

习惯性流产患者绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 免疫失衡的检测及其临床意义*

杨小猛¹, 赵 丹², 杜丽伟¹, 唐琼玲¹, 蒋淑萍¹, 陈 相¹, 陈书恩¹, 姜艳华³ (1. 深圳市罗湖区妇幼保健院检验科 518019; 2. 深圳市罗湖区慢性病防治院检验科 518023; 3. 深圳市罗湖区妇幼保健院妇产科 518019)

【摘要】 目的 探讨绒毛和蜕膜中调节性 T 细胞(Treg)/Th17 免疫失衡在习惯性流产(RSA)患者免疫发病机制中的作用。**方法** 收集 RSA 患者和自愿终止妊娠的早孕妇女(正常对照组)的绒毛和蜕膜,采用流式细胞术检测其中 Treg 和 Th17 细胞数量,采用 RT-PCR 检测其中叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)和维甲酸相关核孤儿受体 γ t(ROR γ t)的 mRNA 水平;收集 RSA 患者和正常对照组的外周血,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其中转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素(IL)-10、IL-17A 和 IL-17F 的水平;统计分析 Treg 细胞和其相关细胞因子、Th17 细胞和其相关细胞因子之间的相关性。**结果** 和正常对照组比较,RSA 患者绒毛和蜕膜中 Th17 细胞明显增多(均 $P<0.01$),Treg 细胞明显减少(均 $P<0.01$),ROR γ t 的 mRNA 水平明显升高(均 $P<0.01$),Foxp3 的 mRNA 水平明显降低(均 $P<0.01$);RSA 患者外周血中 IL-17A 和 IL-17F 水平明显升高(均 $P<0.01$),TGF- β 和 IL-10 水平明显降低(均 $P<0.01$);RSA 患者和正常对照组 Treg 细胞数量和 TGF- β 及 IL-10 水平、Th17 细胞数量和 IL-17A 及 IL-17F 水平均呈正相关(均 $P<0.01$)。**结论** 绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 免疫失衡可能与 RSA 的免疫发病机制有关。

【关键词】 习惯性流产; Treg/Th17 平衡; 转化生长因子- β ; 白细胞介素-10; 白细胞介素-17A; 白细胞介素-17F

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)01-0022-04

Immune unbalance detection of Treg / Th17 in villus and deciduas in patients with habitual abortion and its clinical significance* YANG Xiao-meng¹, ZHAO Dan², DU Li-wei¹, TANG Qiong-ling¹, JIANG Shu-ping¹, CHEN Xiang¹, CHEN Shu-en¹, JIANG Yan-hua³ (1. Department of Clinical Laboratory, Luohu District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518019, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Luohu District Chronic Disease Prevention and Cure Hospital, Shenzhen, Guangdong 518023, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, Luohu District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518019, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of immune unbalance of Treg/Th17 in villus and decidua on the immunopathogenesis in recurrent spontaneous abortion(RSA). **Methods** The villus and decidua specimens were collected from the patients with RSA and early pregnancy women of voluntarily terminating pregnancy(normal control group). The Treg/Th17 cell count was detected by the flow cytometry. The RT-PCR method was adopted to detect the mRNA levels of ROR γ t and Foxp3 in villus and decidua. The levels of peripheral blood IL-17A, IL-17F, TGF- β and IL-10 in the two groups were detected by ELISA. Finally, the correlations between Treg cells with the related cytokines and between Th17 cells with the related cytokines were statistically analyzed. **Results** Compared with the normal control group, the Th17 cells in villus and decidua in the patients with RSA were significantly increased($P<0.01$), while the Treg cells were significantly decreased($P<0.01$), the mRNA level of ROR γ t was significantly increased($P<0.01$) and the mRNA level of Foxp3 was significantly decreased($P<0.01$); the peripheral blood IL-17A and IL-17F levels in the RSA patients were significantly increased($P<0.01$) and the TGF- β and IL-10 levels were significantly decreased($P<0.01$). The Treg cells quantity was positively correlated with the peripheral blood TGF- β and IL-10 levels and the Th17 cells quantity was positively correlated with peripheral blood IL-17A and IL-17F levels in the RSA patients and the normal control group($P<0.01$). **Conclusion** The imbalance of Treg/Th17 in villus and decidua may be related with the immunopathogenesis of RSA.

【Key words】 Recurrent spontaneous abortion; Balance of Treg/Th17; TGF- β ; IL-10; IL-17A; IL-17F

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(医疗卫生类)(201203194)。
作者简介:杨小猛,男,副主任技师,博士,主要从事分子免疫学和生殖免疫学基础研究工作。

习惯性流产(RSA)是一种由母胎免疫耐受失衡引起的疾病,育龄妇女中发病率约为 1%~5%。RSA 的病因十分复杂,一般认为与遗传、解剖结构、内分泌、免疫、感染和环境因素等有关;除此之外尚有 50%~60% 的患者病因不明^[1]。近年来研究发现,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)和 Th17 细胞是不同于 Th1 和 Th2 的 CD4⁺T 细胞亚群。Treg 细胞表达叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3),是一种下调免疫应答的细胞,可通过接触抑制或分泌白细胞介素(IL)-10 和转化生长因子-β(TGF-β)发挥维持自身免疫耐受和抗炎的功能;Th17 细胞表达维甲酸相关核孤儿受体 γt(RORγt),主要分泌 IL-17A 和 IL-17F,可能在自身免疫性疾病、炎症和肿瘤等多种免疫性疾病中起重要作用^[2]。Treg/Th17 平衡失调与多种疾病有关^[3],而其与 RSA 的关系尚不明^[4]。因此,本研究将检测 RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg 和 Th17 细胞数量、Foxp3 和 RORγt 的 mRNA 水平,以及 RSA 患者外周血中 TGF-β、IL-10、IL-17A 和 IL-17F 等细胞因子水平,探讨绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 数量和功能平衡与 RSA 的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 RSA 患者(孕周为 8~10 周)30 例,年龄为 22~38 岁,平均 32 岁,其诊断标准参照文献[5]。30 例自愿终止妊娠的早孕妇女(孕周为 8~10 周)为正常对照组,年龄为 23~38 岁,平均 31 岁。两组患者均为 2013 年 9 月至 2014 年 5 月在深圳市罗湖区妇幼保健院妇产科门诊就诊患者。正常对照组妇女无不良妊娠史,无遗传、解剖结构和内分泌异常,无自身免疫性疾病史。两组研究对象年龄和孕周差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,所有入选对象均签订知情同意书。

1.2 仪器与试剂 RPMI-1640 培养液为美国 Gibco 公司产品,TRIzol 试剂盒、随机引物和 RNaseH 反转录试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品,佛波脂和离子霉素为美国 Sigma 公司产品,固定破膜液为美国 BD 公司产品,细胞因子 ELISA 试剂盒、PE 标记的抗 IL-17A 单抗、PE-Cy5 标记的抗 Foxp3 单抗、PE 标记的小鼠 IgG1 和 PE-Cy5 标记的小鼠 IgG1 均为美国 eBioscience 公司产品,SYBR Premix Taq 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司。Coulter EPICS-XL 型流式细胞仪为美国贝克曼库尔特公司产品,ABI7300 型荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,MK3 型酶标仪为美国赛默飞世尔产品。

1.3 方法

1.3.1 绒毛和蜕膜单个核细胞制备 收集所有入选对象的绒毛和蜕膜,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗去除黏液和血液。无菌条件下剪碎组织,加入 0.25% 的胰酶-EDTA(pH8.0)于 37℃消化 1 h,获得细胞悬液。细胞悬液中加入淋巴细胞分离液于 500×g 离心 30 min 获得绒毛单个核细胞和蜕膜单个核细

胞,并用 PBS 洗两遍。为测定 Th17 细胞,将上述单个核细胞重悬于 RPMI-1640 培养液中(含 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、2 mmol/L 谷氨酸和 10% 热灭活的胎牛血清),调整细胞浓度约为 1×10⁶/mL。加入 50 ng/mL 佛波脂、1 μmol/L 离子霉素和 1 μL/mL 莫能霉素,于 37℃、5% CO₂ 环境中培养 4 h,备用。为测定 Treg 细胞,将上述单个核细胞悬液直接备用。

1.3.2 流式细胞术检测绒毛和蜕膜中 Treg 和 Th17 细胞数量 佛波脂和离子霉素下调 T 细胞表面 CD4 分子的表达,因此本实验以 CD3⁺CD8⁻IL-17⁺ 细胞定义 Th17 细胞;而 Treg 细胞被定义为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞。按试剂盒步骤对 Th17 和 Treg 细胞进行荧光抗体染色,孵育完成后上流式细胞仪检测,结果以阳性细胞所占百分比表示。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测绒毛和蜕膜中 RORγt 和 Foxp3 的 mRNA 水平 收集所有入选对象的绒毛和蜕膜,用 PBS 冲洗去除黏液和血液。无菌条件下剪碎组织,加入 0.25% 的胰酶-EDTA(pH8.0)于 37℃消化 1 h,参照 TRIzol 试剂盒说明书方法抽提总 RNA,并采用随机引物和 RNase H 反转录试剂盒生成 cDNA,然后采用 SYBR Premix Taq 试剂盒在荧光定量 PCR 仪上完成扩增检测。引物序列为 Foxp3, F: 5'-TCT TCC TTG AAC CCC ATG CC-3', R: 5'-AAA TGT GGC CTG TCC TGG AG-3'; RORγt, F: 5'-GAG CCA AGG CTC AGT CAT GAG AA-3', R: 5'-GTC CCT CTG CTT CTT GGA CAT-3'。以上所有实验均设置复孔检测。mRNA 定量采用相对 Ct 法^[6],看家基因 GAPDH 用作标准化,无模板标本用作无模板对照,目的基因定量公式为 $2^{-\Delta Ct} = \text{Power}(2, -(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}))$ 。

1.3.4 ELISA 检测外周血细胞因子水平 收集所有入选对象外周静脉血,800×g 离心 10 min 分离血清备用。采用商品化的 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-17A、IL-17F、TGF-β 和 IL-10 的水平。以上所有实验均设置复孔检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 Student-*t* 检验, Th17 细胞数量与 Th17 相关细胞因子水平,以及 Treg 细胞数量与 Treg 相关细胞因子水平间的相关性采用线性相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg 和 Th17 细胞数量 RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg 细胞数量均分别低于正常对照组($t=7.499, P<0.01; t=6.701, P<0.01$);RSA 患者绒毛和蜕膜中 Th17 细胞数量均分别高于正常对照组($t=7.994, P<0.01; t=8.694, P<0.01$);RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 比值均分别低于正常对照组($t=10.030, P<0.01; t=11.122, P<0.01$),见表 1。

表 1 RSA 患者和正常对照组绒毛和蜕膜中 Treg 和 Th17 细胞数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th17(%)		Treg(%)		Treg/Th17(%)	
		绒毛	蜕膜	绒毛	蜕膜	绒毛	蜕膜
正常对照组	30	3.89±1.59	4.08±1.54	12.22±2.75	11.76±3.28	3.14±1.12	2.88±0.95
RSA 组	30	7.84±2.19	8.15±2.05	7.72±1.80	7.20±1.77	0.98±0.37	0.88±0.26
<i>t</i>		7.994	8.694	7.499	6.701	10.030	11.122
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 RSA 患者绒毛和蜕膜中 RORγt 和 Foxp3 的 mRNA 水平 RSA 患者绒毛和蜕膜中 Foxp3 表达均明显低于正常对照组($t=14.132, P<0.01; t=14.411, P<0.01$),而 RORγt 表达均明显高于正常对照组($t=14.132, P<0.01; t=12.377, P<0.01$)。其中 RSA 患者绒毛中 RORγt 表达是正常对照组的 2.5 倍(5.7/2.3),蜕膜中 RORγt 表达是正常对照组的 3.0 倍(17.1/5.7);绒毛中 Foxp3 表达是正常对照组的 0.2 倍(2.1/10.5),蜕膜中 Foxp3 表达是正常对照组的 0.2 倍(1.5/7.5),见表 2。

2.3 RSA 患者外周血中 Treg 和 Th17 相关细胞因子水平 RSA 患者外周血中 Treg 细胞相关细胞因子 TGF-β 和 IL-10 水平均明显低于正常对照组($t=10.691, P<0.01; t=13.182, P<0.01$),而 Th17 相关细胞因子 IL-17A 和 IL-17F 水平均明

显高于正常对照组($t=12.030, P<0.01; t=11.601, P<0.01$),见表 3。

表 2 RSA 患者和正常对照组绒毛和蜕膜中 RORγt 和 Foxp3 的 mRNA 水平比较($n=30, \bar{x} \pm s$)

组别	n	绒毛		蜕膜	
		RORγt	Foxp3	RORγt	Foxp3
正常对照组	30	2.3±0.7	10.5±3.2	5.7±1.2	7.5±2.2
RSA 组	30	5.7±1.1	2.1±0.6	17.1±4.9	1.5±0.6
t		14.283	14.132	12.377	14.411
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 RSA 患者和正常对照组外周血 Treg 和 Th17 相关细胞因子比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	n	IL-17A	IL-17F	TGF-β	IL-10
正常对照组	30	15.83±4.25	20.17±5.63	352.64±97.52	556.41±112.81
RSA 组	30	43.21±11.72	45.48±10.54	143.28±44.65	231.47±74.18
t		12.030	11.601	10.691	13.182
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 RSA 患者和正常对照组绒毛和蜕膜中 Treg、Th17 细胞数量与外周血相关细胞因子的关系 RSA 患者和正常对照组绒毛中 Treg 数量与外周血 TGF-β、IL-10 水平呈正相关($r=0.966, P<0.01; r=0.961, P<0.01$),蜕膜中 Treg 数量与外周血 TGF-β、IL-10 水平也呈正相关($r=0.955, P<0.01; r=0.952, P<0.01$);RSA 患者和正常对照组绒毛中 Th17 数量与外周血 IL-17A、IL-17F 水平呈正相关($r=0.961, P<0.01; r=0.953, P<0.01$),蜕膜中 Th17 数量与外周血 IL-17A、IL-17F 水平也呈正相关($r=0.967, P<0.01; r=0.972, P<0.01$)。

3 讨 论

RSA 是目前难治性不育中急需解决的问题,一般认为与染色体异常、内分泌失调、生殖结构畸形和感染有关;此外尚约有 60%~70% 患者原因不明,研究发现 RSA 患者体内免疫失衡可能是重要原因之一。Treg 和 Th17 细胞是近年来新发现的不同于 Th1、Th2 的 CD4 阳性 T 细胞亚群,Treg 细胞是一种下调免疫应答的细胞,表达 Foxp3 并通过接触抑制或分泌 IL-10 和 TGF-β 等细胞因子发挥维持自身免疫耐受和抗炎的功能;Th17 细胞表达 RORγt,主要分泌 IL-17A 和 IL-17F,可能在自身免疫性疾病、炎症和肿瘤等多种免疫性疾病中起重要作用^[2]。研究表明,Treg/Th17 平衡失调与多种疾病有关^[3],而其与 RSA 的关系目前尚不清楚。

正常的母胎免疫耐受是成功的妊娠过程的有力保证,正常孕妇的母胎免疫耐受既能抵抗微生物感染又不排斥表达半同种异体父系抗原的胚胎或胎儿^[7]。Treg 细胞是一群独特的 CD4⁺ T 细胞亚群,具有免疫抑制功能,介导体内的免疫抑制效应,是维持免疫耐受和控制免疫应答的重要细胞。Treg 细胞数量降低与机体受损的免疫内环境稳定和自身免疫性疾病的发生有关^[8]。正常妊娠的小鼠和人类 Treg 细胞数量明显增多,在母体免疫细胞首次接触胎儿抗原是起关键的保护作用。Treg 细胞增殖不足的小鼠有流产倾向,而正常妊娠小鼠的

Treg 细胞的增殖能力较高;有流产倾向的小鼠经过继免疫来自正常妊娠小鼠的 Treg 细胞能够阻止自发流产的发生^[9]。本研究发现,RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg 细胞数量和 Foxp3 的 mRNA 水平均低于正常对照组,其外周血中 TGF-β 和 IL-10 水平也均低于正常对照组;同时,RSA 患者和正常对照组的绒毛和蜕膜中 Treg 细胞数量与外周血中 TGF-β 和 IL-10 水平呈正比。活化的 Treg 细胞能分泌包括 TGF-β 和 IL-10 等大量的免疫抑制因子,而 TGF-β 和 IL-10 参与调节 Treg 细胞的数量和功能,TGF-β 是维持 Treg 细胞数量和功能的关键因子,IL-10 能诱导 Treg 细胞的产生^[10]。因此,本研究结果提示,RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg 细胞数量减低和功能缺陷减弱了患者的免疫抑制功能,并与自发性流产的发生密切相关。

Th17 细胞是另一群不同于 Th1、Th2 和 Treg 细胞的 CD4⁺ T 细胞,分泌 IL-17A、IL-17F、IL-22 和 IL-26 等细胞因子,原始 CD4⁺ T 细胞在 TGF-β、IL-6、IL-23 和 IL-1 的作用下分化为 Th17 细胞^[11]。Th17 细胞可能在自身免疫性疾病、炎症和肿瘤等多种免疫性疾病中起重要作用^[12]。本研究发现,RSA 患者绒毛和蜕膜中 Th17 细胞数量和 RORγt 的 mRNA 水平均高于正常对照组,其外周血中 IL-17A 和 IL-17F 水平也均高于正常对照组;同时,RSA 患者和正常对照组的绒毛和蜕膜中 Th17 细胞数量与外周血中 IL-17A 和 IL-17F 水平呈正比。IL-17 通过介导中性粒细胞浸润,激活 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α、NO、基质金属蛋白酶、NF-κB 配体的受体活化剂和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子而引发炎症反应^[13]。因此,本研究结果提示,RSA 患者绒毛和蜕膜中 Th17 细胞数量增多和过度的功能活化增强了患者的炎症反应,并与自发性流产的发生密切相关。

近年来 Treg/Th17 平衡与妊娠的关系受到广泛重视,研究发现 RSA 患者外周血和蜕膜中 Treg 细胞明显减少^[14],作者前期研究也证实 RSA 患者外周血 Treg 细胞数量低下且免疫下调性细胞因子 TGF-β 和 IL-10 水平降低^[15]。本研究发

现, RSA 患者绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 比值明显低于正常对照组。Th17 和 Treg 细胞来自同样的前体细胞, 原始 CD4⁺ T 细胞在 TGF- β 和 IL-6 刺激下分化为 Th17 细胞而在 TGF- β 刺激下分化为 Treg 细胞; 同时 Treg 细胞转录因子 Foxp3 和 Th17 细胞转录因子 ROR γ t 能够相互抑制对方的功能。因此, 本研究结果提示, Treg/Th17 平衡失调与自发性流产的发生有关。

总之, 本研究结果表明绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 数量和功能平衡在维持正常妊娠中发挥重要作用, 绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 数量和功能失衡可能参与 RSA 免疫发病机制。探讨绒毛和蜕膜中 Treg/Th17 细胞数量和功能平衡与 RSA 发病机制的关系, 将可能为诊断和治疗 RSA 的治疗提供理论和实验依据。

参考文献

- [1] Bubanovic IV. Induction of thymic tolerance as possibility in prevention of recurrent spontaneous abortion[J]. Med Hypotheses, 2003, 60(4): 520-524.
- [2] Peiser M. Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 261037-261039.
- [3] Galati D, De Martino M, Trotta A, et al. Peripheral depletion of NK cells and imbalance of the Treg/Th17 axis in idiopathic pulmonary fibrosis patients[J]. Cytokine, 2014, 66(2): 119-126.
- [4] Wang WJ, Liu FJ, Qu HM, et al. Regulation of the expression of Th17 cells and regulatory T cells by IL-27 in patients with unexplained early recurrent miscarriage[J]. J Reprod Immunol, 2013, 99(1/2): 39-45.
- [5] Lin QD, Qiu LH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of recurrent spontaneous abortion with immune type[J]. Front Med China, 2010, 4(3): 275-279.
- [6] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data

by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.

- [7] Gobert M, Lafaille JJ. Maternal-fetal immune tolerance, block by block[J]. Cell, 2012, 150(1): 7-9.
- [8] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance[J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.
- [9] Yin Y, Han X, Shi Q, et al. Adoptive transfer of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells for prevention and treatment of spontaneous abortion[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 161(2): 177-181.
- [10] Wang BL, Su H, Chen Y, et al. A role for trichosanthin in the expansion of CD4CD25 regulatory T cells[J]. Scand J Immunol, 2010, 71(4): 258-266.
- [11] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H) 17 cells[J]. Nature, 2008, 454(7202): 350-352.
- [12] Qi W, Huang X, Wang J. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment[J]. Cell Immunol, 2013, 285(1/2): 18-22.
- [13] Zhao L, Tang Y, You Z, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18909.
- [14] Wang WJ, Hao CF, Yi L, et al. Increased prevalence of T helper 17(Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients[J]. J Reprod Immunol, 2010, 84(2): 164-170.
- [15] 杨小猛, 赵丹, 陈书恩, 等. CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞、TGF- β 和 IL-10 在反复自然流产中的变化[J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(12): 19-21.

(收稿日期: 2014-05-03 修回日期: 2014-09-21)

(上接第 21 页)

- [4] Wong KL, Wong CT, Liu WC, et al. Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites[J]. Biomaterials, 2009, 30(23/24): 3810-3817.
- [5] 王雪毓, 陈玲, 苏健裕, 等. 高直链玉米淀粉对聚己内酯组织工程支架结构和性能的影响[J]. 华南理工大学学报, 2009, 37(12): 18-22.
- [6] 王杨, 胡金莲. 抗感染纳米羟基磷灰石局部药物缓释微球的研制及体外释药实验[J]. 家庭医药: 医药论坛, 2010, 2(11): 818-820.
- [7] 章柏平, 汤善华, 张立, 等. 可塑性纳米羟基磷灰石/聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物-聚乙二醇释药系统治疗兔骨髓炎[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(21): 3871-3876.

- [8] 杨春丽, 刘金辉, 蔡旗. 热毒宁注射液联合盐酸氨溴索注射液佐治婴幼儿毛细支气管炎的疗效观察[J]. 中国医药指南, 2013, 11(33): 199-200.
- [9] 曹耿华, 毕衍泽, 陈民芳, 等. 骨折内固定用新型 Mg-Zn-Ca/HA 复合材料的成分、组织结构与性能[J]. 稀有金属材料与工程, 2013, 42(8): 1633-1637.
- [10] Peng QY, Cong PH, Liu XJ, et al. The preparation of PVDF/clay nanocomposites and the investigation of their tribological properties[J]. Wear, 2009, 266: 713-720.
- [11] Kim HJ, Kim UJ, Kim HS, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds[J]. Bone, 2008, 42(6): 1226-1234.

(收稿日期: 2014-04-24 修回日期: 2014-09-19)