

## 不同静电纺丝膜上骨髓间充质干细胞的黏附、增殖与成血管平滑肌分化

孙现娟<sup>1</sup>, 王秋花<sup>1</sup>, 张锦艺<sup>1</sup>, 杨杨杨<sup>1</sup>, 王文双<sup>2</sup>, 张晓晴<sup>1</sup><https://doi.org/10.12307/2025.217>

投稿日期: 2023-11-29

采用日期: 2024-01-16

修回日期: 2024-02-22

在线日期: 2024-03-08

中图分类号:

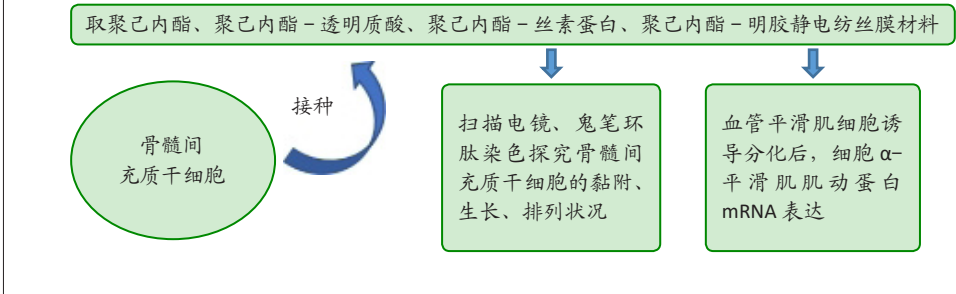
R459.9; R318; R654

文章编号:

2095-4344(2025)04-00661-09

文献标识码: A

文章快速阅读: 4种静电纺丝膜材料上骨髓间充质干细胞的增殖、黏附及成血管平滑肌分化



文题释义:

血管组织工程: 利用血管壁的正常细胞和生物可降解材料来制备、重建和再生血管的科学。

骨髓间充质干细胞: 是最早发现的间充质干细胞, 来源于发育早期的中胚层和外胚层, 具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点。

摘要

背景: 临床上迫切需要小口径人工血管来治疗冠状动脉和外周动脉疾病, 目前, 血管组织工程已成为制备小口径人工血管的主要方法, 选择合适的生物材料和细胞来源是小口径组织工程血管构建成功的关键因素。

目的: 观察4种静电纺丝膜材料对骨髓间充质干细胞增殖、黏附及分化为血管平滑肌细胞的影响。

方法: 分离提取SD大鼠骨髓间充质干细胞。将骨髓间充质干细胞分别接种于聚己内酯(PCL)、聚己内酯-透明质酸(PCL-HA)、聚己内酯-丝素蛋白(PCL-SF)、聚己内酯-明胶(PCL-GEL)静电纺丝膜材料上, 培养1, 3, 7 d后, 扫描电镜下观察材料上的细胞排布, 鬼笔环肽染色观察材料上的细胞增殖与黏附, qRT-PCR检测材料上细胞分泌的CD90、Meflin、转化生长因子 $\beta$  mRNA表达; 向血管平滑肌细胞诱导分化7 d后, qRT-PCR检测材料上细胞 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达。结果与结论: ①扫描电镜下可见骨髓间充质干细胞在4种静电纺丝膜上均沿着静电纺丝膜的纤维走向排列; ②鬼笔环肽染色显示, 骨髓间充质干细胞在4种静电纺丝膜上分布规律, 均沿着纤维走向呈现平行分布, 并且PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL静电纺丝膜较PCL静电纺丝膜更有利于骨髓间充质干细胞的增殖、黏附, PCL-SF静电纺丝膜相较于PCL-HA、PCL-GEL静电纺丝膜更有利于骨髓间充质干细胞的增殖、黏附; ③qRT-PCR检测显示, 4种静电纺丝膜材料均可维持骨髓间充质干细胞CD90和Meflin的mRNA表达, 组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL组培养1, 7 d的转化生长因子 $\beta$  mRNA表达高于PCL组( $P < 0.05$ ), PCL-SF组培养3, 7 d的转化生长因子 $\beta$  mRNA表达高于其他3组( $P < 0.05$ ), PCL-HA组培养7 d的转化生长因子 $\beta$  mRNA表达高于PCL-GEL组( $P < 0.05$ ); ④qRT-PCR检测显示, PCL-SF组 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达高于其他3组( $P < 0.05$ ), PCL-HA组 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达高于PCL组( $P < 0.05$ ); ⑤结果表明: 相较于PCL、PCL-HA、PCL-GEL静电纺丝膜, PCL-SF静电纺丝膜与骨髓间充质干细胞结合更适合制备小口径组织工程血管。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 小口径组织工程血管; 静电纺丝; 聚己内酯; 聚己内酯-透明质酸; 聚己内酯-丝素蛋白; 聚己内酯-明胶

缩略语: 聚己内酯: polycaprolactone, PCL; 丝素蛋白: silk fibroin, SF; 透明质酸: hyaluronic acid, HA; 明胶: gelatine, GEL

## Adhesion, proliferation, and vascular smooth muscle differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes

Sun Xianjuan<sup>1</sup>, Wang Qihua<sup>1</sup>, Zhang Jinyi<sup>1</sup>, Yang Yangyang<sup>1</sup>, Wang Wenshuang<sup>2</sup>, Zhang Xiaoqing<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Gynecology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China<sup>1</sup>滨州医学院基础医学院, 人体解剖与组织胚胎学教研室, 生物材料与组织再生国际合作联合实验室, 山东省烟台市 264003; <sup>2</sup>烟台毓璜顶医院妇科, 山东省烟台市 264000

第一作者: 孙现娟, 女, 1998年生, 山东省临沂市人, 汉族, 硕士, 主要从事生物材料与组织再生研究。

共同第一作者: 王秋花, 女, 1999年生, 山东省德州市人, 汉族, 硕士, 主要从事生物材料与组织再生研究。

通讯作者: 张晓晴, 教授, 滨州医学院基础医学院, 人体解剖与组织胚胎学教研室, 生物材料与组织再生国际合作联合实验室, 山东省烟台市 264003

共同通讯作者: 王文双, 主任医师, 烟台毓璜顶医院妇科, 山东省烟台市 264000

<https://orcid.org/0009-0001-0155-6129>(孙现娟); <https://orcid.org/0009-0006-1656-6676>(王秋花)

基金资助: 山东省自然科学基金-青年基金项目(ZR2021QC034), 项目负责人: 张晓晴; 泰山学者青年项目(tsqn202103111),

项目负责人: 张晓晴

引用本文: 孙现娟, 王秋花, 张锦艺, 杨杨杨, 王文双, 张晓晴. 不同静电纺丝膜上骨髓间充质干细胞的黏附、增殖与成血管平滑肌分化 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(4):661-669.



Sun Xianjuan, Master, School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China  
 Wang Qiuhua, Master, School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China  
 Sun Xianjuan and Wang Qiuhua contributed equally to this article.

**Corresponding author:** Zhang Xiaqing, Professor, School of Basic Medical Sciences, Binzhou Medical University, Department of Human Anatomy and Histoembryology, Joint Laboratory for International Cooperation in Biomaterials and Tissue Regeneration, Yantai 264003, Shandong Province, China

**Co-corresponding author:** Wang Wenshuang, Chief physician, Department of Gynecology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Small diameter artificial vessels are urgently needed to treat coronary artery and peripheral artery diseases in clinical practice. At present, vascular tissue engineering has become the main method for preparing small diameter artificial vessels. Selecting suitable biomaterials and cell sources is the key factor for successful construction of small diameter tissue engineered vessels.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of four kinds of electrospinning membrane materials on proliferation, adhesion and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular smooth muscle cells.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and extracted from SD rats. The bone marrow mesenchymal stem cells were inoculated separately on polycaprolactone (PCL), polycaprolactone-hyaluronic acid (PCL-HA), polycaprolactone-silk-filament proteins (PCL-SF), and polycaprolactone-gelatin (PCL-GEL) electrospinning membrane materials. After 1, 3, and 7 days of culture, the cell arrangement on the material was observed under scanning electron microscope. The proliferation and adhesion of the material were observed by phalloidin staining. The mRNA expressions of CD90, Mefflin, and transforming growth factor  $\beta$  were detected by qRT-PCR. After 7 days of induced differentiation into vascular smooth muscle cells, the mRNA expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin on the material was detected by qRT-PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Bone marrow mesenchymal stem cells were arranged along the fibers of the four kinds of electrospinning membranes under scanning electron microscopy. (2) Phalloidin staining showed the regular distribution of bone marrow mesenchymal stem cells on the four kinds of electrospinning membranes and parallel distribution along the fiber direction. Moreover, PCL-HA, PCL-SF, and PCL-GEL electrospinning membranes were more conducive to the proliferation and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells than PCL electrospinning membranes. Compared with PCL-HA and PCL-GEL electrospinning membranes, PCL-SF electrospinning membranes were more conducive to the proliferation and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells. (3) qRT-PCR showed that the four kinds of electrospun membrane materials could maintain the mRNA expression of CD90 and Mefflin in bone marrow mesenchymal stem cells, but there was no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). The mRNA expression of transforming growth factor  $\beta$  in PCL-HA, PCL-SF, and PCL-GEL groups was higher than that in PCL group on days 1 and 7 ( $P < 0.05$ ), and the mRNA expression of transforming growth factor  $\beta$  in PCL-SF group was higher than that in the other three groups on days 3 and 7 ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of transforming growth factor  $\beta$  in PCL-HA group was higher than that in PCL-GEL group on day 7 ( $P < 0.05$ ). (4) qRT-PCR showed that the mRNA expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin in PCL-SF group was higher than that in the other three groups ( $P < 0.05$ ), and that in PCL-HA group was higher than that in PCL group ( $P < 0.05$ ). (5) The results indicate that compared with PCL, PCL-HA and PCL-GEL electrospinning membranes, PCL-SF electrospinning membranes combined with bone marrow mesenchymal stem cells are more suitable for the preparation of small diameter tissue engineered vessels.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cell; small diameter tissue engineered vessels; electrospinning; polycaprolactone; polycaprolactone-hyaluronic acid; polycaprolactone-silk fibroin; polycaprolactone-gelatin

**Funding:** Shandong Natural Science Foundation-Youth Fund Project, No. ZR2021QC034 (to ZXQ); Mount Taishan Scholar Youth Project, No. tsqn202103111 (to ZXQ)

**How to cite this article:** SUN XJ, WANG QH, ZHANG JY, YANG YY, WANG WS, ZHANG XQ. Adhesion, proliferation, and vascular smooth muscle differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(4):661-669.

## 0 引言 Introduction

心血管疾病是全球死亡的主要原因，其中发病率较高的是冠状动脉和外周动脉疾病<sup>[1]</sup>，血管疾病的高发使得临床上迫切需要与天然血管机械性能相似、具有良好生物相容性且能促进血管组织再生的小口径组织工程血管<sup>[2-3]</sup>，但是目前小口径组织工程血管因机械性能差、通畅率低等尚未被成功批准临床应用<sup>[4]</sup>。能够模拟天然血管细胞外基质的生物材料支架和血管组织细胞是用于构建小口径组织工程血管的重要组成部分<sup>[5-6]</sup>。

前期研究发现，成熟的血管组织细胞（如血管平滑肌细胞）存在增殖能力差、细胞凋亡率高的缺点<sup>[7]</sup>，不适合小口径血管组织工程应用。间充质干细胞具有较强自我更新和多向分化的能力，可参与免疫调节、抑制炎症反应，其分泌的生长因子和细胞因子等可以调控组织微环境，从而促进组织修复、再生，因此间充质干细胞具有用于小口径血管组织工程的潜能<sup>[8]</sup>。前期研究发现，骨髓间充质干细胞作为来源最早的间充质干细胞可以被分化为血

管平滑肌细胞<sup>[9-10]</sup>，并且支持造血功能<sup>[11]</sup>，因此骨髓间充质干细胞或许是制备小口径组织工程血管可靠的细胞来源之一。

用于制备支架的生物材料可分为天然生物材料和合成高分子生物材料两大类<sup>[12]</sup>，应用广泛的天然生物材料有丝素蛋白、透明质酸、明胶等。丝素蛋白（silk fibroin, SF）与静电纺丝的结合是一种很有前途的组织工程支架制备方法，蚕丝纤维的来源多种多样，如蜘蛛、蚕、蝎子、螨虫和苍蝇，其中蚕丝是生物医学器械发展的良好来源，具有良好的生物相容性、可调节的生物降解性及良好的机械性能，独特的弹性和强度以及与哺乳动物细胞的相容性使其成为一种有吸引力的组织工程材料<sup>[13-17]</sup>。透明质酸（hyaluronic acid, HA）是一种非硫酸基糖胺聚糖，是皮肤细胞外基质的主要成分，参与炎症反应、血管生成和组织再生过程，还具有具有良好的生物相容性、生物降解性和亲水性等，是组织工程领域中应用较广泛的天然生物材料<sup>[18-21]</sup>。明胶（gelatine, GEL）具有良好的生物相容

性、可生物降解性及非免疫原性, 其与软骨中的胶原纤维具有相似的肽链, 可以促进细胞的黏附和增殖, 在医疗领域中被用作支架、器械涂层、伤口敷料、组织黏合剂等<sup>[22]</sup>。然而, 天然生物材料普遍存在降解速率快、力学性能较差等问题, 需要进行修饰以提高其稳定性<sup>[12]</sup>。

与天然生物材料相比, 合成高分子生物材料具有更好的机械强度和可调节的降解速率, 如聚己内酯 (polycaprolactone, PCL)。PCL 是 FDA 批准的一种可降解高分子合成材料, 前期研究发现其具有良好的机械性能, 可以承受动脉血流剪切应力和应变压力<sup>[23]</sup>。然而, PCL 存在降解速率慢、亲水性差、缺乏细胞黏附位点、生物相容性较差等缺点<sup>[24]</sup>, 因此 PCL 小口径人工血管与体内血管组织的结合效率低<sup>[25]</sup>。故很多研究为了结合天然生物材料和合成高分子生物材料的优点, 选择将两者结合形成复合材料用于组织再生<sup>[26-27]</sup>。PCL 复合材料在许多组织修复、再生研究中都有应用, 但是目前尚无研究对 PCL 复合材料进行系统地对比, 以筛选出更适合用于小口径组织工程血管制备的 PCL 复合生物材料。

此次实验从大鼠胫骨和股骨内提取骨髓间充质干细胞并进行一系列相关鉴定, 随后将骨髓间充质干细胞接种于 PCL、PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL 静电纺丝膜上, 通过扫描电镜、鬼笔环肽染色、qRT-PCR 等实验探究骨髓间充质干细胞在不同材料上的黏附、增殖、排列、细胞因子表达及向血管平滑肌细胞分化等情况, 以此筛选出较适合骨髓间充质干细胞生长的复合生物材料, 旨在为小口径组织工程血管的构建提供更有利的选择。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验, 生物分子学实验, 多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 3-10 月在滨州医学院基础医学院完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 8 周龄雄性 SD 大鼠 3 只, 体质量 (250±30) g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号: SCXK(鲁)20230002。自由进水及饮食, 适应性喂养 1 周后进行实验。实验方案已通过滨州医学院动物伦理委员会审查通过, 伦理审批号: 伦研批第 2022-019 号。

1.3.2 静电纺丝膜材料 PCL(西安昊然生物科技有限公司, 货号: 7104)、PCL-HA(西安昊然生物科技有限公司, 货号: CP\_20230206009)、PCL-SF(西安昊然生物科技有限公司, 货号: CP\_20230206010)、PCL-GEL(西安昊然生物科技有限公司, 货号: CP\_20230206007)。

1.3.3 试剂与器材 DMEM 培养基(赛澳美细胞技术有限公司); 胎牛血清(上海金畔生物科技有限公司); CD90、

CD29、CD45 抗体 (Biolegend 公司); 成脂诱导分化试剂盒 (上海恩吉斯生物科技有限公司); 成骨诱导分化试剂盒 (上海恩吉斯生物科技有限公司); 成软骨诱导分化试剂盒 (上海恩吉斯生物科技有限公司); 转化生长因子  $\beta 1$  抗体 (亚科因生物技术有限公司); 结晶紫 (索莱宝公司); 罗丹明标记鬼笔环肽 (索莱宝公司); 戊二醛 (麦克林公司); 基因引物 (烟台润泽生物科技有限公司); RNA 反转录试剂盒 (诺唯赞公司); SYBR Green PCR 试剂盒 (诺唯赞公司); 荧光倒置显微镜 (美国 Echo 公司); CO<sub>2</sub> 培养箱 (上海力新仪器有限公司); 电镜扫描仪 (蔡司); PCR 仪 (罗氏公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的提取与原代培养 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 过量麻醉处死 SD 大鼠, 用体积分数 75% 乙醇浸泡 15 min 消毒, 无菌条件下取出胫骨和股骨 (尽量保持 2 个髁的完整, 剔除附在骨头上的肌肉) 放在无菌加 1% 青链霉素混合液的 PBS 中清洗 2 次; 切除胫骨和股骨的髁, 采用 1 mL 注射器用 DMEM 低糖完全培养基 (含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液) 冲洗髓质至无菌离心管中, 用针头轻轻地上下拉几次, 以产生单细胞悬浮液, 反复冲洗直到骨头变白; 1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清; 用无菌 PBS 清洗并再次离心 (1 200 r/min 离心 10 min), 收集细胞沉淀, 用 5 mL DMEM 低糖完全培养基重悬, 接种在培养瓶中, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱内进行原代培养。24 h 观察细胞贴壁后, 去除培养基用 PBS 轻轻冲洗, 去除未贴壁细胞, 加入新鲜培养基后继续培养, 每 3 d 更换 1 次培养基。

待原代细胞达 80%-90% 融合度时, 吸弃原培养基, 用无菌 PBS 清洗 2 遍; 加入 2 mL 37 °C 预热的含 0.01% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中消化 2 min, 显微镜下观察细胞多数脱落后加入 2 mL 预热的 DMEM 低糖完全培养基中和消化液, 用移液枪反复吹打混匀; 移入离心管中进行离心 (1 200 r/min 离心 5 min), 弃上清液, 用 2 mL DMEM 低糖完全培养基重悬细胞沉淀, 按照 1 : 2 比例进行传代扩增培养。细胞传至第 3 代后进行相关实验。倒置显微镜下连续观察原代及多次传代大鼠骨髓间充质干细胞的形态、密度及融合度等生长状况, 拍照记录。

### 1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定

流式细胞术检测目的细胞表面抗原: 取第 5 代骨髓间充质干细胞, 用胰蛋白酶消化收集细胞并用预冷的 PBS 清洗细胞, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 得到细胞沉淀, 用流式细胞缓冲液将细胞稀释至  $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。每个 EP 管中加入 50  $\mu\text{L}$  细胞样品及 45  $\mu\text{L}$  缓冲液, 分别加入 5  $\mu\text{L}$  CD90(PE)、CD29(FITC)、CD45(APC) 抗体, 混合后 4 °C 避光孵育 40 min; 4 °C, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用

预冷的 PBS 清洗 2 次, 加入 500  $\mu$ L 缓冲液重悬于流式上样管中, 立即上机检测。

**成脂诱导分化实验:** 取第 5 代骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度达到 100% 或过融合时加入成脂诱导培养液 (含体积分数为 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 青链霉素混合液、0.2% 胰岛素、0.2% 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.1% 罗格列酮、0.1% 地塞米松的成脂诱导分化基础培养基) 继续培养。以未加入成脂诱导液为对照。间隔 2 d 更换 1 次诱导液。诱导 21 d 后, 在光镜下可观察到细胞形态改变, 胞浆中出现大量脂滴时使用油红 O 染液对脂滴进行染色, 观察脂滴染色情况。

**成骨诱导分化实验:** 取第 5 代骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度达到 60%–70% 时加入成骨诱导培养液 (含体积分数为 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 青链霉素混合液、0.2% 抗坏血酸、0.01% 地塞米松、1%  $\beta$ -甘油磷酸钠的成骨诱导分化基础培养基) 继续培养。以未加入成骨诱导液为对照。间隔 2 d 更换 1 次诱导液。成骨诱导 21 d 后, 观察细胞的形态的改变及产生钙结节数量, 用茜素红染液对细胞进行染色, 观察染色情况。

**成软骨诱导分化实验:** 取第 5 代骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度达到 90%, 加入成软骨诱导培养液 (含体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液、0.1% 脯氨酸、0.3% 抗坏血酸、1% 转化生长因子  $\beta$ 1、1% 丙酮酸钠、1% ITS 添加物的成软骨诱导分化基础培养基) 继续培养。间隔 2 d 更换 1 次诱导液。以未加入成软骨诱导液为对照。成软骨诱导 21 d 后, 观察细胞形态的改变, 用阿利新蓝染液对细胞进行染色, 观察染色情况。

**成血管平滑肌细胞诱导分化实验:** 取第 5 代骨髓间充质干细胞接种于 96 孔板中, 培养至细胞融合度达到 90%, 实验组加入成血管平滑肌细胞诱导培养液 (含 5 ng/mL 转化生长因子  $\beta$ 1、体积分数 1% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基), 以加入含体积分数 1% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基为对照。诱导 1 周后, 显微镜下观察细胞形态, 利用 Image J 软件分析细胞长度与细胞面积。

**1.4.3 骨髓间充质干细胞集落形成实验** 取第 5 代骨髓间充质干细胞接种于 6 孔板中, 每孔 40 个细胞。培养 14 d 后, 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 用蒸馏水清洗 2 次, 3% 结晶紫染色 10 min, 用蒸馏水清洗后显微镜下观察染色情况。集落数 =  $n$  孔中细胞集落数总和 /  $n$  孔, 集落形成率 = 集落数 / 接种细胞总数  $\times$  100%。

**1.4.4 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜材料上的培养** 将 PCL、PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL 静电纺丝膜材料剪成 8 mm $\times$ 8 mm 大小, 放入 48 孔板中, 每孔加 500  $\mu$ L 体积分数 75% 乙醇过夜消毒, 次日将乙醇吸出, 将 48 孔板开

盖放于超净台下静置 15 min, 并用 DMEM 低糖培养基浸泡 15 min, 确保无残留的乙醇。取  $5 \times 10^4$  个骨髓间充质干细胞分别种于 PCL、PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL 静电纺丝膜上, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 在不同时间点进行以下检测。

**材料上的细胞排布:** 培养第 2 天时吸弃培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 2.5% 戊二醛固定 4 h; 用 PBS 清洗 3 次, 每次 15 min; 分别用体积分数 30%, 50%, 70%, 90%, 100% 乙醇进行梯度脱水, 各 2 次, 每次 10 min; 放在通风橱下过夜, 自然风干; 次日制样, 喷金, 于电镜扫描仪下观察并拍照。

**材料上的细胞增殖与黏附:** 以聚苯乙烯上培养的细胞为对照。培养第 1, 3, 7 天时, 吸弃培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min; 用 PBS 清洗两三次, 每次 10 min; 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min; 用 PBS 清洗两三次, 每次 10 min; 取 200  $\mu$ L 配制好的 TRITC 标记鬼笔环肽工作液滴于细胞上室温避光孵育 30 min; 用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用 200  $\mu$ L DAPI 溶液 (100 nmol/L) 对细胞核复染 30 s; 用 PBS 清洗, 滴加抗荧光衰减剂封固, 在荧光显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件分析细胞数量与黏附面积。

**材料上细胞因子表达检测:** 培养第 1, 3, 7 天时, 吸弃培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 将材料转移至 1.5 mL EP 管中, 用眼科剪将材料剪碎, 提取总 RNA。将测定好的 RNA 放于冰上溶解, 根据测定好的浓度, 计算出 500 ng RNA 所需体积用于后续反转录。在 RNase-free 的 PCR 管中配制混合液, 所有试剂加完混合均匀后, 放入 PCR 仪中 (42  $^{\circ}$ C 2 min); 在上述 PCR 管中直接加入 4  $\mu$ L 5 $\times$ HiScript II qRT SuperMix II, 混合均匀后用掌上离心机离心, 放入 PCR 仪中 (50  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s)。将反转录得到的 cDNA 稀释 10 倍放于冰上备用, 在 2 mL RNase-free EP 管配制混合液, 将混合液加入到八排管中, 用掌上离心机离心后放入 PCR 仪器中: 预变性, 95  $^{\circ}$ C 30 s; 循环反应 (40 个循环), 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s; 熔解曲线, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s。以 GAPDH 作为内参, 检测 CD90、Meflin、转化生长因子  $\beta$  mRNA 的相对表达量, 使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法进行半定量分析。引物序列见表 1。

表 1 | qRT-PCR 检测引物序列  
Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列 (5'-3')
转化生长因子 $\beta$ -F	CAT TGC TGT CCC GTG CAG A
转化生长因子 $\beta$ -R	AGG TAA CGC CAG GAA TTG TTG CTA
CD90-F	CAC TCT CCT GCT TTC AGT CTT GC
CD90-R	GGC TGA ACT CAT GCT GGA TGG
Meflin-F	GCC CCT ATG GTC AGG CAC AT
Meflin-R	TCG GCA TCC ACT GAC TGG AAC
$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 -F	CGT GAC TAC TGC TGA GCG TGA
$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 -R	TGC CCA TCA GGC AGT TCG TAG

1.4.5 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上的成血管平滑肌细胞分化 取第5代骨髓间充质干细胞种于PCL、PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL静电纺丝膜上,细胞数量为 $5 \times 10^4$ ,加入用DMEM低糖培养基(含有体积分数1%胎牛血清和5 ng/mL转化生长因子 $\beta 1$ )培养1周,诱导分化为血管平滑肌细胞。诱导结束后,采用qRT-PCR检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达情况。检测方法同上。

1.5 主要观察指标 4种静电纺丝膜对骨髓间充质干细胞增殖、黏附及向血管平滑肌细胞分化的影响。

1.6 统计学分析 所有实验数据应用Graphpad Prism 8.02软件和Image J软件进行数据处理和统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,其中 $P < 0.05$ 表示数据差异有显著性意义,所有实验结果均为独立重复3次的实验结果。该文统计学方法已经滨州医学院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 原代骨髓间充质干细胞形态 原代培养3 d后细胞已贴壁并开始伸展,细胞形态一致,呈纺锤形,增殖速度较快,见图1。

2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定

2.2.1 流式细胞术检测细胞表面抗原 第5代骨髓间充质干细胞高表达CD90、CD29,阳性表达率分别为(99.7 $\pm$ 0.3)%, (99.6 $\pm$ 0.6)%;低表达CD45,阳性表达率为(2.2 $\pm$ 0.4)%,见图2。

2.2.2 成脂诱导分化潜能 成脂诱导21 d后细胞逐渐由纺锤形变成多边形或者圆形,胞浆内聚集了大小不等的脂滴,经油红O染色后脂滴呈鲜红色,见图3。

2.2.3 成骨诱导分化潜能 成骨诱导21 d后,细胞逐渐由纺锤形变成多边形,可见大量钙盐沉积的矿化结节,经茜素红染色后可见深红色的结节,见图3。

2.2.4 成软骨诱导分化潜能 成软骨诱导21 d后,细胞逐渐由纺锤形变成不规则形,有小结节形成,经阿利新蓝染色后细胞呈蓝色,见图3。

2.2.5 诱导分化为血管平滑肌细胞实验 经诱导分化1周后,实验组细胞形态变得狭长,细胞面积增大,呈山谷状,末端重叠生长,对照组细胞仍然保持骨髓间充质干细胞原有的纺锤形,见图4。

2.3 骨髓间充质干细胞集落形成实验 骨髓间充质干细胞集落形成率为(92.5 $\pm$ 2.25)%,见图5。

2.4 骨髓间充质干细胞在静电纺丝膜材料上的排布 扫描电镜下可见骨髓间充质干细胞在PCL、PCL-SF、PCL-GEL、PCL-HA静电纺丝膜上均沿着静电纺丝膜的纤维走向排列,见图6。

2.5 骨髓间充质干细胞在静电纺丝膜材料上的黏附与增殖 鬼笔环肽染色显示,骨髓间充质干细胞在聚苯乙烯板中

的分布杂乱,在PCL、PCL-SF、PCL-GEL、PCL-HA静电纺丝膜上分布规律,均沿着纤维走向呈现平行分布,见图7;PCL、PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL静电纺丝膜较聚苯乙烯板更利于骨髓间充质干细胞的黏附和增殖,PCL-HA、PCL-SF、PCL-GEL静电纺丝膜较PCL静电纺丝膜更有利于骨髓间充质干细胞的增殖和黏附,同时PCL-SF静电纺丝膜上的细胞黏附面积及细胞数目较PCL、PCL-GEL、PCL-HA静电纺丝膜增多,见图8。

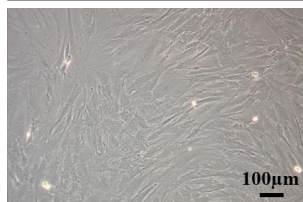
2.6 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜材料上细胞因子表达 qRT-PCR检测结果显示,4种静电纺丝膜均能维持骨髓间充质干细胞CD90和Meflin mRNA的表达,组间比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ );培养第1,7天时,PCL-HA组、PCL-SF组、PCL-GEL组的转化生长因子 $\beta$  mRNA表达要高于PCL组( $P < 0.05$ );培养在第3,7天时,PCL-SF组转化生长因子 $\beta$  mRNA表达高于PCL组、PCL-HA组、PCL-GEL组( $P < 0.05$ );培养第7天时,PCL-HA组转化生长因子 $\beta$  mRNA表达也高于PCL-GEL组( $P < 0.05$ ),见图9。

2.7 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜材料上诱导分化为血管平滑肌细胞实验 qRT-PCR检测结果显示,PCL-SF组 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达高于PCL、PCL-HA、PCL-GEL组( $P < 0.05$ ),PCL-HA组 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白mRNA表达高于PCL组( $P < 0.05$ ),见图10。

## 3 讨论 Discussion

根据世界卫生组织数据显示,心血管疾病是世界范围内死亡的主要原因,其中发病率较高的为冠状动脉和外周动脉疾病<sup>[28]</sup>,自体小口径血管(大隐静脉、乳内动脉等)旁路移植术是治疗此类疾病的金标准方案<sup>[29]</sup>,然而,高龄、基础病、前期旁路移植术等导致自体小口径血管不可用,故临床上迫切需要与天然血管性能相似的小口径人工血管来治疗此类疾病。可靠的细胞来源和能够模拟天然血管细胞外基质的生物材料支架是用于构建小口径组织工程血管的重要组成部分<sup>[5-6]</sup>。

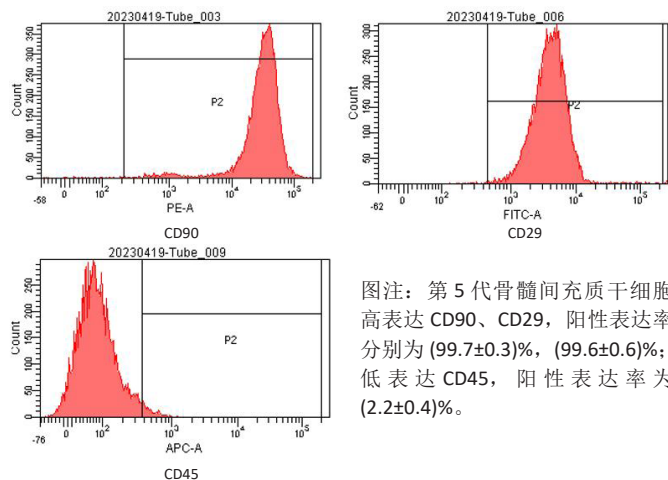
近年来越来越多的研究将细胞疗法特别是干细胞疗法与组织工程结合在一起治疗心血管疾病<sup>[30]</sup>。骨髓间充质干细胞被认为是一种很有前途的细胞资源,可以有效向血管平滑肌细胞和内皮细胞分化<sup>[31]</sup>,此次实验也成功将骨髓间充质干细胞诱导分化为血管平滑肌细胞。此次实验成功将骨髓间充质干细胞从大鼠胫骨与股骨内提取出来,实验结果显示其表面标记物CD90、CD29高表达,CD45几乎不表达,具有成脂、成骨、成软骨分化能力,并且可以形成细胞集落,增殖能力强,以上均表明骨髓间充质干细胞分离的细胞产量高,具有集落形成潜力、自我更新能力、间充质干细胞表面标记物表达能力和体外多细胞系分化能力<sup>[32]</sup>。



图注：第 5 代骨髓间充质干细胞形态一致，呈纺锤形，比例尺 =100 μm。

图 1 | 骨髓间充质干细胞的形态学观察 (倒置显微镜)

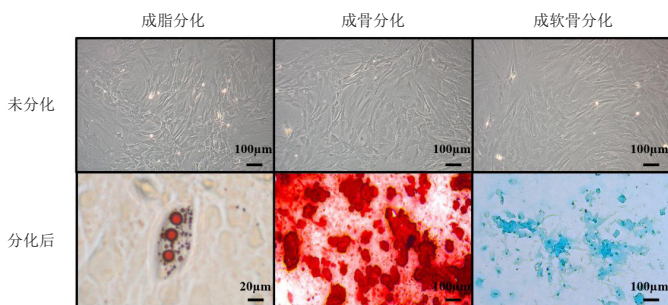
Figure 1 | Morphological observation of bone marrow mesenchymal stem cells (inverted microscope)



图注：第 5 代骨髓间充质干细胞高表达 CD90、CD29，阳性表达率分别为 (99.7±0.3)%、(99.6±0.6)%；低表达 CD45，阳性表达率为 (2.2±0.4)%。

图 2 | 骨髓间充质干细胞表面标记物表达

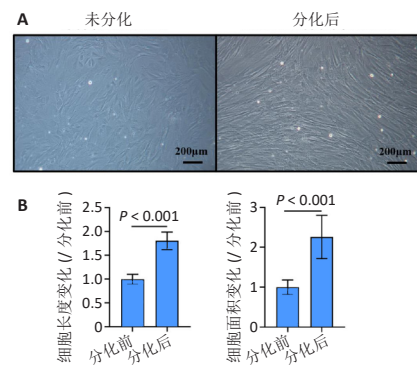
Figure 2 | Expression of surface markers of bone marrow mesenchymal stem cells



图注：成脂诱导分化 21 d 后，油红 O 染色后可见鲜红色脂滴；成骨诱导分化 21 d 后，经茜素红染色后可见深红色结节；成软骨诱导分化 21 d 后，阿利新蓝染色后可见细胞呈蓝色。

图 3 | 骨髓间充质干细胞的成脂、成骨及成软骨分化

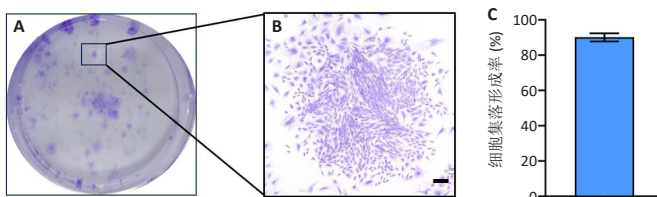
Figure 3 | Adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells



图注：A 为第 5 代诱导分化前后骨髓间充质干细胞的形态，诱导分化后的细胞形态狭长，呈山谷状，为末端重叠生长的血管平滑肌细胞。B 为诱导分化前后细胞长度与细胞面积定量分析结果。

图 4 | 骨髓间充质干细胞诱导分化为血管平滑肌细胞实验

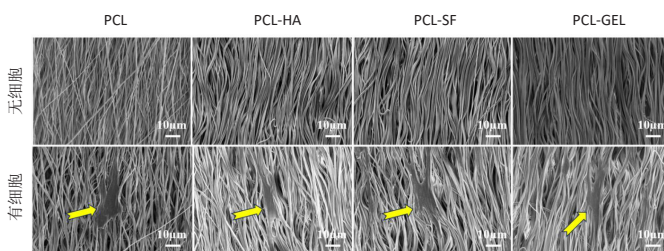
Figure 4 | Experimental study on inducing differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular smooth muscle cells



图注：A、B 为第 5 代骨髓间充质干细胞在 6 孔板中连续培养 14 d 后的集落形成情况，比例尺 =200 μm；C 为骨髓间充质干细胞集落形成率的量化分析。

图 5 | 骨髓间充质干细胞集落形成单位测定

Figure 5 | Determination of colony forming unit of bone marrow mesenchymal stem cells



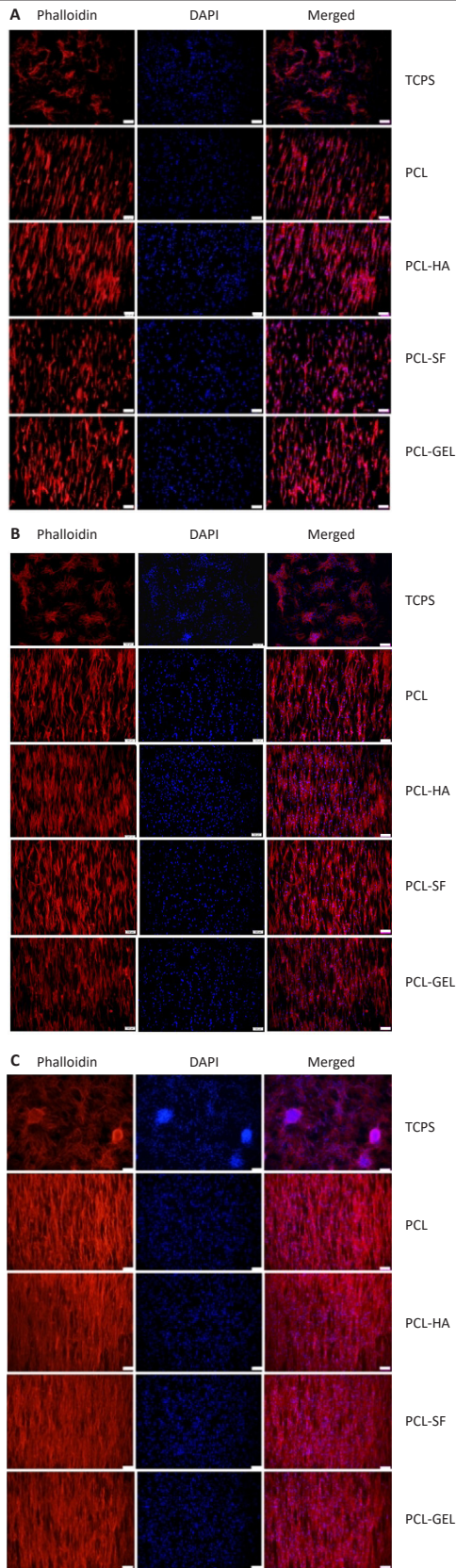
图注：PCL 为聚己内酯，HA 为透明质酸，SF 为丝素蛋白，GEL 为明胶。骨髓间充质干细胞在 4 种静电纺丝膜上均沿着静电纺丝膜的纤维走向排列，箭头所指方向即为细胞，比例尺 =10 μm。

图 6 | 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上的排布 (扫描电镜)

Figure 6 | Arrangement of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes (scanning electron microscope)

在之前的研究中发现，材料的生物相容性和生物活性较差会导致血栓形成、内膜增生、动脉粥样硬化、钙化、感染和长期通畅欠佳<sup>[33]</sup>，所以材料的选择至关重要。为了模拟天然血管细胞外基质，用于小口径组织工程血管制备的生物材料必须具有良好的生物相容性和特定的机械性能<sup>[34]</sup>，应用广泛的天然生物材料——丝素蛋白、透明质酸、明胶均具有良好的生物相容性、生物降解性和亲水性<sup>[35-37]</sup>，借助静电纺丝技术<sup>[38]</sup>，PCL 可以与天然生物材料进行复合，可以实现纤维和孔径范围从微米到纳米级的转变，从而调整生物材料支架的微观结构、生物化学性能及机械强度，调控细胞的附着、迁移、增殖等生命活动以及氧气与营养物质的交换<sup>[39]</sup>。PCL<sup>[23]</sup>、PCL-SF<sup>[40]</sup>、PCL-GEL<sup>[41]</sup>、PCL-HA 静电纺丝膜作为良好的生物材料支架在组织工程中广泛应用<sup>[42]</sup>，但是目前没有研究对其进行系统比较。

此次实验将骨髓间充质干细胞接种在 PCL、PCL-SF、PCL-HA、PCL-GEL 4 种静电纺丝膜材料上面，通过探究骨髓间充质干细胞在不同材料上的排布、数目及黏附面积以及细胞因子的表达，对这几种生物材料进行一个系统对比。实验结果显示，骨髓间充质干细胞在 PCL、PCL-SF、PCL-HA、PCL-GEL 静电纺丝膜上的细胞黏附性及细胞数量显著优于聚苯乙烯，并且骨髓间充质干细胞在聚苯乙烯



图注: TCPS 为聚苯乙烯, PCL 为聚己内酯, HA 为透明质酸, SF 为丝素蛋白, GEL 为明胶。A-C 分别为培养 1, 3, 7 d。骨髓间充质干细胞在 4 种静电纺丝膜上分布规律, 均沿着纤维走向呈现平行分布, PCL-SF 静电纺丝膜相较于 PCL、PCL-HA、PCL-GEL 静电纺丝膜更有利于骨髓间充质干细胞的增殖与黏附, 比例尺 =100 μm。

图 7 | 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上的增殖与黏附 (鬼笔环肽染色)  
Figure 7 | Proliferation and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes (Phalloidin staining)

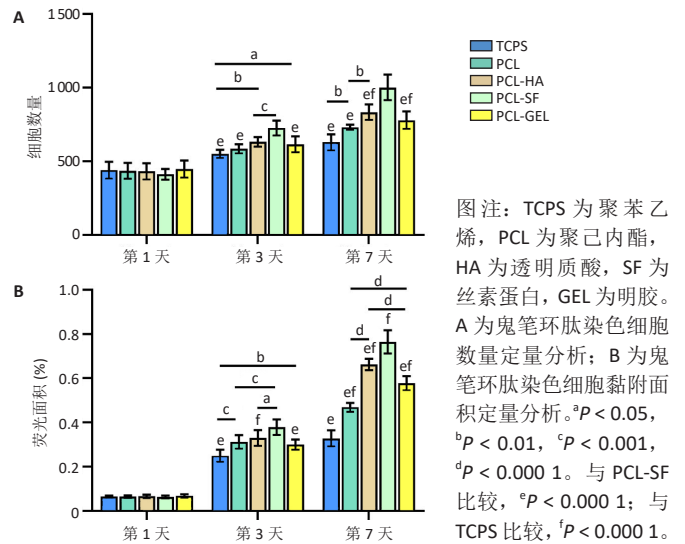
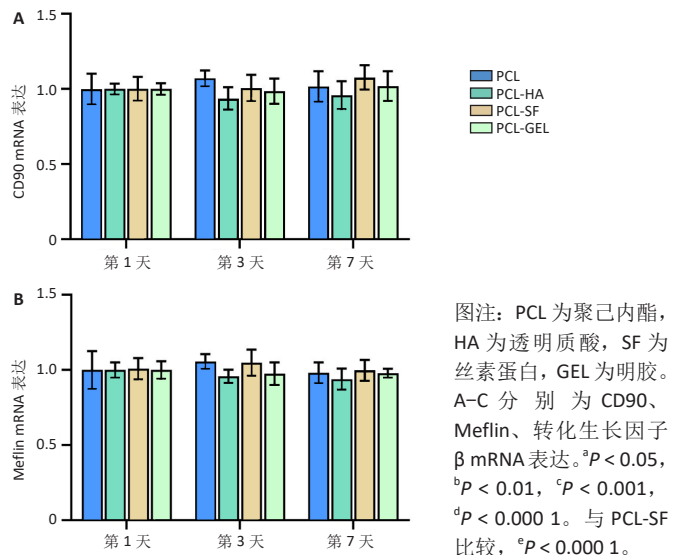
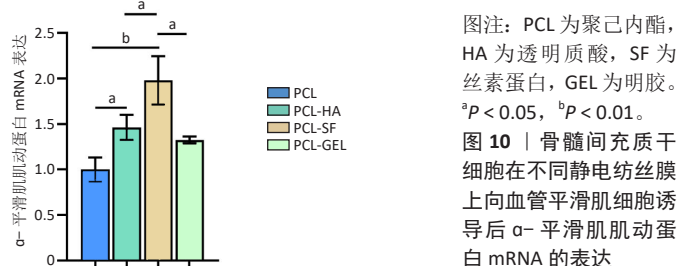


图 8 | 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上的细胞数量与黏附面积  
Figure 8 | Number and adhesion area of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes



图注: PCL 为聚己内酯, HA 为透明质酸, SF 为丝素蛋白, GEL 为明胶。A-C 分别为 CD90、Meflin、转化生长因子 β mRNA 表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$ , <sup>d</sup> $P < 0.0001$ 。与 PCL-SF 比较, <sup>e</sup> $P < 0.0001$ 。

图 9 | 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上的细胞因子表达  
Figure 9 | Cytokine expression of bone marrow mesenchymal stem cells on different electrospinning membranes



图注: PCL 为聚己内酯, HA 为透明质酸, SF 为丝素蛋白, GEL 为明胶。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 10 | 骨髓间充质干细胞在不同静电纺丝膜上向血管平滑肌细胞诱导 α-平滑肌肌动蛋白 mRNA 的表达  
Figure 10 | Alpha-smooth muscle actin mRNA expression after bone marrow mesenchymal stem cells were induced to vascular smooth muscle cells on different electrospinning membranes

中的分布杂乱,但在4种静电纺丝膜材料上面排列规则,均沿着静电纺丝纤维方向排布,并且PCL-SF、PCL-HA、PCL-GEL这3种复合生物材料相较于单纯的PCL更能提供良好的细胞黏附性,利于细胞的黏附和增殖,这也证实天然细胞外基质的成分可以为细胞提供更有力的机械支持和结合位点<sup>[43]</sup>,也说明在材料表面预先沉积涂层可以高度改善细胞黏附和保留<sup>[44]</sup>。同时,骨髓间充质干细胞在PCL-SF静电纺丝膜上的黏附面积以及细胞数目较PCL、PCL-GEL、PCL-HA静电纺丝膜增多,以此猜想该结果可能与SF独特的弹性、强度以及与哺乳动物细胞相容性有关<sup>[43]</sup>。PCL-SF组抗炎因子转化生长因子 $\beta$ 的表达也要优于PCL组、PCL-GEL组、PCL-HA组,炎症反应在血管再生和重塑过程中起着重要作用,但是长期炎症反应会导致血管组织再生失败,所以炎症反应的消退是必要的<sup>[45]</sup>,而骨髓间充质干细胞具有免疫调节和抗炎活性<sup>[46]</sup>。

血管平滑肌细胞是构成血管中膜的主要细胞成分,其功能主要是收缩和调节血管张力、血流和血压,对血管系统良好运行起着至关重要的作用<sup>[47]</sup>。此次实验利用转化生长因子 $\beta 1$ 成功将骨髓间充质干细胞诱导分化为血管平滑肌细胞,发现PCL-SF组血管平滑肌细胞标记物 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达高于PCL组、PCL-GEL组、PCL-HA组,以上均表明PCL-SF与骨髓间充质干细胞结合更适合用于构建小口径组织工程血管。近年来关于小口径血管组织工程的研究很多,但仍没有研究解决小口径人工血管紧缺的问题,此次实验结果推动了人工小口径血管临床转化进程。

**致谢:** 研究由泰山学者青年项目(tsqn202103111)和山东省自然科学基金-青年基金(ZR2021QC034)资助。

**作者贡献:** 孙现娟进行实验设计,实验实施为孙现娟、王秋花,实验评估为张晓晴,资料收集为张锦艺、杨杨杨,孙现娟成文,张晓晴、王文双审核。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

[1] MALLIS P, KOSTAKIS A, STAVROPOULOS-GIOKAS C, et al. Future perspectives in small-diameter vascular graft engineering. *Bioengineering*. 2020;7(4):160.

[2] GONG W, LEI D, LI S, et al. Hybrid small-diameter vascular grafts: Anti-expansion effect of electrospun poly  $\epsilon$ -caprolactone on heparin-coated decellularized matrices. *Biomaterials*. 2016;76:359-370.

[3] CAO X, MAHARJAN S, ASHFAQ R, et al. Bioprinting of Small-Diameter Blood Vessels. *Engineering*. 2021;7:832-844.

[4] YOGI A, RUKHLOVA M, CHARLEBOIS C, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into vascular smooth muscle cells for tissue engineering applications. *Biomedicine*. 2021;9(7):797.

[5] KHARBIKAR BN, MOHINDRA P, DESAI TA. Biomaterials to enhance stem cell transplantation. *Cell Stem Cell*. 2022;29(5):692-721.

[6] LEAL BBJ, WAKABAYASHI N, OYAMA K, et al. Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts. *Front Cardiovas. Med*. 2021;7:592361.

[7] CHANG S, SONG S, LEE J, et al. Phenotypic modulation of primary vascular smooth muscle cells by short-term culture on micropatterned substrate. *PLoS One*. 2014;9(2):e88089.

[8] DING DC, SHYU WC, LIN SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14.

[9] SHOJAEI F, RAHMATI S, BANITALEBI DEHKORDI M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. *Wound Repair Regen*. 2019;27(6):661-671.

[10] ZHANG X, BENDECK MP, SIMMONS CA, et al. Deriving vascular smooth muscle cells from mesenchymal stromal cells: Evolving differentiation strategies and current understanding of their mechanisms. *Biomaterials*. 2017;145:9-22.

[11] BAKER N, BOYETTE LB, TUAN RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*. 2015;70:37-47.

[12] HAYAT U, RAZA A, BILAL M, et al. Biodegradable polymeric conduits: Platform materials for guided nerve regeneration and vascular tissue engineering. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2022;67:103014.

[13] KUNDU B, RAJKHOWA R, KUNDU SC, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457-470.

[14] PRAKASH NJ, MANE PP, GEORGE SM, et al. Silk Fibroin As an Immobilization Matrix for Sensing Applications. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(6):2015-2042.

[15] MAZUREK Ł, SZUDZIK M, RYBKA M, et al. Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing. *Biomolecules*. 2022;12(12):1852.

[16] CHEN K, LI Y, LI Y, et al. Silk Fibroin Combined with Electrospinning as a Promising Strategy for Tissue Regeneration. *Macromol Biosci*. 2023;23(2):e2200380.

[17] YANG C, LI S, HUANG X, et al. Silk Fibroin Hydrogels Could Be Therapeutic Biomaterials for Neurological Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:2076680.

[18] MARINHO A, NUNES C, REIS S. Hyaluronic acid: A key ingredient in the therapy of inflammation. *Biomolecules*. 2021;11(10):1518.

[19] GRAÇA MFP, MIGUEL SP, CABRAL CSD, et al. Hyaluronic acid-Based wound dressings: A review. *Carbohydr Polym*. 2020;241:116364.

[20] ROSSATTO A, TROCADO DOS SANTOS J, ZIMMER FERREIRA ARLINDO M, et al. Hyaluronic acid production and purification techniques: a review. *Prep Biochem Biotechnol*. 2023;53(1):1-11.

[21] PEREIRA H, SOUSA DA, CUNHA A, et al. Hyaluronic Acid. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1059:137-153.

- [22] AHMADY A, ABU SAMAH NH. A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2021;608:121037.
- [23] DE VALENCE S, TILLE JC, MUGNAI D, et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials.* 2012;33(1):38-47.
- [24] HOSSEINZADEH S, ZAREI-BEHJANI Z, BOHLOULI M, et al. Fabrication and optimization of bioactive cylindrical scaffold prepared by electrospinning for vascular tissue engineering. *Iran Polym J.* 2022; 31(2):127-141.
- [25] VALENCE SD, TILLE JC, CHAABANE C, et al. Plasma treatment for improving cell biocompatibility of a biodegradable polymer scaffold for vascular graft applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(1):78-86.
- [26] HUANG L, GUO S, JIANG Y, et al. A preliminary study on polycaprolactone and gelatin-based bilayered tubular scaffolds with hierarchical pore size constructed from nano and microfibers for vascular tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32(14): 1791-1809.
- [27] ASHAMMAKHI N, GHAVAMINEJAD A, TUTAR R, et al. Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022; 28(3):633-664.
- [28] YOUSEFI-AHMADIPOUR A, ASADI F, PIRSADEGHI A, et al. Current Status of Stem Cell Therapy and Nanofibrous Scaffolds in Cardiovascular Tissue Engineering. *Regen Eng Transl Med.* 2021:0123456789.
- [29] WEEKES A, BARTNIKOWSKI N, PINTO N, et al. Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts. *Acta Biomater.* 2022;138: 92-111.
- [30] MIRANDA-NIEVES D, ASHOUR A, CHAIKOF EL. Bioinspired Vascular Grafts. *Organ Tissue Eng.* 2021:3-22.
- [31] LI N, RICKEL AP, SANYOUR HJ, et al. Vessel graft fabricated by the on-site differentiation of human mesenchymal stem cells towards vascular cells on vascular extracellular matrix scaffold under mechanical stimulation in a rotary bioreactor. *J Mater Chem B.* 2019;7(16):2703-2713.
- [32] PURWANINGRUM M, JAMILAH NS, PURBANTORO SD, et al. Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci.* 2021;22(6):e74.
- [33] GREENWALD SE, BERRY CL. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol.* 2000;190(3): 292-299.
- [34] HICKEY RJ, PELLING AE. Cellulose biomaterials for tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:45.
- [35] XING Y, GU Y, GUO L, et al. Gelatin coating promotes in situ endothelialization of electrospun polycaprolactone vascular grafts. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32(9):1161-1181.
- [36] GHOLIPOURMALEKABADI M, SAPRU S, SAMADIKUCHAKSARAEI A, et al. Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand? *Adv Drug Deli Rev.* 2020;153:28-53.
- [37] CORTES H, CABALLERO-FLORÁN IH, MENDOZA-MUÑOZ N, et al. Hyaluronic acid in wound dressings. *Cell Mol Biol.* 2020;66(4):191-198.
- [38] O'CONNOR RA, CAHILL PA, MCGUINNESS GB. Effect of electrospinning parameters on the mechanical and morphological characteristics of small diameter PCL tissue engineered blood vessel scaffolds having distinct micro and nano fibre populations – A DOE approach. *Polym Test.* 2021;96. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107119>
- [39] YANG S, ZHENG X, QIAN M, et al. Nitrate-Functionalized poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Small-Diameter Vascular Grafts Enhance Vascular Regeneration via Sustained Release of Nitric Oxide. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:770121.
- [40] ZHAO L, LI X, YANG L, et al. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo. *Mater Sci Eng C.* 2021; 118:111441 .
- [41] LU X, ZOU H, LIAO X, et al. Construction of PCL-collagen@PCL@PCL-gelatin three-layer small diameter artificial vascular grafts by electrospinning. *Biomed Mater.* 2022;18(1):10.1088/1748-605X/aca269
- [42] TANG D, CHEN S, HOU D, et al. Regulation of macrophage polarization and promotion of endothelialization by NO generating and PEG-YIGSR modified vascular graft. *Mater Sci Eng C.* 2018;84:1-11.
- [43] FOMBY P, CHERLIN AJ, HADJIZADEH A, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Ann Am Thorac Soc.* 2010;12(3):181-204.
- [44] FAYON A, MENU P, EL OMAR R. Cellularized small-caliber tissue-engineered vascular grafts: looking for the ultimate gold standard. *NPJ Regen Med.* 2021;6(1):46.
- [45] WEI Y, WANG F, GUO Z, et al. Tissue-engineered vascular grafts and regeneration mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;165:40-53.
- [46] CRUPI A, COSTA A, TARNOK A, et al. Inflammation in tissue engineering: The Janus between engraftment and rejection. *Eur J Immunol.* 2015; 45(12):3222-3236.
- [47] SHI J, YANG Y, CHENG A, et al. Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 2020;319(3): H613-H631.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)