

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.21.009

[http://www.crter.org]

黄凯, 陈雄生, 贾连顺, 朱巍, 房雷. 纳米脱钙骨基质促进骨愈合[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(21):3862-3869.

纳米脱钙骨基质促进骨愈合**☆

黄凯¹, 陈雄生², 贾连顺², 朱巍², 房雷²

1 上海长征医院闸北分院, 上海市 200070

2 上海长征医院, 上海市 200043

文章亮点:

- 1 评价纳米脱钙骨基质作为骨移植替代物的植骨融合能力, 寻找自体骨移植的良好替代物。
- 2 课题采用 MICROS 超细研磨粉碎机制备纳米脱钙骨基质, 进行随机对照动物实验与自体骨对比观察植骨融合能力, 目前未见有相关研究报道。
- 3 实验以改良 Urist 法制备人同种异体脱钙骨基质, 使用液氮冷冻球磨机及 MICROS 超细粉碎机制备纳米脱钙骨基质。此法制备纳米脱钙骨基质颗粒在材料表面自然形成不规则的纳米沟槽, 可促进成骨细胞在其表面黏附生长及分泌基质, 增强成骨诱导活性。
- 4 寻找良好的骨移植替代物的相关研究是临床医学及材料学领域的热点及难点, 本课题旨在证明纳米脱钙骨基质是一种良好的骨移植替代物, 为其进一步为临床推广应用提供理论基础。

关键词:

生物材料; 纳米生物材料; 脱钙骨基质; 自体骨; MICROS 超细粉碎机; 植骨融合; 骨移植替代物; 成骨细胞; 成骨诱导; 省级基金

摘要

背景: 纳米脱钙骨基质具有较大的表面积/体积比, 纳米颗粒团聚后在表面自然形成不规则的纳米沟槽, 可促进成骨细胞在其表面黏附生长及基质分泌。

目的: 评价纳米脱钙骨基质作为骨移植替代物的植骨融合能力。

方法: 以改良 Urist 法制备人同种异体脱钙骨基质, 使用液氮冷冻球磨机及 MICROS 超细粉碎机制备纳米脱钙骨基质。咬除家兔 L₂₋₄ 双侧小关节及双侧椎板和横突表面皮质骨, 随机分为 3 组, 分别在腰椎椎板及横突间植入纳米脱钙骨基质、脱钙骨基质及自体骨, 术后 4, 8, 12 周通过影像学、组织学观察植骨融合效果。

结果与结论: ①X 射线与 CT 表现: 术后 12 周, 纳米脱钙骨基质组椎板、附件形态已接近正常节段, 新生骨与椎板间隙完全消失, 新生骨与植骨床骨质密度均匀一致; 脱钙骨基质组植骨区域椎板表面有少量新生骨块影, 在新生骨与椎板表面尚有一定间隙; 自体骨组椎板与植骨融合界面愈合良好, 植骨区有新生骨块影, 融合骨块质地均匀。②组织学表现: 术后 12 周, 纳米脱钙骨基质被新生骨替代, 与椎板间形成骨性连接, 新生骨内可见大量骨细胞, 与自体骨组效果相似; 脱钙骨基质组植骨区达到骨性愈合, 新生骨内可见板层样骨, 也有类骨物质。表明纳米脱钙骨基质具有良好的成骨诱导能力, 是自体骨移植的良好替代物。

黄凯☆, 男, 1979 年生, 上海市人, 汉族, 2011 年解放军第二军医大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事脊柱外科、关节镜方面研究。
13817784210@163.com

通讯作者: 陈雄生, 硕士生导师, 主任医师, 上海长征医院, 上海市 200043
chenxiongsheng@vip.sohu.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)21-03862-08

收稿日期: 2012-11-16
修回日期: 2012-12-04
(20121013005/GW · W)

Nano decalcified bone matrix promotes bone fusion

Huang Kai¹, Chen Xiong-sheng², Jia Lian-shun², Zhu Wei², Fang Lei²

1 Zhabei Branch of Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200070, China

2 Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200043, China

Abstract

BACKGROUND: Nano decalcified bone matrix has a bigger surface area/volume ratio. Irregular nano-cannelure will appear on the surface when nanoparticles are agglomerated, thereby promoting

Huang Kai☆, M.D., Attending physician, Zabei Branch of Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200070, China
13817784210@163.com

Corresponding author: Chen Xiong-sheng, Master's supervisor, Chief physician, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200043, China
chenxiongsheng@vip.sohu.com

Supported by: the Shanghai Science and Technology Committee, No. 054119641*, 0852nm03100*

Received: 2012-11-16
Accepted: 2012-12-04

osteoblasts to grow and excrete matrix on the surface.

OBJECTIVE: To assess the bone graft and fusion of nano decalcified bone matrix as a bone graft substitute.

METHODS: The completely decalcified bone matrix was produced by improved Urist method, and the nano decalcified bone matrix was produced by liquid nitrogen frozen ball mill equipment and MICROS super fine mill. Nano decalcified bone matrix, decalcified bone matrix and autogenous bone were, respectively, implanted into the bilateral lumbar laminae and transverse process of rabbits undergoing removal of cortical bone on the surface of the bilateral lumbar laminae and transverse process. Fusion level at 4, 8 and 12 weeks after operation was observed through iconography and histology.

RESULTS AND CONCLUSION: X-ray and CT manifestations: 12 weeks after operation, the lumbar lamina of nano decalcified bone matrix group gained favorable bony fusion, the lamellar space disappeared completely, and the bone mineral density of new bone and fusion bed was uniformity. There was a small amount of new bone tissues on the implanted region of decalcified bone matrix group, and the new bone did not gain favorable bony fusion. Autologous bone graft gained good bony fusion. Histological results: 12 weeks after operation, show that nano decalcified bone matrix was replaced by new bone, forming a bony connection with the lumbar lamina. A great quantity of osteocytes could be seen in the new bone after nano decalcified bone matrix grafting similar to autologous bone grafting. The groups of decalcified bone matrix and autologous bone also gained bony fusion. In the decalcified bone matrix group, lamellar bone and neoplastic bone were visible in the new bone. Nano decalcified bone matrix possesses a better capacity of osteogenic induction, which is an outstanding substitute for autogenous bone.

Key Words: biomaterials; nanobiomaterials; decalcified bone matrix; autologous bone; MICROS superfine mill; bony fusion; bone graft substitute; osteoblasts; osteogenic induction; provincial grants-supported paper

Huang K, Chen XS, Jia LS, Zhu W, Fang L. Nano decalcified bone matrix promotes bone fusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(21): 3862-3869.

0 引言

植骨融合手术、骨缺损修复所需要的植骨材料来源及选择是骨科医生经常面对的一个难题^[1-2]。自体骨、异体骨和合成骨替代材料3大类是目前常用的骨缺损修复材料^[3-4]。自体髂骨植骨是公认的骨移植金标准,但存在增加患者创伤、延长手术时间、供骨量及供骨尺寸和大小有限、供骨区并发症多等缺陷^[5-6]。异体骨包括同种异体骨和异种骨,其制备和存贮成本高,制备方法未能标准化,可能存在免疫排斥反应或导致细菌及病毒传染缺点。人工合成材料为临床骨缺损治疗提供了另外的途径,但无机合成材料仅具有骨传导性,骨诱导性欠佳,且材料易碎、抗剪切力低、抗骨折性能差^[7-8]。

随着外科技术的发展,临床上对骨移植需求量的增加^[9-10],研究、制备理想的骨移植材料替代自体骨移植用于骨缺损修复成为目前医学和生物材料科学的重要课题^[11-12]。近年来纳米科技及纳米医学的飞速发展,纳米骨移植材料的相关研究已成为研究热点^[13-14]。脱钙骨基质在微结构和成分上与天然骨骼高度相似,在美国市场已经投放15年^[15]。纳米脱钙骨基质具有较大的表面积/体积比,纳米颗粒团聚后在表面自然形成不规则的纳米沟槽,可以促进成骨细胞在其表面黏附生长及基质分泌^[16-17]。实验将纳米脱钙骨基质植于家兔腰椎椎板间,评价其促进骨愈合的能力,证实其具有良好的骨传导及骨诱导性,为其进一步在临床推广应用提供理论基础。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2008年1月至2010年11月在武汉理工大学及解放军第二军医大学完成。

材料:

脱钙骨基质及纳米脱钙骨基质: 采用术中切除废弃的人同种异体骨(除外各类传染性疾病、肿瘤及感染), 以改良Urist法制备: 无水乙醇浸泡2 h; 去乙醇加乙醚浸泡1 h; 蒸馏水反复冲洗去尽乙醚; 0.6 mol/L盐酸浸泡, 浸泡过程中不断搅拌, 每12 h更换盐酸溶液, 浸泡72 h以充分脱钙; 蒸馏水反复冲洗后用蒸馏水浸泡, 充分去除残留的盐酸; 无水乙醇浸泡2 h; 去除乙醇后乙醚浸泡1 h; 通风处干燥制得脱钙骨基质。液氮冷冻球磨粉碎机将制得的脱钙骨基质颗粒进行预粉碎, 再由MICROS湿式超细研磨粉碎机将所得的脱钙骨基质粉末进行研磨粉碎, 研磨结束后将匀浆高速离心, 取得纳米脱钙骨基质标本, 将标本塑形后置于真空冷冻干燥箱进行干燥, 最终制得纳米脱钙骨基质。

实验动物: 成年新西兰家兔, 体质量(2.7±0.3) kg, 雌雄不拘, 由解放军第二军医大学动物实验中心提供。根据植骨材料不同, 将兔随机分为自体骨组、纳米脱钙骨基质组、脱钙骨基质组, 每组12只。

实验方法:

动物骨缺损模型的制作: 将家兔俯卧位固定于兔板上, 氯胺酮50 mg/kg肌肉注射麻醉, 术区剃毛并常规碘伏消毒, 铺无菌单。取腰椎后正中纵行切口, 切开皮肤、皮下组织, 骨膜剥离子沿棘突骨膜下向两侧钝性分离椎旁肌, 显露至椎板和关节突关节。咬骨钳咬除L₂₋₄双侧小关节, 咬除双侧椎板和横突表面皮质骨作为植骨床, 将纳米脱钙骨基质、脱钙骨基质颗粒及自体骨1 g分组植于植骨床表面, 逐层缝合切口。术后肌肉注射160×10⁴ U青霉素并分组分笼饲养, 术后次日起肌肉注射青霉素80×10⁴ U/d, 连续3 d。

影像学观察: 术后4, 8, 12周随机抽取家兔拍摄腰椎正、侧位X射线片及手术节段CT平扫。检查前氯胺酮50 mg/kg麻醉。X射线片及CT扫描由专人拍摄, X射线拍摄条件: 75 kV, 40 mAs, 球管距胶片距离60 cm。CT扫描条件: 120 kV, 350 mAs, 扫描厚度为1.0 mm。

组织学观察: 术后4, 8, 12周各组随机抽取并处死2只兔, 切取植骨区标本, 包括椎板、关节突关节和新形成的骨块制作标本。经固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡和包埋、切片、苏木精-伊红染色制成标本切片。切片标本在Olympus BH-2生物显微镜下观察并摄影记录。

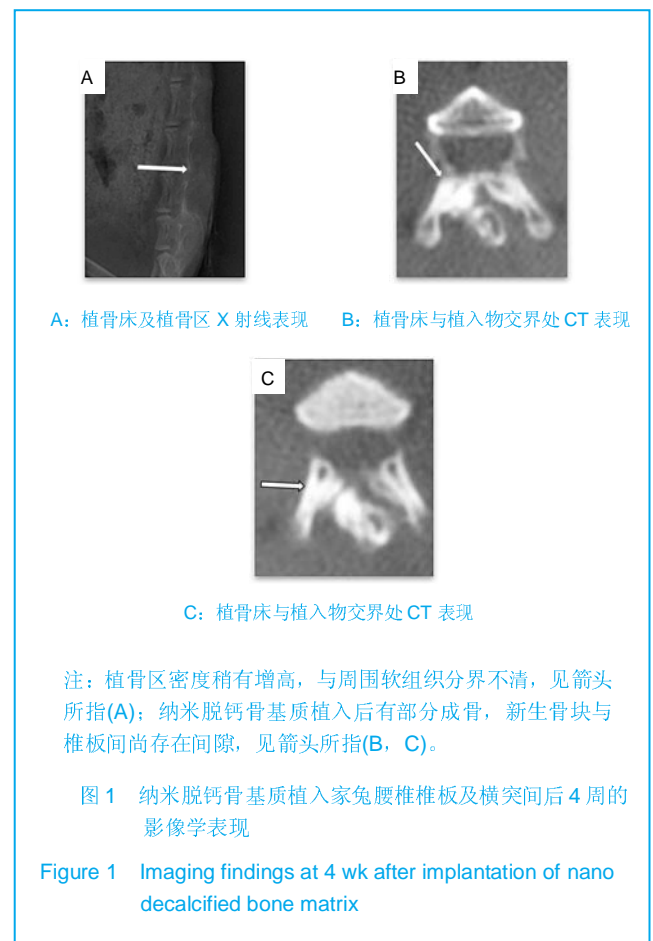
主要观察指标: 术后4, 8, 12周各组X射线及组织学观察结果。

2 结果

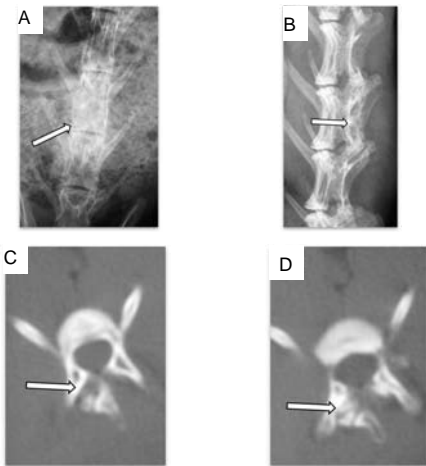
2.1 实验动物数量分析 36只兔均进入结果分析。

2.2 各组术后不同时间点影像学观察结果 纳米脱钙骨基质组、脱钙骨基质组及自体骨各组均取得骨性融合。纳米脱钙骨基质组融合速度、新生骨质质地、密度高均与自体骨组接近; 脱钙骨基质组融合速度、质量均弱于纳米脱钙骨基质及自体骨组。

纳米脱钙骨基质组: 术后4周, X射线片及CT扫描结果见图1。植骨床及植骨区: 植骨区密度稍有增高, 与周围软组织分界不清, 见图1A。植骨床与植入物交界处: 纳米脱钙骨基质植入后有部分成骨, 新生骨块与椎板间尚存在间隙, 见图1B, C。



术后8周, X射线片及CT扫描结果见图2。植骨床及植骨区: 植骨区密度较周围软组织稍有增高, 见图2A, B; 植骨床与植入物交界处: 植骨床与植入材料间间隙仍存在, 见图2C, D。

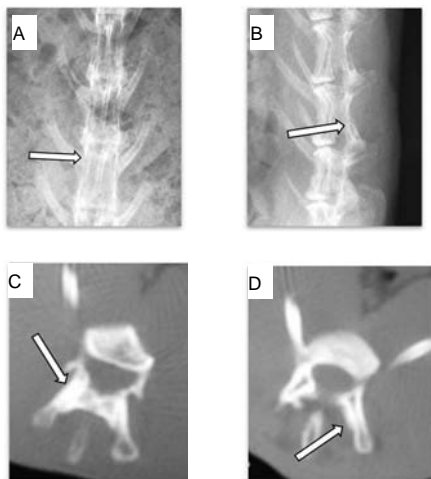


注: A, B: 植骨床及植骨区 X 射线表现: 植骨区密度较周围软组织稍有增高, 见箭头所指; C, D: 植骨床与植入物交界处 CT 表现: 植骨床与植入材料间间隙仍存在, 见箭头所指。

图 2 纳米脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 8 周的影像学表现

Figure 2 Imaging findings at 8 wk after implantation of nano decalcified bone matrix

术后12周, X射线片及CT扫描结果见图3。植骨床及植骨区: 植骨区椎板密度稍增高, 椎体、附件形态已接近正常节段, 见图3A, B; 植骨床与植入物交界处: 植骨床区域骨密度增高, 新生骨与椎板间隙完全消失, 新生骨与植骨床骨质密度均匀一致, 见图3C, D。



注: A, B: 植骨床及植骨区 X 射线表现: 植骨区椎板密度稍增高, 椎体、附件形态已接近正常节段, 见箭头所指; C, D: 植骨床与植入物交界处 CT 表现: 植骨床区域骨密度增高, 新生骨与椎板间隙完全消失, 新生骨与植骨床骨质密度均匀一致, 见箭头所指。

图 3 纳米脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 12 周的影像学表现

Figure 3 Imaging findings at 12 wk after implantation of nano decalcified bone matrix

脱钙骨基质组: 术后4周, X射线片及CT扫描结果见图4。植骨床及植骨区: 植骨区域稍有高密度信号, 未见明显成骨, 见图4A; 植骨床与植入物交界处: 植骨区域椎板表面密度稍增高, 脱钙骨基质颗粒与椎板信号有差异, 见图4B, C。



A: 植骨床及植骨区 X 射线表现: 植骨区域稍有高密度信号, 未见明显成骨, 见箭头所指

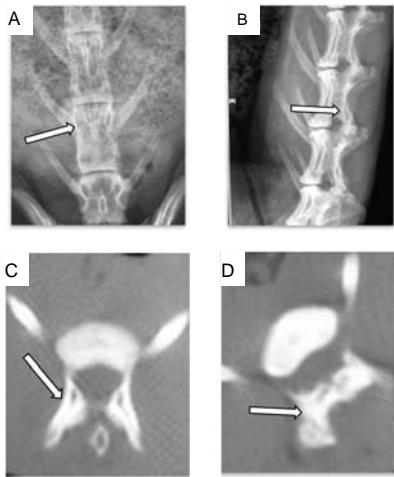
B, C: 植骨床与植入物交界处 CT 表现: 植骨区域椎板表面密度稍增高, 脱钙骨基质颗粒与椎板信号有差异, 见箭头所指

图 4 脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 4 周的影像学表现

Figure 4 Imaging findings at 4 wk after implantation of decalcified bone matrix

术后8周, X射线片及CT扫描结果见图5。植骨床及植骨区: 植骨区域信号较4周时有增强, 见图5A, B; 植骨床与植入物交界处: 植骨区信号较4周时增强, 有一定成骨, 但脱钙骨基质颗粒与椎板间仍存在间隙, 见图5C, D。

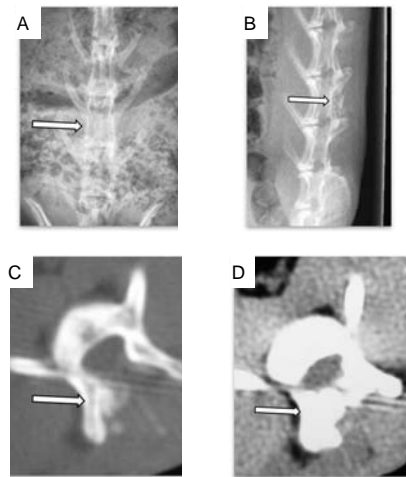
术后12周, X射线片及CT扫描结果见图6。植骨床及植骨区: 植骨区域椎板表面有少量新生骨块影, 见图6A, B; 植骨床与植入物交界处: 脱钙骨基质在椎板表面有一定成骨, 两侧成骨量不均匀, 新生骨与椎板表面尚有一定间隙, 见图6C, D。



A, B: 植骨床及植骨区 X 射线表现: 植骨区域信号较 4 周时有增强, 见箭头所指
 C, D: 植骨床与植入物交界处 CT 表现: 植骨区信号较 4 周时增强, 有一定成骨, 但脱钙骨基质颗粒与椎板间仍存在间隙, 见箭头所指

图 5 脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 8 周的影像学表现

Figure 5 Imaging findings at 8 wk after implantation of decalcified bone matrix



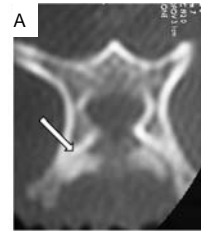
A, B: 植骨床及植骨区 X 射线表现: 植骨区域椎板表面有少量新生骨块影, 见箭头所指
 C, D: 植骨床与植入物交界处 CT 表现: 脱钙骨基质在椎板表面有一定成骨, 两侧成骨量不均匀, 新生骨与椎板表面尚有一定间隙, 见箭头所指

图 6 脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 12 周的影像学表现

Figure 6 Imaging findings at 12 wk after implantation of decalcified bone matrix

自体骨组: 术后4周CT扫描见植骨区高信号影, 植骨

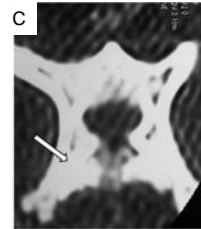
块与椎板有明显间隙, 成骨量少, 尚未融合, 见图7A。X射线可见植骨区高密度影。术后8周, X射线见植骨区密度增高, 见图7B, CT扫描见植骨区有较多成骨, 植骨块与椎板间隙基本消失。术后12周, CT扫描可见椎板与植骨融合界面愈合良好, 见图7C, X射线可见植骨区均有新生骨块影, 融合骨块质地均匀。



A: 术后 4 周 CT 扫描



B: 术后 8 周 X 射线表现



C: 术后 12 周 CT 扫描

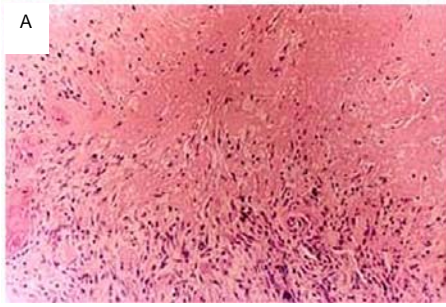
注: 术后 4 周植骨块与椎板有明显间隙, 成骨量少, 尚未融合, 见箭头所指; 术后 8 周植骨区密度增高, 见箭头所指; 术后 12 周椎板与植骨融合界面愈合良好, 见箭头所指。

图 7 自体骨植入家兔腰椎椎板及横突间后 4, 8, 12 周的影像学表现

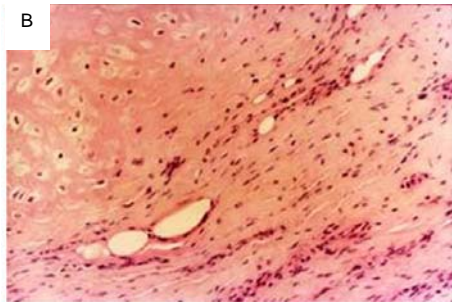
Figure 7 Imaging findings at 4, 8, 12 wk after autologous bone implantation

2.3 各组组织学观察结果

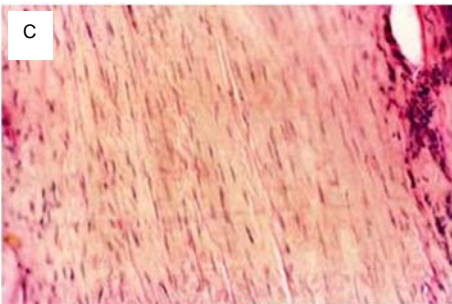
纳米脱钙骨基质组: 术后4周, 可见新生骨和纤维骨痂形成于椎板与纳米脱钙骨基质交界部, 纳米脱钙骨基质表面可见成骨细胞; 术后8周, 植骨区可见成骨细胞、混合骨痂, 部分纳米脱钙骨基质被吸收; 术后12周, 纳米脱钙骨基质被新生骨替代, 与椎板间形成骨性连接, 新生骨内可见大量骨细胞, 见图8。



A: 4 周



B: 8 周



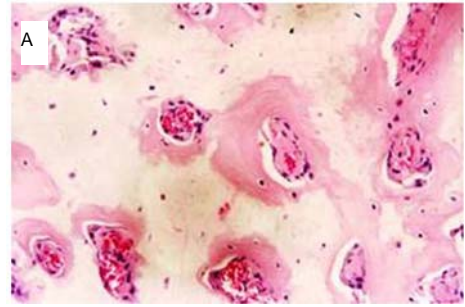
C: 12 周

注: 术后 4 周, 可见新生骨和纤维骨痂形成于椎板与纳米脱钙骨基质交界部, 纳米脱钙骨基质表面可见成骨细胞; 术后 8 周, 植骨区可见成骨细胞、混合骨痂, 部分纳米脱钙骨基质被吸收; 术后 12 周, 纳米脱钙骨基质被新生骨替代, 与椎板间形成骨性连接, 新生骨内可见大量骨细胞。

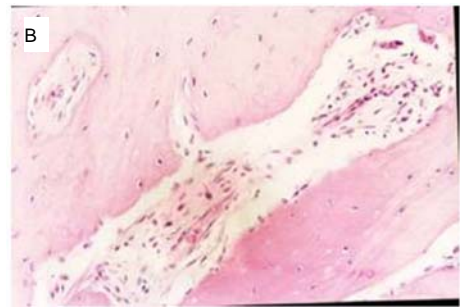
图 8 纳米脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 4, 8, 12 周的组织学观察结果(苏木精-伊红染色, ×10)

Figure 8 Histological observation at 4, 8, 12 wk after implantation of nano decalcified bone matrix (Hematoxylin-eosin staining, ×10)

脱钙骨基质组: 术后4周, 新生骨及纤维骨痂形成于植骨交界部, 脱钙骨基质内可见纤维骨痂及纤维结缔组织, 新生骨内可见成骨细胞及软骨细胞; 术后8周, 植骨区可见少量成骨细胞及不均匀成骨; 术后12周, 植骨区达到骨性愈合, 新生骨内可见质地均匀、排列较整齐的板层样骨, 也有类骨物质, 中间可见血管形成, 见图 9。



A: 4 周



B: 8 周



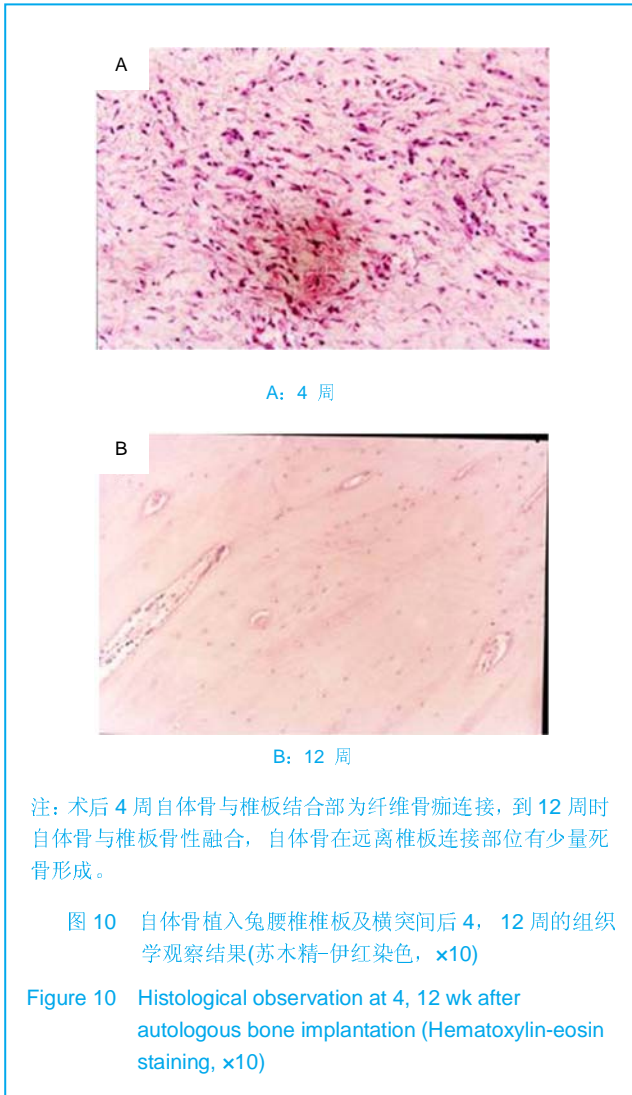
C: 12 周

注: 术后 4 周, 新生骨及纤维骨痂形成于植骨交界部, 脱钙骨基质内可见纤维骨痂及纤维结缔组织, 新生骨内可见成骨细胞及软骨细胞; 术后 8 周, 植骨区可见少量成骨细胞及不均匀成骨; 术后 12 周, 植骨区达到骨性愈合, 新生骨内可见质地均匀、排列较整齐的板层样骨, 也有类骨物质, 中间可见血管形成。

图 9 脱钙骨基质植入家兔腰椎椎板及横突间后 4, 8, 12 周的组织学观察结果(苏木精-伊红染色, ×10)

Figure 9 Histological observation at 4, 8, 12 wk after implantation of decalcified bone matrix (Hematoxylin-eosin staining, ×10)

自体骨组: 术后4周时自体骨与椎板结合部为纤维骨痂连接, 术后8周时纤维骨痂部分成骨, 到12周时自体骨与椎板骨性融合。自体骨在远离椎板连接部位有少量死骨形成, 图10。



3 讨论

近10年来, 骨移植和骨移植替代物的研究一直是骨科领域的热点之一, 而自体骨, 尤其是自体髂骨移植仍是当今植骨的金标准^[18]。目前脊柱外科手术中最常用的仍是自体髂骨移植, 虽然保证了植骨融合的效果, 却不可避免的延长了手术时间、给患者造成额外的创伤及供骨区并发症等。异体(异种)骨、脱钙骨基质及合成骨移植材料等多种骨移植替代物已在临床使用^[19-20], 但是这些替代物没有一种同时具备成骨性、骨传导性和骨诱导能力, 同时在生物力学、生物安全性上也存在一定缺陷, 无法很好的满足临床需求^[21-22]。

近年来, 纳米技术已成为材料学领域引人注目的研究热点^[23-24]。纳米技术在很多边缘学科领域的研究已经取得了突破性的进展, 并且不断向医学领域渗透^[25-26], 但纳米技术很少被应用到骨科领域。目前骨科领域研究

的比较好的有纳米银离子的杀菌抑菌作用, 仿生骨仿生关节的研究应用等。

研究表明, 由于受纳米颗粒产生的介电限域效应和量子尺寸效应等特性的影响, 纳米材料往往具有不同于块体材料的原子或分子介观性质。纳米颗粒组成的材料具有很大的界面, 界面表面原子在外力变形条件下很容易迁移^[27], 因此条块状纳米脱钙骨基质具有一定的延展性及韧性; 另外, 纳米脱钙骨基质颗粒在材料表面自然形成不规则的纳米沟槽, 可促进成骨细胞在其表面黏附生长及分泌基质, 增强成骨诱导活性。所以纳米脱钙骨基质在生物力学上更适用于脊柱各部位的植骨融合, 同时也是良好的骨组织工程支架^[28]。

虽然全球对于纳米材料、纳米技术在生物医学的应用有了广泛的研究, 但目前大部分研究仍处于体外实验或动物实验阶段^[29-30]; 在大量临床应用前纳米材料及技术还需经过大量人体试验。另外, 由于纳米材料的特殊性质可能存在一定的毒副作用, 其安全性研究亦有待于进一步深入, 以便在技术成熟并形成产业前评估其对人体及环境的影响。

实验通过与异种脱钙骨基质颗粒移植及自体骨移植的影像学及组织学比较, 结果表明纳米脱钙骨基质在实验中表现出较强的成骨诱导能力, 在家兔体内成骨速度快, 成骨量多, 骨缺损愈合良好, 是良好的骨移植替代物。

致谢:衷心感谢武汉理工大学材料与新技术国家重点实验室王玉成教授、解放军第二军医大学动物实验中心及免疫学教研室在实验过程中给予的帮助和支持。

基金资助:上海市科委基金资助项目(054119641, 0852nm03100)。

作者贡献:第一、二作者进行实验设计, 实验实施为全部作者, 实验评估为第二、三作者, 资料收集为第一、四、五作者, 第一作者成文, 第二、三作者审核, 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。

伦理要求:实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明:文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他

人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon*. 2012; 10(4): 230-239.
- [2] Bhatt RA, Rozental TD. Bone Graft Substitutes. *Hand Clin*. 2012; 28(4): 457-468.
- [3] Enrique Guerado, Carl Hans Fuerstenberg. What bone graft substitutes should we use in post-traumatic spinal fusion? *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S64-S71.
- [4] Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, et al. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. *Injury*. 2010; 41(7): 731-738.
- [5] Nenad I, Petar N, Zorica A, et al. Biphasic calcium phosphate coated with poly d, l lactide co glycolide biomaterial as a bone substitute. *Eur Ceram Soc*. 2007; 27: 1589-1594.
- [6] De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2007; 89(3): 649-658.
- [7] Hsu W, Fuchs D. A Meta-Analysis of Fusion Rates from Bone Graft Substitutes in a Rodent Posterolateral Spine Arthrodesis Model. *Spine J*. 2011; 11(10 Suppl): S59-S60.
- [8] Athanasiou VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, et al. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med Sci Monit*. 2010; 16(1): 24-31.
- [9] Powell M, Griffin M, Tai S. Bottom-up risk regulation? How nano-technology risk knowledge gaps challenge federal and state environmental agencies. *Environ Manage*. 2008; 42(3): 426-443.
- [10] Hak DJ. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007; 15(9): 525-536.
- [11] Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S77-S81.
- [12] Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S26-S29.
- [13] Jurczyk MU, Jurczyk K, Miklaszewski A, et al. Nanostructured titanium-45S5 Bioglass scaffold composites for medical applications. *Mater Design*. 2011; 32(10): 4882-4889.
- [14] Calderera-Moore M, Peppas NA. Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems. *Adv Drug Del Rev*. 2009; 61(15): 1391-1401.
- [15] Rodgers WB, Gerber EJ. A DBM, BMA, Local Bone Graft Composite in Multi-Level PLIF: Fusion Rates. *Spine J*. 2010; 10(9 Suppl): S26.
- [16] Li XQ, Liu TQ, Song KD. Dalian Ligong Daxue Xuebao. 2005; 45(5): 653-657.
李香琴, 刘天庆, 宋克东. 成骨细胞在纳米材料表面上粘附特性[J]. 大连理工大学学报, 2005, 45(5): 653-657.
- [17] Qian Y, Zhang ZF, Shen ZL, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2005; 13(12): 911-914.
钱望, 张兆锋, 沈尊理, 等. 冻干脱钙骨表面纳米结构对细胞行为的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(12): 911-914.
- [18] Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Artif Organs*. 2005; 8(3): 131-136.
- [19] Bohner M. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. *Mater Today*. 2010; 13(1-2): 24-30.
- [20] Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S16-S21.
- [21] Geurts J, Chris Arts JJ, Walenkamp GH. Bone graft substitutes in active or suspected infection. Contra-indicated or not? *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S82-S86.
- [22] Drosos GI, Babourda E, Magnissalis EA, et al. Mechanical characterization of bone graft substitute ceramic cements. *Injury*. 2012; 43(3): 266-271.
- [23] Chitsazi MT, Shirmohammadi A, Faramarzie M, et al. A clinical comparison of nano-crystalline hydroxyapatite (Ostim) and autogenous bone graft in the treatment of periodontal intrabony defects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(3): E448-E453.
- [24] Kweon H, Lee KG, Chae CH, et al. Development of Nano-Hydroxyapatite Graft With Silk Fibroin Scaffold as a New Bone Substitute. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 69(6): 1578-1586.
- [25] Chai YC, Kerckhofs G, Roberts SJ, et al. Ectopic bone formation by 3D porous calcium phosphate-Ti6Al4V hybrids produced by perfusion electrodeposition. *Biomaterials*. 2012; 33(16): 4044-4058.
- [26] Huang K, Chen XS, Jia LS, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2009; 17(13): 1017-1019.
黄凯, 陈雄生, 贾连顺, 等. 纳米脱钙骨基质的制备及其性能检测[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(13): 1017-1019.
- [27] Zhao XM. *Dalian Ligong*. 2005; 27(4): 35-36.
赵晓明. 纳米材料的特性及应用[J]. 电大理工, 2005, 27(4): 35-36.
- [28] Qian Y, Shen ZL, Zhang ZF, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi*. 2006; 20(5): 561-564.
钱望, 沈尊理, 张兆锋, 等. 运用组织工程原理结合纳米技术构建骨组织的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(5): 561-564.
- [29] Kailasanathan C, Selvakumar N, Naidu V. Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composites for bone graft materials. *Ceram Int*. 2012; 38(1): 571-579.
- [30] Tang ZB, Cao JK, Wen N, et al. Posterolateral spinal fusion with nano-hydroxyapatite-collagen/PLA composite and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 6(4): 325-336.