

血管化在骨组织工程的作用及其相关影响因素探讨

程丽佳^{1,2*}, 蓝艺鑫^{1*}, 何鸿雁^{1*}, 唐昊宇¹, 冯启洋¹, 咎丽¹, 王育壮¹, 姚奇¹, 王娟^{3#}

¹成都大学医学院, 四川 成都

²成都大学附属医院(临床医学院), 四川 成都

³成都中医药大学公共卫生学院, 四川 成都

Email: #everzijin@cdu.tcm.edu.cn

收稿日期: 2020年8月31日; 录用日期: 2020年9月15日; 发布日期: 2020年9月22日

摘要

近年来,随着骨组织工程研究的逐步深入,发现血管化是骨缺损疾病愈合的关键。骨缺损修复的过程中,血管的生长及血管网的建立有益于移植部位的血供及营养成分的供给,从而促进骨缺损处骨组织的生长及愈合。本文将对血管化在骨组织工程中的作用及其相关影响因素进行探讨。

关键词

骨组织工程, 生物材料, 血管化

The Role of Vascularization in Bone Tissue Engineering and Its Related Influencing Factors Were Discussed

Lijia Cheng^{1,2*}, Yixin Lan^{1*}, Hongyan He^{1*}, Haoyu Tang¹, Qiyang Feng¹, Li Zan¹, Yuzhuang Wang¹, Qi Yao¹, Juan Wang^{3#}

¹School of Medicine, Chengdu University, Chengdu Sichuan

²Affiliated Hospital & Clinical College of Chengdu University, Chengdu Sichuan

³School of Public Health, Chengdu University of Traditional Chinese medicine, Chengdu Sichuan

Email: #everzijin@cdu.tcm.edu.cn

Received: Aug. 31st, 2020; accepted: Sep. 15th, 2020; published: Sep. 22nd, 2020

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 程丽佳, 蓝艺鑫, 何鸿雁, 唐昊宇, 冯启洋, 咎丽, 王育壮, 姚奇, 王娟. 血管化在骨组织工程的作用及其相关影响因素探讨[J]. 生物医学, 2020, 10(4): 75-81. DOI: 10.12677/hjbm.2020.104011

Abstract

In recent years, with the development of bone tissue engineering, it has been found that vascularization is the key to bone defect healing. In the process of bone defect repair, the growth of blood vessels and the establishment of vascular network are beneficial to the blood supply and nutrient supply of the graft site, so as to promote the growth and healing of bone tissue at the bone defect site. This paper will discuss the role of vascularization in bone tissue engineering and its related influencing factors.

Keywords

Bone Tissue Engineering, Biomaterials, Vascularization

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球每年有大量大面积创伤与大段骨缺损疾病产生，骨组织修复已成为临床上急需解决的问题。大量研究表明，骨组织工程血管化是引起骨缺损愈合和恢复的关键因素，主要包括血管发生和血管生成[1]。在骨组织工程中，骨缺损部位在组织修复时，血管的生长及毛细血管网的建立可以为骨组织提供营养支持，若材料不利于血管的生长，最终骨缺损移植部位会因为血供不足，骨组织无法生长而难以达到修复与愈合的目的。影响骨移植材料血管化的因素可从支架材料的力学性能和结构特征、种子细胞的联合培养、生长因子的添加三个方面进行探究(图 1)。其基本思路即在骨替代生物材料上赋予生长因子与种子细胞后植入体内，生长因子作为信号分子募集骨形成细胞，种子细胞的植入有利于骨组织的形成与生长，支架用于支撑血管以及细胞的黏附、爬行、生长[2]。其中生物材料支架作为核心，为骨缺损部位提供一定的机械稳定性，同时可作为生物活性因子及移植细胞的转载体，是实现生物活性因子时空调控和动态血管重新生成的关键组分[3]。由于血管化在骨组织工程中起着极其重要的作用，因此探究促进缺损骨组织血管化的方法在临床应用中意义重大。

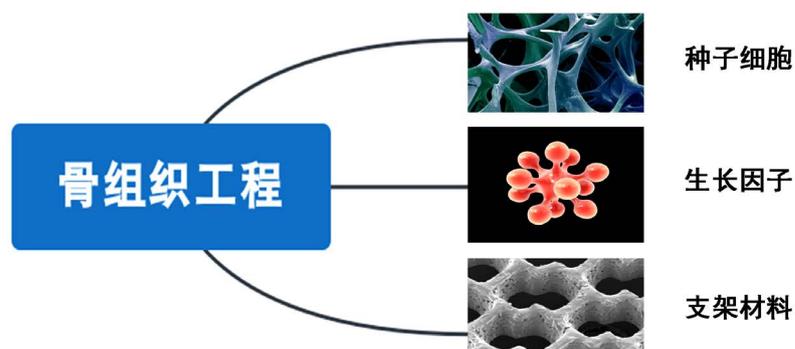


Figure 1. Three elements of bone tissue engineering

图 1. 骨组织工程的三要素

2. 支架材料在骨组织工程中的应用

2.1. 支架材料的血管化过程

骨缺损问题在临床操作手术中常使用骨替代物进行相关治疗。在利用骨替代生物材料进行治疗的过程中，血管化为骨组织形成与生长的核心。支架材料在体内的血管化过程主要包括血管发生及血管生成[4]。血管发生过程类似于胚胎发育过程中循环系统的建立，指来源于中胚层的血管祖母细胞在原位聚集生长和分化，逐渐形成初始的血管丛；血管生成是指在已有的毛细血管及毛细血管后静脉的基础上形成新的血管。血管生成的方式包括：① 内皮细胞发芽式生长，即内皮细胞向官腔外增殖、扩张；② 内嵌式生长，即组织间质向血管腔内生长，将血管腔一分为二。在骨组织的生理状态下，骨缺损的自身修复主要由血肿形成、血肿机化、骨痂形成和骨痂改建 4 个阶段完成[5]。骨组织工程生物材料植入后，在移植早期会出现与正常生理状态下相同的局部创伤、血肿形成及纤维化过程，而后在移植体与骨断端之间的纤维组织中出现以下变化(图 2)。

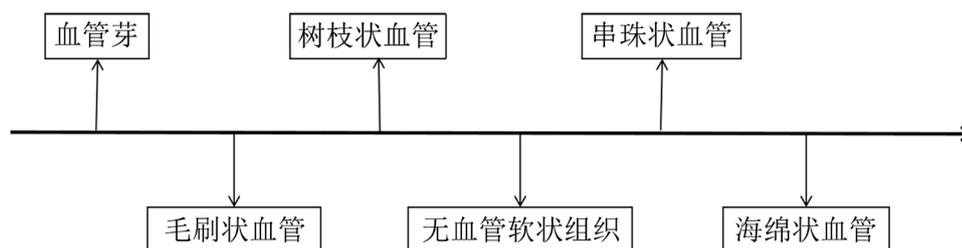


Figure 2. Bone tissue growth process after biomaterial implantation

图 2. 生物材料植入后骨组织生长过程

骨组织材料中血管生成后，相关的血管组织交错形成新的毛细血管网，同时经植入物沿血管网长入，并逐渐向组织深处扩散，使得骨移植体的材料边缘填充从而变得模糊[6]。最近的一项研究对骨组织中血管长入支架材料的过程进行了描述[7]，即材料植入后，首先引起局部创伤，炎症因子释放并沿着细小通道侵入材料孔隙，进而形成间充质组织；同时，血管内皮细胞从周围组织迁移到材料间隙中或者沿材料攀附生长，促进血管生成，随后毛细血管会沿着周围材料长入形成细小的通道，并在间充质组织中形成血管网络。随着相关血管网络向材料内不断扩散延伸，骨组织材料逐渐被降解，随之被新生组织爬行替代，最终引起组织钙化成骨。该过程即是通过植入支架材料来完成对缺损区域的填充及连接。

2.2. 支架材料的性能

支架是用于模拟骨组织细胞外基质的一种临时性机械结构。其主要目的是为骨重塑提供一个合适的环境，在骨重塑过程中可发生最小的并发症[8]。支架本身具有的性能作为整个支架的主体部分，是直接影响支架材料在体内移植成功与否的关键因素，理想的支架[9]要求具有良好的生物相容性、机械性能、可塑性、生物可降解性、合适的孔径和孔隙度等。

2.2.1. 支架材料的生物相容性

生物相容性是指材料与组织间的局部相容性[10]，良好的生物相容性主要表现为支架材料不引发任何的毒性效应及炎症反应，同时为细胞的生长提供良好的微环境[11]。在骨材料植入生物体后，为促进骨组织的血管生成及血管网的建立，保证骨组织愈合与缺损处的修补，支架材料的生物相容性在其中的作用不容小觑。现主要支架材料有天然高分子材料、合成高分子材料、医用生物陶瓷材料和生

物医用金属材料等。其中胶原、壳聚糖(Chitosan)、纤维蛋白凝胶、海藻酸钠(Sodium alginate)和丝素蛋白等天然高分子材料[12]无毒、抗原性弱,具有良好的亲水性、生物相容性、细胞亲和性以及降解性,但由于其机械强度较差,降解速度不易控制,故在应用于临床时常表现出一定的局限性。聚酯类材料[13]如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚(乙酸-共聚-乙醇酸)(PLGA)、聚(ϵ -己内酯)(PCL)和聚- β -羟丁酸(PHB)等合成高分子材料有良好的生物降解性,可为组织细胞的长入提供合适的空间、可塑性较高,同时该材料具有可调节性生物降解周期,在一定程度上弥补了天然高分子材料的缺陷;然而与这些优点并存的还有其较弱的机械性能和免疫功能。生物活性晶体生物陶瓷如磷酸钙[14]具有良好的生物相容性、骨传导性、骨诱导性,但其脆性大、抗折强度低、降解速度难以控制、不适用于承重骨缺损的修复,致使其不能与新生骨形成相匹配。Barre 等在其研究中提出了一种基于海藻酸盐的水凝胶材料,该材料表现出良好的生物相容性,同时其具有促进皮下移植部位细胞的长期存活和血管网形成方面的潜力[15]。随着骨支架材料的不断发展,单一的材料支架已无法满足机体对支架材料的要求,因此研究者们提出将两种及以下的生物材料复合,制成复合型支架,进而提高其各方面的性能。目前,天然高分子材料与合成高分子材料的杂交是一种很有前途的新型骨组织工程支架,其结合了两种材料的优点,满足了生物活性、机械强度、易塑型等多项要求[16]。多种材料组合有利于发挥材料优势,使材料的生物相容性比单一材料更易满足机体需求,同时复合型材料由于具有可调节的降解速率、良好的机械性能等优点,近年来一直是业内研究的焦点[17]。

2.2.2. 支架材料的可降解性及其孔隙度

生物材料的降解在骨组织工程中也起着不容忽视的作用,根据靶组织的不同,支架应在可控的降解速率下降解以支持新骨的形成,支架材料的降解速率应与再生骨的生长速率相匹配。在骨组织工程中,支架的制造原料首选生物降解材料,目前,有众多具备良好生物降解性的骨修复材料,在已用于支架制备研究的材料中,合成高分子材料虽具有一定的可降解性,但其降解速率参差不齐,且其降解速率越快,酸性副产物越多[18],支架降解和降解衍生物可能引起免疫原性反应,引起环境变化,影响其中包埋药物/生长因子的释放和细胞活性[19]。丝素蛋白是一种主要由蚕和蜘蛛产生的纤维蛋白,其在骨组织工程中可调节生物降解率,同时支持骨髓间充质干细胞向成骨细胞系分化的能力[20]。

在骨组织工程中,血管生成及血管网的建立均需依靠材料孔隙进行,支架应具有相互连接的结构和高孔隙度,以确保细胞穿透和营养物质充分扩散到结构内的细胞[21]。孔隙度高低是由内表面积和体积比体现出来的,内表面积和体积比越高,则孔隙度越高;一般来说,该比例越高,细胞附着和骨生长情况越好。然而,支架材料的孔隙度越高,其机械性能越差,对此,优化孔隙度的同时平衡好其机械性能至关重要[18]。

2.2.3. 支架材料的机械性能

理想情况下,支架材料需保证与植入部位准确吻合,同时应具有良好的机械性能。从实用角度来看,植入的支架必须足够坚固,以保证其在手术过程中的安全性以及术后完成相关功能恢复的能力。支架材料的机械性能主要指其力学性能,包括强度和韧性,良好的骨修复材料需模拟生物体骨组织的结构、成分等,与植入部位邻近组织的力学性能相匹配,同时能为新生组织提供一定的支撑结构[22]。单纯的天然高分子材料、合成高分子材料和医用生物陶瓷材料力学性能普遍较差,而低力学性能易引起材料早期塌陷,可导致组织再生不足或植入失败[19]。对此,生物陶瓷和生物活性玻璃等材料等常被添加到天然聚合物和合成聚合物中,以创造具有增强机械性能和生物性能的支架,复合支架中常用到的生物陶瓷主要为羟基磷灰石和磷酸三钙。人工合成的纳米羟基磷灰石复合材料中加入玻璃和其他矿物作为填料有助于提高支架材料的力学性能,且允许定制材料以满足特定的功能和几何要求[18]。

3. 种子细胞联合培养的应用

在近年的骨组织工程研究中, 血管生成相关种子细胞与成骨种子细胞共同培养即种子细胞联合培养体系在血管生成和骨再生中的作用愈发得到重视。目前, 成骨种子细胞研究重点是种子细胞的来源, 主要有骨外膜、松质骨、骨髓基质细胞、骨外组织、胚胎干细胞等。脐静脉血管内皮细胞培养、大动脉和微动脉血管内皮属血管生成种子细胞主要来源。

根据培养的方式不同, 细胞培养的方法可分为体外培养和体内培养[23]。两种方法中细胞比例不同, 其促进成骨的效果也有一定差异, 张建[24]等已证明将成骨细胞与血管内皮细胞按 2:1 的比例培养具有较好的促成骨作用。在促进骨组织成骨的机制中, 成骨细胞与血管内皮细胞两种细胞之间主要依靠相互分泌的细胞因子对二者进行调控[25], 即已有研究提出以种子细胞 - 细胞因子 - 支架材料三种联合的体系能促进血管化。

在骨组织工程中, 通过将成骨细胞、破骨细胞[26]的空间分布对骨缺损等疾病的治疗效果进行对比。破骨细胞中, 由于不同细胞的表面微型孔和孔隙结构, 骨组织细胞在空间分布中的不同。种子细胞的联合培养结合观察细胞生长状况, 从而进行相关骨组织工程的研究。

4. 促血管化细胞因子的应用

促血管化细胞生长因子主要包括血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)、血管紧张素(Angiotensin, Ang)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)及骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等。VEGF 是血管形成的关键因子[27], 主要作用于血管化早期, 以血管内皮细胞为靶细胞, 促进原始血管网形成。Ang 常表达于内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等多种细胞, 主要作用于血管改建、塑形, 促进血管网生成。FGF 以内皮细胞(endothelial cells, ECs)在内的多种细胞为靶细胞, 既能促进 ECs 分裂, 又能趋化 ECs, 具有强烈的促进血管生成作用。BMP 属于转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)家族成员[2], 可通过诱导 VEGF 等细胞因子的生成, 间接促进血管化。它还能通过诱导多能干细胞分化为成软骨细胞和成骨细胞, 促进骨组织生成, 同时还可上调 VEGF 表达, 促进血管生成。

5. 血管化相关联合技术的应用

如今, 除种子细胞 - 细胞因子 - 支架材料的模式能促进血管化, 将显微外科技术与骨组织工程联合应用也可进行相关骨组织生物工程研究。现存在的几种相关技术主要有筋膜瓣包裹术、肌瓣、骨膜瓣植入技术、血管束植入技术和预构血管技术[28]。筋膜瓣包裹术[29]的核心在于将向体内移植带血管蒂的组织筋膜包裹于组织工程骨表面, 使筋膜内丰富的毛细血管沿材料表面长入材料内部, 促进缺损骨的生成及愈合; 肌瓣、骨膜瓣植入技术是将材料预先种植于血供丰富的带蒂肌瓣中, 待其完成成骨及再血管化后再进行移植; 血管束植入技术[30]是将血管束植入人工骨材料内, 血管束的植入可使材料中孔隙增加, 以此促进材料的血管化; 预构血管技术[31]是将具有内皮结构的血管预构于组织工程骨中, 预构成功后再将组织工程骨通过显微外科技术移植入体内行人工血管 - 宿主血管吻合术, 移植处便可即刻获得血供, 从而促进相关骨组织恢复与愈合。

综上, 几种人工构建血管技术, 肌瓣、筋膜瓣、血管束等在实际应用中均要求骨缺损部位组织具备植入的条件, 而临床中由于时间关系, 导致组织常纤维化而使条件难以完全满足, 以致上述操作在进行中存在一定困难。而显微外科技术在血管化中可快速准确向血管供血, 但其由于对技术要求高因而需要进一步探索。

6. 总结

骨组织工程的发展中, 材料的血管化影响组织的血管生成与血管网的建立, 进而促进组织的恢复和愈合。当前使材料血管化的方法主要有种子细胞的联合培养、生长因子的修复和支架材料构建血管等。随着这些技术的不断提升, 多种技术联合应用已成为骨组织工程血管化相关研究的研究重点。在相关技术的应用中, 3D 打印方法与传统支架制备方法结合, 在支架制备中具有较大的潜力; 新型复合型材料在实际应用方面体现出较大的优势, 弥补了单一材料的缺点, 多方面促进骨组织工程血管化; 促血管化因子的运用能帮助并诱导细胞分化促进成骨生成等。由于不同的单一的材料具有不同的优缺点, 故临床上常利用多种材料结合的方法, 促进骨组织血管化的生成。但由于骨组织工程的复杂性和特殊性, 相比之下, 自体骨的优势仍十分显著。随着对骨组织血管化相关方面的深入了解, 结合多学科进行研究, 人工骨替代天然骨必将成为未来的发展趋势。

基金项目

本文由四川省卫生健康科研课题普及项目(19PJ161), 四川省教育厅高等教育人才培养质量和教学改革项目(JG2018-783), 四川省科技厅项目(2018JY0348), 肉类加工四川省重点实验室开放基金(19-R-04, 19-R-05), 国家级大学生创新创业训练计划项目(201911079025, 201911079040X), 四川省创新创业训练计划项目(S202011079036X, S202011079122X 和 S202011079135S)和成都大学大学生创新创业训练计划项目(CDU_CX_2020340, CDU_CX_2020341 和 CDU_CX_2020351)资助。

参考文献

- [1] 赵天源, 孙红. 骨组织工程支架材料及其血管化的研究进程[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(38): 6832-6838.
- [2] 李海艳, 邹柳, 申利贤, 等. 支架、细胞、因子: 组织工程血管化策略的研究与前景[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(14): 2259-2265.
- [3] 李婧, 王怀明. 修饰生物材料促进骨组织工程血管化研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(2): 258-263.
- [4] Brey, E.M., Uriel, S., Greisler, H.P. and McIntire, L.V. (2005) Therapeutic Neovascularization: Contributions from Bioengineering. *Tissue Engineering*, **11**, 567-584. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.567>
- [5] 杨飞. 新型促血管化骨组织工程支架材料制备及体内外生物学性能评价[D]: [硕士学位论文]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [6] 程丽佳, 鄢硕, 时政, 等. 羟基磷灰石/磷酸三钙生物材料植入小鼠体内的血管化过程[J]. 生物医学工程学杂志, 2017, 34(1): 83-86.
- [7] 张志达, 江晓兵, 沈耿杨, 等. 磷酸钙及硫酸钙支架在骨组织工程中的研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(8): 1203-1209.
- [8] Kantaros, A., Chatzidai, N. and Karalekas, D. (2016) 3D Printing-Assisted Design of Scaffold Structures. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, **82**, 559-571. <https://doi.org/10.1007/s00170-015-7386-6>
- [9] Bianco, P. (2015) Stem Cells and Bone: A Historical Perspective. *Bone*, **70**, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.011>
- [10] 朱超, 蒋欣泉, 张志愿. 丝蛋白作为骨组织工程支架材料的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(5): 541-543.
- [11] 龚明明, 谭丽丽, 杨柯. 骨组织工程支架材料及其力学性能[J]. 材料导报, 2007, 21(10): 43-46+54.
- [12] 李金雨. 利用羟基磷灰石支架孔隙结构调控血管生长和异位骨形成[D]: [博士学位论文]. 成都: 西南交通大学, 2016.
- [13] 吕洪磊, 张彩云, 顾玉芳, 等. 羟基磷灰石/壳聚糖/聚乳酸骨组织工程支架材料生物相容性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(5): 561-564.
- [14] 乔永军, 翟仲军, 陈丽梅, 等. 具有抗菌性和生物相容性的壳聚糖/羟基磷灰石三维复合材料: 一种具有抗菌能力的骨组织工程支架[J]. 科学通报, 2015, 60(33): 3273.

- [15] Barre, A., Naudot, M., Colin, F., Sevestre, H., Collet, L., Devauchelle, B., Lack, S., Marolleau, J.P. and Le Ricousse, S. (2020) An Alginate-Based Hydrogel with a High Angiogenic Capacity and a High Osteogenic Potential. *BioResearch Open Access*, **9**, 174-182. <https://doi.org/10.1089/biores.2020.0010>
- [16] Zhang, L., Yang, G.J., Johnson, B.N. and Jia, X.F. (2019) Three-Dimensional (3D) Printed Scaffold and Material Selection for Bone Repair. *Acta Biomaterialia*, **84**, 16-33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>
- [17] 张迪峰, 余霄, 庞清江. 骨组织工程支架及骨修补材料: 复合型骨移植材料的前景更好[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(26): 4253-4258.
- [18] Wubneh, A., Tsekoura, E.K., Ayranci, C. and Uludağ, H. (2018) Current State of Fabrication Technologies and Materials for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, **80**, 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>
- [19] Yang, D.W., Xiao, J.Y., Wang, B.Y., Li, L., Kong, X.L. and Liao, J.F. (2019) The Immune Reaction and Degradation Fate of Scaffold in Cartilage/Bone Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C*, **104**, Article ID: 109927. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109927>
- [20] Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K. and Hofmann, S. (2016) Silk Fibroin as Biomaterial for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, **31**, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.005>
- [21] Preethi Soundarya, S., Haritha Menon, A., Viji Chandran, S. and Selvamurugan, N. (2018) Bone Tissue Engineering: Scaffold Preparation Using Chitosan and Other Biomaterials with Different Design and Fabrication Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, **119**, 1228-1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.056>
- [22] 魏晨旭, 何怡文, 王聃, 侯婧霞, 谢辉, 殷放宙, 陈志鹏, 李伟东. 组织工程学中骨修复材料的研究热点与进展[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(10): 1615-1621.
- [23] 彭坤, 李婧, 王斯睿, 等. 可降解血管支架结构设计及优化的研究进展[J]. 中国生物医学工程学报, 2019, 38(3): 367-374.
- [24] 张健. 成骨细胞与血管内皮细胞联合培养复合肌瓣构建血管化组织工程骨的实验研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2005.
- [25] 宁钰, 赵红斌. 生物支架材料在骨组织工程中的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(46): 105-106.
- [26] 钱超, 郭杨, 马勇. 骨组织工程中成骨、破骨细胞三维空间培养的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(2): 280-282.
- [27] Boyan, B.D., Cohen, D.J. and Schwartz, Z. (2017) 7. 17 Bone Tissue Grafting and Tissue Engineering Concepts. In: Ducheyne, P., Ed., *Comprehensive Biomaterials II*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, 298-313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10240-1>
- [28] Spicer, P., Young, S., Kasper, F.K., Athanasiou, K.A., Mikos, A.G. and Wong, M.E.-K. (2014) Tissue Engineering in Oral and Maxillofacial Surgery. In: Lanza, R., Langer, R. and Vacanti, J., Eds., *Principles of Tissue Engineering*, 4th Edition, Academic Press, Cambridge, 1487-1506. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00071-9>
- [29] 王炜. 带蒂筋膜瓣包裹组织工程骨血管化的实验研究[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2011.
- [30] 张春梅, 田洪玲, 赵洁, 等. 肝素抗凝材料联合血管束植入修复骨缺损的血管化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(21): 3944-3951.
- [31] 张迅. VEGF 促进兔同种异体骨异位预构骨皮瓣的进程[D]: [硕士学位论文]. 新乡: 新乡医学院, 2016.