

## 半水硫酸钙复合功能化多壁碳纳米管骨修复材料生物相容性

楼毅<sup>1</sup>, 潘宗友<sup>1</sup>, 吴瑞凯<sup>1</sup>, 薛恩兴<sup>1</sup>, 江立波<sup>1</sup>, 杨光永<sup>1</sup>, 周洋<sup>1</sup>, 刘建莉<sup>2</sup>,  
黄庆<sup>2</sup>, 徐华梓<sup>1</sup>

1 温州医学院附属第二医院, 浙江 温州 325000

2 中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 浙江 宁波 315201

楼毅, 潘宗友, 吴瑞凯, 等.  $\alpha$  半水硫酸钙复合功能化多壁碳纳米管骨修复材料生物相容性. 生物工程学报, 2012, 28(3): 340-348.

Lou Y, Pan ZY, Wu RK, et al. Biocompatibility of  $\alpha$ -calcium sulfate hemihydrate (CSH)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT) composites for bone reconstruction application. Chin J Biotech, 2012, 28(3): 340-348.

**摘 要:** 旨在评价  $\alpha$  半水硫酸钙复合功能化多壁碳纳米管骨修复材料的生物相容性, 为后期临床实验奠定基础。分别采用兔 L929 成纤维细胞与材料浸提液以及材料片剂与兔骨髓基质干细胞复合培养, 在不同时段运用倒置显微镜观察, MTT 检测, 扫描电子显微镜分析等手段, 观察材料对细胞的相容性; 进行急性、亚急性毒性实验, 肌肉植入实验, 骨植入实验等, 观察材料对组织的相容性。结果表明, L929 成纤维细胞在材料浸提液中生长良好, MTT 检测与对照组无显著差异 ( $P>0.05$ ); 扫描电子显微镜结果显示, 细胞能在材料上黏附并增殖; 体内实验表明材料对机体无毒, 无致敏性, 组织相容性佳。 $\alpha$  半水硫酸钙/碳纳米管复合材料表现出的良好生物相容性, 有望在骨组织工程中得到广泛运用。

**关键词:**  $\alpha$  半水硫酸钙, 碳纳米管, 生物相容性, 骨修复材料

# Biocompatibility of $\alpha$ -calcium sulfate hemihydrate (CSH)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT) composites for bone reconstruction application

Yi Lou<sup>1</sup>, Zongyou Pan<sup>1</sup>, Ruikai Wu<sup>1</sup>, Enxing Xue<sup>1</sup>, Libo Jiang<sup>1</sup>, Guangyong Yang<sup>1</sup>, Yang Zhou<sup>1</sup>, Jianli Liu<sup>2</sup>, Qing Huang<sup>2</sup>, and Huazi Xu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

<sup>2</sup> Ningbo Institute of Material Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, Zhejiang, China

**Abstract:** We examined the biocompatibility and the safety of  $\alpha$ -calcium sulfate hemihydrate (CSH)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT) composites for bone reconstruction application. The biocompatibility of the CSH/MWCNT composites was evaluated by the measures which taking L929 fibroblast cells cultured in the extracted liquid of the composite soaking solution and putting bone marrow stromal cells planted on the composite pellets *in vitro*, respectively. The cell proliferation was evaluated by MTT test and further observed using an inverted optical microscope and a scanning electric microscope. The toxicity of the composites was evaluated by acute and subacute systemic toxicity test. Long-term muscle and bone implantation *in vivo* tests were also conducted. L929 fibroblast cells grew well in the extracted liquid, as well as bone marrow stromal cells that could adhere on the surface of sample pellets and proliferated rapidly. MTT test showed that there were no significant differences between the experimental and control groups ( $P>0.05$ ). *In vivo* test manifested that the composites were no toxicity, no irritation to skin and good for bone defect reconstruction. It was proved that  $\alpha$ -calcium sulfate hemihydrate (CSH)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT) composites exhibited excellent biocompatibility for the potential application in bone tissue engineering.

**Keywords:**  $\alpha$  calcium sulfate hemihydrate, multi-walled carbon nanotubes, biocompatibility, bone reconstruction materials

$\alpha$  半水硫酸钙作为骨修复材料具有以下优点: 1) 良好的生物相容性及可降解性<sup>[1-2]</sup>; 2) 稳定的钙离子释放速度; 3) 骨缺损区作为空隙的填充物, 形成微酸环境, 利于血管和成骨细胞的长入<sup>[3]</sup>。然而其抗压性能差, 无弹性, 在修复缺损时有一种填砖式效果, 而且骨组织在其上生长属于二维生长模式, 不能很好地促进其生长。碳纳米管<sup>[4-5]</sup>是一种新型的支架材料, 其三维的空间结构、巨大的比表面积有利于成骨细胞多方向长入; 互联的多孔网状结构为营养物质与代谢废物的交换提供了通道; 低密度、高强度, 高弹性模量的特性, 使其作为复合材料的添加剂, 能使材料的强度发生数量级改变。将  $\alpha$  半水硫酸钙与

碳纳米管结合, 制备出复合材料, 使两者优势互补, 从而更好地满足临床需要。目前我院与中国科学院已共同研制出  $\alpha$  半水硫酸钙/碳纳米管复合材料, 但其生物相容性尚待论证。本实验通过体外细胞培养和体内动物实验的方法, 参照国内外生物材料相容性评价的标准<sup>[6-8]</sup>, 对该复合材料进行相应的论证, 探讨该骨修复支架材料的可行性, 为后续实验奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 所需材料和主要仪器

$\alpha$  半水硫酸钙/碳管复合材料及其浸提液, 复合材料混悬液 (复合材料与生理盐水质量配比

浓度 4 wt % 和 20 wt %), 日本大耳白, SD 大鼠 (温州医学院动物中心提供); CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 FS), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所), DMEM 高糖培养液 (Hyclone 公司, 美国), MTT、DMSO、细胞培养瓶、培养板 (Sigma 公司, 美国), 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本), 扫描电子显微镜 (PhilipsXL-20, 荷兰) 等。

### 1.1.1 复合支架材料的制备及其结构特点

多壁碳纳米管 (深圳纳米港有限公司) 首先经过硝酸回流热处理, 处理温度为 120 °C, 处理时间为 4 h。处理后的碳纳米管经去离子水洗涤后用表面活性剂进行功能化, 使之表面带负电荷基团。然后将一定配比的功能化多壁碳纳米管和氢氧化钙溶液混合, 滴加硫酸缓慢生成二水硫酸钙, 产物过滤干燥后得复合粉体; 向复合粉体中加入适量转晶剂并进行水浴反应, 反应完全后过滤、干燥, 得到最终的  $\alpha$  半水硫酸钙复合碳纳米管粉体; 最后将复合粉体进行水合并压片, 制备出  $\phi 15 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  尺寸大小片剂 (图 1), 其中  $\alpha$  半水硫酸钙与碳纳米管的质量比为 20:1。复合材料经扫描电子显微镜观察 (图 1), 可见碳纳米管均匀分布于半水硫酸钙晶体之间, 形成三维贯通结构, 孔径约 5~10  $\mu\text{m}$ , 孔隙率达 50% 以上, 微孔之间通过碳纳米管相连; 对比碳纳米管、 $\alpha$  半水硫酸钙和复合材料的 X 射线衍射图 (图 1), 证实最终产物为  $\alpha$  半水硫酸钙/碳纳米管复合材料。生物力学测试表明, 其抗压强度大于 5 MPa, 符合人工骨的力学要求。

### 1.1.2 浸提液的制备

在超净工作台上将消毒后的复合材料颗粒 (约  $\phi 15 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ ) 置入无菌容器中, 按一定比

例加入 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素, 10 nmol/L 地塞米松, 50 mg/L 维生素 C) 于 37 °C 环境下放置 3 d; 将液体置于无菌离心管中离心, 取其上清液, 得  $\alpha$  半水硫酸钙/碳纳米管复合材料浸提液<sup>[9]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 倒置显微镜观察

取第 3 代 L929 成纤维细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化后, 调整细胞浓度至  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 将其接种于 6 孔板中, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 待细胞贴壁后每孔加入 3 mL 复合材料浸提液, 每 3 天换液 1 次, 于 2、4、6 d 观察细胞生长状况和形态结构。

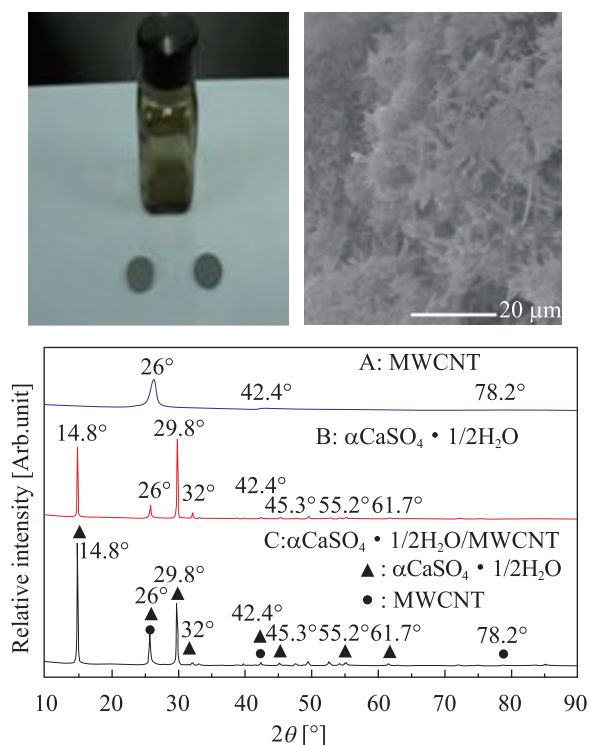


图 1 复合材料成品的显微结构以及碳管、半水硫酸钙和复合材料的 XRD 图

Fig. 1 The microscopic structure of composite material, and the chart for the MWCNT,  $\alpha$ -CSH and  $\alpha$ -CSH/MWCNT composites under XRD.

### 1.2.2 细胞增殖实验

采用第3代L929成纤维细胞,0.25%胰蛋白酶消化后,调整细胞浓度至 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ,分别将细胞悬液加入至3块96孔板中(第3、6、9、12列孔除外),每孔100  $\mu\text{L}$ ,放入 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24 h,使细胞贴壁。向第1、4、7、10列孔中加入复合材料的浸提液100  $\mu\text{L}$ ,作为实验组;向第2、5、8、11列孔中加入DMEM液100  $\mu\text{L}$ 作为对照组;向第3、6、9、12列孔中加入200  $\mu\text{L}$  DMEM液,作为空白组;放入 $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养,并于1、3、5、7 d进行MTT法<sup>[7]</sup>检测(空白组调零)。采用SPSS 13.0软件,将同一时间组间吸光度值进行 $t$ 检验。计算细胞相对增殖率(RGR)。计算公式:RGR: (实验组 $\bar{x}$ /对照组 $\bar{x}$ ) $\times 100\%$ ,根据6级毒性评分标准,转换成毒性级。

### 1.2.3 扫描电子显微镜观察

将一定数量的兔骨髓基质干细胞接种于 $\phi 15 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 的复合材料片剂上,分别共同培养1、3、5 d后取材,经PBS冲洗后,用2%戊二醛固定、锇酸染色、梯度乙醇(70%、80%、90%、100%)脱水、真空干燥、喷金,在温州医学院电子显微镜室PhilipsXL-20型扫描电子显微镜上进行观察并摄像。

### 1.2.4 毒性实验

取30只SD大鼠(雌雄各半),随机分成2组。第1组中10只大鼠进行腹腔注射4wt%材料混悬液2 mL,另10只腹腔注射20wt%混悬液2 mL,此为实验组。第2组中10只大鼠腹腔均注射生理盐水2 mL,设为对照组,分别在给药前后2周测其体重和进行血常规,血生化检验并取其心、肝、脾、肺、肾作病理切片。

### 1.2.5 致敏试验

将复合材料放入一定量生理盐水中,配成悬浊液,3 000 r/min离心10 min,取其上清液;取日本大耳白2只(体重2~3 kg/只),脊柱两侧剪毛,在左侧用上清液皮内注射10个位点,右侧对称处注射生理盐水10个位点,每点0.5 mL;注射后24 h、48 h和72 h观察局部皮肤情况。

### 1.2.6 肌肉植入实验

取SD大鼠5只(约200 g/只),10%水合氯醛腹腔麻醉后,在椎旁两侧切开,暴露两侧椎间肌,植入消毒后的复合材料0.5 g,缝合。术后观察SD大鼠情况,并于术后1月处死,作病理切片,观察炎症情况。

### 1.2.7 骨植入实验

取日本大耳白5只(2~3 kg/只),术前左前肢备皮,用10%水合氯醛腹腔麻醉后,暴露桡骨中段,剥离骨膜,保护神经和血管,在桡骨远端3 cm处将线锯由一侧穿过桡骨骨间膜至对侧,做1.5 cm骨缺损后植入复合材料人工骨,术后不进行内外固定,术后4、8、12周,作病理切片,观察骨生长及炎症情况。

## 2 结果

### 2.1 倒置显微镜观察

L929成纤维细胞在复合材料浸提液中培养2、4、6 d结果如图2所示。细胞接种24 h后完全贴壁,形态良好,呈梭形,胞核较大,在培养瓶中分布均匀,可见少量漂浮死细胞;第2天,细胞开始增殖,第4~6天细胞增殖明显增快,呈簇集生长,集落逐渐融合成片,为平行排列或旋涡状,生长旺盛,与对照组相比,未见明显差别。

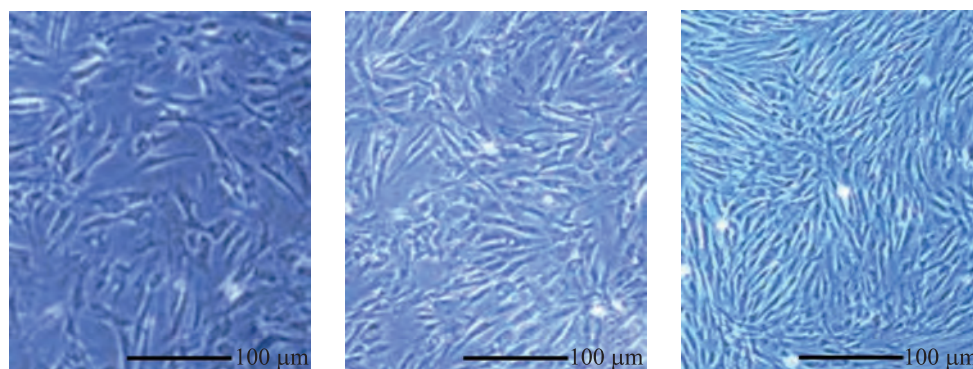


图 2 L929 成纤维细胞在浸提液中 2、4、6 天的生长状况

Fig. 2 L929 fibroblast cell grew in the extracted liquid of composite materials for 2, 4, 6 days, respectively.

## 2.2 细胞增殖实验

第 1、3、5、7 天细胞 MTT 检测, 结果如表 1 所示。

检测结果显示, 实验组光吸收度 ( $OD$  值) 随着时间的延长而升高, 与对照组相比未见明显差异 ( $P>0.05$ ), 表明两组间细胞增殖能力趋向一致。

## 2.3 扫描电子显微镜观察

由图 3 可见, 第 1 天, 有少量骨髓基质干细胞在复合材料上贴壁生长, 细胞形态良好, 伸展成圆形, 伸出伪足粘附于材料表面; 第 3 天, 细胞有增多的趋势, 并在材料上呈三维生长模式; 第 5 天, 细胞数量明显增多并排列紧密, 可见相邻细胞间的絮状分泌外基质, 细胞牢牢贴附于材料表面与孔隙中, 形态无明显差别。

## 2.4 毒性实验

术后 2 周, 实验动物情况良好, 未出现食欲不振、活动度下降的现象; 受试大鼠呼吸平稳, 无惊厥、腹泻、体重下降等现象, 实验组血常规与血生化正常, 详见表 2~3。实验组大鼠高低剂量注射未见死亡现象; 实验组与对照组各项指标无明显差异 ( $P>0.05$ )。将心肝脾肺肾作切片染色 (图 4), 发现组织细胞形态良好, 无充血、水肿、变性、坏死等现象, 组织内未见巨噬细胞、中性粒等炎症细胞聚集, 复合材料未在组织内沉积。

## 2.5 致敏实验

实验组与对照组注射位点皮肤在 24 h、48 h、72 h 观察, 均未发现红肿、溃烂、渗液等情况。

表 1 实验组与对照组不同时段 MTT 检测数据 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 MTT test for experimental and control groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Time (d)	Experimental group	Control group	Cell relative growth rate (%)	Toxicity
1	0.311±0.031	0.322±0.023	96.6	1 grade
3	0.547±0.050	0.565±0.080	96.8	1 grade
5	0.733±0.050	0.761±0.120	96.3	1 grade
7	0.992±0.058	1.010±0.114	98.2	1 grade

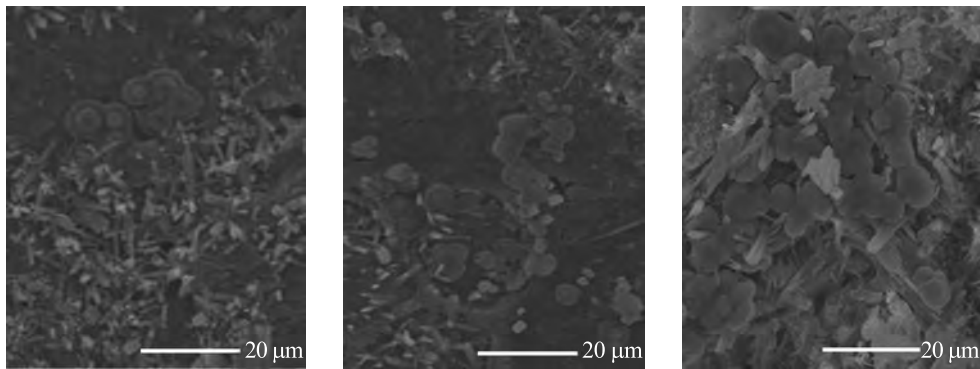


图 3 骨髓基质干细胞在复合材料上 1、3、5 天的生长情况  
Fig. 3 The bone marrow stromal cells had grown on the surface of composite materials for 1, 3, 5 days, respectively.

表 2 材料对大鼠血象的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 2 The rats' hemogram were effected by composite materials for two weeks after surgey ( $\bar{x}\pm s$ )

Group	<i>n</i>	Hemoglobin (g/L)	White blood cell (/mm <sup>3</sup> )	Red blood cell ( $\times 10^{12}$ /L)
1	10	140.2±22.10	9700.2±2250.26	360.2±158.40
2	10	136.1±20.30	9820.3±2258.76	362.1±166.70
3	10	132.4±20.10	9789.3±2321.47	365.5±162.40
<i>P</i> value	1#	>0.05	>0.05	>0.05
	2#	>0.05	>0.05	>0.05

The concentration of solution for group1 is 4 wt% and group 2 is 20 wt%; group 3 is normal saline. The *P* value of group 1# is Group 1 compared with group 3; the *P* value of group 2 # is group 2 compared with group 3.

表 3 材料对大鼠肝肾功能的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 The rats' hepatic and renal function were effected by composite materials for two weeks after surgey ( $\bar{x}\pm s$ )

Group	<i>n</i>	Blood urea nitrogen (μmol/L)	Total protein (g/L)	Alanine transaminase (U/L)
1	10	74.5±2.12	56.01±0.48	5.90±0.46
2	10	72.0±2.41	55.78±0.35	5.99±0.76
3	10	73.0±2.01	55.73±0.62	5.95±0.58
<i>P</i> value	1#	>0.05	>0.05	>0.05
	2#	>0.05	>0.05	>0.05

The concentration of solution for group1is 4wt% and group 2 is 20wt%; group3 is normal saline. The *P* value of group 1# is group1 compared with group 3; the *P* value of group 2 # is group 2 compared with group 3.



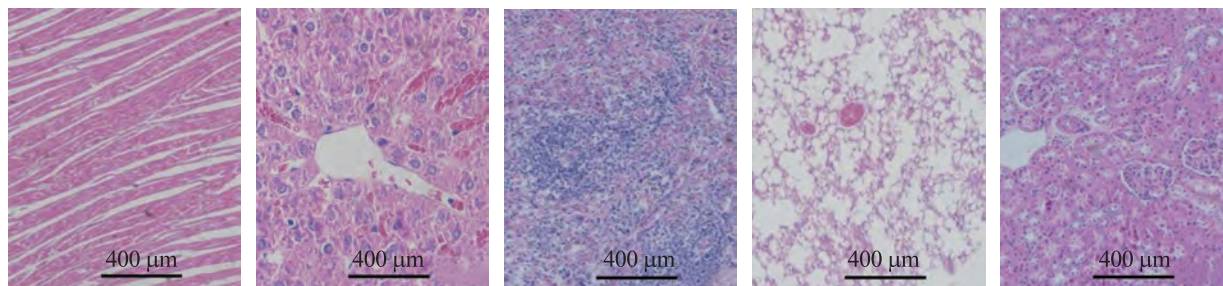


图4 术后2周大鼠心肝脾肺肾(左至右)HE染色

Fig. 4 The HE stain chart for heart, liver, spleen, lung and kidney (from left to right) of rats for 2 weeks after surgery.

## 2.6 肌肉植入实验

术后动物活动良好, 生命体征平稳, 创口未发现红肿感染等现象。术后1月病理切片(图5), 未发现植入处有炎症细胞浸润, 肌肉组织结构正常。

## 2.7 骨植入实验

实验动物创口愈合良好, 未见感染及窦道形成; 术后4周病理切片未见淋巴细胞、中性粒细胞聚集, 偶见少量巨噬细胞; 术后8周骨缺损区有骨盐沉积, 在髓腔区域有纤细的骨小梁形成, 骨密度增加; 术后12周, 成骨细胞生长活跃, 可见少量中性粒细胞和巨噬细胞, 骨缺损区变得

不明显, 有大量骨痂形成, 材料与新生骨组织呈融合状态(图6)。

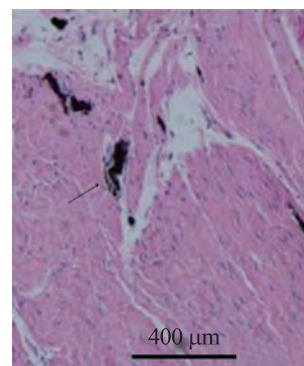


图5 肌肉组织与材料生物相容性良好

Fig. 5 The composite materials is of good biocompatibility with muscle tissue.

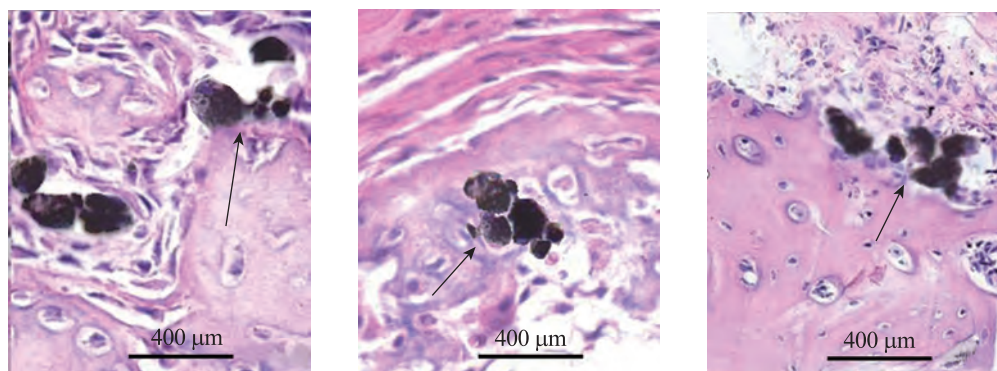


图6 术后4、8、12周骨缺损修复情况

Fig. 6 The status of bone reconstruction for 4,8,12 weeks, respectively after surgery.

### 3 讨论

理想的植骨材料应具备以下特点:良好的生物相容性;具有骨传导性基质或支架能够允许细胞长入;来源广泛;结构完整;具有一定的力学强度。目前临床上的骨修复材料均达不到上述要求,原因在于:自体骨虽为骨修复材料的“金标准”但其来源有限,增加手术创伤和时间,易出现感染等并发症;异体骨虽来源广泛但抗原性强;天然以及合成高分子材料、无机材料机械耐受性差,降解不稳定;这些情况致使单一材料制备的组织工程支架的性能不能达到更高的应用要求,因此,复合支架的研究成为热点。

硫酸钙作为骨修复材料已达百年之久<sup>[10-11]</sup>,体外复合细胞培养实验证实<sup>[12-13]</sup>,其可促使成骨细胞贴壁,增殖旺盛,破骨细胞可吞噬吸收材料。组织学观察发现<sup>[14]</sup>成骨细胞聚集在植入的硫酸钙周围,产生类骨质,但其降解速度过快,缺损区易出现“真空带”,会被纤维组织填充,不利于骨缺损愈合。Hing 等<sup>[15]</sup>认为,造成半水硫酸钙降解快的原因有:局部没有促进骨盐沉积,无骨传导活性的支架存在;早期骨沉积不稳;局部降解的颗粒浓度升高,进而激发炎症反应。而碳纳米管强大的吸附能力及韧性<sup>[16]</sup>,正好可以弥补半水硫酸钙的不足。此外,碳纳米管特殊的结构效应<sup>[17-19]</sup>,如表面界面效应;独特的物理化学性质,如较低的密度;使其作为支架材料,在骨缺损修复方面表现出潜在的应用价值。 $\alpha$ 半水硫酸钙复合功能化多壁碳纳米管骨修复材料理论上不仅能够骨缺损修复时提供足够、持久的钙离子浓度,缓解降解速度;其良好的骨传导活性<sup>[4]</sup>、优异的力学性能<sup>[5]</sup>以及三维的多孔空间结构能够更好地

促进骨缺损修复。

由于生物医学材料植入人体后可能引起免疫应答或排异现象,其质量的优劣直接关系到病人的健康,因此对其生物相容性检测至关重要。

目前常用的检验方法为体外细胞培养与体内植入实验。体外细胞培养能够直接观察材料对细胞生长的影响,具有灵敏度高、重复性好等优点;体内植入实验可以观察材料植入部位周围组织的病理变化以及对机体整体的影响<sup>[20]</sup>。本研究通过体外细胞培养发现,细胞在材料的浸提液中生长良好,并且增殖旺盛,说明此复合材料与细胞具有良好的相容性;通过电子显微镜观察进一步证实,随着时间的延长,在材料上的细胞逐渐增多、铺展并有相互融合和向材料内部延伸与贯穿的趋势,说明材料能够促进细胞黏附,爬行与分化;材料三维的支架结构,为细胞的增殖提供更大的空间。毒性实验和致敏实验,证明此复合材料对机体无毒,无皮肤致敏性。肌肉组织切片表明,材料植入早期,虽有少量炎症细胞浸润,但随后炎症指数逐渐回落,其炎症变化属于一过性,符合术后正常应激反应规律;材料逐渐降解并被周围肌组织所替代,证明材料具有组织亲和性和可降解性。骨组织切片证实,材料植入骨缺损后2周即有软骨样细胞和组织形成,成骨细胞聚集在材料周围,但没有见到异物巨细胞反应、肉芽肿或其他炎症细胞;术后4周成骨细胞系增殖分化,骨岛和骨小梁形成,材料与骨组织开始融合;术后8周,骨陷窝与骨组织形态趋于成熟;术后12周,骨缺损明显缩小,骨盐沉积速度加快,材料的降解速度与新生骨的形成速度相匹配,形成的新生骨质量与植入自体髂骨接近。

综上所述, $\alpha$ 半水硫酸钙复合多壁碳纳米管



骨修复材料具有优异的生物相容性,但其对人体的疗效如何还有待于进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Nilsson M, Wang JS, Wielanek L, et al. Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86(1): 120–125.
- [2] Woo KM, Yu B, Jung HM, et al. Comparative evaluation of different crystal-structured calcium sulfates as bone-filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 91(2): 545–554.
- [3] Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*, 2001, 71(6): 354–361.
- [4] Usui Y, Aoki K, Narita N, et al. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small*, 2008, 4(2): 240–246.
- [5] Yu MF, Lourie O, Dyer MJ, et al. Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load. *Science*, 2000, 287(5453): 637–640.
- [6] Pharmaceutical Affairs Bureau of the Ministry of Health. Biological Evaluation of Technical Requirements for Biological Materials and Medical Devices. Beijing: People's Medical Publishing House at the City of Beijing, 1997: 1–44.  
卫生部药政管理局. 生物材料和医疗器材生物学评价技术要求. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 1–44.
- [7] USP X X II 24 (USA): Biological reactivity test, *in vivo*.
- [8] Hao HP. Biological Evaluation Biomedical Materials Standard-Implementation Guide. Beijing: Standard Press in China, 2000.  
郝和平. 生物医学材料生物学评价标准实施指南. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [9] Wang X, Shi YP, Zhu XT, et al. Evaluation on the cytotoxicity of polymeric material for medical use by MTT-assay. *Shandong J Biomed Eng*, 2003, 22(1): 46–47.  
王昕, 施燕萍, 朱雪涛, 等. MTT 法评价医用高分子材料的细胞毒性. 山东生物医学工程, 2003, 22(1): 46–47.
- [10] Carter DR, Spengler DM. Mechanical properties and composition of cortical bone. *Clin Orthop*, 1978, 135: 193–217.
- [11] Legeros RZ. Calcium Phosphates in Oral Biological and Medicine. Basel, Switzerland: Karger AG, 1991: 236–242.
- [12] Sidqui M, Collin P, Vitte C, et al. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrate. *Biomaterials*, 1995, 16(17): 1327–1332.
- [13] Pecora G, Andreana S, Margarone JE III, et al. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1997, 84(4): 424–429.
- [14] Thomas MV, Puleo DA. Calcium sulfate: properties and clinical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, 88(2): 597–610.
- [15] Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J*, 2007, 7(4): 475–490.
- [16] Saito N, Usui Y, Aoki K, et al. Carbon nanotubes for biomaterials in contact with bone. *Curr Med Chem*, 2008, 15(5): 523–526.
- [17] Zhang LD, Mou JM. Nanometer Material and Nanometer Structure. Beijing: Science Press, 2001.  
张立德, 牟季美. 纳米材料和纳米结构. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] Xu BS. Nanometer Material and Its Application Technology. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.  
许并社. 纳米材料及应用技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [19] ZhangLD. The Fourth Wave—The Shock Wave of Nanometer. Beijing: China Economic Publishing House, 2003.  
张立德. 第4次浪潮—纳米冲击波. 北京: 中国经济出版社, 2003.
- [20] Cui YM, Hu YY, Lu CW, et al. Biocompatibility studies on two different biomaterials combined with cultured bone marrow stromal cells *in vitro*. *Chin Orthop J*, 2003, 11(16): 1113–1116.  
崔玉明, 胡蕴玉, 吕昌伟, 等. 骨髓基质细胞与两种不同载体材料生物相容性的实验研究. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(16): 1113–1116.