

血管内皮生长因子/纳米晶胶原基骨缓释系统与人骨髓间充质干细胞的体外生物相容性*

徐晓峰¹, 刘小平², 王明伟², 刘进炼³, 陈静家², 李 阳², 张志坚²

In vitro biocompatibility between vascular endothelial growth factor/nanohydroxyapatite collagen slow-release system and human bone marrow mesenchymal stem cells

Xu Xiao-feng¹, Liu Xiao-ping², Wang Ming-wei², Liu Jin-lian³, Chen Jing-jia², Li Yang², Zhang Zhi-jian²

Abstract

BACKGROUND: Using carrier or slow-release system to load growth factor can protect the biological activity of the growth factor and slow down its release, which enhances the cell growth and tissue repairing, regeneration constantly. This is one direction to the exploratory development of controlled release carrier.

OBJECTIVE: To observe the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF)/nano-hydroxyapatite collagen (nHAC) slow-release system and the *in vitro* biocompatibility with human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs).

METHODS: MSCs obtained from human bone marrow were induced, proliferated *in vitro* and seeded onto the nHAC scaffolds loaded with VEGF, heparin and fibronectin (experimental group) or single nHAC scaffolds (control group). The quantity and the duration of VEGF release from the scaffolds which loaded with VEGF were determined; the attachment rate of cells on the scaffolds, number of cells in the scaffolds, and alkaline phosphatase (ALP) activity at different time points (3, 7, 10, 14 days) were observed. The cell growth on scaffolds was also observed.

RESULTS AND CONCLUSION: ①The release of VEGF on the scaffolds of experimental group could last for 14 days. ②The differentiation of MSCs into osteoblastic phenotype was demonstrated by the positive staining of alkaline phosphatase (ALP) and collagen type I. ③The adhesive rates, cell numbers and the expression of the ALP at the same time point in the scaffolds of experimental group were significantly greater compared with control group ($P < 0.05$). ④Cells could be observed on every scaffold by scanning electron microscopy, and the cells in experimental group grew better than the control group.

Xu XF, Liu XP, Wang MW, Liu JL, Chen JJ, Li Y, Zhang ZJ. *In vitro* biocompatibility between vascular endothelial growth factor/nanohydroxyapatite collagen slow-release system and human bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(25): 4636-4640. [http://www.crter.cn http://en.zgclck.com]

摘要

背景: 利用载体或缓释系统负载生长因子,既能保护生长因子的生物活性,又可以使生长因子缓慢释放,从而持续促进细胞生长及组织修复再生,是目前控制释放载体材料应用研究的方向之一。

目的: 观察血管内皮生长因子/纳米晶胶原基骨缓释系统的体外缓释效果及与种子细胞的生物相容性。

方法: 人骨髓间充质干细胞经体外诱导培养、扩增后种植于血管内皮生长因子+肝素/纤维连接蛋白+纳米晶胶原基骨支架(实验组)和单纯的纳米晶胶原基骨支架(对照组)行体外培养。测定缓释支架材料上血管内皮生长因子的释放量和持续时间;种植细胞后细胞的黏附率;培养 3, 7, 10, 14 d 时支架材料中细胞数、碱性磷酸酶活性以及细胞在材料上的生长状况。

结果与结论: ①该缓释支架具有一定的血管内皮生长因子缓释效果,持续时间可达 14 d。②第 3 代人骨髓间充质干细胞经成骨诱导培养,可表达成骨细胞表型:碱性磷酸酶细胞化学染色、I 型胶原免疫荧光染色均为阳性。③体外实验显示该缓释支架与人骨髓间充质干细胞具有优良生物相容性:相同时间点实验组的细胞黏附率、支架上细胞数量及细胞碱性磷酸酶活性均明显高于对照组;扫描电镜发现两组材料上均有细胞生长,但实验组的细胞生长状况明显好于对照组。

关键词: 血管内皮生长因子; 肝素; 纤维连接蛋白; 纳米晶胶原基骨; 人骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.25.019

徐晓峰, 刘小平, 王明伟, 刘进炼, 陈静家, 李阳, 张志坚. 血管内皮生长因子/纳米晶胶原基骨缓释系统与人骨髓间充质干细胞的体外生物相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(25):4636-4640.

[http://www.crter.org http://cn.zgclck.com]

0 引言

利用组织工程技术构建组织工程骨治疗骨缺损是具有临床应用前景的治疗方法,其中支架材料是构建组织工程骨的关键要素之一,理想的支架材料应具有生长因子的缓释效果,以利于种子细胞的增殖及分化。寻找一种有利

于种子细胞发挥最优生物功能、具备生长因子控释效果的缓释支架材料,是骨组织工程研究的热点。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有特异性促进血管内皮生长和血管生成的诱导因子^[1],可以明显促进成骨细胞的增殖,在骨损伤修复中具有重要作用。纳米晶胶原基骨(nanoHydroxyapatite/collagen, nHAC)可以作为

¹Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China; ²School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; ³Department of Orthopedics, Suzhou Kowloon Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical School, Suzhou 215021, Jiangsu Province, China

Xu Xiao-feng, Chief physician, Associate professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
aabbxp@163.com

Supported by: the Social Development Program of Zhenjiang, No. SH2002019*

Received: 2010-03-02
Accepted: 2010-04-01

¹ 江苏大学附属医院骨科, 江苏省镇江市 212001;
² 江苏大学临床医学院, 江苏省镇江市 212013;
³ 上海交通大学医学院苏州九龙医院骨科, 江苏省苏州市 215021

徐晓峰, 男, 1962年生, 江苏省南通市人, 汉族, 1983年南通医学院毕业, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事骨组织工程方面的研究。
aabbxp@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)25-04636-05

收稿日期: 2010-03-02
修回日期: 2010-04-01
(20100302004/M·A)

支架材料应用于组织工程^[2]。

本实验利用生物学方法,将VEGF负载于nHAC上,制备VEGF缓释支架,探讨其对成骨诱导的人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells,hBMSCs)增殖、分化的影响,旨在通过体外实验为骨组织工程寻找较理想的缓释支架材料,为骨缺损的治疗提供实验基础。

1 材料和方法

设计: 完全随机分组设计,对比观察实验。

时间及地点: 于2009-06/2010-02在江苏大学基础医学实验室完成。

材料:

主要材料、试剂及仪器	来源
纳米晶胶原基骨	清华大学材料学实验室
大鼠 VEGF	美国 Peprotech 公司
纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、 肝素(heparin, HP)、地塞米松、 维生素 C、 β -甘油磷酸钠	美国 Sigma 公司
大鼠 VEGF ELISA 试剂盒	美国 R&D 公司
Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG、 hoechst33342	美国 Sigma 公司
小鼠抗大鼠 I 型胶原单克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
碱性磷酸酶检测试、染色试剂盒	南京建成生物工程研究所
光学显微镜	日本 OLYMPUS 公司
FLX800 酶标仪	美国 Gene company Limited
电子显微镜	南京农业大学生科院提供

实验方法:

VEGF+HP/FN+nHAC支架的制备: 将nHAC骨块浸泡于FN溶液中(0.25 g/L),振荡混匀器搅拌15 min, 4℃处理48 h;取出后置于肝素(12 500 U:1)溶液中,振荡混匀器搅拌15 min, 4℃处理48 h;再取出后浸泡于VEGF溶液中(0.1 g/L),振荡混匀器搅拌15 min, 4℃处理2 h。

VEGF+HP/FN+nHAC支架浸泡液取样: 取制备好的上述复合支架样本4个,分别置于无菌试管中,加1%BSA-PBS(pH 7.2)缓冲液500 μ L浸泡,每过24 h后吸出全部浸泡液移至无菌试管,再向样本试管内添加等量1%BSA-PBS(pH 7.2)缓冲液,取出的浸泡液置于-70℃冰箱保存,待行ELISA检测。

hBMSCs的分离、培养及成骨诱导: 骨髓标本取自4名健康青年男性自愿者(23, 26, 29, 30岁),均无全身性疾病和代谢性疾病,取得知情同意后,无菌条件下于髂后上棘处抽取骨髓共6 mL,置于抗凝环境。密度梯度离心法分离有核细胞层,得均一性较好的hBMSCs,将其反复吹打混匀后置于含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养基内在37℃、体积分数为5%CO₂的孵箱

中培养、扩增、传代,取第3代hBMSCs置于含体积分数为10%胎牛血清、10 nmol/L地塞米松、50 mg/L维生素C、10 mmol/L β -甘油磷酸钠的L-DMEM 培养基中行成骨细胞诱导培养14 d。

构建组织工程骨: 将VEGF+HP/FN+nHAC(实验组)和nHAC(对照组)样本置于24孔培养板内,0.25%胰酶消化成骨诱导的hBMSCs,制成 3×10^9 L⁻¹的细胞悬液,吸取100 μ L,分别滴加到已置入24孔板的材料表面,在37℃,体积分数为5%CO₂,饱和湿度静置3 h后翻转材料,向每组材料的另一面滴加100 μ L细胞悬液,37℃,体积分数为5%CO₂,饱和湿度静置培养3 h后,加上述成骨诱导培养液浸没材料,置于孵箱中培养,2 d或3 d换液1次,在不同时相点分别取材进行各项指标的观测。

VEGF体外释放量及持续时间检测: VEGF体外释放实验可采取双抗夹心法ELISA测定。取每日所取样本浸泡液100 μ L,等量稀释后按大鼠VEGF ELISA试剂盒说明进行检测,用酶标仪于280 nm处测出液体中VEGF吸光度,以吸光度间接反应VEGF浓度,绘制出VEGF释放曲线。

hBMSCs成骨诱导的鉴定: hBMSCs诱导培养后,倒置显微镜下观察其形态变化,并行碱性磷酸酶细胞化学染色、I型胶原免疫荧光染色。

材料的细胞黏附率测定: 接种细胞后6 h,分别取每组材料4个样本,0.25%胰蛋白酶消化,PBS洗涤4次,使黏附在材料上的细胞脱落,细胞计数板进行计数,根据公式:细胞黏附率=(黏附细胞数/接种细胞数) $\times$ 100%,计算细胞黏附率。

支架上细胞计数: 第3, 7, 10, 14天时,每组材料各取样本4块,PBS洗涤4遍,0.25%胰酶消化细胞,反复吹打支架后加入等量含体积分数为10%胎牛血清的培养基终止消化,取出支架,培养液离心,制悬,计数。

碱性磷酸酶活性检测: 上述计数后的细胞悬液,在冰浴中用超声细胞破碎机处理5次,6 s/次,共30 s,然后1 000 r/min离心5 min,取上清液,按碱性磷酸酶试剂盒介绍的方法,计算出碱性磷酸酶比活性。

扫描电镜观察: 第7天和14天时,每组分别取出3块细胞支架复合物,40 g/L多聚甲醛-2.5%戊二醛固定,乙醇梯度脱水,临界点干燥,喷金,扫描电镜下观察细胞生长情况。

主要观察指标: 缓释支架材料上VEGF的释放量和持续时间;种植细胞后细胞的黏附率、不同时间点(3, 7, 10, 14 d)支架材料中细胞数、碱性磷酸酶活性以及细胞在材料上的生长状况。

设计、实施、评估者: 由第一、二作者进行实验设计,第二作者参与实验的实施,全部作者参与实验结果的评估。

统计学分析: 由第二作者使用SPSS 13.0软件包采用软件中的两独立样本间的 t 检验,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 缓释支架材料上 VEGF 的释放量和持续时间 VEGF 呈持续递减释放, 在第1周能保持较高浓度, 第8~10 天处于平台期, 后逐渐减少, 持续时间可达14 d, 见图1。

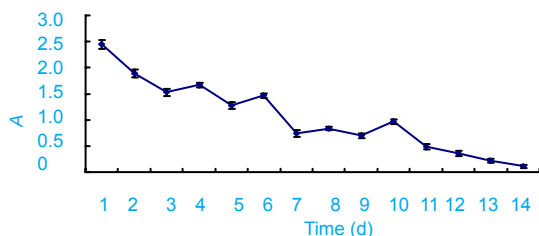


Figure 1 Release of vascular endothelial growth factor in experimental group
图1 缓释支架材料上 VEGF 的释放曲线

2.2 hBMSCs成骨诱导的鉴定 hBMSCs培养14 d左右倒置显微镜下见细胞铺满瓶底, 多为梭形, 形态比较一致, 呈鱼群样排列, 见图2; 经诱导培养14 d后, 大部分细胞体积增大, 突触增多, 呈多边形, 见图3; 碱性磷酸酶细胞化学染色呈阳性, 可见胞质中紫红色颗粒, 见图4; I 型胶原免疫荧光染色阳性, 蓝色荧光为细胞核, 红色荧光表示 I 型胶原在细胞的分布, 见图5。



Figure 2 Morphologic characterization of marrow mesenchymal stem cells cultured for 14 d (inverted microscope, $\times 100$)
图2 hBMSCs 培养 14 d 形态(倒置显微镜, $\times 100$)

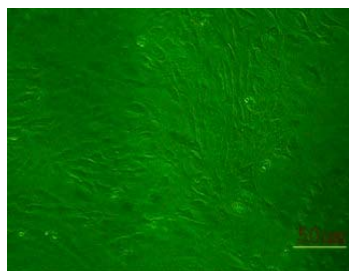


Figure 3 Morphologic characterization of induced marrow mesenchymal stem cells for 14 d (inverted microscope, $\times 100$)
图3 hBMSCs 经诱导培养 14 d 形态(倒置显微镜, $\times 100$)

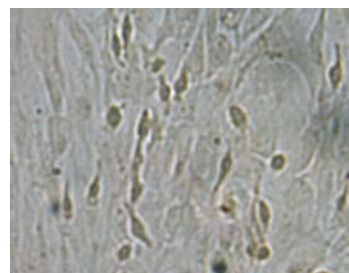


Figure 4 Induced marrow mesenchymal stem cells showing positive expression of alkaline phosphatase ($\times 400$)
图4 碱性磷酸酶细胞化学染色阳性($\times 400$)

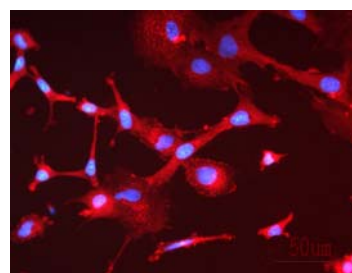


Figure 5 Induced marrow mesenchymal stem cells showing positive expression of collagen type I ($\times 400$)
图5 I 型胶原免疫荧光染色阳性 ($\times 400$)

2.3 材料的细胞黏附率测定 接种6 h后, 实验组的细胞黏附率为 $(52.8 \pm 2.1)\%$, 对照组的细胞黏附率为 $(39.8 \pm 3.8)\%$, 两组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 支架材料上细胞计数 两组材料上细胞数量均随培养时间延长而逐渐增多, 相同时相点实验组材料上的细胞数量与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图6。

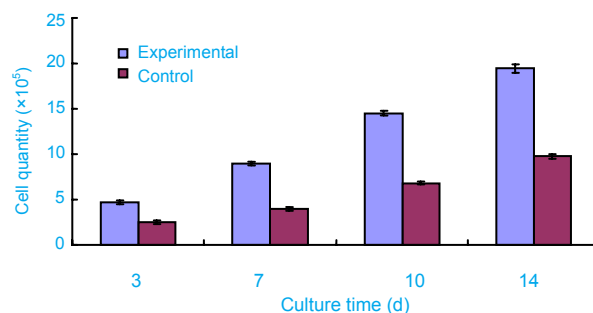


Figure 6 Cell number of mesenchymal stem cells attached to different scaffolds
图6 两组支架材料上细胞计数

2.5 碱性磷酸酶表达量检测 两组碱性磷酸酶活性在第10天时达到最高峰, 相同时相点实验组碱性磷酸酶表达量最高, 与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

表1 两组支架材料不同时间点碱性磷酸酶表达量检测
Table 1 Alkaline phosphatase activity in two groups at different time points (x $\pm$ s, nkat/L)

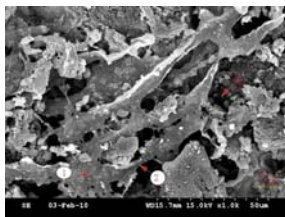
Group	Culture time (d)			
	3	7	10	14
Experimental	2115.4 $\pm$ 41.7	3155.6 $\pm$ 35.0	5421.1 $\pm$ 80.0	742.4 $\pm$ 46.7
Control	868.5 $\pm$ 31.7 ^a	1330.3 $\pm$ 36.7 ^a	2042.1 $\pm$ 40.0 ^a	1850.4 $\pm$ 43.3 ^a

^aP < 0.05, vs. experimental group at the same time point

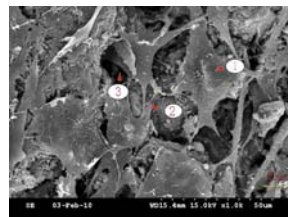
2.6 扫描电镜观察细胞在材料上的生长状况

实验组: 7 d后电镜下可见较多细胞生长, 细胞突起接触融合, 包绕在材料表面, 见图7a; 14 d后见细胞体积增大, 大量细胞形成片状, 包绕和填充于支架空隙, 见图7b。

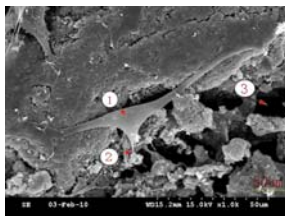
对照组: 7 d后见支架表面黏附的细胞明显较少, 细胞之间少有突起连接, 见图7c; 14 d后见细胞略有增多, 突起间连接略松散, 见图7d。



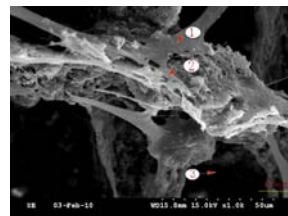
a: Experimental group at 7 d: a large number of cells interconnected and attached to the surface of the scaffold



b: Experimental group at 14 d: the cells on the material grown up, with close interconnecting



c: Control group at 7 d: few cells on the scaffold



d: Control group at 14 d: decreased cells with increased cell process linkage

① cell body; ② cell process linkage; ③ vacant space of scaffold

Figure 7 Cell growth on the scaffolds observed by scanning electron microscopy ($\times 1\,000$)

图7 扫描电镜观察细胞在材料上的生长状况 ($\times 1\,000$)

BMSCs种植于骨形态发生蛋白及血管内皮生长因子/nHAC支架构建组织工程骨成功修复了大鼠股骨缺损。组织工程骨的构建可以分为3个主要步骤: 种子细胞的增殖分化、支架材料的合成 $\rightarrow$ 种子细胞与生长因子/支架材料复合 $\rightarrow$ 组织化工程骨植入体内。其中, 良好的支架材料和生长因子对细胞的黏附, 增殖、分化具有决定性作用。然而外源性生长因子存在稳定性差, 生物半衰期短等不足, 限制了其临床应用。寻找适宜的方法将生长因子负载于支架材料中, 达到缓慢控制释放, 防止生长因子从释放部位迅速扩散, 达到有效刺激细胞的增殖、分化、生长与组织再生同步的目的^[4], 已成为组织工程学的重要研究内容。采用聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)及其共聚物(PLGA)等合成生物材料制备的多孔支架, 由于其制作过程复杂, 大都要用到有机溶剂并需要水溶液后处理, 从保持生长因子活性和载药量考虑, 很难将生长因子直接加入到聚合物原料中共处理。将生长因子包埋于疏水性可降解聚合物的微粒中, 在多孔支架的制备过程中加入到基质材料中, 但这种方法有操作复杂、载药量低、生长因子释放速率不易调控等问题^[5], 而利用生物学方法对已成型的多孔支架进行表面处理后将生长因子负载上去, 不但方法简单, 且可以保持生长因子的活性, 有一定缓释效果, 是目前一种较好的方法。

本实验所用的nHAC其晶体与胶原分子的组装结构与天然骨中矿物和胶原的组装结构相似, 已经作为骨缺损代用人工合成生物支架材料应用于临床^[6]; nHAC具有与天然松质骨类似的三维孔洞网络结构, 孔隙大小约100 μm ^[7], 能与BMSCs复合^[8], 研究表明其复合细胞后具有体内成骨能力^[9]。纤维连接蛋白是细胞外基质的重要成分, 是一种重要的桥接分子, 可通过氢键以及范德华力等与材料表面非特异性结合^[10], 从而促进细胞和材料的黏附还能促进成骨细胞的生长、分化^[11], 纤维连接蛋白分子结构中C端和N端均有肝素的结合位点, C端的肝素结合域由III12、III13、III14三个III型重复序列组成, 含有272个氨基酸(Tyr1720-Tyr1991)^[12], N端的肝素结合域FN-Hep I由五个I型重复序列组成, 含有237个氨基酸(Ser46-Gly282)^[13], 可以和肝素生物性结合。VEGF是一种能够与肝素静电结合的碱性糖蛋白^[14], 与肝素有高度亲和力^[15], 两者结合后生长因子的释放时间显著延长^[16], 根据生长因子的体内贮藏机制, 从仿生学角度出发, 肝素亲和性生长因子的控制释放载体通常可设计成结合有肝素的天然或合成聚合物水凝胶, 包括胶原和明胶、纤维蛋白胶、纤维连接蛋白、透明质酸、海藻酸盐、壳聚糖等, 此法可以提高生长因子的负载量, 增强其活性, 延长释放时间^[17]。

本实验构建VEGF+HP/FN+nHAC缓释支架的方法简单, 可行性强, 不但充分利用了所选用的细胞外基质蛋白的生物学特性, 而且保留了nHAC原有的基本结构。

3 讨论

目前, 临床上修复骨缺损使用的自体骨、异体骨虽然有较好的生物相容性和生物活性, 但因自体骨来源有限, 异体骨有一定排斥反应, 而限制了其广泛应用; 人工骨及骨替代材料来源充足, 但在生物活性及可降解性等方面存在缺陷。将种子细胞植于生长因子/支架材料上构建组织工程骨可较好的解决上述问题, 徐晓峰等^[3]将

在构建支架的过程中,首先FN通过氢键及范德华力等与nHAC表面非特异性结合,后经FN分子结构中C端和N端的肝素结合位点将肝素结合于FN之上,再利用肝素对VEGF的特殊亲和性,将VEGF结合于nHAC表面, FN-肝素-VEGF由分子间共价键和范德华力相互作用后,形成较稳定的复合物,负载于nHAC的网状空隙内,随着FN的水解,分子间共价键和范德华力的减弱,VEGF缓慢持续的释放,实验组经Elisa方法检测,证明了该缓释支架能够延缓VEGF的释放,具有一定的缓释效果。MSCs来源广泛且在体外可大量扩增,可定向诱导为成骨细胞^[18],田志逢等^[19]将其做为种子细胞修复骨缺损取得满意效果,实验中hBMSCs经诱导为成骨细胞后种植于该缓释支架,通过计算细胞黏附率、支架内的细胞数及扫描电镜观察,证实了VEGF+HP/FN+ nHAC缓释支架无细胞毒性,且更有利于细胞的黏附生长和分化,能使成骨诱导的种子细胞表达更强的成骨能力,表现出优良的生物相容性。首先:FN这一桥接分子表面修饰nHAC后,形成的三维网状结构显著提高了细胞的黏附率,使支架上的细胞数量增多、融合更好。再次,由于VEGF可明显增加成骨细胞增殖力^[20],随着VEGF的缓慢、持续释放,VEGF通过成骨细胞的Flt-1受体起作用,持续促进成骨细胞的增殖分化。总之,通过FN表面修饰后再经HP将VEGF复合于nHAC支架上,达到了缓慢释放的目的,构建了带有生长因子缓释效果的复合支架,使该支架能更好的促进成骨定向诱导的BMSCs黏附、增殖及分化,为后期进一步的体内实验奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Kaigler D, Wang Z, Horger K, et al. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res*. 2006;21(5):735-744.
- [2] Liao SS, Cui FZ, Zhang W, et al. Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao. 2003;25(1):36-38.
廖素三,崔福斋,张伟.组织工程中胶原基纳米复合材料的研制[J].中国医学科学院学报,2003,25(1):36-38.
- [3] Xu XF, Xu CZ, Ma P, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(16):3052-3057.
徐晓峰,徐成振,马鹏,等.细胞支架与骨形态发生蛋白及血管内皮生长因子复合修复大鼠股骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(16):3052-3057.
- [4] Bo JG, Yang J, Zhu DW, et al. Kexue Tongbao. 2006;51(5):506-513.
柏金根,杨健,朱敦皖,等.生长因子及其与体内微环境的多重相互作用[J].科学通报,2006,51(5):506-513.
- [5] Tessmar JK, Göpferich AM. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):274-291.
- [6] Huang YH, Shen TC, Xu XF. Jiangsu Daxue Xubao: Yixueban. 2004;14(4):292-294.
黄永辉,沈铁城,徐晓峰.纳米羟基磷灰石/胶原骨在骨折后骨缺损中的应用[J].江苏大学学报:医学版,2004,14(4):292-294.
- [7] Wei G, Jin Q, Giannobile WV, et al. The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials*. 2007;28(12):2087-2096.
- [8] Sun W, Li ZR, Zhang L, et al. Zhongguo Wuzhenxue Zazhi. 2006;16(8):1419-1421.
孙伟,李子荣,张岚,等.纳米晶胶原基骨与骨髓间充质干细胞复合培养对表型影响[J].中国组织工程杂志,2006,16(8):1419-1421.
- [9] Zhu JZ, Miao ZN, Qian HG, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2006;10(41):195-197.
祝建中,苗宗宁,钱寒光,等.纳米晶羟基磷灰石与兔骨髓间充质干细胞复合培养回植体内的成骨性能[J].中国组织工程研究与临床康复,2006,10(41):195-197.
- [10] Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*. 2005;26(23):4805-4816.
- [11] Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, et al. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials*. 2007;28(24):3469-3477.
- [12] Garcia-Pardo A, Rostagno A, Frangione B. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 38 kDa domain containing the C-terminal heparin-binding site (Hep III site) and a region of molecular heterogeneity. *Biochem J*. 1987;241(3):923-928.
- [13] Kishore R, Samuel M, Khan MY, et al. Interaction of the NH2-terminal domain of fibronectin with heparin. Role of the omega-loops of the type I modules. *J Biol Chem*. 1997;272(27):17078-17085.
- [14] Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, et al. Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31508-31515.
- [15] Watanabe M, Shin'oka T, Tohyama S, et al. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng*. 2001;7(4):429-439.
- [16] Jeon O, Ryu SH, Chung JH, et al. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. *J Control Release*. 2005;105(3):249-259.
- [17] Riley CM, Fuegy PW, Firpo MA, et al. Stimulation of in vivo angiogenesis using dual growth factor-loaded crosslinked glycosaminoglycan hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27(35):5935-5943.
- [18] Xu XF, Qian D, Ma P, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(36):7093-7102.
徐晓峰,钱栋,马鹏,等.骨形态发生蛋白2和音猬因子体外诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(36):7093-7102.
- [19] Tian ZF, Qin SJ, Wang RF, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(15):2801-2805.
田志逢,秦书俊,王瑞芳,等.骨髓间充质干细胞复合异种骨基质明胶修复大鼠桡骨缺损[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(15):2801-2805.
- [20] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*. 2002;30(3):472-477.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 镇江市社会发展基金资助项目(SH2002019)。

课题名称: 骨髓间质干细胞体外扩增回植对骨缺损的作用。

致谢: 感谢江苏大学基础医学院贺清华提供相应技术性帮助。

利益冲突: 与其他项目无任何利益冲突。

课题的意义: 实验的创新之处在于利用生物学方法,通过纤维连接蛋白、肝素、血管内皮生长因子分子之间的特殊亲和力和力将血管内皮生长因子负载于纳米晶胶原基骨支架上,既达到血管内皮生长因子从支架上缓慢释放的目的,又保持了其活性,为组织工程提供一种新的复合支架。

课题评估的“金标准”: 观察指标评价中应用 Elisa 检测 VEGF 缓释效果,碱性磷酸酶及 I 型胶原免疫荧光染色检测成骨细胞表达,这些方法为目前公认的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: ①对于纤维连接蛋白、肝素、血管内皮生长因子分子之间结合的饱和和剂量还没有具体的、科学的指标,只处于摸索阶段。具体大规模应用到组织工程中还需要有很长的路要走。②血管内皮生长因子释放过程中的存在形式尚需进一步研究和分析。③实验所有数据和结果都只是在体外平面上,还缺乏体内实验的数据结果,这是今后的发展方向和继续研究的重点。

提供临床借鉴的价值: 该实验为骨组织工程研制一种新型复合支架,为进一步体内试验和将骨组织工程应用于临床修复骨缺损提供基础。