

# 胶原蛋白复合壳聚糖支架的制备及生物学性状：壳聚糖及胶原比例筛选\*\*\*

王征, 马云胜, 穆长征, 王亚光

## Preparation and biological characteristics of collagen-chitosan composite scaffold: Proportion of chitosan and collagen

Wang Zheng, Ma Yun-sheng, Mu Chan-zheng, Wang Ya-guang

### Abstract

**BACKGROUND:** Chitosan and collagen scaffolds have been used as a common carrier material for tissue engineering. However, how to obtain an ideal cell carrier by adjusting the ratio between the two is still an unsolved problem.

**OBJECTIVE:** To adjust the proportion of collagen and chitosan for complex scaffolds, to detect and compare biological properties of scaffolds prepared at various proportions.

**METHODS:** Chitosan and type collagen protein were added by ratio 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. The materials were freeze-dried after UV cross-linking, then neutralized by NaOH and distilled water, followed by additional freeze-drying. The scaffolds at different proportions were observed for the properties, the degradation rate, the porosity, and swelling ratio. The size and distribution of the holes were detected under scanning electron microscopy.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At a fixed proportion of chitosan, there were significant differences in scaffold aperture by the statistical comparison ( $P < 0.05$ ). The aperture diameter of the scaffold prepared at 1:3 ratio was the largest, (298.0±36.0) μm; the overall porosity was up to 93.9%~97.5%, the increasing ratio of collagen showed less impact on the porosity. The swelling rate reached about 80%, swelling degree of the scaffold was at an inverse proportion with the increase in the proportion of collagen. The degradation rate of the scaffold was increased with the increasing proportion of collagen. The higher chitosan concentration is, the slower degradation is. By means of UV cross-linking method, 1:3 ratio of collagen-chitosan scaffolds is more suitable for cartilage tissue engineering.

Wang Z, Ma YS, Mu CZ, Wang YG. Preparation and biological characteristics of collagen-chitosan composite scaffold: Proportion of chitosan and collagen. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(29):5367-5370. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 壳聚糖和胶原类支架已成为组织工程常用的载体材料。但是, 现阶段如何能够通过调节二者比例而达到理想的细胞载体仍是目前需要解决的问题之一。

**目的:** 调节胶原与壳聚糖二者配制比例制备支架材料, 检测及对比不同比例支架材料生物学性质。

**方法:** 制备 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 比例的壳聚糖、I 型胶原蛋白成分, 经紫外线交联后冷冻干燥, 再将其用 NaOH 与蒸馏水进行中和, 二次冻干制备好支架。观察不同比例支架的材料性质、孔隙率、降解率、溶胀率; 扫描电镜观察孔径的大小及形态。

**结果与结论:** 在壳聚糖含量固定, 支架的大体孔径经统计比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。1:3 比例制备的孔径最大, 达到(298.0±36.0) μm; 支架总体的孔隙率为 93.9%~97.5%, 胶原比例的增加对支架孔隙率的影响较轻微。各组支架的溶胀率可达到 80%左右, 支架的溶胀程度随胶原比例增加而减少。在支架的降解率随着胶原比例增加而增加, 而壳聚糖含量越高, 降解速度越慢。结果证实, 通过紫外光交联法, 按照 1:3 配比的胶原和壳聚糖的支架材料更加适合软骨组织工程的要求。

**关键词:** 壳聚糖; 胶原蛋白; 支架; 紫外线交联; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.29.012

王征, 马云胜, 穆长征, 王亚光. 胶原蛋白复合壳聚糖支架的制备及生物学性状: 壳聚糖及胶原比例筛选[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(29):5367-5370. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

组织工程支架做为支持细胞生长的桥接材料, 要求应具备良好的组织相容性, 高度的多孔性, 孔间联通。并且孔径至少应在 50 μm 以上, 孔隙率在 70%~90% 才能为细胞生长提供足够的空间<sup>[1]</sup>。尤其是广泛存在的大交通孔有利于软骨细胞和基质形成<sup>[2]</sup>。另外还需具有可控的材料降解率, 保证材料的降解时间与组织形成时间相匹配。有一定的强度, 并易于

加工, 消毒, 储存等要求<sup>[3]</sup>。

壳聚糖作为组织工程中支架材料, 具有可生物降解、低抗原性、良好的生物相容性和无热原反应, 其用途非常广泛。壳聚糖和胶原类支架是组织工程常用的载体材料。单纯用壳聚糖做为支架材料, 脆性较大, 细胞黏附性低<sup>[4]</sup>; 单纯用胶原其物理强度差降解速度快<sup>[5]</sup>。二者复合, 使得壳聚糖支架上结合大量的胶原纤维丝构成的网, 增加了对细胞的亲和力。但是现阶段如何能够通过调节二者比例而达到所需要的具有足够强度, 韧性, 可控的降解速度且

Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Wang Zheng★, Studying for master's degree, Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China  
yunshengma@126.com

Correspondence to: Mu Chang-zheng, Master, Master's tutor, Professor, Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China  
muchangzheng@sina.com

Supported by: Innovation Team Project Fund of Liaoning Provincial Department of Education, No. 2006T062\*; Liaoning Provincial Natural Science Foundation, No. 2007Z201\*

Received: 2010-04-01  
Accepted: 2010-05-10

辽宁医学院组织学与胚胎学教研室, 辽宁省锦州市121001

王征★, 男, 1980年生, 辽宁省沈阳市人, 回族, 辽宁医学院在读硕士, 主要从事软骨组织工程方面研究。  
yunshengma@126.com

通讯作者: 穆长征, 硕士, 硕士生导师, 教授, 辽宁医学院组织学与胚胎学教研室, 辽宁省锦州市121001  
muchangzheng@sina.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2010)29-05367-04

收稿日期: 2010-04-01  
修回日期: 2010-05-10  
(20100401010/W·Y)

对细胞生长的低毒性要求仍是要研究的重点。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 实验于2009-12/30在辽宁医学院解剖与组胚实验室完成。

**材料:** 壳聚糖与I型胶原蛋白(Sigma公司); 冷冻干燥机(北京格拉威科技有限责任公司); 离子溅射仪(HITACHIE-1010)、扫描电镜HITACHI-3000N)(日本)。

**实验方法:**

**支架的制备:** 按照5种不同比例配制的支架。配制0.2 mol/L的冰醋酸溶液, 称取壳聚糖0.2 g, 胶原蛋白按比例称取0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g 想将壳聚糖粉末溶于冰醋酸中配制成2%的壳聚糖溶液, 后依次按照不同比例(1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5)的壳聚糖和胶原比例加入I型胶原蛋白。4℃的冰箱中过夜, 注入长约15 cm, 直径约5 mm的管状模具中, 后放入-80℃的冰箱中冷冻成型, 退下模具后放入冷冻干燥机中-53℃冻干24 h后得到壳聚糖胶原蛋白复合支架。支架成型后以紫外线发生器, 以500 μW/m<sup>2</sup>的剂量照射3 h充分使其交联。后再经过1 mol/L的NaOH中进行中和, 三蒸水反复冲洗后, 二次冻干成型后得到胶原壳聚糖复合支架。

**孔径大小的测定:** 取二次冻干后各组支架材料, 将样品裁剪成直径4 mm, 高2 mm大小的小片, 分别对其表面、底部及内部结构喷金处理后置于扫描电镜下, 加速电压20 kV, 对支架行大体摄片, 并用扫描电镜行微结构观察。每种支架取样3次(n=3), 扫描电镜图中随机选择10个孔, 测量每孔大小。

**孔隙率的测定:** 采用乙醇替代法测定<sup>[5]</sup>, 将一定体积的支架材料置于一定体积(V<sub>1</sub>)的乙醇中, 循环抽真空至无气泡逸出, 材料和乙醇的总体积为V<sub>2</sub>, 视(V<sub>2</sub>-V<sub>1</sub>)为支架固体的体积。将含乙醇的支架材料移出后所剩乙醇体积为V<sub>3</sub>, 材料中所含乙醇的体积(V<sub>1</sub>-V<sub>3</sub>)为材料孔隙所占的体积, 则材料的总体积为:

$$V=(V_2-V_1)+(V_1-V_3)=V_2-V_3$$

所以, 壳聚糖多孔支架的孔隙率:

$$P=(V_1-V_3)/(V_2-V_3)$$

**降解率的测定:** 将5种不同比例的支架样品各取4个裁剪成半径为2 mm, 高为5 mm的圆柱体, 先称取其干质量(m<sub>1</sub>), 随即放入PBS液的离心管中, 放入37℃的恒温水浴箱中, 每3 d换液, 隔1周, 2周, 3周, 4周取出二次干燥后测干质量(m)。

$$\text{降解率}=(m_1-m)/m_1 \times 100\%$$

**溶胀率的测定:** 称取支架在干态时的质量为m, 然后将支架在PBS中浸泡24 h后小心取出, 用滤纸吸干表面的水分, 称质量为m<sub>t</sub>, 则支架溶胀率=(m<sub>t</sub>-m<sub>0</sub>)/m<sub>0</sub>×100%。

**扫描电镜观察:** 将样品裁剪成直径4 mm, 高2 mm大小的小片, 真空喷金后, 扫描电镜观察表面结构和孔径变化, 选择合适的放大倍数拍摄扫描照片, 并在材料内部选取3个高倍视野(500倍), 每视野测量6个孔径值, 计算材料的平均孔径。

**主要观察指标:** ①支架材料大体外观。②支架孔径、孔隙率、降解率、溶胀率。③支架扫描电镜观察结果。

**设计、实施、评估者:** 实验设计为第一、二作者, 试验实施为第一作者, 结果评估为第二、三作者, 均经过系统培训, 未使用盲法估计。

**统计学分析:** 由第四作者采用SPSS 13.0软件分析, 做t检验; 样本均数间比较使用方差分析; P<0.05为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 支架材料大体外观** 呈圆柱型(同模具)外观呈白色爆花糖样, 支架表面呈叠瓦状, 大体观察可见表面布满孔隙。随着胶原比例的增加制备的支架表面肉眼见越光滑, 孔隙也越来越丰富, 支架的柔韧性及可塑性也随之增加。冻干的胶原/壳聚糖支架孔隙丰富, 大小比较均一, 且孔与孔之间相互联通构成了交通孔。见图1a。

**2.2 各组支架孔径** 各组比例配比的支架材料孔径在90~360 μm之间, 1:1为(236.00±55.74) μm; 1:2为(150.00±46.09) μm; 1:3为(298.00±36.01) μm; 1:4为(173.00±35.02) μm; 1:5为(181.00±79.10) μm; 各组孔径比较差异均有显著性意义(P<0.05)。在各组孔径趋势图中可见在1:3时比例的支架孔

径达到最大。见表1。

表1 各组孔径, 孔隙率, 溶胀率, 降解率, 有无炎症反应结果  
Table 1 The pore size, porosity, swelling and degradation rate, inflammatory reaction in each group

Ratio	1:1	1:2
Pore size ( $\mu\text{m}$ )	236.0 $\pm$ 55.7	150.0 $\pm$ 46.1
Porosity (%)	97.5 $\pm$ 0.2	97.1 $\pm$ 0.6
Swelling rate (%)	88.5 $\pm$ 21.0	83.3 $\pm$ 31.0
Degradation rate (%)	1 wk	15.5 $\pm$ 1.6
	2 wk	1.1 $\pm$ 0.4
	3 wk	1.4 $\pm$ 0.2
	4 wk	1.6 $\pm$ 0.7

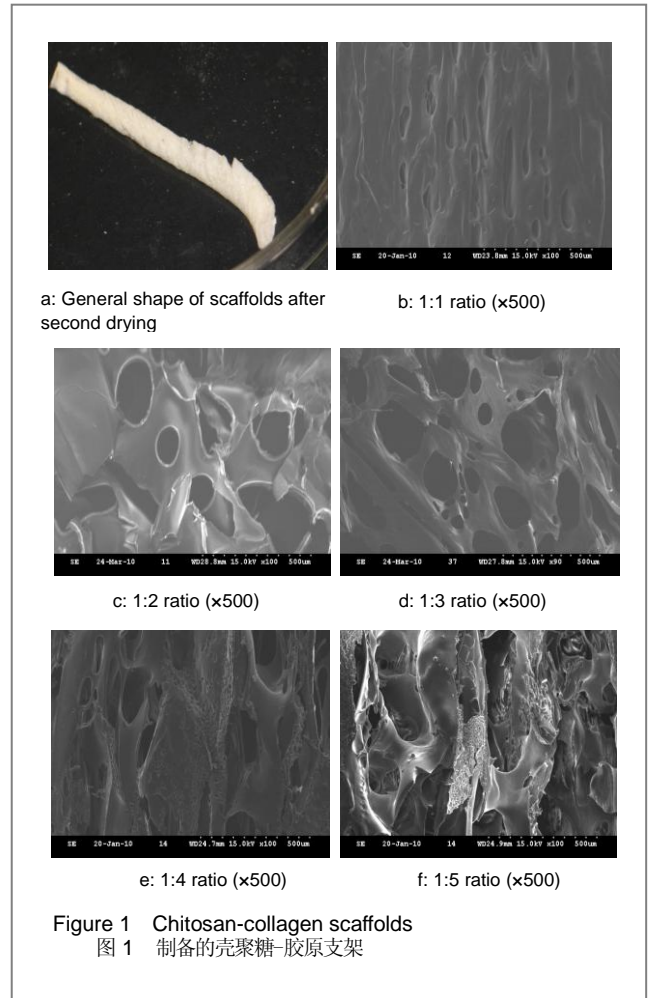
Ratio	1:3	1:4	1:5	
Pore size ( $\mu\text{m}$ )	298.0 $\pm$ 36.0	173.0 $\pm$ 35.02	181.0 $\pm$ 79.0	
Porosity (%)	94.0 $\pm$ 0.6	93.9 $\pm$ 1.1	94.0 $\pm$ 1.2	
Swelling rate (%)	83.0 $\pm$ 41.0	74.3 $\pm$ 13.0	78.0 $\pm$ 18.0	
Degradation rate (%)	1 wk	15.12 $\pm$ 1.7	14.5 $\pm$ 1.3	30.0 $\pm$ 2.0
	2 wk	4.0 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 1.6	18.0 $\pm$ 1.2
	3 wk	5.1 $\pm$ 1.3	9.0 $\pm$ 1.5	11.0 $\pm$ 1.1
	4 wk	3.3 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.8	26.0 $\pm$ 0.8

2.3 各组支架孔隙率 见表1。各组支架的孔隙率均达到了90%以上孔隙率范围93.9%~97.5%之间。各组材料经统计分析比较结果, 各组支架孔隙率差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

2.4 各组支架降解率 各组材料从外形上看, 4周时, 除1:5配比组支架以完全降解, 1:4还其他几组均保持了原有的圆柱状外观。各组材料经统计分析结果显示1:5配比组与其他4组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 如表1所示: 各组支架在第1周时降解速度较快, 特别是按1:5比例制备的材料, 在第1周就已降解30%左右, 其余4组各组间进行比较后差异也有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 通过表1可以看出其余4组支架材料降解率在15%左右, 在第2周与第3周时各组支架材料1:1的降解较缓慢, 每周平均降解速度为1.1%左右, 另外, 支架材料的降解率随含胶原比例的增加, 而降解速度加快。1:2组每周约降解2%, 1:3平均降解4%, 1:4平均为9%, 1:5平均为18%。

2.5 各组支架溶胀率结果 各组支架经统计分析后, 各组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各组支架吸水率在82%~88%之间, 可以看出各组支架比例均在93%以上, 说明各组支架对细胞的吸水性均表现良好。见表1。

2.6 各组支架扫描电镜结果 支架整体观可见支架表面与内部可见较为均匀分布的丰富的孔隙, 孔隙周围可见胶原连接成丝状, 在各组比例的支架孔径在200~300  $\mu\text{m}$ 之间, 另外孔径随胶原含量的增加孔径也有所变化。见图1b~f。



### 3 讨论

目前发现壳聚糖具有促进伤口愈合和吸收效应<sup>[6-7]</sup>, 抑菌<sup>[8]</sup>, 药物缓释<sup>[9-11]</sup>, 神经组织修复作用<sup>[12-15]</sup>, 并且具有良好的神经细胞亲和性, 对脊髓神经元及周围神经生长有明显促进作用。

有学者在对壳聚糖与视网膜神经细胞的研究中发现, 配置成不同比例的壳聚糖对SD大鼠视网膜神经细胞生长有明显促进作用<sup>[16]</sup>。以往还有人尝试将壳聚糖单独作为支架载体用于组织工程细胞载体也取得了很好的预期效果<sup>[17-18]</sup>。国内学者欧阳彬等<sup>[17]</sup>应用兔自体软骨细胞复合壳聚糖, II型胶原, PGA(聚羟基乙酸)3种支架材料, 观察软骨细胞生长情况的差异, 结果将壳聚糖做为支架载体的软骨细胞生长情况优于后者。壳聚糖支架更适合软骨细胞的贴附生长, 有利于维持软骨细胞的表型。除此之外在研究中发现, 壳聚糖还可同其他材料结合到一起进行应用<sup>[19-20]</sup>, 是较好的软骨组织工程细胞支架。但单纯应用壳聚糖有它自身存在的缺点: 脆性较大, 细胞黏附性低等。需通过对其表面改性加以修饰与其他材料复合来加以改善, 才能使它更有利于细胞黏附与增殖。胶原作为细胞外基质的主要成分, 也可为生物细胞提供用

于维持结构的支架,同时在溶解状态下胶原蛋白可形成一种胶状溶液,可刺激细胞分裂,其降解产物可被细胞利用合成新的基质<sup>[21]</sup>。然而单独应用胶原缺点是降解速度过快,可塑性虽强但缺乏一定强度。二者复合应用可对各自的缺点互为中和,达到组织工程所需要的支架材料要求。

本实验制备的支架各组材料扫描电镜观察结果可见材料表面多孔,且广泛联通性孔径。且可见胶原交织成网状,可以为细胞联系起到桥接的作用。孔径平均在200 μm以上,该支架具有高度多孔性,并且孔间联通广泛,符合细胞生长的空间条件需要。在支架制备过程中,壳聚糖加热后不会融化或变软,而是随着温度的升高而碳化,所以不能用热处理,热铸型等方法制备壳聚糖材料。

冷冻干燥法是一种制备壳聚糖支架的优选方法<sup>[22-23]</sup>。有文献指出在-20 °C的时候孔径相对均匀<sup>[24]</sup>,但是在实际的制备过程中,发现在-20 °C的低温条件下制备的支架极易受到室温的影响,而-80 °C的相对更容易成型。在孔隙率方面,各组材料总体均达到了90%以上,虽然随胶原比例的增大而有所变化但变化不大。在溶胀率方面,溶胀率越大,与吸收细胞的数量呈正相关。各组材料平均溶胀率平均在80%左右,在试验中发现溶胀率随胶原比例的增加有降低的趋势。另外支架的孔径在壳聚糖浓度一定的情况下,胶原的含量与孔径的大小无关,综合评估各组比例的支架材料,在1:3比例制备的支架孔径较大,可以为细胞提供更大的生存空间。

在对壳聚糖与胶原进行交联方面,有文献报道应用紫外线有促进其交联的作用<sup>[25]</sup>。胶原分子经紫外线照射后激发产生自由基反应,使胶原发生分子内或分子间交联。采用紫外线交联避免了应用2.5 g/L中性戊二醛或是京尼平等化学试剂对细胞的毒性作用<sup>[26]</sup>,所以该方法对细胞的毒性较低,甚至无毒性<sup>[27]</sup>。

实验结果表明,1:3比例的支架体外试验时在第1周降解速度较快,随后几周,逐渐基形成了匀速降解,第4周时平均降解率在28%左右,并且外形良好。这可以为软骨形成提供良好的外部支撑环境。

#### 4 参考文献

- [1] Senel S,Lkinci G,Kas S,et al.Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery.Int J Pharm.2000; 193(2):197-203.
- [2] Malicev E,Radosavljevic, D Duval E, et al. Fibrin gel improved the Spatial Uniformity and Phenotype of Human Chondrocytes Seeded on Collagen Scaffolds Biotechnol Bioeng. 2007; 96(2): 364-370.
- [3] Park YJ, Lee YM, Park SN, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. Biomaterials. 2002; 21(2):153-159.
- [4] Griffin DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, et al. Chitosan Scaffolds:interconnective pore size and cartilage engineering. Acta Biomater. 2006; 2(3):313-320.
- [5] Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, et al. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. J Biomed Mater Res A. 2003; 65(4):489-497.
- [6] Di Martino A, Sittlinger M, Risbud M. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. Biomaterials. 2005; 26(30): 5983-5990.

- [7] Chen Y, Dou GF, Luo YJ, et al. Gaofenzi Tongbao. 2005; (1): 94-100. 陈煜, 龚桂芳, 罗运军, 等. 甲壳素和壳聚糖在伤口辅料中的应用[J]. 高分子通报, 2005(1): 94-100.
- [8] Chen W, Wu QP, Zhang JM. Weishengwu Xuebao. 2008; 48(2): 164-168. 陈威, 吴清平, 张菊梅. 壳聚糖抑菌机制的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(2):164-168.
- [9] Zhang PP, Tang ZF. Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue Zazhi. 2009; 26(7): 542-545. 张培培, 唐忠峰. 药物阿司匹林剂型的研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(7): 542-545.
- [10] Yu TT. Guangdong Yaoxueyuan Xuebao. 2001; 17(1): 26-28. 余婷婷. 壳聚糖的药物制剂学进展[J]. 广东药学院学报, 2001, 17(1): 26-28.
- [11] He AM, Lin SM. Fudan Xuebao. 2007; 34(3): 463-464. 何爱明, 林世明. 阿司匹林壳聚糖微球的研制及药理学参数测定. 复旦学报, 2007, 34(3): 463-464.
- [12] Yang JY, Li XH, Li GF, et al. Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi. 2007; 34(3): 463-464. 杨吟野, 李训虎, 李国富, 等. 壳聚糖和PHBHHx用作神经修复导管材料的研究[J]. 生物医学工程杂志, 2002, 19(1): 25-29.
- [13] Zhou T, Zhou B, Huang SL. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2004; 8(22): 4640-4641. 周涛, 周波, 黄书岚. 壳聚糖在脑组织中的生物相容性[J]. 中国临床康复, 2004, 8(22):4640-4641.
- [14] Zhi XD, Wang W, Bao DY. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007; 11(5):1065-1068. 智晓东, 王伟, 包大禹. 壳聚糖导管结合碱性成纤维细胞生长因子修复大鼠坐骨神经缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(5): 1065-1068.
- [15] Zhang WG, Lv DC, Fu ZY, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2006; 86(15): 1065-1068. 张卫国, 吕德成, 傅重洋, 等. 壳聚糖复合他克莫司缓释鞘管促进大鼠坐骨神经再生的研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(15):1065-1068.
- [16] Yang H, Zhao Y. Huazhong Keji Daxue Xuebao: Yixueban. 2010; 39(1): 116-119. 杨红, 赵燕. 壳聚糖促进体外培养SD大鼠视网膜神经细胞生长的初步研究[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2010, 39(1):116-119.
- [17] Ouyang B, Fan WM, Ma YM, et al. Jiangsu Yiyao. 2007; 33(9):904-906. 欧阳彬, 范伟民, 马益民, 等. 壳聚糖、II型胶原和PGA三种支架体外构建组织工程软骨的比较研究[J]. 江苏医药, 2007, 33(9):904-906.
- [18] Shim IK, Suh wh, Lee SY, et al. Chitosan nano-/micro fibrous double-layered membrane with rolled-up three-dimensional structures for chondrocyte cultivation. Jbiomed Mater Res A. 2008. 18(6): 157-163.
- [19] Xu Y, Zhu LY, Tian J, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu Zazhi. 2009; 13(8):1423-1426. 许勇, 朱立新, 田京, 等. 纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合材料与骨髓间充质干细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程与临床康复杂志, 2009, 13(8):1423-1426.
- [20] Wu JQ, Yang TF, Liu Y, et al. Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi. 2008; 12(6):1349-1353. 吴佳奇, 杨天府, 刘阳, 等. 多孔P A66 / n-HA复合MSCs修复兔膝关节骨软骨缺损的初步研究[J]. 生物医学工程杂志, 2008, 12(6):1349-1353.
- [21] Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 47(1):39-54.
- [22] Madhally SV, Matthew HW. Porous chitosan Scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. 1999; 20(21):1133-1142.
- [23] Kong L, Ao Q, Wang A, et al. Preparation and Characterization of a Multilayer Biomimetic Scaffold for Bone Tissue Engineering. J Biomater Appl. 2008; 22(3):223-239.
- [24] Yang J, Yang GH, Liu W. Shanghai Dier Junyi Daxue Xuebao. 2004; 24(4):296-298. 杨军, 杨光辉, 刘伟. 组织工程化表皮膜片的构建极其在增殖性疤痕治疗中的应用[J]. 上海第二军医大学学报, 2004, 24(4):296-298.
- [25] Li Z, Cen L. Zuzhi Gongcheng yu Zhongjian Waikexue Zazhi. 2007; 3(4): 189-192. 李喆, 岑莲. 羧基化壳聚糖支架材料的研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2007, 3(4): 189-192.
- [26] Yang Y, Deng D, Liu W, et al. Zuzhi Gongcheng yu Zhongjian Waikexue. 2009; 5(4):186-189. 杨漾, 邓丹, 刘伟等. 不同浓度配比的壳聚糖-胶原复合材料对细胞亲和性的影响[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2009, 5(4):186-189.
- [27] Liang ZH, Zhou CR, Li LH. Gaofenzi Cailliaoxue yu Gongcheng Zazhi. 2006; 22(2):181-184. 梁志红, 周长忍, 李立华. 几种改良方法对胶原膜微观结构的影响[J]. 高分子材料科学与工程杂志, 2006, 22(2):181-184.

来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 辽宁省教育厅创新团队基金项目基金(2006T062); 辽宁省自然科学基金(20072201)。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。