

文章编号:1004-7220(2011)05-0441-07

· 论著 ·

新型动态载荷与循环灌注生物反应器系统的设计

陈学忠^{1,2}, 侍才洪¹, 李瑞欣¹, 郭勇¹, 李志宏¹, 王亮¹, 张西正¹

(1. 军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161; 2. 南方医科大学 生物医学工程学院, 广州 510515)

摘要: 目的 设计一套动态应变加载系统和三维灌注培养系统,并测试其性能。方法 明确动态载荷与循环灌注生物反应器的设计原则;设计并构建动态应变加载系统和三维灌注培养系统,研制供三维灌注与加载专用的培养舱;测定培养系统的无菌效果以及其应变加载的精确度和稳定性,进行组织工程骨的初步培养观察。结果 该生物反应器可为组织培养物提供不同大小和频率的压应变以及不同流量的灌注条件,可控精度高、操作简单可行、性能稳定;连续运转5 d后,培养液中无细菌生长。初步培养结果表明,体外构建的组织工程骨在生物反应器中培养10 d,其成骨细胞的增殖和成骨活性明显高于静态培养和单纯灌注培养。结论 该生物反应器可以成为三维条件下进行骨细胞生物力学研究的一种较理想的动态培养与应变加载装置。

关键词: 生物反应器; 骨组织工程; 生物力学; 细胞培养; 压应变; 动态载荷

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Design of a new dynamic load and circulating-perfusion bioreactor system

CHEN Xue-zhong^{1,2}, SHI Cai-hong¹, LI Rui-xin¹, GUO Yong¹, LI Zhi-hong¹, WANG Liang¹, ZHANG Xi-zheng¹ (1. *Institute of Medical Equipment, Academy of Military and Medical Sciences, Tianjin 300161, China*; 2. *Biomedical Engineering College, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*)

Abstract: **Objective** To design and build a new dynamic load and circulating perfusion bioreactor system and test its performance. **Methods** The design principle of the bioreactor system was specified and the dynamic strain loading system and 3D perfusion culture system were designed and built accordingly. A special culture chamber for 3D perfusion and compressive loading was also developed. The sterility of the culture chamber and the accuracy and stability of the strain loading were measured, and the result from the culture of tissue engineering bone was preliminarily observed. **Results** This bioreactor system could provide compressive strains with different magnitudes and frequencies, as well as perfusions under different flow conditions. It could be controlled accurately and operated easily with a steady performance. No germs were grown in the culture medium after 5 days' running. The preliminary results showed that after the tissue engineering bones were cultured in the bioreactor for 10 days, cell proliferation and ALP activity in this perfusion culture and loading group were significantly higher than those in the static culture group and the simple perfusion culture group. **Conclusions** The bioreactor could be an ideal dynamic culture and loading device for biomechanical study of tissue engineering bone.

Key words: Bioreactor; Bone tissue engineering; Biomechanics; Cell culture; Compressive strain; Dynamic loads

收稿日期:2010-11-15; 修回日期:2011-04-18

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(10832012),天津市自然科学基金面上项目(09JCYBJC14100)。

通讯作者:张西正, Tel: (022)84656716; E-mail: z56787@sohu.com。

随着骨组织工程与生物力学研究的不断深入开展,用于优化其体外培养微环境的各种生物反应器的研究也正在不断地进行。然而,能同时进行三维灌流和动态压应变加载,施于多种力学耦联作用的培养系统尚未完善。为了更好地进行组织工程骨的培养与体外骨细胞生物力学方面的研究,本课题组设计并建立了一套新型的动态载荷与循环灌流生物反应器系统(已获国家实用新型专利,专利号:zl201010249985.3)。该生物反应器不仅能为组织培养物提供良好的三维灌流培养条件,而且能在培养过程中进行精确的压应变刺激和测试,为体外三维条件下研究骨细胞对力学刺激的响应和骨组织内细胞之间的通讯关系提供了一种可靠的平台。

1 材料与方法

1.1 动态载荷与循环灌流生物反应器系统的设计

1.1.1 设计原则 根据目前骨组织工程化培养生物反应器研究的发展趋势,结合骨组织的力学感知传导机理和三维条件下研究细胞生物力学的要求,新型生物反应器系统的设计按如下原则进行:(1)生物反应器不仅要为工程化组织培养提供类似在体组织的可控力学激励,而且要提供模拟生理条件下的营养物质和代谢物的有效运输。(2)可进行多通道灌流培养和模块式组合,增加工程化组织培养的数量,便于对各个培养单位进行灌流和力学刺激。(3)灭菌方便,密封性好,能长期保持无菌状态。(4)系统操作方便、合理,参数监测和记录准确、稳定。

1.1.2 刚性框架的设计 刚性框架系统为单臂滑动式结构,采用不锈钢材料,滑动套筒与压电陶瓷一起可沿着滑槽上下移动。刚性框架上有滑动套筒的升降螺杆和预紧调整螺杆。通过升降螺杆和紧固螺杆的双向调节,可将压电陶瓷升降和锁定固定,消除单根螺杆受力时因螺纹的微小回程产生的松动,使得压电陶瓷在进行应力加载时不发生漂移,并达到灵活装卸培养舱和进行精确力学加载的目的。刚性框架系统设计示意图如图1(b)所示。

1.1.3 加载动力与控制系统的的设计及其工作原理

载荷施加单元的核心部件为内置位移传感器的智能型压电陶瓷(PS150/10/80VS15型),与压电陶瓷伺服器连接构成加载动力系统,计算机通过EPP并

行总线与伺服器连接后构成闭环控制。通过专用软件操作界面设定所需的频率、位移、波形和持续时间,计算机生成并发送指令去控制压电陶瓷伺服器,由其产生并输出相应的幅值、波形和频率电压信号后,压电陶瓷活动端则产生相应的位移变化,该位移变化通过加载棒传输到组织工程培养物上产生相应的微应变。而压电陶瓷内置位移传感器再将实际工作信号传回,并在计算机的操作界面实时显示所采集到的频率、位移和波形和已完成的工作时间等数据。压电陶瓷的频率范围为0~1 kHz,其活动端产生的伸长位移范围为0~105 μm ,精确度为满行程的 10^{-3} 。

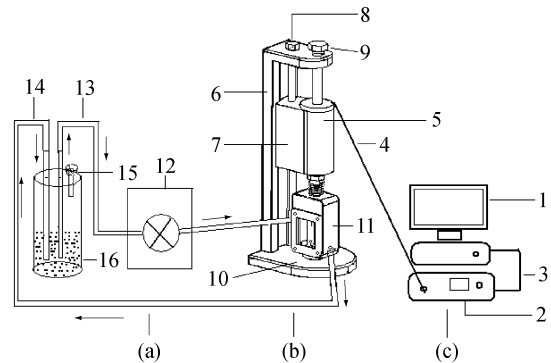


图1 动态载荷与循环灌流生物反应器的结构示意图 (a)三维循环灌注系统,(b)压电陶瓷加载装置,(c)压电陶瓷加载动力与控制系统

Fig.1 Schematic diagram of the dynamic load and circulating-perfusion bioreactor system (a) 3D circulating-perfusion system, (b) Loading device, (c) Loading power and control system

1 - 上位计算机,2 - 压电陶瓷伺服器,3 - 数据线,4 - 输入电压与微位移传感信号线,5 - 封装压电陶瓷,6 - 刚性框架,7 - 滑动套筒,8 - 升降螺杆,9 - 紧固螺杆,10 - 加载平台,11 - 培养舱,12 - 蠕动泵,13 - 培养液输出管道,14 - 培养液输入管道,15 - 空气过滤器,16 - 培养液储存罐

1.1.4 三维循环灌注系统的设计及其工作原理

整个系统由配备加载棒的灌流培养舱、培养液储存罐、多通道双向蠕动泵和连接管组成,每套系统可与同时连接12个灌注培养舱,各个培养单位可随实验需要随时装卸和搬移,便于同时或分别实施对组织培养物的灌流或应变加载。培养液流动循环途径如图1(a)所示,可在储存罐内通过空气过滤器与外界进行气体交换。蠕动泵能提供精确而持续的液体流动,其流量大小可通过其液晶控制面板进行调节。

单个培养舱的结构和实物如图2所示。其主体框架呈长方体形状,培养小室大小为3 cm × 3 cm × 3 cm大小,外框大小为5 cm × 3 cm × 6.5 cm,由聚四氟乙烯制成,两侧壁由透明玻璃构成观察窗。培养舱底部中央为不锈钢的培养物装载平台。在培养舱中间设计1个厚度为6 mm的纵向限流隔板以确保培养基流经支架材料,而不是从支架边缘的非灌注流径绕过。隔板中央为加载棒滑动通道。通过伸缩弹簧和带螺纹的滑动套筒与螺母等附件装置将加载棒弹性固定于培养舱正中央,调节螺母的位置即可使加载棒的横杆沿着滑槽升降,达到与培养物预紧或松开的目的。这种设计既可以在加载前通过加载棒的预紧调整将组织工程培养物固定在装载平台上,使其不发生漂浮和滑脱移位,又不影响加载时的位移产生和传输。

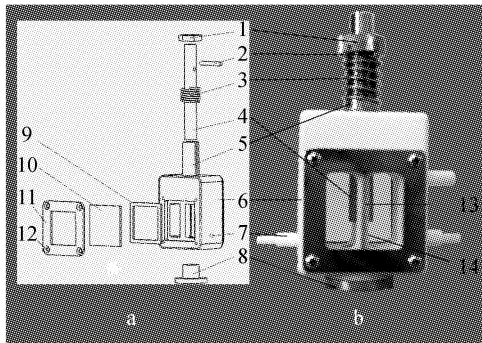


图2 单个培养舱的结构图(a)和实物图(b)

Fig.2 Schematic diagram (a) and photo (b) of the culture chamber

1-预紧螺母,2-横杆,3-伸缩弹簧,4-加载棒,5-滑动套筒,6-主体框架,7-培养液输入、输出孔,8-装载平台,9-密封圈,10-玻璃侧壁,11-固定压框,12-固定孔,13-限流隔板,14-组织培养物装载处

1.2 反应器系统的运行测试

1.2.1 应变加载测试 无菌条件下将直径为10 mm、厚度为5 mm的圆盘状三维多孔支架试件分别置于8个培养舱中,每个培养单位加入含10%胎牛血清的 α -MEM培养液80 mL;以10 mL/min的流速实施循环灌流;将培养舱移至压电陶瓷加载装置上并连接固定,通过计算机分别输入各种频率、位移(10~100 μ m)和工作时间等指令,观察并记录所采集到实际工作数据,计算其与设定数据的偏差。

1.2.2 细菌学检测 将运行中的反应器置于5%

CO₂和37℃恒温培养箱内,每天移至超净台中进行应力加载2 h,连续运转5 d,每天抽取5 mL培养液作细菌培养。

1.3 组织工程骨的初步培养观察

采用小鼠胚胎成骨细胞株MC3T3-E1,接种于上述胶原多糖基纳米羟基磷灰石(nHACP/PLA)支架上。每个支架接种细胞悬液(密度为 2.0×10^6 /mL)100 μ L,1 h后加入 α -MEM+10%FBS的培养液,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。4 h后进行分组,静态培养组:培养物置于培养皿内静态培养;单纯灌流培养组:培养物置于生物反应器培养舱内灌流培养,灌流速度为10 mL/min;灌流培养+应变加载组:在灌流培养组的基础上对予以动态微应变刺激(加载条件:3 500 μ ϵ ,1 Hz,每次2 h,1次/d)。通过以下各项指标对培养效果进行评估。

1.3.1 细胞增殖效应检测 采用CCK-8细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8,日本同仁化学研究所)检测各组支架材料上成骨细胞的生长情况。于培养后5、10 d分别取出各组培养物16块。每块组织培养物加入培养液600 μ L和CCK-8液60 μ L,4 h后吸取上清,酶标仪检测并记录各孔A值($\lambda=450$ nm)。

1.3.2 碱性磷酸酶(ALP)活性测定 于培养后10 d取出各组培养物3块。剪碎后0.25%胰酶消化,离心清洗3次,加入0.1% Triton X-100 200 μ L,4℃冰箱过夜(12 h),超声裂解1 min。吸取细胞裂解液,按ALP检测试剂盒(南京建成生物研究所)说明步骤操作,依次加入缓冲液、基质液和显色剂,520 nm波长测吸光度(A值)。各组数据分别除以相应细胞裂解液的蛋白总量,按公式计算出其细胞内ALP活性,以上实验重复测定5次。

1.3.3 支架内细胞分布及形态观察 将培养10 d后取出各组培养物4块,分别用手术刀从中间切割成两半,其中半块削切成厚约0.2~0.4 mm厚切片,直接在普通光镜下和HE染色后光镜下观察。另外一半用2.5%戊二醛固定,梯度酒精脱水。真空干燥后喷金,扫描电镜观察。

1.4 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件包进行分析,数据以均数 \pm 标准差表示;对实验数据采用重复测量方差分析,各组间多重比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为统计学有意义。

2 结果

2.1 设计结果

设计并构建了一套动态载荷与循环灌注生物反应器系统。整套设备的实物图如图3所示。

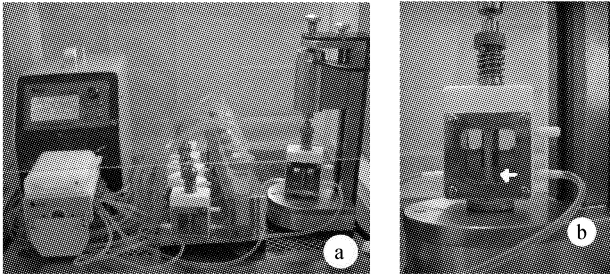


图3 在工作状态中的动态载荷与循环灌注生物反应器实物图 (箭头所示为组织培养物)

Fig.3 Photo of the dynamic load and circulating-perfusion bioreactor under working condition (arrow points to the culture medium)

2.2 微应变加载测试结果

加载装置能按上位计算机操作界面设定的各种工作指令运行(见图4),实际工作频率和工作时间均和给定指令相一致,加载棒所产生的实际位移大小与所预设的位移大小值偏差为 $(0.2 \sim 12) \times 10^{-3}$,设定的位移值为 $50 \mu\text{m}$ (振幅+偏置),实际工作产生的位移为 $50.06 \mu\text{m}$ (实时显示),偏差值即为 $0.06 \mu\text{m}$,仅为总位移的0.012。

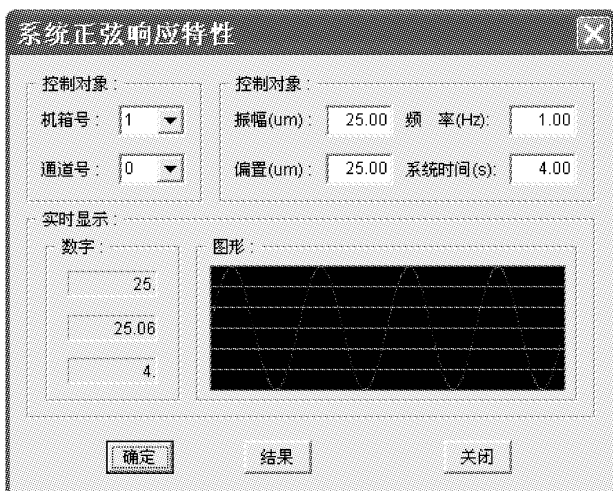


图4 上位计算机中的加载参数及实时显示界面

Fig.4 Computer interface of the loading parameter and real time data display

2.3 细菌学检测

反应器连续运行5 d,所提取培养基均无细菌生长。

2.4 组织工程骨的初步培养结果

2.4.1 细胞增殖效应检测结果 表1所示为培养一定时间后各组成骨细胞增殖的情况。经SPSS 17.0软件包重复测量方差分析显示,培养5 d时,不同实验组 $F = 339.852, P < 0.001$;培养10 d时,不同实验组 $F = 76.340, P < 0.001$ 。在培养后5 d和10 d时,灌注培养+应变加载组的A值均明显高于静态培养组和灌注培养组,灌注培养组高于静态培养组。LSD-t法两两比较, $P < 0.05$ 表示各组间差异均有统计学意义。

表1 各组不同时间点的CCK-8检测A值($n = 16, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Absorbance value of CCK-8 test at different interval time in different groups($n = 16, \bar{x} \pm s$)

组别	5 d	10 d
静态培养组(对照组)	1.572 ± 0.082	2.217 ± 0.109
灌注培养组	1.973 ± 0.070	2.453 ± 0.080
灌注培养+应变加载组	2.278 ± 0.068	2.614 ± 0.082

2.4.2 碱性磷酸酶(ALP)活性测定结果 培养后10 d,各组细胞的ALP活性(U/gprot, $n = 15$)分别为: 8.936 ± 0.589 (灌注培养+应变加载组)、 7.759 ± 0.466 (灌注培养组)、 5.673 ± 0.427 (静态培养组)。实验数据经重复测量方差分析显示,不同实验组 $F = 164.489, P < 0.001$,灌注培养组和灌注培养+应变加载组的细胞ALP活性明显高于静态培养组,尤其是灌注培养+应变加载组,成骨细胞表达更高的ALP活性。LSD-t法两两比较, $P < 0.05$ 表示各组间差异均有统计学意义。

2.4.1 支架内细胞分布及形态观察 如图5、6所示,各组支架切片及扫描电镜观察均可看到其支架孔内和在孔壁上有成骨细胞附着生长,细胞为多角形或梭形,长出的伪足使其相互连接。灌注组及灌注加载组支架内部的细胞分布相对较多,孔内细胞呈现复层生长的情况较为多见,尤其是灌注加载组更为明显,细胞生长数量和细胞外基质分泌量均较多,部分孔内细胞和分泌的基质融合成片。但各组支架内部均存在一定的“空化”现象,其中以静态培养组较为严重,部分孔内仅有少量细胞生长。

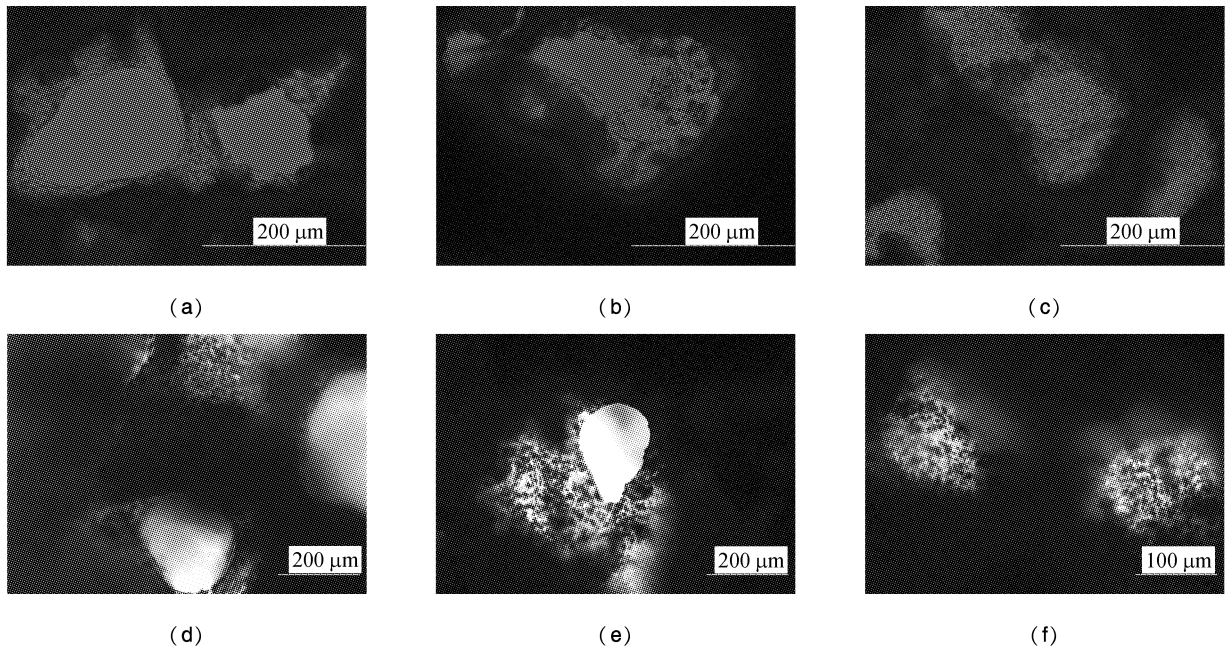


图5 细胞/支架复合物培养 10 d 后观察(支架内部中层厚组织切片 $\times 200$) (a) ~ (c) 倒置相差显微镜观察,(d) ~ (f) HE 染色;(a)、(d) 静态培养组,(b)、(e) 灌流培养组,(c)、(f) 灌流培养 + 应变加载组

Fig.5 Observation of MC3T3-E1 cells and scaffolds cultured for ten days (middle layer of scaffolds, thick tissue section $\times 200$) (a) ~ (c) Observation by inverted phase contrast, (d) ~ (f) HE staining;(a), (d) Static culture group; (b), (e) Perfusion culture group; (c), (f) Perfusion culture and strain loading group

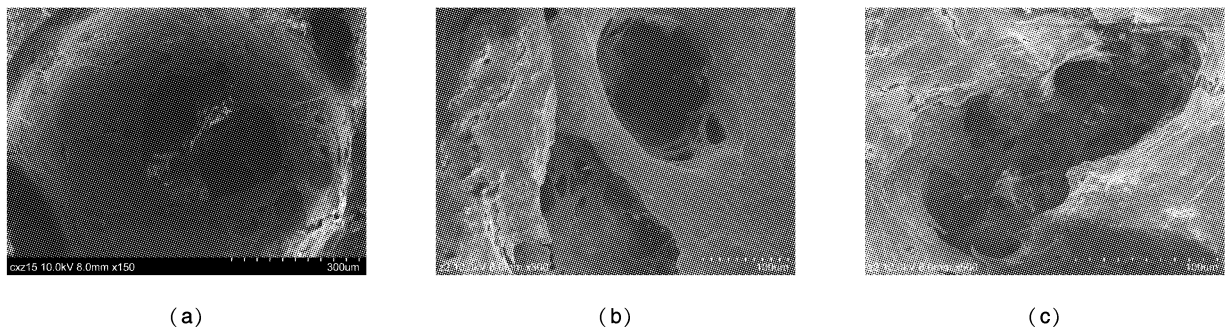


图6 细胞/支架复合物培养 10 d 后支架内部中层扫描电镜观察 (a) 静态培养组 ($\times 150$), (b) 灌流培养组 ($\times 300$), (c) 灌流培养 + 应变加载组 ($\times 500$)

Fig.6 Observation of middle layer of scaffolds by SEM for MC3T3-E1 cells and scaffolds cultured for ten days (a) Static culture group ($\times 150$), (b) Perfusion culture group ($\times 300$), (c) Perfusion culture and strain loading group ($\times 500$)

3 讨论

采用动态培养取代传统的静态培养方法已经成为组织工程骨在体外培养的一种新趋势。因此,满足各种动态培养需要的专业型生物反应器的研制也逐渐成为骨组织工程研究领域里的热点之一。但目前骨组织工程研究中所应用的一些生物反应器均

存在着一定的缺陷,或者无法很好地满足组织工程研究者的某些特定需要。如机械搅拌式或微载体反应器产生的剪切力较大,搅拌过程中,种植在支架材料上的细胞所受到的流体剪切力大小不均,不易控制^[1]。旋转壁式生物反应器由于几乎没有破坏性的剪切力,细胞表型表达更充分,有利于其本身的三维生长,给高密度培养细胞和培养大体积的组织等

提供了有利条件^[2-3]。但是,低剪切应力也使某些细胞在生长过程中丧失了其应有的应力刺激。气升式生物反应器由于在培养基中产生连续性气泡,在一定程度上影响了传质性能^[4]。灌注式生物反应器能够使支架内部的细胞得到充足的营养物质转运及适当的流体切应力刺激,并有利于种子细胞在支架材料中分布均匀和增殖,促进其向成骨细胞表型分化和骨基质的形成^[5-8],因而有利于大段组织工程骨的体外构建与培养^[9]。但是单纯的灌注式生物反应器无法对培养物施加压缩载荷等应力的刺激,使组织工程骨在培养过程中无法得到类似体内的力学激励机制。

动态载荷与循环灌注生物反应器是为了更好地模拟体内骨的生理与力学微环境而进行专门设计的一类新型仿生学生物反应器。他通过蠕动泵的输送方式使培养液直接从支架内部的空隙中缓慢通过,不仅使传质效率得到提高,而且可以适量施加流体切应力。而在三维灌注的同时进行微应变加载,使骨组织培养物获得类似于在体内的力学激励机制,或者根据研究需要施予不同应变量的力学载荷,以研究在各种压应变载荷条件下的细胞生物学行为。该加载装置的核心部件——智能型封装压电陶瓷,既是微位移的致动器,同时也是微位移的测量工具,具有操作简单、精确度高(纳米级)、数据跟踪记录及时准确的特点。而传统的动态应变细胞培养装置往往采用步进电动机作为动力系统来施加载荷,不仅需要另行开发软件来控制运行,而且精确度也仅达到 $0.01\text{ mm}^{[10]}$,不利于对小块培养物施加精确的微应变,难以满足目前在三维条件下进行细胞力学生物学的研究需要。本生物反应器通过设计灌注与加载专用的培养舱,与多通道蠕动泵连接,实现了多个培养单位灌注与加载的同时实施。因而从设计和测试效果来看,该生物反应器在传质效率与压应变调控的精确度以及实验效率方面都将得到较大的提高。

在组织工程骨的初步培养试验中,CCK-8和ALP活性检测提示,灌注培养+应变加载组的MC3T3-E1细胞在增殖效应和成骨活性方面均明显优于静态培养组或单纯灌注培养组,而单纯灌注培养组也优于静态培养组。组织厚切片电镜扫描观察结果揭示,培养物在该反应器中予以循环灌注和动

态压应变刺激后,虽然有利于成骨细胞深入支架内部的附着生长,局部有细胞密度增高现象,但与静态培养一样,并没有达到细胞均匀分布的目的;考虑主要是与支架的孔隙率与连通性,孔径的大小、形状以及缺乏细胞接种专用装置有关,这些因素直接导致了细胞在初始接种时刻无法均匀地负载于支架各部。因此,选用孔径和形态更均一,连通性能及力学传递性能更优良的细胞培养支架是力学环境下构建组织工程骨中的重要环节。

然而,与其他的灌注培养装置或动态压应变加载装置一样,该生物反应器所反映出的只是培养物或多孔培养支架上表观的灌注条件和表观微应变,而多孔支架材料内部的应力分布无法直接通过设备的数据显示出来,而且不同类型的支架材料或组织培养物之间的内部压应力和流动切应力分布尚可能存在一定的差异。为了充分了解细胞在支架内部的力学感应环境和探讨三维条件下细胞力学的响应机理,本课题组将继续筛选更优良的骨支架材料或采用活体骨组织培养,通过有限元分析和数值模拟的方法计算特定细胞-支架材料复合物中流体切应力与压应力的分布情况,并利用该生物反应器来进行更多的对比实验,进一步深入研究三维条件下各种应力刺激对成骨细胞的生物行为的影响。

4 结语

本实验设计的三维循环灌注与动态载荷生物反应器系统,能对组织培养物提供灌注培养条件和施加精确的动态微应变,可望用于三维条件下研究骨细胞对力学刺激的响应机理和在动态培养条件下构建具有应用价值的组织工程骨。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Liu TQ, Li XQ, Sun XY, *et al.* Analysis on forces and movement of cultivated particles in a rotating wall vessel bioreactor [J]. *Biochem Eng J*, 2004, 18(2): 97-104.
- [3] 倪明, 谢慧琪, 陈俊伟, 等. 利用旋转式生物反应器快速扩增骨髓间充质干细胞[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(1): 28-33.

- Ni M, Xie HQ, Chen JW, *et al.* Rapid expansion of bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) using rotary bioreactor [J]. *J Med Biomech*,2009,24(1): 28-33.
- [4] 汤亭亭. 生物反应器在组织工程研究中的应用[J]. *医用生物力学*,2009,24(1):6-7.
- Tang TT. Application of bioreactors in tissue engineering [J]. *J Med Biomech*,2009,24(1): 6-7.
- [5] 董世武,应大君,段小军,等. 一种骨种子细胞体外应力培养系统的建立[J]. *医用生物力学*,2004,19(4): 193-197.
- Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, *et al.* Establish a fluid flow shear stress model for culturing bone engineering seeded cells in vitro [J]. *J Med Biomech*, 2004, 19(4): 193-197.
- [6] 孙晓江,戴赳戎,汤亭亭. 流体剪切应力对骨细胞分子活动的影响[J]. *医用生物力学*,2007,22(1): 109-114.
- Sun XJ,Dai KR, Tang TT. Flow shear stress induced molecular events of bone cells [J]. *J Med Biomech*,2007,22(1): 109-114.
- [7] Datta N,Pham QP,Sharma U,*et al.* In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2006,103(8): 2488-2493.
- [8] Comes ME,Sikavitsas VI,Behravesh E,*et al.* Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res A*,2003,67(1): 87-95.
- [9] 李德强,杨爱玲,汤亭亭,等. 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[J]. *医用生物力学*, 2009,24(1): 8-14.
- Li DQ, Yang AL, 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.
- [10] 张玉龙,秦廷武,杨志明. 一种改进型动态应变三维细胞培养装置的研制[J]. *生物医学工程研究*,2008,27(4): 248-250.

~~~~~  
(上接第 435 页)

- [19] Zahran M, El-Mowafy O, Tam L, *et al.* Fracture strength and fatigue resistance of all-ceramic molar crowns manufactured with CAD/CAM technology [J]. *J Prosthodont*, 2008, 17(5): 370-377.
- [20] 程绮婷,赵克,张新平. 牙科陶瓷力学性能与可靠性的研究方法[J]. *中华口腔医学研究杂志*,2009,3(3): 63-65.
- [21] Chen J, Zhang LP, Mu YZ, *et al.* Clinical survey of IPS-empress full crowns [J]. *J Clin Stomatology Conferences*, 2004, 20: 421-422.
- [22] Kim JW, Kim JH,Thompson VP, *et al.* Sliding contact fatigue damage in layered ceramic structures [J]. *J Dent Res*, 2007, 86(11): 1046-1050.
- [23] Qasim T, Ford C, Bush MB, *et al.* Effect of off-axis concentrated loading on failure of curved brittle layer structures [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006, 76(2): 334-339.
- [24] Burke FJ. Four year performance of dentine-bonded all-ceramic crowns [J]. *Br Dent J*, 2007, 202(5): 269-273.
- [25] Estafan D, Dussetschleger F, Agosta C, *et al.* Scanning electron microscope evaluation of CEREC II and CEREC III inlays [J]. *Gen Dent*, 2003, 51(5): 450-454.
- [26] Bremer BD, Geurtsen W. Molar fracture resistance after adhesive restoration with ceramic inlays or resin-based composites [J]. *Am J Dent*, 2001, 14(4): 216-220.