

异体骨结合骨髓间质干细胞移植治疗骨缺损的动物实验

傅 明, 梁海翔, 何爱珊, 雷 磊, 林子洪, 盛璞义, 杨子波, 廖威明
(中山大学附属第一医院骨科关节外科, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】研究使用异体骨混合骨髓间质干细胞移植治疗骨缺损的可行性及动物实验初步结果。【方法】将 15 只新西兰白兔双侧桡骨造成 1 cm 骨缺损模型, 随机选择同一只动物的一侧为实验侧, 自体配对的另一侧为对照侧。将表面脱钙的同种异体骨和来源于受体的体外培养增殖的骨髓间质干细胞混合植入实验侧骨缺损, 对照侧仅植入同样制作的异体骨。12 周后, 进行 X 线检查、生物力学检查和组织学检查, 将结果进行对比。【结果】动物在术后 12 周, 实验侧 X 线片光密度测量结果, 破坏载荷时扭矩和扭角测量结果均优于对照侧; 组织学评分中, 实验侧骨痂量评分优于对照侧, 骨连接成熟程度和骨髓发育程度两者没有明显差异。【结论】骨髓间质干细胞可以促进异体骨在移植后的成骨作用, 在增多成骨量的同时不影响骨组织发育。

关键词: 异体骨; 骨髓间质干细胞; 移植; 骨缺损

中图分类号: R68

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0515-05

Treatment of Bone Defect Bone Allograft with Bone Marrow Stem Cell in Animal Experiment

FU Ming, LIANG Hai-xiang, HE Ai-Shan, LEI Lei, LIN Zi-Hong, SHENG Pu-Yi,
YANG Zi-bo, LIAO Wei-Ming

(Department of Orthopaedics, Joint Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University; Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the feasibility and result of transplanting bone allograft with bone marrow stem cell in treatment of bone defect in animal experiment. 【Methods】Fifteen New Zealand white rabbits were chosen for the 1 cm bone defect model of both radiuses. Randomly, one radial side was chosen for the model, and the other side was for the control one. The bone defect of experimental side was filled with surface-demineralized bone allograft and bone marrow stem cell cultured in vitro. The control side was filled with bone allograft only. After 12 weeks, all the animals were observed by X ray, biomechanics, and histology. The results were analyzed and compared. 【Results】After 12 weeks, the X ray density, the torsional moment and angle in failure load test and the score of callus in histological grading were all improved in the experimental side, compared with the control side. There was not statistically significant difference in both mature degree of bone union and growth degree of bone marrow. 【Conclusion】Bone marrow stem cell can enhance the osteogenesis of bone allograft after transplantation, which increases the bone formation without affecting the development of bone tissue.

Key words: allograft bone; bone marrow stem cell; allograft

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):515-519]

骨移植是治疗骨缺损最主要的方法, 同种异体骨以其生物学特性和形态结构与自体骨相近, 可以长期保存等优点而已广泛应用于临床, 但大段异体骨移植后, 由于骨融解吸收的速度快于新骨形成, 影响了大段异体骨结构性骨移植的远期疗效。已有实验证实骨髓间质干细胞 (bone

marrow stem cell, MSC) 在一定诱导因素作用下能向成骨细胞分化, 促进成骨^[1,2], 但将异体骨和骨髓间质干细胞混合移植后的效果如何, 目前未见报道。本研究应用异体骨混合骨髓间质干细胞植入动物体内进行实验性探索, 希望通过骨髓间质干细胞的成骨作用, 达到改善治疗效果的目的, 为临

收稿日期: 2007-05-08

基金项目: 广东省自然科学基金(4105329); 广东省科技厅科技计划项目(2003C34102)

作者简介: 傅 明(1962-), 男, 广东江门人, 副主任医师, E-mail: ming_fu@126.com; 廖威明, 教授, 博士生导师, 通讯作者。

床提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康新西兰白兔 15 只, 雌雄不限, 体质量 2.8~3.5 kg, 平均为 3.1 kg, 兔龄 5~10(S=7)月。

1.2 实验试剂和材料

低糖型 DMEM 干粉培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium): 13.75 g/包(美国 Gibco 公司)。胎牛血清 (FBS; 美国 Hyclone 公司)。0.25% 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司)。淋巴细胞分离液 (天津 TBD 生物技术中心), 密度为 1.077。PBS 平衡盐溶液 (美国 Hyclone 公司)。青霉素-硫酸链霉素双抗溶液: 青霉素 1 万 U+链霉素 10 mg/mL (美国 Gibco 公司)。异体骨: 从健康 5 月龄新西兰白兔桡骨截取。

1.3 异体骨的制备

从 5 月龄的健康新西兰白兔双侧取出桡骨, 截去两段干骺端后得到直径均匀的长约 5 cm 的骨段, 将每段骨截成 3 段各长约 1.5 cm 的骨段, 在充分清除骨髓和软组织后, 先用三氯甲烷 乙醇=1 1 的溶液浸泡 24 h 进行脱脂; 用 0.6 mol/L 的盐酸浸泡 15 min 进行表面脱钙; 用 PBS 溶液冲洗后, 再用 PBS 溶液, 37 ℃ 浸泡 24 h 中和盐酸; 测定浸泡后的溶液 pH 值约为 7.0~7.2 后, 用超纯水 250 mL+青霉素 10 万 U+庆大霉素 8 万 U+链霉素 100 μg 浸泡 24 h, 然后在超净台内晾干。将上述处理的异体骨分别装入 2 mL 的冻存管内密封, 在 -80 ℃ 下深度冰冻 2 周; 然后用 2.0 Mrads 剂量的 射线照射 12 h 灭菌。再放入 -80 ℃ 下深度冰冻保存备用。使用时, 将异体骨放入约 37 ℃ 的 PBS 中浸泡解冻后使用。

1.4 细胞培养

对于骨髓间质干细胞的制备、原代培养和保存方法, 具体见参考文献 [3]。

1.5 动物实验

将 15 只 5 月龄新西兰兔随机选择一侧桡骨植入已经制备好的异体骨; 另一侧桡骨植入制备好的异体骨和自体来源的经过培养增殖的骨髓间质干细胞。手术后每只动物单笼饲养, 定期观察。

手术方法和步骤: 剥离桡骨中段骨膜约长 1.2 cm, 锯断并取出 1.0 cm 长桡骨, 造成骨缺损, 并用

刮匙刮除骨断端各约 0.5 cm 的骨髓腔内的骨髓组织。将随机选择的一侧作为实验侧, 在桡骨缺损处植入上述已制备好的异体骨, 然后用 1 mL 注射器吸出事先准备好的骨髓间质干细胞混悬液, 在植入的异体骨髓腔内注入 0.5 mL 细胞混悬液。不作内固定, 逐层缝合肌间软组织和皮下组织。将注射器针头穿过软组织刺入植骨周围的间隙内, 将剩余的 0.5 mL 细胞悬液注入植骨周围的间隙。缝合皮肤, 关闭切口。将另一侧桡骨缺损处同上方法植入异体骨, 但不加骨髓间质干细胞悬液, 作为对照侧。

1.6 观察方法

症状和体征观察: 包括动物术后伤口情况和肢体功能恢复情况。X 线照片检查: 在术后 12 周时对白兔行 X 线照片检查。X 线片结果利用图像分析系统进行灰度测试, 达到半定量测量。生物力学检查: 在第 12 周时, 用空气栓塞法处死动物, 取出双侧桡骨, 剔净附丽的软组织。将桡骨截取包括手术区域的一段长约 4 cm 的骨段, 将截取的骨段两端包埋, 在生物力学测试机上进行扭转应力测定, 电脑记录破坏扭矩和扭角。组织学检查: 将生物力学检测前的桡骨, 按照骨缺损修复形态学标准进行评分。在生物力学检测后的桡骨上异体骨和自体骨交接处截取一段长为 0.8 cm 的部分进行纵行切片。10% 福尔马林浸泡固定后, 脱钙、石蜡包埋、脱水, HE 染色后进行光镜下检查。参照 Nilsson 等提供的方法建立组织学评分标准 (表 1)。

表 1 骨缺损愈合组织学评分标准
Table 1 The score standard about bone healing

Observation item	Conditions	Scores
Bone healing:	Most of fibro bony callus	1
	Original bone formation	2
	Lamellar bone formation	3
Bony callus:	A little	1
	Medium	2
	Generous	3
Bone marrow:	Cavitas medullaris clogging and original bone marrow formation	1
	Cavitas medullaris and medium bone marrow formation	2
	Cavitas medullaris easy and smooth, generous bone marrow or yellow bone marrow formation	3

1.7 统计方法

用 SPSS10.0 软件进行统计处理, 计量资料采用配对两样本的 t 检验进行处理, 计数资料采用配对设计差值的符号秩和检验 (Wilcoxon 法)。

2 结果

2.1 细胞培养结果

实验中观察到, MSCs 在接种到培养瓶后 24 h, 大部分细胞贴壁, 多呈圆形, 在倒置显微镜下折光性较强。48 h 后, 部分细胞开始出现多形性变化, 呈现出多角样、椭圆形和短梭形; 部分细胞开始呈巢状生长。在培养初期的 2~3 d 内, 细胞变化缓慢; 其后, 细胞增殖加快, 尤其在细胞较密集处, 增殖和变形较明显。6~12 d 为细胞快速增殖期, 此时仍以短梭形细胞为主, 但是, 部分细胞开始逐渐变成长梭形。培养 12~14 d 左右, 细胞铺满瓶底, 呈现类似成纤维细胞样的长梭形。此时细胞表现为典型的“鱼群样”聚集 (图 1)。第一次传代后, 培养 24 h, 可见细胞大部分贴壁, 部分细胞开始变形。传代后细胞生长和增殖速度加快。培养 7 d 后, 细胞呈长梭形, 可以铺满培养瓶底。此时, 细胞生长表现为旋涡状生长, 分布均匀 (图 2)。

2.2 动物大体观察

所有实验动物均得到有效观察。植骨手术后所有动物觅食正常, 活动能力相似, 伤口无渗出, 肿胀程度轻。所有切口得到一期愈合, 术后两周伤口缝线自行脱落。术后 12 周, 取出桡骨后, 见到实验侧和对照侧的桡骨均得到骨性愈合。实验侧骨痂生成量较对照侧多。实验侧可见到植入的异体

骨周围生成明显的骨痂和骨桥, 骨质较硬。对照侧虽然也达到骨性愈合, 但是, 异体骨植入区骨量较另一侧少, 骨痂生成也较少 (图 3)。



图 3 骨的外观

Fig.3 View of the bone

Left: Control side; Right: Experimental side

2.3 X 线检查结果

在动物饲养 12 周时, 行 X 光检查, 见实验组骨折断端骨质生长良好, 有连续性骨痂通过骨折断端, 骨折线模糊至消失; 对照组也见有骨痂生长, 但部分骨折断端仍可见透亮线 (图 4)。检查结果用 JVC ky-F30B 3-CCD 彩色图象摄录输入仪输入德国产 KORTRON IBAS 2.0 全自动图象分析系统测量光密度。同一只动物双侧肢体为配对样本, 测量相同长度 (包括手术植入异体骨部位和两端的一段自体骨) 的骨段, 结果为: 实验侧光密度均值为 1699.3 ± 305.3 , 对照侧均值为 (1510.4 ± 281.4) , $t=2.292$, $P < 0.05$ (表 2), 提示光密度的总

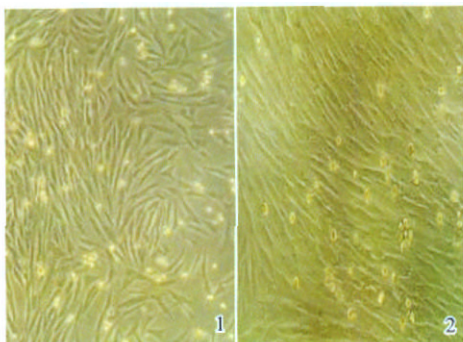


图 1 MSCs 原代培养第 12 天

图 2 MSCs 传 1 代后培养第 7 天

Fig.1 The result of MSCS after stock culture in 12 days ($\times 100$)

Fig.2 The result of MSCS after atavism culture in 7 days ($\times 100$)

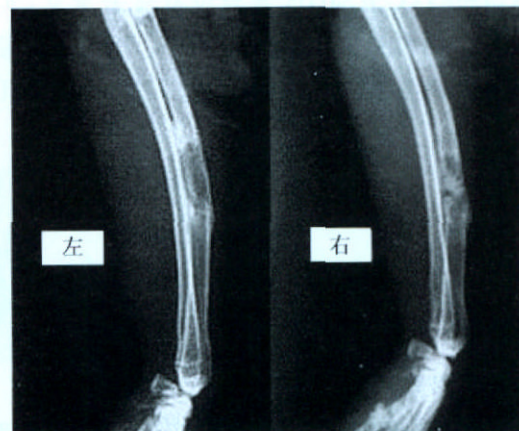


图 4 骨的 X 线照片

Fig.4 X-film of the bone

Left: Experimental side; Right: Control side

体均数不等,实验侧比对照侧骨量更多。

表 2 异体骨植入后 3 个月 X 线照片光密度及桡骨扭矩、扭角测量结果

Table 2 The measurements about photo densitometry in exograph, torque and torsion angle after bone allograft in three months ($\bar{x} \pm s$)

Group	Densitometry (OD)	Torque (Nt/m)	Torsion (°)
Positive	1699.3 ± 305.3	0.243 ± 0.018	21.056 ± 2.262
Negative	1510.4 ± 281.4	0.179 ± 0.025	15.007 ± 0.964

Compared positive side with negative side, the photo densitometry in exograph: $t=2.292$, $P < 0.05$; the torque: $t=3.064$, $P < 0.01$; the torsion angle: $t=2.413$, $P < 0.05$

2.4 生物力学检查结果

将同一只动物双侧桡骨作为配对样本,在美国产 MTS 858 mini Bionix 生物材料试验机上测量破坏扭矩和扭角,结果为:实验侧扭矩均值为(0.243 ± 0.018) Nt/m,对照侧均值为(0.179 ± 0.025) Nt/m, $t=3.064$, $P < 0.01$ (表 2),提示实验侧骨强度更好;实验侧扭角均值(21.056 ° ± 2.262 °),对照侧均值(15.007 ° ± 0.964 °), $t=2.413$, $P < 0.05$ (表 2),提示实验侧骨的弹性更好。

2.5 组织学检查结果

组织学由病理研究人员根据表 1 的方法评分,评分结果为:骨组织连接情况实验组 23 分,对照组 23 分;骨髓腔情况实验组 18 分,对照组 17 分;骨痂生长情况实验组 28 分,对照组 20 分。结果用配对设计差值的符号秩和检验(Wilcoxon 法)进行统计分析,结果显示,实验侧与对照侧骨组织连接: $T=0.333$, $P > 0.05$,差异没有显著意义;实验侧与对照侧骨髓腔情况: $T=0.816$, $P > 0.05$;实验侧与对照侧骨痂生长情况: $T=2.111$, $P < 0.05$ (图 5)。

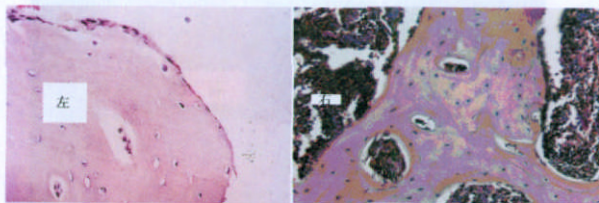


图 5 3 个月时骨痂生长情况

Fig.5 The circumstances of bone healing in three months

Left: negative side (x400); right: positive side (x100); Compared positive side with negative side, there were more bone-formation in positive side

3 讨论

3.1 骨髓间质干细胞在修复骨缺损中的作用

MSC 是一种来源广泛,获取容易,能在体外培养得到大量增殖并保持成骨活性的细胞^[2,3]。本实验根据 MSC 的这些特点,利用 MSC 具有的分化成骨的能力,将 MSC 作为种子细胞植入动物体内,在局部促使其转化为成骨细胞,形成新的骨质,填补缺损,最终达到修复骨缺损的目的。

3.2 骨髓间质干细胞成骨的环境

MSC 向成骨细胞分化需要在一定的环境中,在一定的诱导因素存在下进行。干细胞存在的微环境称为“干细胞壁龛”^[4-6]。本实验通过提供骨髓腔和骨周间隙为 MSC 生存和分化的微环境,利用异体骨和自体骨中诱导骨生长的 BMP、TGF- β 、bFGF 等为诱导因子,使 MSC 获得向成骨细胞分化生长的有利环境。实验表明,在上述环境中,MSC 通过分化为成骨细胞等方式,促进了成骨。研究表明,局部 MSC 浓度要超过 $2 \times 10^7/\text{cm}^3$ 才能确保新骨形成,本实验使骨髓腔和骨周间隙 MSC 细胞浓度接近 $2 \times 10^8/\text{cm}^3$,手术野的出血形成血肿,将植入的 MSC 包裹,使 MSC 局限于术野置入的异体骨周围。

3.3 异体骨的作用

本实验采用特殊方法处理异体骨,降低了异体骨的抗原性的目的,使异体骨在植入受体体内后,免疫反应引起移植失败的可能性得到较大程度控制。实验中,在对异体骨采用表面脱钙,表面脱钙可以使异体骨中的 BMP 等骨诱导因子部分暴露,促进成骨;同时保持了异体骨具有一定的机械强度^[7,8]。表面脱钙后,在骨质表面(包括骨外壁和骨髓腔内壁)形成一层胶原样结构,有利于吸附植入的 MSC 细胞。实验中,异体骨还在植入前经过抗菌素溶液浸泡、射线照射等处理,避免了感染影响植骨的效果。研究发现,射线照射的剂量在 2 Mrads,时间达到 12 h 能够杀灭包括芽孢在内的所有细菌。经过上述的处理使得异体骨在植入受体之前达到完全无菌,较低的抗原性又保持了一定的外形和机械强度,适合作为修复骨缺损的组织工程材料^[9]。

3.4 骨髓间质干细胞与异体骨结合治疗骨缺损的效果和意义

本实验显示, 实验侧异体骨植入体内后达到骨性愈合。其成骨作用不仅发生在异体骨和自体骨连接处, 而且在整个植骨区域都可以观察到不同程度的新骨形成。由于手术中植入异体骨周围的 MSC 是在缝合骨周软组织后, 穿过软组织注射到异体骨周围, 可以在一些大体标本观察到部分区域形成隆起较明显的骨痂。这种现象可能是在穿刺部位形成的针道中残留的 MSC 成骨作用的结果。这表明 MSC 有很好的成骨效果。纵行剖开骨质后, 可以见到植入的异体骨与自体骨之间的分界不明显, 部分样本在骨髓腔内形成红骨髓样成分, 部分样本的异体骨骨髓腔未完全再通。在骨皮质外壁和骨髓腔内壁都可以见到类似软骨样物质, 说明存在软骨成骨作用。对照侧, 也全部达到骨性愈合, 但骨痂主要分布在异体骨与自体骨连接处, 骨痂的量也较实验侧少。纵行剖开骨质可见到大部分骨髓腔未再通, 红骨髓样物质也较实验侧少。通过大体标本观察可见实验侧比对照侧形成的骨痂多, 而且分化程度更成熟。

对标本行 X 光照片后, 通过图像分析系统测量其光密度可以半定量测量骨密度的强弱。从实验结果可以看到: 实验侧结果的均值比对照侧高, 实验侧与对照侧有显著性差异。表明实验侧平均骨密度较对照侧高, 成骨量较对照侧多。说明 MSC 植入后成骨, 促进了骨缺损的修补。

在生物力学试验机上测量标本的扭矩和扭角, 可以了解成骨后骨质的强度和弹性。扭矩为在做扭转应力试验时达到骨质破裂的所需力矩。扭矩越大, 骨质强度越大, 达到骨折时所需力矩越大。扭角为扭转应力试验中达到骨质破裂时, 骨质两端围绕中轴线相对旋转的角度差值。扭角越大, 骨质抗扭转的能力越强, 弹性越好^[10-12]。实验结果可见实验侧的扭矩的均值和扭角均值均比对照侧高, 差异有显著性。说明实验侧不仅成骨量比对照侧多, 而且形成的骨质强度比对照侧高, 弹性更好。

组织学观察, 对照侧与实验侧在组织连接程度和骨髓腔再通程度上差异不明显, 但骨痂量差异显著。组织连接程度和骨髓腔发育程度反映了新形成的骨质的成熟程度, 两者之间差异不显著。说明植入的骨髓间质干细胞发育速度和成骨速度与动物体内的细胞相类似。骨痂量的差异可以看出实验侧主要通过成骨量增加达到增大骨强度的作用。

综上所述, 异体骨结合骨髓间质干细胞移植能够达到促进异体骨成骨的目的, 这种作用主要是通过增加局部或骨量来实现的, 植入的骨髓间质干细胞使局部形成较多的自源的骨性组织, 当异体骨逐渐被受体动物吸收后, 这些新形成的骨质可以在局部提供较多的力量支持和维持一定的体积^[13], 不仅一定程度适应了肢体活动的需要, 而且维持一定骨的形态, 有利于以后进一步的骨质修复。这种方法可以为临床提高异体骨远期疗效提供帮助。

参考文献:

- [1] XIE C, REYNOLDS D, AWAD H, et al. Structural Bone Allograft Combined with Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells As a Novel Platform for Bone Tissue Engineering [J]. *Tissue Eng*, 2006, 18(6):86-93.
- [2] 张丽蓉, 陈振光, 项鹏, 等. 成人骨髓间质干细胞基本生物学特性 [J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(3): 170-172.
- [3] 雷磊, 廖威明, 盛璞义, 等. 重组 PCL3- 转化因子 B₂ 基因转染兔骨髓基质干细胞体外诱导向软骨细胞分化的实验研究, *中国修复与重建杂志* [J]. 2006, 20(2): 134-138.
- [4] TSUCHIDA H, HASHIMOTO J, CRAWFORD E, et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(1):44-53.
- [5] WAN C, HE Q, LI G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model [J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(4):610-618.
- [6] 朱美玲, 陈汝光, 刘华, 等. 人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间质干细胞基本生物学特性的比较 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 504-507.
- [7] BRUDER S P, JAISWAL N, RICLTON N S, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1998, (355 Suppl):S247-256.
- [8] DEN BOER F C, WIPPERMANN B W, BLOKHUIS T J, et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(3):521-528.
- [9] HENG B C, PHAN T T, LIU H, et al. Can the therapeutic advantages of allogenic umbilical cord

(下转第 572 页 to page 572)

国外于上世纪 60 年代就开始了关于牙科畏惧症对人们口腔健康、心理和行为的研究^[6]。本调查选用以体征为依据的 Venham 临床焦虑及合作行为级别评定量表,对克制力较弱而表里如一的儿童比较合适,结果较为客观^[7]。本研究结果显示,直接与儿童患者谈话是一种有效的减轻牙科畏惧症的方法,在不同的年龄组都得出了相同的结果 ($P < 0.01$),但谈话时间的延长和其合作程度之间,不成正比 ($P > 0.05$);而在不同的年龄组间,合作率的差别也有统计学意义 ($P < 0.05$),年龄越大,合作性越高。有研究表明,群体中的儿童受外在力量的控制影响较大,易服从成年人的意志以及同伴领袖的权威,有较强的附属心理,在规范约束的情况下产生大量的从众反应^[8]。因此,如果在为儿童患者诊疗的过程中,医生用其熟悉的语言对他们进行安抚和指导,能增加其安全感,松弛紧张情绪,同时也可以与儿童患者间建立良好的信任关系^[9],让其感到自己受重视,被关怀,治疗时能主动合作,在一定程度上减轻牙科畏惧症的程度,有利于治疗的顺利进行。而随着年龄的增长,知识增多,好胜心和荣誉感增强,因此牙科畏惧症发生的程度也有所减轻。这也和其他学者的研究结论一致:对牙科的恐惧,与其他或特异性畏惧症一样,随年龄的递增而减轻^[10,11]。

此外,我们在日常医疗工作中还常使用以下方法来减轻患儿的牙科畏惧症,例如:牙医要以一个赞扬患儿、关心患儿的形象出现;在不影响诊疗效果的前提下,简化治疗,尽可能做到无痛操作^[12];医生在与儿童患者进行语言交流的同时,可以同时使用一些肢体动作来提高患儿对医生的信任感,如说话时双眼与患儿有眼神的交流,并适当前倾身体,表明你对他的重视,有兴趣与其交谈。针对不同年龄儿童给予适当的控制权,如让 4 岁的孩子决定先磨哪颗牙等。

总之,随着传统医学模式向生物-心理-社会医学模式的转变,牙科医师将面临更高的要求,特别是对儿童的诊疗过程中,除了要具备熟练的操作技能外,还要注意患儿的心理,多进行有效的语言交流,提高与患儿的沟通能力,确立医患间良好的信赖关系以便更好地为患儿服务。

参考文献:

- [1] 汪俊,王慧民. 三种儿童牙科畏惧评估方法的一致性研究[J]. 上海口腔医学,2006,15(6):581-584.
- [2] 吴友农. 概述牙科畏惧症[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,1997,7(3):199-201.
- [3] LOCKER D, LIDDELL A G, DEMPSTER L, et al. Age of onset of dental anxiety [J]. Dent Res, 1999, 78(3): 790-796.
- [4] 王慧民,冯希平. 儿童牙科畏惧症[J]. 国外医学口腔医学分册,2004,31(4):295-297.
- [5] 梁焕友,彭助力,潘集阳,等. 牙科畏惧调查(dfs)量表中文版的研制与评价[J]. 中山大学学报:医学科学版,2006,27(2):236-241.
- [6] 方园. 儿童牙科畏惧症的预防治疗及其研究进展[J]. 现代口腔医学杂志,2007,21(2):206-208.
- [7] 吴忠,陈耀俊. 儿童牙科畏惧症调查研究[J]. 口腔医学,2005,25(2):111-113.
- [8] 陈仙梅. 正式规范的约束[J]. 应用心理学,1992;7(2): 28-31.
- [9] 李晨军,张建设,马高旗,等. 心理干预对儿童牙科畏惧评影响的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2003,13(10):589-591.
- [10] HAGGLIN C. Variations in dental anxiety among women in sweden [J]. J Dent Res, 1999, 78(10):1655-1661.
- [11] 何宏,韩俊力,徐群. 儿童牙科畏惧症的调查分析[J]. 上海口腔医学,2004,13(3):176-178.
- [12] 孟晓菲. 儿童牙科畏惧症 31 例治疗体会[J]. 人民军医,2005,48(10):599-602.

(编辑 王晓鹰)

(上接第 519 页 from page 519)

blood-derived stem cells and autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells be combined and synergized? [J] ASAI O J, 2006, 52(6): 611-613.

- [10] 吴文周,朱健,王显耀,等. 大段负重骨移植中的生物力学实验研究[J]. 中国生物医学工程学报,2000,19(2): 191-193
- [11] 廖威明,周肇平,曲广运,等. 运动、钙和雌激素对去势雄性大鼠股骨生物力学影响的比较[J]. 医用生物物

学,1998,13(3): 164-168.

- [12] 陈柏龄,廖威明,李佛保,等. 轻度承重活动对卵巢切除大鼠骨密度组织计量和生物力学的影响[J]. 中山大学学报,2001,22(3): 187-191.
- [13] OUYANG H W, CAO T, ZOU X H, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects [J]. Transplantation, 2006, 82(2):170-174.

(编辑 徐杰)