

红色荧光基因慢病毒转染骨髓间充质干细胞：表达21 d对细胞活性无影响

尹 飏, 杨逸禧, 杨 波, 王 箭, 黎双庆, 杨富国(广州医科大学附属第三医院骨科, 广东省广州市 510150)

文章亮点:

1 近年来相继报道了利用 HIV-1 慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白基因转染多种细胞的研究。研究结果均表明转染效率高、效果稳定、不影响靶细胞生物学特性及其功能。在多种细胞共培养的实验中, 需要使用不同荧光标记区别各种细胞以确定在共培养体系中各细胞的形态及对该体系的影响。
2 文章特点在于应用慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染体外培养的人骨髓间充质干细胞, 观察增强型红色荧光蛋白在人骨髓间充质干细胞中的表达, 获得其最佳感染复数值, 以研究人骨髓间充质干细胞在动物模型体内发生的形态学和生物学转变, 使其能与其他共培养的细胞得以区别, 从而为后期人骨髓间充质干细胞追踪提供实验依据。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 慢病毒; 增强型红色荧光蛋白; 人骨髓间充质干细胞; 转染; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 慢病毒感染

基金资助:

国家青年科学基金项目(31200726); 广州市应用基础研究项目(2013J4100101)

摘要

背景: 掌握转染的最佳感染复数和产生较强荧光强度的时间, 可为后期观察人骨髓间充质干细胞在动物模型体内的示踪奠定基础。

目的: 探讨 HIV-1 来源的慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞的可行性。

方法: 将第 4 代人骨髓间充质干细胞分成空白组和感染复数为 2, 3, 4 组, 以细胞数 5.0×10^5 个接种于 12 孔培养皿, 添加含有体积分数为 1% 胎牛血清的成人骨髓间充质干细胞完全培养基 1 mL。调整慢病毒携带增强型红色荧光蛋白感染滴度为 1.0×10^{11} TU/L, 加入各组培养皿中病毒液体积分别为 10, 15, 20 μ L, 感染复数分别为 2, 3, 4, 空白组加入 10 μ L PBS。转染后 24, 72 h 荧光倒置显微镜观察细胞红色荧光表达情况并计算出转染率。

结果与结论: 增强型红色荧光蛋白在骨髓间充质干细胞中稳定表达, 转染后 24 h 倒置荧光显微镜下可见红色荧光, 72 h 荧光达到最强, 细胞转染率与感染复数值呈线性增长关系。转染后 21 d 内, 各转染实验组的人骨髓间充质干细胞数量与空白组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 以上结果提示采用 HIV-1 来源的慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白转染标记人骨髓间充质干细胞是可行的, 当感染复数为 4 时转染效率高并可持续表达至少 21 d, 且标记后对其增殖活性无影响。

尹飏, 杨逸禧, 杨波, 王箭, 黎双庆, 杨富国. 红色荧光基因慢病毒转染骨髓间充质干细胞: 表达 21 d 对细胞活性无影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10):1539-1543.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.012

Lentiviral vectors with red fluorescent proteins for transfection of human bone marrow mesenchymal stem cells: the red fluorescent protein can express for 21 consecutive days and exert no effects on cell viability

Yin Biao, Yang Yi-xi, Yang Bo, Wang Le, Li Shuang-qing, Yang Fu-guo (Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: To grasp the optimal multiplicity of infection (MOI) and the time when stronger fluorescence intensities produce can lay the foundation for tracing observation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo* in animal models.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of HIV-1 lentivirus carrying enhanced red fluorescent protein to transfect human bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Human bone marrow mesenchymal stem cells at passage 4 were divided into blank group and MOI 2, 3, 4 groups. After that, the cells were seeded into 12-well plates at a density of 5.0×10^5 , and cultured in 1 mL complete medium for adult bone marrow mesenchymal stem cells containing 1% fetal bovine serum. The infectious titer of lentivirus-carried enhanced red fluorescent protein was adjusted to 1.0×10^{11} TU/L. Lentivirus

尹飏, 男, 1971 年生, 江西省吉安市人, 汉族, 2000 年解放军第一军医大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨关节与脊柱疾病的研究。

通讯作者: 杨波, 主任医师, 教授, 广州医科大学附属第三医院骨科, 广东省广州市 510150

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2015)10-01539-05
稿件接受: 2015-01-18
http://www.crter.org

Yin Biao, Master, Associate chief physician, Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yang Bo, Chief physician, Professor, Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-01-18

solution 10, 15, 20 μL at MOI=2, 3, 4 were respectively added into the MOI 2, 3, 4 groups, and 10 μL PBS was added into the blank group. At 24 and 72 hours after transfection, the expression of red fluorescence was observed under an inverted fluorescence microscope and the transfection efficiency was calculated.

RESULTS AND CONCLUSION: Enhanced red fluorescent protein expressed stably in bone marrow mesenchymal stem cells. At 24 hours after transfection, red fluorescence could be seen under the inverted fluorescence microscope and achieved the peak at 72 hours after transfection. Within 21 days after transfection, there were no differences in the number of human bone marrow mesenchymal stem cells between the MOI 2, 3, 4 groups and blank group ($P > 0.05$). These results show that the HIV-1 lentivirus carrying enhanced red fluorescent protein is feasible to transfect human bone marrow mesenchymal stem cells, with the highest transfection efficiency when the MOI=4, which can express at least for 21 days and have no effects on the proliferative activity of labeled cells.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Lentivirus Infections

Funding: the National Natural Science Foundation of China for the Youth, No. 31200726; the Basic Research for Application of Guangzhou City, No. 2013J4100101

Yin B, Yang YX, Yang B, Wang L, Li SQ, Yang FG. Lentiviral vectors with red fluorescent proteins for transfection of human bone marrow mesenchymal stem cells: the red fluorescent protein can express for 21 consecutive days and exert no effects on cell viability. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(10):1539-1543.

0 引言 Introduction

骨髓中骨髓基质非造血细胞含有的间充质干细胞被认为是一种具有多向分化潜能的细胞, 它可分化成为多种类型的结缔组织, 形成骨、软骨、骨骼肌、肌腱、韧带、真皮、脂肪和骨髓基质^[1-3], 也可分化成神经系统的神经元和神经胶质细胞^[4-6]。研究表明, 骨髓间充质干细胞与内皮细胞混合培养可刺激骨形成蛋白2表达增强, 反过来也调节血管内皮细胞生长因子分泌^[7-9], 表明了骨髓间充质干细胞在骨组织工程学中有重要作用。用荧光蛋白分别标记人脐静脉内皮细胞和人骨髓间充质干细胞, 二者在三维生长环境中可形成缝隙连接, 增强骨原细胞的成骨活性^[9], 分泌旁分泌因子诱导血管样结构的生成, 并且为新生血管提供立体支架与力学支持^[10-11]。在后期实验中通过观察荧光蛋白标记的两种细胞的形态学变化和三维立体结构证实了这一观点。目前实验中荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞常用感染复数在2-4^[12-13]。本实验采用慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞, 观察增强型红色荧光蛋白在人骨髓间充质干细胞中的表达, 获得其最佳感染复数值, 了解慢病毒对人骨髓间充质干细胞生物学特性的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学水平, 体外观察性实验。

时间及地点: 于2014年8至11月在南方医科大学骨与软骨再生医学重点实验室完成。

材料: 人骨髓间充质干细胞、人骨髓间质干细胞完全培养基、人骨髓间质干细胞成脂及成骨诱导液、带有增强型红色荧光蛋白基因的慢病毒(RFP-Lentivirus)购于广州赛业生物科技有限公司, 胎牛血清购于美国Gibco公司, 胰蛋白酶-EDTA与青-链霉素混合液购于北京索莱宝公司。

实验方法:

人骨髓间充质干细胞传代培养与成脂、成骨分化能力测定:

人骨髓间充质干细胞传代培养: 将购入的人骨髓间

充质干细胞用胰酶消化1 min后加入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的成人骨髓间质干细胞完全培养基(含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素)并吹打, 将其置于15 mL离心管中以1 000 r/min离心5 min, 去上清液, 再加入37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的成人骨髓间充质干细胞完全培养基, 吹打均匀, 以1:2比例传代, 接种至25 cm^2 培养瓶中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 细胞培养箱培养。24 h后更换培养液, 以后每隔2 d换液1次, 直至细胞长至80%。

人骨髓间充质干细胞体外诱导成脂分化能力测定: 第4代人骨髓间充质干细胞经消化离心重悬后进行计数并接种于12孔培养皿, 每孔细胞数 5.0×10^5 个, 共接种5个孔, 接种后第2天换人骨髓间质干细胞成脂诱导液, 每天更换1次, 诱导第10天进行油红O染色。

人骨髓间充质干细胞体外诱导成骨分化能力测定: 取第4代人骨髓间充质干细胞经消化离心重悬后进行计数并接种于12孔培养皿, 每孔细胞数 5.0×10^5 个, 共接种5个孔, 接种后第2天换人骨髓间质干细胞成骨诱导液, 每天更换1次, 诱导第10天进行茜素红染色。

人骨髓间充质干细胞的表型鉴定: 取传至第4代人骨髓间充质干细胞, 待细胞长满90%时进行鉴定。常规消化离心重悬, 收集细胞沉淀, PBS洗涤3次, 制成 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞悬液。取细胞悬液100 μL 加入荧光标记的各表型抗体10 μL 孵育, 洗涤后上流式细胞仪检测细胞CD29, CD44, CD71, CD105, CD166, CD14, CD34, CD45表面抗原表达。

慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞: 取传至第4代人骨髓间充质干细胞, 消化离心重悬后平均分成4组, 每组细胞数 5.0×10^5 , 接种于12孔培养皿, 每组4个皿。

各组细胞分别添加含有体积分数为1%胎牛血清的成人骨髓间质干细胞完全培养基1 mL。调整慢病毒携带增强型红色荧光蛋白感染滴度为 1.0×10^{11} TU/L, 加入各组培养皿中病毒液体积分别为10, 15, 20 μL , 感染复数分别为

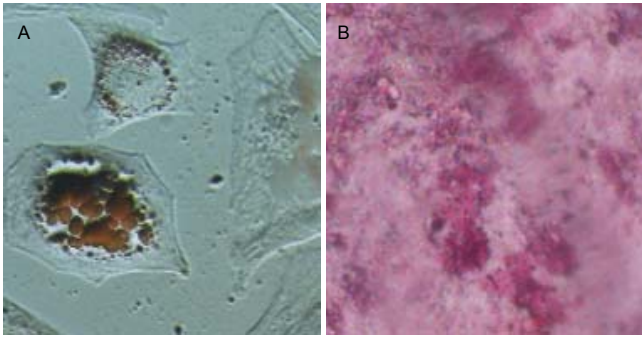


图 1 人骨髓间充质干细胞体外诱导成脂、成骨分化能力($\times 200$)
Figure 1 Adipogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* ($\times 200$)

图注: 图中 A 为骨髓间充质干细胞成脂诱导第 10 天, 光镜下可见细胞内泡状脂滴形成; B 为骨髓间充质干细胞成骨诱导第 10 天, 光镜下可见明显钙质沉积。

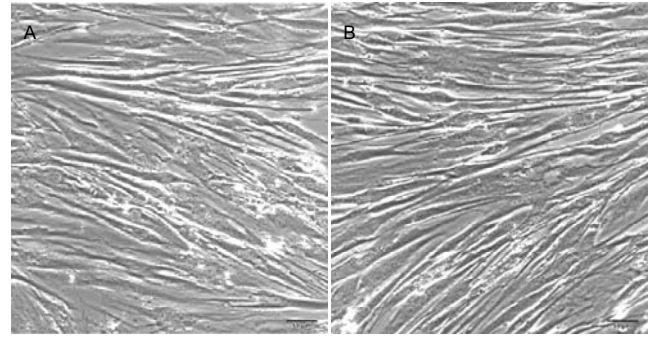


图 3 培养第 14 天人骨髓间充质干细胞形态($\times 100$)
Figure 3 Morphology of human bone marrow mesenchymal stem cells cultured for 14 days ($\times 100$)

图注: 图中 A 显示未转染的第 4 代人骨髓间充质干细胞; B 显示感染复数为 4 慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染的第 4 代人骨髓间充质干细胞。光镜下两组细胞生长状态与形态结构并无太大差异, 细胞碎片及死亡细胞数量较少。

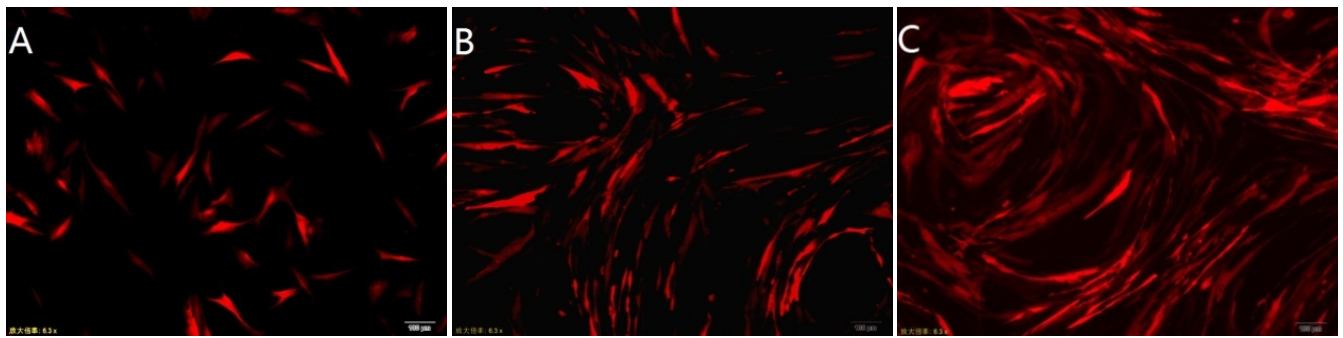


图 2 慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染后人骨髓间充质干细胞的红色荧光表达情况($\times 100$)
Figure 2 Expression of red fluorescence after human bone marrow mesenchymal stem cells transduced with lentiviral vectors carrying enhanced red fluorescent protein ($\times 100$)

图注: 图中 A 为感染复数=2 组, B 为感染复数=3 组, C 为感染复数=4 组。其中感染复数=4 组细胞荧光数量最多, 细胞转染率最高。

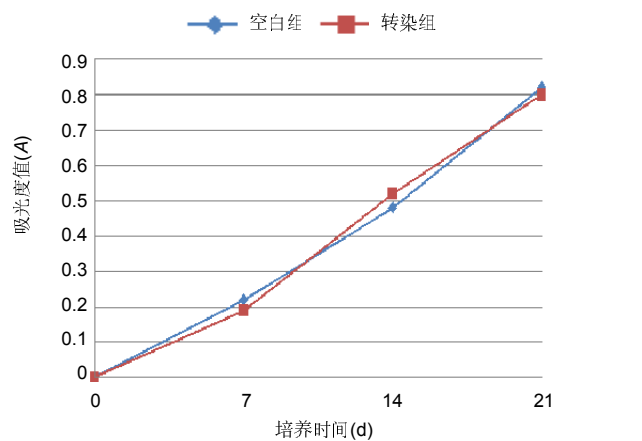


图 4 慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染前后人骨髓间充质干细胞的生长曲线

Figure 4 Growth curves of human bone marrow mesenchymal stem cells before and after infection by lentiviral vectors carrying enhanced red fluorescent protein

图注: 转染组与空白组培养各时间点吸光度值差异无显著性意义。

染率(%)=含荧光蛋白细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染对人骨髓间充质干细胞增殖的影响: 取传至第 4 代人骨髓间充质干细胞, 消化离心重悬后进行计数, 铺入 12 孔细胞培养板, 每孔细胞数 5.0×10^5 , 培养第 0, 7, 14, 21 天在光镜下观察细胞形态及数量, 采用 MTT 法检测细胞存活和生长增殖情况。

主要观察指标: ①增强型红色荧光蛋白在人骨髓间充质干细胞中的表达, 获得其最佳感染复数值。②人骨髓间充质干细胞增殖情况。

2 结果 Results

2.1 人骨髓间充质干细胞表面标志物鉴定 使用流式细胞技术检测人骨髓间充质干细胞表面标志物, 结果显示 CD29、CD44、CD71、CD105、CD166 表达阳性, 而 CD14、CD34、CD45 表达阴性。

2.2 人骨髓间充质干细胞体外诱导成脂分化能力测定 第 4 代人骨髓间充质干细胞经成脂诱导液培养 72 h 后, 细胞出现小脂滴, 继续培养 10 d 后脂滴数量增加并相互融合, 细胞呈长梭形或多边形, 油红 O 染色显示有大量脂质沉淀(图 1A)。

2.3 人骨髓间充质干细胞体外诱导成骨分化能力测定 第4代人骨髓间充质干细胞经成骨诱导培养72 h后, 细胞体积增大, 呈短梭形。诱导第10天细胞质可见钙质沉积并出现钙结节, 经茜素红染色后可呈红色结节(图1B)。

2.4 慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞 第4代人骨髓间充质干细胞经过增强型红色荧光蛋白转染72 h后, 以荧光倒置显微镜观察各组细胞的红色荧光表达情况。感染复数为2, 3, 4组转染24 h后在倒置荧光显微镜绿色光激发下可见细胞呈强度稍弱的红色荧光, 72 h后各组细胞荧光强度达到最高峰, 其中感染复数为4组产生荧光的细胞数量最多(图2)。感染复数为2, 3, 4组的细胞转染率分别为(28.8±1.2)%, (57.2±3.7)%, (90.2±2.9)%。3组细胞持续培养到21 d后细胞所发出的荧光仍未见明显减弱。空白组无红色荧光蛋白表达。

2.5 慢病毒携带增强型红色荧光蛋白转染对人骨髓间充质干细胞增殖影响 在培养第0, 7, 14, 21天利用未转染第4代人骨髓间充质干细胞与感染复数为4的增强型红色荧光蛋白转染人骨髓间充质干细胞作对比, 光镜下两组细胞生长状态与形态结构并无太大差异, 细胞碎片及死亡细胞数量较少(图3)。MTT法测定感染复数为4组细胞数量与空白组比较差异无显著性意义(图4)。

3 讨论 Discussion

人骨髓间充质干细胞易于取材, 在体外可长期培养和大量增殖, 在适宜培养条件下保持其未分化状态。人骨髓间充质干细胞具有多向分化的潜能, 在不同诱导剂下可分化为各种特定细胞。此外, 人骨髓间充质干细胞还具有无免疫原性这一特性, 植入宿主体内无明显免疫排斥反应, 可定向迁移和长期存活, 并保持多向分化潜能, 这为临床提供很大的便利^[14]。

慢病毒载体是在HIV-1病毒基础上改造而成的病毒载体系统, 与一般的反转录病毒载体不同, 慢病毒载体基因组(正链RNA)进入细胞后, 在细胞浆中被其自身携带的反转录酶反转为DNA, 形成DNA整合前复合体, 进入细胞核后, DNA整合到细胞基因组中。整合后的DNA转录mRNA, 回到细胞浆中, 表达目的蛋白或产生RNAi干扰^[15]。慢病毒载体系统具有高效而稳定的基因转移效率, 因而被广泛使用^[16-18]。近年来相继报道了HIV-1慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白基因转染多种细胞的研究。各种研究结果显示, HIV-1慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白转染效率高、效果稳定、不影响靶细胞生物学特性及其功能。本实验使用慢病毒为“自杀”性病毒, 病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞, 也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代, 属于假型病毒因此没有毒性作用。

在本次实验中, 感染复数为4组细胞产生荧光的细胞数量最多, 转染后的细胞在21 d内生长状态与形态结构与未

转染组无明显差异, 证实慢病毒携带增强型红色荧光蛋白可稳定高效转染人骨髓间充质干细胞, 且转染后细胞增殖能力不受慢病毒携带增强型红色荧光蛋白影响。经慢病毒载体系统转染标记的人骨髓间充质干细胞, 后期将会与人脐静脉内皮细胞混合并接种到鼠尾胶原中, 鼠尾胶原凝固后为鼠尾胶原细胞提供一个三维的生长环境, 便于细胞生长和增殖^[19-20]。胶原和纤维蛋白作为支架生成血管的基质具有其独特的创伤修复作用^[21-22], 该基质具有生物降解性, 能提供和自身组织一样的三维环境, 允许细胞在细胞外基质分布和沉积, 也能够分化成任何期望的形状适应组织缺陷大小。支架对于细胞生长不仅具有培养支持作用, 而且还可以通过机械的和生物化学的信号渠道影响着细胞的增殖。

人骨髓间充质干细胞与人脐静脉内皮细胞在适宜条件下混合培养会自发形成有管腔结构的微血管网, 3周左右时间可形成广泛稳定的血管网^[23], 而且可以为新骨的生成提供营养物质和调节骨祖细胞的增殖分化^[24], 二者相互作用可以生成血管样结构^[25-27]。可持续表达21 d红色荧光蛋白的人骨髓间充质干细胞, 满足了后续试验中将该种细胞植入动物模型中检测其形态学和生物学改变的时间要求。人骨髓间充质干细胞与内皮细胞存在合作与协同关系从而形成新生微血管网^[28-30], 这一点可以通过后期影像学得到证实。HIV-1慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白转染多种细胞转染效率高、效果稳定、不影响靶细胞生物学特性及其功能。在多种细胞共培养的实验中, 需要使用荧光标记区别各种细胞以确定在共培养体系中各细胞的形态及对该体系的影响。而近年来关于人骨髓间充质干细胞与多种细胞共培养的实验也逐渐增加, 最佳的转染效果能够保证该细胞在实验中被充分观察与评估。本次实验证实, 采用 HIV-1来源的慢病毒载体介导增强型红色荧光蛋白转染标记人骨髓间充质干细胞是可行的, 当感染复数为4时对细胞生长影响小, 转染效率高, 这为指导后续实验提供了重要参考。

致谢: 感谢南方医科大学骨与软骨再生实验室提供实验场地和相关实验设备。

作者贡献: 实验设计为第四作者, 实验实施为第二作者, 实验评估为第一作者, 资料收集为第二作者。第一作者成文, 第三作者审校, 第一对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 人骨髓间充质干细胞购于广州赛业生物科技有限公司, 实验获得广州医科大学附属第三医院医学伦理委员会批准。

学术术语: 感染复数(multiplicity of infection, MOI)传统的感染复数概念起源于噬菌体感染细菌的研究。噬菌体的数量单位为 pfu(plaque forming unit, 空斑形成单位)。一般认为感染复数是一个比值, 没有单位, 其实其隐含的单位是 pfu number/cell。后来感染复数被普遍用于病毒感染细胞的研究中, 含义是感染时病毒与细胞数量的比值。

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] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64(2): 278-294.
- [2] Santa María L, Rojas CV, Minguell JJ. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2004;300(2):418-426.
- [3] Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(8):980-985.
- [4] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282(1):148-152.
- [5] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(19):10711-10716.
- [6] Wu YX, Zhang JH, Ben XM. Neuronal-like cell differentiation of non-adherent bone marrow cell-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res.* 2013;8(22): 2078-2085.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Villars F, Guillotin B, Amédée T, et al. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(4):C775-C785.
- [10] Merfeld-Clauss S, Gollahalli N, March KL, et al. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(9):2953-2966.
- [11] Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, et al. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood.* 2009;114(24):5091-5101.
- [12] 罗毅, 辛毅, 张颖. GFP和RFP报道基因在人体不同细胞中转导率的比较研究[J]. *北京生物医学工程*, 2011, 30(1):20-25.
- [13] 张颖, 辛毅, 汪劲松, 等. 绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白共转染骨髓间充质干细胞鼠心肌细胞、Eahy926细胞表达特征的共聚集分析[J]. *新乡医学院学报*, 2011, 28(2):147-151.
- [14] Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des.* 2005;11(10):1255-1265.
- [15] Lasek AW, Azouaou N. Virus-delivered RNA interference in mouse brain to study addiction-related behaviors. *Methods Mol Biol.* 2010;602:283-298.
- [16] Tannemaat MR, Verhaagen J, Malessy M. The application of viral vectors to enhance regeneration after peripheral nerve repair. *Neural Res.* 2008;30(10):1039-1046.
- [17] Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol.* 2010; (197):143-170.
- [18] Pan S, Wan JZ, Liu SS, et al. Lentivirus carrying the Atoh1 gene infects normal rat cochlea. *Neural Regen Res.* 2013;8(17): 1551-1559.
- [19] Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.* 2003; 22(1):81-91.
- [20] de Isla N, Huselstein C, Jessel N, et al. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Biomed Mater Eng.* 2010;20(3):127-133.
- [21] Dietrich F, Lelkes PI. Fine-tuning of a three-dimensional microcarrier-based angiogenesis assay for the analysis of endothelial-mesenchymal cell co-cultures in fibrin and collagen gels. *Angiogenesis.* 2006;9(3):111-125.
- [22] Martineau L, Doillon C. J. Angiogenic response of endothelial cells seeded dispersed versus on beads in fibrin gels. *Angiogenesis.* 2007;10(4):269-277.
- [23] Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, et al. Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(8):3311-3316.
- [24] 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.
- [25] Shepherd BR, Jay SM, Saltzman WM, et al. Human aortic smooth muscle cells promote arteriole formation by coengrafted endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(1): 165-173.
- [26] Au P, Tam J, Fukumura D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood.* 2008;111(9):4551-4558.
- [27] Ghanaati S, Fuchs S, Webber MJ, et al. Rapid vascularization of starch-poly(caprolactone) in vivo by outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5(6):e136-143.
- [28] Wang ZZ, Au P, Chen T, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol.* 2007;25(3):317-318.
- [29] Koike N, Fukumura D, Gralla O, et al. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature.* 2004;428 (6979): 138-139.
- [30] Nguyen LL, D'Amore PA. Cellular interactions in vascular growth and differentiation. *Int Rev Cytol.* 2001;204:1-48.