

蒋学泉, 张文云, 李娜, 等. 树鼩背部肌肉植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 466 - 472.

Jiang XQ, Zhang WY, Li N, et al. Biological properties of porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscle of tree shrew [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 466 - 472.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.007

树鼩背部肌肉植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能

蒋学泉¹, 张文云^{1*}, 李娜², 何武书¹, 和丽佳¹, 袁艳波¹

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院口腔科 昆明 650032;

2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 初步探讨多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能。方法 选用树鼩 15 只, 雌雄不限, 每只背部肌肉均植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO、Bio-Oss 骨粉、ATLANTIK 人工骨、国产金世植骨灵人工骨, 多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 为实验组, 其余为对照组。术后进行动物大体观察及手术部位观察, 4 周、8 周、12 周每次随机抽取 4 只动物处死, 进行埋植部位肌肉组织病理学观察、碱性磷酸酶活性 (ALP) 及钙含量测定。结果 HE 染色显示实验 HAPw/n-ZnO 组与各对照组肌间质内均可见钙化灶, 实验组肌肉可见炎症细胞明显聚集; Masson 染色显示实验组与各对照组植入材料周边均可见绿染的胶原纤维; 碱性磷酸酶活性及钙含量测定实验组与金世植骨灵组及 Bio-Oss 骨粉组的差异有统计学意义, 金世植骨灵组及 Bio-Oss 骨粉组优于实验组, 与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义。结论 多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 在植入树鼩背部肌肉后有成骨活性但未异位成骨, 且引起炎症反应。

【关键词】 HAPw/n-ZnO 复合材料; 异位成骨; 生物活性; 炎症反应; 树鼩

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0466-07

Biological properties of porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscle of tree shrew

JIANG Xuequan¹, ZHANG Wenyun^{1*}, LI Na², HE Wushu¹, HE Lijia¹, YUAN Yanbo¹

(1. Department of Stomatology, the 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China.

2. Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118)

Corresponding author: ZHANG Wenyun. E-mail: wenyunzh88@126.com

【Abstract】 Objective To explore the biological properties of the porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscles of tree shrew. **Methods** Fifteen healthy 12-month old male and female tree shrews were selected, and each of the back muscles were implanted with porous composite materials, including HAPw/n-ZnO, bio-oss bone powder, ATLANTIK artificial bone, and domestic product Jinshi Zhiguling artificial bone. Four animals were randomly sacrificed at 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks after surgery, and the gross observation, histopathological examination, alkaline phosphatase activity (ALP), and calcium content were determined. **Results** The pathological examination using

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81260272); 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81260272), Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program (2017HC019).

【作者简介】 蒋学泉 (1987—), 男, 医师, 硕士。Email: 352364866@qq.com

【通信作者】 张文云 (1970—), 男, 教授, 主任医师。主要从事牙科美容修复与材料研究。Email: wenyunzh88@126.com

HE staining revealed calcification in the muscle tissues in both of HAPw/n-ZnO and control groups. Obvious inflammatory cell infiltration in the muscle tissues was seen in the experimental group. Masson staining showed green-stained collagen fibers around the implanted material in both the experimental and control groups. There were significant differences in the alkaline phosphatase activities and calcium concentration among the experimental, Jinshi Zhiguling artificial bone, and Bio-Oss groups. The result of Jinshi Zhiguling artificial bone and Bio-Oss groups were better than the experimental group, and there were no significant differences compared with that of ATLANTIK artificial bone group. **Conclusions** The four kinds of materials have osteogenic activity in the back muscle of tree shrews, with no heterotopic osteogenesis, and induce inflammatory reaction.

【Keywords】 HAPw/n-ZnO porous composite material; ectopic osteogenesis; biological activity; inflammatory reaction; tree shrew

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

因外伤、肿瘤、牙周病及长期缺失牙等原因造成的颌面部骨缺损,严重影响患者的功能、外形和生活质量,需要通过植骨术来修复重建骨缺损^[1]。然而常常因植骨术后继发感染而导致失败,如何在彻底控制感染的同时促进骨质的生长愈合,成为目前研究的热点^[2]。Ripamonti 等^[3]发现 Ca.P 生物材料植入实验动物非骨部位的 HA 表面形成了类骨质,但以树鼯作为人工骨材料的实验动物目前还未见报道。本课题组前期制备得到多孔复合材料 HAPw/n-ZnO,实验证明该复合材料有优良的抗菌能力和一定的成骨能力。本实验将多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入树鼯背部肌肉内并通过大体观察、组织病理学等检测分析多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的生物学性能,为构建新型抗菌骨修复材料提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 12 月龄清洁级树鼯 15 只,雌雄不限,体重 120~140 g,无背部疾患,由中国医学科学院医学生物学研究所【SCXK(滇)K2013-0001】提供,在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SYXK(滇)K2013-0001】完成动物实验。实验方案获得中国人民解放军第九二〇医院伦理委员会通过(2016009)。

1.1.2 试剂与仪器

多孔复合材料 HAPw/n-ZnO(自制于昆明理工大学生物材料实验室)、Bio-Oss 骨粉(瑞士 Geistlich 集团)、法国 ATLANTIK 人工骨(法国),金氏植骨灵(中国)ALP 试剂盒、Masson 染色试剂及苏木精-伊红染液均来自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的构建

将所有骨修复材料用⁶⁰Co 照射消毒,手术器械进行高温高压消毒,备用。树鼯术前 12 h 常规禁食,背部术区备皮,用质量浓度为 6 g/L 的戊巴比妥钠经肌肉注射 0.1 mL 麻醉,背部棘突正中 5 cm 长皮肤切口,切开皮肤及皮下组织,暴露肌肉组织,于背部肌间隙内以止血钳钝性分离,制成双侧背部肌袋模型,每侧两个肌袋,前后共四个肌袋,每个肌袋间前后距离 6 cm,左右距离 2.5 cm。分别植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO、Bio-Oss 骨粉、ATLANTIK 人工骨和金世植骨灵各 0.1 mL。人工骨材料植入后逐层缝合肌层及皮肤,缝合皮肤后碘伏消毒,术后常规分笼饲养。术后处理:(1)每只树鼯肌肉注射青霉素(10 万 U/d),1 次/d,共 3 d;(2)术后进软食,10 d 后拆线;(3)定期观察动物状态及伤口愈合情况。

1.2.2 实验分组

以四个不同的植入位点分为四组,多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 组为实验组,其余三组为平行对照组。

1.2.3 标本处理

分别于术后 4、8、12 周行质量浓度为 6 g/L 戊巴比妥钠 1 mL 麻醉后牺牲 4 只树鼯。待树鼯心跳停止后,将其固定在手术台上,沿原手术入路切开皮肤,将植入材料及包裹材料的肌肉组织一并取出,取出部位肌肉大小为边长 1 cm 方形,厚度约 0.5 cm。取出后行大体观察,剖开后一部分置入 4% 的甲醛中固定 48 h,一部分行碱性磷酸活性及钙含量测定,行碱性磷酸活性及钙含量测定时随机取一块大小相同的大腿部正常肌肉组织作为空白对照组。剩余树鼯继续按同等条件饲养。

1.2.4 组织学观察

不同时期处死的标本固定完成并修整标本块后通过脱钙、流水冲洗、脱水透明、浸蜡包埋。然后以植入材料区域为中心做矢状面组织切片,切片厚 5 μm , 分别行 HE 染色和 Masson 三色染色,二甲苯透明中性树胶封固,光镜下观察。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定

取约 0.2 g 标本组织称重后,加入 1 mL 去离子水研磨成匀浆,吸入离心管中,用 1 mL 去离子水洗匀浆 2 次,均吸入同离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min (12 000 r/min),加细胞裂解液破膜。按 ALP 试剂盒进行检测,于 520 nm 波长处测定吸光度,并按其提供公式计算各管中计算单位质量标本组织 ALP 活性 (kat/g)。

1.2.6 钙含量测定

将植入物周围组织的去上清离心沉淀物用盐酸消化,用原子吸收分光光度计测定钙含量,以标本湿重 (mg) 为除数,得出单位重量标本含钙量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重组织)。

1.3 统计学方法

全部数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,各组间样本均数差异比较采用单因素方差检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察结果

所有实验动物术后同一条件下分笼饲养,其活动、进食、精神状态良好,背部创口均为一期愈合,无明显感染、无材料脱落现象。术后 1~5 d,背部术区创面黏膜略充血发红,术后 10 d 所有动物背部术区创面愈合,可拆线。

2.2 组织学结果

2.2.1 大体观察

术后 4 周,可见植入材料分散在肌肉内,材料硬度高,骨修复材料颗粒棱角分明,骨材料表面部分肌肉附着;术后 8 周,植入骨材料在肌肉内呈分散状态,骨修复材料颗粒棱角较 4 周时明显变圆钝,骨修复材料已被肌肉完全包裹;术后 12 周,可见植入材料在肌肉内更加分散,骨修复材料表面圆钝,表面完全被肌肉附着,材料较大的空隙内可见有软组织生长。

2.2.2 HE 染色的组织学改变

(1) 术后 4 周:各组植入材料均较硬,且材料颗粒与颗粒之间呈分散状,无法行常规组织切片。

(2) 术后 8 周:由图 1 可见:实验组植入材料局部可见钙化灶(约 5%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%),实验组较多异物巨细胞,明显聚集,无其他炎症细胞,表明多孔 HAPw/n-ZnO 复合材料引起了机体炎症反应;ATLANTIK 人工骨组植入材料局部可见钙化灶(约 5%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%);Bio-Oss 组:植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生;金世植骨灵组植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生。

(3) 术后 12 周:图 2 可见:实验组植入材料局部可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见较多纤维组织增生(10%~15%),实验组较多异物巨细胞,明显聚集;ATLANTIK 人工骨组植入材料局部可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%);Bio-Oss 组:植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(约 10%),植入材料周边可见纤维组织增生;金世植骨灵组植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(约 10%),植入材料周边可见纤维组织增生。

2.2.3 Masson 三色染色观察胶原纤维分布

(1) 术后 4 周:植入材料过硬,无法行常规组织切片。

(2) 术后 8 周:由图 3 可见,实验组植入材料周边少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内未发现骨胶原纤维;ATLANTIK 人工骨组:植入材料周边出现少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内未发现骨胶原纤维,但颜色较实验组深;Bio-Oss 组:植入材料周边和肌肉间质内均发现少量绿染的骨胶原纤维,颜色较实验组深;金世植骨灵组:结果与 Bio-Oss 组基本一致。

Masson 三色染色结果绿染的骨胶原纤维说明有少量不成熟的骨组织,Bio-Oss 组与金世植骨灵组绿染的范围与深度均优于实验组。ATLANTIK 人工骨组则略优于实验组。

(3) 术后 12 周:由图 4 可见:各组植入材料周边出现绿染的范围较 8 周时并无明显变化,但色泽较 8 周时略深,各组均没有出现蓝染和红染。

实验组和 ATLANTIK 人工骨组依然只有植入材料周边出现少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内

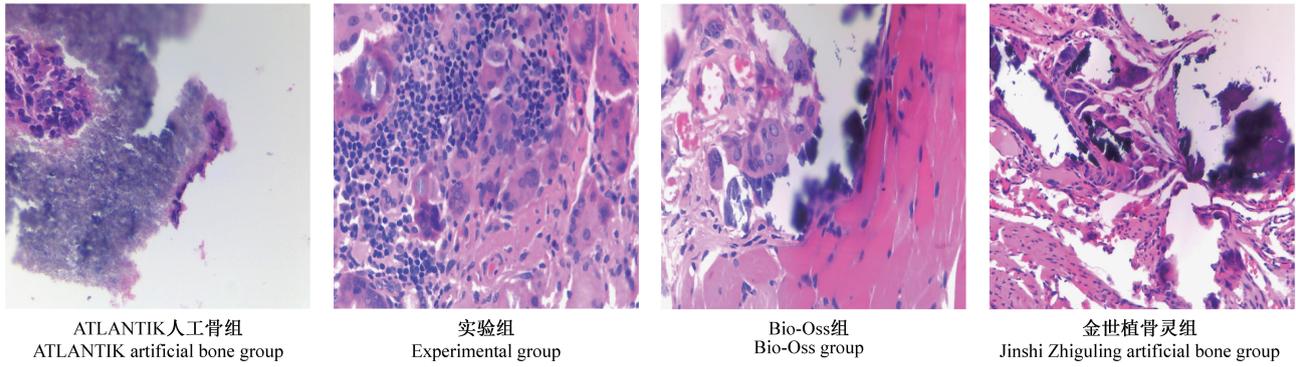


图 1 术后 8 周植入材料周围的肌肉组织的病理改变(HE 染色, ×400)

Figure 1 Histology of the muscle tissues around implant material at 8 weeks after surgery(HE staining, ×400)

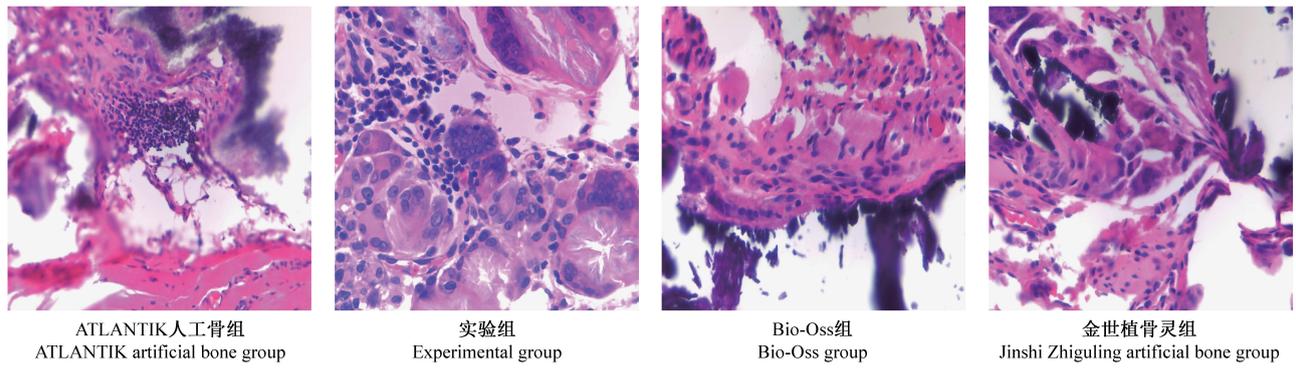


图 2 术后 12 周植入材料周围肌肉组织的组织学改变(HE 染色, ×400)

Figure 2 Histological changes in the muscle tissues around the implant material at 12 weeks after surgery(HE staining, ×400)

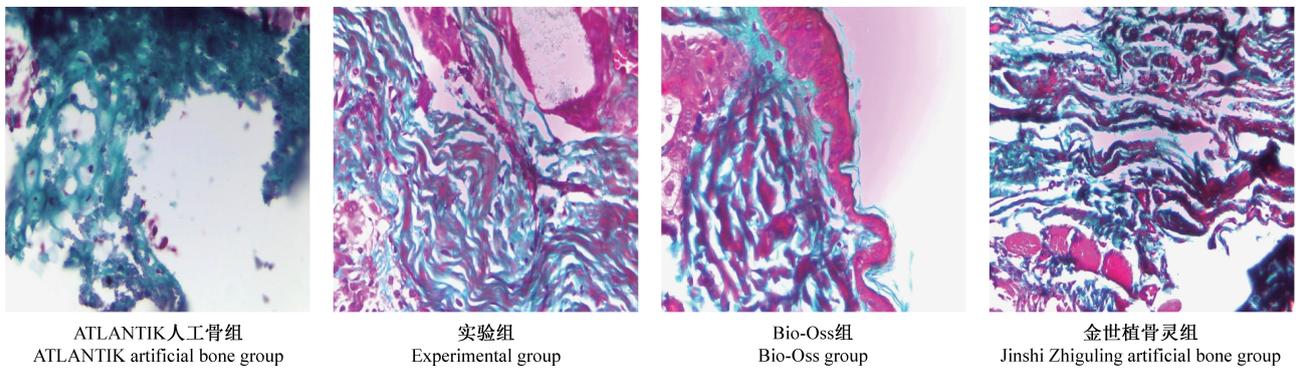


图 3 术后 8 周肌肉组织中的骨胶原分布(Masson 三色染色, ×400)

Figure 3 Distribution of collagen fibers in the bone tissues at 8 weeks after surgery(Masson trichrome staining, ×400)

未发现骨胶原纤维; Bio-Oss 组与金世植骨灵组: 植入材料周边和肌肉间质内均发现少量绿染的骨胶原纤维, 颜色较实验组和 8 周时变深。

Masson 三色染色有绿、蓝、红三色, 由绿至红说明骨质变得更为成熟。Bio-Oss 组与金世植骨灵组绿染的范围与深度均优于实验组, ATLANTIK 人工骨组则略优于实验组, 但均未在 8 周时在树鼯背部肌肉内诱导出较为成熟的骨组织, 但均体现出较强

的体内生物活性。

2.3 碱性磷酸酶活性检测结果

在三个不同的时间段, 实验组较 Bio-Oss 组、金世植骨灵组和正常肌肉组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组, 实验组优于正常肌肉组, 且差异有统计学意义。与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

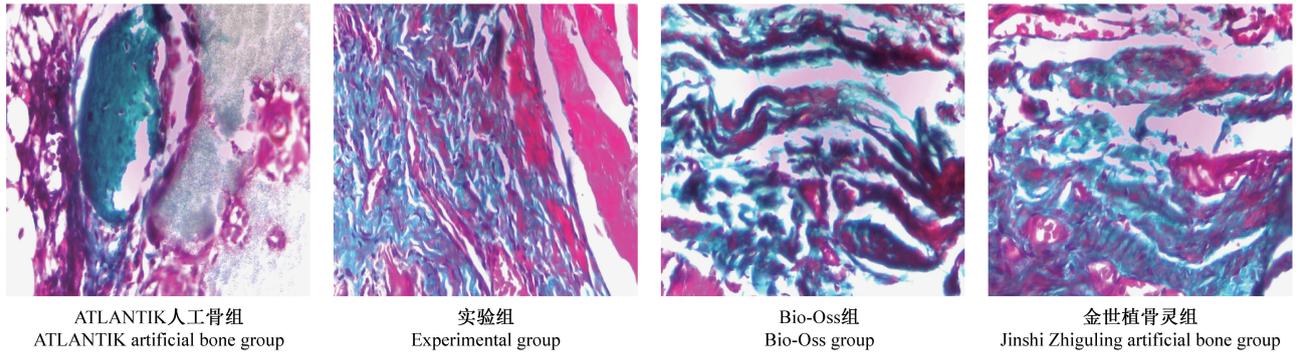


图 4 术后 12 周肌肉组织内的胶原纤维分布 (Masson 三色染色, $\times 400$)

Figure 4 Distribution of collagen fibers in the bone tissues at 12 weeks after surgery (Masson trichrome staining, $\times 400$)

表 1 各组肌肉组织内在不同时间点的碱性磷酸酶活性变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

Table 1 Alkaline phosphatase activity in the muscle tissues of different groups at different time points ($\bar{x} \pm s, g$)

组别 Groups	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks	12 周 12 weeks
ATLANTIK 人工骨 ATLANTIK artificial bone	0.60 \pm 0.15	0.72 \pm 0.25	0.85 \pm 0.30
实验组 Experimental group	0.58 \pm 0.70	0.68 \pm 0.30	0.80 \pm 0.31
Bio-Oss Bio-Oss	1.10 \pm 0.18	1.30 \pm 0.30	1.50 \pm 0.36
金世植骨灵 Jinshi Zhiguling artificial bone	1.15 \pm 0.21	1.52 \pm 0.35	1.68 \pm 0.42
正常肌肉 Normal muscle	0.18 \pm 0.04	0.18 \pm 0.04	0.18 \pm 0.04

表 2 各组肌肉组织中钙含量在不同时间点的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu g/mg$)

Table 2 Calcium content in the muscle tissues in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, \mu g/mg$)

组别 Groups	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks	12 周 12 weeks
ATLANTIK 人工骨 ATLANTIK artificial bone	0.55 \pm 0.07	0.71 \pm 0.06	0.83 \pm 0.04
实验组 Experimental group	0.58 \pm 0.06	0.74 \pm 0.07	0.90 \pm 0.08
Bio-Oss Bio-Oss	0.95 \pm 0.04	1.15 \pm 0.08	1.25 \pm 0.09
金世植骨灵 Jinshi Zhiguling Artificial bone	1.10 \pm 0.05	1.30 \pm 0.11	1.38 \pm 0.15
正常肌肉 Normal muscle	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03

2.4 钙含量检测结果

在三个不同的时间段, 实验组较 Bio-Oss 组、金世植骨灵组和正常肌肉组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组, 实验组优于正常肌肉组, 且差异有统计学意义, 与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。钙含量检测结果见表 2。

3 讨论

选择合适的动物作为骨修复材料肌肉植入是研究的前提及基础^[4-5]。很多研究报道钙磷陶瓷植入狒狒、犬、羊、猪、兔、鼠的非骨性部位 (如肌肉和皮下) 有骨诱导出现^[6-7], 不同的结果可能是因为动物种属间的差异和植入物差异造成。但以树鼩作为人工骨材料肌肉植入实验的实验动物还未见

报道。

在本实验中的四种人工骨,除本课题组自制的多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 外其余三种均已用于临床,ATLANTIK 人工骨主要成分为 70%的羟基磷灰石与 30%的磷酸三钙;Bio-Oss 为脱钙牛骨;金世植骨灵为经过特殊处理并复合 BMP 的牛骨。将四种人工骨材料植入树鼯背部肌肉中,最长为 12 周。通过组织学观察,均未发现成熟的新生骨组织出现,但出现一些钙化灶和幼稚的骨胶原纤维即本研究制备的多孔 HAPw/n-ZnO 复合材料与植入树鼯背部肌肉 12 周后并未诱导出成熟的骨质,尚不能说明多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 是否具有异位成骨能力,但体现出一定的成骨活性。种植体植入部位,也同样影响种植体内骨形成。为了顺利诱导出骨细胞产生,脱钙骨基质通常种植部位是在小鼠的后肢股部肌肉陷窝内,大鼠及兔子的腹部肌肉内及狗颈背部肌肉内。因而,种植体植入部位选择不当可能无法诱导骨形成^[8-9]。树鼯作为人工骨材料软组织植入实验动物目前在国内外还未见报道,树鼯在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类,甚至与人类高度相似^[10-11],且树鼯具有较强的抗感染能力,其大腿部肌肉和背部肌肉可作为口腔科填充类骨材料肌肉植入模型的选择,但因为树鼯个体较小,肌肉较薄,如果是块状骨材料植入时不易操作。本研究结果显示,树鼯可成功构建骨材料肌肉植入动物模型。与非人灵长类动物相比,树鼯来源广泛、价格低廉,可预测树鼯在口腔骨材料相关研究中具有良好的应用前景。

本研究通过 ALP 及钙含量活性检测发现 Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组,实验组优于正常肌肉组,与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义。ALP 是成骨细胞和成骨细胞分化的代表性酶,ALP 作为成骨细胞表型特征之一,在体内外钙化中起关键性作用,随着 ALP 升高的同时出现大量钙盐的沉积,ALP 活性越高,表明成骨前体细胞向成骨细胞分化越明显^[12-13]。本实验中组织学发现实验组与 ATLANTIK 人工骨组植入材料表面有钙化灶,Bio-Oss 组与金氏植骨灵组在植入材料表面与肌肉间质内均发现有钙化灶,表明植入材料表现出生物活性,为骨组织形成提供了部分条件。

本实验不足之处:首先树鼯用量较少,其次观察时间较短,不能更好的了解骨材料的异位成骨

能力。

本实验中,实验组中机体出现了炎症反应且长时间存在,该结果与国内外的研究符合。国外研究认为,n-ZnO 导致细胞产生过量的活性氧,使细胞内氧化和抗氧化状态失去平衡,发生氧化应激反应,导致细胞氧化损伤。如何在发挥 n-ZnO 优异的抗菌性能的同时避免其引发的氧化应激反应^[14-17],本课题组将进一步研究。

4 结论

多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入到树鼯背部肌肉中 12 周后未异位成骨,对照组骨修复材料也未异位成骨,但均体现出异位成骨潜力;多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入机体后引起炎症反应。

参 考 文 献(References)

- [1] Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36): 9622-9629.
- [2] Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, et al. A review of dental implants and infection [J]. *J Hosp Infect*, 2009, 72(2): 104-110.
- [3] Ripamonti U, Crooks J, Kirkbride AN. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation [J]. *South Afr J Sci*, 1999, 95(81): 335-343.
- [4] Qu SX, Guo X, Weng J, et al. Evaluation of the expression of collagen type I in porous calcium phosphate ceramics implanted in an extra-osseous site [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(4): 659-667.
- [5] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles [J]. *Bone*, 2005, 36(6): 1086-1093.
- [6] Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, et al. Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(5): 4419-4427.
- [7] Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Cross species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(6): 1607-1615.
- [8] 李世普. 生物医用材料导论 [M]. 武汉工业大学出版社, 2000.
- [9] Li SP. Introduction to biomedical materials [M]. Wuhan University of Technology Press, 2000.
- [9] 张士成,李世普,陈芳. 磷灰石超微粉对癌细胞作用的初步研究 [J]. *武汉工业大学学报*, 1996, 18(1): 5-8.
- Zhang SC, Li SP, Cheng F. Studies on effects of apatite ultrafine powder on cancer cells [J]. *J Wuhan Univ Technol*, 1996, 18

- (1): 5-8.
- [10] 许凌,范宇,蒋学龙,等. 树鼩进化分类地位的分子证据 [J]. 动物学研究,2013,34(2): 70-76.
Xu L, Fan Y, Jiang XL, et al. Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrews [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 70-76.
- [11] 徐林,张云,梁斌,等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J]. 动物学研究,2013,34(2): 59-69.
Xu L, Zhang Y, Liang B, et al. Tree shrews under the spot light: emerging model of human diseases [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 59-69.
- [12] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dkl1/pref-1 [J]. Bone Miner Res, 2004, 19(5): 841-852.
- [13] Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells [J]. Med Dent Sci, 2003, 50(1): 63-69.
- [14] Xia T, Kovochich M, Liong M, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties [J]. ACS Nano, 2008, 2(10): 2121-2134.
- [15] O' Toole TE, Hellmann J, Wheat L, et al. Episodic exposure to fine particulate air pollution decreases circulating levels of endothelial progenitor cells [J]. Circ Res, 2010, 107(2): 200-203.
- [16] He LQ, Lu JH, Yue ZY. Autophagy in ageing and ageing-associated diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(5): 605-611.
- [17] Roy R, Kumar S, Tripathi A, et al. Interactive threats of nanoparticles to the biological system [J]. Immunol Lett, 2014, 158(1-2): 79-87.

[收稿日期] 2019-01-07