

异种骨治疗骨缺损的瓶颈及发展趋势

李保亮¹, 刘雷¹, 赵文博¹, 栾富均², 李沁³

(1.四川大学华西医院骨科, 四川 成都 610041; 2.重庆医科大学附属永川医院, 重庆 402160; 3.四川大学华西医院承办西藏分院, 四川 成都 610041)

【摘要】 异种骨具有来源广泛、价格低廉、制备方法较为简单等优势, 利用其修复骨缺损当前研究热点。单纯异种骨材料修复骨缺损的临床过程较长, 效果差强人意, 主要困扰为置入体内后的成骨和血管化。将细胞及细胞因子与异种骨材料组成重组异种骨, 并通过多种方式促进其血管化可加速其与体内骨融合, 具有达到自体骨修复骨缺损临床效果的发展前景。

【关键词】 修复外科手术; 新生血管化, 病理性; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.12.023

Bottleneck and development trend of bone xenograft for the treatment of bone defect LI Bao-liang, LIU Lei, ZHAO Wen-bo, LUAN Fu-jun, and LI Qin. Department of Orthopaedics, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

ABSTRACT Bone xenograft bone for the treatment of bone defect is one of the current research focus, which has advantages of extensive sources, low cost, simple preparation method. While the process of single bone xenograft bone in repairing bone defect is very long, and the clinical outcome is not satisfactory. The main problems focus on formation of bone and vascularization. Reconstituted bone xenograft combined with cells and xenogenic bone material could promote vascularization and bone fusion in vivo, thus achieve a clinical effect of autogenous bone in repairing bone defect.

KEYWORDS Reconstructive surgical procedures; Neovascularization, pathologic; Review literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(12): 1166-1170 www.zggszz.com

骨移植是临床医生治疗骨不连、骨缺损以及进行关节融合的重要手段。自体骨由于具有骨传导性、骨诱导性、成骨性等优点是骨移植材料的金标准, 但由于其增加患者创伤、加重患者痛苦等促使临床医生寻求替代材料。异种骨作为 20 世纪 50~60 年代兴起的骨移植材料, 具有来源广泛、价格低廉等优点且理化特性与人骨质类似, 具有广阔的发展前景。目前困扰骨科医生的主要问题为怎样使异种骨由死骨变活骨, 从而使其表现出类似自体骨生物力学性能。本文就异种骨免疫学特性、异种骨材料制备及异种骨活化进行深入讨论。

1 异种骨免疫学特性

异种组织免疫原特性与人体组织免疫原特性差异很大, 因此充分掌握异种骨组织免疫学特点是进行异种骨材料研究的必要前提。骨组织中无机成分主要是碳酸羟基磷灰石, 与人骨类似, 因此异种骨去除有机成分后无免疫原性且生物相容性较好。有机成分主要为胶原蛋白, 其中 95% 为 I 型胶原, 一般认

为在种系间结构组成差异不大, 其抗原部分主要为氨基末端区域, 该抗原成分不引发明显免疫反应, 也不影响成骨作用。引发免疫反应的主要成分包括骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等, 所有这些细胞表面均存在 MHC-I 型抗原及 α -Gal 抗原; MHC-II 抗原主要存在于骨髓细胞表面。在异种移植由于种属间 MHC 结构差异较大, T 细胞借助于受者的抗原递呈细胞, 通过间接途径识别抗原引发免疫反应。 α -Gal 抗原是主要存在于灵长目以外哺乳动物体内的异种抗原, 该抗原主要通过与人血清内存在的抗 α -Gal 抗体结合而引发体液免疫反应^[1]。尽管目前存在多种去抗原处理方法, 但其核心均为破坏上述细胞结构完整性, 去除抗原蛋白组分。轻微免疫学反应对其生物性能无不良影响, 而过分追求消除免疫反应反而可降低成骨性能, 故今后研究方向应从单纯物种间免疫反应差异向免疫反应与生物活性方面转变。

2 异种骨材料制备

由于种属间免疫学差异导致其与人体组织相容性差, 直接用于人体引起强烈的免疫排斥反应, 因此去除抗原物质是保证异种骨载体良好性能的前提。经过去抗原处理的异种骨应具备以下特点: 良好的

通讯作者: 刘雷 E-mail: liuinsistence@163.com

Corresponding author: LIU Lei E-mail: liuinsistence@163.com

组织相容性,并随本体骨组织的长入降解为可吸收组分;具有多孔结构,有利于营养物质输送、组织细胞的粘附增殖等;具有骨传导性。为达到上述目的,研究人员设计出多种去抗原处理方法,依据处理媒介不同主要分为物理方法和化学方法。

2.1 物理方法

目前常用的物理异种骨脱抗原方法包括高温煅烧和冷冻冻干骨。高温煅烧主要通过碳化作用破坏骨内有机质从而彻底消除其抗原性,煅烧后其主要成分为羟基磷灰石。对异种骨进行高温处理时,其成分变化主要经历以下阶段:低于 200 °C 时主要是水分的丧失;200~300 °C 开始破坏细胞成分;高于 300 °C 时胶原及蛋白组分开始燃火;400~900 °C 时碳酸磷灰石逐步转变为羟磷灰石,从而引发骨材料结晶度等方面的改变。在 300 °C 煅烧骨组织时不改变结晶度及无机组分,在材料表面形态及理性特性等方面与人骨类似。有证据表明在 300 °C 煅烧的 Bio-Oss 骨材料内残留 I 型胶原及表面氮,这些物质可能有利于改善其力学特性及生物相容性。Rokn 等^[2]发现 Bio-Oss 骨的成骨能力与 β -磷酸三钙相似,但其诱发的局部组织炎症反应甚至更低且成骨性能更佳。与上述亚高温处理相比,900 °C 以上处理异种骨时,获得骨材料不含有机组分因此不需担心免疫反应的影响,组织成分主要为 HA (羟磷灰石)。Pramanik 等^[3]研究发现牛骨在 900 °C 进行煅烧时可获得纳米羟基磷灰石,该晶体材料具有相互交通密集孔从而提升其生物相容性,且物理性能较佳。但是此种方法获得骨材料只具备骨传导性,无骨诱导性,且其置入体内后能否逐步降解尚需进一步研究。

冷冻骨的一般处理温度为 -20 °C,在冰结晶颗粒缓慢形成的过程中通过力学作用、化学损伤及酶反应而降低骨组织抗原性。该处理方法保留了骨组织中 I 型胶原及 BMP 等成骨活性成分,与煅烧相比具有物理特性更佳且置入体内后诱导成骨作用更强等优点。但是其祛除抗原作用较差,甚至引发免疫反应而影响成骨作用。Andrade 等^[4]发现 -70 °C 对细胞等抗原成分破坏较 -20 °C 效果更好,但同时胶原蛋白造成损伤程度加重,损害骨组织机械特性。与之相比,深低温冷冻后再对异种骨进行脱水处理其祛除抗原作用较为彻底。冷冻后的干燥脱水过程在降低免疫原性的起重要作用,其原理在于脱水过程所伴发的细胞内钠离子浓度的增加。冻干骨残留水分为 3%~5%,保存时间可达 4~5 年。冻干异种骨具有生物力学特性较佳、经济方便等优点。刘玉增等^[5]以免桡骨缺损作为实验模型,对冻干异种冻干与冻干同种骨治疗骨缺损效果进行对比分析,结果发现术

后 12 周两组组织学分析无明显差异,置入异种骨大部为骨小梁替代,部分动物出现部分骨髓组织、髓腔再通。Long 等^[6]对冻干骨进行扫描电镜观察发现尚有少了细胞组分残留,T 细胞增殖试验亦证实其引发的免疫反应较其他处理方式更加强烈。尽管冻干骨物理特性较佳且有骨诱导特性但残留抗原物质较多,因此最好与其他处理方式联合应用,从而在保持其良好理化特性的同时最大限度的去除免疫原性。

2.2 化学方法

该法主要利用化学试剂对异种骨进行脱脂、脱蛋白、脱细胞以及去除矿物质等处理获得部分脱蛋白骨、完全脱脂脱蛋白骨及脱细胞骨基质等。传统脱脂方法主要为氯仿、甲醇等有机溶剂浸泡,但其脱脂作用不完全且容易残留从而危害人体健康。超临界 CO₂ 作为一种较为成熟工业萃取剂最先应用于生物工程领域,该物质具有类似气体的扩散性及液体的溶解能力,同时兼具低黏度,低表面张力的特性,使得超临界流体能够迅速渗透进入微孔隙的物质。田家亮等^[7]利用超临界 CO₂ 对猪骨进行脱脂处理,发现脱脂效果优于传统脱脂方法,且保存了骨组织多孔结构和合适的孔隙率。但是超临界 CO₂ 对设备要求高,增加工艺成本,尚难大规模应用于工业生产。

异种骨脱蛋白媒介包括次氯酸钠、双氧水、乙醇等,其中 H₂O₂ 应用最多,其作用机制为通过强氧化作用使蛋白质变性,消除或减弱抗原性。高浓度 H₂O₂ 浸泡可部分消除异种骨的抗原性,且浸泡时间越长抗原性消除越彻底,但浸泡时间增加以及 H₂O₂ 浓度越高必然会损害骨组织机械强度,合适的处理时间目前较大争议。高中礼等^[8]通过研究发现异种骨经 30% H₂O₂ 处理 8 h 为最佳处理时间可使抗原性降至最低,最大程度地保留生物力学强度。但同时利用 30% H₂O₂ 对骨组织进行脱蛋白处理,发现 12~36 h 后有机物含量无明显改变且细胞等抗原成分已基本祛除,超过 30 h 对胶原蛋白及羟基磷灰石破坏加重,推荐处理时间在 12~30 h 内为宜^[9]。

通过把上述化学处理剂综合利用,研究人员探索出了 BioCleanse 骨组织处理系统:将骨组织冲洗后依次浸乙醇、双氧水、洗涤剂及清洗液,同时在正负压交替的环境下进行组织震荡漂洗^[10]。该技术首先用于处理同种异体骨,可有效祛除骨中脂肪组织、细胞成分及其他抗原成分,在祛除抗原成分的同时可较好的保持理化特性且具有消毒灭菌效果。Katz 等^[11]以 BioCleanse 处理的牛骨作为实验组,以同种异体羊骨作为对照组,置入羊胫骨缺损模型,结果发现经 BioCleanse 处理异种骨所引发的免疫反应与同种异体骨相似,且与受体骨组织融合较佳,周围组织

无明显纤维化反应。目前此类异种骨研究相对较少,其实际临床效果有待进一步研究。

3 重组异种骨

异种骨在经上述脱抗原处理时,成骨作用相关的活性成分亦遭到破坏,所制备的异种骨支架近具备骨传导性能或微弱的骨诱导性能,无成骨性能。单纯异种骨材料置入体内后依靠两端骨组织爬行替代,因此需要修复骨缺损作用缓慢甚至不能修复。而异种骨支架与成骨活性物质或细胞结合后可获得成骨性能,临床效果得到一定提升。

3.1 异种骨与细胞重组

重组细胞来源包括胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞以及脂肪间充质干细胞等。理论上胚胎干细胞性能最佳,但社会伦理问题等使其应用受限。骨髓间充质干细胞相关研究最为充分,其多能干细胞具有分离培养简单、体外扩增迅速及有向成骨细胞分化趋势等优点,动物及临床实验均证明其与骨支架材料复合后成骨性能极佳^[12]。但以下问题限制其在临床的广泛应用:数量较少,约 100 000 个骨髓细胞中含有 1 个骨髓间充质干细胞;随体外扩增系数增加成骨性能下降;提取骨髓细胞时对身体局部伤害较大。作为骨髓间充质干细胞的潜在替代细胞,脂肪间充质干细胞相关研究近来逐渐增多。该细胞在细胞表面标志物、基因表达序列及分化潜能等方面与骨髓间充质干细胞相似,因此该细胞可发挥成骨作用。Arrigoni 等^[13]以羟磷灰石做为支架材料与脂肪间充质干细胞复合用于修复兔胫骨骨缺损,结果发现与对照组相比脂肪间充质干细胞可明显改善骨组织产生速度。但骨间充质干细胞及脂肪间充质干细胞与支架材料复合后何者成骨性能更强目前仍未达成一致。Han 等^[14]以兔颅骨缺损为实验模型对两者成骨性能进行对比,发现两者成骨性能相当。Niemeyer 等^[15]以羊胫骨缺损作为实验模型对两者进行对比,得出了骨髓间充质细胞成骨性能高于脂肪间充质细胞的结论。

3.2 异种骨与骨形态蛋白重组

骨形态蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是由两相同条肽链构成的二聚体,包含多个功能各异的亚型。其中 BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP9 具有成骨潜能,其成骨作用关键在于诱导间质干细胞向前成骨细胞分化,BMP 是惟一能够使未分化骨细胞分化为成骨细胞和成软骨细胞的细胞因子。Long 等^[16]将牛松质骨与牛骨形态蛋白组成重组异种骨,对其分析发现其具有良好的生物力学性能和骨诱导性能,且无明显免疫学反应。但 BMP 在骨组织中含量极低、提纯过程费时费力,目前应用基因重

组技术进行人工合成的 rhBMP2 和 rhBMP7 已进行商业化应用。Francis 等^[17]分析 55 例牙槽骨缺损修补手术中应用 BMP 重组异种骨与自体髂骨移植的资料,结果显示 BMP 重组异种骨在临床效果、影像学表现及术后感染发生率方面均优于自体髂骨,且由于缩短手术时间未增加总体花费。

3.3 异种骨与 PRP 重组

血小板可分泌多种促进骨生成细胞因子,如转化生长因子的两个亚分类 TGF β 1 和 TGF β 2、血管内皮生长因子以及上皮生长因子等。将新鲜全血经分离浓缩后获得富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP),其血小板浓度可达全血几倍至十几倍,PRP 与骨支架材料复合理论上可以促进骨质生成。PRP 来自自身血液不仅容易获得制作简便价格低廉而且几乎没有安全隐患,并且其中的生长因子等生物活性因子的比例最接近人体,生长因子之间协同作用最佳^[18]。但其确切效果尚未取得一致意见。Park 等^[19]以兔颅骨缺损为实验模型,将 PRP 与支架材料植入骨缺损处,结果发现与单纯植入支架材料的对照组相比,实验组骨再生明显增加。但 Yoon 等^[20]同样以兔颅骨缺损为实验模型,以 Bio-Oss 复合 PRP,结果发现其促进骨生成作用不明显。Sánchez 等^[21]认为 PRP (富血小板血浆) 只在一个较小的浓度范围内具有促进骨质生成作用,即其浓度在 1 000 000/ μ l 效果较佳,低于此浓度时其促进骨生成作用不甚明显,而浓度过高时骨生成有抑制作用。

4 异种骨血管化

血供是组织获得氧气与营养的必须条件,依靠分子扩散对骨营养的供应深度在 100~200 μ m,异种骨材料置入体内后血管化是其与周围骨组织融合的起始及关键环节。如仅依靠周围血管自然长入,对于单纯异种骨置入材料来说无疑会延长其融合时间,对于重组异种骨来说则会使其临床效果大大折扣。因此,应采取有力措施促进异种骨血管化进程。

4.1 原位异种骨血管化

原位异种骨血管化是指将 VEGF、PDGF 及 EGF 等生长因子与异种骨材料复合后置入体内,从而促进异种骨血管化进程。目前主要有 2 种方法:将生长因子与异种骨颗粒复合植入体内,此时生长因子释放及降解均较快速,起效作用时间短暂;生长因子包埋如胶囊内可达到长期缓慢释放的目的。Yoon 等^[20]利用富血小板纤维蛋白促进了局部血管结构的快速生长。与未复合富血小板纤维蛋白的移植物相比,加入富血小板纤维蛋白后血管化速度及新生骨的生产速度均明显增加。此外,干细胞复合异种骨材料后同样可以促进血管化。殷剑等^[22]将兔自体脂肪干细胞

直接置于植骨周围,与对照组相比,CT 扫描发现实验组血供及代谢未见明显改善。该技术与其他血管化技术相比具有操作技术相对简单、可行度高及不对机体造成损伤等优点,但其血管化由外向内,进程相对缓慢。

4.2 异位骨血管化

异位血管化将异种骨材料预先植入体内血供丰富的部位如皮下或肌肉内,使得局部血管从异种骨组织表面长入。杨佩等^[23]将脂肪干细胞与支架材料复合后置入鼠股四头肌肌袋内,术后 2、4 周进行组织学检测发现支架孔隙中均长入大量血管,并有小动脉长入。但此时血管的生成部位等完全随机进行不受人为控制,置入骨缺损部位时血管吻合较为困难。另一种方法是将局部组织内血管等包埋入异种骨组织内,可选择动脉、静脉或动静脉回路作为其血供来源。待血管长入异种骨组织后,将此骨与血管一起移植到骨缺损部位。Matsuda 等^[24]利用脂肪干细胞与支架材料构成组织工程骨,通过中空管道包埋小鼠股动静脉环路,结果在数周后发现血管网长入支架内。尽管该法血管化作用较为理想,但是不可避免的对局部血供造成破坏,可能引发缺血、血栓等不良后果。

4.3 体外预血管化

体外预血管化是利用血管内皮细胞与异种骨材料体外混合培养,血管内皮细胞在体外培养后生成新血管。此外血管内皮细胞可促进骨先质细胞向成骨细胞分化,因此对局部骨组织生产亦有一定促进作用。Rouwkema 等^[25]首次利用骨原细胞和内皮细胞在骨架材料上培养出血管结构该体系的优点在于骨原细胞可分泌大量的 VEGF,从而促进血管内皮细胞增殖分化;而内皮细胞通过分泌 IGF-1、BMP-2 等骨生成因子促进骨原细胞的生长分化。此外共培养体系内还需加入平滑肌细胞和周皮细胞,只有上述 3 种细胞复合在一起方能生产有功能的血管结构。经过预血管化后植入体内的骨支架材料的血管化速度明显增加。除血管内皮细胞外,具有多向分化潜能的间充质干细胞亦可分化为血管内皮细胞。Koob 等^[26]将间皮干细胞以及内皮细胞与骨支架材料在体外共培养后置入鼠颅骨缺损模型,发现间皮干细胞具有稳定内皮细胞形成初始血管结构的作用。体外构造血管网是一种非常理想的骨组织工程方法,该方法前景广阔但难度大,目前尚处于实验探究阶段。

5 展望

异种骨材料经脱抗原,与细胞因子重组进一步血管化后可在体内发挥优异的效果。目前异种骨材

料的脱抗原制备已取得了良好成绩,短时期内很难取得更大提升;而将异种骨材料重组及置入体内后血管化方兴未艾,是当前研究的突破热点。综合利用各种细胞因子赋予异种骨材料骨诱导性的同时使其快速再血管化是当前研究未曾克服的难点,同样这也是未来异种骨材料的发展方向。未来研究重点应为异种骨支架与多种细胞因子及细胞成分进行重组,并协调其相互作用以及与机体局部微环境的相互作用,使得骨组织再生与血管化协调进行,最终达到类似自体骨移植修复骨缺损的临床效果。

参考文献

- [1] Feng W, Fu L, Liu J, et al. The expression and distribution of xenogeneic targeted antigens on porcine bone tissue[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(5): 1419-1422.
- [2] Rokn A, Moslemi N, Eslami B, et al. Histologic evaluation of bone healing following application of anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate in rabbit calvaria[J]. *J Dent (Tehran)*, 2012, 9(1): 35-40.
- [3] Pramanik S, Mohd H, Asyikin S, et al. Morphological change of heat treated bovine bone; a comparative study materials[J]. *Materials*, 2013, 6(1): 65-75.
- [4] Andrade MG, Su CN, Marchionni AM, et al. Effects of freezing on bone histological morphology[J]. *Cell Tissue Bank*, 2008, 9(4): 279-287.
- [5] 刘玉增,李琪文,王继芳.冻干同种异体骨与冻干异种骨移植治疗骨缺损的比较实验研究[J]. *中国骨伤*, 2005, 18(5): 282-284. Liu YZ, Li QW, Wang JF. Experimental comparison of freeze-drying allograft bone with freeze-drying xenograft bone for the repair of segmental bone defect[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(3): 258-261. Chinese with abstract in English.
- [6] Long B, Dan L, Min L, et al. The influence of approaches for the purification of natural cancellous bone grafts: Morphology, microstructure, composition, strength and biocompatibility study[J]. *Materials Letters*, 2010, 4: 2056-2059.
- [7] 田家亮,周宗科,廉永云,等.三种不同脱脂方法对猪骨脱脂的效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(16): 3133-3136. Tian JL, Zhou ZK, Lian YY. Effects of three defatting ways on porcine bone[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu*, 2009, 13(16): 3133-3136. Chinese.
- [8] 高中礼,王金成,杨晨,等.不同时间脱蛋白异种骨抗原性和生物力学相关性研究[J]. *骨与关节损伤杂志*, 2002, 17(2): 122-123. Gao ZL, Wang JC, Yang C, et al. The correlative study of antigenicity and biological mechanic of heterogenic bone deproteinized by different time[J]. *Gu Yu Guan Jie Sun Shang Za Zhi*, 2002, 17(2): 122-123. Chinese.
- [9] Li D, Bi L, Meng G, et al. Mineral status and mechanical properties of cancellous bone exposed to hydrogen peroxide for various time periods[J]. *Cell Tissue Bank*, 2011, 12(1): 51-58.
- [10] Vaishnav S, Thomas Vangness C Jr, Dellamaggiora R. New techniques in allograft tissue processing[J]. *Clin Sports Med*, 2009, 28(1): 127-141.

- [11] Katz J, Mukherjee N, Cobb RR, et al. Incorporation and immunogenicity of cleaned bovine bone in a sheep model[J]. *J Biomater Appl*, 2009, 24(2): 159-174.
- [12] Udehiya RK, Amarpal, Aithal HP, et al. Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(3): 743-752.
- [13] Arrigoni E, de Girolamo L, Di Giancamillo A, et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration; histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization[J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(2): 331-339.
- [14] Han DS, Chang HK, Kim KR, et al. Consideration of bone regeneration effect of stem cells; comparison of bone regeneration between bone marrow stem cells and adipose-derived stem cells[J]. *J Craniofac Surg*, 2014, 25(1): 196-201.
- [15] Niemeyer P, Fechner K, Milz S. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3572-3579.
- [16] Long B, Dan L, Jian L, et al. Evaluation of a novel reconstituted bone xenograft using processed bovine cancellous bone in combination with purified bovine bone morphogenetic protein[J]. *Xenotransplantation*, 2012, 19(2): 122-132.
- [17] Francis CS, Mobin SS, Lypka MA. rhBMP-2 with a demineralized bone matrix scaffold versus autologous iliac crest bonegraft for alveolar cleft reconstruction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2013, 131(5): 1107-1115.
- [18] 陈帅, 张宁, 陈维善. 富血小板血浆修复骨缺损的机制研究进展[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(3): 258-261.
Chen S, Zhang N, Chen WS. Research progress of the mechanism of repairing bone defect with PRP[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(3): 258-261. Chinese with abstract in English.
- [19] Park JK, Joo HJ, Lee ES, et al. The effect of PRF and PRP for new bone formation of beta-TCP in skull of white rabbit[J]. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2011, 33: 19-25.
- [20] Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes; a study of rabbit cranial defects[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2014, 42(7): 1071-1077.
- [21] Sánchez AR, Sheridan PJ, Eckert SE, et al. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts in periimplant defects; a vital fluorescence study in dogs[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2005, 7(2): 61-69.
- [22] 殷剑, 杨毅, 杨小丰. 快速浓集自体脂肪干细胞促进移植异体骨早期血管化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(27): 4996-5000.
Yin J, Yang Y, Yang XF. Rapid accumulation of autologous adipose-derived stem cells promotes early vascularization of implanted allogeneic bone[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu*, 2012, 16(27): 4996-5000. Chinese.
- [23] 杨佩, 黄欣, 王春生, 等. 预分化脂肪干细胞与纤维蛋白胶和磷酸钙骨水泥自体异位构建血管化移植[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(51): 8801-8808.
Yang P, Huang X, Wang CS, et al. Prefabrication of vascularized grafts based on pre-differentiated adipose derived stem cells, fibrin sealant and porous calcium phosphate cement scaffold[J]. *Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu*, 2013, 17(51): 8801-8808. Chinese.
- [24] Matsuda K, Falkenberg KJ, Woods AA, et al. Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(11-12): 1327-1335.
- [25] Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(9): 2685-2693.
- [26] Koob S, Torio-Padron N, Stark B, et al. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(3-4): 311-321.

(收稿日期: 2014-08-13 本文编辑: 李宜)