

纳米非计量磷灰石/聚合物复合支架的制备和性能研究

王志伟, 苏佳灿, 马玉海, 张欣, 曹烈虎, 李明

(上海市第二军医大学附属长海医院 骨科, 上海 200433)

摘要: 采用快速成形法制备了孔径和孔隙率可控、大孔互相贯通的纳米缺钙羟基磷灰石(cd-HA)与聚己内酯(PCL)复合材料多孔支架, 并对复合支架的微结构进行了表征. 通过细胞培养和体内动物实验研究了该支架的生物学性能. 结果表明: 复合材料的亲水性和细胞粘附率随磷灰石含量增加而提高; 成骨细胞在复合支架上的增殖明显高于纯PCL; μ -CT和组织学分析结果显示, 新骨在支架的表面形成并长入其中. 相互贯通的多孔支架促进了细胞的增殖和新骨长入支架内部. cd-HA/PCL复合材料支架具有很好的生物相容性, 在组织工程领域中有潜在的应用前景.

关键词: 缺钙羟基磷灰石; 纳米复合材料; 快速成形; 多孔支架

中图分类号: TB383

文献标识码: A

Preparation and Properties of Nano Calcium Deficient Apatite/Poly(ϵ -caprolactone) Composite Scaffold

WANG Zhi-Wei, SU Jia-Can, MA Yu-Hai, ZHANG Xin, CAO Lie-Hu, LI Ming

(Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Nano calcium deficient hydroxyapatite (cd-HA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) composite scaffold with well interconnected and open macropores was prepared by rapid-prototyping technique, and its pore size and porosity was controlled. In addition, the characterization of the microstructure of the cd-HA/PCL composite scaffold was carried out. The biological properties of the composite scaffold were investigated through cell culture and animal model experiments. The results showed that the hydrophilicity and cell attachment ratio of the composite increased with the increase of cd-HA content in the cd-HA/PCL composite, and the proliferation ratio of the MG₆₃ cells on the composite scaffold was much higher than that on the PCL scaffold. Radiological and histological examinations confirmed that the newly bony tissue formed on the surfaces of the composite scaffold and grew into the pores of the composite scaffolds. The well interconnected macropores in the composite scaffolds might encourage cell proliferation and thus enhance new bone formation in the porous scaffolds. In summary, the results indicates that the cd-HA/PCL composite scaffold with excellent biocompatibility has potential application in tissue engineering.

Key words: calcium deficient hydroxyapatite; nano composite; rapid-prototyping; porous scaffold

磷酸钙生物材料具有优异的生物相容性和生物活性, 已广泛应用于硬组织修复生物材料的研究中, 如羟基磷灰石(HA)、双相磷酸钙陶瓷和磷酸三钙等^[1]. 不同钙磷比($n(\text{Ca})/n(\text{P})$)对应磷酸钙生物材料的不同成分和结构, 当 $n(\text{Ca})/n(\text{P}) = 1.67$, 对应的化学式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 即化学计量HA; 当 $n(\text{Ca})/n(\text{P}) = 1.50$, 对应的化学式为

$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$, 即磷酸三钙($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). 当 $n(\text{Ca})/n(\text{P})$ 介于1.50~1.67, 对应的化学式为 $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$), 即非化学计量缺钙HA(calcium deficient hydroxyapatite, cd-HA)^[2]. 一些研究表明, 非化学计量HA具备更好的降解性, 在人体内降解更快, 在植入体周围容易形成较多的钙、磷离子, 有利于在材料表面形成类骨磷灰

石,从而有利于在材料表面形成新骨^[34].因此,可通过调控 Ca/P 来控制磷酸钙材料的降解性及其它生物学性能.

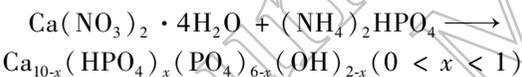
磷酸钙生物陶瓷虽然在临床上已广泛地用于人体骨骼系统修复和重建,然而块状陶瓷脆性大、加工难、易断裂;颗粒陶瓷有游走、移位的缺点,限制了其作为多孔支架材料的广泛应用.为了改善钙-磷生物材料的脆性和提高其可塑性,模仿天然骨的组成结构特点,制备无机/有机复合生物活性材料是近年来硬组织修复工程多孔支架材料研究的热点^[5-6].本研究将制备纳米非化学计量磷灰石,并把它和可降解高分子材料聚己内酯(PCL)复合制备 cd-HA/PCL 复合材料.

多孔支架是骨修复和组织工程的关键技术之一,如何制备可控的多孔支架,使之有利于细胞/组织长入,在理论和临床实践上都有十分重要的意义^[7].近年来,快速成形技术的发展为组织工程支架的制备开辟了新途径,快速成形技术是由 CAD 模型直接驱动的快速制造任意复杂形状三维物理实体的技术总称.快速成形技术制备出的支架具有高孔隙率,孔与孔之间完全通透,宏观形状可控,孔隙率和孔径独立控制等优点^[8-9].本研究将以自制的 cd-HA/PCL 复合材料为原料,采用快速成形技术制备多孔支架,同时通过细胞培养和动物体内植入实验研究其生物学性能.

1 材料和方法

1.1 纳米缺钙磷灰石(cd-HA)的制备

cd-HA 的制备采用下列的反应式:



为了合成非化学计量的 cd-HA,调控反应物的钙磷原子摩尔比为 1.58.实验中将 2.5 mol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶于 1000 mL 去离子水,为 1 号液,加氨水调节 pH 值,使之大于 10.把 4 mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1500 mL 去离子水中,为 2 号液,将 500 mL 二甲基甲酰胺(N,N-Dimethyl-formamide, DMF)分散剂加入到 2 号液中.在加热(70℃)和搅拌条件下,缓缓将 1 号液滴入 2 号液中,滴完后,温度上升到 100℃ 维持 2h,后自然冷却,在常温下放 24h,用水离心洗 3 次和乙醇洗 2 次,用透射电子显微镜(TEM, JEM-2010, Japan)观察.本实验所用的试剂(AR)为国药集团化学试剂有限公司生产.

1.2 复合材料及其支架的制备

将 100g 纳米缺钙磷灰石含水浆液(5wt%)加入带有分水装置、搅拌装置和冷凝装置的三颈瓶中,同时加入 150 mL 溶剂 DMF 和 5g 聚乙二醇分散剂(PEG6000,上海试剂四厂).温度逐步升至 100℃,

在 100 ~ 120℃ 脱水,然后加入 7.5g 的聚己内酯(PCL,美国 Sigma 公司, Mn = 60000),在 120℃ 条件下,搅拌复合 4h,取出试样,用热去离子水洗涤 4 次,乙醇洗涤 2 次,并于 50 ~ 60℃ 干燥 48h 得复合材料样品(40wt% cd-HA 含量).采用该方法制备不同 cd-HA 含量(如 20wt% 和 60wt%)的复合材料.

40wt% cd-HA 含量复合材料采用低温挤出成形设备-生物材料快速成形机(自制设备),快速成形机由控制系统,送料机构,喷头和工作台所组成.应用低温挤出成形工艺,通过挤压喷头将复合材料溶解挤出,材料在室温下成形,可得到常温下固态的三维多孔的 dc-HA/PCL 复合材料支架.

采用转靶 X 射线衍射仪(XRD, D/MAX 2550 VB/PC, 日本 Rigaku 公司)测试复合材料的物相,用扫描电子显微镜(SEM, JSM-6360LV, 日本 JEOL 公司)表征多孔支架的形貌和表面微结构,用排水法测定多孔材料的孔隙率.

1.3 复合材料的亲水性和细胞黏附率

将 cd-HA/PCL 复合材料(不同 cd-HA 含量)致密样品(5mm × 5mm × 1mm)用于水接触角的测定,在接触角测定仪(OCA-20, Dataphysics, Germany)上用液滴法测量蒸馏水液体的接触角,纯 PCL 同样大小样品为对照,样品(40wt% cd-HA)用于细胞粘附测定,取 96 孔培养板,在孔培养板内放入备用的样品(n = 5).调整 MG₆₃ 成骨细胞浓度为 4 × 10⁴/mL,将细胞悬液 0.5 mL 滴加到样品上.置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中复合培养 4h 后, PBS 冲洗,去除未粘附的细胞.用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,收集细胞并记数,计算细胞粘附率.细胞粘附率计算公式为:粘附率(%) = 粘附细胞数/总细胞数 × 100%.

1.4 MTT 法检测细胞增殖

将 cd-HA/PCL 复合多孔支架(cd-HA 含量为 40wt%)样品(5mm × 5mm × 4mm)用氧乙烷消毒备用,PCL 支架和细胞培养板为对照样品. MG₆₃ 成骨细胞悬液以 4 × 10⁴/mL 个密度接种于含有支架样品培养板中,每孔加入细胞悬液 100 μL,对照组 PCL 加入相同数量的细胞悬液和培养基.后置于培养箱中孵育,常规培养.分别于接种后 1、4、7d 进行 MTT 检测.将支架从培养孔中取出,在 PBS 液中轻轻清洗 3 次,置于新的培养板中,每孔加入培养液 100 μL 及 MTT 20 μL,培养箱中继续培养 4h,然后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,摇床上振荡 20min,选择 490nm 波长在分光光度仪上测定各孔光密度值(O. D.),每组测量 5 孔.

1.5 动物体内植入实验

将 cd-HA/PCL 复合多孔材料(cd-HA 含量为

40wt%) 支架样品(6mm × 6mm × 6mm)用环氧乙烷消毒备用. 按常规方法麻醉动物后, 将样品植入新西兰白兔的股骨缺损处内, 术后在第4和第8w分别处死动物取样, 实验样品(支架植入骨缺损部位)用高分辨率微计算机X射线断层照相系统(Micro-CT, Siemens SOMATOM Sensation, 西门子)照相, 通过重建得到3-D图像. 将一部分标本置于4%的福尔马林液中固定3~4d, 脱钙21d, 中途更换脱钙液一次, 充分脱钙后, 再次修整标本, 装盒后清水充分冲洗, 酒精梯度脱水、浸蜡、包埋, 石蜡切片厚度约为5 μ m, H&E染色, 显微镜组织学观察.

2 结果和讨论

2.1 复合多孔支架的表征

图1是通过快速成形技术制备的cd-HA/PCL复合材料多孔支架的光学显微镜照片, 可以看出, 支架具有规则的、连续贯通的多孔结构; 多孔支架是由很多cd-HA/PCL复合材料棒通过一定的排列搭接而成, 棒与棒之间的距离可以通过调节机器参数来控制. 通过快速成形技术制备的多孔支架, 可以根据实际需要调控支架孔径大小和孔的排列等参数. 作为

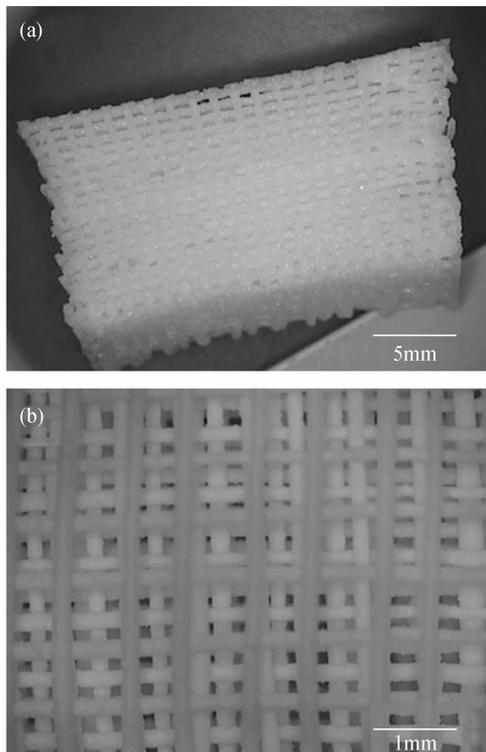


图1 cd-HA/PCL 复合材料支架的光学显微镜照片(40wt% cd-HA)

Fig. 1 Optical micrographs of the porous composite scaffolds with 40wt% cd-HA

(a) Scaffold sample; (b) Transverse direction

骨再生和修复的组织工程支架材料, 材料的多孔性是非常重要的. 支架的空间结构和形貌对骨细胞的正常生长影响很大, 要制备完美的骨组织工程多孔支架, 除了选择合适的生物材料外, 对材料的成形也十分重要^[10]. 传统方法如气体发泡、微粒过滤法等制备的多孔支架很难精确地控制孔径大小、孔隙率、孔的排列和形貌, 以及大孔之间的连通性^[11]. 本实验制备的支架具有宏观形状可控, 高孔隙率, 大孔之间完全通透, 大孔径独立控制等优点, 这将有利于骨细胞/组织生长和长入.

2.2 复合材料支架的微结构分析

图2是cd-HA/PCL复合材料支架的SEM正面和切面图照片, 可以看出, 多孔支架的大孔是相互贯通的; 支架的孔径在400~450 μ m之间, 这些大孔的分布是比较均匀的, 孔隙率测试结果显示, 该多孔支架为82%. 传统工艺制备多孔支架很难形成200 μ m以上的可控孔结构, 难以保证大孔均匀、大孔之间的完全贯通. 本研究采用快速成形技术可以根据需要控制孔径的大小、大孔的排列及形貌等支架的性能. 多孔性结构支架可为细胞提供较大的粘附面, 有利于细胞的粘附, 并且允许血管组织向内生长. 高孔隙率的支架材料具有大的比表面积, 有利于和体液充分接触, 这不仅有利于材料本身降解, 也能够为大量细胞种植、生长以及分泌细胞外基质提供足够空间. 同

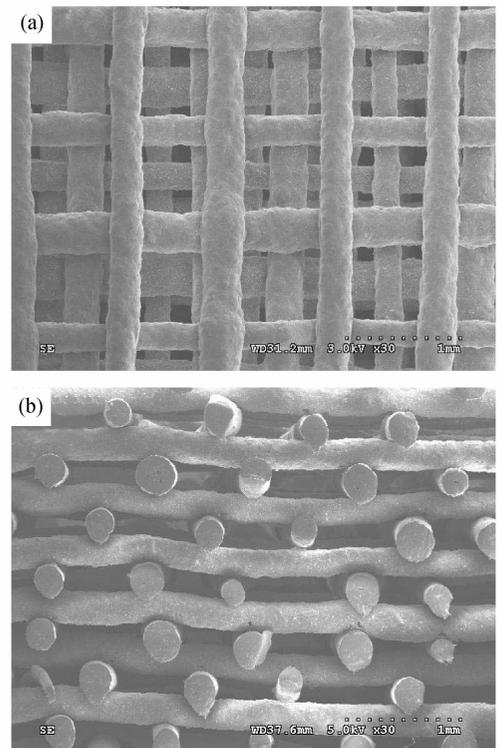


图2 cd-HA/PCL 复合支架的SEM照片

Fig. 2 SEM photographs of the porous composite scaffolds

(a) Sagittal direction; (b) Transverse direction

时可提供给细胞生长所必须的气体和养分交换环境,有助于种植细胞的营养交换和废物排出^[12-13]。

图 3(a)是纳米缺钙磷灰石的 TEM 照片,从图可见,合成的 cd-HA 有一定的结晶形貌,呈针(棒)状,长度大约在 50 ~ 90nm,宽度大约在 20 ~ 40nm 的范围内。图 3(b)是含 40wt% 纳米缺钙磷灰石的复合材料支架表面的 SEM 照片,从图可见,磷灰石颗粒较均匀地分散在 PCL 基体中,少部分发生了团聚,复合材料表面存在大量的磷灰石颗粒。将纳米非计量缺钙磷灰石分散到 PCL 基体中,可提高 PCL 的生物活性,而暴露在材料表面的纳米磷灰石颗粒将直接关系到复合材料的生物学性能;复合材料表面的磷灰石越多,植入体内后,细胞的反应就越明显,新骨在材料表面就越容易形成,如在钛合金表面喷涂羟基磷灰石生物活性涂层^[14]。

2.3 XRD 分析

图 4 是含 40wt% 磷灰石的 cd-HA/PCL 复合材料的 XRD 图谱,可以看出,复合材料包含 cd-HA 和 PCL 两种物相,相对于 HA 生物陶瓷而言,cd-HA 具有较低的结晶度,这种纳米级的 cd-HA 与人骨的矿物相具有更相似的成分和结构,与人体骨细胞/组织有天然的亲和性,具有优异的生物学性能^[4]。自然骨是由磷灰石和胶原纤维构成的无机/有机高分子

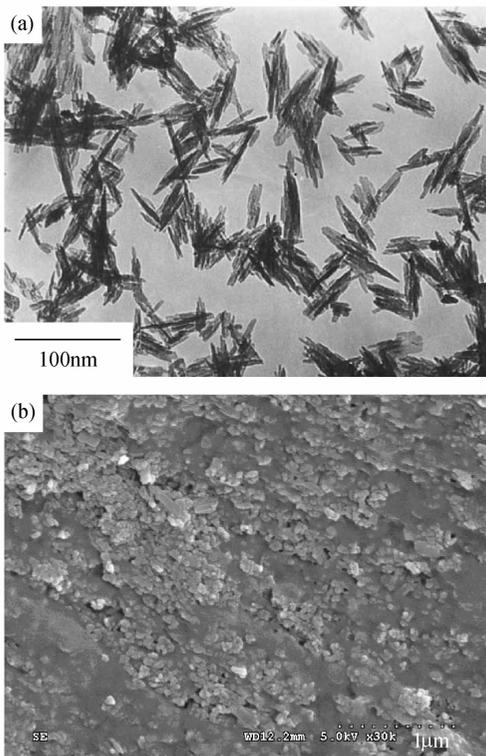


图 3 (a) cd-HA 的 TEM 照片和 (b) cd-HA/PCL 复合材料表面的 SEM 照片

Fig. 3 (a) TEM image of cd-HA and (b) SEM image of cd-HA/PCL composite with 40 wt% cd-HA

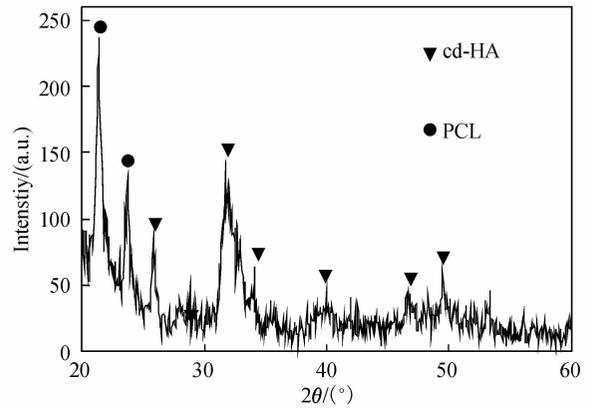


图 4 cd-HA/PCL 复合材料的 XRD 图谱 (40wt% cd-HA)
Fig. 4 XRD pattern of cd-HA/PCL composite with 40wt% cd-HA

复合材料,基于仿生的概念,近年来,纳米复合生物材料受到广泛重视,它综合无机材料的生物活性和高分子材料的可加工性等优点^[15]。PCL 是一类优良的医用高分子材料,有很好的生物相容性和降解性,在生物医学领域有着广泛而长期的应用,因此,本研究用 PCL 来提高纳米磷灰石的韧性和可塑性,制备生物相容性好和生物活性优良的骨修复支架材料。

2.4 复合材料的亲水性和细胞粘附性能

细胞在材料表面的粘附是评价材料生物相容性的重要指标之一。本实验通过接种成骨细胞于 cd-HA/PCL 复合材料表面,观察细胞的粘附情况,以此来考察复合材料的生物相容性。从表 1 可以看出,随着 cd-HA 在复合材料中含量的增加,材料的水接触角下降,表明材料的亲水性提高,相应材料的细胞粘附率提高。较纯 PCL 而言,加入 20wt% 磷灰石于复合材料中,材料的亲水性提高和细胞粘附率提高并不十分明显,这主要是材料表面暴露的磷灰石不多;然而,随着磷灰石在复合材料增加到 40wt% 和 60wt% 时,复合材料亲水性和细胞粘附率出现了明显的提高(材料表面暴露的磷灰石更多)。一些研究表明,材料表面亲水性提高有利于提高细胞粘附率,本研究的结果证实了随着磷灰石在复合材料含量的增加,材料的亲水性和细胞粘附率都得到了相应的提高。

表 1 复合材料和 PCL 样品的水接触角和细胞粘附率
Table 1 Water contact angle and cell adhesion ratio on composite and PCL

| Samples | Water contact angle / (°) | Cell adhesion ratio / % |
|----------------|---------------------------|-------------------------|
| PCL | 77.5 ± 0.8 | 22.5 ± 1.1 |
| 1(20wt% cd-HA) | 63.2 ± 1.0 | 29.2 ± 1.5 |
| 2(40wt% cd-HA) | 39.5 ± 0.7 | 48.7 ± 2.0 |
| 3(60wt% cd-HA) | 20.3 ± 1.4 | 54.7 ± 0.9 |

2.5 细胞增殖

图5显示成骨细胞在复合材料和PCL支架上的增殖情况,用MTT处理细胞所得的OD值与细胞活力和数量之和成正比.由图可见,复合材料和PCL的细胞活力和数目随时间的推移而增加,复合材料在4和7d的OD值比PCL和对照组(细胞培养板)明显高.结果表明,加入纳米非计量磷灰石于PCL基体中提高了复合材料的生物学性能,促进了细胞增殖.细胞在材料表面的分裂和增殖,是评价生物材料性能的一个重要方面,其实质上是材料与细胞相互作用的过程^[16].本实验比较了不同时间培养细胞在复合材料和PCL支架的增殖情况,结果提示,材料组成成分的不同,使材料表面的微观结构不同,进而最终影响细胞/材料的相互作用.将磷灰石加

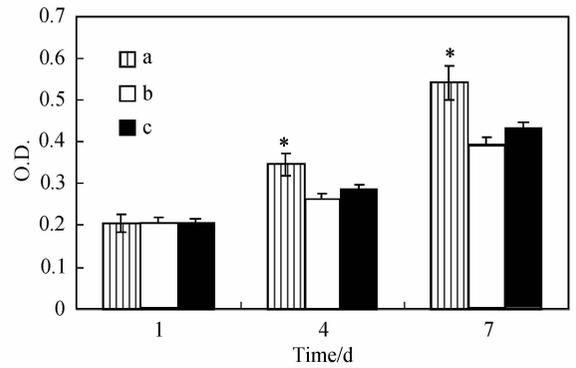


图5 成骨细胞在(a)复合材料(40wt% cd-HA), (b)PCL支架和(c)空白对照的增殖

Fig.5 Proliferation of osteoblast on (a) composite with 40wt% cd-HA, (b) PCL scaffolds and (c) control with time ($n = 5$, $*P < 0.05$)

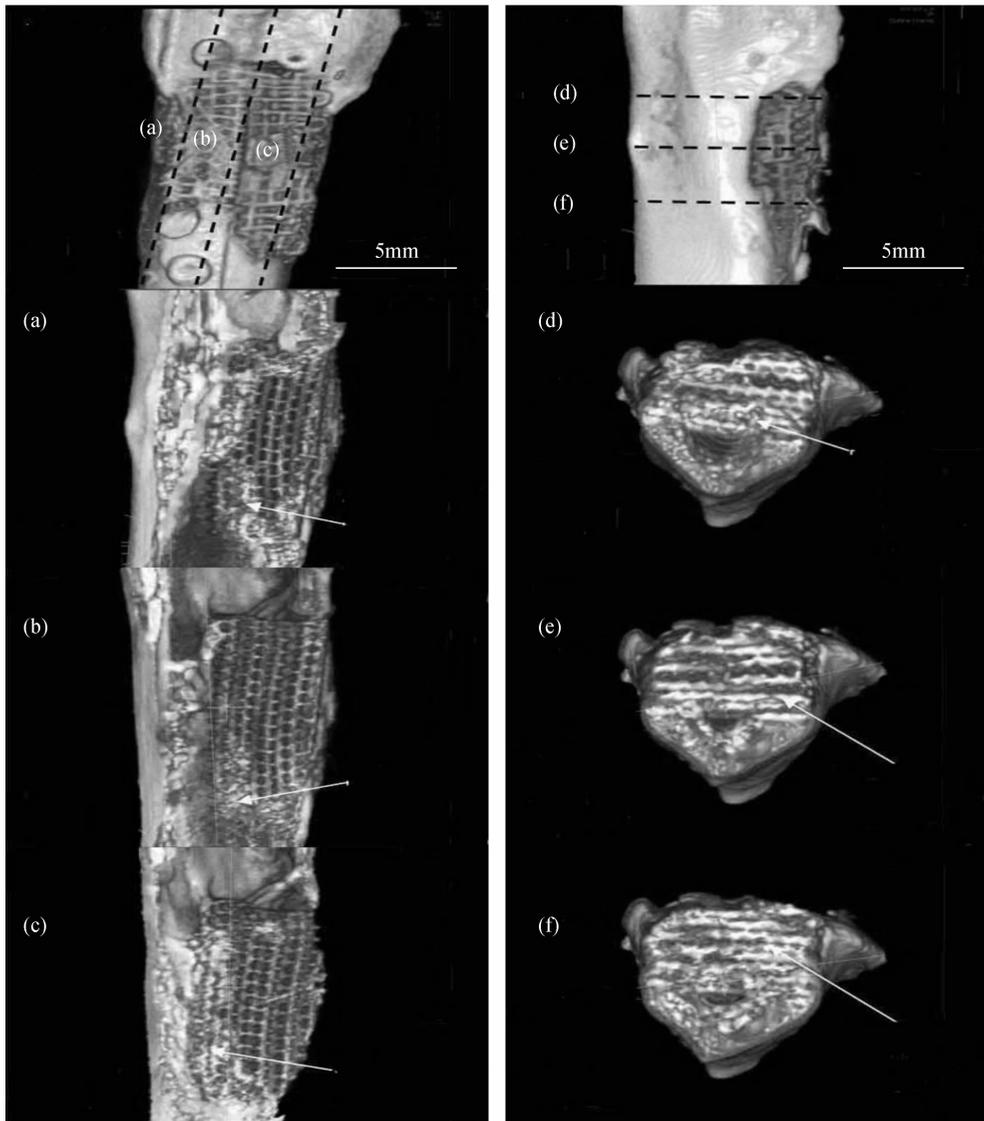


图6 复合材料支架植入兔骨缺损8w的 μ -CT图像,支架在径向((a)、(b)、(c)和横向(d)、(e)、(f))方向被分成3等份,箭头表示长入的骨组织

Fig.6 Micro-CT images after 8w implantation. Images of the scaffold divided into three equal parts to sagittal ((a), (b), (c) and transverse direction (d), (e), (f)), arrows represent ingrowth bone tissue

入到 PCL 基体中,复合材料表面暴露的磷灰石改善了复合材料的表面生物学特性,提高了材料的生物活性,从而使培养细胞产生正的反应(增殖),细胞增殖明显同时也说明了复合材料具有很好的生物相容性.

2.6 Micro-CT 分析

一般来说,植入体内的多孔支架生物相容性越好,组织反应越轻微,新骨就越容易长入多孔支架内,在径向和横向方向分成3个等份,三维重建图像显示(图6),支架的径向和横向面都有新骨生成.新骨样不断地延展,直接粘附在支架材料的表面及深部.本实验用 μ -CT检测了复合材料支架植入兔骨缺损8w的情况,将植入骨缺损8w的支架深地长入多孔支架内部.这些说明纳米非计量缺钙磷灰石/PCL复合材料表面存在的磷灰石有利于新骨形成,可引导骨细胞/组织长入其中.实验结果表明,磷灰石复合材料具有良好的生物活性和生物相容性.

2.7 组织学分析

图7是磷灰石/PCL复合材料支架植入兔股骨缺损(a)4w和(b)8w的组织学(H&E染色)照片,结果显示,4w时,少量的新生骨样基质在材料界面上

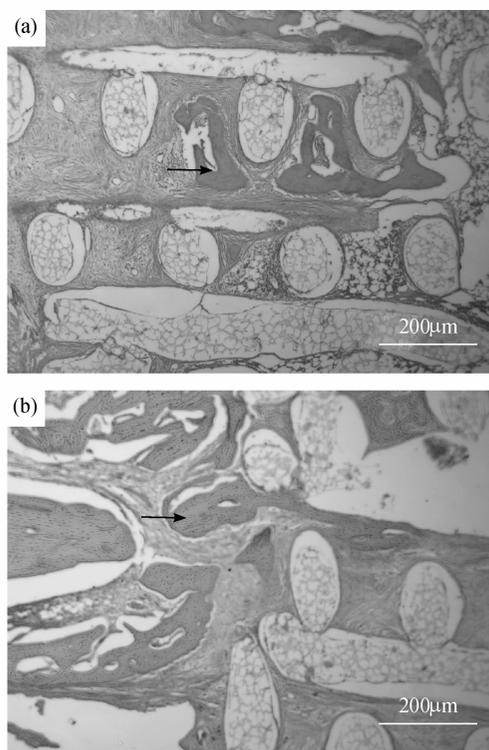


图7 cd-HA/PCL复合材料支架植入兔股骨缺损(a)4w和(b)8w的组织学切片(H&E染色)

Fig.7 Histological appearances of rabbit thighbone defect implanted with cd-HA/PCL composite scaffolds for (a) 4w and (b) 8w (H&E)

Arrows represent ingrowth bone tissue

形成,并长入多孔材料支架中.同时,一些纤维组织也长入多孔支架中,包裹材料的致密结缔组织-材料界面上出现带状的矿化很低的成骨区域.支架植入8w时,大量的新骨组织长入多孔支架材料中.在支架周围,也观察到了一些肥大的骨髓细胞.一些新骨形成一个环形包围着支架,包裹材料的组织间成骨现象明显,较多长入材料的孔隙内,材料-骨组织之间无明显的结缔组织间隔,而是形成了直接的结合.实验结果表明,复合材料的表面生物学特性有利于新骨形成,相互贯通的大孔支架促进新骨长入其中.

3 结论

通过快速成形方法制备了纳米非计量缺钙磷灰石与聚己内酯复合材料多孔支架.复合支架的大孔直径、孔隙率和孔的连通性等参数可控;相对于纯PCL材料,加入cd-HA于PCL基体中,明显提高复合材料的亲水性;同时,复合材料的成骨细胞粘附率和增殖也明显提高.动物体内植入实验的 μ -CT和组织学结果显示,新骨在cd-HA/PCL复合材料的表面形成,并长入多孔支架.结果表明,相互贯通的复合材料大孔支架促进了细胞的增殖,细胞/组织很容易长入多孔支架,新骨可以在多孔支架内部较多较快地形成.本实验证实了cd-HA/PCL复合材料大孔支架具有很好的生物活性和生物相容性.

参考文献:

- [1] Kamitakahara Masanobu, Ohtsuki Chikara, Miyazaki Toshiki. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J. Biomater. Appl.*, 2008, **23** (3): 197-212.
- [2] Kim Hyunbin, Camata Renato P, Lee Sukbin, et al. Crystallographic texture in pulsed laser deposited hydroxyapatite bioceramic coatings. *Acta Materialia*, 2007, **55** (1): 131-139.
- [3] Dumelie N, Benhayoune H, Richard D, et al. In vitro precipitation of electrodeposited calcium-deficient hydroxyapatite coatings on Ti₆Al₄V substrate. *Materials Characterization*, 2008, **59** (2): 129-133.
- [4] LI Yu-Bao, de Wijn J, Klein C P A T, et al. Groot de K. Preparation and characterization of nanograde osteoapatite-like rodcrystals. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.*, 1994, **5** (3): 252-255.
- [5] WEI Jie, LI Yu-Bao, He Yi. Processing properties of nano apatite-polyamide biocomposites. *J. Mater. Sci. Lett.*, 2005, **40** (3): 793-797.
- [6] LIAO Su-San, Watari Fumio, ZHU Yu-He, et al. The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro. *Dental Materials*, 2007, **23** (9): 1120-1128.
- [7] Murugan Ramalingam, Ramakrishna Seeram. Nano-featured scaffold

- folds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Engineering*, 2006, **12**(3): 435-447.
- [8] Lopez-Heredia Marco A, Sohier Jerome, Gsillard Cedric, *et al.* Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, **29**(17): 2608-2615.
- [9] YANG Shou-Feng, YANG Hong-Yi, CHI Xiao-Peng, *et al.* Rapid prototyping of ceramic lattices for hard tissue scaffolds. *Materials and Design*, 2008, **29**(9): 1802-1809.
- [10] Darling Andrew, Shor Lauren, Khalil Saif, *et al.* Multi-material scaffolds for tissue engineering. *Macromolecular Symposia*, 2005, **227**(1): 345-355.
- [11] Hollister Scott J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 2005, **4**(7): 518-524.
- [12] Mohamad Yunos D, Bretcanu Oana, Boccaccini Aldo R. Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *J. Mater. Sci.*, 2008, **43**(13): 4433-4442.
- [13] Jones Julian R, Ehrenfried Lisa M, Hench Larry L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, **27**(7): 964-973.
- [14] LIU Xuan-Yong, Fu Ricky K Y, Poon Ray W Y, *et al.* Biomimetic growth of apatite on hydrogen-implanted silicon. *Biomaterials*, 2004, **25**(25): 5575-5581.
- [15] WEI Jie, LI Yu-Bao. Tissue engineering scaffold material of nano-apatite crystals and polyamide composite. *Eur. Poly. J.*, 2004, **40**(3): 509-515.
- [16] LIU Hai-Feng, FAN Hong-Bin, WANG Yue, *et al.* Ligament tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, **29**(6): 662-674.

Journal of Inorganic
Materials