Chinese Journal of Oral Implantology, 2000, 5(4): 177-179.
- [6] Hong Hua, Wei Jie, Liu Changsheng. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration [J]. Composites Part B, 2007, 38(3): 311-316.
- [7] Wang J, Glimcher M J, Mah J, et al. Expression of bone microsomal casein kinase II, bone sialoprotein, and osteopontin during the repair of calvarial defects [J]. Bone, 1998, 22(6): 621-628.
- [8] Kim Kyoung-Hwa, Jeong L, Park Ho-Nam, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration [J]. J Biotech, 2005, 120(3): 327-339.
- [9] Murphy W L, Kohn D H, Mooney D J. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide - co - glycolide) scaffolds in vitro [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 50(1): 50-58.
- [10] Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtzen W, et al. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23(6): 1461-1469.
- [11] Lin F C, Wang D M, Lai J Y. Asymmetric TPX membranes: Membranes with high gas flux [J]. J Membrane Sci, 1996, 110(1): 25-36.
- [12] Hämmeler C H F, Lang N P. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioabsorbable materials [J]. Clin Oral Impl Res, 2001, 12(1): 9-18.
- [13] Owen G Rh, Jackson J, Chehroudi B, et al. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration [J]. Biomaterials, 2005, 26(35): 7447-7456.
- [14] Zitzmann N U, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonabsorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration [J]. Int J Maxillofac Implants, 1997, 12(6): 844-952.
- [15] Shenck R K, Buser D, Hardwick W R, et al. Healing pattern of bone regeneration in membrane - protected defects: A histologic study in the canine mandible [J]. Int J Oral Max Impl, 1994, 9(1): 13-29.
- [16] Nasser N J, Friedman A, Friedman M, et al. Guided bone regeneration in the treatment of segmental diaphyseal defects: A comparison between absorbable and non-absorbable membranes [J]. Injury, 2005, 36(12): 1460-1466.
- [17] Artzi Z, Givol N, Rohrer M D, et al. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects, Part 2: Morphometric analysis [J]. J Periodontol, 2003, 74(8): 1153-1160.
- [18] Solheim E. Osteoinduction by demineralized bone [J]. Int Orthop, 1998, 22(5): 335-342.
- [19] Mauney J R, Jaquiere C, Volloch V, et al. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering [J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3173-3185.
- [20] Wang Xuejiang, Li Yubao, Wei Jie, et al. Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly (hexamethylene adipamide) composites [J]. Biomaterials, 2002, 23(24): 4787-4791.
- [21] Wang Huanan, Li Yubao, Zuo Yi, et al. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano - hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2007, 28(22): 3338-3348.
- [22] 张翔, 李玉宝, 左奕, 吕国玉. 加工工艺对n-HA/PA66复合材料结晶行为和力学性能的影响 [J]. 复合材料学报, 2007, 24(3): 72-77.
- Zhang Xiang, Liu Yubao, Zuo Yi, Lü Guoyu. Effect of processing conditions on crystallization behavior and mechanical properties of n - HA/PA66 composites [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2007, 24(3): 72-77.
- [23] Bai Shi, Mo Anchun, Xian Suqin, et al. Characterization and antibacterial effect of a novel nanocomposite membrane [J]. Key Engineering Materials, 2007, 19(330/332): 325-328.
- [24] Lü Guoyu, Li Yubao, Yang Aiping, et al. Preparation and antibacterial activity of silver ions-substituted hydroxyapatite/titania [J]. Materials Science Forum, 2006, 510/511: 78-81.
- [25] Zhang Xiang, Li Yubao, Zuo Yi, et al. Morphology, hydrogen-bonding and crystallinity of nano - hydroxyapatite/ polyamide 66 biocomposites [J]. Composites Part A, 2007, 38(3): 843-848.
- [26] Hynes R O. Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion [J]. Cell, 1992, 69(1): 11-25.
- [27] Bos R, Vander Mei H C, Busscher H J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—Its mechanisms and methods for study [J]. FEMS Microbiology Review, 1999, 23(2): 179-230.
- [28] Wei Guobao, Ma P X. Structure and properties of nano - hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. Biomaterials, 2004, 25(20): 4749-4757.