

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.20.002

PHBHHx 与人脐带间充质干细胞的体内异位成骨研究*

马敏先¹, 何志旭², 王梅³, 叶川⁴, 王永¹, 曾筱¹, 张俊标¹, 刘琴¹

(1. 贵州医科大学附属医院口腔修复科, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学干细胞与组织工程中心, 贵阳 550004; 3. 贵州省贵阳市口腔医院口腔修复科 550002; 4. 贵州医科大学附属医院骨科, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 探讨以 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯(PHBHHx)为支架材料, 以人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)为种子细胞的复合物体内构建组织工程骨的能力。方法 将 hUCMSCs 接种在 PHBHHx 上体外成骨诱导培养 2 周, 诱导组为实验组, 不滴加 hUCMSCs 组为对照组, 植入裸鼠皮下, 并分别于 1、3、5 个月取材行 HE、I 型胶原免疫组织化学、碱性磷酸酶染色及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测。结果 PHBHHx 表现出良好的细胞吸附性。实验组细胞大、小形态基本保持原状, 成骨特异性指标检测均为阳性; 对照组细胞则不能保持原状, 体积逐渐缩小至完全降解, 成骨特异性指标均为阴性。结论 PHBHHx 复合 hUCMSCs 经体外成骨诱导后具有在裸鼠体内异位构建组织工程骨的能力。

[关键词] 间充质干细胞; 组织工程; 骨; 3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯

[中图分类号] R68

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)20-2740-04

Heterotopic osteogenesis in vivo of PHBHHx and human umbilical cord mesenchymal stem cells*

Ma Minxian¹, He Zhixu², Wang Mei³, Ye Chuan⁴, Wang Yong¹, Zeng Xiao¹, Zhang Junbiao¹, Liu Qin¹

(1. Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Center of Stem Cells and Tissue Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Department of Prosthodontics, Guiyang Municipal Stomatological Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 4. Department of Orthopedic, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the ability for constructing tissue engineering bone in vivo in complex scaffolds with PHBHHx as the scaffolds material and human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMCs) as the seed cells. **Methods** hUCMSCs were inoculated into PHBHHx scaffolds to induce osteogenesis culture in vivo for two weeks, the the induced group was the experimental group and those without instilling hUCMCs served as the control group, the nude mouse subcutaneous implantation was performed. Then taking material at 1, 3, 5 months after implantation in vivo was performed for conducting HE, collagen I immunohistochemical, alkaline phosphatase staining and RT-PCR. **Results** hUCMSCs showed good cellular adsorbability. The size and form in the experimental group basically maintained the original status, and the osteogenesis specific indicators were positive; but the control group did not keek the original status, its volume was gradually shrunk until complete degradation, and the osteogenesis specific indicators were negative. **Conclusion** The PHBHHx scaffolds combined with hUCMSCs has the capability of in vivo heterotopic constructing tissue engineering bone in nude mouse by in vitro osteogenic induction.

[Key words] mesenchymal stem cells; tissue engineering; bone; PHBHHx

近年来,种植义齿已成为牙列缺损或缺失患者主流的修复方法。目前采用的引导骨再生技术、上颌窦提升术等只能修复少量的牙槽骨缺损;自体骨移植虽然安全可靠,无免疫排斥,但将造成供区继发损伤和并发症;异体或异种骨移植能修复较大骨缺损,但存在免疫排斥。如今骨组织工程已被认为是修复大段骨缺损最有希望的方法之一^[1],支架材料与种子细胞是其中最重要的两个因素。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)含量丰富,具有低免疫原性,取材及分离培养过程对供者无损害,不涉及社会伦理等方面的争议,在组织工程领域具有广阔的应用前景^[2-3]。3-羟基丁酸-3-羟基己酸共聚酯(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate, PHBHHx)因具有较佳的力学性能、良好的生物相容性和可完全降解性,在组织工程和医用材料领域备受关注^[4-6]。目前,PHBHHx在组织工程软骨、血管、心脏瓣膜等领域研究较多^[7],但在骨组织工程研究领域中国内、外报道甚少。本实验以 hUCMSCs 为种子细胞,以 PHBHHx 为支架材料,对 hUCMSCs 和 PHBHHx 作为骨组织工程种子细胞和可

吸收载体材料应用的可行性进行研究。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司, SPF 级, 4~5 周龄, 16~18 g, 许可证号: SCXK(京)2009-0007。

1.2 仪器与试剂 Thermo 3131 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司, 中国), Nikon TE-2000 型倒置相差显微镜(Nikon 公司, 日本), 2331 型 PCR 扩增仪(Eppendorf 公司, 德国), BYY-BC 型电泳仪(北京六一仪器厂); DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国), 胎牛血清(杭州四季青), 碱性磷酸酶染色试剂盒(南京建成生物有限公司), I 型胶原免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

1.3 脐带及支架材料来源 脐带从贵州医科大学附属医院产科获得, 均来自足月妊娠剖宫产健康胎儿。经产妇及家属同意, 脐带标本用于科学实验研究。PHBHHx 由清华大学化工系研制并提供, 孔径为 100~200 μm, 孔隙率 90%, 孔间相互连通。

1.4 实验方法

1.4.1 hUCMSCs 体外分离培养及鉴定 无菌收集脐带, 剥

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目[黔科合 J 字(2010)2177 号];贵州省科学技术联合基金资助项目[黔科合 LG 字(2012)002 号]。

作者简介:马敏先(1971—), 副主任医师, 硕士, 主要从事种植及骨组织工程方面的研究。

离华通胶,将其剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,均匀接种于含完全培养基(低糖 DMEM 培养基和 10% 胎牛血清)的培养瓶内,置 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱内培养,倒置显微镜观察细胞的生长和形态变化;当细胞生长融合达 90% 时,按 1:2 的比例传代。

1.4.2 hUCMSCs 向成骨细胞诱导分化及鉴定 收集第 4 代 hUCMSCs,将细胞以 1×10⁵/mL 的密度接种于 6 孔板,用完全培养基进行培养,次日实验组更换成诱导培养基(含 10% 胎牛血清、1×10⁻⁸ mol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C、10 mmol/L β-甘油磷酸钠的高糖 DMEM 培养基)进行成骨细胞诱导,对照组用完全培养基进行培养,每 3 天更换 1 次培养液,诱导 14 d 后进行 I 型胶原免疫组织化学和碱性磷酸酶染色(alkaline phosphatase,ALP)染色,21 d 后进行茜素红染色。

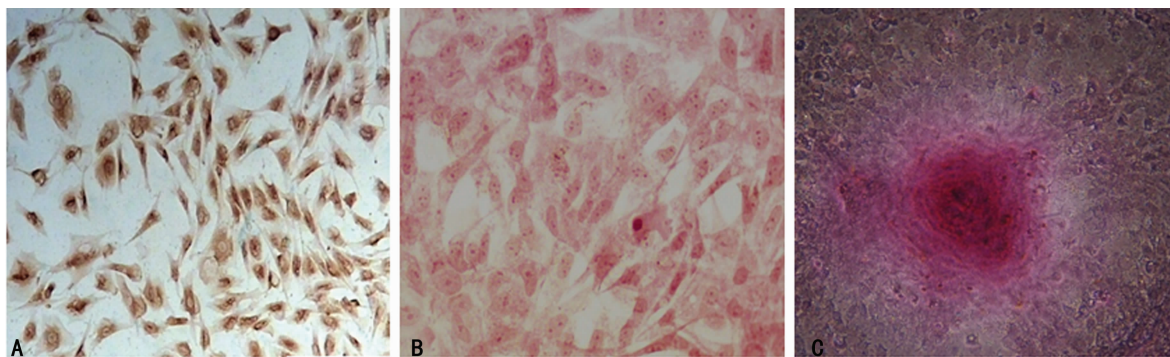
1.4.3 hUCMSCs/PHBHHx 复合物的构建并植入裸鼠皮下 将 PHBHHx 切成 1.00 cm×0.50 cm×0.05 cm 大小,高温高压消毒,利用完全培养基浸泡备用。收集第 4 代 hUCMSCs,按 2×10⁷/mL 的密度将细胞悬液滴加在 PHBHHx 上,2 d 后更换培养基,实验组更换为成骨诱导液,对照组则是未滴加细胞成分的 PHBHHx。hUCMSCs/PHBHHx 体外复合培养 2 周,用 10% 水合氯醛作裸鼠腹腔注射麻醉(5 mL/kg),消毒皮肤,在背部正中切开长约 1 cm,血管钳钝性分离后左侧和

右侧皮下分别植入实验组和对照组细胞/材料复合物,实验组和对照组各植入 12 块复合物。术后裸鼠单只分笼饲养,观察裸鼠整体和切口愈合情况及复合物形态变化。

1.4.4 检测指标 于植入后第 1、3、5 个月分别予戊巴比妥安乐死处理 4 只裸鼠,石蜡包埋,组织切片行 HE、I 型胶原免疫组织化学、ALP 染色。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测第 3、5 个月实验组和对照组的骨特异性 I 型胶原和骨桥蛋白 mRNA 的表达情况。引物由上海生工生物工程有限公司合成,扩增产物的大小及引物序列分别如下:β-actin 的扩增产物大小为 564 bp,上游引物 5'-CTG GGA CGA CAT AGG AGA AAA-3',下游引物 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3'; I 型胶原蛋白扩增产物大小为 371 bp,上游引物 5'-GGC AAG GTG TTG TGC GAT GAC-3',下游引物 5'-AGA CCA CGA GGA CCA GAG GGA C-3';骨桥蛋白扩增产物大小为 280 bp,上游引物 5'-TGC TGG TGT AGA CCC CAA AAG-3',下游引物 5'-CAG GGA GTT TCC ATG AAG CCA C-3'。

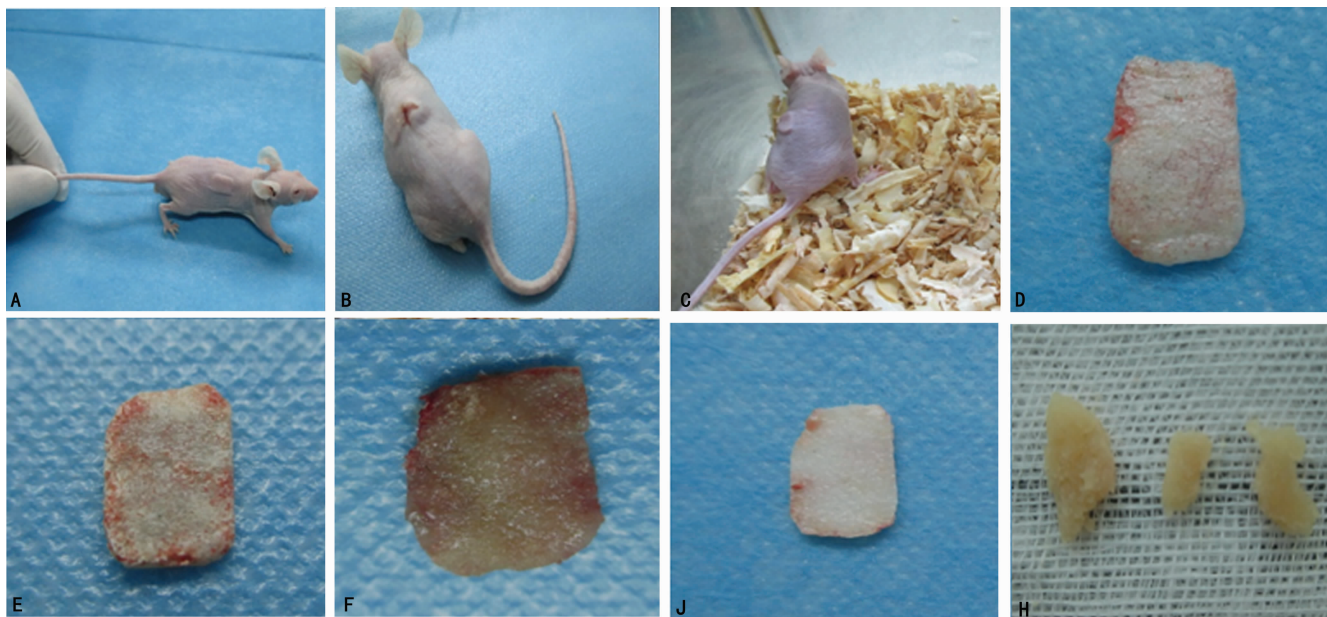
2 结 果

2.1 hUCMSCs 形态学观察及鉴定 原代培养 6 d 左右组织块周围有细胞爬出,贴壁生长,12 d 左右细胞生长增快、数量增多,呈平行排列或漩涡状生长,传至第 4 代以后,细胞形态较单一,多为长梭形。



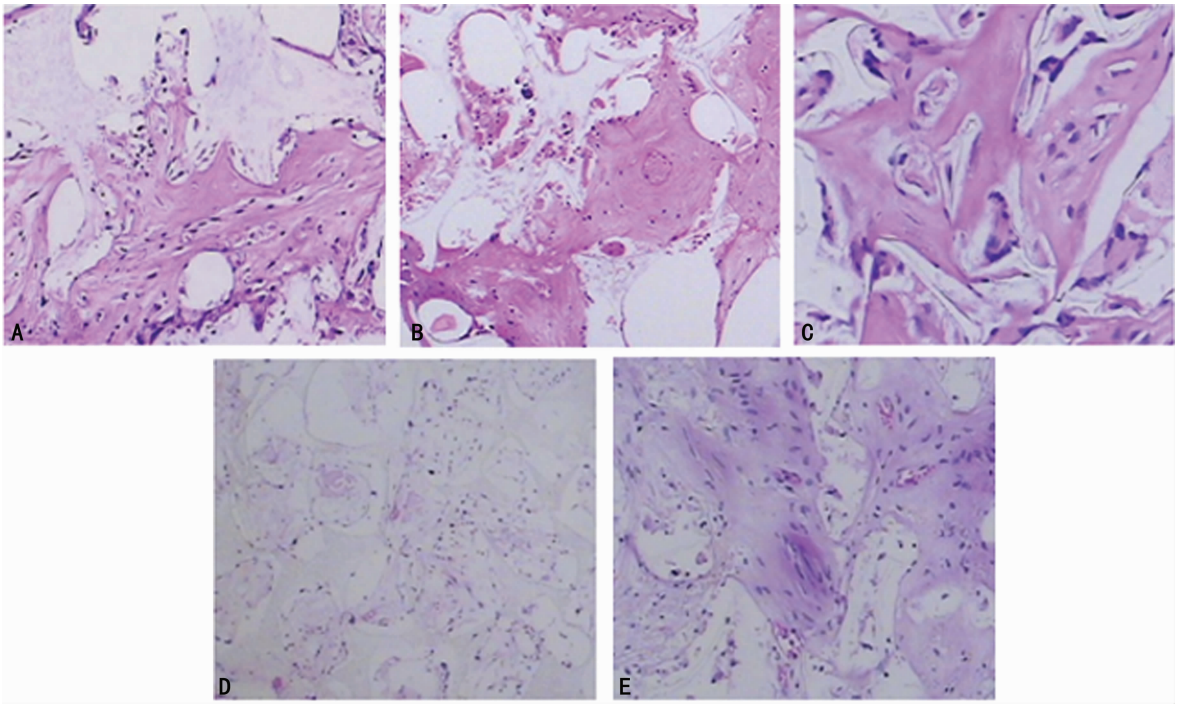
A:成骨细胞 I 型胶原免疫组织化学染色(×100);B:成骨细胞碱性磷酸酶染色(×100);C:成骨细胞茜素红染色(×100)。

图 1 hUCMSCs 成骨分化及鉴定



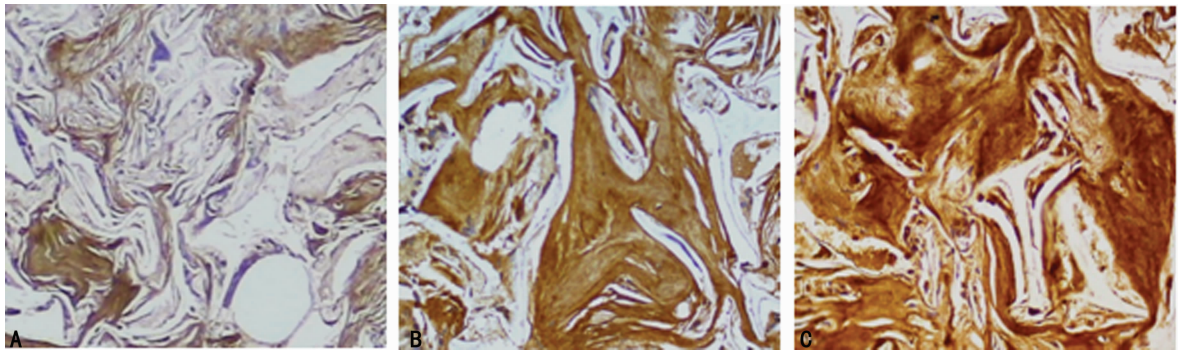
A~C:hUCMSCs/PHBHHx 植入裸鼠背部皮下 1(A)、3(B)、5(C)个月大体观;D~F:hUCMSCs/PHBHHx 实验组植入 1(D)、3(E)、5(F)个月大体观;G~H:hUCMSCs/PHBHHx 对照组植入 1(G)、3(H)个月大体观。

图 2 hUCMSCs/PHBHHx 复合物植入裸鼠大体观



A~C: hUCMSCs/PHBHHx 实验组植入 1(A)、3(B)个月 HE 染色($\times 100$), 5(C)个月 HE 染色($\times 300$); D~E: PHBHHx 对照组植入 1(D)、3(E)个月 HE 染色($\times 100$)。

图 3 hUCMSCs/PHBHHx 复合物 HE 染色



A: 1 个月; B: 3 个月; C: 5 个月。

图 4 hUCMSCs/PHBHHx 实验组植入 1、3、5 个月 I 型胶原免疫组织化学染色($\times 100$)

2.2 hUCMSCs 成骨分化及鉴定 成骨诱导 14 d, I 型胶原免疫组织化学染色呈阳性, 细胞膜及细胞外基质呈棕黄色, 提示局部有 I 型胶原合成和分泌(图 1A), 对照组染色呈阴性; 碱性磷酸酶染色呈阳性, 胞质中呈现灰黑色颗粒或条状、块状沉淀(图 1B), 对照组染色呈阴性; 成骨诱导 21 d, 茜素红染色呈阳性, 细胞汇合聚集后呈多层重叠生长, 圆形的矿化结节呈红色, 周围折光性增强(图 1C), 对照组细胞无矿化结节形成, 染色呈阴性。

2.3 hUCMSCs/PHBHHx 复合物植入裸鼠大体观 实验组细胞/支架复合物的大小形态于 1、3、5 个月基本保持原状, 质地变硬; 而对照组细胞/支架复合物则不能保持原状, 体积逐渐缩小至完全降解(图 2A、2B、2C)。实验组 1 个月时取材见大部分区域仍呈灰白色, 表面形成纤维包裹, 略光滑, 质韧; 3 个月时表面微红, 质地稍硬, 仍有少量材料残留; 5 个月时复合物被硬组织替换, 色红, 厚度增加, 硬度增大, 新生血管相互融合(图 2D、2E、2F)。对照组 1 个月时取材见植入物体积缩小, 表面呈灰白色, 未见纤维包裹; 3 个月时体积明显缩小, 大多降解, 仅残留少许碎块, 色泽略深; 5 个月时完全降解, 仅见少许黏液样物质(图 2G、2H)。

2.4 HE 染色 实验组 1 个月时细胞沿 PHBHHx 孔壁生长,

骨组织雏形形成, 骨小梁、骨髓腔组织结构清楚, 骨小梁周边成骨细胞被覆并产生骨基质, 骨基质内见骨细胞及小血管增生, 部分材料降解; 3 个月时较多编织骨组织和少量板层骨组织形成, 组织结构清楚, 板层骨内见哈弗斯系统雏形, 仍有少量材料残留; 5 个月时较多板层骨组织形成, 结构清楚, 板层骨内见较多哈弗斯系统样结构形成, 大量骨小梁形成, 其内见较多骨细胞, 表面被覆生长活跃的成骨细胞, 材料完全降解(图 3A、3B、3C)。对照组 1 个月时 PHBHHx 表面有大量的空泡和较多的炎性细胞, 见明显 PHBHHx 残留; 3 个月时 PHBHHx 表面有少量的空泡和炎性细胞, 无明显 PHBHHx 残留(图 3D、3E)。

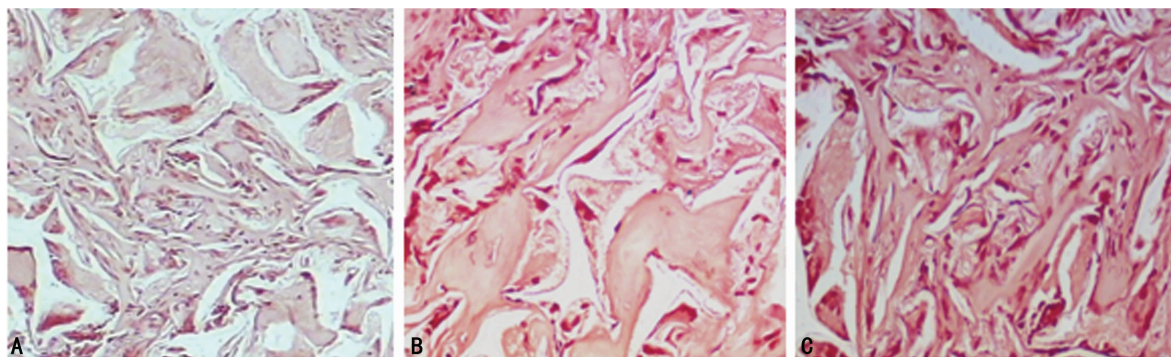
2.5 I 型胶原免疫组织化学染色 实验组 1 个月时呈微弱阳性(图 4A), 3 个月时呈阳性(图 4B), 5 个月时呈强阳性, 细胞外基质有大量的棕黄色异染区(图 4C); 对照组染色阴性。

2.6 碱性磷酸酶染色 实验组 1 个月时呈微弱阳性(图 5A), 3 个月时呈阳性(图 5B), 5 个月时呈强阳性, 呈蓝紫色表达(图 5C); 对照组染色阴性。

2.7 RT-PCR 检测 实验组 3 个月时 I 型胶原蛋白 mRNA 在 371 bp 条带表达, 骨桥蛋白 mRNA 呈阴性表达; 对照组均呈阴性表达(图 6A、6B)。5 个月时 I 型胶原蛋白 mRNA 在

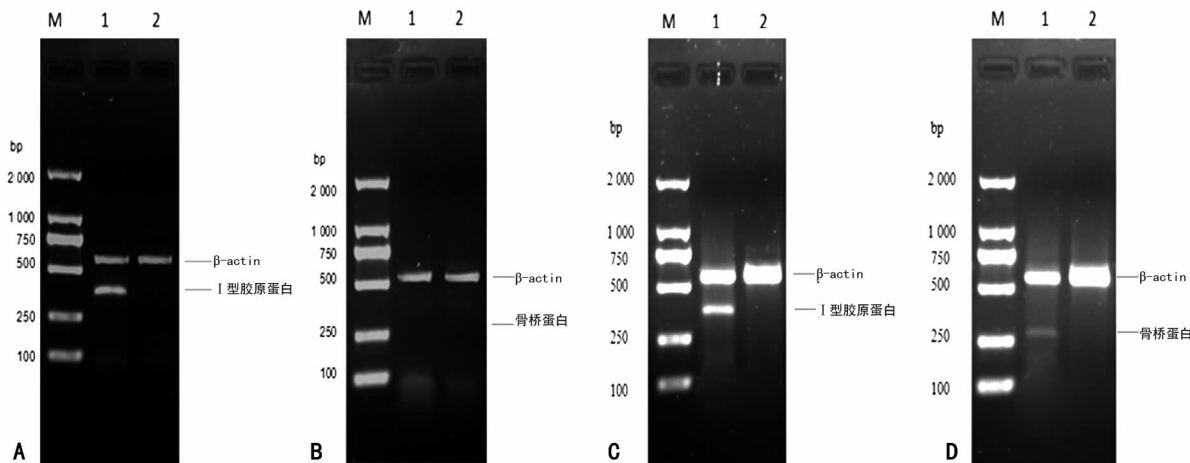
371 bp 条带表达,骨桥蛋白 mRNA 在 280 bp 条带表达;对照

组均呈阴性表达(图 6C、6D)。



A:1 个月;B:3 个月;C:5 个月。

图 5 hUCMSCs/PHBHHx 实验组植入 1、3、5 个月碱性磷酸酶染色(×100)



A~B:hUCMSCs/PHBHHx 植入 3 个月 I 型胶原、骨桥蛋白的基因表达;C、D:hUCMSCs/PHBHHx 植入 5 个月 I 型胶原、骨桥蛋白的基因表达;1:实验组;2:对照组。

图 6 hUCMSCs/PHBHHx 复合物的基因表达

3 讨论

种子细胞的获取是骨组织工程研究的基础。体外分离扩增 hUCMSCs 的方法目前主要有酶消化法和组织块贴壁法。前者具有快速分离 MSCs 的优势,但酶体系有可能降解细胞外膜,甚至对细胞造成损伤,影响细胞贴壁。本实验选用组织块贴壁法对华通胶来源的 hUCMSCs 进行体外分离培养,研究结果与徐燕等^[8]的一致,该方法能更加简单、经济、快捷地分离出具有高增殖活性及多向分化潜能的 MSCs。

可吸收支架材料是骨组织工程的核心要素之一。材料的物理性质会对细胞的黏附等产生很大的影响,亲水性的表面有利于细胞的黏附和生长,多孔结构用于营养物质的渗透和细胞的正常代谢。一般通过表面改性的方法加以改进,如通过培养基浸泡离子注入,多聚赖氨酸包埋等对材料表面进行修饰以改善其亲水性和细胞吸附性^[9-10]。本实验通过用完全培养基浸泡支架材料的方法,提高材料的亲水性,结果发现:材料上的细胞数量增多,呈梭形或多角形,表面光滑,增殖较快。说明用完全培养基浸泡后的材料更能模拟细胞的体外生长环境,有利于细胞的黏附和增殖。

hUCMSCs/PHBHHx 复合物植入裸鼠背部皮下,诱导组细胞/支架复合物的大小形态于第 1、3、5 个月基本保持原状,但质地变硬。HE 染色诱导组 1 个月时见骨组织雏形,3 个月时见较多编织骨组织及哈弗斯系统雏形,5 个月时见较多板层骨组织及哈弗斯系统样结构,这说明植入物在体内经历 5 个月的成熟并逐渐成骨。I 型胶原免疫组织化学及 ALP 染色由弱

阳性-阳性-强阳性的过程正好印证了植入物在体内的成骨情况。以上均表明诱导组在脱离体外诱导环境后 hUCMSCs 并未失去成骨细胞表型同时能继续增殖及分泌细胞外基质,可以代偿 PHBHHx 的降解而维持整个复合物的原有形态。对照组 PHBHHx 则不能保持原状,体积逐渐缩小至完全降解。HE 染色 1 个月时 PHBHHx 表面有较多的炎性细胞,见明显材料残留;3 个月时 PHBHHx 表面有少量的炎性细胞,无明显材料残留。相关特异性指标均为阴性。提示 PHBHHx 作为支架材料在体内有良好的生物相容性和合适的降解率。

RT-PCR 检测又从基因层面验证了以上结果,其中 I 型胶原蛋白在第 3、5 个月时基因表达均呈阳性,而 OPN 基因表达在第 3 个月时呈阴性,第 5 个月时呈弱阳性。可能因为 OPN 是成骨分化中晚期的标志,细胞/支架复合物经体外诱导植入体内成骨需要一定的时间积累,要形成成熟的骨组织,还需要体内相关环境因素的作用^[11-14],如生理刺激等^[15]。

本实验基于骨组织工程的基本原理,结果提示 PHBHHx 复合 hUCMSCs 经体外成骨诱导后具有在裸鼠体内异位构建组织工程骨的能力,为初步构建组织工程骨提供实验依据。但细胞上架率低、分布不均匀、PHBHHx 仍存在亲水性等方面的不足需要在以后的实验中进一步改进。

参考文献

[1] Jayasuriya AC, Shah C, Ebraheim NA, et al. Acceleration of biomimetic mineralization to apply (下转第 2747 页)

参考文献

- [1] 余艺,傅晓英,周昭远,等. 脂肪肝及其腹围与代谢综合征的相关性研究[J]. 海南医学,2011,22(18):13-16.
- [2] 张亚辉,周伏喜,卢放根. 大黄素对大鼠非酒精性脂肪肝及其糖脂代谢紊乱的防治作用[J]. 海南医学,2013,24(5):636-638.
- [3] 蔡佳,贺娟,徐贵丽. 他汀类药物的临床应用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2015,15(2):281-283.
- [4] 王婧,赵泉. 他汀类药物用于糖尿病治疗的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2015,15(2):145-147.
- [5] 张艳敏. 辛伐他汀的不良反应报告[J]. 中国药物经济学,2013(S1):401-402.
- [6] 李敏. 辛伐他汀的不良反应及药物相互作用分析[J]. 中国现代药物应用,2014,8(17):93-94.
- [7] 刘菲,徐源廷,任大伟,等. 掺银聚磷酸钙对成骨细胞分泌血管内皮生长因子的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(47):9269-9272.
- [8] 秦俊法,潘伟清. 饮用天然矿泉水的锶限量指标[J]. 广东微量元素科学,2001,11(1):16-23.
- [9] 殷健. 锶治疗前列腺癌、乳腺癌、肺癌骨转移的临床疗效[J]. 吉林医学,2013,34(25):5178-5179.
- [10] Pemmer B, Hofstaetter JG, Meirer F, et al. Increased strontium uptake in trabecular bone of ovariectomized calcium-deficient rats treated with Strontium ranelate or Strontium chloride[J]. J Synchrotron Radiat,2011,18(Pt 6):835-841.
- [11] 蔡波,张建军. 氯化锶治疗骨质疏松症的疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(31):3464-3465.
- [12] 李牧,杨佳琳,杨庭树,等. 微量元素锶对实验性兔动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. 中国医药导报,2012,9(12):17-19.
- [13] 万英,陈蓉,冯志强,等. 富锶矿泉水对大鼠血清生化指标的影响[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(2):133-136.
- [14] 汪澍,弓慧杰,李著华. 锶矿泉水联合格列美脲对 2 型糖尿病大鼠血脂的影响[J]. 黑龙江医学,2013,37(1):4-8.
- [15] Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, et al. Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene[J]. J Clin Invest, 1997, 100(8):2115-2124.
- [16] 柳童斐,宋保亮. 胆固醇合成途径的负反馈调控机制[J]. 中国细胞生物学报,2013,35(4):401-409.
- (收稿日期:2015-12-18 修回日期:2016-03-02)
-
- (上接第 2743 页)
- in bone regeneration[J]. Biomed Mater, 2008, 3(1):15003.
- [2] Wang L, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(8):2259-2266.
- [3] 隋杰,李志忠,孙国栋,等. 聚左旋乳酸多孔支架材料复合人脐带间充质干细胞的异位成骨[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(12):2120-2124.
- [4] Bian YZ, Wang Y, Aibaidoula G, et al. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration[J]. Biomaterials, 2009, 30(2):217-225.
- [5] Ye C, Li J, He Z, et al. Multilineage differentiation of muscle-derived stem cells from GFP transgenic mice[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(11):1745-1752.
- [6] Xiong YC, Yao YC, Zhan XY, et al. Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2010, 21(1):127-140.
- [7] Ye C, Hu P, Ma MX, et al. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering[J]. Biomaterials, 2009, 30(26):4401-4406.
- [8] 徐燕,李长虹,孟恒星,等. 人脐带间充质干细胞分离培养条件的优化及其生物学特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(32):6289-6294.
- [9] Jacobs T, Morent R, De Geyter N, et al. Plasma surface modification of biomedical polymers; influence on cell-material interaction[J]. Plas Chem Plas Proc, 2012, 32(5):1039-1073.
- [10] Mirmohammadi SA, Khorasani MT, Mirzadeh H, et al. Investigation of plasma treatment on poly(3-hydroxybutyrate) film surface: characterization and invitro assay[J]. Polym Plast Technol Eng, 2012, 51(13):1319-1326.
- [11] 章文苑,律娅婧. 纳米羟基磷灰石/I 型胶原/壳聚糖复合支架材料的制备与优化[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2011, 8(3):1-4.
- [12] Perrier E, Ronzière MC, Bareille R, et al. Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(10):2091-2101.
- [13] Mahnoudifar N, Doran PM. Chondrogenesis and cartilage tissue engineering the longer road to technology development[J]. Trends Biotechnol, 2012, 30(3):166-176.
- [14] 张清林,吕惠成,吴一民. 转化生长因子 $\beta 1$ 联合骨形态发生蛋白 2 诱导骨髓间充质干细胞体外向软骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4371-4375.
- [15] Park JS, Yang HN, Woo DG, et al. The promotion of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis of human mesenchymal stem cells by multiple growth factors incorporated into nanosphere-coated microspheres[J]. Biomaterials, 2011, 32(1):28-38.
- (收稿日期:2015-12-08 修回日期:2016-02-26)