

· 基础研究 ·

不同低氧分压对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响*

彭涛¹, 黄姣², 徐凌^{3△}

(1. 重庆市黔江中心医院口腔科 409000; 2. 重庆市口腔疾病与生物医学研究中心/重庆医科大学附属口腔医院牙周黏膜科 401147; 3. 重庆市口腔疾病与生物医学研究中心/重庆医科大学附属口腔医院修复科 401147)

摘要:目的 研究体外不同低氧分压对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)增殖分化的影响。方法 将体外培养的 MSCs, 分组置于常氧(21%)和低氧(2%、4%、6%、8%)培养箱中培养,用 MTT 法分别于 1、3、5、7、9 d 检测细胞的增殖活性;用酶联免疫检测法分别于 1、3、5、7、9 d 检测细胞碱性磷酸酶(ALP)和 I 型胶原蛋白(COL I)的表达。结果 不同低氧分压对 MSCs 细胞增殖活性有明显促进作用($P < 0.05$);低氧分压抑制 MSCs 细胞的 ALP 和 COL I 表达($P < 0.05$)。结论 低氧微环境可促进 MSCs 的增殖活性,但对细胞的成骨向分化起到抑制作用。

关键词:细胞低氧;骨髓;间质干细胞;碱性磷酸酶;胶原 I 型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.26.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)26-2714-03

Influence of different low oxygen partial pressures on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells in SD rats*

Peng Tao¹, Huang Jiao², Xu Ling^{3△}

(1. Department of Stomatology, Qianjiang District Central Hospital, Chongqing 409000, China; 2. Department of Periodontics, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science/ Affiliated Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China; 3. Department of Prosthodontics, Chongqing Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science/ Affiliated Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different low partial pressure of oxygen on proliferation and differentiation capability of rat mesenchymal stem cells(MSCs) in vitro. **Methods** MSCs were isolated from adult rat bone marrow and cultured in vitro under normoxia(21% oxygen tension) and low PO₂(2%, 4%, 6% and 8% oxygen tension) respectively. The proliferation of MSCs, alkaline phosphatase(ALP) activity, and production of collagens type I (COL I) were examined by means of MTT and enzyme-linked immunoreaction on 1, 3, 5, 7, 9 d respectively. **Results** Different low partial oxygen pressures had significant promoting effect on the proliferation activity of MSCs($P < 0.05$) and decreased ALP activity and the production of COL I ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxia microenvironment can promote the proliferation activity of MSCs and inhibit MSCs to differentiate into osteogenic lineage cells.

Key words: cell hypoxia; bone marrow; mesenchymal stem cells; alkaline phosphatase; collagen type I

骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, MSCs), 由于其特有的成骨分化潜能,因而在骨组织工程领域中备受关注^[1-2]。但是在组织工程实际应用中,做为种子细胞移植入缺损处后,因为没有血管化的同步形成,最初处于一相对低氧环境中,因此研究 MSCs 的增殖和分化是否受缺氧或低氧环境影响具有重要的意义。近年有研究也发现,间充质源性细胞均属于氧感应细胞。本实验通过建立低氧-细胞培养模型,探讨不同低氧分压微环境对 MSCs 增殖及成骨向分化的影响,为后续的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 (1)主要材料:α-MEM 培养基(Gibco, 美国),胰蛋白酶、EDTA、牛血清清蛋白(BSA),考马斯亮蓝(Sigma, 美国),胎牛血清(Hyclone, 美国),MTT 试剂(Gibco, 美国),二甲亚砜(分析纯, 中国),兔抗鼠 SH3、CD34、CD44、CD54、CD105 抗体,兔抗鼠 I 型胶原蛋白(COL I)抗体,生物素化山羊抗兔抗体(BOSTER, 中国),DAB(北京中杉金桥生物技术公司, 中国)。(2)主要仪器:25 cm² 培养瓶、6 孔培养板、

96 孔培养板(Corning, 美国);CO₂ 孵育箱(Sanyo, 日本)、Heraeus 三气细胞培养箱(Pierce, 德国)、倒置相差显微镜(Olympus, 日本)、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(北京柏定生物工程技术有限公司)、Leica 显微镜(德国)、图像分析系统 Image-Pro Plus 4.5(Media, 美国)、HTS7000plus 多孔板高效分析仪(PE, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞来源和培养 取雄性 4 周龄 SD 大鼠,引颈法处死,无菌条件下取大鼠股骨,切除两侧的股骨端,用针管吸取 5 mL 含 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基,冲出骨髓,将其接种于 25 cm² 培养瓶中,用巴氏吸管吹散细胞,然后置于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度条件的 CO₂ 培养箱中静置培养。第 7 天换液,弃悬浮细胞。以后每 3~4 天换液 1 次,待原代细胞生长融合达到 80% 以上进行传代培养,取第 4 代细胞作为实验细胞。进行免疫荧光染色,证实获得 SH3⁺、CD34⁻、CD44⁺、CD54⁺ 和 CD105⁺ 的单核细胞为 MSCs。

1.2.2 不同低氧分压下 MSCs 细胞增殖率的 MTT 法检测

* 基金项目:重庆市科委自然科学基金面上项目(CSTC 2011jjA0274)。△ 通讯作者, Tel:(023)89035821-8124; E-mail: xh1201@163.com。

实验分为低氧组和常氧组(21%),低氧组再分 2%、4%、6%、8%氧分压组(分别为低氧 1 组、低氧 2 组、低氧 3 组、低氧 4 组)。取第 4 代 MSCs 消化后,用含 10%胎牛血清 α -MEM 培养基配制成为 4×10^4 个/mL 的细胞悬液。将细胞接种于 96 孔板中,每孔加入 200 μ L 细胞悬液,每组每个时间点设 5 个复孔。按照分组情况,将实验组细胞放置于预先设置好氧分压的三气培养箱中,常氧组细胞放置于 5%CO₂ 孵箱中静置培养。3~4 天换液 1 次。在 1、3、5、7、9 d 5 个时间点,取出 96 孔板,采取 MTT 法,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长下测定其调零后的光吸收度值(OD 值)。

1.2.3 不同低氧分压下 MSCs 细胞 ALP 活性检测 实验分组同 1.2.2。取第 4 代 MSCs 消化后,配制成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液,接种于 25 cm² 培养瓶里,每瓶加入 2 mL 细胞悬液,每组每个时间点设 3 个复瓶。按照分组情况,将实验组细胞放置于预先设置好氧分压的三气培养箱中,常氧组细胞放置于 5%CO₂ 孵箱中静置培养。3~4 天换液 1 次。在 1、3、5、7、9 d 5 个时间点收集需要检测的细胞,待样品全部收集完成后送检。送检前,反复冻融 3 次,形成冻融液。按试剂使用说明处理收集的样本,用酶联免疫检测仪在 405 nm 波长下测定其 OD 值,再乘以系数 1 383 求出样本中 ALP 活力(U/L)。同时相同办法计算出细胞内总蛋白含量(mg/mL)。最后计算单位蛋白含量的相对 ALP 活性,计算公式为:

$$\text{相对 ALP 活性(mU/mg)} = \frac{\text{ALP 活性(U/L)}}{\text{细胞总蛋白(mg/mL)}} \quad (1)$$

1.2.4 不同低氧分压下 MSCs 细胞 COL I 的检测 实验分组同 1.2.2。取第 4 代 MSCs 消化后,配制成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液。将细胞接种于 6 孔板中的玻璃片上,每张加入 1 mL 细胞悬液,每组每个时间点设 5 张复片。按照分组情况,将实验组细胞放置于预先设置好氧分压的三气培养箱中,常氧组细胞放置于 5%CO₂ 孵箱中静置培养。3~4 天换液 1 次。在 1、3、5、7、9 d 5 个时间点,取出 6 孔板,采用 streptavidin biotin-peroxidase complex method(SABC 法)对 MSCs 进行免疫细胞化学染色。第一抗体为 COL I 兔抗鼠多克隆抗体,第二抗体为链酶亲和素化山羊抗兔 IgG。设置阴性对照(用 PBS 液代替一抗,其余条件不变)。采用图像分析系统对染色切片进行检测。在 200 倍显微镜下将每张切片按系统抽样法随机选

择 4 个视野测定棕黄色阳性颗粒的总面积及平均透光度。然后,通过计算平均积分光密度值(integrated optical density, IOD 值)得出阳性染色强度,试算公式为:

$$\text{平均 IOD 值} = \text{平均透光度} \times \text{平均阳性面积} \quad (2)$$

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用双侧 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 MSCs 细胞增殖率结果 MSCs 在低氧微环境中生长时,OD 值均较其在常氧微环境中生长的 OD 值高,其中低氧 2 组最明显。在第 1、3 天各低氧组的 OD 值变化幅度较小,至第 5 天各组的 OD 值变化幅度开始增加,第 7、9 天各低氧组 OD 值增加明显,而常氧组 OD 值增加较平缓。各低氧组的 OD 值与常氧组比较,在第 5、7、9 天均差异有统计学意义($P < 0.05$),显示低氧微环境能促进 MSCs 的增殖活性。其中,在 4%氧分压为微环境中,MSCs 增殖活动最为活跃,但与其他各低氧组比较其 OD 值差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 MSCs 细胞 ALP 活性定量检测结果 培养第 1 天时各低氧组与常氧组的 MSCs 细胞内 ALP 表达活性均较弱,随着培养时间的延长,各低氧组与常氧组 MSCs 细胞内 ALP 表达活性逐渐增强,常氧组的 ALP 表达活性变化幅度较大,而各低氧组升高较平缓。第 3、5、7、9 天时各低氧组与常氧组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);在各个低氧组内,第 7、9 天时低氧 1 组与低氧 4 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 各低氧组与常氧组 MSCs 细胞的 OD 值比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
常氧组	0.50±0.03	1.10±0.05	1.50±0.03	1.70±0.05	2.30±0.04
低氧 1 组	0.50±0.05	1.40±0.07	2.50±0.08*	3.40±0.10*	4.50±0.10*
低氧 2 组	0.90±0.04	2.00±0.09	3.30±0.10*	4.30±0.10*	5.70±0.10*
低氧 3 组	0.53±0.04	1.40±0.07	3.00±0.10*	4.40±0.10*	5.30±0.10*
低氧 4 组	0.50±0.02	1.00±0.05	2.50±0.07*	3.70±0.10*	5.20±0.10*

* : $P < 0.05$, 与常氧组比较。

表 2 各组 MSCs 细胞 ALP 活性比较($\bar{x} \pm s, \text{mU/mg}, n=3$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
常氧组	36.74±4.81	62.05±5.56	79.71±6.98	89.01±7.67	93.30±6.21
低氧 1 组	20.05±2.91	30.18±3.88*	34.34±5.72*	40.10±2.06* [△]	46.33±4.02* [△]
低氧 2 组	28.45±4.98	33.01±5.02*	41.87±3.35*	46.03±4.94*	58.15±3.27*
低氧 3 组	30.05±5.21	36.52±4.03*	46.17±3.08*	52.72±4.22*	62.87±2.03*
低氧 4 组	31.01±4.06	38.82±3.05*	48.15±4.02*	54.08±4.13*	68.16±3.09*

* : $P < 0.05$, 与常氧组比较; [△] : $P < 0.05$, 与低氧 4 组同时时间点比较。

表 3 各组 MSCs 细胞内 COL I 的 IOD 值比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d
常氧组	1 386.00±164.00	1 486.00±251.00	1 668.00±358.00	1 845.00±325.00	2 089.00±297.00
低氧 1 组	1 028.00±261.00	1 083.00±341.00	1 108.00±324.00	1 134.00±320.00*	1 309.00±212.00*
低氧 2 组	1 052.00±258.00	1 197.00±326.00	1 201.00±387.00	1 254.00±326.00*	1 448.00±235.00*
低氧 3 组	1 167.00±213.00	1 208.00±201.00	1 249.00±215.00	1 362.00±321.00*	1 527.00±289.00*
低氧 4 组	1 191.00±126.00	1 221.00±224.00	1 321.00±268.00	1 405.00±326.00*	1 653.00±276.00*

* : $P < 0.05$, 与常氧组比较。

2.3 各组 MSCs 细胞 COL I 免疫细胞化学染色结果 各低氧组 MSCs 细胞内 COL I 表达均较弱,常氧组 COL I 表达相对较强。随着时间延长,各低氧组 MSCs 细胞内 COL I 增加较平缓,常氧组 COL I 表达变化幅度相对较大。第 7、9 天时各低氧组与常氧组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);但各时间点各低氧组内的差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

3 讨 论

在骨组织工程学应用上,通常采用的方法是从体内获得一定数量的种子细胞,然后在体外进行扩增,之后将其附于一生物相容性以及力学性能良好的支架材料上,移植入体内相应组织缺损处进行修复^[1-3]。但是,以往通常忽略了一个这样的问题,在体外扩增时,细胞处于一个常氧(21%)状态之下,而移植入体内组织缺损处后,因为缺损组织血管化过程需要一定时间,所以种子细胞一开始是处于一个相对低氧的微环境中,以后随着血管化的逐渐形成,微环境的氧分压逐渐回升,但就骨组织而言,始终无法达到 21% 氧分压的环境中^[4-7]。因此,常常在体外实验中研究种子细胞(如 MSCs)的增殖以及成骨向分化的生物学行为,这与将种子细胞置于低氧微环境中生长时的生物学行为相比,可能会有很大的出入。而研究低氧微环境下种子细胞增殖、成骨向分化的生物学行为,对于以后的相关实验动物研究以及临床应用更有实际意义。因此本课题以此为出发点,设计研究 MSCs 在 2%、4%、6%、8%、21% 氧分压环境下的增殖活性以及成骨向分化能力,为将其作为种子细胞应用于牙周骨组织工程学上提供实验依据。

对于实验所选择的氧分压,本课题尽量模拟种子细胞移植入骨缺损处所经历的一个氧分压变化。但是这个影响因素很多,如骨缺损的大小势必会影响细胞所处的氧环境,缺损较大,相应组织血管化就会减慢,多数细胞会较长时间处于低氧环境中,反之,缺损小,组织血管化进程快,血管化面积大,相应细胞就会处于一较高氧分压的环境中;而且移植处组织的血流受阻情况也存在各种差异,这些也会影响到移植种子细胞所处的氧环境。有研究表明,骨髓组织为一相对缺氧组织,其氧分压范围为 1%~7%。本课题选择了氧分压为 2%、4%、6%、8%、21% 作为细胞生长的微环境,一方面希望选择的这个范围能尽可能真实反映种子细胞移植到缺损处所经历的一个氧分压变化范围;另一方面也希望通过这几个氧分压的选择,能研究出 MSCs 在不同氧分压下生物学行为的一个变化规律,为以后的进一步研究提供实验依据。

本实验中采取 MTT 比色试验用于检测细胞的增殖率。MTT 法的检测原理是活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶能够使外源性的 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑啉盐(商品名噻唑蓝,简称 MTT)还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臞,沉积在细胞中,用二甲基亚砷溶解细胞中的甲臞,最后用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其 OD 值,因为 MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比关系,所以该检测方法可以间接反映活细胞的数量。本实验中 MTT 法检测结果显示,各低氧组对 MSCs 的增殖活性有明显的促进作用,在 4% 氧分压时,其促进作用最为明显。这与国外有关研究结果一致,即低氧环境促进 MSCs 的增殖^[6,8-10]。从细胞增殖活性上看,低氧预处理的 MSCs 细胞作为种子细胞是相当有利的。但是,也要考虑到的就是 MSCs 细胞处于低氧环境下的分化情况,特别是成骨向分化的情况,这也是本研究选用其作为种子细胞的重要原因。

众所周知,成骨细胞早期分化的指标之一就是 ALP 活性

的增加。ALP 可以水解有机磷酸酯,进而释放出磷酸盐,使得游离的磷酸盐与钙发生结合,形成磷酸钙,磷酸钙再沉积在细胞周围基质的胶原中,最终形成了新生骨。众多实验证实,没有 ALP 的生成,骨组织钙化就不会发生。从骨组织结构来看,是由 2/3 的无机物和 1/3 的有机物构成,其中 COL I 就占到了有机物中的 80%~90%,对骨组织结构的完整、生物力学的维持起着重要的作用。COL I 构成骨组织的框架,其合成和分泌是骨组织形成的前提条件,加速它的合成分泌,可以明显促进骨组织的矿化进程。因此,本实验选取 ALP 和 COL I 作为检测指标,用于观察 MSCs 细胞在不同低氧分压下成骨向分化的情况。从本实验的数据可以看出,低氧微环境抑制 MSCs 细胞 ALP 活性和细胞内 COL I 的表达,也抑制 MSCs 细胞成骨向分化,而且这种抑制作用与氧分压有关,氧分压越低其抑制作用越明显。这与有关研究结果一致,即认为低氧环境抑制 MSCs 内 ALP 以及 COL I 的表达,抑制 MSCs 成骨向分化^[11-13]。但也有研究却认为低氧环境能促进 MSCs 内 ALP 以及 COL I 的表达^[14-15]。其研究结果的差异性可能为细胞模型不同,或培养条件不同所造成。

以上实验说明在运用组织工程学方法修复牙周骨缺损中,通过低氧预处理的 MSCs 细胞仅能增加其增殖活性但不利于 MSCs 细胞 ALP 活性和 COL I 的表达,也极不利于 MSCs 细胞的成骨向分化。以后的研究应该进一步明确其抑制成骨向分化的作用机制,以期在体外细胞培养中加以干预,使其移植入缺损后更有利于骨组织的形成。

参考文献:

- [1] Kumbar SG, Toti US, Deng M, et al. Novel mechanically competent polysaccharide scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomed Mater*, 2011, 6(6): 3265-3273.
- [2] Klein JD, Fauza DO. Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 698(1): 75-88.
- [3] Oh JS, Ha Y, An SS, et al. Hypoxia-preconditioned adipose tissue-derived mesenchymal stem cell increase the survival and gene expression of engineered neural stem cells in a spinal cord injury model[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 472(3): 215-219.
- [4] Kubo M, Li TS, Suzuki R, et al. Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): 590-595.
- [5] Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signaling controls metabolic demand[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 223-231.
- [6] D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MI2 AM I cells[J]. *Bone*, 2006, 39(3): 513-519.
- [7] Tang YL, Zhu W, Cheng M, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR-4 expression[J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1209-1216.
- [8] Nagano M, Kimura K, Yamashita T, et al. (下转第 2721 页)

全菊等^[7]的调查研究表明同辈教学法应用于临床护理教学既能使同辈施教者和受教者得到能力的提升,还能全面培养护士的综合素质,减轻护士在临床工作中的压力。同时,同辈教育要求同辈施教者和受教者之间充分的交流,易于提高护士的人际交往能力^[8]。

3.3 开展口腔专科护士培训应重视四手操作 进行口腔专科护士的培训必须与时俱进,新技术新方法的引进不可或缺。因此,开展口腔专科护士培训时,对于四手操作的培训必不可少。但由于四手操作目前在中国并不普及,临床采用率低。四手操作技术从 20 世纪 60 年代诞生后一直备受关注,现已成为国外的常规诊疗模式,甚至已有关于六手操作的研究。资料表明四手操作技术在提高治疗质量、降低医生的工作强度、避免交叉感染以及增加患者治疗中的舒适度和安全感方面具有明显的作用^[9],且运用四手操作技术能够显著提高临床口腔诊疗效率^[10]。Baum^[11]研究表明生物学基础知识以及重视实践操作对于口腔诊疗工作很重要。但四手操作在重庆市未得到充分的临床应用,而 96.56% 的护士希望采用四手操作模式,且 57.25% 的护士接受过四手操作的培训。相关研究表明口腔专科护士缺乏,口腔专科护士专业知识薄弱,医护人员对四手操作的认识不够深入是四手操作难以开展的原因^[12]。因此,要普及推广四手操作在临床口腔诊疗工作中的应用并做到真正意义上的四手操作,就要有一支掌握专业理论和技术的口腔医疗护理队伍,而护理队伍的专业培训则显得尤为迫切和需要。四手操作的临床口腔诊疗模式需要口腔专科护士的主动参与,因此,在开展四手操作专业培训的过程中,要求口腔专科护士除了具备一般的护理知识外,还应具备相应的口腔专业知识和对口腔医疗器械设备的熟悉^[13],以完成治疗过程中与口腔医生的规范配合,提高临床口腔诊疗效率。本调查表明仅 57.25% 的护士接受过四手操作的培训,这对于四手操作在本地区的普及是远远不够的,因此,应加大四手操作基础知识与操作技术的培训力度及覆盖面,让四手操作的观念深入到每一位口腔医疗工作者心中。

参考文献:

[1] 魏建华,张浚睿,马婕,等.日本齿科卫生士教育制度对我

(上接第 2716 页)

- al. Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair[J]. *Stem Cells Dev*,2010,19(8):1195-1210.
- [9] Gruber R,Kandler B,Agis H,et al. Bone cell responsiveness to growth and differentiation factors under hypoxia in vitro[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*,2008,23(3):417-426.
- [10] Volkmer E,Kallukalam BC,Maertz J,et al. Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation[J]. *Tissue Eng Part A*,2010,16(1):153-164.
- [11] Kanichai M,Ferguson D,Prendergast PJ,et al. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells:a role for A KT and hypoxia2 inducible factor(HIF)2 alpha[J]. *J Cell Physiol*,2008,216(3):708-716.

国牙科辅助人才培养的启示[J]. *中国高等医学教育*,2009(12):48-49.

- [2] 刘丽杰.口腔科护士的临床价值[J]. *医学信息*,2010,23(10):3804-3805.
- [3] 吴云,王松龄.国内外口腔医学教育及其人才培养模式比较[J]. *中国高等医学教育*,2008(8):35-37.
- [4] 夏岩.全球医学教育最低标准与中国口腔医学教育分层培养模式的思考[J]. *科技信息*,2010(30):496-497.
- [5] 黄慧萍,赵英莉,贾霄云.口腔科门诊护士工作压力情况的调查[J]. *中华护理杂志*,2008,43(10):934-936.
- [6] 李英淑,金彩霞.浅谈导师带教制在低年资护士培养中的作用[J]. *齐齐哈尔医学院学报*,2011,32(3):444-445.
- [7] 丁全菊,许乐.同辈教学法对临床护理教学的启示[J]. *临床护理杂志*,2008,7(1):70-72.
- [8] 朱瑞珠.四手操作技术在口腔临床中的应用现状[J]. *广西医学*,2008,30(4):529-531.
- [9] 张梓华.四手操作在综合性医院口腔科应用的护理体会[J]. *实用护理学杂志*,2010,20(10):31-32.
- [10] 刘卓.四手操作对于口腔治疗的重要性[C].第六次全国国际暨第九次全国口腔颌面外科学术会议论文集,南京,2011.南京:中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会,2011.
- [11] Baum BJ. Inadequate training in the biological sciences and medicine for dental students, An impending crisis for dentistry[J]. *J Am Dent Assoc*,2007,138(1):16-25.
- [12] 陶建英,王芬.四手操作在口腔临床中不易开展的原因与对策[J]. *临床护理杂志*,2006,5(3):24-25.
- [13] 曹玲,张一兵.四手操作在口腔治疗中的护理配合[J]. *临床口腔医学杂志*,2010,26(4):250-251.

(收稿日期:2012-03-26 修回日期:2012-05-21)

- [12] Bessa PC,Casal M,Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I(basic concepts)[J]. *J Tissue Eng Regen Med*,2008,2(1):1-13.
- [13] Usami K,Mizuno H,Okada K,et al. Composite implantation of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells enhances tissue-engineered bone formation[J]. *J Biomed Mater Res A*,2009,90(3):730-741.
- [14] 金小岚,郎红梅,万勇,等.不同氧浓度对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2010,26(5):982-985.
- [15] Pietrogrande L,Raimondo E,Fossali A,et al. Biological and pharmacological factors influencing the fracture healing[J]. *Aging Clin Exp Res*,2011,23(2 Suppl):S65-68.

(收稿日期:2012-05-02 修回日期:2012-05-23)