

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.21.017 [http://www.crter.org]
陈琛, 徐晓峰. 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(21):3921-3927.

骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体的生物相容性**

陈琛¹, 徐晓峰²

1 铜陵市人民医院, 安徽省铜陵市 244000
2 江苏大学附属医院骨科, 江苏省镇江市 212001

文章亮点:

- 1 在以往构建生长因子/复合载体支架的基础上, 利用硫酸钙的物理特性, 将注射式硫酸钙与骨形态发生蛋白2制成缓释载体, 观察骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体的体外缓释作用, 以及对骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的影响。
- 2 体外实验发现骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体具备良好的生长因子释放能力, 与骨髓间充质干细胞具有良好生物相容性, 并且具有骨诱导和骨传导作用。
- 3 骨形态发生蛋白释放过程中存在的形式尚需进一步研究和分析; 实验所用数据和结果都建立在体外平面上, 缺乏体内实验的数据结果, 这也是今后的研究重点。

关键词:

生物材料; 材料生物相容性; 骨形态发生蛋白2; 注射式硫酸钙; 大鼠骨髓间充质干细胞; 生物相容性; 其他基金

摘要

背景: 目前硫酸钙主要被作为抗生素载体和成骨因子载体。

目的: 观察骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释系统的体外缓释效果及与种子细胞的生物相容性。

方法: 制备骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释系统, 检测其体外释放性能。将SD大鼠骨髓间充质干细胞经体外诱导培养、扩增后, 种植于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体和单纯的注射式硫酸钙支架上行体外培养。

结果与结论: 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释支架具有缓释骨形态发生蛋白2的效果, 持续时间可达31 d。骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释支架与大鼠骨髓间充质干细胞具有优良的生物相容性, 并且相同时间点支架上的细胞黏附率、细胞数量及细胞碱性磷酸酶活性均明显高于注射式硫酸钙支架; 扫描电镜发现两组材料上均有细胞生长, 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释支架上的细胞在支架表面和孔隙内生长良好, 细胞突起接触融合, 细胞密集区域可见细胞外基质形成, 大量细胞包绕在材料表面; 注射式硫酸钙支架上的细胞黏附数量较少, 生长情况不及骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释支架上的细胞。

陈琛★, 1987年生, 安徽省芜湖市人, 汉族, 2012年江苏大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨组织工程方面的研究。
cicichan1987@163.com

通讯作者: 徐晓峰, 主任医师, 江苏大学附属医院骨科, 江苏省镇江市 212001
13775534791@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)21-03921-07

收稿日期: 2012-08-06
修回日期: 2013-03-24
(20120613001/GW·W)

Biocompatibility of bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement slow-release carriers

Chen Chen¹, Xu Xiao-feng²

1 Tongling People's Hospital, Tongling 244000, Anhui Province, China
2 Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 2120001, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: The calcium sulfate is mostly used as carriers for antibiotics and osteogenic factors by now.

Chen Chen★, Master,
Physician, Tongling People's
Hospital, Tongling 244000,
Anhui Province, China
cicichan1987@163.com

Corresponding author: Xu
Xiao-feng, Chief physician,
Tongling People's Hospital,
Department of Orthopedics,
Affiliated Hospital of Jiangsu
University, Zhenjiang
2120001, Jiangsu Province,
China
13775534791@163.com

Supported by: the Social
Development Fund Project of
Zhenjiang City, No.
SH2002019*

Received: 2012-08-06
Accepted: 2013-03-24

OBJECTIVE: To observe the *in vitro* delivery effect of bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement slow-release system and the *in vitro* biocompatibility with bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement slow-release scaffold was prepared and its release properties were detected. Bone marrow mesenchymal stem cells obtained from Sprague-Dawley rats were induced, cultured and proliferated *in vitro*, and then, the cells were seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds (experimental group) or single injectable calcium sulfate cement scaffolds (control group).

RESULTS AND CONCLUSION: The release of bone morphogenetic protein-2 on the scaffolds of experimental group could last for 31 days. Rat bone marrow mesenchymal stem cells had a good biocompatibility with the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds. The adhesive rate, cell number and alkaline phosphatase activity at the same time point in the scaffolds of experimental group were significantly greater than those of the control group. Cells could be observed on each scaffold under a scanning electron microscope. In the experimental group, interconnected cell processes were fused, extracellular matrix was visible in the dense area, and the scaffold was surrounded by a large number of cells. The cells in experimental group grew better than the control group.

Key Words: biomaterials; material biocompatibility; bone morphogenetic protein-2; injectable calcium sulfate cement; rat bone marrow mesenchymal stem cells; biocompatibility; other grants-supported paper

Chen C, Xu XF. Biocompatibility of bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement slow-release carriers. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(21): 3921-3927.

0 引言

骨组织工程是目前临床骨缺损修复的研究的热点, 然而由于生长因子存在稳定性差、半衰期短等不足, 限制了其临床应用。目前利用载体或缓释系统负载生长因子既能够保护生长因子的生物活性, 又可以达到生长因子缓慢释放的效果, 从而持续促进细胞生长及组织修复再生^[1-6]。骨形态发生蛋白2能诱导和加速间充质干细胞向成骨样细胞分化^[7]。注射式硫酸钙是医用半水硫酸钙的衍生产品之一, 可以作为支架材料搭载糖蛋白、氨基苷类抗生素^[8]。因此实验应用骨组织工程学方法, 将骨形态发生蛋白2负载于注射式硫酸钙上, 制备骨形态发生蛋白2缓释载体, 探讨其缓释性能及对大鼠骨髓间充质干细胞增值、分化的影响, 旨在通过体外实验为骨形态发生蛋白2寻找较理想的缓释载体。

1 材料和方法

设计: 完全随机分组设计, 对比观察实验。

时间及地点: 于2010年6月至2011年6月在江苏大学基础医学实验室完成。

材料:

骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体与骨髓间充质干细胞生物相容性实验的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
注射型硫酸钙	美国 Wright 公司
L-DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶	Gbico 公司
骨形态发生蛋白 2	PeproTech 公司
1.077 g/mL Ficon 淋巴细胞分离液	天津颀洋生物公司
细胞碱性磷酸酶染液、碱性磷酸酶检测试剂盒、茜素红染液、ELISA 试剂盒	南京碧云天公司
冯库萨染液	舜百生物科技有限公司
FLX800 酶标仪	美国 Gene company Limited
倒置相差显微镜	日本 OLYMPUS 公司
电子显微镜	南京农业大学大学生科院

实验动物: 健康雄性SD大鼠, 体质量约150 g, 由江苏大学动物实验中心提供。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离、培养: 颈椎脱臼处死SD大鼠, 无菌条件下取其股骨、胫骨, 用含体积分数10%胎牛血清的L-DMEM培养液冲洗骨髓腔, 冲出骨髓, 淋巴细胞分离液分离后, 常规传代培养^[9]。

骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙支架的制备: 按照说明书, 将固相硫酸钙粉末天平称质量4 g, 用无菌注射器抽取按固液相配比1:0.4的无菌蒸馏水, 加入100 mg/L骨形态发生蛋白2, 然后将固相粉剂加入含有骨形态发生蛋白2的混合溶剂中, 均匀搅拌1 min, 初步固化后注入自制模具5 mm×5 mm×5 mm内, 用2 kg砝码加压驱赶残存的空气, 约3 min后, 小心顶出样条, 将其置于37 °C恒温箱内继续固化5 min, 固化过程中同时测量硫酸钙的固化温度。固化后经灭菌后的细砂纸打磨, 将已制备的骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙置于4 °C冰箱中保存备用。然后再用以上方法制备单纯注射式硫酸钙(不加骨形态发生蛋白2), 分别制作20个样本。上述操作严格按照无菌要求。

骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙浸泡液取样及检测: 取上述制备好的复合载体样本4个分别置于无菌试管中, 加1%BSA-PBS(pH值7.2) 600 μL浸泡, 每24 h后吸出全部浸泡液移至无菌试管, 再向样本试管内添加等量1%BSA-PBS(pH值7.2), 取出的浸泡液置于-70 °C冰箱保存。通过双抗夹心ELISA法测定每日骨形态发生蛋白2的释放量, 即取每日所取样本浸泡液100 μL, 等量稀释后按大鼠骨形态发生蛋白2/ELISA试剂盒说明进行检测, 用酶标仪于450 nm处测出液体中骨形态发生蛋白2吸光度, 绘制出骨形态发生蛋白2释放曲线。

细胞接种: 将骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙(实验组)和注射式硫酸钙(对照组)样本分别置24孔培养板内, 0.25%胰酶消化生长良好的第2代骨髓间充质干细胞, 吸取制成的浓度 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液100 μL, 分别滴加到已置入24孔板的材料表面, 在37 °C、体积分数为5%CO₂, 饱和湿度静置3 h后翻转材料, 向每组材料的另一面滴100 μL该细胞悬液, 静置培养3 h后, 置于孵箱中培养, 3 d换液1次。

骨髓间充质干细胞成骨诱导的鉴定: 骨髓间充质干细胞与载体复合培养后, 倒置显微镜下观察其形态变化, 接种7 d行碱性磷酸酶细胞化学染色、14 d行茜素红染色及冯库萨染色。

材料上细胞黏附率、细胞计数及碱性磷酸酶活性检测: 接种细胞后6 h, 分别取每组材料4个样本, 0.25%胰蛋白酶

消化, PBS洗涤4次, 用细胞计数板进行计数, 根据公式: 细胞黏附率=(黏附细胞数/接种细胞数)×100%, 计算细胞黏附率。第3, 7, 10, 14天时, 每组材料各取样本4块, PBS洗涤4遍, 0.25%胰酶消化细胞, 反复吹打材料后加入等量含体积分数为10%胎牛血清的培养基终止消化, 取出材料, 培养液离心, 制悬, 计数。上述计数后的细胞悬液, 在冰浴中用超声细胞破碎机处理5次, 6 s/次, 共30 s, 然后1 000 r/min离心5 min, 取上清液, 按碱性磷酸酶试剂盒说明书, 计算出碱性磷酸酶活性。

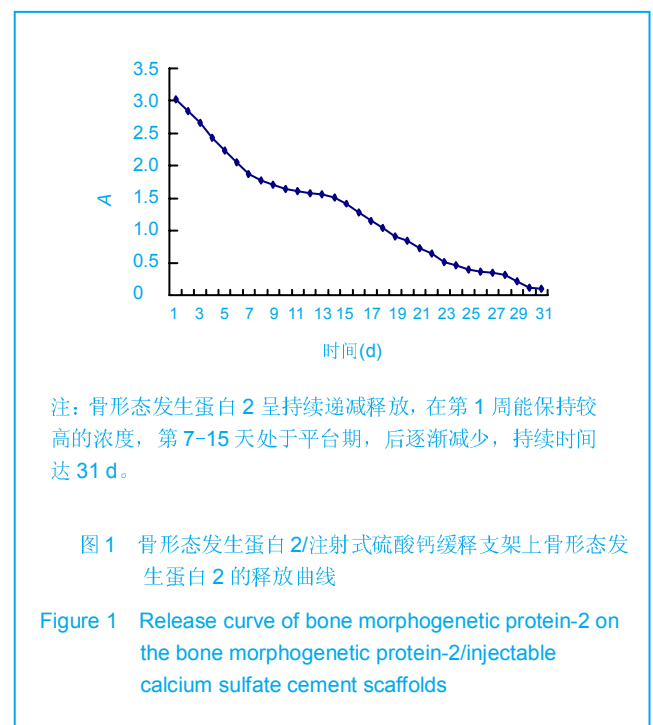
扫描电镜观察: 接种第7天时, 每组分别取出2块细胞支架复合物, 40 g/L多聚甲醛-2.5%戊二醛固定, 乙醇梯度脱水, 临界点干燥, 喷金, 扫描电镜下观察细胞生长情况。

主要观察指标: ①骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙的体外缓释效果。②两组材料上的细胞黏附率、细胞计数及碱性磷酸酶活性检测结果。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 11.5统计软件中的方差分析进行统计学处理, 若有差异有显著性再采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体上骨形态发生蛋白2的释放量和持续时间 骨形态发生蛋白2呈持续递减释放, 在第1周能保持较高的浓度, 第7-15天处于平台期, 后逐渐减少, 持续时间达31 d, 见图1。



2.2 不同材料上的细胞黏附率测定 细胞接种6 h后, 实验组细胞黏附率为(55.2±2.6)%, 对照组细胞黏附率为(35.2±3.2)%, 两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 不同支架材料上的细胞计数 两组材料上细胞数量均随培养时间延长而逐渐增多, 相同时相点实验组材料上的细胞数量与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

表1 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体和单纯注射式硫酸钙支架不同时间点的细胞计数

Table 1 Counts of the bone marrow mesenchymal stem cells after seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds or single injectable calcium sulfate cement scaffolds ($\bar{x} \pm s$)

接种时间	骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体	注射式硫酸钙支架
3 d	4.62±0.27	2.64±0.13 ^a
7 d	9.92±0.14	4.53±0.12 ^a
10 d	15.17±0.18	7.65±0.24 ^a
14 d	21.25±0.52	11.29±0.48 ^a

与骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙支架组比较, ^a $P < 0.05$ 。

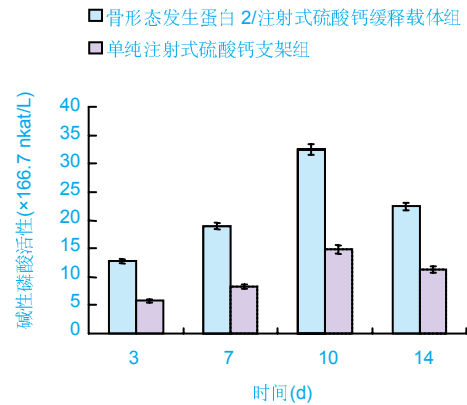
注: 两组材料上细胞数量均随培养时间延长而逐渐增多, 相同时相点骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体材料组上的细胞数量高于注射式硫酸钙支架组($P < 0.05$), 表明骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体与细胞具有良好的相容性。

2.4 不同支架材料的细胞碱性磷酸酶活性检测 两组碱性磷酸酶活性在第10天时达到最高峰, 相同时相点实验组碱性磷酸酶活性最高, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图2。

2.5 骨髓间充质干细胞培养与成骨诱导的鉴定 培养48 h后, 可见有少量贴壁细胞, 多为梭形或成纤维细胞样。7 d左右细胞可长满瓶底, 细胞间排列紧密, 呈均匀一致的长梭形。经过不同载体复合培养后, 行碱性磷酸酶细胞化学染色, 对照组为阴性, 实验组呈阳性, 可见胞质中棕黄色颗粒; 14 d行茜素红和冯库萨染色, 对照组为阴性, 实验组为强阳性, 细胞间可见大块细胞融合形成的钙结节, 见图3-5。

2.6 扫描电镜观察细胞在不同材料上的生长状况 可以观察到该载体存在明显的微孔结构。实验组接种7 d

后电镜下可见较多细胞生长, 细胞突起接触融合, 包裹在材料表面, 见图6A; 对照组接种7 d后见支架表面黏附的细胞明显较少, 细胞之间少有突起连接, 见图6B。



注: 两组碱性磷酸酶活性在第10天时达到最高峰, 并且相同时相点骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体组碱性磷酸酶活性高于单纯注射式硫酸钙支架组($P < 0.05$), 表明骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体具有骨诱导作用。

图2 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体和单纯注射式硫酸钙支架不同时间点的细胞碱性磷酸酶活性

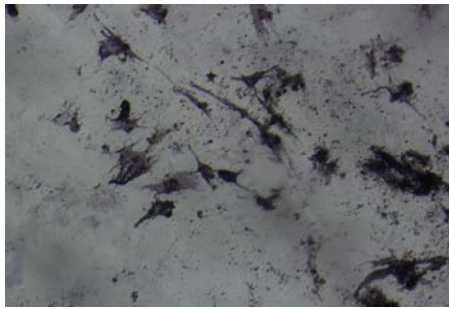
Figure 2 Alkaline phosphatase activity at different time after the cells were seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds or single injectable calcium sulfate cement scaffolds



A: 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体组细胞间排列紧密, 呈均匀一致的长梭形; B: 单纯注射式硫酸钙支架组细胞数较少, 细胞散落

图3 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体和单纯注射式硫酸钙支架7 d (×100)

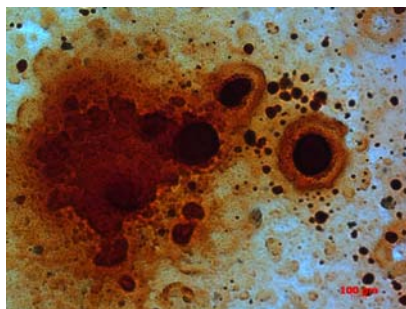
Figure 3 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells 7 d after seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds or single injectable calcium sulfate cement scaffolds (×100)



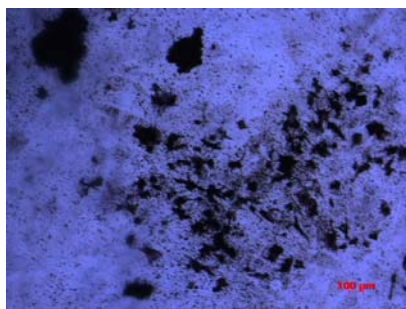
注: 碱性磷酸酶染色呈阳性, 可见胞质中棕黄色颗粒。

图4 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体7 d的碱性磷酸酶染色(×100)

Figure 4 Expression of alkaline phosphatase 7 d after the cells were seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds (×100)



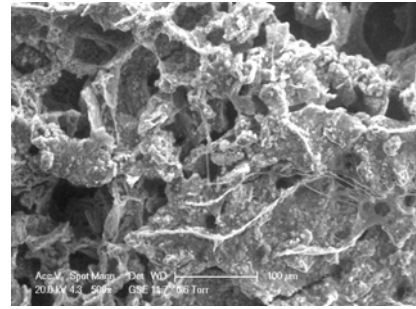
A: 茜素红染色可见大块的红色钙结节



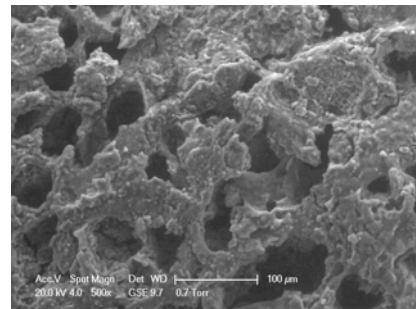
B: 冯库萨染色可见大块黑色的钙结节

图5 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体14 d的茜素红及冯库萨染色(×100)

Figure 5 Alizarin Reds and Von Kossa staining 14 d after the cells were seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds (×100)



A: 骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体组可见较多细胞生长, 细胞突起接触融合, 包绕在材料表面



B: 单纯注射式硫酸钙支架组见支架表面黏附的细胞明显较少, 细胞之间少有突起连接

图6 骨髓间充质干细胞接种于骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体和单纯注射式硫酸钙支架7 d的扫描电镜观察(×1 000)

Figure 6 Scanning electron microscopy observation 7 d after the cells were seeded onto the bone morphogenetic protein-2/injectable calcium sulfate cement scaffolds or single injectable calcium sulfate cement scaffolds (×1 000)

3 讨论

1965年, Urist^[10]首先报道将置于酸溶液中去钙的牛骨骨片植入肌内, 发现能够诱导新骨生成, 他们认为去钙骨基质中存在能诱导骨生长的未知物质, 称之为骨形态发生蛋白。随着分子生物学及重组DNA技术的发展, 已经证实存在并能重组合成骨形态发生蛋白。研究者们经过大量动物实验证实, 骨形态发生蛋白具有强大的促成骨活性, 能够诱导间充质细胞不可逆地分化为骨、软骨组织^[11-13]。骨形态发生蛋白是目前最肯定的具有诱导成骨作用的生长因子^[14], 但其在临床的应用未得到相应认可和推广。主要原因为骨形态发生蛋白的纯度或活性不足, 以及应用骨形态发生蛋白的过程中使用技巧、剂量掌握等方面存在差异。具备良好生物相容性的载体可

以明显改善骨形态发生蛋白生物活性的发挥,其首要的性能就是能对骨形态发生蛋白有良好的缓释作用^[15]。硫酸钙人工骨的应用研究已有1个世纪之久,众多文献表明硫酸钙人工骨具有良好的生物相容性、体内完全降解,是理想的骨移植替代材料。体外细胞培养研究证实成骨细胞可以黏附在硫酸钙表面生长,硫酸钙对成骨细胞无毒性作用,并在一定程度上刺激成骨细胞的增殖和分化。硫酸钙降解的同时为血管和成骨细胞长入提供空间和引导性支架,亦即硫酸钙降解吸收过程同步于骨的爬行替代过程。目前主要是作为抗生素载体和成骨因子载体^[16-17]。Turner等^[18]把含有10%硫酸妥布霉素的硫酸钙片植入犬肱骨近端骨缺损内,发现植入部位周围组织硫酸妥布霉素浓度可以持续增高至14 d,一些动物可以持续到28 d,4周时缺损区内被新生骨组织填充。Berdmore等^[19]成功应用含10%硫酸妥布霉素的硫酸钙片与骨形态发生蛋白联合治疗预防了羊胫骨近端污染骨折感染的发生。

实验采用的是FDA批准上市的美国Wright医疗技术公司研发的注射式硫酸钙,它由特制硫酸钙粉剂和相应的溶剂组成,使用时配置成糊状,固化温度不高于33℃,固化后机械强度与松质骨相当。在以往构建生长因子/复合载体支架的基础上^[20-22],利用硫酸钙的物理特性,将注射式硫酸钙与骨形态发生蛋白2制成缓释载体,观察骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体的体外缓释作用,以及对骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的影响。体外实验发现骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体能够缓慢释放骨形态发生蛋白2,持续时间达31 d,并且有平台期,保持稳定的释放浓度。同时在平面环境下骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体对骨髓间充质干细胞的生长及诱导成骨能力优于单纯注射式硫酸钙。实验组细胞形态由长梭形变成多角形,胞体和胞核增大,且骨髓间充质干细胞发生了成骨分化,可见大块钙结节沉积,表现出明显的成骨效应。实验组细胞数量、细胞黏附率和碱性磷酸酶活性均明显优于对照组,反映了骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙与骨髓间充质干细胞有较好的生物相容性,能够保留生长因子的生物活性,诱导骨髓间充质干细胞成团向成骨细胞分化。扫描电镜观察可见实验组上细胞在支架表面和孔隙内生长良好,细胞突起接触融合,细胞密集区域可见细胞外基质形成,大量细胞包绕在材料表面,对照组上细胞黏附数量较少,生长情况不及实验组。

实验的机制在于:注射式硫酸钙配制时实测最高温

度不超过33℃,而骨形态发生蛋白2失活温度为55-75℃^[23],该载体能够保留骨形态发生蛋白2的生物活性,体外实验也证实该载体能发挥成骨诱导的作用;扫描电镜观察材料断面显示,该载体具备较好的孔隙率及孔径结构,具有较好的降解性及骨传导性。同时骨形态发生蛋白2包裹于注射式硫酸钙内,大分子骨形态发生蛋白2不能从注射式硫酸钙空隙中游离,只能随着注射式硫酸钙的降解逐渐缓慢释放,持续缓慢地发挥其生物学效应;注射式硫酸钙的缓慢降解吸收所形成的弱酸性环境及无机盐能减弱破骨细胞的活性,从而促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,加速新骨的形成。Walsh等^[24]研究发现硫酸钙不仅作为骨缺损填充剂引导组织再生,而且可以间接刺激骨的形成。硫酸钙有诱导成骨的特性,可能与局部pH值降低造成宿主骨局部脱钙、骨基质内成骨诱导因子释放有关。

实验制备的缓释载体具备良好的生长因子释放能力,同时具有骨诱导和骨传导作用,为微创治疗骨缺损提供了一种新的途径。由于本次实验是体外观察骨形态发生蛋白2/注射式硫酸钙缓释载体缓释作用以及与骨髓间充质干细胞的生物相容性,对于在体内环境中该载体如何发挥其作用还需要进一步的实验研究。

致谢:感谢江苏大学基础医学院张志坚副教授提供的技术支持。

基金资助:镇江市社会发展基金资助项目(SH2002019),课题名称:骨髓间质干细胞体外扩增回植对骨缺损的作用。

作者贡献:第一作者进行实验设计,实验实施为第一作者,实验评估为第一作者,资料收集为第一作者,第一作者成文,通讯作者审校,通讯作者对文章负责。

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:实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Liu H,Zhang YG.Shengwu Guke Cailiao yu Linchuang Yanjiu. 2012;9(2):32-34.
刘昊,张永刚.骨组织工程的研究应用与进展[J].生物骨科材料与临床研究,2012,9(2):32-34.

- [2] Huang Y, Ren J, Ren T, et al. Bone marrow stromal cells cultured on poly (lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite composites with chemical immobilization of Arg-Gly-Asp peptide and preliminary bone regeneration of mandibular defect thereof. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(4):993-1003.
- [3] Wang C, Wang Z, Li A, et al. Repair of segmental bone-defect of goat's tibia using a dynamic perfusion culture tissue engineering bone. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92(3): 1145-1153.
- [4] Pirraco RP, Obokata H, Iwata T, et al. Development of osteogenic cell sheets for bone tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(11-12):1507-1515.
- [5] Liu SZ, Hou YD. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(42):7911-7914.
刘顺振, 侯玉东. 骨组织工程支架材料的研究进展及临床应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(42):7911-7914.
- [6] Li DY, Zheng X, Chen YX. *Chuangshang Waikexue*. 2013; 15(1):87-90.
李东亚, 郑欣, 陈一心. 骨组织工程支架材料应用于大段骨缺损的实验研究进展[J]. *创伤外科杂志*, 2013, 15(1):87-90.
- [7] Guo Y, Zhang XZ, Wu JM, et al. *Zhongguo Kangfu Yixue Zazhi*. 2006;21(7):579-581.
郭勇, 张西正, 武继民, 等. 人骨形成蛋白-2基因成骨诱导作用研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(7):579-581.
- [8] Mousset B, Benoit MA, Delloye C, et al. Biodegradable implants for potential use in bone infection. An in vitro study of antibiotic loaded calcium sulfate. *Int Orthop*. 1995;19:157-161.
- [9] Qian D, Ma P, Li Y, et al. *Jiangsu Daxue Xuebao*. 2009; 19(2): 118-120.
钱栋, 马鹏, 李阳, 等. 骨形成蛋白-2结合纤维连接蛋白体外诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞的观察[J]. *江苏大学学报*, 2009, 19(2):118-120.
- [10] Urist MR. Bone formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):4-10.
- [11] Sciadini MF, Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *Orthop Res*. 2000; 18(2): 289-302.
- [12] Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Bone Joint Surg Am*. 2001; 83-A(8): 1219-1230.
- [13] Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, et al. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *Orthop Res*. 2003; 21(6): 997-1004.
- [14] Lieberman JR, Daluishi A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone, *Biology and clinical applications*. *Bone Joint Surg AM*. 2002;84-A(6):1032-1044.
- [15] Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier system for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop*. 1999;367(6):95-106.
- [16] Tian XZ, Liu Y, Chen H, et al. *Shandong Yiyao*. 2008;48(9): 143-144.
田学忠, 刘越, 陈华, 等. 硫酸钙人工骨研究进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(9): 143-144.
- [17] Yu M. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(47):8869-8871.
俞猛. 骨组织工程支架材料修复骨缺损的特性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(47):8869-8871.
- [18] Turner TM, Urban RM, Hall DJ, et al. Local and systemic levels of tobramycin delivered from calcium sulfate bone graft substitute pellets. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;437(2):97-104.
- [19] Beardmore AA, Brooks DE, Wenke JC, et al. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute. *Bone Joint Surg AM*. 2005;87(1):107-112.
- [20] Xu XF, Liu XP, Wang MW, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(25):4636-4640.
徐晓峰, 刘小平, 王明伟, 等. 血管内皮生长因子-纳米晶胶原基骨缓释系统与骨髓间充质干细胞的体外生物相容性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(25):4636-4640.
- [21] Xu XF, Xu CZ, Ma P, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2009;13(16):3052-3057.
徐晓峰, 徐成振, 马鹏, 等. 细胞支架与骨形态发生蛋白及血管内皮生长因子复合修复大鼠股骨缺损[J]. *中国组织工程研究*, 2009, 13(16):3052-3057.
- [22] Xu XF, Liu XP, Wang MW, et al. *Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao*. 2010;29(5):741-746.
徐晓峰, 刘小平, 王明伟, 等. 纳米晶胶原基骨/血管内皮生长因子缓释支架对人骨髓间充质干细胞体外粘附增殖的影响[J]. *中国生物医学工程学报*, 2010, 29(5):741-746.
- [23] Yang LJ, Jin Y, Hu YY. Xi'an: Shanxi Science & Technology Press. 1993: 232-237.
杨连甲, 金岩, 胡蕴玉. 口腔和骨科的生物活性材料[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1993: 232-237.
- [24] Walsh WR, Moberg P, Yu Y, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;(406):228-236.