

· 基础研究 ·

同种异体肌腱羟脯氨酸测定的正交试验

万彦林¹, 高冰², 王丽敏², 胡永成^{3*}, 夏群¹

(1. 天津市第一中心医院骨科, 天津 300192; 2. 北京威达峰医学生物材料有限责任公司, 北京 101102;

3. 天津市天津医院骨与软组织肿瘤科, 天津 300211)

摘要: [目的] 探讨不同因素对检测同种异体肌腱中羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量的影响。[方法] 使用分光光度计, 基于正交试验的方法, 对同种异体肌腱进行 HYP 含量检测, 以样品的酶解时间 (4、12、24 h)、酶解的水浴温度 (37℃、60℃、100℃), 根据样品在酶解过程中需要盐酸优化酶解, 设定酸酶比 (1:2, 1:1, 2:1), 样品酶解时的水浴震荡频率 (180 r/min、200 r/min、250 r/min) 4 个单因素变量交替试验, 得到最优化检测因素。[结果] 单因素分析结果表明, 在其他变量不变的情况下, 酶解时间 12 h, 水浴温度为 60℃, 酸酶比为 2:1, 保证 pH 值为 7.4 左右, 200 r/min 震荡频率, 能保证 HYP 酶解效果最佳, 正交试验及极差分析表明酸酶比影响作用最大, 其他影响因素依次为水浴温度、震荡频率和时间。[结论] 同种异体肌腱 HYP 含量检测, 需调整 pH 值、温度、震荡频率及酶解时间保证酶的活性做高, 使样本检测率达到最高, 以期合理使用资源, 同时达到最佳的检测效果。

关键词: 同种异体肌腱, 羟脯氨酸, 分光光度法检测, 正交试验

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2024) 04-0356-06

An orthogonal test for spectrophotometry of hydroxyproline in allogeneic tendon // WAN Yan-lin¹, GAO Bing², WANG Li-min², HU Yong-cheng³, XIA Qun¹. 1. Department of Orthopedics, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; 2. Beijing Weidafeng Medical Biomaterials Co., LTD., Beijing 101102, China; 3. Department of Bone and Soft Tissue Oncology, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Abstract: [Objective] To investigate the influence of different factors on the spectrophotometry of hydroxyproline (HYP) in allogeneic tendon. [Methods] The HYP content of allograft tendons was detected by spectrophotometer based on orthogonal test. Four factors, including enzymolysis time (4 h, 12 h, 24 h), water bath temperature (37℃, 60℃, 100℃), acid-enzyme ratio (1:2, 1:1, 2:1), and water bath oscillation frequency (180 r/min, 200 r/min, 250 r/min) were set to explore the optimal assay conditions. [Results] The results of single factor analysis showed that under the condition that other variables remained unchanged, the enzymolysis time was 12 h, the water bath temperature was 60℃, the acid-enzyme ratio was 2:1, the pH value was about 7.4, and the shock frequency of 200 r/min could ensure the best enzymolysis effect of HYP. Orthogonal test and range analysis showed that the acid-enzyme ratio had the greatest effect. Other influencing factors are bath temperature, oscillation frequency and time. [Conclusion] In spectrophotometry of HYP content in allograft tendon, pH value, temperature, shock frequency and enzymolysis time should be adjusted to ensure high enzyme activity, so as to achieve the highest detection rate of samples, so as to rationally use resources and achieve the best assay efficiency.

Key words: allograft tendon, hydroxyproline, spectrophotometry, orthogonal test

肌腱损伤是骨科常见的疾患, 自体肌腱重建被认为是黄金标准, 由于自体肌腱移植能造成供区疼痛、瘢痕等并发症发生, 所以目前同种肌腱在严重的肌腱、韧带损伤修复领域应用广泛, 与自体肌腱移植相比, 同种肌腱移植具有诸多优势, 如来源丰富、无供区并发症、解剖形态匹配度更佳等。同种肌腱植入体内后, 在后期愈合过程中, 肌腱中的胶原蛋白起着重

要的作用, 胶原蛋白的氨基酸组成因其来源和蛋白质类型不同而有所差异^[1], 但羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 是胶原蛋白特有的氨基酸, 对维持胶原蛋白的稳定性具有重要作用, 所以测定 HYP 含量, 明确同种异体肌腱胶原蛋白含量, 对于评估使用同种异体肌腱的愈合有重要指导意义。

HYP 含量测定的方法有很多, 如比色法、氨基

DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2024.04.12

作者简介: 万彦林, 主治医师, 研究方向: 运动医学、关节外科、骨与软组织肿瘤, (电话) 13662005238, (电子信箱) jiamu010@163.com

* 通信作者: 胡永成, (电话) 13920006965, (电子信箱) huydoctor@163.com

酸自动分析法、气相色谱法、高效液相色谱法，其中，分光光度法又称为对二甲氨基苯甲醛法或氯胺 T 法，该方法是利用 HYP 经氯胺 T 氧化后，生成的吡咯与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色复合物，在 560 nm 波长下显色，其吸光度与 HYP 含量成正比。因其他方法耗时且费用高，而比色法快速、简便，并且普通实验室易实现，因此最为常用，但在相关的文献报道中，比色法的操作条件不完全一致，检测过程中不同的因素会造成检测结果产生很大差异，因此，有必要对 HYP 的测定条件进行优化，以确保测定结果的准确性。

本论文基于正交试验，使用分光光度法对测定 HYP 的影响因素进行了优化，主要分析包括酶解时间、水浴温度、酸酶比以及水浴震荡频率等因素，优化检测方法，提高 HYP 检测水平。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及来源

人体肌腱由北京威达峰医学生物材料有限责任公司提供。主要试剂包括：盐酸（天津大茂化学试剂厂）、胶原酶 I（200 U 北京索莱宝科技有限公司）、HYP 含量检测试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）、Tris-HCl 缓冲溶液（北京索莱宝科技有限公司）。主要仪器包括：电子天平（上海精其仪器有限公司）、紫外可见分光光度计（L5S 上海仪电分析仪器有限公司）、数显恒温水浴锅（HH5，上海力辰邦西仪器科技有限公司）、高速台式离心机（H1850，湘仪离心机仪器有限公司）、调速多用振荡器（HY-6A 型，常州鸿泽实验科技有限公司）、电热鼓风干燥箱（DHG-9055A，上海一恒科学仪器有限公司）、蒸馏器（上海宝蓝实验仪器制造有限公司）。

1.2 样品的准备

同种异体肌腱在无菌包装袋中，深低温（ $-80^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）下冷冻至少 30 d，室温复温，用无菌生理盐水冲洗 3 次，每次 20 min，使用一次性无菌脉冲清洗，直至肌腱颜色变白，彻底清除肌腱血液，无肉眼可见脂肪存在。将肌腱浸入体积比为 1 : 24 : 75 的过氧乙酸、无水乙醇和蒸馏水配制成含 0.2%（w/w）过氧乙酸和 24%（v/v）无水乙醇的混合溶液中，并在室温下保持 120 min，取出肌腱，纯化水冲洗 3 次后，将肌腱置于装有 95% 纯乙醇的台式恒温摇床（恒温 25°C ）中，连续脱脂 96 h，每 12 h 更换 1 次，用纯化水反复冲洗 3 次，每次 10 min，在干冰下保护下

使用 ^{60}Co 辐射源用 25 kGy 伽马射线进行辐射。经伽马辐照后的肌腱切成约 5 mm^3 的小块，使用万分之一精密天平准确称量重量并记录，备用。

1.3 试剂的配制

取试剂盒中浓度为 0.5 mg/ml HYP 标准液 300 μl 加入 4 700 μl 蒸馏水，混匀得 30 $\mu\text{g/ml}$ HYP 标准液；将 0.027 7 g 无水 CaCl_2 加入 Tris-HCl 缓冲溶液中，配制成含 50 mmol/l CaCl_2 溶液的 Tris-HCl 缓冲溶液 A。I 型胶原酶 200 U 约 7.4 g 加入 Tris-HCl 缓冲溶液中，配制成浓度为 0.74 mg/ml 缓冲溶液 B。

1.4 标准曲线的绘制

取 HYP 试剂盒中 HYP 标准品用蒸馏水稀释为 30、15、7.5、3.75、1.875、0.938、0.469、0.234、0.117 $\mu\text{g/ml}$ 的标准液，用分光光度计测其吸光度，以标准溶液的浓度为 x 轴， ΔA 标准为 y 轴（ ΔA 标准 = A 标准管 - A 空白管），绘制标准曲线，得到回归方程为 $y=0.071 1x+0.029 5$ ， $R^2=0.998 4$ ，表明 HYP 标准溶液在浓度范围内，其浓度与吸光度之间具有良好的线性关系。

1.5 单因素实验

将肌腱块放入含有 1.5 ml 缓冲液 A 的离心管中，充分浸泡肌腱，并将离心管置于 37°C 孵育 1 h；随后将缓冲液 B 加入离心管中，以样品的酶解时间（4 h、12 h、24 h）、样品酶解时的水浴温度（ 37°C 、 60°C 、 100°C ），根据样品在酶解过程中需要盐酸优化酶解，设定酸酶比（1 : 2，1 : 1，2 : 1），样品酶解时的水浴震荡频率（180 r/min、200 r/min、250 r/min）4 个单因素变量交替试验。孵育规定时间后，将消化后各组样品以 14 000 r/min 离心 10 min，移液枪取上清液 500 μl ，弃去未消化杂质，将上清液用蒸馏水定容至 1.5 ml 即为待测样品；再取 HYP 试剂盒中试剂一（氯胺 T）500 μl ，混匀，室温静置 20 min；再在上述溶液中分别加 500 μl 试剂二（二甲氨基苯甲醛）和 1 ml 蒸馏水，混匀，水浴 20 min；室温静置 15 min。取 4 ml 纯化水于比色皿，与待测液同步实验作为空白对照。酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 560 nm，使用蒸馏水调零；分别将样本移入比色皿中，使用分光光度计在 560 nm 波长下测定吸光度 A。将 ΔA 测定（ ΔA 测定 = A 测定管 - A 空白管）代入方程得到 x（ $\mu\text{g/ml}$ ），重复 3 次，取平均值，计算 HYP 含量。

1.6 正交试验优选 HYP 含量检测条件

根据预实验结果，以酶解时间、水浴温度、酸酶比及震荡频率为正交试验的 4 个因素，每个因素设定

3 个水平, 分别为 (4、12、24 h), (37℃、60℃和 100℃), (1:2, 1:1, 2:1), (180、200、250 r/min) 设定四因素三水平正交试验设计表。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件 (美国) 和 Minitab 21 软件 (美国) 对实验数据进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用用正交试验方差分析, 两两比较采用 LSD 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四种因素对 HYP 提取率的影响

四种因素对 HYP 提取率的影响见图 1。

酶解时间: 在 12 h 时, 在其他变量均不变的情况下, 肌腱酶解最相对于 24 h 最快, 相对于在 4 h 时, 溶解最彻底, 部分样本在 4 h 时未完全溶解, 在 12~24 h 内, 肌腱酶解量无明显改变, 所以, 单纯延长酶解时间不会增加酶解量, 12 h, 酶解效率最高。

水浴温度: 取等量底物, 加入适量胶原酶, 分别在 37℃、60℃、100℃水浴中酶反应, 考察反应温度对胶原酶水解胶原底物的影响。通过分析不同温度下酶促反应后的结果发现: 温度较低时, 随着温度的升高, I 型胶原酶活力提高, 在 60℃时达最大值, 之后温度升高酶活力基本不变。结合实验结果, 最终实验选择 60℃为最适反应温度。

酸酶比: 在 Tris-HCl 的有效缓冲范围内, 用盐酸调节配制不同 pH 的缓冲液, 考察反应 pH 对胶原酶水解胶原底物的影响。pH 在 6.6~7.4 时, I 型胶原酶的活性随着 pH 的升高而增大, 在 pH 为 7.4 时, 活性最强, 此时, 酸酶比约为 2:1。此后随着 pH 的升高 I 型胶原酶的活性降低。因此, I 型胶原酶过酸和过碱都不适合胶原酶的反应。

水浴震荡频率: 使用 Tris-HCl 作缓冲液, 调整水浴振荡器的震荡频率。观察到, 在 200 r/min 时, 底物酶解最彻底。在 180 r/min 时, 底物酶解不彻底, 在 250 r/min 时, 底物酶解时间较 200 r/min 时长, 且酶解不彻底。

2.2 极差与方差分析

正交试验结果 $L_9(3^4)$ 见表 1 所示。根据极差数值 R 较大者影响较强得出, 对 HYP 检测影响因素由强到弱依次为: 酸酶比、水浴温度、震荡频率、酶解时间。根据 K 数值得出优化参数为酸酶比为 2:1>水浴温度 60℃>震荡频率 200 r/min>酶解时间 12 h。

方差分析结果见表 2, 不同的影响因素对于 HYP

检测水平影响程度存在差异, 通过判断显著性数值与显著性水平进行比较, 酸酶比为主效应对 HYP 含量的测定影响差异有统计学意义 ($P=0.039$), 各影响主次顺序为: 酸酶比、水浴温度、震荡频率、酶解时间。

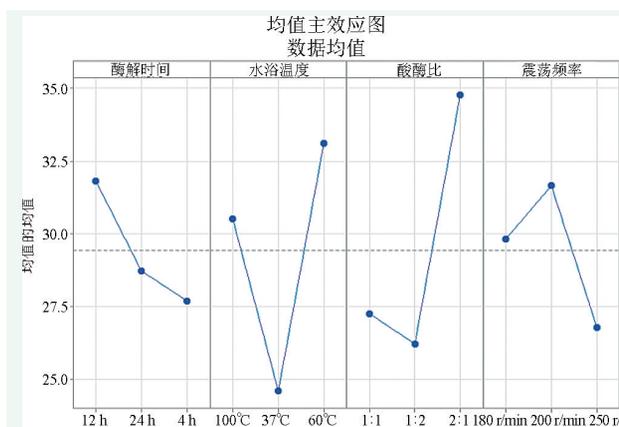


图 1 4 种单因素不同水平作用下 HYP 水平。

Figure 1. HYP levels under four univariate factors respectively.

3 讨论

运动造成的肌腱或者韧带损伤的情况逐年增加, 尤其表现在前交叉韧带损伤或者断裂, 为了维持关节功能, 减少因损伤后早期出现关节炎表现, 大部分患者需进行韧带重建手术治疗, 自体肌腱是手术选择的金标准, 但是由于自体肌腱的肌腱供区术后会出现疼痛、不适等情况, 所以使用同种异体肌腱进行手术修复是新的趋势。同种异体肌腱在临床使用前, 除了需要经过严格的供体筛查及取材过程保证无菌外, 为了降低生物负载, 需进行伽马辐照进行终末灭菌, 但是在伽马辐照灭菌过程中, 会造成胶原蛋白的损伤, 影响胶原蛋白的结构, 造成肌腱的生物力学及组织学出现改变, 所以观察胶原蛋白的稳定性至关重要。

胶原蛋白是丰富的蛋白质家族, 占总蛋白质含量的近四分之一^[2], 为大多数组织类型中的细胞提供支持 and 结构组织。胶原蛋白具有很大的拉伸强度, 其独特特征是具有规则排列的氨基酸^[3]。胶原蛋白每 100 个氨基酸残基含有 9.1 个 HYP 残基, 氨基酸允许胶原蛋白螺旋的急剧扭曲, 从而在结缔组织中建立和维持胶原蛋白分子的刚性结构^[4]。胶原蛋白的热稳定性与 HYP 的含量呈正相关, 有学者验证了运用 HYP 含量定量验证了其胶原蛋白稳定性的关系, 表明 HYP 起着链接多肽和稳定胶原蛋白的三螺旋结构的作用, HYP 含量越低的胶原蛋白, 其螺旋结构被破坏的温度就越低^[5]。

表 1 L₉(3⁴)正交试验结果表
Table 1 L₉(3⁴)orthogonal test results

编号	酶解时间 (h)	水浴温度 (°C)	酶酸比	震荡频率 (r/min)	HYP (μg/g)
1	4 (1)	37 (1)	1 : 2 (1)	180 (1)	20.101
2	4 (1)	60 (2)	1 : 1 (2)	200 (2)	31.477
3	4 (1)	100 (3)	2 : 1 (3)	250 (3)	31.525
4	12 (2)	37 (1)	1 : 1 (2)	250 (3)	22.218
5	12 (2)	60 (2)	2 : 1 (3)	180 (1)	41.274
6	12 (2)	100 (3)	1 : 2 (1)	200 (2)	31.980
7	24 (3)	37 (1)	2 : 1 (3)	200 (2)	31.506
8	24 (3)	60 (2)	1 : 2 (1)	250 (3)	26.592
9	24 (3)	100 (3)	1 : 1 (2)	180 (1)	28.092
K1	83.103	73.825	78.673	89.467	
K2	95.472	99.343	81.787	94.963	
K3	86.19	91.597	104.305	80.335	
k1	27.701	24.608	26.224	29.822	
k2	31.824	33.114	27.262	31.654	
k3	28.73	30.532	34.768	26.778	
R	4.123	8.506	8.544	4.876	

表 2 HYP 检测不同影响因素的方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis for HYP detection with different influencing factors

来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
酶解时间	2	930.831	465.416	3.968	0.058
水浴温度	2	124.088	62.044	0.529	0.606
酶酸比	2	1 117.753	558.877	4.765	0.039
震荡频率	2	382.523	191.262	1.631	0.249
误差	9	1 055.550	117.284		
总计	18	20 527.090			

HYP 是一种重要的氨基酸^[6], 是脯氨酸经过羟甲基化酶催化之后的产物, 它催化蛋白质合成后多肽脯氨酸残基的翻译后修饰, 其含量稳定, 约占胶原蛋白全部氨基酸残基的 13.5%, 在胶原蛋白的 Gly-X-Y 重复中, X 可以是具有重复的各种其他氨基酸残基中的任一种, HYP 仅出现在 Y 位置, 这种氨基酸几乎仅存在于胶原蛋白中, 所以胶原蛋白可以通过 HYP 含量间接定量, 测定 HYP 的含量对胶原蛋白代谢的研究有重要意义^[3]。HYP 的研究有着丰富的历史, 其在化学中严格地是亚氨基酸, 但在生物化学和营养学中被松散地称为氨基酸^[7], Hara^[8] 的综述详细分析了通过不同的活性、序列及代谢物来识别具有不同产物特异性的多种脯氨酸羟化酶, 对 HYP 的异构体进行识别。在胶原蛋白及其酶促水解产物中, 从

蛋白质中的游离脯氨酸或脯氨酸残基产生少量顺式-4-羟基脯氨酸和顺式-4-羟基-D-脯氨酸^[9], 以及顺式-3-羟基脯氨酸和顺式-3-羟基-D-脯氨酸^[10], 但多数 4-羟基脯氨酸, 3-羟基脯氨酸以反式异构体存在, 全身胶原蛋白降解提供大量的反式-4-羟基-L-脯氨酸, 反式-4-羟基-L-脯氨酸是胶原蛋白中最丰富的氨基酸之一, 对于胶原的三螺旋形成、折叠和正常结构是必需的, 游离 HYP 具有清除活性氧并保护细胞免受氧化损伤的能力^[11]。

HYP 的测定一般有水解、衍生、检测 3 个步骤, 其中又以前 2 项研究较多。在试剂、方法学一定的情况下, 胶原蛋白的水解成为影响 HYP 测定的主要因素, 胶原水解完全与否取决于水解的时间、温度, pH 值^[12]。因不同组织胶原蛋白含量不同, 耐受

剪切力必然不同,直接影响水解程度及后续测定HYP含量的精确性。近年来许多学者对HYP的测定条件进行了多方面、多层次、多途径的研究^[13]。李文才^[14]对组织的最适宜水解条件进行了研究探讨,发现在120℃于6 mol/L盐酸溶液中水解28 h时在分光光度计在560 nm波长是测得的值达最大,说明组织在28 h内于6 mol/L盐酸溶液中可完全水解。周少春^[15]在组织匀浆液中加入适量的胰蛋白酶,测得HYP含量较未加胰蛋白酶者明显增高,适量胰蛋白酶的参与有利于HYP的测定。冯志民等^[16]研究温度、氧化时间、样品中盐酸浓度以对HYP测定的影响,认为测定条件为:100℃时2 min, HYP测定结果最好。邢玉梅等^[17]分别对温室20 min、37℃10 min、37℃20 min 3种氧化条件和显色条件进行观察,结果显示3种均氧化完全,认为室温控制在15℃~25℃,放置20 min较为完全,显色温度越高,褪色就越快,温度应选择60℃20 min较为适宜。

酸酶结合提取法通常是首选的方法,稀酸溶液能有效作用于胶原蛋白分子间的氢键,使胶原纤维膨胀展开,利于后续胶原蛋白的提取;但酸溶液不能切断胶原分子端肽间的共价键,使得胶原蛋白不能有效溶出,酶解的方法可将胶原分子端肽间的共价键切除,促进胶原蛋白的溶出且能酶解组织中的非胶原蛋白,以便于后续的盐纯化和透析除去这部分杂蛋白,提高胶原蛋白的纯度,在胶原蛋白分子没有展开、融化或破坏时,这些酶主要切割胶原蛋白的N-端和C-端,极大地提高了胶原蛋白的提取效率,经酶提取后的胶原蛋白,由于大部分端肽已被切除,极大地降低了其免疫原性,利于后续的应用,但应严格控制酸浓度、水解温度、水解时间等影响胶原蛋白提取的重要条件,防止胶原蛋白被彻底水解成氨基酸并破坏氨基酸,胶原蛋白水解过程中,适当的震荡,利于酶与底物的融合,更好地酶解蛋白。同样,热水法在一定条件下用热水浸煮从而得到水溶性胶原蛋白,胶原蛋白的提取率随提取温度的升高而升高。胶原蛋白在热水提取条件下,由于超螺旋空间结构被破坏,不再具备原有胶原蛋白的生理功能,但是此过程中不能使用酶进行,温度过高会使酶失活,造成试剂失效及资源的浪费。

本文重点研究了酶解时间、水浴温度、酸酶比以及震荡频率对样品水解的影响。结果表明,酸酶比为2:1保证pH值为7.4左右,在200 r/min震荡频率的60℃水浴酶解12 h,能保证HYP酶解效果最佳。

参考文献

- [1] Lin YK, Lin DC. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species [J]. *Food Chem*, 2006, 99 (2): 244-251. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.06.053.
- [2] Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens- structure, function, and biosynthesis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55: 1531-1546. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [3] Cissell DD, Link JM, Hu JC, et al. A modified hydroxyproline assay based on hydrochloric acid in Ehrlich's solution accurately measures tissue collagen content [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2017, 23 (4): 243-250. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0018.
- [4] Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, et al. Functional amino acids in swine nutrition and production [M]. *Doppenberg J. Dynamics in animal nutritio. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers*, 2010: 69-98.
- [5] Csekés E, Račková L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (23): 12641. DOI: 10.3390/ijms222312641.
- [6] Wu Z, Hou Y, Dai Z, et al. Metabolism, nutrition, and redox signaling of hydroxyproline [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30 (4): 674-682. DOI: 10.1089/ars.2017.7338.
- [7] Wu G. *Amino acids: biochemistry and nutrition* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2021.
- [8] Hara R, Kino K. Enzymatic reactions and microorganisms producing the various isomers of hydroxyproline [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104 (11): 4771-4779. DOI: 10.1007/s00253-020-10603-1.
- [9] Donald SP, Sun XY, Hu CA, et al. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 1810-1815.
- [10] Shigemura Y, Kubomura D, Sato Y, et al. Dose-dependent changes in the levels of free and peptide forms of hydroxyproline in human plasma after collagen hydrolysate ingestion [J]. *Food Chem*, 2014, 159: 328-332. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.091.
- [11] Hu S, He W, Wu G. Hydroxyproline in animal metabolism, nutrition, and cell signaling [J]. *Amino Acids*, 2022, 54 (4): 513-528. DOI: 10.1007/s00726-021-03056-x.
- [12] 宋矿朋,董江涛,陈百成,等.深低温保存对人类腓绳肌腱结构特性影响的实验研究[J].*中国矫形外科杂志*, 2011, 19 (19): 1629-1633. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.19.14.
Song KP, Dong JT, Chen BC, et al. Differential scanning calorimetry study of human hamstring tendons after cryopreservation [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2011, 19 (19): 1629-1633. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2011.19.14.
- [13] 王华磊,沈卫,张积华,等.γ射线照射对人肌腱组织形态学及羟脯氨酸含量的影响[J].*中国矫形外科杂志*, 2010, 18 (7): 579-583. DOI: 10.7666/d.y1733461.
Wang HL, Shen W, Zhang JH, et al. Effect of γ-rays on the histomorphology and hydroxyproline content of human tendon [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2010, 18 (7): 579-583. DOI: 10.7666/d.y1733461.

- [14] 李文才, 张锦生, 李华, 等. 肝组织羟脯氨酸含量测定方法的优化 [J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(4): 295-297. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2000.04.019.
Li WC, Zhang JS, Li H, et al. Optimization of the assay for hydroxyproline in fresh and fixed liver tissue [J]. Acta Academiae Medicinae Shanghai, 2000, 27(4): 295-297. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2000.04.019.
- [15] 周少春, 车建途, 李定国. 大鼠肝组织羟脯氨酸的测定 [J]. 上海第二医科大学学报, 1997, 17(6): 458-460.
Zhou SC, Che JT, Li DG. Determination of hydroxyproline in rat liver tissue [J]. Acta Universitatis Medicinalis Secundae Shanghai, 1997, 17(6): 458-460.
- [16] 冯志民, 徐衡, 马旺扣. 动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用 [J]. 南京铁道医学院学报, 1999, 18(3): 168-170.
Feng ZM, Xu H, Ma WK. Assay of hydroxyproline in animal tissues and preliminary application [J]. Journal of Nanjing Railway Medical College, 1999, 18(3): 168-170.
- [17] 邢玉梅, 白薇. 尿羟脯氨酸测定方法的质量控制 [J]. 山西医药杂志, 2001, 30(3): 264-265. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9926.2001.03.058.
Xing YM, Bai W. Quality control of urine hydroxyproline determination method [J]. Shanxi Medical Journal, 2001, 30(3): 264-265. DOI: 10.3969/j.issn.0253-9926.2001.03.058.
- (收稿: 2023-07-23 修回: 2023-09-25)
(同行评议专家: 张立峰, 张净宇, 刘艳成)
(本文编辑: 宁桦)

读者 · 作者 · 编者

本刊严查代写代投稿件等学术不端行为的通告

近期本刊在稿件处理过程中不断发现有涉嫌代写、代投的问题, 这种行为严重违反了中国科协等 7 部门联合印发的《发表学术论文“五不准”》要求, 在很大程度上影响了编辑部正常的工作秩序。为了维护学术尊严, 保证杂志的学术质量, 维护期刊的声誉和广大作者与读者的正当权益, 本刊郑重声明如下:

本刊坚决反对由第三方代写、代投、代为修改稿件的行为。自即日起, 凡投给本刊的所有稿件必须是作者亲自撰写的, 稿件内容和所留作者信息必须是真实的。在稿件处理过程中, 本刊的同行评议专家和编辑人员将动态地对文稿反复核对, 请作者理解并积极配合。以下情况将被判定为涉嫌代写、代投等学术不端行为, 无论稿件处理至哪个阶段, 均将终止稿件进一步处理或直接退稿: (1) 作者信息中提供的手机和电子信箱等联系方式非第一作者或通讯作者本人, 或无效; (2) 不回应我们的询问, 或回应不合逻辑; (3) 内容描述不专业, 或不符合逻辑, 不符合医学伦理与规范; (4) 数据或统计值不符合逻辑, 或明显错误; (5) 图片与正文描述不符合; (6) 参考文献引用与正文内容不符合。

期待广大作者和读者与我们携手, 共同反对学术不端行为, 维护医学文献库的圣洁, 打造经得起历史考验、值得信赖的诚信期刊。

《中国矫形外科杂志》编辑部

2021 年 8 月 13 日