

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.004

复合血管内皮细胞的不同孔径磷酸钙陶瓷体内血管化的比较研究*

王德元¹ 白峰^{2△} 高文魁¹ 陈芦斌² 李伟² 范少地²

(1 解放军第四医院骨科 青海 西宁 810001; 2 解放军 451 医院骨科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 比较不同孔径多孔 β -TCP 材料复合血管内皮细胞后的体内血管化, 探索孔隙大小对人工骨材料体内血管形成的作用。**方法:** 血管内皮细胞与连通径均为 100 μM , 而孔径分别为 200-300 μM 和 300~400 μM 两种不同孔隙结构 β -TCP 材料复合后包埋入 36 只成年新西兰兔的腿部肌肉内, 相同结构的空白 β -TCP 材料作对照, 术后 2、4、8 周对材料进行组织学观察、免疫组织化学分析, 计算新生血管密度。**结果:** 复合血管内皮细胞的材料血管形成启动过程早于空白对照组, 术后第 4 周血管管腔已基本成形, 并基本稳定, 至第 8 周开始血管充盈, 微血管密度高于对照组($P<0.05$)。而不同孔径的材料比较发现, 不论是复合血管内皮细胞的材料还是空白材料, 孔径 300~400 μM 的材料内新生血管密度显著高于孔径 200-300 μM 材料($P<0.05$)。**结论:** 材料孔隙较大的材料更有利于材料体内的血管化, 而复合血管内皮细胞后, 更加快了其血管化进程, 这一研究结果提示材料孔隙间的连通是影响材料体内血管化的关键因素, 该研究结论将为改善人工骨材料体内血管化的方法提供新的思路, 同时也为骨移植材料的最优结构的选择提供一定的借鉴。

关键词: 骨组织工程; 血管内皮细胞; 血管化; β -TCP; 孔隙结构

中图分类号: Q95-3, R318.08, R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)20-3815-04

A Comparative Study on Vascularization of Two Different Pore Structure β -TCP Combined with Vascular Endothelial Cell in Vivo*

WANG De-yuan¹, BAI Feng^{2△}, GAO Wen-kui¹, CHEN Lu-bin², LI Wei², FAN Shao-di²

(1 Institute of Orthopedic Surgery, 4 Military Hospital, Xi'ning, Qinghai, 810001, China;

2 Institute of Orthopedic Surgery, 451 Military Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To compare the vascularization of two different three-dimensional structure β -TCP biomaterials combined with vascular endothelial cell in vivo. To explore the effect of pore in the vascularization of artificial bone. **Methods:** Thirty-six adult rabbits were selected for operation. Two different three-dimensional structure β -TCP biomaterials (the pore diameter is 200-300 μM and 300-400 μM , but the same pore interconnection diameter is 100 μM) were planted separately into muscle of every rabbit. The specimens were harvested in 2, 4, 8 weeks after surgery for histology, immunohistochemistry and account the neovessels density in β -TCP. **Results:** The vascularization of β -TCP combined with vascular endothelial cell was earlier than that in blank control group. In four weeks of implantation, blood vessel lumens were formed in β -TCP combined with vascular endothelial cell, and angioplerosis could be found in 8 weeks. The microvessel density in β -TCP combined with VEC was higher than that of blank control group($P<0.05$). No matter with VEC or not, the microvessel density in the β -TCP with pore diameter 300-400 μM was higher than that in the β -TCP with pore diameter 200-300 μM ($P<0.05$). **Conclusion:** The larger pore can induct more complete vascularization of scaffolds, and the vascularization can be accelerated as scaffolds combined with vascular endothelial cell. These conclusions will provide new ideas for the improvement of the efficiency of bioceramic bone substitutes vascularisation in vivo. At the same time, these conclusions will help to choose the optimal structure of bone implants.

Key words: Bone tissue engineering; Vascular endothelial cell; Vascularization; β -TCP; Pore

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R318.08, R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3815-04

前言

严重创伤、感染以及骨肿瘤切除常导致严重的骨组织缺损, 特别是大段骨缺损, 大大增加救治难度。目前临床多采用自体骨移植和同种异体骨移植的方法, 但是自体骨来源有限, 异

体骨移植可能会引起免疫排斥反应。为了解决这些问题, 骨组织工程研究受到了普遍关注, 并成为具有一定应用前景的治疗骨缺损的可供选择的手段。但是解决大段骨缺损修复的问题首先就是要解决大段组织工程化骨的血管化^[1]。尽管各种促进材料血管化的手段已被采用, 如: 血管移植、内皮细胞复合、生长

* 基金项目: 国家十一五科技支撑计划 (2006BAI16B02)

作者简介: 王德元, 男, 骨科副主任, 研究方向: 四肢创伤

△ 通讯作者: 白峰, E-mail: baifeng_fmumu@126.com

(收稿日期: 2013-12-23 接受日期: 2014-01-22)

因子复合等^[25],但是有研究显示即使在富含细胞及骨诱导因子的自体松质骨,其移植后对成骨和愈合发生关键影响的仍是其作为疏松多孔体能够快速发生血管化这一因素。由此提示,各种促血管化手段的有效发挥均依赖于支架材料的三维孔隙结构,因此有必要研究孔隙结构变化对采取一定促血管化手段后材料体内血管化的影响,以选择适合血管化的孔隙结构。本实验选取两种不同孔径多孔磷酸三钙陶瓷材料,复合血管内皮细胞后植入动物体内,比较两种结构材料的体内血管化程度,探讨孔径对血管内皮细胞的促血管化作用的影响。

1 材料和方法

1.1 多孔 β -磷酸三钙材料(β -TCP)

片状多孔 β -TCP 材料由上海贝奥路生物材料有限公司惠赠,直径 10 mm, Ca / P 为 1.5,孔隙率 >75%,连通率大于 90%。本研究选择孔径 200-300 μm 和孔径 300~400 μm 两种不同孔径材料,连通径均为 100 μm 。

1.2 血管内皮细胞(EC)的体外培养及复合

无菌条件下切取一段兔的股动脉,充分冲洗处理血管内外膜后,然后将内膜内面朝下贴在盛有消化液的小培养皿中。按消化离心培养法制成密度为 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个的细胞悬液。按每孔 1 mL 接种在 24 孔培养板内,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中(湿度 100%)常规培养和传代。取第三代血管内皮细胞,用 0.25% 的胰酶消化制成浓度为 3×10^5 / L 血管内皮细胞悬液,按细胞悬液 2 V:新生牛血清 1 V:DMEM 液 2 V:胶原溶液 5V 的比例 4℃ 条件下将 4 种成分快速混匀,加入数滴 1 mol / L 的 NaOH 液调值至中性(培养液中酚红指示),形成内皮细胞胶原混悬液,取 1 mL,4℃ 条件下缓慢滴入放有 β -TCP 生物陶瓷材料的培养皿内,液体淹没材料表面,放入 37℃ 孵箱中培养。3d 后取材。

1.3 实验动物分组及模型制备

取健康新西兰大白兔 36 只,雌雄不限,体重 2.2~3.0Kg,随机分为 2 组:孔径 200-300 μm 组和孔径 300-400 μm 组,2% 异戊巴比妥钠麻醉,双后腿剃毛,消毒,取外侧切口,切开皮肤及皮下组织,显露肌层,采用自体对照,左侧植入 EC+ β -TCP 材料,右侧植入已消毒的同样规格空白 β -TCP 材料,逐层缝合伤口,术后伤口不盖敷料。

1.4 组织学检查

分别于术后 2、4、8 周取材,10%甲醛固定。EDTA 脱钙,冲洗、脱水、石蜡包埋,Zeiss 1516 型电动石蜡切片机垂直方向连续作 5 张组织切片,切片厚度 5 μm ,苏木素伊红(HE)染色,观察材料内血管长入情况。

1.5 免疫组织化学分析

采用链霉抗生物素蛋白过氧化物酶(SP)法,切片脱腊至水,3%H₂O₂ 孵育 5 min,0.1 mol / L 磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡,5%羊血清封闭 10 分钟。滴加 1:200 鼠抗兔 CD34(4℃ 过夜)、PBS 冲洗,滴加生物素标记羊抗小鼠 IgG(37℃,20 min),再滴加辣根过氧化物酶标记链霉抗生物素蛋白(37℃,20 min),二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.6 微血管密度计算

每个标本挑选一张最典型组织学切片进行新生血管计数。用 LEICA MTLA 全自动专业研究级显微镜(德国 LEICA 公司)进行图像采集。于 200 倍的光镜下随机采集 10 个视野,以 CD34 阳性细胞形成血管面细胞总面积百分比进行测定,用 Image pro plus 专业图像分析软件进行分析计算积占。

1.7 统计学处理

所有数据用 SPSS12.0 软件处理。数据用表示。每种结构 3 个时间点之间差异用完全随机设计的多样本比较的 Kruskal-WallisH 秩和检验,同一时间点各结构之间的差异采用两两比较的 Nemenyi 检验比较两种结构之间的差异,P 值 <0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大体观察

术后所有动物切口均无感染性破溃和分泌物。伤口均为 I 期愈合。取材时见所有植入物局部无感染、坏死、囊性包裹及明显炎性反应。术后 2 周,植入物表面被一层透明的纤维结缔组织薄膜包裹,材料形状规则。术后 4 周,植入物与周围组织粘连紧密,横切面色呈灰白,有点状出血,植入材料边缘棱角变钝。术后 8 周,材料变薄,体积缩小,边缘变顿。

2.2 组织学观察

术后 2 周,材料被一薄层纤维组织包裹,新生血管向内部延伸,更多的孔隙被纤维组织侵占,但集中在材料的外周孔隙复合内皮细胞且孔径较大的材料内可见较多的血管形成。4 周时,纤维组织和新生血管进一步向材料中心延伸,材料内的血管数量和纤维组织含量显著增加,孔隙内细胞数量增多,多以成纤维细胞为主。大部分材料全层血管化,而孔径较小的空白材料,其中心部分孔隙内没有或少见血管结构,且新生的血管分布不均。术后 8 周,复合血管内皮细胞的材料血管化程度与 4 周时相比无明显变化,血管数量恒定,材料内充满红细胞的较为成熟的毛细血管数量有所增加,管腔变大,且中心部位也有大管腔的血管出现,而小孔径空白材料中心仅见幼稚的小管腔毛细血管形成。

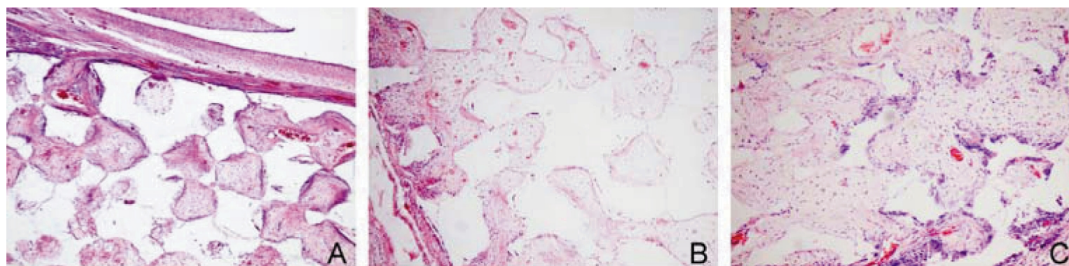


图 1 不同植入时间材料血管形成的组织学分析 A.2 周;B.4 周;C.8 周(HE × 100)

Fig.1 Light microscopic findings in scaffolds at 2(A), 4(B), 8 weeks(C) after implantation. (HE × 100)

2.3 免疫组化分析

CD34 作为血管内皮表面特异抗原,可较早较清楚标记显示出血管结构。染色显示,术后 2 周复合 EC 的多孔材料外周已有较为成熟血管形成,孔径较大的材料内血管较为丰富且管腔较大,而孔径小的空白材料外周仅见幼稚管腔形成。4 周时实验组材料内可见已有血管的充盈,尤其是大孔径材料可见大量成熟血管,材料中心孔隙可见单层内皮细胞组成的毛细血管形成,8 周时,材料中心可见充满红细胞的成熟血管。而对照组

中小孔径材料内血管形成缓慢,第 4 周时不但血管形成结构差,而且数量少,至 8 周时,开始有部分充盈样毛细血管结构出现。

微血管密度分析可以发现,所有组的微血管密度均随着时间的延长而增加,4 周后逐渐进入平台期,微血管密度无明显增加,复合血管内皮细胞组微血管密度较空白组高,而两种孔径材料相比,孔径 300~400 μm 的材料新生血管密度较孔径 200-300 μm 高,差异具有统计学意义($P<0.05$),结果见表 1。

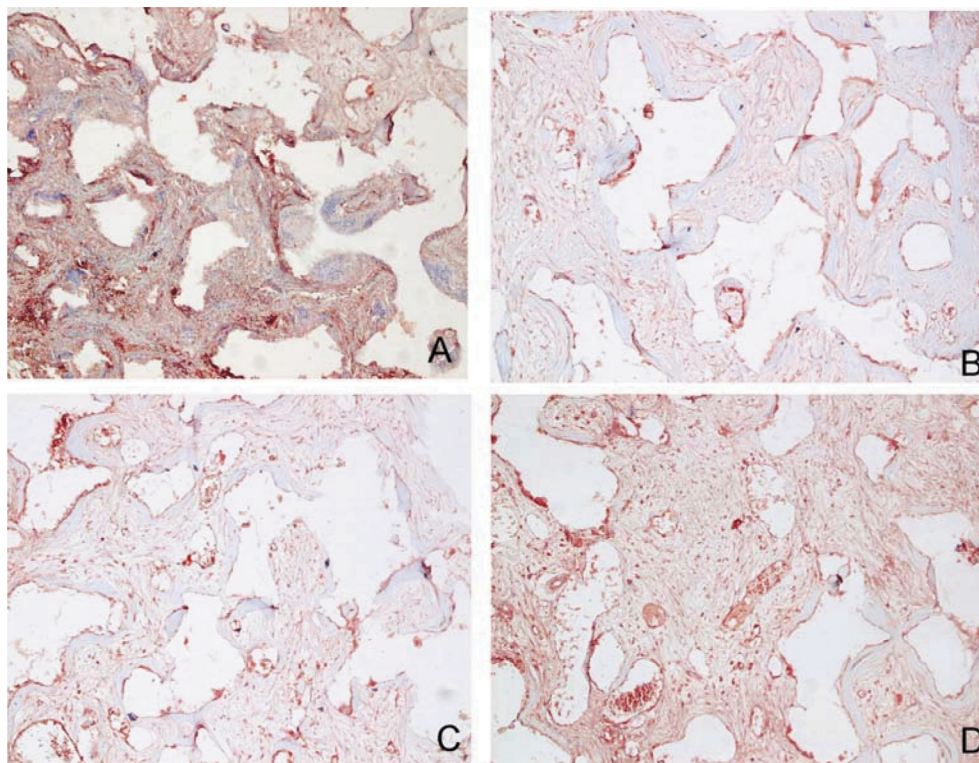


图 2 复合 EC 不同孔径材料与单纯材料 4 周内血管化的免疫组织化学染色。A. 孔径 200-300 μm 材料;B. 孔径 300-400 μm ; C. 复合 EC 的孔径 200-300 μm 材料;D. 复合 EC 的孔径 300-400 μm (SP $\times$ 100)

Fig.2 Immunohistostaining findings in two kinds of scaffolds with different pore size combined with EC or not. (A. 200-300 μm , B. 300-400 μm , C. scaffolds with 200-300 μm pore size combined with EC, D. scaffolds with 300-400 μm pore size combined with EC) and the constant pore size (300-400 μm) four weeks after implantation (SP $\times$ 100)

表 1 复合 EC 的不同孔径 β -TCP 材料不同时间微血管密度比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 The microvessel density in β -TCP combined with VEC in different time($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别 Group	2 周 Two weeks	4 周 Four weeks	8 周 Eight weeks
200-300um/EC	2.79 $\pm$ 0.52*	7.36 $\pm$ 2.13	7.76 $\pm$ 1.99
300-400um/EC	4.27 $\pm$ 0.98*	9.81 $\pm$ 3.65	10.18 $\pm$ 3.56
200-300um	1.67 $\pm$ 0.43	5.55 $\pm$ 1.02	6.79 $\pm$ 1.35
300-400um	2.19 $\pm$ 0.52	6.62 $\pm$ 1.22	8.07 $\pm$ 2.54

注:与空白材料组相比, * $P<0.05$ 。

Note: Compare with control groups, * $P<0.05$.

3 讨论

生物陶瓷作为骨替代材料修复骨缺损具有很高的效能,这是因为材料多孔框架结构,良好的组织相容性和生物相容性,从而加速体内骨再生的速度,有利于骨的功能重建。而在骨的重建过程中,材料的体内血管化是一个非常重要的环节,它影

响着移植后材料与宿主相互结合的起始环节,决定着生物陶瓷支架材料体内移植的成败^[6,7]。骨支架材料的血管化,除了为局部组织的生长提供营养物质外,在骨再生过程中也起着非常关键的作用,它对骨细胞的活性和迁移有着很大的影响。一些研究证实,骨移植物的血管化主要是炎症反应诱导的、骨移植材料再生性能所影响及其复合的细胞和大量存在于细胞外基

质中的生长因子介导的过程^[7-11]。加速骨移植材料体内血管化的方法很多,诸如移植材料复合血管内皮和血管内皮细胞因子,骨膜瓣、肌肉瓣包裹材料及血管束移植等。但是有研究表明,即使在富含细胞及骨诱导因子的自体松质骨,其移植后对成骨和愈合发生关键影响的仍是其作为疏松多孔体能够快速发生血管化这一因素,故而作为组织工程化人工骨支架的骨替代材料,具备这种类似的多孔框架结构而发生快速血管化,成为骨替代材料移植后效应的重要因素^[4,6-12]。

孔隙和孔隙率大小对骨支架材料的体内成骨性能的影响已经得到证实^[13-19],孔隙结构除了对成骨细胞和间充质细胞的增殖产生重要的影响外,同样也干预着材料的血管化作用。有研究表明^[4,6,20],材料的孔隙结构尤其是孔隙大小及连通对材料的血管化有一定的影响,那么当复合血管内皮细胞后是否具有同样的规律有待研究。本课题选用了结构可控的具有规则的球形孔隙、内部孔隙较为均一的2种不同孔径但连通径相同的 β -TCP材料进行血管化研究。材料孔隙之间连通率高,不但为新骨长入材料提供了场所,更利于长入材料深部的血管彼此相通,保证深部组织的营养。与血管内皮细胞复合后,植入兔肌肉内,观察新生血管形成情况。结果发现,复合血管内皮细胞的材料血管形成启动过程早于空白对照组,术后第4周血管管腔已基本成形,并基本稳定,至第8周开始血管充盈,微血管密度高于对照组。而不同孔径的材料比较发现,不论是复合血管内皮细胞的材料还是空白材料,与小孔径材料相比,大孔径的材料内新生血管管腔较大,数量较多,而且血管化速度较快,4周时,复合血管内皮细胞的大孔径材料中心部位已有血管形成。微血管密度比较发现,小孔径材料即使复合了血管内皮细胞后,所形成的新生血管密度也与大孔径空白材料无显著差异。从结果中我们可以分析得出,复合血管内皮细胞可以促进人工骨材料的体内血管化进度和程度,但是不论何种促血管化手段都依赖于材料的孔隙结构才能发挥效能,具有较好孔隙结构的材料将有利于材料内的血管形成。

综上所述,血管化对骨再生过程中细胞的活性和迁移起到了关键作用,骨组织工程研究在很大程度上受制于移植物缺乏血液供应而导致细胞营养障碍,因此,骨移植材料的再血管化是组织工程化骨实用性研究的“瓶颈”环节。本研究中,复合血管内皮细胞可以在一定程度上加快材料血管化进程,但是只有材料具有合适的孔隙结构才能使促血管化手段更好的发挥作用,在本研究结果中可以看到孔隙较大的材料更有利于材料体内血管化。因此,不论是进行骨组织工程化骨的构建还是骨缺损修复材料的选择,都必须考虑材料的孔隙结构。材料的孔隙结构除了孔径还包括孔隙连通这一关键参数,而连通大小对于复合血管内皮细胞后的材料血管化是否具有同样的影响是本课题组的下一步研究计划。这一研究将为改善人工骨材料体内血管化的方法提供新的思路,同时也为骨移植材料的最优结构的选择提供一定的借鉴。

参考文献(References)

- [1] Barou O, Mekraldi S, Vico L, et al. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study [J]. Bone, 2002, 30(4): 604-612
- [2] Boyde A, Corsi A, Quarto R, et al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism[J]. Bone, 1999, 24(6): 579-589
- [3] D Druecke, S Langer, E Lamme, et al. Neovascularization of poly (ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy [J]. J Biomed Mater Res, 2004, 68(1): 10-18
- [4] Maddalena Mastrogiacomio, Silvia Scaglione, Roberta Martinetti, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics[J]. Biomaterials, 2006, 27(17): 3230-3237
- [5] Tsuruga E, Takita H, Itoh H, et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis[J]. J Biochem, 1997, 121(2): 317-324
- [6] J.X.Lu, B.Flautre, K.Anselme, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo[J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(2): 111-120
- [7] Nomi M, Atala A, Coppi PD, et al. Principals of neovascularization for tissue engineering[J]. Mol Aspects Med, 2002, 23: 463-483
- [8] Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering[J]. World J Urol, 2000, 18: 10-18
- [9] Elcin Y M, Dixit V, Gitnick G. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing[J]. Artif Organs, 2001, 25(7): 558-565
- [10] Levine JP, Bradley J. Bone morphogenetic protein promotes osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit[J]. Ann plast Surg, 1997, 39(2): 158-168
- [11] Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B. Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene[J]. Ann Plast Surg, 2002, 49(2): 161-169
- [12] Neil Davies, Stephan Dobner, Deon Bezuidenhout. The dosage dependence of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation[J]. Biomaterials, 2008, 29(26): 3531-3538
- [13] Schwartz Z, Braun G, Kohavi D, et al. Effects of hydroxyapatite implants on primary mineralization during rat tibial healing: biochemical and morphometric analysis[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(8): 1029-1038
- [14] Tsuruga E, Takita H, Itoh H, et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis[J]. J Biochem, 1997, 121(2): 317-324
- [15] S Henno, J.C Lambotte, D Glez, et al. Cathelineau Characterisation and quantification of angiogenesis in β -tricalcium phosphate implants by immuno-histochemistry and transmission electron microscopy [J]. Biomaterials, 2003, 24(19): 3173-3181
- [16] Vassilis Karageorgiou, David Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis[J]. Biomaterials, 2005, 26(27): 5474-5491
- [17] Min Lee, Benjamin M Wu, James C Y Dunn. Effect of scaffold architecture and pore size on smooth muscle cell growth [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009, 87: 1010-1016
- [18] De Oliveira JF, De Aguiar PF, Rossi AM, et al. Effect process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds[J]. Artif Organs, 2003, 27: 406-411

- 瘤变和宫颈微浸润癌治疗中的临床应用[J].中华肿瘤杂志, 2013, 35(7): 543-546
- Zeng Si-yuan, Liang Mei-rong, Li Long-yu, et al. Application of transvaginal external fascia trachelectomy in the treatment of CIN and micro-invasive cervical cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2013, 35(7): 543-546
- [4] 黄宇萍, 朱林平. 宫颈环形电切术治疗宫颈上皮内瘤变的疗效观察[J]. 广西医学, 2011, 33(9): 1147-1149
- Huang Yu-ping, Zhu Lin-ping. Clinical Observation of Loop Electrosurgical Excision for Cervical Intraepithelial Neoplasia[J]. Guangxi Medical Journal, 2011, 33(9): 1147-1149
- [5] Bosgraaf RP, Mast PP, Struijk-van der Zanden PH, et al. Overtreatment in a see-and-treat approach to cervical intraepithelial lesions[J]. Obstet Gynecol, 2013, 121(6): 1209-1216
- [6] Wu D, Zheng Y, Chen W, et al. Prediction of residual/recurrent disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2011, 51(2): 114-118
- [7] Suprasert P, Panyaroj W, Kietpeerakool C. Recurrent rates with cervical intraepithelial neoplasia having a negative surgical margin after the loop electrosurgical excision procedure in Thailand[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2009, 10(4): 587-590
- [8] Martirosian TE, Smith SC, Baras AS, et al. Depot medroxyprogesterone acetate: a risk factor for cervical stenosis after loop electrosurgical excisional procedure management of cervical intraepithelial neoplasia [J]. Low Genit Tract Dis, 2010, 14(1): 37-42
- [9] Shibata T, Ikura Y, Iwai Y, et al. Adenocarcinoma Arising from Vaginal Stump: Unusual Vaginal Carcinogenesis 7 Years After Hysterectomy due to Cervical Intraepithelial Neoplasia[J]. Int J Gynecol Pathol, 2013, 32(6): 606-610
- [10] Duesing N, Schwarz J, Choschzick M, et al. Assessment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) with colposcopic biopsy and efficacy of loop electrosurgical excision procedure (LEEP)[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(6): 1549-1554
- [11] Sun LL, Cao DY, Yang JX, et al. Value-based medicine analysis on loop electrosurgical excision procedure and CO₂ laser vaporization for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2 [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(8): 1064-1070
- [12] 吉海莲, 李越东. 环形电切术治疗宫颈上皮内瘤变 415 例的临床效果[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(10): 1663-1665
- Ji Hai-lian, Li Yue-dong. Clinical efficacy of loop electrosurgical excision procedure for treatment of 415 cases with cervical intraepithelial neoplasia[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2013, 28(10): 1663-1665
- [13] Nessa A, Rashid MH, E-Ferdous N, et al. Screening for and management of high-grade cervical intraepithelial neoplasia? in Bangladesh: a cross-sectional study comparing two protocols[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2013, 39(2): 564-571
- [14] Chen W, Guan T. Diagnosis and treatment of grade III cervical intraepithelial neoplasia by cervical conization in 98 patients [J]. Journal of Southern Medical University, 2010, 30(7): 1642-1644, 1647
- [15] Nogara PR, Manfroni LA, Consolaro ME. Cervical cytology of atypical squamous cells cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H): histological results and recurrence after a loop electrosurgical excision procedure[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 284(4): 965-971
- [16] Malapati R, Chaparala S, Cejtin HE. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure[J]. J Low Genit Tract Dis, 2011, 15(3): 177-179
- [17] Koiss R, Babarczy E, Jenei C, et al. Repeat conisation or HPV test What should be done if histology of the primary conisation requires a second conisation[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2012, 33(2): 134-137
- [18] 杜琼, 杨瑞, 朱开春, 等. 阴道镜活检联合 LEEP 术诊治宫颈病变的疗效分析[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(27): 5353-5355, 5362
- Du Qiong, Yang Rui, Zhu Kai-chun, et al. Analysis of the Effect of Diagnosis and Treatment of Cervical Lesion by Colposcopy and Biopsy Combined with LEEP [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(27): 5353-5355, 5362
- [19] Serati M, Salvatore S, Cattoni E, et al. The impact of the loop electrosurgical excisional procedure for cervical intraepithelial lesions on female sexual function[J]. J Sex Med, 2010, 7(6): 2267-2272
- [20] Zeng SY, Liang MR, Li LY, et al. Efficacy of complications of different surgical treatments in cervical intraepithelial neoplasia III [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2009, 44(8): 574-577

(上接第 3818 页)

- [19] Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth[J]. Biomaterials, 1998, 19(1-3): 133-139
- [20] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds osteogenesis[J]. Biomaterials, 2005, 26: 5474-5491
- [21] Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape[J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 72(1): 96-107
- [22] Jin QM, Takita H, Kohgo T, et al. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 491-499
- [23] Jerome A. Henry, Krishna Burugapalli. Structural variants of biodegradable polyesterurethane in vivo evoke a cellular and angiogenic response that is dictated by architecture [J]. Acta Biomaterialia, 2009, 5(1): 29-42
- [24] Chang Yao, Marta Markowicz, Norbert Pallua, et al. The effect of cross-linking of collagen matrices on their angiogenic capability[J]. Biomaterials, 2008, 29(1): 66-74