

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.001

腺病毒 rhBMP-2 转染兔 BMSCs 复合同种异体脱钙骨基质的生物相容性研究*

蔡伟良, 李 强[△], 宁寅宽, 武成聪, 陈佳滨, 石正松
(桂林医学院附属医院骨二科, 广西桂林 541001)

[摘要] 目的 探讨腺病毒重组人骨形态发生蛋白-2(Ad-rhBMP-2)转染兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)复合同种异体脱钙骨基质(DBM)的生物相容性。方法 参照 Urist 方法制备兔同种异体 DBM 材料,免疫组化观察转染后 BMSCs 内 BMP-2 表达情况;转染 48 h 后复合同种异体 DBM 上,扫描电镜观察细胞生长、贴附情况,MTT 法检测细胞增殖情况。结果 腺病毒转染 48 h 后,BMSCs 能够表达 BMP-2,扫描电镜可见转染后的细胞在 DBM 上贴附良好并且大量增殖。MTT 检测结果显示,种植于 DBM 上的转染后细胞增殖情况正常,与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Ad-BMP-2 转染 BMSCs 与同种异体 DBM 的生物相容性良好。

[关键词] 骨形态发生蛋白质类;腺病毒科;骨髓;间质干细胞;脱钙骨基质

[中图分类号] R683

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1297-03

Study on biocompatibility of Ad-rhBMP-2 transfection on rabbit BMSCs combined with allogeneic DBM*

Cai Weiliang, Li Qiang[△], Ning Yinkuan, Wu Chengcong, Chen Jiabin, Shi Zhengsong

(Second Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the biocompatibility of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with allogeneic decalcified bone matrix(DBM) after transfecting adenoviral recombinant human bone morphogenetic protein-2(Ad-rhBMP-2). **Methods** The rabbit allogeneic DBM material was prepared according to the Urist method. After transfecting Ad-BMP-2 on rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, the immunohistochemical was used to detect the expression of BMP-2 in the transfected cells; after 48 h of transfection, the cells were planted on the allograft DBM, then the scanning electron microscopy was used to observe the cell growth and adhesion condition on material, and the proliferation condition of BMSCs was detected by MTT. **Results** After 48 h of adenoviral transfection, BMSCs could express BMP-2 successfully. The scanning electron microscopy showed that the cells after transfection adhered well and massively proliferated on DBM material. The MTT assay showed that the proliferation condition of the cells after transfection planted on DBM was normal, which showed no statistically significant difference when compared with the control group ($P>0.05$). **Conclusion** The Ad-BMP-2 transfection on BMSCs is well biocompatible to allogeneic DBM.

[Key words] bone morphogenetic proteins; adenoviridae; bone marrow; mesenchymal stem cells; decalcified bone matrix

现代临床医学中,由于不同原因引起的骨质缺损和骨质坏死依然是亟待解决的问题之一。目前临床上应用于骨重建可用的材料包括自体骨移植、异体骨移植和人工合成骨替代物。由于自体骨有限、异体骨移植存在免疫及疾病传播的风险及人工合成替代物疗效不明显的不足,因此,组织工程骨成为另一种解决骨组织缺损、坏死、延迟愈合的方法。组织工程骨中 3 个核心要素为种子细胞、支架材料和细胞因子。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因其取材创伤小、易于分离培养,是目前热门的种子细胞之一^[1]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)在骨修复过程中可促进成骨细胞增殖、基质分泌和血管化^[2-3]。脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)来源于骨组织,具有理想的孔隙结构,并具有良好的降解性。本实验以兔 DBM 为支架,以腺病毒为载体介导 BMP-2 转染 BMSCs 接种于 DBM,观察和探讨 DBM 植骨材料作为 BMP-2 基因转染后 BMSCs 支架的生物学相容性,为临床上骨缺损的修复做进一步实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)BMSCs:兔 BMSCs 来源于本课题组前期保存细胞株^[4]。(2)腺病毒载体:携带 hBMP-2 和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的腺病毒载体(Ad-BMP-2/EGFP)、携带 EGFP 基因的腺病毒对照载体(Ad-EGFP)由 Invitrogen 公司提供。(3)实验动物:清洁级新西兰大白兔 4 只,体质量 1.50~2.00 kg,购于桂林医学院动物实验中心,实验过程符合动物伦理学要求^[5]。(4)主要试剂:胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,低糖 DMEM 购自美国 Gibco 公司,胰蛋白酶、MTT 购自韩国 Biosharp 公司,DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,4%多聚甲醛、脱钙液由桂林医学院附属医院病理科提供,MTT 购自美国 Sigma 公司。(5)主要仪器:BHC-1300 生物安全柜为浙江苏州净化设备有限公司产品,CO₂ 培养箱、-80℃超低温冰箱、液氮罐为美国 Thermo 公司产品,倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品,MLDEL680 型酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品,扫描电镜为 FEI Quanta 200 FEG 美国 FEI 公司产品。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160199)。 作者简介:蔡伟良(1988—),在读硕士研究生,主要从事骨组织工程研究。

[△] 通讯作者, Tel:15977330608; E-mail:li.q12251970@163.com。

1.2 方法

1.2.1 制备 DBM 将新西兰大白兔处死,取四肢骨及椎体松质骨,根据 Urist 等^[6]方法经 -80°C 低温冻存 72 h,剔除骨组织以外组织,脱钙液脱钙 72 h,置乙醚、乙醇中各脱脂 24 h,以无菌蒸馏水反复冲洗、浸泡,直至浸泡液呈中性为止。此时松质骨块呈白色海绵状,能压缩变形并自动恢复至原状。去酸处理后的骨块继续在蒸馏水中浸泡 24 h,取出后自然晾干,制成 $4\text{ mm}\times 4\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ DBM,环氧乙烷消毒, 4°C 保存备用。

1.2.2 BMSCs 的复苏 液氮罐中取出第 9 代细胞 37°C 水浴锅中解冻,细胞悬液转移至事先加入 DMEM 培养基离心管中, $1\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min,弃上清液,加完全培养基重悬,接种于培养皿中, $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 饱和湿度环境中培养。贴壁约 80%左右传代,取相同代数细胞进入实验。

1.2.3 Ad-BMP-2/EGFP 转染兔 BMSCs 处于对数生长期第 10 代细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化,细胞计数后按 1×10^6 个细胞种植于培养皿中,根据腺病毒携带基因片段不同分为 Ad-EGFP 与 Ad-BMP-2 两组。以不含血清的 DMEM 按病毒滴度稀释病毒原液,使病毒工作液感染复数(multiplicity of infection, MOD)为 100 感染 BMSCs,置培养箱中培养 24 h,24 h 后换含有 15%胎牛血清体积分数的完全培养基继续培养。48 h 后荧光显微镜下观察转染 Ad-EGFP 的 BMSCs 绿色荧光蛋白的表达,检测转染效率。

1.2.4 免疫组化检测转染后细胞 BMP-2 的表达 消化 Ad-BMP-2 转染 48 h 后的细胞进行爬片, 4% 多聚甲醛固定,按 S-P 免疫组化试剂盒进行操作,DAB 显色,未转染组设置阴性对照,封片后行倒置显微镜观察。

1.2.5 BMSCs 复合 DBM 植骨材料 选取脱钙骨基质 24 块,放入体积分数为 15%胎牛血清的 DMEM 培养液中浸泡 12 h,无菌滤纸吸干备用。选取 BMP-2 基因转染 48 h 后的 BMSCs 与同期对照组细胞,胰酶消化后调整细胞密度为 1×10^6 个/mL 细胞悬液,每块接种 0.06 mL,细胞悬液充分渗入后放入 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度孵箱中贴附 4 h,再缓慢加入体积分数为 15%胎牛血清的 DMEM 培养液静置培养,隔天换液。培养 48 h 后倒置显微镜、荧光显微镜观察细胞黏附情况

1.2.6 观察细胞在 DBM 上黏附情况 各组与生物支架材料复合培养 6、12、24 h,随机抽取各组 4 块复合材料,PBS 冲洗 3 遍,去除未黏附的细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞并计数,计算细胞黏附率(黏附细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.2.7 扫描电镜观察 材料与细胞复合培养第 7 天,取各组

部分样品,PBS 漂洗, 2% 戊二醛固定,丙酮依次梯度脱水,乙酸异戊酯置换,临界点干燥,喷金后观察。通过扫描电镜观察材料表面细胞附着、分布、生长情况。

1.2.8 MTT 分析 DBM 植骨材料对转染后 BMSCs 存活及增殖的影响 实验分为实验组和对照组。实验组为转染 BMP-2 的 BMSCs/DBM 复合物,对照组为单纯转染 BMP-2 的 BMSCs,分别于 2、4、6、8 d 吸出原培养基,加 $100\ \mu\text{L}$ MTT ($5\ \text{g}/\text{L}$), 37°C 孵育 4 h 后,吸弃孔内上清液,加入二甲亚砜 $150\ \mu\text{L}$,振荡 15 min 裂解细胞,使沉淀物充分溶解;取出材料后在酶联免疫检测仪上测定吸光度(A)值,测定波长为 490 nm。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 复苏 复苏后的细胞生长状态良好,成梭状生长,旋涡状排列。细胞排列密集,单个细胞轮廓较清楚

2.2 Ad-EGFP 转染效率的检测 Ad-EGFP 在 MOI=100 时转染兔 BMSCs 48 h 后,在荧光显微镜观察下,转染后的细胞状态较好,镜下可见绿色荧光表达,肉眼观察转染效率达到 95%以上,经 Ad-BMP-2 转染后 BMSCs 荧光显微镜下可见绿色荧光,见图 1。

2.3 免疫组化检测 BMP-2 的表达 兔 BMSCs 转染 BMP-2 后免疫组化检测结果显示,细胞质中有棕黄色颗粒性染色,呈阳性表达(图 2),而未转染细胞内 BMP-2 蛋白水平较低,免疫组化结果提示阴性,细胞质无染色。

2.4 BMSCs 复合 DBM 植骨材料观察 复合 48 h 后,倒置显微镜下可见 DBM 材料具有良好孔隙与三维结构(图 3)。荧光显微镜下 Ad-EGFP 转染细胞与 DBM 复合组可观察到支架材料上细胞正常生长发出明亮绿色荧光,见图 4。

2.5 细胞在 DBM 上黏附率的测定 经细胞计数法检测,细胞与 DBM 复合 6 h 后,细胞黏附率为 $(70.00\pm 3.70)\%$;复合 12 h 后黏附率为 $(77.00\pm 4.60)\%$;复合 24 h 后黏附率为 $(80.00\pm 3.80)\%$ 。

2.6 扫描电镜观察 扫描电镜下 DBM 表面较平整,可见 DBM 呈现疏松多孔结构,孔径大小不一,形状不规则并相互交通。DBM 的孔隙直径为 $(215.00\pm 86.00)\ \mu\text{m}$,孔隙率达 $(76.00\pm 3.51)\%$,见图 5。细胞与 DBM 材料复合体外培养 7 d 后扫描电镜观察可见脱钙骨表面的细胞粘连成片,细胞布满孔隙,呈伸展状、立体状生长,见图 6。

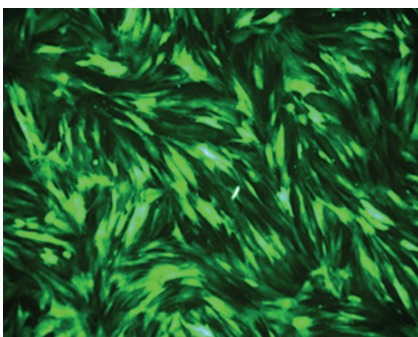


图 1 显微镜下见 Ad-BMP-2 转染后 BMSCs($\times 100$)

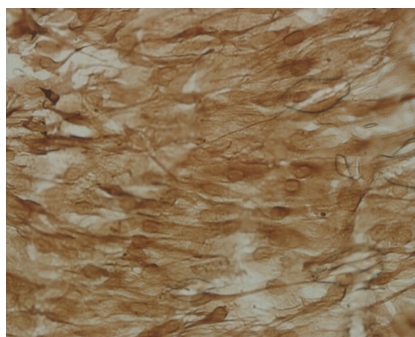


图 2 Ad-BMP-2/EGFP 转染 24 h 后 BMP-2 免疫组化结果($\times 200$)

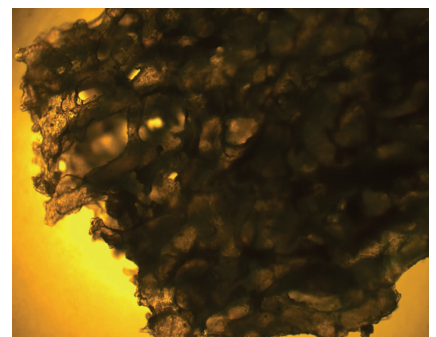


图 3 倒置显微镜下见支架材料细胞($\times 40$)

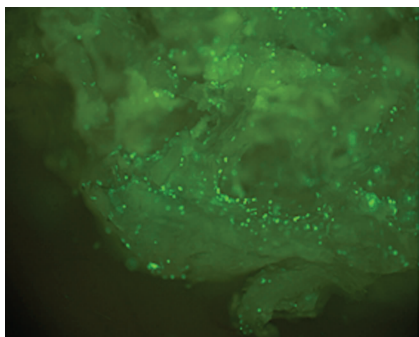


图 4 荧光显微镜下见支架材料细胞(×100)

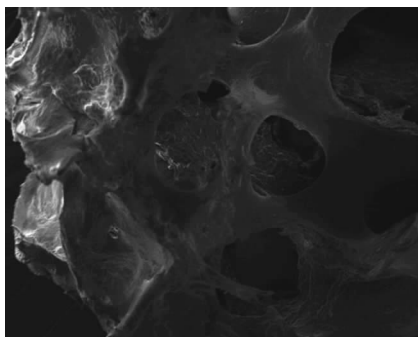


图 5 DBM 支架材料三维立体及孔隙结构(×200)

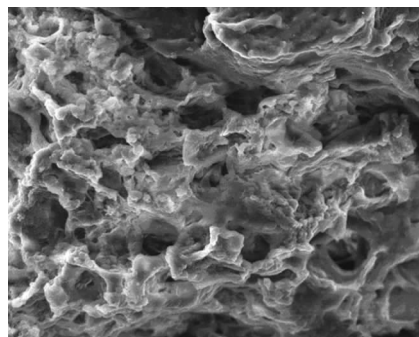


图 6 体外复合 7 d 后扫描电镜下细胞(×600)

2.7 MTT 分析 DBM 对 BMSCs 存活及增殖的影响 实验组与对照组的 A 值,都随时间延长而逐渐增高,经检测于 2、4、6、8 d 各组之间吸光度值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1

表 1 两组细胞 MTT A 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	2 d	4 d	6 d	8 d
对照组	0.17±0.53	0.22±0.66	0.30±0.68	0.37±0.64
实验组	0.16±0.69	0.23±0.42	0.29±0.74	0.34±0.78
P	0.62	0.74	0.61	0.30

3 讨 论

组织工程骨构建分为 3 个主要方面:种子细胞、细胞因子、支架材料。支架材料作为一个重要方面不仅影响细胞黏附后的生物学效应,而且决定组织工程骨植入体内后是否能与机体相结合并且进行修复作用。理想组织工程骨需要具有以下几个方面^[7-8]:(1)生物相容性。支架材料表面是否适于细胞黏附、生长、增殖与分泌骨基质,最好还应具备骨传导性与骨诱导性双重特性^[9-10]。支架材料在满足医用生物材料基本要求之外,材料植入体内后支架材料本身与其降解产物不会产生炎症反应、免疫反应与毒副作用。(2)物理性质。支架材料需要具有易于塑形,方便加工与操作,便于进一步应用。材料需要具备良好的三维立体孔隙结构,提供细胞生长、血管与神经长入的空间,同时便于代谢产物的排出。(3)降解性。生物支架材料应具备完全自我降解能力,为新生组织结构提供足够空间有利于自身骨组织重建。

BMP 是一类能够在体内外都有强烈的诱导启动成骨分化的作用,其作用贯穿整个成骨过程。其中 BMP-2 以其突出的骨诱导活性^[11-13],已被广泛应用于骨组织工程领域。本实验同时以腺病毒为载体介导 h-BMP2、EGFP 基因体外转染兔 BMSCs,通过观察发现转染后细胞生长情况正常,腺病毒转染效率大于 95%。EGFP 基因表达的 EGFP 蛋白,可在荧光显微镜下发绿色荧光,作为报告蛋白,间接反映 EGFP/BMP-2 基因成功进入细胞并表达相应目的蛋白^[14]。经 Ad-hBMP-2 转染后,转染后兔 BMSCs 细胞 rh-BMP-2 免疫组化结果呈阳性表达,提示兔 BMSCs 能够表达目的基因,利用腺病毒重组 BMP2 基因可以成功进行基因转移并且保持外源性基因在细胞内部的表达,通过过表达目的蛋白,促进 BMSCs 向成骨细胞分化,加快骨组织生成。

现阶段研究使用的组织工程骨主要由生物材料与人工合

成材料组成。人工合成材料植入体内后易出现排斥与炎症反应,并且人工合成材料不具备促进细胞增殖与分化的特点^[15],导致实验结果无法达到预期水平。本实验参照 Urist 等^[6]方法制得同种异体 DBM,经过检测后显示制备的 DBM 具有良好的三维立体与孔隙结构,其平均孔隙率约为(76.00±3.51)%,孔径大小为(215.00±86.00) μm 。以上数据说明制备 DBM 内部具有相互连通的空隙与足够空间从而有利于细胞在支架内部生长、增殖、血管神经长入、代谢及降解产物的排出。支架材料体外复合细胞培养能够简单、快速、便捷观察细胞与支架材料的生物相容性。本实验将经腺病毒转染 EGFP 后的细胞种植到 DBM 支架材料后继续置于完全培养基中培养,通过荧光显微镜下可见细胞生长状况良好,细胞黏附于支架材料上发出明亮绿色荧光。扫描电镜观察腺病毒转染 hBMP-2 后的细胞良好的贴附与于支架材料表面。细胞生长状态良好,伸出伪足至 DBM 孔隙中,细胞相互重叠紧密附着在周围的孔隙结构中。

本实验利用 MTT 法观察 BMSCs 的增殖情况,结果表明各组之间细胞生长与增殖情况良好,无明显差异,证明同种异体 DBM 支架材料对于细胞的生长、增殖无影响,说明同种异体 DBM 支架材料具备理想的生物相容性。

本实验运用腺病毒为载体重组 hBMP-2 转染 BMSCs 后种植同种异体 DBM 支架材料上,通过上述一系列观察证实种植于支架材料上的细胞生长情况良好,能够稳定吸附支架上,构建成稳定的组织工程骨,从而为进一步修复骨缺损动物模型奠定了基础。

参考文献

[1] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42 (2): 295-303.

[2] Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, et al. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo[J]. Tissue Eng, 2002, 8(3): 441-452.

[3] Santoni BG, Pluhar GE, Motta T, et al. Hollow calcium phosphate microcarriers for bone regeneration: in vitro osteoproduction and ex vivo mechanical assessment[J]. Biomed Mater Eng, 2007, 17(5): 277-289.

[4] 武成聪, 李强, 陈佳滨, 等. 短期冻存兔骨髓间充质干细胞对其生物特性的影响[J]. 重庆医学, 2014, (下转第 1304 页)

林敏感葡萄球菌感染则建议选用氨苄西林/舒巴坦 1.50 g 每天 4 次、头孢呋辛 0.75 g 每天 3 次、阿米卡星 0.60 g 每天 1 次、和莫西沙星 0.40 g 每天 1 次治疗;如为甲氧西林耐药葡萄球菌或不能确定是否甲氧西林耐药菌感染,则建议选用利奈唑胺 0.40 g 每天 2 次或万古霉素 0.75 g 每天 2 次治疗。需要说明的是,本研究是基于 Mohnarin 2011 年度报告中 ICU 细菌耐药性监测结果作出的,并且细菌耐药情况对给药方案有较大的影响,因此,临床实践中,要充分考虑 ICU 葡萄球菌的耐药情况和本地区的流行病学情况作出调整。在缺乏相关数据情况下的经验性用药,本研究结果仍具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] Drusano GL, Preston SL, Hardalo C, et al. Use of preclinical data for selection of a phase II/III dose for evernimicin and identification of a preclinical MIC breakpoint[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 13-22.
- [2] 赵学群, 王屏, 姜伟, 等. 耐甲氧西林表皮葡萄球菌感染患者万古霉素的给药方案探讨[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(14): 3496-3497, 3500.
- [3] Stevens DL, Herr D, Lampiris H, et al. Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(11): 1481-1490.
- [4] 沈萍, 魏泽庆, 陈云波, 等. Mohnarin 2011 年度报告: ICU 细菌耐药性监测 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(24): 5472-5476.
- [5] 汪复, 张婴元. 实用抗感染治疗学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 152-320.
- [6] Frei CR, Wiederhold NP, Burgess DS. Antimicrobial breakpoints for Gram-negative aerobic bacteria based on pharmaco-

kinetic-pharmacodynamic models with Monte Carlo simulation[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(3): 621-628.

- [7] Meyers BR, Wilkinson P, Mendelson MH, et al. Pharmacokinetics of ampicillin-sulbactam in healthy elderly and young volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(10): 2098-2101.
- [8] 张婴元, 汪复, 张菁, 等. 头孢菌素类的临床药物动力学研究及给药方案的制订 [J]. *中华传染病杂志*, 1995(4): 195-198.
- [9] 张沂, 王洪武, 王睿, 等. 阿米卡星的临床药理学与体内抗生素后效应 [J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(5): 321-323.
- [10] Kontou P, Manika K, Chatzika K, et al. Pharmacokinetics of moxifloxacin and high-dose levofloxacin in severe lower respiratory tract infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 42(3): 262-267.
- [11] 张雷. 利奈唑胺在中国人群的群体药代/药效动力学研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011.
- [12] 胡瑾瑜, 施耀国, 张菁, 等. 万古霉素在健康老年人和年轻人的药代动力学 [J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2003, 3(3): 138-142.
- [13] Kuti JL, Kiffer CR, Mendes CM, et al. Pharmacodynamic comparison of linezolid, teicoplanin and vancomycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase - negative staphylococci collected from hospitals in Brazil [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(2): 116-123.
- [14] Sarro AD, Fera MT. New and investigational antimicrobials for the treatment of severe skin infections [J]. *Curr Drug Ther*, 2008, 3(1): 54-69.

(收稿日期: 2014-10-15 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 1299 页)

- 43(4): 459-461.
- [5] 中华人民共和国科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2007(4): 35-36.
- [6] Urist MR, Mikulski A, Boyd SD. A chemosterilized antigen-extradigested alloimplant for bone banks [J]. *Arch Surg*, 1975, 110(4): 416-428.
- [7] Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(20): 4095-4103.
- [8] Yarlagadda PK, Chandrasekharan M, Shyan JY. Recent and current developments in tissue scaffolding [J]. *Biomed Mater Eng*, 2005, 15(3): 159-177.
- [9] Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, et al. Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(33): 3944-3967.
- [10] Wang Y, Huang YC, Gertzman AA, et al. Endogenous regeneration of critical-size chondral defects in immunocompromised rat xiphoid cartilage using decellularized human bone matrix scaffolds [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18

(21/22): 2332-2342.

- [11] Chung JH, Jeon HJ, Hong SY, et al. Palmitate promotes the paracrine effects of macrophages on vascular smooth muscle cells; the role of bone morphogenetic proteins [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e29100.
- [12] McCullough KA, Waits CA, Garimella R, et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6 and 7 during induced heterotopic bone formation [J]. *J Orthop Res*, 2007, 25(4): 465-472.
- [13] Zhang YF, Song JH, Shi B, et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4635-4642.
- [14] 刘永亮, 叶钢, 易善红, 等. BMP7 和 EGFP 重组腺病毒体外转染兔骨髓间充质干细胞的研究 [J]. *四川医学*, 2008, 29(2): 129-131.
- [15] Ellis E 3rd, Messo E. Use of nonresorbable alloplastic implants for internal orbital reconstruction [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 62(7): 873-881.

(收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2014-12-10)