

# 异种脱蛋白松质骨支架体内移植后血清T细胞亚群的变化\*☆

高春阳, 姜宏春, 金春明, 溪克敏

## Immune properties of xenogeneic-deproteinized-cancellous-bone as tissue engineered scaffold

Gao Chun-yang, Jiang Hong-chun, Jin Chun-ming, Xi Ke-min

### Abstract

**BACKGROUND:** It has showed that deproteinized cancellous bone maintains natural network pore system and provides better cancellous compatibility than other mechanical materials except immunology.

**OBJECTIVE:** To fabricate xenogeneic-deproteinized-cancellous-bone scaffold and to explore the intensity of immune reaction sparked by xenogeneic deproteinized cancellous bone implanted at goats.

**METHODS:** We made deproteinized bone derived from pig femoral cancellous bone by physical and chemical treatments. Their morphological features, constitute components and mechanical properties were examined by scanning electron microscopy, X-rays diffraction analysis, mechanical experimental instrument and so on. Eight male goats were divided into experimental and control group according to transplant materials. Materials included xenogeneic deproteinized cancellous bone and fresh xenogeneic cancellous bone.

**RESULTS AND CONCLUSION:** It showed that deproteinized cancellous bone maintained natural network pore system. The main organic material was collagen I and inorganic was hydroxyapatite. It hardly has any antigen and it has good histocompatibility. The mechanical strength was no significant difference between deproteinized cancellous bone and fresh cancellous bone. In experimental group, T lymphocyte subsets CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup> in blood samples had no significant difference at different time point, and there was no positive stained reddish zones in the slides of xenogeneic deproteinized cancellous bone implanted for 4 weeks at intertransverse. Xenogeneic deproteinized cancellous bone may be safe in immunology.

Gao CY, Jiang HC, Jin CM, Xi KM. Immune properties of xenogeneic-deproteinized-cancellous-bone as tissue engineered scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(29):5343-5346.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 研究提示异种脱蛋白松质骨可能成为一种极有实用价值的骨组织工程支架材料,但仍缺少细胞生物学及免疫学论证。

**目的:** 脱蛋白法制备骨组织工程用的异种松质骨支架,探讨其山羊体内移植后免疫学性能。

**方法:** 成年猪股骨远端松质骨,采用逐级脱蛋白方法去除异种骨中的抗原性成分。取6~8月龄雄性山羊8只随机分成2组,实验组双侧3、4横突间各植入脱蛋白松质骨2块。对照组植入相同数量未经处理新鲜松质骨。

**结果与结论:** 采用脱蛋白处理后的猪松质骨光镜下可见骨孔内无细胞、神经、血管和嗜酸性物质染色。脱蛋白松质骨中胶原氨基酸含量高,与新鲜松质骨相比无明显差异,而酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸波峰消失。新鲜松质骨氨基酸含量为19.89%,脱蛋白松质骨氨基酸含量为18.06%。脱蛋白松质骨植入后各时间点CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>水平与植入前相比基本保持一致,植入4周后局部抗原免疫组织化学未见阳性表达。提示经脱蛋白处理后异种松质骨低免疫原性,植入体内后没有特异性抗体产生,具有良好的组织相容性。

**关键词:** 异种脱蛋白松质骨; 支架; 移植; CD3<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.29.006

高春阳, 姜宏春, 金春明, 溪克敏. 异种脱蛋白松质骨支架体内移植后血清T细胞亚群的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(29):5343-5346. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

异种脱蛋白松质骨作为骨组织工程支架具有独特的优越性,其中最具有吸引力的就是来源广泛且不存在社会伦理学问题<sup>[1]</sup>。以往研究中未发现异种脱蛋白松质骨对个体间充质干细胞的生物学特性有不良影响,显示了良好的细胞相容性<sup>[2]</sup>,以其为支架构建的组织工程骨在脊柱横突间成骨融合作用也另人鼓舞<sup>[3]</sup>。这暗示异种脱蛋白松质骨可能成为一种极有实用价值的骨组织工程支架材料,但因为缺少细胞生物学及免疫学论证<sup>[4]</sup>,很难在市场上商业化。

按照移植免疫学理论,异种材料移植会导致免疫反应,这是由其自身的主要组织相容性复合物决定的<sup>[5]</sup>。医用生物材料植入到体内到底免疫反应如何关系到能否作为支架材料应用于组织工程,进而应用于临床<sup>[6]</sup>。为此实验针对异种脱蛋白骨免疫原性及大动物体内植入后相关免疫学指标检测以评价其可行性。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-08/2010-08在黑龙江省纤维生物化重点实验室完成。

Department of Orthopedics, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Gao Chun-yang☆, Doctor, Associate professor, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China  
Gchy1969@163.com

Supported by: Science Research Project of Mudanjiang Medical College, No. 2010-27\*

Received: 2011-01-27  
Accepted: 2011-04-06

牡丹江医学院红旗医院骨科,黑龙江省牡丹江市157011

高春阳☆,男,1969年生,辽宁省海城市人,汉族,2006年解放军第三军医大学毕业,博士,副教授,副主任医师,主要从事骨科基础与临床研究。  
Gchy1969@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225 (2011)29-05343-04

收稿日期:2011-01-27  
修回日期:2011-04-06  
(20100823007/W·W)

**材料:** 6~8月龄健康雄性青山羊8只, 体质量20~20.5 kg, 由牡丹江医学院动物中心提供。

**主要试剂仪器:**

试剂及仪器	来源
鼠抗羊 CD3-FITC/CD4-PE/ CD45-PerCP、鼠抗羊 CD3- FITC/CD8-PE/CD45-PerCP、鼠抗羊 CD28 单克隆抗体	BD 公司, 美国
混合酶(胰蛋白酶: 胶原酶)	Sigma 公司, 美国
过氧化酶标记的猪抗羊 IgG	北京生物制品研究所
全自动氨基酸分析仪(日立 I-8800)	日立

### 实验方法:

**脱蛋白松质骨支架制备:** 取成年猪新鲜股骨远端松质部分, 所截取骨块内不含软骨及皮质骨成分, 初制为3 cm×0.5 cm×0.5 cm大小, 其长轴与所取松质骨小梁排列方向一致, 取材各骨块的表现孔隙密度基本相同<sup>[7]</sup>。参照Marts方法<sup>[8]</sup>。骨块1:1氯仿甲醇液脱脂24 h, 50 ℃蒸馏水震荡冲洗, 体积分数20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浸渍24 h。反复3次。每阶段利用倒置显微镜观察骨块大体形态结构直至骨孔内无细胞、基质等组织成分。扫描电子显微镜下随机选择不同区域, 游标卡尺测量样品孔径范围。并经图像分析系统计算孔隙率。收集每次倒出的处理液, 离心后获得沉淀物。氨基酸分析仪测定羟脯氨酸的含量。将处理后的骨块蒸馏水于室温下浸泡透析24 h, 烘干。每块电子天平称质量(1.0±0.1) g。<sup>60</sup>Co辐射消毒, 无菌袋真空包装, 低温(-4 ℃)储藏。全自动氨基酸分析仪检测脱蛋白松质骨及新鲜松质骨样品。

**实验动物及分组:** 将雄性青山羊8只随机分成2组, 每组4只。实验组双侧3, 4横突间各植入脱蛋白松质骨2块(共4块, 质量约4 g)。对照组植入相同数量未经处理新鲜松质骨。

**T淋巴细胞亚群检测:** 术前24 h、术后3, 7, 14, 28 d无菌条件下各抽取20 mg/L肝素抗凝外周血2 mL, 分成4管, 每管0.5 mL。各加入10 μL鼠抗羊CD3-FITC、CD4-FITC、CD8-FITC、CD28-PE单克隆抗体, 置于37 ℃、体积分数5%饱和湿度CO<sub>2</sub>细胞培养箱内2 h, PBS液3 mL洗涤2次, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。恢复体积至0.5 mL, 加固定液后上流式细胞仪, 分析阳性细胞百分率, 光源488 nm(氩激光)样本分析常规设置的淋巴细胞门, 每次分析5 000个以上细胞。

**免疫酶组织染色分析脱蛋白松质骨的抗原性:** 植入后28 d切取植入标本。每组各4块, 体积分数4%甲醛液固定72 h, 石蜡包埋, 制备成厚5 μm的切片。第1抗体为材料植入4周后自体血清。第2抗体为辣根过氧化物标记的猪抗羊IgG结合物。底物: 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)。

**主要观察指标:** ①植入材料表征。②植入后外周血

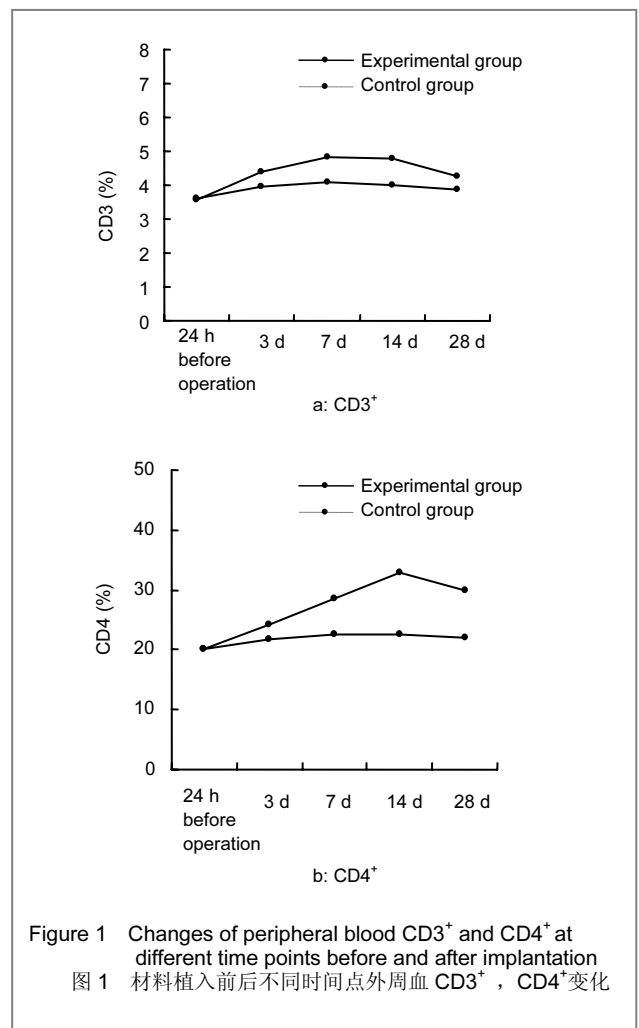
T细胞亚群检测情况。③两种材料植入4周取材组织免疫酶染色情况。

**统计学分析:** 由本文作者应用SPSS 10.0软件包进行处理, 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 植入材料表征** 采用脱蛋白处理后的猪松质骨光镜下可见大小不等、相互交通、开放孔隙的网架结构。扫描电镜显示: 孔径(394±124) μm (200~500 μm), 孔隙率70%。表面形貌为小梁状和山嵛状。骨孔内无细胞、基质等组织成分, 孔壁光滑。无细胞、神经、血管和嗜酸性物质染色。新鲜松质骨可见较多骨髓组织和细胞。处理液沉淀物羟脯氨酸的含量为0.06%。脱蛋白松质骨中胶原类氨基酸(Gly、Arg、LYs)含量高, 与新鲜松质骨相比无明显差异。新鲜松质骨中可见酪氨酸(Tyr)、色氨酸和半胱氨酸(Cys)波峰, 而脱蛋白松质骨中该波峰消失。新鲜松质骨氨基酸含量为19.89%, 脱蛋白松质骨氨基酸含量为18.06%。

**2.2 植入后外周血T细胞亚群检测情况** 见图1, 2。



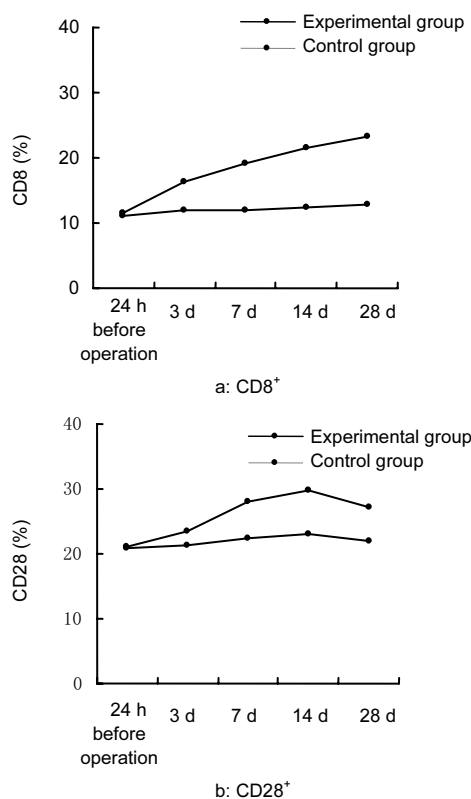


Figure 2 Changes of peripheral blood CD8<sup>+</sup> and CD28<sup>+</sup> at different time points before and after implantation  
图2 材料植入前后不同时间点外周血 CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>变化

**2.3 两种材料植入4周取材组织免疫酶染色情况** 两组材料周围被纤维样组织包裹, 未见明显水肿和积液, 实验组切片显示材料已碎裂成多个小条状或小块状, 较多间充质细胞和结缔组织细胞充填, 有少量淋巴细胞聚集。未见明显新骨小梁形成, 免疫组化染色结果未见棕红色阳性区域。对照组大量纤维组织包裹, 有较多乳白色豆渣样物质生成, 切片镜下不同区域可见棕红色阳性染色。

### 3 讨论

生物衍生骨来源包括同种异体骨和异种骨<sup>[9]</sup>。目前以去抗原同种异体骨为支架复合种子细胞构建组织工程骨取得了令人鼓舞的成绩, 已初步试用于临床并取得较好效果<sup>[10]</sup>。尚存在问题: 同种异体骨获得程序复杂<sup>[11]</sup>, 社会伦理学制约<sup>[12]</sup>, 供体不足以及潜在的疾病传播<sup>[13]</sup>。因而异种骨支架材料的研究成为有意义的工作。动物骨均有相似的生物材料结构和造型, 较人工合成材料骨具有极好的细胞贴附性和细胞生长增殖环境<sup>[14]</sup>。但由于异种骨移植时种属间的抗原差异, 存在剧烈的免疫排斥反应, 骨组织相容性差, 关键问题是植入体内免疫问题<sup>[15]</sup>。如能克服免疫原性, 异种骨将会是一种经济、有效的组织

工程骨支架材料<sup>[16]</sup>。

刘玮等<sup>[17]</sup>研究了异种皮质骨抗原的分布, 发现抗原主要位于骨细胞和哈佛氏管内皮细胞上。松质骨无论是在结构上, 还是在组成成分上均与皮质骨存在着很大的差别, 抗原成分复杂<sup>[18]</sup>。松质骨由骨小梁构成, 在其疏松的网状孔隙结构中除含有丰富的骨细胞、成骨细胞、软骨细胞和软骨母细胞外, 还有大量的血细胞、骨髓造血细胞、以及血管内皮细胞、神经细胞等<sup>[19]</sup>。国内学者通过双PAP及免疫荧光染色方法研究松质骨抗原分布情况, 发现在骨小梁骨基质染色阴性, 而骨细胞、成骨细胞、软骨细胞、软骨母细胞以及骨陷窝等均有不同程度的阳性染色<sup>[20]</sup>。骨小梁间大量的血浆性成分和血细胞、骨髓造血细胞也表现出强烈的阳性染色, 在松质骨移植后的排斥反应中发挥作用<sup>[21]</sup>。骨胶原主要是I型胶原, 一般认为在种系间结构组成差异不大, 异种胶原能刺激宿主产生抗体, 但抗体的产生与移植排斥反应并无明确的肯定关系<sup>[22]</sup>。Frank等<sup>[23]</sup>认为这对成骨过程无影响, 仅为一种副现象。异种松质骨移植抗原的研究结果提示, 在处理异种松质骨的时候, 应彻底清除抗原性较强的各种细胞成分及血浆成分, 清洁骨陷窝壁, 选择性地保留抗原性相对较弱的网状骨基质结构<sup>[24]</sup>。

松质骨的最大特点是其疏松的网状孔隙结构<sup>[25]</sup>, 松质骨中有机质40%, 无机盐60%, 有机质中大约90%为胶原, 其余为氨基多糖、其他蛋白质、肽类及脂类。检测骨基质中羟脯氨酸、脯氨酸及芳香族氨基酸含量, 可特异地反映有机质中包括胶原蛋白在内的各种组成成分的变化。材料制备中氨基酸定量分析指导松质骨脱蛋白调控, 与以往方法相比能降低去免疫原的不确切性<sup>[26]</sup>, 并寻找到一个合适的脱蛋白时间点, 即去除免疫原同时最大程度保持脱蛋白松质骨力学性能, 这是本实验在思路与方法上创新性改进<sup>[27]</sup>。实验结果显示采用脱蛋白处理后的猪松质骨保持完整网架结构, 无细胞、神经、血管和嗜酸性染色物质。处理液中羟脯氨酸含量低微, 表明脱脂和脱蛋白处理对猪骨胶原破坏轻微, 对保持异种骨基质的天然状态无较大影响。新鲜松质骨氨基酸图谱中酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)和半胱氨酸(Cys)波峰等芳香族氨基酸含量较高, 而处理骨其波峰消失, 证明去抗原成分的有效性。

体内植入可以了解生物材料对机体直接作用, 通过生物材料与机体之间的相互作用以及材料的降解过程中产生物质是否引起排斥反应可以评价材料的组织相容性<sup>[28]</sup>。体液中T细胞亚群的分析作为判断生物材料移植后免疫状态具有重要意义。CD3分子是由五条肽链以非共价键组成的复合分子, 表达于所有成熟T细胞表面。CD3分子与T细胞抗原识别受体TCR组成复合受体分子, 是T细胞识别抗原的主要识别单位, 具有稳定的TCR分子结构和传递活化信号的作用。CD4是存在于大多数诱导T

细胞表面的糖蛋白, 为 MHC- II 类分子的受体, 调节 TCR/CD3 复合体功能。CD8 为 MHC- I 类分子的受体, 也具有调节 TCR/CD3 复合体功能。CD4、CD8 及其比值反映机体免疫状态, 是移植免疫检测的重要指标。CD28 是 T 细胞膜上重要的共刺激分子, 与其配基 APC 表达的 B7 分子相互作用产生 T 细胞活化必需的第二信号, 是检测免疫应答的又一重要指标。作者用流式细胞术对异种脱蛋白骨和新鲜松质骨植入前后不同时间点外周血 T 细胞亚群进行检测, 结果显示对照组术后各时间点 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup> 均高于异种脱蛋白骨组 ( $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup> 在第 14 天达最高峰值后开始下降, CD8<sup>+</sup> 第 28 天仍维持在较高水平, CD4<sup>+</sup> 与 CD8<sup>+</sup> 曲线变化不完全同步。实验组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup> 术后各时间点与术前相比基本保持一致水平, 4 组变化同步, 表明未引起明显免疫反应。

以往许多骨与软骨移植的动物实验或临床实验中观察到, 移植后的存活及功能与全身免疫反应相关性不完全一致<sup>[29]</sup>。这说明外周血或全身免疫反应并不能代表局部情况。实验材料植入第 4 周取材, 采用免疫酶组织染色技术研究异种脱蛋白骨的抗原性, 结果显示在异种脱蛋白骨材料周围肌肉组织无水肿、积液及坏死, 材料碎裂成多个小条状或小块状, 周围被较多间充质细胞等结缔组织细胞包围, 免疫组化染色没有棕红色阳性区域。对照组切片镜下可见大量淋巴细胞聚集, 不同区域可见棕红色阳性染色。这一对比结果也验证了经脱蛋白处理后异种松质骨低免疫原性, 植入体内后没有特异性抗体产生, 具有良好的组织相容性。

#### 4 参考文献

- [1] Yang ZM, Li YL, Xie HQ, et al. Zhonghua Zhengxing Waiké Zazhi. 2002; 18(1): 6-8.  
杨志明, 李彦林, 解慧琪, 等. 生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J]. 中华整形外科杂志, 2002, 18(1): 6-8.
- [2] Gao CY, Li QM, Jian YK, et al. Zhongguo Xuefu Zhongjian Waiké Zazhi. 2007; 21(2): 115-120.  
高春阳, 李起鸿, 简月奎, 等. 异种脱蛋白松质骨为载体构建的组织工程骨在脊柱横突间融合的实验观察[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(2): 115-120.
- [3] Devine SM. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? J Cell Biochem Suppl. 2002; 38(5): 73-79.
- [4] DAI F, Shi DW, He WF, et al. hCTLA4-Gene Modified Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells as Allogeneic Seed Cells in Bone Tissue Engineering. Tissue Eng. 2006; 12(9): 2583-2590.
- [5] Makino T, Hak DJ, Hazelwood SJ, et al. Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. J Orthop Res. 2005; 23(3): 632-638.
- [6] Luo ZJ, Hu YY, Wang X, et al. Zhonghua Guke Zazhi. 1997; 17(11): 714-716.  
罗卓荆, 胡蕴玉, 王茜, 等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸渍对牛松质骨力学特性的影响[J]. 中华骨科杂志, 1997, 17(11): 714-716.
- [7] Hu YK, An H, Cao BZ. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 1998; 14(5): 277-279.  
胡永康, 安洪, 曹本珍. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(5): 277-279.
- [8] Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. Exp Hematol. 2005; 33(2): 219-225.
- [9] Yang FC, Yang ZM, Zhou YT, et al. Zhonghua Shiyan Waiké Zazhi. 2004; 21(1): 12-14.  
阳富春, 杨志明, 周悦婷, 等. 猕猴组织工程骨异体植入修复骨缺损 T 淋巴细胞亚群检测[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(1): 12-14.
- [10] Shi HC, Zhou Q, Xu JZ. Zhonghua Chuangshang Guke Zazhi. 2006; 8(10): 974-976.  
施洪臣, 周强, 许建中. 组织工程中胶原支架材料的研究进展[J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(10): 974-976.
- [11] Li G, Gao CY, Jin LM. Construction of tissue-engineered bone using a xenogenic deproteinized bone scaffold for spinal intertransverse fusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 13(38): 7459-7463.
- [12] Sun G, Gao CY, Zhou B. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 13(29): 5719-5722.  
孙革, 高春阳, 周斌. 异种脱蛋白松质骨作为支架材料的性能分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(29): 5719-5722.
- [13] Gao CY, Sun G, Han DM. Zhongguo Jiaoxing Waiké Zazhi. 2009; 17(11): 854-857.  
高春阳, 孙革, 韩冬梅. 异种脱蛋白松质骨复合自体 MSCs 横突间成骨融合的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(11): 854-857.
- [14] Li G, Gao CY, Jin LM. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 13(12): 2217-2220.  
李罡, 高春阳, 金莲锦. 异种脱蛋白松质骨支架与经诱导骨髓间充质干细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(12): 2217-2220.
- [15] Gao CY, Sun G, Han DM. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 13(3): 475-480.  
高春阳, 孙革, 韩冬梅. 异种骨支架材料的研制及相关表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 475-480.
- [16] He QY, Li QH, Xu JZ. Immobilization of human articular chondrocytes and their characteristics. Tissue engineering. 2006; 12(4): 1123.
- [17] Liu W, Lu YP, Hu YY. Zhonghua Guke Zazhi. 1998; 9(1): 53-55.  
刘玮, 陆裕朴, 胡蕴玉. 异种骨支架抗原的免疫组织化学实验研究[J]. 中华骨科杂志. 1998, 9(1): 53-55.
- [18] He QY, Li QH, Yang L, et al. Immobilization of human articular chondrocytes and induction of their phenotype. Chin Med J. 2003; 116(9): 1351-1356.
- [19] He QY, Li QH, Chen BL, Xu JZ. Repair flexor tendon defects of rabbit with tissue engineering method. Chinese J Traumatology. 2002; 5(3): 1-9.
- [20] Gamradt SC, Lieberman JR, et al. Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. Clin Orthop Relat Res. 2008; (417): 183-94.
- [21] Luo ZJ, Hu YY, Wang Q. Zhongguo Jiaoxing Waiké Zazhi. 1998; 5(6): 539-541.  
罗卓荆, 胡蕴玉, 王茜. 异种松质骨移植抗原分布的免疫学组化研究[J]. 中国矫形外科杂志, 1998, 5(6): 539-541.
- [22] Savolainen S, Usenius JP, Hermesniemi J, et al. Iliac crest versus artificial bone graft in 250 cervical fusion. Acta Neurochir. 1994; 129(1-2): 54.
- [23] Frank O, Heim M, Jakob M, et al. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. J Cell Biochem. 2007; 85(4): 737-746.
- [24] Zhang XY, Liu XY, Ge BF. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008; 12(27): 5214-5220.  
张旭元, 刘兴炎, 葛宝丰. 异种脱蛋白松质骨复合纤维蛋白及骨形态发生蛋白修复兔桡骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(27): 5214-5220.
- [25] Hollinger JO, Schmitz JP, Mark DE. Osseous would healing with xenogenic bone implants with a biodegradable carrier. Surg. 2007; 105: 150-162.
- [26] Ekelund A, Aspenburg P, Nilsson O. No effect of immunosuppression with cyclosporin. A detected on bone ingrowth into cancellous allo and xenografts in the rat. Acta Orthop scand. 2009; 70: 466-491.
- [27] Yang LL, Dai JX, Cui TT, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007; 11(44): 2217-2220.  
杨林林, 戴景星, 崔甜甜, 等. 猪源性异种骨支架材料的生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(44): 2217-2220.
- [28] Wang ZG, Liu J, Hu YY. Binzhou Xueyuan Xuebao. 2007; 30(1): 25-28.  
王志刚, 刘建, 胡蕴玉. 重组异种骨植骨的临床安全性研究[J]. 滨州医学院学报, 2007, 30(1): 25-28.
- [29] Chen KJ, Wang DJ, Jiang YB. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2009; 4: 17-19.  
陈克家, 王德就, 蒋亚斌. 深低温处理对异种骨-髓髓-骨移植排斥反应的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 4: 17-19.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 牡丹江医学院科研立项(2010-27)。

**作者贡献:** 实验设计、实施为第一作者, 评估为第二、三、四作者。双盲法评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。