

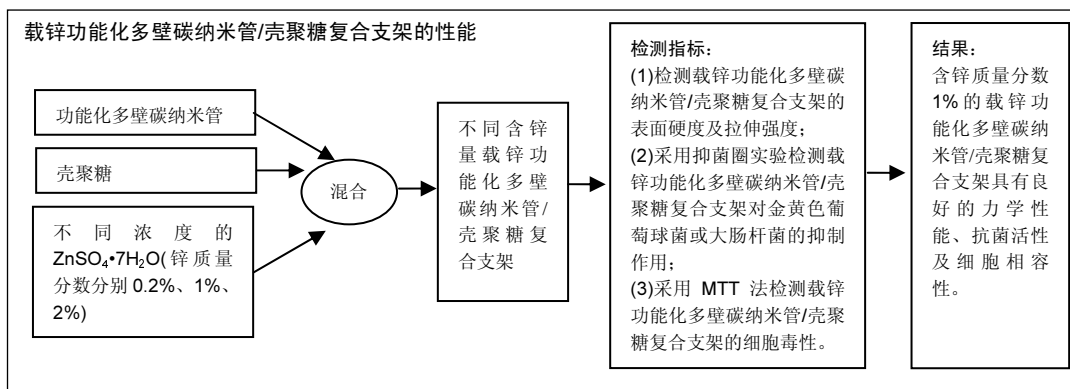
# 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的制备与性能评价

杨 犇<sup>1</sup>, 何东宁<sup>1</sup>, 秦博恒<sup>1</sup>, 张保平<sup>2</sup> (<sup>1</sup>山西医科大学口腔医学系, 山西省太原市 030001; <sup>2</sup>中国科学院山西煤炭化学研究所, 山西省太原市 030001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0064

ORCID: 0000-0001-7374-0833(何东宁)

文章快速阅读:



杨犇, 男, 1985 年生, 陕西省渭南市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士, 主要从事骨组织工程支架材料方面相关研究。

通讯作者: 何东宁, 副教授, 山西医科大学口腔医学系, 山西省太原市 030001

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2017-09-05



文题释义:

**功能化碳纳米管:** 利用强酸(如浓硝酸和浓硫酸)可对碳纳米管进行改性, 在碳纳米管表面增加功能基团(如羧基、羟基等)可获得功能化碳纳米管。功能化碳纳米管显著改善了碳纳米管在水中的分散性及与聚合物反应的能力, 此外, 在聚合物基质中添加少量功能化碳纳米管, 可改善材料的性能, 促进材料与细胞间的相互作用, 增加细胞代谢功能。

**壳聚糖:** 是一种天然多糖, 由  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-d-葡萄糖和  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-氨基-d-葡萄糖单元共聚而成, 具有良好的生物相容性、生物可降解性、促进伤口愈合及抗微生物活性, 然而, 单纯使用壳聚糖作为骨组织工程支架时机械性能较差, 在骨缺损区不能有效承重。

摘要

**背景:** 单纯使用壳聚糖作为骨组织工程支架时机械性能较差, 在骨缺损区不能有效承重, 因此, 许多学者尝试开发多壁碳纳米管/壳聚糖骨组织工程支架。

**目的:** 构建载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架, 测试其力学性能、抗菌活性与细胞相容性。

**方法:** ①采用“混合法”制备功能化多壁碳纳米管; 将壳聚糖、功能化多壁碳纳米管溶液(功能化多壁碳纳米管质量分数 0.5%)与不同浓度的  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (锌质量分数分别为 0.2%、1%、2%)混合, 制备载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架, 检测纯壳聚糖支架及载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表面硬度及拉伸强度; ②采用抑菌圈实验检测纯壳聚糖支架及载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对金黄色葡萄球菌或大肠杆菌的抑制作用; ③采用载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架浸提液培养小鼠成骨细胞 MC3T3-E1, 培养 1, 2, 3 d 后, 采用 MTT 法检测细胞增殖, 计算细胞相对增殖率, 评价细胞毒性。

**结果与结论:** ①3 组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表面硬度、拉伸强度均高于纯壳聚糖支架 ( $P < 0.05$ ), 3 组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架间的表面硬度、拉伸强度比较差异无显著性意义; ②3 组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌性能均高于纯壳聚糖支架 ( $P < 0.05$ ), 且抗菌性能随着复合支架中锌质量分数的增加而增强; ③含锌质量分数 0.2%、1% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架无细胞毒性; ④结果表明, 含锌质量分数 1% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架具有良好的力学性能、抗菌活性及细胞相容性。

**关键词:**

功能化多壁碳纳米管; 锌; 复合支架; 力学性能; 生物材料; 骨生物材料; 壳聚糖; 抗菌性能

**主题词:**

壳聚糖; 纳米管; 碳; 锌; 组织工程

**基金资助:**

山西省卫生与计划生育委员会资助项目(2015112)

## Preparation and performance properties of functionalized multi-walled carbon nanotubes/chitosan-zinc composite scaffolds

Yang Ben<sup>1</sup>, He Dong-ning<sup>1</sup>, Qin Bo-heng<sup>1</sup>, Zhang Bao-ping<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Stomatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; <sup>2</sup>Institute of Coal Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

Yang Ben, Studying for master's degree, Department of Stomatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: He Dong-ning, Associate professor, Department of Stomatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** A pure chitosan (CS) scaffold has poor mechanical properties, and cannot play a load-bearing role in the bone defect region. Therefore, many scholars attempt to develop multi-walled carbon nanotube (MWCNT)/chitosan (MWCNT/CS) bone tissue scaffolds.

**OBJECTIVE:** To develop the functionalized MWCNT/CS composite scaffolds carrying zinc (f-MWCNT/CS-Zn) and to test its mechanical properties, antibacterial activity and biocompatibility.

**METHODS:** (1) F-MWCNT composite scaffolds were prepared by the acid mixture method, and f-MWCNT/CS-Zn composite scaffolds were prepared through mixing CS, f-MWCNT (0.5%) with different concentrations of  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (the concentrations of Zn in the composite scaffolds were 0.2%, 1%, 2%, respectively). The surface hardness and tensile strength of the pure CS scaffold and the f-MWCNT/CS-Zn composite scaffolds were measured. (2) The inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* of the pure CS scaffold and f-MWCNT/CS-Zn scaffolds was tested by inhibition zone test. (3) The osteoblasts MC3T3-E1 were cultured with the leaching solution of f-MWCNT/CS-Zn composite scaffolds. The cell proliferation was detected by MTT assay at 1, 2, 3 days after culture, then the relative proliferation rate was calculated and the cytotoxicity was evaluated.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) The surface hardness and tensile strength of the f-MWCNT/CS-Zn composite scaffolds were higher than those of the pure CS scaffold ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the surface hardness and tensile strength between the different zinc-containing composite scaffolds. (2) The antibacterial properties of the three f-MWCNT/CS-Zn composite scaffolds against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were higher than those of the pure CS scaffold ( $P < 0.05$ ), and the antibacterial activity was enhanced with the increase of zinc mass fraction. (3) The f-MWCNT/CS-0.2%Zn and f-MWCNT/CS-1%Zn composite scaffolds had no cytotoxicity. To conclude, the f-MWCNT/CS-1%Zn composite scaffold has good mechanical properties, antibacterial activity and biocompatibility.

**Subject headings:** Chitosan; Nanotubes; Carbon; Zinc; Tissue Engineering

**Funding:** the funded project of Shanxi Province Health and Family Planning Commission, No. 2015112

## 0 引言 Introduction

各种原因导致的骨损伤和骨缺损修复再生是全世界整形外科的一大难题。由于自体骨和同种异体骨移植的缺陷与并发症<sup>[1-3]</sup>, 开发骨组织工程移植物替代品是治疗骨缺损的一个有效选择<sup>[4-6]</sup>。理想的组织工程支架材料应当与天然骨的功能相似, 可代替天然骨的细胞外基质成分, 并且对周围组织无明显毒性, 允许成骨细胞在其表面正常的增殖与分化, 可生物降解, 具有与天然骨相似的功能结构, 如孔径大小、孔隙率及机械强度等<sup>[7-8]</sup>。

天然聚合物因其良好的理化特性和生物学特性被广泛应用于骨组织工程研究。壳聚糖是一种天然多糖, 由 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-d-葡萄糖和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-氨基-d-葡萄糖单元共聚而成, 具有良好的生物相容性、生物可降解性、促进伤口愈合及抗微生物活性, 在生物医学领域具有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。壳聚糖可被制作成各种形式, 如膜、纤维、海绵、水凝胶等复杂结构用于骨科治疗。壳聚糖的阳离子性质可吸附带负电荷的蛋白多糖<sup>[10]</sup>, 并且可负载治疗药物或生长因子等, 防止与植入相关的感染并加速新骨生成<sup>[11-12]</sup>。

然而, 单纯使用壳聚糖作为骨组织工程支架时机械性能较差, 在骨缺损区不能有效承重<sup>[13]</sup>。与其他材料相比, 碳纳米管具有优异的机械性能, 并且被认为是一种可应用于组织工程的生物材料<sup>[14]</sup>。碳纳米管与各种聚合物制成支架材料已被广泛应用于骨组织工程<sup>[15]</sup>。利用强酸(如浓硝酸和浓硫酸)可对碳纳米管进行改性, 在碳纳米管表面增加功能基团(如羧基、羟基等)可获得功能化的碳纳米管。功能化碳纳米管显著改善了碳纳米管在水中的分散性及与聚合物的反应的能力。此外, 在聚合物基质中添加少量的功能化碳纳米管, 可以改善材料的性能。功能化碳纳米管复合支架表面的成骨细胞生长优于普通聚合物支架, 表明功能化碳纳米管更容易与细胞相互作用, 同时增加了细胞代谢功能。功能化碳纳米管和聚合物组成的复合支架在早期就可刺激机体产生矿化液, 这种仿生特性是引起支架骨矿化

的重要功能<sup>[16]</sup>。三维多孔支架可维持骨缺损区的空间结构, 为成骨细胞附着增殖提供支持。由于碳纳米管的高机械强度和导电性, 其与壳聚糖组成的复合支架材料被认为是骨组织工程最有前景的生物材料之一<sup>[17]</sup>。许多学者尝试开发用于骨组织工程的多壁碳纳米管/壳聚糖支架<sup>[18-19]</sup>。

对于骨组织植入物, 常伴有细菌感染风险, 耐药菌可能会增加感染风险并导致植入失败。因此, 具有抗微生物性能的支架材料对于成功的骨修复再生则更为理想。壳聚糖和碳纳米管都具有与金属离子较高的结合能力<sup>[20-21]</sup>。锌具有较高的抗菌活性, 低毒, 化学性质稳定, 作用时间持久<sup>[22]</sup>, 可在支架制备期间掺入天然或合成的生物聚合物中, 用于骨组织工程<sup>[23-24]</sup>。锌通过转运锌储存蛋白和锌转运蛋白在成骨细胞矿化中发挥重要作用<sup>[25]</sup>, 它同时参与刺激大鼠颅盖骨细胞中胶原蛋白的形成。锌可抑制破骨细胞分化并促进成骨细胞的活性, 同时促进骨形成<sup>[26]</sup>。因此, 基于壳聚糖、功能化碳纳米管和锌的特性, 此次实验使用壳聚糖和功能化的多壁碳纳米管并将锌引入其中, 以实现整个支架材料更好的抗菌性能和成骨性能, 通过“溶液共混法”联合“冷冻干燥法”制备了三维多孔结构的f-MWCNT/CS-Zn复合支架, 模仿天然骨的结构功能应用于骨组织工程。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 支架制备与观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年3月至2017年2月在中国科学院煤炭化学研究所和山西医科大学实验中心完成。

1.3 材料 壳聚糖(黏度50-800 mPa·s, 脱乙酰度80.0%-95.0%, 生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司, 上海); 多壁碳纳米管(管径<8 nm, 长度10-30  $\mu$ m, 北京德科岛金科技有限公司); 硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 上海); MC3T3-E1细胞(通派(上海)科技有限公司); MEM- $\alpha$ 培养基(Gibco公司, 美国); 胎牛血清(sigma公司, 美国); MTT细胞增殖及细胞毒性检

测试剂盒(博士德, 中国); 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌(山西医科大学第一附属医院医院); VFD冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司); JSM-6360LV扫描电子显微镜(JEOL, 日本); G200纳米压入仪(Nano Indenter, 美国); 电子万能测试机(TRAPEZIUM, 日本); D8 ADVANCE广角X射线衍射仪(Bruker, 德国); 细胞培养箱(Forma, 美国); Eon酶标仪(Biotek, 美国)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 功能化多壁碳纳米管的制备** 将0.5 g多壁碳纳米管置于烧瓶中, 加入150 mL浓硫酸和50 mL浓硝酸, 将烧瓶置于80 °C超声恒温水浴箱中反应6 h, 形成均匀黑色溶液, 将溶液高速离心洗涤至中性, 真空抽滤, 产物在80 °C真空干燥箱中干燥24 h, 得到功能化多壁碳纳米管。

**1.4.2 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的制备** ①将800 mg壳聚糖溶解于40 mL 1%乙酸溶液中, 磁力搅拌60 min; ②称取功能化多壁碳纳米管4 mg, 分散于16 mL 1%的乙酸溶液中, 35 °C恒温水浴箱中超声处理90 min。然后取经上述处理完毕的功能化多壁碳纳米管溶液与处理完毕的壳聚糖溶液混合, 磁力搅拌60 min; ③将混合后溶液超声30 min, 静置2 h去除泡沫, 调节溶液的pH值至中性; ④将上述处理完毕的混合溶液置于磁力搅拌机中, 边搅拌边滴加不同浓度的ZnSO<sub>4</sub>溶液, 充分混合均匀, 使锌的质量分数分别为0.2%、1%、2%; ⑤将混合溶液于真空干燥箱蒸发浓缩至一定体积, 置于-50 °C冷冻干燥箱真空冷冻干燥48 h, 制备出含锌量分别为0.2%、1%、2%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。通过①+③+⑤制备出纯壳聚糖支架。

#### 1.4.3 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表征

**形貌观察:** 将制备好的纯壳聚糖支架和3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料剪切成合适大小, 粘贴于石墨台上, 抽真空后喷金, 使用扫描电镜观察其表面形态、结构和孔隙大小。

**表面硬度测定:** 以纯壳聚糖支架为对照组, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架为实验组。使用美国MTS公司的G200纳米压入仪检测支架的表面硬度, 每种材料测量6个点, 取平均值。

**拉伸强度测试:** 以纯壳聚糖支架为对照组, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架为实验组。将材料制成长度为80 mm、宽度为10 mm的试样, 使用电子游标卡尺测量厚度5次, 取其平均值。室温下采用电子万能力学测试机进行拉伸实验, 以5 mm/min的速率进行测试, 每种支架材料测量5次, 得到平均应力-应变曲线。

**X射线衍射吸收光谱:** 将制备好纯壳聚糖支架和3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料压碎剪, 切成细小粉末, 分别使用筛子筛选制成适用于X射线衍射的样品。使用德国Bruker D8 ADVANCE X-射线衍射仪, CuK $\alpha$ 射线, 电压40 kV, 电流40 mA, 波长=0.154 18 nm进行测试, 记录材料的X射线衍射曲线。

**红外吸收光谱:** 将ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、功能化多壁碳纳米管分别捣碎制成细小粉末, 并将制备好的纯壳聚糖支架和3

组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料分别压碎, 剪切制成细小粉末, 使用筛子筛选制备成适合于傅里叶红外光谱样品。使用Thermo Scientific NICOLET IS 50红外光谱仪检测获取上述材料的红外吸收光谱。

**抑菌圈实验:** 以纯壳聚糖支架为对照组, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架为实验组。通过使用金黄色葡萄球菌(革兰阳性细菌)和大肠杆菌(革兰阴性细菌)的抑菌圈实验评价载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的抗菌性能。复苏金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 接种于LB液体培养试管中, 37 °C恒温培育24 h, 分别制备成1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL浓度细菌悬浮液。配置LB琼脂固体培养基, 分别加入100  $\mu$ L制备好的两种细菌悬液, 将4种支架材料制备成直径为0.4 cm、高为0.2 cm的圆柱体, 间隔一定距离依次放置于同一培养基中, 每种菌株重复6次, 放于37 °C恒温倒置培育24 h, 游标卡尺测量抑菌圈大小。

**细胞毒性实验:** 使用MTT法进行载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的细胞毒性评价。 $\gamma$ 射线消毒3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料。将200 mg载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料加入2 mL培养基中, 37 °C浸泡24 h, 制作材料浸提液。将小鼠成骨细胞MC3T3-E1接种于96孔板, 每孔接种大约1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞, 加入新鲜配置的 $\alpha$ -MEM培养基100  $\mu$ L, 放入37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养24 h; 去除96孔板上的培养基, 实验组加入制备好的各组材料浸提液100  $\mu$ L, 每种材料重复5孔, 以加入培养基的为空白对照组。放入37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱培养, 24, 48, 72 h后, 每孔加入10  $\mu$ L MTT (5 g/L)液继续培养4 h, 然后每孔加入100  $\mu$ L DMSO, 10-15 min后, 用酶标仪检测各孔在490 nm波长的吸光度(A)值。计算各组支架相对增殖率(RGR)。细胞相对增殖率=实验组样品A值/空白组A值。评价3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架材料的细胞毒性。按照美国药典细胞相对增殖率与细胞毒性等级关系: 细胞相对增殖率 $\geq$ 100%为0级, 80% $\leq$ 细胞相对增殖率 $<$ 100%为1级, 50% $\leq$ 细胞相对增殖率 $<$ 80%为2级, 30% $\leq$ 细胞相对增殖率 $<$ 50%为3级, 0 $\leq$ 细胞相对增殖率 $<$ 30%为4级。依据国家标准(GB/T16886.5-2003) 0级与1级代表无明显细胞毒性, 2, 3, 4级代表具有细胞毒性且毒性依次增加。

**1.5 主要观察指标** 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架, 测试其力学性能、抗菌活性与细胞相容性。

**1.6 统计学分析** 使用SPSS 19.0软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用LDS-t 检验进行统计学分析,  $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 扫描电镜观察支架表面形貌** 纯壳聚糖支架和3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架均具有三维微孔样结构, 微孔分布较为均匀, 相互连通, 孔隙的形态大小不规则, 孔隙率高, 孔径主要在50-300  $\mu$ m之间, 适合成骨细胞的黏附和生长, 见图1。

2.2 支架表面硬度测试结果 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表面硬度高于纯壳聚糖支架( $P < 0.01$ ); 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表面硬度相似, 组间两两比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图2, 添加0.5%功能化多壁碳纳米管的复合支架表面硬度较纯壳聚糖支架提高了约12%, 说明功能化壁碳纳米管提高了复合支架的表面硬度, 制备的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架具有较好的力学性能, 而添加0.2%、1%、2%的锌对支架表面硬度无明显影响,

2.3 支架拉伸强度测试结果 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的拉伸强度明显大于纯壳聚糖支架( $P < 0.01$ ), 复合支架的拉伸强度较纯壳聚糖支架提高了约13%, 添加0.2%、1%、2%的锌对复合支架拉伸强度无明显影响, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的力学强度相似, 组间两两比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图3。

2.4 X射线衍射吸收光谱分析结果 壳聚糖有3个峰值对应2个晶体结构。壳聚糖的3个主要吸收峰值在 $8.5^\circ$ 、 $11.5^\circ$ 和 $22^\circ$ 附近, 所有的样品均包含这3个峰值, 证明了壳聚糖晶体的存在。功能化多壁碳纳米管的主要吸收峰值在 $25^\circ$ 和 $43^\circ$ 附近。 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 的主要吸收峰值在 $15^\circ$ 、 $18^\circ$ 、 $20^\circ$ 和 $22^\circ$ 附近。在3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架中没有观察到功能化多壁碳纳米管和 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 的特征吸收峰, 说明加入0.5%的功能化多壁碳纳米管和0.2%、1%、2%的 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 对支架主体壳聚糖的晶体结构没有明显影响, 4组材料具有相似的峰值, 见图4。

2.5 红外吸收光谱分析结果 功能化多壁碳纳米管在 $1635\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰对应-COOH基团, 在 $3446\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰对应-OH基团; 壳聚糖在 $3436\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰对应-OH基团,  $1517\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰对应-NH<sub>2</sub>基团; -COOH吸收峰在功能化多壁碳纳米管/壳聚糖中没有出现, 可能是功能化多壁碳纳米管的-COOH基团与壳聚糖的-NH<sub>2</sub>基团反应形成了新的酰胺键(CONH); 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架中, -NH<sub>2</sub>吸收峰与-OH吸收峰强度减弱, 说明-NH<sub>2</sub>基团和-OH基团可能与 $Zn^{2+}$ 发生了络合, 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架各组分间实现了一定程度的化学结合, 见图5。另外, 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架在水中是稳定的, 1个月的观察没有发现降解、分离和絮状沉淀。

2.6 抑菌圈实验结果 与纯壳聚糖支架相比, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径增大( $P < 0.01$ ), 说明载锌的复合支架对金黄色葡萄球菌具有更好的抑制作用, 随着支架中锌含量的增加, 复合支架对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径增大, 组间两两比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 说明随着支架中锌含量升高, 复合支架的抗菌作用增强; 与纯壳聚糖支架相比, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对大肠杆菌的抑菌圈直径增大( $P < 0.01$ ), 随着支架中锌含量增加, 复合支架对大肠杆菌的抑菌圈直径增大, 组间两两比较差异

有显著性意义( $P < 0.01$ ), 见表1, 说明制备的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对大肠杆菌具有一定的抗菌活性, 随着支架中锌含量增加, 复合支架对大肠杆菌的抗菌作用增强, 说明实验制备的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架具有较好的抗菌性能。

表1 复合支架对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌圈直径  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ , mm)  
Table1 The inhibition zone diameter of different scaffolds

组别	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
纯壳聚糖支架组	4.93±0.19	4.56±0.15
载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架		
含锌量 0.2%组	7.14±0.17 <sup>a</sup>	6.92±0.16 <sup>a</sup>
含锌量 1%组	9.74±0.16 <sup>ab</sup>	9.32±0.39 <sup>ab</sup>
含锌量 2%组	11.18±0.21 <sup>abc</sup>	10.70±0.25 <sup>abc</sup>

表注: 与纯壳聚糖支架比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与含锌量 0.2%组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与含锌量 1%组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

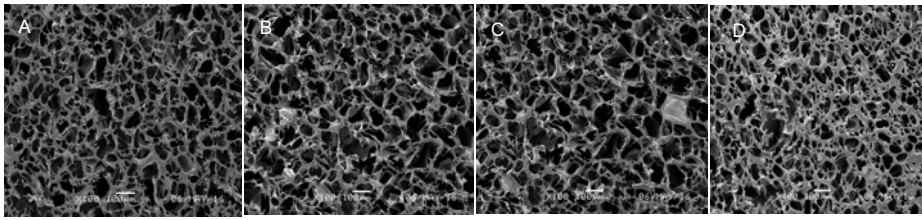
2.7 细胞毒性实验结果 培养的第1, 2, 3天, 含锌量0.2%、1%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架细胞相对增殖率均大于80%, 且含锌量1%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架培养第3天的细胞增殖率大于100%, 毒性评级为1或0; 培养的第1, 2, 3天, 含锌量2%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的细胞相对增殖率在50%~80%之间, 毒性评级为2, 见图6。这说明制备的含锌量0.2%、1%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对成骨细胞无明显毒性, 生物相容性良好, 适合于成骨细胞的黏附与增殖; 含锌量2%载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对成骨细胞有轻度毒性, 可能与支架中锌含量过高有关。

### 3 讨论 Discussion

骨组织工程优化设计的需要, 促使学者们研究更为理想的复合支架材料<sup>[27-28]</sup>。作为天然存在的高分子聚合物, 具有优异理化性能和生物学性能的壳聚糖在生物医学领域应用广泛<sup>[9]</sup>。壳聚糖与天然骨的细胞外基质结构非常相似, 可制作成各种结构, 如膜、纤维、三维多孔、水凝胶等用于骨科治疗, 满足骨组织工程的多数要求<sup>[29-30]</sup>, 是理想的骨组织工程支架材料<sup>[31-32]</sup>, 但其缺陷是机械强度较差<sup>[33-34]</sup>。

添加一些无机或有机材料到壳聚糖中, 可改善壳聚糖的力学性能, 使之更加适用于骨组织工程。Zhang等<sup>[35]</sup>制备了羟基磷灰石/壳聚糖支架, 研究发现羟基磷灰石/壳聚糖支架改善了壳聚糖支架的力学性能, 抗压强度增加了33%, 并且促进了小鼠成骨细胞MC3T3-E1的增殖。Puvanewary等<sup>[36]</sup>在磷酸三钙/壳聚糖支架中添加岩藻依聚糖生物复合支架, 增加了复合支架的抗压性能、磷灰石沉积和骨钙素的释放, 有利于人间充质干细胞在体外分化为成骨细胞。

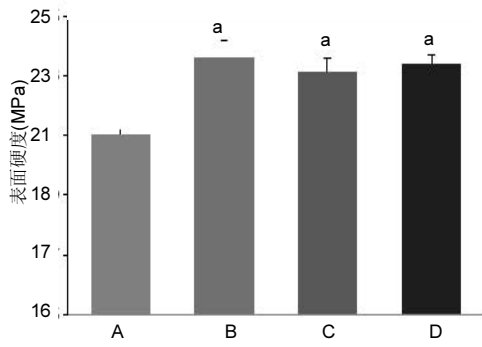
多壁碳纳米管力学性能非常优异, 被誉为“超级纤维”, 低毒, 具有可降解性, 近年来常被应用于提高复合支架的机械强度<sup>[37-38]</sup>。Pan等<sup>[39]</sup>研究了多壁碳纳米管/聚己内酯复



图注：图中 A 为纯壳聚糖支架，B-D 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。4 种支架均具有三维微孔样结构，微孔分布较为均匀，相互连通，孔隙的形态大小不规则，孔隙率高，孔径主要在 50-300 μm 之间。

图 1 扫描电子显微镜观察载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架表面形貌(×100)

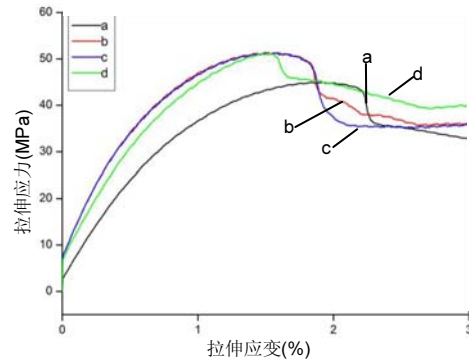
Figure 1 The surface topography of different functionalized multi-walled carbon nanotubes/chitosan-zinc composite scaffolds under scanning electron microscope (×100)



图注：图中 A 为纯壳聚糖支架，B-D 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。与纯壳聚糖支架比较， $aP < 0.01$ 。

图 2 不同支架材料的表面硬度比较

Figure 2 Surface hardness test of different scaffolds



图注：图中 a 为纯壳聚糖支架，b-d 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。

图 3 不同支架材料的应力-应变曲线

Figure 3 Tensile stress-strain curves of different scaffolds

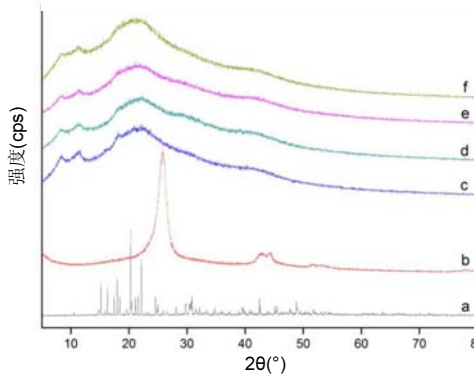


图 4 不同材料的 X 射线衍射光谱分析结果

Figure 4 X-ray diffraction spectra of different materials

图注：图中 a 为  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ，b 为功能化多壁碳纳米管，c 为壳聚糖，d-f 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。在 3 组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架中没有观察到功能化多壁碳纳米管和  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  的特征吸收峰。

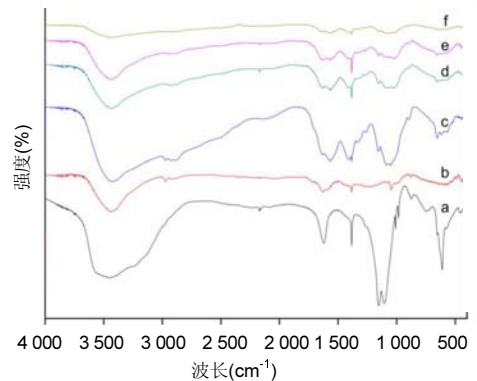


图 5 不同材料的红外吸收光谱分析结果

Figure 5 Fourier transform infrared spectra of different materials

图注：图中 a 为  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ，b 为功能化多壁碳纳米管，c 为壳聚糖，d-f 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。3 组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架中，-NH<sub>2</sub> 吸收峰与 -OH 吸收峰强度减弱，说明 -NH<sub>2</sub> 基团和 -OH 基团可能与  $Zn^{2+}$  发生了络合。

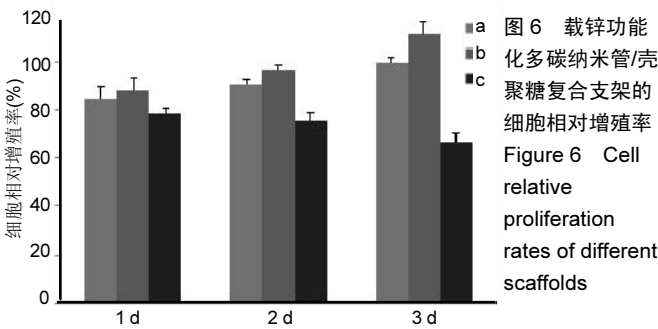


图 6 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的细胞相对增殖率

Figure 6 Cell relative proliferation rates of different scaffolds

图注：图中 a-c 分别为含锌量 0.2%、1%、2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。培养的第 1, 2, 3 天，含锌量 0.2%、1% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架细胞相对增殖率均大于 80%，且含锌量 1% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架培养第 3 天的细胞增殖率大于 100%，毒性评级为 1 或 0；培养的第 1, 2, 3 天，含锌量 2% 的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的细胞相对增殖率在 50%-80% 之间，毒性评级为 2。

合支架，发现含 0.5% 的功能化多壁碳纳米管时，复合支架的力学性能表现最好。Venkatesan 等<sup>[40]</sup>使用冷冻干燥法制备了分别含 0.002 5%、0.005% 和 0.01% 功能化多壁碳纳米管的功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架，具有较高孔隙率，三维多孔的功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架增强了 MG-63 细胞的黏附、分化性能和支架矿化性能，但其未对功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的力学强度进行探讨，推测可能是因为支架的功能化多壁碳纳米管含量较低，对复合支架力学性能改善不明显。Aryaei 等<sup>[41]</sup>制备了含多壁碳纳米管的壳聚糖混合膜，研究发现即使添加少量的多壁碳纳米管，多壁碳纳米管/壳聚糖混合膜的表面硬度、拉伸强度和弹性模量也会明显改善。但单纯的多壁碳纳米管缺少功能基团，在溶液中分散性较差，不容易在壳聚糖中分散均匀，同时多壁碳纳米管与壳聚糖的结合力也

较差。此次研究通过“混酸法”制备了功能化多壁碳纳米管, 在多壁碳纳米管中增加了-COOH、-OH等功能基团, 改善了其在溶液中的分散性, 使功能化多壁碳纳米管和携带有氨基基团的壳聚糖更好地结合, 然后以壳聚糖、功能化多壁碳纳米管与 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 为主要原料, 采用“溶液共混法”联合“冷冻干燥法”制备了载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架。扫描电镜观察显示制备的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架具有三维多孔结构, 孔隙率高, 同时具有合适的孔径大小, 可提供三维空间, 有利于支架内营养物质输送, 成骨细胞的黏附、增殖和新生血管的形成。表面硬度测试和拉伸强度测试结果显示: 载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的力学性能较纯壳聚糖支架提高明显, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架的表面硬度、拉伸强度分别提高了约12%、13% ( $P < 0.01$ ), 具有较好的支撑新骨形成能力。这与Aryaei等的研究结果相似。X射线衍射检测显示, 添加0.5%的功能化多壁碳纳米管对支架主体壳聚糖的晶体结构未产生明显影响。傅里叶红外光谱结果显示, 功能化多壁碳纳米管的功能基团和壳聚糖的带电基团具有分子间相互作用, 实现了一定的化学结合, 这与Aryaei等和Venkatesan等的研究结果一致。

骨组织植入物常伴有细菌感染并发症, 研究具有抗菌性能的骨组织移植是一个有效途径。掺杂抗菌金属离子(如锌和银等)可提高支架的抗菌性能。壳聚糖具有黏膜黏附性及可打开上皮紧密连接作用, 由于壳聚糖链上氨基和羧基的存在, 使其同时具有正负两性, 所以经常被用于负载治疗药物或生长因子。壳聚糖链上的-NH<sub>2</sub>和-OH对金属离子具有很强的结合能力<sup>[42-43]</sup>。同时碳纳米管对金属离子也具有较高的结合力<sup>[21]</sup>。李高清等<sup>[44]</sup>研制了含不同浓度纳米银的壳聚糖纳米银复合物基温敏水凝胶, 与未载银的水凝胶相比, 发现其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、阴沟肠杆菌、流感嗜血杆菌、白色念珠菌、滑念珠菌和克柔念珠菌等均具有明显的抑制作用, 且随着水凝胶中纳米银含量增加, 抑菌作用增强。锌是一种具有优异抗菌活性的金属<sup>[45-46]</sup>。Niranjan等<sup>[30]</sup>研究发现, 与不含锌的壳聚糖/ $\beta$ -甘油磷酸盐水凝胶相比, 含锌的壳聚糖/ $\beta$ -甘油磷酸盐水凝胶金黄色葡萄球菌抑菌圈[从(7.3±0.9)mm增大到(12.0±1.4)mm]及大肠杆菌抑菌圈明显增加[从(8.6±0.9)mm增大到(11.3±0.9)mm], 显示了对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌显著的抑制作用。此次研究利用壳聚糖及功能化多壁碳纳米管对金属离子的强结合力, 分别制备了含锌量0.2%、1%、2%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架, 抗菌实验结果表明与未含锌的支架相比, 3组载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有更好的抗菌活性( $P < 0.01$ ), 且随着支架中锌含量的增加, 支架的抑菌作用增强( $P < 0.01$ ), 与Niranjan等的研究结果一致。同时X射线衍射结果显示, 加入的锌未对支架主体壳聚糖的晶体结构产生明显影响, 支架保留了壳聚糖优异的理化性质和生物学性质。傅里叶红外光谱结果显示, 功能化多壁碳纳米管的功能基团和壳聚糖的带电基团与 $Zn^{2+}$ 实现了

络合。研究表明, 锌在合适浓度下可提高成骨细胞的增殖、黏附与扩散, 通过不同机制促进成骨同时抑制骨组织的吸收<sup>[47-48]</sup>。实验采用MTT法对载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架进行了细胞毒性实验, 结果显示: 含锌量0.2%、1%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架培养第1, 2, 3天的细胞相对增殖率均大于80%, 甚至含锌量1%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架在第3天的细胞相对增殖率大于100%, 毒性评级为1或0, 生物相容性良好; 含锌量2%的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架培养第1, 2, 3天的细胞相对增殖率在50%-80%之间, 毒性评级为2, 对成骨细胞具有轻度毒性, 这是因为锌浓度过高时, 反而会对成骨细胞的增殖具有抑制作用<sup>[49-50]</sup>。

综上所述, 此次研究制备的载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架复合支架结构稳定, 具有良好的微观结构、力学性能、较优的抗菌活性和良好的生物相容性, 后续将通过细胞实验和动物实验对载锌功能化多壁碳纳米管/壳聚糖复合支架复合支架的成骨性能进行进一步研究, 为其在临床中的应用打下良好基础。

**作者贡献:** 何东宁、张保平进行实验设计, 实验实施为杨霖、秦博恒, 实验评估为何东宁、张保平, 资料收集为杨霖、秦博恒, 杨霖成文, 何东宁审核。

**经费支持:** 该文章接受了“山西省卫生与计划生育委员会资助项目(2015112)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 研究用材料科学的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 杨霖对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Delawi D, Krut MC, Huipin Y, et al. Comparing autograft, allograft, and tricalcium phosphate ceramic in a goat instrumented posterolateral fusion model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013; 19(11):821-828.
- [2] 刘守应, 王继芳, 蔡语. 骨再生的研究进展[J]. 中国保健医学杂志, 2014, 16(1):67-70.
- [3] 杨毅, 毕鑫, 李多玉, 等. 人工骨材料修复骨缺损: 多种复合后的生物学与力学特征[J]. 中国组织工程研究, 2014, 16(18):2582-2587.
- [4] Rezvani Z, Venugopal JR, Urbanska AM, et al. A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directions and future trends. *Nanomedicine*. 2016; 12(7):2181-2200.
- [5] 夏琰, 周潘宇, 许硕贵. 生物材料与支架在骨组织工程领域的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2012, 7(5):516-519.
- [6] 李吉鹏, 邓国英, 赵庆华. 种子细胞-支架复合体在骨组织修复中的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(20):1857-1860.

- [7] Billström GH, Blom AW, Larsson S, et al. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S28-33.
- [8] Kosuge D, Khan WS, Haddad B, et al. Biomaterials and scaffolds in bone and musculoskeletal engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013;8(3):185-191.
- [9] Pighinelli L, Kucharska M. Chitosan-hydroxyapatite composites. *Carbohydr Polym*. 2013;93(1):256-262.
- [10] Sowjanya JA, Singh J, Mohita T, et al. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;109:294-300.
- [11] Calderón L, Harris R, Córdoba-Díaz M, et al. Nano and microparticulate chitosan-based systems for antiviral topical delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(1-2):216-222.
- [12] Gao C, Cai Y, Kong X, et al. Development and characterization of injectable chitosan-based hydrogels containing dexame thasone/rhBMP-2 loaded hydroxyapatite nanoparticles. *Mater Lett*. 2013;93(1):312-315.
- [13] Jiang T, Deng M, James R, et al. Micro-and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomater*. 2014;10(4):1632-1645.
- [14] Edwards SL, Werkmeister JA, Ramshaw JA, et al. Carbon nanotubes in scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(5):499-505.
- [15] Sahoo NG, Pan YZ, Li L, et al. Nanocomposites for bone tissue regeneration. *Nanomedicine*. 2013;8(4):639-653.
- [16] Laurencin CT, Nukavarapu SP, Kumbhar SG. Carbon nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering :USA, US20090586345[P]. 2009-09-21.
- [17] Zdenko S, Dimitrios T, Konstantinos P, et al. Carbon nanotube-polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Prog Polym Sci*. 2010;35:357-401.
- [18] Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, et al. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*. 2008;29(1):94-102.
- [19] Ji Z, Lin G, Lu Q, et al. Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer in vitro and in vivo with carbon nanotubes based drug delivery system. *J Colloid Interface Sci*. 2012;365(1):143-149.
- [20] Ma Y, Zhou T, Zhao C. Preparation of chitosan-nylon-6 blended membranes containing silver ions as antibacterial materials. *Carbohydr Res*. 2008;343(2):230-237.
- [21] 王昕, 张春丽, 任广军, 等. 碳纳米管吸附去除水溶液中锌离子的性能 [J]. *电镀与精饰*, 2008, 30(10):4-6.
- [22] Hu H, Zhang W, Qiao Y, et al. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> coatings on titanium. *Acta Biomater*. 2012;8(2):904-915.
- [23] Niranjana R, Koushik C, Saravanan S, et al. A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ $\beta$ -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2013; 54:24-29.
- [24] Applerot G, Lipovsky A, Dror R, et al. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. *Adv Funct Mater*. 2009;19:842-852.
- [25] Nagata M, Lönnedal B. Role of zinc in cellular zinc trafficking and mineralization in a murine osteoblast-like cell line. *J Nutr Biochem*. 2011;22(2):172-178.
- [26] Qiao Y, Zhang W, Tian P, et al. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials. *Biomaterials*. 2014;35(25): 6882-6897.
- [27] 袁景, 甄平. 骨组织工程支架的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(12): 2126-2130.
- [28] 徐大朋, 王绪凯. 骨组织工程支架研究进展[J]. *中国实用口腔杂志*, 2014, 7(3):177-181.
- [29] Jiang T, James R, Kumbhar SG, et al. Chitosan as a biomaterial: structure, properties and applications in tissue engineering and drug delivery. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. 2014; 5:91-113.
- [30] Niranjana R, Koushik C, Saravanan S, et al. A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ $\beta$ -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2013; 54:24-29.
- [31] Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:821279.
- [32] 年争好, 孙凯, 李瑞欣. 组织工程骨研究背景与进展[J]. *中华损伤与修复杂志:电子版*, 2013, 8(5):525-528.
- [33] Muzzarelli RA, Greco F, Busilacchi A, et al. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. *Carbohydr Polym*. 2012;89(3):723-739.
- [34] 赵易尔, 金丹. 壳聚糖复合材料在骨组织工程中的应用[J]. *基因组学与生物学*, 2015, 34(4):842-848.
- [35] Zhang BG, Myers DE, Wallace GG, et al. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):11878-11921.
- [36] Puvaneswary S, Talebian S, Raghavendran HB, et al. Fabrication and in vitro biological activity of  $\beta$ TCP-Chitosan-Fucoidan composite for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2015; 134:799-807.
- [37] Nanda Gopal Sahoo, Yong Zheng Pan, Lin Li, et al. Nanocomposites for bone tissue regeneration. *Nanomedicine*. 2013;8(4):639-653.
- [38] Edwards SL, Werkmeister JA, Ramshaw JA, et al. Carbon nanotubes in scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6(5):499-505.
- [39] Pan L, Pei X, He R, et al. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;93:226-234.
- [40] Venkatesan J, Ryu B, Sudha PN, et al. Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012;50(2):393-402.
- [41] Aryaei A, Jayatissa AH, Jayasuriya AC. Mechanical and biological properties of chitosan/carbon nanotube nanocomposite films. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(8):2704-2712.
- [42] 欧阳明, 丁纯梅, 肖莎, 等. 壳聚糖及Zn<sup>2+</sup>模板壳聚糖膜与Zn<sup>2+</sup>螯合反应的动力学及机理探讨[J]. *化学世界*, 2006, 47(7):388-394.
- [43] Ma Y, Zhou T, Zhao C. Preparation of chitosan-nylon-6 blended membranes containing silver ions as antibacterial materials. *Carbohydr Res*. 2008;343(2):230-237.
- [44] 李高青, 桑青, 崔凯. 壳聚糖纳米银复合物基温敏水凝胶的抑菌性及细胞相容性研究[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(6):63-66.
- [45] Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, et al. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Nano-Hydroxyapatite-Zinc for Bone Tissue Engineering Applications. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012; 12(1):167-172.
- [46] Tripathi A, Saravanan S, Pattnaik S, et al. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/ nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012;50(1):294-299.
- [47] Jin G, Cao H, Qiao Y, et al. Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;117:158-165.
- [48] Qiao Y, Zhang W, Tian P, et al. Stimulation of bone growth following zinc incorporation into biomaterials. *Biomaterials*. 2014;35(25): 6882-6897.
- [49] 余增丽, 李云, 郑艾. 锌对体外培养小鼠胎鼠前肢骨发育的影响[J]. *中华预防医学杂志*, 2002, 36(2):97-99.
- [50] 马丽英, 李灵芝, 李云, 等. 锌缺乏和过量对小鼠胚胎体外骨形成的影响[J]. *营养学报*, 2000, 22(1):18-21.