

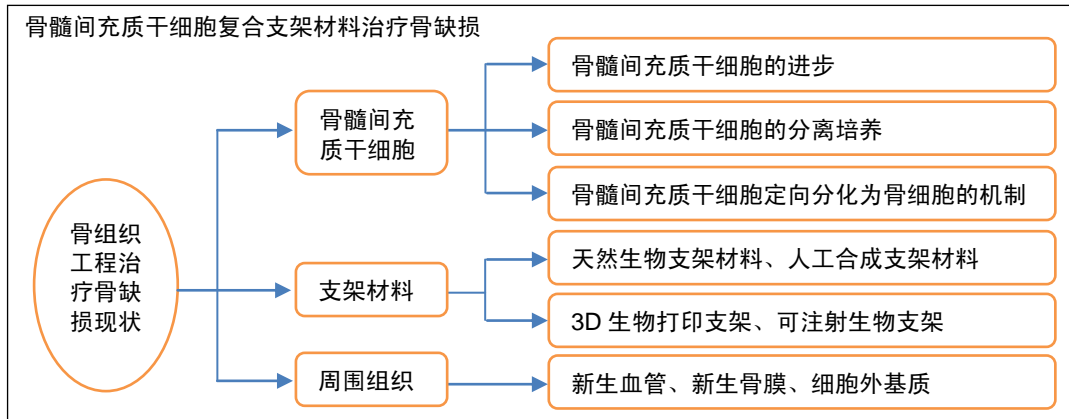
骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损：研究现状及前景展望

池玉磊¹, 卜宪敏², 查玉梅³, 王海滨³, 孟纯阳³, 吴彬^{1,3} (¹济宁医学院临床医学院, 山东省济宁市 272000; ²济宁市第一人民医院, 山东省济宁市 272000; ³济宁医学院附属医院骨科, 山东省济宁市 272000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1819

ORCID: 0000-0002-4187-1465(池玉磊)

文章快速阅读:



池玉磊, 男, 1990年生, 山东省人, 汉族, 济宁医学院在读硕士, 主要从事骨缺损修复方面的研究。

共同第一作者: 卜宪敏, 1980年生, 山东省微山县人, 汉族, 2006年福建医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事外科病理学研究。

通讯作者: 吴彬, 博士, 副主任医师, 济宁医学院, 山东省济宁市 272000; 济宁医学院附属医院骨科, 山东省济宁市 272000

文献标识码:A

稿件接受: 2019-05-17



Chi Yulei, Master candidate, Clinical Institute, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China

Bu Xianmin, Master, Associate chief physician, Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China

Chi Yulei and Bu Xianmin contributed equally to this work.

Corresponding author: Wu Bin, MD, Associate chief physician, Clinical Institute, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China; Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China

文题释义:

骨髓间充质干细胞的优势: 是最早在骨髓中发现的异质性、原始细胞, 具有易获取、易培养、低免疫原性和易于外源基因转染并长期表达等特点, 来源较为方便, 能够定向分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞等, 目前被广泛应用于骨缺损的重建和再生, 是治疗骨缺损的最佳种子细胞。

生物三维打印: 是以活细胞、生物活性因子以及生物材料为基本成形单元, 设计制造具有生物活性的人工器官、植入物或细胞三维结构, 是制造科学与生物医学交叉融合的新兴学科, 也是三维打印技术中最具活力和发展前景的方向。

摘要

背景: 骨缺损是临床常见且较难解决的问题, 骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损是目前研究的热点。

目的: 总结骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损的最新研究进展, 为临床应用提供理论依据。

方法: 文章第一作者通过检索中国知网、万方、维普、PubMed、Embase 和 Web of Science 数据库 2009 年 1 月至 2018 年 12 月相关文献, 检索词为“骨髓间充质干细胞, 分离培养, 支架材料, 骨缺损, 骨组织工程, 成骨分化, 新生血管, 骨膜, 细胞外基质”“bone marrow mesenchymal stem cells, isolation, scaffolds, bone defects, bone tissue engineering, osteogenesis, angiogenesis, periosteum, extracellular matrix”。最终选取符合纳入标准的文献共计 95 篇。

结果与结论: 大量研究表明, 骨髓间充质干细胞是治疗骨缺损的理想种子细胞, 其与支架材料复合能够促进骨缺损修复。目前, 骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损正处于新的发展时代, 是一种很有前景的骨缺损治疗方法, 其中在骨髓间充质干细胞的分离培养、定向分化及支架材料研究方面取得了很大的进展, 并进一步证明了新生血管、骨膜和细胞外基质在整个骨组织工程中的重要作用, 这一研究对未来临床治疗骨缺损具有重大意义。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 支架材料; 骨缺损; 骨组织工程; 成骨分化; 新生血管; 骨膜; 细胞外基质; 国家自然科学基金

中图分类号: R459.9; R394.2; R683

基金资助:

国家自然科学基金(81572205), 项目负责人: 孟纯阳; 山东省自然科学基金(ZR2014CQ042), 项目负责人: 吴彬; 济宁医学院教师扶持基金(JYFC2018FKJ048), 项目负责人: 吴彬; 济宁医学院贺林院士基金(JYHL2018FMS13), 项目负责人: 吴彬

Bone marrow mesenchymal stem cells combined with scaffolds in treatment of bone defects: present and future

Chi Yulei¹, Bu Xianmin², Zha Yumei³, Wang Haibin³, Meng Chunyang³, Wu Bin^{1,3} (¹Clinical Institute, Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China; ²Jining No. 1 People's Hospital, Jining 272000, Shandong Province, China; ³Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272000, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone defect is a common problem encountered in clinical practice. To this end, bone marrow mesenchymal stem cells combined with scaffolds is a hot topic in the treatment of bone defects.

OBJECTIVE: To summarize the latest research progress in bone marrow mesenchymal stem cells combined with scaffolds in the treatment of bone defects, which provides a theoretical basis for clinical application.

METHODS: The first author searched CNKI, WanFang, VIP, PubMed, Embase and Web of Science databases from January 2009 to December 2018. Search terms were "bone marrow mesenchymal stem cells, isolation, scaffolds, bone defects, bone tissue engineering, osteogenesis, angiogenesis, periosteum, extracellular matrix" in Chinese and English. Totals of 95 articles that met the inclusion criteria were selected.

RESULTS AND CONCLUSION: Numerous studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cells are ideal seed cells for the treatment of bone defects, and cell-scaffold composites can promote the repair and healing of bone defects. To date, bone marrow mesenchymal stem cells combined with scaffolds as a promising treatment for bone defects have been in the new development era. Great progress has been achieved in terms of isolation, culture and directed differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells as well as scaffold materials. These findings further indicate the important roles of new vessels, periosteum and extracellular matrix in bone tissue engineering, which are of great significance for the future clinical treatment of bone defects

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; scaffold material; bone defect; bone tissue engineering; osteogenic differentiation; neovascularization; periosteum; extracellular matrix; National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81572205 (to MCY); Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2014CQ042 (to WB); Fund for Teachers Support of Jining Medical University, No. JYFC2018FKJ048 (to WB); Research Fund for Lin He's Academician Workstation of New Medicine and Clinical Translation in Jining Medical University, No. JYHL2018FMS13 (to WB)

0 引言 Introduction

近年来, 由于创伤、感染、恶性肿瘤和先天性疾病等因素所导致的骨缺损是目前临床常见且较难解决的问题^[1-2], 为解决这一难题, 人们对成体干细胞深入研究, 结果发现骨髓间充质干细胞对治疗骨缺损具有重要的临床意义^[3]。骨髓间充质干细胞是一种中胚层来源的多能干细胞, 具有很强的增殖分化能力, 在不同诱导因素下可定向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等, 具有易获取、易培养、低免疫原性和易于外源基因转染并长期表达等特点, 目前被广泛应用于基础实验和临床研究^[4]。骨髓间充质干细胞复合支架材料促进骨缺损修复这一研究已经成为目前组织工程研究的新热点, 文章针对这一研究的最新进展进行综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 以“骨髓间充质干细胞、分离培养、支架材料、骨缺损、骨组织工程、成骨分化、新生血管、骨膜、细胞外基质”“bone marrow mesenchymal stem cells, isolation, scaffolds, bone defects, bone tissue engineering, osteogenesis, angiogenesis, periosteum, extracellular matrix”为关键词, 通过计算机检索中国知网、万方、维普、PubMed、Embase和Web of Science数据库2009年1月至2018年12月相关文献, 个别文献追溯到10年前。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: ①关于骨髓间充质干细胞及成骨分化的相关文献; ②关于骨组织工程及治疗骨缺损的相关文献; ③关于支架材料的相关文献。

排除标准: ①重复性研究; ②缺乏可靠论据论点的文章。

1.3 资料提取与文献质量评价 共检索到相关文献856篇, 见图1, 排除因研究目的与此文无关的和重复的文

献, 最终符合纳入标准有中文4篇, 英文91篇, 共保留95篇文献进行分析、归纳和总结。

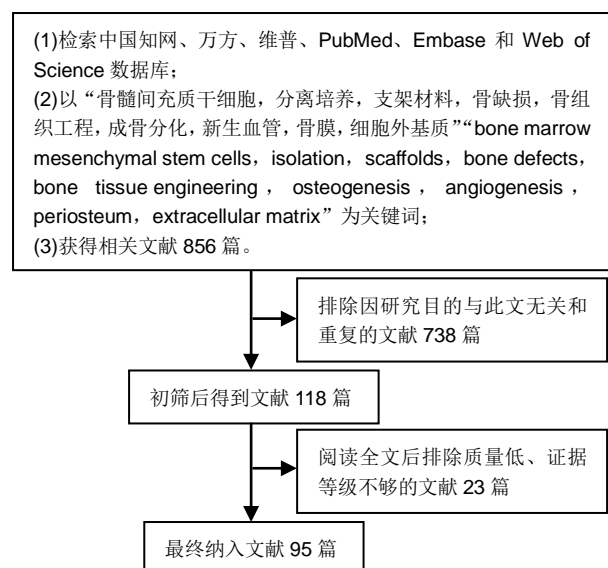


图1 文献筛选流程

2 结果 Results

2.1 骨缺损治疗现状 骨缺损是一种严重的骨科疾病, 其治疗具有挑战性。目前骨缺损的治疗技术包括骨移植技术、带血管腓骨移植技术、Ilizarov骨搬运技术、Masquelet诱导膜技术、钛网cage技术、髓内钉系统骨延长技术和组织工程技术等^[5-7]。移植骨可分为自体骨、同种异体骨、异种骨及人工骨4类, 自体骨移植仍然是目前小缺损(<5 cm)重建的治疗标准, 但由于自体骨取材有限, 并容易产生医源性损伤、术后疼痛等并发症, 自体骨移植的临床应用还较为局限; 相比之下, 同种异体骨和异种骨移植在疾病传播和免疫原性反应等方面发生的风险概率都很高, 目前也并没有被接受为骨缺损的标准治疗方式。同样, Masquelet诱导膜技术和Ilizarov骨搬运技术是目前较大骨缺损(>5 cm)重建的首选方

法,但这些技术操作复杂,对术者技术要求高,其预后避免不了高并发症和再手术率的风险^[8-10]。因此,人们不得不探索一种新的治疗方法来更好的代替自体骨。近年来,组织工程技术为治疗骨缺损提供了新的研究方向和思路,该技术将组织工程和细胞生物学的原理和方法相结合,研发相关生物材料(人工骨)复合骨髓间充质干细胞对骨缺损组织的结构、功能进行修复和改善^[7],并取得了相关突破和进展。

2.2 骨髓间充质干细胞的进步 19世纪德国病理学家科恩海姆(Cohnheim)提出骨髓中存在一种非造血间充质干细胞的观点,到了19世纪中叶Friedenstein的研究证实了骨髓间充质干细胞的存在^[11]。直到1991年美国生物学家卡普兰Caplan将其命名为间充质干细胞^[12]。为了作为科学研究的识别标准,2006年国际细胞治疗协会(ISCT)提出了定义人类间充质干细胞的最低标准:首先,间充质干细胞在标准培养条件下保持塑料黏附性;其次,间充质干细胞必须具有特异性表面抗原的表达,见表1;第三,间充质干细胞必须在体外分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞^[13]。根据剑桥词典,干细胞被定义为一种可以发育成任何其他类型的细胞^[16]。目前,很多学者认为骨髓间充质干细胞在体内的主要功能不是多能性,而是免疫调节和营养,因此在2010年和2017年首次使用间充质干细胞一词的论文作者卡普兰Caplan呼吁更名为药用信号细胞^[14-15]。还有些学者称其为间充质基质细胞,虽然名字不应该被认为是科学进步的障碍,但这些细胞临床效果的潜在预期可能会阻碍骨髓间充质干细胞在再生医学领域的作用^[16]。

表1 间充质干细胞的表面分子表达

阳性 ≥ 95%(+)	阴性 ≤ 2%(+)
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 或 CD11b
	CD79a 或 CD19
	HLA-DR

2.3 骨髓间充质干细胞的分离培养 骨髓间充质干细胞是一种很有前途的细胞,体外可分化成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等^[17],其数量占骨髓单核细胞的0.001%-0.01%,这一比例会随着年龄的增长而降低^[18],如何高效的分离骨髓间充质干细胞是未来组织工程发展进步的前提,但直到目前为止,还没有唯一的标志物可以对其进行识别和分离^[19]。骨髓间充质干细胞分离培养的方法有全骨髓贴壁法、密度梯度离心法、流式细胞仪分选法、免疫磁珠分选法、膜过滤方法及膜迁移法等^[19]。流式细胞仪分选法和免疫磁珠分选法虽然能够分离出高纯度的骨髓间充质干细胞,但由于操作复杂、价格比较昂贵同时对细胞损伤较大,因此很多研究小组不

把这2种方法作为首选。全骨髓贴壁法和密度梯度离心法虽然分离出骨髓间充质干细胞纯度不如以上2种方法,但操作简单、经济,是目前较为常用的分离方法,其中密度梯度离心法主要分为Ficoll^[20]、Percoll^[21]、Lymphoprep等离心法^[22]。2016年Meppelink等^[17]采用综合离心技术运用BMC装置在90 s内集中了骨髓,使单核细胞的产量提高了10倍,与Ficoll离心法相比,细胞保存率提高了2倍,这是一种既经济、高效又方便在手术室内使用的新型分离方法,将来可以为组织工程的发展打下基础。还有些学者通过适当延长细胞黏附间隔和缺氧培养的差异黏附性分离小鼠骨髓间充质干细胞,实现了一种简单易行、成本低廉的分离方法^[23]。总之,骨髓间充质干细胞的分离培养还没有统一的标准,未来需要研究出更加完善的体外分离培养技术,使骨髓间充质干细胞更加高效广泛的应用于临床治疗^[24]。

2.4 骨髓间充质干细胞定向分化为骨细胞机制 骨髓间充质干细胞的成骨分化是一个复杂的过程,受物理、化学及生物等因素的影响,由多种调控因子和蛋白质共同调控^[25]。首先,骨祖细胞分化为前成骨细胞,然后形成成熟的成骨细胞,最后成骨细胞矿化在细胞外基质中并成为成熟的骨细胞^[26]。因此,研究相关诱导因子和信号通路对于骨种植体、骨替代材料、骨再生细胞支架的发展至关重要^[27]。目前,骨发育过程中重要信号通路的参与,已被各种研究证实。下面将阐述一些重要信号通路在骨折愈合修复中的作用,如Wnt/ β -catenin信号通路、Notch信号通路、BMP/TGF- β 通路、PI3K/Akt/mTOR通路等。

2.4.1 Wnt/ β -catenin信号通路 Wnt蛋白是分泌分子家族的成员,其与七次跨膜卷曲蛋白(FZD)受体结合,导致通路的中心角色 β -catenin在下游被激活^[28]。Wnt信号被认为参与了骨的整个愈合过程,这种信号在细胞增殖、分化、自我更新和细胞命运的决定中起着重要作用^[29]。更重要的是,Wnt信号通路参与促进成骨细胞生成和成骨分化,从而增强成骨质量。另一方面,Wnt信号抑制剂失活突变也会导致骨量增加。敲除编码可溶性FZD受体蛋白的基因,即Wnt通路的拮抗剂,在小鼠模型中会导致骨小梁矿物质的密度增高。据报道,在骨折愈合模型中,Wnt/ β -catenin信号在骨折修复的不同阶段发挥的作用仍具有争议。如在骨折愈合早期,无论是抑制还是激活Wnt通路,都会抑制骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。后期Wnt通路会积极促进骨髓间充质干细胞成骨细胞分化^[30]。

2.4.2 Notch信号通路 Notch信号通路作为一种高度进化保守的配体受体信号通路,在细胞存活、增殖及分化中发挥着重要的作用机制^[31-32],Notch信号通路在Notch受体(Notch 1-4)与其配体相互作用后被激活。配体结合后,ADAM-10或-17和 γ -分泌酶水解切割Notch受体,在细胞内被释放,然后转移到细胞核中以激活靶

基因^[31]。Notch信号通路是另一种对成骨细胞具有直接骨诱导作用的潜在途径之一。已有研究证明Notch-2受体特别是Jag-1信号通路参与骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。用Jag-1处理骨髓间充质干细胞会导致成骨细胞相关基因碱性磷酸酶和骨唾液蛋白表达增加,从而诱导成骨细胞生成。此外,还证明了Jag-1与生物材料结合有助于促进成骨细胞分化^[33]。从小鼠胚胎肢体骨髓间充质干细胞中移除Notch-2,显著增加了青春期小鼠的小梁骨量。在间充质祖细胞中,转录因子RBPjk(RBPjk是所有典型Notch信号的中介)缺失会导致显著的高骨质量表型,其特征是成骨细胞数量增加及骨髓间充质干细胞池减少。然而,单个Notch受体的作用及其下游信号机制尚未阐明^[34-35]。

2.4.3 骨形态发生蛋白/转化生长因子 β 通路 骨形态发生蛋白作为多功能旁分泌生长因子属于转化生长因子 β 家族,在成骨分化过程中起着重要作用。骨形态发生蛋白/转化生长因子 β 与骨形态发生蛋白或转化生长因子 β 特异性1型和2型丝氨酸/苏氨酸激酶受体之间的相互作用通过Smad依赖性途径和Smad非依赖性信号传导启动信号级联反应^[36]。体内和体外实验都证明了在骨骼发育开始骨形态发生蛋白/转化生长因子 β 信号通路是不可缺少的重要信号通路^[37]。此外,骨形态发生蛋白信号通路对于成骨的进展和成熟至关重要,这可能取决于作用于Runx2下游的转录因子Osterix。在骨形态发生蛋白中,骨形态发生蛋白2是研究的热点,其临床应用已经帮助了越来越多患者在治疗骨缺损领域实现了骨再生^[38]。

有许多治疗策略对临床治疗骨缺损具有重要意义,这为骨再生开辟了新的途径。最有趣的策略之一是靶向上述分子信号传导途径,以通过增加成骨细胞的数量或促进其成熟来增加骨再生的功效。如PI3K/Akt/mTOR通路、MAPK通路、PDGF信号、IGF信号、FGF通路、钙离子等信号通路在细胞增殖、分化、生长、存活、发育、再生、自我更新和细胞命运的决定中起着重要作用^[25-27]。另外,还有些研究小组认为旁分泌因子在骨缺损部位产生促成骨微环境,在骨再生过程中起着至关重要的作用^[39-41]。总之,深入了解骨再生过程中所涉及的分子信号通路,有助于将新的治疗方法从实验带到临床。

2.5 支架材料 骨修复能力会受到骨感染或周围组织血供不足、全身疾病等多种情况的负面影响^[42]。人们对骨移植物的选择仍然受到很大的限制。支架材料主要分为合成高分子材料和天然高分子材料两大类,合成高分子材料如羟基磷灰石、磷酸三钙、磷酸钙水泥、纳米陶瓷、聚乙乳酸和聚乙醇酸等^[43-51],天然高分子材料如胶原、明胶和壳聚糖等^[52-53],目前生物支架材料研究的热点是将不同的生物材料混合在一起,以制备高性能的复合材料,克服单一组分材料的缺陷,见表2。人们再通过纳米技术、电纺技术、低温技术、固-液相分离技术、

基因工程及3D生物打印技术等制备出具有生物活性、骨传导性、骨诱导性、降解可控性等多孔生物支架^[54-57]。目前研究表明,携带骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子基因的纳米支架材料具有诱导基因表达的功能,并能使携带基因在体内外可控性表达,进而加速修复临界大小的颅骨缺损的能力^[58-59]。另外,目前3D打印生物支架和可注射性生物支架都是研究的热点。

表2 两大生物材料的优缺点

支架材料	优点	缺点
天然高分子材料	亲水特性强,具有生物相容性、免疫调节活性、可塑性和细胞趋化性,促进细胞的黏附和诱导分化,毒性弱	缺乏一定的机械强度,缺乏一定的骨传导性,降解速率较快
合成高分子材料	机械性能好,骨传导性强,生物相容性和生物降解性能优良	亲水性能较差,吸附率较低,塑形能力较弱,炎症反应发生率较高

2.5.1 3D生物打印支架 3D生物打印技术用于精确分配细胞负载的生物材料,用于构建复杂的三维功能活体组织或人造器官^[60]。传统的立体平版印刷术(SLA)是骨骼工程中最早的3D打印技术之一。立体平版印刷术的高制造精度允许在微米级和纳米级上生产结构,使用的许多光固化系统表现出差的生物降解速率和生物相容性^[61]。生物打印技术和骨工程油墨材料的发展是骨缺损修复三维支架研究的重点^[62]。到目前为止,已经开发出了几种生物打印方法,包括基于喷墨的生物打印^[63],基于挤压的生物打印^[64],以及基于激光的生物打印^[65]。对于骨骼工程来说,3D生物打印的主要优势在于它可以制造细胞分布可控的支架^[66]。目前很多学者正在运用3D打印技术改善支架的机械性能和生物相容性^[43],促进骨髓间充质干细胞黏附、生长和分化,促进血管向内生长、骨组织形成,同时还可以改进生物降解、生物活性。Yan等^[67]通过表面氨解和逐层组装技术来控制去氧胺的释放,促进了成骨相关基因的表达,促进缺损部位骨再生,在节段性骨缺损的治疗中具有巨大的临床应用潜力。目前,具有快速血管化能力和骨诱导生物活性的3D生物打印支架将是临床上理想的骨替代物。

2.5.2 可注射生物支架 可注射生物支架可以更好地模拟天然骨的结构和力学性能,同时精确匹配缺陷的骨缺损形状。通过多种生物活性物质对支架进行修饰,利用热敏聚合物纳米水凝胶与骨基质蛋白2发生双重作用,实现骨基质蛋白2的持续递送和可注射骨再生^[68]。Chen等^[69]打破了传统的步骤多、耗时长久的固定化策略,通过化学修饰技术制备了壳聚糖-P24/羟基磷灰石(CS-P24/HA)控释支架,其支架复合骨髓间充质干细胞能稳定释放P24长达90 d,CS-P24/HA可诱导骨髓间充质干细胞的体外和体内成骨分化,进而提高组织工程骨支架的骨修复效果。近年来,被称为新型脂质体的类固

醇可以诱导骨髓间充质干细胞成骨分化,促进骨再生,未来可以将药物封装到功能性非磷脂双层结构中,以提高现有治疗药物的临床疗效,这对治疗感染性骨缺损具有重大的意义^[70]。

2.6 周围组织 骨缺损的修复不仅仅是骨髓间充质干细胞和支架材料,周围组织及诱导环境的支持也是必不可少的^[71]。目前,很多学者在骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损的研究中更加注重新生血管、新生骨膜及细胞外基质的研究,下面就分别从新生血管、新生骨膜和细胞外基质分别进行总结介绍。

2.6.1 新生血管 新生血管在骨缺损修复过程中起着至关重要的作用,它不仅是营养物质扩散、细胞增殖和新生骨组织生长的营养传递器官,而且在骨缺损修复过程中参与调控细胞和信号分子^[67]。目前正在研究几种赋予3D打印支架具有血管化和成骨诱导特性的方法,利用特异性生长因子刺激新生血管发育成熟,从而促进骨细胞前体成骨分化,加速骨缺损的修复^[72-74]。骨形态发生蛋白2和血管内皮生长因子在骨形成和修复过程中具有协同作用,这一现象被称为成骨-血管生成耦联,利用高效的基因激活支架模拟骨-血管生成耦联,从而加速骨再生^[58]。因此,合成生物材料耦合成骨及新生血管的研究受到越来越多的关注。

2.6.2 新生骨膜 新生骨膜在骨缺损修复重建中起着不可或缺的作用,电纺纤维片模拟细胞外基质,其多功能性以及高表面积纤维基质对细胞附着、载药和传递的益处使得能够构建灵活的组织膜,可以适合任何大小和形状的骨骼。为了克服纳米纤维片在细胞附着和诱导血管向内生长方面的局限性,进一步采用聚己内酯、胶原蛋白、纳米羟基磷灰石复合电纺纳米纤维片植入骨髓间充质干细胞,自底向上逐层构建仿生组织工程骨膜,用于骨缺损修复和重建,以显著提高骨缺损修复的成功率。尽管在小动物模型中取得了不同程度的成功,但目前还没有关于依赖骨膜修复的完整再现的临床报道。供体细胞的命运和宿主细胞对移植修复的贡献尚不清楚。如何控制移植表面的骨形成,以及如何将生物活性分子和相关细胞群结合起来诱导骨形成和血管再生,这仍然是一个挑战^[75-76]。

2.6.3 细胞外基质 细胞外基质是由许多细胞分泌的生长因子和组织特异性微环境相似的基本结构组成,是一个复杂的网络,可以提高细胞的增殖和存活率^[77]。细胞外基质中蕴藏着许多生物活性元素(如Ca、La、Li、Mg、Sr)^[78-80]、功能性分子和蛋白质(例如I型胶原、纤连蛋白和糖胺聚糖)可被细胞内化,激活细胞内信号耦联,从而增强骨髓间充质干细胞增殖、分化、矿化及血管新生^[81-82]。根据相关研究,人们发现骨髓间充质干细胞在体外增殖和分化过程中不断分泌细胞外基质并释放出许多生物活性物质,细胞外基质可以促进血管形成

和骨缺损的修复^[83-84]。还有些学者发现水凝胶作为三维支架,为细胞增殖、分化和功能维持提供了合适的微环境,使外源性细胞生长并分泌新的细胞外基质,从而加速骨缺损的重建^[85]。另外,一些生物活性植物化学物质(如槲皮素等)、缺氧微环境、低频脉冲电磁场都能促进骨髓间充质干细胞成骨分化和骨缺损修复^[86-88]。

2.7 骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损临床报道 临床研究表明,使用自体骨髓间充质干细胞结合支架材料治疗骨缺损是可行、安全的^[89-90]。在获得确凿证据更好地运用于临床之前,系统地重复实验是必要的。大量动物研究提供了使用骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损这一概念的证据,并进行了一些临床研究来评估这种方法在临床中的安全性和有效性。人类首次使用骨髓间充质干细胞的临床试验是在2001年Quarto等在《新英格兰医学杂志》中的报道,他们使用基于骨髓间充质干细胞的组织工程方法成功治疗了3例大骨缺损患者。每例患者均从骨髓中分离骨髓间充质干细胞,体外扩增。将这些细胞放置在大孔羟基磷灰石支架上,并将其植入病变部位。术后回访,3例患者均恢复肢体功能^[91]。Hibi等^[92]将复合自体骨髓间充质干细胞和富血小板血浆的成骨材料,作为自体骨移植的替代物,成功修复了牙槽裂骨缺损。运用骨髓间充质干细胞复合支架材料进行有效修复鼻窦、颌骨骨缺损等都所有报道^[93-94]。最新文献报道修复上颌囊性骨缺损也取得了理想效果^[95]。目前,有关骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损的大量临床前数据已经积累,因此骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损正在进入一个新的发展时代,将重点从最初的可行性研究转移到优化治疗效果,从而实现更一致的临床效力。

3 讨论与展望 Discussion and prospects

综上所述,文章回顾了骨缺损的治疗现状和骨髓间充质干细胞的发展史,讨论了骨髓间充质干细胞的分离培养及其成骨机制。最后,详细阐述了骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损的最新进展及临床报道,进而了解所涉及的各种支架材料及血管、骨膜和细胞外基质在整个骨组织工程中的重要作用。最后得出结论:骨髓间充质干细胞是治疗骨缺损的理想种子细胞,其复合支架材料能够促进骨缺损的修复。目前,骨髓间充质干细胞复合支架材料治疗骨缺损正处于新的发展时代,是一种很有前景的骨缺损治疗方法。面对未来,骨髓间充质干细胞高效精准分化为骨细胞及其分子机制、更加安全有效的支架材料探索、3D生物打印技术在高分辨率细胞沉积、细胞分布受控、血管化和复杂细胞外基质支配等方面仍存在技术挑战。不久的将来,经过不断地探索和努力,骨髓间充质干细胞复合支架材料在治疗骨缺损方面一定会取得更大的进展。

作者贡献: 第一作者进行文章构思、收集资料并成文, 通讯作者审校。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81572205)”“山东省自然科学基金(ZR2014CQ042)”“济宁医学院教师扶持基金(JYFC2018FKJ048)”“济宁医学院贺林院士基金(JYHL2018FMS13)”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。

写作指南: 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

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] Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2937-2948.
- [2] Liu Z, Yuan X, Fernandes G, et al. The combination of nano-calcium sulfate/platelet rich plasma gel scaffold with BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat critical-sized calvarial defects. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):122.
- [3] Chu W, Gan Y, Zhuang Y, et al. Mesenchymal stem cells and porous β -tricalcium phosphate composites prepared through stem cell screen-enrich-combine(-biomaterials) circulating system for the repair of critical size bone defects in goat tibia. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):157.
- [4] Kim DK, Kim JI, Hwang TI, et al. Bioengineered Osteoinductive Broussonetia kazinoki/Silk Fibroin Composite Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(2):1384-1394.
- [5] 袁昊龙, 王志刚, 张镡. Masquelet技术重建骨缺损研究进展[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(21):1330-1336.
- [6] 胡汉, 田竞, 周大鹏. 成人长骨大范围骨缺损治疗的研究进展[J]. 中国临床实用医学, 2016, 7(6):102-104.
- [7] 戚晓阳, 邱旭升, 施鸿飞, 等. 大段骨缺损的治疗进展[J]. 实用骨科杂志, 2017, 23(8):715-719.
- [8] Nauth A, Schemitsch E, Norris B, et al. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment. *J Orthop Trauma.* 2018;32 Suppl 1:S7-S11.
- [9] Mauffrey C, Barlow BT, Smith W. Management of segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23(3):143-153.
- [10] Whitely M, Cereceres S, Dhavalikar P, et al. Improved in situ seeding of 3D printed scaffolds using cell-releasing hydrogels. *Biomaterials.* 2018;185:194-204.
- [11] Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015;16(3):239-253.
- [12] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-650.
- [13] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
- [14] Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(6):1445-1451.
- [15] Caplan AI. What's in a name? *Tissue Eng Part A.* 2010;16(8):2415-2417.
- [16] De Windt TS, Vonk LA, Saris DBF. Response to: Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(8):1747-1748.
- [17] Meppelink AM, Wang XH, Bradica G, et al. Rapid isolation of bone marrow mesenchymal stromal cells using integrated centrifuge-based technology. *Cytotherapy.* 2016;18(6):729-739.
- [18] Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(4):412.
- [19] Nicodemou A, Danisovic L. Mesenchymal stromal/stem cell separation methods: concise review. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(4):443-460.
- [20] Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int.* 2008;32(9):1116-1125.
- [21] Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 2002;20(3):249-258.
- [22] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-1209.
- [23] Hu Y, Lou B, Wu X, et al. Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:6704583.
- [24] Bara JJ, Richards RG, Alini M, et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells.* 2014;32(7):1713-1723.
- [25] Liu H, Wei LK, Jian XF, et al. Isolation, culture and induced differentiation of rabbit mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):3715-3724.
- [26] Huang C, Geng J, Jiang S. MicroRNAs in regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2017;368(2):229-238.
- [27] Yang H, Guo Y, Wang D, et al. Effect of TAK1 on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by regulating BMP-2 via Wnt/ β -catenin and MAPK pathway. *Organogenesis.* 2018;14(1):36-45.
- [28] Gruber J, Yee Z, Tolwinski NS. Developmental Drift and the Role of Wnt Signaling in Aging. *Cancers (Basel).* 2016;8(8):E73.
- [29] Shi J, Chi S, Xue J, et al. Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:9392132.
- [30] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1202-1209.
- [31] Majidinia M, Alizadeh E, Yousefi B, et al. Downregulation of Notch Signaling Pathway as an Effective Chemosensitizer for Cancer Treatment. *Drug Res (Stuttg).* 2016;66(11):571-579.

- [32] Majidinia M, Alizadeh E, Yousefi B, et al. Co-inhibition of Notch and NF- κ B Signaling Pathway Decreases Proliferation through Downregulating I κ B- α and Hes-1 Expression in Human Ovarian Cancer OVCAR-3 Cells. *Drug Res (Stuttg)*. 2017;67(1):13-19.
- [33] Dishowitz MI, Zhu F, Sundararaghavan HG, et al. Jagged1 immobilization to an osteoconductive polymer activates the Notch signaling pathway and induces osteogenesis. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(5):1558-1567.
- [34] Tu X, Chen J, Lim J, et al. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002577.
- [35] Wang C, Inzana JA, Mirando AJ, et al. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1471-1481.
- [36] Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*. 2014;93(4):335-345.
- [37] Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med*. 2009;15(9):417-429.
- [38] Schmidt-Bleek K, Willie BM, Schwabe P, et al. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:141-148.
- [39] Li Y, Jin D, Xie W, et al. Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes: A Possible Therapeutic Strategy for Osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(5):362-368.
- [40] Ogata K, Katagiri W, Hibi H. Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis in vitro. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1979-1988.
- [41] Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:236.
- [42] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011;9:66.
- [43] Siddiqui HA, Pickering KL, Mucalo MR. A Review on the Use of Hydroxyapatite-Carbonaceous Structure Composites in Bone Replacement Materials for Strengthening Purposes. *Materials (Basel)*. 2018;11(10): E1813.
- [44] Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, et al. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143-162.
- [45] Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017;2(4):224-247.
- [46] Dhivya S, Keshav Narayan A, Logith Kumar R, et al. Proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on scaffolds containing chitosan, calcium polyphosphate and pigeonite for bone tissue engineering. *Cell Prolif*. 2018;51(1): e12408.
- [47] Ke X, Zhuang C, Yang X, et al. Enhancing the Osteogenic Capability of Core-Shell Bilayered Bioceramic Microspheres with Adjustable Biodegradation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(29):24497-24510.
- [48] Zhu Y, Zhang K, Zhao R, et al. Bone regeneration with micro/nano hybrid-structured biphasic calcium phosphate bioceramics at segmental bone defect and the induced immunoregulation of MSCs. *Biomaterials*. 2017;147:133-144.
- [49] Wang D, Lin Y, Chen L, et al. Guided bone regeneration using a bone tissue engineering complex consisting of a poly-dl-lactide membrane and bone mesenchymal stem cells. *Oncotarget*. 2017;9(23):16380-16388.
- [50] Kim IG, Hwang MP, Du P, et al. Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing. *Biomaterials*. 2015;50:75-86.
- [51] 刘相杰,宋科官.生物支架材料及间充质干细胞在骨组织工程中的研究与应用[J].*中国组织工程研究*,2018,22(10):1618-1624.
- [52] De Melo Pereira D, Habibovic P. Biomaterialization-Inspired Material Design for Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(22):e1800700.
- [53] Kozusko SD, Riccio C, Goulart M, et al. Chitosan as a Bone Scaffold Biomaterial. *J Craniofac Surg*. 2018;29(7):1788-1793.
- [54] Wang Y, Wang K, Li X, et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174870.
- [55] Kutikov AB, Skelly JD, Ayers DC, et al. Templated repair of long bone defects in rats with bioactive spiral-wrapped electrospun amphiphilic polymer/hydroxyapatite scaffolds. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(8):4890-4901.
- [56] Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(13):4026-4034.
- [57] Goh YQ, Ooi CP. Fabrication and characterization of porous poly(L-lactide) scaffolds using solid-liquid phase separation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(6):2445-2452.
- [58] Rafferty RM, Mencía Castaño I, Chen G, et al. Translating the role of osteogenic-angiogenic coupling in bone formation: Highly efficient chitosan-pDNA activated scaffolds can accelerate bone regeneration in critical-sized bone defects. *Biomaterials*. 2017;149:116-127.
- [59] Rafferty RM, Mencía-Castaño I, Sperger S, et al. Delivery of the improved BMP-2-Advanced plasmid DNA within a gene-activated scaffold accelerates mesenchymal stem cell osteogenesis and critical size defect repair. *J Control Release*. 2018;283:20-31.
- [60] Mandrycky C, Wang Z, Kim K, et al. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv*. 2016;34(4):422-434.
- [61] Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-6130.
- [62] Zhang L, Yang G, Johnson BN, et al. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2019;84:16-33.
- [63] Chou DT, Wells D, Hong D, et al. Novel processing of iron-manganese alloy-based biomaterials by inkjet 3-D printing. *Acta Biomater*. 2013;9(10):8593-8603.
- [64] Trachtenberg JE, Placone JK, Smith BT, et al. Extrusion-based 3D printing of poly(propylene fumarate) scaffolds with hydroxyapatite gradients. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(6):532-554.
- [65] Gudapati H, Yan J, Huang Y, et al. Alginate gelation-induced cell death during laser-assisted cell printing. *Biofabrication*. 2014;6(3):035022.
- [66] Ozbolat IT, Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2013;60(3):691-699.

- [67] Yan Y, Chen H, Zhang H, et al. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials*. 2019;190-191:97-110.
- [68] Vo TN, Shah SR, Lu S, et al. Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2016;83:1-11.
- [69] Chen Y, Liu X, Liu R, et al. Zero-order controlled release of BMP2-derived peptide P24 from the chitosan scaffold by chemical grafting modification technique for promotion of osteogenesis in vitro and enhancement of bone repair in vivo. *Theranostics*. 2017;7(5):1072-1087.
- [70] Cui ZK, Kim S, Baljon JJ, et al. Design and Characterization of a Therapeutic Non-phospholipid Liposomal Nanocarrier with Osteoinductive Characteristics To Promote Bone Formation. *ACS Nano*. 2017;11(8):8055-8063.
- [71] Killington K, Mafi R, Mafi P, et al. A Systematic Review of Clinical Studies Investigating Mesenchymal Stem Cells for Fracture Non-Union and Bone Defects. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(4):284-291.
- [72] Donneys A, Nelson NS, Page EE, et al. Targeting angiogenesis as a therapeutic means to reinforce osteocyte survival and prevent nonunions in the aftermath of radiotherapy. *Head Neck*. 2015;37(9):1261-1267.
- [73] Xu WL, Ong HS, Zhu Y, et al. In Situ Release of VEGF Enhances Osteogenesis in 3D Porous Scaffolds Engineered with Osterix-Modified Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(9-10):445-457.
- [74] Yu WL, Sun TW, Qi C, et al. Enhanced osteogenesis and angiogenesis by mesoporous hydroxyapatite microspheres-derived simvastatin sustained release system for superior bone regeneration. *Sci Rep*. 2017;7:44129.
- [75] Wang T, Zhai Y, Nuzzo M, et al. Layer-by-layer nanofiber-enabled engineering of biomimetic periosteum for bone repair and reconstruction. *Biomaterials*. 2018;182:279-288.
- [76] Ko E, Lee JS, Kim H, et al. Electrospun Silk Fibroin Nanofibrous Scaffolds with Two-Stage Hydroxyapatite Functionalization for Enhancing the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(9):7614-7625.
- [77] Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326(5957):1216-1219.
- [78] Hu H, Zhao P, Liu J, et al. Lanthanum phosphate/chitosan scaffolds enhance cytocompatibility and osteogenic efficiency via the Wnt/ β -catenin pathway. *J Nanobiotechnology*. 2018;16(1):98.
- [79] A A, Menon D, T B S, et al. Bioinspired Composite Matrix Containing Hydroxyapatite-Silica Core-Shell Nanorods for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(32):26707-26718.
- [80] Aquino-Martínez R, Angelo AP, Pujol FV. Et al. Calcium-containing scaffolds induce bone regeneration by regulating mesenchymal stem cell differentiation and migration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):265.
- [81] Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):462-484.
- [82] Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, et al. Cultured cell-derived extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(36):9658-9666.
- [83] Kim B, Ventura R, Lee BT. Functionalization of porous BCP scaffold by generating cell-derived extracellular matrix from rat bone marrow stem cells culture for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):e1256-e1267.
- [84] Harvestine JN, Vollmer NL, Ho SS, et al. Extracellular Matrix-Coated Composite Scaffolds Promote Mesenchymal Stem Cell Persistence and Osteogenesis. *Biomacromolecules*. 2016;17(11):3524-3531.
- [85] Yan Y, Cheng B, Chen K, et al. Enhanced Osteogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by a Functionalized Silk Fibroin Hydrogel for Bone Defect Repair. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(3):e1801043.
- [86] Ho CY, Sanghani A, Hua J, et al. Mesenchymal stem cells with increased stromal cell-derived factor 1 expression enhanced fracture healing. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(3-4):594-602.
- [87] Song JE, Tripathy N, Lee DH, et al. Quercetin Inlaid Silk Fibroin/Hydroxyapatite Scaffold Promotes Enhanced Osteogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(39):32955-32964.
- [88] Wu S, Yu Q, Sun Y, et al. Synergistic effect of a LPEMF and SPIONs on BMMSC proliferation, directional migration, and osteoblastogenesis. *Am J Transl Res*. 2018;10(5):1431-1443.
- [89] Šponer P, Filip S, Kučera T, et al. Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2076061.
- [90] Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):213.
- [91] Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001;344(5):385-386.
- [92] Hibi H, Yamada Y, Ueda M, et al. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(6):551-555.
- [93] Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, et al. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(2):203-209.
- [94] Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, et al. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*. 2008;29(21):3053-3061.
- [95] Redondo LM, García V, Peral B, et al. Repair of maxillary cystic bone defects with mesenchymal stem cells seeded on a cross-linked serum scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(2):222-229.