

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.02.0206

· 综述 ·

## 海洋鱼骨制备双相磷酸钙材料的研究进展

陈海文, 王少海, 朱庆丰, 窦文雪, 唐卫忠\*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院口腔科, 上海 200433

**[摘要]** 双相磷酸钙材料是骨重建手术中替代材料的“金标准”, 其制备方法多为人工合成, 但人工合成方法制备工序复杂、孔径分布不可控、成本较高, 同时生物活性较低。研究发现海洋鱼骨作为一种天然骨来源也可用于制备双相磷酸钙材料, 其来源广泛、制备方法简单、 $\beta$ -磷酸三钙含量高, 并保留了天然的微观孔隙结构, 是一种潜在的骨替代支架材料。本文从制备方法和材料表征方面综述了海洋鱼骨来源制备双相磷酸钙材料的研究进展。

**[关键词]** 骨替代材料; 双相磷酸钙; 海洋鱼骨; 制备; 表征

**[中图分类号]** R 318.08 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)02-0206-05

### Research progress of preparation of biphasic calcium phosphate ceramics from marine fish bone

CHEN Hai-wen, WANG Shao-hai, ZHU Qing-feng, DOU Wen-xue, TANG Wei-zhong\*

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

**[Abstract]** The biphasic calcium phosphate material is the golden standard alternative materials in bone reconstruction operation. It is mostly from artificially synthesized, but the method is featured by intricate preparation process, uncontrollable pore size distribution, high cost, and low biological activity. Some researches have found that marine fish bone, as a natural bone source, can also be used to prepare biphasic calcium phosphate materials. With a wide range of sources, simple preparation methods and high content of  $\beta$ -tricalcium phosphate, it retains the natural microscopic pore structure, making it a potential bone replacement support material. In this paper, the research progress on biphasic calcium phosphate material from marine fish bone is reviewed regarding preparation methods and material characterization.

**[Key words]** bone substitutes; biphasic calcium phosphate; marine fish bone; preparation; characterization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(2): 206-210]

钙磷陶瓷材料是一种骨替代材料, 因成分与骨组织中骨盐 [主要是羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA)] 类似, 同时避免了自体骨来源有限、二次创伤的缺点<sup>[1]</sup>, 因此其在临床上得到了广泛应用。目前用作生物陶瓷材料的主要有 HA、磷酸三钙 (tricalcium phosphate, TCP)、双相磷酸钙 (biphasic calcium phosphate, BCP)、无定形磷酸钙 (amorphous calcium phosphate, ACP) 和缺钙型羟基磷灰石 (calcium deficient hydroxyapatite, CDHA)<sup>[2]</sup>, 其中由不同比例的 HA 和  $\beta$ -TCP 组成的 BCP 具有可控的降解性、良好的骨传导性和生物相容性, 被认为是骨重建手术中骨替代材料的“金标准”<sup>[3]</sup>。

BCP 材料的来源有 2 种, 一种是人工合成, 最

常见的是先应用湿法或沉淀法制备 CDHA, 然后将其煅烧后得到 BCP 粉体<sup>[4]</sup>。但制备工序复杂、孔径分布不可控、成本高, 同时生物活性较低<sup>[5-6]</sup>。另一种方法是通过天然骨制备, 相较于人工合成的方法, 天然骨制备 BCP 的方法简单, 且制得的 BCP 具有天然的孔隙结构<sup>[7]</sup>。目前研究较多的天然骨来源是牛骨、猪骨等, 但其往往需要在 1 300 °C 以上的高温下煅烧或加入化学试剂才能生成 BCP, 而且其中的  $\beta$ -TCP 含量较低<sup>[8]</sup>。鱼骨通常被认为是鱼类加工过程的副产物, 经济价值较低。有研究发现, 部分海洋鱼骨如鲑鱼<sup>[7]</sup>、裸盖鱼<sup>[7]</sup>、沙丁鱼<sup>[7]</sup>、鳕鱼<sup>[9]</sup>、鲷鱼<sup>[10]</sup>、带鱼<sup>[11]</sup>、蓝鲨<sup>[12]</sup>、比目鱼<sup>[13]</sup>、飞鱼<sup>[13]</sup>、鲭鱼<sup>[13]</sup>等通过单纯煅烧的方法在较低的

[收稿日期] 2019-09-26 [接受日期] 2019-10-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81870808). Supported by National Natural Science Foundation of China (81870808).

[作者简介] 陈海文, 硕士生. E-mail: 471765453@qq.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162490, E-mail: 13122331118@163.com

温度下即可制备成BCP材料, 其中 $\beta$ -TCP含量较高, 且保留了天然的微观孔隙结构。本文从制备方法和材料表征等方面对海洋鱼骨制备BCP的研究进展作一综述。

## 1 海洋鱼骨制备BCP方法

1.1 高温煅烧法 高温煅烧法是目前最常见的海洋鱼骨制备BCP方法, 通常是将海洋鱼骨初步去除有机质后, 置于加热炉中, 然后缓慢升温加热, 该方法较为简单。但是, 目前传统的加热炉是采用表面加热机制对试样进行间接加热<sup>[14]</sup>, 根据加热速率的不同, 从试样表面到试样中心会产生较大的热梯度, 可能会对材料的微观结构不利。同时, 常用的加热炉通常是以 $5\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率逐渐升温, 需要的时间较长, 导致高温下得到的晶粒结晶度较大, 晶粒尺寸可能不均匀<sup>[15]</sup>。

1.2 微波加热法 微波加热法是使用微波的方法对材料进行加热, 与传统热传导方法会导致热梯度不同的是, 微波加热是采用体积加热, 内外同时加热, 将能量直接转移到材料中, 从而获得更高的加热速率<sup>[16-17]</sup>。Li等<sup>[18]</sup>用微波和常规加热的方法分别煅烧纳米HA材料, 结果显示微波加热法较常规加热法得到的BCP材料结晶度更低, 晶粒更细、更加均匀。Mangkonsu等<sup>[19]</sup>发现微波烧结法制备的磷酸钙陶瓷材料在硬度、密度和微观结构方面均优于常规烧结的材料。Pei等<sup>[20]</sup>运用3D打印结合微波煅烧的方法制备HA支架材料, 发现相对于3D打印结合传统煅烧, 微波煅烧后的材料中形成了微孔。但是, 目前还没有对鱼骨材料使用微波加热法制备BCP的报道。此外, 微波法处理钙磷材料的介电吸收较低, 会导致其热效率相对较低<sup>[6,21]</sup>。

1.3 碱性水热法 碱性水热法是指在密封的压力容器中, 以碱性水溶液作为溶剂, 粉体经溶解和再结晶而制备材料的一种方法。相对于其他粉体制备方法, 碱性水热法制得的粉体具有晶粒发育完整、粒度小且分布均匀、颗粒团聚较轻的优点<sup>[22]</sup>。Rocha等<sup>[23]</sup>以乌贼骨为原料, 通过碱性水热法在 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 获得了具有良好孔隙联通、孔径大小的HA材料, 并发现在 $1400\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时HA可部分转化为 $\beta$ -TCP, 即成为BCP材料。但是碱性水热法对设备要求较高(耐高温高压的钢材, 耐腐蚀的内衬), 技术难度大(温压控制严格), 安全性能差且成本

较高。

1.4 激光溶蚀法 除了上述方法, Boutinguiza等<sup>[12]</sup>还尝试以蓝鲨鱼骨为材料, 不经过任何煅烧, 而是通过激光消融系统配合气体压缩喷射器成功制备出BCP。但是, 激光溶蚀法的技术难度大、成本高, 且无法保留鱼骨天然的微观孔隙结构。

## 2 海洋鱼骨制备BCP的材料表征

### 2.1 成分特征

2.1.1 热分解行为 海洋鱼骨在煅烧过程中的热分解行为通常分为水分子的分解、有机物分解、脱碳作用3个阶段。Zhu等<sup>[7]</sup>通过热重分析发现, 当温度从室温升至 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 鲑鱼骨、沙丁鱼骨、裸盖鱼骨的质量在加热过程中出现第1次下降, 此阶段主要是吸附水分的丢失; 加热过程中的第2次明显的质量变化出现在 $200\sim 600\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 主要是结晶水及有机物的丢失; 超过 $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 鱼骨的质量出现第3次明显下降, 可能是发生了脱碳反应。不同的研究者统计得到的鱼骨煅烧过程的质量损失率差异较大, Piccirillo等<sup>[9]</sup>认为一方面可能是由于鱼骨种类的不同, 其中有机成分的含量有所差异; 另一方面, 鱼骨煅烧前的预处理方法不同, 对最终的结果也有较大影响。

2.1.2 无机成分物相分析 X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和傅里叶变换红外(Fourier transform infrared, FTIR)光谱是2种常用的分析鱼骨煅烧过程中物相成分和官能团变化的检测方法。海洋鱼骨来源的BCP材料主要成分为HA和 $\beta$ -TCP, 两者的相对含量受到鱼骨种类、煅烧温度、煅烧时间等因素的影响。为确定最佳的煅烧温度, 研究者对多种海洋鱼骨进行了不同温度的煅烧。Zhang等<sup>[11]</sup>在 $600\sim 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对带鱼骨进行煅烧, 发现在 $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时材料中开始同时出现了 $\beta$ -TCP和HA, 而在此之前, 材料中主要的无机相是HA。Hamada等<sup>[13]</sup>发现比目鱼骨、飞鱼骨、鲭鱼骨、沙丁鱼骨在 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上时材料中就开始出现 $\beta$ -TCP和HA双相成分。随着温度的升高,  $\beta$ -TCP的相对含量也逐渐增加, Zhu等<sup>[7]</sup>在 $600\sim 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别煅烧鲑鱼骨、裸盖鱼骨、沙丁鱼骨, 结果发现鲑鱼骨在 $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 $\beta$ -TCP的相对含量达到最高, 而裸盖鱼骨为 $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 沙丁鱼骨为 $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 鲑鱼骨中 $\beta$ -TCP的最高相对含量(49%)明显高于沙

丁鱼骨(39.4%)和裸盖鱼骨(28%)。

除了 $\beta$ -TCP和HA成分,海洋鱼骨来源的BCP材料中还存在少量碳酸根离子。碳酸根离子常见的存在形式为碳酸HA,它的存在可能会降低HA的结晶度,增加材料的溶解度<sup>[24]</sup>。碳酸HA还可以增加晶粒的表面粗糙度,有利于骨诱导<sup>[25]</sup>。

海洋鱼骨来源的BCP材料中还存在微量金属元素,包括Na、Mg、K、Sr等。这些微量元素可能会取代HA中 $\text{Ca}^{2+}$ 的位置,进而影响材料性能。有研究者发现,含微量元素的磷酸钙对细胞生长和骨整合有利,并且能够增强材料的生物相容性<sup>[26]</sup>。此外,微量金属元素的存在还会使材料测得的钙磷比降低<sup>[27]</sup>。

## 2.2 微观结构特征

**2.2.1 晶粒特点** 不同海洋鱼骨制备的BCP材料的微观晶粒形态各异,包括针状、球状、短棒状、不规则状等<sup>[7,28-29]</sup>。晶粒大小主要分布在纳米层次,并随着煅烧温度和时间的增加而逐渐增大。Venkatesan等<sup>[15]</sup>研究发现,未煅烧前的金枪鱼骨的晶粒粒径为5~10 nm,在马弗炉中经900℃煅烧5 h后晶粒粒径增大至300~1 000 nm。Zhu等<sup>[7]</sup>也发现鲑鱼骨等海洋鱼骨经700℃煅烧2 h后晶粒粒径为30~100 nm,温度升高至900℃时晶粒粒径增大到50~200 nm。Sunil和Jagannatham<sup>[30]</sup>在透射电镜下观察不同温度煅烧后的鱼骨,发现粒径的增大是由于随着温度的升高晶粒之间发生融合所致。

**2.2.2 孔隙结构特点** 海洋鱼骨来源的BCP材料保留了天然的孔隙结构,且孔隙间互相联通。与人工合成材料相似,煅烧温度对材料的孔隙率、孔径、比表面积具有显著影响。Ozawa等<sup>[10]</sup>研究鲷鱼骨来源的BCP时发现,随着煅烧温度的升高,材料的平均孔径从600℃时的30 nm增大到1 000℃时的100 nm以上,而比表面积则从10.5 m<sup>2</sup>/g(600℃)下降到1.6 m<sup>2</sup>/g(1 000℃)。不同的鱼骨种类同样对材料性能有影响,Yamamura等<sup>[31]</sup>将石首鱼骨在800℃煅烧后发现材料的平均孔径为8  $\mu\text{m}$ ,明显大于鲷鱼骨来源的孔径。随着煅烧温度的升高,BCP材料的孔隙率和比表面积逐渐降低,晶粒尺寸和平均孔径逐渐增大,从而导致材料的溶解性下降<sup>[32]</sup>。因此,在制备海洋鱼骨来源BCP材料的过程中,控制煅烧温度十分必要。目前对海洋鱼骨来源的BCP材料孔隙结构的研究资料

很少,对骨替代支架材料最优的孔隙结构也存在争议,因此,后续仍需进一步研究。

## 2.3 生物性能特征

**2.3.1 细胞毒性和生物相容性** 在临床应用中,理想的骨替代支架材料应该无细胞毒性且具有良好的生物相容性。Boutinguiza等<sup>[33]</sup>采用MTT法对金枪鱼骨、剑鱼骨来源的BCP进行了细胞毒性实验,结果显示材料对小鼠成骨细胞系MC3T3E1细胞无细胞毒性。Zhu等<sup>[7]</sup>采用CCK-8法对鲑鱼骨、裸盖鱼骨、沙丁鱼骨来源BCP材料的细胞毒性进行了检测,结果也显示无细胞毒性。Yamamura等<sup>[31]</sup>将石首鱼骨来源的BCP材料植入小鼠皮下组织,结果显示生物相容性良好。

**2.3.2 生物降解性能** 海洋鱼骨来源的BCP材料与人工合成材料类似,其降解性在很大程度上取决于HA/ $\beta$ -TCP比例。除此之外,材料的微观结构特征,包括晶粒尺寸、孔径、孔隙率、比表面积等也会影响材料的降解性能。因此,通过控制制备条件(如煅烧温度等)就可以调整鱼骨来源BCP材料的降解性能。

**2.3.3 骨诱导性能** 有研究者认为,BCP材料本身具有一定的骨诱导性能<sup>[34-35]</sup>,其骨诱导性能与成分(HA/ $\beta$ -TCP比例)、微观结构(晶粒尺寸、孔径、孔隙度、表面微结构等)有关<sup>[36]</sup>。对于BCP材料中最佳的HA/ $\beta$ -TCP比例目前尚无统一认识。Cho等<sup>[37]</sup>和Kong等<sup>[38]</sup>发现HA/ $\beta$ -TCP成分比例在60/40和50/50时的细胞增殖率更高。Fariña等<sup>[39]</sup>发现HA/ $\beta$ -TCP含量比在15/85时,在成骨速度、成骨量上明显优于HA/ $\beta$ -TCP含量比在85/15时。对于材料的微观结构,纳米水平的晶粒大小被认为可以促进骨细胞的黏附、增殖和分化<sup>[18]</sup>。孔径不同时其作用也有所差别,大孔(100 nm以上)可以为成骨细胞的定植、分化提供环境<sup>[40]</sup>,而微孔(10 nm以下)则有利于体液的流动并增强蛋白质吸附能力<sup>[41-42]</sup>。Rustom等<sup>[32]</sup>发现大孔与微孔结合的材料骨诱导性能优于单纯大孔材料。除此之外,Adams等<sup>[25]</sup>还发现碳酸HA可以增加HA晶粒的表面粗糙度,利于成骨。

海洋鱼骨来源的BCP材料既具有大量的 $\beta$ -TCP成分,还具有纳米层次的晶粒尺寸、丰富的大孔和微孔,同时还含有少量的碳酸HA,这些条件提示海洋鱼骨来源的BCP材料具有潜在的骨诱导性

能。但是,目前还缺乏海洋鱼骨来源BCP材料骨诱导性能的直接证据。

### 3 小 结

海洋鱼骨通过简单的高温煅烧方法就可获得BCP,该BCP保留了鱼骨的天然微观孔隙结构,并具有良好的生物相容性及潜在的骨诱导性能,有望成为一种潜在的骨替代材料,具有进一步应用于临床的可能。目前,对海洋鱼骨制备BCP材料的认识大多停留于新鱼骨地发现阶段,而对更优化的制备方法、制备过程中的影响因素及调控、材料改性等方面的研究还不够深入,未来有必要进一步深入研究。

### [参 考 文 献]

- [1] ZIMMERMANN G, MOGHADDAM A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes[J]. *Injury*, 2011, 42(Suppl): S16-S21.
- [2] DOROZHKIN S V. Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates[J]. *Acta Biomater*, 2012, 8: 963-977.
- [3] BOULER J M, PILET P, GAUTHIER O, VERRON E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: a review of biological response[J]. *Acta Biomater*, 2017, 53: 1-12.
- [4] NATASHA A N, SINGH R, ABD SHUKOR M H B, YOUNG T C, PURBOLAKSONO J, SOPYAN L, et al. Synthesis and properties of biphasic calcium phosphate prepared by different methods[J]. *Adv Mater Res*, 2014, 970: 20-25.
- [5] DOROZHKIN S V. Bioceramics of calcium orthophosphates[J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1465-1485.
- [6] HONG Y, FAN H, LI B, GUO B, LIU M, ZHANG X, et al. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics[J]. *Mater Sci Eng R*, 2010, 70(3/4/5/6): 225-242.
- [7] ZHU Q, ABLIKIM Z, CHEN T, CAI Q, XIA J, JIANG D, et al. The preparation and characterization of HA/ $\beta$ -TCP biphasic ceramics from fish bones[J]. *Ceram Int*, 2017, 43: 12213-12220.
- [8] LIN F H, LIAO C J, CHEN K S, SUN J S. Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  addition[J]. *Biomaterials*, 1999, 20: 475-484.
- [9] PICCIRILLO C, SILVA M F, PULLAR R C, BRAGA DA CRUZ I, JORGE R, PINTADO M M, et al. Extraction and characterisation of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33: 103-110.
- [10] OZAWA M, SUZUKI S. Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment[J]. *J Am Ceram Soc*, 2002, 85: 1315-1317.
- [11] ZHANG L, ZHANG C, ZHANG R, JIANG D, ZHU Q, WANG S. Extraction and characterization of HA/ $\beta$ -TCP biphasic calcium phosphate from marine fish[J]. *Mater Lett*, 2019, 236: 680-682.
- [12] BOUTINGUIZA M, LUSQUIÑOS F, RIVEIRO A, COMESAÑA R, POU J. Hydroxylapatite nanoparticles obtained by fiber laser-induced fracture[J]. *Appl Surf Sci*, 2009, 255: 5382-5385.
- [13] HAMADA M, NAGAI T, KAI N, TANOUE Y, MAE H, HASHIMOTO M, et al. Inorganic constituents of bone of fish[J]. *Fish Sci*, 1995, 61: 517-520.
- [14] 刘紫微,刘鑫,尹林,邱宗君.加热炉的选型与工艺设计[J].*当代化工*,2017,46:553-555.
- [15] VENKATESAN J, QIAN Z J, RYU B, THOMAS N V, KIM S K. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone[J/OL]. *Biomed Mater*, 2011, 6: 035003. doi: 10.1088/1748-6041/6/3/035003.
- [16] 刘建,刘建华,吴博威,沈少波,袁国华,彭灵芝.微波加热与常规加热硅锰粉固相脱硅动力学比较[J].*工程科学学报*,2017,39:208-214.
- [17] LI X, SONG T, CHEN X, WANG M, YANG X, XIAO Y, et al. Osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramic spheres with nanocrystalline and their efficacy in guiding bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 3722-3736.
- [18] LI B, CHEN X, GUO B, WANG X, FAN H, ZHANG X. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5: 134-143.
- [19] MANGKONSU C, KUNIO I, BUNHAN L, OTMAN R, MOHD NOOR A F. The effect of microwave sintering on the microstructure and properties of calcium phosphate ceramic[J]. *Procedia Chem*, 2016, 19: 498-504.
- [20] PEI X, MA L, ZHANG B, SUN J, SUN Y, FAN Y, et al. Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffold with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering[J/OL]. *Biofabrication*, 2017, 9: 045008. doi: 10.1088/1758-5090/aa90ed.
- [21] CHANDA A, DASGUPTA S, BOSE S, BANDYOPADHYAY A. Microwave sintering of calcium phosphate ceramics[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2009, 29: 1144-1149.
- [22] 施尔畏,夏长泰.水热法的应用与发展[J].*无机材料学报*, 1996, 11: 193-206.

- [23] ROCHA J H, LEMOS A F, AGATHOPOULOS S, VALÉRIO P, KANNAN S, OKTAR F N, et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish[J]. *Bone*, 2005, 37: 850-857.
- [24] WEBSTER T J, ERGUN C, DOREMUS R H, SIEGEL R W, BIZIOS R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics[J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 1803-1810.
- [25] ADAMS B R, MOSTAFA A, SCHWARTZ Z, BOYAN B D. Osteoblast response to nanocrystalline calcium hydroxyapatite depends on carbonate content[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102: 3237-3242.
- [26] FERRARO V, CARVALHO A P, PICCIRILLO C, SANTOS M M, CASTRO P M, PINTADO M E. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues—a review[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33: 3111-3120.
- [27] TERZIOĞLU P, ÖĞÜT H, KALEMTAŞ A. Natural calcium phosphates from fish bones and their potential biomedical applications[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 91: 899-911.
- [28] COELHO T M, NOGUEIRA E S, STEIMACHER A, LIMA W M, BAESSO M L, BENTO A C. Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from the bones of Brazilian river fish[J/OL]. *J Appl Phys*, 2006, 100: 094312. doi: 10.1063/1.2369647.
- [29] NAGA S M, EL-MAGHRABY H F, MAHMOUD E M, TALAAT M S, IBRHIM A M. Preparation and characterization of highly porous ceramic scaffolds based on thermally treated fish bone[J]. *Ceram Int*, 2015, 41: 15010-15016.
- [30] SUNIL B R, JAGANNATHAM M. Producing hydroxyapatite from fish bones by heat treatment[J]. *Mater Lett*, 2016, 185: 411-414.
- [31] YAMAMURA H, DA SILVA V H P, RUIZ P L M, USSUI V, LAZAR D R R, RENNO A C M, et al. Physico-chemical characterization and biocompatibility of hydroxyapatite derived from fish waste[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2018, 80: 137-142.
- [32] RUSTOM L E, BOUDOU T, LOU S, PIGNOT-PAINTRAND I, NEMKE B W, LU Y, et al. Micropore-induced capillarity enhances bone distribution *in vivo* in biphasic calcium phosphate scaffolds[J]. *Acta Biomater*, 2016, 44: 144-154.
- [33] BOUTINGUIZA M, POU J, COMESAÑA R, LUSQUIÑOSA F, DE CARLOS B A, LEÓN B. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2012, 32: 478-486.
- [34] MIRON R J, SCULEAN A, SHUANG Y, BOSSHARDT D D, GRUBER R, BUSER D, et al. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2016, 27: 668-675.
- [35] HABIBOVIC P, GBURECK U, DOILLON C J, BASSETT D C, VAN BLITTERSWIJK C A, BARRALET J E. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants[J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 944-953.
- [36] EBRAHIMI M, BOTELHO M G, DOROZHKIN S V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 1293-1312.
- [37] CHO J S, CHONG-PYONG C, SANG-HOON R. Bioactivity and osteoconductivity of biphasic calcium phosphates[J/OL]. *Bioceram Dev Appl*, 2010, 1: 1-3. doi: 10.4303/bda/D101129.
- [38] KONG Y M, KIM H E, KIM H W. Phase conversion of tricalcium phosphate into Ca-deficient apatite during sintering of hydroxyapatite-tricalcium phosphate biphasic ceramics[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 84: 334-339.
- [39] FARIÑA N M, GUZÓN F M, PEÑA M L, CANTALAPIEDRA A G. *In vivo* behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 1565-1573.
- [40] TOQUET J, ROHANIZADEH R, GUICHEUX J, COUILLAUD S, PASSUTI N, DACULSI G, et al. Osteogenic potential *in vitro* of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic[J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44: 98-108.
- [41] YUAN H, ZOU P, YANG Z, ZHANG X, DE BRUIJN J D, DE GROOT K. Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 1998, 9: 717-721.
- [42] POLAK S J, RUSTOM L E, GENIN G M, TALCOTT M, WAGONER JOHNSON A J. A mechanism for effective cell-seeding in rigid, microporous substrates[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9: 7977-7986.

[本文编辑] 孙岩