

重组人血管内皮生长因子165/重组人骨形态发生蛋白2/脱蛋白骨与深低温冷冻骨成骨能力的比较★

何盛江¹, 郑 华¹, 倪卫东²

Comparison of osteogenesis between the recombinant human vascular endothelial growth factor 165/recombinant human bone morphogenetic protein 2/deproteinized bone and deep frozen bone

He Sheng-jiang¹, Zheng Hua¹, Ni Wei-dong²

Abstract

BACKGROUND: Artificial bone made by vector, osteoinductive factor and growth factor has been proved as an ideal biomaterial.

OBJECTIVE: To compare the revascularization and osteogenesis ability of the composite of recombinant human vascular endothelial growth factor 165/recombinant human bone morphogenetic protein 2/deproteinized bone (rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB) with deep frozen bones.

METHODS: All of the left forearm radial bones were manufactured into the models of bone defect about 15 mm. The models were randomly divided into two groups. The rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB composite was implanted in the experimental group and the deep frozen bones were implanted in the control group.

RESULTS AND CONCLUSION: At 16 weeks, the bone in the defect area healed and the density of the grafts was close to the surrounding normal bone tissue in the experimental group; In the control group, more callus formation could be seen between the ends of the defects, and the density of the grafts was higher than that of the surrounding normal bone tissue. In the experimental group, there were no boundaries on the interface of graft-receptor, and the bone healed. In the control group, the boundaries were vague, and part of the bone healed. At 3 days and 1, 2, 4 and 8 weeks, ink perfusion microvascular analysis showed that the vascular formation in the experimental group was more than that in the control group ($P < 0.01$); Biomechanical testing showed that the three-point bending stress load of the experimental group was significantly stronger than of the control group ($P < 0.01$). The composite of rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB can induce callus formation, accelerate the vascularization of the graft, and have fair biological and biomechanical function.

He SJ, Zheng H, Ni WD. Comparison of osteogenesis between the recombinant human vascular endothelial growth factor 165/recombinant human bone morphogenetic protein 2/deproteinized bone and deep frozen bone. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3611-3615. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 载体+骨诱导因子+生长因子模式人工骨已被证实是理想的人工骨材料。

目的: 验证血管内皮生长因子+骨形态发生蛋白与脱蛋白骨复合成重组人工骨的再血管化及成骨作用, 并与深低温冷冻骨比较。

方法: 新西兰大白兔左前臂制成桡骨 15 mm 骨缺损模型, 随机分成 2 组, 实验组植入重组血管内皮生长因子 165/重组骨形态发生蛋白 2/脱蛋白骨; 对照组植入深低温冷冻骨。

结果与结论: 16 周, 实验组骨缺损区骨性愈合, 移植骨密度接近周围正常骨组织; 对照组: 断端间可见较多骨痂生成, 移植骨密度稍高于周围正常骨组织。实验组移植骨-受体界面无明显分界, 达到骨愈合; 对照组移植骨-受体分界线模糊, 部分骨愈合。第 3 天及第 1, 2, 4, 8 周, 墨汁灌注微血管分析结果显示, 实验组血管生成明显多于对照组($P < 0.01$); 生物力学测试结果显示, 实验组三点抗弯曲应力负荷明显强于对照组($P < 0.01$)。结果表明, 重组血管内皮生长因子 165/重组骨形态发生蛋白 2/脱蛋白骨重组人工骨能诱导断端间骨痂形成, 加快移植物的血管化速度, 且具有良好的生物学功能及生物力学功能。

关键词: 骨形态发生蛋白; 脱蛋白骨; 血管内皮生长因子; 兔; 桡骨; 移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.001

缩略语: VEGF: vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子; BMP: bone morphogenetic protein, 骨形态发生蛋白; DPB: deproteinized bone, 脱蛋白骨

何盛江, 郑华, 倪卫东. 重组人血管内皮生长因子 165/重组人骨形态发生蛋白 2/脱蛋白骨与深低温冷冻骨成骨能力的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3611-3615. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

¹Department of Orthopedics, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

He Sheng-jiang★, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China

Corresponding author: Ni Wei-dong, Chief physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
niweidong18@163.com

Received: 2011-10-02
Accepted: 2011-11-14

0 引言

实验将血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)在体外与脱蛋白骨(deproteinized bone, DPB)复合, 植入实验兔桡骨大段骨缺损模型, 了解

其在体内的再血管化及成骨作用, 并与国内经批准可临床应用的山西奥瑞深低温冷冻骨相比较, 观察其能否更好地促进大段骨缺损的修复。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于2006-01/2009-06在

¹ 重庆医科大学附属永川医院骨科, 重庆市 402160; ² 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆市 400016

何盛江★, 男, 1968年生, 重庆市人, 汉族, 1992年四川大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事创伤骨科研究。

通讯作者: 倪卫东, 主任医师, 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆市 400016 niweidong18@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)20-03611-05

收稿日期: 2011-10-02
修回日期: 2011-11-14
(20110802016/W - C)

重庆医科大学动物实验中心完成。

材料:

试剂及材料	来源
重组人血管内皮生长因子165 (recombinant human vascular endothelial growth factor, rhVEGF-165)	北京博奥森生物技术有限公司
重组人骨形态发生蛋白2 (recombinant human bone morphogenetic protein, rhBMP-2)	广州市达晖生物技术有限公司
山西奥瑞深低温冷冻骨	四川嘉太和公司

实验动物: 健康成年新西兰大白兔68只, 兔龄6~8个月, 雌雄不限, 体质量2.2~3.4 kg, 由重庆医科大学动物实验中心提供, 生产许可证号: SCXK(渝)2007-0001, 使用许可证号: 2007-0001。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

实验方法:

脱蛋白骨的制作: 采集新鲜牛股骨下端松质骨, 尽量去除骨表面肌肉、韧带、骨膜, 制成长约3 mm×4 mm×15 mm松质骨条, 经蒸馏水反复冲洗干净, 以体积分数20%的过氧化氢脱蛋白, 乙醚循环脱脂, 制成脱蛋白骨材料, 冻干, 环氧乙烷消毒, 低温保存备用。

脱蛋白骨的修饰及称质量: 在超净工作台内, 选取大小、质量基本相同的脱蛋白骨骨块, 经超声波清洗机洗涤, 先后经 rhVEGF-165 (3 μg/L) 及 rhBMP-2 (1 mg/L) 稀释液浸泡、控干, 经电子天平称质量、记录并编号后, 即刻分零, 环氧乙烷消毒保存。

深低温冷冻骨的准备: 将山西奥瑞深低温冷冻骨参照已制备的脱蛋白骨质量修剪, 并经电子天平称质量、记录并编号后, 消毒备用。

实验分组: 68只新西兰大白兔左前臂制成桡骨15 mm骨缺损模型, 随机分为2组, 各34只。实验组植入 rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB; 对照组植入山西奥瑞深低温冷冻骨。

建立兔桡骨大段骨缺损模型: 实验兔以速眠新麻醉成功后, 仰卧位固定于手术台上, 常规剃毛, 消毒铺无菌巾, 左侧前臂桡侧中段切口, 逐层显露桡骨, 以牙科磨钻将该处桡骨截断并去除, 造成长约15 mm大段骨缺损, 将移植物固定于桡骨断端, 修复骨膜, 逐层缝合切口, 分笼饲养, 术后肌肉注射青霉素80×10⁴ U, 每日2次连用3 d。

大体观察: 在材料植入后第1, 2, 4, 8,

12, 16周, 随机抽取两组动物各2只, 处死后观察植入区骨生长情况及周围软组织情况。

X射线片检查: 在材料植入后第1, 2, 4, 8, 12, 16周, 分别对两组动物行正侧位X射线拍摄, 观察植入区骨愈合情况、移植植物有无移位等, 间接判断移植物的血管再生和成骨情况。

组织学观察: 在材料植入后第1, 2, 4, 8, 12, 16周, 随机抽取两组动物各2只, 处死后将缺损植入区组织进行固定、脱钙、脱水、切片, 苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察。

墨汁灌注微血管分析: 在材料植入后第3天, 第1, 2, 4, 8周, 随机抽取两组动物各2只行上肢微血管灌注。于腋动脉插管, 结扎腋动脉近端, 切断腋静脉, 经导管持续恒压注入灌注液(500 mL生理盐水+肝素钠12 500 U), 待颜色苍白且腋静脉流出液清凉无色后, 注入墨汁灌注液, 至前臂肌肉及甲床呈深黑色, 取前臂骨标本放于4℃冰箱24 h, 剔除软组织后, 将植入区骨标本制成40 μm厚透明切片, 每张切片中随机选择5个视野, 镜下经图像分析、计数分析, 观察血管生长情况, 最终结果用面积积分吸光度(A)表示(阳性积分吸光度/统计场面积)。

生物力学测试: 在材料植入后第4, 8, 12, 16周, 随机抽取两组动物各3只, 处死后分别解脱尺桡骨远近端关节, 并剔除软组织, 于重庆大学机械工程学院定做模具, 在生物力学测试系统(新三思, 微机控制万能材料试验机, CMT5150)上行三点弯曲测试, 了解其力学强度。

主要观察指标: ①两组兔大体观察。②两组兔植入区X射线片观察。③两组兔植入区组织学观察结果。④墨汁灌注微血管分析。⑤生物力学测试结果。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SAS统计软件包做方差分析, 组间样本行完全随机设计方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用新西兰大白兔68只, 分为2组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 两组兔大体观察结果 所有实验用兔术后无外固定辅助, 即刻负重活动。观察其生命体征平稳, 切口均无红肿、渗出, 伤口愈合Ⅰ/甲, 不需拆线。各组实验兔至处死前笼内活动正常, 无跛行, 无其他并发症。

2.3 两组兔植入区X射线片观察结果

实验组: 材料植入后1周植入区骨折线清晰, 无明显骨痂生成; 2周骨折线仍较清晰, 移植物密度较周围正常骨组织稍高; 4周骨折线趋于模糊, 断端可见有少量骨痂形成; 8周、12周时断端间骨痂形成增多, 骨折线模糊; 16周可见大量骨痂生成, 植入区骨折线消失, 骨缺损区骨性愈合, 移植物密度接近周围正常骨组织, 见图1。

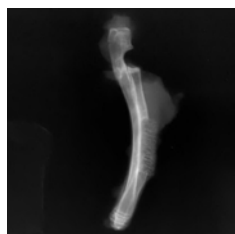


Figure 1 X-ray observation at 16 wk in the experimental group
图1 实验组 16 周 X 射线观察

对照组: 材料植入后1周植入区骨折线清晰, 无明显骨痂生成; 2周骨折线清晰可见, 未见有明显骨痂形成; 4周骨折线较清晰, 移植物密度较正常骨组织略高; 8周时骨折线稍模糊, 骨缺损区有少量骨痂; 12周时植入区骨痂形成增多; 16周时骨折线模糊, 断端间可见较多骨痂生成, 移植物密度稍高于周围正常骨组织, 见图2。

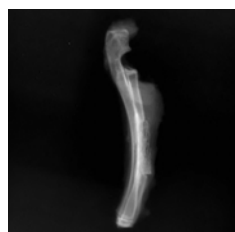


Figure 2 X-ray observation at 16 wk in the control group
图2 对照组 16 周 X 射线观察

2.4 两组兔植入区组织学观察结果

实验组: 材料植入后1周移植物-受体界面清晰, 大量炎性细胞出现, 散在成骨细胞出现; 2周时移植物可见有部分的新生血管、间充质细胞出现, 成骨细胞增多, 部分软骨细胞可见; 4周时移植物可见有大量的新生血管、间充质细胞及少量的炎性细胞出现, 成骨细胞多, 可有成群聚集, 破骨细胞增多, 软骨细胞增生活跃; 8周时可见骨折断端间由编织骨和板层骨构成, 但仍以编织骨为主, 部分骨髓腔再通, 血管增生明显; 12周时成骨细胞成团, 大片编织骨向板层状骨组织转化, 有骨的爬行替代现象, 骨髓腔已再通; 16周时大量的板层状骨组织形成, 移植物-受体界面无明显分界, 达到骨愈合, 见图3。

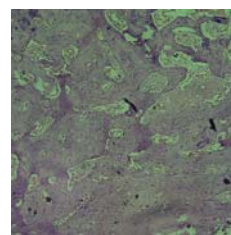


Figure 3 Hematoxylin-eosin staining at 16 wk in the experimental group ($\times 100$)
图3 实验组 16 周苏木精-伊红染色 ($\times 100$)

对照组: 材料植入后1周移植物-受体界面清晰, 大量炎性细胞出现, 散在成骨细胞出现; 2周时移植物-受体界面仍清晰, 炎性细胞仍较多, 少许成骨细胞; 4周时移植物内可见间充质细胞及大量的炎性细胞浸润, 偶见有新生血管, 成骨细胞增多; 8周时新生血管增多但明显较实验组少, 仍可见较多的炎性细胞, 少许编织骨形成, 骨髓腔未通; 12周时可见有编织骨的形成增多; 16周时编织骨向板层状骨组织转化, 有爬行替代现象, 移植物-受体分界线模糊, 部分骨愈合, 见图4。

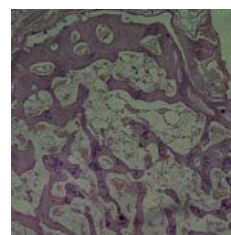


Figure 4 Hematoxylin-eosin staining at 16 wk in the control group ($\times 100$)
图4 对照组 16 周苏木精-伊红染色($\times 100$)

2.5 墨汁灌注微血管分析 实验组术后各期移植物内新生血管较多, 部分趋向成熟(见图5), 与对照组(见图6)比较差异均有显著性意义($P < 0.01$)。见表1。

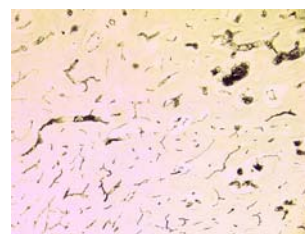


Figure 5 Ink perfusion microvascular analysis at 8 wk in the experimental group ($\times 100$)
图5 实验组 8 周墨汁灌注($\times 100$)

2.6 生物力学测试 材料植入后第4, 8, 12, 16周实验组、对照组三点弯曲应力结果经统计学分析, 实验组三点抗弯曲应力负荷明显强于对照组, 差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。见表2。

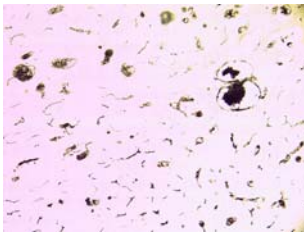


Figure 6 Ink perfusion microvascular analysis at 8 wk in the control group (x100)
图 6 对照组 8 周墨汁灌注(x100)

表 1 微血管图像分析结果
Table 1 Image-analysis result of vas capillary vessels
($\bar{x} \pm s$, $n=2$, IA/ μm^2)

Group	3 d	1 wk	2 wk	4 wk	8 wk
Experimental	0.12 $\pm$ 0.04 ^a	0.18 $\pm$ 0.03 ^a	0.23 $\pm$ 0.04 ^a	0.29 $\pm$ 0.03 ^a	0.36 $\pm$ 0.05 ^a
Control	0.03 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.05

^a $P < 0.01$, vs. control group; IA: integrated absorbance

表 2 三点弯曲应力结果分析
Table 2 Results of three-point bending stress load
($\bar{x} \pm s$, $n=3$, N)

Group	4 wk	8 wk	12 wk	16 wk
Experimental	101.51 $\pm$ 2.32 ^a	95.41 $\pm$ 2.93 ^a	98.64 $\pm$ 2.86 ^a	103.41 $\pm$ 3.32 ^a
Control	67.42 $\pm$ 3.32	56.37 $\pm$ 2.69	57.67 $\pm$ 2.33	70.41 $\pm$ 2.03

^a $P < 0.01$, vs. control group

2.7 材料宿主反应 两组动物早期炎症反应较弱, 未发生感染和死亡。

3 讨论

大段骨缺损骨移植后, 血供重建过程中, 血管生长主要由宿主骨一端向移植体逐渐生长, 这个过程缓慢且最终效果难以保障。

山西奥瑞深低温冷冻骨由山西省骨库将人骨骼放置于-298℃条件下处理后消毒包装, 经国家相关部门批准可用于临床。它具有安全、方便、成骨能力强等优点, 但不足之处在于来源有限、价格昂贵。作者利用异种脱蛋白骨作为载体, 复合 rh VEGF-165 和 rhBMP-2 因子, 以期复合在支架材料上的生长因子能在植入宿主体内后的一定时期内, 高效、稳定地释放, 从而提高植入区局部 VEGF 和 BMP 蛋白表达量, 达到植入物在宿主体内快速血管化, 促进骨缺损区成骨细胞的生长、增殖及分化, 从而达到移植体与受体早期骨性愈合的目的。以期找到一种安全、方便、廉价、成骨能力强的骨移植材料。

异种脱蛋白骨来源广泛, 作为一种生物组织, 它与

宿主骨具有同源性结构, 为细胞附着提供有效的三维立体支架, 它能促进胞外基质的合成和成骨细胞的分化^[1], 因为处理过程中经脱脂、脱蛋白等方法, 故处理后的支架材料具有低抗原性, 且具有较好的组织相容性及细胞相容性, 成为一种良好的骨移植材料^[2-3]。但脱蛋白骨支架材料的骨诱导作用相对自体骨仍欠佳, 脱蛋白骨的最终“活化”有赖于宿主移植区内毛细血管以及纤维结缔组织的长入^[4], 而研究表明新生血管的形成主要与多种诱导因子有关。

BMP 是多功能生长因子, 是一组高度保守的具有类似结构的功能蛋白, 通过旁分泌和自分泌, 能够在体内诱导骨和软骨形成的因子, 并在肢体生长、骨折早期、软骨内骨化、软骨修复时表达, 促使未分化的间质细胞经过趋化、分裂及分化等 3 个环节, 不可逆地转化为成软骨细胞及成骨细胞, 从而诱导新骨生成^[5-7]。Chen 等^[8]将重组的 BMP-2 经皮下注射在实验小鼠颅骨周围, 最终观察到新骨的生成。研究表明, 一定程度上, 成骨量与 BMP 浓度成正比, 而与扩散距离成反比。在一定距离内, 由于 BMP 在骨折端之间重叠分布, 浓度明显高于周围组织, 因而骨再生通常在骨折端间进行。而当骨折端间距大于临界值时, 内源性 BMP 的分布及其量将难以起到诱导趋化的作用, 因此应用外源性 BMP 将会弥补内源性 BMP 的不足。本实验以脱蛋白骨支架材料为载体, 复合一定浓度的 BMP, 研究结果证实实验组骨痂生成及骨折愈合速度明显快于对照组, 其成骨促进作用显著。

研究发现, VEGF 能有效促血管内皮细胞有丝分裂, 有利于新生血管的生成和血管维持功能, 增加血管的通透性, 加快材料局部降解, 并为新骨形成提供良好的靶点微环境^[9], 它还能增加成骨细胞的活性, 促进软骨内成骨, 从而有利于骨形成。研究还证实成骨细胞和血管内皮细胞间存在生长因子旁分泌和分泌的相互作用^[10-11]。本实验以脱蛋白骨支架材料为载体, 复合一定浓度的 VEGF, 结果表明实验组有大量血管形成, 再血管化速度实验组、对照组有明显差异。

在近来的一些研究报道中, 人们也发现 BMP 和 VEGF 在骨折愈合中对成骨有相互依赖合调控的作用^[12]。Peng 等^[13]研究表达人 VEGF 和 BMP 基因工程化的肌源性细胞, 经体外途径修复骨缺损, 结果证实 VEGF 能增加 BMP 募集间充质细胞并提高该细胞活性的作用, 从而促进骨缺损修复。Deckers 等^[14]研究表明, 在骨折愈合过程中, VEGF 和 BMP 的表达是一对偶联过程。BMP 可使成骨样细胞 VEGF 高表达, 从而刺激骨块的血管生成, 并且 VEGF 的产生与局部微环境中 BMP 的浓度呈正相关关系, VEGF 同时也促进成骨细胞的分化。本实验以脱蛋白骨为载体, 同时复合了 BMP 和 VEGF 两种因子, 在手术时, 作者尽量保留了移植区的骨膜, 从而最大限度地保留了 rhBMP-2 和

rhVEGF-165 作用的靶细胞,最终成骨效果以及早期再血管化效应明显优于单纯植入山西奥瑞深低温冷冻骨组,但两种因子相互之间是否相互促进,有无级联放大效应,尚需进一步研究证实。

目前,利用 VEGF 促进局部组织再血管化, BMP 促进骨生长的研究大多是采用局部注射、与载体复合后植入体内或将其经体内基因转染的方法。由于体内存在定向转染效果差、血液稀释等原因,使上述方法存在基因表达时限短、表达量低等缺点,最终限制了其临床应用^[15-16]。本实验采用脱蛋白骨为支架材料,由于制作材料来源于松质骨,孔径维持于 100~300 μm ,孔隙率较高,同时较好的保留了原骨组织的网架结构——三维孔隙系统。脱蛋白骨支架材料其网架有效空间大,具有较好的骨传导性^[17],从而为细胞的生长、贴附、增殖及成骨提供了理想场所^[18-21]。

研究表明,宿主对异种骨移植的免疫反应主要由细胞免疫介导,故而,细胞免疫可反映出移植骨材料抗原性的强弱。但由于骨是一种复合组织,除了骨基质和骨细胞外,还包括脂肪、血管、骨髓成分、神经及纤维结缔组织等成分,这些成分都构成骨移植时主要抗原成分^[22]。本实验采用异种脱蛋白骨移植骨材料,实验中去除了骨膜、韧带、肌肉等软组织,先后经过氧化氢乙醚法循环脱蛋白、脱脂等处理^[23],能较彻底的去除支架材料中主要的免疫原性物质,即蛋白质和脂质成分,有效降低植入宿主体内后引起排斥反应。但作者选择性地保留部分抗原性相对较弱的网状骨基质结构,以维持其天然形态结构和力学强度,而其中特别是骨胶原基质的残留,不可避免地会引起宿主一定的免疫反应。本组实验中,作者观察到两组动物早期炎症反应也明显较弱,最终没有实验动物发生感染和死亡。

综上所述,本实验证实了脱蛋白骨是一种较理想的生长因子的载体, rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB 具有良好的骨诱导和骨传导双重作用, rhVEGF-165/rhBMP-2/DPB 大段异体骨移植,促进了局部血管的早期生成,有利于新骨形成及愈合,并使移植骨逐渐“活化”而最终成为受体自身组织,为大段骨缺损的治疗提供了一种有效的治疗手段。

4 参考文献

- [1] Chen G, Jiang DM. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(42):8265-8268. 陈歌,蒋电明. 钙磷骨水泥 复合脱蛋白骨关节移植修复兔股骨远端关节缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(42): 8265-8268.
- [2] Li YL, Yang ZM, Xie HQ, et al. Zhongguo XiuFu Chongjian Waikexue. 2001;15(4):227-231. 李彦林,杨志明,解慧琪,等. 生物衍生骨支架材料的体外细胞相容性实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 227-231.
- [3] Yang ZM, Li YL, Xie HQ, et al. Zhonghua Zhengxing Waikexue. 2002;18(1):6-8. 杨志明,李彦林,解慧琪,等. 生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J]. 中华整形外科杂志, 2002, 18(1): 6-8.

- [4] Hu YK, An H, Cao BZ, et al. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 1998; 14(5):277-279. 胡永康,安洪,曹本珍,等. 四种脱蛋白骨组织学和生物力学比较研究[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(5): 277-279.
- [5] Stone CA, Lon D, WH et al. A molecular approach to bone regeneration. British J Plastic Surgery. 1997;50(5):369-373.
- [6] Reddi AH, Tin K, Lat Q et al. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells and biomimetic biomaterials. Tissue Eng. 2000;6(4):351-359.
- [7] Reddi AH, Tin K, Lat Q et al. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Clin Orthop. 1995;313:115-119.
- [8] Chen D, Lin Q et al. Bone morphogenetic protein 2 enhances BMP-3, BMP-4 and bone cell differentiation marker genes expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif tissue int. 1996.
- [9] Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, et al. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. J Biochem (Tokyo). 2003; 133(5): 633-639.
- [10] Wang DS, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinology. 1997; 138(7): 2953-2962.
- [11] Street J, Bao M, Deguzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15): 9656-9661.
- [12] Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. Biochem Biophys Res Commun. 2004;316(2): 573-579.
- [13] Peng S, Hairong D, Wright M, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. J Clin Invest. 2002;110(6):751-759.
- [14] Deckers MM, Bezoijsen RI, Vander HG, et al. Bone Morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology. 2002; 143(4): 1545-1553.
- [15] Gu F, Amsden B, Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. J Control Release. 2004;96(3):463-472.
- [16] Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, et al. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. J Orthop Res. 2003;21(2):335-340.
- [17] Ding ZQ, Shi LL, Kang LQ, et al. Linchuang Guke Zazhi. 2010;13(2): 200-203. 丁真奇,石玲玲,康两期,等. 异种脱蛋白骨管移植修复大段骨缺损的力学评估[J]. 临床骨科杂志, 2010, 13(2): 200-203.
- [18] Kunjathan V, Subramanian A, Hanna M, et al. Comparison of different fabrication techniques used for processing 3-dimensional, porous, biodegradable scaffolds from modified starch for bone tissue engineering. Biomed Sci Instrum. 2004;40:129-135.
- [19] El-Ghannam AR. Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: Design principles and structure-bioactivity relationship. J Biomed Mater Res. 2004;69A(3):490-501.
- [20] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2004;32(3):477-486.
- [21] Walles T, Herden T, Haverich A, et al. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. Biomaterials. 2003;24(7):1233-1239.
- [22] Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. J Orthop Res. 1998; 16(6): 654-659.
- [23] Ding ZQ, Tan FS, Wu ZR. Zhonghua Chuangshang Waikexue. 1994;10(6):261-263. 丁真奇,谭富生,吴祖尧. 四种移植材料修复兔颅骨缺损的比较研究[J]. 中华创伤外科杂志, 1994, 10(6): 261-263.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 设计、实施、评估为本文作者。

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。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。