

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.02.0188

· 论 著 ·

可同时释放两种骨形态发生蛋白复合支架的制备

卢春闻¹, 王超¹, 袁佳滨¹, 丁慕晨¹, 徐晓博², 石志才^{1*}, 毛宁方^{1*}

1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433

2. 北方战区陆军 65571 部队卫生队, 四平 136000

[摘要] **目的** 研制一种可同时释放骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 和骨形态发生蛋白 7 (BMP-7) 的生物活性复合支架, 以应用于骨组织工程的研究。 **方法** 分别采用复乳溶剂挥发法和相分离法制备负载 BMP-2 和 BMP-7 的聚乳酸/羟基乙酸-聚乙二醇 (PGLA-PEG) 微球和三维多孔的聚己内酯 (PCL) 支架。然后采用改良的二氯甲烷熏蒸法将 PGLA-PEG 微球黏附在 PCL 支架上, 形成同时负载 BMP-2 和 BMP-7 的复合支架, 并检测 BMP-2 和 BMP-7 的缓释效果。将人成骨细胞系 hFOB1.19 分别种植在复合支架和传统支架中, 研究支架上的细胞增殖能力和成骨分化能力。 **结果** 制备的复合支架能同时缓慢地释放 BMP-2 和 BMP-7。细胞培养第 10 天, 复合支架上的细胞活性优于传统支架 ($P < 0.01$), 细胞形态正常。复合支架上细胞的碱性磷酸酶和 I 型胶原蛋白、骨钙素、骨桥蛋白 3 种成骨基因的 mRNA 水平均高于传统支架 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论** 成功研制出一种可同时释放 BMP-2 和 BMP-7 的生物活性复合支架, 并可用于骨组织工程的研究。

[关键词] 骨和骨组织; 组织工程; 骨形态发生蛋白质类; 聚合物; 组织支架; 骨生成**[中图分类号]** R 68 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)02-0188-06

Bone tissue engineering of a composite scaffold simultaneously releasing two kinds of bone morphogenetic proteins

LU Chun-wen¹, WANG Chao¹, YUAN Jia-bin¹, DING Mu-chen¹, XU Xiao-bo², SHI Zhi-cai^{1*}, MAO Ning-fang^{1*}

1. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Medical Team, No. 65571 Troop of PLA Northern Theater Command, Siping 136000, Jilin, China

[Abstract] **Objective** To prepare a 3D polymer scaffold capable of simultaneously releasing both bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-7 for osteogenic differentiation of hFOB1.19 cells in bone tissue engineering. **Methods** The BMP-2 and BMP-7 microspheres of poly(glycolic acid-co-lactic acid)-polyethylene glycol (PGLA-PEG) were prepared using an emulsion method, and the 3D porous scaffold of PGLA-PEG was produced by phase separation. Then in order to obtain composite scaffold loaded with BMPs, the two microspheres were fixed into scaffolds with methylene chloride fumigation technology, and the slow-release of BMP-2 and BMP-7 was observed. The human osteoblast line cells (hFOB1.19) were seeded on the prepared composite scaffolds for testing cell proliferation and osteogenic differentiation. **Results** It was showed that the produced 3D composite scaffolds could release the BMP-2 and BMP-7 gradually. The hFOB1.19 cells grew better on the 3D composite scaffolds than on the traditional scaffolds on day 10 of cell culture ($P < 0.01$), and the cells had normal morphology. The mRNA levels of alkaline phosphatase, collagen type-I, osteocalcin and osteopontin of cells on the 3D composite scaffolds were higher than those on the scaffold without BMPs ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** We have successfully prepared a 3D polymer scaffold which can simultaneously release BMP-2 and BMP-7, and it may be used bone for tissue engineering.

[Key words] bone and bones; tissue engineering; bone morphogenetic proteins; polymers; tissue scaffolds; osteogenesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(2): 188-193]

作为自体骨及同种异体骨的替代品, 人工骨也许 许是治疗骨缺损最有前途的方法之一^[1-2]。因此, 与**[收稿日期]** 2016-06-21 **[接受日期]** 2017-01-11**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272026, 8167090274)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81272026, 8167090274)。**[作者简介]** 卢春闻, 博士生, 主治医师。E-mail: luchunwench@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors)。Tel: 021-31161689, E-mail: zhicaishi@vip.sina.com; Tel: 021-31161690, E-mail: maonf@163.com

自然骨结构类似、具备骨诱导活性功能的复合生物材料是“仿生”人工骨研究热点之一。研究发现大量的生长因子参与了人体骨折后的自然愈合过程,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)^[3-4]、血管内皮生长因子^[5]、表皮生长因子^[6]和成纤维因子^[7]等,其中以BMP家族最为重要,其代表因子为BMP-2和BMP-7,两者均已被美国国家食品和药物监督管理局(FDA)批准用于骨缺损的临床治疗。关于BMP-2和BMP-7在骨组织工程支架材料的负载和释放的研究越来越受到研究者的关注。

在诱导成骨效应时BMP-2和BMP-7均表现出明显的剂量依赖性,小剂量成骨诱导效应欠佳;高剂量的成骨诱导效应虽好,但是成骨速度过快会引起成骨质量低以及骨吸收^[8]。同时,BMP-2和BMP-7的半衰期短,如果直接应用于体内,因酶的作用^[9-10]或者稀释使其活性降低^[11]。因此,许多学者试图通过将BMP包裹或添加到其他材料基质中以增强局部浓度,延长BMP的活性作用时间。目前将BMP-2和BMP-7同时负载并能实现缓慢释放的研究并不多见。本研究致力于研制一种能够同时释放BMP-2和BMP-7的复合支架,同时研究该支架上的人成骨细胞系hFOB1.19的增殖分化能力和成骨能力,为其在骨组织工程的临床应用奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 聚己内酯(PCL,相对分子质量25 000)和聚乳酸-羟基乙酸-聚乙二醇(PGLA-PEG,相对分子质量25 000)购于山东岱岗生物科技有限公司;扫描电子显微镜(SEM)由日本电子株式会社(JEOL)生产;匀浆机购自德国IKA公司;qPCR仪、ELISA试剂盒购于美国Life公司;所有细胞培养试剂、耗材和生长因子均购于美国赛默飞公司;其他试剂购于上海国药试剂有限公司。

1.2 BMP-PCL复合支架的制备

1.2.1 PGLA-PEG微球的制备 采用复乳溶剂挥发法($W_1/O/W_2$)制备负载BMP-2和BMP-7的PGLA-PEG微球。内水相(W_1):0.1%的BMP-2/PEG(质量比1:10)水溶液;油相(O):PGLA-PEG/二氯甲烷(体积比1:20)溶液;外水相(W_2):0.5%的聚乙烯醇(PVA)/吐温20(质量体积比5:1)水溶液。分别配制 W_1 、O、 W_2 。将 W_1 与O按照体积比30:1的比例混合,1 200 r/min ($r=14$ cm)匀浆1 min,形成初乳液(E)。再将E均匀地滴加到外水相 W_2 中,磁力搅拌器200 r/min搅拌12 h。得到固化的负载BMP-2的PGLA-PEG微球。用相同的方

法制备负载BMP-7的PGLA-PEG微球。

1.2.2 PCL支架的制备 将1 g PCL回流溶解在25 mL 1,4-二氧六环中,形成的均匀溶液倒入用泡沫固定的50 mL玻璃杯中,置于专用的液氮罐中迅速冷冻2 min,然后于冷冻干燥机中冷冻干燥2 d以除去残余的有机溶剂所制备的支架为传统支架。在传统支架上加BMP微球制备成PCL支架。

1.2.3 BMP-PCL复合支架的制备及观察 首先用锋利刀片将制备成功的PCL支架切成约50 mg的小块,置于4℃冷冻干燥6 h,然后加入2种BMP微球悬浮液体各40 μ L(约10 mg)。待悬浮液完全吸附在支架内部后,冷藏风干即可得到同时负载BMP-2和BMP-7复合支架。上述操作均在4℃进行。制备完成后将BMP-PCL复合支架放置在倒置的1 L烧杯中,使用二氯甲烷熏蒸10 min,以加固微球在PCL支架上的黏附能力。取出后冻干6 h以除去残余的二氯甲烷。为了检测BMP-2、BMP-7微球是否黏附在PCL支架内部,将制备成功的BMP-PCL复合支架(以下简称复合支架)切割一小块,放入50 mL离心管中,加入20 mL PBS,100 r/min摇晃10 min以确保微球黏附在PCL支架中。利用SEM观察样品的微观形貌,观察时电压为2~10 kV。

1.3 复合支架BMP-2及BMP-7的释放曲线测试 将复合支架放入含有50 mL PBS的离心管,置于37℃培养箱中,待检测时摇晃离心管,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测PBS中的BMP-2和BMP-7含量。补取样时间点计算支架的BMP释放率(R): $R(\%) = \text{BMP}_{\text{放}}/\text{BMP}_{\text{总}} \times 100\%$,其中 $\text{BMP}_{\text{放}}$ 为复合支架释放的BMP含量, $\text{BMP}_{\text{总}}$ 为复合支架样品负载的BMP含量。

1.4 复合支架上细胞的增殖情况检测 将乙醇浸泡处理的复合支架置入48孔板,每孔种植 2×10^5 个细胞,37℃ 5% CO_2 的条件下培养。分别于细胞培养第5、第10天时,向每孔加入1 mL 10%的CCK-8溶液[避免产生气泡以影响光密度(D)值],将培养板在培养箱内孵育2 h,用酶标仪测定在450 nm波长处的 D 值。将接种细胞的复合支架依次用5%戊二醛固定2 h、PBS清洗、梯度乙醇脱水、冷冻干燥除去残余乙醇后,采用SEM观察。

1.5 复合支架上细胞的成骨分化情况 检测复合支架上细胞中碱性磷酸酶(ALP)的活性以初步评估成骨细胞分化情况。检测方法如下:弃去细胞培养板中原培养液,PBS洗2次后每孔加入500 μ L的0.2% Triton X-100,确保所有支架完全浸泡在Triton X-100中,于4℃裂解;取50 μ L裂解液于96孔板中,加入

50p-NPP 工作液于 37℃ 反应 30 min 后,加入 50 μL 的 1% NaOH 溶液终止反应,使用分光光度计检测 405 nm 波长处的 D 值,然后测定同一样品中蛋白质的含量,绘制标准曲线计算 ALP 的活性。

为了更好地分析复合支架对细胞的成骨分化程度,我们采用 qPCR (Quanti Tect SYBR Green PCR Kit) 检测了 3 种与成骨分化相关的标记基因 [I 型

胶原蛋白 (type I collagen, COL-I)、骨钙素 (osteocalcin, OC) 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)] 的 mRNA 水平。以 GAPDH 为内参基因,每个样品设 3 个复孔。引物序列见表 1。

1.6 统计学处理 数据均采用 SPSS 22.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。检验水准(α)为 0.05。

表 1 qPCR 的引物序列
Tab 1 Primer sequences of qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
COL-I	GAC GAA GAC ATC CCA CCA AT	AGA TCA CGT CAT CGC ACA AC
OC	GTG CAG CCT TTG TGT CCA A	GCT CAC ACA CCT CCC TCC T
OPN	ACT GAT TTT CCC ACG GAC CT	TCA GGG TAC TGG ATG TCA GG
GAPDH	CAC ATC TTC CAG GAG CGA G	TCA CGC CAC AGT TTC CCG GA

COL-I : Type-I collagen ; OC: Osteocalcin; OPN; Osteopontin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2 结果

2.1 复合支架的微观形态观察 BMP-2 微球(图 1A)和 BMP-7 微球(图 1B)均呈规则的球状结构,表面略微粗糙,平均直径分别为 $(42.6 \pm 4.1) \mu\text{m}$ 和 $(47.5 \pm 7.2) \mu\text{m}$ 。PCL 支架(图 1C)内部孔径约 100~300 μm。如图 1D 所示,微球均能够成功地黏

附或镶嵌在 PCL 支架中。

2.2 复合支架同时缓释 BMP-2 和 BMP-7 的检测 复合支架具备同时缓释 BMP-2 和 BMP-7 的能力,且缓释效果相似(图 2)。在最初的 24 h 内,2 种 BMP 均有约 30% 的突释;24 h 后,两者均趋于缓释,且释放率基本相同;至第 10 天时,2 种 BMP 的释放量均在 55%~60%。

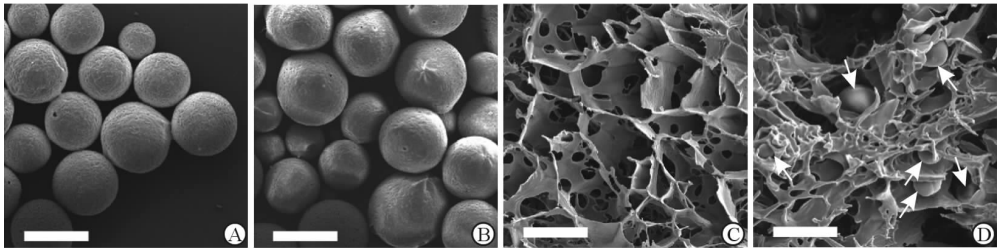


图 1 扫描电子显微镜下制备成功的复合支架微观形貌

Fig 1 The micromorphology of composite scaffolds by scanning electron microscope

A; BMP-2 microspheres; B; BMP-7 microspheres; C; PCL scaffolds; D: The composite scaffolds. BMP: Bone morphogenetic protein; PCL: Polycaprolactone. The bars are 50 μm in A and B, and 100 μm in C and D

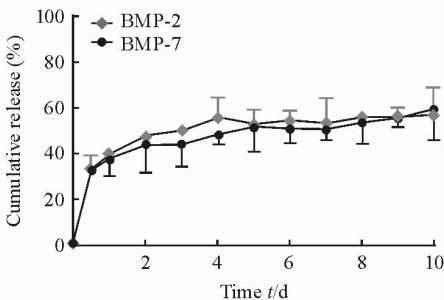


图 2 复合支架同时缓释 BMP-2 和 BMP-7

Fig 2 Simultaneous release of BMP-2 and BMP-7 by composite scaffolds

BMP: Bone morphogenetic protein. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.3 复合支架上 hFOB1.19 细胞活性的检测 采用 CCK-8 法检测复合支架上人成骨细胞系 hFOB1.19 细胞的增殖能力。如图 3A 所示,在细胞培养第 5 天时复合支架和传统支架上的细胞活性相近;但在第 10 天时复合支架上细胞的活性高于传统支架 ($P < 0.01$)。通过 SEM 观察微观形态,细胞培养至第 5 天时 hFOB1.19 细胞黏附在复合支架的三维多孔中,且可见明显的细胞伪足结构(图 3B),表明其生长活跃;培养至第 10 天时,所有支架上 hFOB1.19 细胞均生长良好(图 3C)。

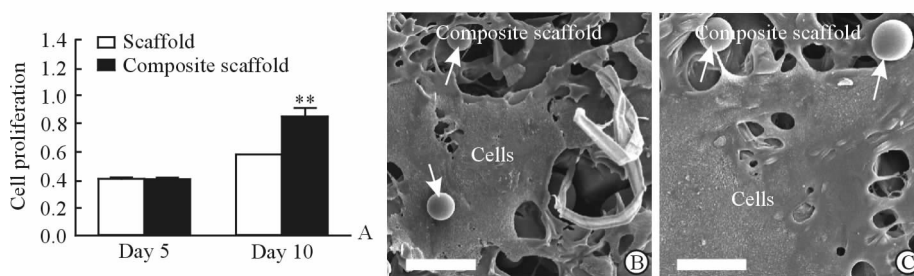


图3 复合支架上 hFOB1.19 细胞的生长

Fig 3 hFOB1.19 cells grew well on the composite scaffolds

A: The hFOB1.19 cells proliferation; B: The SEM graph at day 5; C: The SEM graph at day 10. SEM: Scanning electron microscope. White arrows indicate microspheres. ** $P < 0.01$ vs scaffold group of day 10. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. The bar in Fig 3B and 3C is $100 \mu\text{m}$

2.4 复合支架对成骨分化的影响 分别于细胞培养第5天与第10天时,检测复合支架和传统支架上细胞的ALP活性和COL-1、OC、OPN的mRNA水平。结果显示在细胞培养的第5天和第10天时,复合支架上细胞的ALP活性均高于传统支架($P <$

0.01,图4A);第10天时COL-1、OC、OPN的mRNA水平均高于传统支架($P < 0.05$, $P < 0.01$,图4B~4D),提示同时缓释BMP-2和BMP-7的复合支架更有利于人成骨细胞的诱导分化。

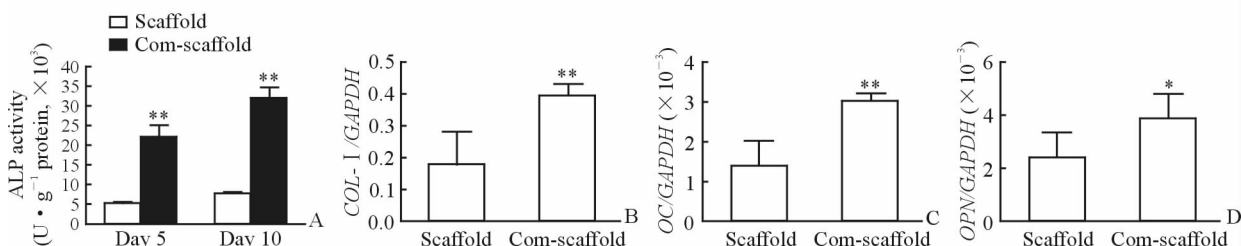


图4 复合支架对成骨分化的影响

Fig 4 Effect of composite scaffold (com-scaffold) on osteogenesis differentiation

A: The ALP activity; B: The relative mRNA level of COL-1; C: The relative mRNA level of OC; D: The relative mRNA level of OPN. ALP: Alkaline phosphatase; COL-1: Type-I collagen; OC: Osteocalcin; OPN: Osteopontin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs scaffold group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

骨细胞(含干细胞分化后的骨细胞)、骨支架材料和骨相关活性因子是构成骨组织工程的3个基本要素。基于骨相关活性因子促进成骨分化,越来越多的研究者尝试通过将不同的生物材料和细胞结合拟实现人工骨组织的制备。负载及缓释骨相关活性因子的人工骨支架是目前研究的热点^[1]。

已有大量研究将骨相关活性因子BMP单独包裹在不同的生物材料载体中,其中部分已应用于临床治疗^[10-11]。但是极少有研究将2种BMP共同使用,主要原因是很难同时有效地控制2种BMP蛋白的释放和作用。针对控制支架中BMP-2及BMP-7同步释放这一目标,我们改良已有的高分子合成工艺与结构控

制技术,采用高分子材料分别进行BMP-2和BMP-7微球包裹,制备出大小和包封率接近的BMP-2微球和BMP-7微球。再通过二氯甲烷熏蒸法将制备的BMP微球固定在三维的多孔的PCL支架内部,成功制备出同时释放BMP-2和BMP-7、可用于骨修复的生物活性复合支架,其可成功诱导人成骨细胞系hFOB1.19细胞进行成骨分化。

如图5所示,本研究中所制备的复合支架同时黏附了BMP-2微球和BMP-7微球,2种微球镶嵌在海绵状支架中,能同时缓慢释放BMP-2和BMP-7。检测细胞活性发现相对于传统支架,可同时释放BMP-2和BMP-7的复合支架上hFOB1.19细胞具有更好的增殖能力,提示复合支架更有利于细胞的生长,这将为进一步动物实验提供必要依据。

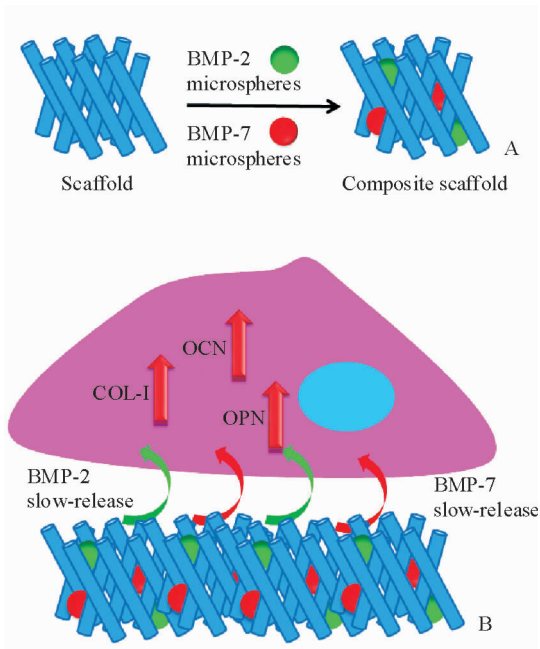


图5 可同时缓释 BMP-2 和 BMP-7 的复合支架的示意图

Fig 5 Diagram of a composite scaffold releasing BMP-2 and BMP-7 simultaneously

A: The diagram of composite scaffold inlaid with BMP-2 and BMP-7;

B: The diagram of simultaneous release of BMP-2 and BMP-7.

BMP: Bone morphogenetic protein

有研究者采用 PLGA 进行 BMP-2 和 BMP-7 的缓释载体的制备,如采用复乳溶剂挥发法制备了负载 BMP-2 蛋白的 PLGA 微球,将其应用于大鼠颅盖骨临界骨缺损模型时,发现 PLGA 微球能够通过释放 BMP-2 蛋白促进骨缺损愈合^[3-4,8]。但未见相关的临床研究,而且采用 PLGA-PEG 进行的 BMP 包裹也未见报道。同时,PCL 广泛应用于制备各种微球和医学三维支架,我们采用复乳溶剂挥发法制备出同时负载 BMP-2 和 BMP-7 PGLA-PEG 微球的 BMP-PCL 复合支架,将复合支架和 hFOB1.19 细胞共培养,检测发现复合支架上细胞的 ALP 活性和成骨分化能力均优于传统支架。

除了 ALP 活性,成骨分化有关基因 COL-1、OC 和 OPN 的 mRNA 水平也是成骨研究和判定的重要指标,特别在骨组织工程领域^[12-13]。COL-1 是成骨细胞最明显的标记物,大部分成骨细胞中均存在大量 COL-1^[14]。增殖期成骨细胞数量不断增加,以形成多层细胞,并合成、分泌 COL-1 参与细胞矿化,导致骨结节的形成。OPN 是一种细胞外基质蛋白,富含谷氨酸、丝氨酸及天冬氨酸,也是一种典型的细胞分泌型的糖基化含磷蛋白,调节着成骨细

胞或组织的矿化^[15-16]。OC 由成骨细胞合成和分泌,含量较稳定,不受骨吸收因素的影响,是一种典型的成骨分化标记物。复合支架上细胞中 3 种基因 mRNA 水平均高于传统支架,进一步说明同步释放 2 种 BMP 的微环境更有利于 hFOB1.19 细胞的成骨分化,也是重要的临床依据。

综上所述,本研究采用 2 种不同的生物材料 PGLA-PEG 和 PCL,成功制备一种同时释放 BMP-2 和 BMP-7、可用于骨修复的复合支架。将可负载和缓释 2 种 BMP 的微球黏附于 PCL 支架中,成功实现了 2 种 BMP 的缓慢释放并能支持成骨细胞系 hFOB1.19 的生长和成骨分化,其细胞增殖能力和成骨分化能力均优于传统的三维 PCL 支架。

[参考文献]

[1] BIGHAM-SADEGH A, ORYAN A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering[J]. Connect Tissue Res, 2015, 6: 175-194.

[2] AI J, EBRAHIMI S, KHOSHZABAN A, JAFARZADEH KASHI T S, MEHRABANI D. Tissue engineering using human mineralized bone xenograft and bone marrow mesenchymal stem cells allograft in healing of tibial fracture of experimental rabbit model[J]. Iran Red Crescent Med J, 2012, 14: 96-103.

[3] BESSA P C, CASAL M, REIS R L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2008, 2: 81-96.

[4] KUBOKI Y, SASAKI M, SAITO A, TAKITA H, KATO H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106 (Suppl 1): 197-203.

[5] ZHANG Q, HUBENAK J, IYYANKI T, ALRED E, TURZA K C, DAVIS G, et al. Engineering vascularized soft tissue flaps in an animal model using human adipose-derived stem cells and VEGF+PLGA/PEG microspheres on a collagen-chitosan scaffold with a flow-through vascular pedicle [J]. Biomaterials, 2015, 73: 198-213.

[6] JABBARZADEH E, DENG M, LÜ Q, JIANG T,

- KHAN Y M, NAIR L S, et al. VEGF-incorporated biomimetic poly(lactide-co-glycolide) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2012, 100: 2187-2196.
- [7] JIANG J, FAN C Y, ZENG B F. Experimental construction of *BMP-2* and *VEGF* gene modified tissue engineering bone *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 1744-1755.
- [8] PAULY S, KLATTE F, STROBEL C, SCHMIDMAIER G, GREINER S, SCHEIBEL M, et al. *BMP-2* and *BMP-7* affect human rotator cuff tendon cells *in vitro*[J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2012, 21: 464-473.
- [9] YILGOR P, HASIRCI N, HASIRCI V. Sequential *BMP-2/BMP-7* delivery from polyester nanocapsules [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93: 528-536.
- [10] MACIAS D, GANAN Y, SAMPATH T K, PIEDRA M E, ROS M A, HURLE J M. Role of *BMP-2* and *OP-1* (*BMP-7*) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development [J]. *Development*, 1997, 124: 1109-1117.
- [11] LYONS K M, HOGAN B L, ROBERTSON E J. Colocalization of *BMP 7* and *BMP 2* RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development [J]. *Mech Dev*, 1995, 50: 71-83.
- [12] DOĞAN A, DEMIRCI S, BAYIR Y, HALICI Z, KARAKUS E, AYDIN A, et al. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol App*, 2014, 44: 246-253.
- [13] LI D, DAI K, TANG T. Effects of dextran on proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10: 587-596.
- [14] QI H, YE Z, REN H, CHEN N, ZENG Q, WU X, et al. Bioactivity assessment of PLLA/PCL/HAP electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 139-144.
- [15] SCHOFFER M D, VELTUM A, THEISEN C, CHEN F, AGARWAL S, FUCHS-WINKELMANN S, et al. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and *BMP-2*: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22: 1753-1762.
- [16] VALANEZHAD A, TSURU K, ISHIKAWA K. Fabrication of strongly attached hydroxyapatite coating on titanium by hydrothermal treatment of Ti-Zn-PO₄ coated titanium in CaCl₂ solution [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2015, 26: 212.

[本文编辑] 杨亚红