

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.07.003

· 基础研究 ·

犬上颌窦黏膜干细胞的培养和成骨性能的鉴定

张静¹, 朱双喜², 彭伟², 李祥², 荣琼³, 陈松龄²

1. 广州中医药大学祈福医院口腔科, 广东 广州(511495); 2. 中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州(510080); 3. 云南省第一人民医院口腔科, 昆明理工大学附属医院口腔科, 云南 昆明(650032)

【摘要】 目的 探讨犬上颌窦黏膜干细胞的成骨性能。方法 取健康 Beagle 犬上颌窦黏膜, 免疫磁珠法分选 CD146 阳性细胞, 培养犬上颌窦黏膜干细胞。流式细胞术检测一代细胞的表面抗原 CD146 和 CD44、CD34。犬上颌窦黏膜干细胞经基础培养(基础培养组)和成骨诱导培养(成骨诱导组)后, 应用 Real-time PCR、免疫组化法检测 2 组成骨相关基因 mRNA 和蛋白的表达, 应用 ALP 试剂盒检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性, 应用茜素红染色、Von Kossa 染色观察成骨诱导后矿化结节的形成。**结果** 成功培养犬上颌窦黏膜干细胞, 流式细胞术检测显示 CD146 和 CD44 阳性、CD34 阴性。成骨诱导组犬上颌窦黏膜干细胞 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2) ($t = 14.44, P < 0.001$)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN) ($t = 7.85, P = 0.001$) 和 ALP mRNA ($t = 14.27, P < 0.001$) 表达量明显高于基础培养组, 差异均有统计学意义; 成骨诱导组 RUNX2 和 OPN 蛋白表达水平增强。犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导后, 与基础培养组相比, ALP 活性增高, 3 d ($t = 8.79, P < 0.001$)、7 d ($t = 9.75, P < 0.001$)、14 d ($t = 12.14, P < 0.001$)、21 d ($t = 19.62, P < 0.001$)、28 d ($t = 17.53, P < 0.001$) 时, 成骨诱导组明显高于基础培养组; 犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导后茜素红和 Von Kossa 染色可见到明显的矿化结节。**结论** 犬上颌窦黏膜干细胞具有成骨能力。

【关键词】 上颌窦黏膜; 干细胞; 成骨; 碱性磷酸酶; Runt 相关转录因子 2; 骨桥蛋白; 矿化结节

【中图分类号】 R783.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)07-0422-06

【引用著录格式】 张静, 朱双喜, 彭伟, 等. 犬上颌窦黏膜干细胞的培养和成骨性能的鉴定[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(7): 422-427.

Culture and identification of the osteogenic properties of beagle maxillary sinus membrane stem cells

ZHANG Jing¹, ZHU Shuangxi², PENG Wei², LI Xiang², RONG Qiong³, CHEN Songling². 1. Department of Stomatology, Clifford Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511495, China; 2. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Stomatology, First People's Hospital of Yunnan Province, Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, China

Corresponding author: CHEN Songling, Email: surgman@sohu.com, Tel: 0086-20-87755766

【Abstract】 Objective To investigate the osteogenic properties of maxillary sinus membrane stem cells (MSMSCs).

Methods Beagle maxillary sinus mucosa was collected, immunomagnetic bead method was applied for isolation of CD146⁺ cells, and MSMSCs were harvested and cultured from the canine maxillary sinus floor mucosa. The levels of the cell surface antigens CD44, CD146, and CD34 were determined at passage one by flow cytometry. Cells at passage one were cultured in basal medium and osteogenic inductive medium. Real-time PCR, immunohistochemical staining, alkaline phosphatase activity, alizarin red staining and Von Kossa staining were used to investigate the osteogenic properties in vitro. **Results** The canine MSMSCs were cultured successfully. The results of flow cytometry were positive for CD146 and CD44 expression but negative for CD34 expression. The relative mRNA expression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) ($t = 14.44, P < 0.001$), osteopontin (OPN) ($t = 7.85, P = 0.001$) and alkaline phosphatase alka-

【基金项目】 国家自然科学基金(81371111); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2017FE468-168)

【作者简介】 张静, 主治医师, 学士, Email: 544967651@qq.com

【通信作者】 陈松龄, 教授, 博士生导师, Email: chensongling@hotmail.com

line phosphatase ($t = 14.27, P < 0.001$) was apparently higher in the osteoinductive medium group than in the basal medium group, the differences in relative mRNA expression between the groups were significant. The protein levels of RUNX2 and OPN increased in the osteoinductive medium group. The alkaline phosphatase activity of the MSMSCs increased when the cells were cultured in osteoinductive medium; the activity increased to a level that was significantly higher than that in basal medium, particularly at days 3 ($t = 8.79, P < 0.001$), 7 ($t = 9.75, P < 0.001$), 14 ($t = 12.14, P < 0.001$), 21 ($t = 19.62, P < 0.001$) and 28 ($t = 17.53, P < 0.001$). Obvious mineralized nodules were observed by alizarin red staining or Von Kossa staining.

Conclusion Maxillary sinus membrane stem cells exhibit osteogenic ability.

【Key words】 Maxillary sinus membrane; Stem cells; Osteogenesis; Alkaline phosphatase; Runt-related transcription factor 2; Osteopontin; Mineralized nodules

上颌窦底提升术是解决上颌后牙区骨量不足的有效方式,已广泛用于上颌后牙区牙种植,但由于上颌窦底提升后窦底空间的成骨速度慢、成骨量不足等问题,与牙槽骨其他区域相比种植体存留率较低^[1]。近年来研究发现上颌窦黏膜参与上颌窦底提升空间成骨^[2-4]。Mahler等^[2]发现上颌窦外提升患者术后出现感染化脓,经积极抗感染、手术清创及重新填充骨移植材料处理,数月后发现骨移植材料最上方出现“圆屋顶形”密质骨,推测上颌窦黏膜具有成骨的潜能。Cricchio等^[3]发现同期种植时,新骨形成似乎是从上颌窦黏膜向种植体表面扩展。Palma等^[4]通过对比卷尾猴上颌窦底提升同期牙种植中不填充骨移植材料和填充自体骨6个月后的骨-种植体接触率和骨质量,发现二者并没有统计学差异。该研究不仅证实了上颌窦底成骨空间维持的重要性,而且有了新的发现:未植骨侧上颌窦新骨常在在上颌窦黏膜接触的血块中形成,因此认为上颌窦黏膜有骨诱导作用。上颌窦黏膜干细胞则是上颌窦黏膜发挥成骨作用的重要细胞来源^[5]。本课题组前期研究也证实人上颌窦黏膜含有间充质干细胞,且具有多向分化能力^[6]。为了更进一步探索上颌窦黏膜干细胞的成骨能力和成骨机制,本研究拟采取犬上颌窦黏膜,通过免疫磁珠法分选 CD146 阳性细胞,分离纯化获得上颌窦黏膜干细胞^[7],并通过实验鉴定其成骨能力,以为促进上颌窦底提升术后的成骨效果提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

年龄 1~2 周岁 Beagle 犬,体质量 15~20 kg,购自高要市康达实验动物科技有限公司。

胎牛血清(Gibco,美国); II 型胶原酶(Gibco,

美国);中性蛋白酶(Roche,美国); α -MEM 基础培养基(武汉博士德公司)含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺; α -MEM 成骨诱导培养基(武汉博士德公司)含 α -MEM 基础培养基、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C、 10^{-7} mol/L 地塞米松;小鼠抗犬 CD146 单克隆抗体(Gibco,美国);小鼠抗犬 CD34、CD44 单克隆抗体(Gibco,美国);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)测试盒(武汉博士德公司);TRIzol Reagent(Invitrogen,美国);DAB 试剂盒(Abcam,英国);荧光定量 PCR 检测试剂盒(Takara,日本);茜素红(上海杰美基因公司);Von Kossa 染色试剂盒(上海杰美基因公司);兔抗犬 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)多克隆抗体(Abcam,英国);羊抗兔 IgG-HRP(Abcam,英国)。

1.2 犬上颌窦黏膜干细胞的分离培养

Beagle 犬上颌窦黏膜按课题组前期已报道的手术方法取材^[8](图 1)。



图 1 犬上颌窦黏膜取材

Figure 1 Collection of canine maxillary sinus mucosa

酶消化法进行细胞原代培养,至70%~80%汇合时传代,免疫磁珠法分选CD146阳性细胞。将小鼠抗犬CD146单克隆抗体按4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度加入单细胞悬液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min后用PBS漂洗细胞两次,去除多余的抗体。选用包被好的小鼠抗犬IgG免疫磁珠,使用前将磁珠用PBS漂洗2次以去除游离的抗体,并稀释20倍。将预处理的磁珠按4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度放入与一抗充分结合的细胞悬液中,均匀混合后置于室温下孵育30 min。将结合了磁珠的细胞悬液放入高强度磁场中静置5 min,轻洗吸去试管中的液体,将试管脱离磁场并以PBS冲洗试管壁,将粘附在管壁上的细胞(即CD146阳性细胞)冲洗下来制成单细胞悬液,取样品滴于载玻片及细胞计数器上,分别用于细胞纯度分析和活力测定。倒置相差显微镜观察细胞生长情况和细胞形态。

1.3 流式细胞技术检测犬上颌窦黏膜干细胞分子表型

P1代细胞胰酶消化,制成单细胞悬液,PBS洗涤2次,离心收集细胞。

用1 mL含3%胎牛血清的PBS重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。分别用CD44-FIFC、CD146-FIFC、和CD34-FIFC抗体标记,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,PBS洗涤,流式细胞仪检测。

1.4 Real-time PCR检测

P1代细胞接种于6孔板中,细胞密度为 1×10^6 个/孔,分别用 α -MEM基础和成骨诱导培养基培养。7 d后收集细胞行Real-time PCR检测。根据Gene Bank数据库中犬RUNX2、OPN、ALP和GAPDH的mRNA序列设计引物。

RUNX2引物:上游5'-GATCATCGCTGAC-CACCC-3';下游5'-GACAGTAACCACAGTCCCATCT-3';产物大小165 bp。OPN引物:上游5'-CATG-GTTGGCCTTATCCTG-3';下游5'-CGATGCT-GATCCAATGTAG-3',产物大小146 bp。ALP引物:上游5'-GGACTACGCTCACAACA ACTACCA-3';下游5'-ACCCTTGGCGAAGACTGCTA-3',产物大小188 bp。GAPDH引物;上游5'-A TTCCACGGCA-CAGTCAAG-3';下游5'-ATACTCAGCACCAGCAT-CAC-3',产物大小418 bp。

1.5 免疫组化法检测RUNX2和OPN蛋白的表达

P1代细胞接种于6孔板中,细胞密度为 1×10^4 个/孔,分别用 α -MEM基础和成骨诱导培养基培养,用PBS替代一抗设立空白对照。7 d后进行

SAB法免疫组化检测。4%的多聚甲醛4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定20 min,PBS漂洗3次,每次5 min;0.3%的Triton X-100作用15 min,PBS漂洗3次,每次5 min;3% H_2O_2 孵育15 min,PBS漂洗3次,每次5 min;羊血清37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭20 min;1:400的兔抗犬RUNX2或OPN多克隆抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,次日37 $^{\circ}\text{C}$ 复温45 min,PBS漂洗3次,每次5 min;1:500的羊抗兔IgG-HRP 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,PBS漂洗3次,每次5 min;DAB显色,PBS漂洗3次,每次5 min;苏木素复染。倒置显微镜观察、拍照。

1.6 ALP活性检测

P1代细胞接种于6孔板中,细胞密度为 1×10^4 个/孔,分别用 α -MEM基础(基础培养组)和成骨诱导培养基(成骨诱导组)培养。1、3、7、14、21、28 d后收集细胞行ALP活性检测。基础培养组为对照组。

1.7 茜素红及Von Kossa染色

P1代细胞接种于6孔板中,细胞密度为 1×10^4 个/孔, α -MEM成骨诱导培养基连续培养28 d,倒置显微镜观察细胞形态,避免因细胞过密导致剥脱。

在诱导至第28天时进行茜素红及Von Kossa染色。倒置显微镜观察,拍照。

1.8 统计方法

采用SPSS 19.0软件进行统计,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,正态检验后,两组间均数的比较采用 t 检验。检验水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞的形态学观察

原代培养24 h犬上颌窦黏膜干细胞呈梭形或多角形,细胞单个散在分布(图2a)。4 d可出现细胞克隆,细胞快速增殖。约7 d细胞长满孔底的50%,融合成片,细胞以多角形为主(图2b),9~11 d可第1次传代,2~3 d后细胞融合成片,形成单细胞层,细胞形态呈多角形,可见长的突起,细胞核大,核仁明显(图2c)。第1次传代4 d后细胞可达80%汇合,可以进行第2次传代。

2.2 流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测犬上颌窦黏膜干细胞表面标记,结果显示犬上颌窦黏膜干细胞具有与骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSS-Cs)相似的干细胞特异性表面分子,高表达CD146和CD44(共表达分子),造血表面分子标志物CD34几乎不表达(图3)。



a: 原代细胞培养1 d, × 400; b: 原代细胞培养7 d, × 100; c: P1代细胞, × 400, HE染色。

图2 犬上颌窦黏膜干细胞形态 倒置相差显微镜

Figure 2 Morphology of MSMSCs Under inverted phase microscope

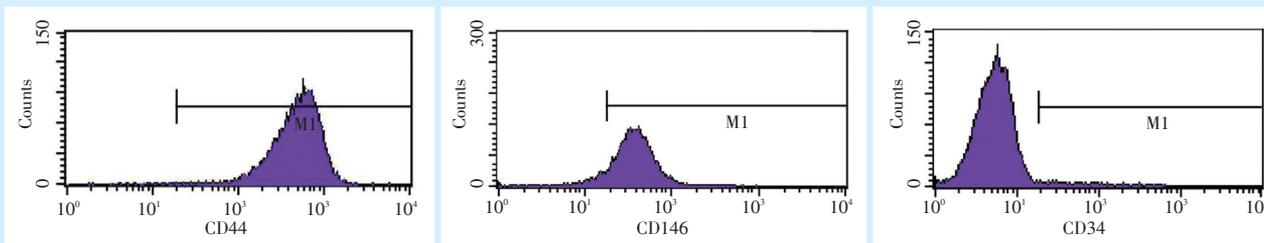
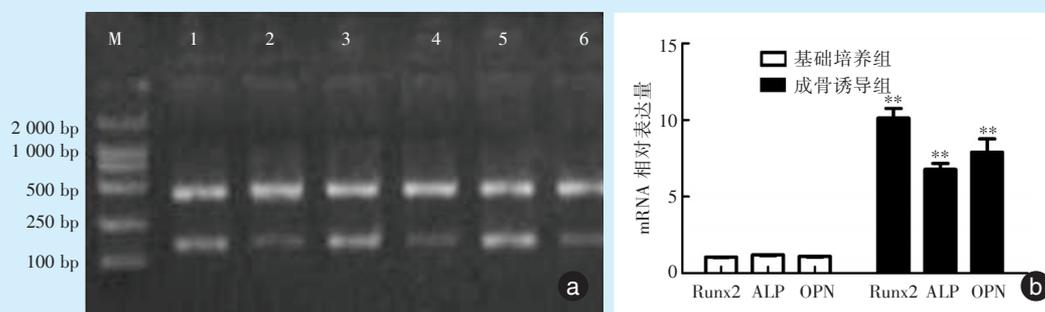


图3 P1代犬上颌窦黏膜干细胞表型的流式细胞术分析

Figure 3 Phenotypic analysis of beagle MSMSCs at passage one by flow cytometry



a: 1、2为成骨诱导组和基础培养组RUNX2表达情况;3、4为成骨诱导组和基础培养组ALP表达情况;5、6为成骨诱导组和基础培养组OPN表达情况;M: Marker; n = 3, b: **为与基础培养组比较, $P < 0.01$ 。RUNX2: Runt相关转录因子2; ALP: 碱性磷酸酶; OPN: 骨桥蛋白。

图4 成骨诱导培养细胞成骨标志物 mRNA 的表达

Figure 4 mRNA expression of osteogenesis markers in MSMSCs after osteogenic induction

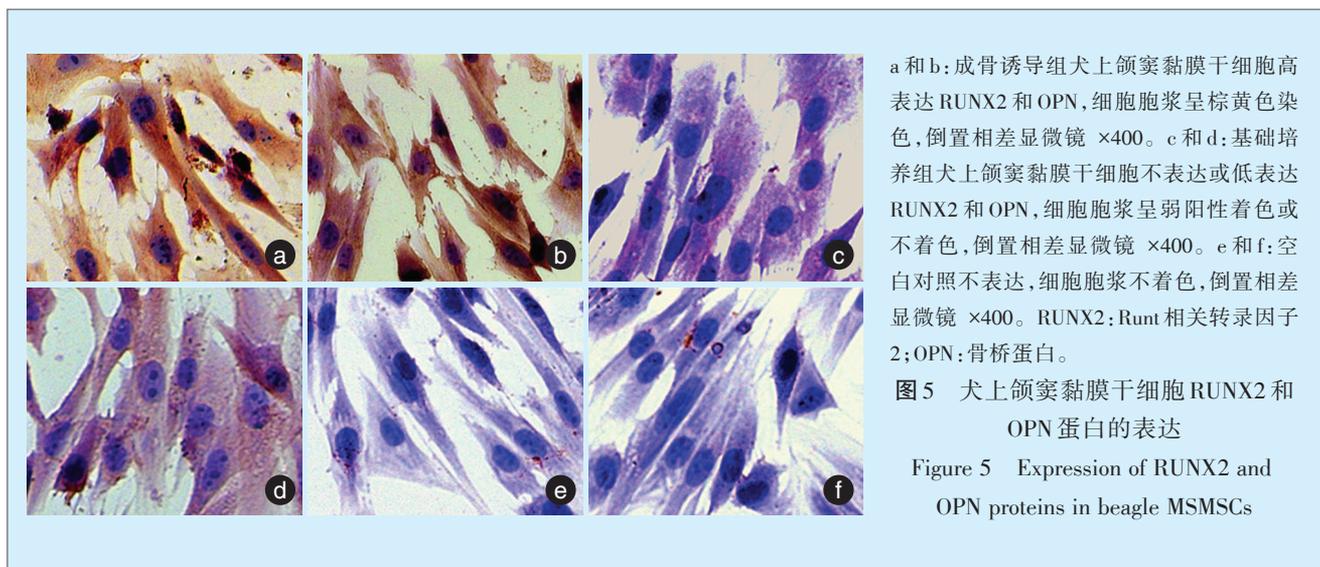
2.3 2组成骨标志物 mRNA 的表达

如图4所示,成骨诱导组犬上颌窦黏膜干细胞RUNX2($t = 14.44, P < 0.001$)、OPN($t = 7.85, P = 0.001$)和ALP mRNA($t = 14.27, P < 0.001$)表达量明显高于基础培养组,各组间mRNA表达量差异

有统计学意义。

2.4 2组RUNX2和OPN蛋白的表达

如图5所示,骨诱导组犬上颌窦黏膜干细胞胞浆中高表达RUNX2和OPN,表达部位主要位于胞浆(图5a和图5b),基础培养组犬上颌窦黏膜干



a和b:成骨诱导组犬上颌窦黏膜干细胞高表达RUNX2和OPN,细胞胞浆呈棕黄色染色,倒置相差显微镜×400。c和d:基础培养组犬上颌窦黏膜干细胞不表达或低表达RUNX2和OPN,细胞胞浆呈弱阳性着色或不着色,倒置相差显微镜×400。e和f:空白对照不表达,细胞胞浆不着色,倒置相差显微镜×400。RUNX2:Runt相关转录因子2;OPN:骨桥蛋白。

图5 犬上颌窦黏膜干细胞RUNX2和OPN蛋白的表达
Figure 5 Expression of RUNX2 and OPN proteins in beagle MSMSCs

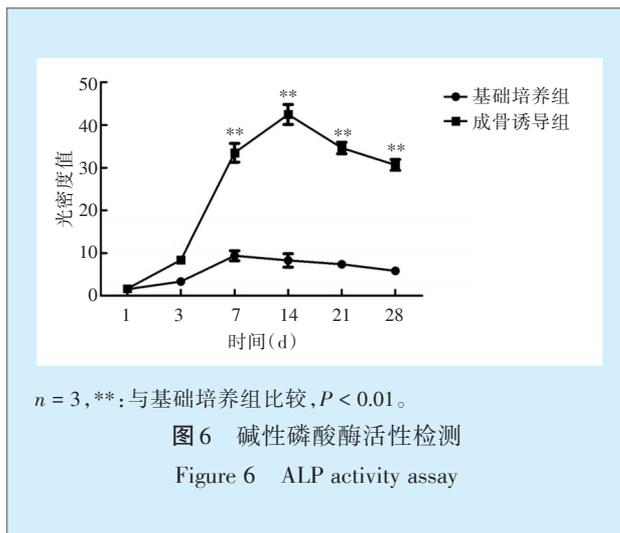
胞不表达或低表达RUNX2和OPN(图5c和图5d),空白对照不表达(图5e和图5f)。

2.5 ALP活性检测

培养细胞经成骨诱导后,ALP活性增高,3 d ($t = 8.79, P < 0.001$)、7 d ($t = 9.75, P < 0.001$)、14 d ($t = 12.14, P < 0.001$)、21 d ($t = 19.62, P < 0.001$)、28 d ($t = 17.53, P < 0.001$)时,成骨诱导组明显高于基础培养组(图6)。

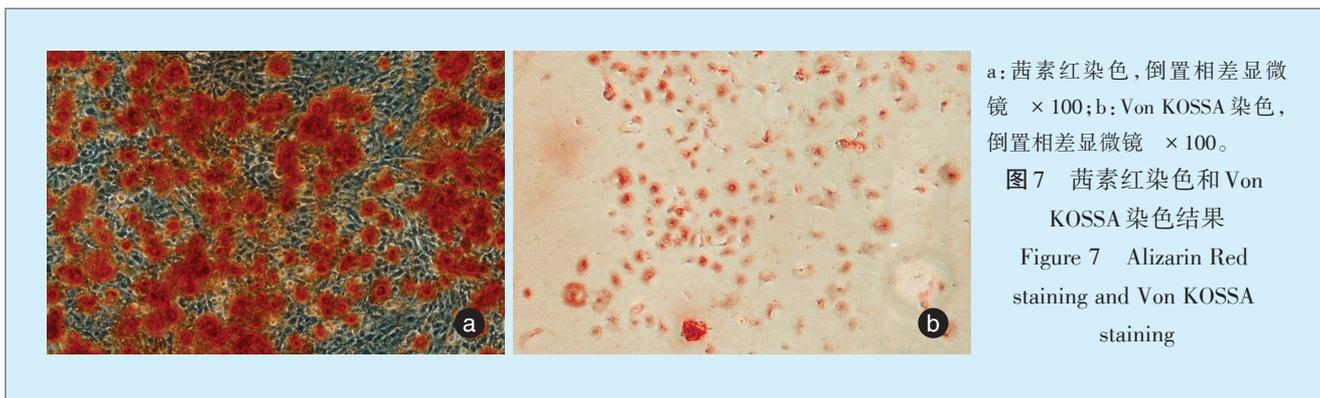
2.6 成骨诱导后矿化结节形成情况

茜素红染色结果显示,犬上颌窦黏膜干细胞成骨诱导培养28 d后,有大量染为红色的矿化结节(图7a)。Von Kossa染色可见到暗红色矿化结节(图7b)。



$n = 3, **$:与基础培养组比较, $P < 0.01$ 。

图6 碱性磷酸酶活性检测
Figure 6 ALP activity assay



a:茜素红染色,倒置相差显微镜×100;b:Von Kossa染色,倒置相差显微镜×100。

图7 茜素红染色和Von Kossa染色结果
Figure 7 Alizarin Red staining and Von Kossa staining

3 讨论

3.1 上颌窦黏膜成骨能力

目前研究发现,上颌窦底提升后新骨形成机理可能与种植体和提升后的上颌窦底黏膜之间所产生的密闭空间成骨有关^[4]。上颌窦黏膜可以生

物屏障膜的功能在新骨形成中发挥作用^[9]。近年来,随着研究的深入,发现上颌窦黏膜在上颌窦底提升成骨中不仅起屏障膜的作用,还具有成骨作用。Srouji等^[10]在裸鼠皮下植入人上颌窦黏膜,发现上颌窦黏膜在裸鼠体内有异位成骨的能力。本课

题组前期研究发现人上颌窦黏膜组织中存在的上颌窦黏膜干细胞在骨诱导条件下具有明显成骨能力,是上颌窦底提升术后窦底成骨的重要细胞来源^[6]。

3.2 上颌窦黏膜干细胞表面标志分子

近年来,研究发现 CD105 和 STRO-1 是骨髓间充质干细胞的表面标志分子^[11,12], Yun 等^[5]和本课题组前期的研究发现人上颌窦黏膜干细胞也高表达 STRO-1 和 CD105,表明上颌窦黏膜干细胞与骨髓间充质干细胞一样具有间充质来源细胞的特性^[6]。上颌窦黏膜干细胞作为一种间充质干细胞,除了表达 STRO-1 (stromal cell antigen-1) 和 CD105,也有可能表达其它间充质干细胞相似的干细胞特异性表面分子。因此本实验检测了其它干细胞表面分子标记物,结果发现犬上颌窦黏膜干细胞高表达间充质来源细胞表面标志物 CD146 和 CD44,几乎不表达造血来源干细胞表面标志物 CD34。为探讨 CD146 和 CD44 阳性的上颌窦黏膜干细胞在成骨诱导条件下向成骨细胞分化的能力,本研究以免疫组化和 Real-timePCR 检测培养细胞成骨相关基因的表达及以 ALP 测试盒检测碱性磷酸酶的活性,以茜素红染色、Von Kossa 染色观察了矿化结节的形成。

3.3 上颌窦黏膜干细胞成骨能力

RUNX2 是一种重要的成骨转录因子,是成骨细胞开始分化的标志,诱导骨髓间充质干细胞成骨分化,是骨形成过程中所必需的关键因子^[13]。ALP 是成骨细胞的功能性酶,在钙盐沉积中起关键性作用,ALP 活性的提高是骨向分化的重要标志^[14]。OPN 也是成骨细胞的标志物,参与骨形成与骨重建过程^[15]。因此通过检测 RUNX2、OPN 及 ALP 的表达,可以评估上颌窦黏膜干细胞成骨能力。本实验发现上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导分化后,RUNX2、OPN 及 ALP mRNA 表达量明显升高,免疫组化检测也发现经成骨诱导培养的上颌窦黏膜干细胞高表达 RUNX2 和 OPN 蛋白,而经成骨诱导后碱性磷酸酶活性升高,茜素红和 Von Kossa 染色出现明显的钙结节,表明了上颌窦黏膜干细胞具有成骨能力。

参考文献

- [1] Rodriguez Y, D'acquino R, Graziano A, et al. Autologous periosteum-derived micrografts and PLGA/HA enhance the bone formation in sinus lift augmentation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 87.
- [2] Mahler D, Levin L, Zigdon H, et al. The "dome phenomenon" associated with maxillary sinus augmentation[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009, 11(Suppl1): e46-51.
- [3] Cricchio G, Palma VC, Faria PE, et al. Histological findings following the use of a space-making device for bone reformation and implant integration in the maxillary sinus of primates[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2009, 11(Suppl1): e14-22.
- [4] Palma VC, Magro-Filho O, De Oliveria JA, et al. Bone reformation and implant integration following maxillary sinus membrane elevation: an experimental study in primates[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2006, 8(1): 11-24.
- [5] Yun KI, Kim DJ, Park JU. Osteogenic potential of adult stem cells from human maxillary sinus membrane by simvastatin in vitro: preliminary report[J]. *J Korea Assoc Oral Maxillofac Surg*, 2013, 39(4): 150-155.
- [6] Guo J, Weng J, Rong Q, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human maxillary sinus membrane[J]. *Sci Rep*, 2015, 29(5): 11660.
- [7] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-155.
- [8] 荣琼, 朱双喜, 陈松龄, 等. 犬上颌窦底黏膜骨原细胞的培养和成骨性能的研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(3): 378-386.
- [9] Li X, Chen SL, Zhu SX, et al. Guided bone regeneration using collagen membranes for sinus augmentation[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2012, 50(1): 69-73.
- [10] Srouji S, Kizhner T, Ben David D, et al. The schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: *in vivo* and *in vitro* study[J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84(2): 138-145.
- [11] Mas A, Nair S, Laknaur A, et al. Stro-1/CD44 as putative human myometrial and fibroid stem cell markers[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(1): 225-34.e3.
- [12] Kim S, Shin SJ, Song Y, et al. *In vivo* experiments with dental pulp stem cells for pulp-dentin complex regeneration[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 409347.
- [13] Hu N, Feng C, Jiang Y, et al. Regulatory effect of Mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs): possible role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-10506.
- [14] Wu L, Zhao X, He B, et al. The possible roles of biological bone constructed with peripheral blood derived EPCs and BMSCs in osteogenesis and angiogenesis[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8168943.
- [15] Tian Y, Cui LH, Xiang SY, et al. Osteoblast-oriented differentiation of BMSCs by co-culturing with composite scaffolds constructed using silicon-substituted calcium phosphate, autogenous fine particulate bone powder and alginate in vitro[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88308-88319.

(编辑 张琳, 曾曙光)