

仿生支架材料骨形态发生蛋白7多肽/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原的制备及其细胞相容性☆

鄢波¹, 胡冬煦², 张阳德², 武宇赤¹

Preparation of bone morphogenetic protein-7 peptide/chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic composite and its cytocompatibility

Feng Bo¹, Hu Dong-xu², Zhang Yang-de², Wu Yu-chi¹

¹Institute of Biomedical Engineering, Central South University, Orthopaedics Department of the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Changsha 410008, Hunan Province, China

Feng Bo ☆, Studying for doctorate, Chief physician, Institute of Biomedical Engineering, Central South University, Orthopaedics Department of the Third Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
bb0472111@yahoo.com.cn

Correspondence to: Zhang Yang-de, Doctoral supervisor, Chief physician, Professor, National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health, Changsha 410008, Hunan Province, China
zyd@2118.cn

Received: 2010-11-20
Accepted: 2010-12-25

Abstract

BACKGROUND: The commonly used scaffold materials in bone tissue engineering are inorganic materials, organic polymer materials and natural derived materials, these materials have their advantages and disadvantages. In order to give full play to the advantages of various materials and make up for its shortcomings, composite materials are currently applied for the preparation of composite scaffold.

OBJECTIVE: To prepare bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) peptide/chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic scaffold, and to explore the effect of it on the adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs).

METHODS: The chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen composite scaffold was prepared, and the microcosmic appearance of the composite was observed by scanning electron microscope. The BMP-7 peptide was introduced into the composite by vacuum adsorption. The *in vitro* release of BMP-7 peptide from the scaffold was detected by using high performance liquid chromatography. The BMSCs were seeded onto the composite scaffold loaded BMP-7 peptide and the unloaded composites served as controls. The BMSCs proliferation, adhesion, growth morphology and alkaline phosphatase activities on the scaffold surface were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: The scaffold of chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen composite was porous at the pore size of 10–100 μm. The releasing character of BMP-7 peptide belonged to slow release. There was no significant difference on the proliferation of the BMSCs between the experimental group and the control group ($P > 0.05$), but the abilities of adhesion and osteogenic differentiation of the BMSCs in the experimental group were significantly greater than those in the control group ($P < 0.05$). BMP-7 peptide/chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic composite scaffold is a kind of ideal scaffold materials for bone tissue engineering and has good biocompatibility.

Feng B, Hu DX, Zhang YD, Wu YC. Preparation of bone morphogenetic protein-7 peptide/chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic composite and its cytocompatibility. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011; 15(8):1392-1396. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前骨组织工程常用的支架材料主要有无机材料、有机高分子材料及天然衍生材料等, 上述材料各有优缺点, 为了充分发挥各类材料的优势, 弥补其不足, 目前多采用联合材料制备复合支架。

目的: 制备新型仿生支架材料骨形态发生蛋白7多肽/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原, 并观察其对骨髓间充质干细胞增殖、黏附及分化的影响。

方法: 制备壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合支架材料, 扫描电镜观察支架材料表面微观形貌; 采用真空吸附法将骨形态发生蛋白7多肽与支架材料复合, 高效液相色谱仪检测骨形态发生蛋白7多肽在体外的释放规律; 将骨髓间充质干细胞接种到复合骨形态发生蛋白7多肽的仿生支架材料上, 以未复合多肽的支架材料作为对照, 检测支架材料表面细胞增殖、黏附率、生长形态及碱性磷酸酶活性。

结果与结论: 壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原支架材料呈多孔状, 孔径10~100 μm; 骨形态发生蛋白7多肽可以从支架材料中缓慢释出; 在复合多肽的仿生支架材料表面, 骨髓间充质干细胞的黏附及向成骨细胞方向分化能力均明显强于对照组($P < 0.05$), 而增殖能力与对照组差异无显著性意义($P > 0.05$)。说明新型仿生支架材料骨形态发生蛋白7多肽/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原是一种理想的骨组织工程支架材料, 具有良好的细胞相容性。

关键词: 支架材料; 骨形态发生蛋白7多肽; 壳聚糖; 胶原; 纳米羟基磷灰石; 骨组织工程; 细胞相容性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.014

鄢波, 胡冬煦, 张阳德, 武宇赤. 仿生支架材料骨形态发生蛋白7多肽/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原的制备及其细胞相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1392-1396. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨组织工程学研究的核心内容包括支架材料的构建、种子细胞的筛选、细胞与支架材料间的相互作用及机制等几个方面^[1-3]。其中支架

材料的构建是目前研究的热点, 新型骨组织工程支架材料不仅仅以组织替代为目的, 而且能够促进组织再生, 具有良好的生物活性特别是骨诱导性, 因此如何研制出具有特定结构和骨诱导活性的仿生骨组织工程材料是亟待解决的关键问题之一^[4-5]。

目前骨组织工程常用的支架材料主要分为以下几类: ①无机材料: 包括羟基磷灰石、磷酸三钙、生物活性玻璃等, 这类材料具有良好的生物相容性、骨传导性和较好的力学性能, 但是这类材料在体内不能完全降解, 质脆, 易断裂^[6-8]。②有机高分子材料: 主要包括聚乳酸、聚乙酸、聚乙酸-聚乳酸共聚物、聚酸酐和聚己内酯等, 这类材料原料来源丰富、具有良好的可加工性、可塑性及可构建高孔隙率三维多孔支架等优点, 其缺点是机械强度低, 降解速率无法与新骨形成速率匹配, 降解产物易引起无菌性炎症^[9-12]。③天然衍生材料: 包括胶原、藻酸盐、纤维蛋白支架、煅烧骨、脱钙骨基质等, 其优点是生物相容性好, 具有天然多孔结构, 缺点是一致性及可修饰性较差^[12-14]。上述材料各有优缺点, 为了充分发挥各类材料的优势, 弥补其不足, 目前多采用联合材料制备复合支架的方法^[15-18]。本实验依据仿生原理, 制备壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料, 此材料是一种具有良好骨传导性的骨组织工程支架材料, 为了进一步改善其骨诱导性, 本实验根据骨形态发生蛋白7的序列特征、晶体结构和其与受体结合机制, 设计合成含13个氨基酸的新型骨形态发生蛋白7多肽(peptide from bone morphogenetic protein 7, pBMP-7), 将其与壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原材料复合, 构建新型仿生支架材料pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原, 并探索其对骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖、黏附及分化的影响。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察实验。

时间及地点: 于2010-08/11在中南大学卫生部肝胆肠外科中心实验室完成。

材料:

主要试剂:

主要试剂	来源
Ficoll-Paque 分离液	TDK 生物公司
PBS、低糖 DMEM 培养基、胎牛血清	Gibco 公司
胰酶	Sigma 公司
纳米羟基磷灰石	本实验制备
pBMP-7	上海吉尔公司
壳聚糖	上海国药集团化学试剂有限公司
胶原	武汉亚法公司
碱性磷酸酶定量试剂盒	南京建成生物制品有限公司

实验动物: 30~35 d 龄健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠8只, 清洁级, 雌雄不限, 平均体质量110(100~120) g, 由湘雅医学院动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(湘)2006-0002。

实验方法:

pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料的制备: 取10 g胶原, 溶于200 mL、0.5 mol/L的醋酸溶液中, 均匀搅拌, 使其充分溶解, 在上述胶原溶液中缓慢滴加0.5 mol/L的H₃PO₄溶液和0.5 mol/L的CaCl₂溶液同时滴加适量0.5 mol/L NaOH溶液使溶液pH值为7.4, 将上述体系充分搅拌12 h以上, 将所得沉淀产物冻干后研磨成粉备用。取适量壳聚糖溶于六氟异丙醇有机溶剂中, 配制质量体积比为100 g/L的黏稠溶液, 加入一定含量纳米羟基磷灰石粉末, 超声波分散30 min, 充分搅拌后, 在模具中降温、成型, 然后冻干去除有机溶剂备用。

采用X-650型扫描电子显微镜, 20 kV下对壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料表面的微观形貌进行观察。

无菌条件下将pBMP-7用无菌去离子水溶解, 使其质量浓度为2 g/L, 然后将壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料制成5 mm×5 mm×2 mm立方体, 将每个材料浸泡于0.5 mL多肽溶液中30 min, 在负压下抽吸30 min, 待pBMP-7溶液完全进入材料后, 将其置于-20 °C预冷1h后冻干, 环氧乙烷消毒, -20 °C保存。

pBMP-7的体外释放规律: 取5份复合支架材料, 每份负载pBMP-7 2 mg, 分别浸入2 mL PBS中, 充分混匀, 置入37 °C恒温箱中, 在不同时间点提取释放液, 采用高效液相色谱仪检测其中pBMP-7的含量, 并计算累积释放量, 高效液相色谱仪检测条件为流动相: 乙腈水为40:60, 固定相为CrestPak C18S柱子(4.6 mm×150 mm), 调节流速为1.0 mL/min, 检测波长220 nm。

BMSCs分离培养及鉴定: 参照Kadiyala等^[19]的方法进行BMSCs的分离培养, 将SD大鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 体积分数75%乙醇浸泡消毒20 min, 无菌条件下取出双侧胫骨和股骨, 剪除骨端, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM低糖培养基冲洗骨髓腔, 将冲洗液收集, 用滴管缓慢滴加于Ficoll分离液上层, 离心收集云雾状细胞层, PBS悬浮洗涤3次后, 用含体积分数10%胎牛血清的DMEM低糖培养基吹打成均匀悬液后, 以3×10⁷ L⁻¹细胞数接种至50 mL培养瓶, 置于37 °C、体积分数5%CO₂

¹中南大学生物医学工程研究院, 内蒙古医学院第三附属医院骨科, 包头市, 内蒙古自治区, 包头市, 014010; 2. 卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南省长沙市 410008

鄧波, 男, 1970年生, 内蒙古包头市人, 汉族, 中南大学生物医学工程研究院在读博士, 主任医师, 主要从事生物医用材料的研究。bb0472111@yahoo.com.cn

通讯作者: 张阳德, 博士生导师, 主任医师, 教授, 中南大学生物医学工程研究院, 卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南省长沙市 410008 zyd@2118.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)08-01392-05

收稿日期: 2010-11-20
修回日期: 2010-12-25
(20101120011/GW
·Y)

及饱和湿度孵育箱中, 3 d后首次换液, 以后每两三天换液, 当细胞生长融合达70%~80%时, 用0.25%的胰酶消化, 以1:3的比例传代培养。并进行CD90和CD34、表面标志物检测。

BMSCs与pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料的复合培养: 取生长良好的第3代BMSCs, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种到置于24孔板的pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原材料上, 每孔1 mL。常规培养72 h后将材料取出, PBS缓冲液漂洗3次后将材料用2.5%的戊二醛固定, 体积分数30%~100%的梯度乙醇脱水, 真空干燥, 表面喷金处理后在扫描电镜下进行观察。

BMSCs黏附率的检测: 在24孔培养板内置入复合pBMP-7的支架材料12片作为实验组, 以12片未复合多肽的支架材料作为对照组。将细胞浓度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液0.1 mL滴加到两组材料上。置于培养箱中常规培养, 于4, 12 h后在实验组和对照组中各取出6片材料, PBS缓冲液冲洗3次, 去除未黏附细胞。用0.25%的胰蛋白酶进行消化收集细胞并计数, 计算细胞黏附率。

$$\text{细胞黏附率} = \frac{\text{黏附细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

BMSCs增殖检测: 取生长良好的第3代BMSCs, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种到置于24孔板的复合pBMP-7的支架材料上作为实验组, 每孔1 mL, 以未复合多肽的支架材料作为对照。接种后2, 4, 6, 8, 10 d对实验组和对照组细胞进行MTT检测, 每组5个复孔。每孔加入MTT(5 g/L)0.1 mL, 37 °C继续孵育4 h。弃上清液, 每孔加入二甲亚砜1 mL, 振荡10 min, 紫外分光光度计上(选择波长为570 nm)读取吸光度值, 记录结果, 绘制生长曲线。

BMSCs分化检测: 取18片复合pBMP-7的支架材料作为实验组, 未复合pBMP-7的材料作为对照组, 分别置于24孔培养板中。取第3代BMSCs, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种在支架材料表面, 分别在复合培养第7, 14, 21天各取出6片材料, PBS冲洗3次, 用胰酶消化并收集细胞, 加细胞裂解液破膜, 按试剂盒说明检测各组细胞碱性磷酸酶活性。

主要观察指标: 支架材料表面细胞增殖、黏附率、生长形态及碱性磷酸酶活性。

统计学分析: 采用SPSS 11.5统计学软件对数据进行分析和处理, 所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间的比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料的微观形貌 电镜观察结果见图1所示, 可见该复合材

料是一种疏松多孔结构, 孔径为10~100 μm不等。

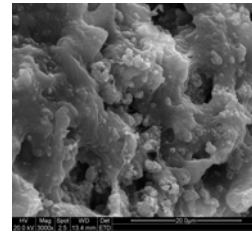


Figure 1 The microcosmic appearance of the chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen composite ($\times 3000$)

图1 壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料的微观形貌 ($\times 3000$)

2.2 pBMP-7多肽的体外释放规律 见图2。

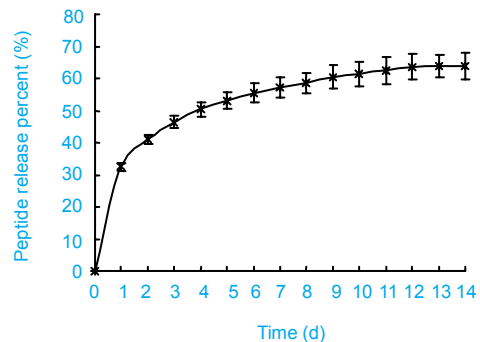


Figure 2 The release curve of bone morphogenetic protein-7 peptide at different time points

图2 不同时间点骨形态发生蛋白7多肽释放情况

第1天时pBMP-7释放量占总量的(32.5±1.22)%, 呈爆发性释放, 以后呈缓慢持续释放, 至14 d累积释放量占总量的(64.02 ± 4.21)%。

2.3 BMSCs在材料表面的形态观察 BMSCs分别与pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料和未复合多肽的壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料培养7 d后, 用扫描电镜观察细胞生长情况, 结果见图3, 4。

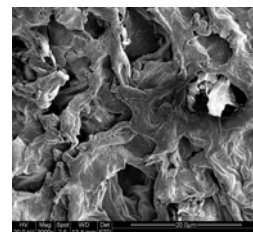


Figure 3 Scanning electron microscopic picture of bone marrow stromal cells cultured with bone morphogenetic protein-7 peptide/chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic composite for 7 d ($\times 3000$)

图3 骨髓间充质干细胞与骨形态发生蛋白7多肽/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料培养7 d后的扫描电镜图片($\times 3000$)

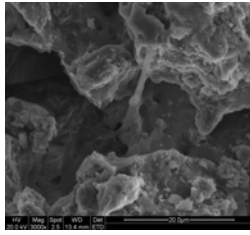


Figure 4 Scanning electron microscopic picture of bone marrow stromal cells cultured with chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen biomimetic composite for 7 d ($\times 3\ 000$)

图4 骨髓间充质干细胞与未复合多肽的壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料培养7d后的扫描电镜图片($\times 3\ 000$)

可见在复合多肽的材料表面有大量细胞呈梭形,有大量突起,并相互连接成片,在未复合多肽的材料表面只有少量细胞,且细胞突起很少,这表明BMSCs在复合了多肽的材料表面生长良好。

2.4 BMSCs在支架材料表面的增殖情况 见图5。

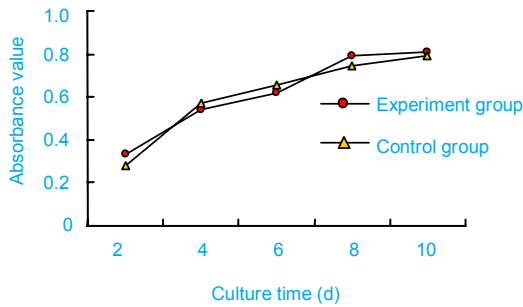


Figure 5 The growth curve of bone marrow stromal cells cultured on the composite scaffold

图5 骨髓间充质干细胞在支架材料表面的生长曲线

在复合培养期间,两组材料对BMSCs的增殖无明显影响($P > 0.05$)。

2.5 BMSCs在支架材料表面黏附率的检测 见图6。

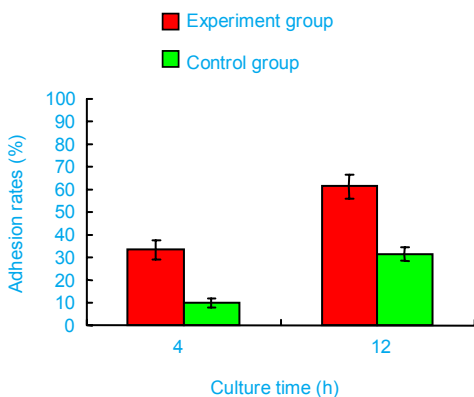


Figure 6 The adhesion rates of bone marrow stromal cells cultured on the composites

图6 骨髓间充质干细胞在支架材料表面的黏附率

培养4 h时实验组黏附率为(33.32 \pm 4.32)%,对照组

黏附率为(10.05 \pm 2.19)%,两组间差异有非常显著性意义($P < 0.01$); 12 h时实验组黏附率为(61.26 \pm 5.47)%,对照组黏附率为(31.54 \pm 3.01)%,两组间差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

2.6 BMSCs在材料表面的分化情况 见表1。

表1 不同时间点实验组与对照组细胞碱性磷酸酶活性
Table 1 The alkaline phosphatase activity of the experimental group and the control group at different time points ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ nkat/L}$)

Group	7 d	14 d	21 d
Experimental	205.54 \pm 36.67	546.11 \pm 88.68	631.13 \pm 106.52
Control	39.84 \pm 12.17	69.18 \pm 25.67	134.19 \pm 36.01
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01

由表1可见。各个时间点实验组碱性磷酸酶活性明显高于对照组($P < 0.01$),表明实验组材料具有诱导成骨能力。

3 讨论

目前骨组织工程常用的支架材料主要分为:无机材料、有机高分子材料及天然衍生材料等。上述各类材料各有优缺点,为了充分发挥各类材料的优势,弥补其不足,目前多采用联合材料制备复合支架的方法,本实验就是根据这一思路,将壳聚糖、羟基磷灰石及胶原复合,充分发挥3种材料的优势,制备出壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料,此材料是一种新型仿生无机相/有机相复合骨组织工程支架材料,其中纳米羟基磷灰石晶体在形态、尺寸、组成、结构和结晶度上与人骨的羟基磷灰石晶体高度类似;材料中含有的壳聚糖和胶原,生物相容性好,且有利于生成类骨质进而矿化,扫描电镜结果表明该复合材料是一种疏松多孔结构,孔径为10~100 μm 不等,与天然骨组织疏松多孔结构相似。

天然骨组织中含有骨诱导活性物质,能够诱导骨组织生长,因此为了赋予壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料骨诱导性,进一步达到仿生的目的,本实验设计合成含13个氨基酸的pBMP-7,将其与壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原材料复合,构建新型仿生支架材料pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原。pBMP-7是一种新型的多肽活性分子,具有与骨形态发生蛋白7类似的生物活性,同时还具有分子量小,空间结构简单呈螺旋状,活性位点易于暴露,易于与支架材料复合,易于大规模制备,成本低廉等优点。一般认为支架材料复合生物活性因子后,只有生物活性因子从材料中缓慢释放,才能最大限度的发挥其生物学作用^[20]。本实验检测了pBMP-7在材料中的释放规律,结果表明,pBMP-7在第1天时呈爆发释放,之后呈缓慢持续释放,基本达到了缓释的要求,其中前

期的爆发释放是真空吸附方式复合生物活性因子的共有特点, 主要是由于附着在支架材料表面的活性因子, 在溶液中迅速溶解扩散而引起的^[21], 后期的缓慢释放机制可能为: pBMP-7的等电点偏酸性, 可以与材料中的纳米羟基磷灰石晶体结合, 随着材料的降解而缓慢释出。

骨组织工程支架材料作为人工细胞外基质, 要为细胞的黏附、生长、分化, 以及进行新陈代谢, 形成新组织提供支持, 因此要具备良好的细胞相容性。本实验将 pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原与BMSCs复合培养, 观察其对BMSCs增殖、黏附及分化的影响, 从而评价其细胞相容性。细胞与材料的黏附细胞迁移、增殖和分化的基础, 材料表面的亲疏水性、表面荷电特性及活性基团等都对材料的黏附性有较大的影响。在实验中作者发现复合pBMP-7的支架材料与单纯支架材料相比可以显著促进BMSCs的黏附, 这是因为复合pBMP-7支架材料表面带正电荷, 有利于细胞膜带负电荷的BMSCs黏附, 同时行扫描电镜观察发现, 细胞在复合pBMP-7的支架材料表面铺展良好, 呈梭形或多角形, 这表明pBMP-7能够明显改善支架材料的黏附性。在细胞增殖实验中, 作者发现细胞在两组材料表面的生长曲线相似, 无差异, 这说明复合pBMP-7的支架材料与单纯支架材料相对BMSCs的生长增殖无影响。在细胞分化实验中, 作者发现将BMSCs与两组材料复合培养7, 14, 21 d后, 复合了pBMP-7的支架材料表面细胞的碱性磷酸酶活性明显高于单纯支架材料组。碱性磷酸酶是具有成骨潜能的细胞标志酶之一, 可间接反映细胞的成骨活性^[22], 因此本实验结果表明复合了pBMP-7的支架材料具有良好的骨诱导性, 能够促进其表面的BMSCs分化为成骨细胞。

综上所述, pBMP-7/壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料作为一种新型仿生复合骨组织工程支架材料具有良好的细胞相容性, 能够促进细胞在其表面增殖、黏附及分化, 是一种很有前景的骨组织工程支架材料。

4 参考文献

[1] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-2543.
 [2] Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*. 2007;38 Suppl 1:S33-37.
 [3] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002;295(5557):1014-1017.
 [4] Oakes BW. Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to clinic. *Med J Aust*. 2004;180(5 Suppl): S35-38.
 [5] Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(1):1-7.
 [6] Duan YR, Zhang ZR, Wang CY, et al. Dynamic study of calcium phosphate formation on porous HA/TCP ceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(11):1205-1211.

[7] Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs*. 2005;8(3):131-136.
 [8] Kim SS, Ahn KM, Park MS, et al. A poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(1):206-215.
 [9] Zhao M, Zheng Q, Wang J, et al. The construction and investigation of PLGA artificial bone by biomimetic mineralization. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2005;25(6):687-689.
 [10] Coombes AG, Meikle MC. Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft. *Clin Mater*. 1994;17(1):35-67.
 [11] Ngiam M, Liao S, Patil AJ, et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*. 2009;45(1):4-16.
 [12] Li X, Feng Q, Liu X, et al. Collagen-based implants reinforced by chitin fibres in a goat shank bone defect model. *Biomaterials*. 2006;27(9):1917-1923.
 [13] Yokoyama A, Gelinsky M, Kawasaki T, et al. Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen—an animal study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;75(2):464-472.
 [14] Jung UW, Song KY, Kim CS, et al. Effects of a chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in a rat calvarial defect. *Biomed Mater*. 2007;2(3):S101-105.
 [15] Clarke KL, Graves SE, Wong AT, et al. Investigation into the formation and mechanical properties of a bioactive material based on collagen and calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med*. 1993;4:107-110.
 [16] McManus AJ, Doremus RH, Siegel RW, et al. Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites. *J Biomed Mater Res A*. 2005;72(1):98-106.
 [17] Miao X, Tan LP, Tan LS, et al. Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA-bioactive glass. *Mater Sci Eng C*. 2007;27(2):274.
 [18] Liao S, Wang W, Uo M, et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials*. 2005;26(36):7564-7571.
 [19] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997;6(2):125-134.
 [20] Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):339-359.
 [21] Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop*. 1999;(367 Suppl):95-106.
 [22] Atmani H, Audrain C, Mercier L, et al. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. 2002;85(3):640-650.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 第三作者进行实验设计, 实验实施为第一、四作者, 实验评估为第一、二作者, 资料收集及成文为第一作者, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

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: 实验过程中对实验动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 以“骨形态发生蛋白 7, 骨髓间充质干细胞, 支架材料, 生物相容性”为关键词检索中文科技期刊数据库、中国期刊全文数据库、数字化期刊全文数据库及中国生物医学文献数据库 2001-11/2010-11 文章。课题创新性地壳聚糖、羟基磷灰石及胶原复合, 充分发挥 3 种材料的优势, 制备出壳聚糖/纳米羟基磷灰石/胶原复合材料, 并将其与骨形态发生蛋白 7 多肽复合, 更进一步增加其诱导成骨的能力。