

成骨细胞诱导骨髓基质细胞体外成骨的初步研究

刘 宁, 查振刚, 王双利, 林宏生, 王国普

(暨南大学附属第一医院 骨科, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 探讨在不使用细胞因子或化学药物的情况下, 成骨细胞(Osteoblast, OB)与骨髓基质细胞(Bone Marrow Stromal Cells, BMSCs)混合培养时, 成骨细胞提供的成骨微环境能否在体外诱导 BMSCs 向成骨细胞分化, 并复合支架形成成熟的骨组织。研究成骨细胞诱导 BMSCs 有效成骨的最小比值(指成骨细胞与骨髓基质干细胞数量的比值)。方法: 分别培养 SD 乳鼠的成骨细胞与 SD 大鼠的 BMSCs, 将成骨细胞和 BMSCs 以 1:9、2:8、3:7、1:0 的不同比例进行混合培养, 通过测定第 3、6、9 天培养液上清中的碱性磷酸酶(ALP)的含量, 研究成骨细胞促 BMSCs 有效成骨的最小比值。将两种细胞以该最小浓度比混匀接种于涂附 I 型胶原壳聚糖材料支架上(直径 9 mm, 高 3 mm)作为混合培养组, 相同终浓度的单纯成骨细胞和单纯 BMSCs 分别接种于相同支架作为阳性对照及阴性对照。另设置低比值成骨细胞对照组(仅含有共培养组中相同的成骨细胞数, 但不含有共培养组中的 BMSCs)。全部标本均于体外培养 8 周后取材, 通过大体观察、组织学及免疫组织化学等相关检测对新生骨进行评价。结果: 成骨细胞和 BMSCs 以 3:7 的比例进行混合培养时已可实现有效成骨。3:7 比例的混合培养组及阳性对照组(成骨细胞组)体外培养 8 周后大体观察和苏木素-伊红染色(HE)、ALP 染色基本相同, 均表达骨特异性细胞外基质 I 型胶原, 形成了较成熟的骨组织。阴性对照组(单纯 BMSCs 组)和低比值成骨细胞组, 原细胞支架复合物变小、变形。低比值成骨细胞组在局部形成了少量的骨组织, 阴性对照组(单纯 BMSCs 组)未能发现骨样组织形成。结论: 在不使用细胞因子或化学药物的情况下, 成骨细胞提供的成骨微环境能够在体外诱导 BMSCs 向成骨细胞分化并形成成熟的骨组织。混合细胞中成骨细胞与 BMSCs 的比例为 3:7 时是有效成骨的最小比值。

[关键词] 骨髓基质细胞; 成骨细胞; 混合培养; 骨形成

[中图分类号] R687 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0413-07

Preliminary study of in vitro osteogenesis by co-culture of osteoblasts and bone marrow stromal cells

LIU Ning, ZHA Zhen-gang, WANG Shuang-li, LIN Hong-sheng, WANG Guo-pu

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** This study explored the feasibility of in vitro osteogenesis by co-culture of osteoblasts and BMSCs so as to confirm the hypothesis that osteoblasts can provide osteogenic microenvironment to induce osteogenic differentiation of BMSCs and thus promote in vitro osteogenesis of BMSCs. The lowest ratio when osteoblasts have fine capacity of inducing BMSCs osteogenic differentiation was also studied. In this way, a novel method in seeding cell culture for bone tissue engineering is expected. **Methods:** The

[收稿日期] 2008-12-01

[基金项目] 国家高技术研究发展计划“863”项目(2007AA09Z4400); 广东省科技计划项目(2005B33101008); 广东省医学科研课题(B2006089); 广州市科技资助项目(2006Z3-E5211); 广州市科技资助项目(2008Z1-E411)

[作者简介] 刘 宁(1972-), 男, 副主任医师, 研究方向: 创伤外科和关节疾病。Tel: 020-38688617; E-mail: liuning0623@sohu.com

newly born (1d) Sprague-Dawley (SD) rats were sacrificed and osteoblasts were obtained by modified enzymatic digestion and differential attachment technique. BMSCs were isolated and cultured from the 1-month-old SD rats through cell attachment to tissue culture. Osteoblasts and BMSCs were mixed at the ratio of 1:9, 2:8, 3:7, 1:0 (osteoblasts: BMSCs) and co-cultured. The lowest effective ratio of osteoblasts on the proliferation of BMSCs and the differentiation of BMSCs into osteoblasts were judged by alkaline phosphatase (ALP) in the culture medium 3, 6, 9 days after co-culture. BMSCs and osteoblasts were mixed at the lowest osteogenic ratio. 200 μL mixed cells ($6.0 \times 10^7/\text{mL}$) were seeded onto a collagen I and chitosan scaffold, 9 mm in diameter and 3 mm in thickness, as co-culture group. Osteoblasts and BMSCs with the same cell number were seeded respectively onto the scaffolds as positive control (osteoblast group) and negative control (BMSCs group). 200 μL osteoblasts (equal to the osteoblasts number of co-culture group) alone were seeded as low concentration osteoblast group. All specimens were harvested after in vitro culture for 8 weeks. Gross observation, histology and immunohistochemistry were used to evaluate the results. **Results:** The lowest effective ratio of osteoblasts on the proliferation and differentiation of BMSCs into osteoblasts is 3:7 (osteoblasts: BMSCs). In both co-culture group and positive control group, the cell-scaffold constructs could maintain the original size and shape during in vitro culture and formed mature bone after 8 weeks of in vitro culture. Furthermore, the neo-bone in both groups were similar to each other in gross appearance and histological features (HE, ALP staining), and abundant collagen I type was also detected by immunohistochemistry in both groups. In negative control group, however, the constructs became smaller during in vitro culture and bone-like tissue could not be observed. In low concentration bone group, the constructs shrunk gradually during in vitro culture although histology showed a small amount bone formation. **Conclusion:** Osteoblasts can provide osteogenic microenvironment to promote in vitro osteogenesis of BMSCs. 30% osteoblasts have fine capacity of inducing BMSCs osteogenic differentiation.

[Key words] bone marrow stromal cells; osteoblasts; co-culture; osteogenesis

种子细胞、支架材料和细胞因子是组织工程骨构建的3个重要组成部分。其中种子细胞是组织工程骨构建和应用研究中的首要环节和基本要素。骨髓间充质干细胞(BMSCs)由于具有强大的增殖能力与多向分化潜能,同时也因为其来源广泛,对供体损伤小,易于培养,已成为骨组织工程较为理想的种子细胞^[1]。BMSCs只有在特定的诱导条件下才能向成骨细胞转化,对于BMSCs向成骨细胞定向分化的条件研究较多,目前多采用在培养液中加入化学物质^[2-3]、细胞因子^[4-5]以及采用基因转染^[6-7]的方法达到促定向分化的目的。然而,在将骨髓基质细胞向成骨细胞定向诱导分化的问题上,现有的几种方法均存在不足之处:常规诱导液导致细胞生长减慢且其具体的作用方式和条件仍存在着争论;使用相关细胞生长因子的刺激尚处于摸索阶段,且细

胞生长因子用量大、成本较高、并可引起机体的不良反应等。因此有必要寻找一种新的诱导方法。本研究研究成骨细胞与BMSCs混合培养时,成骨细胞提供的成骨微环境能否在体外诱导BMSCs向成骨细胞分化,并复合支架形成成熟的骨组织。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)实验动物 清洁级新生SD大鼠(24 h) 8只,由南方医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK2006-0015)。

(2)主要试剂 达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)(DMEM)干粉培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(天津TBD公司);II型胶原酶(美国Sigma公司分装)、I型胶原、胰蛋白酶(Sigma);碱性磷酸酶

(ALP)试剂盒(南京建成生物制品公司);SABC-1021试剂盒(武汉博士德公司进口分装);壳聚糖(济南迈康公司);体积分数为2%乙酸(广州化学制剂厂)。

1.2 实验方法

(1)SD乳鼠成骨细胞的分离、培养 选用“改进酶消化法”。取1日龄新生SD大鼠8只,拉颈处死后,投入含体积分数为75%酒精的容器中浸泡10 min,取出置于消毒皿中。揭开头皮,取出颅骨,放入盛有磷酸盐缓冲液(PBS)的培养皿中。小心剔除颅骨上附着的结缔组织及骨膜,PBS冲洗数次。将颅骨片移到青霉素小瓶中。加入体积分数0.25%胰蛋白酶,用眼科剪将颅骨片剪成约1 mm×1 mm×1 mm大小的骨片。体积分数0.25%胰蛋白酶消化15~20 min。用吸管将之加入离心管中,800 r/min离心5 min后,弃去上清,剩下骨渣用体积分数0.1%Ⅱ型胶原酶在37℃环境下(可置于37℃水浴箱中)消化1 h,并不时振荡。在超净台内,将上清取出置于另一个离心管,1 000 r/min离心10 min,上清吸出加入培养瓶,再加入DMEM液。

采用“反复贴壁法”纯化成骨细胞。将上述含上清的培养液放入体积分数5%二氧化碳(CO₂)培养箱中,在37℃条件下培养10 min后,将培养瓶轻轻倾斜,用吸管吸出培养液至第2瓶培养瓶中,培养10 min后,再同样接种到第3瓶培养瓶中,可得到纯度较高的成骨细胞。第2天换液,除去未贴壁的细胞。以后每2~3 d换液1次。当细胞长满瓶底时,以质量分数0.25%胰蛋白酶消化、传代。收集第三代细胞备用。

(2)SD大鼠BMSCs的分离和体外培养 运用全骨髓贴壁法。2周龄SD大鼠,脱颈处死,体积分数75%乙醇溶液浸泡10 min,取双侧股骨,剪断股骨一端后,用带5号针头的注射器将体积分数为10%胎牛血清的DMEM(含10 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素和20 U/mL肝素)冲洗股骨髓腔,使骨髓完全被冲出,合并冲出液用滴管反复吹打使团块分散,1 000 r/min,离心5 min,取出下层细胞层,DMEM液混匀后接种于25 mL培养瓶,置于37℃,体积分数5% CO₂及饱和湿度的CO₂培养箱内培养。48 h次换液,以后每隔3 d换液一次。待细胞长至90%融合时(大约为10 d),弃培养液,用

PBS轻冲3遍,加入质量浓度2.5 g/L胰蛋白酶,37℃消化、传代。收集第3代细胞备用。

(3)成骨细胞诱导BMSCs有效骨向分化的最小比值的确立 第3代OB以 1×10^5 /mL接种于24孔板,设置对照组及3个实验组,共4组,每组6个复孔。待细胞接种24 h后,弃培养液,PBS液洗2次,换入无血清培养基,24 h同步化后,对照组只加入1 mL体积分数10%胎牛血清DMEM培养基,实验1、2、3组分别加入 9×10^5 /mL、 4×10^5 /mL、 $7/3 \times 10^5$ /mL BMSCs和1 mL体积分数为10%胎牛血清DMEM培养基,使OB和BMSCs直接联合共培养的比例为1:0、1:9、2:8、3:7。培养板置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中继续培养。每3~4 d换液一次,连续共培养9 d。共培养期间分别取3、6、9 d细胞上清液,-20℃保存,收集齐后运用ALP试剂盒检测ALP活性。共培养期间倒置相差显微镜逐日观察细胞形态的变化并行吉姆萨(Giemsa)染色观察。

(4)涂敷I型胶原壳聚糖支架的制备及扫描电镜观察 将纯化好的低分子量壳聚糖溶解于质量分数2%乙酸溶液中,配制成质量分数为2%的壳聚糖乙酸溶液,浇灌入直径9 mm的圆柱形模具中;将材料和模具一并于-80℃冷冻12 h,冷冻干燥1 d后得到成型的材料;用10 mmol/L的NaOH去除材料中残留的乙酸,并在用去离子水将之清洗成中性后,加入质量浓度0.4 g/L的I型胶原并分散均匀,再次冷冻起来,冷冻干燥后得到涂敷I型胶原的壳聚糖支架材料。已制作好支架材料经CO₂消毒后用无菌DMEM培养基反复冲洗,培养箱内晾干备用。

(5)实验分组与体外培养 实验分4组,A组BMSCs成骨细胞按有效成骨的最小比值混匀后以 6.0×10^7 /mL终比值接种于涂敷I型胶原壳聚糖支架;B组接种相同终比值的单纯成骨细胞;C组接种相同终比值的单纯BMSCs;D组则接种单纯成骨细胞(相当于A组中成骨细胞数,不含有A组中的BMSCs)。每组各接种6例标本,均于体外培养8周时取材检测。

接种方法:把涂附I型胶原壳聚糖支架放置于24孔板的孔底,滴加100 μL的细胞悬液,培养1 h翻转,再在另一面滴加100 μL细胞悬液。1 h加培养基淹没整个基质材料。

(6)体外培养物的相关检测 ①大体观察 主要观察各组细胞-材料复合物在体外培养过程中形态、厚度、质地及颜色的变化。②组织学检测 各组培养物经固定、包埋、切片等处理后,分别进行HE、ALP染色。观察各组培养物的组织学结构、细胞外基质ALP分泌及材料支架降解等情况。③免疫组织化学检测 复合组织经质量分数4%多聚甲醛固定后常规梯度乙醇脱水,有机树脂包埋。于硬组织切片机切片(连续进行横行及纵行切片,厚5 μm),以免抗鼠Ⅱ型胶原单克隆抗体(1:200)为一抗,应用的二抗为羊抗兔的SABC,显色剂为二氨基联苯氨(DAB),按标准SABC检测试剂盒说明进行免疫组织化学染色,光镜下观察。

(7)统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行统计学处理。采用单因素方差分析,选择q检验进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结果

2.1 成骨细胞、BMSCs的共培养的形态学变化

原代培养的OB和BMSCs 4 h后开始贴壁,48 h后完全贴壁。BMSCs形态多样,呈梭形、长三角形等,有粗大的角状突起。OB呈卵圆形,融合成单层后呈典型的铺路石样改变。OB与BMSCs联合培养后,细胞相互交织生长,无接触抑制、相互排斥和吞噬现象。OB体积较大,BMSCs体积较小。两种细胞在共同培养初期维持各自细胞形态,随着培养时间的延长,在共同培养第6天时OB与BMSCs失去各自细胞形态均呈长梭形生长。

2.2 共培养细胞ALP活性测定

对照组与实验组[V(OB):V(BMSCs)为3:7]碱性磷酸酶活性明显高于其他两个实验组($P < 0.05$),而对照组与实验组C之间碱性磷酸酶活性并无显著性差异, ($P > 0.05$),见表1。

表1 各共培养组不同时间点的ALP($\bar{x} \pm s$)活性³⁾

组别	n	ALP/(U·L ⁻¹)		
		3	6	9
A1:9组	6	0.171±0.009	0.132±0.007	0.146±0.012
B2:8组	6	0.175±0.011	0.149±0.008	0.182±0.013
C3:7组	6	0.284±0.012 ^{1),2)}	0.241±0.011 ^{1),2)}	0.285±0.016 ^{1),2)}
D对照组	6	0.317±0.015 ¹⁾	0.248±0.013 ¹⁾	0.251±0.011 ¹⁾

1)与A组、B组比较 $P < 0.05$; 2)与D组比较, $P > 0.05$; 3)1 U/L = 16.67 nmol/(S·L)

2.3 I型胶原修饰的壳聚糖大体、扫描电镜观察

冻干后的材料呈白色,表面粗糙,部分呈纤维状排列并有大小不等的隆起。材料内部呈海绵状多孔隙结构。制备的支架材料为多孔的三维立体结构。电镜扫描可见壳聚糖内部形成大小不一的大孔和互连的小孔,彼此相互交通,支架四处均可见白色的微小I型胶原颗粒。孔径为50~200 μm,平均孔径为100 μm。

2.4 种子细胞与I型胶原修饰的壳聚糖复合及增殖的形态学观察

电镜扫描观察发现成骨细胞、BMSCs复合到I型胶原修饰的壳聚糖支架后第2天即在壳聚糖基质材料上黏附和伸展,呈成纤维细胞样。第7天时细胞数量已明显增多,与支架材料结合较紧密,细胞并逐渐长入材料深处。

2.5 大体观察

A组(共培养组)与B组(阳性对照,同比值成骨细胞组)标本大小、厚度与原支架材料相比变化不大,外观均呈褐色(染有培养基的褐红色),触之质硬;C组(阴性对照,同比值BMSCs组)在体外培养过程中变小,变薄,皱缩变形,触之软如海绵;D组(低比值成骨细胞组)培养的组织基本保持了原支架材料的圆柱体外形,但明显变小、软。

2.6 组织学检测

(1)HE染色 体外培养8周后组织学切片观察 A组基本为成熟的成骨细胞,并已形成大量骨组织,可见到尚未降解的少许支架材料,未见有纤维组织(图1-A),组织学特征类似于B组同比值成骨细胞组(图1-B)。C组结构松散,为纤维组织填充(图1-C)。D组(图1-D)只在部分区域形成有少量成熟骨组织,形成的骨量明显低于A组共培养组和B组同比值成骨细胞组,骨组织的连续性欠佳。

(2)ALP染色 A组(图2-A)与B组(图2-B)细胞胞浆中可见浅棕色至棕黑色细小颗粒或大片状黑色沉淀,着色基本一致,C组(图2-C)则几乎未能发现异染基质。D组(图2-D)则仅在局部区域有不连续的黑染。

2.7 I型胶原免疫组织化学

免疫组织化学结果进一步证实,A、B两组新生组织的主要胶原成分为I型胶原,可见成骨细胞核周围呈黄褐色着色(图3)。但A组(图3-A)着色深度较B组(图3-B)略浅,这可能与A组骨成熟

程度及 I 型胶原含量均低于 B 组有关。C 组、D 组 几乎不能着色。

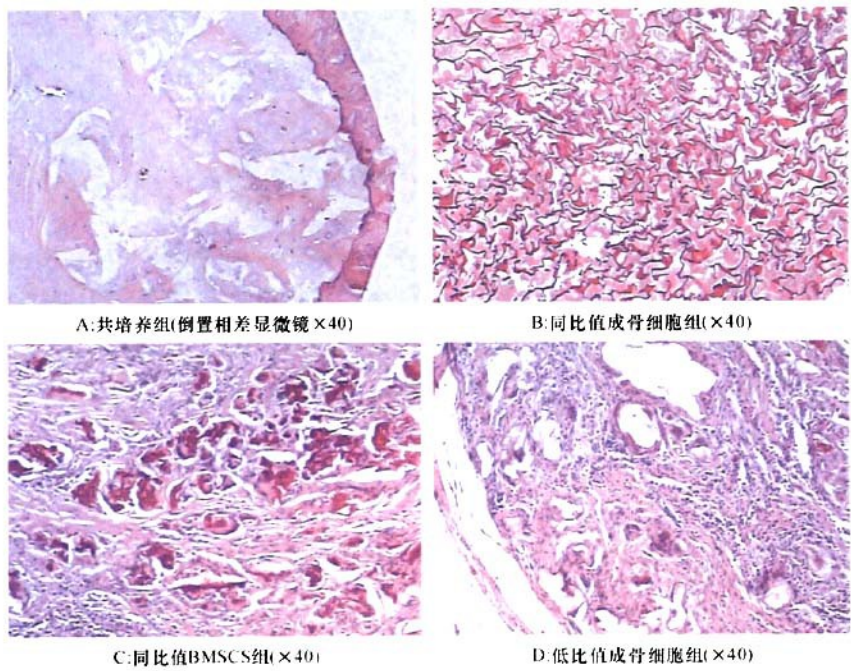


图1 体外培养8周时各组标本的大体和组织学观察

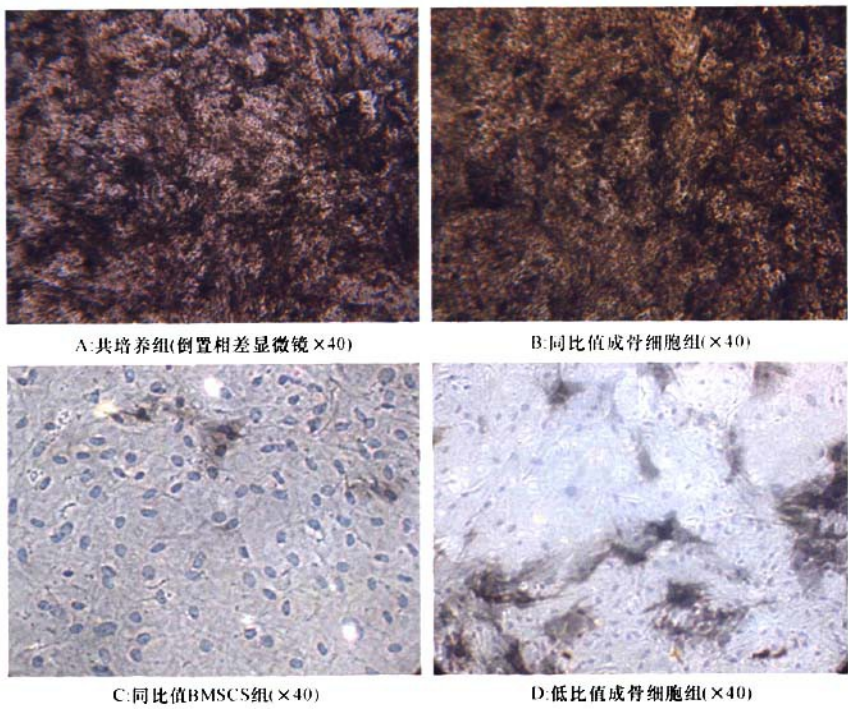
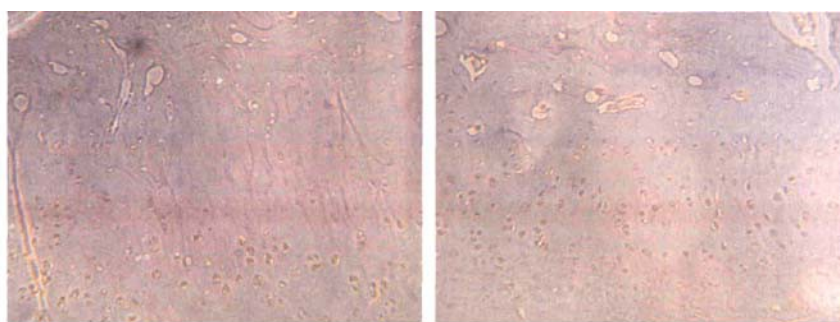


图2 体外培养8周时各组标本的 ALP 染色



A:共培养组(倒置相差显微镜×40)

B:同比值成骨细胞组(×40)

图3 体外培养8周部分标本I型胶原免疫组化检测

3 讨论

BMSCs 存在于骨髓和其他组织中,它能在各自特定的条件下分化再生骨、软骨、肌肉、脂肪等间充质组织,具有典型干细胞的特点^[8-9]。本实验首先探讨了成骨细胞与 BMSCs 两种细胞直接混合培养时不同时间、不同比例对 BMSCs 功能变化的影响。主要目的在于探索两种细胞在何种最小比例下直接混合培养已适合细胞功能的发挥。在直接共培养条件下,不仅细胞分泌的各种因子可通过培养液自由流动,且细胞相互接触,相互作用间作用更为密切。不同比例和不同时间直接混合培养细胞的增殖和功能情况的实验结果表明,单独培养的成骨细胞与两种细胞比例为 3:7 共培养时 ALP 的活性明显高于其他两组,而此两组细胞间的 ALP 活性无显著性差异。因此,当两种细胞以 3:7 的比例直接共培养时,可以促进 BMSCs 的成骨向分化。3:7 是成骨细胞诱导 BMSCs 有效成骨的最小比值。

再将两种细胞以 3:7 的比例混合后接种于支架观察其体外成骨的情况。实验结果表明,3:7 共培养组与同比值成骨细胞组在 8 周时均形成了成熟的骨样组织,相比较原支架材料的大小无塌陷、皱缩。组织学及免疫组织化学也表明成骨细胞及骨特异性基质的量类似。这表明尽管 3:7 共培养组中只有 30% 的成骨细胞,但两者由于混合共培养,其最终形成的成骨效果接近。也可以认为体外共培养过程中 30% 成骨细胞已将 70% 的 BMSCs 诱导成为成骨细胞并形成了骨组织。在另两组中,单独应用相同数量 BMSCs 或单独应用少量成骨细胞接种于相同的支架材料,只形成了很少的骨样组织,这表明单纯的 BMSCs 在没有成骨细胞的诱导作用时,很难在体外

自发形成成熟的骨组织,成骨细胞接种量过少时也不能在体外形成均质连续的骨组织。

BMSCs 在体内主要的分化环境在骨髓及骨松质骨小梁内。BMSCs 在创伤刺激等因素影响下,受局部成骨细胞等形成的成骨“微环境”中复杂细胞信号传导系统的作用进行增殖,经骨原细胞、前成骨细胞最终分化为成骨细胞以参与组织更新和创伤修复。体外时,成骨细胞诱导 BMSCs 成骨分化的机制也涉及好几个方面。成骨细胞具有分泌作用,可分泌骨形成蛋白(BMP)^[10]、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、血小板衍生长因子(PDGF)^[11]、胰岛素样生长因子(IGF)^[12]等。这些因子是公认的 BMSCs 骨分化诱导因子。生长因子与 BMSCs 表面的受体结合,通过受体介导作用,改变细胞内信号系统,最终启动 BMSCs 的特异性成骨转录因子 *Osf2/Cbfa1* 或 *Cbfa1/Runx2*^[13],促进 BMSCs 的增殖及成骨分化。已有实验证实 BMP 对 BMSCs 有骨诱导作用,而转化生长因子(TGF)有促进 BMSCs 增殖作用。BMSCs 也可分泌细胞因子对成骨细胞起诱导作用,最终通过类似正反馈的方式达到促进自身增殖与分化的目的。此外,骨的特异性细胞外基质成分(如 I 型胶原等)及成骨细胞膜表面某些大分子等也是成骨微环境的重要组成部分,对成骨细胞的增殖、黏附、分化状态维持及细胞间信号传导等生物活动具有重要作用。研究还表明,成熟的成骨细胞可以通过细胞间的直接接触作用促进骨髓基质干细胞增殖^[14]。

本实验未探讨成骨细胞在体内促进 BMSCs 骨向分化并形成骨的可行性,因此,尚不能确定共培养

方法构建的骨在体内环境中尤其骨缺损环境中能否维持稳定的成骨表型。进一步的深入研究有必要在前述研究的基础上,系统地比较体外共培养方法构建骨体内植入前后的成骨特性变化,考察力学刺激因素在其中可能发挥的作用,以期改善构建骨的成熟程度及力学特性,为未来的临床应用提供理论依据和技术基础。

[参考文献]

- [1] VAN DAMME A, VANDEN-D RIESSCHE T, COLLEN D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2002, 2(2): 195-209.
- [2] BEFERESFORD J N, BENNETT J H, DEVLIN C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures[J]. *J Cell Science*, 1992, 102(2): 341-351.
- [3] CUI Q, WANG G L, BALIAN G. Steroid-induced adipogenesis in a pluripotent cell line from bone marrow[J]. *J Bone J Surg*, 1997, 79(3): 1054-1063.
- [4] HANADA K, DEMIS J E, CAPLAM A I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(5): 1606-1614.
- [5] KIM K J, ITOH T, KOTAKE S. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 35(3): 279-285.
- [6] YANG X L, KARSENTY G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects[J]. *Trends Molecular Med*, 2002, 8(7): 340-345.
- [7] LIEBERMAN J R, DALUISKI A, STEVENSON S, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats[J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1999, 81(7): 905-917.
- [8] PARK Y J, LEE Y M, PARK S N, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(2): 153-159.
- [9] ANSELME K. Osteoblast adhesion on biomaterials[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(7): 667-672.
- [10] WADA Y, KATAOKA H, YOKOES S, et al. Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells[J]. *Bone*, 1998, 22(5): 479-485.
- [11] YANG D, CHEN J, JING Z, et al. Platelet-derived growth factor(PDGF)-AA: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts[J]. *Cytokine*, 2000, 12(8): 1271-1274.
- [12] BAYLINK J, FINKELMAN R D, MOHAN S. Growth factors to stimulate bone formation[J]. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(2): S565-S572.
- [13] ROEHLECKE C, WITT M, KASPER M. Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cell[J]. *Cells Tissues Organs*, 2001, 168(3): 178-184.
- [14] VAN DER PLASA, NIJWEIDE P J. Cell-cell interactions in the osteogenic compartment of bone[J]. *Bone*, 1988, 9(2): 107-111.

[责任编辑:陈咏梅]