

灌注式生物反应器中流体剪切力对 大段组织工程化骨构建的作用

李德强^{1,5,6}, 杨爱玲², 汤亭亭^{1,5}, 卢建熙^{1,4}, 郭雪岩², 戴赅戎^{1,3,5,6}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 骨科, 上海 200011; 2. 上海理工大学 动力工程学院, 上海 200093;

3. 上海生命科学研究院上海交通大学医学院健康科学研究所 骨科细胞分子生物学实验室, 上海 200025;

4. 上海贝奥路生物材料有限公司, 上海 200335; 5. 上海市骨科内植物重点实验室, 上海 200011;

6. 教育部数字医学工程研究中心, 上海 200030)

摘要: 目的 结合流体力学模型研究灌注式生物反应器中大段组织工程化骨的构建与多孔支架内流体剪切力的关系。方法 利用灌注式生物反应器对复合骨髓基质干细胞的多孔磷酸三钙支架进行灌注培养。培养基的黏度分别为 1.12 mPa·s, 2.23 mPa·s 及 3.35 mPa·s。通过细胞增殖、成骨分化及组织形态学评价组织工程化骨的构建, 建立流体力学模型, 求解支架内的流体剪切力。结果 培养基黏度 2.23 mPa·s 组, 细胞增殖高于其他组。培养基黏度 2.23 mPa·s 及 3.35 mPa·s 组第 28 d 的碱性磷酸酶活性及第 7 d 后的骨钙素分泌高于 1.12 mPa·s 组。培养基黏度越高, 骨桥蛋白的分泌高峰出现越早。28 d 后, 黏度 3.35 mPa·s 组的钙化基质最多。流体力学模型分析, 培养基黏度 1.12 mPa·s, 2.23 mPa·s 及 3.35 mPa·s 组中, 支架内的平均流体剪切力分别为 5 mPa, 11 mPa 和 15 mPa。结论 在利用复合人骨髓基质干细胞的多孔磷酸三钙构建大段组织工程化骨的过程中, 15 mPa 的流体剪切力最有利于组织工程化骨的构建。

关键词: 生物反应器; 骨组织工程; 流体剪切力; 计算流体动力学; 骨髓基质干细胞

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Study on the effects of flow shear stress in constructing large-scale tissue-engineered bone using a perfusion bioreactor

LI De-qi¹, YANG Ai-ling², TANG Ting-ting¹, LU Jian-xi^{1,4}, GUO Xue-yan², DAI Ke-rong^{1,3}. (1. Department of Orthopedic Surgery, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. College of Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 3. Orthopedic Cellular and Molecular Biology Laboratory, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences & Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 4. Shanghai Bio-lu Biomaterials Company Limited, Shanghai 200335, China; 5. Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implant, Shanghai 200011, China; 6. Engineering Research Center of Digital Medicine, Ministry of Education, China)

Abstract: Objective To study the relationship between the construction of large engineered bone and flow shear stress inside the β -tricalcium phosphate (β -TCP) scaffold in perfusion bioreactor with the flow model. **Method** The

收稿日期: 2008-08-20

基金项目: 国际科技合作重点项目 (2005DFA30120), 国家自然科学基金资助项目 (30600629), 高等学校博士学科点专项科研基金 (200802480070), 上海交通大学医学院博士创新基金 (BXJ0821), 国家自然科学基金资助项目 (30600628)

作者简介: 李德强 (1981-), 男, 研究方向: 骨组织工程; 并列第一作者: 杨爱玲 (1969-), 女, 研究方向: 计算流体力学及内流体力学。

通讯作者: 戴赅戎, Tel: (021) 63139920; E-mail: krdai@163.com; 郭雪岩, Tel: (021) 55273473; E-mail: xyguo@usst.edu.cn.

scaffolds seeded with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured in perfusion bioreactor. The viscosity of the media was 1.12 mPa · s, 2.23 mPa · s, and 3.35 mPa · s respectively. The construction of the tissue-engineered bone was assessed through the proliferation and osteogenic differentiation of cells and histological assay of the constructs. The flow model was established to calculate the flow shear stress inside the β -TCP scaffold. **Result** The cell viability was highest in the group with the viscosity of 2.23 mPa · s. The alkaline phosphatase activity at day 28 and the osteocalcin secretion after 7 days were higher in the two groups with the viscosities of 2.23 mPa · s and 3.35 mPa · s than in the group with the viscosity of 1.12 mPa · s. Increasing the viscosity of the medium resulted in an earlier emergence of secretion peak of osteopontin. After 28 days of culture, the mineralized extracellular matrix formed inside the scaffold was most in the group with the viscosity of 3.35 mPa · s. The averaged flow shear stress in the scaffold was 5 mPa, 11 mPa, and 15 Pa accordingly when the viscosity of the media was 1.12 mPa · s, 2.23 mPa · s, and 3.35 mPa · s respectively. **Conclusions** In this study, a 15 mPa of flow shear stress was optimal in the construction of a large-scale tissue-engineered bone using the β -TCP scaffold combined with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a perfusion bioreactor.

Key words: Bioreactor; Bone tissue engineering; Flow shear stress; Computational fluid dynamics; Bone marrow-derived mesenchymal stem cells

为了模拟体内动态微环境以在体外构建组织工程化骨,许多实验室将不同的生物反应器引入到骨组织工程中^[1-3],并已证明液流有利于组织构建^[4-6]。在动态培养中,液流不仅提供了充足的营养,而且对接种在支架上的种子细胞施加一定的机械应力。研究表明,对骨细胞生物学行为的刺激作用,流体剪切力比静水压力和牵张应力更强^[7-9]。在灌注培养中流体剪切力增加了细胞外矿化基质的沉积。然而,这些报道主要是定性研究了流体剪切力在构建小块组织工程化骨中的作用。为了模拟长骨结构并构建适合临床应用的大块组织工程化骨,一种新型的灌注式生物反应器和临界尺寸的多孔 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)支架已在我们实验室设计成功^[1]。此生物反应器能够向大块的 β -TCP支架中提供连续的营养物质,使细胞在长期培养中存活并增殖^[1]。

正如组织工程领域的科学家们所言:一个生物反应器系统提供的最佳液流环境不应该通过反复的实验来确定,而应该通过模拟的方法进行预测^[10]。通过将生物学实验结果与支架内流场分析结合起来,可以改良设计出更有效的生物反应器或支架微结构,以改善组织工程化骨的构建,同时通过计算机模拟预测不同规格支架材料的最佳液流环境。本文研究了在灌注式生物反应器中利用接种了人骨髓间充质细胞的 β -TCP支架,构建大块组织工程化骨过程中不同流体剪切力的作用,并通过数学建模和计算流体动力学,计算 β -TCP支架内的流体剪切力。其目的是寻找有利于大块组织工程化骨构建的最佳流体剪切力以进一步优化灌注条件。

1 材料与方法

1.1 细胞的分离与培养

应用贴壁培养法分离扩增人骨髓基质干细胞(hBMSCs)。由健康供者髂嵴处抽取20 ml骨髓。每1 ml骨髓接种到一个10 cm的培养皿中,用含10%胎牛血清、100 IU/ml青霉素和100 mg/ml链霉素的 α -MEM生长培养基在37 °C/5% CO₂培养箱内培养。3 d后PBS清洗,贴壁细胞主要是人骨髓基质干细胞,继续培养至80%~90%融合。胰酶消化,以 5×10^3 个/cm³细胞的密度传代培养。

1.2 细胞/支架复合体的制备

多孔柱状 β -磷酸三钙支架具有75%的空隙率,孔径(530 ± 100) μ m,孔连通径(150 ± 50) μ m。支架直径14 mm,高度30 mm,中央有一直径3.5 mm、长度25 mm的隧道,整个支架重约3.35 g(见图1)。将第三代hBMSCs制成 2×10^6 个/mL细胞的细胞悬液。将 β -TCP支架浸没在细胞悬液中,通过负压使细胞悬液进入到支架的内部。然后将细胞/支架复合体安装到灌注式生物反应器中,于37 °C/5% CO₂培养箱内孵育。2 h后,向生物反应器系统中加入200 ml的培养基。2 h后,启动灌注式生物反应器。培养基每3 d更换一次。

1.3 灌注式生物反应器

三维灌注式生物反应器系统主要有三部分:蠕动泵、贮液瓶和连接管道(见图2)。贮液瓶贮存灌注培养液,细胞/支架复合体置于贮液瓶中并悬浮于

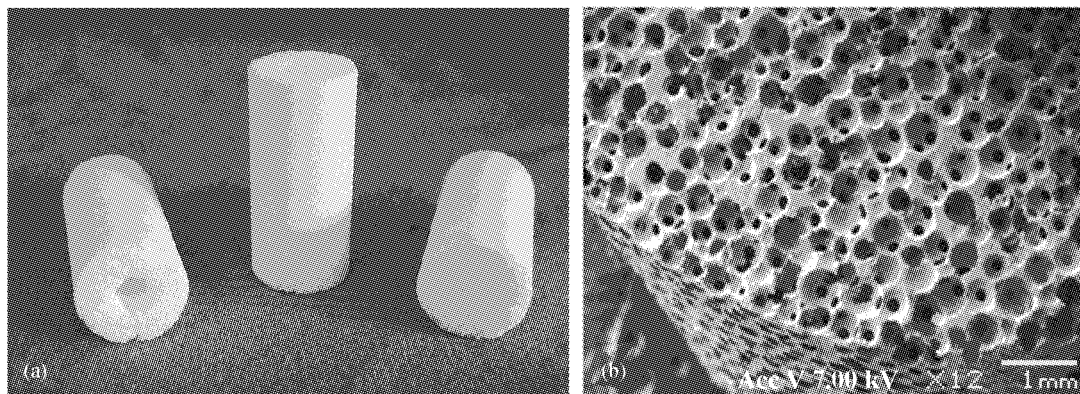


图1 多孔 β -磷酸三钙陶瓷支架,中央有一灌注隧道 (a)整体观,(b)扫描电镜图像(B)

Fig.1 Porous β -tricalcium phosphate (β -TCP) ceramic scaffold with a central tunnel (a) Holistic view, (b) scanning electron micrograph

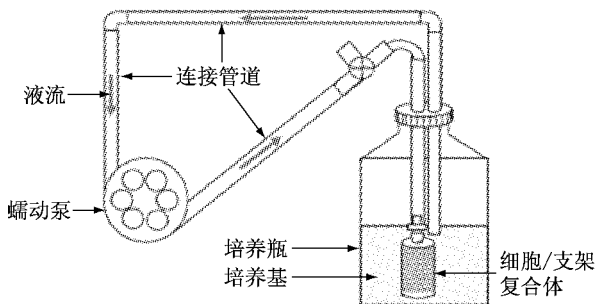


图2 灌注式生物反应器系统示意图

Fig.2 The diagram of the perfusion bioreactor

培养液中。蠕动泵驱动培养液在连接管道和贮液瓶中循环并通过细胞/支架复合体,灌流量为 3 ml/min 。

细胞培养基为 α -MEM,含有 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素和成骨诱导成分,即维生素 C ($50 \mu\text{g/L}$)、 β -甘油磷酸 (10 mmol/l) 和地塞米松 (10 nmol/l)。通过向培养基中添加葡聚糖,调整培养基的黏度分别为 $1.12 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 、 $2.23 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $3.35 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 。将培养基黏度 $1.12 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 组中支架内部的平均剪切力看作 $1\times$,则黏度为 $2.23 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $3.35 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 组中支架内部的平均剪切力可以分别近似看作 $2\times$ 和 $3\times$ 。

1.4 细胞增殖检测

用 MTT 法检测细胞增殖 培养 28d 后,每个圆柱状的支架沿纵轴切割成两部分。一部分用 70% 的酒精固定,用于组织学分析。另一部分用于细胞活性及碱性磷酸酶检测。用 PBS 冲洗标本,转移到 6 孔培养板中,并切割成小块状,加入 6 ml 的

MTT 溶液, 37°C 孵育 4 h。吸除 MTT 溶液,加入 5 ml DMSO 溶液,将小块状的材料研磨后用移液枪吹打均匀, 12 kg ,离心 10 min。收集上清液,分光光度计测量 490 nm 波长的吸光值。材料残渣 50°C 过夜烘干,称重。细胞活性以每克支架材料的吸光值表示。

1.5 成骨分化检测

通过碱性磷酸酶 (AP) 活性、骨桥蛋白 (osteopontin) 和骨钙素 (osteocalcin) 的表达检测接种在 β -TCP 支架上的 hBMSCs 向成骨表型分化。培养 28 d 后,取复合体的一部分用于细胞碱性磷酸酶活性的检测。细胞中 AP 活性应用 AP 活性定量检测试剂盒检测。AP 活性检测结果用根据 DNA 含量得到的细胞数进行标准化。分别在第 4、7、14、28 d 收集培养上清,用 ELISA 试剂盒检测培养上清中骨桥蛋白和骨钙素的含量。

1.6 组织学分析

光学显微镜检测的样本用 70% 的酒精固定 10 d 后,用双能 X 线吸收仪测量骨密度。然后梯度酒精脱水,二甲苯透明,甲基丙烯酸甲酯包埋。用硬组织切片机切片,厚约 $150 \mu\text{m}$ 。磨片抛光至 $50 \mu\text{m}$,用亚甲蓝-苦味酸品红染色,光镜检测拍照。同时对组织学切片进行形态学计量,计算形成的钙化基质占支架孔隙的百分比。

1.7 支架内流体剪切力分析

1.7.1 支架建模 本研究中的 β -TCP 支架是轴对称,因此,该支架的三维结构能够在二维平面中进行模拟。应用一种连续随机的填充算法在圆柱体中建

立一个小球填充床。小球的直径控制在 530 μm , 接触面的直径控制在 150 μm 。支架的数学几何模型就可以理解为此填充床的反填充, 因为支架中的孔隙位置即为小球的位置, 小球之间的孔隙即为支架的实体部分, 然后对建立的支架模型进行网格划分。另外, 为了方便地研究局部流体剪切力, 根据支架的结构参数将支架分为许多亚区。

1.7.2 流场分析 培养基在多孔 β -TCP 支架内的流动可以认为是稳态不可压缩的。流速控制在 3 ml/min。因为本研究中液流的雷诺数小于 50, 所以流动被认为是层流。二维平面上稳定不可压缩的 N-S 方程如下:

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} = 0$$

$$\frac{\partial \rho u^2}{\partial x} + \frac{\partial \rho uv}{\partial y} = -\frac{\partial p}{\partial x} + \frac{\partial \tau_{xx}}{\partial x} + \frac{\partial \tau_{xy}}{\partial y}$$

$$\frac{\partial \rho uv}{\partial x} + \frac{\partial \rho v^2}{\partial y} = -\frac{\partial p}{\partial y} + \frac{\partial \tau_{yx}}{\partial x} + \frac{\partial \tau_{yy}}{\partial y}$$

其中: u 和 v 是速度参数; ρ 为该研究中流体的密度为 1 059 kg/m^3 ; p 为压力; τ 为剪切应力, 即

$$\tau_{ij} = \mu \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right)$$

此处, μ 为流体的动力黏度。根据细胞培养基中葡聚糖的不同浓度, 流体的黏度分别为 1.12 $\text{mPa} \cdot \text{s}$,

2.23 $\text{mPa} \cdot \text{s}$, 3.35 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ 。为了研究不同流体剪切力在构建组织工程化骨过程中的作用, 对不同黏度培养基下的流场进行求解分析。每个亚区的平均流体剪切力用其中心部分的剪切力代表。

1.8 统计学分析

本实验中的数据用 SAS 6.12 统计软件进行分析。每一检测指标取多个样本 ($n=4 \sim 6$ 个/组), 结果用均数 \pm 标准差表示。获得的检测数据用 ANOVA 单因素方差分析。 $P < 0.05$ 代表差异有显著性。

2 结果

2.1 hBMSCs 的增殖及成骨分化

灌注培养 28 d 后, 剪切力 2 \times 组的细胞活性高于其他各组 ($p < 0.05$) (见图 3a)。第 28 d, 剪切力 2 \times 组和 3 \times 组的碱性磷酸酶活性高于 1 \times 组 ($p < 0.05$) (见图 3b), 在 2 \times 组和 3 \times 组织之间, 碱性磷酸酶活性没有显著性差异。骨桥蛋白的分泌在剪切力 3 \times 组第 4 d 达到高峰, 在 2 \times 组第 7 d 达到高峰, 在 1 \times 组第 14 d 达到高峰 (见图 3c)。第 7、14 d 和 28 d, 剪切力 2 \times 组和 3 \times 组的骨钙素水平高于 1 \times 组 ($p < 0.05$) (见图 3d)。

2.2 组织学检测

组织学切片经苦味酸-品红染色显示, 细胞/支架复合 4 h 后 hBMSCs 稀疏的分布于整个 β -TCP 支

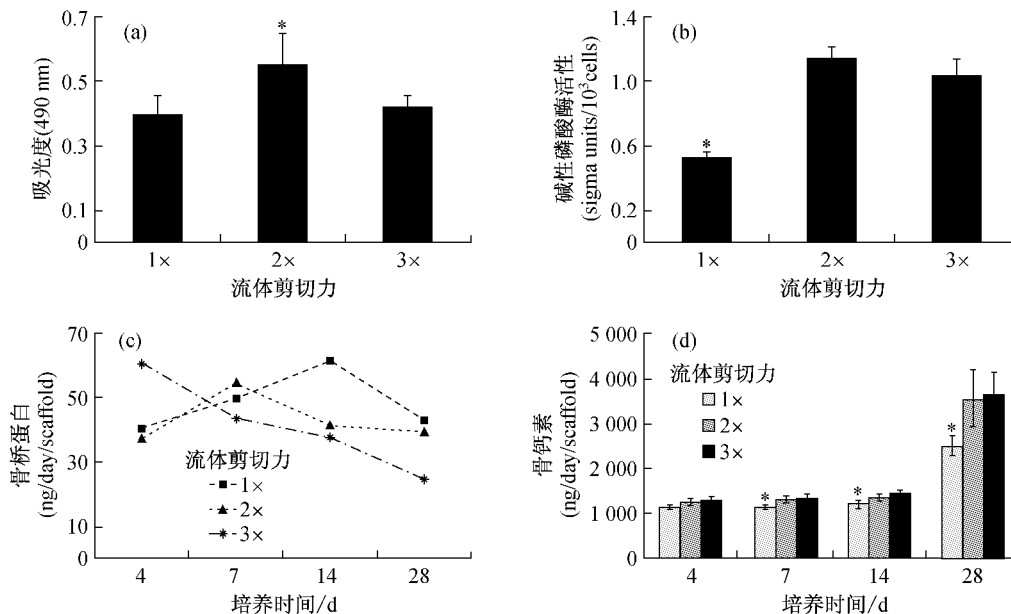


图3 细胞活性(a)以及成骨分化的标志物(b-d)

Fig.3 Cell viability and the markers of osteogenic differentiation

架内部绝大多数孔隙的内表面(见图4a)。灌注培养28 d后,各组均可见到矿化的细胞外基质分布于整个支架内。增加流体剪切力促进矿化的细胞外基质由内到外均匀的分布于整个支架内(图4b~d)。钙化细胞外基质或新骨形成量随着剪切力的增加而增加(见图5a)。双能X线骨密度检测显示,剪切力

3×组复合体的骨密度高于1×组($p < 0.05$), (见图5b)。

2.3 β-TCP 支架的几何模型

多孔β-TCP支架的模型如图6(a)所示,孔隙率70%~75%,球形孔隙均相互联通,孔的直径约530 μm,孔与孔之间的连通径约150 μm。y轴将整个支架分为两部分,每一部分又被分成22个亚区(见图6b)。选用三角形非结构性网格对整个计算区进行网格划分,在整个计算区域内,共有373 606个三角形网格(见图7)。

2.4 流场分析

计算区域内的速度等高线如图8所示。流速在支架的4个顶角处较低,在靠近支架中心隧道入口处较高。支架的其他亚区,流速中等比较均匀。每个亚区的平均剪切力如图9(a~c)所示。在A3-A7、B1-B6和C2-C6这16个亚区,剪切力大小中等且比较均一。在C1、B7和C7 3个亚区内,剪切力较低。在A1、A2和D 3个亚区内,剪切力较高。剪切力的分布模式与流速的分布模式一致。整个支

图4 接种4 h(a)及培养28 d后(b~d)的组织学切片
Fig.4 Histological sections of constructs after 4 hours and 28 days of culture

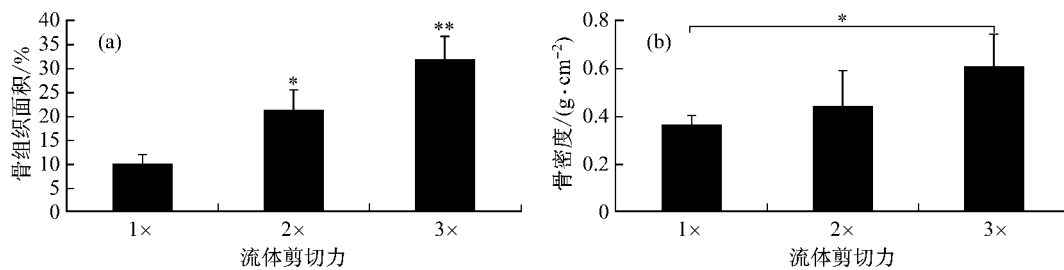


图5 灌注培养28 d后的新骨形成量及骨密度
Fig.5 The new bone volume (a) and bone mineral density (b) after 28 days

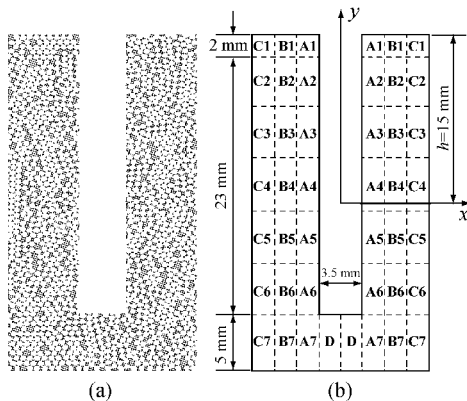


图6 β-TCP 支架的几何模型(a)及分区(b)
Fig.6 The geometric model (a) and zonation (b) of the β-TCP scaffold

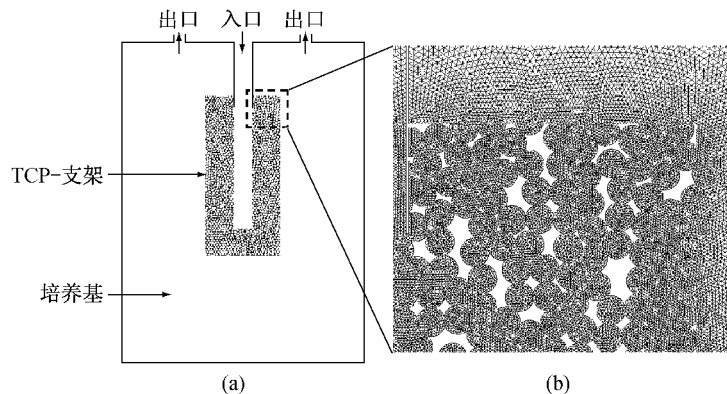


图7 灌注式生物反应器系统的计算区域(a), 以及网格的局部放大(b)
Fig.7 The computational domain of the bioreactor (a) and a local enlarged view (b)

图8 计算区域的速度等高线及支架内部速度等高线的放大
 Fig.8 The velocity contour in the computational domain and an enlarged view

架内的剪切力可以用 A3 - A7、B1 - B6 和 C2 - C6 这 16 个亚区内剪切力的平均值表示。当培养基的黏度分别为 $1.12 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、 $2.23 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 和 $3.35 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 时, 整个支架内相应的平均剪切力分别为 5

mPa 、 11 mPa 和 15 mPa (见图 9d)。

3 讨论

为了定量的研究流体剪切力对细胞增殖及成骨分化的影响,许多研究机构模拟了支架内的流体环境,并计算支架内的局部剪切力^[11-14]。在这些研究中,不同的流体剪切力是通过改变流量实现的。然而当流量改变时,流体剪切力和物质转运均可发生变化。正如我们所知,在大块工程化组织的构建过程中,物质转运是一个非常重要的因素。因此,不同流体剪切力对细胞增殖及成骨分化的作用会受到不同物质转运的影响。在本文实验中为了消除物质转运的影响,向培养基中加入葡聚糖以改变培养基的黏度。根据流体动力学方程中流体剪切力、流体黏度和流量之间的关系,在相同流量下通过改变培养基的黏度可以获得不同的流体剪切力。

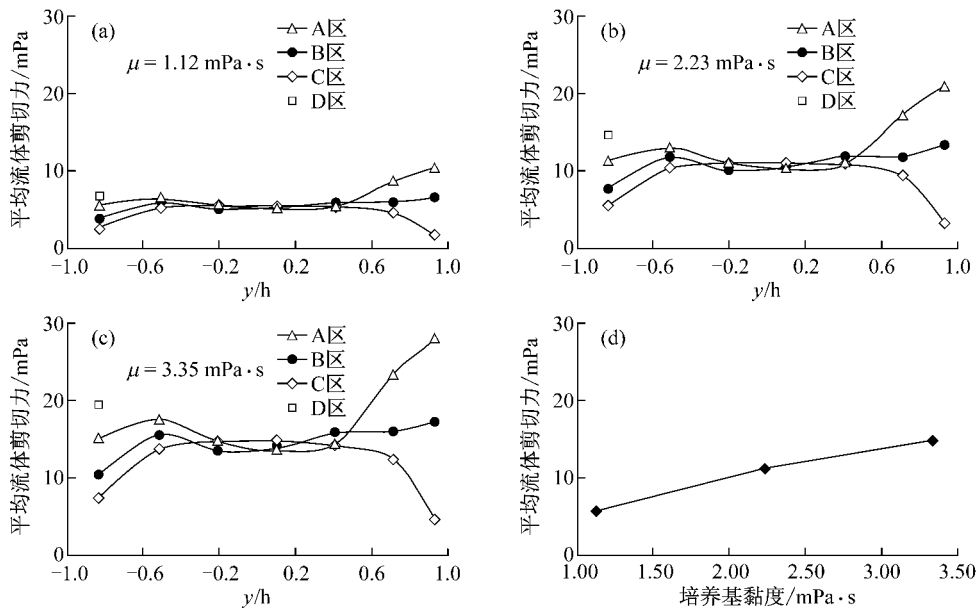


图9 不同粘度条件下,每个亚区内的平均剪切力(a - c)及整个支架内的平均剪切力(d)
 Fig.9 The averaged wall shear stress in each subdomain (a - c) and in whole scaffold (d) with different viscosity

以往关于流体剪切力影响细胞增殖的研究有不同的观点^[11,15]。在本研究中,适当增加流体剪切力促进 hBMSCs 的增殖。然而,当流体剪切力进一步增加时,细胞增殖受到抑制。结合支架内剪切力场的分析,促进 hBMSCs 增殖的最佳剪切力约为 11 mPa 。此剪切力高于以前的研究结果,但是要低于

人体内的流体剪切力($0.8 \sim 3 \text{ Pa}$)^[16,17]。细胞来源的不同、支架结构的不同以及不同物质转运影响的消除,可能是导致结果不一致的主要原因。 β -TCP 支架的几何模型是由实际的三维结构简化得到的二维结构,这或许也影响到了支架内流体剪切力的计算。

组织工程化骨的成功构建需要支架内的种子细胞成骨分化成熟及矿化细胞外基质的形成。本研究中,接种在 β -TCP 支架上的 hBMSCs 的成骨分化对流体剪切力的反应具有量效关系。 β -TCP 支架内的流场分析表明,促进碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌的流体剪切力为 11 ~ 15 mPa。与以往的研究相似,此剪切力高于促进细胞增殖的剪切力。骨桥蛋白是一种由分泌基质的成骨细胞产生的胞外蛋白。骨桥蛋白具有先升后降的表达模式,在较高剪切力 15 mPa 组第 4 d 达到分泌高峰,在中等剪切力 11 mPa 组第 7 d 达到分泌高峰,最后在第剪切力 5 mPa 组第 14 d 达到分泌高峰。表明灌注培养中增加流体剪切力,加速了接种在 β -TCP 支架上的 hBMSCs 的成骨分化。此外,这一现象或许也说明了高流体剪切力主要在短期培养中影响 hBMSCs 的成骨分化,低流体剪切力主要在长期培养中影响 hBMSCs 的成骨分化。随着细胞的增殖和细胞外基质的形成,支架的孔隙率逐渐降低而支架内的流速逐渐增加,相应的支架内的流体剪切力亦逐渐增高。因此,用 7% 葡聚糖浓度的培养基灌注培养 4 d 后,支架内的流体剪切力将超过 15 mPa。当流体剪切力超过 15 mPa 时,骨桥蛋白的表达受到了抑制。然而在整个培养过程中,骨钙素的分泌逐渐增加,而且增加流体剪切力会促进骨钙素的分泌,这提示超过 15 mPa 的流体剪切力不会抑制骨钙素的表达。以上这些数据表明,流体剪切力调节骨桥蛋白和骨钙素表达的信号通路可能不完全相同。与碱性磷酸酶活性和骨钙素的分泌一致,应用 7% 葡聚糖浓度培养的复合体的骨密度最高。根据组织学切片的结果,发现矿化的细胞外基质在应用 7% 葡聚糖浓度培养的复合体中最多,这表明 15 mPa 的流体剪切力能够增加细胞外基质的矿化。

尽管二维的数学几何模型能够模拟 β -TCP 支架内的流场,然而三维支架内的真实流场将更为复杂。在以后的研究中,将建立基于 micro-CT 扫描成像的真实支架三维模型,其流场分析将更为精确。另外,流场的模拟及流体剪切力的计算均是在空的支架模型中进行的。随着细胞的增殖和细胞外基质的形成,支架内的流场会发生一定的变化,在培养过程中流体剪切力也会发生相应的改变。因此,在将来的研究中,支架内流场的动态改变应加以考虑。

4 结语

在利用灌注式生物反应器构建大段组织工程化骨的过程中,流体剪切力影响了人骨髓来源间充质细胞的增殖和成骨分化,以及矿化细胞外基质的沉积。根据支架模型中的流场分析,体外在灌注式生物反应器中有利于大段组织工程化骨构建的最佳流体剪切力约为 15 mPa。

参考文献:

- [1] Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, *et al.* Three-Dimensional Flow Perfusion bioreactor system for Stem Cell Proliferation Inside the Critical-Size β -Tricalcium Phosphate Scaffold [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(12):3535-3543.
- [2] Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(3):549-554.
- [3] Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, *et al.* Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001, 55(2):242-253.
- [4] 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.
- [5] Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS. Perfusion enhances functions of bone marrow stem cells in three-dimensional culture [J]. *Cell Transplant*, 1998, 7(3):319-326.
- [6] Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, *et al.* Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(11):1279-1288.
- [7] 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.
- [8] 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(3 Pt 1):C810-815.
- [9] 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 Pt 1):E751-758.

(下转第 20 页)