

多孔碳酸钙陶瓷与干细胞源性成骨细胞的相容性*☆

魏任雄, 张翼, 谭金海, 蔡林, 金伟

Cytocompatibility of stem cells-derived osteoblasts with porous calcium carbonate ceramics

Wei Ren-xiong, Zhang Yi, Tan Jin-hai, Cai Lin, Jin Wei

Department of Orthopedics, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Wei Ren-xiong☆, Doctor, Attending physician, Department of Orthopedics, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Feiyi030@163.com

Correspondence to: Tan Jin-hai, Doctor, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
guke3224@yahoo.com.cn

Supported by: the Key Grant of Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2009CDA058*

Received: 2011-07-04
Accepted: 2011-08-12

Abstract

BACKGROUND: Foreign studies have confirmed that calcium carbonate ceramics as bone substitute materials has a cytoskeletal role.

OBJECTIVE: To study the cytocompatibility of osteoblasts with porous calcium carbonate ceramics as bone tissue engineering scaffold.

METHODS: Bone marrow stromal cells (BMSCs) obtained from SD rat bone marrow were *in vitro* induced and proliferated. After their osteoblast phenotypes were verified, osteoblasts which cultured from BMSCs were seeded onto prepared porous calcium carbonate ceramics (PCCC group) and common hydroxyapatite ceramics (HA group).

RESULTS AND CONCLUSION: Immunological staining results for calcium nodules, I collagen and alkaline phosphatase were positive. Adherent osteoblasts were found in the two groups. However, the adherent ability, proliferative ability and osteogenic activity in the PCCC group were stronger than those in the HA group. It indicates that the porous calcium carbonate ceramics has good cytocompatibility with BMSCs-derived osteoblasts.

Wei RX, Zhang Y, Tan JH, Cai L, Jin W. Cytocompatibility of stem cells-derived osteoblasts with porous calcium carbonate ceramics as bone tissue engineering scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(42): 7822-7826. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 国内外的研究证实普通碳酸钙陶瓷作为骨替代材料时具有细胞支架作用。

目的: 观察多孔碳酸钙陶瓷与成骨细胞的相容性, 及作为骨组织工程支架的可能性。

方法: SD大鼠骨髓基质干细胞经矿化诱导培养、扩增并检测证实其已具成骨细胞表型后, 分别与多孔碳酸钙陶瓷支架、普通羟基磷灰石陶瓷支架体外复合培养。

结果与结论: 骨髓基质干细胞经体外诱导形成成骨细胞, 钙结节、I型胶原和碱性磷酸酶免疫染色结果阳性。多孔碳酸钙陶瓷支架材料与羟基磷灰石陶瓷材料皆有细胞附着生长, 但多孔碳酸钙陶瓷支架材料细胞的黏附能力、增殖活力及成骨活性均强于羟基磷灰石陶瓷材料。提示多孔碳酸钙陶瓷支架材料与SD大鼠骨髓基质干细胞源性成骨细胞有良好相容性。

关键词: 多孔碳酸钙; 陶瓷支架; 骨髓基质干细胞; 相容性; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.42.008

魏任雄, 张翼, 谭金海, 蔡林, 金伟. 多孔碳酸钙陶瓷与干细胞源性成骨细胞的相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(42):7822-7826. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

国内外的研究已经证实普通碳酸钙陶瓷(hydroxyapatite, HA)作为骨替代材料时所具有的细胞支架作用: 良好的成骨诱导活性、生物相容性和可降解性。临床上, 人工珊瑚也即是碳酸钙陶瓷已被成功用于矫形外科和口腔颌面外科骨缺损的修复。但是, 高孔隙率多孔碳酸钙陶瓷人工骨替代材料的相关研究却未见系统报道。目前, 一种新的生物陶瓷——多孔碳酸钙陶瓷(porous calcium carbonate ceramics, PCCC)由武汉理工大学生物材料研究中心和作者合作研制成功, 该材料的最大优点是它的气孔率、孔径和孔的连通性可以凭借生产过程中NaCl的含量、颗粒分布方式而加以调控, 较传统的普通碳酸钙陶瓷更有利于引导骨再生。

动物实验证实该材料植入机体后, 不产生局部或全身的毒性反应, 无炎症反应和排斥现象, 且该材料能与机体的骨组织直接结合, 二者间无纤维组织形成。虽然PCCC修复骨缺损的动物实验已获得成功, 但缺乏骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)诱导分化的成骨细胞与PCCC复合培养后成骨活性及细胞相容性的详细研究。作者就多PCCC与成骨细胞相容性进行了初步实验研究, 以期为该材料的临床应用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计、对照观察。

时间与地点: 实验于2010-6/11在武汉大学中南医院骨科实验室及医学科研究中心完成。

材料: PCCC和普通羟基磷灰石陶瓷(HA)

由武汉理工大学生物材料研究中心陈晓明教授惠赠。4周龄健康SD大鼠, 体质量180 g, 由武汉大学实验动物中心提供。

主要仪器和试剂:

主要仪器和试剂	来源
胎牛血清、DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
地塞米松、 β -磷酸甘油钠	美国 Sigma 公司
SA2010 型 SABC 试剂盒、I 型胶原多克隆抗体	武汉博士得生物工程有限公司
碱性磷酸酶(ALP)试剂盒	南京建成生物制品公司
CO ₂ 细胞培养孵箱	美国 Forma 公司
酶联免疫检测仪	华东电子管厂
S-520 扫描电镜	日本电子公司
相差显微镜	日本 Olympus
Bpics Elite Esp 型流式细胞	美国 Coulter 公司

实验过程:

SD大鼠BMSCs的获得和培养: SD大鼠10 g/L戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(35 mg/kg)。双侧下肢剪毛, 体积分数75%乙醇消毒, 无菌条件下取出双侧胫骨和股骨, 剪除骨端, 10号注射器抽取1 mL DMEM完全培养液(含体积分数20%小牛血清)自髓腔一端冲洗, 以1 000 r/min离心10 min, 去上层脂肪细胞, 将底层的骨髓细胞制成单细胞悬液, 以 $3 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种至DMEM条件培养液中(含体积分数10%胎牛血清、 10^{-8} mol/L 地塞米松、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 维生素C、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ β -磷酸甘油钠), 置入体积分数5%的CO₂孵箱中37 °C培养。24 h后全量换液, 以后每3 d换液1次。待细胞汇合成单层后, 用2.5 g/L胰蛋白酶进行消化传代, 接种浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 继续用DMEM条件培养液中维持培养。

PCCC制备: PCCC支架为4 mm×4 mm×2 mm块状(含孔率50%~60%, 孔径50~400 μm), 以三蒸水利用超声波振荡清洗, 自然干燥, 37 °C环氧乙烷熏蒸消毒依次浸入1%NaOH 2 h、PBS缓冲液清洗、50%乙醇2 h、PBS缓冲液清洗, 自然干燥备用。羟基磷灰石陶瓷出厂时已消毒灭菌, 以无菌手术刀片切割成4 mm×4 mm×2 mm大小。

BMSCs诱导培养及鉴定: 取3代BMSCs常规培养, 将无菌玻片放入培养皿, 待细胞长至半汇合后取出, 进行以下检测与观察: ①矿化结节染色(茜素红法): 用PBS冲洗2次, 体积分数95%乙醇固定10 min, 蒸馏水冲洗3次; 0.1%茜素红-Tris-HCl(pH=8.3)于37 °C染色30 min; 蒸馏水冲洗, 干燥, 封固。②碱性磷酸酶染色(Gomori钙钴法): PBS冲洗后用冷丙酮固定

10 min, 蒸馏水冲洗数次, 入孵育液中, 37 °C孵育 4~6 h后自来水冲洗数次, 2%硝酸钴中浸3~5 min, 蒸馏水冲洗数次, 1%硫化铵中浸2 min, 自来水冲洗, 自然干燥, 封固。③I型胶原免疫组化染色(SABC法): 采用SA2010型SABC试剂盒, 按SABC法进行染色, I型胶原多克隆抗体以1:100稀释。操作过程严格按试剂盒说明进行, 最后用DAB呈色, 苏木精衬染, 常规封固观察。阳性产物为棕黄色片状或颗粒状染色。

细胞陶瓷支架复合体的制备: 将PCCC、普通羟基磷灰石陶瓷各12块放入24孔培养板上, 以条件培养基浸泡24 h, 自然干燥备用。将已传第3代、并经过条件培养基诱导后生长良好的鼠BMSCs细胞消化、离心, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度利用微量移液器接种到上述材料上, 放入37 °C、体积分数5%的CO₂孵箱中培养4 h后, 再加入适量条件培养基, 放回孵箱中。

相差显微镜与扫描电镜观察: 每日使用相差显微镜观察细胞生长及与生物材料附着的情况。细胞与材料联合培养, 分别于7, 14 d从培养孔中取出材料-细胞复合体, 磷酸盐缓冲液轻轻冲洗2次, 20 g/L戊二醛固定2 h, 10 g/L锇酸固定2 h, 体积分数30%, 50%, 70%, 90%和无水乙醇梯度脱水, 自然干燥, 表面喷金, 扫描电镜观察。

碱性磷酸酶活力测定: 细胞与PCCC和普通羟基磷灰石陶瓷材料(各4块)联合培养1周后, 弃去培养液, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化收集细胞, 经0.01 mol/L pH 7.4的PBS洗3次, 加入100 μL 0.1 mol/L的TritonX-100置4 °C冰箱过夜。观察已无完整细胞结构, 经振荡后, 加入试剂盒中新鲜配制的底色反应剂100 μL , 37 °C温箱内30 min后, 再加入1 mol/L NaOH 50 μL 终止反应, 酶联免疫检测仪410 nm 波长下测定各孔A值。

流式细胞仪检测: 细胞与PCCC和普通羟基磷灰石陶瓷材料(各4块)联合培养1周后, 弃去培养液, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化收集细胞, 经0.01 mol/L pH 7.4的PBS洗3次, 用4 °C、体积分数70%乙醇固定4 h, 离心弃去固定液, PBS重悬5 min, 500~1 000 r/min离心5 min, 弃去PBS, 用1 mL 100 mg/L PI液染色。4 °C避光30 min, 过400目筛后用流式细胞仪进行检测, 用Multicycles软件分析结果并计算两种材料对成骨细胞的细胞周期、DNA含量、倍体水平变化。

武汉大学中南医院骨科, 湖北省武汉市 430071

魏任雄☆, 男, 1980年生, 湖北省黄梅县人, 汉族, 2009年武汉大学医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤与骨组织工程研究。
Feiyi030@163.com

通讯作者: 谭金海, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 武汉大学中南医院骨科, 武汉大学中南医院骨科, 湖北省武汉市 430071
guke3224@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)42-07822-05

收稿日期: 2011-07-04
修回日期: 2011-08-12
(20110704007/W - W)

主要观察指标: ①骨髓基质细胞免疫组织化学染色结果。②相差显微镜与扫描电镜观察。细胞生长及与生物材料附着的情况。③碱性磷酸酶活力测定。④成骨细胞周期各时期分布。

统计学分析: 由第一作者利用SPSS17.0统计软件进行t检验, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示并进行统计学分析。

2 结果

2.1 诱导培养的骨髓基质细胞免疫组织化学染色结果
大鼠BMSC经诱导培养14 d后, 细胞形态不规则, 多呈三角形、多角形, 有较多突起, 见图1。矿化沉积茜素红染色, 见图2、碱性磷酸酶免疫组织化学染色及I型胶原染色均为阳性见图3, 4, 表明大鼠骨髓基质细胞表达成骨细胞表型。

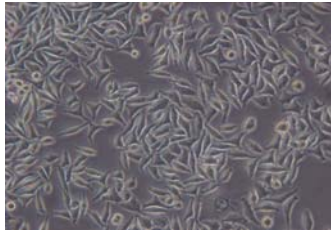


Figure 1 Observation of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured *in vitro* under inverted microscope ($\times 100$)
图 1 大鼠骨髓基质干细胞体外培养后倒置显微镜观察 ($\times 100$)

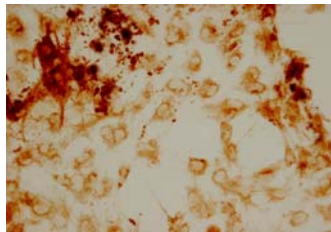


Figure 2 Alizarin red staining for mineralized nodules of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured *in vitro* ($\times 100$)
图 2 大鼠骨髓基质干细胞体外培养后矿化沉积茜素红染色 ($\times 100$)

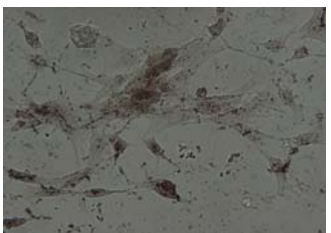


Figure 3 Alkaline phosphatase staining of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured *in vitro* ($\times 100$)
图 3 大鼠骨髓基质干细胞体外培养后碱性磷酸酶免疫组织化学染色 ($\times 100$)

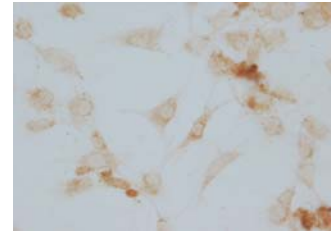


Figure 4 Collagen type I staining of rat bone marrow mesenchymal stem cells cultured *in vitro* ($\times 100$)
图 4 大鼠骨髓基质干细胞体外诱导分化培养后I型胶原染色 ($\times 100$)

2.2 两种材料相差显微镜观察结果 两种材料上皆有细胞附着生长, 但羟基磷灰石陶瓷组细胞开始贴壁时间明显晚于PCCC组细胞, 一般需5.0~6.0 h, 而PCCC组细胞则在4 h内大部分黏附于材料表面。随着培养时间的延长, 周围细胞逐渐移向材料周边, 并开始材料周围与表面密集生长, 此时细胞形态为多角形, 羟基磷灰石陶瓷组与PCCC组细胞生长状态及细胞形态相似, 见图5, 6。未观察到细胞衰老及异常分裂现象。

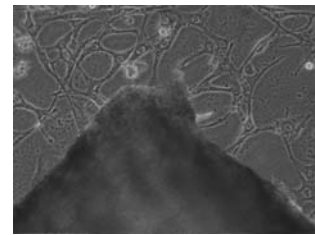


Figure 5 Observation of cell growth under inverted microscope in hydroxyapatite ceramics group ($\times 100$)
图 5 羟基磷灰石陶瓷组细胞生长状况倒置显微镜观察 ($\times 100$)

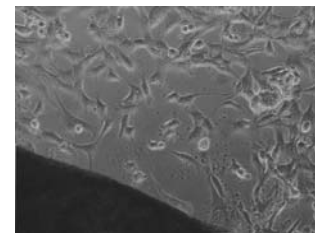


Figure 6 Observation of cell growth under inverted microscope in porous calcium carbonate ceramics group ($\times 100$)
图 6 多孔碳酸钙陶瓷组细胞生长状况倒置显微镜观察 ($\times 100$)

2.3 两种材料扫描电镜观察结果 扫描电镜观察可见7 d时羟基磷灰石陶瓷组与PCCC组细胞在支架的表面上单层生长, 见图7, 8。细胞突起接触融合, 细胞表面及周围可见少量胶原纤维丝; 14 d时可见两组细胞分泌的胶原纤维丝交织覆盖在材料表面和孔隙内, 细胞叠层生长, 分泌钙化基质, 羟基磷灰石陶瓷组细胞表面可见

散在少量高密度颗粒, 见图9, PCCC组表面可见大量高密度颗粒, 见图10。观察期内实验组表面细胞分泌钙化基质均多于对照组。

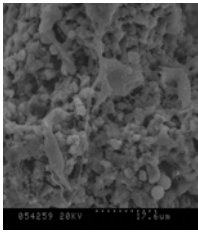


Figure 7 Observation of cell adherent growth at 7 d under scanning electron microscope in hydroxyapatite ceramics group ($\times 900$)
图 7 扫描电镜观察羟基磷灰石陶瓷组细胞培养 7 d 后贴壁生长情况($\times 900$)

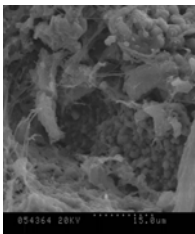


Figure 8 Observation of cell adherent growth at 7 d under scanning electron microscope in porous calcium carbonate ceramics group ($\times 900$)
图 8 扫描电镜观察多孔碳酸钙陶瓷组细胞培养 7 d 后贴壁生长情况($\times 900$)

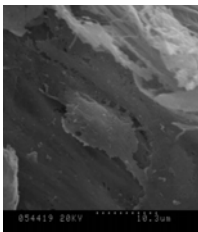


Figure 9 Small quantity of high-density particles under scanning electron microscope in hydroxyapatite ceramics group ($\times 1500$)
图 9 扫描电镜观察羟基磷灰石陶瓷组细胞表面可见散在少量高密度颗粒($\times 1500$)

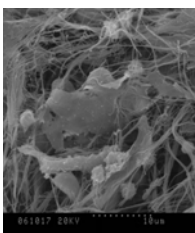


Figure 10 Large quantity of high-density particles under scanning electron microscope in porous calcium carbonate ceramics group ($\times 1500$)
图 10 扫描电镜观察多孔碳酸钙陶瓷组表面可见大量高密度颗粒($\times 1500$)

2.4 碱性磷酸酶活力测定 PCCC组与羟基磷灰石陶瓷组碱性磷酸酶活性分别为 (0.131 ± 0.028) U/mg、 (0.079 ± 0.015) U/mg, 实验组与对照组间差异均有显著性意义($P < 0.05$), 实验组成骨细胞的碱性磷酸酶活性大于对照组。

2.5 流式细胞仪检测 复合培养对SD大鼠成骨细胞的细胞周期有影响, 复合培养7 d后, 两组细胞为正常的二倍体细胞, 未见异倍体细胞。 G_0/G_1 期PCCC组细胞少于羟基磷灰石陶瓷组($P < 0.05$), 而S期及 G_2/M 期细胞增加并且细胞增殖指数(proliferation index, PI)增高($P < 0.05$), 见表1。

表 1 复合培养对成骨细胞周期各时期分布的影响
Table 1 Effect of different ceramics on cell cycle ($\bar{x}\pm s, \%$)

Group	G_0/G_1	S	G_2/M	PI
HA	80.92 ± 1.67	6.75 ± 0.52	12.15 ± 1.23	19.20 ± 1.69
PCCC	70.90 ± 1.47^a	12.50 ± 1.33^a	15.37 ± 1.45	28.19 ± 1.67^a

^a $P < 0.05$, vs. HA group; HA: hydroxyapatite ceramics group; PCCC: porous calcium carbonate ceramics group

3 讨论

目前, 在组织工程研究中应用的支架材料主要有三大类^[1-10]: ①天然支架材料类, 如胶原、明胶、甲壳素、壳聚糖、海藻酸盐、透明质酸钠等, 此类材料制成的细胞支架生物相容性一般较好, 有利于成骨细胞的黏附、分化、增殖; 但其较易被体液的各种酶所降解, 降解速度过快^[11-13]。②合成高分子可降解材料类, 如聚乳酸、聚乙醇酸以及其各种共聚物。聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物在组织工程中的应用的主要结构形式有纤维支架、多孔泡沫以及管状结构等^[14]; 但是其存在亲水性差、引起无菌性炎症、抗压强度差等缺点, 这也限制其临床应用前景。③生物陶瓷类^[15]: 主要包括磷酸三钙、羟基磷灰石、磷酸四钙及其衍生物, 如氟代或氧化羟基磷灰石。由于磷酸钙陶瓷表面的电位效应、润湿性及游离的磷酸根离子不利于细胞的黏附、增殖, 这方面的研究尚有待于进一步深入^[16-18]。④多孔碳酸钙支架材料: 天然珊瑚(主要成分为碳酸钙)制成的细胞支架在20世纪90年代初即被用于作为人类骨髓细胞、成纤维细胞、牙龈纤维细胞及胎鼠骨细胞的体外培养^[19-23]。作者实验发现, 尽管培养早期人类细胞的贴壁率较低, 但20 d后细胞和培养板一致, 细胞的生理活性正常, 分泌的骨基质蛋白, I型、III型胶原、骨桥素均显示阳性, 细胞在支架上增殖持续时间长。

曾垂省等^[24]采用盐析法制备了PCCC, 该陶瓷的气孔率、孔径和孔连通性能通过调控温度、添加NaCl的含量、粒径和颗粒分布方式来调控。作者前期研究用带血

管蒂骨膜瓣包裹PCCC修复兔胫骨缺损, 实验证实该材料植入机体后, 不产生局部或全身的毒性反应, 无炎症反应和排斥现象, 且该材料能与机体的骨组织直接结合, 二者间无纤维组织形成^[25]。

通过在体外模拟体内细胞生长的微环境, 将材料与细胞复合培养可直接观察细胞在生物材料上生长的状况, 了解细胞与材料之间的相互作用, 有助于组织工程支架材料的筛选。大鼠BMSC矿化诱导培养后的成骨为贴壁依赖型细胞, 只有附着在材料上才能表达生理功能^[26]。细胞与材料之间黏附特性的差异将会导致细胞在增殖、分化功能方面不同的表达。应用相差显微镜和扫描电子显微镜对比观察细胞对材料的黏附以及细胞在材料上的生长及分泌钙化基质的情况, 结果显示成骨细胞在PCCC支架材料表面比羟基磷灰石陶瓷材料表面能表达出更好的黏附能力、增殖活力及成骨活性, PCCC具有更适合于细胞生理功能发挥的三维环境。

碱性磷酸酶是成骨细胞分化成熟的重要标志, 反映了成骨细胞合成I型胶原、形成骨基质的能力。PCCC组细胞碱性磷酸酶活性大于羟基磷灰石陶瓷组($P < 0.05$), 这说明实验组成骨细胞较对照组具有更好的功能和活性状态。可能的机制为PCCC支架材料表层具有表面或界面效应使材料的比表面积增加, 表面活性增大, 引导组织细胞的能力增强。

实验结果显示两组细胞为正常的二倍体细胞, 未见异倍体细胞。实验组较对照组G₀/G₁期细胞减少, 而S期及G₂/M期细胞增加并且PI增高($P < 0.05$), 可以认为实验组细胞增殖活性高于对照组。这可能与PCCC具有良好引导组织细胞黏附、增殖的能力有关。

4 参考文献

[1] Kasai T, Sato K, Kanematsu Y, et al. Bone tissue engineering using porous carbonate apatite and bone marrow cells. *J Craniofac Surg.* 2010;21(2):473-478.

[2] Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):685-697.

[3] Kastrinaki MC, Papadaki HA. Mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis: biological properties and clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009;4(1):61-69.

[4] Sun H, Liu W, Zhou G, et al. Tissue engineering of cartilage, tendon and bone. *Front Med.* 2011;5(1):61-69.

[5] Saranya N, Saravanan S, Moorathi A, et al. Enhanced osteoblast adhesion on polymeric nano-scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol.* 2011;7(2):238-244.

[6] Griffin M, Iqbal SA, Bayat A. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *J Bone Joint Surg Br.* 2011;93(4):427-434.

[7] Carpentier B, Layrolle P, Legallais C. Bioreactors for bone tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 2011;34(3):259-270.

[8] Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, et al. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology.* 2011;75(8):1381-1399.

[9] El Haj AJ, Cartmell SH. Bioreactors for bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010 Dec;224(12):1523-1532.

[10] Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224(12):1415-1440.

[11] Venkatesan J, Qian ZJ, Ryu B, et al. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomed Mater.* 2011;6(3):035003.

[12] Matsushima S, Isogai N, Jacquet R, et al. The Nature and Role of Periosteum in Bone and Cartilage Regeneration. *Cells Tissues Organs.* 2011 May 20.

[13] Perez RA, Ginebra MP, Spector M. Cell response to collagen-calcium phosphate cement scaffolds investigated for nonviral gene delivery. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(4):887-897.

[14] Xu H, Han D, Dong JS, et al. Rapid prototyped PGA/PLA scaffolds in the reconstruction of mandibular condyle bone defects. *Int J Med Robot.* 2010;6(1):66-72.

[15] Chandramohan D, Marimuthu K. Characterization of natural fibers and their application in bone grafting substitutes. *Acta Bioeng Biomech.* 2011;13(1):77-84.

[16] Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2011;21:341-354.

[17] Ngiam M, Liao S, Patil AJ, et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone.* 2009;45(1):4-16.

[18] Ni GX, Yao ZP, Huang GT, et al. The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(4):961-967.

[19] Guarino V, Ambrosio L. Temperature-driven processing techniques for manufacturing fully interconnected porous scaffolds in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224(12):1389-1400.

[20] Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, et al. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2009;6 Suppl 3:341-348.

[21] Mahony O, Jones JR. Porous bioactive nanostructured scaffolds for bone regeneration: a sol-gel solution. *Nanomedicine (Lond).* 2008;3(2):233-245.

[22] Siddappa R, Fernandes H, Liu J, et al. The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2(3):209-220.

[23] Yu HD, Zhang ZY, Win KY, et al. Bioinspired fabrication of 3D hierarchical porous nanomicrostructures of calcium carbonate for bone regeneration. *Chem Commun (Camb).* 2010;46(35):6578-6580.

[24] Zeng CS, Liang YL, Chen XM, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng yu Linchuang Kangfu.* 2008; 12(10):1867-1869. 曾垂省, 梁亦龙, 陈晓明, 等. 升温速度对多孔生物陶瓷特性的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复.* 2008, 12(10):1867-1869.

[25] Tan JH, Chen XM, Chen ZG, et al. *Zhonghua Shiyuan Waikexi Zazhi.* 2003;12:1131-1132. 谭金海, 陈晓明, 陈振光, 等. 多孔碳酸钙陶瓷修复骨缺损的实验研究[J]. *中华实验外科杂志.* 2003, 12:1131-1132.

[26] Wang FK, Liu L, Li YL, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng yu Linchuang Kangfu.* 2008;12(33):6401-6405. 王福科, 刘流, 李彦林等. 骨髓基质干细胞与PDPB体外构建组织工程骨的适宜条件[J]. *中国组织工程研究与临床康复.* 2008, 12(33):6401-6405.

[27] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 湖北省自然科学基金重点项目 (2009CDA058)。

作者贡献: 实验设计及实施主要由第一、二作者完成, 第四、五作者评估, 经正规培训, 采用盲法评估。第一作者成文, 第三作者审核, 第一作者对文章负责。第三作者为通信作者。

利益冲突: 课题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 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[27]。

本文创新性: 与国内外同类研究比较, 实验主要着重与研究干细胞源性的成骨细胞与多孔碳酸钙陶瓷的相容性及符合培养的生物行为改变, 发现多孔碳酸钙陶瓷与干细胞源性的成骨细胞具有良好组织相容性。