

负载 BMP 的新型组织工程骨的构建及骨缺损修复实验

胡稷杰¹, 金丹¹, 全大萍², 钟世镇³, 陈灵昊¹, 魏宽海¹, 赵洁², 裴国献¹(南方医科大学¹南方医院创伤骨科,³临床解剖研究所, 广东广州 510515;²中山大学高分子研究所, 广东广州 510275)

摘要:目的 探讨以聚乳酸-乙醇酸(poly-(D, L-lactide-co-glycolide), PLGA)、骨形态发生蛋白(BMP)、骨髓基质干细胞(BMSCs)构建新型组织工程骨并观察其在动物体内的成骨能力。方法制作新西兰大白兔右桡骨中段 15 mm 骨缺损实验模型, 随机分为实验组、对照组和空白组, 实验组植入同时负载 5 mg BMP 及 1×10^6 个已向成骨细胞诱导的 BMSCs 的 PLGA、对照组植入负载 1×10^6 个已向成骨细胞诱导的 BMSCs 的 PLGA、空白组仅植入 PLGA。术后对动物进行大体观察、摄 X 线片观察各组不同时相骨缺损修复情况、比较不同时相的骨缺损区 X 线阻射密度、并于术后第 4、8、12 周取出骨缺损区标本进行大体观察和组织学切片观察, 图像分析骨小梁的生成数量。结果 实验组在 12 周内骨缺损完全修复, 且同时期内新生骨的数量和质量显著优于对照组, 空白材料组骨缺损主要由纤维结缔组织填充。结论 利用含 BMP 的 PLGA 支架与 BMSCs 复合构建的新型组织工程骨具有良好的骨缺损修复能力。

关键词:骨形态发生蛋白; 聚乳酸-乙醇酸; 骨髓基质干细胞; 组织工程

中图分类号: R322.71 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)11-1369-06

Bone defect repair with a new tissue-engineered bone carrying bone morphogenetic protein in rabbits

HU Ji-jie¹, JIN dan¹, QUAN Da-ping², ZHONG Shi-zhen³, CHEN Jiong-hao¹, WEI Kuan-hai¹, ZHAO Jie², PEI Guo-xian¹
¹Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital, ³Institute of Clinical Anatomy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Polymer Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To construct a new tissue-engineered bone with poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA), bone morphogenetic protein (BMP) and bone marrow-derived stem cells (BMSCs) and observe its effect in repairing segmental bone defects. **Methods** A 15-mm bone defect in the right radius was induced in New Zealand white rabbits, and the models were randomized into three groups to receive implantation of the tissue-engineered bone grafts constructed with PLGA carrying 5 mg BMP and about 1×10^6 BMSCs (experimental group), grafts of PLGA with about 1×10^6 BMSCs (control group), or grafts of exclusive PLGA (blank control group), respectively. The osteogenesis in the bone defect after the implantation on was evaluated X-ray films, and the histological changes of the tissues sampled from the bone defect 4, 8, and 12 weeks after operation were observed and new bone formation was measured by image analysis. **Results** The bone defect was completely repaired in the experimental group 12 weeks after the implantation, showing the best results among the 3 groups. The bone defects in the blank control group was filled with only fibrous and connective tissues at 12 weeks. **Conclusion** This tissue-engineered bone constructed with PLGA, BMP and BMSCs possesses good ability in repairing segmental bone defect.

Key words: bone morphogenetic protein; poly (D, L-lactide-co-glycolide); bone marrow-derived stem cells; tissue engineering

临床上的各种原因导致的骨缺损的治疗一直未能得到圆满解决。目前临床使用的自体骨与异体骨移植治疗骨缺损方法均有不同程度的缺陷。骨组织工程研究为解决这一问题提供了新的思路。组织工程骨的体外构建可以用种子细胞和包含或不包含细胞因子的支架材料来进行^[1]。种子细胞主要是指具有向成骨

系分化的干细胞如骨髓基质干细胞(BMSCs);骨形态发生蛋白(BMP)是研究较早的骨生长因子,其诱导成骨的作用已被多次实验所证实。它是唯一能够单独诱导骨组织形成的局部生长因子,在一定条件下,能诱导未分化的间充质细胞向骨系细胞转化,促进骨细胞的生长增殖^[2];聚乳酸(PLA)及其与聚羟基乙酸的共聚物(PLGA)是一种生物相容性良好的可降解材料,其降解机制为主链含有不稳定易被水解或酶解的化学键,故目前公认 PLA/PLGA 是一种良好的可生物降解的控释骨架,且具有支架和缓释的双重作用,本课题前期研究也证明 PLGA 对 BMSCs 的形态与增殖、细胞周期、DNA 含量及倍体水平均无影响^[3]。

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 国家高新技术发展项目(2003AA205010)

Supported by National High-Tech Development Program of China (2003AA205010)

作者简介: 胡稷杰(1979-), 硕士, 研究方向: 骨组织工程, 电话: 020-61641745; 61360586, E-mail: hjj0610@163.com

通讯作者: 裴国献, 教授, 博士生导师, 电话: 020-61641741

PLA是最早作为骨、软骨组织工程的支架材料,也是目前运用最广泛的骨组织工程材料^[4,5]。本研究探讨以 PLGA 作为 BMP 的载体及组织工程骨的支架,并与 BMSCs 复合构建新型组织工程骨的可行性及修复骨缺损的效果。

1 材料与方法

1.1 动物模型与实验分组

新西兰大白兔 27 只,体质量 2.0~2.5 kg·b.w.,雌雄不限。根据处置条件随机分为实验组、对照组和空白组,每组 9 只动物。实验组为负载 BMP 与 BMSCs 的 PLGA,对照组为仅复合 BMSCs 的 PLGA,空白组仅植入 PLGA。使用戊巴比妥钠(50 mg/kg·b.w.)经耳缘静脉注射麻醉后,在无菌操作下,在右前臂前内侧作长约 3 cm 纵形切口,切开皮肤、筋膜,逐层分开肌肉、血管、神经,充分暴露桡骨中段,作 1.5 cm 的骨缺损,并切除骨膜缺损区骨膜。生理盐水冲洗切口,植入不同组别的植入物,逐层关闭切口,术中及术后均不作固定,动物分笼饲养。

1.2 骨髓采集与细胞培养

按照我实验室已成熟的全骨髓细胞培养方法,于动物骨缺损模型制备前 4~6 周在无菌条件下以 16 号骨髓穿刺针自髂嵴处刺入兔髂骨骨髓腔,抽吸双侧骨髓共 3 ml,混入 DMEM 培养基,500 U/ml 肝素溶液抗凝,混匀后低速离心(800 r/min)5 min,去除上清液,培养基重悬后过 90 目滤网接种。于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,4 d 后半量换液(DMEM 完全培养基,15%新生牛血清),以后 2~3 d 全量换液 1 次,倒置显微镜逐日观察,待细胞汇合成单层后以 0.25%胰蛋白酶消化,计数,传代培养,常规 3 d 换液 1 次。传至第 3 代细胞开始用 DMEM 条件培养基(含 15%新生牛血清、50 μg/ml 抗坏血酸、10⁻⁸ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β-甘油磷酸钠)换液,备用。

1.3 材料准备及与细胞复合培养

空白 PLGA 与负载 BMP 之 PLGA 材料均由课题合作单位中山大学高分子研究所提供(其中(其中 BMP 为 rhBMP-2,购自北京军事医学科学院),切割成长 15 mm、直径约 3 mm 的圆柱状,经 37℃环氧乙烷熏蒸消毒。依据我们前期的实验方法^[3]对消毒后的材料进行处理,浸泡条件培养基后常温干燥。收集培养至第 3 代的细胞 1×10⁶ 个与条件培养基混合制成 200 μl 细胞悬液,以微量移液器缓慢滴加到干燥后的 PLGA 表面,静止培养 4h 后加入条件培养基共同培养 3 d 后植入动物体内。

1.4 观测内容

1.4.1 动物术后观察 动物术后活动及伤口愈合情

况。

1.4.2 X 线观察 动物进行麻醉后摄尺桡骨正位片,按照条件统一为 40 kV,50 mA,0.2 s,投照距离 60 cm。阻射密度以同一照片骨缺损邻近区域相同面积皮质骨密度为 100,相同面积照片底色为 0 来测量骨缺损区阻射密度相对值,同一照片骨缺损区的平均阻射密度取所有可见阻射阴影密度的均值。

1.4.3 大体标本观察 分别在术后 4,8,12 周各处死 3 只动物,截取骨缺损区部分尺桡骨,观察植入材料的降解情况、与宿主骨界面结合情况及周围软组织反应。

1.4.4 组织学切片观察 对骨缺损中部组织以 10%多聚甲醛固定,10%硝酸进行脱钙后采用石蜡包埋,连续进行横行及纵行切片(厚度 5 μm),HE 染色,光镜下观察。每只动物取 3 张横行间断切片在 100 倍光镜下观察新骨形成情况,每张切片随机取 5 个视野,利用 Photoshop6.0 软件分析新生骨小梁面积像素值,并计算其在视野总面积像素值的百分比。

1.5 数据处理

采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行统计学处理,同一时间不同组标本骨缺损区的 X 线阻射密度、组织学切片新生骨小梁面积比数据均比较采用方差分析。

2 结果

2.1 空白 PLGA 及 PLGA 与细胞复合生长 3 d 的扫描电镜形态

在电镜下可见 PLGA 呈疏松的多孔状,孔径大小不等,且互相连通(图 1);细胞呈不规则形态,胞体变扁平,贴附在材料表面,细胞在材料表面伸出突触,连接成片(图 2)。

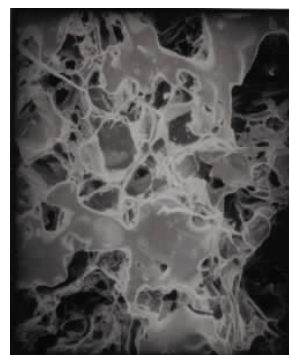


图 1 PLGA 扫描电镜观察
(×100)

Fig.1 Morphology of PLGA material under scanning electron microscope (Original magnification: ×100)

2.2 动物术后观察

对照组 1 只动物因伤口感染死亡,其余动物术后饮食正常,手术切口无红肿及渗液,一期愈合,皮肤缝线自行脱落。

2.3 X 线观察



图 2 BMSC 与 PLGA 复合培养 3 d 扫描电镜观察 (×500)
Fig.2 Morphology of BMSCs under scanning electron microscope on the 3rd day of culture with PLGA material (Original magnification: ×500)

本实验的 X 线的成骨特点为实验组与对照组新骨形成自缺损中心区及两断端同时均匀生长,逐步与两断端融合。空白组未观察到明显成骨现象。术后 4 周 X 线显示:空白组可见清晰 1.5 cm 骨缺损区,说明 PLGA 无明显 X 线阻射现象,宿主骨断端清晰;对照组出现不连续的密度较正常骨偏低的骨痂,且较均匀分布在断端及中心区域;实验组在植入材料中心处出现连续性骨痂,且两侧骨痂均匀向中间延伸,宿主骨与植入组织工程骨之间界面模糊(图 3);术后 8 周 X 线显示:空白组骨缺损区未见新生骨痂,骨折断端变圆滑;对照组骨缺损靠近尺骨区域出现连续性薄层骨痂;实验组骨缺损区域新生骨皮质连续性恢复,但髓腔不通,且密度明显低于宿主骨(图 4);术后 12 周 X 线显示:空白组 X 线表现与 8 周时基本相同,对照组缺损区骨痂密度、数量增加,但明显直径低于断端宿主骨;实验组显示组织工程骨与宿主骨之间的骨痂已完全骨化,髓腔贯通,靠近尺骨部分密度尤其增高(图 5)。本实验各组不同时相骨缺损修复的 X 线阻射密度值见表 1。

2.4 大体标本观察

4 周大体组织学观察见实验组骨缺损的断端及靠近尺骨侧有较多硬度较高的类骨样组织,对照组骨缺损断端及中段靠近尺骨侧少量类骨质生成,空白组表面有一层较致密的纤维组织膜包裹,植入的 PLGA 被部分吸收,质地变软。第 8 周实验组及对照组骨缺

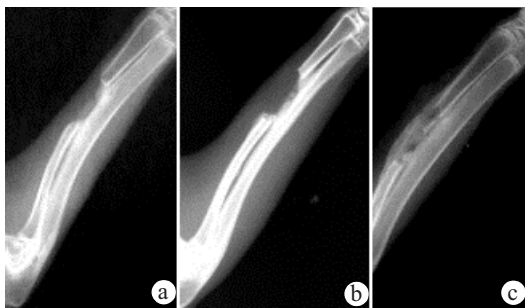


图 3 术后 4 周 X 线片

Fig.3 X-ray of the bone defects 4 weeks after operation

a: Blank; b: Control; c: Experimental group



图 4 术后 8 周 X 线片

Fig.4 X-ray of the bone defects 8 weeks after operation

a: Blank; b: Control; c: Experimental group



图 5 术后 12 周 X 线片

Fig.5 X-ray of the bone defects 12 weeks after operation

a: Blank; b: Control; c: Experimental groups. Arrowheads indicates newly formed bone marrow cavity

表 1 X 线分析骨缺损平均阻射密度

Tab.1 Relative values of callus density at the bone defects evaluated by X-ray (n=3, Mean±SD)

Group	Post-operative time (weeks)		
	4	8	12
Blank*	33.81±1.23	37.18±1.44	38.42±3.88
Control*	46.58±1.45	56.80±0.78	68.44±1.53
Experimental*	47.79±1.26	63.89±1.18	78.40±1.24

*P<0.05

损区域出现连续性骨痂,空白组 PLGA 被大部分吸收,剩余少量纤维结缔组织。第 12 周实验组骨缺损区已完全修复,未见剩余 PLGA,且新生骨直径较邻近宿主骨直径略粗,完全离断后发现髓腔已再通;对照组出现连续性新骨生成,但直径较邻近宿主骨部分纤细;空白组仅发现骨缺损断端少许新生骨,缺损区域被大量结缔组织填充。

2.5 组织学切片观察

第 4 周实验组 PLGA 已降解成网状,缺损区内大量软骨细胞生成,含少量骨基质(图 6a),对照组可见较多软骨细胞生成(图 6b),空白组为纤维组织和大量淋巴细胞(图 6c)。第 8 周实验组仅剩余少量网

状 PLGA,生成大量较成熟的编织骨,可见少许软骨基质(图 7a),对照组成熟骨组织较少,大部分为软骨基质填充(图 7b),空白组主要为纤维组织(图 7c)。第 12 周实验组完全为成熟的骨组织(图 8a),对照组组

仍可见部分软骨基质(图 8b),空白组缺损靠近宿主骨区域可见少许软骨细胞及软骨组织,其余部分仍为纤维组织填充(图 8c)。三组不同时相骨缺损区新生骨组织的图像分析结果见表 2。

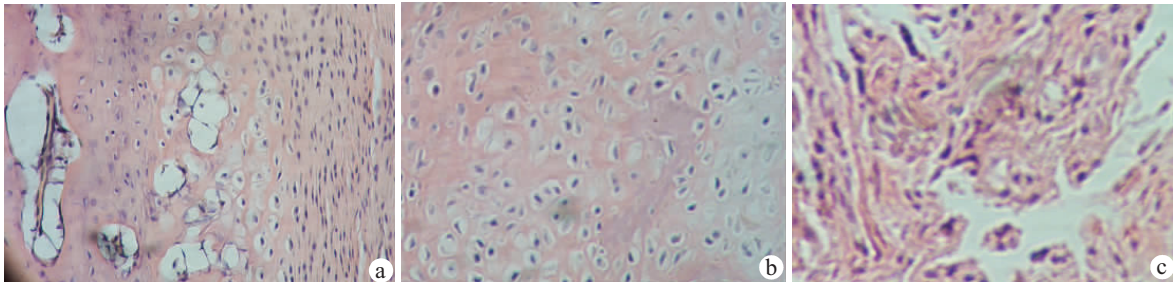


图 6 第 4 周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig.6 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 4 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

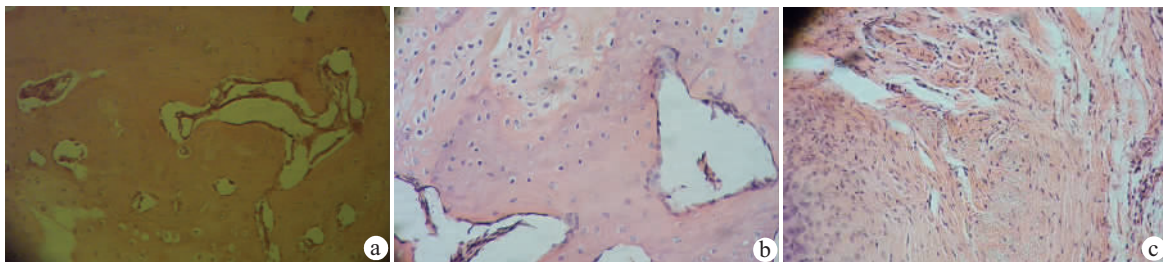


图 7 第 8 周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig.7 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 8 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

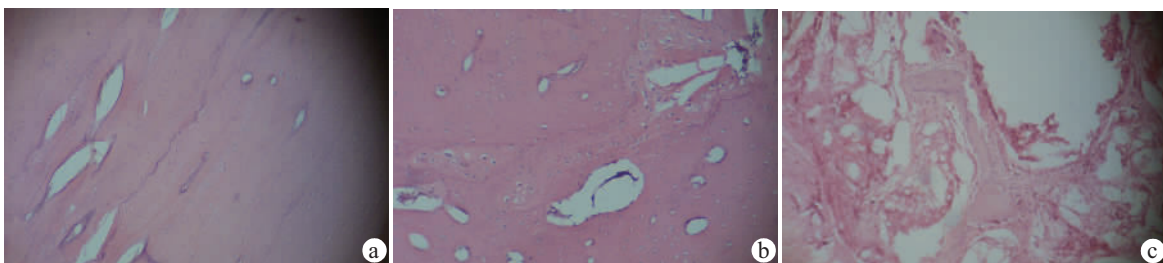


图 8 第 12 周实验组(a)、对照组(b)和空白组(c)组织切片观察

Fig.8 Typical histological sections of decalcified specimens harvested from the experimental (a), control (b) and blank control (c) groups 12 weeks after operation (HE staining, original magnification: $\times 100$)

表 2 新骨小梁占骨缺损区域面积百分比

Tab.2 Percentage area of the new bone formation in the total bone defect area ($n=3$, %, $Mean \pm SD$)

Group	Post-operative time (week)		
	4	8	12
Blank	22.18 \pm 0.23	29.54 \pm 0.44	31.42 \pm 0.48
Control	26.58 \pm 0.45	46.81 \pm 0.56	68.44 \pm 0.53
Experimental	37.97 \pm 0.26	73.49 \pm 0.51	96.67 \pm 0.24

3 讨论

3.1 种子细胞的选择

和其他组织工程研究研究的原理与方法类似,骨组织工程的研究也主要集中在种子细胞、支架材料和骨的构建 3 个方面。关于种子细胞的选取,目前研究主要集中于 BMSCs 的研究。BMSCs 体外培养在一定的诱导条件下可以大量向成骨细胞分化并形成骨组织^[6],我们实验室早期工作也证实了这一点^[7]。尽管

有文献报道认为同种异体软骨细胞经过分离培养、传代消化之后抗原性降低,植入体内后可保持其分泌基质的功能^[8],但是考虑到细胞分离和尽量避免植入材料免疫反应,我们仍然选取了自体干细胞与材料复合后移植。植入动物体内在不同时间取材后发现,实验组和对照组动物手术区周围组织反应轻微。空白 PLGA 组在 12 周仅在支架与宿主骨的桥接部位形成少量骨样组织,而对照组自 4 周时即可通过 X 线和组织切片观察到显著的骨化过程,支架表面与内部均可发现骨样组织,这表明植入的经诱导的 BMSCs 可能继续成活,增殖,分化发挥成骨活性,并未完全衰亡或被免疫系统消灭。由此可以认为空白 PLGA 支架修复骨缺损主要是靠“爬行替代”方式成骨,12 周空白组骨缺损内仅有大量纤维组织填充,说明这种成骨方式明显不足以完全修复兔桡骨缺损。大体观察和切片观察还发现试验组和对照组的 PLGA 支架降解速度快于空白组,这有可能是大量经诱导的 BMSCs 能够在分裂增殖形成新骨组织的同时趋化破骨细胞聚集,从而加速了支架材料的吸收。

3.2 支架材料的制备与负载细胞因子的选择

骨组织工程支架的原料可分为无机类和有机类。尽管无机类材料具有良好的生物相容性、生物降解性和骨传导性^[9],但是这类材料降解极其困难,影响了新生骨的生成和改建;脱钙骨基质作为细胞载体尽管具有细胞相容性好的特点,但是其固有的抗原性仍无法彻底解决。PLGA 是一种生物相容性良好的可降解材料,其降解机制为主链含有不稳定易被水解或酶解的化学键,故目前公认 PLA/PLGA 是一种良好的可生物降解的控释骨架,且具有支架和缓释的双重作用,是较理想的骨组织工程支架材料。为利于细胞生长,组织工程支架材料要求一定的孔径和孔径率。Robinson 等^[10]认为支架孔径在 200~300 μm 有利于骨介导,而孔隙率要求则在能维持一定外形的情况下,应尽可能高而有利于细胞种植。我们选取聚乳酸与聚羟基乙酸的共聚物 PLGA 制备组织工程支架,该支架采用低热高压法制作,可根据各种试验要求方便地制成各种形状,避免了使用有机溶剂,且易于负载细胞因子,且制备的 PLGA 支架孔隙率高达 95% 以上,孔径大小较均匀,为 150~200 μm ,其中 PLA 与 PGA 的摩尔比为 75/25^[11]。该支架的细胞相容性在前期试验已得到验证。目前认为 BMP 是骨组织工程中唯一能够单独诱导骨组织形成的局部生长因子^[2],PLA 及 PLGA 作为 BMP 的载体是有效的,可以充分发挥 BMP 的持续刺激和诱导成骨作用^[12,13]。

3.3 新型组织工程骨成骨特点

在 PLGA 支架制备过程中添加已研成粉末状的 BMP,制备成每块含 5mgBMP 的 PLGA 支架,并与成

骨细胞诱导的 BMSCs 构建成新型组织工程骨。利用这种体外构建的组织工程骨进行的骨缺损修复实验取得了满意的效果。本实验采用兔单侧前臂桡骨中断缺损模型,通过尺骨稳定骨缺损端并能保持骨缺损的长度。该组织工程骨同时起到了细胞支架与 BMP 控释载体作用。且由于 BMP 是研成粉末混入支架,在体内降解并发生促进成骨的作用之前必须有一个缓慢溶解的过程,从而达到了控制释放 BMP 的目的。通过对实验组骨缺损各时相标本横切面的组织学切片观察,我们认为新骨的生成是在骨缺损横截面上是均匀生成的,是一种均匀的生长方式。这充分说明不仅是从植入物外表面渗入的自体间充质细胞与 BMP 作用后成骨,而主要是植入物本身携带的细胞也同时与 BMP 发生了成骨作用,从而大大加快了骨缺损修复速度;根据局部 X 线平均阻射密度和切片分析,新生骨痂的数量在靠近尺骨侧明显增加,这是由于靠近尺骨骨膜区域有较多间充质细胞,从而形成更多新生骨。

术后大体观察与标本组织学观察还发现,3 组材料植入后在整个试验阶段,除 4 周时骨缺损区发现少量淋巴细胞浸润之外,未发现急性炎症反应征象。而 8 周后发现的多核巨细胞,可能是材料脱落下颗粒导致巨噬细胞汇集,本质是一种异物反应,有助于材料降解吸收^[14]。与其他组织工程骨实验比较,本研究在 12 周时实验组动物局部植入物已完全吸收,骨皮质连续性恢复,新生骨已出现了明显的髓腔再通现象,而目前其他单纯的 BMP 载体修复骨缺损都尚不能达到这一效果^[15,16]。

综上所述,实验组骨缺损区的成骨速度和成骨质量显著高于对照组和空白组,对兔桡骨缺损修复效果满意。我们认为,以 PLGA 作为 BMP 的载体及组织工程骨的支架,并与 BMSCs 复合构建的新型组织工程骨是可行的,但仍有一些问题需要继续探讨:(1)如何增强细胞与 PLGA 支架的贴附能力。这一点在前阶段试验对于空白 PLGA 的细胞相容性研究中已发现,在支架消毒后、与细胞复合前须经过多次处理,增加了材料污染的可能,在本实验体外构建组织工程骨过程中也不甚满意。目前拟通过增加 PLGA 表面活性位点并附加多肽链来改善 PLGA 表面亲水性较差的缺点;(2)尽管根据实验结果我们认为支架负载的细胞参与并有效促进了成骨过程,试验组成骨效果好于已报道的单纯的 BMP 载体修复骨缺损研究,但有关 BMP 对支架中负载的 BMSCs 增殖、分化的作用机理尚不明确,需进一步进行试验研究;(3)检测该负载 BMP 支架对于 BMP 控制释放的速度。尽量使 BMP 释放速度满足生理情况下骨缺损修复过程的需要,制成该支架释放 BMP 的体外缓释曲线,总结释放规律;(4)寻求支架中最佳的因子浓度与成骨效果

的量效关系。在达到理想的骨缺损修复效果的前提下尽量减少添加因子的量;(5) 探讨 PLGA 支架同时负载其他神经或血管生长因子的可能性及多种因子的复合作用对骨缺损修复的影响。

参考文献:

- [1] Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies [J]. Clin Orthop, 1999, (367 Suppl): 68-83.
- [2] Carl A, Kirker H. Potential application sand delivery strate gies for bone morphogenetic proteins [J]. Advanced Drug Delivery Rev, 2000, 43(1): 65-92.
- [3] 胡稷杰, 裴国献, 全大萍, 等. 新型聚乳酸-羟基乙酸支架的细胞相容性研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2005, 7(4): 358-62.
Hu JJ, Pei GX, Quan DP, *et al.* Cellular compatibility of a new type of polylactic glycolic acid (PLGA) scaffold[J]. Chin J Orthop Trauma, 2005, 7(4): 358-62.
- [4] 曹谊林, 商庆新. 软骨、骨组织工程的现状与趋势[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 7-9.
Cao YL, Shang QX. The status quo and tendency of cartilage and bone tissue engineering[J]. Chin J Traumatol, 2001, 17(1): 7-9.
- [5] Quirk RA, Chan WC, Davies MC, *et al.* poly(l-lysine)-GRGDS as abiomimetic surface modifier for poly(lactic acid)[J]. Biomaterials, 2001, 22(8): 865-972.
- [6] Chang SL, Yang JW, Rifas L, *et al.* Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone[J]. Endocrinology, 1994, 134(1): 277-86.
- [7] 金丹, 裴国献, 王前, 等. 骨髓基质细胞体外培养骨发生潜能及条件研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 8(6): 565-6.
- [8] Wakitani S. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in collagen gel [J]. Tissue Engineering, 1998, 4(4): 429-44.
- [9] Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D, *et al.* Effect of surface reaction stage on fi-bronction mediated adhesion of osteoblast-like cell to bioactive glass[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 40(1): 48-56.
- [10] Robinson BP, Hollinger JO, Szachowicz EH, *et al.* Calvarial bone repair with porous D.L Poly lactide [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1995, (1126): 707-713.
- [11] 罗丙红, 全大萍, 廖凯荣, 等. 低热-高压法制备 PLGA 多孔支架及其体外降解研究[J]. 功能高分子学报, 2003, (16)2: 149-55.
Luo BH, Quan DP, Liao KR, *et al.* Scaffolds with high porosity for tissue engineering fabricated by low heat-high pressure and their degradation *in vitro*[J]. J Funct Polymers, 2003, (16)2: 149-55.
- [12] Agrawal CM, Best J, Heckman JD, *et al.* Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture nonunions [J]. Biomaterials, 1995, 16(16): 1255-60.
- [13] Zellin G, Linde A. Importance of delivery system for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects [J]. J Biomed Mater Res, 1997, 35(2): 181-90.
- [14] Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, *et al.* Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit[J]. Biomaterials, 1998, 19(10): 889-96.
- [15] 谭祖键, 李起鸿, 许建中, 等. 聚乳酸作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(12): 742-7.
Tan ZJ, Li QH, Xu JZ, *et al.* An experimental study of bone defects repaired with bone morphogenetic protein using polylactic acid as carrier[J]. Chin J Orthop, 2000, 20(12): 742-7.
- [16] Takashi K. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite[J]. Biomaterials 26 (2005): 73-9.

(责任编辑: 吴锦雅)

(上接 1360 页)

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287 (5457): 1433-45.
- [2] Ito H, Nakajima A, Nomoto H, *et al.* Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1 [J]. J Neurosci Res, 2003, 71(5): 648-58.
- [3] Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: Role of retinoic acid [J]. J Nutr Biochem, 2000, 11(1): 2-13.
- [4] Mey J, McCaffery P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates [J]. Neuroscientist, 2004, 10(5): 409-21
- [5] Katoh M. Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: threshold model of WNT action [J]. Int J Mol Med, 2002, 10(6): 683-7.
- [6] Chu PW, Cheung WM, Kwong YL. Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells [J]. Neuroreport, 2003, 14(15): 1935-9.
- [7] Wohl CA, Weiss S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors [J]. J Neurobiol, 1998, 37(2): 281-90.
- [8] Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures [J]. J Neurobiol, 1999, 38(1): 65-81.
- [9] Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development [J]. Int Rev Cytol, 2001, 209: 1-77.
- [10] Verma AK, Shoemaker A, Simsiman R, *et al.* Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin A-deficient diet [J]. J Nutr, 1992, 122(11): 2144-52.
- [11] Zhao X, Patton JR, Davis SL, *et al.* Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator [J]. Mol Cell, 2004, 15(4): 549-58.
- [12] Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid [J]. J Lipid Res, 2002, 43(11): 1773-808.
- [13] Yen A, Fenning R, Chandraratna R, Walker P, *et al.* A retinoic acid receptor beta/gamma-selective prodrug (tazarotene) plus a retinoid X receptor ligand induces extracellular signal-regulated kinase activation, retinoblastoma hypophosphorylation, G0 arrest, and cell differentiation [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(6): 1272-37.
- [14] Vivanco-Ruiz MM, de The H, Tiollais P, *et al.* Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene [J]. Nature, 1990, 343(6254): 177-80.
- [15] Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, *et al.* Peripheral infusion of IGF- I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus [J]. J Neurosci, 2000, 20(8): 2896-903.
- [16] Cheung WM, Ip NY. Interaction of neurotrophins and retinoic acid in neuronal differentiation [J]. Mol Cells, 1998, 8(4): 496-502.