

胶原补片上生长因子释放及对人骨髓干细胞增殖与分化的影响

啜俊波¹, 康凯¹, 孙露¹, 曲辉², 蔡俊¹, 陈克功¹, 谢宝栋¹, 蒋树林¹, 田海¹, 李仁科¹(哈尔滨医科大学附属二院, ¹心血管外科, 哈尔滨医科大学心肌缺血机理与诊疗技术省部共建教育部重点实验室, ²儿内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

文章亮点:

- 1 多组动物实验证明了心肌细胞移植对改善心脏功能的效果, 但移植细胞效率低下却是一个公认的问题。为减少移植细胞的流失, 构建合适的移植载体与细胞共同移植于受体心脏已成为学界的共识。
- 2 选择胶原海绵作为细胞载体, 除了因为胶原海绵为人体天然的间质成分, 具有良好的组织相容性, 天然的多孔隙性, 合适的降解率及生物安全性等外, 更关键的是利用碳化二亚胺法处理可激活其表面富含的羧基, 相互交联或与多种生长因子共价结合, 在增强了补片自身的机械性能的同时, 又能使生长因子与之稳定结合。
- 3 实验首次使用碳化二亚胺法将生长因子血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子共价结合于胶原补片上, 实现两种因子持续、缓慢的释放, 同时生长因子的持续作用可使接种于其上的骨髓干细胞增殖加速, 分化减缓。

关键词:

生物材料; 缓释材料; 心脏补片; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 细胞移植; 载体; 碳化二亚胺法; 生长因子; 缓释; 血管形成; 国家自然科学基金

主题词:

胶原; 碳化二亚胺类; 血管内皮生长因子类; 成纤维细胞生长因子2

基金资助:

黑龙江省卫生厅课题资助项目(2013053); 国家自然科学基金(81471805); 中国博士后科研基金(2014M551272); 黑龙江省教育厅科研课题(12541434)

缩略语:

血管内皮生长因子: vascular endothelial growth factor, VEGF; 碱性成纤维细胞生长因子: basic fibroblast growth factor, bFGF

摘要

背景: 动物实验证明心肌细胞移植可改善心脏功能, 但移植细胞效率较低, 为减少移植细胞的流失, 构建合适的移植载体与细胞共同移植于受体心脏已成为学界的共识。

目的: 观察经碳化二亚胺法处理, 共价结合生长因子胶原补片上生长因子的释放情况, 以及其对骨髓干细胞增殖与分化的影响。

方法: 采用碳化二亚胺法将胶原补片激活后, 对照组胶原补片直接保存于 PBS 内, 实验组胶原补片继续浸于含有血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的 PBS 内, 使其与生长因子共价结合, 检测共价结合于胶原补片上生长因子的量; 保存后 1 d、3 d、7 d、2 周、3 周、4 周, 采用 ELISA 法检测血清内血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的含量。将 0.5×10^6 的人骨髓间充质干细胞均匀接种于两组补片上, 采用苏木精-伊红染色计数细胞, MTT 法及 Brdu 增殖实验对比补片上的细胞增殖情况; 以 RT-PCR 法检测两组细胞内 I、III 型胶原表达情况, SMA 免疫荧光染色对比两组补片上的细胞分化情况。

结果与结论: 胶原补片上血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的共价结合率分别为 42.4%、24.5%。保存 4 周内, 胶原补片上的血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子均呈现持续、缓慢的释放模式。与单纯胶原补片比较, 共价结合生长因子的胶原补片可在体外有效促进人骨髓间充质干细胞的增殖并抑制其分化。

啜俊波, 康凯, 孙露, 曲辉, 蔡俊, 陈克功, 谢宝栋, 蒋树林, 田海, 李仁科. 胶原补片上生长因子释放及对人骨髓干细胞增殖与分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(52):8474-8479.

Release and effect of growth factors conjugated into collagen patches on human bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and differentiation

Chuai Jun-bo¹, Kang Kai¹, Sun Lu¹, Qu Hui², Cai Jun¹, Chen Ke-gong¹, Xie Bao-dong¹, Jiang Shu-lin¹, Tian Hai¹, Li Ren-ke¹(¹Department of Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Key Laboratory of Myocardial Ischemia Mechanism and Treatment (Harbin Medical University), Ministry of Education, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; ²Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Preclinical trials in animals have demonstrated myocardial cell transplantation can improve heart function, but it is hindered by the low retention of transplanted cells. Therefore, it becomes a common strategy to

啜俊波, 男, 1979 年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 哈尔滨医科大学附属二院在读博士, 主要从事组织工程心肌补片研究。

通讯作者: 康凯, 博士后, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 哈尔滨医科大学附属二院, 黑龙江省哈尔滨市 150086

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.52.020
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)52-08474-06
稿件接受: 2014-11-18

Chuai Jun-bo, Studying for doctorate, Department of Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Key Laboratory of Myocardial Ischemia Mechanism and Treatment (Harbin Medical University), Ministry of Education, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Kang Kai, M.D., Associate chief physician, Associate professor, Master's supervisor, Department of Cardiovascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Key Laboratory of Myocardial Ischemia Mechanism and Treatment (Harbin Medical University), Ministry of Education, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-11-18

generate a proper cell platform to promote cell retention and vasculature formation.

OBJECTIVE: To evaluate the cytokine release of a novel cytokine-conjugated collagen patch prepared with 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) and its physiological effects on proliferation and differentiation of seeded human bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: After activating and crosslinking by EDC, the control patches (EDC-patch) were preserved in PBS and the experimental patches (GF-patch) were immersed into PBS containing vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor for cytokine conjugation. Collagen patches without EDC treatment underwent same process as internal control. ELISA was performed to detect the content of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the supernatant of GF-patch at 1, 3, 7 days, 2, 3, 4 weeks after patch preparation. The 0.5×10^6 human bone marrow mesenchymal stem cells were evenly seeded on both kinds of patches and the cell proliferation was identified by hematoxylin-eosin staining followed by cell counting, MTT assay or BrdU staining test. Accordingly, cell differentiation was illustrated by RT-PCR for collagen I and collagen III expression, and immunofluorescent staining for SMA in seeding cells.

RESULTS AND CONCLUSION: 42.4% vascular endothelial growth factors and 24.5% basic fibroblast growth factors were successfully conjugated into collagen patches and they both exhibited the constant, controlled-release mode during the 4-week observation period. By contrast, the patch without EDC treatment just showed the physical bonding of both cytokines. In comparison with EDC-patch, GF-patch presented the capability to induce cell proliferation while retard cell differentiation.

Subject headings: collagen; carbodiimides; vascular endothelial growth factors; fibroblast growth factor 2

Funding: the Project of Heilongjiang Health Bureau, No. 2013053; the National Natural Science Foundation of China, No. 81471805; the China Postdoctoral Science Foundation, No. 2014M551272; the Project of Heilongjiang Education Bureau, No. 12541434

Chuai JB, Kang K, Sun L, Qu H, Cai J, Chen KG, Xie BD, Jiang SL, Tian H, Li RK. Release and effect of growth factors conjugated into collagen patches on human bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(52):8474-8479.

0 引言 Introduction

目前, 细胞移植效率低下依旧是影响心肌细胞治疗效果的瓶颈问题之一^[1], 其根本原因在于细胞移植后血流冲刷导致的移植细胞流失^[2], 以及缺血缺氧造成的移植细胞死亡^[3]。因此构建可负载各种生长因子的细胞平台, 在为移植细胞提供附着基质的同时, 指导细胞增殖、分化并加速移植载体再血管化进程已成为当今学术界改善细胞移植效果的重要研究策略, 各种生长因子的缓释平台层出不穷^[4-5]。

胶原海绵是一种从动物皮肤和肌腱中提取出来的多孔天然生物材料^[6-7], 其物理结构上与真皮组织比较相近, 具有良好的水气通透性、机械强度及可塑性; 可以进行化学交联, 可被组织吸收, 并能与药物相互作用, 交联或者经过酶处理后, 其免疫原性可降至较低水平。作为一种天然无毒的生物材料, 胶原海绵不但能促进细胞的生长, 更是为细胞迁移、增殖提供了一个支架, 而且能够促进周围毛细血管的生成^[8-9]。

本实验系利用碳化二亚胺法 (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride chemistry, EDC)将血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)共价结合在胶原补片上, 在体外检测这两种生长因子的释放曲线, 以及这一平台对人骨髓干细胞增殖与分化的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 体外组织工程心肌补片制备及生物学作用观察

实验。

时间及地点: 于2012年7月至2013年9月在哈尔滨医科大学心肌缺血省部共建重点实验室完成。

材料:

共价结合生长因子胶原补片上生长因子释放情况实验的试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
胶原海绵	美国Davol公司(1050050)
24 g/L碳化二亚胺(22980)	Fisher
60 g/L N-羧基琥珀酰亚胺(BC97)	Sulfo-NHS
1 mg/L VEGF(100-20)、1 mg/L bFGF(100-18B)	Peprtech
ELISA试剂盒	上海蓝基生物科技有限公司
IMDM	美国Gibco公司
体积分数10%胎牛血清	以色列Biological Industries公司
光学显微镜	日本Olympus公司
10 mmol/L Brdu单克隆抗体(B5002)	Sigma

骨髓: 取自哈尔滨医科大学附属二院心外科接受手术治疗的冠心病患者, 年龄55-76岁, 合并糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、肝炎及严重心力衰竭的患者除外。实验实施前已经哈医大二院伦理委员会批准(伦理号: 2014-研-010), 取材前均已签署知情同意书。具体取材方法和流程见文献[10-11]。

实验方法:

补片的制备: 首先用专用模具将胶原海绵切成直径5 mm的圆形补片, 实验组补片浸泡于含有1-(3-二甲氨基

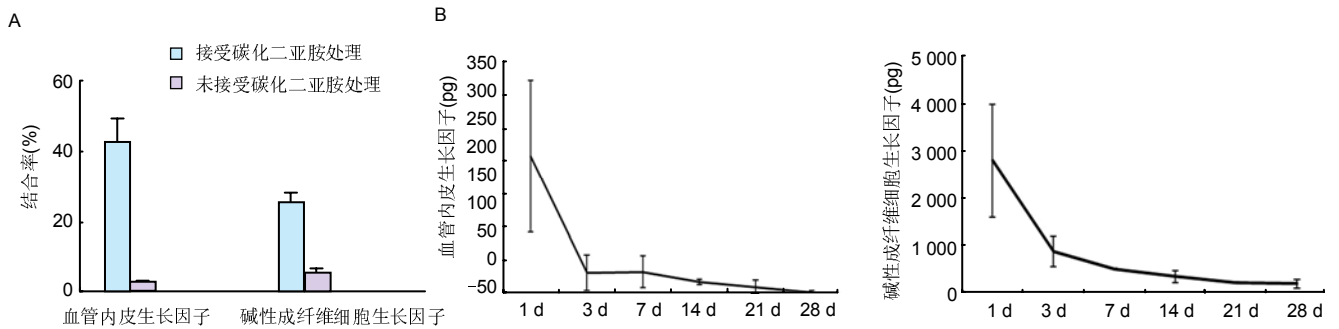


图1 接受和未接受碳化二亚胺法处理胶原补片与血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子结合效率的比较

Figure 1 Comparison of binding ratio of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor between collagen scaffolds with or without 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride treatment

图注: 图中A为接受和未接受碳化二亚胺法处理的胶原补片与血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子结合效率的比较; B为经碳化二亚胺法处理, 共价结合生长因子胶原补片在28 d内的两种生长因子释放曲线。

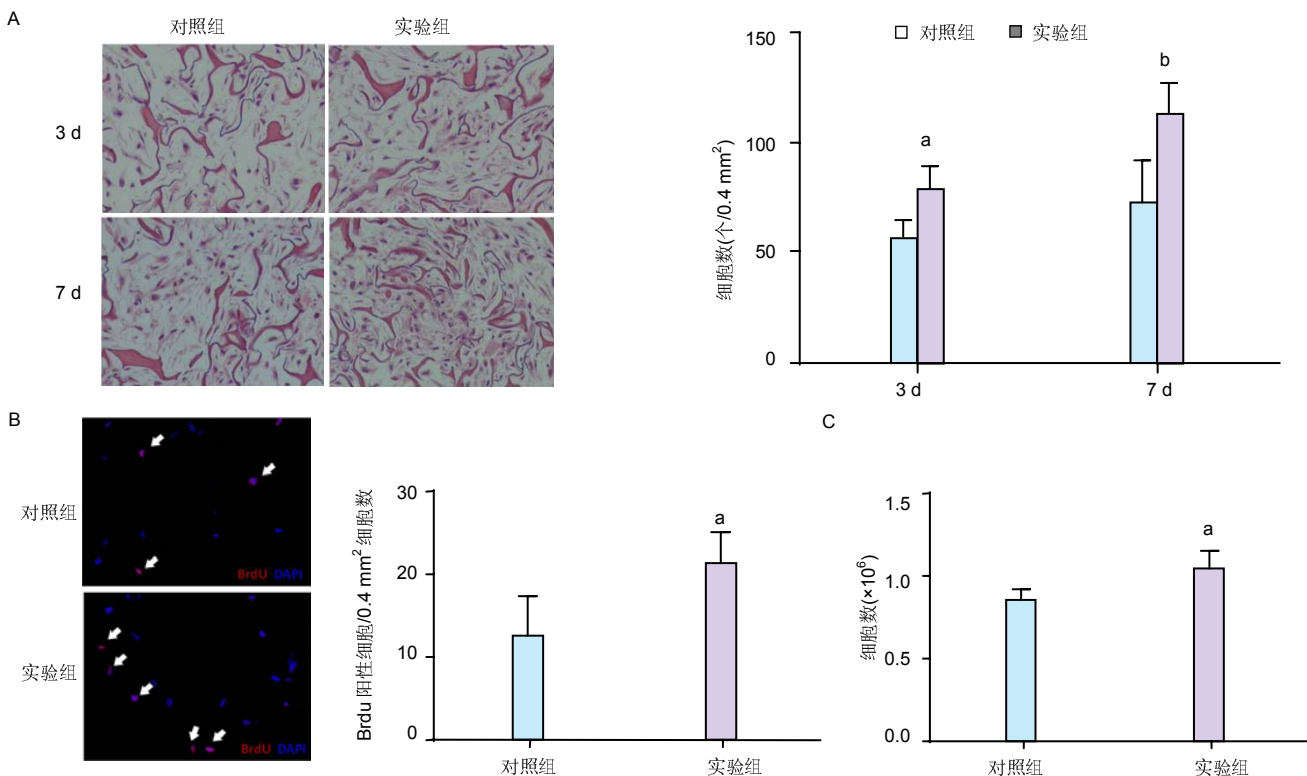


图2 实验组与对照组胶原补片对骨髓间充质干细胞增殖影响的比较

Figure 2 Comparison of the effects of collagen patches conjugated with cytokines or not on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 图中A为细胞接种于两种补片3, 7 d后的苏木精-伊红染色(×200); B为细胞接种24 h后BrdU免疫荧光染色(×200)检测处于S期的细胞(箭头)比率; C为细胞接种4 d后, MTT检测细胞数目。

丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐及N-羟基琥珀酰亚胺的PBS中20 min(室温), 使胶原补片活化、交联; 随后将活化后的补片转移至含有VEGF和bFGF的PBS中2 h(室温), 使其与生长因子共价结合, 用清洁PBS漂洗8次后保存于PBS中, 4 °C保存备用。对照组补片仅行碳化二亚胺法处理使胶原补片活化、交联就保存在PBS中。全部操作在无菌条件下完成。

解离曲线的测定: 共价结合于胶原补片上的生长因子含量由加入反应液的生长因子(VEGF及bFGF均为150 ng)减去洗脱液中的生长因子含量间接获得, 以未经碳化二亚胺法处理, 浸于含有生长因子PBS中的胶原补片作为内对

照。新鲜制备的共价结合生长因子的胶原片保存于PBS内, 于保存后1 d、3 d、7 d、2周、3周、4周分别收集并检测保存补片的上清液内的生长因子含量。洗脱液及上清液内的生长因子含量利用相应的ELISA试剂盒检测获得。

骨髓间充质干细胞的分离及培养: 肝素化前取骨穿液5.0-6.0 mL, 注入装有4 mL淋巴细胞分离液的离心管中, 密度梯度离心, 取单个核细胞层, 以 1.6×10^6 移入含IMDM+体积分数10%FBS的培养瓶中, 置入体积分数5%CO₂孵箱中37 °C培养, 长至80%融合时传代, 取第3代细胞用于实验。

鉴定: 取第3代细胞 10^5 - 10^6 个, 4 °C 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 100 μL cell staining buffer重悬细胞; 在

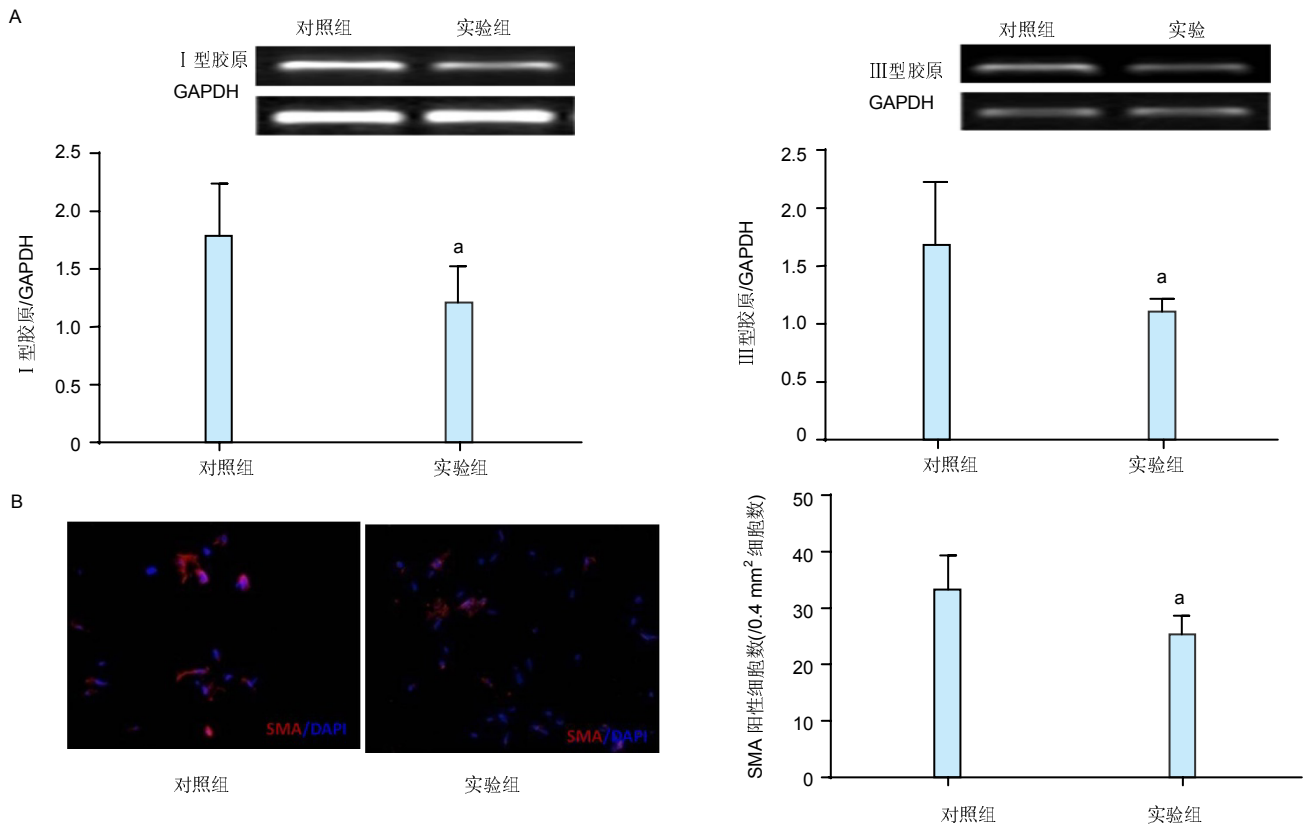


图3 实验组与对照组胶原补片对骨髓间充质干细胞分化影响的比较

Figure 3 Comparison of the effects of collagen patches conjugated with cytokines or not on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 与对照组比较, ^a*P* < 0.05; 图中 A 为细胞接种 4 d 后, RT-PCR 法对比两种补片上细胞内胶原型 I、III 型的表达; B 为细胞接种 4 d 后行 SMA 免疫荧光染色(×200), 比较两组补片上 SMA 阳性细胞占全部细胞的比率。

空白管、同型对照管、检测管分别加入 50 μL cell staining buffer/同型抗体/实验抗体, 轻轻混匀, 避光孵育室温孵育 20 min; 孵育完成后, 加入 1 mL cell staining buffer, 4 °C 1 000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清, 用流式细胞仪检测, 结果显示此种培养方法所取细胞, 均能稳定阳性表达细胞表面抗原 CD29、CD90、CD105, 不表达白细胞共同抗原 CD45 及造血系标志物 CD34 和 CD133。由此可以证明采用上述方法分离的单个核细胞为骨髓间充质干细胞^[10, 12]。

细胞在补片上的种植及培养: 首先, 将上述实验组与对照组补片置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 温箱内孵育 30 min, 然后用无菌吸纸将其吸干, 转移并固定于自制的 20 mm 培养皿内。同时, 消化离心培养好的骨髓间充质干细胞, 以 0.5 × 10⁶/补片的密度将细胞悬液分 5 点均匀接种于补片上, 每个培养皿加入 100 μL 培养液后置于温箱孵育 40 min, 待细胞在补片上贴附牢固后加培养液至浸过补片。每二三天更换培养液 1 次。

细胞增殖测定:

苏木精-伊红染色后计数细胞: 细胞接种于补片后 3, 7 d, 分别将两组补片 (n=5) 浸于体积分数 10% 甲醛溶液中室温下固定 24 h。石蜡包埋后切片, 行苏木精-伊红染色。细胞计数按照双盲原则进行。请两位观察者分别于光学显微镜下随机选择 5 个视野行细胞计数。

MTT 检测: 将未接种细胞及接种有已知细胞数 (0, 0.2 × 10⁶, 0.4 × 10⁶, 0.8 × 10⁶, 1.6 × 10⁶) 的补片行 MTT 检查, 测得的 A 值作标定曲线。接种后 4 d 进行 MTT 检测: 即先将两种补片置于含有 MTT 工作液 (1 g/L, 500 μL/补片) 的 24 孔板中, 温箱孵育 4 h, 然后将其吸干, 置入 DMSO (500 μL/补片) 中涮洗 10 min, 将洗脱液移至 96 孔板, 620 nm 分光光度计下计数, 因形成的甲臞盐与具有代谢活性的骨髓间充质干细胞呈正比, 故所得出的 A 值经标定曲线校正后即可得出活性细胞的数目。

BrdU 增殖实验: 接种 24 h 后, 将 10 mmol/L 的 BrdU 溶液加入培养液, 48 h 后将补片速冻, 制成冰冻切片, BrdU 单克隆抗体免疫荧光染色, 免疫荧光显微镜下观察 BrdU 染色情况, 比较两组补片上处于增殖期 (S 期) 细胞的比率, 以间接推断细胞增殖情况。

细胞分化测定:

RT-PCR 检测两种补片细胞内 I 型胶原及 III 型胶原的形成: 接种 4 d 后, 取出补片, 速冻并将其研成粉末, 采用 TRizol 法提取出细胞内全部 RNA 后, 将其置于含有特殊引物酶的聚合酶链锁反应液中扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行分离显影。人胶原引物酶序列为: I 型胶原, 前向: 5'aca gcc tcc aac tgc tcc ta3', 反向: 5'cga agc ctc tgt gtc ctt tc3'; III 型胶原, 前向: 5'cac tgg tgc taa ggg aga

gc3', 反向: 5' ctc cag cct ctc cat ctt tg3'. 因胶原主要由成纤维细胞生成, 故两种补片上细胞内的不同含量可以反映其向成纤维细胞分化的多少。

SMA免疫荧光染色: 接种4 d后, 将补片置于40 g/L多聚甲醛固定24 h, 速冻并制成5 μm厚的冰冻切片后, 行SMA免疫荧光(Santa Cruz, SC-6956)染色。按双盲原则在荧光显微镜下观察细胞SMA染色的阳性率, 对比两组补片上骨髓间充质干细胞向成纤维细胞的转化率。

主要观察指标: 共价结合生长因子胶原补片上生长因子的释放情况及其对人骨髓干细胞增殖与分化的影响。

统计学分析: 统计软件采用Graphpad 5.0, 所有数值均以 $\bar{x} \pm s$ 显示。苏木精-伊红染色细胞计数比较采用重复测量方差分析, 其余细胞增殖及分化的指标比较均采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 ELISA检测结果 经碳化二亚胺法处理后, VEGF与bFGF与胶原补片发生共价结合, 结合率分别为(42.4±6.8)%和(24.5±3.3)%; 而未经EDC法处理的胶原补片仅体现出了两者之间的物理结合, 结合率分别是(2.6±0.4)%和(5.2±1.1)% (图1A)。释放曲线显示(图1B), 共价结合的VEGF及bFGF均较稳定, 只有极少数生长因子解离释放出来; 至制备后28 d, 大部分生长因子仍存留于补片上。

2.2 细胞增殖 苏木精-伊红细胞计数结果显示(图2A), 骨髓间充质干细胞在两种补片上均随时间延长呈增长趋势, 这证明碳化二亚胺法处理后的胶原补片适合细胞生长, 可作为细胞移植的载体; 接种后3, 7 d, 实验组补片上的碳化二亚胺均多于对照组补片, 证明缓释的生长因子促进了细胞增殖。BrdU增殖实验则显示(图2B)在碳化二亚胺补片上更多的碳化二亚胺进入了增殖期; MTT检验(图2C)则定量证明了实验组补片对碳化二亚胺的促增殖作用。

2.3 细胞分化 RT-PCR显示(图3A), 在实验组补片上的细胞I、III型胶原的表达明显下调, 这说明经生长因子作用后, 更多的细胞专注于增殖而减少了分化; SMA免疫荧光染色(图3B)则从另一个角度进一步证明的上述结论。

3 讨论 Discussion

迄今, 虽然多组动物实验证明了心肌细胞移植对改善心脏功能的效果^[13-14], 但移植细胞效率低下却是一个公认的问题^[15]。有研究显示, 采用心肌内直接注射的方式进行细胞移植, 约90%的移植细胞将被循环血流冲走或自注射部位漏出, 能存活下来的细胞不到10%^[2], 而有幸在局部存留下来的细胞也将有90%左右在移植后1周内死亡^[3]。因此采用何种方法来增加移植细胞的存留和存活就成为提高细胞移植效率必须面对的一个问题。为减少移植细胞的流失, 构建合适的移植载体与细胞共同移植于受体心脏已成为学界的共识。各种天然的细胞外基质材料如胶原^[16]、粘

连蛋白^[17]、Matrigel胶或hydrogel胶^[18-19], 以及某些天然材料如岩藻酸^[20]、壳聚糖等都曾作为移植细胞附着的生物载体用来改善细胞的存留^[21]。此外, 移植载体的另一项重要作用是提供适宜细胞生存的三维结构, 并加速移植细胞周围组织的再血管化进程^[22]。为达到上述目的, 一系列生长因子或其组合被整合进移植载体, 借以调控细胞的生理活动和再血管化进程^[23]。但由于多数生长因子的半衰期较短, 单次局部给药并不能产生明显的药理效果; 通过静脉或其他途径全身给药, 又有诱发潜在肿瘤的风险。故建立一种可持续、稳定、局部给药的生长因子的释放平台就显得尤为重要^[24-25]。

当然, 要想使生长因子与细胞载体稳定结合, 单纯的物理附着是不够的。早期曾有学者用可溶性生长因子浸泡过的明胶海绵作细胞载体, 发现效果并不理想; 而近期Wu等^[26]的研究更证实与hydrogel胶化学结合的VEGF, 会较物理结合的VEGF能更好促进梗死心肌的再血管化。

实验这里选择胶原海绵作为细胞载体, 除了因为胶原海绵为人体天然的间质成分具有良好的组织相容性, 天然的多孔隙性, 合适的降解率及生物安全性等外^[9, 27-28], 更关键的是利用碳化二亚胺法处理可激活其表面富含的羧基, 相互交联或与多种生长因子共价结合, 在增强了补片自身的机械性能的同时, 又能使诸如VEGF、bFGF等生长因子与之稳定结合。本实验已证实, 这种共价结合使得生长因子的释放相当稳定, 而随着生长因子的释放和局部作用, 种植于其上的骨髓间充质干细胞也发生了明确改变。可以推测, 利用这一平台进行细胞的体内移植, 极有可能促进细胞周围组织的再血管化, 为改善移植细胞的存活创造有利条件。

至于生长因子的选择, 是基于如下考虑: ①bFGF是一种强有力的有丝分裂原, 具有强大的促多种成体干细胞分裂增殖的作用^[29]; Zhang等^[30]也证实VEGF可通过AKT-PKC信号通路促进骨髓间充质干细胞的增殖。②VEGF和bFGF在功能血管形成过程中具有强大的协同作用, 可有效促进细胞周围组织的功能血管形成^[31]。而这反过来又会促进移植细胞的存活。当然, 在本实验中仅证实了这一平台在体外对骨髓间充质干细胞的生理作用, 至于体内研究结果, 还需要进一步的观察和评价。

致谢: 感谢加拿大多伦多大学李仁科老师的指导帮助。

作者贡献: 实验设计第二作者, 实施第一、三、四作者, 统计评估第一、二作者, 资料收集第一、二、三、四作者, 成文第一作者, 审校第二作者, 所有作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 本实验获得哈医大二院医学伦理委员会的批准。

学术术语: 胶原海绵-是一种从动物皮肤和肌腱中提取出来的一种多孔的天然生物材料, 其物理结构上与真皮组织比较相近, 具有良好的水气通透性、机械强度及可塑性; 可以进行化学交联,

可被组织吸收, 并能与药物相互作用, 交联或者经过酶处理后, 其免疫原性可降至较低水平; 作为一种天然无毒的生物材料, 不但能促进细胞的生长, 更是为细胞迁移、增殖提供了一个支架, 而且能够促进周围毛细血管的生成。

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] Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl.* 2011;26(4): 383-417.
- [2] Leor J, Aboulaiaf-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III56-61.
- [3] Zhang M, Methot D, Murry CE, et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(5):907-921.
- [4] Sun XT, Ding YT, Yan XG, et al. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an in vitro quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World J Gastroenterol.* 2004;10(17): 2524-2528.
- [5] Godier-Furnémont AF, Martens TP, Koeckert MS, et al. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(19): 7974-7979.
- [6] Olsen D, Yang C, Bodo M, et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12): 1547-1567.
- [7] Kumar MS, Kirubanandan S, Sriprya R, et al. Triphala incorporated collagen sponge--a smart biomaterial for infected dermal wound healing. *J Surg Res.* 2010;158(1):162-170.
- [8] Wang W, Lin S, Xiao Y, et al. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci.* 2008;82(3-4): 190-204.
- [9] Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009;30(30): 5897-5909.
- [10] 康凯, 曲辉, 汤继权, 等. 利用人骨髓基质干细胞构建组织工程心脏瓣膜的体外实验[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(6):957-962.
- [11] 康凯, 曲辉, 汤继权, 等. 共价结合生长因子的胶原补片改善大鼠室壁瘤修补术后移植细胞生存率的实验研究[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2013, 20(4):451-456.
- [12] Yao J, Jiang SL, Liu W, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 or vascular endothelial growth factor transfection of aged human mesenchymal stem cells enhances cell therapy after myocardial infarction. *Rejuvenation Res.* 2012;15(5):495-506.
- [13] Otto Beitnes J, Oie E, Shahdadfar A, et al. Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function. *Cell Transplant.* 2012;21(8): 1697-1709.
- [14] Tian H, Huang ML, Liu KY, et al. Inhibiting matrix metalloproteinase by cell-based timp-3 gene transfer effectively treats acute and chronic ischemic cardiomyopathy. *Cell Transplant.* 2012;21(5):1039-1053.
- [15] Malliaras K, Marban E. Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed. *Br Med Bull.* 2011;98:161-185.
- [16] Krupnick AS, Kreisel D, Engels FH, et al. A novel small animal model of left ventricular tissue engineering. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21(2):233-243.
- [17] Nakamuta JS, Danoviz ME, Marques FL, et al. Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold. *PLoS One.* 2009;4(6):e6005.
- [18] Zimmermann WH, Didié M, Wasmeier GH, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation.* 2002;106(12 Suppl 1):1151-1157.
- [19] Miyagi Y, Zeng F, Huang XP, et al. Surgical ventricular restoration with a cell- and cytokine-seeded biodegradable scaffold. *Biomaterials.* 2010;31(30):7684-7694.
- [20] Gaetani R, Doevendans PA, Metz CH, et al. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials.* 2012;33(6):1782-1790.
- [21] Lu WN, Lü SH, Wang HB, et al. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(6):1437-1447.
- [22] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2007;100(2):263-272.
- [23] Takahashi H, Yokota T, Uchimura E, et al. Newly developed tissue-engineered material for reconstruction of vascular wall without cell seeding. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(4): 1269-1276.
- [24] Hao X, Silva EA, Månsson-Broberg A, et al. Angiogenic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2007;75(1):178-185.
- [25] Steffens GC, Yao C, Prével P, et al. Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):502-509.
- [26] Wu J, Zeng F, Huang XP, et al. Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. *Biomaterials.* 2011;32(2):579-586.
- [27] 蔡敏倩, 王晓杰, 李校堃. 胶原蛋白海绵的性质及其临床应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(12):2270-2274.
- [28] 迟妍妍, 乐尧金, 刘旭昭, 等. 胶原蛋白海绵的生物特性及体内降解吸收[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(34):5515-5519.
- [29] Yeoh JS, de Haan G. Fibroblast growth factors as regulators of stem cell self-renewal and aging. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(1): 17-24.
- [30] Zhang J, Xie SS, Han XX, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and the signaling mechanism. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011;31(10):1697-1700.
- [31] 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(9 Suppl): II365-371.