

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011年5月19日 (19.05.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/057521 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/02 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/077114
- (22) 国际申请日: 2010年9月19日 (19.09.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910211585.0 2009年11月10日 (10.11.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国医学科学院基础医学研究所 (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN).
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 许海燕 (XU, Haiyan) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。孔桦 (KONG, Hua) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。齐晓谨 (QI, Xiaojin) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。孟洁

- (MENG, Jie) [CN/CN]; 中国北京市东城区东单三条5号, Beijing 100005 (CN)。顾宁 (GU, Ning) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, Jiangsu 210009 (CN)。张宇 (ZHANG, Yu) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, Jiangsu 210009 (CN)。
- (74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层, Beijing 100738 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,

[见续页]

(54) Title: MAGNETIC COMPOSITE MATERIAL AND APPLICATION THEREOF IN REGENERATION AND REPAIR OF BONE TISSUE

(54) 发明名称: 一种磁性复合材料及其在骨组织再生和修复中的应用

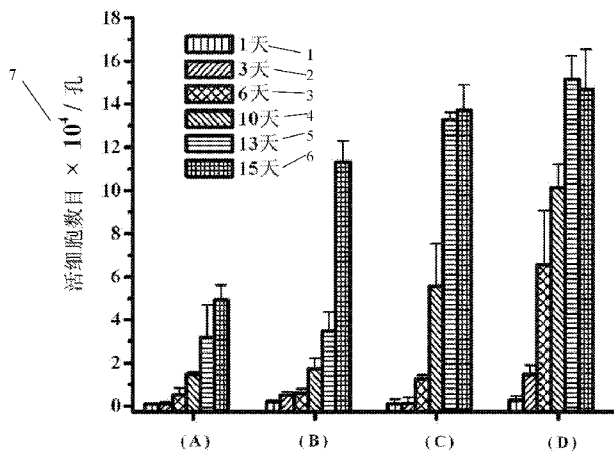


图 5 / Fig. 5

1 1 DAY
 2 3 DAYS
 3 6 DAYS
 4 10 DAYS
 5 13 DAYS
 6 16 DAYS
 7 THE NUMBER OF THE LIVE CELLS $\times 10^4$ / PORE

(57) Abstract: A magnetic composite material is consisted of: a) 10 to 50 grams of a polymer per 100ml organic solvent, wherein said polymer is selected from the group consisting of polylactic acid, polyglycolic acid, lactic acid-glycolic acid copolymer, polycaprolactone, polyamide and poly hydroxybutyric acid; b) 10 grams of hydroxyapatite nanoparticles per 100 ml organic solvent; and c) 2.5 grams of γ -Fe₂O₃ nanoparticles per 100 ml organic solvent, wherein said organic solvent is selected from the group consisting of tetrahydrofuran (THF), dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMAc), chloroform and dioxane. The application of the magnetic composite material in the regeneration and repair of bone tissue, the method to prepare the magnetic composite material and the product made from said magnetic composite material are also described.

[见续页]



WO 2011/057521 A1



BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括经修改的权利要求及声明(条约第 19 条(1))。

(57) 摘要:

一种磁性复合材料, 由下述组分组成: a) 以 100 毫升有机溶剂计 10 至 50 克的高分子材料, 其中所述高分子材料选自聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚酰胺或聚羟基丁酸; b) 以 100 毫升有机溶剂计 10 克的羟基磷灰石纳米粒子, 和 c) 以 100 毫升有机溶剂计 2.5 克的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子, 其中所述有机溶剂选自四氢呋喃(THF)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMAc)、氯仿或二氧六环。磁性复合材料在骨组织再生和修复中的应用, 以及制备该磁性复合材料的方法和由所述磁性复合材料制备的制品被描述。

一种磁性复合材料及其在骨组织再生和修复中的应用

技术领域

5 本发明涉及一种用于骨组织再生和修复的磁性复合材料及其制备方法。本发明还涉及一种由该磁性复合材料制备的制品及其用途。

背景技术

骨损伤和骨缺损是临床上常见的疾病，常需植骨治疗[1]。传统医学对于损伤或疾病引起的骨缺损通常依靠自体骨[2]和异体骨[3-4]移植进行骨修复。自体骨移植修复效果好，但存在供应有限，需进行二次手术的缺点，且术后并发症可达8%。同种异体骨存在免疫原性和致病性等缺点，所以也不是理想的骨修复材料。

20世纪80年代出现的骨组织工程改变了以自体组织损伤为代价修复创伤的传统治疗模式。用少量的组织细胞经体外培养扩增后修复骨缺损，同时可依据骨缺损情况任意塑形达到完善的形态修复，为最终实现无损伤修复创伤和真正意义上的功能重建开辟了一条新的途径。

随着骨组织工程支架材料的研究逐渐深入，羟基磷灰石（HA），尤其是羟基磷灰石纳米粒子（nHA）作为一种生物陶瓷类材料，以其优良的生物学性能受到研究者的广泛关注。羟基磷灰石是一种具有代表性的生物活性陶瓷，化学分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ，性脆，微溶于水，易溶于酸而难溶于碱，呈弱碱性（pH值为7-9），其化学组成和结晶结构类似于人体骨骼中的磷灰石，钙磷摩尔比为1.67，与天然骨接近。HA分子中的 Ca^{2+} 可与含有羧基的氨基酸、蛋白质、有机酸等发生交换反应，具有良好的骨传导性能和生物活性，能与骨组织形成牢固的骨性结合促进骨骼生长，并且相态比较稳定，无毒性、发炎性，是公认的性能良好的骨修复替代材料。但HA也有其自身的一些缺点，如压缩强度较低，抗疲劳性差，生物可吸收性差，替代速度慢，植入体内后可能出现疏松、迁移、破坏等。

羟基磷灰石纳米粒子（nHA）的晶粒尺寸、晶界宽度都限于纳米

量级的水平。根据“纳米效应”理论，单位质量的纳米级粒子的表面积明显大于微米级粒子，使处于粒子表面的原子数目明显增加，提高了粒子的活性。因此，nHA 粒子较微米级 HA 更利于与骨组织的整合，骨传导性能、溶解性能和力学性能较微米级 HA 也有所提高。此外，nHA 在功能上表现出一定的特异性，如对一些肿瘤细胞的生长具有抑制作用，而对正常细胞基本没有负面作用[22]。因此，nHA 在骨组织工程领域应用更为广泛。

单一组分的羟基磷灰石作为骨组织工程种植材料存在强度低、韧性差、难以承受较大的负荷或冲击的不足，限制了其直接作为种植体材料的使用。为了提高羟基磷灰石陶瓷材料的力学性能，使其得以在临床上推广应用，国内外众多实验室采用将羟基磷灰石与其它材料复合的方法来改善其使用性能。目前采用的基质材料主要包括可生物降解的天然生物材料（如：胶原蛋白[5-8]、透明质酸、壳聚糖、丝素蛋白等）和合成高分子材料（如聚乳酸（PDLLA）、聚羟基乙酸、乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA）等）。

胶原对溶液中 Ca^{2+} 有良好的亲和性，在HA结晶过程中起晶核和矿化模板作用。Du[5]、Liu[6]、K.Rezwan[7]等对纳米羟基磷灰石 / 胶原复合材料进行X-射线衍射、扫描电镜、透射电镜观察，发现纳米羟基磷灰石与I型胶原分子的自组装结构与天然骨的微结构类似。Venugopal J[8]等发现胶原/羟基磷灰石的电纺丝支架能够支持细胞增殖，与单纯胶原支架相比，胶原/羟基磷灰石的电纺丝还能明显增加成骨细胞矿化。

壳聚糖（CS）是一种天然的生物可降解多糖，具有无毒性、无刺激性、生物相容性、生物可降解性、易于改性等优良性能，但缺乏骨键合生物活性，缺乏弹性和柔韧性。将羟基磷灰石和壳聚糖两种材料复合，集二者的优点于一身，克服了两种单组分材料各自的不足。

Chesnutt BM[9]发现细胞在羟基磷灰石/壳聚糖支架材料上的粘附和增殖数量均有提高。

丝素蛋白（SV）是从蚕丝中提取的天然高分子纤维蛋白，有很多优异的性质，如良好的生物相容性和力学性能；良好的生物降解性；支持细胞的粘附、增殖和分化等。丝素蛋白含有较多的羟基和羧基，能与钙离子紧密结合，诱导羟基磷灰石在丝蛋白上矿化结晶，形成自

组装纳米复合物材料。一系列研究结果表明[10-12]，丝素蛋白作为模板为羟基磷灰石晶体的成核和晶体生长提供了活性位点，促进羟基磷灰石的晶体生长，并影响羟基磷灰石晶体沿c轴的自组装择优取向。

通过羟基磷灰石材料与粘弹性高分子材料的复合，使羟基磷灰石颗粒难以向周围组织迁移，克服了羟基磷灰石材料被植入体内后可能出现的疏松、迁移、损坏等缺点，并且可以使羟基磷灰石的生物可吸收性得到提高，同时可以达到对周围的软组织不产生损伤的效果。Deng[13]等合成了nHA / PDLLA复合材料，对材料的力学性能测试结果表明，在一定范围内，随着nHA含量的增加，复合材料的拉伸强度得到提高，推测这是由于nHA作为短小纤维填充到有机基体中，提高了聚合物的强度。Nie H[14]等将HA/PLGA支架作为载体运载DNA/壳聚糖粒子，促进细胞粘附和基因转染，从而促进骨再生。最近还有人[15]将羟基磷灰石、胶原、壳聚糖、PDLLA共同复合，制备细胞支架用于运载骨形成蛋白以促进骨再生。

目前临床上治疗骨缺损所应用的人工骨填充物主要有：磷酸钙骨水泥[16]，硫酸钙[17]，珊瑚羟基磷灰石[18]等。作为人工骨替代物，硫酸钙和磷酸钙在临床上的使用比较广泛，其中，硫酸钙骨粉固化后较磷酸钙坚固，具有较强的支撑作用，且降解速度较磷酸钙快。另外临床上还使用一些复合材料用于骨缺损的填充，如采用自体骨、人工骨及骨膜碎片混合填充[19]，包括纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合骨填充材料[20]和纳米羟基磷灰石/胶原人工骨[21]等。

虽然现有技术中已经存在许多用于治疗骨损伤和骨缺损的材料，但是目前仍需要能够进一步提高骨损伤和骨缺损的治疗效果的材料。

25 发明内容

因此，一种用于骨组织再生和修复的磁性复合材料，由下述组分组成：

a) 以100毫升有机溶剂计10至50克的高分子材料，其中所述高分子材料选自聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚酰胺或聚羟基丁酸，

b) 以100毫升有机溶剂计10克的羟基磷灰石纳米粒子(nHA)，和

c) 以100毫升有机溶剂计2.5克的 γ - Fe_2O_3 纳米粒子,

其中所述有机溶剂选自四氢呋喃 (THF)、二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc)、氯仿或二氧六环。

本发明还提供一种制备所述磁性复合材料的方法, 该方法包括将
5 组分a)、b) 和c) 通过机械方法分散在有机溶剂中以使得 γ - Fe_2O_3 纳米粒子和羟基磷灰石纳米粒子均匀分布在高分子材料连续相中, 形成均匀的复合材料。

本发明还提供一种由所述磁性复合材料制得的制品。

当磁性纳米粒子的尺寸小到某一临界尺寸时, 每个粒子为单个磁
10 畴, 此时粒子中电子的热运动动能超过了电子自旋取向能, 磁矩呈无规排列, 磁性纳米粒子就由铁磁性或亚铁磁性变为超顺磁性。不同磁性材料进入超顺磁性的临界尺寸各不相同, 对 γ - Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 纳米粒子而言, 其临界尺寸分别为14nm、20nm。

磁性纳米粒子的特殊性质主要表现在超顺磁性和磁化率方面, 由
15 于磁性纳米粒子特殊的磁性性质, 使得这些粒子在磁记录材料、磁性液体、生物医学、传感器、催化、永磁材料、颜料、雷达波吸波材料以及其它领域有着广阔的应用前景。

本发明复合材料具有超顺磁特性和优良的生物相容性, 能够显著
20 促进前成骨细胞在其上的粘附、增殖, 并促进前成骨细胞向成骨细胞的转化、骨基质分泌、以及骨细胞的矿化。当在外加磁场下使用时, 这种促进效果更加显著。

附图说明

图 1 为 γ - Fe_2O_3 /nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜的磁化曲线。

25 图 2 为表面连接了 DMSA 的 γ - Fe_2O_3 纳米粒子的透射电镜照片。

图3为 γ - Fe_2O_3 /nHA/PDLLA磁性纳米纤维无纺膜的SEM图片。

图4为浸泡 γ - Fe_2O_3 /nHA/PDLLA磁性纳米纤维无纺膜的磷酸缓冲液的pH变化图。

图 5 为 MC3T3-E1 在基本培养基中在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺
30 膜和 γ - Fe_2O_3 /nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的增殖情况的图, 其中 (A) 表示在不施加磁场下, 在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜上的增

殖情况；(B)表示在施加磁场下，在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜上的增殖情况；(C)表示在不施加磁场下，在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的增殖情况；(D)表示在施加磁场下，在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的增殖情况。

5 图 6 为 MC3T3-E1 在诱导培养基中在 nHA/ PDLLA 纳米纤维无纺膜和 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的增殖情况的图，其中 (A)表示在不施加磁场下，在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜上的增殖情况；(B)表示在施加磁场下，在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜上的增殖情况；(C)表示在不施加磁场下，在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性
10 纳米纤维无纺膜上的增殖情况；(D)表示在施加磁场下，在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的增殖情况。

图 7 为不同培养时间的前成骨细胞在不同基底材料上生长过程中分泌碱性磷酸酶的情况的图，其中 (A)表示在施加磁场下，在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜上生长过程中分泌碱性磷酸酶的情况，
15 (B)表示在施加磁场下，在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上生长过程中分泌碱性磷酸酶的情况。

图8a和8b为本发明培养21天的前成骨细胞在 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜上的形态和分泌骨基质情况的SEM图片。

图9为培养21天的前成骨细胞在nHA/PDLLA纳米纤维无纺膜上的
20 形态和分泌骨基质情况的SEM图片。

图10为骨移植40和70天后兔子骨缺损部位的CT扫描三维重建图像。a、b分别为自体骨移植40和70天后的图像；c、d分别为磁性纳米纤维复合材料骨移植40和70天后的图像。

25 具体实施方式

在一个具体实施方案中，本发明提供一种用于骨组织再生和修复的磁性复合材料，由下述组分组成：

a) 以100毫升有机溶剂计10至50克的高分子材料，其中所述高分子材料选自聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚酰胺或聚羟基丁酸，
30

b) 以100毫升有机溶剂计10克的羟基磷灰石纳米粒子(nHA)，和

c) 以100毫升有机溶剂计2.5克的 γ - Fe_2O_3 纳米粒子,

其中所述有机溶剂选自四氢呋喃 (THF)、二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc)、氯仿或二氧六环, 所述羟基磷灰石纳米粒子的粒径为30-50nm和 γ - Fe_2O_3 纳米粒子的粒径为14nm。

5 在一个具体实施方案中, 该 γ - Fe_2O_3 纳米粒子优选为表面连接了二巯基丁二酸 (DMSA) 的 γ - Fe_2O_3 纳米粒子。

在一个具体实施方案中, 该高分子材料优选为聚乳酸。

在一个具体实施方案中, 所述制品为纳米纤维无纺膜、无纺毛毡、泡沫、光滑的薄膜、片材、管材或表面涂层或者其他几何形状的制品。

10 在一个具体实施方案中, 所述纳米纤维无纺膜的厚度为约 20 微米。

在一个具体实施方案中, 按下述步骤制备复合材料:

(1) 将 2.5 克干燥的 γ - Fe_2O_3 纳米粒子分散在 100ml 有机溶剂中。采用超声波震荡分散方法, 在超声槽中超声 0.5~15min (超声功率: 10~80%), 再用探头超声 1~10 次, 每次 1~120 秒。其中有机溶剂选自四氢呋喃 (THF)、二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基乙酰胺 (DMAc)、氯仿或二氧六环。

(2) 将 10 克干燥的羟基磷灰石纳米粒子 (nHA) 分散到上述 100 毫升的 γ - Fe_2O_3 悬浮溶液中。采用超声波震荡分散方法, 在超声槽中超声 0.5~15min (超声功率: 10~80%), 再用探头超声 1~10 次, 每次 1~120 秒。

(3) 将 10 至 50 克高分子材料溶解到上述 γ - Fe_2O_3 和 nHA 的溶液中, 采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器 (转速为 50 转/分钟), 形成流动性好、混合均匀的溶液。

25 在一个具体实施方案中, 本发明提供了一种磁性纳米纤维无纺膜材料, 其是使用上述复合材料静电纺丝制备而成。具体而言, 是将上述复合材料加入到注射泵中, 在泵压或重力作用下于室温使纺丝液从喷头处喷出。在注射泵喷头和接收板间加上 15kV 的高压电场。由于聚合物溶液表面电荷的排斥作用, 液滴拉伸成泰勒锥形状, 在电场作用下拉伸成纤维, 接收板以一定速度转动收集纤维, 纤维直径在 100~
30 600nm 之间, 根据接收板转动的速度, 得到定向或非定向的磁性纳米纤维无纺膜。当需要纤维无规则排列时, 接收板以 0-10 转/分钟的速度

转动；当需要纤维取向排列时，接收板以 100 转/分钟的速度转动。

在一个具体实施方案中，本发明提供了一种无纺毛毡。使用乱针法处理多层电纺丝薄膜，得到无纺毛毡材料。

5 在一个具体实施方案中，本发明提供了一种泡沫材料。在上述复合材料中，每 100 毫升有机溶剂加入 0.1~20 克的发泡剂，然后将所得溶液浇铸到设计好形状的模具中成型，得到泡沫材料。

在一个具体实施方案中，本发明提供了一种浇铸膜片。将复合材料浇铸到设计好形状的模具中成型，得到浇铸片材。片材厚度可以通过浇铸的溶液体积来控制。

10 在一个具体实施方案中，本发明提供了一种浇铸管材。将管形模具在复合材料中浸沾、干燥，反复多次，直至达到需要的厚度。脱出模具，得到浇铸管材。

在一个具体实施方案中，本发明提供了一种挤出管材或膜片。将复合材料加入到水相介质中，使溶液中组分共沉淀，沉淀物干燥后，
15 通过挤出机模头挤出牵拉，得到片材或者管材。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种体外细胞培养板，其包括上述磁性纳米纤维无纺膜和一种基底材料，其中将磁性纳米纤维无纺膜喷射在基底材料上，形成薄膜表层，然后以该具有薄膜表层的基底材料为底，加工成体外细胞培养板。所述基底材料可以使用聚氨酯
20 板材、聚苯乙烯板材、硅橡胶片材、具有聚合物涂层的玻璃。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种产品，其包括表面具有磁性纳米纤维无纺膜的体外细胞培养板，和套在体外细胞培养板外面的金属盒，其中在金属盒两侧贴有磁条。

25 这些体外细胞培养板及其产品能够用于前成骨细胞、软骨细胞的培养。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种骨修复临床治疗用品包。将前成骨细胞、或者成骨细胞种植在磁性纳米纤维无纺膜、或者无纺毛毡、或者泡沫材料上，植入体内骨缺损部位。用胶带将两个磁条或者磁片固定在骨缺损部位外面。

30 在一个具体实施方案中，本发明提供一种用于体外骨组织培养的用途，其中将前成骨细胞、或者成骨细胞种植在磁性纳米纤维无纺毛

毡、或者泡沫材料上，放入生物反应器中，在施加外加磁场的条件下进行体外动态培养。

下面以具体实施例来说明本发明，但是这些实施例不意于限制本发明的范围。

- 5 羟基磷灰石纳米粒子从市场上购得。本发明所用高分子材料从市场上购得，其数均分子量为 50,000-200,000。

实施例

实施例 1

10 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的制备

在氮气下配制 500 mL FeCl₃ (0.1M)和 FeSO₄ (0.06M) 水溶液，在室温下，向水溶液中滴加 200mL 氨水(1.5M) 并激烈搅拌。三十分钟后，用磁场收集所得到的 Fe₃O₄ 纳米粒子，并用水洗涤三次。将这些粒子重新分散到水中，在 95℃空气中和通风条件下氧化成 γ -Fe₂O₃。将 γ -Fe₂O₃ 15 与 DMSA（二巯基丁二酸）在 pH=2.7 的水溶液中混合搅拌 1 小时，即得到表面连接了 DMSA 的超顺磁性 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子。

表面连接了 DMSA 的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子 (γ -Fe₂O₃/DMSA) 的粒径和形貌用透射电镜观察和确定 (TEM, JEOL, JEM-200EX), 结果显示粒子呈准球形，平均直径为 14nm，如图 2 所示。

20 实施例 2

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液；

25 B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚乳酸 (PDLLA)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA/DMAc 复合材料溶液。

30 D、将上述复合材料 2ml 加入注射泵，喷头为 9#注射器针头，喷头与高压静电发生器正极相连，接收盘与阴极相连，接收盘离喷头的

距离为 25cm, 在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝; 接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维, 得到纤维直径分布在 100~600nm 之间的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜。

实施例 3

5 A、在 25ml 小烧杯中, 加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc), 将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中, 采用超声波分散均匀, 得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液;

B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末, 采用超声波分散均匀, 得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液;

10 C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 2g 聚乳酸 (PDLLA), 采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌 (转速为 50 转/分钟), 形成流动性好、混合均匀的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA/DMAc 复合材料溶液。

D、将上述复合材料 2ml 加入注射泵, 喷头为 9#注射器针头, 喷头与高压静电发生器正极相连, 接收盘与阴极相连, 接收盘离喷头的距离为 25cm, 在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝; 接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维, 得到纤维直径分布在 100~600nm 之间的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜。

实施例 4

20 A、在 25ml 小烧杯中, 加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc), 将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中, 采用超声波分散均匀, 得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液;

B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末, 采用超声波分散均匀, 得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液;

25 C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 10g 聚乳酸 (PDLLA), 采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌 (转速为 50 转/分钟), 形成流动性好、混合均匀的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA/DMAc 复合材料溶液。

D、将上述复合材料 2ml 加入注射泵, 喷头为 9#注射器针头, 喷头与高压静电发生器正极相连, 接收盘与阴极相连, 接收盘离喷头的距离为 25cm, 在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝;

接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维，得到纤维直径分布在 100~600nm 之间的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜。

实施例 5

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 三氯甲烷 (CHCl₃)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在三氯甲烷中，采用超声波分散均匀，得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液；

B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 羟基丁酸-戊酸共聚物 (PHBV)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌 (转速为 50 转/分钟)，形成流动性好、混合均匀的 γ -Fe₂O₃/nHA/PHBV/CHCl₃ 复合材料溶液。

D、将上述纺丝溶液 2ml 加入注射泵，喷头为 9#注射器针头，喷头与高压静电发生器正极相连，接收盘与阴极相连，接收盘离喷头的距离为 25cm，在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝；接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维，得到纤维直径分布在 100~600nm 之间的 γ -Fe₂O₃/nHA/PHBV 磁性纳米纤维无纺膜。

实施例 6

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液；

B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚乳酸 (PDLLA)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌 (转速为 50 转/分钟)，形成流动性好、混合均匀的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA/DMAc 复合材料溶液。

D、在上述 C 步骤的溶液中加入发泡剂过氧化苯甲酰 (BPO) 0.5g 并混合均匀，将溶液浇铸到直径 35mm 的圆柱形玻璃模具中，待溶剂挥发干净后，脱去模具，放入真空烘箱中 50℃ 下干燥 72 小时，彻底去除残余溶剂，得到磁性泡沫复合材料。

实施例 7

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 三氯甲烷 (CHCl_3)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子分散在三氯甲烷中，采用超声波分散均匀，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液；

5 B、在上述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 羟基丁酸-戊酸共聚物 (PHBV)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{nHA}/\text{PHBV}/$
10 CHCl_3 复合材料溶液；

D、将上述复合材料浇铸到直径 8cm 的圆形玻璃模具中，待溶剂挥发干净后，脱去模具，放入真空烘箱中 50°C 下干燥 72 小时，彻底去除残余溶剂，得到磁性片材。

实施例 8

15 A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 四氢呋喃 (THF)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子分散在四氢呋喃中，采用超声波分散均匀，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液；

B、在上述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

20 C、在上述含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚醚型聚氨酯 (PU)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{nHA}/\text{PU}/\text{THF}$ 复合材料溶液；

D、将管状模具在上述复合材料中反复浸涂，待溶剂挥发干净后，
25 脱去模具，放入真空烘箱中 50°C 下干燥 72 小时，彻底去除残余溶剂，得到磁性管材。

实施例 9

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基甲酰胺 (DMF)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子分散在二甲基甲酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液；
30

B、在上述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，

采用超声波分散均匀，得到含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚己内酯 (PCL)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /nHA/ PCL / DMF 复合材料溶液；

D、将上述复合材料加入到水相介质中，使溶液中组分共沉淀，沉淀物干燥后切粒，粒料通过挤出机模头挤出牵拉，得到片材。

实施例 10

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液；

B、在上述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA)，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /nHA/PLGA/DMAc 复合材料溶液；

D、将上述复合材料加入到水相介质中，使溶液中组分共沉淀，沉淀物干燥后切粒，粒料通过挤出机模头挤出牵拉，得到片材。

实施例 11

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺 (DMAc)，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子分散在二甲基乙酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液；

B、在上述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚己内酯 (PCL)，玻棒搅拌至溶解，封口放置至完全溶解，得到 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /nHA/PCL/DMAc 复合材料溶液；

D、将上述复合材料加入到水相介质中，使溶液中组分共沉淀，沉淀物干燥后，通过挤出机模头挤出牵拉，得到片材。

实施例 12

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二氧六环，将实施例 1 中制备的 0.5g 干燥的 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子分散在二氧六环中，采用超声波分散均匀，得到 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液；

5 B、在上述 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的溶液中加入 2g 干燥的 nHA 粉末，采用超声波分散均匀，得到含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液；

C、在上述含有 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子和 nHA 的溶液中加入 4g 聚羟基丁酸，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的磁性复合材料溶液；

10 D、将管状模具在上述磁性复合材料中反复浸涂，待溶剂挥发干净后，脱去模具，放入真空烘箱中 50°C 下干燥 72 小时，彻底去除残余溶剂，得到磁性管材。

比较例 1

对照材料的制备

15 所述对照材料为不含磁性材料的 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜，其制备方法如下：

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺（DMAc），将 2g 干燥的 nHA 粉末分散在二甲基乙酰胺中，采用超声波分散均匀，得到 nHA 的溶液；

20 B、在上述 nHA 的溶液中加入 4g 聚乳酸 PDLLA，采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成流动性好、混合均匀的 nHA/PDLLA/DMAc 复合材料溶液。

C、将上述纺丝溶液 2ml 加入注射泵，喷头为 9#注射器针头，喷头与高压静电发生器正极相连，接收盘与阴极相连，接收盘离喷头的距离为 25cm，在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝；
25 接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维，待纺丝溶液全部喷完，就得到纤维直径分布在 100~600nm 的 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜。

比较例 2

PDLLA 无纺膜的制备

A、在 25ml 小烧杯中，加入 20ml 二甲基乙酰胺（DMAc）；

B、在二甲基乙酰胺中加入 4g 聚乳酸（PDLLA），采用旋转电机控制的不锈钢锚式搅拌器搅拌（转速为 50 转/分钟），形成均匀的聚乳酸溶液。

5 C、将上述溶液 2ml 加入注射泵，喷头为 9#注射器针头，喷头与高压静电发生器正极相连，接收盘与阴极相连，接收盘离喷头的距离为 25cm，在注射泵喷头和接收板间施加 15kV 电压进行静电纺丝；接收盘缓慢转动均匀接收纺丝纤维，得到纤维直径分布在 100~600nm 的 PDLLA 纳米纤维无纺膜。

10 下面以实施例 2 制备的 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜为例进行性能表征：

磁性纳米纤维无纺膜的磁性分析

如图 1 所示，由于加入了超顺磁性 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子，所制备的纳米纤维无纺膜具有顺磁性，当外加磁场大于 5000Gs 时，其磁化强度达
15 到饱和值，为 0.0492emu/g，成为磁性纳米纤维无纺膜。

磁性纳米纤维无纺膜形貌和微观结构

磁性纳米纤维无纺膜呈浅棕黄色，该颜色来源于超顺磁性 γ -Fe₂O₃ 纳米粒子，纤维膜柔软，厚约 20 微米。

如图 3 所示，从扫描电子显微镜中可以看到，大多数磁性纳米纤维
20 的直径在 100~600nm 范围内，相互交叠，构成类似天然细胞外基质的三维网络结构；纺丝纤维表面粗糙，突出的颗粒状物质为 nHA 纳米粒子。

磁性纳米纤维无纺膜的降解性能分析

25 模拟体内酸碱度环境，将磁性纳米纤维无纺膜浸泡在磷酸缓冲液中，观察两个月内磷酸缓冲液环境的 pH 变化情况，结果如图 4 所示，其中对照（PBS）是指将一瓶没有浸泡样品的空白 PBS 缓冲液在同样条件下放置（37°C），由于在 50 天的实验过程中空气中的二氧化碳会少量溶入，它的 pH 值会发生轻微的下降。以此为对照，说明浸泡了复
30 合材料的 PBS 缓冲液的 pH 的下降主要来自材料的降解。虽然 PDLLA 降解产生的乳酸会导致环境酸度增加，但由于复合材料中加入的 nHA

中和了部分酸性，因此在两个月的检测时间内，浸泡液的 pH 值从最初的 7.4 下降到 5.5。

磁性纳米纤维无纺膜的表面化学成分分析

5 **表 1 通过 XPS 检测得到的三种材料的表面化学组成。**

元素	PDLLA 纳米纤维无纺膜	nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜	γ -Fe ₂ O ₃ /nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜
C	57.76	56.09	55.13
O	42.24	43.16	43.76
P	0	0.75	0.7
Fe	0	0	0.41

从表 1 可以看出，磁性纳米纤维无纺膜表面成分包括：铁元素：0.41%、磷元素：0.7%。

磁性纳米纤维无纺膜具有促进前成骨细胞增殖、分化成骨和矿化的作用。

10 **前成骨细胞的增殖分析**

图 5 和 6 给出了小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 在施加和不施加磁场条件下，在 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜(A、B)和 γ -Fe₂O₃/nHA/PDLLA 磁性纳米纤维无纺膜(C、D)上增殖的情况。表 2 和表 3 分别给出了在基本培养基和诱导培养基条件下各组材料细胞增殖情况的显著性差异分析。从图 5 和 6 中可以看出，在 13 天的培养期间内，在基本/诱导培养基、有/无外加磁场的情况下，生长在磁性纳米纤维无纺膜上的细胞数量在各时间点均多于 nHA/PDLLA 纳米纤维无纺膜，而在施加外加磁场的情况下生长的细胞数量又多于没有施加外加磁场的情况。

结合显著性差异分析可以发现，在基本培养基中，磁性纳米纤维无纺膜在联合应用外加磁场的情况下，细胞增殖数量明显多于对照材料上的细胞数（即 $P < 0.05$ ）（ P 表示概率，在 $P < 0.05$ 时，表明两个组之间具有显著性差异）；当没有外加磁场时，磁性纳米纤维无纺膜上的细胞增殖数量在 6~15 天也明显多于对照材料上的细胞数量（ $P < 0.05$ ）。这说明磁性纳米纤维无纺膜本身能够促进前成骨细胞增殖。

在诱导培养基中，无论是否施加磁场，在培养的 13 天内，磁性纳米纤维无纺膜上的细胞增殖数量始终都明显多于对照组 ($P<0.05$)；但是在第十五天时，无论是否施加磁场，磁性纳米纤维无纺膜上细胞的数量均开始减少，表明已经有部分前成骨细胞分化为骨细胞。这说明磁性纳米纤维无纺膜本身也能够促进前成骨细胞增殖和向成骨细胞分化。同时我们也能发现，联合应用外加磁场能够提高磁性纳米纤维无纺膜对细胞增殖的促进作用。

表 2 MC3T3-E1 在基本培养基中增殖情况的显著性差异分析

在磁性纳米纤维无纺膜和对照材料基底上培养

细胞的天数

分组	1 天	3 天	6 天	10 天	13 天	15 天
A/D	*	**	**	**	**	**
B/D		*	**	**	**	
C/D	*	**	*	*		
A/C			*	*	**	**
B/C	*		**	*	**	*
A/B	**	**				**

表 3 MC3T3-E1 在诱导培养基中增殖情况的显著性差异分析

在磁性纳米纤维无纺膜和对照材料基底上培养

细胞的天数

分组	1 天	3 天	6 天	8 天	13 天	15 天
A/D	**	*	**	**	**	**
B/D		**	**	**	**	**
C/D			*	**	*	**
A/C	*	**	**	**	**	**
B/C		**	**	**	**	*
A/B	**	**	**			**

注：图 5 和 6 中柱图从左到右依次为 A、B、C、D，*表示 $P<0.05$ ，**表示 $P<0.01$ 。

分化成骨分析

在诱导培养条件下，前成骨细胞一方面不断增殖，使细胞数量增加，另一方面会对诱导物质产生反应，逐步分化为成骨细胞，开始形成新骨的过程。一旦前成骨细胞分化为成骨细胞，其增殖过程就停止了。实验结果表明，在同等培养条件下和同一时间点上，在磁性纳米纤维无纺膜上生长的前成骨细胞的碱性磷酸酶分泌数量更高（如图 7 所示），同时分泌更多的骨基质，在磁性纳米纤维无纺膜上的前成骨细胞大部分已经分化为成骨细胞，形成矿化结，并且分泌了大量的基质（如图 8a 和 8b 所示）。在对照材料上生长的细胞部分分化为成骨细胞，出现了矿化结，但分泌基质很少（如图 9 所示）。这些结果表明，磁性纳米纤维无纺膜材料可以促进前成骨细胞向骨细胞分化，并加快其成骨速度。

动物体内骨损伤修复分析

选择健康成年新西兰大白兔，按随机法分为 2 组：一组为自体骨对照组，另一组为磁性纳米纤维无纺膜组，制造骨缺损，分别取髂骨处骨块和磁性纳米纤维无纺膜材料填充至骨缺损处，常规缝合皮肤。术后对所有实验动物肌注双抗 3 天，放养于兔笼，自由活动。雌性材料组兔笼周围加均匀静磁场。术后 40 和 70 天分别对兔进行 CT 扫描。手术 40 天后，骨移植部位均有新骨质发生，新骨骨密度接近兔子自体骨密度。磁性纳米纤维无纺膜材料骨移植部位的新骨质体积与自体骨移植部位的骨质体积几乎相等（如图 10a、10b 所示）。手术 70 天后，两种材料骨移植部位的新骨质的体积比手术后 40 天时均有明显增加。更值得注意的是，磁性材料骨移植部位的新骨质甚至大于自体骨移植部位（如图 10c、10d 所示）。这表明磁性纳米纤维无纺膜材料在磁场条件下具有良好的体内诱导成骨的作用。

虽然本发明已以优选实施例揭露如上，但是并非用以限定本发明，任何本领域技术人员在不脱离本发明的精神和范围内，可作改动与润饰，因此本发明的保护范围应当以权利要求书为准。

参考文献

1. 丰强, 闵思佳, 张海萍等, 羟基磷灰石及其复合材料在骨组织工程中的研究进展, 蚕桑通报, 2008, 39(1):9~12。
2. 乔保中, 李志安, 郑敏, 自体骨粒骨水泥填充骨缺损治疗四肢骨巨细胞瘤临床观察, 山东医药, 2008, 48(32):75~76。
- 5 3. Jia Yan-fei, Guo Shi-bing, Feng Wei, Allogeneic bone for repairing bone defects after resection of benign bone tumor and tumor-like lesions, Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(7):1368~1371。
4. 郭世炳, 冯卫, 贾燕飞, 张明, 异体动感小块骨修复良性骨肿瘤及瘤样病变切刮术后骨缺损, 中国修复重建外科杂志, 10 2007,21(8):789~792。
5. Du C, Cui Fz, Feng Ql, et al. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. J Biomed Mater Res, 1998, 42(4): 540~548。
- 15 6. Xiaohua Liu, Laura A. Smith, Jiang Hu, Peter X. Ma Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2009,30(2):2252-2258。
7. K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, Aldo Roberto Boccaccini. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering Biomaterials 2006,27 (18): 20 3413-3431。
8. Venugopal J, Low S, Choon AT, Sampath Kumar TS, Ramakrishna S. Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers. J Mater Sci Mater Med. 2008, 19(5): 2039~46。
- 25 9. Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, et al. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. J Biomed Mater Res A. 2009, 88(2): 491~502。
10. Wang L, Nemoto R, Senna M. Changes in microstructure and physico-chemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content [J]. Journal of the European Ceramic Society, 2004, 24(9): 2702~2715。
11. Kong X. D., Cui F. Z., Wang X. M., et al. Silk fibroin regulated

mineralization of hydroxyapatite nanocrystals [J]. Journal of Crystal Growth, 2004, 270(1-2): 197~202。

12. Wang L, Li C. K. Z., Senna M, High-affinity integration of hydroxyapatite nanoparticles with chemically modified silk fibroin [J].
5 Journal of Nanoparticle Research, 2007,9(5): 919~929。

13. Deng X. M., Hao J. Y., Wang C. S. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly (D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals[J]. Biomaterials, 2001, 22(2):2867-2873。

14. Nie H, Wang CH. Fabrication and characterization of
10 PLGA/HAP composite scaffolds for delivery of BMP-2 PDLLA smid DNA. J Control Release. 2007, 120(1-2): 111-21。

15. Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. J Control
15 Release. 2009, 134 (2): 111~7。

16. 苗军, 王继芳, 刘春蓉等, 磷酸钙骨水泥填充骨缺损中 6 种添加剂对其注射性的影响, 中国临床康复, 2004, 8(5):868~869。

17. 孙刚, 高韧, 张峰, Osteoset 医用硫酸钙颗粒在四肢骨缺损中的应用. 青岛大学医学院学报, 2008, 44(6):528~532。

18. 李洪潮, 孟志斌, 符国良, 黎坚, 珊瑚羟基磷灰石人工骨填充治疗四肢长管骨良性骨病性骨缺损, 南方医科大学学报, 2008,
20 28(10):1925~1926。

19. 白建华, 彭广灿, 杜英波, 自体骨、人工骨及骨膜碎片混合填充治疗 OFD10 例, 山东医药, 2006, 46(23): 91。

20. 梁熙, 蒋电明, 倪卫东等, 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 复合骨填充材料修复良性骨肿瘤骨缺损临床疗效观察, 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(8):785~788。

21. 黄永辉, 沈铁城, 徐晓峰等, 纳米羟基磷灰石/胶原骨修复骨缺损的效果评估, 中国临床康复, 2006, 10(37):51~53。

22. Li Shipu, Zhang Shicheng, Chen Wenjie. Effects of hydroxyapatite ultrafine powder on colony formation and cytoskeletons of MGC-803 cell[J]. Bioceramics, 1996, 9(2):225~227。

权利要求书

- 1、一种用于骨组织再生和修复的磁性复合材料，由下述组分组成：
- 5 a) 以100毫升有机溶剂计10至50克的高分子材料，其中所述高分子材料选自聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚酰胺或聚羟基丁酸，
- b) 以100毫升有机溶剂计10克的羟基磷灰石纳米粒子，和
- c) 以100毫升有机溶剂计2.5克的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子，
- 10 其中所述有机溶剂选自四氢呋喃、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、氯仿或二氧六环。
- 2、根据权利要求1所述的磁性复合材料，其中所述羟基磷灰石纳米粒子的粒径为30-50nm和 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的粒径为14nm。
- 15 3、根据权利要求1或2所述的磁性复合材料，其中所述 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子是表面连接了二巯基丁二酸的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子。
- 4、一种制备权利要求1所述的磁性复合材料的方法，其包括将组分a)、b)和c)通过机械方法分散在有机溶剂中以使得 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子和羟基磷灰石纳米粒子均匀分布在高分子材料连续相中，形成均匀的复合材料。
- 20 5、一种由权利要求1所述的磁性复合材料制得的制品，其中所述制品为纳米纤维无纺膜、无纺毛毡、泡沫、光滑的薄膜、片材、管材或表面涂层。
- 25 6、根据权利要求5所述的制品，其中所述纳米纤维无纺膜的厚度为20微米。

经修改的权利要求

国际局收到日：2011年3月11日(11.03.2011)

1、一种用于骨组织再生和修复的超顺磁性复合材料，由下述组分组成：

5 a) 以100毫升有机溶剂计10至50克的高分子材料，其中所述高分子材料选自聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸-乙醇酸共聚物、聚己内酯、聚酰胺或聚羟基丁酸，

b) 以100毫升有机溶剂计10克的羟基磷灰石纳米粒子，和

c) 以100毫升有机溶剂计2.5克的 γ -Fe₂O₃纳米粒子，

10 其中所述有机溶剂选自四氢呋喃、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、氯仿或二氧六环。

2、根据权利要求1所述的磁性复合材料，其中所述羟基磷灰石纳米粒子的粒径为30-50nm和 γ -Fe₂O₃纳米粒子的粒径为14nm。

15

3、根据权利要求1或2所述的磁性复合材料，其中所述 γ -Fe₂O₃纳米粒子是表面连接了二巯基丁二酸的 γ -Fe₂O₃纳米粒子。

4、一种制备权利要求1所述的超顺磁性复合材料的方法，其包括
20 将组分a)、b)和c)通过机械方法分散在有机溶剂中以使得 γ -Fe₂O₃纳米粒子和羟基磷灰石纳米粒子均匀分布在高分子材料连续相中，形成均匀的复合材料。

5、一种由权利要求1所述的磁性复合材料制得的制品，其中所述
25 制品为纳米纤维无纺膜、无纺毛毡、泡沫、光滑的薄膜、片材、管材或表面涂层。

6、根据权利要求5所述的制品，其中所述纳米纤维无纺膜的厚度为20微米。

按照条约 19 条（1）所作的声明

权利要求 1 和 4 被修改后的权利要求 1 至 4 替换。具体而言，

- 1、权利要求 1 中的“磁性”修改为“超顺磁性”；
- 2、权利要求 4 中的“磁性”修改为“超顺磁性”；
- 3、其他权利要求没有变化。

所述权利要求 1 和 4 所做修改可在本申请说明书第 4 页第 18 行，第 14 页第 13-14 行找到修改依据。

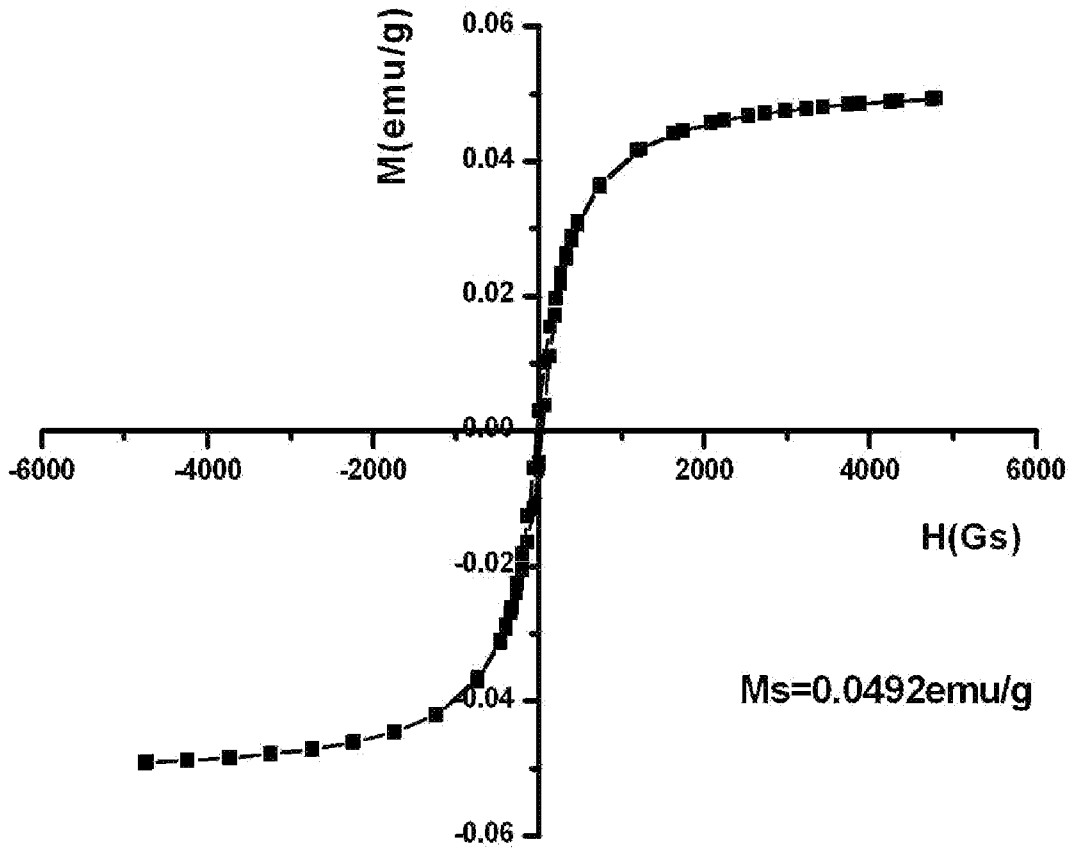


图 1

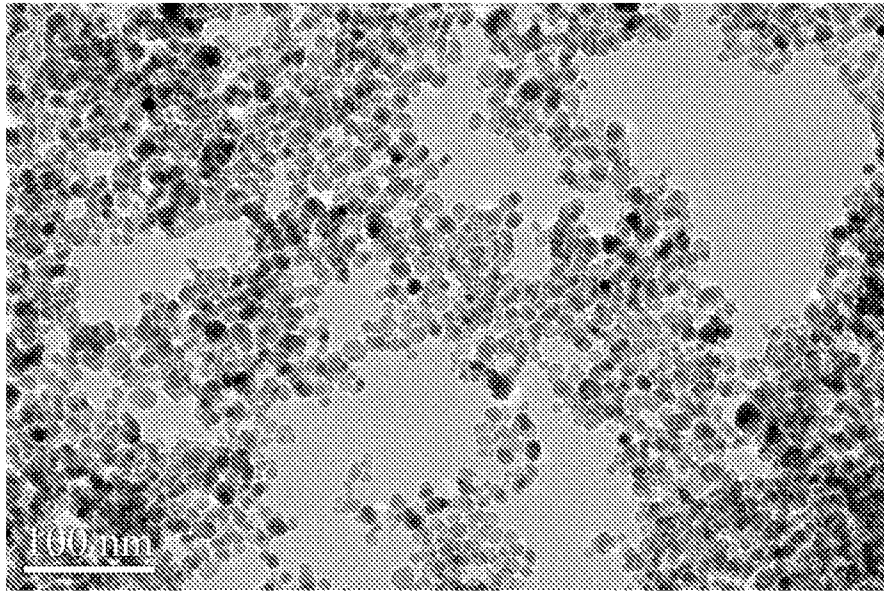


图 2

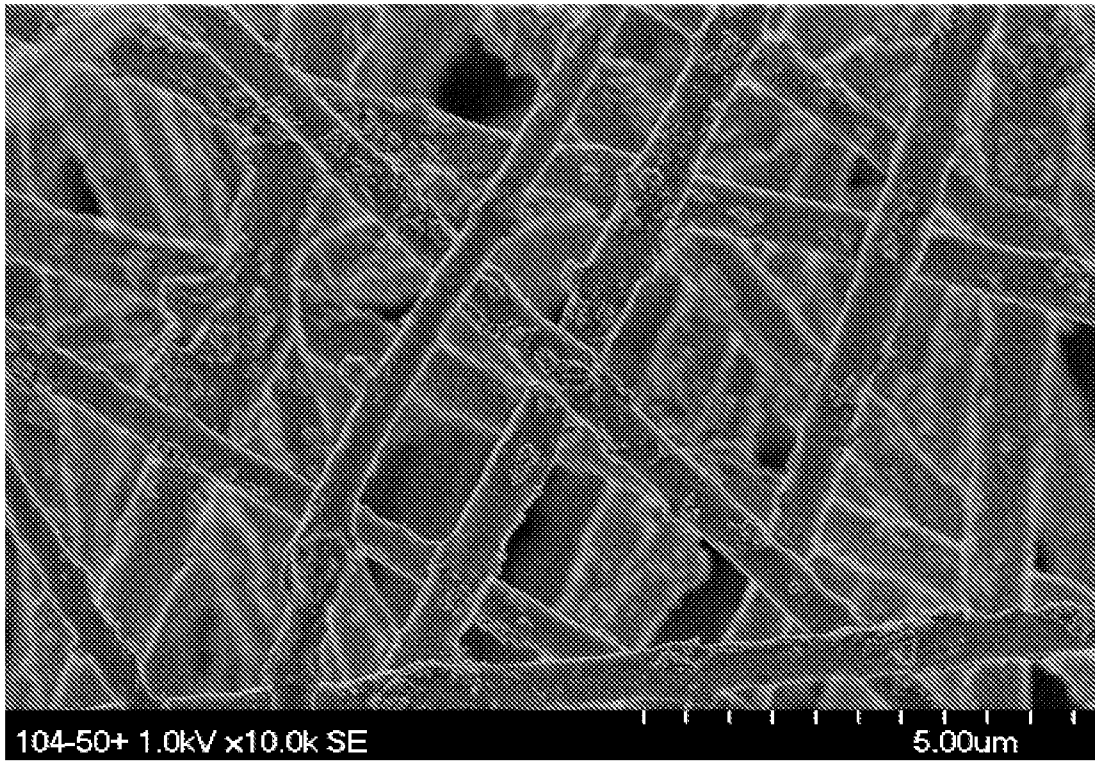


图 3

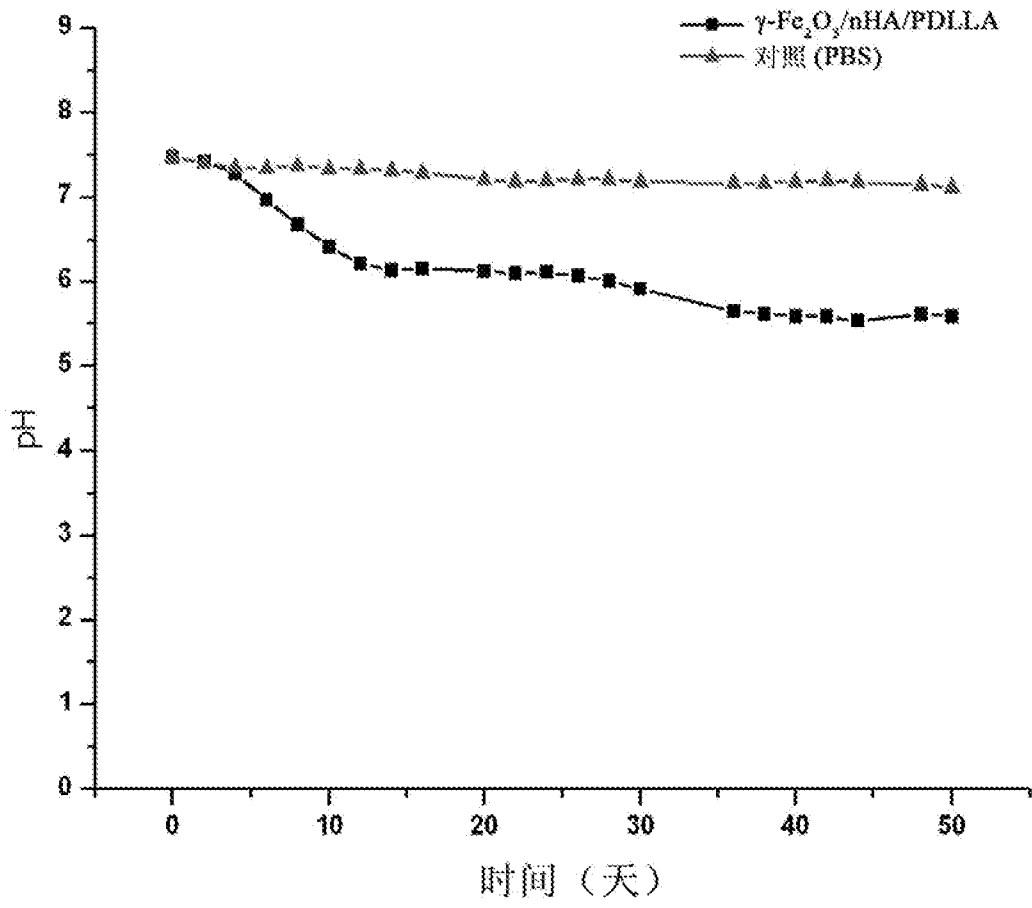


图 4

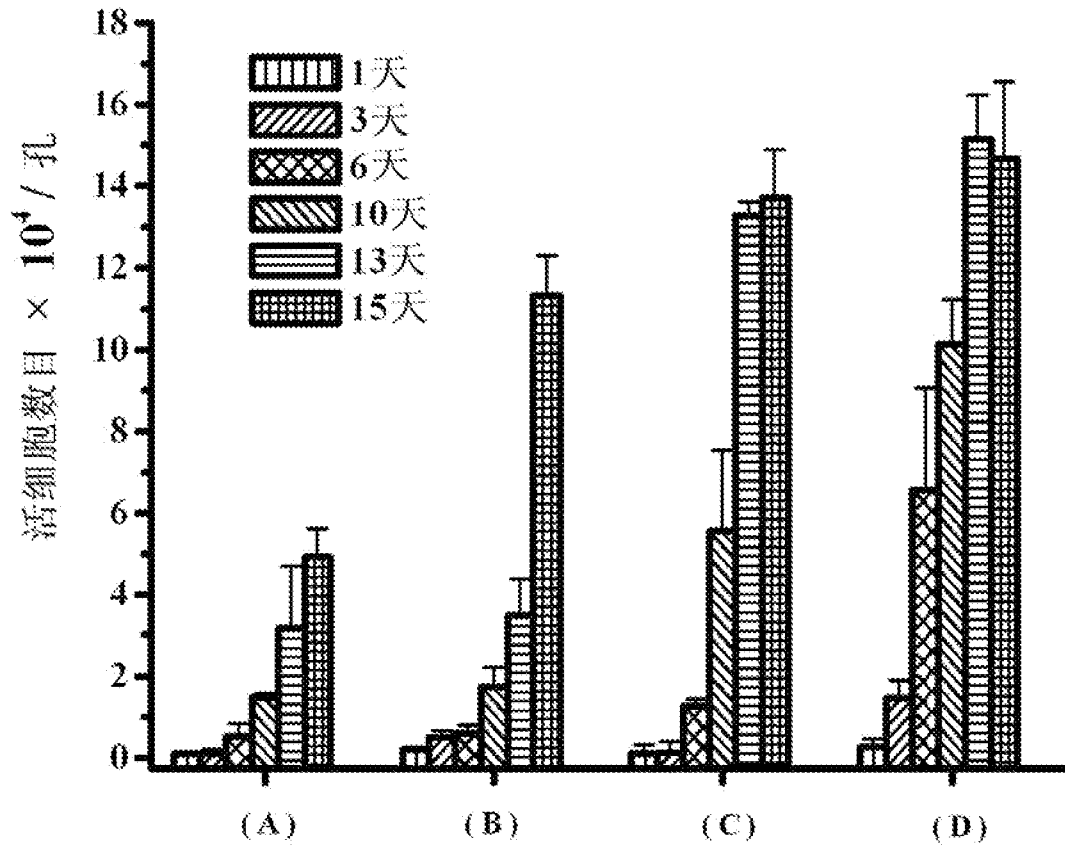


图 5

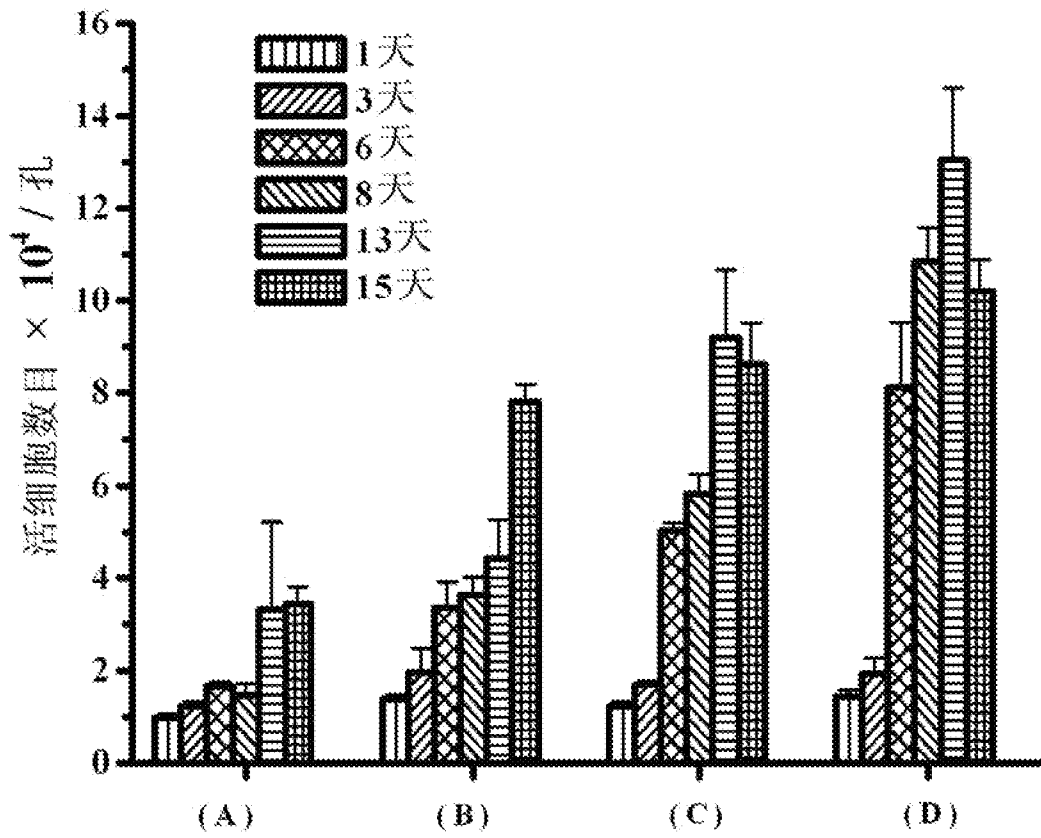


图 6

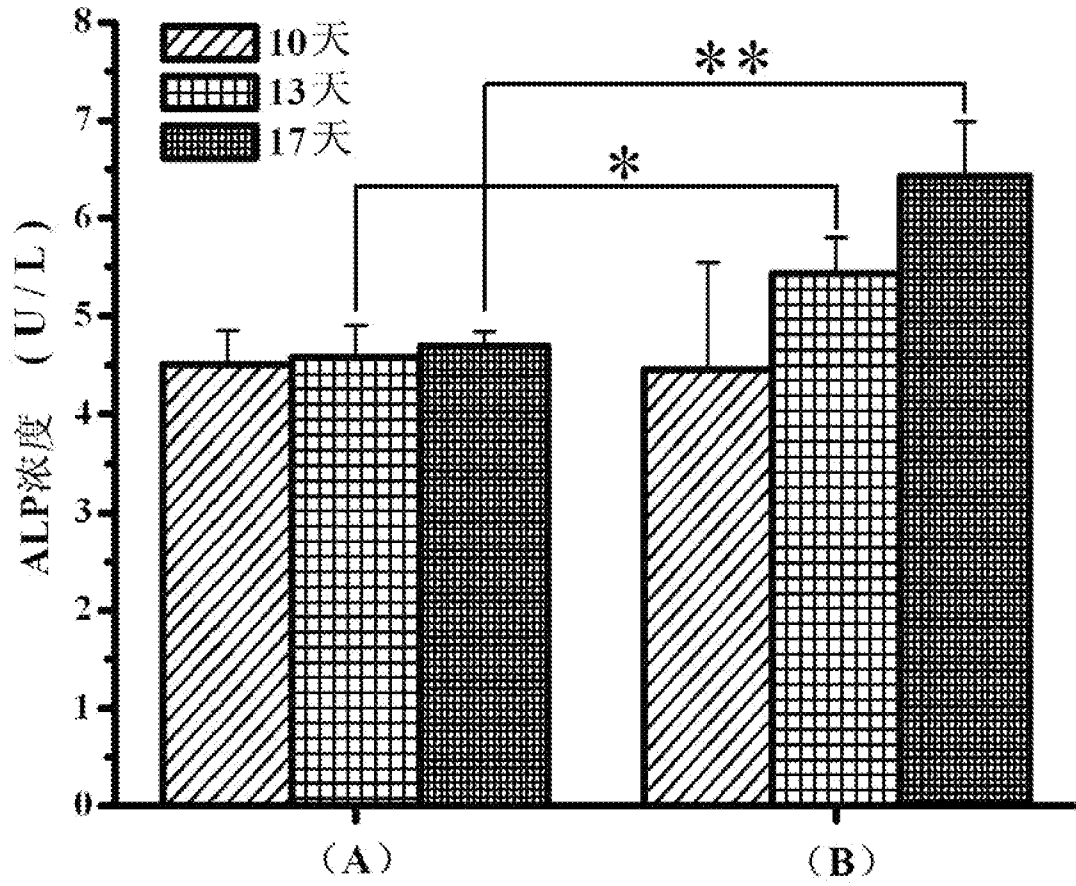


图 7

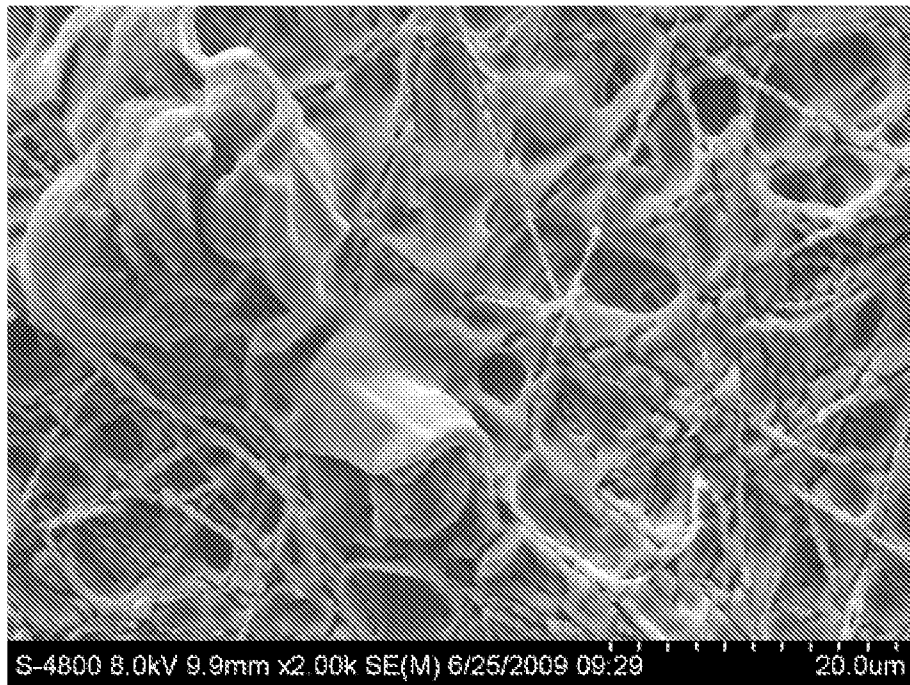


图 8a

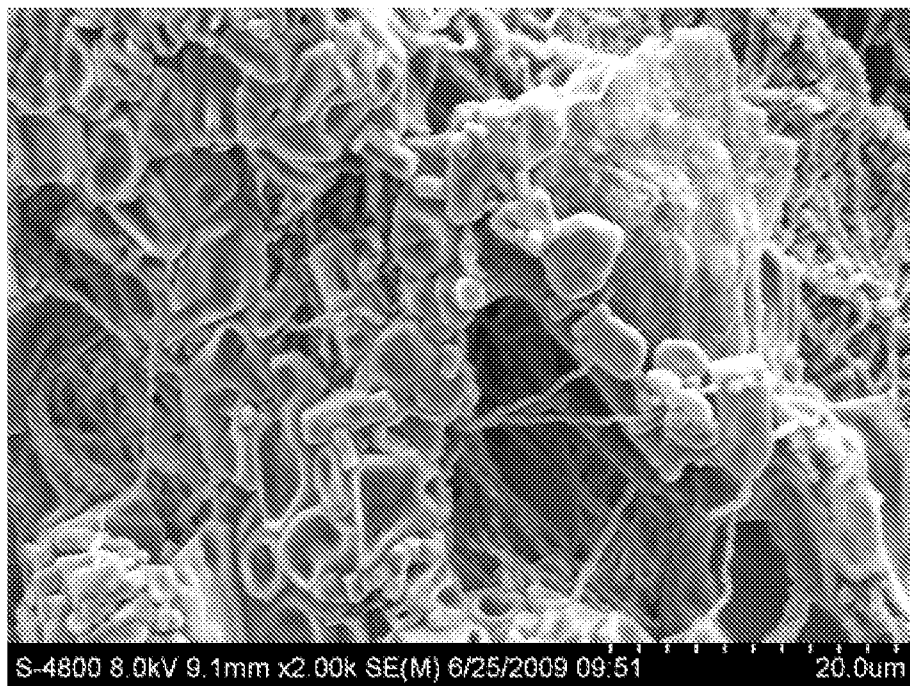


图 8b

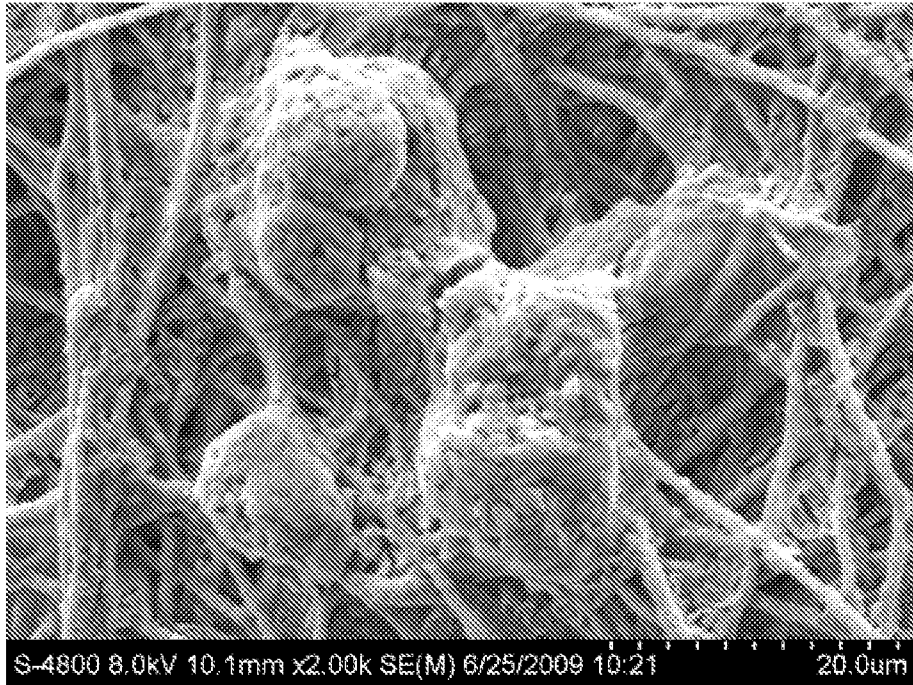


图 9

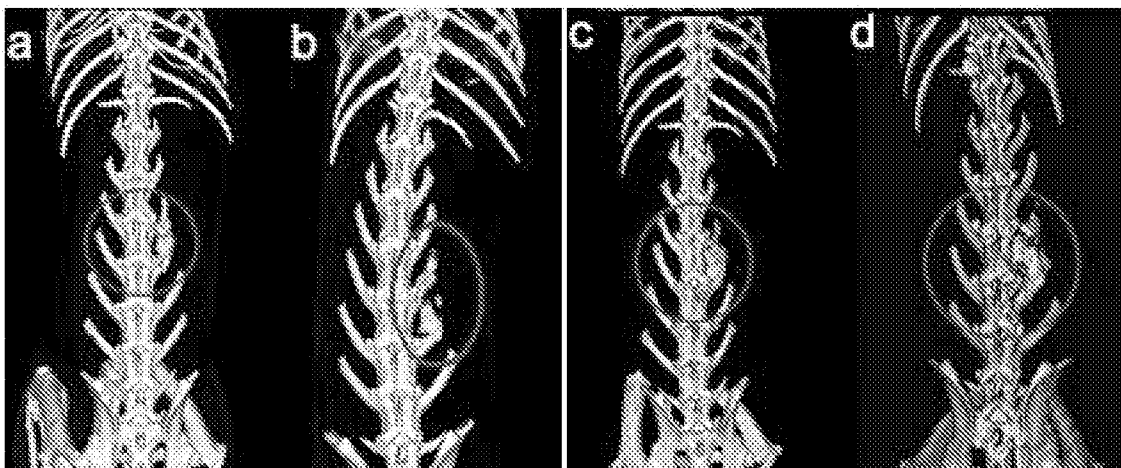


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61L27

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNKI, CPRS, WPI, EPODOC: poly(lactic acid), PLA, poly(glycolic acid), PGA, poly(lactic acid-co-glycolic acid), PLGA, polycaprolactone, PCL, polyamide and poly (hydroxybutyric acid), hydroxyapatite, HA, nanometer, ferric oxide, Fe₂O₃, magnetic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US2007/0041908A1 (FRAYSSINET P P et al.) 22 Feb. 2007 (22.02.2007) claims 1-10, description paragraphs 0015-0022	1,2,4-6
Y	claims 1-10, description paragraphs 0015-0022	3
Y	JIA Qiuling et al. SYNTHESIS AND APPLICATION OF LUMINESCENT NANO MAGNETIC PARTICLES. MATERIAL REVIEW. Nov. 2006, Vol.20, special VII, pages 30-32, parts 0 and 1.1	3
A	CHEN Fuping et al. PREPARATION OF MAGNETIC IRON OXIDE/HYDROXYAPATITE/ CHITOSAN RODS BY IN SITU PRECIPITATION. ACTA POLYMERIC SINICA. Sep. 2006, No. 6, pages 756-760	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 Nov. 2010 (15.11.2010)

Date of mailing of the international search report

23 Dec. 2010 (23.12.2010)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

ZHAO Jie

Telephone No. (86-10)62084695

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077114

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO03087444A1 (COOMBES A G A et al.) 23 Oct. 2003 (23.10.2003) whole document	1-6
A	EP0361797A (UNIV KYOTO) 04 Apr. 1990 (04.04.1990) whole document	1-6
A	WO03049780A1 (TECH-MEDICAL SRL) 19 Jun. 2003 (19.06.2003) whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/077114

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date		
US2007/0041908A1	22.02.2007	FR2857268A1	14.01.2005		
		WO2005004942A2	20.01.2005		
		EP1651287A2	03.05.2006		
		EP1651287B1	09.01.2008		
		DE602004011227E	21.02.2008		
		ES2297471T	01.05.2008		
		DE602004011227T	02.01.2009		
		AT383175T	15.01.2008		
		PT1651287E	28.02.2008		
		DK1651287T	05.05.2008		
		WO03087444A1	23.10.2003	AU2003224267A1	27.10.2003
				EP1492909A1	05.01.2005
				US2005161857A1	28.07.2005
EP0361797A	04.04.1990	CA2482086A	23.10.2003		
		JP2088059A	28.03.1990		
		JP5043393B	01.07.1993		
		EP0361797B1	30.08.1995		
		DE68924031E	05.10.1995		
		CA1340870C	04.01.2000		
		KR0157033B	16.11.1998		
		KR0157034B	01.02.1999		
		KR0157035B	01.02.1999		
		DE68924031T	25.01.1996		
		JP1821435C	10.02.1994		
WO03049780A1	19.06.2003	AU2002358639A1	23.06.2003		
		IT1326979B	11.03.2005		
		IT1341814B	18.10.2007		
		ITMI20012588A	10.06.2003		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/077114

Continuation of: second sheet, A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/18 (2006.01) i

A61L 27/12 (2006.01) i

A61L 27/02 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/077114

A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61L27		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, CPRS, WPI, EPODOC: 聚乳酸, PLA, 聚乙醇酸, PGA, 乳酸-乙醇酸共聚物, PLGA, 聚己内酯, PCL, 聚酰胺, 聚羟基丁酸, 羟基磷灰石, HA, 纳米, 氧化铁, 三氧化二铁, 磁性, poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(lactic acid-co-glycolic acid), polycaprolactone, polyamide and poly(hydroxybutyric acid), hydroxyapatite, nanometer, Fe ₂ O ₃ , magnetic		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US2007/0041908A1 (FRAYSSINET P P 等) 22.2 月 2007 (22.02.2007) 权利要求 1-10,说明书第 0015-0022 段	1,2,4-6
Y	权利要求 1-10,说明书第 0015-0022 段	3
Y	贾秋凌等, 载有荧光量子点的纳米磁性微粒的合成方法及应用前景, 《材料导报》第 20 卷专辑 VII, 30-32 页, 2006 年 11 月, 0 和 1.1 部分	3
A	陈福平等, 原位沉析法制备磁性氧化铁羟基磷灰石/壳聚糖棒材, 《高分子学报》第 6 期, 756-760 页, 2006 年 9 月	1-6
A	WO03087444A1(COOMBES A G A 等) 23.10 月 2003 (23.10.2003) 全文	1-6
A	EP0361797A (UNIV KYOTO) 04.4 月 1990 (04.04.1990) 全文	1-6
A	WO03049780A1(TECH-MEDICAL SRL) 19.6 月 2003(19.06.2003)全文	1-6
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 15. 11 月 2010 (15.11.2010)	国际检索报告邮寄日期 23.12 月 2010 (23.12.2010)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 赵洁 电话号码: (86-10) 62084695	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/077114

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US2007/0041908A1	22.02.2007	FR2857268A1	14.01.2005
		WO2005004942A2	20.01.2005
		EP1651287A2	03.05.2006
		EP1651287B1	09.01.2008
		DE602004011227E	21.02.2008
		ES2297471T	01.05.2008
		DE602004011227T	02.01.2009
		AT383175T	15.01.2008
		PT1651287E	28.02.2008
		DK1651287T	05.05.2008
WO03087444A1	23.10.2003	AU2003224267A1	27.10.2003
		EP1492909A1	05.01.2005
		US2005161857A1	28.07.2005
EP0361797A	04.04.1990	CA2482086A	23.10.2003
		JP2088059A	28.03.1990
		JP5043393B	01.07.1993
		EP0361797B1	30.08.1995
		DE68924031E	05.10.1995
		CA1340870C	04.01.2000
		KR0157033B	16.11.1998
		KR0157034B	01.02.1999
		KR0157035B	01.02.1999
		DE68924031T	25.01.1996
		JP1821435C	10.02.1994
WO03049780A1	19.06.2003	AU2002358639A1	23.06.2003
		IT1326979B	11.03.2005
		IT1341814B	18.10.2007
		ITMI20012588A	10.06.2003

续：第 2 页，A. 主题的分类

A61L 27/18 (2006.01) i

A61L 27/12 (2006.01) i

A61L 27/02 (2006.01) i