

# 纳米羟基磷灰石-壳聚糖骨组织工程支架的研究

王新<sup>1</sup> 刘玲蓉<sup>1</sup> 张其清<sup>1,2</sup>

**摘要】** 目的 以一种简单、有效的方法制备多孔的纳米羟基磷灰石(nano hydroxyapatite, nano-HA)-壳聚糖(chitosan, CS)复合支架,并评价其理化性能及与细胞相容性。方法 采用原位复合-冷冻干燥方法,制备多孔 nano-HA-CS 支架。通过扫描电镜、透射电镜、X 线衍射和傅立叶红外光谱分析支架的微观形貌及材料的组成。分离初生 Wistar 大鼠的成骨细胞,取传代培养第 3 代细胞分别与 nano-HA-CS 支架和纯 CS 支架共培养 2、4、6、8 h,各时间点各取 4 个样品,测定细胞在支架上的黏附率,并通过组织化学染色、扫描电镜观察细胞形态。结果 nano-HA-CS 复合支架具有多孔结构,孔径为 100~500  $\mu\text{m}$ ,大多数孔径为 400~500  $\mu\text{m}$ 。具有很高的孔隙率,随 CS 和 HA 含量的增加,孔隙率明显降低,密度升高。扫描电镜和透射电镜观察显示合成的 HA 晶体,晶粒大小为纳米级,在支架孔壁上均匀、连续分布如“铺路石”样。X 线衍射和红外光谱分析表明合成的 HA 是含  $\text{CO}_3^{2-}$  弱结晶纳米晶体。细胞相容性实验显示,成骨细胞在支架上黏附、增殖,并分泌纤维状细胞外基质;在复合支架上的黏附率明显高于纯 CS 支架。结论 采用原位复合与冷冻干燥法结合制备的 nano-HA-CS 复合支架具有良好的理化性质和细胞相容性,有望应用于组织工程骨的构建。

**关键词】** 纳米羟基磷灰石 壳聚糖 骨组织工程 支架

中图分类号: R318.08 Q813 文献标识码: A

A STUDY ON NANO-HYDROXYAPATITE-CHITOSAN SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING/WANG Xin, LIU Lingrong, ZHANG Qiqing. Institute of Biomedical Engineering, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin, 300192, P. R. China. E-mail: wangxinoneone@126.com

Corresponding author: ZHANG Qiqing, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

**Abstract】 Objective** To fabricate a nano-hydroxyapatite-chitosan (nano-HA-CS) scaffold with high porosity by a simple and effective technique and to evaluate the physical and chemical properties and the cytocompatibility of the composite scaffold. **Methods** The three-dimensional nano-HA-CS scaffolds with high porosity were prepared by the in situ hybridization-freeze-drying method. The microscopic morphology and components of the composite scaffolds were analyzed by the scanning electron microscopy (SEM), the transmission electron microscopy (TEM), the X-ray diffraction (XRD) examination, and the Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR). The calvarial osteoblasts were isolated from the neonatal Wistar rats. The serial subcultured cells (3rd passage) were respectively seeded onto the nano-HA-CS scaffold and the CS scaffold, and then were co-cultured for 2, 4, 6 and 8 hours. At each time point, four specimens from each matrix were taken to determine the cell-adhesion rate. The cell morphology was observed by the histological staining and SEM. **Results** The macroporous nano-HA-CS scaffolds had a feature of high porosity with a pore diameter from 100 to 500  $\mu\text{m}$  (mostly 400-500  $\mu\text{m}$ ). The scaffolds had a high interval porosity; however, the interval porosity was obviously decreased and the scaffold density was increased with an increase in the contents of CS and HA. The SEM and TEM results showed that the nano-sized HA was synthesized and was distributed on the pore walls homogeneously and continuously. The XRD and FTIR results showed that the HA crystals were carbonate-substituted and not well-crystallized. The cytocompatibility test showed that the seeded osteoblasts could adhere to the scaffolds, proliferating and producing the extracellular matrix on the scaffolds. The adherence rate for the nano-HA-CS scaffolds was obviously higher than that for the pure CS scaffolds. **Conclusion** The nano-HA-CS scaffolds fabricated by the in situ hybridization-freeze-drying method have a good physical and chemical properties and a good cytocompatibility; therefore, this kind of scaffolds may be successfully used in the bone tissue engineering.

**Key words】** Nano hydroxyapatite Chitosan Bone tissue engineering Scaffold

**Foundation item:** Program of Tianjin for Tackling Hard-nut Problems in Science and Technology (05YFGZGX03800)

基金项目:天津市科技攻关项目资助项目(05YFGZGX03800)

作者单位:1 中国医学科学院 中国协和医科大学生物医学工程研究所 天津市生物医学材料重点实验室(天津,300192);2 厦门大学生物医学工

程研究中心 厦门大学医学院 厦门市生物医学工程技术研究中心

通讯作者:张其清,教授,博士生导师,研究方向:组织引导再生, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

具有多孔结构的三维支架是组织工程中的重要研究内容。理想的骨组织工程支架应该能模拟骨组织的形态、结构和功能<sup>[1]</sup>。壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然可降解多糖,生物相容性好,塑形容易,已广泛应用于组织工程研究<sup>[2]</sup>。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)是骨组织的成分。纳米HA(nano-HA)除了具有传统HA的特性外,在理化性质和生物学方面有更大的优越性<sup>[3,4]</sup>。为了结合CS和HA两种材料的优点,现在常把两种材料复合以得到具有更好性能的材料<sup>[5]</sup>。传统的方法是将HA粉体与CS溶液共混,但是nano-HA存在易聚集、分散困难的缺点。原位复合的方法,是采用预先配制均一的HA前体-CS反应体系,然后在强碱溶液中缓慢反应,制备的nano-HA-CS棒材具有多层结构,nano-HA可均匀分散在复合材料中<sup>[6]</sup>。但是这种材料不具有细胞迁移、生长所必需的多孔结构。我们通过将原位复合和冷冻干燥的方法相结合,合成了新型nano-HA-CS多孔支架,并对其进行了理化性质和细胞相容性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

CS(浙江金壳生物化学有限公司,黏均分子量 $5.95 \times 10^5$ ,脱乙酰度90.75%); $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH(分析纯,天津大学科威公司);HA粉体(四川新津县马龙化工厂); $\alpha$ -MEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(Hyclone公司,美国);0.25%胰蛋白酶(Sigma公司,美国)。JSM-6700F型扫描电镜、JEM-100CX型透射电镜(JEOL公司,日本);DMAX/2500/PC型X线衍射仪(Rigaku公司,日本);FTS3000型傅立叶红外光谱(BIO-RAD公司,美国)。

### 1.2 nano-HA-CS复合支架制备

按参考文献[6]方法,分别称取一定质量的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和CS溶解在2.0%的乙酸溶液中并充分搅拌,最终配成一定浓度和质量比的nano-HA-CS前体溶液(CS浓度,CS-HA理论生成量质量比:CS 1.0%,CS-HA 1:1;CS 1.0%,CS-HA 1:2;CS 2.0%,CS-HA 2:1;CS 2.0%,CS-HA 2:2;CS 3.0%,CS-HA 3:1),离心去气泡。预先用少量溶液注入模具,在模具内沉积一层CS膜;然后用配制的混合液注满容器,将容器置入4.0% NaOH溶液中,室温下反应。10 h后将反应所得的凝胶体浸入去离子水,浸泡至中性,除去残留的NaOH。将清洗后的凝胶体放入-30℃低温冰箱预冻6 h,然后进行冷冻干燥,制得多孔支架。

### 1.3 nano-HA-CS支架材料的物理化学性能表征

**1.3.1 支架形态学观察** 将支架用利刀切开,以显示内部结构,喷金镀膜后在JSM-6700F型扫描电镜下观察其微观形貌,JEM-100CX型透射电镜观察HA晶体颗粒大小和分布。

**1.3.2 支架孔隙率、密度测定** 采用液体置换法测定<sup>[7]</sup>,用量筒量取 $V_1$ 体积的无水乙醇,取一定质量(W)的支架浸入其中,反复抽真空至无气泡逸出,此时量筒读数是 $V_2$ ,将含乙醇的支架材料移出后记所剩乙醇体积为 $V_3$ ,支架孔隙率(P)可用下式计算: $P = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3)$ ,支架的密度 $d = W / (V_2 - V_3)$ ,每种样品测6个。

**1.3.3 支架化学性质分析** DMAX/2500/PC型X线衍射仪、FTS3000型傅立叶红外光谱分析材料的组成和结晶结构。

### 1.4 细胞相容性实验

**1.4.1 细胞-支架共培养** 取大小为 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 的nano-HA-CS支架(CS 1%, HA-CS 1:1)和纯CS支架酒精消毒后备用。提取初生Wistar大鼠颅成骨细胞(天津利居生物制品供应中心),并进行传代培养至第3代。细胞汇合后,经胰酶消化、培养基稀释,形成密度为 $1.0 \times 10^5 / \text{ml}$ 的细胞悬液。取细胞悬液均匀接种于两种支架上,置于 $37^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养5 d。 $\alpha$ -MEM+10%胎牛血清培养液每2天更换1次。

**1.4.2 成骨细胞在支架上的细胞黏附率检测** 细胞-支架复合物共培养2、4、6、8 h,分别在每个时间点取出复合支架和纯CS支架各4个样品,PBS液冲洗3次,用细胞计数板计算黏附细胞的百分率<sup>[8]</sup>。

**1.4.3 细胞形态观察** 将培养5 d的样品经过固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE染色后,在光镜下观察。经过2.5%的甲醛固定和1.0%的锇酸二次固定,梯度酒精逐级脱水,真空干燥、喷金后在扫描电镜下观察细胞形态。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件包进行分析,数据以均值 $\pm$ 标准差表示。组间比较采用方差分析,组内两两比较采用独立样本 $t$ 检验, $P$ 值 $< 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 nano-HA-CS支架的形态及孔隙率

扫描电镜观察复合支架具有多孔结构(图1 a~c),孔径为 $100 \sim 500 \mu\text{m}$ ,大多数孔径为 $400 \sim 500 \mu\text{m}$ 。支架孔内无HA晶体聚集,孔壁上有大量细小的HA晶体连续、均匀分布,犹如“铺路石”状紧密镶嵌在孔壁上

(图1 d)。支架具有很高的孔隙率,而随着CS和HA含量的增加,支架的孔壁增厚,孔隙率降低,密度升高,见表1。支架的密度、CS和HA总含量不同的支架,两两比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。支架孔隙率比较,支架(CS 1.0%, CS-HA 1 1)与支架(CS 2.0%, CS-HA 2 1; CS 2.0%, CS-HA 2 2; CS 2.0%, CS-HA 3 1)比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。透射电镜观察,可见大量的HA晶体包裹于CS的基体中,晶体呈球形,直径为60 nm左右,在基体中分散良好(图2)。

表1 nano-HA-CS 支架的密度与孔隙率( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Density and interval porosity of the nano-HA-CS scaffolds ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

CS 浓度 (%) Concentration of CS (%)	CS-HA 比例 CS-HA ratio (W W)	密度 ( $g/cm^3$ ) Density ( $g/cm^3$ )	孔隙率 (%) Interval porosity (%)
3.0	3 1	0.091 ± 0.008	88.3 ± 4.3*
2.0	2 2	0.096 ± 0.009	87.6 ± 4.2*
2.0	2 1	0.069 ± 0.012	89.4 ± 7.2*
1.0	1 2	0.072 ± 0.006	90.2 ± 3.2
1.0	1 1	0.049 ± 0.005	92.9 ± 3.0

\* 与支架(CS 1.0%, CS-HA 1 1)比较  $P$  值  $< 0.05$

\* Compared with the scaffold (CS 1.0%, CS-HA 1 1),  $P < 0.05$

## 2.2 nano-HA-CS 支架化学性质分析

X 线衍射分析见图3。在复合支架衍射谱中可明显见到与HA特征衍射峰位置相对应的衍射峰。但与HA粉末的衍射谱比较,复合支架的衍射峰峰形明显变宽,峰位重叠。随CS-HA含量和比例的变化,各衍射峰的强度也不同。在复合支架的红外光谱中(图4),除可见HA中 $PO_4^{3-}$ 、 $OH^-$ 的特征吸收峰外,在 $1420\text{ cm}^{-1}$ 附近还出现了 $CO_3^{2-}$ 的吸收峰。而相对于纯CS谱图,CS酰胺谱带( $1655\text{ cm}^{-1}$ )和酰胺谱带( $1596\text{ cm}^{-1}$ )的吸收峰在复合支架的谱图中向低波数方向偏移。CS-HA含量和比例不同的支架特征吸收峰的强度也不同。

## 2.3 细胞相容性实验

细胞-支架复合物共培养4、6、8 h,成骨细胞在nano-HA-CS复合支架上的黏附率分别为 $24.25\% \pm 2.88\%$ 、 $35.51\% \pm 3.81\%$ 和 $67.63\% \pm 3.63\%$ ,均明显高于在纯CS支架上的黏附率 $15.34\% \pm 2.81\%$ 、 $22.84\% \pm 3.02\%$ 和 $46.04\% \pm 3.62\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。成骨细胞与支架复合培养5 d,组织切片HE染色可见梭形的成骨细胞,核为圆形,黏附生长于支架孔内(图5)。扫描电镜观察可见大量梭形、多角形的成骨细胞黏附于材料表面,另有大量成骨细胞开始分泌纤维状细胞外基质,包裹于基质中的成骨细胞呈球形(图6)。

## 3 讨论

组织工程的目的是运用生命科学和工程科学的原理和方法,研究、开发具有修复或改善组织或器官功能的新一代临床应用取代物,用于替代组织或器官的一部分或全部功能<sup>[9]</sup>。骨组织工程为因外伤、骨肿瘤、骨病等造成的骨缺损修复提供了一条新的解决途径。支架、种子细胞、生物活性因子,是组织工程中的关键因素。支架作为种子细胞的细胞外基质,新形成的组织框架,其性质直接影响细胞的黏附、增殖和分化等生物学特性,最终影响组织构建。骨组织工程支架材料的要求:应具有一定机械强度,为新生组织提供支撑;具有一定骨传导性,有利于临近正常骨组织爬行替代;具有良好的生物相容性,有利于细胞黏附和生长;具有良好的生物降解性,能随新骨形成,逐渐被骨组织替代<sup>[10]</sup>。结合两种材料的优点,CS-HA复合材料可以更好满足上述要求。另外,组织工程支架应具有三维多孔结构,一定孔径孔隙率的支架是细胞与周围环境进行营养物质交换,促进骨组织再生、修复的必要条件<sup>[11]</sup>。CS-HA复合材料可以通过冷冻干燥法、粒子沥滤法等,制备成多孔支架。其中,冷冻干燥法以水为致孔剂,无有机溶剂残留,且简单、可控,具有一定的优越性。

骨是一种复杂的生物矿化体系。生理状态的HA晶体极小,尺度在纳米级,以有机质形成的网络为模板有规律的沉积,形成连续的、有支持力的结构<sup>[12]</sup>。因此,从仿生学的角度看,应当保持骨组织替代材料中HA在纳米状态。我们的实验通过把原位复合与冷冻干燥的方法相结合,解决了传统方法nano-HA在基体中的分散问题,制备了高孔隙率,大孔nano-HA-CS支架。在原位复合反应中,预先形成的CS膜具有半透膜作用,可以使 $-OH$ 向内缓慢渗透,进而控制CS沉积和HA形成两个反应有序进行,同时CS可以起到模板的作用指导HA的沉积,最终形成nano-HA分散均匀的复合物凝胶<sup>[6]</sup>。再通过预冻、冰晶致孔,冷冻干燥最终制成多孔支架。

制备的复合支架保持了很高的孔径和孔隙率,表明大量HA晶体的形成并未影响支架的孔结构,这有利于氧气和营养物质的供应、细胞的迁移、增殖和分化<sup>[11]</sup>。有机质对矿物质沉积有指导作用,扫描电镜和透射电镜可观察到,复合支架的孔壁上有大量纳米级的HA晶体,按CS形成的框架有序沉积,彼此连接,与CS基体结合紧密,晶体大小与骨组织中的磷灰石类似。nano-HA-CS支架中HA的X线衍射峰峰形变宽,峰位重叠,是因为形成的HA晶粒在纳米级,且呈弱结

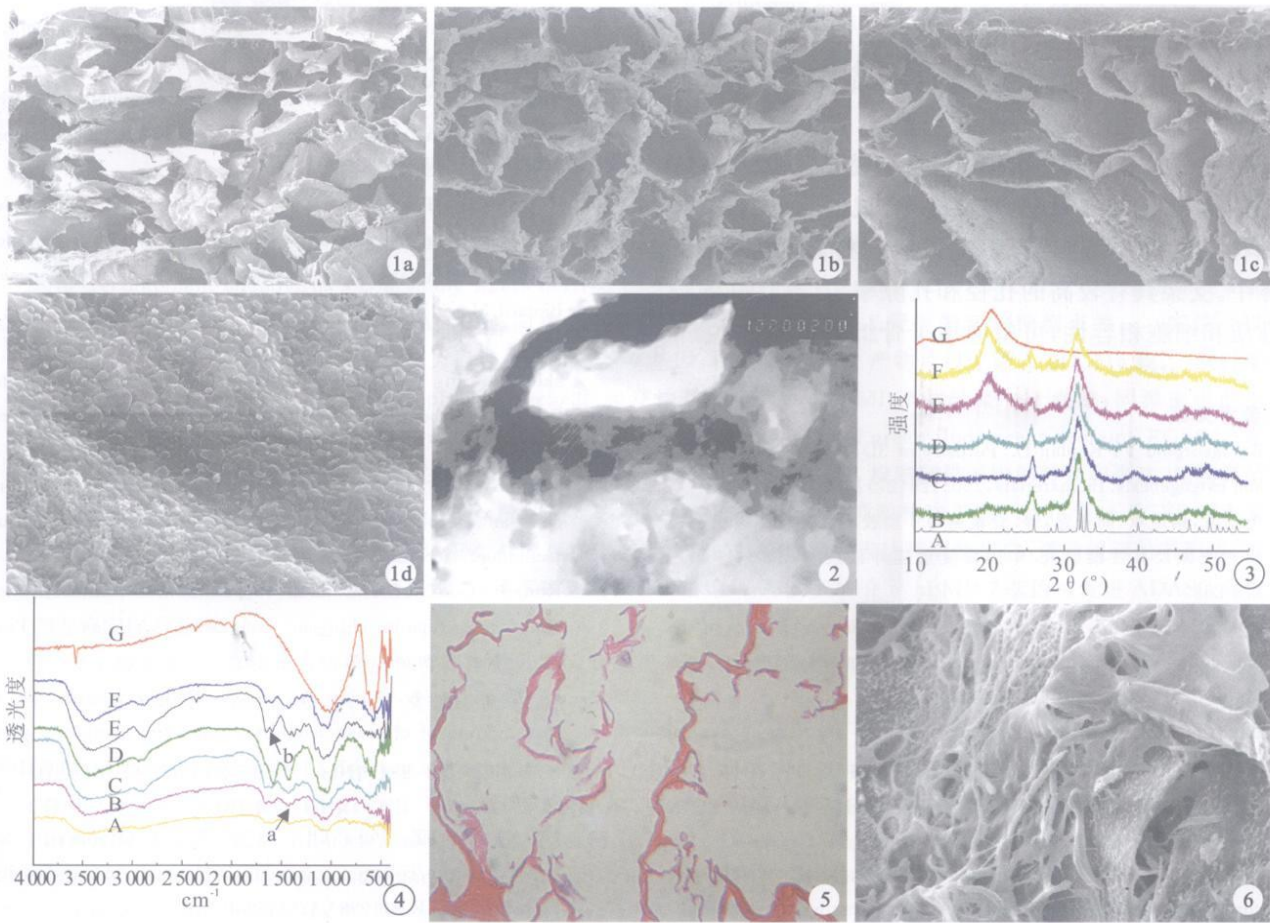


图1 扫描电镜观察 nano-HA-CS 支架的微观形貌 a CS 1.0%, CS-HA 1 1 (×50) b CS 1.0%, CS-HA 1 2 (×50) c CS 2.0%, CS-HA 2 2 (×50) d 支架孔壁上的 HA 晶体连续、均匀分布,如“铺路石”状(×10 k) 图2 透射电镜观察 nano-HA-CS 支架 (CS 1.0%, CS-HA 1:1) 的微观形貌 (×100 k) 图3 nano-HA-CS 支架的 X 线衍射谱图 A: HA B: CS 1.0%, CS-HA 1 1 C: CS 1.0%, CS-HA 1 2 D: CS 2.0%, CS-HA 2 2 E: CS 2.0%, CS-HA 2 1 F: CS 3.0%, CS-HA 3 1 G: CS 图4 nano-HA-CS 支架的红外光谱分析 A: CS 2.0%, CS-HA 2 1 B: CS 3.0%, CS-HA 3 1 C: CS 1.0%, CS-HA 1 2 D: CS 1.0%, CS-HA 1 1 E: CS F: CS 2.0%, CS-HA 2 2 G: HA a: CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 的吸收峰 b: CS 酰胺 谱带和酰胺 谱带 图5 成骨细胞与支架共培养5 d 的组织切片观察 (HE × 400) 图6 成骨细胞与支架共培养 5 d 的扫描电镜观察 (× 500)

Fig. 1 Microscopic morphology of the nano-HA-CS scaffold a CS 1.0%, CS-HA 1 1 (×50) b CS 1.0%, CS-HA 1 2 (×50) c CS 2.0%, CS-HA 2 2 (×50) d The nano-HA crystals distributed on the pore walls homogeneously and continuously (×10 k) Fig. 2 The TEM image of the nano-HA-CS scaffold (CS%: 1.0%, CS-HA: 1 1, TEM ×100 k) Fig. 3 The XRD patterns for the nano-HA-CS scaffold A: HA B: CS 1.0%, CS-HA 1 1 C: CS 1.0%, CS-HA 1 2 D: CS 2.0%, CS-HA 2 2 E: CS 2.0%, CS-HA 2 1 F: CS 3.0%, CS-HA 3 1 G: CS Fig. 4 The FTIR spectra for the nano-HA-CS scaffold A: CS 2.0%, CS-HA 2 1 B: CS 3.0%, CS-HA 3 1 C: CS 1.0%, CS-HA 1 2 D: CS 1.0%, CS-HA 1 1 E: CS F: CS 2.0%, CS-HA 2 2 G: HA a: CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> derived bands b: Bands of amide and amide Fig. 5 The histological section observation on the osteoblasts co-cultured with the scaffold for 5 days (HE × 400) Fig. 6 The SEM observation on the osteoblasts co-cultured with the scaffold for 5 days (× 500)

晶状态的原因<sup>[13]</sup>; 红外光谱中出现的 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 的吸收峰表明合成的是含碳酸纳米晶体<sup>[14]</sup>, 其特点与骨组织中 HA 结构类似。复合支架红外光谱中 CS 的酰胺 谱带和酰胺 谱带向低波数方向移动表明, 在原位复合反应过程中 HA 和 CS 两种分子间产生了化学作用, 可能是 CS 中的 -NH<sub>2</sub> 与 HA 中的 -OH 之间的氢键作用以及 -NH<sub>2</sub> 和 Ca<sup>2+</sup> 之间的螯合作用引起的<sup>[15]</sup>, 该作用能使 CS 基体与 HA 晶体结合更加牢固, 有效限制 HA 颗粒移位。纳米晶体巨大的比表面积, 具有晶格缺陷的含

CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 弱晶体结构, 该特点使支架中的 nano-HA 更易在生理状态下溶解, 从而提高材料周围局部的 Ca、P 离子浓度, 有利于在材料表面形成类骨磷灰石层, 而表面形成富 Ca-P 层和类骨磷灰石层是支架材料植入体内后形成骨键合的关键因素<sup>[16,17]</sup>。细胞相容实验的结果表明, 成骨细胞能很好地在复合支架上黏附、增殖, 表达细胞功能, 比在纯 CS 支架上具有更高的细胞黏附率, 更有利于成骨细胞黏附, 这些结果可能与以下因素有关: 含 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 弱结晶 HA 生物相容性好; 纳米晶体晶

粒细小、数量多,增加了材料表面的粗糙程度;晶粒表面积巨大,处于晶粒表面的原子多,有利于与细胞黏附相关蛋白的相互作用,从而更有利于成骨细胞黏附<sup>[18]</sup>。

研究表明,采用原位复合与冷冻干燥的方法相结合制备的 nano-HA-CS 支架,合成的 nano-HA 与骨结构中的 HA 结构类似,并可以很好地分散在 CS 基体中。支架具有较高的孔径和孔隙率,具有良好的物化性质和细胞相容性,可望应用于骨组织工程。

4 参考文献

- 1 Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5474-5491.
- 2 史德海,蔡道章,周长忍,等.壳聚糖与型胶原复合制作组织工程软骨支架及其性能研究. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(4): 278-282.
- 3 Huang J, Best SM, Bonfield W, et al. *In vitro* assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*, 2004, 15(4): 441-445.
- 4 Pezzatini S, Solito R, Morbidelli L, et al. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(3): 656-663.
- 5 Zhang Y, Ni M, Zhang M, et al. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng*, 2003, 9(2): 337-345.
- 6 Hu Q, Li B, Wang M, et al. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 2004, 25(5): 779-785.
- 7 Zhang R, Ma PX. Poly(alpha-hydroxy acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(4): 446-455.
- 8 Zhang L, Hum M, Wang M, et al. Evaluation of modifying collagen matrix with RGD peptide through periodate oxidation. *J*

- Biomed Mater Res*, 2005, 73(4): 468-475.
- 9 Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science, 1993, 260(5110): 920-926.
- 10 Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998, 16(5): 224-230.
- 11 Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 1998, 39(2): 190-199.
- 12 Marks Jr SC, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002: 3-15.
- 13 Manjubala I, Scheler S, Bossert J, et al. Mineralisation of chitosan scaffolds with nanoapatite formation by double diffusion technique. *Acta Biomater*, 2006, 2(1): 75-84.
- 14 Kong L, Gao Y, Cao W, et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 75(2): 275-282.
- 15 Li Z, Yubao L, Aiping Y, et al. Preparation and *in vitro* investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J Mater Sci Mater Med*, 2005, 16(3): 213-219.
- 16 Du C, Cui FZ, Feng QL, et al. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J Biomed Mater Res*, 1998, 42(4): 540-548.
- 17 Du C, Cui FZ, Zhu XD, et al. Three-dimensional nano-HA/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(4): 407-415.
- 18 Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 2006, 27(14): 2798-2805.

(收稿: 2006-12-07 修回: 2006-12-15)

(本文编辑: 王雁)

· 信 息 ·

第一届全国膝关节稳定性重建新进展学习班通知

由中华医学会骨科分会主办、上海市第六人民医院关节镜外科承办的第一届全国膝关节稳定性重建新进展学习班将于2007年4月3日~8日在上海举行。本学习班内容包括前交叉韧带损伤、后交叉韧带损伤、膝关节后外侧韧带结构损伤、膝关节后内侧韧带结构损伤和髌股关节不稳的最新治疗技术,以及计算机导航韧带重建、交叉韧带翻修手术和膝关节稳定性重建术后康复等内容,本学习班采用理论授课、手术示教和模拟操作的方式进行,适合骨科、运动医学科、康复科医师参加。

本学习班为国家级继续教育项目,限学员40名,完成学业者将获得国家级继续教育 类学分12分。报名截止日期:2007年3月20日。联系地址:上海市徐汇区宜山路600号,上海市第六人民医院关节镜外科;联系人:皇甫小桥;邮政编码:200233。联系电话:021-64369181-8091, 8092; 1374339076。E-mail: sh6thph@163.com。