DOI:10.16016/j.1000-5404.201508035

新型 α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料理化特性研究

杨晓勇[1,2],徐永清[2],唐 辉[2],王 毅[2],夏成琼[3],姚培恒[2],汤 逊[2] (400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[1]; 650032 昆明,成都军区昆明总医院:骨科,全军骨科中心[2],耳鼻喉科[3])

[摘要] **目的** 使用不同复合工艺制备 α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料,与 WRIGHT 公司生产的硫酸钙 Osteoset 进行理化特性和生物相容性的比较。**方法** 对不同工艺制备的 α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料(根据工艺不同分为 A、B 组)及 Osteoset(C 组),进行 X 射线衍射分析、微观形貌观察及体外细胞毒性实验、溶血实验、热原反应检测,同时对人工骨材料进行肌肉包埋实验,对 3 种材料进行对比研究。**结果** X 线衍射分析显示,各组材料出现各自的特征性衍射峰,未出现新的衍射峰;透射电镜微观形态观察提示,各组均呈现较多相互联通的平行的大孔结构,孔隙分布均匀,孔隙结构之间贯通性良好,晶体结构形态相对均匀一致等特点。体外细胞毒性实验提示:A、B、C 组各时间点 RGR 值均大于 75%,各实验组毒性分级为Ⅰ级,阴性对照组毒性级别为 0 级,阳性对照组毒性级别为Ⅳ级。溶血实验示:A 组、B 组、C 组平均溶血率为分别为 0.95%、2.22%、1.05%。热原实验示:A 组各时间点体温升高 0.2 ℃,体温升高总和为 0.4 ℃;B 组各时间点体温升高 0.1 ~0.2 ℃,体温升高总和为 0.3 ℃;C 组各时间点体温升高 0.1 ~0.2 ℃,体温升高总和为 0.3 ℃。各实验组体温升高均小于 0.6 ℃,体温升高总和小于 1.3 ℃。人工骨材料肌肉包埋,组织学检查显示肌纤维组织生长结构正常,无明显炎症细胞浸润,无排异反应。各组对细胞生长、增殖无影响,未发现溶血、热原反应及局部炎症反应,是理想的骨替代材料。**结论** 自制的两种复合人工骨材料均表现出良好的生物相容性,是一种具有潜在临床应用前景的新型人工骨材料。

[关键词] α-半水硫酸钙;β-磷酸三钙;人工骨;骨代用品
[中图法分类号] R318.08;R322.71 [文献标志码] A

Physicochemical properties and biological compatibility of α-CSH/β-TCP composite artificial bone materials

Yang Xiaoyong[1,2], Xu Yongqing[2], Tang Hui[2], Wang Yi[2], Xia Chengqiong[3], Yao Peiheng[2], Tang Xun[2] ([1]Postgraduate Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Orthopaedics, Orthopaedic Center of PLA, Affiliated Orthopaedics Hospital, [3]Department of Otolaryngology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Provin, 650032, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the physicochemical properties and biological compatibility of α-calcium sulfate hemihydrates (α-CSH)/β-tricalcium phosphate (β-TCP) composite artificial bone materials prepared by different preparation processes and calcium sulfate material Osteoset purchased from WRIGHT company, in order to provide theoretical basis and experimental basis for the development and improvement of new artificial bone materials. **Methods** X-ray diffraction analysis, morphology observation, *in vitro* cytotoxicity test, hemolysis test, and pyrogen reaction were adopted to detect physicochemical properties of α-CSH/β-TCP composite artificial bone materials (divided into A group and B group according to different preparation processes) and Osteoset group (C group). Artificial bone material muscle embedding and histological examination were performed to test the biological compatibility of the 3 kinds of materials.

[基金项目] 云南省科技厅支持项目(2010BC006)
[通信作者] 汤 逊,E-mail:dsjyyxj@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.014.html(2015-11-27)

Results X-ray diffraction analysis found that the 3 kinds of materials had own characteristic diffraction peaks and no new peaks. Microcellular structure observation suggested that each group showed more interconnected parallel pores, uniform pore distribution, good pore penetrating structure, and relatively uniform and consistent crystal structure and morphology. MTT assay found that: the RGR value of group A, B, C were greater than 75% in different time point, and the Toxicity grading for level Ⅰ, Toxicity level 0 for negative control group, and level Ⅳ for positive control group. Hemolytic experiment shows: The average rate of hemolysis of each group was 0.95%, 2.22%, 1.05% respectively. The body temperature of each group rise 0.2 ℃, 0.1 ~0.2 ℃, 0.1 ~0.2 ℃ in different time point. And the sum rise total was 0.4 ℃, 0.3 ℃, 0.3 ℃ respectively. Under optical microscope the growth structure of muscle fiber turns normal, without any inflammatory cell infiltration and rejection reaction. The cell growth and proliferation were not affected, and the hemolysis, pyrogen reaction and inflammatory reaction were not found. **Conclusion** The 2 kinds of homemade composite artificial bone materials show good biocompatibility, and have potential clinical application prospect.

[**Key words**] α-calcium sulfate hemihydrates; β-tricalcium phosphate; artificial bone materials

Supported by the Supporting Project of Yunnan Provinciol Department of Science and Technology (2010BC006). Corresponding author: Tang Xun, E-mail: dsjyyxj@163.com

我国每年约有300万人需要行骨移植术且逐年增多,骨移植已经成为仅次于输血的组织移植,其替代材料将具有巨大的研究价值和市场前景。自体骨移植和异体骨移植存在二次创伤、出血量增多、慢性疼痛等风险[2],或存在免疫反应、病毒传染的风险[3],限制了其在大面积骨缺损修复中的研究和应用。人工骨具有独有的优势,成为研究的热点。优良的人工骨应具有以下特性:良好的生物相容性、可控的降解速率、足够的机械强度、良好的骨传导性能、优良的骨诱导性、容易获取和制备、价格低廉等[4]。现有的骨替代材料,如天然高分子材料类、人工合成高分子材料类、无机材料类、纳米材料类等,来源丰富,储存和使用方便,价格适宜,但均不能完全符合以上条件。

α-半水硫酸钙作为一种新型的骨移植修复材料,可完全降解,经体液溶解和细胞降解释放出来的物质,对材料周围组织及机体无毒性,具有良好的组织相容性[5-6],并有利于新骨的形成,但其降解速度很快[7]。β-磷酸三钙作为一种新型的骨组织替代修复材料能在体内完全降解[8],降解速度慢,不利于新骨的改建及塑形[9]。近年研究表明,通过改变两者的比例、烧结温度、空隙等可调节降解速度[10-11]。本课题组与昆明理工大学材料工程学院合作,通过不同工艺制备β-磷酸三钙复合α-半水硫酸钙,本研究分析其物理特性、体外细胞毒性、溶血反应、热原反应、组织炎症反应,并评估复合材料的生物安全性。通过建立兔桡骨骨缺损模型,评估不同材料在修复骨缺损中的效果,以期为植骨材料的进一步研发改进提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙(实验室自制),硫酸钙Osteoset(美国Wright公司),小鼠L929成纤维细胞(中国科学院昆明动物研究所惠赠),二水硫酸钙(分析纯,天津风船化学试剂公司),磷酸二氢钠(分析纯,北京化学试剂公司),无水乙醇(分析纯,天津风船化学试剂公司),DMEM培养基(美国Gibco公司),噻唑蓝液、二甲基亚砜(DMSO)试剂(美国Sigma公司),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),0.64%苯酚溶液(广东西陇化工股份有限公司)。

1.2 实验设备

D/max-220型X射线衍射仪(日本理学),扫描电子显微镜(荷兰Philips-FEI公司),高压反应釜(威海鑫泰化工设备厂),倒置相差显微镜(日本Olympus公司),离心机(北京医用离心机厂),电子天平(上海海康电子仪器厂),高压灭菌锅(宁波久兴医疗器械有限公司),CO_2细胞培养箱(美国Thermo公司),紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),电热恒温培养箱(北京市永光明医疗器械厂)。

1.3 实验动物及分组

8月龄健康日本大耳白兔18只,雌雄不限,清洁级,体质量2.5~3.5 kg,由昆明医科大学实验动物中心提供,在成都军区昆明总医院动物中心实验室饲养。实验动物按随机数字表法分为A、B、C 3组,每组6只。对不同工艺制备的α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料根据工艺不同分为A、B组2组,以及

硫酸钙(Osteoset)组(C组)。

1.4　方法

1.4.1　X线衍射检测材料　　将α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料硫酸钙Osteoset进行X射线衍射(X-ray diffraction,XRD)分析。将3种材料置于D/max-220型衍射仪下,扫描速度45°/min,电流120 mA,扫描角度10°~70°,根据衍射图谱做衍射图分析对比。

1.4.2　材料微观形态观察　　取α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料及硫酸钙Osteoset颗粒,做好样品标记后液氮脆断,置入离子溅射仪器,调整真空值<10,稳定放电阀电流值12 mA,样品喷镀离子(30 min)后用扫描电镜观察材料的形貌结构。

1.4.3　体外细胞毒性实验(MTT)　　将小鼠L929成纤维细胞均匀制成细胞悬液后置于含DMEM培养液的培养瓶中,于37 ℃的CO_2细胞培养箱中培养24 h,待细胞贴壁后弃去原培养液并用PBS液洗涤2次;将上述细胞培养液移位于96孔板,每孔分别加入浸提液(按1 cm^2/10 mL的比例加入含10%小牛血清的DMEM培养液,置于37 ℃的CO_2细胞培养箱中72 h,离心后提取上清液于4 ℃条件下保存)200 μL,作为实验组;阴性对照组加入含10%小牛血清的DMEM培养液;阳性对照组加入含0.64%苯酚的DMEM培养液。每48小时换液1次,72 h后加入MTT溶液100 μL于37 ℃孵育4 h后终止培养;分别于490 nm波长处测定24、48、72 h的光密度值[D(490)],计算细胞相对增殖率[RGR=实验组D(490)值/阴性对照组D(490)值×100%],观察细胞生长情况及形态变化。

1.4.4　细胞溶血实验　　将离心管置于37 ℃中水浴30 min,分别加入0.2 mL已制备好的1∶1稀释的抗凝兔血,混匀,继续在37 ℃中水浴60 min,后于2 300 r/min下离心5 min。取上清液3 mL,置于比色皿中,用紫外分光光度计于545 nm波长处测定光密度值[D(545)]。

溶血率=[实验材料组D(545)值-阴性对照组D(545)值]/[阳性对照组D(545)值-阴性对照组D(545)值]

1.4.5　热原实验　　选取日本大耳白兔6只,按随机数字表法分为3组,每组2只,实验前7 d内测得体温合格(3次/d,体温38.5~39 ℃)。将预先制备的浸滴液自兔耳缘静脉按10 mL/kg缓慢注射,每隔1 h测肛温,共计3次,最高体温减去正常体温,就是该兔升高的体温度数。评价标准:每只实验动物体温升高度数均<0.6 ℃或3只实验动物体温升高度数之和<1.3 ℃,则可判定人工骨材料无热源反应。

1.4.6　肌肉包埋实验　　日本大耳白兔12只,按随机数字表法分为3组,每组4只。采用耳缘静脉麻醉,选取兔双侧臀大肌作为材料埋植部位,植入灭菌后的3组人工骨材料,逐层缝合肌肉、筋膜及皮肤,无菌敷料覆盖、固定;术后不固定、制动,2%头孢唑啉钠注射液5 mL肌肉注射预防感染。对侧采用相同的手术方法植入同种人工骨材料。术后4、8周分别处死各组中随机选取的1只兔子,将材料连同周围的肌肉组织行病理组织学观察。

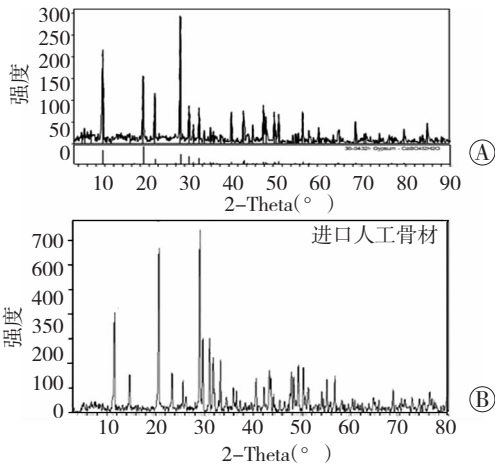
1.5　统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法(LSD检验),α=0.05为检验水准。

2　结果

2.1　材料X射线衍射分析

α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙复合人工骨材料(A、B组)出现α-半水硫酸钙和β-磷酸三钙各自的特征衍射峰(图1A),并且衍射峰的强度高,结晶度好,未出现行新的衍射峰。硫酸钙Osteoset衍射角2。出现特征性衍射峰(图1B),与标准的α-硫酸钙图谱吻合,衍射峰强度高、峰宽较窄,没有杂峰出现,证实该种材料纯度高。X射线衍射分析显示,通过不同工艺制备的α-半水硫酸钙/磷酸三钙复合人工骨材料(A、B组)及硫酸钙Osteoset材料出现各自特征性的衍射峰,峰值高,未出现新的衍射峰,说明3组人工骨材料纯度高,在制备过程中没有新的杂质产生。



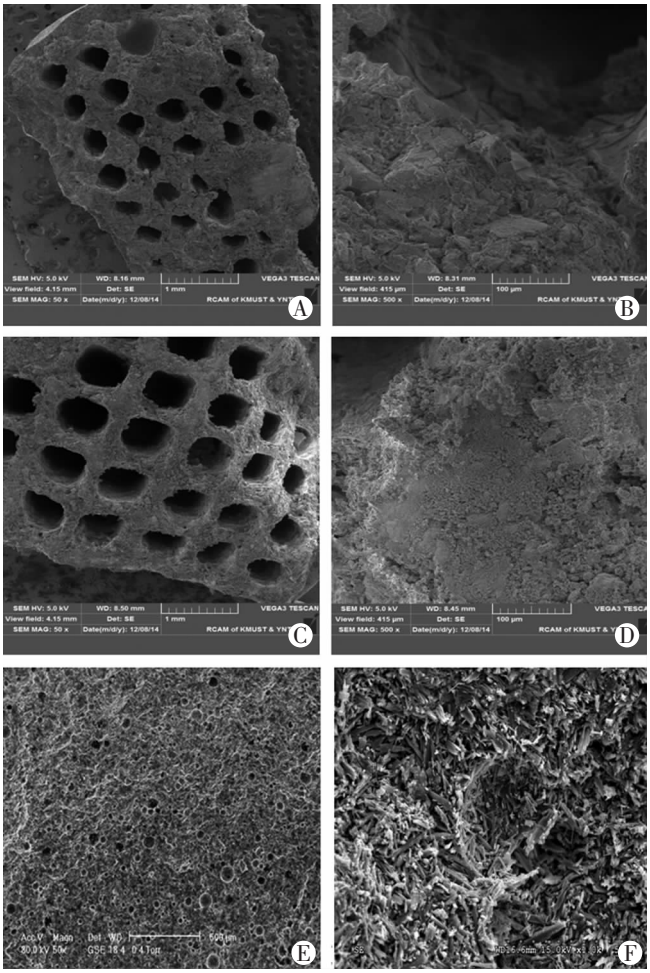
A:α-半水硫酸钙/β-磷酸三钙;B:硫酸钙Osteoset
横坐标:衍射条件2-theta;纵坐标:强度

图1　3种材料人工骨材料X射线衍射分析

2.2　材料微观形态分析

扫描电镜观察显示:A组复合人工骨材料表面粗糙,有较多相互联通的平行的大孔结构,孔隙大小为200~400 μm,孔隙结构之间贯通性良好,孔隙分布均匀,晶体结构良好(图2A、B)。B组复合人工骨材料

表面粗糙,有较多的相互联通的平行的大孔结构,孔径排列整齐均匀,孔隙结构之间贯通性,孔径大小为150~300 μm,晶体结构良好(图2C、D)。C组复合人工骨材料表面较平整,孔壁上布满微孔结构,孔隙结构之间交通性良好,有较多的相互联通的大孔/微孔结构,晶体结构形态相对均匀一致,颗粒大小均匀、孔隙率较为完善(图2E、F)。A组的孔隙率为75%,B组的孔隙率为65%,C组孔隙率为67%。都具有空间网状结构,在微孔数量及分布上C介于A组与B组之间。



A:A组(×50);B:A组(×500);C:B组(×50);D:B组(×500);E:C组(×400);F:C组(×1 000)

图2 扫描电镜观察3种材料微观形态变化

2.3 体外细胞毒性实验

A组24、72 h细胞相对增殖率分别为97.88%、92.10%;B组24、72 h细胞相对增殖率分别为91.80%、93.33%;C组24、72 h细胞相对增殖率分别为92.34%、89.96%。各实验组毒性分级为Ⅰ级,阴性对照组毒性级别为0级,阳性对照组毒性级别为Ⅳ级。各实验组分别与阳性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。表明本实验人工骨材料无毒,符合生物材料体外毒性标准。

表1 各组兔不同时间点平均D(490)值及RGR值比较

组别	24 h		72 h	
	D(490)值	GR(%)	D(490)值	RGR(%)
A组	1.063±0.035	97.88[a]	1.423±0.030	92.10[a]
B组	0.997±0.043	91.80[a]	1.442±0.712	93.33[a]
C组	1.003±0.023	92.34[a]	1.390±0.028	89.96[a]
阴性对照组	1.086±0.063	100.00	1.545±0.072	100.00
阳性对照组	0.088±0.071	8.10	1.189±0.067	7.65

a:$P<0.05$,与阳性对照组比较

2.4 细胞溶血实验

A、B、C 3个实验组D(545)值(0.021 0±0.001 5)、(0.031 0±0.003 4)、(0.028±0.001)分别与阳性对照组(0.707 0±0.023 9)比较,差异有统计学意义($P<0.05$);实验组平均溶血率分别为0.95%、2.22%、1.05%,差异无统计学意义($P>0.05$)。表明两种人工骨材料均符合生物医学材料溶血率≤5%的标准。

2.5 热原实验

A组各时间点体温升高0.2 ℃,体温升高总和为0.4 ℃;B组各时间点体温升高0.1~0.2 ℃,体温升高总和为0.3 ℃;C组各时间点体温升高0.1~0.2 ℃,体温升高总和为0.3 ℃。3组体温升高均小于0.6 ℃,体温升高总和小于1.3 ℃。表明人工骨材料无热源反应,符合生物医学材料热原反应相关标准(表2)。

表2 3组兔用药前后各时间点肛温情况(℃)

时间		A组		B组		C组	
用药前		38.6	38.7	38.5	38.6	38.7	38.6
用药后	1 h	38.8	38.9	38.7	38.6	38.8	38.7
	2 h	38.6	38.7	38.6	38.7	38.9	38.8
	3 h	38.7	38.6	38.7	38.7	38.7	38.7
体温升高		0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2

2.6 肌肉内埋藏实验

动物一般情况:3组动物术后当日精神状态欠佳,进食、活动少,术后第1天开始精神状态逐渐好转,活动逐渐恢复正常,创面局部未见明显红肿、淤青、渗血、渗液。切口均一期愈合。

大量切片组织学观察发现,3组动物体内材料情况一致。术后4周时材料周围组织生长正常,表面被少量肉芽组织充填,可见淋巴细胞及纤维母细胞,材料与周边组织边界清楚,嵌合牢固,部分纤维组织长入人工骨网孔中。术后8周时人工骨材料网孔中有大量组织填充,可见材料降解后形成的孔隙和空洞,材料与周围肌肉组织边界模糊,材料周围组织可见少许炎性细胞浸润,未见骨样细胞或组织形成。表明3种人工骨材料均具有良好的体内植入安全性(图4)。

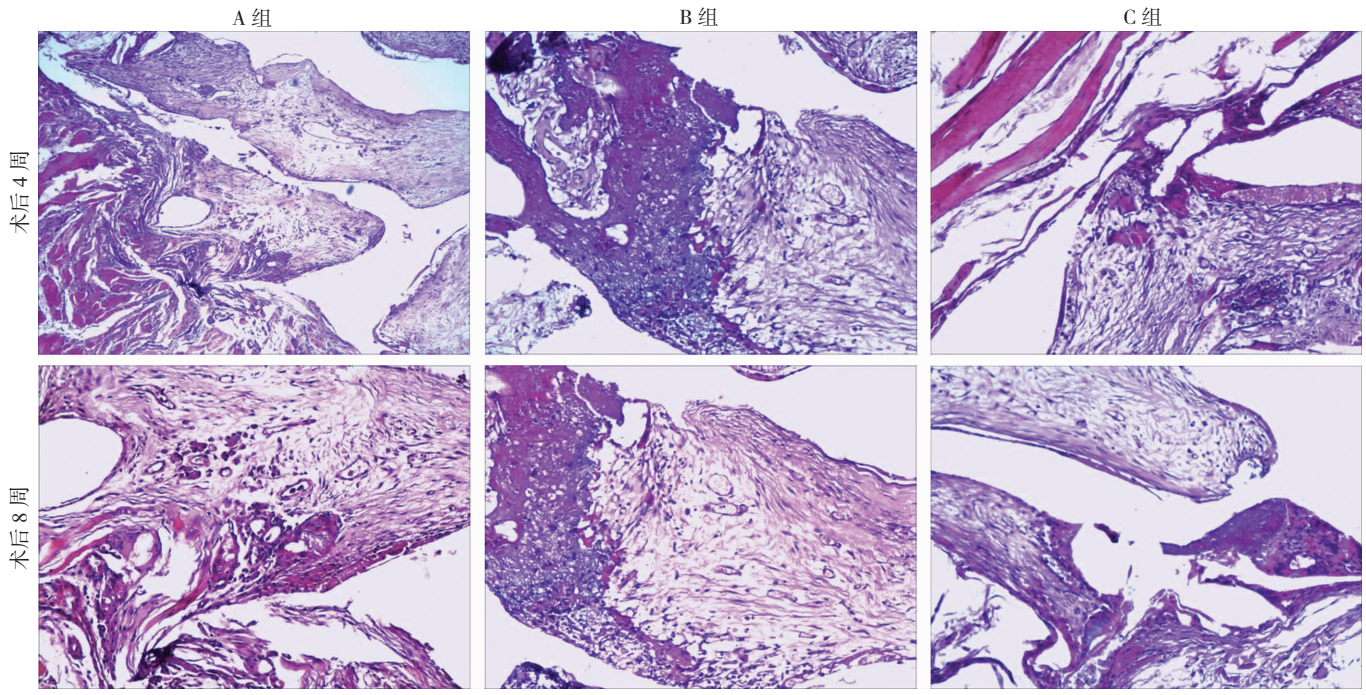


图 4 3 组兔肌肉内埋藏实验组织学病理变化(HE ×200)

3 讨论

创伤、肿瘤、脊柱融合、先天性畸形等疾病需要植骨材料的量不断增多,推动了人工骨材料的发展[12]。近年研究和开发的人工合成材料种类多,硫酸钙和磷酸三钙也逐渐成为骨移植替代材料研究的热点之一[13-15]。磷酸三钙在体内降解速度慢,硫酸钙在体内降解速度快,单一材料受其理化特性的限制,难以克服自身存在的缺陷,不利于新生骨的生长和修复。而上述两种材料可依据各自的理化特性,取长补短,通过不同工艺制备出适合体内降解和成骨的新型人工骨。α-半水硫酸钙和 β-磷酸三钙复合支架的制备方法种类多[16],复合的工艺复杂。本实验室通过独创的工艺制备出不同孔隙大小、不同孔隙率、不同复合比例的网格状支架,在材料的生物力学、降解速度、诱导成骨性能探索出一条稳定的工艺,由于正在申请专利,相关数据和结果有待发表。

X 衍射是利用 X 射线射到晶体内原子,原子间距离与入射 X 射线波长分析数量级,得出材料的衍射谱,并与相关标准进行比较。本实验组的 3 种材料衍射峰强度高、峰宽较窄,没有杂峰出现,证实该种材料纯度高,在制备过程中无其他的物质长生。微观形态学是观察材料的空间网状结构,3 种材料均具有相互联通大孔、微孔结构,孔径排列整齐均匀,孔隙结构之间贯通性好,呈网格状。它不仅为细胞粘附、增殖提供场所,而且对细胞基质及营养成分的渗透有利。并用相关软件计算出各种材料的粒径形态、大小及分布曲线,进一步研究材料的空间结构。通过不同倍数的电镜观察计算孔隙率,并与预先设计的孔隙结构进行比较,进一步稳定制备工艺。

人工骨材料的组织相容性是骨修复材料发展和临床应用的前提。各国研究人员初步拟定了从细胞水平到动物水平的比较成熟的评价指标,以及相关的生物学评价标准[17-18]。根据国际标准化组织和中国卫生部规定,对于长期植入体内的材料必须进行评估生物安全性。本课题严格按照 ISO 10993《医疗器械生物学评价标准》的要求,进行了体外细胞毒性实验、溶血实验、热源实验、肌肉包埋实验,检测 3 种人工骨材料的生物相容性。

体外细胞毒性实验检测细胞存活和生长,是检测生物相容性最常规的实验。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将外源性的 MTT 还原为不能自溶于水的紫色结晶,而二甲基亚砜能溶解紫色结晶,测定其光密度值,计算 RGR 值,可间接反映活细胞数量[19],在显微镜下观察细胞生长。本实验结果显示:3 种材料在 24、72 h 各实验组毒性分级为Ⅰ级,符合生物材料体外毒性标准。溶血实验测定材料与血细胞在体外接触过程中红细胞溶解和血红蛋白游离程度来评价材料的急性体外溶血活性,其敏感性高、操作简便、重复性好。本实验测得的 3 种材料的溶血率分别是 0.95%、2.22%、

1.05%,符合医用材料溶血率≤5%的标准,可认为这3种材料无溶血作用。热原实验是将一定量的材料的浸提液经静脉注射入动物体内,在规定的时间内检测其体温变化情况,以确定浸提液中热原含量是否符合人体要求的一种方法。本实验3组动物体温升高均小于0.6 ℃,体温升高总和小于1.3 ℃。表明人工骨材料对动物无毒性作用。肌肉包埋实验将人工骨材料通过无菌放置于动物体内,在相应的时间内观察材料本身及周围组织,观察有无炎症。该实验实经济、简便,是评价生物相容性不可或缺的。本实验中3种材料周围组织中未见明显的炎性细胞及毒性反应,表现出良好的生物相容性及体内植入安全性。

本研究通过体外细胞毒性实验、溶血实验、热原实验、肌肉包埋实验研究人工骨材料的生物相容性。结果显示3种材料无细胞毒性反应、无溶血反应、热原反应阴性、肌肉包埋实验未见毒性。初步验证了通过不同工艺制备的2种人工骨材料和已经使用于临床的Osteoset,均具有良好的生物相容性,有广阔的研究和临床使用前景。

参考文献:

[1] Holzwarth J M, Ma P X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering[J]. Biomaterials, 2011, 32(36): 9622-9629. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.09.009

[2] Mao K, Yang Y, Li S, *et al*. Investigation of the histology and interfacial bonding between carbonated hydroxyapatite cement and bone[J]. Biomed Mater, 2009, 4(4): 045003. DOI:10.1088/1748-6041/4/4/045003

[3] Giannoudis P V, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update[J]. Injury, 2005, 36(Suppl 3): S20-S27. DOI:10.1016/j.injury.2005.07.029

[4] Lerner T, Griefingholt H, Liljenqvist U. Bone substitutes in scoliosis surgery[J]. Orthopade, 2009, 38(2): 181-188. DOI:10.1007/s00132-008-1369-3

[5] Yang H L, Zhu X S, Chen L, *et al*. Bone healing response to a synthetic calcium sulfate/β-tricalcium phosphate graft material in a sheep vertebral body defect model[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012, 100(7): 1911-1921. DOI:10.1002/jbm.b.32758

[6] Johnson L J, Clayer M. Aqueous calcium sulphate as bone graft for voids following open curettage of bone tumours[J]. ANZ J Surg, 2013, 83(7/8): 564-570. DOI:10.1111/j.1445-2197.2012.06175.x

[7] Ball J P, Mound B A, Nino J C, et a1. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(7): 2089-2095. DOI:10.1002/jbm.a.34879

[8] Damron T A. Use of 3D beta-tricalcium phosphate (Vitoss) scaffolds in repairing bone defects[J]. Nanomedicine (Lond), 2007, 2(6): 763-775. DOI: 10.2217/17435889.2.6.763

[9] Pinto A J, Carneiro J, Katsikopoulos D, *et al*. The Link between Brushite and Gypsum: Miscibility, Dehydration, and Crystallochemical Behavior in the $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$-$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ System[J]. Cryst Growth Des, 2011, 12(1): 445-455.

[10] Mao K, Zhou F, Cui F, *et al*. Preparation and properties of α-calcium sulphate hemihydrate and β-tricalcium phosphate bone substitute[J]. Biomed Mater Eng, 2013, 23(3): 197-210. DOI:10.3233/BME-130744

[11] Mao K, Cui F, Li J, *et al*. Preparation of combined β-TCP/α-CSH artificial bone graft and its performance in a spinal fusion model[J]. J Biomater Appl, 2012, 27(1): 37-45. DOI:10.1177/0885328210391919

[12] Stafford P R, Norris B L. Reamer-irrigator-aspirator bone graft and bi Masquelet technique for segmental bone defect nonunions: a review of 25 cases[J]. Injury, 2010, 41(Suppl 2): S72-S77. DOI: 10.1016/S0020-1383(10)70014-0

[13] Liu X, Wang X M, Chen Z, *et al*. Injectable bone cement based on mineralized collagen[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, 94(1): 72-79. DOI: 10.1002/jbm.b.31625

[14] 毛克亚, 李江涛, 杨云, 等. β-TCP/α-CSH 复合植骨材料固化性能与力学强度[J]. 医用生物力学, 2010, 25(6): 456-459, 478.

[15] 韦标方.病灶清除自体骨联合自骨化磷酸钙人工骨植入治疗早期非创伤性股骨头坏死[J]. 第三军医大学学报, 2014,36(08): 773,779.

[16] Liu Y, Lim J, Teoh S H. Review: development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(5): 688-705. DOI:10.1016/j.biotechadv.2012.10.003

[17] 杜建,丁元法,苏向东,等. 医用镍钛形状记忆合金的表面改性及生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(25): 4689-4691. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.25.026.

[18] ISO 10993. Biological evaluation of medical devices[S]. International Standards Organization, 2009.

[19] Ball J P, Mound B A, Nino J C, *et al*. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(7): 2089-2095. DOI:10.1002/jbm.a.34879

(**收稿**:2015-08-10;**修回**:2015-09-09)

(编辑 龙 亮)