

骨外科

DOI: 10.11699/cyxb20131103

犬股骨髁脱蛋白骨关节的理化特性和生物安全性

瞿向阳¹, 蒋电明², 李明¹, 罗聪¹, 蒋林峻¹, 张寒³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院骨科, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016;

3. 重庆市高新区人民医院儿科, 重庆 400039)

【摘要】目的:探讨用过氧化氢-乙醚法制备同种异体脱蛋白骨关节(deproteinized osteo-articulation, DPOA), 讨论其理化特性和生物安全性。**方法:**采用过氧化氢-乙醚法将成年杂交犬股骨下端半关节松质骨脱脂、脱蛋白制作成生物衍生骨关节材料 DPOA。体视学显微镜、扫描电子显微镜观察 DPOA 材料外表面、孔隙内表面结构、孔径大小和孔间交通情况。HE 染色观察 DPOA 材料的细胞成分清除情况;pH 计检测仪检测 DPOA 材料的培养液 pH 值;微量凯氏定氮法检测 DPOA 材料中蛋白质含量;生物力学测试 DPOA 应力负荷;细胞毒性实验及溶血实验测试体外生物安全性。**结果:**体视学显微镜、扫描电子显微镜观察结果显示, DPOA 材料具有原骨组织的三维多孔-网架结构系统。计算机图像分析系统结果显示, 孔隙率为 $(84.76 \pm 4.63)\%$, 孔径最大为 $(318.64 \pm 16.35) \mu\text{m}$, 最小为 $(112.13 \pm 15.42) \mu\text{m}$ 。HE 染色显示 DPOA 材料细胞成分得到了彻底清除。浸泡 DPOA 材料组培养液 pH 为 7.382 ± 0.009 。DPOA 蛋白质含量为 $(0.017 \pm 0.003)\%$ 。生物力学测试最大应力负荷为 $(226.00 \pm 7.65) \text{N}$, 接近正常骨关节力学载荷。细胞毒性实验测试细胞毒性 0 级, 溶血试验 $< 5\%$ 。**结论:**用过氧化氢-乙醚法制作的同种异体天然衍生 DPOA, 保持了原骨组织密集的孔隙网状结构, 并具有原有的解剖结构外形, 其理化特性和生物安全性符合要求, 可作为一种组织工程支架或犬股骨半关节移植材料。

【关键词】脱蛋白骨;理化特性;生物安全性;支架材料**【中国图书分类法分类号】**R687.3+4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-07-18

Physicochemical characteristics and biological safety of allogeneic deproteinized osteo-articulation

QU Xiangyang¹, JIANG Dianming², LI Ming¹, LUO Cong¹, JIANG Linjun¹, ZHANG Han³

(1. Department of Orthopedics, the Children's Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

3. Department of Pediatrics, People's Hospital in Gaoxin District of Chongqing)

【Abstract】Objective: To explore a method to prepare deproteinized osteo-articulation (DPOA) with hydrogen peroxide and ether as well as to discuss its physicochemical characteristics and biological safety. **Methods:** Distal femur semi-joint cancellous bones of adult hybrid canine were made into bio-derived osteo-articulation materials with hydrogen peroxide and ether by degreasing and deproteinizing; outside surface, pore texture of internal surface, pore size and traffic situation among pores of DPOA were observed by stereology microscope and scanning electron microscope; eliminated cell composition of DPOA was observed by HE staining; culture solution pH values of DPOA were detected by instrument; protein contents of DPOA were detected by micro Kjeldahl method; stress weight was detected by biomechanics test; biological safety in vitro was tested by cytotoxicity test and hemolysis test. **Results:** Results of stereology microscope and scanning electron microscope reveal that DPOA had three-dimensional and porous-grid structure system of original bone tissue. Results of computer picture analytical system reveal that porosity was $(84.76 \pm 4.63)\%$, maximum aperture was $(318.64 \pm 16.35) \mu\text{m}$ and minimum aperture was $(112.13 \pm 15.42) \mu\text{m}$. HE staining revealed that cell composition of DPOA was eliminated entirely. pH value of DPOA culture solution was 7.382 ± 0.009 . Protein content of DPOA was $(0.017 \pm 0.003)\%$. Maximum stress weight of biomechanics test was $(226.00 \pm 7.65) \text{N}$, approaching mechanics loading of normal osteo-articulation. Cytotoxicity was 0 grade. Result of hemolysis test was $< 5\%$. **Conclusions:** Allogeneic natural derived DPOA made by hydrogen peroxide and ether method retains pore net structure of original bone tissue and possesses the intrinsic anatomical configuration. Its physicochemical characteristics and biological safety are qualified and can be used as an osteo-articulation grafting trestle material.

【Key words】deproteinized bone; physicochemical characteristics; biological safety; trestle material

作者介绍: 瞿向阳, Email: drqxy04090@126.com,

研究方向: 骨科生物活性材料及小儿骨科。

对骨关节缺损的修复重建材料的选择已有很多学者进行了研究。在众多材料中,金属、陶瓷或高分子材料假体虽已较多地应用于临床,但这些都具有一个共同的问题:易折断、下沉、磨损等导致需要翻修。同种异体骨关节是一种天然的骨修复重建材料,在三维立体结构和理化特性上和受体骨关节结构基本一致,日益受到研究者的高度重视。但是由于异体骨关节材料免疫原性的存在,直接用于体内不可避免地会发生免疫排斥反应,进而影响移植物的存活和伤口的愈合,导致骨关节修复重建的失败^[1]。采用过氧化氢-乙醚法对天然的同种异体骨关节进行处理,可去除其中的免疫原性物质,降低或避免移植入体内后发生免疫排斥反应,本实验对过氧化氢-乙醚法制作的同种异体脱蛋白骨关节(deproteinized osteo-articulation, DPOA)进行理化及生物安全性检测,为 DPOA 体内修复骨关节缺损及临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 DPOA 的制作

选取实验动物犬[标准健康成年杂种犬 6 只,体质量 (10.0±0.5) kg,雌雄不限,由重庆医科大学实验动物中心提供],麻醉后处死,洁净环境下剥离出双侧股骨下段及整个膝关节,用线锯距关节面 30 mm 垂直于股骨纵轴切断股骨下段,尽量剔除骨表面软组织,即肌肉、骨膜、韧带等,骨皮质及髌部散在钻孔,用生理盐水反复浸泡、洗净备用。将上述制备的骨块分批浸入 20%的过氧化氢溶液中脱蛋白处理,将该容器密闭,置于 37℃恒温水箱中,浸泡 72 h,每 12 h 更换浸泡液 1 次。再用生理盐水冲洗干净后,室温下晾干,置于 Soxhlet 容器中,容器底部加入 250 ml 乙醚,将骨块置于容器中部,37℃下进行乙醚循环脱脂处理 24 h,以去除骨块中的脂肪成分。在超声波清洗机中加入洗涤液(75%乙醇),将脱蛋白骨块放入洗涤液中以超声波振荡清洗,再用三蒸水同法洗涤 3 次,生理盐水+庆大霉素+地塞米松浸泡 48 h,脱干材料中的液体,洁净包装,环氧乙烷消毒,-20℃冰箱中保存备用。

1.2 材料的理化指标检测

1.2.1 孔径、孔隙率的检测 随机取制作完成的 DPOA 材料,分别行大体及体视学显微镜下观察其表面形态结构及剖开后的内部结构。扫描电子显微镜观察该材料外表面、内部孔隙内表面结构、孔径大小、孔隙率和空间交通情况。用计算机图像分析系统进行图像分析,测出 DPOA 材料的孔径大小(最大径、最小径)和孔隙率。

1.2.2 HE 染色的观察 取 DPOA 材料的髓腔部分做石蜡切片,采用 HE 法显色作光学显微镜观察材料内部的细胞结构清除情况。

1.2.3 pH 值检测 将质量基本相等的 DPOA 材料放入容积

为 100 ml 消毒的玻璃瓶中,用 30 ml DMEM 细胞完全培养液浸泡。无菌封闭瓶口,置于 37℃、饱和湿度、5%CO₂、pH 值 7.2 的培养箱中,分别于 1、2、4 d、1 周、2、4、8 周,每次随机取 3 瓶,将浸泡过的培养液用 pH 计分别进行测试,记录 pH 测试结果。用未放置 DPOA 的相同 DMEM 培养液作对照。

1.2.4 蛋白质含量测定 采用微量凯氏定氮法对 DPOA 材料中蛋白质进行测量,并以新鲜骨关节材料作为对照组同样进行蛋白质含量测定。按以下公式计算: $X = (V - V_0) \times C \times 0.014 \times B / m \times 100 \times F$ (X:样品中蛋白质含量, g/100 g; V:样品消耗盐酸标准液的体积, ml; C:盐酸标准液摩尔浓度, mol/L; 0.014:1 mol/L 盐酸标准液 1 ml 相当氮克数; B 定容体积/取液量; m:样品的质量, g; F:氮换算为蛋白质计算因子, 6.25)。

1.2.5 生物力学测试 随机取制作完成的 DPOA 材料在生物力学测试系统(MTS 型,美国)上行 3 点弯曲测试,每次加载前先进行预载以消除标本的松弛、蠕变等时间效应的影响,然后开始正式测试。以 0.5 mm/s 加载,标本测试距离为 30 mm,做 3 点弯曲最大载荷并计算弯曲应力,同样方法取异体未脱蛋白脱脂处理的半关节材料作对照。随机取制作完成的 DPOA 材料及异体未脱蛋白脱脂处理的半关节材料切取髌部 1 cm×1 cm×1 cm,作垂直压缩实验,对照测试标准块结构的力学强度,垂直压缩实验用 Instron1011 生物力学测试系统(英斯特朗公司,美国);常温常压下,每个标本放于 Instron1011 测试机两加载头之间,加载速度为 2 mm/min,200 N 预压 3 次后,应力加到材料断裂停止加载。

1.3 体外生物安全性检测

1.3.1 细胞毒性实验 将 DPOA 用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液浸泡 24 h,制备 20% DPOA 培养液。取 P₂ 代骨髓间充质干细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl。置入 37℃,5%CO₂,培养箱培养,24 h 后弃去原培养基,用 PBS 洗涤 2 次。对照组为新鲜培养液,阳性管为含 0.64%苯酚培养液,实验组为 20%DPOA 培养液,继续培养 24、48、72 h。各观察期,弃去培养皿中的浸提液和培养基,每孔加入 20 μl MTT 液,继续培养 6 h,吸去原液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷,振荡 10 min,在免疫酶标仪上以 570 nm 波长测定吸光度(absorbance, A)值,计算细胞的相对增殖度(relative growth rate, RGR)^[2]。根据细胞毒性实验毒性评定标准:0 级, RGR≥100; 1 级, RGR 为 75~99; 2 级, RGR 为 50~74; 3 级, RGR 为 25~49; 4 级, RGR 为 1~24; 5 级, RGR 为 0。0~1 级为反应合格, 2 级应结合细胞形态分析并综合评价, 3~5 级为反应不合格。

1.3.2 溶血实验 将抗凝新鲜实验动物犬(标准健康成年杂种犬 1 只,体质量 10 kg,雌性,由重庆医科大学实验动物中心提供)血用生理盐水稀释成 2%犬血悬液。将 20%DPOA 浸提液、生理盐水(阴性对照)、双蒸水(阳性对照)各 2 ml,分别加入 2%犬血悬液 2 ml 内,每组 5 份。37℃水浴 1 h,肉眼观察有无溶血。1 000 r/min 离心 5 min。取上清液 1 ml,加入 0.1% Na₂CO₃ 溶液 4 ml,在分光光度计 540 nm 处测定各样本 A 值。计算溶血率。溶血率=(样品 A_{450 nm}-阴性对照 A_{450 nm})/(阳性对照 A_{450 nm}-阴性对照 A_{450 nm})。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据录入及统计分析。各组数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, DPOA 的 pH 值、蛋白含量、生物力学测试结果比较采用两独立样本 t 检验, 细胞毒性实验结果比较采用重复测量资料方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结 果

2.1 孔径、孔隙率的测定

2.1.1 DPOA 的大体观察结果 按照过氧化氢-乙醚法制得的生物衍生支架材料 DPOA, 外观灰白色, 无异味, 形状同新鲜活体股骨髁, 关节面光滑, 外层皮质质地坚韧有一定强度, 材料予以纵形剖开, 肉眼观察材料内部为疏松多孔网状结构, 孔径大小不一 (图 1)。



图 1 DPOA 形态大体观察

Fig.1 General morphology of DPOA

2.1.2 DPOA 体视学显微镜观察结果 图 2 可见 DPOA 材料具有多孔结构, 孔径大小不一, 形状不规则, 孔内表面欠光滑, 孔间光线不直通, 骨小梁连续。



图 2 DPOA 体视学显微镜观察 (40 $\times$)

Fig.2 Stereoscope observation results of DPOA (40 $\times$)

2.1.3 DPOA 扫描电镜观察结果 DPOA 材料具有天然骨组织的密集孔隙-网状结构系统, 其天然骨组织支架三维多孔结构保持完好 (图 3), 经计算机图像分析系统对照片进行图像分析, 结果如下: DPOA 材料孔隙率为 $(84.76 \pm 4.63)\%$; DPOA 材料孔径最大为 $(318.64 \pm 16.35) \mu\text{m}$, 最小为 $(112.13 \pm 15.42) \mu\text{m}$ 。

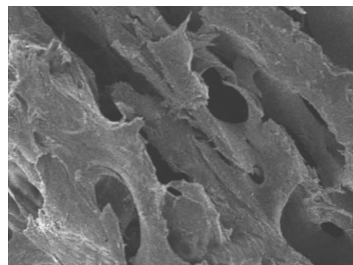


图 3 DPOA 扫描电镜观察 (100 $\times$)

Fig.3 Scanning electron microscope observation results of DPOA (100 $\times$)

2.2 HE 染色光学显微镜观察结果

DPOA 材料内部的细胞成分得到了彻底地清除, 消除了材料由细胞成分引起的免疫原性 (图 4)。

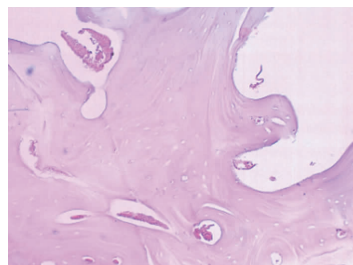


图 4 DPOA 光学显微镜观察 (HE, 200 $\times$)

Fig.4 Optical microscope observation results of DPOA (HE, 200 $\times$)

2.3 DPOA 的 pH 值测定结果

分别测得浸泡 DPOA 实验组和阴性对照组第 1、2、4 天、1、2、4、8 周的 DMEM pH 值见表 1。由表 1 得知, DPOA 实验组与阴性对照组 pH 值其均值分别为 (7.382 ± 0.009) 和 (7.381 ± 0.013) , 呈弱碱性, 2 组间比较差异无统计学意义 ($t=0.947, P=0.36$)。

2.4 DPOA 蛋白质含量测定结果

DPOA 实验组材料及对照组新鲜骨关节经微量凯氏定氮法检测, 按上述公式计算, 结果为对照组新鲜骨关节蛋白质含量为 $(28.197 \pm 0.010)\%$, DPOA 实验组蛋白质含量仅 $(0.017 \pm 0.003)\%$, 2 组间比较差异有统计学意义 ($t=4.947$,

表 1 DPOA 浸泡液与 DMEM 阴性对照组 pH 值检测结果 ($n=6$)

Tab.1 Comparison of pH value between DPOA soak group and DMEM negative control group ($n=6$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 4 天	第 1 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
DPOA 实验组 ^a	7.379 ± 0.012	7.389 ± 0.013	7.372 ± 0.107	7.392 ± 0.112	7.395 ± 0.072	7.391 ± 0.062	7.401 ± 0.042
阴性对照组	7.373 ± 0.101	7.386 ± 0.102	7.384 ± 0.059	7.376 ± 0.072	7.387 ± 0.114	7.393 ± 0.101	7.392 ± 0.076

注: a, 与阴性对照组比较, $P>0.05$

$P=0.003$),表明 DPOA 材料中蛋白质含量极少。

2.5 生物力学测试结果

2 组标本在三点弯曲过程中出现骨皮质及骨小梁断裂时的应力载荷为最大应力载荷并记录,经统计分析,对照组新鲜骨关节三点弯曲应力载荷结果为 (246.00 ± 6.32) N,DPOA 实验组为 (226.00 ± 7.65) N,2 组间差异无统计学意义($t=1.031$, $P=0.31$),表明 DPOA 材料具有接近正常骨关节的力学强度,垂直压缩实验测试髌部标准块结构的力学强度结果为 DPOA 实验组为 (106.00 ± 3.65) N,对照组为 (162.00 ± 4.37) N,2 组间差异有统计学意义($t=2.431$, $P=0.03$),表明 DPOA 材料髌部的力学强度差于正常骨关节髌部。

2.6 细胞毒性实验结果

DPOA 实验组材料对骨髓间充质干细胞毒性作用结果见表 2。由表 2 得知,DPOA 实验组材料对骨髓间充质干细胞毒性作用为 0 级,DPOA 实验组细胞增殖率和阳性对照组细胞增殖率之间差异有统计学意义($F=64.12$, $P=0.006$),与阴性对照组细胞增殖率之间差异无统计学意义($F=1.02$, $P=0.380$)。标准规定:生物材料的细胞毒性必须 ≤ 1 级^[3-4]。故 DPOA 材料的细胞毒性符合标准要求。

表 2 DPOA 实验组、阴性对照组及阳性对照组对骨髓间充质干细胞 A 值

Tab.2 A values of bone mesenchymal stem cells among DPOA experimental, negative and positive groups

组别	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.06	0.25 ± 0.03
阳性对照组	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.02
DPOA 实验组	0.23 ± 0.04^{ab}	0.26 ± 0.04^{ab}	0.24 ± 0.06^{ab}

注:a,与阴性对照组比较, $P>0.05$;b,与阳性对照组比较, $P<0.05$

2.7 溶血实验结果

DPOA 材料对健康犬血的溶血实验结果见表 3。由表 3 得知,DPOA 实验组 A 值为 0.043 ± 0.004 ,阴性对照组 A 值为 0.036 ± 0.007 ,阳性对照组 A 值为 0.214 ± 0.042 ,DPOA 实验组溶血率为 3.9%,未超过 5%,达到标准要求^[3]。

表 3 DPOA 材料溶血实验结果

Tab.3 Result of hemolysis test in DPOA materials

组别	A 值	溶血率 (%)
阴性对照组	0.036 ± 0.007	0.0
阳性对照组	0.214 ± 0.042	100.0
DPOA 实验组	0.043 ± 0.004	3.9

3 讨论

目前,对修复骨关节缺损支架材料的研究是组织工程学研究的重点,支架材料是细胞附着的基本框架和代谢场所,它的成分、框架结构和代谢趋向直接影响着细胞的生长、分化及转归等多种功能活动^[4-6]。

理想的支架材料应具备良好的组织相容性和细胞相容性,良好的细胞界面,具有三维的立体网状结构,具有良好的骨诱导性和传导性等特性,利于细胞的黏附、生长、增殖和分化,并形成功能性组织^[7]。

本研究选用犬的股骨髌具有皮质骨带关节面的结构,具有与移植宿主骨关节一致的外形结构,能够在解剖学上与之匹配,且与宿主骨骼具有同源性结构,其抗原性较低,不会或很少引起宿主的免疫反应,其密集的微孔结构主要成分为骨胶原和矿物质,X 线衍射分析其组成为羟基磷灰石,其分子式为 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{OH})_4$,将该材料植入机体,可发挥骨传导作用。采用过氧化氢-乙醚法制作 DPOA,去除非胶原蛋白、肽类及脂类、细胞等,以降低抗原性。材料皮质及髌部散在钻孔,剔除附着的韧带和骨膜,利于进一步脱蛋白和脱脂处理。经脱蛋白、脱脂处理后的 DPOA 具有天然的密集微孔系统,有利于新生毛细血管的长入和间质细胞的迁入,从而诱导骨的发生^[8]。过氧化氢-乙醚法制备的 DPOA 与 Oswestry 骨,Kiel 骨和乙醇法制得的 DPOA 相比,虽经脱蛋白脱脂处理,仍具有接近正常骨关节的力学强度,可能是因为材料具有坚韧的骨皮质结构,虽其髌部松质骨的力学强度明显低于正常松质骨组织,但并不影响该材料的整体力学性能,适合作为骨关节移植材料,并且同种异体 DPOA 作为一种生物组织和宿主骨能具有一致的结构,是骨发生细胞附着的有效支架,不但能促进成骨细胞的分化和细胞外基质的合成,且易为受体破骨细胞接近清除^[9-11]。但 DPOA 材料的皮质骨结构可能也是体内植入后阻碍受体血管、组织、细胞的长入,从而延长与宿主骨愈合的时间,本实验通过对 DPOA 材料皮质散在钻孔,希望能降低该材料的这种屏障作用。经对其理化特性的检测,该材料 pH 值为弱碱性,与体内植入环境较一致,有利于钙盐的沉积^[12]。本实验对制备的同种异体脱蛋白骨进行的理化测试结果符合理想支架材料要求。

生物材料能否进入临床应用的关键标准是生物相容性和无毒性,国际标准化组织以 10993 编号发布了 18 个标准被广泛采纳^[13],对 DPOA 的生物安全性评价,本实验参照国家标准^[3,14]对该材料进行了细胞毒性实验、溶血实验等体外检测,从而了解其生物安全性。本研究通过 MTT 法检测 DPOA 材料浸提液细胞毒性实验、溶血实验等方法,对 DPOA 材料的生物安全性进行评价。MTT 法最早是由 Mosroanm^[15]于 1983 年提出,现已广泛应用于对材料

的细胞相容性的评价^[16-19]。在本实验中,DPOA 浸提液毒性结果按美国药典中细胞相对增殖率与细胞毒性的分级关系进行分级,其细胞毒性均为 0 级。故 DPOA 材料符合组织工程支架材料的无毒性要求。溶血实验被认为是细胞毒性评价的一个补充实验。本研究中阴性对照组和 DPOA 实验组静置后各管内均见到有血细胞的沉积,2 组 A 值无明显差异。而阳性对照组各管颜色均一,呈淡红色,表现为明显溶血的现象,其 A 值与阴性对照组和 DPOA 实验组均有显著差异。最终求得材料浸提液相对溶血率为 3.9%,符合溶血率<5%的标准要求,进一步补充说明了 DPOA 材料的无毒性。

综上所述,本研究取犬股骨髁部,采用过氧化氢-乙醚法制得的天然生物衍生骨关节支架材料——DPOA,保持了原骨组织密集的孔隙网状结构,并具有原有的解剖结构外形,其理化特性符合要求,体外生物安全性检测表明其具有良好的生物安全性,可作为一种组织工程支架或犬股骨半关节移植材料,为后期该材料的体内植入及进一步临床应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 蒋电明,安 洪,吴祖尧.异体脱蛋白骨关节移植的初步实验与临床应用[J].伤残医学杂志,1998,6(1):5-8.
- [2] 代震宇,李 军,蒋电明,等.纳米羟基磷灰石/聚氨基酸复合材料生物安全性评价[J].第三军医大学学报,2010,32(21):2294-2299.
- [3] Dai Z Y,Li J,Jiang D M,et al.Biological safety of nano-hydroxyapatite and poly-amino acid compound[J].Journal of the Third Military Medical University,2010,32(21):2294-2299.
- [4] 卫生部药政管理局.GB 16886-1 生物材料和医疗器材生物学评价技术要求[S].北京:人民卫生出版社,1997.
- [5] Bureau of Pharmaceutical Affairs of Ministry of Public Health.GB 16886-1 The technical requirements of biological evaluation about biological material and medical equipment[S].Beijing:People's Medical Publishing House,1997.
- [6] 刘 雷,李起鸿,唐康来,等.异种脱蛋白骨的生物相容性研究[J].第三军医大学学报,2006,28(22):2227-2229.
- [7] Liu L,Li Q H,Tang K L,et al.On biocompatibility of heterogeneous deproteinized bone as scaffold material[J].Journal of the Third Military Medical University,2006,28(22):2227-2229.
- [8] Nagahara S,Matsuda T.Cell substrate and cell interactions differently regulate cytoskeletal and extracellular matrix protein gene expression[J].Biomed Mater Res,1996,32(4):677-686.
- [9] Boyan B D,Hummert T W,Dean D D,et al.Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response[J].Biomaterials,1996,17(2):137-146.
- [10] 毛天球,杨维东,陈富林,等.组织工程骨的研究[J].中国修复重建外科杂志,2003,17(2):121-124.
- [11] Mao T Q,Yang W D,Chen F L,et al.Study on tissue engineering bone[J].Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery,2003,17(2):121-124.
- [12] 胡永康,安 洪,曹本珍,等.四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究[J].中华创伤杂志,1998,14(5):277-279.
- [13] Hu Y K,An H,Cao B Z,et al.Comparative study on four types of deproteinized bones histologically and biomechanically[J].Chinese Journal of Traumatology,1998,14(5):277-279.
- [14] Tapety F I,Amizuka N,Usoshima K,et al.A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis[J].Clin Oral Impl Res,2004,15(3):315-324.
- [15] Stavropoulos A,Karring T.Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss (R)) in the treatment of intrabony periodontal defects;6-year results from a randomized-controlled clinical trial[J].J Clin Periodontol,2010,37(2):200-210.
- [16] Baldini N,De Sanctis M,Ferrari M.Deproproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery[J].Dent Mater,2011,27(1):61-70.
- [17] Kue R,Suhrahi A,Nagte D,et al.Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs[J].Biomaterials,1999,20(13):1195-1201.
- [18] ISO.ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices[S].Switzerland:International Organization for Switzerland,1997.
- [19] State Pharmaceutical Administration.GB/T16886.2-1997 Biological evaluation of medical devices[S].Beijing:People's Medical Publishing House,1997.
- [20] Mosmann T.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays[J].J Immunol Methods,1983,65(1-2):55-63.
- [21] Kirchner S,Zeller A.Comparison of different cytotoxicity measures for the in vitro micronucleus test (MNVit) in L5178Y tk(+/-)cells:summary of 4 compounds (mitomycin C,cyclophosphamide,colchicine and diethylstilboestrol) with clastogenic and an eugenic mode of action[J].Mutat Res,2010,702(2):193-198.
- [22] Cariou O,Laroche-Prigent N,Ledieu S,et al.Cytosine arabinoside,vinblastine,5-fluorouracil and 2-aminoanthracene testing in the in vitro micronucleus assay with L5178Y mouse lymphoma cells at Sanofi Aventis,with different cytotoxicity measurements,in support of the draft OECD test guideline[J].Mutat Res,2010,702(2):148-156.
- [23] Ciapetti G,Genni E,Pratelli L,et al.In vitro evaluation of cell/bio-material interaction by MTT assay[J].Biomaterials,1993,14(5):359-364.
- [24] Wataha J C,Hanks C T,Craig R G,et al.In vitro effects of metal ions on cellular metabolism and the correlation between these effects and the uptake of the ions[J].J Biomed Mater Res,1994,22(28):427-433.

(责任编辑:唐秋姗)