

· 论 著 ·

BMP-2 及 VEGF 双基因骨髓干细胞复合磷酸钙支架 生物相容性的体外实验研究*

刘云龙, 李 奇[△], 林荔军, 林昭伟, 帅 明

(南方医科大学珠江医院骨科中心, 广州 510280)

摘要:目的 制备 BMP-2 及 VEGF 双基因骨髓干细胞复合磷酸钙支架, 探讨所制备支架材料的生物相容性。方法 以磷酸钙粉为原料制备多孔磷酸钙支架材料(CPC), 对所得支架材料采用双基因转染的鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)复合共制备成双基因修饰磷酸钙支架材料, 采用扫描电子显微镜及万能测试机对材料的表征及物理性能进行评价; 复合共培养 2 周后计算细胞在支架材料上的黏附率, 利用倒置相差显微镜及扫描电镜下观察细胞在材料内的黏附和生长情况, 分别采用 MTT 法、碱性磷酸酶活性测定(ALP)及茜素红染色检测 MSCs 在支架材料上的增殖、分化及矿化情况。结果 制备的双基因修饰磷酸钙支架材料具有良好孔隙结构和一定强度; 双基因转染的 MSCs 在支架表面附着良好, 细胞增殖测定、细胞 ALP 及茜素红染色检测显示该材料对 MSCs 生长和功能表达未见明显抑制作用, 生物相容性良好。结论 双基因修饰磷酸钙支架材料具有良好孔隙结构和较好力学强度; 双基因转染的 MSCs 可以在其上进行良好的黏附、生长、增殖、分化以及矿化, 具有良好的生物相容性。

关键词: 骨形态发生蛋白质类; 血管内皮生长因子类; 骨组织工程; 磷酸钙人工骨; 材料试验

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2060-04

An biocompatibility study on bone regeneration with BMP-2 and VEGF transfected mesenchymal stem cells seeded on calcium phosphate cement*

Liu Yunlong, Li Qi[△], Lin Lijun, Lin Zhaowei, Shuai Ming

(Department of Orthopaedic Surgery, Zhujiang Hospital of South Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China)

Abstract: **Objective** To investigate the preparation and characterization of the calcium phosphate loaded MSCs with gene transfection of BMP-2 and VEGF composite scaffold, and to investigate the MSCs with two gene transfection biocompatibility of the composite scaffold. **Methods** Porous calcium phosphate scaffold was prepared by using calcium phosphate powder with directional crystal template method, the calcium phosphate loaded MSCs with two gene transfection composite scaffold was prepared by using the porous calcium phosphate scaffold. The crystalline phase of the obtained nacre nanoparticles was analyzed with morphology of the nacre nanoparticles was examined by TEM; After two weeks of MSCs with two gene transfection cultured on porous calcium phosphate scaffold, MSCs morphology was observed by inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope, MTT assay and ALP activity test were used to evaluate the MSCs abilities of proliferation and osteogenetic-differentiation respectively. The amount and area of calcium nodules were observed by alizarin red staining. **Results** The calcium phosphate composite scaffold loaded MSCs with two gene transfection possessed porous structure and satisfying compressive strength; the MSCs with two gene transfection adhered and grew well on the surface of the scaffold, MTT detection, expression of the ALP and staining of alizarin red showed that the differentiation and minerlization of MSCs with two gene transfection was regular, the composite scaffold is non-cytotoxic biological materials which has good biocompatibility. **Conclusion** Calcium phosphate loaded MSCs with two gene transfection has an appropriate structure, suitable compressive strength as a tissue engineering scaffold materials. 2. Calcium phosphate loaded MSCs with two gene transfection is non-cytotoxic biological materials, which has good biocompatibility, and the differentiation and minerlization of MSCs with gene transfection of BMP-2 and VEGF is regular. The composite scaffold met the needs of bone tissue engineering.

Key words: bone morphogenetic proteins; vascular endothelial growth factors; bone tissue engineering; CPC scaffold; materials testing

骨与关节创伤、肿瘤及关节翻修术等原因所致的骨缺损是当前骨外科常见的问题之一, 应用组织工程方法构建人工骨修复材料为骨缺损的修复提供了方向。磷酸钙人工骨因良好的相容性、可被骨组织完全降解而成为组织工程学方法修复骨缺损支架材料的研究热点^[1]。成骨因子 BMP-2 和成血管因子

VEGF 在骨再生中都发挥着重要作用, 二者联合应用能促进新骨形成和骨缺损周围组织的侧支循环的建立, 能放大各自单一作用效应联合重建骨与血供来加速骨愈合。利用基因治疗策略将双基因 BMP-2 和 VEGF 转染至骨髓间充质干细胞(MSCs), 通过与支架材料复合构建血管化组织工程骨, 可在局

* 基金项目: 广州市科技计划基金资助项目(2011J520000)。作者简介: 刘云龙(1985~), 硕士研究生在读, 主要从事骨关节与创伤的研究。

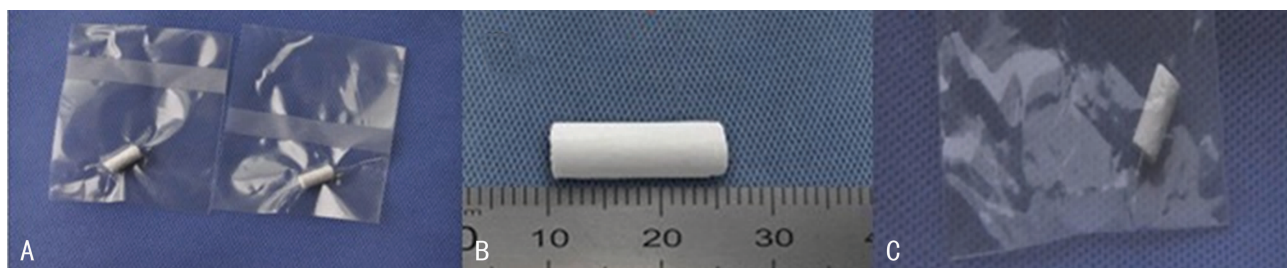
[△] 通讯作者, Tel: 13631325833; E-mail: 1135584334@qq.com。

部持续、稳定地促进组织工程骨体内成骨及血管化,以达到修复骨缺损的目的。为验证 BMP-2 及 VEGF 双基因骨髓干细胞复合磷酸钙支架材料的临床应用安全性,本研究对其进行了生物相容性评价研究。

1 材料与方法

1.1 双基因修饰多孔磷酸钙复合支架的制备 结合作者前期的实验研究结果将磷酸钙粉制备枝状多孔磷酸钙支架材料(Support1,以下简称 S1),成品为直径 5 mm、高 15 mm 的圆柱状多孔磷酸钙支架材料,将该支架材料经蒸馏水清洗 3 次,自然干燥,高温、高压消毒后用 RPM-1640 培养液(含 20% 胎牛血清)无菌条件下预湿 24 h,吸出多余液体,备用。在 24 孔培养板内置入多孔磷酸钙支架,采用分步负压吸附沉淀法制备细

胞-支架复合体,将传代后生长旺盛的双基因转染大鼠 NSCs,经同步化后用 0.25% 的胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整以 1×10^5 /mL 的密度悬浮细胞,微量加样器取 100 μ L 细胞悬液均匀接种于预处理的多孔磷酸钙支架材料中,尽量减少液体自行流出的情况发生;接着放入自制的负压注射器中缓慢负压抽吸,使溶液浸入支架内部,待 10 min 细胞初步黏附,再次接种、负压抽吸,反复 3 次,使细胞充分均匀散布在支架中;于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养箱静置 6 h 以利于细胞充分贴附到材料上。再加培养液继续培养,从而制得 BMP-2 及 VEGF 双基因修饰多孔磷酸钙复合支架(Support2,以下简称 S2)(图 1)。每 2~3 d 换液 1 次,培养 2 周后取出复合体用于检测。



A:前期试验制备的多孔磷酸钙支架 S1;B:BMP-2 及 VEGF 双基因修饰多孔磷酸钙复合支架 S2;C:S2 封装,Co60 消毒(2 种支架均为直径 5 mm、高度 15 mm 的圆柱状支架)。

图 1 多孔磷酸钙支架 S1 及 S2

1.2 研究方法

1.2.1 双基因修饰磷酸钙复合支架的物理及力学性能测试 复合培养 2 周后取出支架材料,4% 的戊二醛固定,丙酮脱水,乙酸异戊酯置换,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下干燥。采用超高分辨率场发射扫描电子显微镜观察表面形貌以及阿基米德法测定孔隙率,并通过万能测试机测试抗压强度。

1.2.2 双基因修饰磷酸钙复合支架的细胞相容性 (1)实验分组:BMP-2 及 VEGF 双基因转染 MSCs 复合多孔磷酸钙支架实验组,单纯 BMP-2 及 VEGF 双基因转染 MSCs 为对照组。(2)双基因转染 MSCs 与磷酸钙支架材料的复合情况:双基因转染的 MSCs 接种于磷酸钙支架材料上进行培养 2、4、8、12 h 后各取出 6 孔,PBS 液冲洗去除未黏附细胞,收集细胞并计算细胞黏附率。细胞黏附率计算公式:黏附率=黏附细胞数/总细胞数 $\times 100\%$;常规培养 1、2、3 d 后将复合细胞共培养支架材料取出后,扫描电镜下观察细胞在材料内的黏附和生长情况。(3)MTT 法检测双基因转染 MSCs 在支架上的增殖:两组分别置于 24 孔板中培养 1、3、7 d 后,每组各取 6 孔进行增殖检测,每孔加入 0.5% MTT 溶液 100 μ L,于培养箱内继续培养 4 h 后吸弃上清液,再加入 DMSO 1 mL,振荡 10 min 使结晶物充分溶解,每孔吸取 150 μ L 液体移入 96 孔培养板中,酶标仪于 490 nm 波长下检测各孔吸光度(OD)值。(4)碱性磷酸酶(ALP)活性检测双基因转染 MSCs 在支架材料上的分化:两组分别置于 24 孔板中培养 1、3、7 d 后吸弃培养液,PBS 液洗涤 2 遍,再加入 0.25% 胰蛋白酶消化 3~5 min,再加 DMEM 终止消化,吸入离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,然后每管滴加 2% Triton X-100 200 μ L,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜裂解细胞,次日反复吹打后,以 1 000 r/min 离心 10 min。每孔取 50 μ L 上

清液按 ALP 检测试剂盒说明操作。(5)茜素红-Tris-HCl 染色检测双基因转染 MSCs 在支架材料上的矿化:两组分别置于 24 孔板中培养,每 3 d 更换 DMEM 诱导液 1 次,连续培养 3 周。倒置相差显微镜下观察细胞钙化情况,如可见白色结节,用 0.1% 茜素红-Tris-HCl 染色 30 min,PBS 液冲洗。倒置相差显微镜下观察原白色结节部位,染色鲜红者即为矿化结节。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行分析处理。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

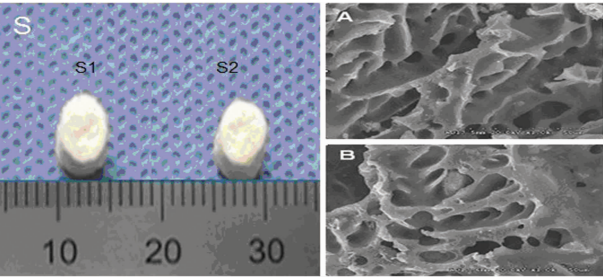
2.1 双基因修饰磷酸钙复合支架的物理及力学性能测试

(1)扫描电镜观察:2 种支架材料表面凹凸不平,孔隙大小多样,类圆形孔居多,大孔内部呈三维网状结构都存在孔洞与孔洞之间的连通,S2 支架材料中的大孔改变不明显,但大孔中有部分小孔却被细胞及分泌的基质所覆盖(图 2A、B);(2)所测得结果按相关公式计算 2 种支架材料的孔径,二者比较差异无统计学意义($P = 0.405$),见图 3;按比重法来测量 2 种支架材料的孔隙率,S2 支架材料孔隙率明显下降,具有统计学意义($P < 0.001$),见图 4。(3)力学性能测试:根据相关公式计算出 2 种支架材料的抗压强度没有显著差异($P = 0.256$),见图 5。

2.2 双基因转染 MSCs 与磷酸钙支架材料的复合情况

MSCs 在支架上复合培养 1、2、3 d 的黏附生长扫描电镜照片(图 6),复合培养 3 d 后细胞大量紧密生长并有伪足相连;MSCs 在支架材料表面的黏附率(图 7),随着时间的延长,细胞黏附率逐渐增大,4 h 与 2 h 相比差异无统计学意义($P = 0.072$);8、12 h 分别与之前的时间点相比,差异有统计学意义($P < 0.001$)。说明 BMP-2 及 VEGF 双基因转染 MSCs 在支

架材料表面上黏附能力良好且 4 h 后细胞黏附率增长迅速。



A:S1 支架扫描电镜观察;B:S2 支架扫描电镜观察。

图 2 扫描电镜下观察 2 种支架材料图

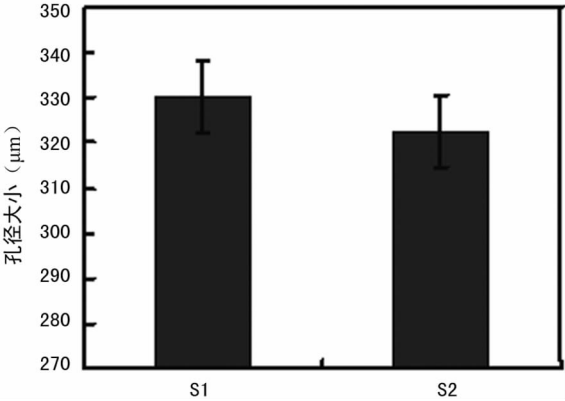


图 3 2 种支架材料孔径大小比较

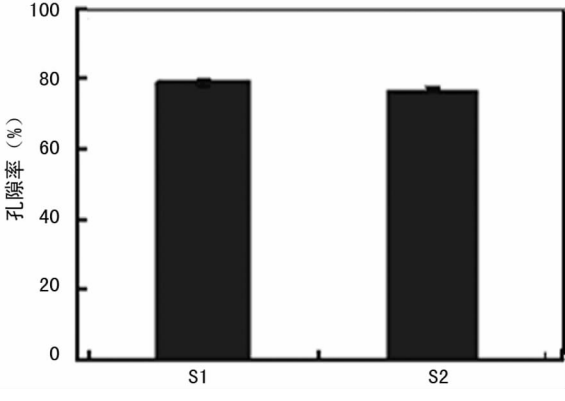


图 4 2 种支架材料孔隙率比较

2.3 MTT 法检测双基因转染 MSCs 在支架上的增殖情况
MTT 检测 MSCs 在支架材料中生长良好,OD 值随时间延长而增大,采用 *t* 检验分析发现:在培养 1 d ($P=0.179$) 和 3 d ($P=0.114$) 时两组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);培养 7 d 时 ($P<0.001$) OD 值对照组高于实验组,两组间比较差异

有统计学意义 ($P<0.001$),说明随着细胞数目的增多,细胞的接触抑制以及支架材料由于孔径有限限制了 MSCs 的增殖 (表 1)。

2.4 ALP 活性检测双基因转染 MSCs 在支架材料上的分化情况
随着培养时间的延长,复合于支架材料的 MSCs 碱性磷酸酶的活性逐渐升高。采用 *t* 检验分析发现:培养 1 d ($P=0.083$) 时两组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);培养 3 d ($P=0.002$)、7 d ($P<0.001$) 时, MSCs 的 ALP 的活性实验组明显高于对照组,两组间比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$),说明支架材料能促进 MSCs 的成骨分化 (表 2)。

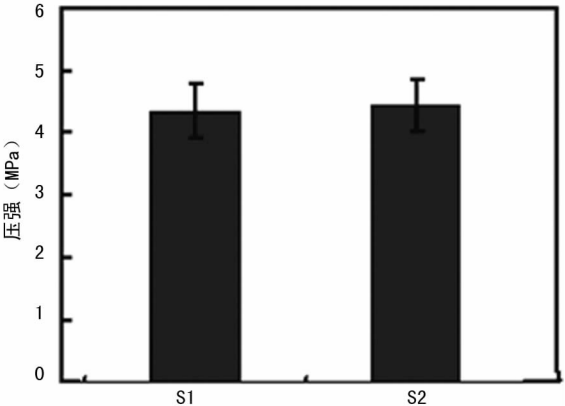


图 5 2 种支架材料抗压强度的比较

表 1 支架材料对 MSCs 的增殖能力影响 (OD 值, $n=6$)

组别	1 d	3 d	7 d
实验组	0.41±0.01▲	0.61±0.08▲	0.70±0.05#
对照组	0.43±0.05	0.69±0.13	0.91±0.04

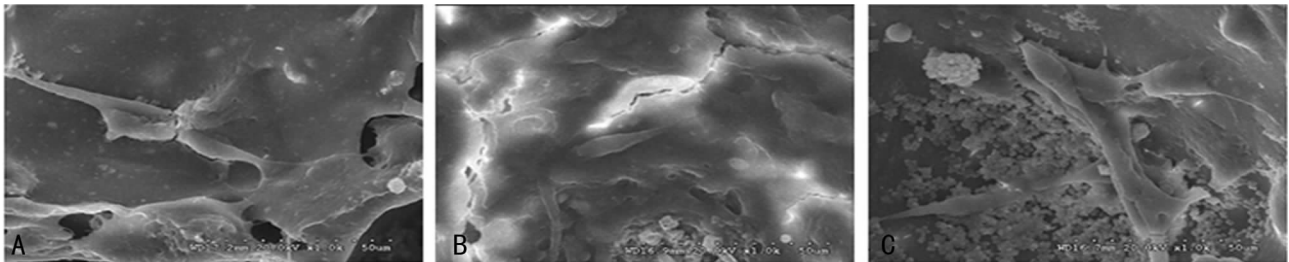
▲ $P>0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$ 与对照组比较。

表 2 支架材料对 MSCs 的 ALP 活性的影响 ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $n=6$)

组别	1 d	3 d	7 d
对照组	8.11±0.79▲	9.72±1.05#	10.80±3.11#
实验组	8.80±0.81	12.05±1.13	46.25±3.04

▲ $P>0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与对照组比较。

2.5 茜素红-Tris-HCl 染色检测双基因转染 MSCs 在支架材料上的矿化情况
培养 3 周后,双基因转染 MSCs 可形成肉眼可见的白色矿化结节,经茜素红染色可见大小不一、形态各异的红色结节 (图 8)。与对照组相比,实验组的矿化结节数目和面积明显增加。



A:复合培养 1 d(×1 000);B:复合培养 2 d(×1 000);C:复合培养 3 d(×1 000)。

图 6 双基因转染的 MSCs 在支架材料上黏附生长的扫描电镜照片

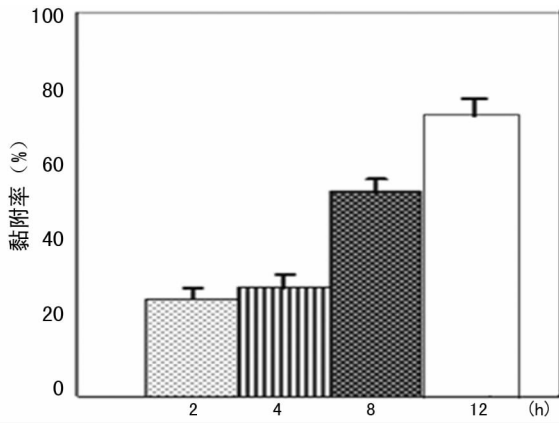
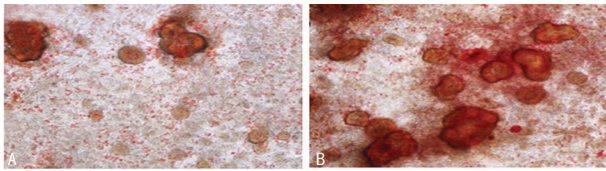


图 7 支架材料中双基因转染的 MSCs 在不同时间点的黏附率



A: 对照组, 培养 3 周($\times 100$); B: 实验组, 培养 3 周($\times 100$)。

图 8 两组 MSCs 矿化结节茜素红·Tris-HCl 染色

3 讨 论

磷酸钙人工骨作为骨缺损组织工程支架材料可为成骨细胞的长入提供支撑结构,有利于细胞的黏附、营养物质的交换,并有利于细胞增殖和分化并向支架内部迁移,为细胞生长提供合适的外部环境,同时,磷酸钙人工骨的三维支架结构还能起到模板作用,引导组织再生和组织结构修复^[2],作为一理想的组织工程支架材料能促进组织再生的化学表面和一定的力学强度^[3-4]。孔隙率及孔隙大小被认为是影响磷酸钙人工骨降解的主要因素^[5],较大的孔隙率有利于增大材料与体液之间的接触面积,有利于细胞及血管的长入,加快支架的降解速度^[6]。Bolgen 等^[3]认为在三维支架材料中多孔之间的联接有利于细胞及血管性组织的长入,并被认为是材料中血管化及营养物质渗入的必要条件^[7-9]。Wei 等^[10]的研究也证实三维立体的材料环境可以促进 MSCs 向成骨细胞进行分化。因此,提高磷酸钙人工骨三维支架内部孔隙之间的联通性,是获得力学强度与降解速度之间的平衡的一可能有效方法^[11]。本研究前期采用定向冰晶模板法提高了三维结构内部的孔隙的联通性,本研究扫描电镜观察可见 CPC 支架材料具有疏松多孔结构,单个孔呈椭圆形、圆形或多边形,不规则,孔与孔之间相互连通,孔壁厚度比较均匀,与天然松质骨微观结构相同,具有良好的可降解性。

生物活性因子在促进骨修复过程中发挥极其重要的作用。BMP 对骨原细胞的分化起决定性作用,是促进成骨的主要因素^[12]。有研究表明 BMP-2 是 BMP 家族成员中作用最强的因子^[13],采用 BMP-2 直接或者通过其他载体局部应用可促进骨的形成已经过实验证实^[14]。同样骨组织工程中骨血管化也是一个关键环节,其作用贯穿于整个移植修复过程,充足的血供在确保种子细胞存活、增殖及分化的同时还有益于新骨的加速形成,从而加快修复骨的缺损。VEGF 作为一种特异性最高的促血管生成因子^[15],在血管生成中的直接和间接的调控作用

已经得到公认。然而,只有解决了转染 BMP-2 及 VEGF 的 MSCs 在材料上的接种问题才能确保该种子细胞成功地在 CPC 支架材料上向成骨细胞分化。为此,本研究采用分步负压吸附沉淀法进行细胞接种,该方法不仅可以使高浓度的细胞悬液均匀进入支架材料内部的空隙中,而且对种子细胞在材料空隙内的贴附和成活也有利。本实验将 BMP-2 及 VEGF 双基因转染的 MSCs 接种到 CPC 支架材料上建立细胞支架材料的三生物活性复合体后,通过扫描电镜观察细胞在材料表面的生长情况,发现细胞在支架材料上贴附、生长良好且生存状态良好;通过 MTT 检测细胞在支架材料上的生长及增殖情况发现 MSCs 细胞在材料上正常的贴壁、增殖和迁移生长,即该材料具有很好的细胞亲和性;通过碱性磷酸酶活性检测和茜素红染色, MSCs 在支架材料上的成骨分化情况发现材料表面的细胞数量随着培养时间的延长逐渐增多且成骨分化良好,其中细胞接种第 7 天后碱性磷酸酶的活性显著高于对照组。染色显示红色矿化结节与对照组相比,实验组在数目和面积上明显增加,即该材料具有很好的成骨诱导及促分化性能;应力分析 BMP-2 及 VEGF 双基因转染 MSCs 复合 CPC 支架材料具有良好的力学性能。

综上所述,本研究通过将 BMP-2 及 VEGF 双基因转染的 MSCs 与具有多微孔立体结构磷酸钙支架材料的体外复合培养进行细胞相容性验证发现:双基因转染的 MSCs 在 CPC 支架材料上不仅可以良好地进行的黏附、生长、增殖和分化,同时还表现出较好的诱导成骨性能。该实验结果为下一步将 BMP-2/VEGF 双基因骨髓干细胞复合磷酸钙人工骨应用于体内骨缺损的修复和检测其促进骨再生奠定了良好的实验基础。

参考文献:

- [1] 王文波,陈中伟,陈统一,等. 自固化磷酸钙人工骨的生物安全性试验研究[J]. 中国生物医学工程学报,2001,11(3):193-199.
- [2] Dai C, Han G, Lu J, et al. Osteogenic evaluation of calcium/magnesium-doped mesoporous silica scaffold with incorporation of rhBMP-2 by synchrotron radiation-based μ CT[J]. Biomaterials, 2011, 33(5): 654-657.
- [3] Bolgen N, Yang Y, Korkusuz P, et al. Three-dimensional ingrowth of bone cells within biodegradable cryogel scaffolds in bioreactors at different regimes[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(10): 1743-1750.
- [4] Li M, Liu X, Liu X, et al. Creation of macroporous calcium phosphate cements as bone substitutes by using genipin-crosslinked gelatin microspheres[J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(4): 925-934.
- [5] Kruyt M, de Bruijn J, Rouwkema J, et al. Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(6): 1081-1088.
- [6] Yoshikawa M, Tsuji N, Shimomura Y, et al. Osteogenesis depending on geometry of porous hydroxyapatite scaffolds[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 83(2): 139-145. (下转第 2066 页)

缩和骨骼改变并存的现象,而且随着畸形时间的延长,骨骼改变更为明显。通过对马蹄内翻足的不同发育阶段的骨骼发育进行分析发现^[12],距骨骨化的改变较为明显。松解软组织挛缩和矫正距骨在三维空间上的选择畸形是治疗的关键之处。0~6 个月的患儿足部相对较为柔软,畸形可以矫正,通过更换石膏,在学步前就可以矫正畸形^[12]。而此年龄的患儿对于 Carroll 手术的耐受性较差,肌腱的延长和缝合较为困难,影响手术的疗效^[13]。7~12 个月患儿尚未负重或刚开始学习走路,足跗骨的形态仍未发生较大改变^[14]。手术矫正畸形后,距骨和踝关节可以较快恢复至正常解剖结构。大于 1~3 岁的患儿已经可以行走,受到负重的影响之后,距骨的旋转畸形加重,骨骼的形态也发生了改变,跟骨向内旋,舟骨被挤压变形,足部的内收内翻位畸形更加严重^[15],保守治疗的效果不如手术治疗的效果。年龄对于不同治疗方案疗效和疗程是有显著影响的。0~6 个月的患儿更适用于 Ponseti 法保守治疗,7~12 个月的患儿适宜用 Carroll 手术治疗。大于 1~3 岁患儿的治疗效果不如 1 岁以内的患儿,但仍应该积极采取手术治疗,可以取得一定的疗效。通过随访发现,年龄对于不同治疗方案的复发率也有一定影响。随访结果表明,Ponseti 法治疗 0~6 个月的患儿复发率较低,Carroll 手术治疗 7~12 个月的患儿复发率较低,1~3 岁的患儿的复发率 2 种治疗方案比较差异无统计学意义,但是均高于其他年龄组。说明 CCF 的治疗最好选择在 1 岁以内进行。

参考文献:

- [1] 姜海. Ponseti 方法治疗儿童先天性马蹄内翻足进展[J]. 中华小儿外科杂志, 2012, 33(6): 464-466.
- [2] 曹东华, 张炫, 林长坤, 等. GLI3 基因在单纯性马蹄内翻足发病机制中的作用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(3): 260-265.
- [3] 赵国平, 唐建东, 吴显培, 等. Ponseti 方法治疗先天性复发性马蹄内翻足疗效[J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31

(12): 928-931.

- [4] 梅海波, 赫荣国, 刘昆, 等. 儿童复发性马蹄内翻足的定位诊断与外科治疗的选择[J]. 中华小儿外科杂志, 2010, 31(9): 683-688.
- [5] 李俊慧. Ponseti、Carroll 疗法治疗小儿马蹄内翻足疗效比较[J]. 中外医疗, 2012, 31(1): 93-94.
- [6] 徐建军, 刘美凤, 赵勇, 等. Ponseti、Carroll 疗法治疗小儿马蹄内翻足疗效对比观察[J]. 山东医药, 2010, 50(1): 73-74.
- [7] 万梓鸣, 李明. 先天性马蹄内翻足治疗进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(8): 991-993.
- [8] 滕水生, 王权发, 娄辉, 等. 6 个月内婴幼儿先天性马蹄内翻足 Ponseti 疗法临床研究[J]. 临床误诊误治, 2012, 25(1): 68-70.
- [9] 杨璇, 刘亚坤, 杜青, 等. 初始治疗年龄对婴幼儿先天性马蹄内翻足 Ponseti 方法疗效的影响[J]. 中华外科杂志, 2011, 49(10): 957-958.
- [10] 滕水生, 王权发, 娄辉, 等. Ponseti 技术治疗婴幼儿先天性马蹄内翻足 62 例[J]. 临床小儿外科杂志, 2012, 11(2): 137-138.
- [11] 王海. 先天性马蹄内翻足的治疗[J]. 四川医学, 2011, 32(9): 1491-1494.
- [12] 刘喜平. 先天性马蹄内翻足影像学评价新进展[J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(9): 701-703.
- [13] 徐向阳, 刘津浩, 朱渊, 等. 高弓马蹄内翻足术后复发与跟骨截骨[J]. 中华骨科杂志, 2009, 29(1): 50-53.
- [14] 杜香平. 先天性马蹄内翻足的基因研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2010, 9(6): 457-459.
- [15] 程建岗, 刘建, 李伟华, 等. 先天性马蹄内翻足致病基因的研究进展[J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 10(4): 429-431.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-02-22)

(上接第 2063 页)

- [7] Heo SJ, Kim SE, Wei J, et al. In vitro and animal study of novel nanoapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite scaffolds fabricated by layer manufacturing process[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(5): 977-989.
- [8] Wei J, Chen F, Shin JW, et al. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite-polycaprolactone composite scaffold[J]. Biomaterials, 2009, 30(6): 1080-1088.
- [9] Scaglione S, Lazzarini E, Ilengo C, et al. A composite material model for improved bone formation[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2010, 14(6): 81-95.
- [10] Wei L, Zhang X, Cai Z, et al. Nano-hydroxyapatite/fibrin glue/recombinant human osteogenic protein-1 artificial bone for repair of bone defect in an animal model[J]. Micro & Nano Letters IET, 2012, 7(5): 602-606.
- [11] 尹苏敏, 李延报, 兰祥辉, 等. 纳米二氧化硅/磷酸钙复合骨水泥的力学强度和水化过程[J]. 硅酸盐学报, 2012, 24

(12): 1577-1581.

- [12] Dean DB, Watson JT, Moed BR, et al. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture[J]. Front Biosci, 2009, 32(14): 2878-2888.
- [13] Seol YJ, Kim KH, Park YJ, et al. Osteogenic effects of bone-morphogenetic-protein-2 plasmid gene transfer[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2008, 49(1): 85-96.
- [14] Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, et al. Micro CT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects[J]. Tissue Eng, 2007, 13(3): 501-512.
- [15] Karis BG, Belmiro C, Cavalcanti E, et al. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair[J]. Brazil J Otorhinolaryngol, 2011, 77(4): 202-205.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-02-22)