

[文章编号 1000-1182(2005)06-0529-05]

釉基质蛋白控释微球的研制及其生物学性能的初步研究

陈发明¹, 吴织芬¹, 金岩², 吴红³, 杜岩¹, 王国芳¹, 聂鑫²

(1. 第四军医大学口腔医院 牙周黏膜病科; 2. 第四军医大学口腔医学院 组织工程实验中心;
3. 第四军医大学基础部 化学系, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 探讨载釉基质蛋白(EMP)的右旋糖酐凝胶微球(dex-MP)的制备工艺及其理化与生物学性能。方法 采用乳化化学交联技术制备载EMP的dex-MP(EMP-dex-MP),正交设计法优化制备工艺;观察EMP-dex-MP形态和粒径,测定其包封率与载药量;测定微球的溶胀、降解性能,动态透析法检测其体外释药特征及其影响因素;通过EMP-dex-MP对体外培养的人牙周膜细胞(PDL)增殖和分化的影响,评价其生物学性能。结果 EMP-dex-MP形态规则,粒径25 μm左右,分布较为均匀;EMP载药量(32.8 ± 1.2)%,包封率(78.9 ± 1.0)%。体外释药实验表明EMP-dex-MP中80%的EMP在前20 d释放,在葡聚糖酶存在下40 d左右可以完全降解。与单纯EMP相比,EMP-dex-MP能持续促进PDL的增殖和分化达12 d左右。结论 dex-MP作为活性生长因子载体,具有确定的缓释作用,并可以通过制备工艺的改变控制其释药行为;EMP-dex-MP作为EMP的一种新的给药方式,比传统给药方式可以更加有效地促进牙周组织相关细胞的增殖与分化。

[关键词] 釉基质蛋白类; 右旋糖酐; 微球体; 控制释放

[中图分类号] R 781.4 **[文献标识码]** A

Preparation of Enamel Matrix Proteins Controlled Release Microspheres and Their Biological Effects on the Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells in vitro CHEN Fa-ming¹, WU Zhi-fen¹, JIN Yan², WU Hong³, DU Yan¹, WANG Guo-fang¹, NIE Xin². (1. Dept. of Periodontology and Oral Medicine, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Center Lab for Tissue Engineering, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 3. Dept. of Chemistry, Faculty of Preclinical Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To prepare enamel matrix proteins (EMP) loaded dextran-based hydrogel microspheres (EMP-dex-MP), and to evaluate their EMP controlled release property and their biological effects on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells (PDL) *in vitro*. **Methods** Using dimethylbenzene as the oil phase, EMP-dex-MP were achieved by emulsion-chemical crosslinking technique. The process of the recombination preparation was optimized by orthogonal factorization method. The configuration and size of EMP-dex-MP were determined by scanning electron microscope. The EMP loading content and encapsulation rate of EMP-dex-MP, and their biodegradation characteristic were studied by routine analysis methods. Dynamic dialysis method was used to determine the release characteristic of EMP-dex-MP *in vitro* and its influencing factors. The proliferation of cultured PDL was measured by MTT method and the differentiation of PDL was measured by their alkaline phosphatase (ALP) activities. **Results** The results showed that EMP-dex-MP were homogenous and stable with the average diameter 25 μm, and the EMP loading content was (32.8 ± 1.2)%, the encapsulation rate was (78.9 ± 1.0)%. Under 9% physiological saline solution contained a very thimbleful quantity of dextranase EMP-dex-MP could be biodegraded completely during about 40 days. The *in vitro* experiments showed that about 80% of EMP could be released out in 20 days. Using EMP-dex-MP could enhance the proliferation responses and ALP activities of PDL more than 12 days. **Conclusion** As a new sustained release system of growth factors, the dex-MP is stable, workable and biodegradable. EMP-dex-MP, whose drug release can be controlled by preparation technique, may be more effective in promoting periodontal tissue regeneration.

[Key words] enamel matrix proteins; dextran; microsphere; controlled release

[收稿日期 2004-12-24; 修回日期 2005-05-10]

[基金项目]“十五”国家科技攻关计划资助项目(2004BA720A26)

[作者简介]陈发明(1972-),男,安徽人,讲师,博士,现在山东青岛解放军第401医院口腔科工作

[通讯作者]吴织芬, Tel: 029-84776322

外源性生长因子的开发和利用为牙周组织的修复再生带来了新的希望,为引导组织再生技术的完善和发展提供了新的研究空间¹。但外源性生长因子必须借助合适的载体才能更好发挥其生物学作用,因

此生长因子载体与缓释系统的研究受到日益广泛的重视和关注²。将药物缓释技术在肿瘤治疗、定位给药等方面的研究经验引入生长因子的控制释放促进缺损组织的修复再生,具有重要的临床意义^{3,4}。釉基质蛋白(enamel matrix proteins, EMPs)是釉质发育过程中未矿化釉质中含有的蛋白成分,研究⁵发现它还可以由赫特威氏上皮根鞘内层细胞合成,并参与牙骨质的发生,对成骨细胞的增殖与分化有显著的作用。本研究利用生物相容性好、可体内降解的右旋糖酐(dextran, dex)来源的生物材料为载体,制备含EMPs的右旋糖酐基凝胶微球(dex-based hydrogel microspheres, dex-MPs),并初步考察其理化与生物学性能,以探讨载EMPs的dex-MPs(EMPs-dex-MPs)在促进牙周组织再生和牙周组织工程中的应用潜能。

1 材料和方法

1.1 主要设备与试剂

DU-640型紫外分光光度计(Beckman公司,美国),HI-集热型磁力搅拌器(江苏金坛正基仪器有限公司),真空干燥箱(大连第四仪表厂),医用离心机(北京仪器厂),S-520扫描电镜(日本日立公司),超速离心机(Beckman公司,美国)。猪EMPs(第四军医大学杜岩提取),dex-GAM(参照参考文献⁶合成),右旋糖酐T-40(dextran T-40,夏斯生物科技公司进口分装),乳化剂Span-80(Sigma公司,美国),交联剂四甲基乙二胺TEMED(上海生工),MTT(Sigma公司,美国),DMEM培养液(Gibco公司,美国),碱性磷酸酶检测试剂盒(北京中山生物工程高科技公司)。

1.2 EMPs-dex-MPs的制备

基本制备工艺参见参考文献⁶。称取dex-GMA 1.2 g溶于PBS缓冲液(6 ml),通入氮气5 min,加入适量EMPs,待其全部溶解后,将溶液匀速滴加到反应体系中。滴加完毕后,向体系中滴加乳化剂0.4 ml,控制温度30℃和搅拌速率350 r/min,60 min后即得EMPs-dex-MPs,真空冷冻干燥备用。根据正交实验设计,在参照参考文献和单因素考察的基础上,选取对微球粒径、载药量和包封率等有明显影响的4个因素:乳化剂加入量、dex-GMA与二甲苯的比例、搅拌速度和EMPs加入量为考察指标,每个因素3个水平,按L₉(3⁴)正交设计表安排实验。在正交设计实验中引入理想函数对微球制备工艺进行综合评价。由正交设计结果的极差可得,四因素的重要性次序为: dex-GMA与二甲苯的比例、乳化剂加入量、搅拌速度和EMPs加入量。dex-GMA与二甲苯的比例、乳化剂加入量、搅拌速度主要影响粒子分布百分比,而EMPs加入量主要影响微球载药量和包封率。通过直观分

析,确定微球的优化处方。

1.3 EMPs-dex-MPs性能考察

1.3.1 形态和粒径 取适量冻干EMPs-dex-MPs均匀散在样品平台上,用导电胶固定后喷金,用扫描电镜观察微球表面形态并拍照;随机测定1 000倍视野的所有微球的粒径,当微球达500个以上时计算平均粒径。

1.3.2 包封率(drug encapsulation ratio, DE)与载药量(drug loading, DL)测定 用紫外分光光度法定量的EMPs溶液(pH=7.0),按照制备工艺制备EMPs-dex-MPs乳状液,调pH为7.0,超速离心(40 000 r/min, 30 min),收集上清液,取沉淀加入定量生理盐水超声震荡分散后再离心,合并2次上清液测定260 nm及280 nm处吸光度OD,根据以标准蛋白质溶液(EMPs)所绘制的标准曲线换算成蛋白质浓度,计算DE和DL。DE(%)=(W_{total}-W_{free})/W_{MPS}×100%;DL(%)=(W_{total}-W_{free})/W_{dex-GMA}×100%(W_{total}:加入的生长因子的总量;W_{free}:离心后上清液中游离生长因子的量;W_{MPS}:微球总重量;W_{dex-GMA}:加入的dex-GMA的量)。由于EMPs可能在油相中具有适当的溶解性,所以EMPs分散到油相介质中就可使微球中EMPs含量降低。为了提高微球的载药量和包封率,首先将二甲苯用EMPs饱和,然后用其上层澄清的饱和二甲苯作为油相,按正交实验优化的工艺制得3批含药微球,用紫外分光光度法测定DE和DL。

1.3.3 体外释药特性测定 参照参考文献⁴介绍的方法对EMPs-dex-MPs的体外释药特征进行动态检测。12个有塞锥形瓶中分别盛有10 ml生理盐水作释药介质,编号1~12。每瓶加入0.1 g EMPs-dex-MPs,摇匀,置于37℃孵箱内,记录释药起始时间。分别于4、8、16、24、48、96、144、240、288、320、392和480 h取1~12号锥形瓶,超速离心(40 000 r/min, 30 min)2次,以释药介质为参比,高效液相分析法测定上清液蛋白含量,根据累计释药百分数(cumulative release rate, Q)描绘累计释药曲线。

1.3.4 溶胀率(swelling ratio, Rs)测定 将质量为W_D微球置于室温PBS中12 h后取出,置于与水平面呈60°的玻璃平板上,分别于溶胀20、40、60、80、100、120、140、200、320、460、600、720 min后称重记为W_w。利用下列公式计算Rs, Rs=(W_w-W_D)/W_D×100%。根据实验结果,绘制溶胀曲线和微球释放曲线。同时分别考察不同交联剂TEMED(N,N,N,N-tetramethylethylenediamine)用量(1、2、3 ml)制备的微球的溶胀性能变化及其与微球体外释药的关系。

1.3.5 体外降解实验 称取4份干燥载药微球各

0.1 g, 溶于滴加 0.005 % 葡聚糖酶溶液 0.1 ml 的生理盐水(10 ml)中, 分别于 37 °C 恒温放置 10、20、30、40 d 后冷冻干燥称重并电镜观察微球降解情况。

1.4 EMPs-dex-MPs 对外培养的人牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)的生物学效应

1.4.1 PDLs 的培养 按照参考文献⁷的方法培养, 取第 5~7 代细胞进行实验。

1.4.2 MTT 比色法检测细胞增殖效应 PDLs 经消化后计数, 用培养液调整浓度至每毫升 1×10^4 个细胞, 加入 96 孔板, 每孔 100 μ l。24 h 后按组别换成不同培养液(A组: 含 200 μ g/L 单纯 EMPs; B组: 200 μ g/L EMPs 的 EMPs-dex-MPs; C组: 不含 EMPs 的空白 dex-MPs; D组: 空白对照)各 200 μ l。每时间点设 4 个孔, 分别在培养 1、2、3、5、7、10 和 12 d, 加入 5 % MTT 20 μ l, 4 h 后吸去孔内液体, 加入 150 μ l 二甲亚砜, 振荡 10 min 后酶联检测仪 490 nm 波长测光吸收值(OD 值)。

1.4.3 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测 亦在 1.4.2 相同时间点弃去培养液, 加入 0.2 % Triton X-100 各 50 μ l, 按试剂盒要求先后加入缓冲液、基质液各 50 μ l, 显色剂 150 μ l, 分光光度计 520 nm 波长测 OD 值。

1.4.4 统计学分析 用统计分析系统(SAS6.12)软件包, 对结果进行统计学分析, 所有数据均经过正态分布检验、方差齐性检验、方差分析及多个实验组与一个对照组均数的两两比较。

2 结果

2.1 EMPs-dex-MPs 制备

按正交实验优化的工艺制备 4 批含 EMPs 微球, 进行正交复核实验, 测得微球的 20~30 μ m 粒径分布百分比(72.4 \pm 1.8)%, 微球载药量(29.9 \pm 0.9)%, 药物包封率(73.6 \pm 1.8) %。结果表明微球制备工艺稳定、重现性良好。

2.2 EMPs-dex-MPs 性质

2.2.1 形态和粒径 EMPs-dex-MPs 表面形态良好, 80 % 微球粒径在 25 μ m 左右, 分散好(图 1)。

2.2.2 载药量与包封率 用紫外分光光度法测得微球载药量(32.8 \pm 1.2)%, 包封率(78.9 \pm 1.0)%, 与正交复核实验的结果进行比较, 表明用饱和油相法可提高微球的载药量和包封率。

2.2.3 体外释药特征 动态透析法检测表明 EMPs-dex-MPs 释药符合双相动力学释药规律。初相为快速释药相, 后相为缓释相, 80 % 药物释放在前 20 d。

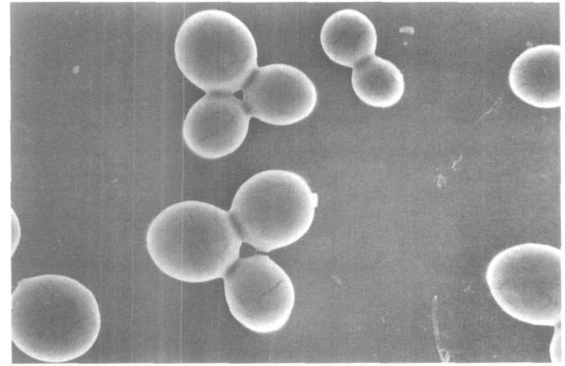


图 1 EMPs-dex-MPs 形态 SEM \times 500

Fig 1 Conformation of EMPs-dex-MPs SEM \times 500

2.2.4 溶胀性能 不同交联剂 TEMED 用量制备的微球溶胀率(R_s)有明显差别(图 2)。不同 TEMED 用量的 EMPs-dex-MPs 微球溶胀曲线见图 2, 微球释放曲线见图 3。由图 2、3 可见, 微球溶胀率和药物释放之间关系密切, 溶胀率大, 释药加快。

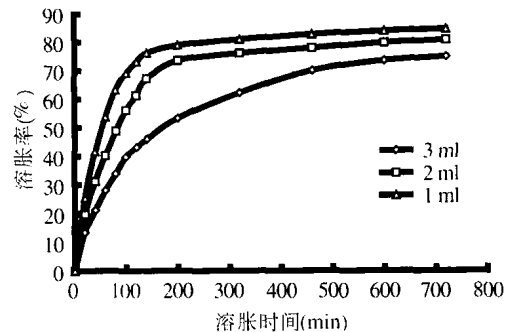


图 2 不同 TEMED 用量制备的 EMPs-dex-MPs 溶胀曲线

Fig 2 The swelling curve of EMPs-dex-MPs prepared with different amount of TEMED

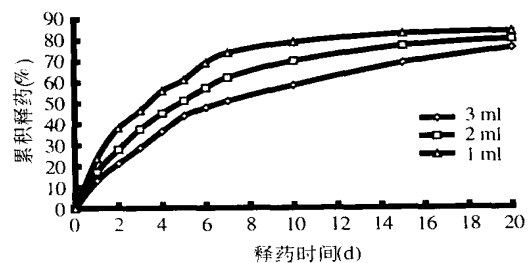


图 3 不同 TEMED 用量制备的 EMPs-dex-MPs 释药曲线

Fig 3 The drug release profile of EMPs-dex-MPs prepared with different amount of TEMED

2.2.5 降解性能 随着时间延长, EMPs-dex-MPs 在葡聚糖酶的作用下, 表面逐渐降解, 变得凸凹不平, 微球形态破坏, 直至完全降解。扫描电镜下可见 10 d 后微球开始粘连, 部分开始溶解; 20 d 后微球广泛粘连、溶解; 30 d 后微球大部分溶解破坏; 40 d 后大部分微球溶解消失, 残余少量微球可见表面凸凹不平, 微球形态完全破坏, 直至完全降解。

2.3 EMPs-dex-MPs 对 PDLcs 增殖的影响

PDLcs 在含有 EMPs-dex-MPs 的培养液中生长迅速,细胞增殖活跃,形态良好,表明 EMPs-dex-MPs 具有良好的细胞相容性。EMPs-dex-MPs 促进 PDLcs 增殖的时间效应见图 4。由图 4 可以看出,A、B 两组在 3 d 内增殖效果无显著性差异 ($P > 0.05$),但明显快于 C、D 组 ($P < 0.01$);3 d 后,B 组较 A 组增殖明显加快 ($P < 0.01$),并持续到 12 d 左右,表明 EMPs-dex-MPs 对生长因子有确切的缓释作用。

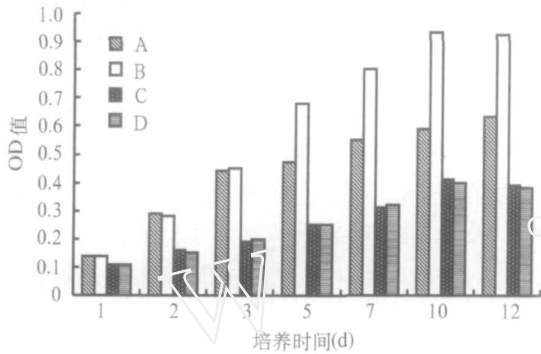


图 4 EMPs-dex-MPs 促进 PDLcs 增殖的时间效应

Fig 4 The enhancement effect on the proliferation responses of PDLcs by EMPs-dex-MPs

2.4 EMPs-dex-MPs 对 PDLcs 分化的影响

EMPs-dex-MPs 对 PDLcs 的 ALP 活性表达的影响见图 5。由图 5 可以看出 EMPs-dex-MPs 明显提高 PDLcs 的 ALP 活性,并且持续时间较单纯 EMPs 显著延长 ($P < 0.01$)。

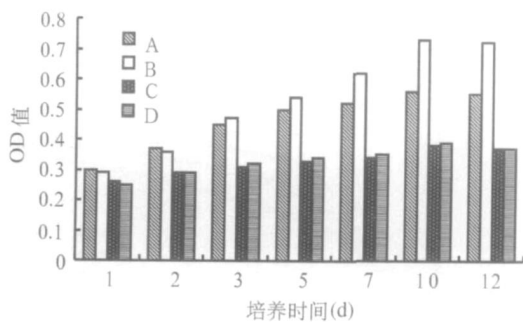


图 5 EMPs-dex-MPs 对 PDLcs 的 ALP 活性表达的影响

Fig 5 Effects of EMPs-dex-MPs on the ALP activity expression of PDLcs

3 讨论

生长因子释放系统是影响生长因子发挥效能的重要因素,良好的载体系统可避免生长因子在体内被组织液稀释或代谢,使生长因子集中在靶组织附近释放,从而增强专一性和疗效,此外通过缓释系统可以延长生长因子在体内的作用时间。实验表明,微球载体较传统载体有载药量大、使用方便、在体内易降解吸收等特点;同时,微球结构还可以保护药物免受外界环境的破坏,将不可混合的化合物隔离,使不同类的材料具有良好的亲和性。壳聚糖、聚乳酸和聚羟基

乙酸的共聚体、明胶等多种材料已经被学者广泛用来作为生长因子的微球载体进行研究,但在缓释方面凝胶载药系统具有明显的优势^{2-4,6}。然而,目前生长因子微载体的研究还处于初级阶段,还有许多问题没有解决,深入进行外源性生长因子的开发和应用是组织工程研究的重点,如何利用合适的载体负载活性生长因子持续促进组织再生是目前最有前途、最接近临床应用的研究课题^{3,4,6,8-10}。

引入右旋糖酐凝胶作为蛋白类药物载体应用广泛,最近几年来大多数学者都把目光投向了具有可控性和调节性微凝胶的设计、合成与应用研究^{3,4,6,9-11}。凝胶微球(亦称微凝胶)具有良好的溶胀性能,而溶胀性能是影响微球载药、释药及降解性能的重要指标,控制溶胀参数是凝胶给药系统较常用的对药物控制释放的方法^{3,6}。本实验对不同微粒的右旋糖酐基微凝胶的溶胀性能进行了相应的测试,结果表明他们的溶胀参数随着粒径的减小而增大,提示通过制备工艺的改变也可以控制微凝胶的溶胀性能,从而达到控制给药。实验中还发现,可以通过交联剂用量的改变控制微球溶胀性能,从而达到控制给药的目的。这是因为交联剂用量越大,交联密度越大,微球的强度越大,微球的溶胀度越小,同时微球中的微通道越少,水在其中的出入越困难,药物分子释放扩散的阻力越大,药物的释放速率越慢。同时由溶胀曲线和释药曲线还可以看出,这两种曲线很相似,说明了两之间的一致性,即在释放初期,微球通过微孔道迅速吸水,快速溶胀,导致微球释药迅速,同时溶胀越快则释药越快,表明了释放行为遵守溶胀控制机制,而溶胀达到平衡后,药物只能通过骨架慢慢地扩散或通过微球的降解慢慢地释放,则释药速率将减慢,此时释放行为遵守扩散控制机制。本研究结果表明,设计合成的 dex-MPs 具有良好的成球性能,载药量大,在葡聚糖酶存在的情况下 40 d 左右可以完全降解,可以通过制备工艺的改变来控制微球的粒径,从而改变其溶胀、载药、释药及降解性能,符合作为生长因子控释载体的条件,是一种很有前途的载体材料,其应用研究有待进一步深入。

[参考文献]

- 1] 陈发明,吴织芬,金 岩. 牙周组织工程研究进展 J. 中华口腔医学杂志,2004,39(6):520-522.
(Chen FM, Wu ZF, Jin Y. Development and advancement in periodontal tissue engineering J. Chin J Stomatol, 2004, 39(6):520-522.)
- 2] 陈发明. 生长因子载体及缓释系统的研究进展 J. 国外医学口腔医学分册,2005,32(1):44-46.

- (Chen FM. Development of carriers and sustained release system of growth factors J. Foreign Medical Science Stomatology, 2005, 32(1):44-46.)
- 3] Holland TA, Tessmar JK, Tabata Y, et al. Transforming growth factor-beta1 release from oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment J. J Control Release, 2004, 94(1):101-114.
- 4] 陈发明,吴织芬,金岩,等.重组人骨形态发生蛋白-2缓释微球对成骨细胞的作用J.中华实验外科杂志,2005,22(2):151-153.
(Chen FM, Wu ZF, Jin Y, et al. Effect of recombinant human morphogenic protein-2 sustained release microspheres on the proliferation and differentiation of osteoblasts J. Chin J Exp Surg, 2005, 22(2):151-153.)
- 5] 束蓉,刘正,葛琳华,等.猪釉基质蛋白对MC3T3-E1成骨细胞增殖分化的影响J.华西口腔医学杂志,2003,18(4):226-228.
(Shu R, Liu Z, Ge LH. Influence of porcine enamel matrix protein on MC3T3-E1 osteoblast proliferation and differentiation J. West China J Stomatology, 2003, 18(4):226-228.)
- 6] 陈发明,吴织芬,金岩,等.载rhBMP₂凝胶微球控释系统的设计与合成J.实用口腔医学杂志,2005,21(2):174-177.
(Chen FM, Wu ZF, Jin Y, et al. Development of a hydrogel microsphere delivery system for rhBMP₂ J. J Pract Stomatol, 2005, 21(2):174-177.)
- 7] 董广英,吴织芬,王勤涛,等.胰岛素和转化生长因子-1对人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性和总蛋白含量的影响J.华西口腔医学杂志,2001,19(3):146-148.
(Dong GY, Wu ZF, Wang QT, et al. Effects of insulin and transforming growth factor-1 on alkaline phosphatase activity and total protein content in human periodontal ligament cells J. West China J Stomatology, 2001, 19(3):146-148.)
- 8] Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: Effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane J. Tissue Eng, 2003, 9(2):153-162.
- 9] Park IK, Seo SJ, Akashi M. Controlled release of epidermal growth factor (EGF) from EGF-loaded polymeric nanoparticles composed of polystyrene as core and poly(methacrylic acid) as corona *in vitro* J. Arch Pharm Res, 2003, 26(3):649-652.
- 10] Aukunuru JV, Ayalaomayajula SP, Kompella UB. Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells J. J Pharm Pharmacol, 2003, 55(9):1199-1206.
- 11] Franssen O, Vandervennet L, Roders P, et al. Degradable dextran hydrogels: Controlled release of a model protein from cylinders and microspheres J. J Control Release, 1999, 60(2):211-221.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第523页)

可以起到冲击性的抗菌效果,而且由于纳米材料中纳米粒子的特性¹⁰,它还可被用作根充材料基质,复合以具抗菌力的物质如碘仿等,在保持类似首剂效应的同时获得更持久的抗菌性,从而减少因细菌感染导致的根管治疗失败率。但其他抗菌物质的加入会不会对材料的其他性能造成影响,则需要相关的研究。

[参考文献]

- 1] Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failures: Why well-treated teeth can fail J. Int Endod J, 2001, 34(1):1-10.
- 2] Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of root filling and coronal restoration J. Int Endod J, 1995, 28(1):12-18.
- 3] Østavik D, Pitt Ford TR. Essential endodontology M. Oxford: Blackwell Science, 1998:42-67.
- 4] 严永刚,李玉宝,汪建新,等.聚酰胺66/羟基磷灰石复合材料的制备和性能研究J.塑料工业,2000,28(3):38-40.
(Yan YG, Li YB, Wang JX, et al. Study on preparation and properties of Polyamide 66/nano-apatite composite J. China Plastics Industry, 2000, 28(3):38-40.)
- 5] 王学江,李玉宝.羟基磷灰石纳米针晶与聚酰胺仿生复合生物材料研究J.高技术通讯,2001,11(5):1-5.
(Wang XJ, Li YB. Study on bionic composite of nano-HA needle-like crystals and polyamide J. High Technology Letters, 2001, 11(5):1-5.)
- 6] Kaplan AE, Picca M, Gonzalez MI, et al. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: An *in vitro* evaluation J. Endod Dent Traumatol, 1999, 15(1):42-45.
- 7] Lai CC, Huang FM, Chan Y, et al. Antibacterial effects of resinous retrograde root filling material J. J Endod, 2003, 29(2):118-120.
- 8] Leonardo MR, de Silva LA, Tanomaru Filho M, et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics J. J Endod, 2000, 26(7):391-394.
- 9] Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, et al. Mechanism of action of calcium and hydroxylions of calcium hydroxide on tissue and bacteria J. Braz Dent J, 1995, 6(2):85-90.
- 10] Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo* J. Biomaterials, 2001, 22(13):1705-1711.

(本文编辑 王晴)