

## SGBG/PHBV 与人牙周膜细胞的生物相容性

黄南楠, 孙文娟, 吴 坚, 李婵秀, 唐 倩  
(中山大学附属第三医院口腔科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】研究溶胶-凝胶生物活性玻璃(SGBG)/聚羟基丁酸戊酸共聚酯(PHBV)与人牙周韧带细胞(PDLC)的生物相容性,为牙周组织工程支架的选择提供依据。【方法】采用组织块法培养原代人PDLC,分为浸提液组和对照组接种于96孔板,每组9孔,分别加入浓度为100%、75%、50%、25%、0%的浸提液,48 h后采用MTT比色分析法的浸提液实验对材料进行毒性评级。采用人PDLC与SGBG/PHBV体外三维培养,扫描电镜下观察细胞形态及生长情况。实验组采用SGBG/PHBV复合培养,对照组采用普通培养基培养,培养12、24、48 h后,每组取27个样本定量检测上清液碱性磷酸酶(ALP)含量。【结果】浸提液培养结果显示:毒性评级为1级和0级。扫描电镜示人PDLC在三维支架上贴附生长均良好。实验组上清液ALP含量高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。【结论】SGBG/PHBV对人PDLC无毒性,SGBG/PHBV和人PDLC三维培养,表现出良好的生物相容性,有望应用于进一步的牙周组织工程的研究。

**关键词:**溶胶-凝胶生物活性玻璃/聚羟基丁酸戊酸共聚酯;人牙周韧带细胞;牙周组织工程

中图分类号:R318

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)04-0526-06

### Biocompatibility between SGBG/PHBV and Human PDLC

HUANG Nan-nan, SUN Wen-juan, WU Jian, LI Chan-xiu, TANG Qian

(Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: TANG Qian, E-mail: doodoer@126.com

**Abstract:**【Objective】The biocompatibility between SGBG/PHBV and human PDLC were investigated to provide a basis for the choice of the scaffold material of periodontal tissue engineering. 【Methods】Human PDLC were cultured using tissue-explant technique. Seeding on 96 wells plate, 9 wells for one group, Four different concentrations (100%, 75%, 50%, 25%, 0%) of maceration extract of SGBG/PHBV were added into the culture plants after 48-h cell seeding, the grades of the cytotoxicity of SGBG/PHBV was evaluated by MTT assay. Human PDLC cultured in vitro were collected and seeded on the three-dimensional scaffolds of SGBG/PHBV, the cellular morphology and cell growth on the scaffolds were observed and photographed by scanning electronic microscope. Human PDLC seeded on the three-dimensional scaffolds of SGBG/PHBV in the experimental group, and human PDLC seeded by DMEM in the control group, after 12-, 24-, and 48-h cell seeding, got 27 samples for each group, and the affection of the SGBG/PHBV on cell secretory function was observed by spectrophotometry which assayed the biochemical indexes ALP in supinate. 【Results】The grades of the cytotoxicity of SGBG/PHBV were 0 and 1. It was displayed that human PDLC adhered and proliferated well on the scaffold of SGBG/PHBV under the scanning electronic microscope. The significant difference of ALP in supinate between the experimental group and the control group ( $P < 0.05$ ). 【Conclusions】SGBG/PHBV had no cytotoxicity to human PDLC. SGBG/PHBV is potential to further study as the scaffolds of periodontal tissue engineering since it displayed the satisfactory biocompatibility with human PDLC.

**Key words:** SGBG/PHBV; PDLC; periodontal tissue engineering

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4): 526-531]

收稿日期:2017-03-21

基金项目:广东省科技计划项目(2010B031100021)

作者简介:黄南楠,硕士研究生,主治医师,研究方向:牙周病学, E-mail: hnnhuangnannan@163.com;唐倩,通信作者,副主任医师,研究方向:牙周病学, E-mail: doodoer@126.com

在牙周病变发展的过程中,牙周组织因为炎症因素而发生不可逆的丧失。因此,牙周炎是成年人失牙最主要的原因<sup>[1]</sup>。牙周病研究领域的最重要课题,就是如何重建牙周组织,达到牙周再生。牙周组织再生,主要包括牙周韧带、牙骨质和牙槽骨的修复<sup>[2]</sup>。组织工程技术的研究和开展,应用到牙周再生领域,是牙周病治疗方法的一个新的突破点。目前牙周组织工程研究中,寻找更合适的支架材料,是学者们不断研究的重点问题<sup>[3-4]</sup>。本实验采用的支架材料是溶胶-凝胶生物活性玻璃(sol-gel bioglass, SGBG)/聚羟基丁酸戊酸共聚酯(poly-3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV),前期国内外对此材料的研究,多在于成骨方面<sup>[5]</sup>,在牙周组织再生方面的研究较少。本研究选用体外培养的第四代人牙周韧带细胞作为种子细胞,通过MTT比色法,及种子细胞与支架材料体外三维培养,检测两者之间的体外生物相容性,以期望在支架材料的选择方面,为牙周组织工程的进一步深入研究,提供相关实验数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂和仪器

主要试剂包括SGBG/PHBV由华南理工大学提供,全自动高糖DMEM培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自美国PAA公司,胰蛋白酶购自美国Sigma公司,MTT购自美国Sigma公司,碱性磷酸酶试剂盒购自中国南京建成公司。主要仪器包括扫描电镜购自荷兰PHILIPS公司,倒置相差显微镜购自日本Nikon公司,CO<sub>2</sub>培养箱购自美国Forma公司,高速离心机购自中国飞鸽公司,医用超净工作台购自中国苏州净化仪器厂。

### 1.2 人PDLC体外培养及鉴定

人牙周韧带细胞(periodontal ligament cells PDLC)取自健康志愿者(12~20岁,均为2014到2015年期间中山大学附属第三医院口腔正畸科就诊患者,患者本人及患者监护人对本实验知情同意,已通过医院伦理委员会批准)因正畸治疗拔除的健康第一或第二前磨牙周围组织块,除1例接种组织块的第2天出现真菌污染外,其余在培养及传代过程中均无污染。最早观察到细胞从组织块边缘游出的为第6天,最晚的为第21天,第30天仍无细胞生长者予以淘汰。将牙周组织块

置于10%胎牛血清的DMEM完全培养基中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下进行细胞培养。当细胞生满瓶底约80%时,消化传代,冻存第4~8代PDLC用于实验<sup>[6-7]</sup>。采用免疫组织化学法进行细胞角蛋白染色和波形丝蛋白染色,对PDLC的来源进行鉴定。

### 1.3 材料毒性实验

1.3.1 分组 将PDLC细胞分为浸提液组和对照组,分别采用SGBG/PHBV材料浸提液和普通培养基孵育48h。SGBG/PHBV材料浸提液依照国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)制定的标准材料质量与浸提介质体积规定,材料介质比为0.2g/mL进行制备,37℃培养箱放置3d后吸出浸提液,4℃保存备用。制备PDLC悬液,计数后按每孔2000个细胞接种于96孔板。

1.3.2 MTT比色法分析材料的细胞毒性 每组9孔,分别加入200μL含体积分数10%的FBS的DMEM及浓度为100%、75%、50%、25%的浸提液,48h后每孔加入MTT20μL,4h后吸弃孔内上清液,每孔加入DMSO150μL,震荡10min,在酶联免疫吸附检测仪上采用490nm波长,测定各孔光密度(optical density, D)值,计算PDLC的相对增殖率(relative growth rate, RGR)。计算方法为: $RGR = D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白对照组}} \times 100\%$ 。根据美国药典中细胞RGR与细胞毒性分级进行毒性评级<sup>[8]</sup>。

1.3.3 细胞形态观察 采用倒置荧光显微镜下观察两组PDLC的细胞形态。

### 1.4 材料形态和细胞功能实验

1.4.1 分组 将PDLC细胞分为实验组和对照组,实验组采用SGBG/PHBV复合培养,对照组采用普通培养基培养。将支架材料制备成5mm×5mm×3mm大小,过氧化氢等离子低温灭菌系统消毒灭菌,置于24孔板内DMEM预湿过夜。采用0.25%胰蛋白酶消化PDLC,1000r/min离心5min(离心机半径r=12.5cm),调整细胞浓度为 $1 \times 10^6$ /mL,每块材料接种200μL,置于37℃培养箱中。

1.4.2 形态观察 三维培养2周后,取出细胞-支架复合体,体积分数3%的戊二醛固定,梯度乙醇溶液脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥,表面喷金,扫描电镜观察。

1.4.3 细胞功能检测 实验组的三维培养接种方法和密度同1.4.1,分别在三维培养后12、24、48h,

每孔吸出细胞上清液 1 mL, 无菌封存, 4 ℃ 保存。共采集 54 份细胞上清液, 每份取 0.05 mL 放入测定管, 按 ALP 试剂盒说明书步骤, 空白管取 0.05 mL 双蒸水, 标准管取 0.05 mL 标准液。各管加入缓冲液 0.5 mL, 基质液 0.5 mL, 充分混匀后, 37 ℃ 水浴 15 min。各管再加入显色剂 1.5 mL, 立即混匀。用分光光度计在 520 nm、1 cm 光径比色, 空白管调零, 测各管吸光度。计算方法: 上清液 ALP 含量(金氏单位/100 mL) = 测定管吸光度/标准管吸光度 × 标准管含量 × 100 mL / 0.05 mL<sup>[9]</sup>。

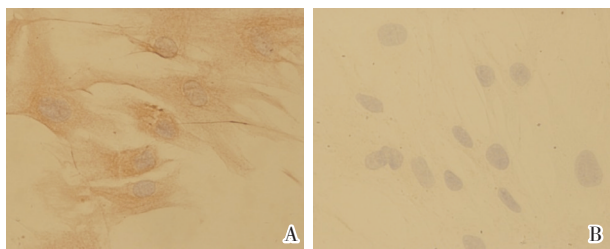
### 1.5 统计学分析

各管吸光度值按公式计算, 并换算成相同细胞数 ALP 含量后, 用 SPSS12.11 统计软件进行 *t* 检验, 取检验水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养及来源鉴定

人 PDLC 传代后, 细胞排列密集时呈漩涡状和火焰状, 大多呈伸展良好的长梭形, 胞体丰满, 并可见胞浆均匀, 核圆, 核仁清晰。采用免疫组化 ABC 法进行细胞角蛋白染色和波形丝蛋白染色, 可见波形丝蛋白染色阳性(图 1A), 细胞角蛋白染色阴性(图 1B), 提示细胞的来源是外胚间充质。



A: The expression of vimentin was positive; B: The expression of cytokeratin was negative. ×400

图1 细胞角蛋白、波形丝蛋白免疫组化染色

Fig.1 Immunohistochemical staining of cytokeratin and vimentin in hPDLC

### 2.2 细胞毒性试验结果

实验组和对照组光密度均值 RGR 毒性评级结果显示, SGBG/PHBV 对人 PDLC 无毒性, 毒性评级为 1 级和 0 级(表 1)。

### 2.3 两组 PDLC 的细胞形态观察

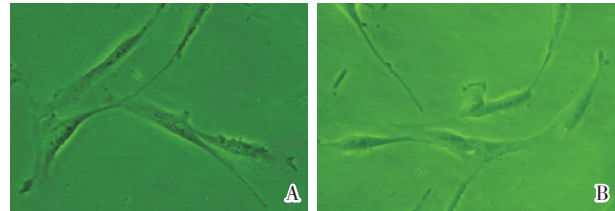
倒置荧光显微镜下细胞形态观察对照组细

表1 RGR 毒性评级

Table 1 Grades of the cytotoxicity of RGR

C(extract)	D(Experimental/control)	RGR/%	Grades
100%	0.329/0.342	96.2	1
75%	0.343/0.342	100.3	0
50%	0.332/0.342	97.1	1
25%	0.327/0.342	95.6	1

胞大多呈长梭形, 细胞核边界清晰, 呈卵圆形, 位于细胞中央, 细胞排列均匀, 呈漩涡状(图 2A)。实验组中浸提液培养的细胞, 呈长梭形, 胞体丰满、伸展良好, 细胞核边界清晰, 呈卵圆形, 位于细胞中央, 两组形态上没有观察到明显差异(图 2B)。



A: experimental group, Human PDLC were long shuttle shaped in vitro, bodies of cells were plump, cells spreaded well and nucleolus were clear; B: control group, Human PDLC were long shuttle shaped in vitro, bodies of cells were plump, cells spreaded well and nucleolus were clear. ×200

图2 荧光显微镜下两组 PDLC 的细胞形态观察

Fig.2 Cellular morphology under inverted microscope

### 2.4 细胞-支架材料形态的观察

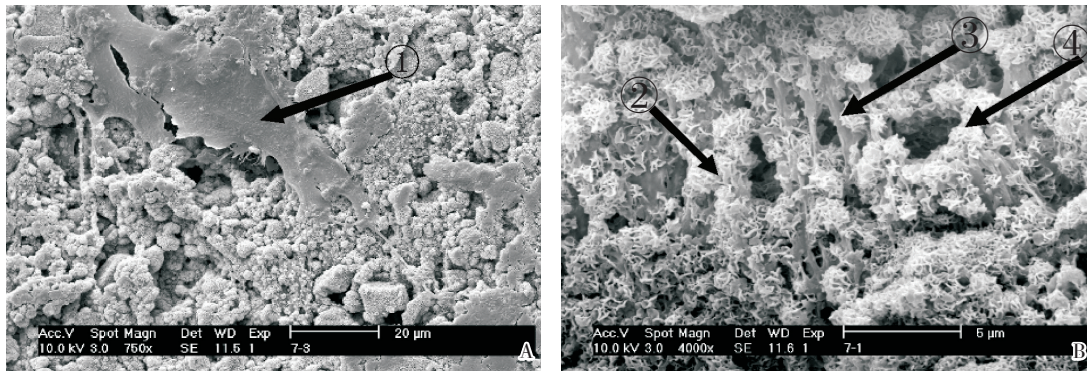
扫描电镜镜下可见, 细胞在三维支架上贴附紧密, 胞体充分伸展(图 3A), 大部分细胞伸展呈长梭形, 跨越孔隙之间黏附, 细胞间可以见到伸出相互连接的突起, 并向空隙内部生长。4 000 高倍镜下可见材料的纳米结构颗粒均匀(图 3B)。

### 2.5 细胞碱性磷酸酶分泌功能测定

细胞培养上清液 ALP 含量测定结果见表 2。表 2 中可看到, 培养 12、24、48 h 后, 实验组的 ALP 含量均高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明实验组的细胞在支架材料上生长, 比对照组的细胞, 可分泌出更多的 ALP。

## 3 讨论

在牙周病变过程中, 由于炎症介导的免疫反



A: The cells proliferated well on the surface of the scaffolds layer; bar = 20 μm; B: The cells migrated into the scaffold along the pores; bar = 5 μm. Arrow ① cells on the surface of the scaffolds layer, ②nanometer particle, ③the pores of the scaffold, ④cells migrated into the scaffold

图3 扫描电镜下细胞-支架材料形态的观察

Fig.3 PDLC cultured with the scaffolds under SEM

表2 hPDLC 三维培养后碱性磷酸酶含量测定  
Table 2 The biochemical index ALP of hPDLC after culture on the scaffold ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Time	Control group	Experimental group	P
12 h	0.23 ± 0.12	0.58 ± 0.09	0.000
24 h	0.26 ± 0.14	0.78 ± 0.28	0.007
48 h	0.30 ± 0.20	2.21 ± 0.84	0.000

应的作用,牙周组织被不可逆地破坏。因此,牙周病治疗领域需要攻破的一个非常重要的课题,就是需要研究出能够获得牙周组织再生的方法,即重建牙周组织各种结构和及其功能。牙周组织缺损的修复,主要包括牙周韧带、牙骨质和牙槽骨三方面的修复。近20年来发展的牙周治疗方面的技术,比如引导组织再生术等,在促进牙周组织再生方面,都有一定程度的作用,但这些技术都存在以下根本缺陷<sup>[10]</sup>:牙周组织前体细胞不能主动地在根面优先附着;忽视了牙周组织在遭受炎症反应所致的不可逆损害后,其前体细胞无论在数量上还是活性上都是非常有限的。随着组织工程学的不断研究和发展,给牙周组织再生的研究,提供了新的思路。组织工程的基本方法之一,是将体外培养的活细胞,且是具有一定高浓度并且功能相关的活细胞,种植于天然的或人工合成的细胞外基质材料上,这些细胞外基质材料必须具有良好生物相容性和生物降解性。细胞和材料共同培养一段时间的后,形成细胞生物材料复合体,将该复合体植入机体病损部位,来形成新的组织和器官,同时希望这些新的组织和器官具有其原来的相应功能和形态,这样就能达到修复创伤和重建

功能的目的<sup>[11]</sup>。现阶段组织工程的研究和应用已取得较大进展,比如在骨、软骨、肌肉、皮肤、肝脏等组织方面<sup>[12]</sup>,但在牙周组织工程方面的研究,国内外正处于初级阶段。种子细胞、支架及三维立体培养是组织工程技术的三大要素<sup>[13-14]</sup>。

由于自体的PDLC植入可避免免疫排斥反应,且取材相对容易,损伤小,在体外培养可以有较强的繁殖能力,故目前牙周组织工程的研究多采用自体PDLC作为种子细胞<sup>[6,15]</sup>。本实验所用细胞,是采用组织块法培养的原代人PDLC,传代后用于本实验。

牙周组织再生不同于其他组织的独特之处就在于,为使再生过程中新产生的结缔组织纤维插入牙骨质和牙槽骨,软组织与硬组织的愈合必须作为一个整体,同步进行。因此牙周组织工程支架材料除了要具备生物学功能如生物相容性外,还要具备生物机械功能如空间维持功能和屏障功能,即一方面要排除不需要的组织向内生长,更要促进理想组织(牙骨质、牙周韧带、牙槽骨)的生长、分化与成熟<sup>[4]</sup>。

进行牙周组织工程研究,采用达到牙周组织工程要求的支架材料是首要任务之一。本研究采用的支架材料是一种纳米尺寸的生物活性玻璃,是利用溶胶-凝胶法制备的。不同于其他生物玻璃采用高温制备,这是一种低温制备的生物材料,是一种经有机改性的SGBG,其有机成分是PHBV。PHBV是某种细菌发酵以后产生的,为一种热塑性生物聚酯,研究证实了它具有非常良好的组织相容性。在既往的研究中,将PHBV作为骨移植组分,观察到它在骨移植中具有增强作用,

一定时间内可以达到完全生物降解<sup>[15]</sup>。将PHBV与SGBG进行复合制备,制备得出一种特别的三维立体多孔材料,这种复合材料优势明显,能同时发挥三种作用,包括局部正性压电效应,以及骨传导作用和骨诱导作用。其中,局部正性压电效应就是PHBV刺激骨细胞生长分化作用的表现,而三维多孔的SGBG具有骨传导作用和骨诱导作用<sup>[16-17]</sup>。有学者研究提出<sup>[18-21]</sup>,SGBG表面部分可在水溶液中形成富含SiO<sub>2</sub>和Ca、P离子的胶样层,有利于羟基磷灰石晶体的形成和沉积。羟基磷灰石多晶体可以吸附多种物质,例如对粘多糖、糖蛋白和多糖胶样层,都表现出较强吸附性,由于羟基磷灰石多晶体吸附了有机成分,因此,SGBG和骨之间可以形成一种非常稳定的结构,是一种有机-无机界面,这种界面不但提供了有利于新骨生长的环境,而且促进新骨在材料表面沉积。PHBV分子链具有很好的水解性,其水解产物排出的同时,羟基磷灰石多晶体在BG表面再次形成。这个水解又结晶的过程,既促进骨组织在多孔支架上新建,也促进骨组织的生长,并且非常有利于骨组织的正常的新陈代谢<sup>[5]</sup>。

本实验结果显示,材料各浓度组的SGBG/PHBV浸提液对人PDLC均未见毒性反应,毒性评级均在1级以内。镜下可见,实验组浸提液培养的细胞与阴性对照组采用培养基培养的细胞,生长形态相似,在形态学上没有观察到明显差异。本实验中,种子细胞与支架材料在体外复合培养,来观察细胞与支架材料直接接触之后的相互影响和生长情况。在这个培养过程中,因为排除了体内多种复杂环境因素的影响,因此更加敏感客观。实验进行的复合立体培养,是将体外培养的高浓度人PDLC接种在SGBG/PHBV三维支架上进行。由于牙周组织的主要功能细胞是PDLC,实验使支架材料直接接触PDLC,研究两者的生物相容性,对于将来采用SGBG/PHBV构建牙周组织工程支架的可能性,进行了初步的分析和研究。本实验利用三维培养技术,使人PDLC在SGBG/PHBV的三维空间结构中生长、附着并增殖。扫描电镜下可观察到人PDLC在支架材料表面和其孔隙间均能贴附生长,保持了细胞原有形态,镜下可观察到伸展良好的长梭形细胞,在细胞增殖密集的区域,可以观察到细胞之间有突起伸出,突起甚至相互连接,表明SGBG/PHBV和人PDLC间具有良好的

相容性,种子细胞在三维支架上能够维持其形态学特征,SGBG/PHBV三维支架的空间结构有利于营养物质均匀扩散到细胞之间,有利于增强细胞与细胞之间的联系,并能促进新组织的形成。

PDLC包括两种表型,分别是成纤维表型和成骨表型,其中成骨表型包括成牙骨质细胞表型和成骨细胞表型<sup>[22]</sup>。成骨细胞表型分泌I型胶原、碱性磷酸酶和骨钙素(osteocalcin,OCN)。成牙骨质细胞表型同样表达成骨样细胞的特征,如碱性磷酸酶的高表达,骨钙素的分泌等<sup>[23]</sup>。Liu等<sup>[24]</sup>的研究结果确定了牙骨质附着蛋白(cementum attachment protein,CAP)可以作为一个特异性标志,来鉴别牙周韧带中是否存在特定的间充质细胞,这种间充质细胞在特定的条件下,具有分化为成牙骨质细胞的潜能。而ALP是否表达,标志着在牙骨质形成过程中,成骨细胞或成牙骨质细胞早期分化。矿化组织的形成,则可考虑为牙骨质形成过程中,成骨细胞或成牙骨质细胞分化末期的指标。本研究定量地测定细胞培养上清液的ALP的含量,实验结果表明材料对PDLC的分泌碱性磷酸酶的功能均未见抑制作用,进一步证实了SGBG/PHBV和PDLC间具有良好的相容性。在相同的细胞数下,实验组的上清液中ALP含量均大于对照组,且有统计学差异,表明细胞在SGBG/PHBV支架上的三维培养更能促进人PDLC的ALP的分泌功能,人PDLC在SGBG/PHBV三维支架上能够维持其生物学性状。

以上结果表明,支架材料SGBG/PHBV与人PDLC之间的生物相容性是良好的,SGBG/PHBV的三维结构基本符合三维培养的要求,可望进一步应用于牙周组织工程的研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹采方. 牙周病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003: 3.  
Cao CF.Periodontology [M].Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:3.
- [2] Parihar AS, Katoch V, Raiguru SA, et al.Periodontal Disease: A possible risk-factor for adverse pregnancy outcome[J]. J Int Oral Health, 2015, 7(7): 137-142.
- [3] Galler KM, D'Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry[J]. Regen Med, 2011, 6(1): 111-124.
- [4] Ivanovski S, Vaquette C, Gronthos S, et al. Multiphasic

- scaffolds for periodontal tissue engineering [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(12):1212-1221.
- [5] Jones JR, Lin S, Yue S, et al. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterization [J]. *Proc Inst Mech Eng H*, 2010, 224(12):1373-1387.
- [6] 黄南楠, 梁焕友, 唐倩, 等. 组织块法培养原代人. PDLC 技术的新探讨 [J/CD]. *中华口腔医学研究杂志 (电子版)*, 2009, 3(1):10-16.
- Huang NN, Liang HY, Tang Q, et al. The new study of the tissue-explant technique on culturing Primary human PDLC [J/CD]. *Chin J Stomatol Res (E Version)*, 2009, 3(1):10-16.
- [7] Tian Y, Bai D, Guo W, et al. Comparison of human dental follicle cells and human periodontal ligament cells for dentin tissue generation [J]. *Regen Med*, 2015, 10(4):461-179.
- [8] 孙文娟, 唐倩, 黄南楠, 等. 双层胶原支架与人牙周膜细胞的体外生物相容性 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2014, 35(2):250-255.
- Sun WJ, Tang Q, Huang NN, et al. Biocompatibility of a double-layer collagen scaffold and human periodontal ligament cells in vitro [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2014, 35(2):250-255.
- [9] Yoshiyuki K, Shuauang Z. Significant Type I and Type III Collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3d peptide scaffolds without extra growth factors [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e10305.
- [10] Tobita M, Mizuno H. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010, 5(9):168-174.
- [11] Wu C, Zhou Y, Lin C, et al. Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(10):3805-3815.
- [12] Schofer M, Roessler P, Schaefer J, et al. Electrospun-PLL Nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25462.
- [13] Bottino MC, Thomas V. Membranes for Periodontal Regeneration: A Materials Perspective [J]. *Front Oral Biol*, 2015, 17(9):90-100.
- [14] Nygaard-Østby P, Bakke V, Nesdal O, et al. Periodontal healing following reconstructive surgery: Effect of guided tissue regeneration using a bioresorbable barrier device when combined with autogenous bone grafting: A randomized controlled trial 10-year follow-up [J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(9):366-373.
- [15] Mopur J, Devi T, Ali S, et al. Clinical and radiographic evaluation of regenerative potential of GTR membrane (Biomesh) along with alloplastic bone graft (Biograft) in the treatment of periodontal intrabony defects [J]. *J Contemp Dent Pract*, 2013, 14(3):434-439.
- [16] 唐倩, 陈建洪, 黄南楠, 等. 新型复合骨植入材料的体内成骨性能研究 [J/CD]. *中华口腔医学研究杂志 (电子版)*, 2010, 4(3):13-16.
- Tang Q, Chen JH, Huang NN, et al. Bone regeneration ability of SGBG/PHBV composite: An in vivo study [J/CD]. *Chin J Stomatol Res (E Version)*, 2010, 4(3):13-16.
- [17] 唐倩, 陈建洪, 吴坚, 等. 多孔复合材料 PHBV-SGBG 的体外细胞相容性和体内成骨性 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2010, 16(1):52-57.
- Tang Q, Chen JH, Wu J, et al. Preliminary study of a novel porous composite: cytocompatibility in vitro and osteogenesis in vivo [J]. *Chin J Biomed Engin*, 2010, 16(1):52-57.
- [18] Biazar E, Heidari K, Pouya M. Behavioral evaluation of regenerated rat sciatic nerve by a nanofibrous PHBV conduit filled with Schwann cells as artificial nerve graft [J]. *Cell Commun Adhes*, 2013, 20(5):93-103.
- [19] Sundaramurthi D, Krishnan U, Sethuraman S. Biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) nanofibers for skin tissue engineering [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(8):1383-1392.
- [20] Biazar E, Keshel SH. Chitosan-cross-linked nanofibrous PHBV nerve guide for rat sciatic nerve regeneration across a defect bridge [J]. *ASAIO J*, 2013, 59(6):651-659.
- [21] Zhou M, Yu U. Cartilage tissue engineering using PHBV and PHBV/Bioglass scaffolds [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1):508-514.
- [22] Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligament and pulp of human exfoliated deciduous teeth [J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 340(9):323-333.
- [23] Wu L, Wei Xi, Ling J, et al. Early osteogenic differential protein profile detected by proteomic analysis in human periodontal ligament cells [J]. *J Periodont Res*, 2009, 44(6):645-656.
- [24] Liu HW, Yacobi R, Savion N, et al. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(10):1691-1695.

(编辑 余 菁)