

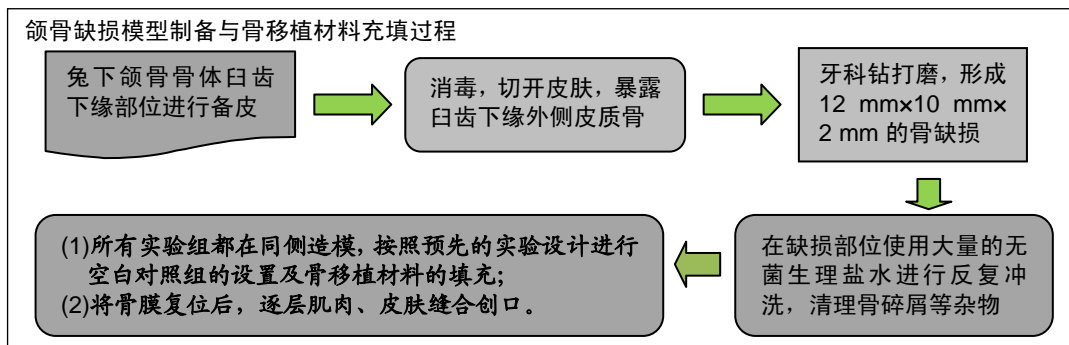
聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料包裹血管内皮生长因子修复下颌骨缺损

余和东¹, 陈永吉¹, 毛敏¹, 陈绍娟¹, 倪小兵¹, 冷卫东¹, 罗杰² (十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院), ¹口腔医学中心, ²神经外科, 湖北省十堰市 442000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1505

ORCID: 0000-0002-6321-9160(余和东)

文章快速阅读:



余和东, 男, 1985年生, 湖北省丹江口市人, 汉族, 2013年中国医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨缺损修复材料的基础研究。

通讯作者: 罗杰, 主任医师, 教授, 十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)神经外科, 湖北省十堰市 442000

文献标识码:A

稿件接受: 2018-08-13



文题释义:

生物活性陶瓷: 通常含有羟基, 还可做成多孔性, 生物组织可长入并同其表面发生牢固的键合; 生物吸收性陶瓷的特点是能部分吸收或者全部吸收, 在生物体内能诱发生新骨的生长。生物活性陶瓷具有骨传导性, 它作为一个支架, 成骨在其表面进行; 其还可作为多种物质的外壳或填充骨缺损。生物活性陶瓷有生物活性玻璃、羟基磷灰石陶瓷、磷酸三钙陶瓷等几种。

血管内皮生长因子: 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子, 具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用, 特别是在低氧环境下能促进血管增生。血管内皮生长因子通过提高血浆酶原活化因子和血浆酶原活化因子抑制因子 I mRNA 的表达, 提高血浆酶原活化因子的活性, 促进细胞外蛋白水解, 进而促进新生毛细血管的形成。

摘要

背景: 前期研究证实, 聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料具有良好的生物相容性、理想孔隙率和力学性能, 可满足非承重区骨缺损的修复要求。

目的: 进一步观察包裹血管内皮生长因子的聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料修复下颌骨缺损的效果。

方法: 将 36 只新西兰大白兔随机分成 4 组, 每组 9 只, 对照组不进行任何处理; 模型组制作下颌骨缺损模型; 假手术组只复制模型组手术过程, 不制作骨缺损; 支架组将包裹血管内皮生长因子的聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料植入下颌骨缺损部位。术后 4, 8, 16 周取下颌骨标本, 进行苏木精-伊红染色与 Van Gieson 染色, 观察骨缺损修复情况; PCR、Western blot 和免疫荧光检测血管内皮生长因子表达情况。

结果与结论: ①苏木精-伊红染色显示, 对照组和假手术组骨结构完整, 模型组术后 16 周内的骨缺损部位无明显变化; 术后 8, 16 周, 支架组支架边缘出现成骨细胞; ②Van Gieson 染色显示, 对照组和假手术组骨结构完整, 造模组术后 16 周内的骨缺损部位无明显变化; 术后 8, 16 周, 支架组支架边缘出现成骨细胞, 未见明显的胶原纤维; ③术后 4 周, 3 组血管内皮生长因子表达无差异; 术后 8, 16 周, 模型组血管内皮生长因子表达低于对照组 ($P < 0.05$), 支架组血管内皮生长因子表达高于对照组 ($P < 0.05$); ④结果表明, 聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料包裹血管内皮生长因子修复下颌骨缺损, 可提高组织内血管内皮生长因子的表达, 促进骨再生。

关键词:

血管内皮生长因子; 聚醚醚酮; 生物陶瓷; 骨缺损; 生物材料; 国家自然科学基金

主题词:

陶瓷制品; 血管内皮生长因子类; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318

基金资助:

国家自然科学基金(51541202, 项目负责人: 冷卫东; 81671831, 项目负责人: 罗杰)

Polyetheretherketone/biphasic bioceramic composite coated with vascular endothelial growth factor to repair mandibular defects

Yu Hedong¹, Chen Yongji¹, Mao Min¹, Chen Shaojuan¹, Ni Xiaobing¹, Leng Weidong¹, Luo Jie² (¹Department of Stomatology, ²Department of Neurosurgery, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China)

Yu Hedong, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

Corresponding author: Luo Jie, Chief physician, Professor, Department of Neurosurgery, Taihe Hospital (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, Hubei Province, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that polyetheretherketone/biphasic bioceramic composites have good biocompatibility, ideal porosity and mechanical properties, which can meet the repair requirements of non-load bearing bone defects.

OBJECTIVE: To further observe the effect of polyetheretherketone/biphasic bioceramic composite coated with vascular endothelial growth factor in the repair of mandibular defects.

METHODS: Thirty-six New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups, nine in each group. The control group did not undergo any treatment. A mandibular defect model was made in the model group. The sham operation group only replicated the surgical procedure of the model group but did not make bone defects. In the scaffold group, the polyetheretherketone/biphasic bioceramic composite coated with vascular endothelial growth factor was implanted into the mandibular defect site. Mandibular specimens were taken at 4, 8, and 16 weeks after operation. Hematoxylin-eosin staining and Van Gieson staining were performed to observe the repair of bone defects. The expression of vascular endothelial growth factor was detected by PCR, western blot and immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Hematoxylin-eosin staining results showed that the bone structure was intact in the control group and the sham operation group, and the bone defect in the model group did not change markedly within 16 weeks after operation; at 8 and 16 weeks after operation, osteoblasts appeared at the scaffold edge of the scaffold group. (2) Van Gieson staining results showed that the bone structure was intact in the control group and the sham operation group, and there was no significant change in the bone defect within 16 weeks after operation; at 8 and 16 weeks after operation, osteoblasts appeared at the scaffold edge of the scaffold group, but not collagen fibers produced. (3) At 4 weeks after operation, there was no difference in the expression of vascular endothelial growth factor among the three groups; at 8 and 16 weeks after operation, the expression of vascular endothelial growth factor in the control group was higher than that in model group ($P < 0.05$), but lower than that in the scaffold group ($P < 0.05$). In conclusion, polyetheretherketone/biphasic bioceramic composites coated with vascular endothelial growth factor to repair mandibular defects can increase the expression of vascular endothelial growth factor and promote bone regeneration.

Subject headings: Ceramics; Vascular Endothelial Growth Factors; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 51541202 (to LWD) and 81671831 (to LJ)

0 引言 Introduction

颌骨缺损在临床上非常多见, 修复重建和骨再生是口腔颌面外科医生和口腔种植医生面临的棘手问题。临床上常用自体体和异体骨移植, 或者诱导成骨, 但它们都有各自难以克服的缺点。颌骨缺损在口腔修复及口腔颌面外科领域是一大难题。近年来, 利用生物组织工程学修复颌骨缺损成为热点。生物组织工程学包括组织工程和生物因子两大块。组织工程材料包括人工合成的磷酸钙类生物硫酸钙、生物陶瓷、多聚物等^[1-3]。生物陶瓷的生物相容性和力学性较优异, 并且具有与机体强亲和性、抗血栓、耐侵蚀及化学、物理性能稳定性等诸多优势^[4]。聚醚醚酮耐高温, 抗化学和抗辐射能力很强, 其弹性与皮质骨弹性很接近, 并且具有很好的生物相容性^[5-7]。在组织工程骨构建过程中, 细胞因子在其中起着非常重要的作用^[8]。血管内皮生长因子是特异性地作用于血管内皮细胞的生长因子^[9]。有研究显示在骨折愈合及血管重建过程中, 血管内皮生长因子表达均升高, 血管内皮生长因子与骨折端血管再生和骨折愈合有关, 可促进血管内皮细胞的增殖; 在软骨生长为成骨过程中, 协调着软骨细胞消长、血管生成、破骨细胞吸收及骨形成之间的关系, 并且能够促进成骨细胞的分化及其功能, 有利于修复骨缺损。因此, 研究利用聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料包裹血管内皮生长因子来修复颌骨缺损模型, 通过苏木精-伊红染色、Van Gieson染色、PCR、Western blot和免疫荧光检测聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料修复血管内皮生长因子表达情况, 并观察其修复效果, 为下一步临床应用打下基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年4月至2017年9月在湖北

医药学院动物实验中心和十堰市太和医院生物医学研究所完成。

1.3 材料

实验动物: 2月龄雄性新西兰大白兔36只, 购于湖北医药学院动物实验中心, 许可证号为SCXK(鄂)2016-0008, 平均体质量2.0 kg。

实验主要试剂和仪器: 包裹血管内皮生长因子的聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料(在华南理工大学材料科学与工程学院国家人体组织功能重建工程技术研究中心和武汉大学口腔医学院牙科分子力学实验室制备); SYBR Green qPCR SuperMix(Invitrogen公司); ChemiDoc™ XRS凝胶成像系统仪(美国Bio-Rad公司); 血管内皮生长因子一抗(Abcam公司); 迷你双垂直电泳仪(北京六一仪器厂); 荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司); 迷你转印电泳仪(北京六一仪器厂); 倒置荧光显微镜, 切片仪(Leica公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 将36只新西兰大白兔随机分成对照组、假手术组、模型组与支架组, 每组9只。对照组不进行任何处理; 模型组制作下颌骨缺损模型; 假手术组只复制模型组手术过程, 不制作骨缺损; 支架组将包裹血管内皮生长因子的聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料植入下颌骨缺损部位。

1.4.2 制作下颌骨缺损模型 选取兔左侧下颌骨体白齿下缘部位进行备皮, 碘酊消毒, 然后在横向将皮肤切开, 钝性剥离肌肉, 使白齿槽部位充分暴露。将骨膜做十字切开后, 利用骨膜剥离器推开骨膜, 暴露白齿下缘的外侧皮质骨。从白齿下缘的中间开始用牙科打磨钻进行打磨, 慢慢向四周造成缺损, 将压根部分去除, 使内侧皮质骨保留。缺损为12 mm×10 mm×2 mm(长、宽、深)的方孔, 在缺损部位使用大量的无菌生理盐水进行反复冲洗, 清理骨碎屑

等杂物。支架组将包裹血管内皮生长因子的聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料植入下颌骨缺损部位。将骨膜复位后, 逐层肌肉、皮肤缝合创口, 缝合时在局部撒少量的抗生素防止感染。

1.4.3 取材 术后4, 8, 16周, 每组每个时间点处死兔3只, 取下颌骨标本。

1.4.4 苏木精-伊红染色 取合适大小的颌骨标本, PBS冲洗, 体积分数10%中性甲醛溶液固定, 脱钙, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色后光学显微镜下观察颌骨病理学变化。

1.4.5 Van Gieson染色 取合适大小的颌骨标本, PBS冲洗, 体积分数10%中性甲醛溶液固定, 脱钙, 石蜡包埋, 切片, Van Gieson染色后光学显微镜下观察颌骨病理学变化。

1.4.6 荧光定量PCR检测血管内皮生长因子表达 取颌骨进行RNA的提取, 提取RNA后根据反转录试剂盒合成cDNA, 以cDNA为模板, 在荧光定量PCR仪上进行检测, 以 β -actin为内参, 算出各组颌骨中血管内皮生长因子的相对表达量。引物: 血管内皮生长因子-F: CCT GGA AGT CTA CGA ACG C, 血管内皮生长因子-R: AGC AAC CCG CAC ATC TCA, β -actin-F: ACT CTT CCA GCC TTC CTT C, β -actin-R: ATC TCC TTC TGC ATC CTG TC。

1.4.7 Western blot检测血管内皮生长因子表达 将颌骨用液氮进行研磨, 加入组织裂解液, 裂解30 min后, 4 °C、10 000 r/min离心10 min, 小心吸取上清, 即可获得总蛋白。根据BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性, 上样, 进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳1.0-2.0 h, 后湿法转膜30-50 min。一抗(IgG类免疫球蛋白)溶液孵育, 4 °C过夜; 二抗(抗IgG抗体)溶液中室温孵育1.0-2.0 h。在膜上滴加ECL曝光液, 在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.4.8 免疫荧光观察血管内皮生长因子表达 取合适大小的颌骨标本, PBS冲洗, 体积分数10%中性甲醛溶液固定, 脱钙, 石蜡包埋, 切片, 一抗溶液孵育, 4 °C过夜; 二抗溶液中室温孵育1.0-2.0 h。在荧光显微镜下进行观察。

1.5 主要观察指标 各组下颌骨标本骨缺损修复情况, 以

及血管内皮生长因子表达情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件分析, 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 经 t 检验显著性差异, 以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 36只兔均进入结果分析。

2.2 颌骨缺损模型情况 颌骨缺损模型构建过程中无动物死亡, 模型完成后兔的状态良好, 见图1。

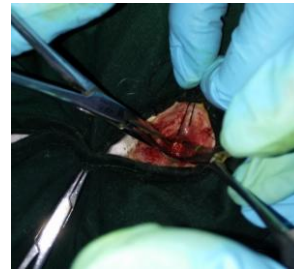


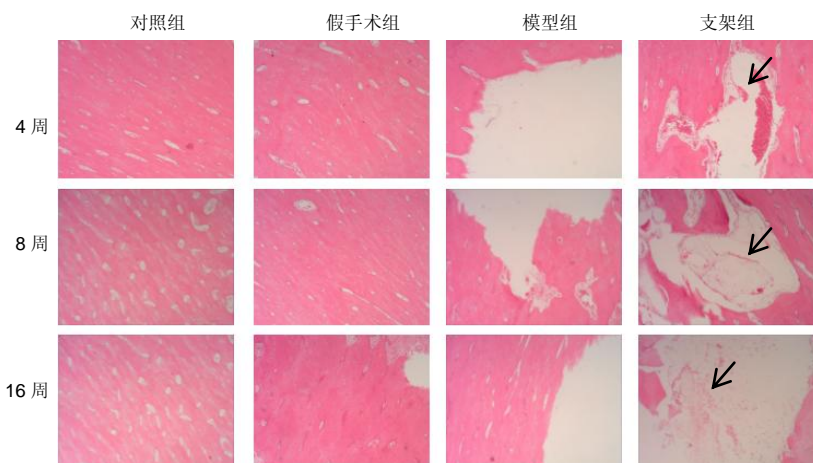
图1 兔颌骨缺损模型
Figure 1 Mandibular defect model

2.3 术后不同时间点各组下颌骨标本苏木精-伊红染色结果 术后4, 8, 16周, 对照组和假手术组骨结构完整, 模型组骨缺损部位无明显变化; 术后8, 16周, 支架组支架边缘出现成骨细胞, 见图2。

2.4 术后不同时间点各组下颌骨标本Van Gieson染色结果 术后4, 8, 16周, 对照组和假手术组骨结构完整, 模型组骨缺损部位无明显变化; 术后8, 16周, 支架组支架边缘出现成骨细胞, 尚不可见明显的胶原纤维, 见图3。

2.5 术后不同时间点各组血管内皮生长因子mRNA表达情况 术后第4周, 各组血管内皮生长因子mRNA表达无差异; 术后第8周, 模型组血管内皮生长因子mRNA较对照组显著下降($P=0.036$), 支架组血管内皮生长因子mRNA表达较模型组表达显著升高($P=0.039$); 术后第16周, 模型组血管内皮生长因子mRNA表达较对照组进一步下降($P=0.012$), 支架组血管内皮生长因子mRNA表达较模型组进一步升高($P=0.026$), 见图4。

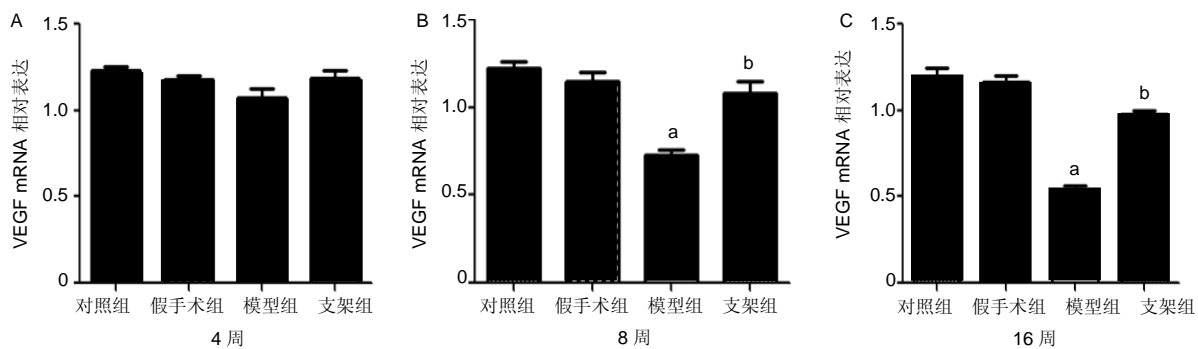
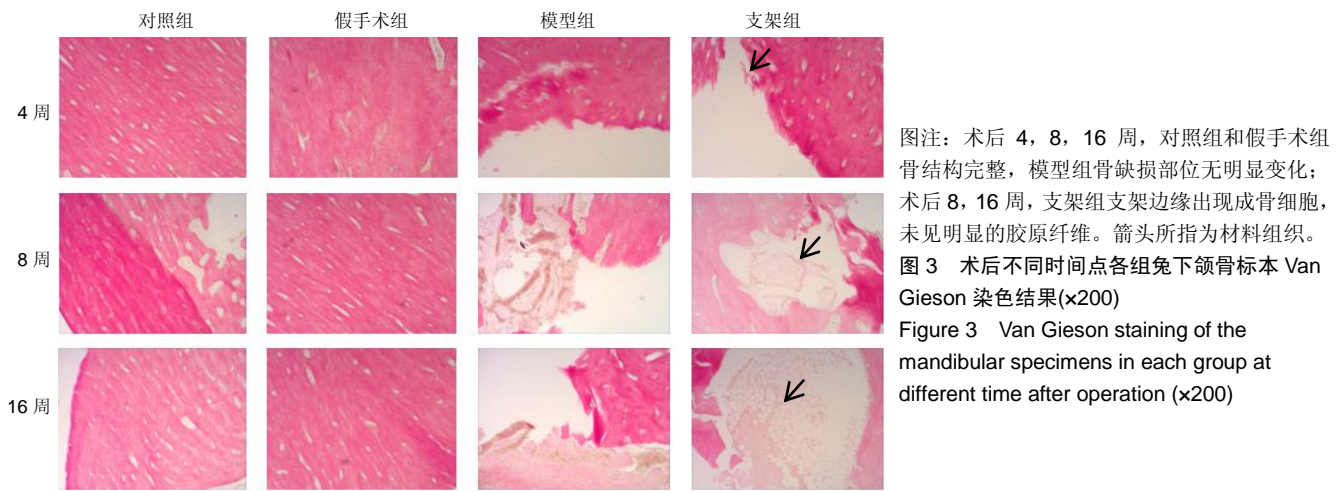
2.6 术后不同时间点各组管内皮生长因子蛋白表达情况 见图5, 6所示, 术后第4周, 各组血管内皮生长因子蛋白



图注: 术后4, 8, 16周, 对照组和假手术组骨结构完整, 模型组骨缺损部位无明显变化; 术后8, 16周, 支架组支架边缘出现成骨细胞。箭头所指为材料组织。

图2 术后不同时间点各组兔下颌骨标本苏木精-伊红染色结果(x200)

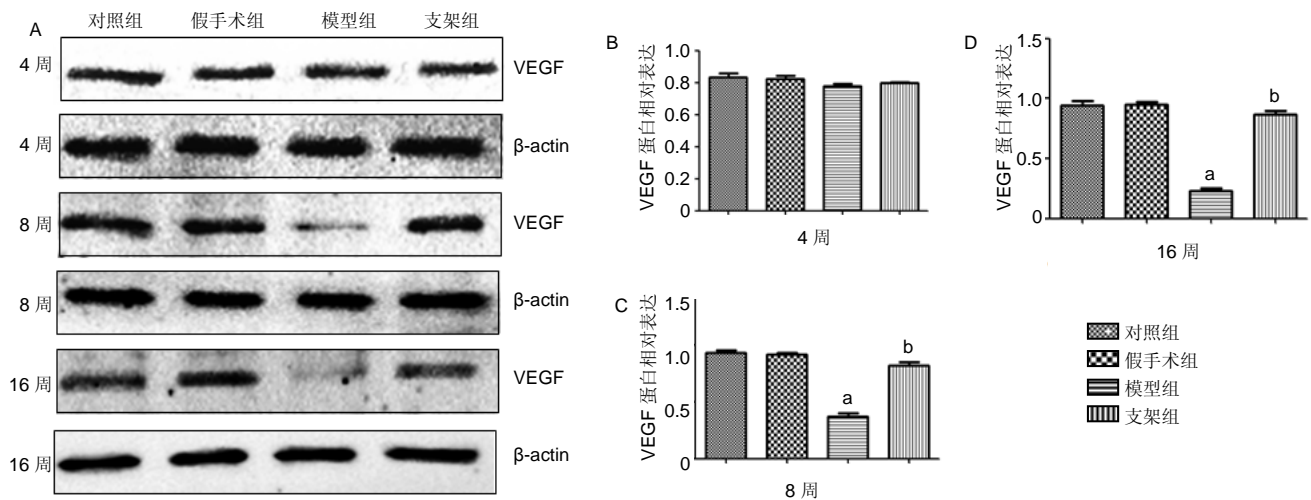
Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of the mandibular specimens in each group at different time after operation (x200)



图注：图中 A-C 分别为术后 4, 8, 16 周 VEGF mRNA 表达。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 4 术后不同时间点各组血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达情况

Figure 4 Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in each group at different time after operation



图注：图中 A 为 VEGF 蛋白表达条带，B-C 分别为术后 4, 8, 16 周 VEGF 蛋白表达量化结果；与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 5 术后不同时间点各组血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达情况

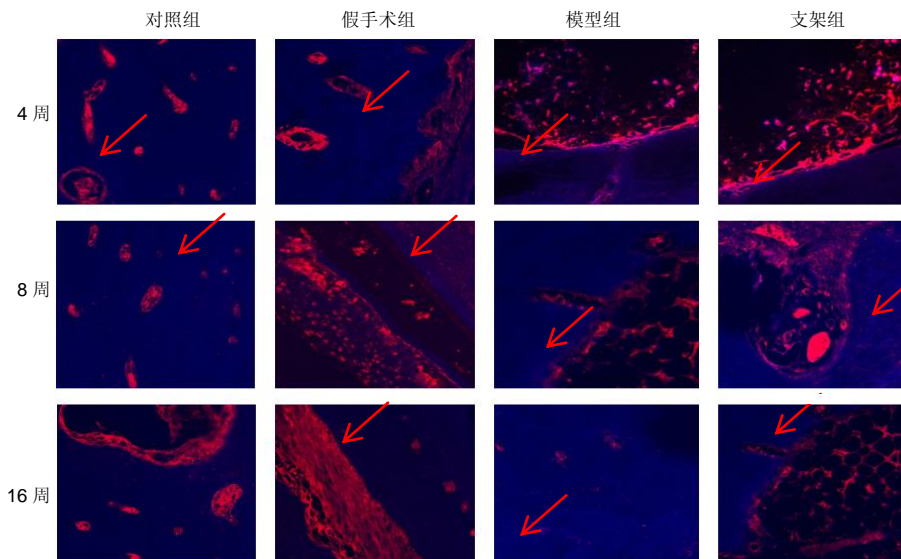
Figure 5 Expression of vascular endothelial growth factor protein in each group at different time after operation

表达无差异；术后第 8 周，模型组血管内皮生长因子蛋白表达较对照组显著下降($P=0.034$)，支架组血管内皮生长因子蛋白表达较模型组显著升高($P=0.041$)；术后第 16 周，与对照组相比，模型组血管内皮生长因子蛋白表达较对照组进一步下降($P=0.015$)，支架组血管内皮生长因子蛋白表达较

模型组进一步升高($P=0.023$)。

3 讨论 Discussion

在颌骨缺损的模型选择上，骨缺损大小与实验的客观性和可靠性直接相关^[10]。Hollinger 等^[11]发现缺损与骨的直



图注: 箭头所指是细胞核。
图6 术后不同时间点各组血管内皮生长因子蛋白免疫荧光观察结果(x200)
Figure 6 Immunofluorescence results of vascular endothelial growth factor protein in each group at different time after operation (x200)

径比例大于1.5则不愈合。Abaoe等^[12-13]则认为兔桡骨的关键尺寸是8 mm。兔桡骨的直径为3.0-4.0 mm, 长度为其直径的两三倍, 为10 mm, 因此认为兔桡骨缺损模型设置为10 mm是可靠的。

生物陶瓷是临床上较常用的人工合成骨生物替代材料, 具有特定的生物功能。生物陶瓷具有很好的力学性和生物相容性, 因此具有较好的应用前景^[14-18]。牙齿在无机成分上由相似晶体结构形态的羟基磷灰石组成, 与自然骨相同。临床上已广泛开展利用动物骨煅烧来制备生物材料的方法^[19-20]。目前修复骨缺损的生物材料是通过高温煅烧获得的羟基磷灰石, 也取得了比较满意的临床疗效。有研究显示, 利用离体牙提取出来的生物陶瓷可发挥骨代替治疗作用^[20-21]。双相陶瓷生物骨为 β -磷酸三钙和羟基磷灰石按照适量比例的混合材料。课题组成员已制备出聚醚醚酮/牙源性双相生物陶瓷复合材料, 并且研究验证其具有良好的生物相容性, 呈现孔间相互连通的多孔网状结构, 具有理想孔隙率和力学性能, 满足了非承重区骨缺损修复要求, 克服了羟基磷灰石和 β -磷酸三钙力学性能不充足、机械强度差等物理性能缺点^[22]。研究通过动物实验验证此生物复合材料修复骨缺损的性能, 利用聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料包裹蛋白因子血管内皮生长因子来作用于骨缺损部位, 获得了较好成效。

血管内皮生长因子能够促进微血管内皮细胞的增殖和通透性, 一些大分子物质可进入细胞外基质, 因此可支持新生血管向内生长^[23]。有研究显示在软骨细胞发育过程中, 软骨细胞能合成血管内皮生长因子, 还有血管内皮生长因子受体^[24]。Horner等^[25]证明, 有大量血管在成骨成长过程中软骨矿化区域血管内皮生长因子的高表达中生成, 表明血管入侵在肥大软骨细胞产生过程中发挥着重要调节作用。同时利用荧光定量PCR、Western blot和免疫荧光检测各组血管内皮生长因子表达量发现, 与对照组相比, 模型组显著下降; 与模型组相比, 支架组血管内皮生长因子

表达显著升高。在第16周时, 与对照组相比, 造模组血管内皮生长因子表达进一步下降; 与造模组相比, 支架组血管内皮生长因子表达进一步升高, 这也进一步说明可能是由于血管内皮生长因子的表达升高, 导致支架组骨细胞生长。同时也有研究表明血管内皮生长因子对成骨细胞具有促分化作用, 并能介导成骨细胞和血管内皮细胞进行自分泌和旁分泌, 促进骨的形成^[26]。这也与此次研究结果一致。研究利用苏木精-伊红和Van Gieson染色结果发现, 移植包裹血管内皮生长因子的支架后, 在第8, 16周时在接合部位有骨原细胞增生, 并且能见一些破骨细胞和成骨细胞。因此, 认为外源性血管内皮生长因子在骨缺损修复过程中参与了血管重建并起到了促进作用, 缩短了新骨形成时间, 加快了骨愈合过程。Lilley等^[27]的研究表明, 如果将血管内皮生长因子抑制剂作用在骨缺损部位, 可抑制缺损部位新生血管的形成及骨的形成, 通过外源性导入血管内皮生长因子合成蛋白, 可促进骨的形成及修复骨缺损。

综上所述, 利用聚醚醚酮/双相生物陶瓷复合材料包裹蛋白因子血管内皮生长因子, 对下颌骨缺损部位的修复与愈合具有重要作用, 为进一步临床治疗骨缺损建立了理论基础。

作者贡献: 冷卫东进行实验设计, 实验实施为余和东和倪小兵, 实验评估为陈永吉, 资料收集为毛敏和陈绍娟, 余和东成文, 罗杰审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(51541202, 81671831)”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中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 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。实验动物在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)。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验

与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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,符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经通过湖北医药学院生物统计学专家审核。

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4.0”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] Briem D, Strametz S, Schröder K, et al. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(7):671-677.
- [2] Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*. 2009;2(2):399-498.
- [3] Katzer A, Marquardt H, Westendorf J, et al. Polyetheretherketone--cytotoxicity and mutagenicity in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(8):1749-1759.
- [4] Converse GL, Conrad TL, Merrill CH, et al. Hydroxyapatite whisker-reinforced polyetherketoneketone bone ingrowth scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(3):856-863.
- [5] Lee JH, Jang HL, Lee KM, et al. In vitro and in vivo evaluation of the bioactivity of hydroxyapatite-coated polyetheretherketone biocomposites created by cold spray technology. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(4):6177.
- [6] Salerno S, Piscioneri A, Laera S, et al. Improved functions of human hepatocytes on NH 3, plasma-grafted PEEK-WC-PU membranes. *Biomaterials*. 2009;30(26):4348-4356.
- [7] Dennes TJ, Schwartz J. A Nanoscale Adhesion Layer to Promote Cell Attachment on PEEK. *J Am Chem Soc*. 2009;131(10):3456-3457.
- [8] Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555.
- [9] Zhao D, Pan C, Sun J, et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2[[sol]]Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene*. 2015;34(24):3107.
- [10] Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998;9(4):310-316.
- [11] Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-68.
- [12] Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg*. 1994;5(3):201-203.
- [13] Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, et al. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1995;66(2):169-173.
- [14] Chen G, Li W, Yu X, et al. Study of the cohesion of TTCP/DCPA phosphate cement through evolution of cohesion time and remaining percentage. *J Mater Sci*. 2009;44(3):828.
- [15] Sayer M, Stratilatov AD, Reid J, et al. Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2003;24(3):369.
- [16] Reid JW, Pietak A, Sayer M, et al. Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*. 2005;26(16):2887.
- [17] Jang JH, Castano O, Kim HW. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1065.
- [18] Arcangeli E, Kon E, Delcogliano M, et al. Nanocomposite biomimetic scaffold in knee osteochondral defect regeneration: an animal study. *J Appl Biomater Biomech*. 2009;7(1):52-53.
- [19] Khadka A, Li J, Li Y, et al. Evaluation of hybrid porous biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide 6 and bone marrow-derived stem cell construct in repair of calvarial critical size defect. *J Craniofac Surg*. 2011;22(5):1852-1858.
- [20] Schneider OD, Weber F, Brunner TJ, et al. In vivo and in vitro evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitute material for complex defects. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(5):1775-1784.
- [21] Chow LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J*. 2009;28(1):1.
- [22] 冷卫东,刘彩云,黄翠,等.聚醚醚酮/牙源性双相生物陶瓷复合材料的制备及力学性能[J].*中国组织工程研究*, 2015,19(52):8418-8422.
- [23] Fontijn D, Bosch LJ, Duyndam MC, et al. Basic Fibroblast Growth Factor-Mediated Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor in 1F6 Human Melanoma Cells is Regulated by Activation of PI-3K and p38 MAPK. *Cell Oncol*. 2009;31(3):179-190.
- [24] Park K, Amano H, Ito Y, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) signaling enhances angiogenesis in a surgical sponge model. *Biomed Pharmacother*. 2016;78:140-149.
- [25] Horner A, Bishop NJ, Bord S, et al. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat*. 1999;194(Pt 4):519-524.
- [26] Becker R, Pufe T, Kulow S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(7):1082-1087.
- [27] Lilley CE, Groutsi F, Han Z, et al. Multiple immediate-early gene-deficient herpes simplex virus vectors allowing efficient gene delivery to neurons in culture and widespread gene delivery to the central nervous system in vivo. *J Virol*. 2001;75(9):4343-4356.