

## 墨鱼骨转化羟基磷灰石制备及细胞相容性

黄谢山<sup>1</sup>, 刘明<sup>2</sup>, 王江<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中南大学湘雅医学院附属海口医院口腔医学中心, 海南省海口市 570208; <sup>2</sup>海南大学材料与化工学院, 海南特有资源与优势化工材料教育部重点实验室, 海南省海口市 570228)

### 文章亮点:

- 1 墨鱼骨文石相碳酸钙和磷酸盐在特定条件下发生水热反应, 反应温度 200 °C 下, 反应时间为 8 h 时转化完全。
- 2 合成手段不经过成核再结晶的过程, 同时保持原来文石相碳酸钙的结晶取向, 因此内部结构和形貌都保持不变。
- 3 实验的特点在于获得的墨鱼骨转化羟基磷灰石材料所具有的良好三维结构, 且对人骨瘤细胞的生长无明显毒性, 不影响细胞的正常增殖, 具有良好的细胞相容性。

### 关键词:

生物材料; 骨生物材料; 材料相容性; 墨鱼骨; 磷酸二铵; 水热反应; 羟基磷灰石; 细胞相容性; 海南省自然科学基金

### 主题词:

羟基磷灰石类; 硬羟基磷灰石; 生物相容性材料; 支架

### 基金资助:

海南省重点科技计划(ZDXM20120066); 海南省自然科学基金(511106)

### 摘要

**背景:** 从自然界中寻找骨移植替代材料来充填骨缺损是目前骨组织工程支架研究的热点。

**目的:** 探索墨鱼骨转化羟基磷灰石三维支架及其作为骨组织工程支架材料的可行性。

**方法:** 以墨鱼骨为原料, 与磷酸氢二铵在特定条件下发生水热反应, 利用 X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱、X 射线光电子能谱法和扫描电镜分别对水热反应产物进行表征。

**结果与结论:** 墨鱼骨水热反应产物为羟基磷灰石。墨鱼骨转化羟基磷灰石保持了良好的文石相结构, 将其与 MG63 细胞体外培养并考察其细胞相容性, 证实墨鱼骨转化羟基磷灰石材料对细胞的生长无明显影响且无明显毒性, 不影响细胞的正常增殖, 可作为新型骨组织工程细胞支架材料。

黄谢山, 刘明, 王江. 墨鱼骨转化羟基磷灰石制备及细胞相容性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(16): 2532-2537.

## Preparation and cytocompatibility of cuttlebone-transformed hydroxyapatite

Huang Xie-shan<sup>1</sup>, Liu Ming<sup>2</sup>, Wang Jiang<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Oral Center, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570228, Hainan Province, China; <sup>2</sup>Materials and Chemical Engineering Department of Hainan University, Ministry of Education Key Laboratory of Application Technology of Hainan Superior Resources Chemical Materials, Haikou 570228, Hainan Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Recently, bone tissue engineering is highlighted from the nature source.

**OBJECTIVE:** To explore the preparation of a cuttlebone-transformed hydroxyapatite scaffold as the novel bone substitution.

**METHODS:** As raw materials, the cuttlebone appeared to have a hydrothermal reaction with diammonium phosphate under specific conditions, and the hydrothermal products were characterized respectively by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy and scanning electron microscopy.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The results showed that the hydrothermal products were hydroxyapatite. The cuttlebone-transformed hydroxyapatite possessed good three-dimensional structure. Cytocompatibility of the cuttlebone-transformed hydroxyapatite with MG63 cells cultured *in vitro* were observed and we found the cuttlebone-transformed hydroxyapatite had no obvious effects on cell growth and no toxicity, which can be used as new bone tissue engineering scaffolds.

**Subject headings:** hydroxyapatites; durapatite; biocompatible materials; stents

**Funding:** the Major Science and Technology Plan of Hainan Province, No. ZDXM20120066; the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 511106

Huang XS, Liu M, Wang J. Preparation and cytocompatibility of cuttlebone-transformed hydroxyapatite. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(16):2532-2537.

黄谢山, 男, 1972 年生, 海南省临高县人, 2012 年中南大学口腔医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面骨创伤、肿瘤修复方面的研究。

通讯作者: 王江, 博士, 副教授, 海南大学材料与化工学院, 海南特有资源与优势化工材料教育部重点实验室, 海南省海口市 570228

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.16.012

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)16-02532-06

稿件接受: 2014-03-04

Huang Xie-shan, Master, Associate chief physician, Oral Center, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570228, Hainan Province, China

Corresponding author: Wang Jiang, M.D., Associate professor, Materials and Chemical Engineering Department of Hainan University, Ministry of Education Key Laboratory of Application Technology of Hainan Superior Resources Chemical Materials, Haikou 570228, Hainan Province, China

Accepted: 2014-03-04

## 0 引言 Introduction

羟基磷灰石, 又称羟磷灰石, 是钙磷灰石( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ )的自然矿物化, 且经常被写成( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )的形式以突出其由羟基与磷灰石两部分组成。OH-基能被氟化物、氯化物和碳酸根离子代替, 生成氟基磷灰石或氯基磷灰石, 其中的钙离子可以被多种金属离子通过发生离子交换反应代替, 形成对应金属离子的M磷灰石(M代表取代钙离子的金属离子)。羟基磷灰石是脊椎动物骨骼和牙齿的主要组成, 人的牙釉质中羟基磷灰石的含量在96%以上。羟基磷灰石具有优良的生物相容性, 并可作为一种骨骼或牙齿的诱导因子, 在口腔保健领域中对牙齿具有较好的再矿化、脱敏以及美白作用。实验证明羟基磷灰石粒子与牙釉质生物相容性好, 亲和性高, 其矿化液能够有效形成再矿化沉积, 阻止钙离子流失, 解决牙釉质脱矿问题, 从根本上预防龋齿病。含有羟基磷灰石材料的牙膏对唾液蛋白、葡聚糖具有强吸附作用, 能减少患者口腔的牙菌斑, 促进牙龈炎愈合, 对龋病、牙周病有较好的防治作用。羟基磷灰石因其与人体自然骨组成和结构极为相似, 并且有良好的生物相容性和生物活性, 被广泛作为人骨缺损修复材料<sup>[1-3]</sup>。其来源有多种, 天然生物质碳酸钙转化即是其中之一。在天然生物质碳酸钙中, 珊瑚是最早得到深入研究的, 且最早应用于临床<sup>[4-15]</sup>。珊瑚的碳酸钙结构多孔而疏松, 即使磨成细微粉末状的珊瑚钙也保有这种特性, 且其除了钙、镁等常量矿物质之外, 还含有数十种微量元素, 而且所有成分都是有机型态的矿物质(经过珊瑚虫的天然螯合), 并非一般无机的化学元素。Roy等<sup>[16]</sup>曾利用水热法将海珊瑚从文石相碳酸钙转变为羟基磷灰石, 由于珊瑚羟基磷灰石与骨组织结构和成分相似, 因此被认为是一种较好的人工骨材料<sup>[17-20]</sup>, 美国生产的Interpore系列产品即是以天然珊瑚为原料, 经水热反应生成的羟基磷灰石材料, 该材料已获美国食品和药物管理局认证, 并应用于临床<sup>[21]</sup>。然而天然珊瑚可塑性较差, 并且属于国家保护的珍贵自然资源, 这限制了其在临床大规模应用。而墨鱼骨是海洋生物墨鱼的脊梁骨, 主要化学成分也为文石相碳酸钙, 同样具有良好的三维多孔房架式网状结构, 且资源丰富<sup>[22-23]</sup>, 将墨鱼骨转化为羟基磷灰石材料, 有望取代天然珊瑚羟基磷灰石在骨缺损修复临床上的应用。实验拟通过水热反应, 将墨鱼骨转化形成羟基磷灰石, 同时通过体外细胞培养试验和MTT检测其生物相容性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 材料学研究。

**时间及地点:** 实验于2013年1至12月在海南大学材料与化工学院生物材料研究所完成。

**材料:**

**生物材料:** 墨鱼骨购自海南省walmart超市购买, 产地为海南省。MG63细胞来源于中南大学湘雅医学院附属海

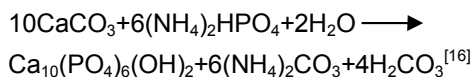
口医院。

墨鱼骨转化羟基磷灰石制备及细胞相容性实验用主要材料及仪器:

材料及仪器	来源
高压反应釜内胆(容量为 80 mL, 聚四氟乙烯制作)	西安常仪仪器厂
X射线衍射仪(D8 Advance 型), 傅里叶变换红外光谱仪(TENSOR27 型)	德国 Bruker 公司
X射线能谱仪, 扫描电镜	日本 Hitachi 公司
αMEM 培养基, 人工化学合成羟基磷灰石材料	自制
细胞培养箱	常州菲普实验仪器厂
光镜	广州维伯鑫生物科技公司
酶联免疫检测仪	北京中仪公司

**方法:**

**墨鱼骨转化羟基磷灰石的制备:** 将墨鱼骨材料进行切割, 然后用蒸馏水进行清洗, 并将其脱脂脱蛋白, 然后制成10 mm×10 mm×5 mm的组织块, 将组织块分为6组, 每组5块, 前5组分别置于高压反应釜内胆中, 再分别加入等量磷酸氢二铵(加入量以墨鱼骨中的Ca和磷酸氢二铵P的化学计量比为1.67作为标准; 溶解法测定墨鱼骨中的Ca含量), 最后加入2 000 mL蒸馏水, 进行水热反应。在200 °C温度下分别反应2, 4, 6, 8, 10 h, 墨鱼骨的碳酸钙和磷酸氢二铵在高温高压条件下发生化学反应:



以未进行水热反应的墨鱼骨作为对照组。

**材料表征:** 于设定时间取出材料, 蒸馏水清洗, 风干。分别进行X射线衍射分析, 傅里叶变换红外光谱分析, X射线能谱分析和扫描电镜分析。

**体外细胞培养试验和MTT试验:** MG63细胞在αMEM培养基中悬浮后接种于培养瓶中于37 °C/体积分数5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养, 每3 d更换培养液。将经过灭菌消毒的墨鱼骨转化羟基磷灰石材料分别置于24孔板中, 再将传代培养的成骨细胞按 $5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度滴加在24孔板中, 每孔滴加1 mL, 待细胞自然沉降在材料表面, 又于37 °C/体积分数5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养, 每3 d换液。根据MG63细胞的增殖周期, 分别取墨鱼骨转化羟基磷灰石材料和细胞复合培养1, 3, 5和7 d进行光镜观察细胞形态和增殖情况。在MTT试验中, 同等条件下, 以人工化学合成羟基磷灰石材料做对比, 以未放置材料作空白对照组, 平行6组进行试验。将复合培养第1, 4, 7天的样品各取6孔, 弃原培养液, 每孔加入MTT 20 μL, 再加入无血清αMEM培养液100 μL, 37 °C/体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4 h后, 去上清, 每孔加入二甲基亚砜150 μL, 振荡10-15 min, 吸取该溶解液至另一24孔板中, 每孔150 μL, 用酶联免疫检测仪在570 nm波长下检测各组吸光度值。

**主要观察指标:** 细胞与材料共培养不同时间后的变化情况。

**统计学分析:** 采用SPSS 18.0软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用两独立样本 $t$ 检验分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 墨鱼骨转化羟基磷灰石材料的制备结果** 图1A是水热反应前(原墨鱼骨)及不同水热反应时间样品粉末的X射线衍射图谱, 图1A中图谱a经X射线衍射图谱处理软件JADE进行分析, 得到其各衍射峰的 $d$ 值与JCPDSNo.05-0453完全一致, 表明构成墨鱼骨的矿物是文石相碳酸钙结构。图1中图谱b, c, d, e, f对应样品的水热反应时间分别为2, 4, 6, 8, 10 h。用MDI Jade 7.0软件分别对各图谱进行分析, 得出在水热反应2 h后, 出现了羟基磷灰石物相, 其晶型结构也发生了变化。随着反应的进行, 墨鱼骨文石矿物相逐步向羟基磷灰石物相转化, 图中b, c, d是文石和羟基磷灰石的衍射峰共存。在反应时间4 h时, 羟基磷灰石衍射峰强度远高于文石, 说明水热反应4 h后, 大部分文石相碳酸钙已转化为羟基磷灰石。图中e其各衍射峰与JCPDSNo.74-0566相符, 说明在反应时间达到8 h时, 文石相碳酸钙已完全转化为羟基磷灰石, 图中f图谱与e图谱完全一样, 说明水热反应8 h后样品的晶型结构稳定无变化。

图1B是水热反应前(原墨鱼骨)及不同水热反应时间样品粉末的傅里叶变换红外光谱图谱。图1B中图谱a与文石相碳酸钙的傅里叶变换红外光谱图相符<sup>[34]</sup>, 表明构成墨鱼骨的矿物是文石相碳酸钙。其 $\text{CO}_3^{2-}$ 不对称伸缩振动峰( $1450\text{ cm}^{-1}$ 强峰)、面外变形振动峰( $880\text{ cm}^{-1}$ 中强峰)和面内变形振动峰( $712\text{ cm}^{-1}$ 弱峰)的吸收强度随着水热反应的进行逐渐变弱(图谱b-d), 在反应达到8 h(图谱e)时消失。在反应达到2 h(图谱b)时, 出现了P-O振动峰( $1084\text{ cm}^{-1}$ 和 $575\text{ cm}^{-1}$ )和OH伸缩振动峰( $615\text{ cm}^{-1}$ ), 其吸收强度随着水热反应时间的进行逐渐增强(图谱b-d)。在反应达到8 h(图谱e)时, 与羟基磷灰

石的傅里叶红外光谱图谱相符。表明墨鱼骨文石相碳酸钙在磷酸盐溶液水热反应作用下, 逐步转化为羟基磷灰石, 并且转化程度随着反应时间的延长而增加。

文石矿物在磷酸盐溶液中水热转变为羟基磷灰石, 通常被认为是发生了局部规整离子交换反应, 因为羟基磷灰石(六方晶系,  $a=0.943\text{ nm}$ ,  $b=0.688\text{ nm}$ ,  $g=1\ 200$ )和文石相碳酸钙( $a=0.939\text{ nm}$ ,  $b=0.574\text{ nm}$ ,  $g=1\ 170$ , 可以描述为假六方晶系)的晶格参数相近<sup>[34]</sup>, 离子所处的位置大致相同<sup>[35]</sup>, 当文石相碳酸钙经局部规整离子交换反应转化为羟基磷灰石时, 由于减少了成核作用所需结构重排的能量, 从而使反应易进行, 表部文石相碳酸钙直接与磷酸盐发生水热反应, 内部文石相碳酸钙不与溶液直接接触, 易与扩散进去的 $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ 离子发生固态局部规整离子交换反应转化成羟基磷灰石, 反应从外到内, 所以是一个随时间逐步转化的过程。

**2.2 墨鱼骨转化羟基磷灰石材料的成分和形貌结构** 图2A是利用X射线光电子能谱法分析的预处理过的墨鱼骨的X射线能谱法谱图, 图2B是利用X射线能谱法分析水热反应8 h的产物的X射线能谱法谱图, 结果显示墨鱼骨的主要化学成分文石相碳酸钙在水热反应8 h的产物中的C元素已经检测不到, 检测到元素主要为Ca, O, P元素<sup>[36]</sup>。X射线能谱法微区定量分析结果如表1所示, 通过计算得到水热反应产物的Ca/P为1.67, 与羟基磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 的化学计量比相符合。说明在水热反应过程中, 经磷酸盐溶液作用, 反应产物中已不存在文石相碳酸钙, 完全转化为羟基磷灰石。

表1 墨鱼骨转化羟基磷灰石的化学成分表  
Table 1 Element composition of cuttlebone-transformed hydroxyapatite

化学成分	含量(%) / 比值
O	59.09
P	13.63
Ca	22.74
Ca/P	1.67

表注: Ca/P 的数量为比值, 无单位。

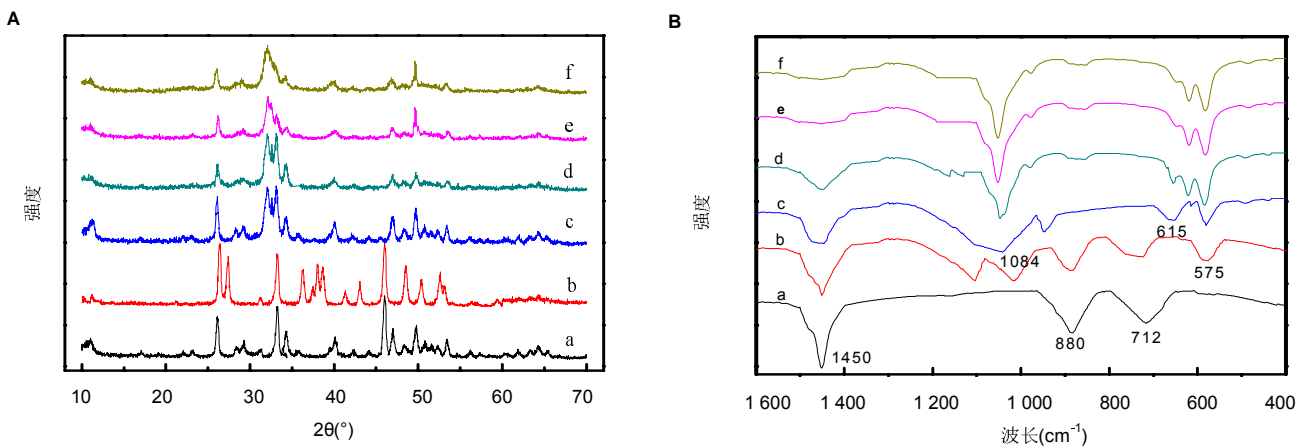


图1 墨鱼骨的X射线衍射图谱(A)和傅里叶变换红外光谱图谱(B)

Figure 1 X-ray diffraction (A) and Fourier transform infrared spectroscopy (B) patterns of the cuttlebone

图注: 图中a为未进行水热反应的墨鱼骨, 图中b-f分别为进行2, 4, 6, 8, 10 h水热反应的墨鱼骨。

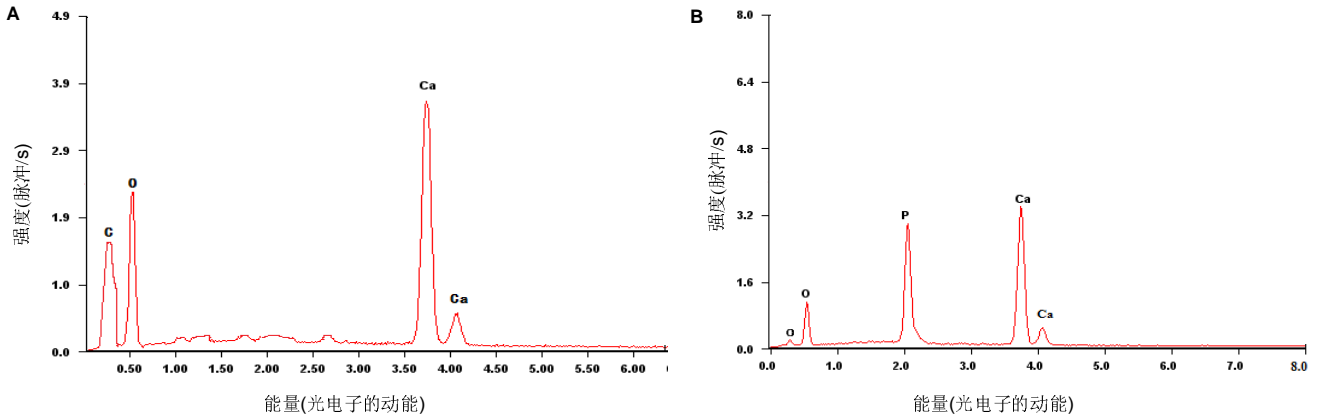


图2 预处理的墨鱼骨和墨鱼骨转化羟基磷灰石的X射线能谱法图谱

Figure 2 Energy-dispersive X-ray spectroscopy patterns of preprocessed cuttlebone and cuttlebone-transformed hydroxyapatite

图注: 图A为预处理的墨鱼骨X射线能谱法图谱, B为墨鱼骨转化羟基磷灰石的X射线能谱法图谱。墨鱼骨的主要化学成分文石相碳酸钙在水热反应8 h的产物中的C元素已经检测不到, 检测到元素主要为Ca, O, P元素。

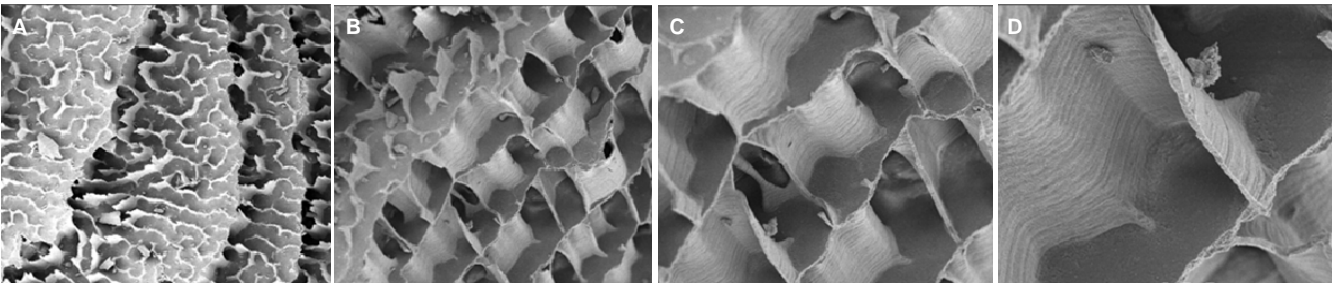


图3 扫描电镜观察到的墨鱼骨转化羟基磷灰石的显微结构

Figure 3 Scanning electron microscope images of cuttlebone-transformed hydroxyapatite

图注: 图中A, B, C, D分别为 $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 500$ , 墨鱼骨转化羟基磷灰石呈多孔状。

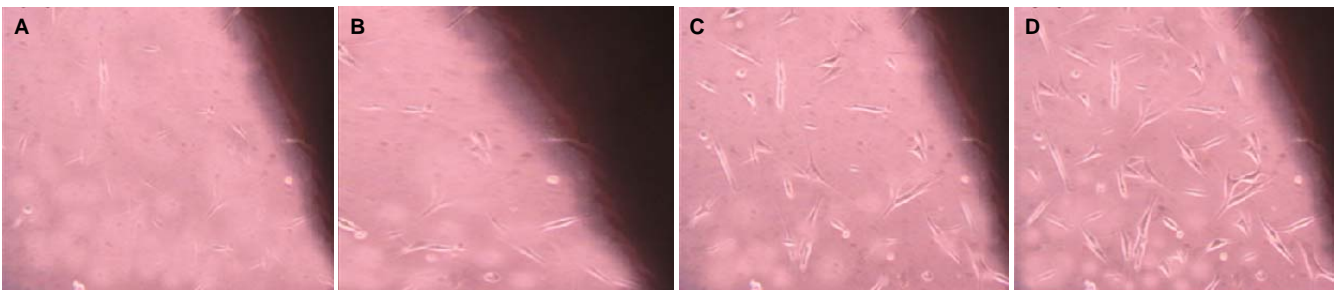


图4 MG63细胞与墨鱼骨转化羟基磷灰石材料体外培养不同时间的细胞形态变化( $\times 100$ )。

Figure 4 Morphological changes of MG63 cells co-cultured with cuttlebone-transformed hydroxyapatite for different time ( $\times 100$ )

图注: 图中A-D分别为MG63细胞与墨鱼骨转化羟基磷灰石材料体外培养1, 3, 5, 7 d时的形态。墨鱼骨转化羟基磷灰石材料不影响细胞正常增殖。

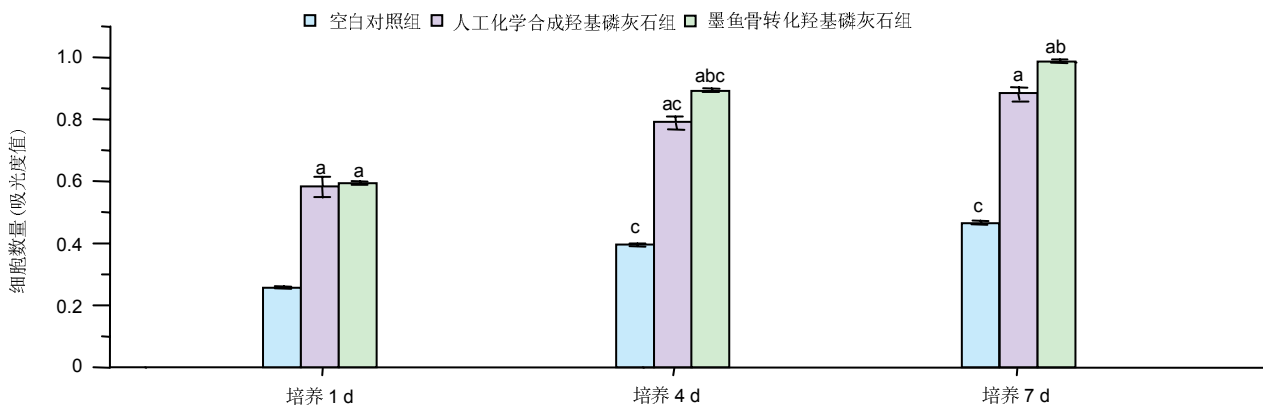


图5 MG63细胞与羟基磷灰石, 墨鱼骨转化羟基磷灰石体外培养不同时间的MTT检测结果

Figure 5 MTT assays for proliferation of MG63 cells co-cultured with hydroxyapatite and cuttlebone-transformed hydroxyapatite

图注: 与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与人工化学合成羟基磷灰石组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与前一时间点相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图3是墨鱼骨转化羟基磷灰石的扫描电镜照片, 大体观察为瓷白色, 背部呈肉眼可见的多孔状外观, 纹理清晰(图3A)。可观察到有较粗大的支柱样结构, 支柱之间相互平行, 即为肉眼可见之清晰纹理, 相邻支柱间是与之相交排列的小梁结构, 壁较薄, 支柱与小梁相间排列。表面光滑, 并呈现出板层样(图3B), 气孔率高达80%以上。构成规则的壁龛样网格(图3C), 由“横墙”和“竖壁”规则搭建而成多孔通道结构, 而且这些孔道是相通的, 孔道开口大体呈长方形, 大小较均匀, 尺寸为200–300 μm(图3D)。

**2.3 墨鱼骨转化羟基磷灰石的细胞相容性** 材料与细胞复合培养1 d, 光镜观察到材料周边有少量细胞, 细胞形态不够清晰, 细胞延展的不够充分(图4A)。材料与细胞复合培养3 d, 材料周边的细胞数量有所增多, 细胞形态趋于清晰, 细胞贴材料周边生长, 生长状态良好, 但生长活力不够旺盛(图4B)。材料与细胞复合培养5 d, 细胞数量明显增加, 细胞贴附材料生长良好, 细胞形态可分辨为梭形、三角形和多边形(图4C)。材料与细胞复合培养7 d, 材料周边的细胞数量明显增多, 布满材料周边胞浆透明, 生长活力旺盛, 细胞形态更加清晰, 多为梭形、三角形和多边形, 无细胞衰老及异常分裂现象(图4D), 可见墨鱼骨转化羟基磷灰石材料不影响细胞正常的增殖。

图5是试验组和对照组MG63细胞的MTT检测结果, 根据吸光度值随着细胞数的增加而增加, 两者呈现明显的正相关关系<sup>[37]</sup>, 各组材料的细胞随着培养时间的延长, 数量都有所增加, 在各个时间点各组之间细胞的数量差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表2为MG63细胞与材料体外培养1, 4和7 d时细胞的相对生长率(细胞相对生长率按下式计算: 细胞相对生长率 =  $\frac{A_E}{A_C} \times 100\%$ , 其中 $A_E$ 和 $A_C$ 分别是实验组和对照组的吸光度值)。按照GB/T16886.5-2003标准<sup>[38]</sup>, 可以看出材料的细胞毒性为0级, 属于无细胞毒性的材料, 从细胞相容性方面的研究结果, 可知材料对MG63细胞的生长无明显影响且无明显毒性, 属于无细胞毒性材料, 具有较好的细胞相容性。

表2 MG63细胞与材料体外培养时细胞的细胞相对生长率和材料的细胞毒性等级

Table 2 Relative growth rate of MG63 cells and cytotoxicity of the samples cultured *in vitro* (n=6)

时间	细胞相对生长率(%)	细胞毒性等级
1 d		
羟基磷灰石	227.7	0
墨鱼骨转化羟基磷灰石	232.0	0
4 d		
羟基磷灰石	200.5	0
墨鱼骨转化羟基磷灰石	225.8	0
7 d		
羟基磷灰石	190.5	0
墨鱼骨转化羟基磷灰石	212.0	0

### 3 结论 Discussion

墨鱼骨文石相碳酸钙和磷酸盐在特定条件下发生水热反应, 随着反应时间的延长, 文石相碳酸钙逐步转化为羟基磷灰石, 在本实验中, 反应温度200 °C下, 反应时间为8 h时转化完全。由于不经过成核再结晶的过程, 同时保持原来文石相碳酸钙的结晶取向, 因此内部结构和形貌都保持不变。

从细胞相容性方面的研究结果可知, 墨鱼骨转化羟基磷灰石材料对人骨瘤细胞的生长无明显毒性, 不影响细胞的正常增殖, 具有良好的细胞相容性。墨鱼骨转化羟基磷灰石材料所具有的良好三维结构和相容性, 使其有望成为一种新型骨组织工程细胞支架材料。

**作者贡献:** 黄谢山进行实验设计, 实验实施为刘明, 实验评估为黄谢山, 资料收集为黄谢山, 黄谢山成文, 王江审核, 王江对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 未涉及伦理问题。

**学术术语:** 水热合成法-是一种常用的无机材料的合成方法, 在纳米材料、生物材料和地质材料中具有广泛的应用。其主要步骤是将反应原料配置成溶液在水热釜中封装并加热至一定的温度。水热釜使得该合成体系维持在一定的压力范围内, 在这种非平衡态的合成体系内进行液相反应往往能够制备出具有特殊优良性质的材料。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

### 4 参考文献 References

- [1] Ozin GA, Varaksa N, Coombs N, et al. Bone mimetics: a composite of hydroxyapatite and calciumdodecylphosphate lamellar phase. *J Mater Chem*. 1997;7:1601-1607.
- [2] Doremus RH. *Bioceramics*. *J Mater Sci*. 1992;27(2):285-297.
- [3] Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res*. 1998;13(1):94-117.
- [4] Burstein FD, Cohen SR, Hudgins R, et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100(4):869-874.
- [5] Choi SH, Levy ML, McComb JG. A method of cranioplasty using coralline hydroxyapatite. *Pediatr Neurosurg*. 1998;29(6): 324-327.
- [6] Boden SD, Martin GJ Jr, Morone M, et al. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(4):320-327.
- [7] Wasielewski RC, Sheridan KC, Lubbers MA. Coralline hydroxyapatite in complex acetabular reconstruction. *Orthopedics*. 2008;31(4):367.
- [8] Thalgott JS, Giuffre JM, Fritts K, et al. Instrumented posterolateral lumbar fusion using coralline hydroxyapatite with or without demineralized bone matrix, as an adjunct to autologous bone. *Spine J*. 2001;12(2):131-137.

- [9] Ono I, Gunji H, Kaneko F, et al. Treatment of extensive cranial bone defects using computer-designed hydroxyapatite ceramics and periosteal flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(5): 819-830.
- [10] Fu K, Meng ZB, Li J, et al. Repairing the defect of benign bone tumor with the coralline hydroxyapatite. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008;33(5):421-424.
- [11] Wolfe SW, Pike L, Slade JF 3rd, et al. Augmentation of distal radius fracture fixation with coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *J Hand Surg Am.* 1999;24(4):816-827.
- [12] Thalgot J, Klez Z, Timlin M, et al. Anterior lumbar interbody fusion with processed sea coral (coralline hydroxyapatite) as part of a circumferential fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002; 27(24):E518-527.
- [13] Gosain AK, Riordan PA, Song L, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(5):1155-1165.
- [14] Ning Y, Wei T, Defu C, et al. The research of degradability of a novel biodegradable coralline hydroxyapatite after implanted into rabbit. *J Biomed Mater Res A.* 2009;88(3):741-746.
- [15] Cohen AJ, Dickerman RD, Schneider SJ. New method of pediatric cranioplasty for skull defect utilizing polylactic acid absorbable plates and carbonated apatite bone cement. *J Craniofac Surg.* 2004;15(3):469-472.
- [16] Roy DM, Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature.* 1974; 247(5438):220-222.
- [17] Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, et al. Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(324):55-65.
- [18] Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(367 Suppl):S107-117.
- [19] Voor MJ, Arts JJ, Klein SA, et al. Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 71(2):398-407.
- [20] Chen F, Mao T, Tao K, et al. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(10):1155-1159.
- [21] Sivakumar M, Kumar TS, Shantha KL, et al. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials.* 1996; 17(17):1709-1714.
- [22] Birchall JD, Thomas NL. On the architecture and function of cuttlefish bone. *J Mater Sci.* 1983;18(7):2081-2086.
- [23] Kumar GS, Girija EK, Thamizhavel A, et al. Synthesis and characterization of bioactive hydroxyapatite-calcite nanocomposite for biomedical applications. *J Colloid Interface Sci.* 2010;349(1):56-62.
- [24] Battistella E, Mele S, Foltran I, et al. Cuttlefish bone scaffold for tissue engineering: a novel hydrothermal transformation, chemical-physical, and biological characterization. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2012;10(2):99-106.
- [25] Kannan S, Rocha JH, Agathopoulos S, et al. Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Acta Biomater.* 2007;3(2):243-249.
- [26] Jia X, Qian W, Wu D, et al. Cuttlebone-derived organic matrix as a scaffold for assembly of silver nanoparticles and application of the composite films in surface-enhanced Raman scattering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009;68(2): 231-237.
- [27] Milovac D, Gallego Ferrer G, Ivankovic M, et al. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;34:437-445.
- [28] Fernandez JM, Molinuevo MS, Cortizo MS, et al. Development of an osteoconductive PCL-PDIPF-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5(6): e126-135.
- [29] Arafat MT, Lam CX, Ekaputra AK, et al. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(2):809-820.
- [30] Kim BS, Yang SS, Lee J. A polycaprolactone/cuttlefish bone-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013. in press.
- [31] Li X, Zhao Y, Bing Y, et al. Biotemplated syntheses of macroporous materials for bone tissue engineering scaffolds and experiments in vitro and vivo. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(12):5557-5562.
- [32] Jia X, Qian W. Simultaneous synthesis and assembly of gold nanoparticles in cuttlebone-derived organic matrix: a "green" pathway for gold nanocomposite. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008; 8(9):4370-4376.
- [33] Ogasawara W, Shenton W, Davis SA, et al. Template mineralization of ordered macroporous chitin-silica composites using a cuttlebone-derived organic matrix. *Chem Mater.* 2000;12(10):2835-2837.
- [34] Taves DR. Similarity of octacalcium phosphate and hydroxyapatite structures. *Nature.* 1963;200:1312-1313.
- [35] 刘金华, 王大志. 乌贼骨及其水热改性制备羟基磷灰石的研究[J]. *无机材料学报*, 2006, 21(2):433-438.
- [36] 胡浩, 朱胜利, 崔振铎, 等. TiZrCuPd金属玻璃表面沉积钙磷层的研究[J]. *功能材料*, 2010, 41(10):1845-1847.
- [37] 杨浩, 王春婷, 吴玉梅, 等. MTT试验中细胞特性状态及细胞数与OD值的关系探讨[J]. *动物医学进展*, 2002, 23(5):49-53.
- [38] 国家药品监督管理局. GB/T 16886.5-2003 医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.

## 更正

因作者校对失误, 在《中国组织工程研究》杂志2014年第18卷第8期张婉楠撰写的《颊侧多曲簧活动矫治器临床应用中的生物学效应》, 文章中有文字错误。原文“作者贡献: 第一作者构思并设计本综述, 经导师尹宗生教授修改, 所有作者共同起草, 第一作者对文章负责。”应更正为“作者贡献: 第一作者构思并设计本综述, 经导师侯录教授修改, 所有作者共同起草, 第一作者对文章负责。”特致歉。