温敏性壳聚糖水凝胶对大鼠成骨细胞的毒性★

李 偏，冯进益，蔡志刚，谢容泉，王德荫，郑立斌，芮 钢

Cytotoxicity of chitosan thermosensitive hydrogel to rat osteoblasts

Li Pian, Feng Jin-yi, Cai Zhi-gang, Xie Rong-quan, Wang De-yin, Zheng Li-bin, Rui Gang

Abstract

BACKGROUND: Thermosensitive chitosan shows good compatibility to many cells. It is a good vector in the tissue-engineering field. However, its effect on osteoblasts remains unclear.
OBJECTIVE: To study the cytotoxicity of chitosan thermosensitive hydrogel to osteoblasts.
METHODS: Osteoblasts were cultured in chitosan thermosensitive hydrogel, and then viewed cell morphology under a microscope; at the same time, osteoblasts were cultured with different concentrations of chitosan thermosensitive extracts *in vitro* for 24, 48, 72, and 96 hours, respectively. The MTT assay was used to determine the relative growth rate (RGR) of osteoblasts and determined the level of cytotoxicity.
RESULTS AND CONCLUSION: Osteoblasts were round at 24 hours after culture in chitosan thermosensitive hydrogel under a microscope, which extruded its horns and amplified after 48 hours. The RGF of osteoblasts cultured in different concentrations of chitosan thermosensitive extracts in vitro in each group was 92% to 112% at different time points, and the cytotoxic of all kind of concentrations of chitosan thermosensitive extracts were 0 or 1, which completely meet the standards of safety evaluation of biological materials.

Li P, Feng JY, Cai ZG, Xie RQ, Wang DY, Zheng LB, Rui G. Cytotoxicity of chitosan thermosensitive hydrogel to rat osteoblasts.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(25):4602-4606.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Xiamen First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Li Pian★, Studying for master's degree, Physician, Xiamen First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Xiamen 361003, Fujian Province, China
Leepian8302@163.com

Correspondence to: Rui Gang, Chief physician, Master's supervisor, Xiamen First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Xiamen 361003, Fujian Province, China
Reigang@yahoo.com.cn

Received: 2010-12-04
Accepted: 2011-02-10

摘要

背景：温敏性壳聚糖与多种细胞相容性良好，是组织工程中不可多得的优良载体，但其对成骨细胞毒性研究相对缺乏。
目的：验证温敏性壳聚糖水凝胶对成骨细胞的毒性。
方法：成骨细胞在温敏性壳聚糖水凝胶中进行培养，显微镜下观察细胞形态及扩增情况，同时，SD大鼠成骨细胞在不同浓度的温敏性壳聚糖水凝胶浸提液中体外培养24，48，72，96 h，MTT法测定细胞相对增殖率，判断细胞毒性的级别。
结果与结论：SD大鼠成骨细胞在温敏性壳聚糖水凝胶中培养24 h内镜下观察呈圆形，48 h后开始伸出触角并扩增；温敏性壳聚糖水凝胶浸提液中培养的各组细胞在不同时间点相对增殖率在92%~112%之间，各浓度的温敏性壳聚糖水凝胶材料浸提液的细胞毒性均为0级或1级，完全符合生物材料的安全评价标准。
关键词：温敏性；壳聚糖；水凝胶；成骨细胞；毒性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.25.011

李偏，冯进益，蔡志刚，谢容泉，王德荫，郑立斌，芮钢. 温敏性壳聚糖水凝胶对大鼠成骨细胞的毒性[J].中国组织工程研究与临床康复，2011，15(25):4602-4606. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

福建医科大学附属厦门第一医院，福建省厦门市 361003

李偏★，男，1983年生，福建省厦门市人，汉族，福建医科大学在读硕士，医师，主要从事脊柱外科与组织工程研究。
Leepian8302@163.com

通讯作者：芮钢，主任医师，硕士生导师，福建医科大学附属厦门第一医院骨科，福建省厦门市 361003
Reigang@yahoo.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2011)25-04602-05

收稿日期:2010-12-04
修回日期:2011-02-10
(20101204003/M·Z)

0 引言

温敏性壳聚糖又称为可注射型温度敏感性水凝胶，它是一种pH值为中性，在室温或低于室温时可保持液态，温度达到体温时可凝胶化的材料，有望被广泛应用于药物释放和组织工程领域，作为药物的可注射型释放载体或组织修复支架材料。

实验采用体外细胞培养技术和四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法研究自制温敏性壳聚糖水凝胶对SD大鼠成骨细胞的毒性作用。

1 材料和方法

设计：以细胞为研究对象，对比观察实验。

时间及地点：实验于2010-05/10在福建医科大学附属厦门第一医院中心实验室完成。

材料：

实验动物：出生3 d的SD乳鼠用于分离培养成骨细胞，由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

实验试剂和仪器：

试剂及仪器	来源
95%脱乙酰度壳聚糖	浙江金壳有限公司
β-甘油磷酸钠、DMEM-F12细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、茜素红染液、四甲基偶氮唑盐	Sigma公司，美国
二甲基亚砜	北京化工厂
标准型细胞培养板	美国Corning
BBGP系列二氧化碳细胞培养箱	上海仕博生物技术有限公司北京分公司
CK型倒置相差显微镜	日本Olympus
550酶标仪	Bio-Rad公司

实验方法：

SD大鼠成骨细胞的培养、传代与鉴定：将出生3 d的SD乳鼠处死后置入体积分数为75%乙醇中浸泡10 min。于超净台上取顶骨，放入装有少量PBS的培养皿中，刮除附着组织，待骨质发白、透亮，再重新用PBS冲洗3次，以0.1% Ⅰ型胶原酶消化30 min，再以PBS冲洗3次，再次加入0.1% Ⅰ型胶原酶，将骨剪成1 mm×1 mm×1 mm大小，用牙科探针将其均匀分布在25 mL培养瓶底。倒置培养瓶，加入3 mL含体积分数为10%胎牛血清、100 mg/L青霉素及100 mg/L链霉素的DMEM-F12培养液，于37 ℃，体积分数5%CO_2培养箱内培养4 h，待组织块贴壁后，缓慢翻转培养瓶，继续培养。每3 d换液1次，待细胞达到汇合点时，用0.25%胰蛋白酶消化，按1∶2 比例传代。原代培养的成骨细胞传至第3代。

另外，制作成骨细胞爬片及茜素红染液，鉴定细胞的组织来源。将成骨细胞用0.25%胰蛋白酶消化，制成细胞悬液，在放入盖玻片的6孔板中每孔加入1 mL细胞悬液，培养箱中孵化30 min后每孔补完全培养基至3 mL，重新置入培养箱中培养，每孔细胞量约3×10^7 L^{-1}。同时，用0.1 mol/L盐酸调整Tris-base液至pH值为8.3，加入茜素红，并过滤。将固定好的细胞爬片置于茜素红染液中，37 ℃孵育1 h后进行显微镜下观察并摄片。

制备温敏性壳聚糖水凝胶：①壳聚糖溶液的配制：将脱乙酰度为95%壳聚糖粉末0.2 g，溶解于4.5 mL的0.1 mol/L的盐酸溶液，于25℃搅拌过夜至完全溶解，以150目绢丝过滤，除去杂质后，滤液静置，并进行高压蒸汽灭菌(121 ℃，15 min)，置入4 ℃冰箱保存备用。②甘油磷酸钠溶液的配制：称取0.28 g的甘油磷酸钠粉末，溶解于去离子水，置于超声振荡器振荡5 min，完全溶解后，用孔径0.2 μm过滤器过滤除菌，于4 ℃保存备用。③温敏性壳聚糖水凝胶的制备：将灭菌过的壳聚糖溶液置入冰浴环境中以磁力搅拌器持续搅拌，壳聚糖溶液与甘油磷酸钠溶液按9∶1的比例逐滴添加甘油磷酸钠溶液，添加完毕后继续搅拌10 min。

SD大鼠成骨细胞复合温敏性壳聚糖水凝胶共培养：消化第3代SD大鼠成骨细胞，离心后用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM-F12培养液吹打成单细胞悬液，调整细胞浓度至1×10^8 L^{-1}。以2∶1的比例将温敏性壳聚糖水凝胶与成骨细胞混合，打入6孔板中，每孔1 mL，于37 ℃、体积分数5%CO_2条件下培养5.0~6.0 min，待壳聚糖/甘油磷酸钠与成骨细胞复合物形成凝胶后取出，每孔加入完全培养液3 mL，继续培养，并于培养24，48，72，96 h后进行0.1%结晶紫染色，显微镜下观察拍照。

温敏性壳聚糖水凝胶浸提液的配制：按10 mL/cm^2的标准，将0.8 cm直径的温敏性壳聚糖水凝胶分别加入不同体积的培养液中，37 ℃下保持24 h。制备出20倍、10倍、5倍、2.5倍的标准浓度的4种浸提液。阳性对照组用纯铅材料，按10 mL/cm^2加入培养液制备浸提液。阴性对照为完全培养液。

温敏性壳聚糖水凝胶对成骨细胞的毒性试验：96孔培养板接种第3代成骨细胞，细胞浓度10^8 L^{-1}，每孔加入0.1 mL。放入体积分数为5%CO_2、37 ℃孵箱内培养24 h后取出，加入浸提液0.1 mL/孔，每种浓度的浸提液加6孔，使孔内浓度最终分别达到40倍、20倍、10倍、5倍标准浓度；分别于24，48，72，96 h取出1块培养板，加四甲基偶氮唑盐，20 μL/孔，4 h后加二甲基亚砜150 μL/孔，振荡10 min，用酶标仪检测，记录吸光度值。相对增殖度=各实验组吸光度平均值/空白对照组吸光度平均值×100%。毒性分级法：0级：相对增殖度≥100%；1级：相对增殖度75%~99%；2级：相对增殖度50%~74%；3级：相对增殖度25%~49%；4级：相对增殖度1%~24%；5级：相对增殖度为0。

统计学分析：采用SPSS 10.0统计软件，结果以$\bar{x}\pm s$表示并进行组间方差分析。

2 结果

2.1 SD大鼠成骨细胞的培养、形态学观察与组织来源鉴定 倒置相差显微镜下观察，接种3~7 d有细胞从骨组织块周围爬出，放射状排列。14 d时细胞生长约铺满培养瓶底的80%，按1∶2传代，两三天可传1代。原代及传代培养的成骨细胞呈短柱状，有突起，一般为梭形、锥形或三角形，细胞核圆形，位于细胞一端，核仁明显，细胞表面有短的突起与相邻细胞连接。见图1~4。

Figure 1 Osteoblasts crawled out of bone block at 4–5 d after culture (×4)
图 1 骨组织块培养四五天后可见成骨细胞从骨块中爬出(×4)

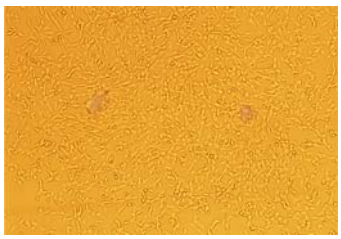


Figure 2 First passaged osteoblasts were fusiform or triangle at 3 d after culture (×4)
图 2 第 1 代成骨细胞培养第 3 天细胞成梭形或三角形(×4)

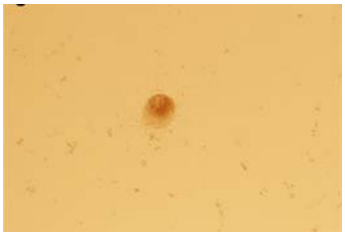


Figure 3 Calcium nodes were formed at 20 d after culture (×10)
图 3 培养 20 d 后可见成骨细胞分泌钙盐形成钙结节(×10)

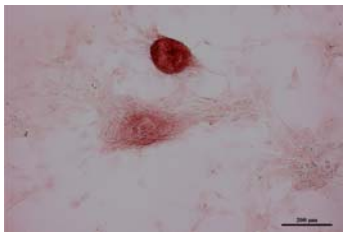


Figure 4 The calcium nodes stained rose pink by Alizarin-red solution (×10)
图 4 钙结节经茜素红染液染色后呈玫瑰红色(×10)

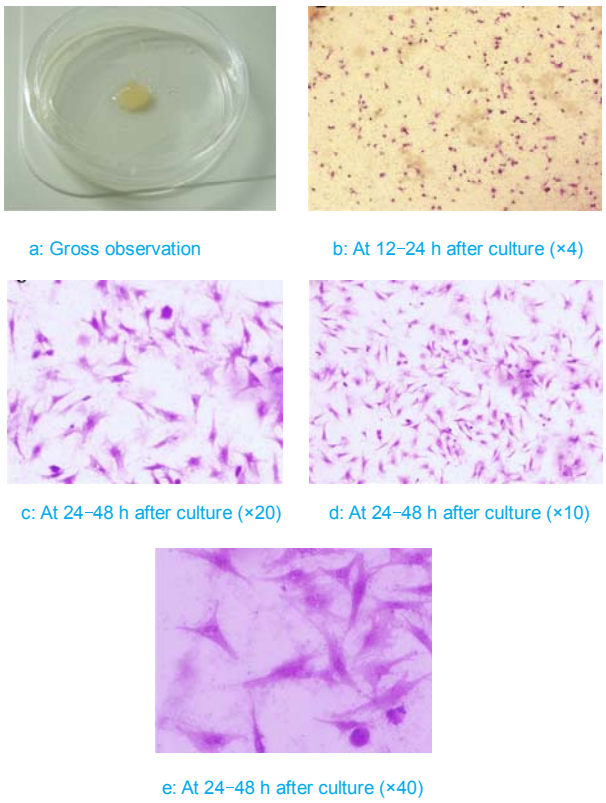
2.2 温敏性壳聚糖水凝胶理化特性 温敏性壳聚糖水凝胶在室温下呈液态，淡黄色、流动性好，pH值6.8~7.2。放置37 ℃孵箱内5.0~6.0 min形成凝胶，呈淡黄色，凝胶形态良好。见图5。

a: Thermosensitive chitosan hydrogel is light yellow liquid in room temperature

b: Thermosensitive chitosan hydrogel forms light yellow gel at 5-6 min after placing into 37 ℃ incubator

Figure 5 The process of thermosensitive chitosan hydrogel's gelation
图 5 温敏性壳聚糖凝胶过程

2.3 成骨细胞在温敏性壳聚糖水凝胶中的培养与观察 温敏性壳聚糖水凝胶复合成骨细胞制成直径约0.8 cm胶体，模拟人工骨，放入培养皿中加入培养液培养，形态良好。显微镜下观察凝胶内细胞成活情况，可见12~24 h内成骨细胞呈圆形，均匀分布在凝胶中；24~48 h后，成骨细胞开始伸出触角，并开始扩增，部分细胞仍呈圆形；48 h后，绝大多数细胞伸出触角，伸展良好，形态较多样，扩增明显。见图6。



a: Gross observation
b: At 12-24 h after culture (×4)
c: At 24-48 h after culture (×20)
d: At 24-48 h after culture (×10)
e: At 24-48 h after culture (×40)

Figure 6 Gross observation of artificial bone tissues and morphology of osteoblasts which cultured in chitosan thermosensitive hydrogel under a microscope
图 6 人工骨组织大体观及成骨细胞在温敏性壳聚糖中镜下观察

2.4 温敏性壳聚糖水凝胶浸提液对成骨细胞毒性检测见表1。

表 1 不同培养时间 MTT 检测各组细胞吸光度值
Table 1 Absorbance value of MTT test in each group ($\bar{x}\pm s$, A)

Group	Culture time			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Negative	0.325±0.027[a]	0.433±0.069[a]	0.510±0.008[a]	0.698±0.053[a]
5-fold extract	0.351±0.026[a]	0.428±0.035[a]	0.503±0.033[a]	0.650±0.059[a]
10-fold extract	0.350±0.028[a]	0.436±0.034[a]	0.508±0.027[a]	0.675±0.075[a]
20-fold extract	0.335±0.021[a]	0.443±0.034[a]	0.516±0.029[a]	0.695±0.074[a]
40-fold extract	0.322±0.027[a]	0.469±0.017[a]	0.487±0.017[a]	0.637±0.069[a]
Positive control	0.187±0.013	0.206±0.016	0.223±0.014	0.285±0.035

[a]$P < 0.05$, *vs.* positive control group

由表1可见，阳性对照组吸光度值与浸提液各浓度

组及阴性对照组之间差异有显著性意义($P < 0.05$)；阴性对照组和浸提液各组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)；不同浓度的浸提液各组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.5 细胞相对增殖度及毒性 在24，48，72，96 h各个不同的时间点检测，无论是高浓度的浸提液还是低浓度的浸提液，其对成骨细胞毒性均为0级或1级。见表2，图7。

表 2 不同培养时间各组细胞相对增殖度及毒性评级
Table 2 The relative degree of cell proliferation and the rating of toxicity

Group	24 h		48 h		72 h		96 h	
	RGR (%)	Rating	RGR (%)	Rating	RGR (%)	Rating	RGR (%)	Rating
5-fold extract	108	0	99	1	99	1	93	1
10-fold extract	107	0	101	0	99	1	91	1
20-fold extract	103	0	102	0	101	0	100	0
40-fold extract	99	1	108	0	95	1	91	1
Positive control	44	3	49	3	44	3	41	3

RGR: relative growth rate

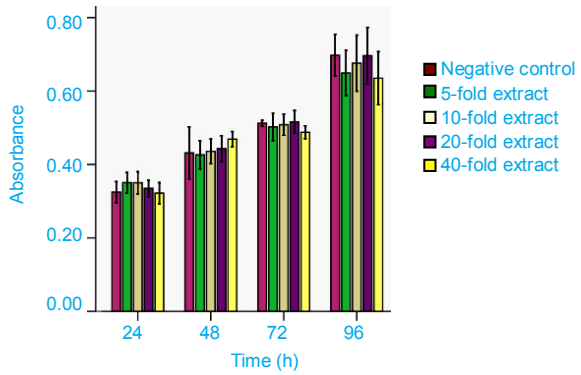


Figure 7 Extract in different concentrations effect on osteoblasts at different time points
图 7 不同浓度浸提液在不同时间段对成骨细胞的影响

3 讨论

实验采用新生SD大鼠颅盖骨，组织块培养法获取成骨细胞[1]。按照薛庆善[2]的差速黏附法，将原代成骨细胞和可能混杂其中的少量成纤维细胞接种于无菌培养瓶中静置10 min左右，轻轻吸取上清液加入到另一个培养瓶中，再静置10 min，将上清液移入培养瓶中培养，除去黏附较快的成纤维细胞。本法培养出来的细胞经过茜素红染液进行钙结节染色，阳性结果鉴定实验细胞为成骨细胞。

目前常用的凝胶制备方法中，物理方法通常需要对壳聚糖进行强碱处理，不利于保持蛋白类物质的生物活性；化学方法则需要化学试剂对壳聚糖进行交联，会对机体产生生物毒性[3-4]。近年来研究发现，通过加入碱性盐、含羟基聚合物或对壳聚糖进行衍生化和接枝反应，可得到具有温度敏感性的壳聚糖基物理凝胶，该溶液在生理(pH7.0)及室温下保持溶液状态，而在温度升至体温(37 ℃)时迅速凝胶化。Chenite等[5]首次用高脱乙酰度的壳聚糖和甘油磷酸钠混合，得到了pH值中性(6.8~7.2)且在常温下可长时间保持液态的壳聚糖/甘油磷酸钠复合物。更重要的是，这种混合物具有温敏活性，即在室温或低于室温时可保持液态较长时间，而温度升高到生理体温(37 ℃)后发生凝胶化。本实验采用200 mg脱乙酰度为95%的壳聚糖，溶解在0.1 mol/L的盐酸溶液4.5 mL，置入冰浴环境中以磁力搅拌器持续搅拌，再将280 mg的甘油磷酸钠溶于0.5 mL蒸馏水中，壳聚糖溶液与甘油磷酸钠溶液按9∶1的比例逐滴添加甘油磷酸钠溶液，添加完毕后继续搅拌10 min。室温下壳聚糖/甘油磷酸钠溶液呈液态，淡黄色、流动性好，将壳聚糖/甘油磷酸钠溶液置于37 ℃环境中5.0~6.0 min，即发溶胶-凝胶转变，pH值在6.8~7.2。很多实验采用脱乙酰度为91%的壳聚糖，同时壳聚糖的体积浓度低于本实验体积浓度1倍[6-7]，甘油磷酸钠体积浓度、壳聚糖与甘油磷酸钠混合比例均不变，混合后获得pH 7.15，较为清亮均质的水溶液(未加热)，但置入37 ℃环境中约10 min才发生溶胶-凝胶转变。Ruel-Gariepy等[8]进一步研究发现壳聚糖脱乙酰度对壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶温度影响较大。脱乙酰度降低使凝胶温度升高，凝胶速度减慢，其中脱乙酰度为70%的壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶温度为66 ℃，而81%、91%和95%的壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶温度分别是57，37，34 ℃。脱乙酰度84%的壳聚糖/甘油磷酸钠在4 ℃下可保持液态至少3个月，在室温下保持2个月，37 ℃时凝胶时间为14 min；而95%的壳聚糖/甘油磷酸钠在4 ℃下8~10 h即发生凝胶化。外界温度对凝胶速度也有较为明显的影响，随着温度的升高凝胶速度成几何增长，凝胶速度依赖于外界温度。本实验采用脱乙酰度为95%的壳聚糖，脱乙酰度更高，形成凝胶pH值仍为中性，而形成时间更短，室温下以液体方式注入体内，可以在较短时间内形成凝胶，无论是负载药物还是包埋细胞和生长因子，都能较好的将其固定于原位，是较为理想的可注射支架材料。

目前温敏性壳聚糖在组织工程方面研究较多的是温敏性壳聚糖复合软骨细胞进行培养，Ruel-Gariepy等[8]为进一步证实壳聚糖/甘油磷酸钠的细胞相容性及其对细胞的毒副反应，将一些细胞系和新鲜软骨细胞(牛和人)包埋其中并进行体外培养，结果显示80%细胞成活；将包埋有软骨细胞的壳聚糖/甘油磷酸钠经皮下注入

小鼠体内，3周后可见软骨细胞，Ⅱ型胶原免疫组化检测阳性。Hoemann等[9-11]报道将原代的牛软骨细胞载入壳聚糖/甘油磷酸钠，在体内、体外均可增生扩散；体外培养3周后可见功能性的基质沉积；注入骨缺损区后可见骨和软骨形成；将自体血混合壳聚糖/甘油磷酸钠后移植于兔、羊和马的软骨缺损区，显示骨髓基质细胞趋化作用提高、修复区血供增加，并且无局部和全身毒副反应。王东武等[12]利用关节软骨细胞复合壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶，软骨细胞在壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶中可存活并保持分泌软骨基质功能，形成类软骨组织。Crompton等[13]将胎鼠的大脑皮质细胞分别在壳聚糖/甘油磷酸钠膜及壳聚糖/甘油磷酸钠水凝胶内进行二维、三维培养，观察神经元数量及突起生长情况，结果发现三维培养更适合神经元及轴突生长。本实验将温敏性壳聚糖水凝胶复合成骨细胞制成直径约0.8 cm凝胶，模拟人工骨，放入培养皿中加入培养液培养，大体观察可见壳聚糖/甘油磷酸钠与细胞复合物形态良好，显微镜下观察凝胶内细胞成活情况，可见12~24 h内成骨细胞呈圆形，均匀分布在凝胶中；24~48 h后，成骨细胞开始伸出触角，并开始扩增，部分细胞仍呈圆形；48 h后，绝大多数细胞伸出触角，伸展良好，形态较多样，扩增明显。连续观察2周，可见细胞存活良好，在凝胶中呈分层生长。实验同时用温敏性壳聚糖制备出20倍、10倍、5倍、2.5倍的标准浓度的4种浸提液，用于培养成骨细胞，检测出温敏性壳聚糖对细胞毒性作用，在24，48，72，96 h各个不同的时间点检测，无论是高浓度的浸提液还是低浓度的浸提液，其对成骨细胞毒性均为0级或1级。阴性对照组和浸提液各组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)，不同浓度的浸提液各组之间差异无显著性意义($P > 0.05$)，阳性组吸光度值与浸提液各浓度组及阴性组之间差异有显著性意义($P < 0.05$)，结合镜下观察温敏性壳聚糖中成骨细胞生长增殖情况、细胞相对增殖度及毒性评级，可以得出：温敏性壳聚糖水凝胶对SD大鼠成骨细胞无毒性，二者相容性好。实验利用温敏性壳聚糖水凝胶复合成骨细胞，构建出了人工骨组织，发现成骨细胞在壳聚糖/甘油磷酸钠凝胶中能良好生长、增殖，且温敏性壳聚糖水凝胶对细胞未见明显毒性，说明温敏型水凝胶壳聚糖/甘油磷酸钠是成骨细胞的良好载体。

壳聚糖是一种天然的碱性阳离子多糖，生物毒性小，具有良好的组织相容性、生物可降解性和黏附性，在医学、生物学领域得到了深入的研究和广泛的应用，通过温度改变，使溶液原位发生凝胶化转变，形成可注射型温敏性的水凝胶，细胞包埋其中能长期生长并扩增，并具备相应功能。温敏性壳聚糖研究适应了微创伤外科技术发展的要求，具有微创伤修复组织缺损或畸形、组织损伤小、不破坏修复区血供、操作简便易行等优点，是一种理想的医用植入材料[14-16]。至于将温敏性壳聚糖水凝胶细胞复合物注射到骨不连接处能否满意填补缺损，能否保持细胞存活并具有一定功能，有待进一步实验来证实。

4 参考文献

[1] Wang Q,Zhong SZ,Gong WH,et al.Zhonghua Guke Zazhi. 1995; 15(6):364-366.
王前,钟世镇,龚文汇,等. 鼠颅盖骨成骨细胞体外培养及ALP免疫组化法鉴别纯化[J].中华骨科杂志,1995,15(6):364-366.
[2] Xue QS.Beijing:Science Press. 2001:485-488.
薛庆善.体外培养的原理与技术[M].北京:科学出版社,2001:485-488.
[3] Berger J, Reist M, Mayer JM,et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications.Eur J Pharm Biopharm. 2004;57(1): 35-52.
[4] Berger J, Reist M, Mayer JM,et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.Eur J Pharm Biopharm. 2004;57(1): 19-34.
[5] Chenite A, Chaput C, Wang D,et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ.Biomaterials. 2000;21(21):2155-2161.
[6] Zhang SQ,Meng XM,Hu YL,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(10):1876-1878.
张素琴,孟祥茂,胡艳冬,等. 大鼠骨髓基质细胞在温敏型壳聚糖水凝胶中的生长[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(10): 1876-1878.
[7] Wu GS,Zhang YW,Wang XW,et al.Shanghai Kouqiang Yixue. 2009;18(2):178-182.
吴广升,张艺文,王新文,等. 壳聚糖温敏凝胶负载釉基质蛋白对骨髓基质细胞的作用[J]. 上海口腔医学,2009,18(2):178-182.
[8] Ruel-Gariépy E, Chenite A, Chaput C,et al. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs.Int J Pharm. 2000;203(1-2):89-98.
[9] Hoemann CD, Sun J, Chrzanowski V,et al. A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage.Anal Biochem. 2002;300(1):1-10.
[10] Tran-Khanh N, Hoemann CD, McKee MD,et al. Aged bovine chondrocytes display a diminished capacity to produce a collagen-rich, mechanically functional cartilage extracellular matrix.J Orthop Res. 2005;23(6):1354-1362.
[11] Hoemann CD, Sun J, Légaré A,et al. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle.Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(4):318-329.
[12] Wang DW,Yang L,Duan XJ.Disan Junyi Daxue Xuebao. 2006; 28(11):1145-1147.
王东武,杨柳,段小军.体外构建可注射性组织工程软骨的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(11):1145-1147.
[13] Crompton KE, Goud JD, Bellamkonda RV,et al. Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering.Biomaterials. 2007;28(3):441-449.
[14] Jeong B, Kim SW, Bae YH.Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels.Adv Drug Deliv Rev. 2002;54(1):37-51.
[15] Grodzinski P, Silver M, Molnar LK.Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges.Expert Rev Mol Diagn. 2006; 6(3):307-318.
[16] Chitkara D, Shikanov A, Kumar N,et al. Biodegradable injectable in situ depot-forming drug delivery systems.Macromol Biosci. 2006;6(12):977-990.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献：实验设计、干预实施、资料收集、成文均由第一作者完成，评估及审校由第二作者完成，第一作者对文章负责。

致谢：实验在福建医科大学附属厦门第一医院中心实验室完成，期间得到冯进益师兄、厦门大学材料系冯祖德教授及谢容泉老师宝贵指导，在此表示衷心感谢。

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。

伦理批准：实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。