

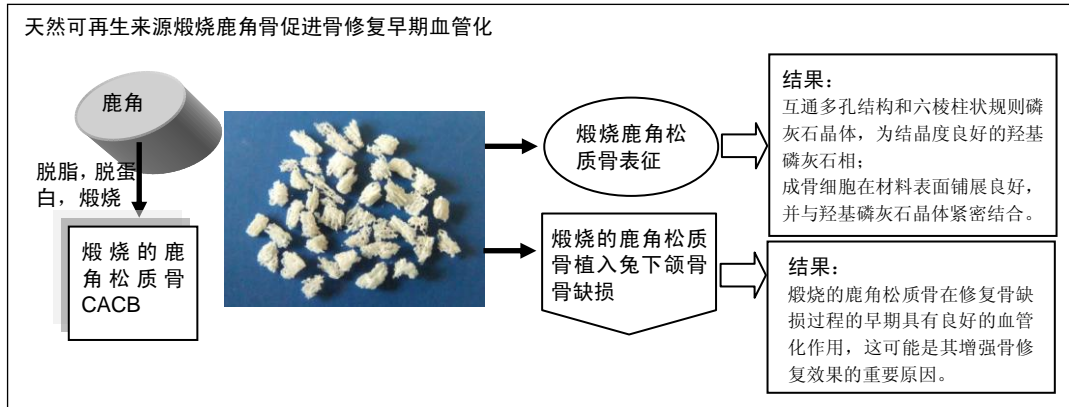
煅烧鹿角松质骨在骨缺损修复过程中的早期血管化

彭 晖¹, 张学慧² (¹北京大学口腔医院第三门诊部, 北京市 100191; ²北京大学口腔医院口腔材料研究室, 北京市 100081)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0865

ORCID: 0000-0001-9595-1295(彭晖)

文章快速阅读:



彭晖, 女, 1982年生, 汉族, 河北省蔚县人, 2012年北京大学医学部口腔医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨组织工程方面的研究。

通讯作者: 张学慧, 副研究员, 北京大学口腔医院口腔材料研究室, 北京市 100081

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2018-04-21



文题释义:

煅烧鹿角松质骨: 是去除鹿角皮质骨后, 经过化学制剂对鹿角松质骨进行脱脂脱蛋白处理, 采用 600 °C 高温煅烧方法获得的一种颗粒状异种无机骨填充材料, 前期研究已经证实其具有良好的成骨性能。

早期血管化: 血管化对骨缺损修复至关重要, 尤其对于大范围骨缺损, 尽早建立血管化可保证缺损区内细胞有充足的营养和氧分, 加速代谢物质的转运, 建立良好的动态微环境, 从而促进骨缺损修复。

摘要

背景: 前期研究成功制备了煅烧鹿角松质骨材料, 并证实其可明显促进骨缺损的修复。

目的: 考察煅烧鹿角松质骨修复骨缺损的早期血管化作用。

方法: 去除鹿角皮质骨, 将鹿角松质骨经脱脂脱蛋白和高温煅烧制备成颗粒状骨填充材料煅烧鹿角松质骨, 采用扫描电镜和 X 射线衍射仪对其进行表面形貌观察和晶相结构检测。将小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 接种于煅烧鹿角松质骨支架材料上, 共培养 1 d 后扫描电镜观察细胞铺展情况。制备兔双侧下颌骨临界尺寸骨缺损模型, 一侧植入煅烧鹿角松质骨材料, 另一侧植入 Bio-Oss[®] 颗粒, 空白对照组不植入任何材料, 术后 4, 8 周取下颌骨标本, 进行苏木精-伊红染色、Masson 染色和 CD31 免疫组织化学染色, 观察成骨和成血管情况。

结果与结论: ①扫描电镜观察可见煅烧鹿角松质骨为互通多孔结构, 棱柱状规则磷灰石晶体, X 射线衍射图谱显示煅烧鹿角松质骨各特征峰与人骨一致, 为结晶度良好的羟基磷灰石相; ②成骨细胞在材料表面铺展良好, 并与羟基磷灰石晶体紧密结合; ③材料植入兔下颌骨缺损 4 周后, 苏木精-伊红染色结果显示煅烧鹿角松质骨组和 Bio-Oss[®] 组植入材料周围有明显新生血管; Masson 染色和 CD31 免疫组织化学结果显示, 两组材料周围有新生成的胶原纤维和新生血管, 且煅烧鹿角松质骨组较 Bio-Oss[®] 组血管化效果更为明显; ④材料植入 8 周后苏木精-伊红染色结果显示, 煅烧鹿角松质骨组、Bio-Oss[®] 组骨缺损处均有大量新骨形成; ⑤结果表明, 煅烧鹿角松质骨在早期骨缺损修复过程中具有良好的血管化作用, 这可能是其促进骨缺损修复的关键因素。

关键词:

鹿角; 骨再生; 骨组织工程; 骨填充材料; 骨缺损修复; 血管化; 骨生成; 血管生成; 支架材料; 生物材料

主题词:

骨再生; 骨生成; 组织工程

基金资助:

国家高技术研究发展(863)计划课题(2015AA033601)

Peng Hui, Master, Physician, the 3rd Dental Center, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100191, China

Corresponding author: Zhang Xue-hui, Associate researcher, Department of Dental Materials, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China

Early vascularization of calcined antler cancellous bone in repairing bone defects

Peng Hui¹, Zhang Xue-hui² (¹The 3rd Dental Center, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100191, China; ²Department of Dental Materials, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China)

Abstract

BACKGROUND: Calcinated antler cancellous bone (CACB) was successfully prepared in the early stage, and was confirmed that it could significantly promote bone defect repair.

OBJECTIVE: To evaluate the early neovascularization of CACB in a bone defect model.

METHODS: CACB was prepared by defatted and deproteinized process and combined with calcination after removal of the cortical bone. The surface morphology and phase composition of CACB granules were evaluated by using scanning electron microscope (SEM) and X-ray diffraction spectrum (XRD). Mouse osteoblasts MC3T3-E1 were cultured with CACB for 1 day to assess the cellular affinity by SEM. Models of critical bone defects were prepared on the bilateral mandibles of 16 New Zealand rabbits. CACB was implanted into the defects on the one side, and Bio-Oss[®] was implanted into the defects on the other side. Nothing was implanted into the defects as blank control. All the rabbit mandibles after 4 and 8 weeks post-surgery were subjected to tissue processing and sectioning. Hematoxylin-eosin, Masson's trichrome staining and CD31 immunohistochemical method were performed separately on consecutive tissue sections to observe the vascularization and osteogenesis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) SEM images showed that CACB exhibited a well-interconnected porous structure and was present as regularly prismatic crystals of hydroxyapatite. The XRD spectrograph revealed that the characteristic peaks of CACB corresponded to the peaks of calcinated human cancellous bone, indicating that the hydroxyapatite phase with good crystallinity is the same as that of human bone. (2) The cellular experiment findings showed that CACB could be conducive for attachment and spreading of MC3T3-E1 cells integrated with hydroxyapatite closely. (3) At 4 weeks post-implantation, hematoxylin-eosin staining results showed a lot of newly formed small blood vessels at the periphery of the scaffold of CACB and Bio-Oss[®]. Masson and CD31 immunohistochemical staining results showed the newly formed collagen fibers and blood vessels around the bone filling materials. Moreover, the ability of vascularization of CACB was more effective than that of Bio-Oss[®]. (4) At 8 weeks post-implantation, hematoxylin-eosin staining results showed there was a large number of newly formed bones in the bone defects and the remaining scaffold was surrounded by newly formed bones. To conclude, our findings reveal that CACB possesses good vascularization during the bone defect repair, which may have a potentially positive effect on promoting osteogenesis.

Subject headings: Bone Regeneration; Osteogenesis; Tissue Engineering

Funding: the National High-Technology Research and Development Research of China (863 Program), No. 2015AA033601

0 引言 Introduction

在口腔临床中由于创伤、严重牙周病、肿瘤等原因造成的骨缺损,常会导致颜面部畸形、功能障碍及牙齿修复困难。目前,骨填充材料的植入是用于骨缺损修复的常规方法^[1-3]。其中,异种骨填充材料由于来源于天然骨组织而具有良好的生物学性能、骨传导性及骨诱导性,被广泛应用^[4-5],如来自牛骨的Bio-Oss[®]^[6-8]、Endobon[®]^[9]、来自猪骨的OsteoBiol[®]^[10]。

研究发现鹿角骨的组成、结构与入骨高度接近^[11],具备成为异种骨填充材料的基础。前期研究成功制备出以鹿角骨为来源的无机骨填充材料——煅烧鹿角松质骨,并已证实其可明显促进骨缺损修复^[12-14]。然而,在机体发育及骨损伤修复的过程中,机体骨质的发生也必须依赖于血管供应,且血管生成亦早于骨生成^[15]。并且,植入修复骨缺损,特别是面积较大的骨缺损修复过程中,新生骨必须通过血管再生来获得营养^[16],因此,使新生骨组织形成之前有良好的血管化是非常重要的因素,骨填充材料在修复过程中的早期血管化,成为骨缺损植入修复的关键环节之一,并已被认为是骨组织工程继种子细胞、支架材料、细胞因子3大因素的又一重要因素^[17-18]。因此,研究将聚焦于煅烧鹿角松质骨的早期血管化作用,以进一步探讨并扩展煅烧鹿角松质骨的应用潜能,首先对煅烧鹿角松质骨的理化性能进行表征,并考察其体外细胞亲和性,最后将其植入兔下颌骨临界骨缺损处进行早期血管化作用的观察和评价。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 材料制备及动物实验对比分析实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年1至12月在北京大学口腔医院实验动物中心完成。

1.3 材料 中年马鹿鹿角购于吉林野生商贸有限公司;小鼠前成骨细胞MC3T3-E1购自北京协和医学院基础医学研究所细胞中心;Bio-Oss[®]来源于瑞士盖世制药有限公司

(Geistlich-Pharma, Switzerland);扫描电镜(ZEISS, Supra 55, Germany);X线电子衍射仪(XRD, Rigaku D/max 2500 VB2+/PC, Japan)。

实验动物: 16只雄性新西兰白兔,体质量约2.5 kg,购自北京大学口腔医院动物中心,许可证号:SYXK(京)2016-0007。

1.4 实验方法

1.4.1 煅烧鹿角松质骨的制备 将新鲜鹿角去除皮质骨后,将鹿角主干的松质骨部分锯成1 cm×1 cm×1 cm的块状,经蒸馏水冲洗后经过一系列化学处理,包括20%NaOH溶液浸泡12 h、1:3三氯甲烷/无水甲醇混合溶液浸泡12 h、体积分数30%双氧水浸泡6 h,每次更换液体时均用流水冲洗2 min,然后将鹿角松质骨块置于65 °C烘箱中烘干,随后,将其置于马弗炉中,自室温以10 °C/min速度匀速升温至600 °C煅烧6 h。待马弗炉降至室温后取出煅烧鹿角松质骨。将获得的块状煅烧鹿角松质骨研磨至如Bio-Oss[®]骨粉般大小的颗粒,直径为1.0-2.0 mm。

1.4.2 煅烧鹿角松质骨的理化性能表征 材料的表面形貌及内部结构通过扫描电镜观察,材料的晶相结构通过X线电子衍射仪检测。

1.4.3 细胞形貌观察 取小鼠前成骨细胞MC3T3-E1,采用该细胞的专用培养基进行培养。将1 cm×1 cm×0.5 cm的煅烧鹿角松质骨支架材料放置于6孔细胞培养板中,在接种细胞前,经⁶⁰Co灭菌材料;将MC3T3-E1制备成细胞浓度 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液,接种至煅烧鹿角松质骨样块,随后放置CO₂培养箱内37 °C饱和湿度条件下培养1 d,将细胞固定、脱水、干燥、喷金,扫描电镜观察。

1.4.4 体内植入实验 实验动物的使用已通过北京大学医学部伦理委员会伦理审查。取新西兰白兔16只,麻醉后备皮,消毒,铺巾,在两侧沿下颌下缘做平行切口,剥离肌肉和骨膜后暴露下颌角位置的骨面,用环钻制备直径为8 mm的临界尺寸骨缺损,用生理盐水冲洗骨渣后,选择其

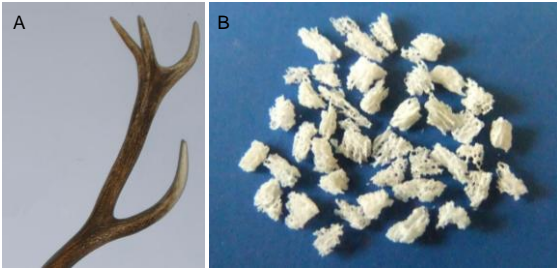


图1 脱落的鹿角和煨烧鹿角松质骨颗粒
Figure 1 Naturally-shed antlers and calcined antler cancellous bone granules
图注: 图中 A 为鹿角, B 为煨烧鹿角松质骨颗粒。

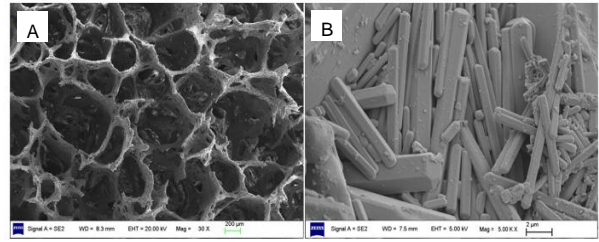


图2 煨烧鹿角松质骨的扫描电镜观察
Figure 2 Scanning electron microscope images of calcined antler cancellous bone
图注: 图中 A 为低倍镜下($\times 30$), 煨烧鹿角松质骨疏松多孔; B 为高倍镜下($\times 5\ 000$), 煨烧鹿角松质骨为羟基磷灰石结构。

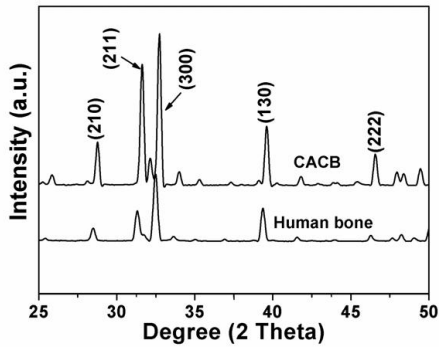


图3 煨烧鹿角松质骨(CACB)和人骨的 X 射线衍射检测结果
Figure 3 X-ray diffraction spectra of calcined antler cancellous bone and calcined human cancellous bone

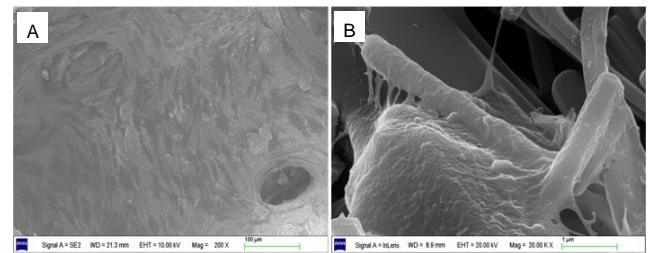


图4 接种至煨烧鹿角松质骨上的小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 形貌
Figure 4 Morphology of mouse MC3T3-E1 cells attached on calcined antler cancellous bone
图注: 图中 A 为低倍镜下($\times 200$), B 为高倍镜下($\times 20\ 000$), 细胞在材料表面铺展良好, 细胞呈多边形形态, 并与羟基磷灰石晶体有良好的结合。

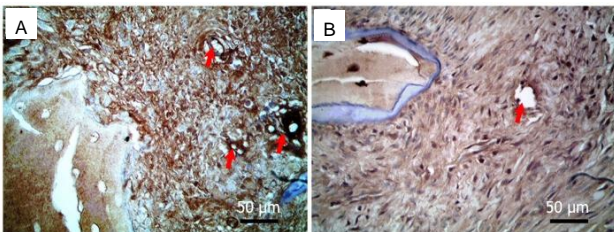


图6 术后4周各组下颌骨标本 CD31 免疫组织化学染色结果($\times 400$)
Figure 6 Immunohistochemical CD31 staining of the mandibular specimens at 4 weeks after implantation ($\times 400$)
图注: 图中 A 为煨烧鹿角松质骨组, B 为 Bio-Oss[®]组; 煨烧鹿角松质骨组 CD31 阳性表达较 Bio-Oss[®]组较多, 见箭头所示。

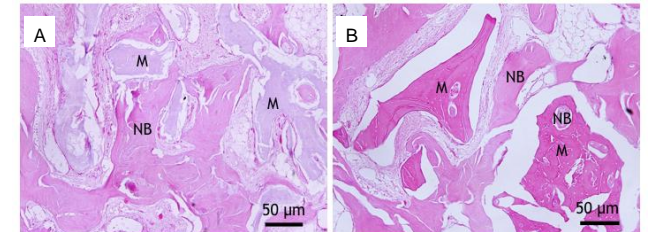
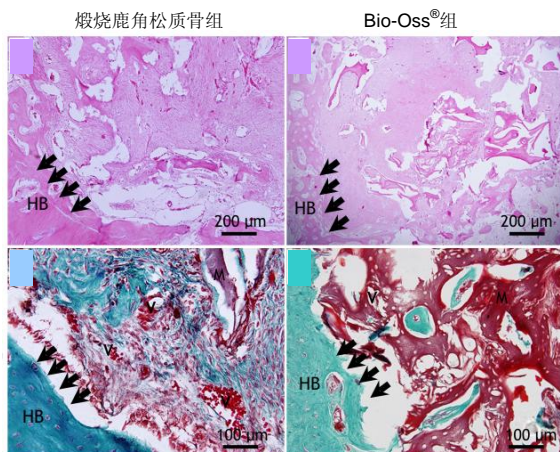


图7 术后8周各组下颌骨标本苏木精-伊红染色结果($\times 400$)
Figure 7 Hematoxylin-eosin staining of the mandibular specimens at 8 weeks after implantation ($\times 400$)
图注: 图中 A 为煨烧鹿角松质骨组, B 为 Bio-Oss[®]组, M 代表材料, NB 代表新生骨; 两组植入材料周围均有大量新生骨生成, 可见残留材料周围被新骨包绕。



苏木精-伊红染色($\times 100$)

Masson 染色($\times 200$)

图5 术后4周各组下颌骨标本组织学观察结果

Figure 5 Histological analysis of the mandibular specimens at 4 weeks after implantation

图注: 黑色箭头指示为新生骨与宿主骨之间的边界, M 代表材料, HB 代表宿主骨, V 代表血管; 苏木精-伊红染色显示, 两组材料周围可见明显的新生血管及一些成骨细胞; Masson 染色显示, 两组材料周围有新生成的规律排列的胶原纤维和新生血管。

中8只一侧植入0.25 g煅烧鹿角松质骨颗粒, 另一侧植入Bio-Oss®颗粒, 另设不植入任何材料的空白对照组($n=8$), 仔细缝合黏骨膜瓣及皮肤。常规饲养, 术后4, 8周分别取下颌骨标本进行后续检测。

组织学评价: 术后4, 8周, 每个时间点取植入材料组与空白对照组兔4只, 处死后取下颌骨样本, 中性甲醛固定后分别进行苏木精-伊红染色、Masson染色、CD31免疫组织化学染色。

苏木精-伊红染色: 固定后的下颌骨标本, 首先经EDTA脱钙、石蜡包埋、病理切片、二甲苯脱蜡处理, 然后将脱蜡后的切片两份无水乙醇浸泡各10 min, 再经体积分数95%–90%–80%–70%乙醇各处理3 min; 蒸馏水洗去乙醇; 苏木精染色5 min后, 1%盐酸+体积分数70%乙醇溶液浸泡1 min, 含氨水的蒸馏水(pH值为8.7)浸泡5 min, 蒸馏水冲洗5 min, 0.5%伊红水溶液染色5 min, 体积分数70%、80%、90%乙醇脱水各1 min, 无水乙醇脱水10 min, 二甲苯透明30 min; 将玻片从二甲苯中取出, 擦去切片四周的二甲苯, 树胶封固后光学显微镜观察拍照。

Masson染色: 石蜡切片经脱蜡后, 置于丽春红酸性品红染液中染色5 min, 蒸馏水洗后置于1%磷钼酸1–3 min, 然后直接入苯胺蓝液中5 min, 流水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封固, 光学显微镜观察拍照。

CD31免疫组织化学染色: 将脱蜡后的切片置于柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH=6)中进行微波修复抗原5 min, 室温自然冷却后经自来水、dd H₂O和TBS洗液冲洗, 然后加入CD31一抗(1:200稀释), 37 °C湿盒孵育2 h, 加入HRP标记的二抗, 37 °C湿盒孵育30 min, DAB显色, 复染, 脱水, 透明, 切片干后用试剂缓冲甘油封固剂封固, 显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 各组兔下颌骨标本成骨和成血管情况。

2 结果 Results

2.1 材料表征

大体形貌观察: 可见煅烧鹿角松质骨骨粉颗粒直径1.0–2.0 mm, 为疏松的多孔结构, 见图1。

扫描电镜观察: 低倍镜下可见煅烧鹿角松质骨疏松多孔, 孔隙互相连通, 通过软件image J测得其孔径范围为300–800 μm; 高倍镜下可见煅烧鹿角松质骨微观结构为棱柱状的羟基磷灰石晶体结构, 测得晶体为400–600 nm宽, 5–15 μm长, 见图2。

晶相分析结果: 通过X射线衍射分析煅烧鹿角松质骨晶体, 显示煅烧鹿角松质骨各特征衍射峰位置与人骨一致, 峰型尖锐清晰, 为结晶度良好的羟基磷灰石相(图3), 提示煅烧鹿角松质骨的主要成分为羟基磷灰石。

2.2 体外细胞形貌观察 将MC3T3-E1与煅烧鹿角松质骨共培养1 d后, 可见细胞在材料表面铺展良好, 细胞呈多

边形形态, 并与羟基磷灰石晶体有良好的结合(图4), 说明煅烧鹿角松质骨具有良好的细胞亲和性。

2.3 动物植入实验早期血管化评价 术后4周苏木精-伊红染色显示, 在植入的煅烧鹿角松质骨和Bio-Oss®材料周围可见明显的新生血管及一些成骨细胞, 表明在骨填充材料植入体内新骨形成阶段伴随新生血管的发生; Masson染色结果显示, 在骨缺损区内, 填充材料周围有新生成的规律排列的胶原纤维(呈绿色)和新生血管(V), 而且煅烧鹿角松质骨组比Bio-Oss®组血管化效果更为明显(图5)。

为了进一步检测骨缺损修复初期新生血管生成的情况, 用血管内皮细胞特性的标志物CD31进行免疫组织化学染色, 结果显示骨形成初期, 煅烧鹿角松质骨组CD31阳性表达(图6)较Bio-Oss®组较多, 也就是说植入煅烧鹿角松质骨的骨缺损部位新骨生成中伴随较大量的新生血管生成。

2.4 动物植入实验骨修复效果评价 术后8周苏木精-伊红染色结果显示, 煅烧鹿角松质骨组、Bio-Oss®组植入材料周围均有大量新生骨生成(图7), 可见残留材料周围被新骨包绕, 两组植入材料的骨修复效果较为接近, 甚至煅烧鹿角松质骨组略优于Bio-Oss®组, 提示煅烧鹿角松质骨的早期血管化对其骨修复效果产生了重要影响。

3 讨论 Discussion

在修复和治疗骨缺损的过程中, 各种异种骨填充材料由于其优越的生物相容性、骨传导性和骨诱导性被广泛的研究和应用^[6, 19-20]。煅烧鹿角骨作为一种异种骨填充材料, 来源于自然脱落的鹿角, 是哺乳动物中唯一可完全再生的器官, 避免了对动物屠杀引起的伦理问题, 并可持续性获得。前期研究还发现煅烧鹿角骨在理化性能方面, 包括相位成分、化学键结构、Ca/P比、孔径和孔隙率与煅烧的人骨非常相似^[12]。研究证明煅烧鹿角松质骨具有优越的生物相容性和体内外成骨活性, 且其成骨效果与材料的鹿龄^[21-22]、煅烧温度有关。前期研究证明中年鹿龄(5–10岁)在600 °C煅烧条件下可完全去除有机物成分^[23-24], 避免了异种材料植入的免疫排斥反应, 且具有更优越的成骨活性, 所以此次研究所用的煅烧鹿角松质骨是在该条件下制备的骨填充材料^[25], 孔径范围为300–800 μm, 在体外与MC3T3-E1具有良好的细胞亲和性。以往研究证实孔径大于300 μm可确保足够的氧和营养供给, 可明显增强血管化和骨生成能力^[26-27]。煅烧鹿角松质骨与细胞良好的亲和性, 可能和其结构与化学组成接近人骨, 有利于细胞的黏附、增殖及发挥生理功能有关^[28], 可作为一种新型的异种骨填充材料来研究。

血管化对于骨组织工程非常重要, 也是骨缺损尤其是大面积骨缺损修复的前提^[29-30]。不管是在天然骨生成改建、骨折愈合、骨缺损修复还是骨移植的过程中, 血管化都是关键环节且贯穿整个修复过程^[31-32]。血管化的过程是将成骨细胞、相关细胞因子、骨修复过程所需要的营养物质及

氧气等带到骨缺损的局部,并通过新陈代谢的过程带走代谢产物,从而维持缺损修复过程微环境的动态平衡^[33]。以往研究表明,内皮细胞与成骨细胞之间的相互作用是骨膜下成骨或者软骨内成骨的先决条件^[34-36]。而且,促进组织工程骨内的血管化过程可提高成骨速度和成骨质量^[37]。

目前,骨组织工程发展的瓶颈之一在于组织工程骨早期血管化^[38]。在骨缺损尤其是大面积缺损的早期血管化过程中,支架内血供不充足可能会导致种子细胞由于氧气、营养物质的缺乏,代谢产物转运不畅而缺血坏死,从而导致修复失败^[39]。研究表明,骨修复中的血管再生与材料种类及性质有关^[40]。为此,此次研究考察了新型异种骨填充材料煅烧鹿角松质骨的早期血管化作用。

此次研究发现,煅烧鹿角松质骨在骨缺损修复早期(4周)具有良好的血管化作用,苏木精-伊红染色直观地显示了在骨填充材料植入体内新骨形成阶段伴随大量血管的新生,这可能是煅烧鹿角松质骨具有良好成骨作用的重要原因之一。Masson染色结果显示在骨缺损区内,填充材料周围有新生成的规律排列的胶原纤维和新生血管;血管内皮细胞标志物CD31免疫组织化学染色结果显示,在骨形成初期煅烧鹿角松质骨组有CD31阳性血管内皮细胞围成的血管腔也证实了这一点。其形成的机制可能是:骨填充材料内部吸附较高密度的血管内皮细胞,在信号因子的作用下向新生的骨样基质和胶原纤维移动,相互连接,形成单层的毛细血管官腔^[41]。血管发生与骨发生是一个多种细胞参与的过程,其中参与成骨作用与成血管作用的细胞及细胞因子,相互依赖,互相作用,通过骨形成的信号通路共同完成了骨缺损修复^[42]。Kaigler等^[43]证明骨髓间充质干细胞在体外分泌的血管内皮细胞生长因子,可促进骨髓间充质干细胞的生长与分化,而骨髓间充质干细胞也能促进血管的生成。与Bio-Oss[®]相比较,煅烧鹿角松质骨在骨缺损部位有较多的新生血管形成,说明煅烧鹿角松质骨的血管化作用更为明显,这种差异可能和它们的微量元素含量有关。前期研究发现,煅烧鹿角松质骨含有高含量的Fe元素^[20],后者对血管化直接相关^[44]。关于煅烧鹿角松质骨在骨缺损修复过程中血管化作用的定量比较及分子机制有待进一步研究。

综上所述,研究结果表明新型异种骨填充材料煅烧鹿角松质骨在修复骨缺损早期具有良好的血管化作用,这对其促成骨作用产生了积极影响,将为今后该类材料实现临床转化及其广泛应用奠定实验基础。

致谢: 感谢 863 计划的资助。

作者贡献: 第一作者与通讯作者共同设计研究;通讯作者指导论文构架及审核论文。

经费支持: 该文章接受了“国家高技术研究发展(863)计划课题的资助(2015AA033601)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题: 实验动物的使用已通过北京大学医学部伦理委员会伦理审查。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Hesse E, Kluge G, Atfi A, et al. Repair of a segmental long bone defect in human by implantation of a novel multiple disc graft. *Bone*. 2010;46:1457-1463.
- [2] Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics*. 2002;25(11):1301-1309.
- [3] Torroni A. Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:1121-1127.
- [4] Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86-A(7):1541-1558.
- [5] Liu T, Wu G, Wismeijer D, et al. Deproteinized bovine bone functionalized with the slow delivery of BMP-2 for the repair of critical-sized bone defects in sheep. *Bone*. 2013;56(1):110-118.
- [6] Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss[®]. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14:137-143.
- [7] Park SA, Shin JW, Yang YI, et al. In vitro study of osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells on heat-treated porcine trabecular bone blocks. *Biomaterials*. 2004;25(3):527-535.
- [8] Zitzmann NU, Scharer P, Marinello CP, et al. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss[®]: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001;21(3):289-295.
- [9] Briem D, Linhart WL, Lehmann W, et al. Long-term results after application of a porous hydroxyapatite ceramic (Endobon) in proximal tibia fractures. *Unfallchirurg*. 2002;105:128-133.
- [10] Figueiredo M, Henriques J, Martins G, et al. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes—comparison with human bone. *J Biomed Mater Res B*. 2010; 92(B):409-419.
- [11] Chen PY, Stokes AG, Mckittrick J. Comparison of the structure and mechanical properties of bovine femur bone and antler of the North American elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Acta Biomater*. 2009;5(2):693-706.

- [12] Zhang X, Cai Q, Liu H, et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41(11):1330-1337.
- [13] Zhang X, Xu M, Song L, et al. Effects of compatibility of deproteinized antler cancellous bone with various bioactive factors on their osteogenic potential. *Biomaterials.* 2013; 34(36):9103-9114.
- [14] Wei J, Xu M, Zhang X, et al. Enhanced Osteogenic Behavior of ADSCs Produced by Deproteinized Antler Cancellous Bone and Evidence for Involvement of ERK Signaling Pathway. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21:1810-1821.
- [15] Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2009;27(10):562-571.
- [16] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295(5557):1009-1014.
- [17] Otfinowski J. Heterotopic Induction of osteogenesis in the course of neural injury. *J Patol Pol.* 1993;44(3):133-168.
- [18] Hara-Irie F, Amizuka N, Ozawa H. Immunohistochemical and ultrastructural localization of CGRP-Positive nerve fibers at the epiphyseal trabeculae facing the growth Plate of rat femurs. *Bone.* 1996;18(1):29-39.
- [19] Develioglu H, Saraydin SU, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J.* 2009,28(4):396-400.
- [20] Develioglu H, Saraydin SU, Kartal U, et al. Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft. *J Oral Implantol.* 2010;36(3):167-173.
- [21] Landete-Castillejos T, Estevez JA, Martínez A, et al. Does chemical composition of antler bone reflect the physiological effort made to grow it? *Bone.* 2007;40(4):1095-1102.
- [22] Wu F, Li H, Jin L, et al. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2013;145(2):403-415.
- [23] Ooi CY, Hamdi M, Ramesh S. Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bon. *Ceramic Int.* 2007; 33(7):1171-1177.
- [24] Figueiredo M, Fernando A, Martins G, et al. Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramic Int.* 2010;36(8): 2383-2393.
- [25] Meng S, Zhang X, Xu M, et al. Effects of deer age on the physicochemical properties of deproteinized antler cancellous bone: an approach to optimize osteoconductivity of bone graft. *Biomed Mater.* 2015;10(3):035006.
- [26] Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, et al. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.* 2008;4(6):1904-1915.
- [27] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005; 26(27):5474-5491.
- [28] van Steenberghe D, Callens A, Geers L, et al. The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(3):210-216.
- [29] Laurencin C, Khan Y, Elamin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices.* 2006;3(1):49-57.
- [30] Linsley CS, Wu BM, Tawil B. Mesenchymal stem cell growth on and mechanical properties of fibrin-based biomimetic bone scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(12):2945-2953.
- [31] Goss TP, Cox QG, Jinnah RH. History and current application of bone transplantation. *Orthopedics.* 1993;16(8):895-900.
- [32] Kirkeby OJ, Nordsletten L, Skjeldal S, et al. Circulation in corticocancellous bone grafts measured with laser Doppler flowmetry. An experimental study in rats. *Stand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1994;28(4):249-254.
- [33] Burder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(367 Suppl):S68-83.
- [34] Griller M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(3): 390-398.
- [35] 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.
- [36] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(2): 284-291.
- [37] Stein H, Perren SM, Cordey J, et al. The muscle bed--a crucial factor for fracture healing: a physiological concept. *Orthopedics.* 2002;25(12):1379-1383.
- [38] 鲍小刚, 许国华. 工程骨的快速血管化[J]. *中国组织工程研究,* 2015, 19(7):1063-1069.
- [39] Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, et al. Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. *Tissue Eng Part A.* 2006;12(5):1261-1273.
- [40] Geiger F, Bertram H, Berger I, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res.* 2005;20(11):2028-2035.
- [41] 余希杰, 杨志明, 马骏荣. 成骨细胞的细胞社会学特征[J]. *中国修复重建外科杂志,* 1998, 12(6):350-354.
- [42] Das A, Botchwey E. Evaluation of angiogenesis and osteogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011; 17(6):403-414.
- [43] Kaigler D, Krebsbach PH, Polverini PJ, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells. *Tissue Eng.* 2003;9(1):95-103.
- [44] Chandra VS, Baskar G, Suganthi RV, et al. Blood compatibility of iron-doped nanosize hydroxyapatite and its drug release. *ACS Appl Mater Inter.* 2012;4:1200-1210.