

文章编号:1004-7220(2012)05-0582-06

灌注型生物反应器中流速对人骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响

孙晓江, 戴尅戎, 谢幼专, 汤亭亭, 于志锋, 张书红

(上海市骨科内植物重点实验室 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海 200011)

摘要: **目的** 探讨在灌注型生物反应器中,大段磷酸三钙(β -TCP)载体内不同流速对人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)增殖及成骨分化的影响。**方法** 利用灌注型生物反应器对复合了hMSCs的大段 β -TCP载体分别以3、6、9 mL/min的流速培养15 d,通过葡萄糖消耗量、细胞活力(MTT比色法)以及扫描电镜(SEM)观测细胞在载体内的增殖情况;以Real-time PCR检测成骨分化相关基因的表达。**结果** 各组葡萄糖的日消耗量随培养时间的延长而增加,初期9 mL/min组细胞增殖明显快于3、6 mL/min组($P < 0.001$),但是灌注培养后期6 mL/min组的细胞增殖快于9、3 mL/min组($P < 0.05$)。灌注培养15 d后,6 mL/min组细胞活力显著高于3、9 mL/min组($P < 0.001$)。SEM观察发现3组 β -TCP载体内均形成复合细胞层,3 mL/min组细胞层呈疏松的簇状,6 mL/min组复合细胞层部分呈膜片状,9 mL/min组复合细胞层多数呈膜片状。在进行成骨诱导灌注培养15 d后,6、9 mL/min组碱性磷酸酶(ALP)及骨桥蛋白(OP)的表达均显著高于3 mL/min组($P < 0.01$);3、6 mL/min组骨钙素(OC)的表达基本相同($P > 0.05$),而9 mL/min组OC的表达量则显著高于另外两组($P < 0.001$)。**结论** 在利用灌注型生物反应器对hMSCs进行灌注培养的早期,9 mL/min的流速最有利于hMSCs的增殖,而晚期6 mL/min的流速最有利于hMSCs的增殖。 β -TCP载体内流体剪切应力(flow shear stress, FSS)随灌注流速的增加而增加,适当的FSS可促进细胞外基质的合成和分布,并增加成骨相关基因的表达。

关键词: 生物反应器; 流体剪切应力; 人骨髓间充质干细胞; 增殖; 成骨分化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effect of perfusion flow rate on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells

SUN Xiao-jiang, DAI Ke-rong, XIE You-zhuan, TANG Ting-ting, YU Zhi-feng, ZHANG Shu-hong (Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Department of Orthopaedics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of different perfusion flow rates on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) in large scale β -TCP (tricalcium phosphate) scaffold at perfusion bioreactor. **Methods** hMSCs isolated from iliac bone marrow aspiration were loaded into large scale β -TCP scaffold and cultured in perfusion bioreactor at the perfusion flow rate of 3, 6 or 9 mL/min for 15 days. The culture media were collected for D-glucose consumption assay every 3 days. After perfusion culture for 15 days, the cell-scaffold composites were harvested for assessment of cell viability by MTT colorimetric method, SEM observation and osteogenic gene expression by real-time PCR. **Results** The proliferation of hMSCs assayed by daily glucose consumption showed that at early stage of culture, cells proliferated faster at flow rate of 9 mL/min

收稿日期:2012-08-24; 修回日期:2012-09-30

基金项目:上海市骨科内植物重点实验室建设基金(08DZ2230330),上海交通大学医学院附属第九人民医院基金(JY2011A03),上海教委重点学科建设基金(J50206)。

通讯作者:戴尅戎, Tel:021-63139920; E-mail:krdai@163.com。

than at 3 or 6 mL/min ($P < 0.001$); while at late stage of culture, cells proliferated faster at flow rate of 6 mL/min ($P < 0.05$). The cell viability indicated that the cell-scaffold composites at flow rate of 6 mL/min exhibited the most viable cells ($P < 0.001$). SEM indicated that all the macropores of the scaffold at different flow rates were filled with cellular layers. All cellular layers at flow rate of 3 mL/min were incompact, but that at 9 mL/min were compact; at flow rate of 6 mL/min, the cellular layers were either compact or incompact. Real-time PCR revealed that after perfusion culture for 15 days, the mRNA expression of osteoblastic genes including ALP and OP, were enhanced significantly at flow rate of 6 and 9 mL/min as compared to that at 3 mL/min ($P < 0.01$); however, the 9 mL/min group presented the higher OC expression than 3 and 6 mL/min group ($P < 0.001$). Conclusions At early stage of perfusion culture, the proliferation of hMSCs was promoted at flow rate of 9 mL/min, while at late stage, there was more viable cells in scaffolds at flow rate of 6 mL/min. The osteoblastic differentiation of hMSCs was facilitated with the increase of perfusion flow rate, which was attributed to the increased flow shear stress. Key words: Bioreactor; Flow shear stress (FSS); Human mesenchymal stem cells (hMSCs); Proliferation; Osteoblastic differentiation

大段骨缺损的治疗是目前骨科临床面临的难题之一,体外构建组织工程化骨为这一难题的解决提供了新的途径。在传统的培养条件下,营养物质和气体交换通过弥散作用实现,种子细胞仅能在大段载体的边缘存活。本课题组通过研究已经初步证实,利用灌注型生物反应器构建组织工程化骨可以确保细胞在大段载体内的存活及增殖^[1-2]。在利用反应器进行灌注培养的过程中,除了能够增加载体中营养物质的运输、影响新合成胞外基质成分的沉积,还可以对细胞施加流体介导的剪切应力刺激、张力刺激以及静水压力刺激^[3-4]。有研究表明,液体流动产生的流体剪切应力(flow shear stress, FSS)刺激对于骨细胞的影响远远大于静水压力刺激或者基质变形引起的牵张拉伸应力的刺激^[3,5]。流体作用可以在一定程度上促进细胞的增殖分化,流体影响细胞增殖分化的机制包括流动电位学说、流体剪力刺激学说以及化学物质运输学说^[6-9]。也有研究表明,FSS是灌注培养过程中影响细胞活动最重要的介导者^[10]。在进行动态灌注培养过程中,灌注速度起着关键作用,它直接决定载体材料中细胞的营养物质以及代谢产物的运输,影响载体中新合成胞外基质成分的沉积,并对载体材料内的细胞产生一定的流体剪切应力刺激^[11]。本研究的目的是探讨在不同灌注速度条件下,人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)在大段磷酸三钙(β -TCP)载体内的增殖及成骨分化情况。

2 材料与方法

2.1 载体及主要试剂

大段柱状多孔 β -TCP 载体由法国 Biocetis 公司

提供,直径 14 mm,高 30 mm,载体中心有一隧道,直径 3.5 mm,长 25 mm。载体平均重量为 (3.35 ± 0.16) g。孔隙率为 75%,孔直径为 (530 ± 100) μm ,孔连接为 (150 ± 50) μm 。载体经高压蒸汽灭菌。 α -MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、Dulbecco-磷酸盐缓冲液(PBS)(Eurobio 公司),D-葡萄糖测定试剂盒(罗氏公司),抗坏血酸、 β -磷酸甘油、地塞米松、MTT(Sigma 公司),Trizol、MMLV 反转录酶(Invitrogen 公司),RNA 酶抑制剂、OligodT₁₈(上海生物工程有限公司),TaqMan Universal PCR Master mix 试剂盒、TaqMan 探针引物(AB 公司)。

2.2 灌注型生物反应器

采用自行设计的生物反应器(见图 1)^[1-2]。整个系统由灌注管道、蠕动泵和培养瓶构成,采用单向灌注培养。

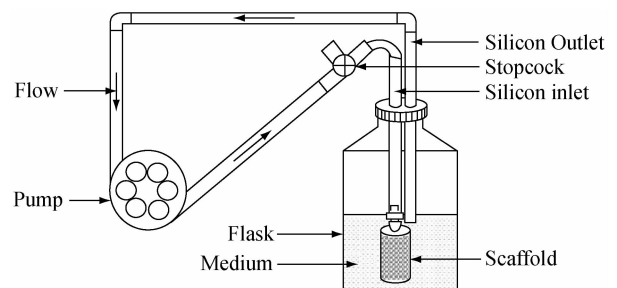


图 1 灌注型生物反应器示意图

Fig. 1 Diagram of the perfusion bioreactor

2.3 骨髓间充质干细胞的分离培养

髂嵴穿刺抽取健康志愿者骨髓以含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养传代,收集第 2 代的 hMSCs,冻

存于液氮中备用^[1]。

2.4 细胞接种与培养

第2代骨髓间充质干细胞达到80%~90%融合时以0.05%的胰蛋白酶消化后计数,制成 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液,按照先前的方法^[1-2]将细胞悬液接种到 β -TCP载体。随后分别以3、6、9 mL/min的灌注速度培养,3 d后初次换液,加入200 mL培养基,之后每3 d换液,15 d后取材检测。

2.5 细胞活力检测(MTT法)

载体内存活细胞的数量可用MTT法测定的细胞活力表示。以不同灌注速度培养15 d后,回收载体,沿纵轴将载体剖成两半,取一半载体按照谢幼专等^[1]的方法行细胞活力检测。

2.6 细胞增殖检测(葡萄糖消耗量)

每次更换培养液时,取5 mL样品进行葡萄糖测定(UV法,罗氏公司)。比色波长340 nm,光径1 cm,用空白管调零点测定各管的吸光值(A)。不同时间点培养基中葡萄糖浓度($C_{\text{葡萄糖}}$)的计算公式为:

$$C_{\text{葡萄糖}}(\text{g/L}) = (A_{\text{样本}}/A_{\text{标准}}) \times \text{标准液浓度}$$

每个细胞载体复合体的葡萄糖日平均消耗量(mg/d/scaffold)可根据测得浓度计算出^[1-2]。

2.7 扫描电镜(SEM)观察

不同灌注速度培养15 d后,每组取约10 mm \times 8 mm \times 5 mm大小的细胞载体复合体,PBS冲洗3次后,以2.5%的戊二醛固定2 h;PBS漂洗2次(10 min/次)后1%的锇酸/PBS固定液固定2 h;PBS漂洗2次(10 min/次)后酒精梯度脱水,临界点干燥后离子溅射喷金,环境扫描电镜(HITACHI,日本)观察。

2.8 细胞成骨分化检测(Real-Time PCR)

不同灌注速度培养15 d后,每组取约10 mm \times 10 mm \times 5 mm大小的细胞载体复合体,冰PBS冲洗后无菌滤纸吸干PBS,研钵中加入2 mL Trizol后冰上彻底研碎细胞载体复合体,按照试剂说明书上的操作步骤提取总RNA后以MMLV反转录酶行反转录获得cDNA,TaqMan MGB探针法Real-time PCR反应检测成骨相关基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白(osteopontin, OP)及骨钙素(osteocalcin, OC)的表达,以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)

作为参比基因,所用的探针引物为AB公司的产品,货号分别为ALP—Hs00758162m1、OC—Hs01587813g1、OP—Hs00167093m1、GAPDH—Hs99999905m1。

2.9 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时认为统计学上有显著差异。

3 结果

3.1 葡萄糖耗量反映的细胞增殖

不同灌注速度培养条件下,各组葡萄糖的日消耗量随培养时间的延长而增加。培养3 d时,9 mL/min组葡萄糖耗量明显快于3、6 mL/min组($F = 14.883$, $P < 0.001$),而3、6 mL/min组间无显著差异($P = 0.193$);培养6 d时,9 mL/min组细胞葡萄糖耗量仍显著高于3、6 mL/min组($F = 4.598$, $P = 0.029$),而3、6 mL/min组间仍无显著差异($P = 0.696$);灌注培养至第9 d时,6 mL/min组的细胞增殖开始快于9、3 mL/min组,但3组间差异没有显著性($F = 1.004$, $P = 0.391$);第12 d时,6 mL/min组的细胞增殖仍快于9、3 mL/min组,但差异还是没有显著性($F = 1.493$, $P = 0.258$);到灌注培养15 d时,6 mL/min组细胞葡萄糖耗量开始显著高于3、9 mL/min组($F = 3.736$, $P < 0.05$);整个培养过程中,3 mL/min组葡萄糖消耗量在各个时间点均最低(见图2)。

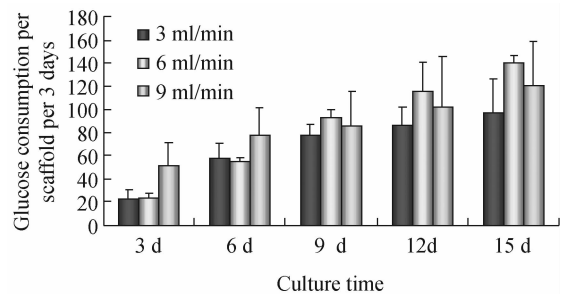


图2 不同灌注流速条件下细胞/载体复合体葡萄糖消耗量的比较
Fig. 2 D-glucose consumption of cell/scaffold composite at different perfusion flow rates

3.2 MTT法检测的细胞活力

成骨诱导灌注培养15 d后在不同灌注速度条

件下,以整个载体 MTT 吸光值表示的载体内的细胞活力结果为:3 mL/min 组 20.58 ± 2.64 ,6 mL/min 组 40.47 ± 7.30 ,9 mL/min 组为 29.77 ± 4.59 ,3 组间具有显著差异 ($F = 19.1, P < 0.001$)。其中 3 mL/min 组显著低于 6 mL/min 组 ($P < 0.001$) 及 9 mL/min 组 ($P = 0.013$);6 mL/min 组显著高于 9 mL/min 组 ($P = 0.004$,见图 3)。

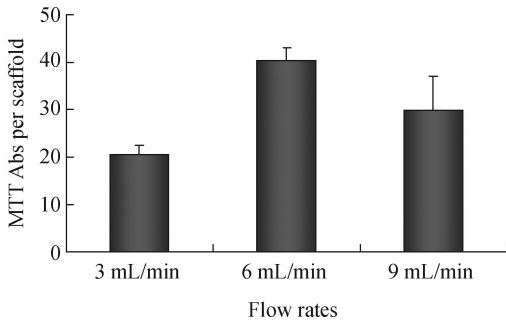


图 3 不同流速灌注培养 15 d 后细胞/载体复合体内的活细胞数量
Fig. 3 Cell viability of cell/scaffold composite cultured at different perfusion flow rates for 15 days

3.3 扫描电镜 (SEM) 观察

成骨诱导灌注 15 d 后进行扫描电镜观察,不同灌注速度条件下 hMSCs 均能够在整个载体内存活并增殖, β -TCP 载体内几乎所有的孔均为聚集生长的复合细胞层所填充(见图 4(a)、(d)、(g))。3 mL/min 组载体孔内复合细胞层多数呈簇状生长,6 mL/min 组载体孔内已经有较多复合细胞层呈膜片状聚集生长,9 mL/min 组载体孔内复合细胞层多数呈膜片状生长(见图 4(b)、(e)、(h))。高倍(200 \times)观察可见膜片状聚集生长的复合细胞层较簇状生长的复合细胞层明显含有更多的胞外基质成分,且基质较为紧密(见图 4(c)、(f)、(i));说明随着灌注速度的增加,细胞合成分泌的胞外基质成分增加,反映 hMSCs 的成骨分化活性随灌注速度的增加而增加。

3.5 Real-time PCR 检测结果

由 TaqMan 探针法进行的 Real-time PCR 结果表明,在进行成骨诱导灌注培养 15 d 后,不同灌注速度条件下成骨相关基因的表达随灌注速度的增加而增加。ALP 的表达,6、9 mL/min 组分别是 3 mL/min 组的 1.42 倍 ($P < 0.05$) 及 1.90 倍 ($P <$

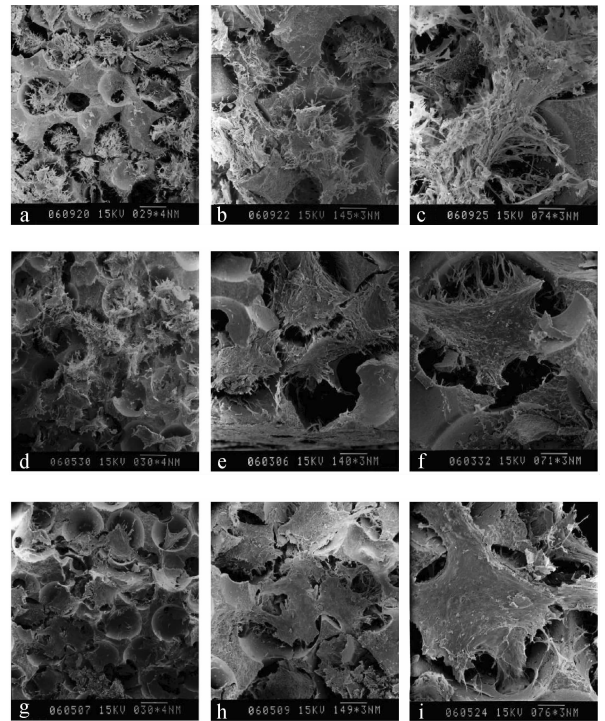


图 4 不同灌注速度载体内细胞的扫描电镜 (SEM) 观察 (a) ~ (c) 灌注速度 3 mL/min 组, (d) ~ (f) 灌注速度 6 mL/min 组, (g) ~ (i) 灌注速度 9 mL/min 组

Fig. 4 SEM images of the cell/scaffold composite at different flow rates (a)-(c) Composite at flow rate of 3 mL/min, (d)-(f) Composite at flow rate of 6 mL/min, (g)-(i) Composite at flow rate of 9 mL/min

0.01),6、9 mL/min 组间 ALP 基因的表达无显著差异 ($P > 0.05$);OP 的表达,6、9 mL/min 组分别是 3 mL/min 组的 2.12 倍 ($P < 0.01$) 及 3.79 倍 ($P < 0.01$);OC 的表达,3、6 mL/min 组基本相同 ($P > 0.05$),而 9 mL/min 组则显著高于 3、6 mL/min 组 ($F = 11.493, P < 0.001$,见图 5)。

4 讨论

本科课题组前期通过自行设计的新型灌注式生物反应器,以 β -TCP 为载体,可以完成大节段工程化骨的体外构建,并成功用于山羊胫骨大节段缺损的修复^[1-2]。在利用灌注型生物反应器构建组织工程化骨的过程中灌注速度是一个很重要的因素,因为它不仅直接影响营养物质及代谢产物的运输、新合成胞外基质成分的沉积,而且还直接决定支架内微孔表面的流体剪切力的大小,从而对种子细胞的增

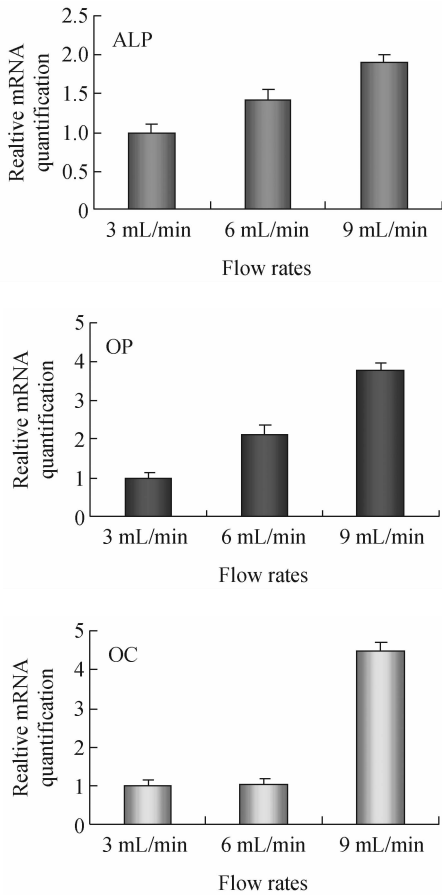


图5 不同灌注速度对于成骨相关基因表达的 Real-time PCR
Fig.5 Real-time PCR of osteogenic related gene expression at different perfusion flow rates

殖分化产生影响^[3-5]。

在以往对成骨细胞或者 hMSCs 三维动态培养的研究中,流速变化很大,0.001 ~ 3 mL/min 之间都有报道^[12-13],而本研究中所采用的流速是 3 ~ 9 mL/min,远较以往 3D 灌注培养研究所用的流速高,这是由于在灌注培养过程中所用的载体材料类型、载体的几何外形以及显微结构等不同所致,而这些因素均可以影响载体材料内流体剪切应力的大小。因此,单独报道流速对于细胞的影响不能对不同灌注实验之间的研究结果的差异进行比较;要比较不同研究结果的差异必须把流速转换为流体剪切应力,这样比较才有意义。模拟流体在复杂结构的 3D 多孔载体材料中的流动、估计多孔载体材料孔表面的流体剪切应力的大小,对于分析比较不同灌注实验结果具有重要意义。本课题是前期用计算流体

动力学 (computational fluid dynamics, CFD) 对灌注培养系统中不同灌注速度下载体内的流体剪切应力进行了分析^[14],在灌注培养体系中,灌注流速为 3、6、9 mL/min 时,载体内的初始流体剪切应力值分别为 (5.2 ± 1.5) 、 (10.6 ± 3.0) 、 (16.2 ± 4.6) mPa。

MSC 生长及成骨分化有 3 个明显的阶段:(1) 快速增殖阶段,伴有胞外胶原基质的形成;(2) 基质成熟阶段,此时细胞增殖降低,ALP 活性增加;(3) 矿化阶段,增殖进一步减慢,ALP 活性减慢,成骨分化标志蛋白包括 OP 及 OC 等的合成增加。本研究中,通过葡萄糖消耗量反映的细胞增殖结果表明,在灌注培养的早期,9 mL/min 组细胞增殖速度最快,6 mL/min 组次之,3 mL/min 组最慢,而到了后期,6 mL/min 组增殖最快,整个培养过程中 3 mL/min 组细胞增殖最慢。说明灌注培养的早期,细胞形成的矿化基质成分较少,载体材料中的流体剪力还没有达到影响细胞成骨分化的临界值,因此各组间的区别主要在于不同灌注速度条件下营养物质及氧的运输不同,灌注速度大,营养及氧供应充分,细胞增殖快;反之,细胞增殖慢。而到了后期,由于培养时间较长,培养过程中,细胞分泌合成的细胞基质会在多孔材料孔隙中沉积,占据流体通道,降低了材料的孔隙率。因此,实际材料中细胞受到的剪切应力随着培养时间的增加而显著增加,从而对 hMSCs 的分化产生明显影响。hMSCs 的增殖与成骨分化是此消彼长的关系,增殖快细胞分化就受影响,反之,分化快时细胞增殖就减慢。9 mL/min 组细胞培养 9 d 以后分化加快,故增殖速度降低,反而会低于 6 mL/min 组。MTT 结果与葡萄糖耗量结果一致,到了培养结束时,6 mL/min 组材料中活细胞最多。

Real-time PCR 结果表明成骨诱导培养 15 d 后,9 mL/min 组(初始 FSS 为 16.2 mPa)和 6 mL/min 组(初始 FSS 为 10.6 mPa)细胞的 ALP、OP 的基因表达均明显高于 3 mL/min 组(初始 FSS 为 5.2 mPa)。9 mL/min 组的 OC 表达显著高于 6、3 mL/min 组,而 6、3 mL/min 组间 OC 表达无明显差异。说明灌注培养过程中,当 FSS 大于 10.6 mPa 时会影响成骨分化早期标志基因 ALP 和中期标志基因 OP 的表达。OC 是成骨分化的晚期标志基因,可以结合羟基磷灰石,在基质矿化阶段由成骨细胞合成^[15]。灌注培养 15 d 后,9 mL/min 组晚期标志

基因 OC 的表达显著高于另外两组,说明随着灌注培养时间的延长,FSS 促进细胞外基质的沉积,占据流体通道,材料孔隙率降低,材料中细胞受到的实际剪切应力已经远大于初始 FSS 的 16.2 mPa,开始影响晚期成骨标志基因 OC 的表达,而此时 6、3 mL/min 组的 FSS 还不足以影响 OC 的表达,两组间并无显著差别。说明在三维培养系统中,FSS 至少要在 16.2 mPa 以上时才会对晚期成骨标志基因 OC 的表达造成影响。

SEM 观察可见 3 种灌注速度条件下,hMSCs 都能在大节段 β -TCP 载体中存活并增殖,随着灌注速度的增加载体孔中复合细胞层及细胞外基质 (ECM) 的致密程度增加。仅在 6、9 mL/min 组可见到膜片状沉积的基质成分,说明流体剪切应力至少应超过 10.6 mPa 才可以改善细胞及胞外基质成分的分布,使之更加致密,从而有利于矿化基质成分的沉积。这与 Sikavitsas 等^[16]的研究结果一致,他们认为在三维培养条件下 10 mPa 水平的剪力就足以促进矿化基质成分的沉积。

5 结论

在利用灌注型生物反应器以 3 种灌注速度对 hMSCs 进行灌注培养时,培养的早期阶段 9 mL/min 的灌注速度最有利于 hMSCs 的增殖,而晚期 6 mL/min 的灌注速度最有利于 hMSCs 的增殖,3 mL/min 灌注培养条件下 hMSCs 的增殖最差;随流速的增加,载体内的 FSS 增加,细胞合成分泌的细胞外基质成分增加,当灌注培养体系中的 FSS 超过 10.6 mPa 时有助于促进 hMSCs 早中期成骨标志基因 ALP 及 OP 的表达,并且可以促进细胞及胞外基质成分的分布,使之更加致密,从而有利于矿化基质成分的沉积。FSS 至少要在 16.2 mPa 以上时才会对晚期成骨标志基因 OC 的表达造成影响。

参考文献:

[1] 谢幼专,朱振安,汤亭亭,等. 利用灌注型生物反应器促进干细胞在大段磷酸三钙载体内扩增[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(23): 1633-1637.
[2] Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, *et al.* Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(12): 3535-3543.

[3] Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, *et al.* Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro [J]. *Faseb J*, 1995, 9(5): 441-445.
[4] Owan I, Burr DB, Turner CH, *et al.* Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273: C810-815.
[5] Smalt R, Mitchell FT, Howard RL, *et al.* Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4): E751-758
[6] Pienkowski D, Pollack SR. The origin of stress-generated potentials in fluid-saturated bone[J]. *J Orthop Res*, 1983, 1(1): 30-41.
[7] Pollack SR, Petrov N, Salzstein R, *et al.* An anatomical model for streaming potentials in osteons [J]. *J Biomech*, 1984, 17(8): 627-636.
[8] Reich KM, Gay CV, Frangos JA. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production [J]. *J Cell Physiol*, 1990, 143(1): 100-104.
[9] Jacobs CR, Yellowley CE, Davis BR, *et al.* Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells [J]. *J Biomech*, 1998, 31(11): 969-976.
[10] Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, *et al.* The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent [J]. *J Biomech*, 2001, 34(5): 671-677.
[11] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(2): 80-86.
[12] Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, *et al.* Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12600-12605.
[13] Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, *et al.* Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(6): 1197-1203.
[14] 孙晓江,戴冠戎,汤亭亭,等. 灌注式生物反应器中大段多孔磷酸三钙载体内流场分布的模拟研究[J]. 医用生物力学, 2009, 24(1): 21-27.
Sun XJ, Dai KR, Tang TT, *et al.* Simulation of flow field within large scale porous β -TCP scaffold in perfusion bioreactor [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(1): 21-27.
[15] Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1993, 289: 292-312.
[16] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, *et al.* Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds [J]. *Ann Biomed Eng*, 2005, 33(1): 63-70.