

KGM/明胶/nano HAP 椎间盘纤维环 组织工程支架的制备与研究

陈希亮¹, 陈庆华¹, 庄颖², 颜廷亭¹

(1. 昆明理工大学 材料科学与工程学院, 昆明 650093; 2. 成都军区昆明总医院, 昆明 650032)

摘要: 椎间盘退变性疾病已经成为严重影响人们工作和生活的疾病, 生物组织工程技术的出现为椎间盘疾病的治疗提供了新的思路和方法。本研究以魔芋葡甘聚糖(Konjac Glucomannan, KGM)、明胶和纳米羟基磷灰石(nano HAP)为原料, 分别采用湿法纺丝法和卷膜法构建了椎间盘纤维环组织工程支架。采用扫描电子显微镜(SEM)、X射线衍射仪(XRD)和傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)对支架的成分、结构和形貌进行了分析, 并测试了纤维环支架的抗压强度、吸水率、孔隙率、体外降解性及细胞毒性。实验结果表明, 得到的椎间盘纤维环组织工程支架具有各向异性的结构特点, 与天然椎间盘纤维环结构极为类似, 且为多孔结构。支架中加入 nano HAP 可以提高其强度; 湿法纺丝法比卷膜法制备的纤维环支架强度高; 戊二醛交联比氨水交联的纤维环支架强度高, 但降解速率快; 此外, 采用戊二醛作交联剂可对 nano HAP 进行更好的包裹, 从而更好地提高支架的强度。支架的吸水率均在700%以上, 孔隙率为66%~75%。该研究为研发新型椎间盘纤维环组织工程支架材料提供了一种思路以及一定的实验和理论依据。

关键词: 椎间盘纤维环; 组织工程支架; 魔芋葡甘聚糖; 明胶; 纳米羟基磷灰石

中图分类号: TB332 文献标识码: A

KGM/Gelatin/Nano HAP Scaffolds for Tissue Engineering of Intervertebral Disc Annulus Fibrosus

CHEN Xi-Liang¹, CHEN Qing-Hua¹, ZHUANG Ying², YAN Ting-Ting¹

(1. Faculty of Materials Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China;
2. Kunming General hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, China)

Abstract: Intervertebral disc degenerative disease has become a serious disease which affects people's work and life, and the emergence of tissue engineering technology provides a new way to the treatment of intervertebral disc disease. In this research, Konjac glucomannan (KGM), gelatin, and nano hydroxyapatite (nano HAP) were used to prepare tissue engineering scaffolds for intervertebral disc annulus fibrosus by wet spinning and rolling film method. Composition, structures and morphologies of the scaffolds were analyzed by scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The compressive strength, water absorption, porosity, *in vitro* degradation, and cytotoxicity of scaffolds were also measured. The results show that the scaffolds are anisotropic structure, similar to natural annulus fibrosus. The scaffolds are porous, with its strength being improved by adding nano HAP. The strength of scaffolds prepared by wet spinning method are higher than that by rolling film method; the scaffolds cross-linked by glutaraldehyde are stronger than that by ammonia because of better nano HAP

combination, and exhibit higher degradation rate. Water absorption and porosity of the scaffolds are over 700%, 66%~75%, respectively. This study provides a theoretical and experimental basis for further development for tissue engineering scaffolds for annulus fibrosus.

Key words: annulus fibrosus; tissue engineering scaffold; konjac glucomannan; gelatin; nano hydroxyapatite

椎间盘退变性疾病是一种常见疾病,在美国仅次于上呼吸道感染而居第二位,是导致劳动力丧失的主要原因之一;亚洲国家如中国因为体力劳动者较多,发病率更高^[1]。生物组织工程技术的出现为椎间盘疾病的治疗提供了新的思路和方法,有望为椎间盘修复或置换提供永久替代产品^[2]。其中,纤维环的再生修复是椎间盘组织工程首先需要解决的问题,只有纤维环得到修复才能让髓核组织保持在椎间隙,进而对退变髓核实施下一步治疗^[3]。

近年来,国内外对用于构建纤维环组织工程支架的材料和方法研究较多,以动物组织为原材料进行处理制备成纤维环组织工程支架为其中一种方法,例如,采用天然管状骨脱钙脱细胞制备成明胶支架^[4-6],或采用动物椎间盘纤维环脱细胞制成组织工程支架等^[7]。静电纺丝法是另一种较热门的纤维环组织工程支架的制备方法,并且材料不像前一种方法那样受到限制,可以实现多种材料共纺。静电纺丝法常用的材料有天然高分子材料,如透明质酸(Hyaluronic acid)、II型胶原(Collagen)等^[8],人工合成材料,如聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚氨酯(PU)、聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)等^[9-13],另外,还可掺杂无机非金属材料,如纳米羟基磷灰石(nano HAP)等^[10]。由于静电纺丝法纺出的丝是随机排列的,为了更符合纤维环定向排列的结构特点,李玉东等^[9]采用动态水流接收装置替代常规静电纺丝接收装置,使纤维得以定向排列。湿法纺丝法是另一种制备具有定向排列纤维结构的纤维环组织工程支架的方法,常采用海藻酸钠(Sodium alginate)、壳聚糖(Chitosan)、PCL、蚕丝(Silk)等^[14-16]材料。

魔芋葡甘聚糖(Konjac glucomannan, KGM)是从魔芋块茎中提取出来的一种中性多糖^[17],在碱性溶液条件下加热 KGM 会使其发生脱乙酰基反应,致使分子链间发生交联从而形成 KGM 水凝胶^[18-19],并且这些交联结构具有热稳定性,即使加热也不会被破坏^[20]。KGM 已被用作软骨组织修复材料^[21-22]。本工作采用无毒性且具有良好的生物相容性的 KGM、明胶和 nano HAP 为原料,分别采用湿法纺丝法和卷膜法制备纤维环组织工程支架,并对比了不同制备方法与工艺条件对纤维环支架结构与性能的影响。

1 实验方法

1.1 材料

实验所用的明胶购买于国药集团化学试剂有限公司(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd),化学纯;KGM 购买于十堰花仙子魔芋制品有限公司(Shiyan Huaxianzi Konjac Productions Co., Ltd),纯度为 99%;nano HAP 为实验室自制。

1.2 纤维环组织工程支架的制备

以 KGM、明胶和 nano HAP 为原料,分别采用湿法纺丝法和卷膜法制备具有结构取向性的纤维环组织工程支架。

湿法纺丝法:先将 1.5 g 明胶溶于 50 mL 蒸馏水,之后加 0.5 g nano HAP,搅匀后放入 1.5 g KGM,继续搅匀,制备出纺丝原液;将纺丝原液注入喷丝设备中,喷头按设定的轨迹作圆周运动,喷出的纺丝原液在固化液中固化为丝状;待原液完全挤出后,取出凝固的初生纤维环,浸没于交联液(交联液为氨水或戊二醛溶液)中交联 8 h,之后用蒸馏水反复浸泡充分洗涤,冷冻干燥,得到椎间盘纤维环组织工程支架。

卷膜法:原液的配制同上述湿法纺丝法;通过流延法将原液制成薄膜,随后对薄膜进行冷冻干燥;浸入交联液(交联液为氨水或戊二醛溶液)中交联 12 h;将半湿状态下的膜切成条状,绕一圆柱形芯缠绕成环状;再次浸入交联液中交联 12 h;之后用蒸馏水反复浸泡、清洗,冷冻干燥,得到椎间盘纤维环组织工程支架。

1.3 表征与检测

采用美国 FEI 公司 Quanta200 型扫描电子显微镜观察纤维环组织工程支架的结构与形貌。采用日本理学 D/max-2200 型 X 射线衍射仪对纤维环组织工程支架进行物相分析,使用 $\text{CuK}\alpha_1$ 辐射($\lambda=0.15406\text{ nm}$),步长为 0.02° ,扫描速度为 $4^\circ/\text{min}$,扫描角度为 $5^\circ\sim 90^\circ$ 。使用 EQUINOX55 型红外光谱仪(德国, BRUKERT)在反射模式下进行操作,对制备的样品进行检测分析,记录波数范围为 $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 。参照国标 GB/1041-92,使用上海衡翼精密仪器有限公司 HY-0230 型万能试验机对纤维环组织工程支架

的抗压强度进行检测。参照国标 GB/T 1034-2008 对纤维环组织工程支架的吸水率进行了测定。参照国标 GB/T21650.1-2008, 采用康塔(Quantachrome)的 PoreMaster 系列压汞仪对样品进行孔隙率测定。参照国标 GB/T14233.3-2005, 采用 CCK-8 法, 选用 L929 细胞, 对样品进行细胞毒性测试。参照国标 GB/T16886.13-2001 对样品进行体外降解测试。

上述检测实验每组重复 5 次, 对实验数据进行平均值和标准差的计算。

2 结果与讨论

2.1 支架的 XRD 分析

图 1 所示为制备的纤维环组织工程支架的 XRD 图谱, 其中, (A)为采用湿法纺丝法制备的支架, (B)为采用卷膜法制备的支架; 图中曲线 a 和 b 分别对应于以氨水和戊二醛为交联剂制备的支架。从图 1 可以看出, 由于存在非晶相高分子明胶和 KGM, 曲线毛刺较多, 所以在 $2\theta=20^\circ$ 左右出现的弥散峰对应于非晶相高分子的衍射峰。图 1(A)中样品在 $2\theta=25.87^\circ$ 、 31.77° 和 39.82° 出现明显的衍射峰, 分别对应于 nano HAP 的(002)、(211)和(310)晶面的特征峰。从图 1(B)中曲线 a 可以看出 nano HAP 的(002)和(211)晶面的特征峰; 曲线 b 除了 nano HAP 的(002)、(211)和(310)晶面的特征峰之外, nano HAP 在 $2\theta=46.71^\circ$ 和 49.47° 还出现了 nano HAP 的(222)和(213)晶面的特征峰。

从图 1(A)和(B)均可以看出, 相比曲线 b, 曲线 a 的毛刺更多, 且 nano HAP 的衍射峰更为宽化, 因此以戊二醛作交联剂比以氨水作交联剂能对 nano HAP 进行更好的包裹。这是由于自然骨是由胶原和 nano HAP 共同组成的有机/无机复合材料, 明胶是

胶原水解的产物, 已有研究表明, 明胶分子侧链的特定官能团对 nano HAP 的特定晶面有良好的吸附作用^[23-24]。在本实验中, 氨水的交联机理是使 KGM 发生脱乙酰化反应^[18,25], 而戊二醛的交联机理则是通过与明胶侧链上的氨基发生反应而生成共价键^[26], 因此, 交联对象与交联机理均有不同。由于明胶对 nano HAP 有良好的吸附特性, 因此戊二醛交联明胶可对 nano HAP 进行更好的包裹。

从图 1 还可以看出, 当交联剂相同时, 不同制备方法制得的纤维环支架的特征峰有一定差异, 采用卷膜法制备的纤维环支架中 nano HAP 的衍射峰更为宽化。这是由于湿法纺丝法制备的纤维环支架是由细丝堆积而成, 相比卷膜法比表面积更高, 因此会有更多的 nano HAP 暴露在表面; 而卷膜法则会将更多 nano HAP 包裹在支架内部, 因此, 卷膜法制备的支架的特征衍射峰更为宽化。

2.2 支架的 FT-IR 分析

图 2 所示为制备的纤维环组织工程支架的红外光谱图, 其中, (A)为采用湿法纺丝法制备的支架, (B)为采用卷膜法制备的支架。从图 2 可以看出, 样品在波数为 2939 和 2887 cm^{-1} 附近处出现的吸收峰对应于亚甲基和甲基的特征吸收峰, 说明样品中存在高分子; 在波数为 1645 、 1234 和 673 cm^{-1} 附近处出现的吸收峰对应于明胶中酰胺 I 键、II 键和 V 键的特征吸收峰; 在波数为 857 cm^{-1} 附近处出现的吸收峰对应于 KGM 中甘露糖的特征吸收峰; 在波数为 1044 和 568 cm^{-1} 附近处出现的吸收峰对应于 nano HAP 中 PO_4^{3-} 的特征吸收峰。

对比采用氨水和戊二醛作交联剂所制备样品的红外光谱图, 可以发现, PO_4^{3-} 在波数为 1044 和 568 cm^{-1} 处吸收峰的积分面积减小, 应该是交联剂对材料的结构产生了影响, 即采用戊二醛作交联剂比以氨水

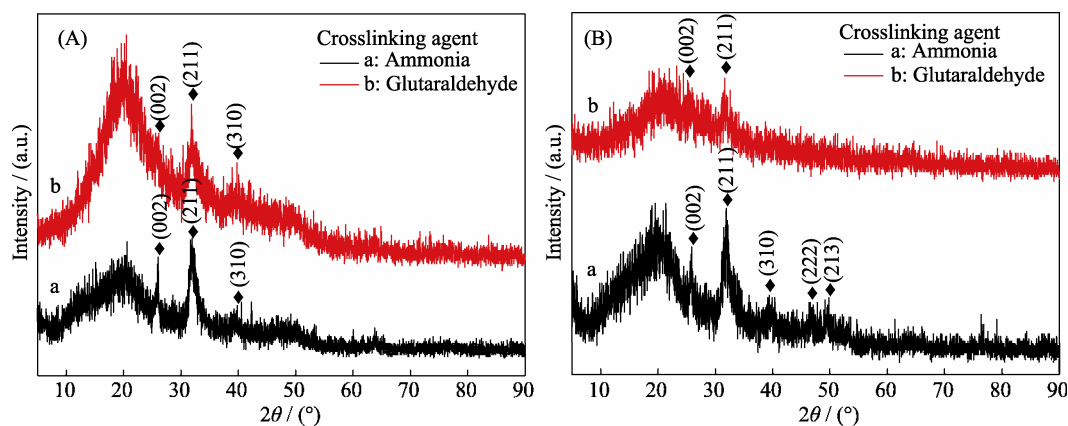


图 1 纤维环组织工程支架的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD patterns of annulus fibrosus tissue engineering scaffolds
(A) Scaffolds prepared by wet spinning method; (B) Scaffolds prepared by rolling film method

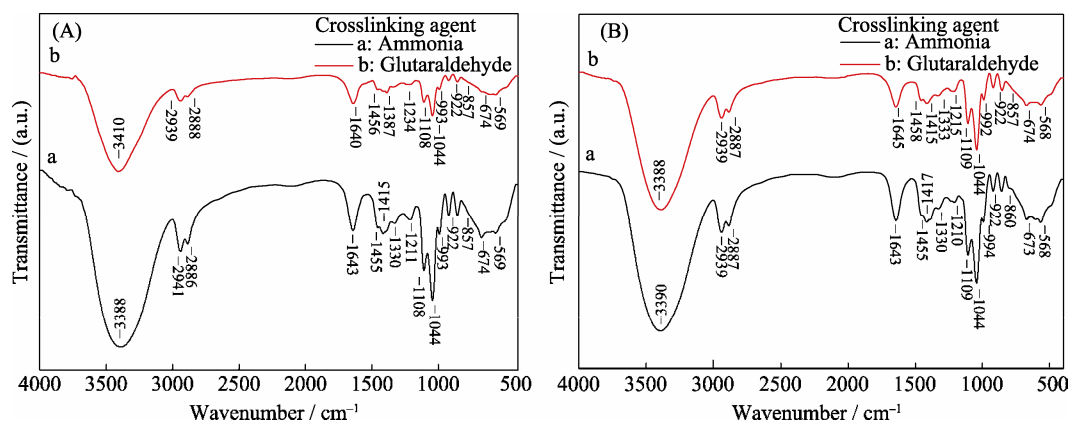


图 2 纤维环组织工程支架的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of annulus fibrosus tissue engineering scaffolds

(A) Scaffolds prepared by wet spinning method; (B) Scaffolds prepared by rolling film method

作交联剂能对 nano HAP 起到更好的包裹作用, 原因已在 XRD 的分析中进行了讨论。

2.3 支架的 SEM 分析

图 3 所示为湿法纺丝法制备的纤维环支架的 SEM 照片, 其中, (a)、(b)为以氨水为交联剂制备的纤维环支架, (c)、(d)为以戊二醛为交联剂制备的支架。从图 3 可以看出, 湿法纺丝法制备的纤维环支架的微观形貌呈细丝状, 丝的直径为 $400\sim 500\ \mu\text{m}$; 图 3(b)和(d)为纤维丝的横切面图, 可以看出, 细丝的内部也呈多孔结构。丝与丝之间的间隙与丝内部的多孔结构可以为营养物质的输送与废弃物的排泄提供通道。从图 3 还可以看出, 细丝表面和内部分布着大量 nano HAP 颗粒。由于 nano HAP 比表面积较大, 特别容易团聚, 因此可以观察到纤维环细丝上的 nano HAP 颗粒也存在团聚现象, 但在细丝表面和内部的分布较为均匀。

对比采用氨水和戊二醛作交联剂制备的纤维环支架的微观形貌, 可以看出, 采用氨水作交联剂制备的纤维环细丝表面形态更为规整, 而采用戊二醛交联的纤维环细丝在制样时更容易出现破碎。这是由于采用不同的交联剂所交联的对象不同, 导致交联后的材料表现出不同的性能。氨水交联的 KGM 表现出更好的韧性, 而戊二醛交联的明胶则表现出

更大的脆性。

图 4 所示为卷膜法制备的纤维环支架的 SEM 照片, 其中, (a, b)为以氨水为交联剂制备的纤维环支架, (c, d)为以戊二醛为交联剂制备的支架。可以看出, 与图 3 相比, 图 4 所示的纤维环支架的形貌有明显不同。湿法纺丝法制备的纤维环支架由同心圆排列的细丝堆积而成, 而卷膜法制备的纤维环支架由同心圆排列的薄带缠绕而成。但是, 二者均具有和天然纤维环相似的各向异性的同心圆结构特征, 此结构有助于提高支架的抗张性能。

从图 4 可以看出, 采用氨水交联的纤维环支架片层间距更密, 而且单个片层的断面处也能呈现多孔结构; 而采用戊二醛交联的纤维环支架单个片层的形态更为完整, 这是由于支架采用不同的交联剂所致。此外, 从图 4 还可以看出, 羟基磷灰石较为均匀地分布在片层的表面和内部。

2.4 支架的力学性能分析

图 5 所示为采用不同方法和不同交联剂制备的纤维环支架的抗压强度, 可以看出, 当使用相同交联剂时, 采用湿法纺丝法制备的纤维环支架比采用卷膜法制备的纤维环支架强度高出 $129\%\sim 149\%$; 当使用相同制备方法时, 采用戊二醛作交联剂制备

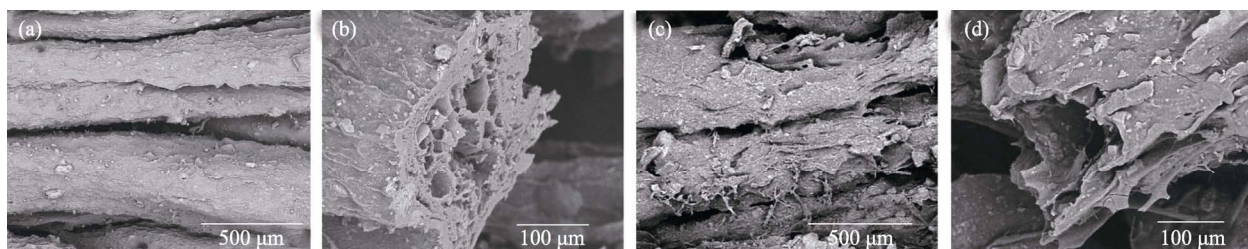


图 3 湿法纺丝法制备的纤维环支架的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of annulus fibrosus scaffolds prepared by wet spinning method

(a, b) Scaffolds crosslinked by ammonia; (c, d) Scaffolds crosslinked by glutaraldehyde

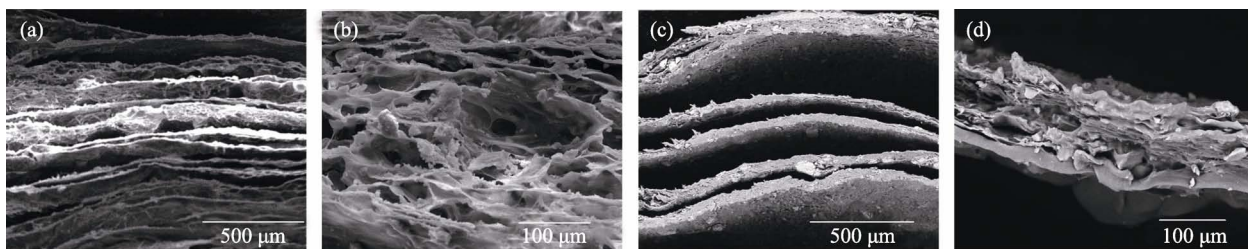


图 4 卷膜法制备的纤维环支架的 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of annulus fibrosus scaffolds prepared by rolling film method
(a, b) Scaffolds crosslinked by ammonia; (c, d) Scaffolds crosslinked by glutaraldehyde

的纤维环支架比采用氨水作交联剂制备的纤维环支架强度高出 95%~112%。原因分析如下: 当使用相同交联剂时, 纤维环支架的结构决定了其力学性能, 细丝状排列的纤维环比同心圆片层状排列的纤维环在受到轴向压力时, 能够较好地对应力进行分摊, 从而提高其轴向的抗压强度; 当使用的制备方法相同时, 交联剂的种类决定了其力学性能, 如前所述, 相比氨水, 采用戊二醛作交联剂能够对 nano HAP 进行更好的包裹, 因此, 分散在材料中的 nano HAP 能更好地起到增强相的作用。此外, 戊二醛交联明胶的强度比氨水交联 KGM 的强度要高, 因此, 采用戊二醛作交联剂能更好地提高纤维环支架的强度。

从图 5 还可以看出, 添加 nano HAP 的纤维环支架与未添加 nano HAP 的纤维环支架相比, 强度可以提高 207%~441%。

2.5 支架的吸水率和孔隙率分析

图 6 所示为纤维环支架的吸水率, 可以看出, 采用不同制备方法、不同交联剂制备的纤维环支架的吸水率为 720%~868%。采用湿法纺丝法和采用卷膜法制备的纤维环支架吸水率相差不明显, 而同种制备方法下, 采用氨水作交联剂比采用戊二醛作交联剂制备的支架的吸水率高 9%~36%。原因分析如下: 纤维环支架的吸水率和高分子的溶胀率是正相

关的。如前所述, 相比氨水, 采用戊二醛作交联剂能够对 nano HAP 进行更好的包裹, 因此在高分子吸水溶胀时, 包裹其中的 nano HAP 颗粒会阻碍高分子链段的伸展, 从而降低材料的溶胀率, 表现为纤维环支架的吸水率降低。

图 7 所示为纤维环支架的孔隙率, 可以看出, 纤维环支架的孔隙率分布在 66%~75%, 湿法纺丝法略高于卷膜法, 此结果与其结构特征相符合。

2.6 支架的降解性能分析

图 8 所示为纤维环支架的降解实验结果。可以

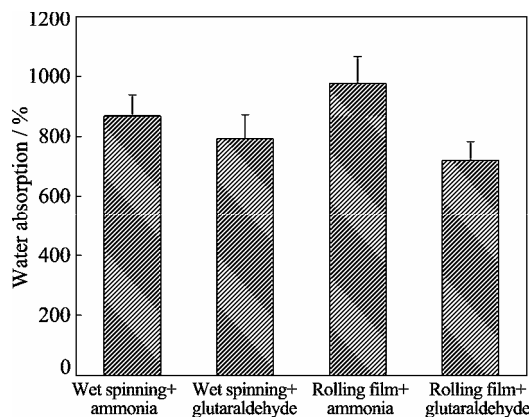


图 6 纤维环支架的吸水率

Fig. 6 Water absorption of annulus fibrosus scaffolds

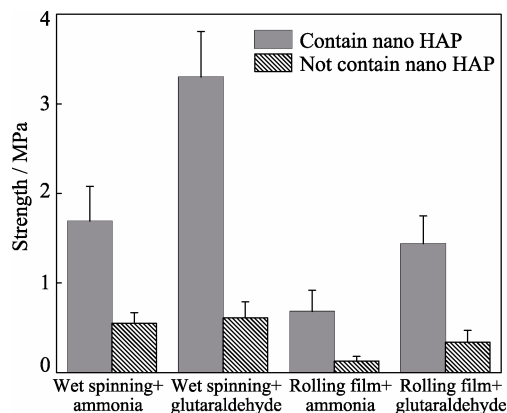


图 5 纤维环支架的抗压强度

Fig. 5 Compressive strength of annulus fibrosus scaffolds

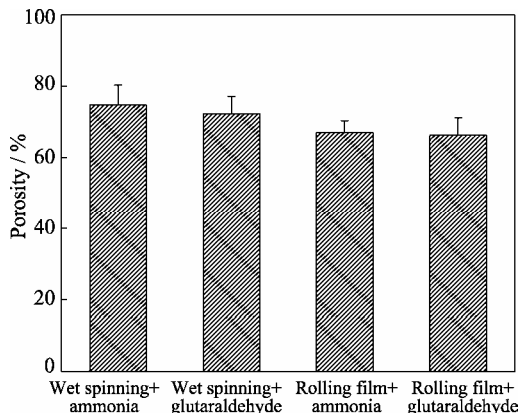


图 7 纤维环支架的孔隙率

Fig. 7 Porosity of annulus fibrosus scaffolds

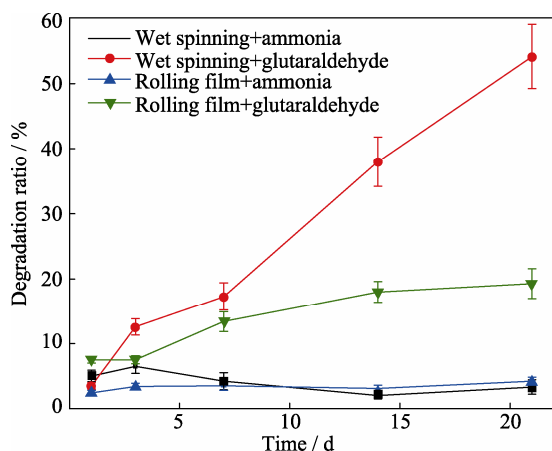


图 8 纤维环支架的降解实验结果

Fig. 8 Degradation results of annulus fibrosus scaffolds

看出,随着时间延长,采用戊二醛作交联剂制备的纤维环支架降解率明显增加,而采用氨水作交联剂制备的纤维环支架降解率基本保持不变。原因分析如下:采用氨水作交联剂,其交联对象为 KGM, KGM 分子链交联形成三维网状结构,而明胶分子链则穿插于 KGM 所形成的三维网状结构中,形成半互穿网络(semi-IPN),因此维持此结构的贡献者为 KGM 三维网状结构;同样,采用戊二醛作交联剂,交联对象为明胶, KGM 分子链穿插于明胶所形成的三维网状结构中,形成半互穿网络,因此维持此结构的贡献者为明胶三维网状结构。在降解过程中,两种支架的降解速率分别取决于 KGM 三维网络和明胶三维网络的降解速率。由于明胶交联网络的降解速率远大于 KGM 交联网络的降解速率,因此采用戊二醛作交联剂制备的支架的降解速率大于采用氨水作交联剂制备的支架。

从图 8 还可以看出,以戊二醛作交联剂时,湿法纺丝法制备的纤维环支架的降解率明显高于卷膜法制备的纤维环支架。这是由于相比卷膜法,湿法纺丝法制备的纤维环支架的比表面积更大,与缓冲液的接触面积也更大,因此降解速率更快。由于 KGM 交联网络的降解速率本身较慢,所以比表面积对以氨水作交联剂制备的支架降解速率的影响并不明显,而以戊二醛作交联剂制备的纤维环支架则较为明显。

2.7 支架的细胞毒性分析

图 9 所示为纤维环支架的细胞毒性实验结果。参照国标 GB/T14233.3-2005,细胞毒性实验结果为 0 级或 1 级,说明制备的纤维环支架均无细胞毒性。

3 结论

以 KGM、明胶和 nano HAP 为原料,分别采用

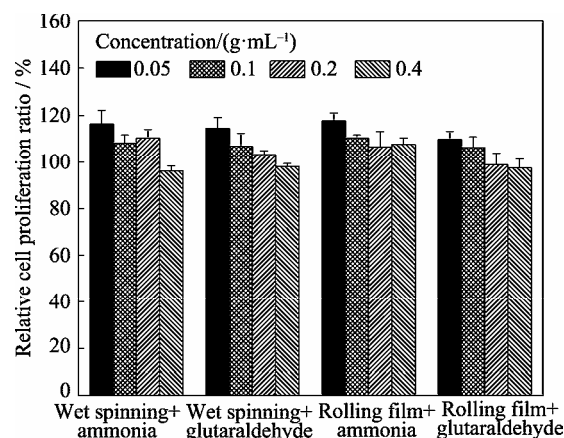


图 9 纤维环支架的细胞毒性实验结果

Fig. 9 Cytotoxicity results of annulus fibrosus scaffolds

湿法纺丝法和卷膜法人工构建了椎间盘纤维环组织工程支架。多孔支架具有与天然椎间盘纤维环极为类似的各向异性结构,且形状可控、尺寸可调。

实验结果表明, nano HAP 可以提高纤维环支架的强度,同时会降低支架的吸水率。相比氨水,采用戊二醛作交联剂可对 nano HAP 进行更好的包裹,且支架强度更高。相比戊二醛,采用氨水作交联剂能显著减缓支架材料的降解速率。

本研究结果为制备高仿真的人工椎间盘纤维环组织工程支架提供了一种思路,并提供了一定的实验与理论依据。

参考文献:

- [1] DEVEREAUX M. Low back pain. *Medical Clinics of North America*, 2009, **93**(1): 477-501.
- [2] RICHARDSON S M, HOYLAND J A, MOBASHERI R, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, **222**(1): 23-32.
- [3] BRON J L, HELDER M N, MEISEL H, et al. Repair, regenerative and supportive therapies of the annulus fibrosus: achievements and challenges. *European Spine Journal*, 2009, **18**(3): 301-313.
- [4] 伍耀宏, 徐宝山, 杨强, 等. 来源于长管状骨的组织工程纤维环支架的理化特性及细胞生物学相容性研究. *中国矫形外科杂志*, 2013, **21**(3): 285-290.
- [5] 潘勇, 周跃, 李长青. 新型组织工程椎间盘纤维环支架材料的制备和形态学观察. *重庆医学*, 2007, **36**(2): 152-155.
- [6] 闫中胜, 徐宝山, 杨强, 等. 新型组织工程椎间盘纤维环支架的制备与性能检测. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, **15**(3): 399-403.
- [7] XU H W, XU B S, YANG Q, et al. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLOS ONE*, 2014, **9**(1): e86723.
- [8] 杨泽龙, 陈竹, 刘康, 等. II型胶原-透明质酸构建组织工程软骨复合三维纳米支架的体外实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2013, **27**(10): 1240-1245.
- [9] 李玉东, 徐源, 周强, 等. 聚乳酸-聚己内酯组织工程纤维环支架的制备及其性能研究. *第三军医大学学报*, 2014, **36**(9):

- 914–918.
- [10] 陈竹, 刘康, 冯刚, 等. 聚乳酸乙醇酸共聚物与纳米羟基磷灰石共混制备组织工程纤维环支架的实验研究. *西部医学*, 2013, **25**(8): 1124–1127.
- [11] VADALA G, MOZETIC P, RAINER A, *et al.* Bioactive electrospun scaffold for annulus fibrosus repair and regeneration. *European Spine Journal*, 2012, **21**(1): 20–26.
- [12] BAO J, LV W, SUN Y Y, *et al.* Electrospun antimicrobial microfibrous scaffold for annulus fibrosus tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 2013, **48**(12): 4223–4232.
- [13] YANG L, KANDEL R A, CHANG G, *et al.* Polar surface chemistry of nanofibrous polyurethane scaffold affects annulus fibrosus cell attachment and early matrix accumulation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, **91**(4): 1089–1099.
- [14] XU B S, DU L L, ZHANG J M, *et al.* Circumferentially oriented microfiber scaffold prepared by wet-spinning for tissue engineering of annulus fibrosus. *RSC Advances*, 2015, **5**(53): 42705–42713.
- [15] SHAO X X, HUNTER C J. Developing an alginate/chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, **82**(3): 701–710.
- [16] CHANG G, KIM H J, VUNJAKNOVAKOVIC G, *et al.* Enhancing annulus fibrosus tissue formation in porous silk scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, **92**(1): 43–51.
- [17] GAO S J, NISHINARI K. Effect of deacetylation rate on gelation kinetics of konjac glucomannan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, **38**(3): 241–249.
- [18] PAN Z D, MENG J J, WANG Y M. Effect of alkalis on deacetylation of konjac glucomannan in mechano-chemical treatment. *Particuology*, 2011, **9**(3): 265–269.
- [19] DAVE V, MCCARTHY S P. Review of konjac glucomannan. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1997, **5**(4): 237–241.
- [20] MARCANO J, HERNANDO I, FISZMAN S. *In vitro* measurements of intragastric rheological properties and their relationships with the potential satiating capacity of cheese pies with konjac glucomannan. *Food Hydrocolloid*, 2015, **51**(1): 16–22.
- [21] 朱向情, 董会, 黄明华, 等. 透明质酸钠/魔芋葡甘聚糖软骨支架材料的研究. *昆明理工大学学报(自然科学版)*, 2012, **37**(3): 25–30.
- [22] 洪东峰, 雷力, 董会, 等. HAP/CS/KGM 复合骨组织工程支架的研究. *武汉理工大学学报*, 2010, **32**(5): 72–76.
- [23] 黄兆龙, 张伟, 崔福斋. 胶原调制磷酸钙矿化成核位点的红外光谱研究. *光谱学与光谱分析*, 2004, **24**(5): 539–542.
- [24] 冯庆玲, 崔福斋, 张伟. 纳米羟基磷灰石/胶原骨修复材料. *中国医学科学院学报*, 2002, **24**(2): 124–128.
- [25] DU X Z, LI J, CHEN J, *et al.* Effect of degree of deacetylation on physicochemical and gelation properties of konjac glucomannan. *Food Research International*, 2012, **46**(1): 270–278.
- [26] FARRIST S, SONG J H, HUANG Q R. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(2): 998–1003.