

数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的致敏实验

林山¹, 黄晓梅^{2,3}, 芮钢¹, 尹庆水⁴, 尤元璋¹ (¹厦门大学附属第一医院骨科, 福建省厦门市 361003; ²漳州职业技术学院食品与生物工程系, 福建省漳州市 363000; ³中国科学院城市环境研究所, 城市生态健康与环境安全研究中心, 福建省厦门市 361021; ⁴解放军广州军区广州总医院, 全军创伤骨科中心, 广东省广州市 510010)

文章亮点:

1 前期研究成功制备了数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料, 并通过实验证实其加工精度为+0.1 cm, 抗压强度为 1.04-3.70 MPa, 具备微孔样结构, 孔与孔之间纵横交错, 孔径为 150-350 μm, 其理化、结构性能和力学性能优越, 具有作为个性化人工骨材料的应用潜力。

2 实验创新性选择最大剂量致敏实验法对数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架进行致敏实验, 发现数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架在致敏方面具有生物安全性。

关键词:

生物材料; 骨生物材料; 珊瑚羟基磷灰石; 左旋-聚乳酸; 快速成形; 骨组织工程; 生物相容性; 福建省自然科学基金

主题词:

羟基磷灰石类; 组织工程; 免疫法

基金资助:

福建省自然科学基金青年创新项目(2013D013); 福建省教育厅科技项目(JA12416); 漳州职业技术学院院级科研项目(ZZY1204)

摘要

背景: 前期实验成功制备了数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料, 并通过实验证实其具有骨组织工程支架材料必需的理化性能。

目的: 评价数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的致敏性。

方法: 将 32 只白化豚鼠随机分为 4 组, 每组 8 只; 实验组分别采用质量比为 3:1 或 4:1 原料制备的数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架浸提液, 阳性对照组采用体积分数为 5% 甲醛溶液, 阴性对照组采用生理盐水。根据《GB-T 16886.10-2005 医疗器械生物学评价第 10 部分刺激与迟发型超敏反应试验》最大剂量致敏试验步骤进行皮内诱导、局部诱导和激发。激发阶段去除贴附物后 24、48 h 豚鼠皮肤反应按 Magnusson 和 Kligman 等级进行分级。激发阶段去除贴附物后 48 h 后对皮肤进行活检, 行苏木精-伊红染色和光镜下观察。

结果与结论: 阴性对照组和质量比为 3:1 或 4:1 原料制备的数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架浸提液组激发阶段去除贴附物后 24、48 h 皮肤无致敏反应, 而阳性对照组在这任一时间点均有中度以上红斑。活检皮肤光镜下实验组未见皮肤水肿, 皮肤棘细胞层水肿, 血管周围、弥漫的真皮和表皮单核细胞浸润, 见散在少量的嗜碱性细胞。说明质量比为 3:1 或 4:1 原料制备的数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架在致敏方面具有生物安全性。

林山, 黄晓梅, 芮钢, 尹庆水, 尤元璋. 数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的致敏实验[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(25):3961-3965.

Sensitization test of the digital coralline hydroxyapatite artificial bone scaffold at the maximal dosage

Lin Shan¹, Huang Xiao-mei^{2,3}, Rui Gang¹, Yin Qing-shui⁴, You Yuan-zhang¹ (¹Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China; ²Department of Food and Biological Engineering, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China; ³Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, Fujian Province, China; ⁴Orthopedic Trauma Center of PLA, General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: We have successfully prepared digital coralline hydroxyapatite artificial bone scaffold in previous experiments, and it has been confirmed that it has the necessary physical and chemical properties of bone tissue engineering scaffolds.

OBJECTIVE: To evaluate the sensitization of digital coralline hydroxyapatite artificial bone scaffold.

METHODS: A total of 32 guinea pigs were randomly divided into saline group (negative control group, $n=8$), 5% formaldehyde group (positive control group, $n=8$), experimental A group (the mass ratio of 3:1, $n=8$), and experimental B group (the mass ratio of 4:1, $n=8$). Sensitization test at the maximal dosage was performed

林山, 男, 1981 年生, 福建省莆田市人, 汉族, 主治医师, 2011 年南方医科大学毕业, 博士, 主要从事骨组织工程与数字骨科研究。

通讯作者: 林山, 厦门大学附属第一医院骨科, 福建省厦门市 361003

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.25.005

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)25-03961-05

稿件接受:2014-04-30

Lin Shan, M.D., Attending physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Corresponding author: Lin Shan, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Accepted: 2014-04-30

according to *Biological Evaluation of Medical Devices-Part 10: Tests for Irritation and Delayed-Type Hypersensitivity*, including intracutaneous induction, local induction, and provocation. Patch was removed after 24 and 48 hours, and the skin response was classified according to Magnusson and Kligman criteria. Patch was removed after 48 hours, and the skin was performed with biopsy, stained with hematoxylin-eosin, and observed under optical microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Sensitization response was not tested in the negative control group, experimental A group and experimental B group at 24 and 48 hours after patch removal; however, moderate erythema was observed in the positive control group. Optical microscope demonstrated that spongiosis, edema, diffuse or perivascular mononuclear infiltration was not observed, and only a small number of basicytes were seen in the experimental A and B groups. These findings indicate that the digital coral hydroxyapatite artificial bone scaffolds, with the mass ratio of 3:1 and 4:1, are biologically safe for sensitization.

Subject headings: hydroxyapatites; tissue engineering; immunization

Funding: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2013D013; the Science and Technology Projects of Fujian Educational Bureau, No. JA12416; the Scientific Research Project of Zhangzhou Institute of Technology, No. ZZY1204

Lin S, Huang XM, Rui G, Yin QS, You YZ. Sensitization test of the digital coralline hydroxyapatite artificial bone scaffold at the maximal dosage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(25):3961-3965.

0 引言 Introduction

由于创伤、感染、肿瘤或发育异常等原因造成的骨缺损一直是困扰临床的一大难题, 绝大多数的骨缺损由于间隙大, 且有些骨缺损解剖结构复杂, 成骨细胞难以爬过间隙而不能正常愈合, 最终形成骨不连, 影响肢体功能。目前临床上骨缺损的修复材料主要采用自体骨、异体骨或组织工程骨等。自体骨移植无免疫反应, 但取骨部位增加创伤, 容易残留慢性疼痛且取骨量有限, 其尺寸和形状也常常受到限制。异体骨虽然能提供足量不同形状尺寸的皮质骨或松质骨, 但容易引起免疫反应, 且在骨缺损边缘与宿主骨的愈合速度较慢, 有传染病毒性疾病的危险, 而且制样、处理和存贮的成本很高, 很难制造出与骨骼相匹配的外形轮廓, 其应用也受到很大限制^[1-3]。

为了克服这些缺点, 人们开始寻找新的骨替代材料, 近10多年来发展起来的骨组织工程学, 为骨缺损的修复开辟了新的渠道, 特别是快速成型技术在该领域的应用, 开辟了数字化组织工程骨修复复杂解剖结构骨缺损的新途径。使用计算机辅助下的快速成型技术, 可以制造任意复杂形状的三维实体, 可以为骨组织工程支架的仿形制造提供可能, 它有效结合计算机辅助设计(computer aided design, CAD)技术, 根据骨缺损的三维形态个性化地制造出人工骨支架^[4-7]。

本课题组将珊瑚羟基磷灰石粉碎后, 按照一定的质量比与左旋-聚乳酸混合均匀后作为原料, 采用CAD相关技术制作骨块的数字化模型, 并将数据导入快速成型机中, 采用选择性激光烧结的快速成型工艺, 成功制备出了数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料^[8], 并已通过实验证实其加工精度为 ± 0.1 cm, 抗压强度为1.04-3.70 MPa, 具备微孔样结构, 孔与孔之间纵横交错, 孔径为150-350 μ m, 其理化、结构性能和力学性能优越, 具有作为个性化人工骨材料的应用潜力^[8-10]。

数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料的研制, 是临床医学、生物化学与分子生物学、计算机工程学等多学科

共同参与的研究, 其充分保留和利用珊瑚天然的微孔样结构, 一次成型, 个性化制备出骨缺损修复的支架材料, 避免了人工骨支架二期制孔的烦琐工艺, 可为骨科、矫型外科、颅颌骨外科、美容外科和口腔外科等复杂解剖结构的骨修复提供一种新型的可降解性人工骨支架材料, 但能否成为骨组织工程支架尚需对其生物学进行评价。

参照“GB/T 16886.1-2001医疗器械生物学评价: 评价与试验”中的规定, 数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料属于与骨接触持久器械^[11-12], 因此实验以白化豚鼠为实验对象, 对数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料进行致敏反应实验, 以评价数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料的生物安全性, 为进一步研究提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 动物体内观察实验。

时间及地点: 于2013年9月至12月在厦门大学附属第一医院医学实验科完成。

材料:

主要试剂与仪器: 珊瑚羟基磷灰石(广东省骨科矫形技术及植入材料重点实验室); 左旋-聚乳酸(医药级, 粒径 ≤ 300 μ m); 氟氏完全佐剂(美国Sigma公司); 5%甲醛溶液(广州化学试剂厂); 10%十二烷基硫酸钠石蜡液(上海美季生物技术有限公司)。

实验动物及分组: 健康白化豚鼠32只, 购自广东省实验动物中心, 许可证号SCXK(粤)2008-0002, 雌雄不拘, 体质量250-350 g, 随机分为实验1组(质量比为3:1)、实验2组(质量比为4:1)、阴性对照组和阳性对照组, 每组各8只。

实验方法:

数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的制备: 将珊瑚羟基磷灰石与左旋-聚乳酸分别按照3:1(实验1组)和4:1(实验2组)的质量比混合均匀后备用。采用Simpleware 3.1 软件, 构建一高为1.5 cm, 直径为0.5 cm的CAD实体圆柱形数字

模型, 通过数控转换, 将数据传到AFS快速自动成型机中, 采用选择性激光烧结的工艺, 在一定的激光参数下(已申请发明专利), 分别对不同质量比且混合均匀的原料进行选择性的烧结堆积成型, 每组制备3块。

材料浸提液的制备: 参照GB-T 16886.5-2003及美国药典的规定^[6], 实验的浸提介质采用生理盐水, 每2 g样品加20 mL浸提介质, 37 °C下浸提72 h, 用0.2 μm微孔滤膜过滤除菌, 分别制备出实验1、2组的浸提液。然后密封于无菌瓶, 置于4 °C冰箱中备用。阴性对照采用生理盐水; 阳性对照采用体积分数5%甲醛溶液。

致敏过程:

皮内诱导阶段: 在实验前1 d采用电动剃毛器将32只豚鼠颈背部的毛剔除干净, 注意避免损伤动物皮肤, 按图1A所示, 将颈背部去毛区中线两侧划定3个对称点, 各点间距1.5 cm, 各对间距2.5 cm, 常规消毒后, 在每点皮内注射0.1 mL下述溶液, 注射好的豚鼠颈背部的情况见图1B。

实验1、2组: ①A点液: 体积比为50:50的FCA与生理盐水混合物。②B点液: 材料浸提液。③C点液: 将B中的材料浸提液与A中配置的乳化剂以50:50体积比例混合后的乳浊液。

阴性对照组: ①A点液: 体积比为50:50的FCA与生理盐水混合物。②B点液: 生理盐水。③C点液: 生理盐水与A中配置的乳化剂以50:50体积比混合后的乳浊液。

阳性对照组: ①A点液: 体积比为50:50的FCA与生理盐水混合物。②B点液: 体积分数5%甲醛溶液。③C点液: 体积分数5%甲醛溶液与A中配置的乳化剂以50:50体积比混合后的乳浊液。

局部诱导阶段: 在皮内诱导后第6天, 各注射点采用10%十二烷基硫酸钠石蜡液, 按摩导入皮肤。

24 h后, 各组于20 mm×40 mm滤纸片上加0.5 mL相应的B点液, 局部贴敷于各组豚鼠的诱导注射点, 在涂抹了受试物的皮肤上覆盖上一层滤纸, 并于滤纸上覆盖一层塑料薄膜防止受试物挥发, 使用3M胶布将斑贴缠绕固定48 h。缠绕豚鼠时的松紧应以不影响豚鼠活动且斑贴不会脱落为宜。

激发阶段: 在局部诱导实验第13天, 用电动剃毛器剃除每只豚鼠腹部被毛, 范围40 mm×60 mm。

剃毛24 h后, 按照局部诱导阶段制备C点液的滤纸片贴敷于各组豚鼠侧腹部去毛区, 于滤纸上覆盖一层塑料薄膜防止受试物挥发, 使用3M胶布将斑贴缠绕固定24 h。缠绕豚鼠时的松紧应以不影响豚鼠活动且斑贴不会脱落为宜。

主要观察指标:

大体观察评分: 激发阶段结束后24、48 h观察各组动物腹部激发部位皮肤致敏情况, 参照Magnusson和Kligman分级表对观察点皮肤反应进行评分^[13-15], 整个实验的评价由同一工作人员, 采用单盲法完成。

Magnusson和Kligman分级标准:

敷贴实验反应	等级
无明显改变	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和水肿	3

并按照以下公式计算平均反应值:

$$\begin{aligned} \text{致敏率} &= \text{红斑或水肿动物数} / \text{该组动物数} \\ \text{平均反应值} &= \sum(\text{等级评分}) / \text{该组动物数} \\ \text{皮肤等级评分为} &1 \text{ 及以上为致敏动物。} \end{aligned}$$

组织学评价: 激发阶段结束后48 h切下豚鼠腹部全层皮肤组织, 于体积分数10%中性甲醛固定12 h以上, 石蜡包埋后行苏木精-伊红染色, 进行组织形态学观察。阳性反应的标准是皮肤棘细胞层水肿, 血管周围真皮和表皮单核细胞浸润。

结果评价: 阴性对照组动物Magnusson和Kligman分级小于1级, 而各组中如记分大于或等于1级时一般提示致敏; 如阴性对照组动物记分大或等于1级时, 各组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 在实验进程中, 参加实验的32只豚鼠均无死亡, 均进入结果分析。

2.2 大体观察评分结果 实验1组、实验2组和阴性对照组于24 h和48 h后均未出现红斑和水肿反应(图2A-C); 阳性对照组24 h出现皮肤发红、水肿反应(图2D), 48 h时阳性对照组出现皮肤红斑加重且水肿皮肤破溃结痂(图3)。除去贴敷物24 h和48 h后, 贴敷区皮肤的红斑和水吸反应等级状况, 见表1。实验两组致敏反应记分均为0分, 阴性对照组的致敏反应记分也为0分。而阳性对照组可见明显致敏。因此, 数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架材料无致敏性。

2.3 组织学评价结果 斑片去除后48 h, 豚鼠腹部全层皮肤组织切片, 分别行苏木精-伊红染色后显示: 实验1组、实验2组和阴性对照组一致, 均未见棘细胞层水肿, 血管周围真皮及表皮无弥漫的单核细胞浸润(图4A-C)。阳性对照组中可见皮肤棘细胞层水肿, 血管周围真皮及表皮弥漫的单核细胞浸润, 见较多嗜碱性细胞(图4D)。

3 讨论 Discussion

珊瑚羟基磷灰石是由天然珊瑚通过“水热反应”生成的珊瑚羟基磷灰石, 其保留了天然珊瑚的多孔结构, 具有较大的孔径、较高的孔隙率和孔隙通过率, 生物相容性好, 大量文献表明珊瑚羟基磷灰石为一类较为理想的骨组织工程支架材料^[15-21]。左旋-聚乳酸是一种在医学上已被广泛应用的人工合成高分子材料, 作为植入物已经通过FDA认证, 并已被广泛用于骨板、骨钉、手术缝合线、纺丝等。本实

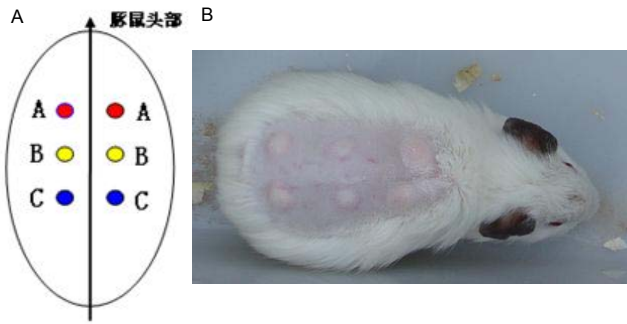


图1 豚鼠皮内诱导注射点示意图及豚鼠颈背部皮内注射完皮内诱导液
Figure 1 Diagram of the intradermal injection sites of guinea pigs as well as after intradermal injection of intradermal induction medium to the neck back of the guinea pigs

图注: 图中A 豚鼠皮内诱导注射点示意图, B 为豚鼠颈背部皮内注射完皮内诱导液。

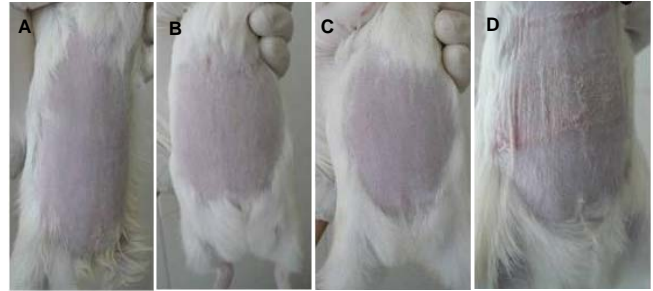


图2 各组白化豚鼠皮内致敏实验激发诱导 24 h 的腹部皮肤反应
Figure 2 Abdominal skin reactions in each group at 24 hours after sensitization test

图注: ①图中 A-D 分别实验 1 组、实验组 2 组、阴性对照组与阳性对照组。②实验 1 组、实验 2 组和阴性对照组未出现红斑和水肿反应; 阳性对照组出现皮肤发红、水肿反应。

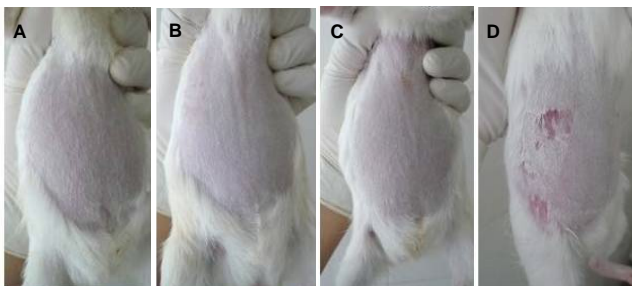


图3 各组白化豚鼠皮内致敏实验激发诱导 48 h 的腹部皮肤反应
Figure 3 Abdominal skin reactions in each group at 48 hours after sensitization test

图注: ①图中 A-D 分别为实验 1 组、实验组 2 组、阴性对照组与阳性对照组。②实验 1 组、实验 2 组和阴性对照组未出现红斑和水肿反应; 阳性对照组出现皮肤红斑加重且水肿皮肤破溃结痂。

表 1 各组致敏状况测定结果

Table 1 Results of sensitization test in each group (n=8)

组别	致敏率(%)		平均反应值	
	24 h	48 h	24 h	48 h
实验 1 组	0	0	0	0
实验 2 组	0	0	0	0
阴性对照组	0	0	0	0
阳性对照组	100	100	1.6	2.9

表注: 实验两组致敏反应记分均为 0 分, 阴性对照组的致敏反应记分也为 0 分, 阳性对照组可见明显致敏。

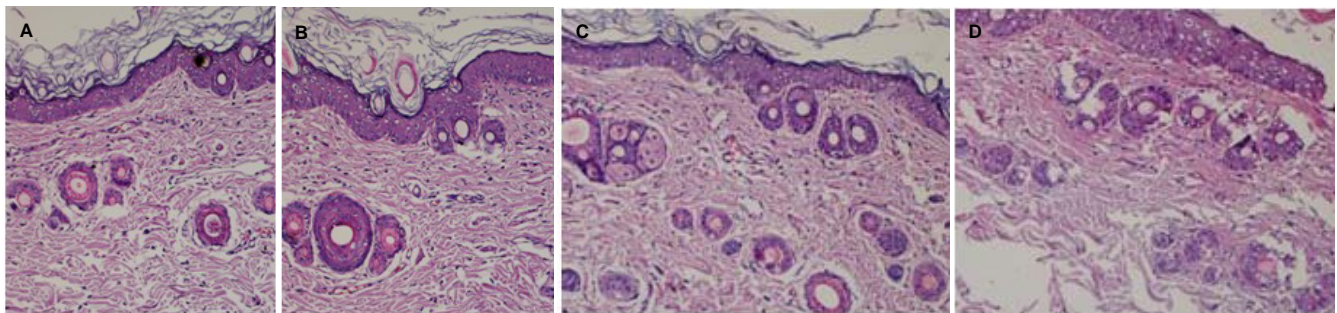


图4 各组白化豚鼠皮内致敏实验激发诱导 48 h 后的腹部皮肤组织苏木精-伊红染色(×200)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of the abdominal skin in each group at 48 hours after sensitization test (×200)

图注: ①图中 A-D 分别为实验 1 组、实验组 2 组、阴性对照组与阳性对照组。②实验 1 组、实验 2 组和阴性对照组一致, 均未见棘细胞层水肿, 血管周围真皮及表皮无弥漫的单核细胞浸润。阳性对照组中可见皮肤棘细胞层水肿, 血管周围真皮及表皮弥漫的单核细胞浸润, 见较多嗜碱性细胞。

验以珊瑚羟基磷灰石为主要原料, 采用左旋-聚乳酸为黏合剂, 通过数字骨科的相关技术构建数字化骨块模型, 并通过快速成型技术, 一次成型, 个性化制备出骨缺损修复的支架材料, 其充分保留和利用珊瑚天然的微孔样结构, 避免了人工骨支架材料二期制孔的烦琐二艺, 有望为骨科、矫形外科等复杂解剖结构的大段骨缺损修复提供一种新型的可降解性人工骨支架材料, 具有良好的科学意义和应用前景。

任何医用材料在应用于人体之前都必须经过严格的生物相容性检验, 以确保医用材料的使用安全性。生物相容

性是指医用材料植入人体后, 与人体之间相互作用产生各种复杂的生物、化学和物理反应, 以及人体对这些反应的忍受程度。Magnusson等^[13, 22-27]于1969年提出的最大剂量致敏实验是最敏感的致敏实验, 其在实验中加入了氟氏完全佐剂, 使豚鼠的致敏能力加强, 显著提高了实验在筛选接触性致敏原的能力, 特别是弱致敏原的能力, 使最大剂量致敏实验法在生物学评价中得到了广泛应用。对于骨组织工程支架材料, 生物安全性要求相对严格, 因此, 本实验选择最大剂量致敏实验法对数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架浸提液进行最大剂量实验, 评价其致敏性。

阳性对照组中持续的红斑、水肿反应, 48 h时皮肤红斑加重, 水肿皮肤破溃结痂提示致敏原可诱发100%的豚鼠致敏。而阴性对照组和实验组的阴性结果显示数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架浸提液没有致敏性。

在本实验中, 阳性对照组活体镜下见管周围真皮和表皮弥漫的单核细胞浸润, 见较多嗜碱性细胞, 因此, 本实验设计能可靠引发实验性过敏反应^[28]。与阳性对照组相比, 实验组和阴性对照组的动物皮肤活检中, 两者表现一致, 均无过敏反应表现。

本实验显示质量比为3:1或4:1的原料制备的数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨支架没有皮肤致敏性, 从致敏性来说, 它适合作为肌肉骨骼植入材料, 但其作为骨组织工程支架的其他生物学性能尚需进一步评价。

致谢: 感谢解放军广州军区总医院和广东省骨科矫形技术及植入材料重点实验室对本研究的支持和帮助。

作者贡献: 第一、二作者进行实验设计、实施, 资料收集、实验评估; 第一、二作者负责成文; 第三、四、五作者负责审核; 第一、二作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验经厦门大学附属第一医院实验动物伦理委员会审查, 符合国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》、卫生部发布的《医学实验动物管理实施细则》、《厦门大学附属第一医院实验动物伦理委员会工作条例》等有关章程。

学术术语: 珊瑚羟基磷灰石-是由天然珊瑚通过“水热反应”生成的珊瑚羟基磷灰石, 其保留了天然珊瑚的多孔结构, 具有较大的孔径、较高的孔隙率和孔隙交通率, 生物相容性好。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Hirokazu K, Takaaki T, Masaaki C, et al. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of beta-tricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2. *Biomaterials*. 2006;27(29):5118-5126.
- [2] Boos AM, Arkudas A, Kneser U, et al. Bone tissue engineering for bone defect therapy. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 2010; 42(6):360-368.
- [3] Horner EA, Kirkham J, Wood D, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010; 16(2):263-271.
- [4] Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud M. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol*. 2004;22(7): 354-362.
- [5] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005;4:518-524.
- [6] Duan B, Wang M, Zhou WY, et al. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2010; 6(12):4495-4505.
- [7] Zhang Y, Hao L, Savalani MM, et al. In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-reinforced polymeric composites manufactured by selective laser sintering. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91(4):1018-1027.
- [8] 林山, 尹庆水, 张余, 等. 数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的制备及性能研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18(24):2082-2086.
- [9] 林山, 尹庆水, 张余, 等. 数字化珊瑚羟基磷灰石人工骨的研制及体外细胞毒性研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2011, 26(2): 121-124.
- [10] 朱辉, 尹庆水, 张余, 等. 数字化载银羟基磷灰石 / 聚乳酸人工骨的制备及细胞毒实验[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(23):4188-4190.
- [11] Wang X, Wang KL, You SH, et al. GB/T 16886.1-2001 Yiliao Qixie Shengwuxue Pingjia: Diyi Bufen: Pingjia yu Shiyuan[P]. 2001:21-33.
- [12] 王昕, 王利钻, 由少华, 等. GB/T 16886.1-2001医疗器械生物学评价:第1部分:评价与试验[P]. 2001:21-33.
- [13] Magnusson B, Kligman AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*. 1969;52(3):268-276.
- [14] You SH, Qian CY, Zhu XT, et al. GB/T 16886.10-2005 Yiliao Qixie Shengwuxue Pingjia Dishibufen: Ciji yu Chifaxing Chaomin Fanying Shiyuan[P]. 2005: 1-39.
- [15] 陈富林, 毛天球, 杨维东, 等. 培养成骨细胞接种于天然珊瑚中再造骨组织的研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15(5):386.
- [16] 陈富林, 毛天球, 羊书勇, 等. 骨髓基质干细胞接种于珊瑚修复兔颅骨缺损的实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2001, 17(1):57.
- [17] 尹庆水, 张余, 李兆麟, 等. 复合珊瑚羟基磷灰石人工骨的研制和临床应用[J]. *骨与关节损伤杂志*, 2003, 18(3):147-149.
- [18] 尹庆水, 张余, 李兆麟, 等. 复合珊瑚羟基磷灰石人工骨的研制及其成骨效应[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2004, 6(1):92-94, 102.
- [19] Dodds RA, York-Ely AM, Zhukauskas R, et al. Biomechanical and radiographic comparison of demineralized bone matrix, and a coralline hydroxyapatite in a rabbit spinal fusion model. *J Biomater Appl*. 2010;25(3):195-215.
- [20] Wasielewski RC, Sheridan KC, Lubbers MA. Coralline hydroxyapatite in complex acetabular reconstruction. *Orthopedics*. 2008;31(4):367.
- [21] 程晓兵, 薛振恂, 周树夏, 等. 多孔块状β-磷酸三钙陶瓷兔颅骨骨膜下埋植可吸收性的定量研究[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(2):189.
- [22] 由少华, 钱承玉, 朱雪涛, 等. GB/T 16886.10-2005医疗器械生物学评价:第10部分:刺激与迟发型超敏反应试验[P]. 2005:1-39.
- [23] 吴平, 刘秦玉, 由少华, 等. GB-T 16886.1-2001 医疗器械生物学评价:第1部分评价与试验[M]. 第二修订版. 国家药品监督管理局, 济南医疗器械质量监督检验中心. 2001:304-309.
- [24] Sato Y, Katsumura Y, Ichikawa H, et al. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis*. 1981;7(5):225-237.
- [25] Turk JL, Polák L. Experimental studies on metal dermatitis in guinea pigs. *G Ital Dermatol Minerva Dermatol*. 1969;44(9): 426-430.
- [26] OECD. Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe. In: Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates. OECD. 1993;480:179-185.
- [27] ISO. ISO10993-10: Tests for irritation and sensitization. In: International Standard 10993-10:1995 (E), Biological evaluation of medical devices. 1995.
- [28] Dvorak HF, Dvorak AM, Simpson BA, et al. Cutaneous basophil hypersensitivity. II. A light and electron microscopic description. *J Exp Med*. 1970;132(3):558-582.