

联合培养体系中对骨髓间充质干细胞*Bmi-1*表达的影响**☆

杨瑞年, 刘 流, 王福科, 赵德萍

Effects of co-culture system on *Bmi-1* expression in bone marrow mesenchymal stem cells

Yang Rui-nian, Liu Liu, Wang Fu-ke, Zhao De-ping

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

Yang Rui-nian☆, Studying for doctorate, Physician, Department of Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China 13888425351@163.com

Corresponding author: Liu Liu, 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*, 81160239*

Received: 2011-12-27
Accepted: 2012-01-22

Abstract

BACKGROUND: Vascular endothelial cells can promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and provide nutritional support for growth and proliferation of BMSCs.

OBJECTIVE: To investigate the effects of human umbilical vein vascular endothelial cells (hUVECs) in a co-culture system on morphology, growth and differentiation of human BMSCs, and *Bmi-1* gene expression in cells.

METHODS: Based on the co-culture system of cells, a simple culture group (hBMSCs group) and a combined culture group (BMSCs + hUVECs group) were established. On days 4, 6, 8, 10, cell morphology was observed and cells were counted for drawing cell growth curves; in addition, *Bmi-1* gene expression in cells was detected in each group using real-time quantitative fluorescent PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: At each time point, compared with hBMSCs group, cells exhibited multiple morphological changes, some cells connected together in the latter stage, and osteogenic differentiation was more obvious in the BMSCs + hUVECs group. At each time point, cell number and *Bmi-1* expression in the BMSCs + hUVECs group were significantly greater than in the BMSCs group. The BMSCs + hUVECs group showed a better compatibility compared with the hBMSCs group. These findings suggest that hUVECs promote the proliferation of hBMSCs in the co-culture system, and increase *Bmi-1* expression in hBMSCs, thereby affecting aging and proliferative capacity of hBMSCs.

Yang RN, Liu L, Wang FK, Zhao DP. Effects of co-culture system on *Bmi-1* expression in bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2524-2529. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 血管内皮细胞能够促进骨髓间充质干细胞向成骨方向转变, 并为干细胞的生长增殖提供营养支持。

目的: 观察人脐静脉血管内皮细胞在联合培养体系中对人骨髓间充质干细胞的形态、生长、细胞分化及其 *Bmi-1* 基因表达的影响。

方法: 在建立细胞联合培养体系基础上, 设立单纯骨髓间充质干细胞培养组、骨髓间充质干细胞与脐静脉血管内皮细胞联合培养组, 分别于第 4, 6, 8, 10 天在相差显微镜下观察形态变化、细胞计数绘制生长曲线并采用实时荧光定量 PCR 检测单独培养的人骨髓间充质干细胞组及联合培养组中人骨髓间充质干细胞的 *Bmi-1* 基因表达情况。

结果与结论: 在各时间点与单纯骨髓间充质干细胞培养组相比较, 联合培养组中干细胞的形态呈多样化, 后期部分细胞之间出现了连接, 成骨分化明显。联合培养组的细胞数量以及 *Bmi-1* 表达量各时间点均显著高于单纯骨髓间充质干细胞培养组。联合培养相容性良好。提示脐静脉内皮细胞对体外联合培养体系中骨髓间充质干细胞具有促进增殖的作用; 能促进骨髓间充质干细胞 *Bmi-1* 基因的表达, 对细胞衰老和增殖能力有显著影响。

关键词: 血管内皮细胞; 骨髓间充质干细胞; 脐静脉血管内皮细胞; *Bmi-1*; 联合培养

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, 人脐静脉血管内皮细胞; VEGF: vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.011

杨瑞年, 刘流, 王福科, 赵德萍. 联合培养体系中对骨髓间充质干细胞 *Bmi-1* 表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2524-2529. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓内的多能干细胞, 取材方便, 有强大复制和多向分化的能力, 一定条件下可向成骨细胞、软骨细胞等分化。然而目前BMSCs成骨分化的具体机制尚不十分清楚, 也未形成统一有效的诱导方法。近年来研究发现血管内皮细胞与BMSCs联合培养体系中, 血管内皮细胞能促进BMSCs的增殖, 并能够促进BMSCs的成骨分化, 但其中确切机制还不完全清楚, 在联合培养体系中

血管内皮细胞对BMSCs中调控其生长增殖的 *Bmi-1* 基因表达起什么影响作用还待进一步研究。

本实验研究人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)与人BMSCs在体外联合培养时, 对人BMSCs细胞的形态、生长、细胞分化的影响, 并证实人血管内皮细胞对联合培养体系中人BMSCs的 *Bmi-1* 基因表达的调控作用。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于2010-08/2011-06在昆明医学院第一附属医院重点实验室完成。

材料:

试剂及仪器	来源
流式细胞仪	FACS, Becton Dickinson 公司
定量 PCR 仪	PRISM 公司
核酸蛋白浓度检测仪	BioRad 公司
抗 CD34-FITC、抗 CD29-PE 藻红蛋白和抗 CD44-pE	Beetonnickinson 公司
HUVECs (catalog number:8000)	Sciencell 公司
反转录试剂盒, 荧光定量 PCR 试剂盒	Takara 公司
反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621	Fermentas 公司

实验方法:

人BMSCs的分离与培养: 在志愿者签署知情同意后, 选取左髂后上棘为穿刺点抽取骨髓液。常规消毒铺巾, 20 g/L利多卡因局部麻醉, 抽吸骨髓液5 mL, 加入肝素抗凝, 输血器过滤3次, 按照Buttiglieri等^[1]的方法, 将骨髓液肝素抗凝后, 加等量PBS混匀, 沿管壁滴入相对密度为1.803的淋巴细胞分离液上, 2 500 r/min离心15 min。吸出中间骨髓单个核细胞层, 加入PBS重悬, 离心洗涤。弃PBS, 加入内皮细胞培养基(添加体积分数10%的胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素)中混匀, 移至25 cm²塑料细胞培养瓶中, 置于37 ℃、体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱内培养, 隔日换液。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, 选取生长良好的第4代细胞用于进一步鉴定及联合培养。

HUVECs的培养: 选用HUVECs系作为人血管内皮细胞的细胞来源, 低血清培养基(500 mL基础液, 血清, 生长因子和双抗), 置于37 ℃, 体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱培养至第3代, 观察各细胞形态结构, 选取生长良好的第3代细胞用于联合培养。见图1。

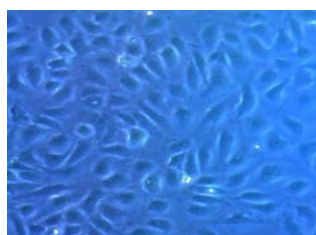
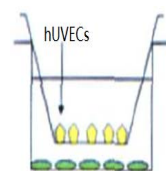


Figure 1 Passage 3 human umbilical vein vascular endothelial cells (x100)
图1 第3代人脐静脉血管内皮细胞(x100)

人BMSCs鉴定: 将待测的细胞用PBS洗涤2次, 随后使用2.5 g/L胰酶+0.02%EDTA液消化细胞, 离心后收集细胞沉淀, PBS液洗涤3次, 取含1×10⁵个细胞的细胞悬液100 μL分别加入荧光标记的CD34、CD29和CD44抗体, 室温条件下反应孵育30 min, PBS洗去未标记的抗体, 用流式细胞仪检测CD34、CD29和CD44表面抗原表达。

联合培养装置的建立: 选用第3代人BMSCs和第3代HUVECs, 23块6孔板均置入插入式培养皿, 建立培养液及细胞因子相互连通的联合培养装置, 见图2, 设立单独hBMSCs组、hUVECs与hBMSCs 1:1联合培养组。每孔加入2 mL含体积分数10%胎牛血清的内皮细胞培养基, 隔日换液, 置于37 ℃、体积分数5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。



MSCs A
a: Joint training group



MSCs B
b: Control group



c: Co-culture system

hBMSCs: Human bone marrow mesenchymal stem cells; hUVECs: human umbilical vein vascular endothelial cells

Figure 2 Schematic diagram of the co-culture system

图2 联合培养体系示意图

细胞大体形态观察以及生长曲线绘制: 分别于4, 6, 8, 10 d倒置显微镜下观察联合培养细胞的形态变化。分别于1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 d各组取1孔用胰酶消化后计数1套联合培养装置中hBMSCs, 描出hBMSCs生长曲线。

昆明医学院第一附属医院头颈外科, 云南省昆明市650032

杨瑞年☆, 男, 1981年生, 云南省昆明市人, 纳西族, 昆明医学院第一附属医院头颈外科在读博士, 医师, 主要从事整形外科及组织工程修复的研究。
13888425351@163.com

通讯作者: 刘流, 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
liuli3939@126.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2012)14-02524-06

收稿日期: 2011-12-27
修回日期: 2012-01-22
(20111227001/W · S)

荧光定量RT-PCR: ①细胞接种于6孔板中, PBS清洗, Trizol抽提RNA, 用反转录试剂盒RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621进行反转录, 按说明书操作, 42 °C反应30 min, 反转录引物采用Oligo dT与Random Hexamer, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。②引物设计: *Bmi-1*, β -actin (内参)基因的引物(上海生工公司合成)和PCR扩增产物长度。

Bmi-1、 β -actin引物序列:

Gene	Primer	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
<i>Bmi-1</i>	Forward 5' ATG CTG CCA	55.8	125
	ATG GCT CTA AT 3'		
	Reverse 5' TTT CCG ATC	53.7	
	CAA TCT GTT CT 3'		
β -actin	Forward 5' GGA TTT GGT	55.0	265
	CGT ATT 3'		
	Reverse 5' TTA GGG TAG	55.0	
	TGG TAG AAG G 3'		

③样本cDNA纯度与浓度检测: 使用核酸蛋白检测仪检测各样本纯度、浓度。④引物及模板验证: 每次操作后, 随机抽取5~8例样本, 采用电泳分析法对看家基因 β -actin、*Bmi-1*的PCR扩增产物检测: 制作约1%琼脂糖凝胶电泳, 0.5 mg/L溴乙锭染色, 取扩增产物10 μ L与6 $\times$ buffer混合, 稳压5 V/cm进行电泳, 约30 min后, 蒸馏水漂洗, 在UVP凝胶成像系统分析系统中扫描、观察电泳结果、拍照。反应体系: 10 $\times$ buffer 1 μ L, dNTP 0.8 μ L, TAP(0.5 U/ μ L) 0.4 μ L, Primer mix 0.1 μ L, cDNA 0.4 μ L, ddH₂O 7.3 μ L。反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 45 s, Repeat2-4, 35 cycles, 72 °C 5 min, 4 °C forever。⑤PCR扩增: PCR仪为ABI 7300 real-time PCR 仪器。反应体系为: 5 $\times$ PCR buffer 5 μ L、0.5 μ L cDNA模板、2.5 μ L dNTPs (2.5 mmol/L)、2.0 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 上下游引物各0.5 μ L (10 μ mol/L), 40 U Taq聚合酶0.2 μ L, 用ddH₂O补足至25 μ L。PCR循环参数为: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 40 s; 40个循环扩增。所有单管样本均复设3孔。根据扩增反应溶解曲线进分析检测扩增反应的特异性。用扩增反应所得Ct值根据公式:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}},$$

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量的差值

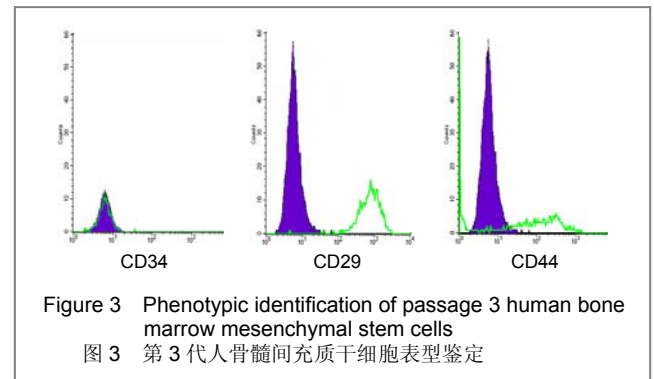
主要观察指标: ①人BMSCs鉴定。②细胞形态观察。③单独hBMSCs组与联合培养组中人BMSCs生长曲线及细胞计数。④荧光定量PCR结果。

统计学分析: 应用SPSS 17.0软件分析, 以重复测量的方差分析及单因素方差分析进行统计学处理, 实验

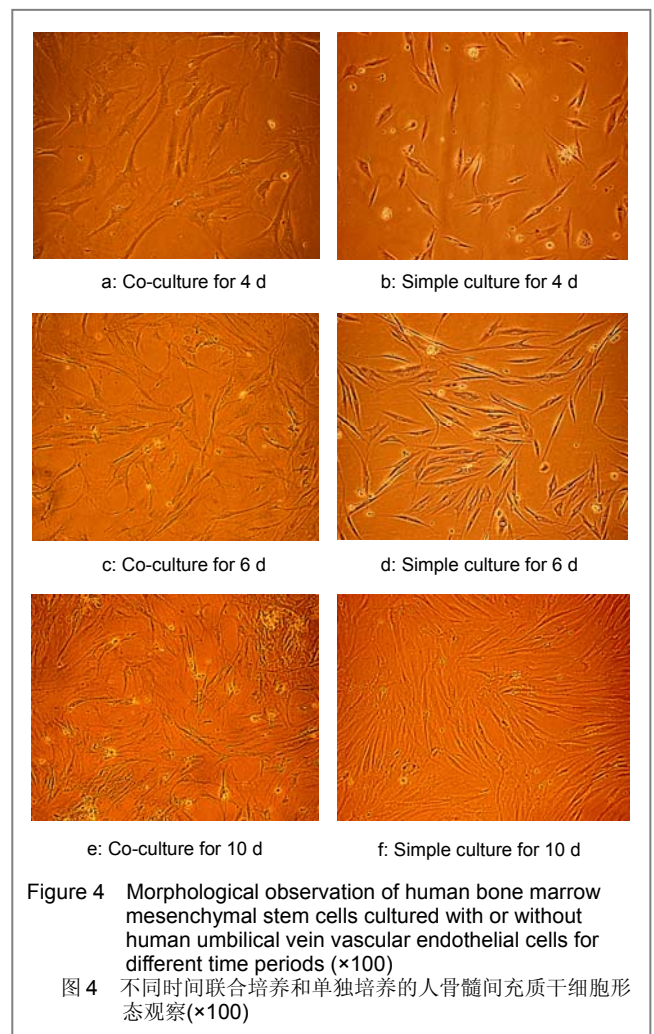
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 人BMSCs细胞鉴定 用流式细胞仪对培养至第3代的人BMSCs进行细胞表型分析, 结果如图3显示: 细胞低表达CD34, CD29、高表达CD44, 符合人BMSCs的特征。



2.2 细胞形态观察 见图4。



第3代人BMSCs与HUVECs联合培养4 d时, 人

BMSCs形态呈多样化, 有梭形和多角形混合生长, 数量较多, 见图4a; 6 d时人BMSCs体积增大, 形态多样化程度加大, 见图4c; 第10天时大部分人BMSCs之间出现了广泛的连接以及细胞团块融合状, 见图4e。第3代人BMSCs单独培养4 d时, 形态单一, 主要呈梭形, 见图4b; 6 d时人BMSCs体积增大, 呈梭形, 见图4d; 第10天时人BMSCs数量增多, 细胞间连接较少, 未见细胞团块融合, 见图4f。

2.3 单独hBMSCs组与联合培养组中人BMSCs生长曲线及细胞计数 见图5。

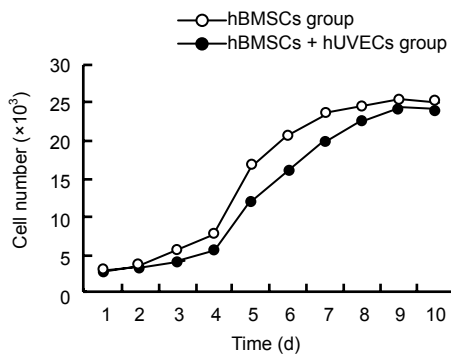


Figure 5 Schematic diagram of cell proliferation in human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) and hBMSCs + human umbilical vein vascular endothelial cells (hUVECs) groups

图5 两组细胞增殖示意图

各组细胞数据分析: BMSCs组和联合培养组在各时间点比较差异有显著性意义($P=0.03 < 0.05$), 见表1。

表1 人骨髓间充质干细胞各时间点计数
Table 1 Number of hBMSCs at each time point
($\bar{x} \pm s$, $n=6$, $\times 10^4$)

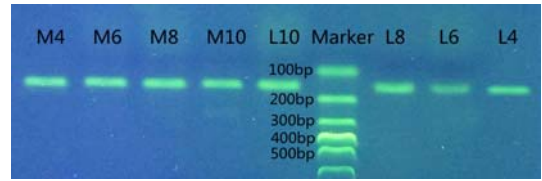
Group	Time (d)				
	1	2	3	4	5
hBMSCs	3.2±0.1	3.5±0.2	4.1±0.1	5.4±0.4	12.2±0.1
hBMSCs+hUVECs	3.0±0.0	3.5±0.2	5.6±0.2	7.8±0.1	16.8±0.2

Group	Time (d)				
	6	7	8	9	10
hBMSCs	16.0±0.4	20.1±0.0	22.8±0.4	24.3±0.3	24.4±0.1
hBMSCs+hUVECs	20.7±0.1	23.6±0.3	24.5±0.5	25.5±0.1	25.0±0.2

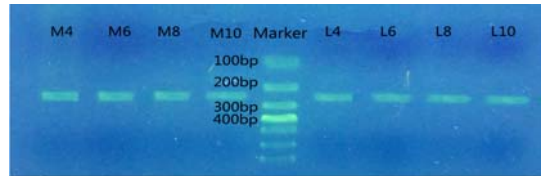
hBMSCs: Human bone marrow mesenchymal stem cells; hUVECs: human umbilical vein vascular endothelial cells

2.4 荧光定量PCR结果

RNA提取及电泳结果: 使用ABI公司提供的核酸蛋白检测仪检测RNA样品的纯度, 样品的 A_{260}/A_{280} 在1.7~2.0, 表明RNA的纯度高, 用RT-PCR扩增两组细胞中*Bmi-1* mRNA、及内参 β -actin mRNA的表达, 结果显示, 两组细胞中各时间点均有*Bmi-1*表达。见图6。



a: *Bmi-1* gene (125 bp), all products ranged between 100–200 bp



b: β -actin (265 bp), all products ranged between 200–300 bp

M4, M6, M8, M10 indicate days 4, 6, 8, 10 in the human bone marrow mesenchymal stem cells group; L4, L6, L8, L10 indicate days 4, 6, 8, 10 in the human bone marrow mesenchymal stem cells + human umbilical vein vascular endothelial cells group

Figure 6 Electrophoresis of amplified gene products

图6 基因扩增产物电泳结果示意图

荧光定量PCR扩增结果: 联合培养组*Bmi-1*检测量随时间延长先增高后降低, 第8天时联合培养组*Bmi-1*最高; 单独人BMSCs组*Bmi-1*在各时间点没有明显变化; 联合培养组与单独人BMSCs组在各时间点差异较明显($F=43.172$, $P < 0.01$), 见图7, 表2。

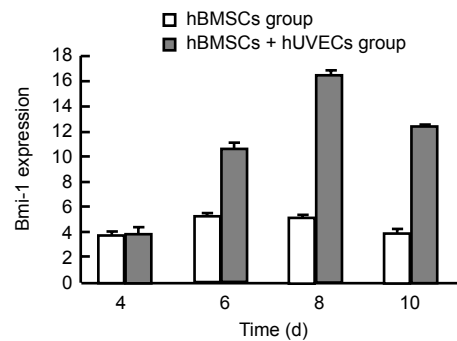


Figure 7 *Bmi-1* expression at each time point in human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) and hBMSCs + human umbilical vein vascular endothelial cells (hUVECs) groups

图7 各组细胞培养各时间点 *Bmi-1* 含量检测示意图

表2 各组细胞培养各时间点 *Bmi-1* 相对定量检测结果
Table 2 Relative expression of *Bmi-1* at each time point in each group
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	Time (d)			
	4	6	8	10
hBMSCs	3.73±0.32	5.39±0.21	5.21±0.13	4.04±0.43
hBMSCs + hUVECs	3.88±0.28	10.72±0.35	16.67±0.24	12.43±0.36

hBMSCs: Human bone marrow mesenchymal stem cells; hUVECs: human umbilical vein vascular endothelial cells

荧光定量PCR扩增曲线及荧光定量PCR *Bmi-1*熔

解曲线, 见图8, 9。

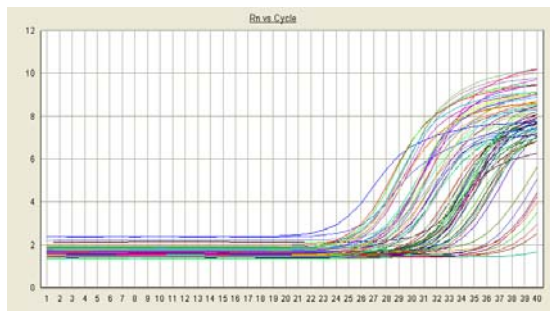


Figure 8 Real-time quantitative PCR amplification curves
图8 荧光定量 PCR 扩增曲线

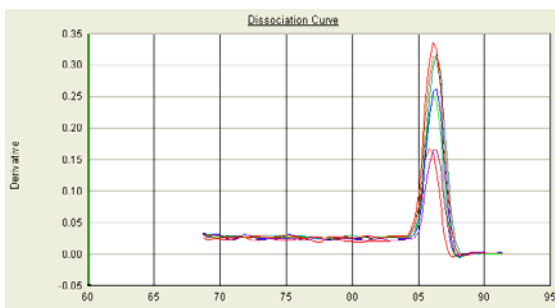


Figure 9 Real-time quantitative PCR dissociation curves of *Bmi-1*
图9 荧光定量 PCR *Bmi-1* 溶解曲线图

3 讨论

3.1 联合细胞培养技术与骨组织工程 近年来, 学者们越来越发现单一种子细胞难以完成构建复杂组织的需要。为此联合培养细胞技术就应运而生。联合细胞培养是一门采用不同类型细胞进行混合培养的技术, 可以采用两种或多种细胞共同培养, 细胞之间存在着精细的相互调控关系。联合细胞培养技术更符合仿生学的原理, 更有利于种子细胞的增殖和分化, 为复杂的细胞诱导分化和体外组织构建提供了的新思路和新方法。其中应用血管内皮细胞联合细胞培养是其中方法之一。

有研究表明成骨细胞可以分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 促进血管内皮细胞生长、分化^[2], 同时由内皮细胞分泌的骨形态发生蛋白也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和蛋白进行相互间的功能调节, 使成骨和血管形成更加合理和快速^[3-4], 在支架植入的情况下加速缺损的修复^[5]。Philippe等^[6]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。同时研究证实加入骨形态发生蛋白2移植物的周围组织中检测到了VEGF含量的上升^[7], VEGF也能促进

BMSCs的增殖^[8], 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。从这些研究可以看出采用成骨细胞和内皮细胞共同培养可以相互促进生长、分化, 有利于组织工程骨快速生长。也有学者采用了内皮细胞和BMSCs在聚乙酸内酯支架上共培养以及三维球体结构中共培养方法^[9-10], 实验表明在两种结构上联合培养的内皮细胞均能显著促进了BMSCs的黏附和增殖, 这为骨组织工程的发展提供了很有希望的解决途径。

本实验采用含有生物半透膜的插入式培养皿与六孔板建立起联合培养体系装置。生物半透膜允许细胞分泌的各种因子以及化学物质通过, 而细胞不能移动通过。这使得在模拟体内细胞之间互相影响效果的同时, 还可以分别对每组细胞进行形态和基因水平的特定研究。将HUVECs和人BMSCs共同培养, 其优势在于两种细胞所分泌的各种因子间的相互作用, 内皮细胞可以产生VEGF, 而VEGF又能参与血管的发生和形成, 这为组织工程骨血管的改建和形成创造了极为有利的条件。因此, 与单独诱导种子细胞成骨相比, 内皮细胞和BMSCs联合培养具有明显的优势。

3.2 *Bmi-1*基因与间充质干细胞的成骨分化 多梳基因家族是果蝇发育时维持同源异形基因稳定表现的重要因子。在胚胎发育、肿瘤发生和干细胞的维持中有着重要的作用。由荷兰癌症中心于1991年在鼠淋巴瘤中发现的*Bmi-1*基因(B cell-specific MLV intergration site-1)是多梳基因家族中重要成员之一, 参与干细胞的增殖、分化与衰老, 在多种肿瘤形成过程中起重要作用。

人类*Bmi-1*基因克隆和定位在10号染色体短臂13区, 含10个外显子, 编码含326个氨基酸的蛋白质, 相对分子质量为36 900。其蛋白表达在细胞质、染色质或染色体。*Bmi-1*基因含有一个环指模序, 位于N-末端的环指结构域, 与抑癌基因*c-Myc*协同在细胞增殖和肿瘤形成中发挥作用。*Bmi-1*通过环指结构与其他环指蛋白, 如*dinG*等形成异源二聚体, 再与其他成分相互结合, 抑制其靶基因的转录。*Bmi-1*基因还含有一个位于中心的保守DNA结合模序螺旋-转角-螺旋-转角(DNA bandinghelix-turn-helix-turn motif, H-T-H-T), 起转录抑制作用^[11]。研究表明, 这两个结构在细胞生存期的延长和抑制p16上是不可或缺的, 敲除这两个结构, *Bmi-1*基因即会失活, 导致早衰^[12], 有学者认为p27结构也参与其中^[13]。*Bmi-1*基因与正常干细胞也有相关性, *Bmi-1*广泛表达于多种类型干细胞, 以致出生后的小鼠, 若缺乏*Bmi-1*则在造血功能、骨骼发育、神经系统功能和小脑的发育上都存在缺陷。

在多细胞生物体的整个生命周期中, 干细胞会产生分化细胞类型, 最终对生物体的寿命起决定作用。为维持自身稳定, 干细胞在自我更新、多向分化、防止过早

衰老和细胞凋亡方面有严格的调节机制。纯化的鼠和人造血干细胞都表达高水平的*Bmi-1*^[14]。Qiao等^[15]从脐带分离的间质干细胞上也有*Bmi-1*表达。牙间充质干细胞的衰老也和*Bmi-1*表达的下降有关^[16]。*Bmi-1*通过控制对干细胞的命运起决定作用的基因如生存基因, 抗增殖基因及干细胞相关基因以调节HSC的自我更新^[9]。所以血管内皮细胞影响BMSCs衰老和增殖能力就可能通过调控*Bmi-1*基因的表达而实现的。从本实验*Bmi-1*基因检测结果看, 联合培养组*Bmi-1*基因明显高于其他各组($P < 0.01$), 说明血管内皮细胞对BMSCs衰老和增殖能力有显著影响。虽然两种细胞联合培养体系研究取得了一定的成果, 但有学者发现在这种共培养系统中基因分析可见, 79条基因表达出现上调, 62条基因表达出现下调, 表明多种基因因素在共培养体系中起到联合的影响作用^[15], 所以揭示更多细胞间基因信号传导通路的影响是作者在下一步的联合培养中研究的重点。

4 参考文献

- [1] Buttiglieri S, Ruella M, Risso A, et al. The aging effect of chemotherapy on cultured human mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2011;39(12):1171-1181.
- [2] Yu D, Lu G, Cao Y, et al. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2011;25(7):837-841.
于德水, 吕刚, 曹阳, 等. BMSCs移植对大鼠脊髓损伤后VEGF基因和血管生成的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011;25(7):837-841.
- [3] Palmieri D, Camardella L, Ulivi V, et al. Trimer carboxyl Propeptide of collagen I produced by Mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *Biol Chem*. 2000;275(42):32658-32663.
- [4] 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.
- [5] Xiao C, Zhou H, Liu G, et al. Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced bone regeneration. *Biomed Mater*. 2011;6(1):015013.
- [6] Philippe P, Frank P, Simone MP, et al. Influences of visualization and osteogenic cells on Heterotopic bone formation within a madrepore ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(6):1932-1941.
- [7] Emes Y, Aybar B, Vural P, et al. Effects of bone morphogenetic proteins on osteoblast cells: vascular endothelial growth factor, calcium, inorganic phosphate, and nitric oxide levels. *Implant Dent*. 2010;19(5):419-427.
- [8] Kong X, Zheng F, Guo LY, et al. Zhongguo Shixian Xueyexue Zazhi. 2010;18(5):1292-1296.
孔霞, 郑飞, 郭凌娜, 等. VEGF通过细胞外信号调节激酶途径促进骨髓间充质干细胞的增殖[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(5): 1292-1296
- [9] Saleh FA, Whyte M, Genever PG, et al. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *Eur Cell Mater*. 2011;22:242-257.
- [10] 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 mode. *Tissue Eng*. 2006;10(10):2889-2903.
- [11] Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2002;62(16):4736-4745.
- [12] KOMORI T. Regulation of skeletal development by the RUNX family of transcription factors. *J Cell Biochem*. 2005;95(3):445-453.
- [13] Zhang HW, Ding J, Jin JL, et al. Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25(3):640-652.
- [14] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6937):302-305.
- [15] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32(1):8-15.
- [16] Mehrzarin S, Oh JE, Chung CL, et al. Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1 expression. *J Endod*. 2011;37(5):662-666.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金资助项目(30960388; 81160239)。

作者贡献: 设计与实施为第一作者, 评估为通讯作者, 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。

伦理要求: 人骨髓间充质干细胞提取志愿者知情同意。

文章概要:

文章要点: 在联合培养体系中血管内皮细胞对骨髓间充质干细胞中调控其生长增殖的 *Bmi-1* 基因表达起什么影响作用还待进一步研究。

关键信息: 实验提示脐静脉内皮细胞对体外联合培养体系中骨髓间充质干细胞具有促进增殖的作用; 能促进骨髓间充质干细胞 *Bmi-1* 基因的表达, 对细胞衰老和增殖能力有显著影响。

研究的创新之处: 共培养体系中人血管内皮细胞对人骨髓间充质干细胞的 *Bmi-1* 基因表达影响研究还未见报道, 该研究将填补国内外该领域的空白。