

血管化人工骨的体外构建和体内异位成骨**

郭英¹, 马卫东², 陈小冬¹, 曲哲²

Construction of vascularization artificial bone *in vitro* and ectopic osteogenesis *in vivo*

Guo Ying¹, Ma Wei-dong², Chen Xiao-dong¹, Qu Zhe²

Abstract

BACKGROUND: Vascularization plays an important role in bone formation and remodeling, however, the oxygen and nutrition are insufficient for large tissue block; therefore, it is necessary to solve the problem of vascularization in tissue engineering field.

OBJECTIVE: To investigate the method of constructing vascularization artificial bone *in vitro* and ectopic osteogenesis *in vivo*.

METHODS: Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and kidney vascular endothelial cells were isolated and cultured, and osteogenesis ability of BMSCs in different co-culture models (co-culture with or without direct contact) were analysed by measuring the quantity of protein and the activity of alkaline phosphatase and osteocalcin. By establishing the three-dimensional co-culture model of rat BMSCs and kidney vascular endothelial cells, vascularized artificial bone was constructed, which was implanted into the muscle of rats. The angiopoiesis and osteogenetic ability of the implants were observed by soft X-ray examination and hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: There was good cell compatibility when rat BMSCs and kidney vascular endothelial cells were co-cultured. The ALP activity and osteocalcin was decreased in the simple culture groups, but increased in the direct and indirect co-culture groups. Statistical analysis showed that the osteogenetic ability of BMSCs co-cultured group was higher than that of simple cultured ($P < 0.05$). The *in vivo* experiment manifested that the intensity of soft X-ray and the quantity of vascular and new formed bone in the vascularized artificial bone group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The osteogenetic ability of BMSCs can be regulated by cytokines and cell membrane proteins when co-cultured with endothelial cells. Compared with traditional artificial bone, vascularized artificial bones has lots of advantages, such as accelerating the differentiation and proliferation of BMSCs, increasing local blood circulation and survive ratio, as well as accelerating osteogenesis and having more powerful anti-infect ability.

¹Department of Prosthodontics,
²Department of Implantology, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Guo Ying★, Master, Attending physician, Department of Prosthodontics, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China guohining@hotmail.com

Correspondence to: Qu Zhe, Doctor, Associate professor, Department of Implantology, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China quzhekq@hotmail.com

Supported by: the Science and Technology Development Plan of Education Department of Liaoning Province, No. 2008027*

Received: 2010-11-26
Accepted: 2011-01-15

Guo Y, Ma WD, Chen XD, Qu Z. Construction of vascularization artificial bone *in vitro* and ectopic osteogenesis *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(20): 3611-3615. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 血管化在骨形成和改建中起重要作用, 目前大的组织块难以获得充足的氧气和营养供应, 因此组织工程中就出现了需要适当血管化的问题。

目的: 建立体外血管化人工骨模型并且体内异位成骨的实验体系。

方法: 分离培养鼠骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞, 体外构建鼠骨髓间充质干细胞和鼠肾血管内皮细胞直接接触培养血管化人工骨组, 以间接接触三维培养体系和两种细胞单独培养体系作为对照。体外通过测定蛋白质含量, 碱性磷酸酶活性和骨钙素, 分析骨髓间充质干细胞在不同混合培养模型中的成骨能力。建立鼠骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞的三维培养体系, 再将两种细胞直接接触组材料和骨髓间充质干细胞单独培养组材料分别植入鼠左右腿肌肉内, 通过软 X 射线摄影和苏木精-伊红染色检测分析不同植入方法的血管形成和成骨能力。

结果与结论: 当两种细胞混合培养时, 具有很好的细胞兼容性。两种细胞单独培养碱性磷酸酶活性和骨钙素较间接接触混合培养降低, 而两种细胞混合培养时, 体系中碱性磷酸酶活性和骨钙素水平增加。动物实验结果显示在混合培养体系中的骨髓间充质干细胞的成骨能力高于单独培养($P < 0.05$)。体内实验表明在血管化人工骨中的软 X 射线骨密度, 血管数量和新形成的骨量均高于对照组($P < 0.05$)。提示在两种细胞混合培养时骨髓间充质干细胞的成骨能力可以被细胞因子和细胞膜蛋白调节, 和传统的人工骨比较, 血管化人工骨有加速骨髓间充质干细胞分化, 增加了局部的血管微循环生存率, 以及加速成骨和更好的抗感染能力。

关键词: 血管化人工骨; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮细胞; 混合培养; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.20.001

郭英, 马卫东, 陈小冬, 曲哲. 血管化人工骨的体外构建和体内异位成骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3611-3615. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

现今组织工程技术主要应用在无血管的组织或者无附加血管供应的组织中, 面对较大缺损的病例, 只依靠血管的扩散生长并不能满足营养需求, 大的组织块难以获得充足的氧气和营养供应, 因此组织工程中就出现了需要适当

的血管化的问题。骨移植修复骨缺损的再血管化是最基本环节^[1]。针对血管化人工骨的不足以及目前研究中所存在问题, 本实验采用细胞培养技术, 体外建立了骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)和肾血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)三维混合培养体系, 通过将BMSCs与VECs直接接触培养^[2]、间接接触培养和BMSCs单独培养比

大连市口腔医院,
1 修复科, 2 种植
科, 辽宁省大连市
116021

郭英★, 女, 1976
年生, 辽宁省大连
市人, 汉族, 2004
年吉林大学毕业,
硕士, 主治医师,
主要从事咬合重
建修复、颞下颌关
节病的临床和科
研工作。
guohining@
hotmail.com

通讯作者: 曲哲,
博士, 副教授, 大
连市口腔医院种
植科, 辽宁省大连
市 116021
quzhekq@
hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2011)20-03611-05

收稿日期: 2010-11-26
修回日期: 2011-01-15
(20101025019/YJ·Z)

较, 探讨其在体内促进人工骨组织血管化和提
高成骨能力的可行性。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2008-07/2009-07在吉林大
学口腔医学院病理实验室完成。

材料:

动物: SPF级1月龄和3月龄Wistar大鼠各10
只, 雌雄不限; SPF级6~8周Wistar大鼠24只,
雌雄不限, 均为吉林大学实验动物部提供的封
闭群动物。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
聚羟基乙酸, 聚乳酸	济南岱盟生物科技有限 公司
放射免疫试剂盒	德国 Biosource 公司
BCA 蛋白检验试剂盒	美国 Pierce 公司
碱性磷酸酶试剂盒	美国 Sigma 公司
JEM-1200EX 型透射电子显 微镜	日本 JEOL 公司
X-650 扫描电镜	日本 HITACHI 公司
图像分析系统	美国 Cold Spring 公司

方法:

鼠BMSCs和肾VECs培养和鉴定: Wistar大鼠
麻醉, 无菌状态下常规解剖分离提取双侧胫骨
和股骨骨髓细胞及肾皮质血管内皮细胞, 通过
常规碱性磷酸酶染色和 Von Kossa 染色鉴定
BMSCs^[3], 通过CD-31和Von willebrand蛋白抗
体免疫组织化学染色和JEM-1200EX型透射电
子显微镜下观察肾VECs^[2-3]。

**聚羟基乙酸聚乳酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic
acid), PLGA)制备及预处理:** 聚羟基乙酸和聚乳酸
粉末(直径为200~250 μm)以15:85比例混合,
PLGA共聚物的孔隙直径为300~500 μm, 孔隙
率为85%。钴60消毒备用。

**BMSCs、VECs和PLGA材料生物相容性和黏附
性检测:** 取2种细胞第3代各1×10⁴个, 加入1 mL
DMEM条件培养液, 接种预先处理好的PLGA
表面, 将黏附材料的细胞培养3 d取出, 体积分
数2.5%戊二醛固定, 体积分数1%锇酸后固定,
常规样品制备, X-650扫描电镜观察^[3]。

**建立鼠BMSCs和鼠肾VECs直接接触培养、间接
接触培养和单独培养三维协同培养体系:** 经过钴60
消毒处理PLGA材料1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 共
24块, 每组分别接种6块材料:

分组处理方法:

组别	接种方法
直接接触 培养组	取传第3代肾 VEC 和 BMSCs 各 1×10 ⁴ 混合, 接种于 PLGA 材料表面, 培 养箱中静置 2 h, 补加条件培养液盖 过材料表面培养。
间接接触 培养组	取传第3代肾 VEC 1×10 ⁴ 接种于 24 孔培养皿中, BMSCs 1×10 ⁴ 接种于 材料表面, 培养箱中静置 2 h, 补加 含 10%胎牛血清(天津血液研究所) 的 DMEM 条件培养液, 12 h 后将材 料放入接种有肾 VEC 的培养皿内。
BMSCs 单独 培养组	取传第3代 BMSCs 各 1×10 ⁴ 个混合, 接种于材料表面, 培养箱中静置 2 h 后补加条件培养液盖过材料表面。
肾 VECs 单独培养组	取传第3代肾 VECs 各 1×10 ⁴ 个混合, 接种于材料表面, 培养箱中静置 2 h 后补加条件培养液盖过材料表面。

各组每24 h更换3 mL的DMEM条件培养
液, 共培养5 d。收集第5天条件培养液, 采用
放射免疫试剂盒检测骨测量培养液中骨钙素骨
钙素含量^[4-5]; 用0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,
5 d后, 用BCA蛋白检验试剂盒检测蛋白质的含
量^[6], 使用碱性磷酸酶试剂盒检测细胞内碱性
磷酸酶合成^[7]。

构建动物模型: 麻醉6~8周雄性Wistar大鼠,
取股肌。因动物实验无法构建间接培养组, 因
而本次实验中只比较带有VECs和不带有VECs
组。将载有BMSCs和VECs的材料(直接接触培
养组)植入左腿(实验组); 将只载有BMSCs的材
料(BMSCs单独培养组), 载体植入右腿(对照组)
肌囊内, 缝合切口。2组实验动物每组6只, 自
身对照。每天注射青霉素, 分别在4, 8, 12周
处死, 每组取2只每次处死8只鼠, 取出标本,
甲醛溶液固定。用软X射线检测和苏木精-伊红
染色^[7-8], 结果利用图像分析系统进行Image
Software软件(美国NIH公司)电脑分析测量骨
形成面积及新生血管面积^[9]。

主要观察指标: 移植后大鼠血管形成数量。

统计学分析: 数据用统计学软件SPSS
11.5软件进行t 检验和ONE-ANOVA检验, 每次
实验每组样本数为6, 所有的实验被重复3次。
P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 Wistar大鼠24只全
部进入结果分析, 无脱失。

2.2 培养和检测鼠BMSCs VonKossa染色阳性为黑色, 呈斑块状, 多见于细胞密集生长区, 证明该细胞具成骨细胞生物学特性, 见图1, 证实细胞的成骨生物学特性^[3]。

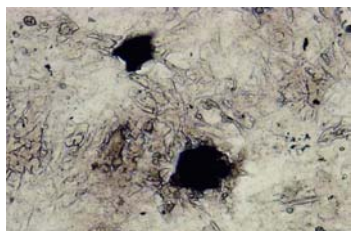
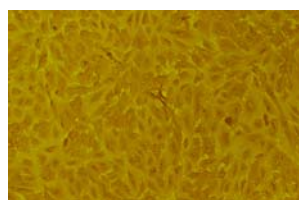
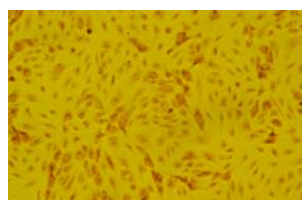


Figure 1 Bone marrow mesenchymal stem cells were positive stained by VonKossa (black area), which speckle presented in the dense cells section ($\times 40$)
图1 BMSCs 细胞 VonKossa 染色阳性区为黑色, 呈斑块状, 多见于细胞密集生长区($\times 40$)

2.3 肾VECs培养及鉴定 血管内皮细胞呈圆形或椭圆形, 呈单层铺路石样排列, 免疫组织化学CD31和VWF抗体染色阳性^[10-11], 见图2。



a: PECAM-1 antibody

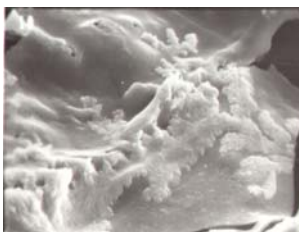


b: Von Willebrand factor antibody

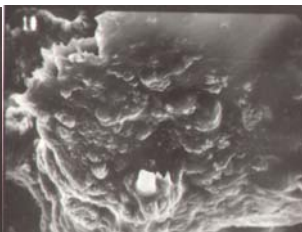
Figure 2 Immunohistochemistry staining of kidney vascular endothelial cells (Immunohistochemistry staining, $\times 100$)

图2 肾血管内皮细胞免疫组织化学检测(免疫组织化学染色, $\times 100$)

2.4 BMSCs、肾VECs与材料生物相容性和黏附性 见图3。



a: BMSCs



b: VECs

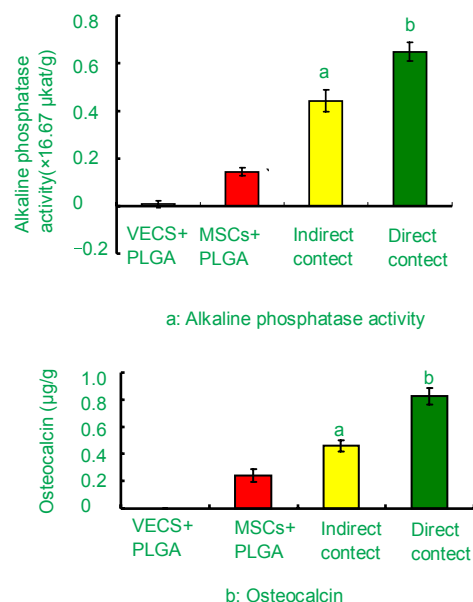
Figure 3 Scanning electron microscopy of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and kidney vascular endothelial cells (VECs) adhered on the surface of PLGA scaffold ($\times 1\,000$)

图3 骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞黏附在 PLGA 支架材料表面的扫描电镜检测($\times 1\,000$)

扫描电镜观察见BMSCs在支架材料内表面黏附生长良好, 细胞伸展, 伪足明显, 细胞间伪足相互交叉,

材料孔隙内可见大量细胞黏附生长; 肾VECs呈圆形或椭圆形, 在支架材料内表面呈单层铺路石样排列。

2.5 鼠BMSCs和鼠肾VECs直接接触、间接接触和单独三维培养对BMSCs分化的影响 培养5 d后, 各组蛋白质含量、骨钙素含量和碱性磷酸酶活性分析, 见图4。



^aP < 0.01, vs. single culture; ^bP < 0.05, vs. indirect culture

Figure 4 Effect of kidney vascular endothelial cells (VECs) on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiation in co-culture system at 5 d

图4 培养5 d后, 混合培养体系中血管内皮细胞对骨髓间充质干细胞分化的影响

2.6 异位成骨动物模型标本软X射线测量及密度分析 在4周处死的鼠股骨标本, 实验组有明显的X射线点状阻射区存在, 8, 12周处死的鼠股骨标本X射线可见片状阻射区, 界限不清, 骨密度低于正常骨组织。对实验组和对照组X射线片进行扫描, 计算机图像密度分析, 发现实验组和对照组12周均可见标本骨密度值高于8周标本骨密度值($P < 0.05$)。实验组8周和12周标本骨密度值高于同期对照组标本骨密度值, 但均低于正常骨组织密度($P < 0.05$), 见图5。



a: BMSCs single culture



b: Direct culture

Figure 5 X-ray images of each specimen at 12 wk after operation

图5 术后12周, 各组标本软X射线检测

2.7 异位成骨标本骨及血管形成数量分析

移植后4周: 经苏木精-伊红染色可见大量材料碎片, 材料边缘仍可见成纤维细胞层包裹, 但较薄, 一般为一两层, 仍可见淋巴细胞浸润, 成骨细胞样细胞较多。实验组材料碎片之间可见成骨细胞样细胞, 周围有少量骨基质沉积, 而对照组未见。实验组标本中心及外周均可见血管形成和长入, 管腔内可见到红细胞; 而对照组仅外周可见血管长入, 管腔内见有红细胞, 见图6a, b。

移植后8周: 随着材料降解, 于吸收部位可见少部分钙盐沉积, 部分区域已被新生骨替代。材料周边仍可见成纤维细胞层, 小血管继续增多, 很少见到淋巴细胞浸润。少部分区域已有典型骨小梁形成, 骨小梁染色不均匀, 成骨细胞较多, 梭形, 核蓝染, 位于骨小梁周围。实验组新骨形成明显优于对照组, 见图6c, d。

移植后12周: 随着材料降解, 于吸收部位可见部分材料位置钙盐沉积, 大部分被新生骨替代, 并见大量较典型的骨小梁结构, 其内骨陷窝增多, 骨小梁周边可见成骨细胞和不规则的骨基质形成, 骨小梁染色趋于均匀, 未见有炎症反应, 见图6e, f。骨形成面积、血管逐渐增大, 且实验组高于对照组($P < 0.05$)。

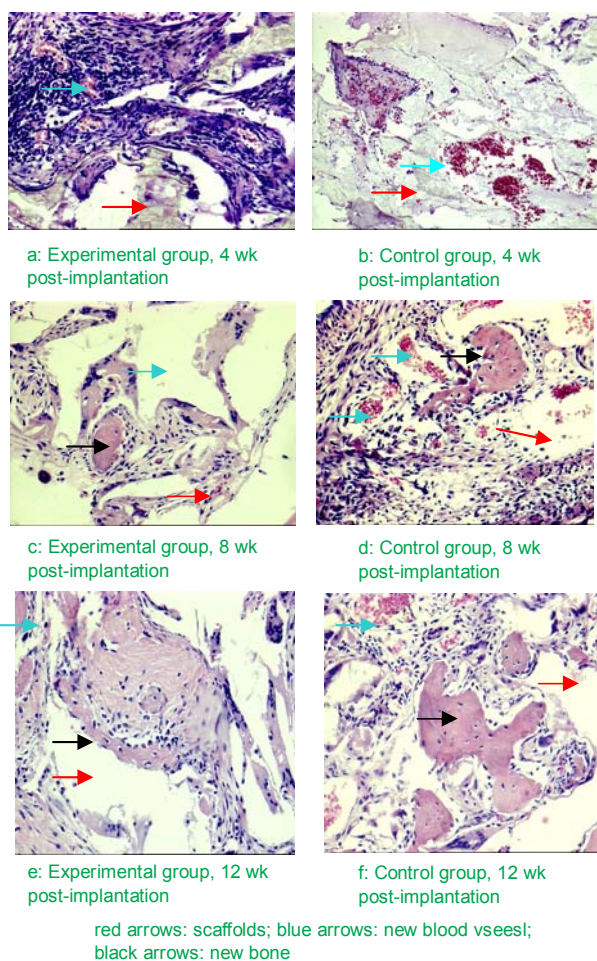


Figure 6 Osteogenic ability of each group at different time points (Hematoxylin-eosin staining, $\times 10$)
图6 各组移植后不同时间成骨变化(苏木精-伊红染色, $\times 10$)

3 讨论

成骨细胞与内皮细胞之间通过生长因子间接相互促进学说已广为接受, Villars等^[5]在前人细胞因子学说的基础上^[12], 经过一系列实验提出两种细胞之间作用是由间接接触作用和直接接触作用共同完成的。2000年Villars等^[5]提出人BMSCs和内皮细胞之间接触连接是由一种特殊的缝隙连接蛋白——连接蛋白43完成的, 并通过应用18 α -干甘草次酸抑制连接蛋白43的合成发现, 混合培养中BMSCs分化能力降低, 证明两种细胞之间特异的连接蛋白有传递细胞信号而达到相互促进的作用。但对于细胞因子促进学说和膜蛋白促进学说国内外争议很大。但上述研究均局限于两种细胞平面接触的二维培养体系^[13-15], 而体内正常组织中细胞之间为三维空间存在, 国内外尚未见报道。

针对上述研究均局限于两种细胞平面接触的二维体系, 而体内正常组织中细胞间为三维空间存在, 作者率先提出构建BMSCs与VEC三维接触培养体系的理论: 即在直接接触培养体系, 使两种细胞在三维空间条件下完全接触, 而间接接触培养体系, 使两种细胞存在于同一个培养条件中, 而相互之间完全不接触, 充分模拟体内生长环境。本文结果表明: 间接接触培养VEC对BMSCs的促进作用高于单独培养, 提示细胞因子参与了VEC对BMSCs增殖和成骨能力的促进作用, 而直接接触培养高于间接接触培养, 表明不仅细胞因子参与了VEC对BMSCs增殖和成骨能力的促进作用, 而且细胞间膜蛋白的直接接触也参与此作用, 进一步从三维空间角度证明细胞因子促进学说和膜蛋白促进学说, 为血管化人工骨的构建奠定了理论基础。

早期临床采用显微外科技术将带血管蒂的自体骨用于修复骨缺损, 随着组织工程技术的发展, 出现了几种血管化人工骨构建方法: 组织工程化肌骨瓣, 血管蒂筋膜包裹人工骨和复合生长因子构建血管化人工骨应用^[9, 16-18]; 被认为是修复较大面积缺损的好方法, 但这种方法有造成患者二次损伤、来源部位局限、对显微外科技术要求较高和移植后不易成活等诸多不足。针对以上方法的不足, 结合Frerich等^[17]的研究, 本文设想将VEC和成骨细胞混合, 在支架材料上体外培养, 将形成毛细血管样结构而后融合成毛细血管网, 构建原发的血管化人工骨不仅可以加快骨缺损修复速度, 也可能扩大缺损修复面积^[12]。

为此, 本次实验以VEC和BMSCs之间相互作用及机制研究结果为基础, 体外构建了血管化人工骨培养系统, 即VEC和BMSCs复合PLGA支架材料, 植入鼠肌囊内。与单纯人工骨植入对比, 发现8, 12周标本X线骨密度和新骨形成量明显增高, 血管化人工骨组X射线骨密

度仍然低于正常骨密度,需进一步矿化。血管化人工骨培养组,光镜观察发现2周的标本在其中心部位就可见小血管形成而对照组新生血管只见于外周,证明实验组植入材料中的VECs在骨形成早期有形成新生血管的能力,可与外周血管融合提供材料中心营养,而单纯人工骨只能靠外周血管逐渐长入提供营养^[19-20],4,8,12周的标本血管形成面积实验组明显高于对照组。

综上,证明血管化人工骨组在新骨形成和血管化程度方面均优于单纯人工骨构建组,进一步从异位成骨角度为血管化人工骨优于传统单纯人工骨提供实验根据^[21-22],为应用于临床患者修复大面积骨缺损奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? J Cell Biochem. 2000;79(4):672-685.
- [2] Shu SW, Li SL. Beijing: People's Medical Press. 2002:343-346. 舒盛文, 李盛林. MSCs培养[M] //张魁华, 于世凤. 实验口腔病理学. 北京: 人民卫生出版社, 2002:343-346.
- [3] Qu Z, Sun HC, Guo Y, et al. Kouqiang Yixue Yanjiu. 2003;19(6):480-483. 曲哲, 孙宏晨, 郭英, 等. 血管内皮细胞对骨髓间充质干细胞成骨能力影响的体外研究[J]. 口腔医学研究, 2003,19(6):480-483.
- [4] Mooren RE, Hendriks EJ, van den Beucken JJ, et al. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. Tissue Eng Part A. 2010;16(10):3159-3172.
- [5] Villars F, Guillotin B, Amédée T, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. Am J Physiol Cell Physiol. 2002;282(4):C775-785.
- [6] Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. J Orthop Trauma. 2010;24(9):552-556.
- [7] Yu LX, Hu PZ. Zhongguo Yiliao Shebei. 2009;24(3):122-123. 余立新, 胡鹏志. 钼靶X线机(软X线)检查手足部软组织中低密度异物的应用研究[J]. 中国医疗设备, 2009,24(3):122-123.
- [8] Wu YL, Liu GY. Sichuan Jiepo Xue Zazhi. 1997;5(1):60. 吴雨岭, 刘广益. 苏木精—伊红整块染色法[J]. 四川解剖学杂志, 1997,5(1):60.
- [9] Heidrich F, Sossalla S, Schotola H, et al. The role of phospho-adenosine monophosphate-activated protein kinase and vascular endothelial growth factor in a model of chronic heart failure. Artif Organs. 2010;34(11):969-979.
- [10] Guo S, Cheng Y, Ma Y, et al. Endothelial progenitor cells derived from CD34+ cells form cooperative vascular networks. Cell Physiol Biochem. 2010;26(4-5):679-688.
- [11] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem. 2006;54(4):385-395.
- [12] Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, et al. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res. 1996;11(4):472-479.
- [13] Zhang W, Abukawa H, Troulis MJ, et al. Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. Methods. 2009;47(2):122-128.
- [14] Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. J Dent Res. 2003;82(3):177-182.
- [15] Pradier A, Passweg J, Villard J, et al. Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity. Cell Transplant. in press.

- [16] Zheng J, Huynh H, Umikawa M, et al. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. Blood. 2011;117(2):470-479.
- [17] Frerich B, Lindemann N, Kurtz-Hoffmann J, et al. In vitro model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30(5):414-420.
- [18] Yang Q, Ye ZY, Zhang JX, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and vascular endothelial growth factor protein in gastric carcinoma and its relationship to its pathological features and prognosis. Anat Rec (Hoboken). 2010;293(12):2012-2019.
- [19] Baró M, Ferreyra R, Nemer K, et al. A histomorphometric study of osteocytic lacunae in interradicular bone with periodontal disease. Acta Odontol Latinoam. 2003;16(1-2):3-7.
- [20] Rawlinson A, Elcock C, Cheung A, et al. An in-vitro and in-vivo methodology study of alveolar bone measurement using extra-oral radiographic alignment apparatus, Image Pro-Plus software and a subtraction programme. J Dent. 2005;33(9):781-788.
- [21] Pennesi G, Scaglione S, Giannoni P, et al. Regulatory Influence of Scaffolds on Cell Behavior: How Cells Decode Biomaterials. Curr Pharm Biotechnol. in press.
- [22] Jégoux F, Goyenvallée E, Cognet R, et al. Mandibular segmental defect regenerated with macroporous biphasic calcium phosphate, collagen membrane, and bone marrow graft in dogs. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;136(10):971-978.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 辽宁省教育厅科技发展计划资助项目 (2008027)。

作者贡献: 曲哲进行实验设计, 实验整体规划, 实验实施为郭英, 完成每个检测实验, 实验评估, 资料收集为陈晓东, 郭英完成全文书写, 马卫东审校, 曲哲对文章负责。

致谢: 特此对于吉林大学口腔医院孙宏晨教授对于整个课题的指导给予感谢。

利益冲突: 本文未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准, 在吉林大学口腔医学院动物实验室监督下完成。

本文创新性:

提供证据: 大连市科学技术信息研究所检索中国专利文摘数据库(1985/2011)、中文科技期刊文摘数据库(1989/2011)、中国技术成果数据库(1978/2011)、中国学术会议论文数据库(1953/2011)、中国学位论文数据库(1984/2011)、INTERNET 相关网站、中国生物医学文摘数据库(1978/2011)、中国重大科技成果数据库(1986/2011)及 Pubmed 数据库(1979/2011), 结果发现除作者及通讯作者已经发表一些相关研究初步发表外, 未见其它以骨髓间充质干细胞和血管内皮细胞混合培养构建的血管化人工骨修复颌骨的报道。

创新点说明: 率先将组织工程中骨组织培养与血管重建结合引入骨组织工程, 尝试解决人工骨构建与植入后的成活与后续功能重建问题。体外建立血管内皮细胞、成骨细胞三维立体共生体系, 通过三维立体共生体系直接、间接培养探讨其相互促进机制国内外尚未见报道。