

骨髓间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞的共培养

罗淑平¹, 杜玉婷², 白驹²(¹解放军兰州军区兰州总医院重症医学科, 甘肃省兰州市 730050; ²成都市亚非牙科, 四川省成都市 610000)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 骨髓间充质干细胞的取材创伤小, 来源充足, 体外增殖能力强, 且具有肯定的成骨分化潜能, 在骨缺损、骨折和成骨不全等疾病的治疗方面显示出巨大的潜力。而内皮细胞在组织工程骨的血管化及血管组织工程中也已得到广泛应用。
- 2 文章增加的新信息: 脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞共培养的研究, 都围绕着模拟体内环境、细胞与细胞之间的相互作用、共培养体系中培养基的选择、细胞比例的控制等对内皮细胞成血管作用和骨髓间充质干细胞骨生成作用的影响, 对骨组织工程及骨再生治疗具有重大的作用。
- 3 临床应用的意义: 将骨髓间充质干细胞与内皮细胞共培养来扩增骨髓间充质干细胞数量, 同时促进血管生成, 可能为骨组织工程和骨再生的应用提供了一个很有前景的方法。

关键词:

干细胞; 移植; 人脐静脉内皮细胞; 骨髓间充质干细胞; 共培养; 成血管作用; 成骨作用

主题词:

脐静脉; 内皮细胞; 骨髓; 间质干细胞; 共同培养技术

摘要

背景: 将人脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞共培养来扩增骨髓间充质干细胞数量, 同时促进血管生成, 可能为骨组织工程和骨再生提供了一个很有前景的方法。

目的: 对近年国内外关于人脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞共培养的研究及其相关进展进行综述。

方法: 用计算机检索中国知网(2000年1月至2012年3月)、Web of Knowledge 数据库及 PubMed 数据库(1980年1月至2012年3月)关于干细胞共培养的文献。中文关键词为“人脐静脉内皮细胞、骨髓间充质干细胞细胞、细胞共培养、组织工程”, 英文关键词为“human umbilical vein endothelial cells, bone Mesenchymal stem cells, coculture, tissue engineering”。计算机初检得到 135 篇文献, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 103 篇, 共保留 32 篇文献做进一步分析。

结果与结论: 通过查阅国内外文献, 发现内皮细胞与骨髓间充质干细胞共培养的研究, 都围绕着模拟体内环境、细胞与细胞之间的相互作用、共培养体系中培养基的选择、细胞比例的控制等对内皮细胞成血管作用和骨髓间充质干细胞骨生成作用的影响。很多研究对骨组织工程及骨再生治疗都具有重大的作用, 但共培养中内皮细胞与骨髓间充质干细胞之间的作用机制以及在人体内的具体调控仍需要进一步的研究与分析。

罗淑平, 杜玉婷, 白驹. 骨髓间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞的共培养[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7370-7374.

Coculture of human umbilical vein endothelial cells and bone marrow mesenchymal stem cells

Luo Shu-ping¹, Du Yu-ting², Bai Ju² (¹Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ²Yafei Dental, Chengdu 610000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells can improve both osteogenic and angiogenic outcomes and provide a promising strategy for bone tissue engineering and osteogenesis.

OBJECTIVE: To summarize recent researches and related progresses in coculture of human umbilical vein endothelial cells and bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: A computer-based online search of CNKI database from January 2000 to March 2012, PubMed database and Web of Knowledge database from January 1980 to March 2012, was performed with the keywords of “human umbilical vein endothelial cells, bone mesenchymal stem cells, coculture, tissue engineering” both in Chinese and English. A total of 135 articles were screened out, 103 of them were excluded due to unrelated study objective and repeated contents, and finally 32 articles were involved in further analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: At present, studies on coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells mainly focus on mimicking *in vivo* environments, the interactions between cells, and the influence of different cell ratios and culture media. Most of these researches play important roles in bone tissue engineering and bone regeneration therapy, but the mechanism of action and concrete regulation *in*

罗淑平, 女, 1984年生, 甘肃省民勤县人, 汉族, 2008年兰州大学毕业, 主管护师, 主要从事重症护理工作。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.45.028

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)45-07370-05

稿件接受: 2014-10-18

Luo Shu-ping, Nurse in charge, Department of Critical Care Medicine, General Hospital of Lanzhou Military Region, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Accepted: 2014-10-18

vivo between bone marrow mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells still need further research and analysis.

Subject headings: umbilical veins; endothelial cells; bone marrow; mesenchymal stem cells; coculture techniques

Luo SP, Du YT, Bai J. Coculture of human umbilical vein endothelial cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7370-7374.

0 引言 Introduction

间充质干细胞作为一种有黏附性、类成纤维细胞的成体干细胞不仅存在于骨髓中,也存在于人体其他一些组织中,包括血液、脂肪组织、关节液、肌肉、皮肤以及牙髓^[1]。人类骨髓间充质干细胞是最常用于研究和临床应用的间充质干细胞。骨髓间充质干细胞的取材创伤小,来源充足,体外增殖能力强,且具有肯定的成骨分化潜能^[2],在骨缺损、骨折和成骨不全等疾病的治疗方面显示出巨大的潜力^[3]。在体外可将骨髓间充质干细胞分化成典型的成骨细胞,这样就为骨组织工程的应用提供了一个极好的种子细胞来源^[4]。然而,在临床应用中,骨髓间充质干细胞也有其限制性。骨髓间充质干细胞在成人骨髓中的含量很低,而在修复大块骨缺损等的治疗中细胞需求量很大,且骨再生过程中血管生成不足,将严重影响新生骨组织的数量和质量^[5]。

内皮细胞广泛存在于人体内,并且形成了整个脉管系统的内在细胞衬里。伴随着组织损伤,微循环参与到炎症反应和随后的愈合反应中以便恢复损伤组织的生理功能。内皮细胞与血液直接接触,其可通过多种途径在调节血压、炎症细胞的黏附与迁移、凝血和纤溶、血管形成等生理及病理过程中发挥极其重要的作用^[6]。研究发现,血管内皮细胞可以产生许多生长因子和细胞因子,同时具有自发形成微毛细血管的功能。基于以上特性,在组织工程骨的血管化及血管组织工程中作为种子细胞得到广泛应用。长期以来,大部分对人自体血管内皮细胞的研究多是基于人脐静脉内皮细胞。将脐带来作为内皮细胞的取材来源主要有以下几个优势:①脐带是分娩过程中的废弃物,来源很丰富,也较容易获取。只要征得产妇及家人同意,不涉及到社会伦理和法律的制约。②脐带血管没有分支,操作较易,长度理想,能够保证收集到足量的细胞。

Ball等^[7]指出当间充质干细胞与其他类型的细胞接触培养时会受到极大的影响。在这些细胞中,内皮细胞可以表达一些细胞因子,如骨形态发生蛋白2,当它在体外与骨髓间充质干细胞接触时能诱导其成骨性分化^[8]。因此,应用细胞共培养方法,尤其是将骨髓间充质干细胞与内皮细胞共培养来扩增骨髓间充质干细胞数量,同时促进血管生成,可能为骨组织工程和骨再生的应用提供了一个很有前景的方法,但其细胞共培养的具体机制目前还未完全研究清楚^[1, 9]。

本文将从内皮细胞(人脐静脉内皮细胞)和骨髓间充质

干细胞共培养体系的选择以及共培养中人脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞间的相互影响等方面进行综述,希望通过探讨影响共培养的因素及细胞间相互作用的机制,为组织骨工程的研究提供一个新的思路。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索中国知网(<http://epub.cnki.net/Grid2008/index.htm>)2000年1月至2012年3月、Web of Knowledge 数据库(http://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&SID=1FaHdbHCGND5cN86jfl&search_mode=GeneralSearch)及PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>)1980年1月至2012年3月有关干细胞共培养的文章,中文关键词为“人脐静脉内皮细胞,骨髓间充质干细胞细胞,共培养,组织工程”;英文关键词为“human umbilical vein endothelial cells, bone Mesenchymal stem cells, coculture, tissue engineering”。共检索到文献135篇,其中英文93篇,中文42篇。

1.2 纳入标准 选择与干细胞共培养研究有关的文献,同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

1.3 排除标准 重复性研究以及与研究目的无关的文献。

1.4 数据的提取 计算机初检得到135篇文献,阅读标题和摘要进行初筛,排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究103篇,共保留32篇文献做进一步分析。

2 结果 Results

2.1 细胞共培养系统接触模式的选择

2.1.1 非接触共培养/直接接触共培养 非接触共培养是用具有渗透性的物质物理性的将两种细胞分开,或使用条件培养基或通过从其中一种细胞中获得的细胞外基质间接的共培养^[10]。直接接触共培养是将两种细胞直接接触,允许两种细胞之间最大限度的相互作用(例如,用可扩散性因子或通过黏附和缝隙连接进行接触)^[11]。非接触共培养可以分析和消除两种细胞之间相互污染的危险,其中一种细胞分泌的扩散性因子可以穿过中间的遮挡屏障以诱导细胞分化。陆军等^[12]采用具有半透膜的细胞培养池结合6孔板的方式进行非接触共培养诱导,将人脐静脉内皮细胞铺于培养池内,第3代骨髓间充质干细胞以 1×10^5 孔铺在培养池外的6孔板内,两种细胞

的初始比例为1:5, 加入含体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM培养液, 培养14 d, 结果表明在非接触共培养方式下, 人脐静脉内皮细胞可成功诱导人骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化, 表达内皮细胞特有的表面标志CD31和vWF, 阳性率均>99%, 并能够在脱细胞牛静脉血管支架上黏附生长。非接触共培养的主要缺点是它们切断了细胞间密切的物理性接触或调节, 而这种对于信号转导的限制与体内环境相悖。直接接触共培养可以在二维培养板表面上或球形和三维支架式的共培养体系中培养^[13]。Kaigler等^[14]研究发现只有当间充质干细胞和内皮细胞直接接触的共培养时碱性磷酸酶活性和骨钙素的分泌才会同时增加。因此, 目前的研究大部分都采用的是直接接触共培养系统。彭锦等^[15]研究表明人脐静脉内皮细胞可以通过细胞间直接接触诱导共培养的骨髓间充质干细胞开始向内皮分化, 其机制可能与细胞间直接接触促进细胞分泌血管内皮生长因子以及细胞融合密切相关。刘春晓等^[16]将人骨髓间充质干细胞及人脐静脉内皮细胞按1:1比例直接共培养, Matrigel实验显示共培养组形成的毛细血管状结构较单一细胞组多, 在共培养体系中, 未诱导的人骨髓间充质干细胞能促进形成毛细血管状结构, 已成骨诱导的人骨髓间充质干细胞成骨矿化能力增强。

2.1.2 二维/三维培养模式 目前, 一些用于研究骨髓间充质干细胞和内皮细胞间二维或三维培养基中相互作用的体外共培养模式已建立起来。大部分研究数据显示用传统的二维表面或在三维结构内共培养, 骨髓间充质干细胞的成骨和成血管潜能都要比其单独培养时高。二维培养为细胞接触的分子基础提供了详细的信息, 也为内皮细胞控制骨髓间充质干细胞分化的细胞机制提供信息。三维培养为细胞间相互作用、功能性骨血管的快速形成、细胞的生存提供了一个生理性优化的环境^[17]。当间充质干细胞与人静脉内皮细胞在悬浮培养基中共培养时, 它们能自发的形成三维结构。在这个系统中, 内皮细胞受到刺激而形成三维预成血管网架, 间充质干细胞中特定的成骨因子(如碱性磷酸酶的活性)表达增强^[14, 18]。

2.2 基础培养基的选择 在细胞共培养体系中, 培养基的选择没有固定的模式。但是在共培养体系中, 敏感性较强的细胞类型所占比例一般较重, 从而决定了最终培养基的选择^[6]。在人静脉内皮细胞和间充质干细胞的研究中, 骨血管生成的培养基选择取决于对培养基要求更苛刻内皮细胞^[19]。Bidarra等^[9]实验结果表明, 不同类型细胞在不同培养基中的生长情况表现不同。人静脉内皮细胞适宜的顺序: IMDM>M199=M199+DMEM>DMEM, 间充质干细胞适宜的顺序是: M199+DMEM>DMEM>IMDM=M199, 所以得出结论, M199+DMEM的混合基质能为两种细胞提供最适宜的

培养环境。也有学者在实验中使用另外4种培养基: 促成骨细胞增殖培养基, 成骨性培养基, 内皮细胞培养基和后者1:1的混合物。结果仅在成骨性培养基中观察到有矿化的发生^[20]。

2.3 不同细胞比例对间充质干细胞的影响 为了评估骨髓间充质干细胞与人静脉内皮细胞的相对比例对骨髓间充质干细胞行为的影响, 一些学者采用了一些对比研究。结果显示骨髓间充质干细胞:人静脉内皮细胞比例为50%:50%时, 骨髓间充质干细胞的代谢活性增加最多, 75%:25%组骨髓间充质干细胞的增殖率最高。在这个比例下, 人静脉内皮细胞的降低最为轻微。25%:75%和50%:50%者碱性磷酸酶活性最高^[9]。Xue等^[21]以1:5(内皮细胞/间充质干细胞)的比例在骨髓间充质干细胞中加入脐静脉内皮细胞共培养5 d后, 两种细胞增殖显著增加, 经检测发现两种细胞间存在细胞桥, 同时检测到碱性磷酸酶的mRNA表达增强。这种影响比在培养基中加入成骨因子如地塞米松, 抗坏血酸和 β -甘油磷酸酯要更为显著。Ma等^[20]在加入成骨培养基中, 碱性磷酸酶活性、矿化程度和CD31⁺染色在共培养以(内皮细胞/间充质干细胞)50%:50%的比例时有最高的表达, 并得出结论认为50%:50%的比例是可以获得成骨和成血管分化最佳效果的组合。但目前对细胞比例的选择还没有最后的定论。

2.4 共培养中细胞的数量、形态及分化特征 实验研究证明, 共培养中细胞的数量增加明显。Bidarra等^[9]将两种细胞分开分析, 单独培养的骨髓间充质干细胞数量显著增加, 培养14 d以后数量便不再变化; 共培养中骨髓间充质干细胞的细胞数量增长一直延续到第21天, 而在后两个星期共培养者的增殖率明显高于单独培养者(1.5×10^3 或 3×10^3 /cm²)。研究结果显示, 人脐静脉内皮细胞具有刺激骨髓间充质干细胞增殖的潜力。尽管人脐静脉内皮细胞在共培养中的相对比例有所下降, 但内皮细胞的增殖时间延长^[9]。

细胞的形态变化方面研究发现, 单独培养中, 前2周内皮细胞随机分布在培养基表面, 到第21天, 开始出现类似成纤维细胞形状的压力纤维平行伴随于细胞。而共培养中, 细胞重排显示出显著不同的形式, 其形成了一个管状的细胞网架。到第21天, 可以观察到有交错排列的带有密集压力纤维的细胞骨架生成^[22]。有研究观察到人脐静脉内皮细胞可沿成骨前体细胞迁移, 共培养可刺激趋化因子的释放, 而趋化因子又可以反过来促进人脐静脉内皮细胞的迁移^[23]。

基因表达方面, 共培养骨髓间充质干细胞中碱性磷酸酶和I型胶原的基因表达显著高于单独培养^[21]。血管内皮生长因子(VEGF165)在共培养的骨髓间充质干细胞中表达明显升高^[24]。同时, 神经钙黏蛋白的表达增加, 伴随着其调节细胞间黏附与信号转导, 使得共培养中骨

髓间充质干细胞在成骨分化早期数量显著增多^[25]。内皮细胞能参与不同水平的诱导成骨: 分泌骨形态发生蛋白以诱导成骨, 控制调节成骨分化所需的3种转录因子(Dlx 5, cbfa1/runx2, osterix)以及在预成的血管网中产生矿化组织^[26]。同时, 骨髓间充质干细胞又能促进内皮细胞分泌骨形态发生蛋白2^[27]。

2.5 两种类型细胞间的作用机制 共培养环境中, 脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞之间可以通过以下3种机制进行联系: ①通过两个邻近细胞的膜分子间直接接触而相互作用(黏附和紧密连接)。②信号分子通过邻近细胞胞质间的自由扩散而形成的缝隙连接。③靶细胞上的特定受体或从细胞外基质中释放的可扩散因子旁分泌作用^[11]。

2.5.1 细胞间的紧密连接(黏附) Li等^[25]研究显示, 骨髓间充质干细胞的细胞质中神经钙黏蛋白(N-cadherin)在共培养下主要集中于共培养的骨髓间充质干细胞的细胞膜上, 证明了神经钙黏蛋白在共培养中表达增强并且促进了细胞间的黏附。在另一项研究中, 血管内皮钙黏蛋白与 β -连环蛋白在共培养中的细胞连接区域发生暂时性消失, 可扰乱细胞间的黏附以促进人脐静脉内皮细胞的迁移^[24]。

2.5.2 缝隙连接 内皮细胞和骨髓间充质干细胞共培养时可以通过细胞质的连接来进行联系和信息交换。在骨髓间充质干细胞中, 主要的缝隙连接蛋白是连接蛋白43。这种蛋白和连接蛋白37、连接蛋白40在内皮细胞中也表达^[28]。虽然缝隙连接基因表达的确切机制仍不清楚, 但其将依赖于: ①渗透连接通道的信号类型。②涉及的连接蛋白(connexins)类型, 因为它们具有不同的分子渗透率。有实验显示缝隙连接介导的细胞与细胞间反应是干细胞分化中必需的^[11]。另外, 有研究指出内皮细胞与成骨样细胞间的相互联系依赖于旁分泌因素和在细胞分化中有重要作用的缝隙连接(连接蛋白43)^[22]。

2.5.3 旁分泌作用 Wang等^[2]研究认为共培养涉及到管状因子如血管内皮生长因子, 这可以证实内皮细胞和骨髓间充质干细胞共培养可产生影响骨细胞生长和分化的生长因子。在共培养体系中, 血管内皮生长因子为两种细胞的联系起到核心的作用。它由骨形成细胞分泌, 如成骨细胞、骨前体细胞或间充质干细胞, 能促进内皮细胞增殖、迁移和毛细血管状结构的形成^[29]。血管内皮生长因子能延长内皮细胞的生存时间和增殖效力, 并能通过激活特定受体以刺激细胞分化和血管生成^[8, 30]。有研究表明, 血管内皮生长因子受体2(KDR)和尿激酶类纤维溶酶原激活剂(uPA)在人脐静脉内皮细胞中的释放增加。同时, 共培养增加了骨髓间充质干细胞对血管内皮生长因子165的分泌; 血管内皮生长因子继而活化人脐静脉内皮细胞中的尿激酶类纤维溶酶原激活剂, 后者可能是和血管内皮钙黏蛋白一起启动了细胞迁移和自

组装网络的形成^[26]。

3 总结和展望 Conclusions and prospects

综上所述, 通过细胞共培养可增加骨髓间充质干细胞的增殖与分化, 同时能提高脐静脉内皮细胞的成血管功能和骨髓间充质干细胞的成骨矿化能力。过去10年, 大量研究数据已表明血管内皮细胞和成骨细胞之间存在着密切的功能性联系, 这种细胞与细胞之间的联系对于调节细胞行为及骨生长和重建极为重要^[31]。然而, 对于脐静脉内皮细胞和骨髓间充质干细胞体外共培养的机制及相互影响的研究还并不清楚, 以及在体内骨髓间充质干细胞和内皮细胞通过直接细胞接触的作用机制也尚缺乏清楚认识。应当对这些方面继续进行研究, 为将来骨髓间充质干细胞和内皮细胞(或其前体细胞)整合到生物复合材料上为骨缺损区提供活骨替代方法, 为骨组织工程提供了新的发展前景^[32]。

作者贡献: 构思并设计本综述为罗淑平, 资料收集为杜玉婷, 分析并解析数据为罗淑平、杜玉婷。罗淑平成文, 白驹审校, 罗淑平对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 人脐静脉内皮细胞-在进行血管内皮细胞实验时, 通常选用的细胞模型为脐静脉内皮细胞, 而不是直接采用静脉血管内皮细胞或动脉血管内皮细胞。原因是二者都为分化的细胞, 不具有无限繁殖的能力。而脐静脉内皮细胞是一种干细胞, 能无限次传代(理论上), 易于实验操作。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(2):462-471.
- [2] Wang L, Tran I, Seshareddy K, et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(8):2259-2266.
- [3] Sensebé L, Krampere M, Schrezenmeier H, et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010;98(2):93-107.
- [4] Moiola EK, Hong L, Mao JJ, et al. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen*. 2007;15(3):413-421.
- [5] Alsberg E, von Recum HA, Mahoney MJ. Environmental cues to guide stem cell fate decision for tissue engineering applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2006;6(9):847-866.
- [6] Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Unger RE. Co-culture systems for vascularization—learning from nature. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4-5):291-299.

- [7] Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):714-727.
- [8] Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J.* 2005;19(6):665-667.
- [9] Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, et al. Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem Cell Res.* 2011;7(3):186-197.
- [10] Meury T, Verrier S, Alini M. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem.* 2006;98(4):992-1006.
- [11] Grellier M, Bordenave L, Amédée J. Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2009;27(10):562-571.
- [12] 陆军, 黄薇, 陈欣欣. 非接触共培养法诱导人骨髓间充质干细胞向内皮细胞的分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(38): 7435-7438.
- [13] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, et al. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function. *Bone.* 2008;42(6):1080-1091.
- [14] 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.
- [15] 彭锦, 迟路湘. 细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(21): 2286-2289.
- [16] 刘春晓, 吴欢欢, 马慧雨, 等. 人骨髓间充质干细胞与脐静脉内皮细胞体外共培养的研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 7(2): 65-69, 84.
- [17] Jarrahy R, Huang W, Rudkin GH, et al. Osteogenic differentiation is inhibited and angiogenic expression is enhanced in MC3T3-E1 cells cultured on three-dimensional scaffolds. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(2):C408-414.
- [18] Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng.* 2006;12(9):2685-2693.
- [19] Santos MI, Unger RE, Sousa RA, et al. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials.* 2009;30(26):4407-4415.
- [20] Ma J, van den Beucken JJ, Yang F, et al. Coculture of osteoblasts and endothelial cells: optimization of culture medium and cell ratio. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(3):349-357.
- [21] Xue Y, Xing Z, Hellem S, et al. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biomed Eng Online.* 2009;8:34.
- [22] Yourek G, Hussain MA, Mao JJ. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO J.* 2007;53(2):219-228.
- [23] Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(3):390-398.
- [24] Li H, Daculsi R, Grellier M, et al. The role of vascular actors in two dimensional dialogue of human bone marrow stromal cell and endothelial cell for inducing self-assembled network. *PLoS One.* 2011;6(2):e16767.
- [25] Li H, Daculsi R, Grellier M, et al. Role of neural-cadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(2):C422-430.
- [26] Grellier M, Granja PL, Fricain JC, et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials.* 2009;30(19):3271-3278.
- [27] Saleh FA, Whyte M, Ashton P, et al. Regulation of mesenchymal stem cell activity by endothelial cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(3):391-403.
- [28] Yeh HI, Lee PY, Su CH, et al. Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment. *Am J Hypertens.* 2006;19(2):129-135.
- [29] Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem.* 2005;95(4):827-839.
- [30] Unger RE, Sartoris A, Peters K, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials.* 2007;28(27):3965-3976.
- [31] Moon JJ, West JL. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials. *Curr Top Med Chem.* 2008;8(4):300-310.
- [32] Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med.* 2009;15(4):180-189.