文章编号:1000-5404(2011)11-1165-05

论著

超声波辅助脱钙技术用于猪脱钙骨基质制备的效果评价

任智超,王 欣,刘宝林 (200093 上海,上海理工大学医疗器械与食品学院)

【摘要】 **目的** 以猪后腿骨干骺端为对象,考察超声波技术在脱钙骨基质制备过程中的作用。**方法** 6月龄公猪后腿骨清洗切片,分别用传统脱钙制备法和超声波辅助脱钙制备法进行脱钙骨基质的制备,超声波功率:220 W,频率:25 kHz。超声波处理时间0~6h。以脱钙骨的脱钙率考察超声波对脱钙效果的影响;利用Micro-CT和显微镜观察脱钙骨的大体三维结构;测量其孔隙率和孔径大小;利用物性测试仪测量脱钙骨的压缩模量以表征其力学性能。**结果** 脱钙骨脱钙率的测量结果显示,与传统脱钙法相比,超声波辅助脱钙制备法仅需6 h就可使脱钙率达到100%,脱钙时间可缩短45.5%;且制备的脱钙骨具有良好的孔隙率和互相连通的孔径结构,孔隙率达到85%以上,孔径大小为(348.18±64.86) μm,与传统制备方法无显著差异;并具有良好的力学性能,在脱除90%以上的钙后脱钙骨的压缩模量仍可达到(6.42±0.83) N/mm^2。**结论** 超声波辅助脱钙技术可以有效提高脱钙骨基质的制备效率,且制备效果良好。

【关键词】 猪;干骺端;超声波;脱钙骨
【中图法分类号】 R318.08;R312;R322.71 【文献标志码】 A

Application of ultrasound-aided decalcifying techniques in preparation of decalcified swine bone matrix

Ren Zhichao, Wang Xin, Liu Baolin (College of Medical Instruments and Food Engineering, Shanghai University of Science and Technology, Shanghai, 200093, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the role of ultrasound-aided decalcifying techniques in preparation of decalcified swine bone matrix. **Methods** Hind leg bone of male swine at the age of 6 months was cleaned and cut into sections. Decalcified swine bone matrix was prepared with the traditional and ultrasound-aided decalcifying techniques, respectively. The ultrasound power, frequency and time used in preparation of decalcified swine bone matrix were 220 W, 25 kHz and 0 – 6 h, respectively. Effect of ultrasound-aided decalcifying technique on the decalcification rate of bone matrix was observed. Three-dimensional structure of the decalcified bone matrix was observed under a microscope. Porosity and pore size of the decalcified bone matrix were measured by micro-CT. Mechanical properties of the decalcified bone matrix were assayed and expressed as a compress modulus. **Results** The decalcification rate of ultrasound-aided decalcifying technique for bone matrix could reach 100% in 6 h, which was significantly higher than that of traditional decalcifying technique. The decalcifying time of ultrasound-aided decalcifying technique for bone matrix could be shorted by 45.5%. The porosity and pore size of the decalcified bone matrix were over 85% and 348.18 ± 64.86 μm, respectively, which were not significantly different from those of decalcified bone matrix prepared with the traditional method. The mechanical properties of the decalcified bone matrix were rather good with a compress modulus of 6.42 ± 0.83 N/mm^2 when the decalcification rate reached 90%. **Conclusion** Ultrasound-aided decalcifying techniques can effectively improve the preparation rate of decalcified bone matrix.

【**Key words**】 swine; metaphysis; ultrasound; decalcified bone matrix

Supported by the National Natural Science Foundation of China (50776060), the Day-star Program of Shanghai (07QA14042); the Project of New Century Excellent Talents of Ministry of Education (NCET-07-0559); Key Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission (S30503), the Shanghai Eastern Scholar Plan and the Inspiring Fund for Minimally Invasive Surgery of College of Medical Instruments and Food Engineering of Shanghai University of Science and Technology. Corresponding author: Wang Xin, E-mail: wx0426951@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金(50776060);上海市启明星项目(07QA14042);教育部新世纪优秀人才项目(NCET-07-0559);上海市教委重点学科项目(S30503);上海市东方学者项目资助及上海理工大学医疗器械与食品学院微创励志基金
【通信作者】 王 欣,E-mail:wx0426951@126.com

脱钙骨是一种自体可降解的抗原灭活的异种或同种异体骨质，是骨组织工程常用的一种生物衍生材料。1965年，Urist证实脱钙骨具有诱导成骨作用[1]。随后，脱钙骨的成骨诱导活性被大量的试验研究和临床实践所证实[2-6]。脱钙骨具有良好的生物相容性、生物活性以及生物降解性[7-10]。已有研究表明，猪后腿骨干骺端的松质骨是制备脱钙骨基质的优良材料，利用猪后腿骨干骺端制备脱钙骨基质可以加大对其的利用，变废为宝，有着广阔的发展前景。

目前脱钙骨的制备方法主要采用传统的Urist法，该方法操作简单，制备成本低，但脱钙环节需耗费大量的时间（一般为12 h以上）。研究表明，超声振动可加剧分子运动，增加相互碰撞机会，提高分子平均能量，降低反应活化能，从而提高化学反应速度，甚至改变化学反应机理，启动新的反应渠道[11-14]。近年有学者采用超声波技术对人牙齿脱钙效果进行研究，结果表明超声波技术能将牙体表面钙团洗脱，打开更多通道与脱钙液接触，缩短人牙齿脱钙的时间，并且使牙齿表面脱钙均匀[15]。亦有学者研究了超声波技术在骨组织免疫组化染色中的作用，结果表明，超声技术不但可以加快骨组织的脱钙速度，同时有利于骨组织免疫组化染色[16]。本研究拟将超声技术引入脱钙骨的制备过程，以传统制备方法为对照，考察超声波技术对脱钙骨的钙含量、孔隙率、孔径大小、压缩模量等多个理化指标的影响，对超声波法制备脱钙骨的可行性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料：当天宰杀的同一批次猪的后腿骨，猪龄6个月的公猪2头，后腿骨数量：4根，购于上海复新屠宰场。

试剂：碳酸钙、乙二胺四乙酸钠（EDTA）、氨水、氯化铵、三乙醇胺、铬黑T指示剂、盐酸羟胺、无水乙醇、无水乙醚、Triton X-100、浓盐酸等均购于中国医药集团（上海）化学试剂公司，均为分析纯。

仪器：分析天平（AB204-N，梅特勒-托利多仪器有限公司）；双频超声波清洗器（SCQ-900A，上海声浦超声波设备厂）；物性测试仪（EZ-TEST，日本SHIMADZU公司）；Micro-CT（1074HR，比利时Skyscan公司）；电热恒温水浴锅（HHS，上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；Nikon显微镜（55I，日本尼康公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 脱钙骨的传统制备法 根据脱钙骨的Urist制备法[17]，传统制备法流程如下：预处理：购得样品并清洗后，先将干骺端按照5 mm×5 mm×3 mm的尺寸切片，然后再用高压水枪冲洗除去骨片孔隙中的骨髓，使切片呈乳黄色孔隙结构。

预处理后的猪的后腿骨干骺端→5% Triton X-100溶液中脱细胞48 h（每12小时换液1次）→蒸馏水冲洗0.5 h→无水乙醚脱脂48 h（每12小时换液1次）→蒸馏水冲洗0.5 h→0.6 mol/L盐酸脱钙12 h→蒸馏水冲洗0.5 h→30 ℃恒温干燥12 h→得到脱钙骨成品→置于无水乙醇中贮存。

1.2.2 超声波辅助脱钙 根据脱钙骨制备的工艺，在脱钙处理环节中采用超声波技术进行辅助脱钙。根据相关的研究报道[18]，以及实验室现有的设备条件将超声波脱钙的试验条件设计为：超声波功率：220 W，超声波频率：25 kHz。超声波处理时间：1~6 h。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 脱钙率 EDTA滴定法，在文献[19]的基础上加以改进。具体过程如下：称取一定量的脱钙骨样品（m_s），至烧杯中加入1∶1浓盐酸（6 mol/L）10 ml；盖上玻片，电炉加热至沸腾，反复3次至样品全部溶解，用去离子水冲洗玻片，冲洗液滴加入烧杯中；将烧杯中的溶液倒入100 ml容量瓶中，冲洗烧杯3次，加去离子水至刻度，摇匀。移液管从容量瓶中吸取体积为V_1的溶液分别置于3个锥形瓶中。再向3个锥形瓶中分别加入5%的三乙醇胺3 ml，氨性缓冲溶液15 ml，柠檬酸钠3 ml，铬黑T指示剂5滴，然后用0.02 mol/L的EDTA进行滴定，当锥形瓶中溶液的颜色由酒红色变为亮蓝色即为滴定终点，EDTA消耗的体积记为V_0。

脱钙骨钙含量计算公式如下：

$$X = \frac{V_1 \times T}{m_s \times (\frac{V_0}{100})}$$

式中，

X—脱钙骨钙含量，(mg/g)

V_0—滴定钙离子所消耗EDTA的体积的平均值（3个样品的平均值），(ml)

T—EDTA的标定的浓度，

m_s—样品的质量，(g)

V_1—所取样液的体积(ml)

脱钙骨脱钙率的计算公式如下：

$$K = \frac{(X_0 - X)}{X_0} \times 100\%$$

式中，

K—脱钙骨脱钙率，

X_0—不经脱钙处理样品的钙含量，(mg/g)

X—脱钙处理后脱钙骨的钙含量，(mg/g)

1.3.2 孔隙率 采用Skyscan 1074HR型Micro-CT对脱钙骨样品进行扫描，每转动3.6°进行扫描拍照，每个样品扫描360°。扫描后利用Micro-CT的系统软件对脱钙骨进行三维重构，再利用Micro-CT的CTAN软件对三维重构后脱钙骨的孔隙率进行测量分析。

1.3.3 孔径 将脱钙骨样品进行切片，厚度在0.5 mm左右。置于载玻片上利用Nikon 55i型显微镜进行拍照，显微镜目镜为10倍镜，物镜为4倍镜。利用Digimizer3.1图片分析软件对孔径大小进行测量，随机选取5个区域对脱钙骨孔径大小进行测量。

1.3.4 压缩模量 采用压缩法，物性测试仪压头直径2 cm，

压缩速率为 0.5 mm/s。选取脱钙骨中心部位,进行压缩测量。单位 N/mm^2,以脱钙骨弹性变形区的曲线的斜率表示其压缩模量,此斜率即为应力与应变的比值。每种处理方式选 3 个样品进行测量,最后取平均值。

1.4 数据分析方法

应用 SPSS 18.0 软件进行数据处理,采用 ANOVA 进行 Duncan 多重检验分析,并用 Excel 软件进行图形绘制。

2 结果

2.1 脱钙方法对脱钙率的影响

脱钙骨的脱钙率代表了脱钙骨的脱钙程度,是判断脱钙骨制备效果的一项重要指标,当脱钙率达到 100% 时表示完全脱钙。传统制备法及超声波制备法对脱钙率的影响如图 1 所示。由图 1 可见,随脱钙时间延长,2 种方法所制备的脱钙骨的脱钙率均不断提高。在脱钙的第 1 h,2 种方法的脱钙率上升明显,超声波制备法的脱钙率为(92.05 ± 0.51)%,传统脱钙法的脱钙率为(78.57 ± 0.89)%,从脱钙效果来看超声波制备法明显好于传统制备法,两者呈显著性差异($P < 0.05$)。脱钙 1h 后随着脱钙时间的延长,脱钙率缓慢提高,传统制备法脱除样品中 100% 的钙所需的时间为 11 h,而超声波波制备法仅需 6h 就可完成此过程,脱钙时间相对缩短了 45.5%。

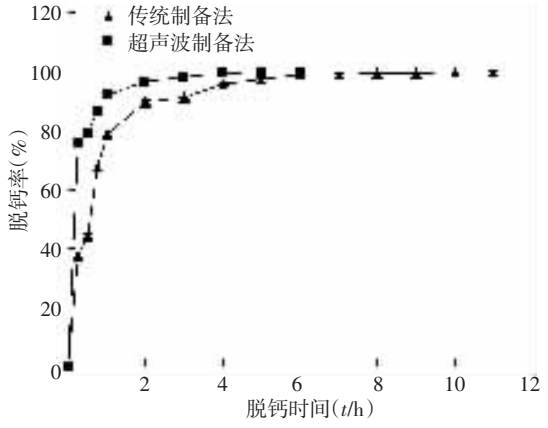


图 1　脱钙方法对脱钙骨的脱钙率的影响

2.2 脱钙方法对孔隙率的影响

作为支架材料,脱钙骨应具有较高的孔隙率,以利于细胞和生长因子在脱钙骨支架内均匀地分布及生长[20]。本研究采用 Micro-CT 对脱钙骨进行 360° 二维扫描,之后利用 Micro-CT 的系统软件对扫描结果进行三维重构分析,重构出脱钙骨的截面图。分析结果表明,超声波法制备的脱钙骨具备良好的三维网状孔隙结构,且孔隙间彼此相通。

脱钙骨作为支架材料孔隙率应在 75% 以上,才能有利于细胞的黏附及细胞外基质的生长,国内外相关文献关于脱钙骨孔隙率的报道一般在 80% 以上[21],本研究中,超声波制备法制备的脱钙骨,当脱钙率为 100% 时,脱钙骨的孔隙率为(88.34 ± 1.54)%,传统方法制备的脱钙骨,当脱钙率为 100% 时,脱钙骨的孔隙率为(87.87 ± 1.55)%,脱钙的孔隙率 2 种方法所得到的脱钙骨的孔隙率均在 85% 以上,无显著差异,具有良好的孔隙率。

利用 Micro-CT 扫描分析的结果,应用 Micro-CT 的 CTAN 测量软件获得了脱钙骨的孔隙率。传统方法和超声波法制备的脱钙骨的孔隙率随脱钙时间的变化情况如图 2 所示。

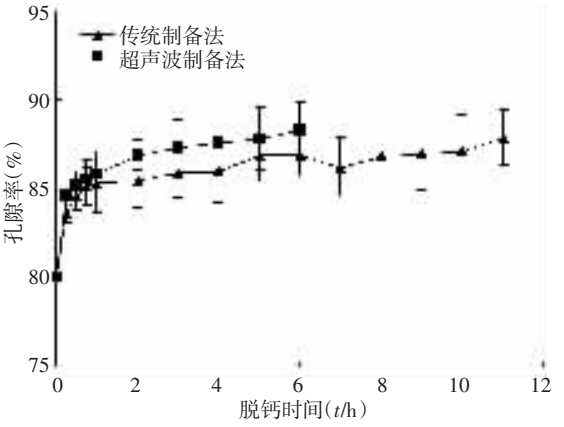


图 2　脱钙方法对脱钙骨孔隙率的影响

由图 2 可见,随脱钙时间延长,2 种制备方法对脱钙骨的孔隙率的影响也有所区别。超声波法制备的脱钙骨的孔隙率在前 2 h 内迅速增大,由未脱钙时的(80.06 ± 0.24)% 迅速增大到(86.91 ± 1.42)%,之后孔隙率随脱钙时间的延长而缓慢增加,到第 6 小时时脱钙完成,此时孔隙率为(88.34 ± 1.54)%。而传统方法制备的脱钙骨的孔隙率在脱钙 2 h 内的增大也较快,由未脱钙时的(80.06 ± 0.24)% 迅速增大到(85.47 ± 1.52)%,但显著低于超声波法的孔隙率变化速度,两者孔隙率变化速度差异性显著($P < 0.05$)。随后,孔隙率随脱钙时间延长而缓慢增加,到脱钙完成时(11 h)孔隙率达到(87.87 ± 1.55)%。

2.3 脱钙方法对孔径的影响

作为支架材料,脱钙骨的孔径大小是一个重要的指标,孔径大小影响支架材料的成骨作用。有研究证实,支架材料的孔径大小至少为 100 μm 才有可能使新骨长入。本研究中应用两种方法得到的脱钙骨的孔径如图 3 和图 4 所示,图 3 为传统方法制备得到的脱钙骨,其脱钙率为 100%,孔隙率为(87.87 ± 1.55)%;图 4 为超声波法制备得到的脱钙骨,其脱钙率为 100%,孔隙率为(88.34 ± 1.54)%。由图 3,图 4 可见,2 种方法制备得到的脱钙骨具有良好的孔径结构,孔径之间彼此相连,适合细胞及细胞生长因子的附着。

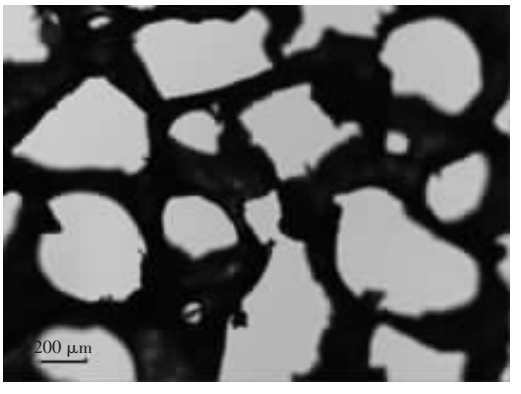


图 3　传统制备方法脱钙骨孔径观察

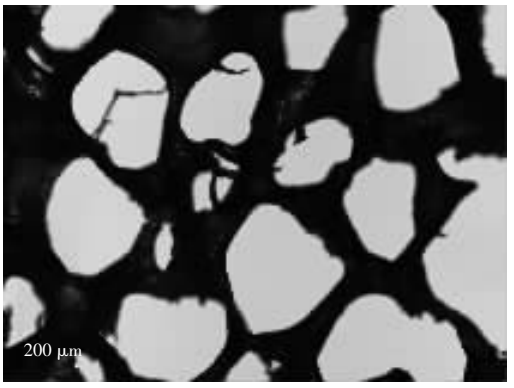


图4 超声波制备方法脱钙骨孔径观察

由图5可见，制备方法不同，脱钙骨的孔径随脱钙时间的变化也有一定区别。超声波法制备的脱钙骨的孔径在0～1 h内呈显著增大趋势，孔径由最初的(308.03±76.01) μm增大至(344.75±51.18) μm，随后孔径随脱钙时间的变化趋缓，脱钙完成后孔径为(348.18±64.86) μm。而传统制备法制备的脱钙骨孔径由最初的(308.03±76.01) μm增大至(340.37±59.68) μm则需要2 h，用时相对较长，脱钙终点样品的孔径大小为(348.98±51.68) μm，与超声波法制得的样品的孔径无显著差异。与相关报道的脱钙骨的孔径相似，本研究中应用传统方法或超声波法制备的脱钙骨的孔径均在300 μm之上，符合组织工程支架材料的要求，超声波法可大幅提高制备效率，同时未对脱钙骨的孔径产生负面影响。

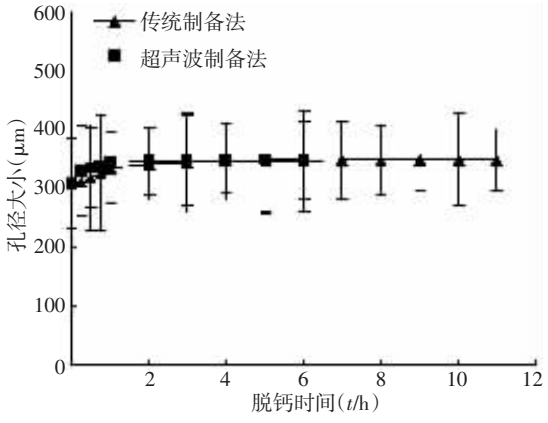


图5 脱钙方法对脱钙骨孔径大小的影响

2.4 脱钙方法对压缩模量的影响

脱钙骨作为支架材料不仅要为细胞提供理想的生存环境，还要满足一定的力学性能，这样脱钙骨才能在植入人体内后起到一定支撑作用，帮助人体承担压力有助于缺损组织的愈合[20]。压缩模量是脱钙骨力学性能的一个重要指标，代表脱钙骨抵抗压力变形的能力。各方法对脱钙骨压缩模量影响的结果如图6所示。

经压缩试验曲线分析，在弹性变形阶段，脱钙骨在受到压缩时发生弹性形变，当外力取消时脱钙骨可恢复原来形状。在蠕变阶段，随着压力的增大脱钙骨的结构开始发生变化，结构逐渐受到破坏。在塑性变形阶段，脱钙骨的结构完全遭到破坏，随着压力的增大开始发生不可恢复的形变。脱钙骨的压缩模量就是在弹性形变阶段里应力和应变的比值。

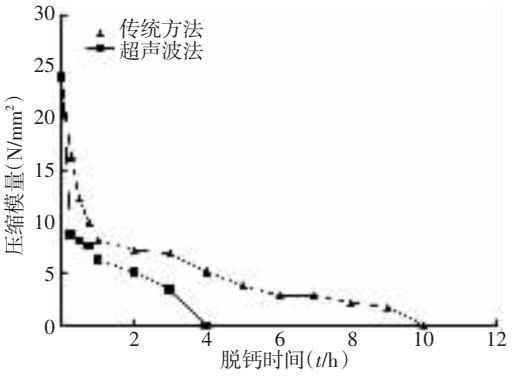


图6 脱钙方法对脱钙骨压缩模量的影响

在临床医学中，脱钙骨压缩模量并没有统一的标准，有研究将压缩模量在2 N/mm²左右的支架材料应用于试验研究中并取得了不错的效果[22]。图6表明，2种方法制备的脱钙骨的压缩模量均随脱钙时间的延长不断降低。采用超声波制备法，脱钙骨在脱除90%的钙后压缩模量仍为(6.42±0.83) N/mm²，大于2N/mm²具有更好的力学性能。同时超声波法制备的脱钙骨压缩模量达到6.42N/mm²仅需要1 h，而传统制备法则需要3 h以上的时间，制备时间相对缩短了67%，两者差异性显著($P<0.05$)。

3 讨论

脱钙骨是骨组织工程常用的一种生物衍生支架材料。但目前脱钙骨基质的制备方法主要采用传统的Urist法，虽然该方法操作简单，制备成本低，但需耗费大量的时间，大大影响了脱钙骨基质的制备效率。超声波是一种频率在2×10^4～2×10^9 Hz的超过人耳听觉范围的声波，具有可传递很强的能量，产生反射、干涉、叠加和共振现象，以及可在界面上产生强烈的冲击和空化现象等特点。超声波所产生的效应，可加剧分子运动，增加分子间相互碰撞机会，提高分子平均能量，降低反应活化能，从而提高了化学反应速度。通过与传统脱钙制备方法的比较发现，超声制备法可显著缩短脱钙时间，有效提高了脱钙骨的制备效率；制备的脱钙骨具备良好的三维网状孔隙结构，且孔隙间彼此相通，同时符合临床应用的力学性能要求，获得了良好的制备效果。

脱钙率代表了脱钙骨的脱钙程度，通过考察脱钙时间与脱钙率的变化，可以反映脱钙骨的脱钙效率。与传统制备法相比，超声波制备法脱除样品中100%的钙所需的脱钙时间相对缩短了45.5%，显著提高了脱钙骨的制备效率，这是因为，样品的脱钙过程实际上是骨头上的Ca^{2+}离子与盐酸中的Cl^-离子结合成$CaCl_2$的过程，超声波通过机械振动将能量传递给反应物质，振动能量不断地被媒质吸收及内摩擦使样品由内到外均能发生反应，并使分子激烈的运动，增加了分子间有效碰撞的频率，从而提高了化学反应速率，加快了Ca^{2+}离子与Cl^-离子的结合从而提高了脱钙效率；

而传统制备法的反应则是由样品外部向内部逐渐进行,从而使脱钙速度相对较慢。本研究在脱钙骨传统制备法的基础上,采用超声波技术进行辅助制备,通过考察脱钙时间与脱钙率的变化关系,证明了超声波可以提高脱钙骨的制备效率。

脱钙骨的三维多孔结构反映了脱钙骨的制备效果。良好的孔隙率和孔径大小可以为种子细胞的生长和细胞外基质的形成提供充分合适的空间,有利于新骨的生成。采用超声波法制备的脱钙骨,其孔隙率为(88.34±1.54)%,孔径大小为(348.18±64.86)μm,与传统的制备方法相比没有显著性的差异($P>0.05$),说明脱钙骨并没有因为超声波效应而造成三维结构发生变化而影响脱钙骨的制备效果,而与其他脱钙骨的相关研究相比[23],本试验制备的脱钙骨具有较高的孔隙率和孔径大小,获得了较好的制备效果。

压缩模量表征了脱钙骨的力学性能,试验中脱钙骨的压缩模量随脱钙时间的延长不断下降,这是由于,脱钙骨的支撑强度是由骨小梁来承担的,而骨小梁的主要成分是钙盐和胶原,当钙盐不断以离子形式脱离骨小梁时,骨小梁的支撑作用便会降低,从而使抵抗变形的能力下降,压缩模量降低。样品中的含钙量越少,则样品的压缩模量就会越低。超声波法制备的脱钙骨在脱除90%以上的钙后压缩模量仍为(6.42±0.83)N/mm^2,大于其他研究报道中的压缩模量[22],因此该方法制备的脱钙骨具有更好的力学性能。

本实验考察了超声波技术脱钙骨制备过程中的应用可行性。通过与传统脱钙制备方法的比较发现,超声波制备法可显著缩短脱钙时间,仅需6h就可完全脱钙,相对缩短了45.5%的时间;超声波法制备的脱钙骨具备良好的三维网状孔隙结构,且孔隙间彼此相通,脱钙终点时,脱钙骨的孔隙率均在85%以上,孔径为(348.18±64.86)μm,与传统方法制备的脱钙骨孔隙率、孔径无显著差异,适合细胞及生长因子附着生长,同时符合临床应用的力学性能要求,采用超声波制备法,脱钙骨的压缩模量达到6.42/mm^2仅需要1h,有效提高了脱钙骨的制备效率。本研究证明了超声波技术在脱钙骨制备中应用的可行性,对超声波技术在脱钙骨制备中的应用具有重要的意义。

参考文献:

[1] Urist M R. Bone: formation by autoinduction[J]. Since, 1965, 150(698): 893-899.
[2] 王志平, 柳峰, 赵建华. 脉冲电磁场对脱钙骨基质诱导人骨髓干细胞成骨分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 947-950.
[3] McMillan J, Kinney R C, Ranly D M, *et al*. Osteoinductivity of demineralized bone matrix in immunocompromised mice and rats is decreased by ovariectomy and restored by estrogen replacement [J]. Bone, 2007, 40(1): 111-121.
[4] 赵建华, 廖维宏, 刘鹏, 等. 消旋聚乳酸/羟基磷灰石/脱钙骨基质人工骨修复兔桡骨大段骨缺损的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1943-1946.
[5] Gong M Q, Zhang D W, Wan Y Q, *et al*. Engineered synovial joint condyle using demineralized bone matrix [J]. Mater Sci Eng C, 2010, 30(4): 531-536.
[6] Zhang B, Liu M Y, Zhao J H. Osteoinductive activity of demineralized bone matrix and deprotenized bone derived from human avascular necrotic femoral head [J]. Chin J Traumatol, 2009, 12(6): 379-383.
[7] Kim Y K, Kim S G, Lim S C, *et al*. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(6): e6-e11.
[8] Lima E G, Grace-Chao P H, Ateshian G A, *et al*. The effect of devitalized trabecular bone on the formation of osteochondral tissue-engineered constructs [J]. Biomaterials, 2008, 29(32): 4292-4299.
[9] Yuan J D, Nie W B, Fu Q, *et al*. Novel three-dimensional nerve tissue engineering scaffolds and its biocompatibility with Schwann cells [J]. Chin J Traumatol, 2009, 12(3): 133-137.
[10] 李强, 何清义, 许建中, 等. 羊脱钙骨基质作为骨组织工程支架材料的性能评估[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 9-11.
[11] 石海信. 声化学反应机理研究[J]. 化学世界, 2006, 47(10): 635-638.
[12] Said K, Moussaoui Y, Kammoun M, *et al*. Ultrasonic activation of Heck type reactions in the presence of Aliquat-336 [J]. Ultrason Sonochem, 2011, 18(1): 23-27.
[13] Kumar D, Kumar G, Poonam, *et al*. Ultrasonic-assisted transesterification of Jatropha curcus oil using solid catalyst, Na/SiO_2 [J]. Ultrason Sonochem, 2010, 17(5): 839-844.
[14] Mendez-Arriaga F, Torres-Palma R A, Petrier C, *et al*. Ultrasonic treatment of water contaminated with ibuprofen [J]. Water Res, 2008, 42(16): 4243-4248.
[15] 刘英群, 祝莹颖, 王铜. 微波和超声波对人牙齿脱钙效果的比较研究[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 25(6): 707-709.
[16] 熊正文, 李德炳, 冯骥良, 等. 不同脱钙条件对骨组织免疫组织化学染色抗原性的影响[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(5A): 1092-1094.
[17] Urist M R, Strates B S. Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins [J]. Clin Orthop Relat Res, 1970, 71: 271-278.
[18] 法京, 沈强, 俞彰, 等. 超声波骨组织电镜样品脱钙处理的实验研究[J]. 复旦学报: 医学版, 2003, 30(2): 117-119.
[19] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 105-108.
[20] 曹谊林. 组织工程学[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 102-103.
[21] 秦雄, 徐志飞, 唐华, 等. 猪脱钙骨基质作为组织工程人工肋骨支架的可行性研究[J]. 生物医学工程与临床, 2009, 13(3): 171-174.
[22] 戴刚, 石宗利, 李起鸿, 等. 新型骨与软骨组织工程支架材料制备及其性能研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 502-505.
[23] 叶青, 谢肇, 罗飞, 等. 多聚赖氨酸修饰的山羊脱钙骨富集骨髓干细胞的性能评价[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2037-2040.

(收稿:2010-11-26 修回:2011-01-12)
(编辑 王 红)