加培养液的情况下静置一段时间。长时间处于无培养液环境又造成支架中细胞的大量死亡。这不仅造成种子细胞的极大浪费，而且种子细胞难于达到组织化所要求的细胞密度。如何提高接种效率，改善细胞在支架中分布状况以促进工程化组织成熟是尚未很好解决的技术难题。

周强等[6]利用胶原这一脊椎动物和人体最主要的结构蛋白在特定条件下可交联形成凝胶的特性，首先将细胞与胶原凝胶液均匀复合，然后在凝胶凝固之前将细胞-凝胶复合物接种到适宜的支架上，最终获得细胞-胶原凝胶-支架复合物。这种以凝胶为接种媒介，分两阶段接种的方法，称为双相接种法。他们采用双相接种法构建组织工程软骨不仅获得了近 100% 的种子细胞粘附率，同时构建的组织工程化软骨在维持软骨细胞的表型及组织结构等方面均取得良好效果。本研究应用双相接种技术构建组织工程骨，获得平均 99.75% 的细胞粘附率，明显高于静置接种法。

Li 等[7]的研究证实高密度和均匀接种的组织块中有更多的种子细胞处于 S 期，表明高密度有利于接种后细胞的持续增殖。本实验中双相接种法构建的组织块从第 5 天开始 ALP 活性明显高于静置接种法。直到第 14 天时，静置法构建的组织块的 ALP 活性才达到双相接种法第 5 天的水平。ALP 活性增高可能是多方面因素共同作用的结果：一方面双相接种的组织块中有更多的种子细胞；另一方面可能是双相接种的工程化组织中种子细胞以更快的速度增殖；第三，接种于胶原凝胶中的 MSCs 能更充分地表达其成骨表型。Mizuno 等[8]研究发现：I 型胶原能诱导 MSCs 向成骨细胞分化，这种作用是胶原分子中 DGEA 序列与 MSCs 膜上 $\alpha_2\beta_1$ 受体结合而介导信号传递的结果。

双相接种法构建的工程化组织中的种子细胞从一开始便处于三维立体的环境之中，细胞与细胞之间有胶原基质相互间隔，这种立体的生长环境是细胞赖以维持其表型的基础。而静置接种法构建组织的初期，细胞在支架中或处于二维平面上，或相互直接地紧密接触，堆积在一起，随着胶原基质的不断分泌、积累，支架的孔隙逐渐缩小，细胞才逐渐进入立体的环境之中。本实验观察到双相接种的细胞在 4 h 已开始出现突起，8 h 已在胶原凝胶中均匀分布并向四周形成大量突起，而静置接种法 8 h 细胞仍堆积在一起，难以伸展。由此推测静置法高密度接种可能存在细胞间抑制，伸展缓慢和贴附能力下降可能是这种抑制的表现。

无论从细胞数量，还是 ALP 活性，双相接种法构建的工程化组织均比静置接种法提前达到较为理想的状态，有利于工程化组织的体外熟化。综上所述，双相接种法不仅可在高密度情况下获得高的接种效率，而且胶原凝胶提供的生存环境有利于种子细胞的增殖和表型的表达，是一种值得推荐的组织工程骨构建方法。

参考文献：

[1] Saini S, Wick T M. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(2): 510-521.

[2] Vunjak Novakovic G, Freed L E. Culture of organized cell communities [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 33(1-2): 15-30.

[3] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, *et al*. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use[J]. Exp Hematol, 2004, 32(12): 1212-1225.

[4] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版西安公司，2004. 161-162.

[5] 柴　岗，张　艳，王　敏，等. 人骨髓基质细胞诱导成骨细胞和脱钙骨粘附率的研究[J]. 实用美容整形外科杂志，2003，14(2)：66-69.

[6] 周　强，李起鸿，戴　刚，等. 关节软骨细胞三维支架双相接种体外生成软骨组织的观察[J]. 中华骨科杂志，2002，22(6)：372-376.

[7] Li Y, Ma T, Kniss D A, *et al*. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices [J]. Biotechnol Prog, 2001, 17(5): 935-944.

[8] Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen[J]. J Biochem (Tokyo), 2001, 129(1): 133-138.

（编辑　王　红）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg)，但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部