

深低温冻储同种异体气管移植并骨髓间充质干细胞移植后气管上皮细胞血管内皮生长因子的表达[☆]

韩云¹, 纪子钊¹, 蓝妮², 庞超见², 佟晓杰², 石文君¹

Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation combined with cryopreservation on trachea allograft epithelium vascular endothelial growth factor levels

Han Yun¹, Ji Zi-zhao¹, Lan Ni², Pang Chao-jian², Tong Xiao-jie², Shi Wen-jun¹

Abstract

BACKGROUND: Cryopreserved tissues can maintain their vitality and integrity, and reduce the antigenicity.

OBJECTIVE: Using intravenous transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with cryopreserved allograft, to investigate the role of BMSCs on enhancing the implant survival and revascularization by measuring vascular endothelial growth factor (VEGF) levels.

METHODS: After transplanted with cryopreserved 2 weeks and 6 weeks allocraft, PKH-26 labeled 3-5 passage BMSCs were injected into the recipient rats *via* the tail vein. Rats in the control groups were injected with the same amount of phosphate buffer solution (PBS). We observed the histology of the transplanted trachea and measured the VEGF protein levels in the epithelium to evaluate the role of BMSCs transplantation on the epithelium revascularization.

RESULTS AND CONCLUSION: Rats from BMSCs injection group survived a long period. Histological observation showed that the tracheal lumen was covered by pseudo-striated ciliated columnar epithelium. VEGF protein levels in the BMSCs injection group were higher than PBS group. BMSCs may exert their reparation function *via* enhancing epithelium VEGF expression and revascularization.

Han Y, Ji ZZ, Lan N, Pang CJ, Tong XJ, Shi WJ. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation combined with cryopreservation on trachea allograft epithelium vascular endothelial growth factor levels. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(18): 3293-3297. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 深低温冷冻后的组织可以保持其原有的活力和组织完整性,并能消减抗原性。

目的: 静脉移植骨髓间充质干细胞合并深低温处理供体气管后进行同种异体气管移植,观察骨髓间充质干细胞在促进上皮再生和再血管化后的作用。

方法: 用深低温冻储2周和6周的气管进行Wistar大鼠同种异体气管移植后,用PKH-26标记的3~5代骨髓间充质干细胞经鼠尾静脉移植入受体体内,等量的磷酸盐缓冲液注射作为实验对照。观察供体气管的组织学和血管内皮生长因子蛋白表达。

结果和结论: 骨髓间充质干细胞移植合并深低温冻储后的移植气管结构完整,软骨无变性坏死;深低温6周的移植气管上皮再生情况优于2周。骨髓间充质干细胞移植组的上皮细胞表达血管内皮生长因子水平高于磷酸盐缓冲液对照组。结果显示,骨髓间充质干细胞移植合并深低温冻储6周后移植气管存活期好于深低温冻储2周;骨髓间充质干细胞能够促进移植周围新生血管的增加,从而促进气管损伤的修复。

关键词: 气管移植;骨髓间充质干细胞;同种异体;深低温冻储;血管内皮生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.18.016

韩云, 纪子钊, 蓝妮, 庞超见, 佟晓杰, 石文君. 深低温冻储同种异体气管移植并骨髓间充质干细胞移植后气管上皮血管内皮生长因子的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(18):3293-3297.

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

0 引言

上皮再生和再血管化是气管移植亟待解决的难题。由于支配气管的血管纤细,气管移植难以像其他器官移植那样可以用吻合血管的方法为长段气管提供血供。气管移植引起排斥反应,导致移植黏膜下微循环栓塞,从而影响上皮再生;还会导致移植气管狭窄、软骨环软化,影响移植气管的存活。因此降低移植植物自身的抗原性,减低移植手术后免疫排斥反应的

程度是促进上皮再生的一个解决办法。深低温冷冻后的组织可以保持其原有的活力和组织完整性,并能消减抗原性。其中,深低温冻储6周的气管移植效果要优于深低温冻储2周者。但是,深低温处理6周仍不能完全清除异体气管的免疫原性。气管上皮在复温后仍然存在,但形态上表现为退化样变,如纤毛缺失,由复层变为单层上皮,可能是引起免疫排斥反应的原因。

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)只表达少量MHC-I类抗原,因而自身免疫原性弱,具备在

¹Department of Thoracic Surgery, China Medical University Affiliated Shengjing Hospital, Shenyang 110004, Liaoning Province, China; ²Department of Anatomy, College of Basic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Han Yun[☆], M.D., Ph.D., Attending surgeon, Department of Thoracic Surgery, China Medical University Affiliated Shengjing Hospital, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
ryan.hanyun@gmail.com

Supported by: Science and Technology Research Program of Liaoning Educational Committee, No. L2010606*

Received: 2010-10-26
Accepted: 2010-12-03

¹ 中国医科大学附属盛京医院胸外科,辽宁省沈阳市110004; ² 中国医科大学基础医学院解剖教研室,辽宁省沈阳市110001

第一作者及通讯作者: 韩云[☆], 男, 1971年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2010年中国医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事气管移植的组织工程学研究。
ryan.hanyun@gmail.com

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)18-03293-05

收稿日期: 2010-10-26
修回日期: 2010-12-03
(20101026012W-W)

受体内长期存活的前提条件。此外BMSCs有很强的免疫调节功能^[1-5], 并可向损伤组织迁移和具有修复作用^[6-8]。目前国内外有许多关于BMSCs应用于移植领域方面的研究, 多数实验得出的结论是BMSCs减轻了排斥反应^[4, 9], 但未见应用于气管移植的报道。实验用静脉移植BMSCs合并深低温处理供体气管进行同种异体气管移植, 通过检测移植气管上皮血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平探讨BMSCs在促进上皮再生和再血管化的作用。

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2009-03/2010-02在中国医科大学基础医学院解剖学系实验室完成。

材料: 清洁级远交系雌性Wistar大鼠72只, 体质量280~300 g, 分别作为大鼠同种异体气管移植的供体和受体; 另取四五周龄Wistar大鼠, 体质量60~80 g, BMSCs培养原代取材使用。实验动物由中国医科大学实验动物部提供。抗VEGF抗体为美国SantaCruze公司产品; VEGF蛋白免疫组织化学试剂盒及一抗均购自武汉博士德公司。

实验方法:

实验动物和分组: 作为气管移植供体的大鼠24只, 每只大鼠可提供2个6~8个气管环的供体气管。作为气管移植受体大鼠48只, 随机分为4组, 给予同种异体深低温冻储2周和6周的气管移植后, 通过鼠尾静脉注射BMSCs分别为BMSC 2周组和 BMSC 6周组, 注射PBS分别为PBS 2周组和PBS 6周组作对照。各组分别拟于移植后的第1, 4和8周各处死4只。

PKH-26体外标记BMSCs: BMSCs的分离纯化、培养与传代方法参考文献^[10]。用荧光染料PKH-26对收集后的3~5代BMSCs进行标记。该染料可稳定的与细胞膜脂质区结合并发出红色荧光, 并能在体内稳定存留6个月, 主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖研究及体内外细胞示踪研究。收集PKH-26标记后的BMSCs以备注射移植用。

异体气管移植步骤: 按3.5 mL/kg腹腔注射体积分数10%水合氯醛将受体大鼠麻醉后, 取仰卧位, 颈部纵行切口, 钝性分离颈前肌群到气管前筋膜。游离颈部气管。结扎气管供应动脉。取甲状软骨下方四五个气管环处为切除气管上级。向下切除6个气管环。先切断头侧, 后切断尾侧。将此气管段取出(6个气管环)。将冻储的供体气管复温后用生理盐水冲洗修剪成8个气管环后将其置入气管缺损处, 软骨对软骨, 膜部对膜部。先吻合尾侧, 分别在0, 3, 6, 9点处用强生公司抗菌5-0可吸收缝线缝合4针, 先缝后壁, 后缝前壁。注意吸净气管内残留的血块。吻合后注意实验鼠的呼吸频率及有无喘鸣音。

呼吸节律60~70次/min。缝合肌层, 将胸腺组织覆盖于气管前方。缝合皮下组织、皮肤。肌肉注射长效青霉素 40×10^4 U。术后仰卧位放入饲养笼中, 保温处理。

鼠尾静脉注射: 鼠尾部消毒。取尾部中后1/3交界处, BMSCs组用1 mL注射器注入0.5 mL左右无菌BMSC悬液(约 5×10^6 个细胞), 对照组同法注入等量PBS。注入时应无阻力, 如阻力大则可能注入到皮下组织。

VEGF蛋白免疫组织化学测定: 气管常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 用切片机连续切片, 片厚5 μ m, 70 $^{\circ}$ C烤片过夜。具体步骤如下: 切片常规脱蜡至水, 蒸馏水洗3 min, 3次; 体积分数3% H_2O_2 处理10 min阻断内源性过氧化物酶, 0.01 mol/LPBS振动漂洗5 min, 3次; 然后入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉加热至沸腾后断电, 间隔5~10 min, 反复一两次, 冷却后PBS洗2次; 滴加5%BSA封闭液, 室温20 min, 甩去多余液体; 滴加1:100兔抗VEGF 4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜, PBS洗2 min, 3次; 生物素化羊抗兔IgG (1:200) 室温孵育20 min, PBS洗2 min, 3次; 滴加SABC, 室温孵育20 min, PBS洗5 min, 4次; DAB显色液显色5~15 min, PBS终止反应。苏木精轻度复染, 自来水返蓝15 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 以中性树胶封固。阴性对照用正常羊血清代替一抗, 其余的步骤与上述相同, 结果为阴性。VEGF免疫阳性产物为棕黄色, 阳性着色定位于细胞浆内, 以胞浆内出现清晰淡黄色至棕褐色颗粒者判断为染色阳性, 无显色或有少量模糊淡黄色颗粒者为染色阴性。每只动物在靠近吻合口处的移植上皮部位随机选取5个高倍视野, 用MetaMorph/DP10/BX41图像分析系统以半定量积分法对VEGF免疫反应阳性进行评估^[11]。VEGF阳性表达率=着色强度(不着色记0分, 淡黄色1分, 棕黄色2分, 棕褐色3分) \times 阳性细胞比例(<5%记0分, 5%~10%记1分, 11%~50%记2分, 51%~80%记3分, >80%记4分)。其中着色强度以一个高倍视野中多数细胞的呈色反应为准, 阳性细胞比例为盲观测计数一个高倍视野中免疫组织化学染色阳性的上皮细胞的比例。5个高倍视野的平均值代表该实验动物的VEGF阳性表达率。为减少系统误差, 全部VEGF结果的观察和评估有两位作者共同分析完成。

主要观察指标: 动物存活率, 移植物的形态学和移植气管上皮的光学和电子显微镜观察, 荧光检测及免疫组织化学观察。

统计学分析: 结果中的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Statistica 6.0 软件处理。组间数据比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

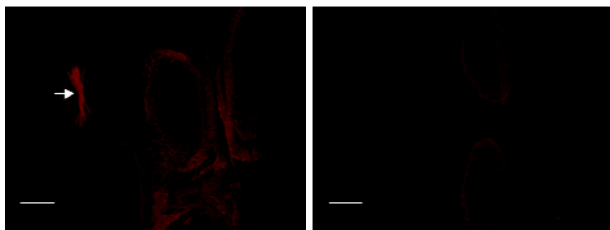
2.1 动物存活率和组织学观察 BMSCs移植合并深低

温冻储后的移植气管结构完整, 病理检查管腔内为假复层纤毛柱状上皮所覆盖, 软骨无变性坏死; 术后均能长期存活。

PBS对照组中, 深低温6周的移植气管(PBS 6周)上皮再生情况优于2周(PBS 2周)。PBS 6周实验大鼠最长存活35 d, PBS 2周实验大鼠最长存活10 d。

BMSCs移植组中, BMSC 6周实验大鼠能存活到8周(12只大鼠分别按实验设计在1, 4, 8周时处死), BMSC2周实验大鼠中有1只能存活到8周(8只大鼠分别按实验设计在1周和4周时处死, 1只在8周按实验设计处死), 其余3只分别于30, 32和42 d时死亡。移植物上皮再生情况无明显差别。

2.2 PKH-26标记BMSCs结果 在气管组织定植后呈现红色荧光。移植后1周即可见受体气管吻合口处组织有红色荧光标记, 移植后4周和8周仍可见受体气管和移植气管处有红色荧光标记, 其中以吻合口处荧光标记较多。各时间段远离吻合口的受体气管基本未见红色荧光标记物, 见图1。表明BMSCs经静脉移植后, 可向损伤的气管组织迁移并定植, 而且可随移植气管的血管化逐渐由受体气管切缘向移植气管迁移, 最后可定植于移植段气管。



a: Anastomotic site, oval tracheal ring can be seen. Arrow points to non-specific binding of suture
b: Recipient trachea that are further away from the anastomotic site, basically no visible red fluorescence

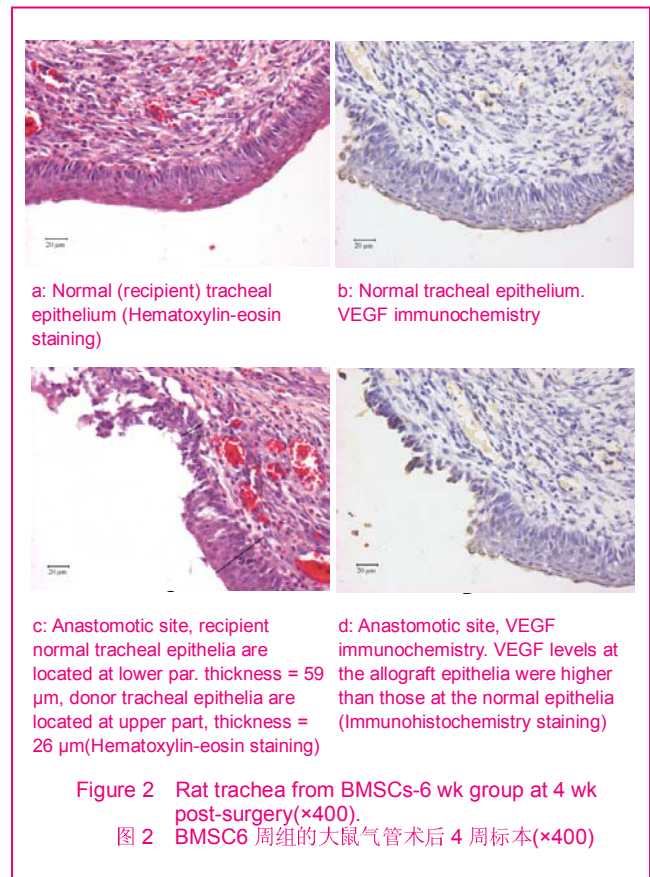
Figure 1 PKH-26 red fluorescence labeling of bone marrow derived mesenchymal stem cells (scale bar = 500 μ m, \times 200)

图1 气管吻合口 PKH-26 标记的骨髓间充质干细胞 (标尺=500 μ m, \times 200)

2.3 大鼠气管上皮免疫组织化学观察 正常气管上皮见图2a, b。免疫组织化学结果发现VEGF蛋白在气管上皮内有阳性表达。在吻合口处, 可见正常气管的复层柱状上皮(见图2c, 标记59 μ m处, 为移行部位的正常气管上皮部分, 取自BMSC6周组的大鼠气管术后4周标本), 而移植气管上皮虽有再生, 但与正常上皮相比较薄(见图2c, 标记26 μ m处, 为移行部位的移植气管上皮部分)。另外, 移植气管上皮的VEGF阳性表达高于正常上皮(见图2d), 提示移植的BMSCs可能作用于受损部位, 促进移植上皮再生和VEGF高表达, 以促进新生血管生成。

BMSCs移植组的上皮再生情况优于注射PBS对照组(见图3a, b)。BMSCs移植组可见复层(较正常气管上

皮薄)上皮, 而对照组上皮缺失或只有单层细胞。另外, VEGF阳性表达在BMSCs移植组(见图3c)明显高于PBS对照组(见图3d)。各组VEGF蛋白阳性表达率见表1。



a: Normal (recipient) tracheal epithelium (Hematoxylin-eosin staining)

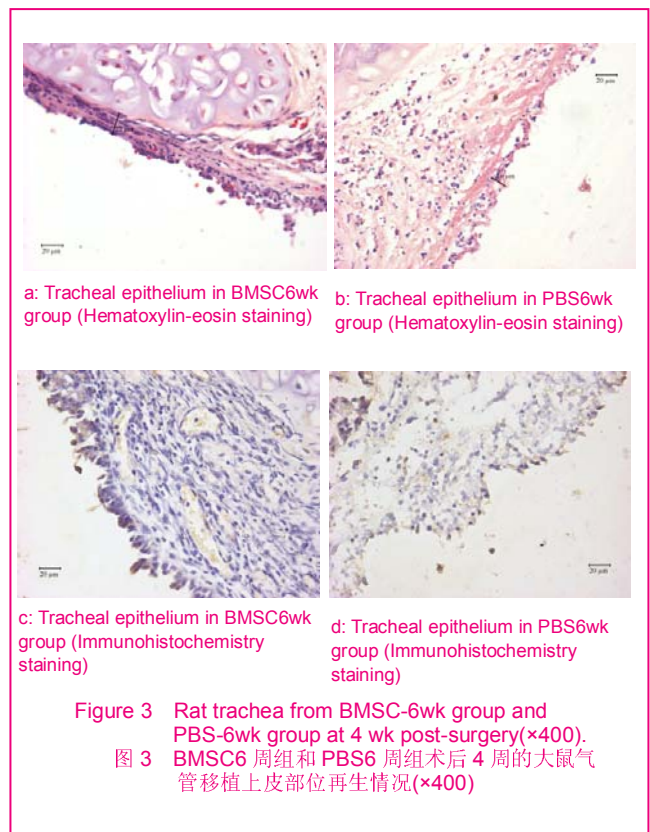
b: Normal tracheal epithelium. VEGF immunohistochemistry

c: Anastomotic site, recipient normal tracheal epithelia are located at lower part, thickness = 59 μ m, donor tracheal epithelia are located at upper part, thickness = 26 μ m (Hematoxylin-eosin staining)

d: Anastomotic site, VEGF immunohistochemistry. VEGF levels at the allograft epithelia were higher than those at the normal epithelia (Immunohistochemistry staining)

Figure 2 Rat trachea from BMSCs-6 wk group at 4 wk post-surgery(\times 400).

图2 BMSC6周组的大鼠气管术后4周标本(\times 400)



a: Tracheal epithelium in BMSC6wk group (Hematoxylin-eosin staining)

b: Tracheal epithelium in PBS6wk group (Hematoxylin-eosin staining)

c: Tracheal epithelium in BMSC6wk group (Immunohistochemistry staining)

d: Tracheal epithelium in PBS6wk group (Immunohistochemistry staining)

Figure 3 Rat trachea from BMSC-6wk group and PBS-6wk group at 4 wk post-surgery(\times 400).

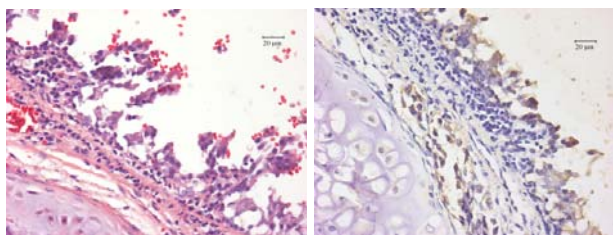
图3 BMSC6周组和PBS6周组术后4周的大鼠气管移植上皮部位再生情况(\times 400)

表 1 各组中 VEGF 蛋白阳性表达率的比较
Table 1 VEGF-ir levels in each experimental group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, %)

Group	1 wk	4 wk	8 wk
PBS 2 wk	1.5±0.3		
PBS 6 wk	3.2±0.3	3.0±0.4	
BMSC 2 wk	10.2±0.7 ^a	10.0±0.8 ^a	8.8 ^b
BMSC 6 wk	11.1±0.8 ^a	11.6±0.6 ^a	10.7±1.2 ^a

^a $P < 0.05$, vs. PBS group; ^b $r=1$ at this time point

BMSCs移植组移植后1, 4和8周的气管标本中, BMSC 2周和BMSC 6周的移植气管VEGF阳性表达无明显差别, 见图4(取自BMSC 2周术后4周标本)。



a: Hematoxylin-eosin staining b: Immunohistochemistry staining

Figure 4 Rat trachea from BMSC2wk group at 4 wk post-surgery($\times 400$).

图4 BMSC 2周组移植后4周的大鼠气管移植上皮部位 VEGF 阳性表达($\times 400$)

3 讨论

深低温冻储既能抑制移植后的免疫排斥反应, 又是供体气管长期保存的有效方法, 是实验研究和临床应用的方向。而同时应用BMSCs移植拟减轻免疫排斥反应和促进新生血管生成, 促进移植气管上皮再生, 是本研究的创新之处。实验研究表明, BMSCs移植合并深低温冻储后的移植气管结构完整, 组织学检查管腔内为假复层纤毛柱状上皮所覆盖, 软骨无变性坏死; 术后均能长期存活。PBS对照组中, 深低温6周的移植气管(PBS6周)上皮再生情况优于2周(PBS2周), PBS6周实验大鼠最长存活35 d, PBS2周实验大鼠最长存活10 d; BMSCs移植组中, BMSC6周实验大鼠能存活到8周(12只大鼠分别按实验设计在1, 4, 8周时处死), BMSC2周实验大鼠中有1只能存活到8周(8只大鼠分别按实验设计在1周和4周时处死, 1只在8周按实验设计处死), 其余3只分别于30, 32和42 d时死亡。移植物上皮再生情况无明显差别。

PKH-26标记的BMSCs在气管组织定植后呈现红色荧光。术后1周即可见受体气管吻合口处组织有红色荧光标记, 术后4周和8周仍可见受体气管和移植气管处

有红色荧光标记, 其中以吻合口处荧光标记较多。各时间段远离吻合口的受体气管基本未见红色荧光标记物。表明BMSCs经静脉移植后, 可向损伤的气管组织迁移并定位, 而且可随移植气管的血管化逐渐由受体气管切缘向移植气管迁移, 最后可定位于移植段气管。

VEGF是一种血管内皮细胞特异性的有丝分裂原, 被认为是作用最强、特异性最高的血管生成调控因子, 它能特异性作用于血管的内皮细胞, 促进增殖和新血管的形成^[12-14], 在血管生成的生理和病理过程中发挥独特作用^[14-15]。Dodge-Khatami等^[16]研究了在预先在自体气管表面应用VEGF是否能促进移植后的组织愈合, 认为VEGF通过加速自体移植气管的再血运, 促进组织愈合。Samadi等^[17]用VEGF121转染的耳软骨进行喉气管重建术, 也发现VEGF转染能够促进移植植物血管生成。也有学者尝试用基因治疗的方法将bFGF基因和VEGF基因转染单侧胸骨乳突肌肉瓣和双侧胸骨舌骨肌肉瓣, 然后用转基因肌肉瓣包裹对兔颈部10个环自体移植气管进行基因治疗, 使移植气管血运建立并长期存活^[18]。

BMSCs来源于中胚层, 是存在于骨髓基质中的一种多能干细胞, 属于成体干细胞, 连续传代培养和冷冻保存后具有多向分化潜能^[19]。在组织工程学中, 人们用BMSCs作为种子细胞, 经培养分化后与不同生物材料复合, 修复骨、软骨、肌腱、韧带等组织缺损^[20-26]。BMSCs免疫原性弱, 不表达MHC-II类抗原或T细胞共刺激分子B7, 只表达少量MHC-I类抗原, 因而具备在受体长期存活的前提条件。BMSCs在体外具有抑制T细胞的活性, 表现出很强的免疫调节功能^[1-5], 因此BMSCs可诱导产生移植免疫耐受, 解决不同基因移植排斥反应及移植植物抗宿主病等移植问题。另外, BMSCs具有多器官归巢性和多向分化潜能, 可向损伤组织迁移并具有修复作用, 经静脉输注体内后替代衰老或损伤的组织细胞^[6-8], 已被尝试应用于心脏及脑的缺血性疾病、糖尿病和神经退行性疾病^[27-30]。有关BMSCs的器官保护和器官修复的作用机制有许多推测, 包括BMSCs可向器官特异性表型的细胞分化, BMSCs与已存在的分化细胞融合, 通过旁分泌或内分泌的形式对存留细胞的保护作用, 以及抑制器官损伤引起的炎症反应等等。另外, 人们发现BMSCs在体内或体外实验中均表现出促血管生成的作用^[31-32]。BMSCs可通过分泌VEGF165和其他生长因子来增强内皮细胞和平滑肌细胞的增殖能力^[33-34]。BMSCs在体内或体外实验中均表现出促血管生成的作用^[31-32]。BMSCs可通过分泌VEGF165和其他生长因子来增强内皮细胞和平滑肌细胞的增殖能力^[33-35]。因此推测BMSCs移植组可能通过诱发VEGF在组织损伤部位的表达来促进移植植物再血运。通过免疫组织化学检测作者发现VEGF蛋白在气管上皮内有阳性表达, 术后1周的气管标本中, BMSCs移植组的VEGF阳性上皮表达高于

PBS对照组。BMSCs移植术后1, 4和8周的气管标本中, BMSC2周和BMSC6周的移植气管VEGF阳性上皮表达无明显差别。移植物内VEGF蛋白的高水平表明BMSCs可能促进移植物周围新生血管的增加, 从而促进气管的损伤恢复^[31]。另外, BMSCs也可能通过抑制免疫排斥反应来促进移植气管的上皮再生和功能恢复。

4 参考文献

- [1] Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*.2005; 2: 8.
- [2] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*.2004; 363: 1439-1441.
- [3] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*.2003; 75: 389-397.
- [4] Lasala GP, Minguell JJ. Bone marrow-derived stem/progenitor cells: their use in clinical studies for the treatment of myocardial infarction. *Heart Lung Circ*. 2009; 18: 171-80.
- [5] Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*.2003; 5: 485-489.
- [6] Mora AL, Rojas M. Aging and lung injury repair: a role for bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*.2008; 105: 641-647.
- [7] Mishra PK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*.2008; 9: 122-128.
- [8] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*.2008; 2: 169-183.
- [9] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 568-584.
- [10] Pang CJ, Tong XJ, Liu GB, et al. *Zhongguo Yike Daxue Xuebao*. 2010;39(4): 262-265.
庞超见, 佟晓杰, 刘贵波, 等. VEGF在小剂量超短波促进种植骨髓间充质干细胞脱细胞支架修复大鼠坐骨神经损伤中的表达[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 39(4): 262-265.
- [11] Xu LZ, Yang WT. *Zhongguo Aizheng Zazhi*. 1996; 6: 229-231.
许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. *中国癌症杂志*, 1996; 6: 229-231.
- [12] Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation*.1995; 92: 11365-11371.
- [13] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*. 2000; 55: 15-35; discussion 35-36.
- [14] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*.1989; 246: 1306-1309.
- [15] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*.1989; 161: 851-858.
- [16] Dodge-Khatami A, Backer CL, Holinger LD, et al. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in an experimental rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg*.2001; 122: 554-561.
- [17] Samadi DS, Jacobs IN, Walsh D, et al. Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of human vascular endothelial growth factor in a rabbit laryngotracheal reconstruction model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*.2002; 111: 295-301.
- [18] Zhang QX, Zhou G, Wang CM, et al. [Experimental research of promoting revascularization of tracheal transplantation by gene therapy]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*.2004; 42: 622-626.
- [19] Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, et al. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*.2009; 5: 36-50.
- [20] Yang Q, Peng J, Guo Q, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*.2008; 29: 2378-2387.
- [21] Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*.2004; 32: 160-165.
- [22] Zhang S, Zhu L. [Progress in the study of articular cartilage tissue engineering seeding cells]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*.2008; 22: 1505-1507.
- [23] Xu S, Xu Y. [Recent progress of BMSCs acting as seeding cell for tissue engineered cartilage]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*.2008; 22: 163-166.
- [24] Wang IN, Lu HH. Role of cell-cell interactions on the regeneration of soft tissue-to-bone interface. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*.2006; 1: 783-786.
- [25] Zhu L, Wu Y, Jiang H, et al. Engineered cartilage with internal porous high-density polyethylene support from bone marrow stromal cells: A preliminary study in nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg*.2009.
- [26] Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*.2003; 5: 32-45.
- [27] Karussis D, Kassis I, Kurkalli BG, et al. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*.2008; 265: 131-135.
- [28] Tang Y, Yasuhara T, Hara K, et al. Transplantation of bone marrow-derived stem cells: a promising therapy for stroke. *Cell Transplant*.2007; 16: 159-169.
- [29] Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol*.2007: 219-242.
- [30] Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc*.2009; 41: 1797-1800.
- [31] Tang YL, Zhao Q, Zhang YC, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*.2004; 117: 3-10.
- [32] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*.2002; 418: 41-49.
- [33] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*.2004; 109: 1543-1549.
- [34] Deng YB, Ye WB, Hu ZZ, et al. Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. *Neurol Res*.2009; 32: 148-156.
- [35] Kim HS, Lee HJ, Yeu IS, et al. The neovascularization effect of bone marrow stromal cells in temporal muscle after encephalomyosynangiosis in chronic cerebral ischemic rats. *J Korean Neurosurg Soc*.2008; 44: 249-255.
- [36] 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.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 本课题受辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2010606)资助。

作者贡献: 实验设计为第一、二、三、五和六作者, 实施为第一、二、三、四作者, 评估为全部作者。作者均受过系统培训。气管上皮的组织学观察和 VEGF 蛋白表达水平检测采用盲法评估。

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。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[36]。

本文创新性:

提供证据: 1989-01/2010-12 经检索 MEDLINE 数据库, 通过“Bone marrow derived mesenchymal stem cells”和“tracheal allograft”和“Vascular Endothelial Growth Factor”进行检索, 没有将骨髓间充质干细胞从体循环输入检测其促进移植气管上皮再生的相关研究。因此本实验具有先进性。

创新性说明: 有关骨髓间充质干细胞在气管移植领域方面的研究, 多见于将其作为种子细胞, 构建组织工程化气管。作者查阅文献后, 认为探讨静脉移植骨髓间充质干细胞在促进上皮再生和再血管化的作用有理论创新。实验结果提示冻储时间需 6 周以上以达到较理想的降低免疫源性的效果。