

# 异位预成中心性血管化人工骨的构建

王思明<sup>1</sup>, 阚娜<sup>1</sup>, 张磊<sup>2</sup> (连云港市第二人民医院, <sup>1</sup>口腔科; <sup>2</sup>病理科, 江苏省连云港市 222023)

## 文章亮点:

1 预构骨皮瓣研究启发人们构建预构血管化骨进行游离移植来替代带血管蒂游离自体骨移植修复大段骨缺损的想法。作者通过将β-磷酸三钙与自体微小颗粒骨复合并将自体血管植入人工骨中异位预成中心性血管化人工骨, 形成与缺损区形态大小完全吻合的血管化骨组织, 探索构建血管化组织工程骨新方法的可行性。  
2 实验结果显示血管束的植入有较强的促骨形成的能力, 证明中央性血管束植入β-磷酸三钙人工骨营造的中心性血管化环境是完全可行且效果明显的。

## 关键词:

组织构建; 骨组织工程; 异位骨形成; 中心性血管化; 预成骨; 人工骨

## 主题词:

骨生成; 新生血管化, 生理性; 磷酸钙类

## 基金资助:

连云港市卫生局科研基金资助项目(1223)

## 摘要

**背景:** 血管化在骨形成和改建中起重要作用, 生物活性陶瓷β-磷酸三钙的多孔性及可吸收性为血管植入构建血管化人工骨提供可能。

**目的:** 探讨异位预成中心性血管化人工骨的建立、血供及人工骨血管化的机制, 为异位预成中心性血管化人工骨的临床应用提供理论依据。

**方法:** 选择新西兰兔的腰背动脉解剖分离形成血管束, 实验侧将血管束移入人工骨侧槽内, 并用自体微小骨颗粒填满, 埋入背阔肌肌袋内, 以未做血管束植入动物作为对照。术后4, 6, 8周行大体形态学和组织学检查。

**结果与结论:** 血管束植入组人工骨形成类似滋养孔的结构, 血管丰富, 血管通畅。中心性血管化人工骨各处均有大量血管新生, 4-8周充满全层, 4周时开始出现新生骨和骨代谢, 12周新生骨更趋于成熟。对照组仅少量血管自周围长入, 新生骨少且不成熟。结果表明中心性血管化人工骨可显著促进人工骨血管化。该模型有望成为磷酸钙人工骨的临床应用的新方式。

王思明, 阚娜, 张磊. 异位预成中心性血管化人工骨的构建[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33):5271-5275.

## Construction of the central vascularized bone

Wang Si-ming<sup>1</sup>, Kan Na<sup>1</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Stomatology, <sup>2</sup>Department of Pathology, the Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222023, Jiangsu Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The vascularization plays a key role in bone formation and reconstruction. Bioactive β-tricalcium phosphate has a porosity and absorbability that allow a possibility of constructing vascularized bone.

**OBJECTIVE:** To explore the blood supply and construction of the central vascularized β-tricalcium phosphate, as well as the mechanism of vascularization in artificial bone for its further clinical application.

**METHODS:** The lumbar dorsal artery of New Zealand rabbits was isolated and prepared into vascular bundle. At the experimental side, the vascular bundle was implanted into channel of the β-tricalcium phosphate, then filled with the autologous tiny bone particles, and embedded into the latissimus dorsi muscle. Animals without the vascular bundle implantation were taken as the control group. The samples were determined for the morphology and histology at 4, 8, and 12 weeks post-surgery.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The site where the vascular bundle was implanted appeared foramen nutrien-like structure, the blood vessels were abundant and smooth. The central vascularized tricalcium phosphate were filled with new-born vessels at 4-8 weeks. The newly formed bone and bone metabolism appeared at 4 weeks and newly formed bones were more mature at 12 weeks. In the control group, there were only a few new-born vessels, the newly formed bone was immature. The central vascularized β-tricalcium phosphate can significantly improve the vascularization of artificial bone. This model can probably serve as a new method for tricalcium phosphate in clinical use.

**Subject headings:** bone formation; vascularization, physiological; calcium phosphates

**Funding:** the Scientific Research Fund of Lianyungang Bureau of Health, No. 1223

Wang SM, Kan N, Zhang L. Construction of the central vascularized bone. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(33):5271-5275.

王思明, 男, 1971年生, 山东省枣庄市人, 汉族, 2007年山西医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事颌面整复研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.33.004

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)33-05271-05

稿件接受: 2014-06-12

Wang Si-ming, Master, Associate chief physician, Department of Stomatology, the Second People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222023, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-06-12

## 0 引言 Introduction

肿瘤、创伤、先天性疾病所致的颌骨大范围或区域性及方块缺损在临床上十分常见, 目前, 对骨缺损的修复以带血供的自体骨移植疗效最佳, 但自体骨来源有限, 且可能对供区造成继发性损伤。因此, 寻找一种具有良好生物学性能, 以及适宜力学性能的骨替代物一直是颌骨缺损修复重建领域的发展方向<sup>[1-2]</sup>。组织工程是在组织水平上操作的生物工程, 主要致力于组织和器官的形成和再生<sup>[3]</sup>。组织工程为颌骨缺损修复提供了一条新途径, 组织工程骨经过大量试验研究证明是修复骨缺损较理想的方法和未来的研究方向。

近年来, 有学者提出应用骨诱导性的生物材料, 不外加细胞或生长因子, 以自身机体作为生物反应器, 在无明显影响机体功能的非骨环境直接构建形成具有生命活力的骨替代物, 移植后修复骨缺损, 即体内骨组织工程技术<sup>[4]</sup>。该技术赋予材料诱导性, 以充分调动机体自我康复的功能, 实现病损组织结构再生和功能重建, 符合当今生物材料设计的原则和发展方向。

随着骨组织工程技术的发展, 骨组织工程的再修复有了较大进展, 但是在构建较大体积组织工程骨方面还存在比较多的问题, 其中最主要的就是缺血坏死<sup>[5-6]</sup>, 在大体积骨缺损修复重建时, 当组织工程骨的厚度超过100  $\mu\text{m}$ 时, 在体内构建能为细胞提供氧、营养及去除代谢废物的功能性血管会面临重大挑战<sup>[7-8]</sup>, 其主要原因在于未能很好解决组织工程骨的血管化问题<sup>[9]</sup>。因为小块组织工程骨植入体内后, 早期依靠组织液的渗透可获得营养, 而大块组织工程骨的营养仅靠组织液的渗透是远远不够的, 必须通过血管再生来获得。所以研究组织工程骨的血管化技术是非常必要的, 只有血管化组织工程骨才能为成骨细胞的分裂、增殖等功能活动提供充足营养, 并与自体骨组织演变成一个整体, 在体内发挥持久的生理功能。血管的长入可以为细胞提供稳定的内环境, 促进细胞生长及成骨分化, 而成骨细胞的分化和基因表达又可以促进血管的生长及稳定, 两者协同促进骨的生成及修复<sup>[10-11]</sup>。作为体内组织工程骨的构建场所, 非骨组织的选择至关重要, 肌肉组织有丰富的血供和间充质干细胞来源, 为异位骨提供了良好的生成环境。实验将具有骨诱导性生物活性陶瓷 $\beta$ -磷酸三钙分别植入肌肉内, 同时将自体血管植入, 探索一种血管束植入人工骨异位构建血管化人工骨的方法, 以达到内生性供血的目的是, 为下一步修复骨缺损提供一个新思路。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 自体对照观察动物实验。

**时间及地点:** 实验于2013年1月至2014年3月在蚌埠医学院实验中心完成。

**材料:**

**实验动物:** 成年健康新西兰白兔18只, 体质量2.5-3.0 kg, 雌雄不限。动物由蚌埠医学院实验动物中心提

供, 许可证号: 0018961。

异位预成中心性血管化人工骨实验用主要材料及试剂:

材料及试剂	来源
圆柱状生物活性陶瓷 $\beta$ -磷酸三钙(密度 $\leq 2.00 \text{ g/cm}^3$ , 气孔率 $\geq 40\%$ , 气孔孔径: 10-1 000 $\mu\text{m}$ )	武汉华威生物材料有限公司
CD34单克隆抗体	美国NeoMarkers公司产品购自福州迈新生物技术开发有限公司

**材料的处理:** 选择长10 mm直径7 mm的圆柱状生物活性陶瓷 $\beta$ -磷酸三钙作为基质材料, 并沿纵轴一侧用金刚砂车针制备出宽度和深度为2.0-3.0 mm的沟槽, 同时取一块约5.0 mm $\times$ 5.0 mm髂骨牙科磨钻制成直径50-100  $\mu\text{m}$ 颗粒骨备用。

**实验方法:**

**动物分组处理:** 18只新西兰白兔共36侧背阔肌右侧为实验组(中心性血管化组)和左侧对照组(非血管化组)。速眠新II 1.2 mL/kg肌注麻醉新西兰兔, 取背部正中纵形切口, 于背阔肌深层肌膜下分离并形成肌袋, 实验组解剖出腰背动脉, 并解剖游离出长约5 cm一段, 将腰背动脉穿过人工骨侧槽, 自体颗粒骨填入人工骨侧槽剩余间隙, 并要保证血流通畅, 勒血试验证明腰背动脉双向通畅, 缝合肌层包裹人工骨形成肌袋(图1A)。对照组单纯将自体颗粒骨填入人工骨侧槽后植入肌袋, 切口分层缝合, 植入后分笼饲养, 肌注庆大霉素 $4 \times 10^4 \text{ U}$ , 2次/d, 持续5 d。自体颗粒骨移植后4, 8, 12周分别取材观察。

**主要观察指标:** ①大体观察: 对比观察人工骨植入前后吸收情况、质地表面血供。②组织学观察: 植入后4, 8, 12周处死动物, 病理常规取材, 脱钙脱水处理, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察人工骨内血管再生和骨生长情况。③切片免疫组织化学血管染色, 应用CD34单克隆抗体标记, 采用S-P法进行免疫组织化学染色, 阳性染色表现为棕黄色, 定位于血管内皮细胞胞浆。每张切片随机选取3个100倍视野计数, 取平均值。计数血管数目。④计算新骨形成面积, 随机选取3个100倍视野, 应用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文报告分析系统测定苏木精-伊红染色的组织切片新骨形成面积。新骨形成面积=新骨形成面积/统计面积 $\times 100\%$ 。

**统计学分析:** 采用SPSS 11.5软件处理, 组间比较采用 $t$ 检验, 组内比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用新西兰白兔18只, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

**2.2 大体观察结果** 所有动物均成活, 切口无感染, 一期愈合, 标本大体观察可见在植入物表面已形成新生的肉芽

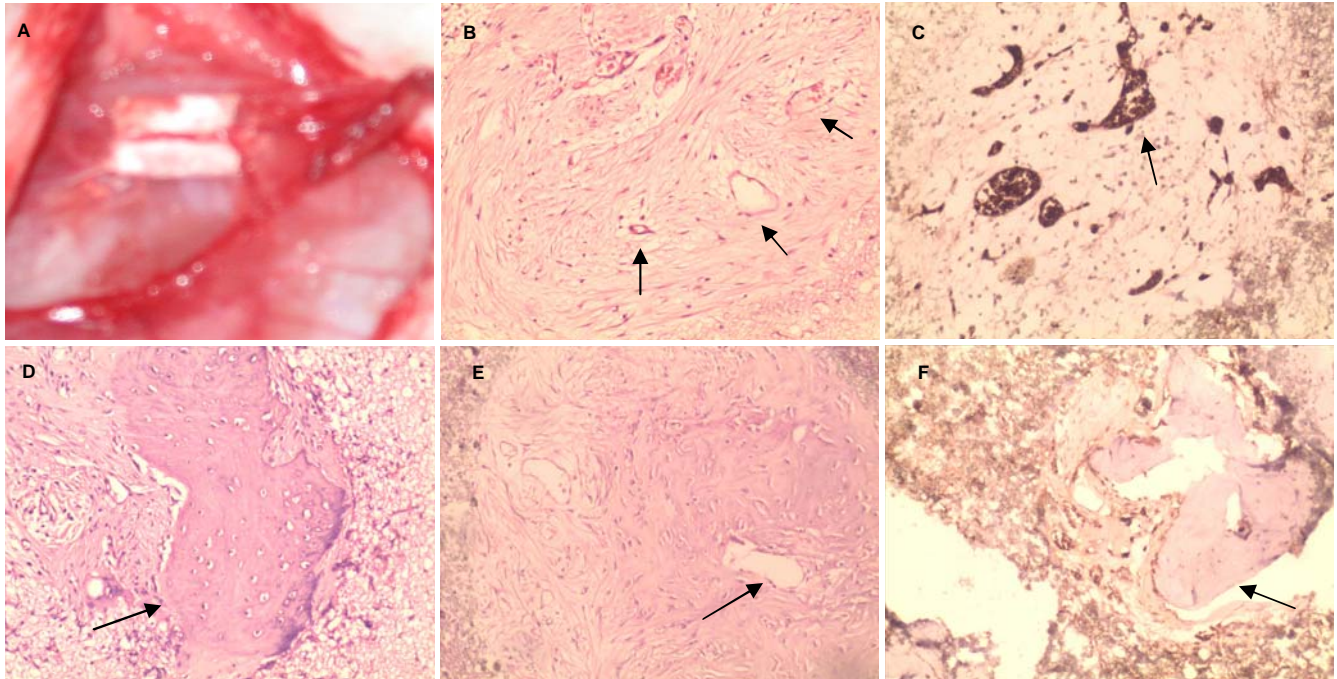


图1 异位预成中心性血管化人工骨模型及组织学观察结果( $\times 100$ )

Figure 1 Central vascularized model and its histological observation in experimental group and control group ( $\times 100$ )

图注: 图中A为异位预成中心性血管化人工骨模型; B为实验组4周新生血管丰富(箭头所指, 苏木精-伊红染色); C为实验组8周人工骨孔隙内血管丰富(箭头所指)且较成熟(免疫组织化学染色); D为实验组8周有新骨形成(箭头所指, 苏木精-伊红染色); E为实验组12周实验组大量成纤维细胞中心血管无退化(箭头所指, 苏木精-伊红染色); F为实验组12周新骨趋于成熟, 人工骨材料出现吸收(箭头所指, 免疫组织化学染色)。

表1 各时间点实验组和对照组免血管计数比较

Table 1 Count of blood vessels in experimental group and control group ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

术后时间	实验组	对照组	P
4周	5.94 $\pm$ 0.27	4.77 $\pm$ 0.24	< 0.01
8周	9.16 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	7.88 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	< 0.01
12周	8.70 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	7.66 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	< 0.05

表注: 实验组: 中心性血管化; 对照组: 非血管化。新生血管随着时间的延长而逐渐增加, 而在8周时血管增生达到最高峰。与4周比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

组织包绕。自体颗粒骨移植后4周人工骨与周围肌肉纤维组织粘连紧密, 分离困难, 横切面有点状出血, 实验组血流通畅, 人工骨表面色鲜红, 对照组人工骨表面色较浅。自体颗粒骨移植后12周时可见表面有浅弹坑样吸收痕迹。

**2.3 组织学观察结果** 自体颗粒骨移植后4周时, 实验组人工骨孔隙内新生的血管及纤维组织明显增多, 对照组仅人工骨表层有血管新生且较稀疏, 实验组标本内小血管增生活跃(图1B), 新生毛细血管基本充满全层, 并且在视野内无论外周还是中心分布比较均匀, 而对照组血管增生主要集中在外周部分, 靠近中央部分较分散。

自体颗粒骨移植后8周时, 实验组表层和间隙内大量肉芽组织充满, 血管分布广泛, 人工骨孔隙内开始出现多层复杂结构毛细血管壁, 部分可见管腔, 血管结构较成熟, 管腔清晰可见, 并可见新骨形成(图1C, D); 对照组间隙内也充满组织, 以纤维结缔组织为主, 少量血管伴行, 实验组和对照组血管化达高峰。

表2 各时间点实验组和对照组新骨形成面积比较

Table 2 Area of new bone in experimental group and control group ( $\bar{x} \pm s, n=18$ )

术后时间	实验组	对照组	P
4周	8.13 $\pm$ 1.24	3.78 $\pm$ 1.36	< 0.05
8周	34.18 $\pm$ 1.96	9.27 $\pm$ 2.13	< 0.05
12周	38.67 $\pm$ 2.98	31.36 $\pm$ 3.37	< 0.05

表注: 实验组: 中心性血管化; 对照组: 非血管化。各组内比较: 随时间延长, 各时间段实验组较对照组有更明显的血管化趋势和更强的成骨效能, 与实验组比较,  $P < 0.05$ 。

自体颗粒骨移植后12周时, 人工骨孔隙内毛细血管网结构已基本构成, 大量成纤维细胞中心血管无退化(图1E), 孔隙内主要成分是纤维组织和骨组织, 孔隙边缘出现环形的空白区, 为人工骨被吸收的标志, 相比较下, 实验组人工骨吸收速度及成骨速度均较对照组快(图1F)。

**2.4 血管密度统计结果** 新生血管随着时间的延长而逐渐增加, 而在8周时血管增生达到最高峰, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 表1)。

**2.5 新骨形成面积** 各组随时间延长新生骨面积递增, 各时间段实验组较对照组有更明显的血管化趋势和更强的成骨效能, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 表2)。

### 3 讨论 Discussion

因先天畸形、创伤、炎症和肿瘤等所致的大段骨缺损的治疗一直是骨科领域的一个疑难和具有挑战性的课题。虽然组织工程骨修复骨缺损的研究取得了大量的成果<sup>[12-14]</sup>, 但

大部分仅限于小尺寸的组织工程骨,而对于大尺寸的组织工程骨,种子细胞尤其是靠近中心的细胞常因为不能获得足够的营养及氧气,不能及时排出代谢产物而死亡,进而严重影响组织工程骨对骨缺损的修复效果,甚至导致失败<sup>[8]</sup>。

随着显微外科和组织工程的发展,构建血管化骨成为修复骨组织缺损的重要手段,在众多的方法中血管束植入法是目前研究较多的构建方法之一<sup>[15-17]</sup>。Li等<sup>[18]</sup>用带血管蒂的骨膜瓣包裹组织工程骨成功修复了骨缺损,带血管蒂的骨膜瓣包裹组的成骨以及血管化效果明显优于无蒂骨膜瓣包裹组、单纯组织工程骨组和单纯支架组。Zhao等<sup>[19]</sup>在异种脱蛋白松质骨复合骨髓间充质干细胞的组织工程骨中植入血管网,成功修复了兔桡骨缺损,组织工程骨植入血管后的成骨量以及新生骨强度比单纯组织工程骨或单纯支架内植入血管组明显增高,说明血管化在骨的生成及塑形过程中起着重要的促进作用。国内王永刚等<sup>[20]</sup>将自体血管植入组织工程骨修复兔股骨缺损,发现植入血管处组织工程骨形成类似滋养孔的结构,血管双向通畅;植入血管束的组织工程骨受周围组织血管长入和血管束外生血管的双重营养。血管束植入法可以加快组织工程骨在体内的生理性改建转化过程。Terheyden等<sup>[21-22]</sup>利用埋植的方法在小猪背部异位预构成血管化人工骨,修复小猪下颌骨。血管化骨一个主要问题就是人工骨再生血管与机体血管建立吻合形成自体血管化骨。郭英等<sup>[23]</sup>应用鼠骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞体外建立骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞三维培养体系,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。证明血管化人工骨组在新骨形成与血管化程度方面均优于单纯人工骨组。

组织工程骨移植入体内后主要的血液供应有两个来源<sup>[24-25]</sup>:一是新生的血管长入,二是局部的血液浸润渗透。新生的血管长入作用持久而广泛,但是新生的血管长入需要较长的时间,往往就在这段时间(约2周的时间)组织工程骨中心就会出现缺血坏死,血液浸润渗透虽然能在短时间内为植入物内部的种子细胞提供适宜生长的微环境,但是其作用范围有限,只有在血液浸润的200  $\mu\text{m}$ 范围内的组织才能获得有效的氧供与营养物质<sup>[26-28]</sup>。因此,建立组织工程骨的血液供应显得极其重要。

本实验异位预成中心性血管化人工骨的思路是在人工骨内植入机体血管,人为加强局部血管化并诱导血管新生,形成血管化骨的过程。实验预先设计好带侧槽骨支架材料( $\beta$ -磷酸三钙),将自体血管穿过侧槽,且植入后使血管不受压,同时填入自体松质骨微小骨粒,异位构建中心性血管化骨。目前大多数异位预成血管化骨的研究都采用骨髓干细胞作为种子细胞,骨髓干细胞不仅分离培养困难,而且形成的骨量有限,难以在短期内达到临床应用的需<sup>[29]</sup>。实验应用自体松质骨微小骨粒(直径50-100  $\mu\text{m}$ )替代体外培养的种子

细胞异位构建出血管化骨,自体松质骨微小颗粒具有异位成骨及释放骨形态生长因子和血管生长因子作用<sup>[30]</sup>,能够有效促进新生骨组织的生长和血管新生,既符合异位预成血管化骨的基本原理,又避免了种子细胞分离培养等繁杂步骤,不失为一种潜在可行的血管化骨修复骨缺损修复方法。

实验显示随着时间变化,植入血管上新生出大量的新生血管,新生血管随着时间的延长而逐渐增加,而在8周时血管增生达到最高峰。通过植入血管束芽生出的新生血管来促进人工骨的血管化进程。术后8周即出现明显的成骨现象,12周左右有成熟的骨小梁出现,新生骨中细胞成分变少,新生骨更趋于成熟。在同一切片中可以同时看到骨的不同成熟阶段和多个成骨中心并存,除周边的成骨,还有中央部位的多中心成骨,说明材料内呈多中心成骨,这种多中心成骨主要是由人工骨中央植入的血管束促发的。在孔隙内成骨的同时,孔隙的周边部分人工骨出现吸收现象,在高倍镜下可见多核的破骨细胞活动。说明在新骨形成同时,人工骨材料出现吸收,呈现边新生边吸收现象。

实验中使用的 $\beta$ -磷酸三钙是一种多孔结构制成的人工骨替代材料,具有良好的生物降解性和生物相容性。其同时具有的良好骨引导作用,能促进成骨细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞爬行长入;并且在制备过程中能控制其孔隙率。其生物降解性又能确保及时被吸收保证新骨组织良好生长,并已在临床得到应用<sup>[31]</sup>。本实验为下一步成骨试验探索一种可能的途径。首先构建一种新的、能够异位预构血管化人工骨的动物模型。并进一步探索先血管化后成骨的可能性、机制和方法,为进一步临床实验提供理论依据。

实验结果显示,大体形态学观察和组织学观察均可见人工骨成活,早期人工骨的孔隙内均可见大量血管和纤维结缔组织新生,随时间推移,血管成分逐渐变少,成纤维细胞变成纤维,并有编织骨形成,植入并保持血流通畅的血管束组较未植入血管束组新生组织要明显偏多,说明血管束的植入有较强的促骨形成的能力,说明外源性血管束植入方法是可行的、有意义的。在成骨后有望远端断蒂,形成一个带动静脉的血管化骨,可以异位或带蒂移植修复骨缺损。中心性血管化人工骨在生理和结构上具有更好的血供和成骨效果,基本上达到了多点新生的要求,植入后的血管未见明显的退化,证明中央性血管束植入 $\beta$ -磷酸三钙人工骨营造的中心性血管化环境是完全可行且效果明显的。此法可待进一步研究,以明确中心性 $\beta$ -磷酸三钙人工骨血管化的定量预期和效果,并作为一极具前途的血管化方案应用于人工骨移植修复骨缺损,解决临床需要。同时,此法亦可为各种 $\beta$ -磷酸三钙人工骨降解吸收情况的定量标准化测定提供一个良好的组织模型,为 $\beta$ -磷酸三钙人工骨的进一步临床应用提供理论基础。

总之,实验首次提出一个新的思路解决骨组织的血管化问题。为异位构建大块血管化骨提供了可能。

**作者贡献:** 王思明进行实验设计, 实验整体规划, 实验实施为阙娜、张磊, 完成每个检测实验, 实验评估、资料收集为阙娜, 盲法评估, 王思明完成全文书写, 王思明对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 磷酸三钙-又称磷酸钙, 化学式  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 白色晶体或无定形粉末, 存在多种晶型转变, 主要分为低温  $\beta$  相( $\beta$ -TCP) 和高温  $\alpha$  相( $\alpha$ -TCP), 相转变温度为  $120\text{--}170\text{ }^\circ\text{C}$ , 熔点  $1670\text{ }^\circ\text{C}$ ; 溶于酸, 不溶于水和乙醇。磷酸三钙在人的骨骼中普遍存在, 是一种良好的骨修复材料。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Hernigou P, Homma Y. Tissue bioengineering in orthopedics. Clin Cases Miner Bone Metab. 2012;9(1):21-23.
- [2] Dahlin PL, Kasper FK, Mikos AG. Polymeric nanofibers in tissue engineering. Tissue Eng Part B Rev. 2011;17(5):349-364.
- [3] 商庆新, 曹谊林, 张涤生. 生物工程领域的崭新前沿-组织工程[J]. 现代康复, 2001, 5(6):7-9.
- [4] Service RF. Tissue engineering. Technique uses body as "bioreactor" to grow new bone. Science. 2005;309(5735):683.
- [5] Naito Y, Shinoka T, Duncan D, et al. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. Adv Drug Deliv Rev. 2011;163(4-5):312-323.
- [6] Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. Eur Cell Mater. 2008;15:100-114.
- [7] Yu H, VandeVord PJ, Mao L, et al. Improved tissue: engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. Biomaterials. 2009;30(4):508-517.
- [8] Sukmana I. Microvascular guidance: a challenge to support the development of vascularised tissue engineering construct. Scientific World Journal. 2012;2012:201352.
- [9] Luk JM, Wang PP, Lee CK, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. J Immunol Methods. 2005;305(1):39-47.
- [10] Gardin C, Bressan E, Ferroni L, et al. In vitro concurrent endothelial osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genomics analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts. Stem Cells Dev. 2012;21(5):767-777.
- [11] Rath SN, Prymachuk G, Bleiziffer OA, et al. Hyaluronan-based heparin-incorporated hydrogels for generation of axially vascularized bioartificial bone tissues. in vitro and in vivo evaluation in PLDLLATCP-PCL-composite system. Mater Sci Mater Med. 2011;22(5):1279-1291.
- [12] Wang HW, Cheng CW, Li CW, et al. Fabrication of pillared PLGA microvessel scaffold using femtosecond laser ablation. Int J Nanomedicine. 2012;7:1865-1873.
- [13] 卜令学, 王艳辉, 李宁毅, 等. 应用骨髓基质细胞片层构建组织工程骨的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2011, 46(12):747-750.
- [14] 姚金凤, 李晓宇, 王爱军, 等. 骨诱导性磷酸钙陶瓷支架在脂肪组织中构建体内组织工程骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(12):2109-2112.
- [15] Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, et al. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. Plast Reconstr Surg. 2006;17:1471-1479.
- [16] Street J, Bao M, Guzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:9656-9661.
- [17] 赵明东, 林宏, 蒋继乐, 等. 骨髓基质干细胞联合血管束植入构筑血管化组织工程骨[J]. 中华外科杂志, 2012, 28(2):107-110.
- [18] Li JJ, Zhao Q, Wang EB, et al. Transplantation of Cbfa1overexpressing adipose stem cells together with vascularized periosteal flaps repair segmental bone defects. J Surg Res. 2012;176(1):E13-E20.
- [19] Zhao M, Zhou J, Li X, et al. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with Mesenchymal stem cells in rabbits. Microsurgery. 2011;31(2):130-137.
- [20] 王永刚, 裴国献. 血管束植入在组织工程骨血管化构建中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(1):26-28.
- [21] Terheyden H, Knak C, Jepsen S, et al. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft Using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30(5):373-379.
- [22] Terheyden H, Warnke P, Dunsche A, et al. Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30(6):469-478.
- [23] 郭英, 马卫东, 陈小冬, 等. 血管化人工骨的体外构建与体内异位成骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3611-3615.
- [24] Khanarian NL, Haney NM, Burga RA, et al. A functional agarose-hydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration. Biomaterials. 2012;33(21):5247-5258.
- [25] Rodrigues MT, Lee SJ, Gomes ME, et al. Bilayered constructs aimed at osteochondral strategies: the influence of medium supplements in the osteogenic and chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. Acta Biomater. 2012;8(7):2795-2806.
- [26] Harichandan A, Buhning HJ. Prospective isolation of human MSC. Best Pract Res Clin Haematol. 2011;24(1):25-36.
- [27] Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, et al. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. Cytometry A. 2013;83(1):48-61.
- [28] Park JS, Shim MS, Shim SH, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bonemarrow encapsulated in fibrin gels containing TGF- $\beta$ 3. Biomaterials. 2011;32(32):8139-8149.
- [29] Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, et al. Cell therapy for bone disease: a review of current status. Stem Cells. 2003;21(5):610-619.
- [30] 马凯宇, 栾宏佳, 徐公平, 等. 自体微小颗粒骨异位成骨实验研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8(29):6340.
- [31] 王思明, 孙媛. 颗粒状  $\beta$  磷酸三钙复合骨形态发生蛋白 2 修复齿槽裂骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(51):9687-9690.