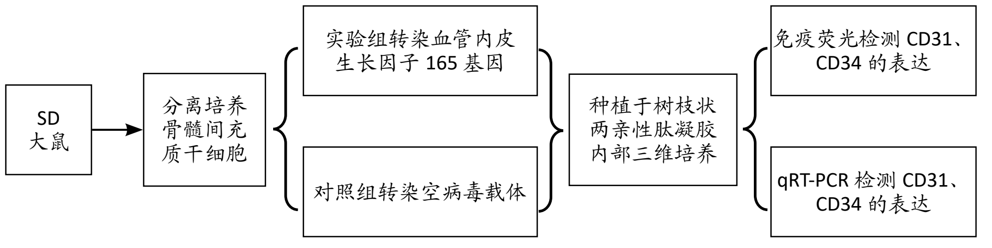
血管内皮生长因子 165 基因转染骨髓间充质干细胞构建血管化两亲性肽凝胶模块

蒋星海[1]，宋玉林[2]，李德津[2]，邵建敏[1]，徐军志[1]，刘华凯[1]，吴应国[1]，沈岳辉[1]，冯思诚[1]

https://doi.org/10.12307/2026.501
投稿日期：2024-10-24
采用日期：2024-12-17
修回日期：2025-01-26
在线日期：2025-02-18
中图分类号：
R459.9；R318；R684
文章编号：
2095-4344(2026)08-01903-09
文献标识码：A

文章快速阅读： 多肽凝胶促进转染血管内皮生长因子 165 的骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化



文题释义：
树枝状两亲性肽：是近年来发展起来的一类新型高分子肽支架材料，由亲水性肽列及疏水性脂肪族长烷基链构成，亲水性的肽列可以连接活性结构，自组装成超分子纳米结构，形成扭曲的条带状和高纵横比的纳米纤维状，自组装多肽序列的活性区域是水溶性的，可暴露于水溶液中，形似伸展的树枝状。
感染复数：传统的感染复数概念起源于噬菌体感染细菌的研究，是感染时噬菌体与细菌的数量比值，也就是平均每个细菌感染噬菌体的数量。噬菌体的数量单位为pfu。一般认为感染复数是一个比值，没有单位。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。通过摸索合适的感染复数值使病毒转染达到满意的效率。

摘要
背景：组织工程模块为股骨头坏死的治疗提供了新的思路，将血管化支架移植于坏死区域，在生长因子及支架的作用下诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化，促进微血管生成改善局部血运能够促进坏死区域的修复。
目的：探讨体外构建诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化的树枝状两亲性肽自组装凝胶模块的可行性。
方法：分离提取4-6周龄SD大鼠骨髓间充质干细胞，采用流式细胞术进行鉴定，体外定向成脂、成骨诱导分化检测细胞多向分化潜能。采用固相法合成肽 $^{\text{RGDK-}\backslash}_{\text{IKVAVAK-}/}$KGGGGAAAA(K)-$C_{16}H_{31}O$，调配质量浓度为10 mg/mL多肽溶液，加入生理盐水后触发多肽自组装，形成半透明的水凝胶，透射电子显微镜下观察凝胶结构。用携带血管内皮生长因子165基因的腺病毒转染大鼠骨髓间充质干细胞，然后将10 mg/mL多肽溶液和细胞悬液混合，细胞分布于凝胶内部形成三维培养体系，设置为实验组；将转染空病毒的骨髓间充质干细胞与10 mg/mL多肽溶液混合形成三维培养体系，设置为对照组。体外培养7 d后采用免疫荧光及RT-qPCR检测血管内皮细胞分化情况。
结果与结论：①流式细胞术结果显示间质干细胞表面分子CD29、CD44表达≥95%，造血干细胞表面分子CD34、CD45表达≤2%；在体外能够向成骨、成脂诱导分化；②树枝状多肽溶液在离子触发下形成的凝胶呈透明状，透射电镜下观察呈形态均一的小尺寸纳米胶束；③免疫荧光及RT-qPCR结果显示，实验组血管内皮生长因子165表达水平高于对照组，且血管内皮特异性标记物CD31、CD34表达水平高于对照组。结果表明，血管内皮生长因子165基因转染骨髓间充质干细胞种植于多肽凝胶构建组织工程模块，能够诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化。
关键词：树枝状两亲性肽；骨髓间充质干细胞；基因转染；血管内皮生长因子165；三维培养；血管化；股骨头坏死

Vascular endothelial growth factor 165 genes transfected into bone marrow mesenchymal stem cells to construct a vascularized amphiphilic peptide gel module

Jiang Xinghai[1], Song Yulin[2], Li Dejin[2], Shao Jianmin[1], Xu Junzhi[1], Liu Huakai[1], Wu Yingguo[1], Shen Yuehui[1], Feng Sicheng[1]
[1]The Third People's Hospital of Jingdezhen, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China; [2]The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China
Jiang Xinghai, MS, Attending physician, The Third People's Hospital of Jingdezhen, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China
Corresponding author: Song Yulin, MD, Chief physician, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Abstract
BACKGROUND: The tissue engineering module provides a new idea for the treatment of femoral head necrosis. A vascularized scaffold was constructed and transplanted into the necrotic area, and the bone marrow mesenchymal stem cells were induced to differentiate into vascular endothelial cells under the action of growth factors and scaffolds, which promoted the generation of microvessels and improved local blood vascularity, thereby promoting the repair of

[1] 景德镇市第三人民医院，江西省景德镇市 333000；[2] 南昌大学第二附属医院，江西省南昌市 330000
第一作者：蒋星海，男，1991 年生，江西省上饶市人，汉族，2018 年南昌大学毕业，硕士，主治医师，主要从事骨组织工程材料研究。
通讯作者：宋玉林，博士，主任医师，南昌大学第二附属医院，江西省南昌市 330000
https://orcid.org/0000-0002-0469-4148(蒋星海)
基金资助：景德镇市科技计划项目 (2022SFZC012)，项目负责人：蒋星海
引用本文：蒋星海，宋玉林，李德津，邵建敏，徐军志，刘华凯，吴应国，沈岳辉，冯思诚 . 血管内皮生长因子 165 基因转染骨髓间充质干细胞构建血管化两亲性肽凝胶模块 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(8):1903-1911.

the necrotic area.

OBJECTIVE: To investigate the feasibility of constructing a dendritic amphiphilic peptide self-assembly gel module with the ability to induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells *in vitro*.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and extracted from SD rats aged 4–6 weeks and identified by flow cytometry. *In vitro* directed adipogenic and osteogenic induced differentiation was used to detect the multidirectional differentiation potential of cells. Peptides $^{\text{RGDK}-}_{\text{IKVAVAK}-}\rangle$KGGGGAAAA(K)-$C_{16}H_{31}O$ were synthesized by solid-phase method. The concentration was 10 mg/mL peptide solution. After the addition of normal salt solution, the peptide self-assembly was triggered, forming a translucent hydrogel. Transmission electron microscopy was utilized to observe the gel structure. In the experimental group, rat bone marrow mesenchymal stem cells were transfected with adenovirus carrying vascular endothelial growth factor 165 gene. The 10 mg/mL peptide solution was mixed with the cell suspension, and the cells were distributed inside the gel to form a three-dimensional culture system. In the control group, bone marrow mesenchymal stem cells transfected with empty virus were mixed with 10 mg/mL peptide solution to form a three-dimensional culture system. Immunofluorescence and RT-qPCR were used to detect the differentiation of vascular endothelial cells after 7 days of *in vitro* culture.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Flow cytometry results showed that the expression of CD29 and CD44 on the surface of mesenchymal stem cells was ≥95%, and the expression of CD34 and CD45 on the surface of hematopoietic stem cells was ≤2%. Bone marrow mesenchymal stem cells were successfully differentiated by osteogenic induction and adipogenic induction *in vitro*. (2) The dendritic peptide solution was triggered by ions to form a transparent gel, and the small-sized nanomicelles with uniform morphology were observed under electron microscopy. (3) The results of immunofluorescence and RT-qPCR showed that the expression level of vascular endothelial growth factor 165 in the experimental group was higher than that in the control group, and the expression levels of CD31 and CD34 were higher than those in the control group. These results suggest that vascular endothelial growth factor 165 gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells implanted in a tissue engineering module constructed by peptide gel can induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells.

Key words: dendritic amphiphilic peptide; bone marrow mesenchymal stem cell; gene transfection; vascular endothelial growth factor 165; three-dimensional culture; vascularization; femoral head necrosis

Funding: *Jingdezhen Science and Technology Plan Project, No. 2022SFZC012 (to JXH)*

How to cite this article: *JIANG XH, SONG YL, LI DJ, SHAO JM, XU JZ, LIU HK, WU YG, SHEN YH, FENG SC. Vascular endothelial growth factor 165 genes transfected into bone marrow mesenchymal stem cells to construct a vascularized amphiphilic peptide gel module. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(8):1903-1911.*

0 引言 Introduction

股骨头坏死是骨科医生面临的一个棘手问题，基本病理机制有多种观点，在骨细胞增殖能力减弱、凝血功能异常、局部微血管损害、脂代谢异常、炎症反应加重等方面皆有研究 [1]。股骨头坏死好发于中青年，主要表现为髋关节疼痛及功能障碍，早期治疗以减轻负重、药物干预、物理治疗为主，保髋手术主要是保留自身髋关节为主的修复重建术，这种手术对患者接受度好，但是由于股骨头修复困难，治疗往往只能延缓坏死的进展 [2-3]，许多患者最终不得不面临髋关节置换手术。股骨头坏死难以修复的原因有骨髓间充质干细胞数量不足、活性低以及供应股骨头的血管损伤等 [4]。股骨头血管损伤后，股骨头全部或部分失去血运，局部造成缺血、缺氧，伤后血运阻断 8 h 即可形成缺血坏死 [5]。坏死部位缺乏有活性的干细胞导致细胞增殖、血管分化潜能减弱，血运重建不足使得坏死继续进展。随着组织工程技术发展，越来越多的研究聚焦于坏死区域移植有活性的骨髓干细胞、骨组织支架、生长因子等，为股骨头坏死的修复提供了新的思路，在基础实验及临床应用都逐渐取得了进展 [6]。组织工程化修复股骨头坏死的关键环节是血管化 [7]，因此需构建具有血管分化能力的组织工程模块用于股骨头缺血坏死治疗，其中种子细胞、生物支架材料、细胞因子是必不可少的 [8]。一个合适的生物支架要求具有良好的生物相容性和可降解性，内部要有较大的孔隙以利于营养物质的输送，通过细胞增殖提供足够的干细胞，并且在相应细胞因子作用下向血管内皮细胞分化促进毛细血管修复再生，从而促进坏死区域的骨组织重建及血管系统重建 [9]。

该研究前期已合成具有良好组织相容性的树枝状两亲性肽支架 [10]，在培养液促发下能自组装为三维多孔纳米纤维凝胶，多肽活性结构位于纳米纤维表面，凝胶含水量可达 99% 以上，具有很大表面积和比积，营养物质及代谢产物可通过三维多孔的凝胶进行交换，这种自组装三维凝胶有良好的细胞相容性 [11]。选用血管内皮生长因子 165(vascular endothelial growth factor 165，VEGF165) 基因转染骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal cells，BMSCs) 构建种子细胞，将种子细胞种植于树枝状两亲性肽凝胶内部构建组织工程模块，探讨该模块对骨髓间质干细胞向血管内皮细胞诱导分化的可能性，为构建新的血管化组织材料奠定基础，为新的生物骨移植材料结合组织工程技术治疗股骨头坏死提供实验数据和理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 5–10 月在南昌大学第二附属医院分子中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4–6 周龄雄性 SD 大鼠 20 只，体质量 80–100 g，由南昌大学医学院动物中心提供，许可证号：SYXK (赣)2021-0004，实验前适应性饲养 1 周，

环境条件为室温 22–25 ℃，相对湿度 40%–60%，光照周期 12 h，自由饮水，常规饲养饮食。实验方案经景德镇市第三人民医院医学伦理委员会审批，审批号为 LLB202217。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 主要试剂和仪器 DMEM/F12 培养基 (Hyclon 公司，美国)；胰酶 –EDTA 消化液 (Solarbio 公司)；胎牛血清 (Gibco 公司，美国)；成骨、成脂诱导分化培养基 (Cyagen 公司，美国)；VEGF165 腺病毒 (汉恒生物工程有限公司)；812 包埋剂 (SPI 公司，美国)；TRIzol 总 RNA 抽提试剂 (Invitrogen 公司，美国)；HiScript Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒 (Vazyme 公司，中国)；RealStar Green Fast Mixture 试剂盒 (Genstar 公司，中国)；牛血清蛋白、DAPI(Servicebio 公司，中国)；免疫荧光一抗：小鼠来源多克隆抗体 Anti-CD31、Anti-CD34(Servicebio，中国)；免疫荧光二抗：CY3 标记山羊抗小鼠 IgG (Servicebio，中国)；流式抗体 (CD29、CD34、CD45、CD44 抗体)(Biolegend 公司)；透射电子显微镜 (HITACHI)；倒置显微镜、正置荧光显微镜 (Nikon 公司，日本)；实时荧光定量 PCR 仪 (ABI Stepone plus)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞分离培养 SD 大鼠麻醉后颈椎脱臼法处死，体积分数为 75% 乙醇浸泡 5 min，移入超净工作台，无菌条件下分离双侧股骨和胫骨，去除股骨和胫骨上的所有软组织，然后浸泡在预冷的 PBS 中，置于冰上，剪开两端骨骺，用 DMEM/F12 完全培养基冲洗吹出骨髓组织，将收集的骨髓液过滤后接种于 100 mm 细胞培养皿，放入 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中培养，48 h 后首次换液，以后每 2 d 换液 1 次，当培养皿内贴壁细胞量达到 80% 时进行传代。

1.4.2 骨髓间充质干细胞鉴定 取细胞融合率 90% 左右的骨髓间充质干细胞，倒掉培养基，用 PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，在显微镜下观察到细胞解离后加入 DMEM/F12 完全培养基终止消化，用吸管将细胞吹打下来，收集细胞液，1 000 r/min 离心 5 min，倒掉上清液，PBS 洗涤 2 次，加 PBS 重悬细胞，调整细胞浓度为 $1×10^9$ L^{-1}。准备 4 个 EP 管分别加入细胞悬液 100 μL、流式单克隆抗体 5 μL，检测抗体分别为 CD34-PE、CD45-FITC、CD29-FITC，CD44-PE，对照组加 PBS，室温下孵育 30 min，倒掉上清液，PBS 洗涤 3 次，每管加入 500 μL PBS 重悬细胞，上流式细胞仪检测分析。

1.4.3 体外定向成骨诱导分化 取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，倒掉培养基，用 PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞密度为 $5×10^3/cm^2$，加入 6 孔板，每孔加入 2 mL DMEM/F12 完全培养基，待细胞汇合达 60%，更换为成骨诱导分化培养基进行成骨分化，每 3 d 换液 1 次，3 周后倒掉培养基，PBS 冲洗 2 次，40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，PBS 冲洗 2 次，加入茜素红染色 10 min，吸弃染液，PBS 冲洗 3 次，显微镜下观察。

1.4.4 体外定向成脂诱导分化 取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，倒掉培养基，用 PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，将细胞密度调整为 $5×10^3/cm^2$，加入 6 孔板，每孔加入 2 mL DMEM/F12 完全培养基，待细胞汇合达 60%，更换为成脂诱导分化培养基进行成脂分化，每 3 d 换液 1 次，培养 14 d 后镜下观察出现足量、大小适宜的脂滴时进行油红 O 染色。倒掉培养基，PBS 冲洗 2 次，40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，PBS 冲洗 2 次，加入油红 O 工作液染色 15 min，吸弃染液，PBS 冲洗 3 次，显微镜下观察。

1.4.5 病毒构建与转染 构建有巨细胞病毒 (CMV) 作为启动子的腺病毒载体，插入 hVEGF165 基因构建成双顺反子载体，内部有核糖体进入位点区域 (绿色荧光)。将构建的病毒在 293 细胞中进行大量扩增，把病毒用氯化铯梯度离心法进行纯化，调整病毒滴度为 $1×10^{15}$ L^{-1}–$1×10^{16}$ L^{-1}。取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，倒掉培养基，用 PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞浓度为 $1×10^8$ L^{-1}，以每孔 100 μL 细胞悬液 ($1×10^4$ 个细胞) 接种于 96 孔板，放入 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养过夜。取 6 个 EP 管，分别按感染复数值为 3，10，30，100，300，1 000 的梯度计算加入相应的病毒量，都稀释到 100 μL DMEM/F12 完全培养基。将 6 组病毒分别加入培养孔中孵育 4–8 h，弃去有含病毒的培养液，PBS 冲洗 2 次，继续用 DMEM/F12 完全培养基培养。培养 2 d 后观察细胞存活情况，荧光显微镜观察各组绿色荧光表达量。根据转染的比例及细胞存活状态估计最合适的感染复数值以进行下一步实验。

1.4.6　多肽凝胶自组装及检测　固相法合成肽 ${}^{\text{RGDK-}}_{\text{IKVAVAK-}}$KGGGGAAAA(K)-$C_{16}H_{31}O$，以 10 mg/mL 的质量浓度将实验设计的肽粉末溶解于蒸馏水中。在 1.5 mL EP 管中加入 100 μL 多肽溶液，然后缓慢加入 100 μL 生理盐水触发多肽自组装成半固体的凝胶。取一块凝胶组织使用电镜固定液 4 ℃固定 2-4 h，然后室温下经过 1% 锇酸固定 2 h，梯度乙醇、100% 丙酮脱水，812 包埋剂包埋切片，2% 醋酸铀染色 15 min，枸橼酸铅染色 15 min，透射电子显微镜下观察凝胶内部的纤维结构。

1.4.7　免疫荧光检测　①实验组：取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，以最佳感染复数病毒量转染 VEGF 基因 (感染复数 =100) 获得种子细胞；取融合率 85% 左右的种子细胞，倒掉培养基，PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞浓度为 $1×10^9$ L^{-1} 加入 24 孔板，每孔 200 μL ($2×10^5$ 个细胞)，与 200 mL 多肽溶液混合触发自组装形成凝胶三维培养。②对照组：取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，以最佳感染复数转染对照空病毒 (感染复数 =100) 获得种子细胞；取融合率 85% 左右的种子细胞，倒掉培养基，PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞浓度为 $1×10^9$ L^{-1} 加入 24 孔板，每孔 200 μL ($2×10^5$ 个细胞)，与 200 mL 多肽溶液混合触发自组装形成凝胶三维培养。两组细胞于 37 ℃、含体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中培养 7 d，使用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，室温下加入牛血清蛋白封闭 20 min，加入一抗后 4 ℃孵育过夜，加入二抗，室温下孵育 0.5 h，激光扫描共聚焦荧光显微镜下观察。一抗为小鼠来源多克隆抗体 Anti-CD31(稀释比 1 ∶ 500)、Anti-CD34(稀释比 1 ∶ 500)，二抗为 CY3 标记山羊抗小鼠 IgG(稀释比 1 ∶ 300)。

1.4.8　实时荧光定量 PCR　①实验组：取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，以最佳感染复数病毒量转染 VEGF 基因 (感染复数 =100) 获得种子细胞；取融合率 85% 左右的种子细胞，倒掉培养基，PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞浓度为 $1×10^9$ L^{-1}，取一块 6 孔板每孔加入 10 mg/mL 多肽溶液 1 mL，然后加入 1 mL 细胞悬液触发自组装成凝胶，细胞均匀分布在凝胶内部形成三维培养体系，重复 3 个孔。②对照组：取细胞融合率 85% 左右的骨髓间充质干细胞，以最佳感染复数转染对照空病毒 (感染复数 =100) 获得种子细胞；取融合率 85% 左右的种子细胞，倒掉培养基，PBS 冲洗两三次，加入胰酶消化 3 min，调整细胞浓度为 $1×10^9$ L^{-1}，取一块 6 孔板每孔加入 10 mg/mL 多肽溶液 1 mL，然后加入 1 mL 细胞悬液触发自组装形成三维培养体系，重复 3 个孔。两组细胞在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养 7 d 后，将两块 6 孔板取出，弃去培养基，PBS 冲洗 2 遍，每孔加入 1 mL TRIzol 试剂将细胞裂解，将裂解的样品装入 1.5 mL EP 管中，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液加入 0.2 mL 氯仿，手动摇匀 15 s，室温孵育 3 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，此时分 3 层，下层为红色酚氯仿相，RNA 分布于上层无色水相；将上层水相层转移至无菌无 RNA 酶的离心管，加入等体积的异丙醇混合使 RNA 沉淀，室温孵育 10 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，此时 RNA 沉淀于管底部；将上清液移除，加入 1 mL 体积分数 75% 无水乙醇清洗 RNA 沉淀，4 ℃、7 000 r/min 离心 5 min，小心吸除无水乙醇，加入无 RNA 酶水 20 μL 反复吹打使 RNA 完全溶解，紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度。使用 SuperMix 试剂盒将提取的 RNA 反转录合成 cDNA，运用荧光实时定量 PCR 检测引物 VEGF165、CD31、CD34，引物序列见**表 1**。每个扩增反应体系加入 cDNA 2 μL、RealStar Green Fast Mixture 试剂 10 μL，引物 Forward 0.4 μL，Reverse 0.4 μL，ddH_2O 7.2 μL；PCR 扩增循环程序：预变性 95 ℃，10 min；变性 95 ℃ 15 s，退火 55 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 15 s，此过程循环 40 次。每组样本重复检测 3 次。内参设定为 GAPDH，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因与内参的相对表达量。

表 1｜荧光实时定量 PCR 引物序列
Table 1 ｜ Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因		引物序列 (5'-3')	引物编号
GAPDH	Forward	AGT GCC AGC CTC GTC TCA TA	NM_017008.4
	Reverse	AGA GAA GGC AGC CCT GGT AA	
VEGF165	Forward	GGG AGC AGA AAG CCC ATG AA	NM_001110333.2
	Reverse	AGA TGT CCA CCA GGG TCT CA	
CD31	Forward	CGT TCA ACA GAG CCA GCA TT	NM_031591.1
	Reverse	GGC AAT GAC CAC TCC AAT GA	
CD34	Forward	ACA CTC CAC CTG GAA CAC CA	NM_001107202.2
	Reverse	AGC ACA TGG CTC AGT GGT TG	

表注：VEGF165 为血管内皮生长因子 165。

1.5　主要观察指标　①骨髓间充质干细胞的流式鉴定及成骨、成脂分化潜能；②肽溶液自组装水凝胶的性状及透射电镜下形态；③腺病毒转染后的荧光表

达；④腺病毒转染后的骨髓间充质干细胞与多肽凝胶体外培养 7 d 后，免疫荧光检测血管内皮细胞特异性标记物 CD31、CD34 表达，qPCR 检测 VEGF165、CD31、CD34 的相对表达量。

1.6 统计学分析 所有数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两两比较采用独立样本 *t* 检验，采用 GraphPad Prism 5 统计学软件作图。以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过景德镇市第三人民医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞形态及鉴定结果 从大鼠骨髓腔中提取的骨髓组织培养 3 d 后，在倒置显微镜下可以观察到散在分布的贴壁细胞，形态呈短梭形或椭圆形分布在培养皿底，并可见悬浮不贴壁的细胞 (图 **1A**)；培养 7 d 后随着换液悬浮不贴壁的细胞被去除，留下呈长梭形、多角形或扁平形贴壁细胞 (图 **1B**)。传至第 2 代后细胞形态呈均匀的长梭形逐渐融合 (图 **1C**)，第 3 代细胞呈整齐的漩涡状排列 (图 **1D**)。

大鼠骨髓间充质干细胞免疫表型鉴定结果：流式细胞术检测间充质干细胞阳性标志物 (CD29、CD44) ≥ 95%，其中 CD29 表达率为 98.8%，CD44 表达率为 97.8%；间充质干细胞阴性标志物 (CD34、CD45) ≤ 2%，CD34 表达率 1.61%，CD45 表达率为 1.28%，见图 **2**。

大鼠骨髓间充质干细胞成骨、成脂诱导分化能力：骨髓间充质干细胞成骨诱导培养 3 周后，可观察到茜素红将钙结节染成红色 (图 **3A**)；骨髓间充质干细胞成脂诱导 2 周后，可观察到被油红 O 工作液染成红色的脂滴 (图 **3B**)。

2.2 病毒转染最佳感染复数值 按感染复数值为 3，10，30，100，300，1 000 的梯度转染骨髓间充质干细胞，培养 2 d 在荧光显微镜下观察。感染复数值为 3 时观察到少量绿色荧光 (图 **4A**)，随着感染复数值梯度增高，相应的荧光表达也逐渐增强，当感染复数值为 100 时观察到绿色荧光高峰 (图 **4B–D**)。感染复数值 ≥ 300 时细胞大量死亡，因此推测感染复数值为 100 转染效果最佳。

2.3 两亲性肽凝胶鉴定 实验设计的 $\begin{matrix}\text{RGDK–}\backslash\\ \text{IKVAVAK–}/\end{matrix}$KGGGGAAAA(K)- $C_{16}H_{31}O$ 分子结构式如图 **5** 所示。取 1.5 mL EP 管，将 100 μL 多肽溶液加入 EP 管中，缓慢加入生理盐水触发多肽自组装，大体观察呈半透明冻胶状，倒置于 EP 管中不脱落。在透射电镜下观察凝胶内部呈小尺寸纳米胶束状，粒径均为 200 nm，见图 **6**。

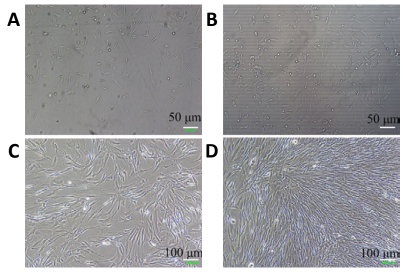
2.4 免疫荧光检测结果 实验组在三维培养 7 d 后，激光扫描共聚焦荧光显微镜下观察到血管内皮标记物 CD31，CD34 表达红色荧光，提示骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞诱导分化；对照组未观察到红色荧光表达，见图 **7**。

2.5 qRT-PCR 检测结果 实验组转染的目的基因 VEGF165 表达水平明显高于对照组，血管内皮细胞相关基因 CD31、CD34 明显高于对照组，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 **8**。

3 讨论 Discussion

股骨头坏死发病没有明确的诱因，可能和酗酒、激素类药物应用有关，也可能由髋部创伤导致，其基本病理机制有骨细胞增殖能力减弱、局部微血管损害血液供应差、脂代谢异常、炎性细胞浸润等 [12]。各种机制相互影响，例如微血管损伤导致形成缺血缺氧的微环境加速细胞凋亡，坏死的细胞、组织进一步加重炎性细胞浸润 [13]；机体的正常修复过程遭受破坏，使得坏死区域逐渐形成瘢痕、空洞 [14]。由于缺乏足够的干细胞及微循环重建，使得股骨头坏死区域修复困难 [15]。

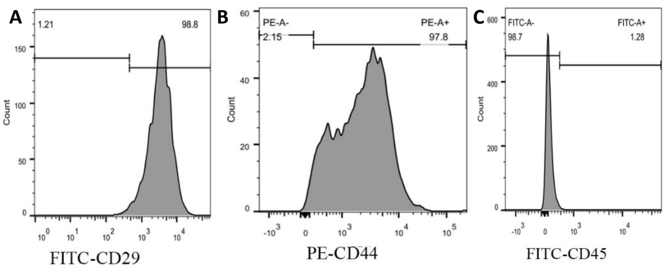
股骨头坏死的治疗一直是一个难题，早期的保守治疗都围绕延缓坏死的进展为主，减轻负重、药物干预等。但是随着时间的推移坏死逐渐加重，患者髋部疼痛也逐步加剧，影响生活质量而不得不选择手术。很多年轻患者并不甘于接受髋关节置换手术，由于假体寿命有限可以预见需要多次手术，对患者经济及心理都是很大的打击，并且接受髋关节置换患者依然有可能面临髋部疼痛及髋关节活动受限。如果保髋手术能够修复坏死的区域治愈股骨头坏死，将会为大量患者带来极大的利益。利用组织工程支架植入坏死区域促进修复是一个不错的选择方向。组织工程应用于股骨头坏死有很多研究，植入的干细胞能够增殖分化，良好支架材料能够为细胞长入提供依附，生长因子能够诱导干细胞向预期的方向分化。该研究预期构建一个具有血管化的组织工程模块，将其植入损伤部位，在生长因子诱导

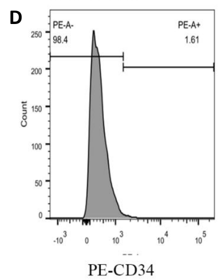


图注：图 A 为原代培养 3 d，形态呈短梭形或椭圆形分布在培养皿底，并可见悬浮不贴壁的细胞；B 为原代培养 7 d，悬浮细胞减少，贴壁细胞呈长梭形、多角形或扁平形；C 为第 2 代骨髓间充质干细胞，呈均匀的长梭形逐渐融合；D 为第 3 代骨髓间充质干细胞，呈现典型的漩涡状排列。

图 1 | SD 大鼠骨髓间充质干细胞形态

Figure 1 | **Morphology of Sprague-Dawley rat bone marrow mesenchymal stem cells**

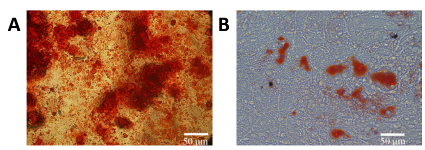




图注：图 A，B 显示 CD29、CD44 阳性表达率为 98.8%，97.8%；C，D 显示 CD45、CD34 阳性表达率为 1.28%，1.61%。

图 2 | 流式细胞仪检测第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞表面抗原

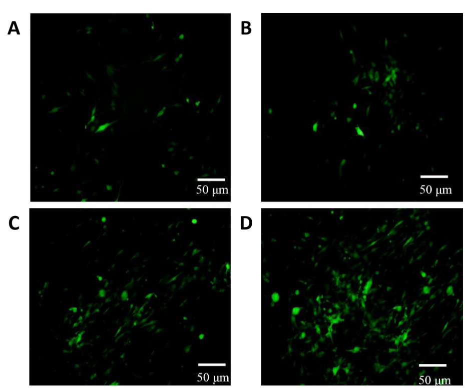
Figure 2 | **Detection of surface antigens of the third generation rat bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry**



图注：图 A 为大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导 3 周后茜素红染色，倒置显微镜下可观察到大量钙结节；B 为大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导培养 2 周后油红 O 染色，倒置显微镜下可观察到细胞出现脂滴。

图 3 | 大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化潜能

Figure 3 | **Multidirectional differentiation potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells**



图注：图 A–D 为感染复数为 3，10，30，100 时荧光表达量。感染复数值为 3 时观察到少量绿色荧光，随着感染复数值梯度增高，相应的荧光表达也逐渐增强，当感染复数值为 100 时观察到绿色荧光高峰。

图 4 | 病毒以不同感染复数值转染大鼠骨髓间充质干细胞 48 h 后荧光显微镜下观察

Figure 4 | **Fluorescence microscopic observation of rat bone marrow mesenchymal stem cells 48 hours after virus transfection at different multiplicity of infection values**

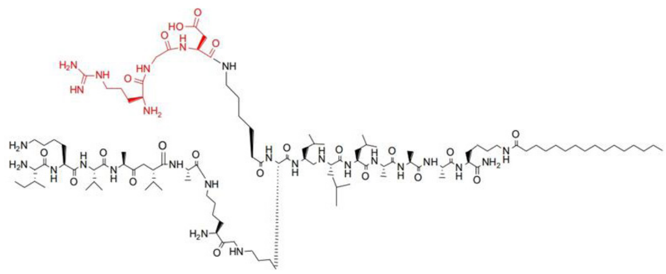
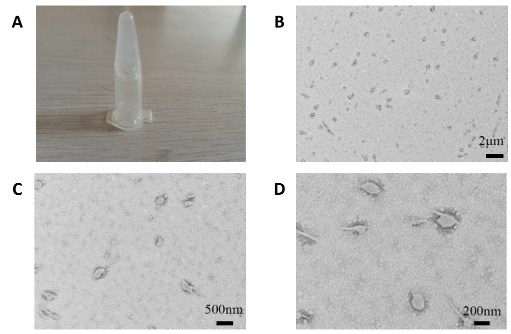


图 5 | 树枝状多肽的分子结构式

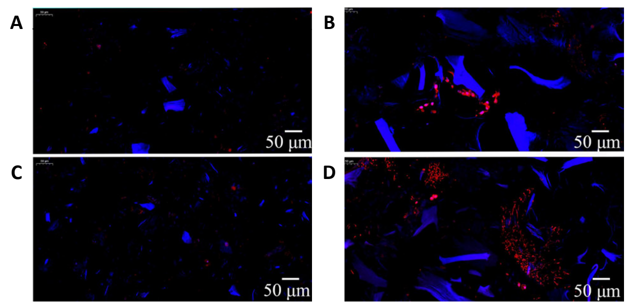
Figure 5 | **Molecular structure of dendritic peptide**



图注：图 A 为树枝状多肽凝胶呈现半透明的冻胶状，倒置不脱落；B–D 为透射电镜下观察凝胶呈形态均一的小尺寸纳米胶束，粒径约为 200 nm。

图 6 | 树枝状多肽凝胶鉴定

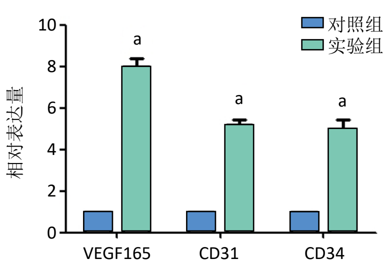
Figure 6 | **Dendritic peptide gel identification**



图注：转染血管内皮生长因子 165 基因的大鼠骨髓间充质干细胞在多肽凝胶中三维培养 7 d。图 A，C 为对照组 CD31、CD34 阴性表达；B，D 为实验组 CD31、CD34 阳性表达。

图 7 | CD31、CD34 免疫荧光染色 (×200)

Figure 7 | **Immunofluorescence staining of CD31 and CD34 (×200)**



图注：转染 VEGF165 基因的大鼠骨髓间充质干细胞在多肽凝胶中三维培养 7 d。与对照组相比，$^{a}P < 0.05$。

图 8 | qRT-PCR 检测血管内皮生长因子 165(VEGF165)、CD31、CD34 基因表达

Figure 8 | **Expression of vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165), CD31 and CD34 genes detected by qRT-PCR**

下向血管分化以促进微血管沿着支架再生，随着微循环的建立，营养及微环境改善，有利于干细胞增殖分化，骨形成体系达到平衡 [16-17]；局部的循环建立通畅亦将减少缺血缺氧的发生、减轻炎症反应。植入的支架能够为细胞生长提供载体，填补空洞加强支撑结构 [18]。

构建具有血管化的组织工程模块，种子细胞、生物支架材料、细胞因子的选取尤为重要。骨髓间充质干细胞在股骨头坏死治疗中已有应用，在血管介入结合骨髓干细胞治疗 [19]、生物支架材料结合干细胞治疗、基因转染干细胞治疗等多方领域都有尝试，且取得了一定的治疗效果 [20-21]。与脂肪和脐血来源间充质干细胞相比，骨髓间充质干细胞具有免疫调节、抗炎和组织修复能力强等优势 [22]，可以进一步向骨细胞、血管内皮细胞诱导分化，都能促进坏死修复。此次构建血管化组织工程模块使用骨髓干细胞作为种子细胞。

该实验用差速贴壁法分离培养获得骨髓间充质干细胞，通过换液、传代将杂质及悬浮细胞去除，观察到典型的间充质干细胞形态，从长梭形、多角形或扁平形逐渐融合呈均匀的长梭形状，并呈现典型的漩涡状排列。流式细胞术检测间充质干细胞阳性标志物 (CD29、CD44) ≥ 95%，间充质干细胞阴性标志物 (CD34、CD45) ≤ 2%，亦证明了间充质干细胞的特异性及纯度。骨髓间充质干细胞成骨诱导培养 3 周后，可以观察到茜素红将钙结节染成红色；成脂诱导 2 周后显微镜下可观察到被油红 O 工作液染成红色的脂滴，进一步证实了骨髓间充质干细胞的多向分化潜能。

骨缺血坏死修复过程中，微血管再生是一个核心的环节。微血管的生成可以促进损伤局部营养及氧气供应及加快代谢产物排出 [23]。干细胞向血管内皮细胞分化需要各种细胞因子调节，因此要构建血管化组织工程模块，需要使其表达对应的生长因子以促进血管分化 [24]。该实验选用 VEGF165 来构建组织工程模块，VEGF165 促血管生成活性强，广泛分布于体内 [25]，也是实验研究中常用的诱导血管分化的生长因子 [26]。VEGF 促进骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化及内皮细胞浸润，在诱导血管再生过程中发挥关键作用 [27-28]。实验通过基因转染技术，成功将携带 VEGF165 的病毒转染到骨髓间充质干细胞 [29]。转染 2 d 后通过观察病毒携带的绿色荧光表达估算适合的感染复数值，转染率与感染复数值呈正相关，当感染复数为 100 时，可以观察到最多的荧光表达，转染率高，且细胞存活状态好。当感染复数 ≥ 300 时细胞难以存活，大量凋亡，因此以最佳的感染复数值 100 将携带 VEGF165 的病毒对骨髓间充质干细胞进行基因改性，使其过表达 VEGF165 细胞因子 [30]。qPCR 结果显示实验组细胞 VEGF165 表达量较对照组明显增多，通过对种子细胞进行基因改性使其能够自行产生所需的生长因子，该方法简便易行，并且根据需要可以转染多种目的基因达到更好的效果。

该实验选用树枝状两亲性肽作为构建血管化组织工程模块的支架，它包含亲水性和疏水性单元，能够通过分子间非共价键相互作用形成有序的聚集体，通过自组装形成凝胶 [31-32]。树枝状两亲性肽可以通过引入不同末端基团进行设计，以使其发挥不同的作用。该研究以 G4A4 作为肽的主体，在头部通过连接 3 个赖氨酸 K 分支单元，使亲水端能够引入 RGD 及 IKVAV 活性基团 [33]。尾部的疏水结构连接脂肪族长烷基 $C_{16}H_{31}O$，设计出来一种新型的树枝状两亲性肽 $^{\text{RGDK–}\backslash}_{\text{IKVAVAK–}/}$KGGGGAAAA(K)-$C_{16}H_{31}O$。树枝状多肽具有特殊而有效的属性，引入不同的末端基团，对材料发挥的作用至关重要。此次多肽中引入 RGD 和 IKVAV 两个活性结构，通过分子内非共价键 (氢键，疏水键，范德华力) 等作用下，疏水端聚集，亲水端的 RGD 和 IKVAV 两个活性结构发挥作用 [34]。IKVAV 短肽是层粘连蛋白 a 链上的一个活性区域，JIANG 等 [35] 的研究发现含 IKVAV 的水凝胶能够通过抑制成纤维细胞迁移和活化减少纤维瘢痕的生成；GONZÁLEZ-PÉREZ 等 [36] 认为 IKVAV 短肽有诱导血管形成和神经修复的作用；YIN 等 [37] 认为含 IKVAV 的水凝胶生物降解性和生物相容性好，可生物降解，形成新血管。RGD 与整合素受体的结合在细胞黏附机制中起主要作用，能够改善细胞密度，增加细胞在凝胶内部的黏附 [38]；SHIN 等 [39] 研究发现 RGD 组织工程支架能够有效促进血管平滑肌再生。

多肽溶液在生理盐溶液触发下形成凝胶，大体观察呈半透明冻胶状，倒置于 EP 管中不脱落。透射电镜下观察凝胶孔隙大，成小尺寸纳米胶束状 [40]，透射电镜显示粒径为 200 nm，纤维孔隙大，细胞有更大的黏附、生长空间，能够更好地与外界进行营养物质交换及排出代谢产物。亲水端的 RGD 和 IKVAV 活性结构像树枝状向外延展，促进细胞黏附、

增殖、分化[41]。当今应用较广的骨组织工程支架有磷酸钙生物陶瓷支架、生物玻璃可吸收支架、聚合物支架、金属支架等，不同的支架材料有各自的利弊。应用于骨组织的支架性能取决于能诱导新血管形成的能力，并且要求具有良好的生物相容性、孔隙率、可生物解性[42]。

该实验肽凝胶具有良好的孔隙及利于血管分化的活性结构，生物相容性好，多肽的降解产物为氨基酸，对机体有营养作用[43]，是一个良好的选择。该实验中对照组与实验组将多肽溶液在含种子细胞的培养基混合触发下自组装成水凝胶，细胞均匀分布于凝胶内部。凝胶含水量多达 99%，多孔隙的结构使细胞内外更好地进行物质交换，三维环境下细胞能够发挥良好的增殖分化能力[44]。两组在体外培养 7 d，qPCR 结果显示实验组细胞 VEGF165 表达较对照组有显著增高，血管内皮标记物 CD31，CD34 的表达均显著高于对照组，因此实验组在三维培养及细胞因子的作用下能够诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮分化。通过免疫荧光检测发现对照组内皮标记物 CD31，CD34 表达阴性，实验组血管内皮标记物 CD31，CD34 表达阳性，且可以观察到实验组凝胶内部的细胞呈现圆形聚集成串均匀分布。二维培养环境下细胞贴壁生长容易形成接触抑制，而三维培养解除了这一限制；凝胶纤维亲水端的 RGD 和 IKVAV 活性结构亦能够增强细胞黏附，促进细胞增殖、分化。

此次实验成功构建了血管化树枝状两亲性肽自组装凝胶模块，该组织工程模块能够促进骨髓干细胞向血管内皮细胞分化，但是该研究结果数据偏少，未能充分证明不同组别骨髓间充质干细胞向血管化内皮细胞定向诱导分化的差异，并且该组织工程模块在股骨头缺血坏死治疗中的应用仍需进一步研究。

作者贡献：蒋星海负责实验实施、论文撰写，邵建敏、吴应国、沈岳辉负责实验数据分析处理，李德津负责细胞培养、指标检测，徐军志、刘华凯、冯思诚负责数据和文章的校对，宋玉林负责实验设计。

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。

出版规范：该文章撰写遵守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] COHEN-ROSENBLUM A, CUI Q. Osteonecrosis of the Femoral Head. Orthop Clin North Am. 2019;50(2):139-149.
[2] KONARSKI W, POBOŻY T, ŚLIWCZYŃSKI A, et al. Avascular Necrosis of Femoral Head-Overview and Current State of the Art. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(12):7348.
[3] NALIKASHVILI A, ENOKYAN V, LYSAK A, et al. Aseptic necrosis of the femoral head: what do we know about treatment options? Georgian Med News. 2024;(350):23-24.
[4] 柴威涛 , 郭成龙 , 张晓刚 , 等 . 股骨头坏死的中西医研究进展 [J]. 中医研究 , 2023,36(12):92-96.
[5] 张兆坤 , 赵俊杰 , 王玺玉 , 等 . 股骨头坏死中骨微血管内皮细胞对氧化应激性损伤的修复机制 [J]. 中华骨与关节外科杂志 ,2024, 17(10):950-956.
[6] 陈凯佳 , 刘景云 , 曹宁 , 等 . 组织工程技术在股骨头坏死治疗中的应用及前景 [J]. 中国组织工程研究 ,2024,28(9):1450-1456.
[7] SINGH M, SINGH B, SHARMA K, et al. A Molecular Troika of Angiogenesis, Coagulopathy and Endothelial Dysfunction in the Pathology of Avascular Necrosis of Femoral Head: A Comprehensive Review. Cells. 2023;12(18):2278.
[8] 祁桐 . 新型仿生组织工程神经修复大鼠周围神经缺损实验研究 [D]. 长春 : 吉林大学 ,2023.
[9] SIMUNOVIC F, FINKENZELLER G. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. Cells. 2021;10(7):1749.
[10] 蒋星海 .NT-3 基因转染的大鼠骨髓干细胞在树枝状两亲性肽凝胶中培养向神经元分化的研究 [D]. 南昌 : 南昌大学 ,2018.
[11] 宋玉林 , 郑启新 , 吴凯 , 等 . 含 IKVAV 两亲性肽自组装凝胶二维诱导神经干细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复 ,2009, 13(34):6667-6670.
[12] 何伟 . 股骨头坏死的诊断与保髋治疗 [J]. 中医正骨 ,2024,36(9): 12-14+18.
[13] MA T, WANG Y, MA J, et al. Research progress in the pathogenesis of hormone-induced femoral head necrosis based on microvessels: a systematic review. J Orthop Surg Res. 2024;19(1):265.
[14] GONCHAROV EN, KOVAL OA, NIKOLAEVICH BEZUGLOV E, et al. Conservative Treatment in Avascular Necrosis of the Femoral Head: A Systematic Review. Med Sci (Basel). 2024;12(3):32.
[15] ZHENG LW, LAN CN, KONG Y, et al. Exosomal miR-150 derived from BMSCs inhibits TNF-α-mediated osteoblast apoptosis in osteonecrosis of the femoral head by GREM1/NF-κB signaling. Regen Med. 2022; 17(10):739-753.
[16] MURAB S, HAWK T, SNYDER A, et al. Tissue Engineering Strategies for Treating Avascular Necrosis of the Femoral Head. Bioengineering (Basel). 2021;8(12):200.
[17] MA J, SUN Y, ZHOU H, et al. Animal Models of Femur Head Necrosis for Tissue Engineering and Biomaterials Research. Tissue Eng Part C Methods. 2022;28(5):214-227.

[18] LOU P, DENG X, HOU D. The effects of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 scaffold on dog femoral head osteonecrosis model: a preclinical study. Biomed Mater. 2023;18(2): 025011.
[19] WANG X, HU L, WEI B, et al. Regenerative therapies for femoral head necrosis in the past two decades: a systematic review and network meta-analysis. Stem Cell Res Ther. 2024;15(1):21.
[20] LI M, CHEN D, MA Y, et al. Stem cell therapy combined with core decompression versus core decompression alone in the treatment of avascular necrosis of the femoral head: a systematic review and meta-analysis. J Orthop Surg Res. 2023;18(1):560.
[21] ULUSOY İ, YILMAZ M, KIVRAK A. Efficacy of autologous stem cell therapy in femoral head avascular necrosis: a comparative study. J Orthop Surg Res. 2023; 18(1):799.
[22] 齐泽强 , 郭庭煜 , 吴治念 , 等 . 骨髓间充质干细胞治疗肝衰竭的作用机制 [J]. 基础医学与临床 ,2024,44(11):1608-1612.
[23] ZHENG GS, QIU X, WANG BJ, et al. Relationship Between Blood Flow and Collapse of Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head. J Bone Joint Surg Am. 2022;104(Suppl 2):13-18.
[24] SHU P, SUN DL, SHU ZX, et al. Therapeutic Applications of Genes and Gene-Engineered Mesenchymal Stem Cells for Femoral Head Necrosis. Hum Gene Ther. 2020;31(5-6):286-296.
[25] CHEN H, TANG S, LIAO J, et al. VEGF165 gene-modified human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect against acute liver failure in rats. J Gene Med. 2021;23(10):e3369.
[26] 季庆辉 , 乔建民 , 薛宇 , 等 .BMSCs 与 VEGF 结合藻酸钙支架治疗兔早期股骨头坏死的疗效 [J]. 中国老年学杂志 ,2019,39(3):657-659.
[27] RUIZ DE ALMODOVAR C, FABRE PJ, KNEVELS E, et al. VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. Neuron. 2023;111(8):1348.
[28] 肖雪 , 张宁馨 , 宋坪 . 干细胞在皮肤再生中的作用及其信号通路 [J]. 皮肤科学通报 ,2024,41(5):556-561.
[29] YANG C, YANG S, DU J, et al. Vascular endothelial growth factor gene transfection to enhance the repair of avascular necrosis of the femoral head of rabbit. Chin Med J (Engl). 2003;116(10):1544-1548.
[30] 蒋星海 , 赵彪 , 吴凯 , 等 . 血管内皮生长因子 165、神经营养因子 3、血管生成素 1 基因转染诱导骨髓间充质干细胞向神经元及血管内皮细胞分化 [J]. 中国组织工程研究 ,2018,22(25):3956-3962.
[31] ÁLVAREZ Z, KOLBERG-EDELBROCK AN, SASSELLI IR, et al. Bioactive scaffolds with enhanced supramolecular motion promote recovery from spinal cord injury. Science. 2021;374(6569):848-856.
[32] CĂTA A, IENAȘCU IMC, ŞTEFĂNUȚ MN, et al. Properties and Bioapplications of Amphiphilic Janus Dendrimers: A Review. Pharmaceutics. 2023;15(2):589.
[33] 陈睿 , 宋玉林 , 汪文玉 , 等 . 大鼠骨髓间充质干细胞与树枝状两亲性多肽自组装凝胶支架的生物相容性 [J]. 西安交通大学学报 (医学版),2016,37(6):803-809.
[34] WANG Y, SU H, WANG Y, et al. Discovery of Y-Shaped Supramolecular Polymers in a Self-Assembling Peptide Amphiphile System. ACS Macro Lett. 2022;11(12):1355-1361.
[35] JIANG T, LI S, XU B, et al. IKVAV peptide-containing hydrogel decreases fibrous scar after spinal cord injury by inhibiting fibroblast migration and activation. Behav Brain Res. 2023;455:114683.
[36] GONZÁLEZ-PÉREZ F, ALONSO M, GONZÁLEZ DE TORRE I, et al. Protease-Sensitive, VEGF-Mimetic Peptide, and IKVAV Laminin-Derived Peptide Sequences within Elastin-Like Recombinamer Scaffolds Provide Spatiotemporally Synchronized Guidance of Angiogenesis and Neurogenesis. Adv Healthc Mater. 2022;11(22):e2201646.
[37] YIN Y, WANG W, SHAO Q, et al. Pentapeptide IKVAV-engineered hydrogels for neural stem cell attachment. Biomater Sci. 2021;9(8): 2887-2892.
[38] KUMAR VB, TIWARI OS, FINKELSTEIN-ZUTA G, et al. Design of Functional RGD Peptide-Based Biomaterials for Tissue Engineering. Pharmaceutics. 2023;15(2):345.
[39] SHIN YC, KIM J, KIM SE, et al. RGD peptide and graphene oxide co-functionalized PLGA nanofiber scaffolds for vascular tissue engineering. Regen Biomater. 2017;4(3):159-166.
[40] 梁菊 , 来丹玉 , 吴文澜 , 等 . 三条两亲性多肽的自组装行为及酸敏特性 [J]. 物理化学学报 ,2015,31(4):722-728.
[41] ADACHI T, MIYAMOTO N, IMAMURA H, et al. Three-Dimensional Culture of Cartilage Tissue on Nanogel-Cross-Linked Porous Freeze-Dried Gel Scaffold for Regenerative Cartilage Therapy: A Vibrational Spectroscopy Evaluation. Int J Mol Sci. 2022;23(15):8099.
[42] 冷一 , 李祖浩 , 任广凯 , 等 . 生物活性支架在骨组织工程中的应用及进展 [J]. 中国组织工程研究 ,2019,23(6):963-970.
[43] SON Y, HUANG H, ZHENG Q, et al. The cytocompatibility of self-assembly hydrogel from the neotype of amphiphilic peptide with neural stem cells. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2009;26(4):807-810.
[44] BAIRAGI D, BISWAS P, BASU K, et al. Self-Assembling Peptide-Based Hydrogel: Regulation of Mechanical Stiffness and Thermal Stability and 3D Cell Culture of Fibroblasts. ACS Appl Bio Mater. 2019;2(12): 5235-5244.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)