

血管内皮细胞和脂肪干细胞体外联合培养细胞的增殖***☆

王福科¹, 刘流¹, 何晓光¹, 赵德萍², 袁瑞红¹, 代晓明¹, 李逸松¹

Proliferation of vascular endothelial cells and adipose tissue-derived stem cells under *in vitro* coculture

Wang Fu-ke¹, Liu Liu¹, He Xiao-guang¹, Zhao De-ping², Yuan Rui-hong¹, Dai Xiao-ming¹, Li Yi-song¹

Abstract

BACKGROUND: Vascular endothelial cells (VECs) have the ability to enhance adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) to ossify and new blood vessel can provide nutrition for the ossification of stem cells.

OBJECTIVE: To explore the influence of coculture of VECs and ADSCs on cell proliferation *in vitro*.

METHODS: We set simple VECs group, 3: 1, 1: 3, 1: 1 coculture group and simple ADSCs group. Cells were incubated in L-DMEM containing fetal bovine serum at 37 °C in a 5% CO₂ saturated humidity incubator. Morphological changes were observed by inverted microscope. Cell growth curve was drawn using modified MTT assay.

RESULTS AND CONCLUSION: ADSCs and VECs were mixed at 3: 1 and 1: 1 for 14 days. Many synaptic linkages were visible among cells. Partial cells fused into a mass. Cell masses were not observed by other culture methods. With prolonged time, the absorbance of every group was increased gradually and reached a peak in ADSCs, 3: 1, 1: 3 and 1: 1 ratio groups on day 12 and the highest was the 1:1 group, but the time of reaching the peak was on day 10 in the VECs group. The absorbance was gradually reduced under other culture methods. Results have indicated that VECs and ADSCs can stimulate proliferation each other in the system of co-culture *in vitro*; it can reach the best result when the proportion is 1: 1.

Wang FK, Liu L, He XG, Zhao DP, Yuan RH, Dai XM, Li YS. Proliferation of vascular endothelial cells and adipose tissue-derived stem cells under *in vitro* coculture. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32): 6001-6005. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 血管内皮细胞可有力支持脂肪干细胞向成骨方向转变, 还可以加快血管的发生, 为干细胞成骨提供营养支持。

目的: 探讨血管内皮细胞和脂肪干细胞体外联合培养对混合细胞增殖的影响。

方法: 设立单纯血管内皮细胞培养组、脂肪干细胞与血管内皮细胞按 3: 1, 1: 3, 1: 1 混合培养组、单纯脂肪干细胞培养组, 加入含胎牛血清的 L-DMEM, 置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中。倒置显微镜下观察细胞形态变化, 改良 MTT 法绘制细胞生长曲线。

结果与结论: 脂肪干细胞与血管内皮细胞按 3: 1, 1: 1 混合培养 14 d, 细胞之间出现许多突触连接, 部分细胞融合成团块状, 其余培养方式均未见细胞团出现。随培养时间的延长, 各培养方式下细胞吸光度值均逐渐升高, 单纯脂肪干细胞培养、脂肪干细胞与血管内皮细胞按 3: 1, 1: 3, 1: 1 混合培养 12 d 时细胞吸光度值达高峰, 且按 1: 1 混合培养的吸光度值最高; 而单纯血管内皮细胞培养 10 d 吸光度值达高峰; 随后各培养方式下细胞吸光度值逐渐下降。提示血管内皮细胞与脂肪干细胞体外联合培养, 细胞能够相互促进增殖, 1: 1 混合比例条件下细胞增殖能力最强。

关键词: 增殖; 联合培养; 体外; 血管内皮细胞; 脂肪干细胞; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.024

王福科, 刘流, 何晓光, 赵德萍, 袁瑞红, 代晓明, 李逸松. 血管内皮细胞和脂肪干细胞体外联合培养的细胞增殖[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):6001-6005. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

为进一步促进组织工程骨的快速血管化, 在构建组织工程骨时不仅需要植入有成骨潜能的干细胞, 而且同时植入加速血管形成的内皮细胞。近年来研究人员发现内皮细胞可以分泌骨形成蛋白, 促进成骨分化的同时, 刺激成骨细胞及其前体细胞分泌血管内皮生长因子。而血管内皮生长因子在血管发生和形成过程中发挥着重要作用, 可以促进内皮细胞增殖和血管发生, 缺乏则会导致严重的血管畸形和缺失^[1-2]。这些研究证明血管内皮细胞可以有力的支持脂

肪干细胞向成骨方向转变, 还可以加快血管的发生, 为干细胞的成骨提供营养支持。

实验观察大鼠脐血来源血管内皮细胞与脂肪干细胞在体外联合培养时, 对各细胞的形态、生长、细胞分化的影响。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2007-10/2009-12在中国科学院昆明动物研究所(国家级重点实验室)完成。

材料: 妊娠3周龄SD孕鼠2只, 体质量

¹Department of Head and Neck Surgery, ²Experimental Center, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Wang Fu-ke[☆], Doctor, Lecturer, Department of Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
wfk.04@126.com

Correspondence to: Liu Liu, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Department of Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
liuliu3939@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960388*; the Associated Specific Foundation Program of Department of Science and Technology of Yunnan Province, No. 2007C0007R*; the Doctor Innovation Foundation Program of Kunming Medical College, No. KM2007D03*

Received: 2010-02-22
Accepted: 2010-05-20

昆明医学院第一附属医院, ¹ 头颈外科, ² 实验中心, 云南省昆明市 650032

王福科☆, 男, 1975年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2009年昆明医学院毕业, 博士, 讲师, 主要从事骨组织工程方面的研究。wfk.04@126.com

通讯作者: 刘流, 博士, 教授, 博士生导师, 昆明医学院第一附属医院头颈外科, 云南省昆明市 650032 liuliu3939@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)32-06001-05

收稿日期: 2010-02-22
修回日期: 2010-05-20 (20091124011/ZS-Q)

(500±10) g; 18周龄SD大鼠2只, 体质量(200±10) g, 均由昆明医学院动物科提供, 动物生产许可证号: SCXK(滇)2005-0008, 实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[3]。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
低糖 DMEM 培养基、新生牛血清	Gibco 公司
胰蛋白酶、EDTA、SDS、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、维生素 C	Sigma 公司
MTT	美国 amresco 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
超净工作台、恒温 CO ₂ 培养箱	Thermo Scientific
低温自动平衡离心机	北京医用离心机厂
倒置显微镜	Olympus
电热恒温水箱	上海医疗仪器七厂
ELX-800 酶标检测仪	BIO-TEK 公司

实验方法:

脐血单个核细胞的分离与诱导分化培养: 以体积分数为3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔麻醉妊娠SD大鼠, 于体积分数为75%的乙醇中浸泡10 min, 按文献[4-5]的方法分离脐血单个核细胞, 无菌条件下切开皮肤, 打开腹腔, 无菌条件下采集肝素抗凝的大鼠脐血约3 mL, 与PBS按1:1混匀, 按4:1比例与0.5%甲基纤维素混匀, 室温静置30 min沉降红细胞; 吸取上清, 叠加到相对密度为1.803的大鼠淋巴细胞分离液, 1 200 r/min离心20 min; 取界面层, 加入PBS重悬, 离心洗涤; 加入5 mL含血管内皮细胞诱导液的L-DMEM完全培养基(添加体积分数10%的胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素、VEGF 20 μ g/L、IGF-1 2 μ g/L、FGF 2 μ g/L、EGF 20 μ g/L), 吹打均匀后加入底面积为25 cm²培养瓶中, 置37 °C、体积分数5%的CO₂饱和湿度中培养。当原代细胞融合并覆盖瓶底90%以上时, 用2.5 g/L胰蛋白酶与0.1 g/L EDTA消化, 按1:2传代培养, 诱导培养6周^[4], 倒置显微镜下查看细胞形态结构。

脂肪干细胞的分离与培养: 以体积分数为3%戊巴比妥(1 mL/kg)腹腔麻醉SD大鼠2只, 脱颈处死, 按文献[5-6]的方法分离大鼠脂肪干细胞, 加入含体积分数为10%新生牛血清的DMEM培养基, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中培养细胞至第3代。

脐血源血管内皮细胞与脂肪干细胞的培养和鉴定: 分别取两种细胞, 种植于6孔板盖玻片上各2孔, 脐血源血管内皮细胞组1孔进行CD34免疫荧光染色, 1孔为阴性对照组。脂肪干细胞组1孔进行CD90免疫荧光染色, 1孔为阴性对照组。

各组贴壁细胞PBS冲洗2遍, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, 干燥10 min, 3%血清白蛋白孵育标本20 min, 分别加入不同 I 抗室温孵育60 min(阴性对照组不加 I 抗, PBS洗3遍(5 min/次)), 分别滴加适量山羊抗兔或抗小鼠cy3荧光素标记 II 抗, 湿盆中37 °C孵育30 min, PBS洗3遍(5 min/次), DAPI浸染1 min, 50%缓冲甘油封固, 荧光显微镜下观察。

脂肪干细胞与脐血源血管内皮细胞的共同培养: 取诱导6周浓度为 $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的新生牛血清培养脂肪干细胞与脐血来源血管内皮细胞, 按照单纯血管内皮细胞、脂肪干细胞与血管内皮细胞按3:1, 1:3, 1:1混合、单纯脂肪干细胞培养于15块6孔板中, 每种浓度18孔, 每孔加入含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM 1.5 mL, 隔日换液, 置于37 °C、体积分数5%的CO₂饱和湿度培养箱中共同培养。分别于7, 14 d倒置显微镜下观察联合细胞的形态变化。

细胞生长曲线绘制: 取诱导6周浓度为 $2.5 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的新生牛血清培养脂肪干细胞与脐血来源血管内皮细胞, 按照单纯血管内皮细胞、脂肪干细胞与血管内皮细胞按3:1, 1:3, 1:1混合、单纯脂肪干细胞培养于15块6孔板中, 每种浓度6孔, 每孔加入含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM 100 μ L, 置于37 °C、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱中共同培养。分别于1~15 d取出一块96板, 加MTT(0.5%)20 μ L, 4 h后加三联液(每100 mL含SDS 10 g、异丁醇5 mL、0.012 5 mol盐酸)80 μ L, 再等12 h后用酶标检测仪在490 nm波长下测定各孔吸光度(A)。描绘出各浓度细胞的生长曲线, 比较各组细胞生长曲线差异。

设计、实施、评估者: 实验设计、干预实施均为第一作者, 结果评估为第二、三作者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.5软件分析统计结果确定联合细胞最佳比例, 以随机区组的两因素方差分析和完全随机设计的单因素方差分析进行统计学处理, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察 诱导培养6周, 脐血单个核细胞呈漩涡状生长, 大部分细胞由长梭形变短, 部分变为多角形, 见图 1。新生牛血清分离培养的原代脂肪干细胞呈细长梭形, 细胞较

细小, 见图2。第3代脂肪干细胞形态单一, 呈梭形, 细胞排列成螺旋状, 没有细胞重叠现象, 见图3。

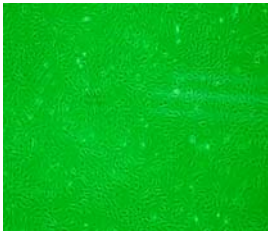


Figure 1 Vascular endothelial cells from cord blood induced for 6 wk ($\times 40$)
图1 诱导6周的脐血来源血管内皮细胞($\times 40$)



Figure 2 Primarily cultured adipose tissue-derived stem cells cultured by new-born calf serum ($\times 40$)
图2 新生牛血清培养的原代脂肪干细胞($\times 40$)

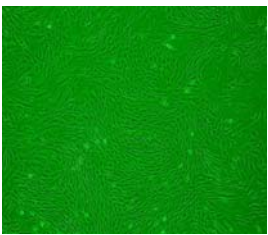


Figure 3 Growth condition of the third passage of adipose tissue-derived stem cells ($\times 40$)
图3 第3代脂肪干细胞生长情况($\times 40$)

2.2 脐血源血管内皮细胞与脂肪干细胞的鉴定结果
脐血源血管内皮细胞免疫荧光检测可见细胞呈多角形, CD34为阳性, 见图4; 细胞核被DAPI染为蓝色, 细胞质内存在大量红色颗粒。脂肪干细胞CD90为阳性, 见图5; 细胞呈长梭形, 细胞质内存在大量红色颗粒。阴性对照组未发现阳性细胞, 见图6。

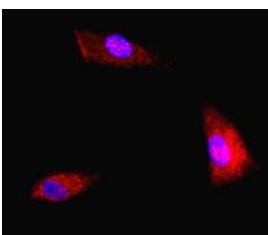


Figure 4 CD34 immunofluorescent staining of polyhedral cells ($\times 630$)
图4 多角细胞 CD34 荧光染色($\times 630$)

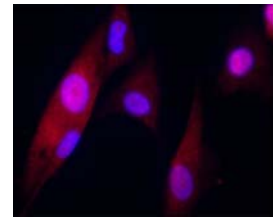


Figure 5 Immunofluorescent staining on CD90 of the fusiform cells ($\times 630$)
图5 梭形细胞 CD90 免疫荧光染色($\times 630$)

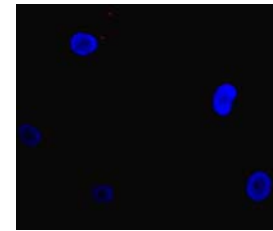
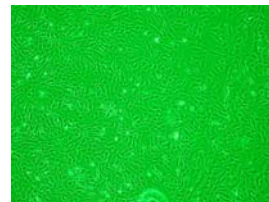
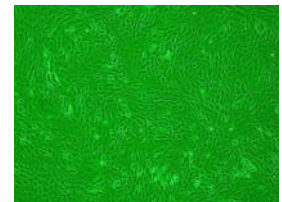


Figure 6 Immunofluorescent staining of the control group ($\times 630$)
图6 对照组荧光染色($\times 630$)

2.3 脐血源血管内皮细胞与脂肪干细胞的共同培养结果
单纯脂肪干细胞培养, 可见细胞保持原有的梭形, 细胞数量逐渐增多, 细胞形态挤压变小, 未出现细胞融合团块状和突触连接, 见图7。



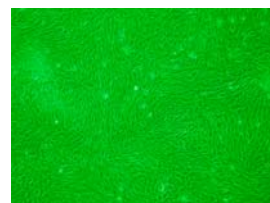
a: On d 7



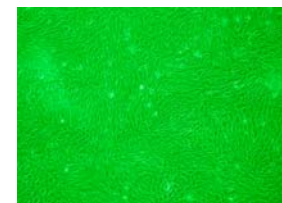
b: On d 14

Figure 7 Immunofluorescent staining of the control group ($\times 630$)
图7 对照组荧光染色($\times 630$)

单纯血管内皮细胞培养, 7 d时细胞保持原有的梭形, 见图8a; 14 d时细胞失去梭形, 形体变大呈多角形, 细胞长出细小突触并相互连接, 未见细胞融合团块, 见图8b。



a: On d 7 ($\times 100$)

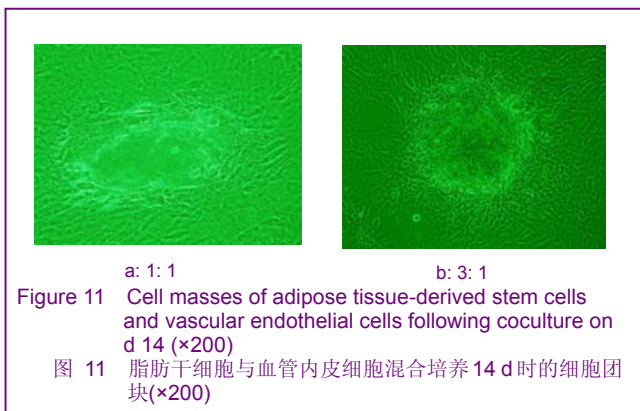
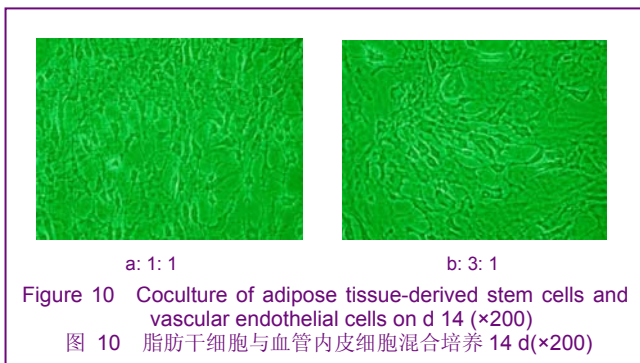
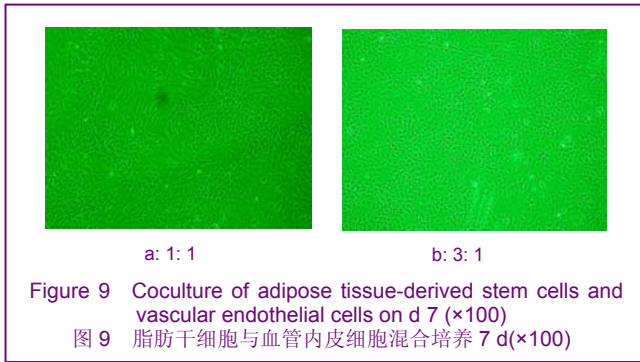


b: On d 14 ($\times 200$)

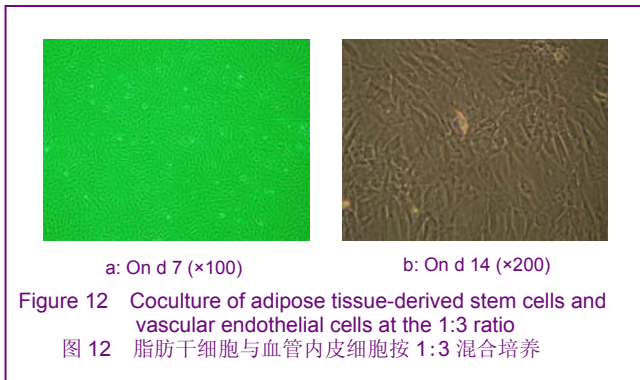
Figure 8 Culture of vascular endothelial cells alone
图8 单纯血管内皮细胞培养

脂肪干细胞与血管内皮细胞按1:1和3:1混合培养, 7 d

时部分细胞保持原有的梭形, 部分细胞形态呈多角形, 巢样分布, 见图9; 14 d细胞之间出现许多突触相互连接, 部分细胞融合成团块状, 见图10, 11。

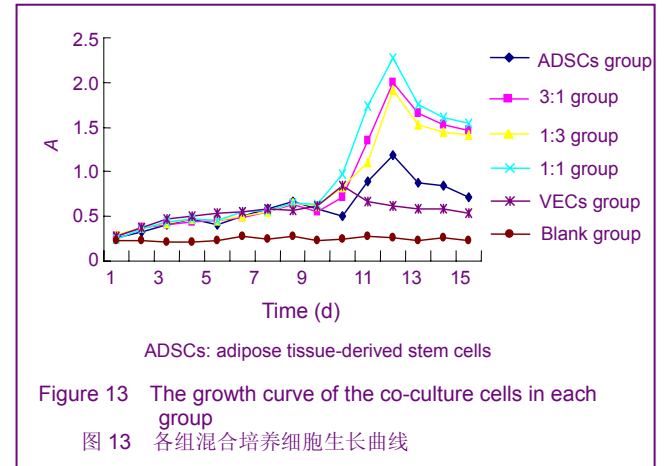


脂肪干细胞与血管内皮细胞按1:3混合培养, 细胞保持原有的梭形, 细胞数量逐渐增多, 细胞形态挤压变小, 未出现细胞融合团块状和突触连接, 见图12。



2.4 细胞生长曲线 单纯脂肪干细胞培养、脂肪干细

胞与血管内皮细胞按3:1, 1:3, 1:1混合培养12 d 时各组细胞吸光度值达高峰, 且脂肪干细胞与血管内皮细胞按1:1混合培养的吸光度值最高; 单纯血管内皮细胞培养第10天吸光度值达到高峰; 随后各组细胞吸光度值逐渐下降, 见图13。



各组吸光度值见表1, 校正方差分析模型检验 $F=66.767, P < 0.01$; 组间分析 $F=88.385, P < 0.01$; 各时间段分析 $F=59.046, P < 0.01$; 各组最大值时单因素方差分析 $F=188.860, P < 0.01$; 两两比较结果见表2。

表 1 各组培养细胞吸光度值的测定结果
Table 1 Absorbance measurement results of cocultured cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6, A$)

Time (d)	ADSCs	Coculture of ADSCs and VECs			VECs
		3:1	1:3	1:1	
1	0.26±0.00	0.28±0.01	0.29±0.02	0.25±0.02	0.27±0.02
2	0.32±0.03	0.37±0.02	0.37±0.01	0.36±0.01	0.38±0.01
3	0.41±0.00	0.41±0.22	0.44±0.33	0.44±0.02	0.47±0.02
4	0.47±0.02	0.44±0.01	0.47±0.03	0.47±0.00	0.50±0.02
5	0.40±0.04	0.45±0.02	0.45±0.04	0.46±0.01	0.53±0.03
6	0.51±0.03	0.49±0.00	0.51±0.01	0.55±0.01	0.56±0.06
7	0.58±0.01	0.55±0.01	0.56±0.01	0.57±0.01	0.59±0.02
8	0.66±0.08	0.63±0.06	0.65±0.01	0.65±0.01	0.57±0.01
9	0.58±0.10	0.55±0.01	0.62±0.03	0.63±0.03	0.62±0.03
10	0.51±0.09	0.71±0.09	0.83±0.07	0.98±0.14	0.85±0.01
11	0.90±0.26	1.35±0.21	1.11±0.30	1.74±0.29	0.67±0.05
12	1.19±0.13	2.00±0.05	1.92±0.04	2.27±0.22	0.62±0.03
13	0.88±0.11	1.66±0.11	1.52±0.13	1.76±0.07	0.58±0.01
14	0.85±0.09	1.51±0.05	1.44±0.12	1.60±0.09	0.58±0.01
15	0.71±0.03	1.46±0.03	1.42±0.02	1.54±0.10	0.54±0.03

ADSCs: adipose tissue-derived stem cells; VECs: vascular endothelial cells

表 2 各组培养细胞最大吸光度值的两两比较结果
Table 2 Results of the paired comparison of the co-cultured cells at maximal absorbance

Time (d)	ADSCs	Coculture of ADSCs and VECs			VECs
		3:1	1:3	1:1	
ADSCs	-	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.1$
Coculture of ADSCs and VECs					
3:1	$P < 0.01$	-	$P > 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$
1:3	$P < 0.01$	$P > 0.05$	-	$P < 0.01$	$P < 0.01$
1:1	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	-	$P < 0.01$
VECs	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	-

ADSCs: adipose tissue-derived stem cells; VECs: vascular endothelial cells

3 讨论

确保种子细胞在支架材料上稳定黏附、增殖、分化对于骨组织工程非常重要。有研究表明, 血管内皮细胞联合细胞培养不仅可提高组织的血管化速度, 而且能促进成骨细胞和骨髓间充质干细胞分化、增殖。成骨细胞可分泌血管内皮生长因子促进内皮细胞生长、分化, 内皮细胞通过分泌骨形成蛋白影响成骨细胞的增殖、分化, 成骨细胞和内皮细胞通过这些细胞因子进行相互间功能的调节, 促进成骨和血管形成, 其中内皮生长因子是其中的关键因素^[7-10]。Philippe等^[11]也认为这种观点, 此外还认为血管内皮生长因子促进内皮细胞表达的主要因子是骨形成蛋白2, 两种细胞分泌的生长因子之间形成一个正反馈调节, 因此两种细胞可互相促进而非相互抑制。而且成骨细胞分泌的I型胶原对血管内皮细胞有趋化作用^[12], 从而加快血管化进程, 促进骨折愈合。有学者采用了内皮细胞和骨髓间充质干细胞共同培养的方法, 实验表明联合培养的内皮细胞可促进了骨髓间充质干细胞在聚乙酸内酯支架的黏附和增殖^[13]。这些研究在此实验中得到了验证, 在血管内皮细胞和脂肪来源的联合培养体系中, 混合细胞的增殖速度明显高于单种细胞, 而且1:1浓度的混合细胞增殖最快; 细胞间出现了大量的突触连接, 部分混合细胞失去了接触抑制的特点形成细胞团块, 这都与细胞之间的相互促进有关。

Villars等^[12]还证实联合培养内皮细胞和成骨细胞能增加成骨细胞碱性磷酸酶活性, 单纯血管内皮生长因子并不能刺激成骨细胞的碱性磷酸酶活性, 这说明促进成骨细胞的功能不仅需要因子间的相互作用, 还需细胞膜蛋白成分的参与。在这种共培养系统中基因分析可见, 79条基因上调, 62条基因下调, 血小板衍生生长因子受体 α 基因发生下调, 表明基因因素在共同培养中起一定作用^[14]。虽然两种细胞联合培养体系研究取得了一定的成果, 但其中两种细胞的相互影响的确切分子机制还不十分明了, 而且在机体内各种组织能保持相应的特异形态和功能, 是多种细胞相互影响的结果, 在将来的骨组织工程研究中有可能使用的联合培养细胞不仅仅是这两种细胞, 还有可能是多种细胞的联合培养才能取得最好的增殖和分化效果。

4 参考文献

- [1] Suri C, McClain J, Thurston G, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998;282(5388):468-471.
- [2] Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*. 2001; 294(5542):564-567.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

- [4] Wang FK, Liu L, Zhao DP, et al. Kunming Yixueyuan Xuebao. 2008; 29(5): 21-25, 32. 王福科, 刘流, 赵德萍, 等. 大鼠脐血来源血管内皮细胞的制备和鉴定[J]. 昆明医学院学报, 2008, 29(5): 21-25, 32.
- [5] Pei XT. Beijing: Kexue Chubanshe. 2006: 83-100. 裴雪涛. 干细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 83-100.
- [6] Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*. 2005; 140(1): 138-143.
- [7] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*. 2002; 143(4): 1545-1553.
- [8] Murota SI, Onodera M, Morita I. Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 902: 208-212.
- [9] Palmieri D, Camardella L, Ulivi V, et al. Trimer carboxyl propeptide of collagen I produced by mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000; 275(42): 32658-32663.
- [10] Velazquez OC, Snyder R, Liu ZJ, et al. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J*. 2002; 16(10): 1316-1318.
- [11] Philippe P, Frank P, Simone MP, et al. Influences of visualization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 111(6): 1932-1941.
- [12] Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF. *J Cell Biochem*. 2000; 79(4): 672-685.
- [13] Choong CS, Huttmacher DW, Triffitt JT. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006; 12(9): 2521-2531.
- [14] Finkenzeller G, Arabatzis G, Geyer M, et al. Gene expression profiling reveals platelet-derived growth factor receptor alpha as a target of cell contact-dependent gene regulation in an endothelial cell-osteoblast co-culture model. *Tissue Eng*. 2006; 12(10): 2889-2903.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金(30960388), 课题名称“hVECs 联合培养体系中 Bmi-1, Runx2 基因变化与 hBMSCs 的增殖和成骨分化研究”; 云南科技厅联合专项基金资助项目(2007C0007R), 课题名称“脐血内皮细胞与骨髓间充质干细胞联合培养移植修复颌骨缺损”; 昆明医学院博士创新基金项目(KM2007D03), 课题名称“异源间充质干细胞对新型仿生骨衍生材料移植的免疫调节作用研究”。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 文章首次在体外和体内观察脐血源血管内皮细胞和脂肪干细胞联合培养情况下, 共同培养细胞之间的相互作用和黏附、增殖特点。

课题评估的“金标准”: 实验在倒置显微镜下及荧光显微镜下, 观察鉴定脐血源血管内皮细胞与脂肪干细胞的形态变化, 采用改良 MTT 法绘制细胞生长曲线。

课题的偏倚与不足: 研究未设计两种细胞相互影响的基因和分子机制, 在 2009 年申请的国家自然科学基金中已经进行相关分析。

提供临床借鉴的价值: 目前课题组研究成果包括: ①血管内皮细胞和脂肪干细胞体外培养下细胞相互促进增殖, 血管内皮细胞能在体外诱导脂肪干细胞向成骨细胞方向分化, 1:1 比例细胞联合培养可以达到最好效果。②组织工程骨植入种子细胞在体内能大量增殖, 参与新组织和新生血管的形成。在目前异体间充质干细胞应用于人体的安全性未研究清楚以前, 制备简单、来源广泛、增殖和分化能力强的自体血管内皮细胞和脂肪干细胞作为组织工程种子细胞联合移植具有一定优势。