

BrdU 标记 VECs 和 ADSCs 构建组织工程骨体内增殖研究

赵玉鑫¹⁾, 王福科²⁾, 李彦林²⁾, 张红³⁾, 王国梁²⁾, 何川²⁾

(1) 郑州大学附属肿瘤医院骨与软组织肿瘤科, 郑州 450008; 2) 昆明医科大学第一附属医院运动医学科; 3) 精神科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 研究联合培养的血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 和脂肪干细胞 (adipose-derived stromal cells, ADSCs) 构建组织工程骨, 在体内增殖和分化情况. **方法** (1) 用猪椎骨制备部分脱蛋白骨, 纤维粘连蛋白修饰制成部分脱蛋白生物骨, 电镜扫描生物骨表面情况; (2) 选用大鼠脐血单个核细胞诱导分化的血管内皮细胞和大鼠脂肪干细胞, 体外 1:1 浓度联合培养; (3) 分别用 BrdU 标记的血管内皮细胞、脂肪干细胞和联合培养细胞体外复合部分脱蛋白生物骨, 体外培养 6 d 后植于 SD 大鼠两侧股部肌袋处; 2 周、4 周、8 周、12 周取材, 硬组织切片中 BrdU 抗体免疫荧光染色, 观察植入的种子细胞在机体内的增殖分化情况. **结果** (1) 猪椎骨制备部分脱蛋白骨孔隙分布均匀, 由大量的羟基磷灰石纤维编织而成; 部分脱蛋白生物骨表面可见大量颗粒状蛋白结晶; (2) BrdU 免疫荧光染色各组植入种子细胞开始呈分散状分布, 细胞逐渐增殖呈巢状, 血管内皮细胞组和联合培养细胞组植入内皮细胞增殖形成大量新生血管; 未标记 BrdU 空白组未见阳性细胞出现. **结论** 组织工程骨植入种子细胞在体内能大量增殖, 参与新组织和新生血管的形成.

[关键词] 血管内皮细胞; 脂肪干细胞; 联合培养; BrdU

[中图分类号] R318.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 03 - 0013 - 03

Proliferation of the Co-culture System Composed of Adipose-Derived Stromal Cells and Vascular Endothelial Cells Marked by BrdU on Bone Tissue Engineering Bone in Vivo

ZHAO Yu-xin¹⁾, WANG Fu-ke²⁾, LI Yan-lin²⁾, ZHANG Hong³⁾, WANG Guo-liang²⁾, HE Chuan²⁾

(1) Dept. of Bone and Soft Tissue Tumors, The Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450008; 2) Dept. of Sports Medicine; 3) Dept. of Psychiatry, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to investigate the proliferation and differentiation of the co-culture system composed of adipose-derived stem cells (ADSCs) and vascular endothelial cells (VECs) on bone tissue engineering bone in vivo. **Methods** (1) The PDPB materials were made with porcine spine bone. It was modified by fibronectin to make partially deproteinised biologic bone (PDPBB), and then the surface information of PDPBB was observed with a scanning electron microscope. (2) Rat ADSCs and VECs induced differentiation from mononuclear cells from umbilical cord blood in rats were isolated and co-cultured by the proportion of 1:1 in vitro. (3) VECs, ADSCs and co-cultured cells marked by BrdU were compounded separately with the PDPBBs in vitro, and the tissue engineering bones were transplanted into both sides of femoral muscles bags in SD rats after cultured 6 days. The immunofluorescence staining of BrdU antibody was separately carried on in order to observe the proliferation and differentiation of the seeds implanted cells after 2 weeks, 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks in vivo. **Results** (1) PDPB with pore distribution prepared by pig spinal was made by a large number of hydroxyapatite fibers woven. Partially deproteinized bone surface showed a large number of granular biological protein crystallization. (2) Using

[基金项目] 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB032); 云南省卫生厅科技计划项目 (2012WS0013)

[作者简介] 赵玉鑫 (1976~), 男, 河南商丘市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤防治工作.

[通讯作者] 王福科. E-mail:wfk.04@126.com

BrdU immunofluorescence staining, seed cells implanted in each group disseminated in the beginning, and then cell gradually proliferated in a nesting pattern. VECs and co-cultured cell groups formed a large number of new vessels after implanting endothelial cells. No positive cell was observed in the unmade BrdU control group. **Conclusion** The seed cells implanted in the tissue engineered bone can be proliferated in vivo, and participate in the formation of new tissues and vessels.

[**Key words**] Vascular endothelial cells; Adipose-derived stromal cells; Co-culture; BrdU

近来研究发现, 血管内皮细胞联合细胞培养不仅可以提高组织的血管化速度, 而且可以促进成骨细胞和骨髓间充质干细胞分化、增殖作用. 成骨细胞可以分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 促进内皮细胞生长、分化, 内皮细胞通过分泌骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 影响成骨细胞分化, 成骨细胞和内皮细胞通过这些细胞因子进行相互间功能的调节, 促进成骨和血管形成, 其中 VEGF 是其中的关键因素^[1,2]. 有学者^[3]采用了内皮细胞和骨髓间充质干细胞共同培养的方法, 实验表明联合培养的内皮细胞大大促进了骨髓间充质干细胞在聚乙酸内酯支架的黏附和增殖. 本研究通过溴脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 标记血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VECs) 和脂肪干细胞 (adipose-derived stromal cells, ADSCs) 构建组织工程骨植入体内, 旨在研究体外血管内皮细胞和脂肪来源的联合培养体系在机体内支架材料上的黏附、增殖.

1 材料与方法

1.1 实验动物

足月妊娠 SD 大鼠 2 只, 18 周龄 SD 大鼠 2 只由昆明医科大学动物科提供 (动物生产许可证号: SCXK (滇) 2005-0008 号).

1.2 主要仪器和试剂

超净工作台 (Thermo Scientific), 恒温 CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific), 低温自动平衡离心机 (北京医用离心机厂), 倒置显微镜 (Olympus), 荧光显微镜 (Olympus PM-20 型), 硬组织切片机 (德国 LEICA SP2500 型), 低糖 DMEM 培养基 (Gibco), 胰蛋白酶 (Sigma) EDTA (Sigma), 胰蛋白酶 (Sigma), 新生牛血清 (Gibco 公司), 胎牛血清 (Hyclone), 纤维粘连蛋白 (R&D), BrdU (美国 upstate), BrdU 一抗 (小鼠单克隆抗体) (Thermo scientific), 山羊抗小鼠 IgG (FITC 标记) (美国 KPL 公司), DAPI (Sigma).

1.3 实验方法

1.3.1 部分脱蛋白生物骨的制备 按文献方法^[4]取新鲜市售猪椎骨制成 0.5 cm × 0.4 cm × 0.3 cm 和 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 的部分脱蛋白骨块和骨片, 150 μg/mL 纤维连接蛋白^[5,6]浸泡 PDPB 12 h, 制成部分脱蛋白生物骨 (partially deproteinised biologic bone, PDPBB), 干燥箱风干, 钴 60 放射灭菌备用.

1.3.2 脐血单个核细胞的分离与血管内皮细胞诱导分化培养 3% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔麻醉足月妊娠 SD 大鼠 2 只, 75% 的酒精中浸泡 10 min, 按照文献^[5,6]试验方法分离脐血单个核细胞; 加入 5 mL 含血管内皮细胞诱导液的 L-DMEM (添加 10% 胎牛血清, 1% 青霉素, 1% 链霉素, VEGF 20 μg/L, IGF-1 2 μg/L, bFGF 2 μg/L, EGF 20 μg/L) 完全培养基, 诱导培养 6 周^[7], 倒置显微镜下查看细胞形态结构.

1.3.3 脂肪干细胞的分离与培养 3% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔麻醉 18 周龄 SD 大鼠 2 只, 脱颈处死, 按照文献^[8,9]试验方法分离大鼠脂肪干细胞, 含 10% 新生牛血清 DMEM 培养基, 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养细胞至第三代.

1.3.4 脐血源血管内皮细胞与脂肪干细胞鉴定 各取 2 种细胞, 按照^[7,10]的方法对 2 种细胞进行鉴定.

1.3.5 体外构建组织工程骨 取 0.5 cm × 0.4 cm × 0.3 cm 的 PDPBB 材料 144 块, L-DMEM 预湿, 随机分为 4 组 (A 组: PDPBB + 血管内皮细胞; B 组: PDPBB + 脂肪干细胞; C 组: PDPBB + 1:1 联合培养细胞^[11]; D 组: PDPBB + 脂肪干细胞), 每组 36 块, 置入 2 块 6 孔板中, 每组 2 孔. 取试验一分离培养的第四代脂肪干细胞和诱导 6 周后的脐血来源的血管内皮细胞, 分别按照 5.0 × 10⁶/mL 的浓度^[12]接种预湿过的各组 PDPBB 100 μL, 置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养 4 h 后, 加入 L-DMEM 完全培养基 4 mL (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μg/mL, 15% 新生牛血清, HEPES 0.01 mol/L), 隔日换液.

1.3.6 溴脱氧尿嘧啶核苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 标记种子细胞 将 BrdU 粉末用 PBS 液稀

释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液体, 于 A 组、B 组和 C 组组织工程骨培养 3 d 时, 换含 Brdu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的完全培养基培养 72 h 标记各组组织工程骨的种子细胞^[3,4], 未标记 BrdU 的 D 组为空白组。

1.3.7 异位植入组织工程骨 取健康 SD 大鼠 72 只, 雌雄不限, 随机分为 4 组 (A 组: PDPBB + 血管内皮细胞组; B 组: PDPBB + 脂肪干细胞组; C 组: PDPBB + 1:1 联合培养细胞组; D 组: PDPBB + 未标记 BrdU 脂肪干细胞组), 每组 18 只, 3% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 肌肉注射麻醉, 脱毛, 0.5% 碘伏消毒手术区域, 分层切开双侧股部皮肤、皮下, 钝性分离肌肉, 造成肌袋, 将 BrdU 标记好的组织工程骨按照 A 组、B 组、C 组和 D 组分别置于 SD 大鼠两侧股部肌袋处。术毕肌注青霉素 0.5 万 U 预防切口感染。术后各组动物于相同条件下分笼饲养。

1.3.8 一般观察 术后各组动物的活动、进食、伤口愈合情况。动物处死后植入材料的大体观察及其与周围软组织的关系。

1.3.9 Brdu 免疫荧光染色 分别于 1、2、4、8、12 周从 A 组、B 组、C 组、D 组取材, 每组 3 块, 硬组织切片机切片, 每块选取 3 片, 脱塑液脱塑, 100% ~ 80% 梯度酒精脱去脱塑液, PBS 清洗 2 min \times 3 次, 加入磷酸盐缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min 修复抗原, 3% 血清白蛋白 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 吸取血清, 每片加 Brdu 一抗 100 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 清洗 2 min \times 3 次, 每片加山羊抗小鼠 FITC 标记二抗 100 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 吸干二抗, 加入 DAPI 液 100 μL 再避光孵育 30 min, 吸取 DAPI 液, 50% 缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察植入细胞在机体内的增殖和分化情况。

2 结果

2.1 术后一般情况观察

术后各组动物无死亡, 第 1 天动物开始进食, 饮食、活动正常。第 1 周内切口肿胀, 2 周后完全愈合。

2.2 各组组织工程骨 Brdu 免疫荧光染色结果

Brdu 免疫荧光染色可见植入细胞 FITC 免疫荧光染色在绿光下细胞核发绿光, DAPI 染色所有细胞核呈蓝色作为对照; 各组植入种子细胞开始呈分散状分布 (图 1、图 2、图 6、图 9), 细胞逐渐增殖呈巢状 (图 3、图 5、图 10), 部分植入细胞进入支架材料内部增殖呈巢状分布 (图 3), 8 周、12 周仍见大量植入细胞存在 (图 8、图 9、图 10); 血管

内皮细胞组和联合培养细胞组植入内皮细胞增殖形成大量新生血管 (图 11 ~ 12; 图 9 ~ 10); 未标记 BrdU 空白 D 组未见阳性细胞出现 (图 13)。

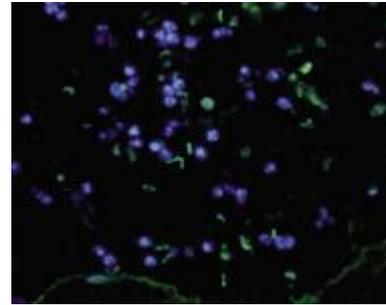


图 1 ADSCs 组 1 周 ($\times 200$): 植入种子细胞呈分散状分布

Fig. 1 The ADSCs group after implantation for 1 week ($\times 200$): the implanted seed cells were scattered distribution

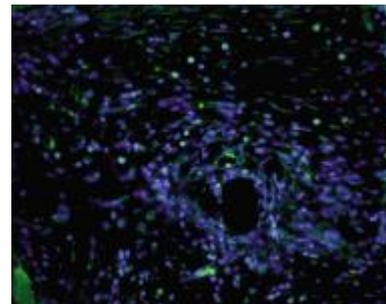


图 2 ADSCs 组 2 周 ($\times 200$): 植入种子细胞呈分散状分布, 细胞开始增殖

Fig. 2 The ADSCs group after implantation for 2 weeks ($\times 200$): the implanted seed cells were scattered distribution, and began to proliferate

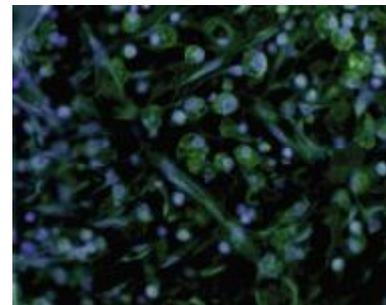


图 3 VECs 组 1 周 ($\times 200$): 大量植入血管内皮细胞散状分布, 未见参与血管形成

Fig. 3 The VECs group after implantation for 1 week ($\times 200$): a large number of implanted vascular endothelial cells disseminated distribution, not involved in angiogenesis

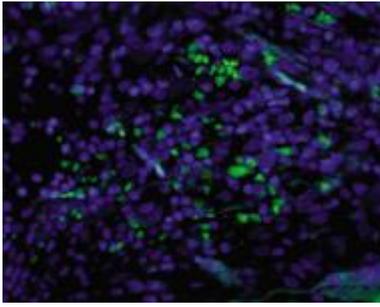


图 4 联合细胞组 1 周 ($\times 200$) 植入联合培养细胞分散存在于组织内, 数量较单种细胞接种多

Fig. 4 The co-culture cells group in the 1st week ($\times 200$): the implanted co-cultured cells disseminated distribution implants, and the number of cells was more than the single-species

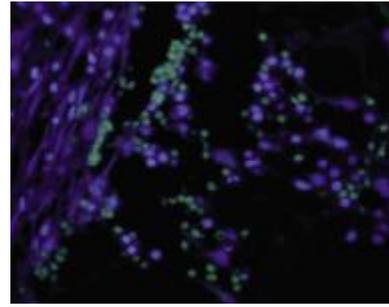


图 7 联合细胞组 4 周 ($\times 200$): 植入联合培养细胞开始增殖, 周围大量 BrdU 阴性细胞核被 DAPI 染成蓝色

Fig. 7 The co-culture cells after implantation for 4 weeks ($\times 200$): the implanted co-cultured cells began to proliferate, and a large number of BrdU-negative nuclei stained blue by DAPI

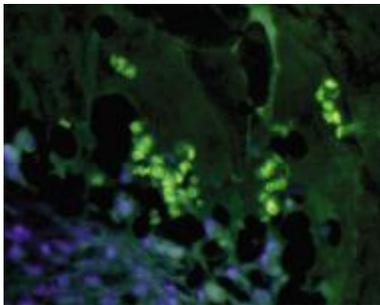


图 5 ADSCs 组 4 周 ($\times 200$): 部分植入细胞进入支架材料内部增殖呈巢状分布

Fig. 5 The ADSCs group after implantation for 4 weeks ($\times 200$): part of implanted cells entered into the scaffold material and proliferated in a nesting pattern

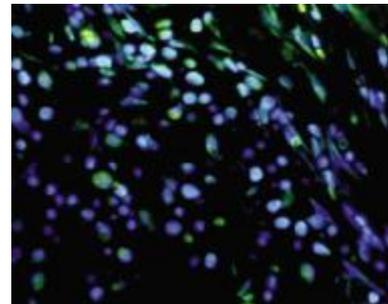


图 8 ADSCs 组 8 周 ($\times 200$): 8 周仍见大量植入细胞存在

Fig. 8 The ADSCs group after implantation for 8 weeks ($\times 200$): a large number of implanted cells still could be seen in 8th week

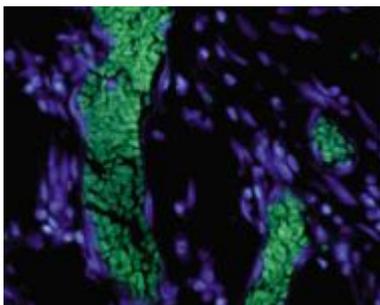


图 6 ADSCs 组 12 周 ($\times 200$): 在 12 周时大量 BrdU 阳性细胞增殖, 呈巢状集聚在一起

Fig. 6 The ADSCs group after implantation for 12 weeks ($\times 200$): a large number of BrdU-positive cells could be seen in the 12th week, were gathered together nested

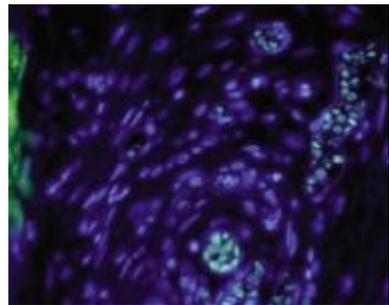


图 9 联合细胞组 8 周 ($\times 200$): 植入细胞增殖, 部分细胞参与新生血管壁的形成

Fig. 9 The co-culture cells after implantation for 8 weeks ($\times 200$): the implanted co-cultured cells began to proliferate, and some cells involved in the formation of new blood-vessel wall

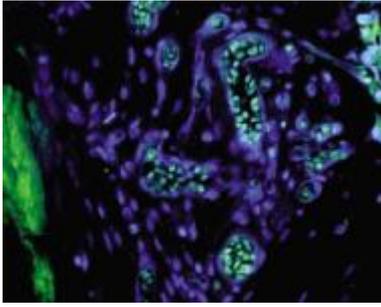


图 10 联合细胞组 12 周 ($\times 200$): 联合培养组植入细胞随时间延长逐渐增殖, 部分细胞参与新生血管壁的形成, 部分细胞巢状分布于骨支架材料间隙内

Fig. 10 The co-culture cells after implantation for 12 weeks ($\times 200$): the implanted cells gradually extended, of which some cells involved in the formation of new blood-vessel wall and some cells located in bone scaffold gap

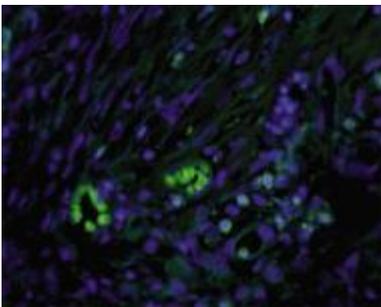


图 11 VECs 组 8 周 ($\times 200$) 大量植入血管内皮细胞参与新生血管形成, 部分血管壁细胞呈 BrdU 阳性, 部分呈阴性

Fig. 11 The VECs group in the 8th week ($\times 200$): a large number of implanted endothelial cells involved in angiogenesis. Some of the blood vessel wall cells were BrdU-positive, and some were negative

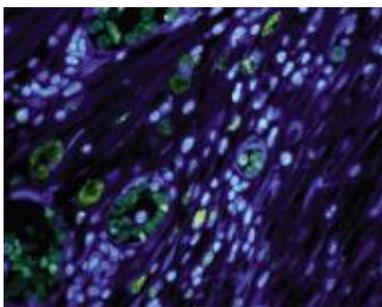


图 12 VECs 组 12 周 ($\times 200$): VECs 组植入的血管内皮细胞逐渐增殖, 参与新生血管壁的组建, 大量 BrdU 阳性细胞组成管状结构, 组织内有大量的新生血管形成

Fig. 12 The VECs group after implantation for 12 weeks ($\times 200$): the implanted VECs proliferated gradually and taken part in new blood vessel wall, many BrdU-positive cells formed tubular structures, a large number of organizations neovascularization

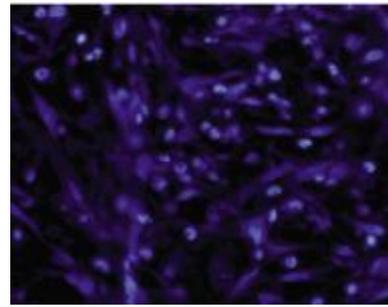


图 13 未标记 BrdU 对照组未能检测到绿色阳性细胞 ($\times 200$)

Fig. 13 The green positive cells failed to be detected in the unmarked BrdU control group ($\times 200$)

3 讨论

3.1 VECs 和 ADSCs 联合培养体系优势

近来研究人员发现 VECs 可以分泌 BMP、VEGF 等因子^[12,13,2]。在 VECs 与成骨细胞联合修复骨缺损过程中, Philippe 等^[13]认为成骨细胞表达 VEGF, VEGF 促进内皮细胞的分裂增殖, 同时 VEGF 促进内皮细胞表达 BMP-2, BMP-2 作用于成骨细胞一方面可以提高 VEGF 的表达另一方面可以促进骨再生, 2 种细胞分泌的生长因子之间形成一个正反馈调节, 因此两种细胞可互相促进而非相互抑制。2005 年 Lavender 等^[14]在研制人工血管系统中发现, 在平滑肌细胞和血管内皮细胞共培养系统中平滑肌细胞的血小板衍生生长因子 BB (PDGF-BB) 和转化生长因子 β (TGF- β) 分泌增加, VEC 的 VEGF 明显增高^[15]。虽然这些作用的机理还不清楚, 但总的来说 2 种细胞之间通过各自分泌的细胞因子影响白介素-8 (IL-8)、单核细胞趋化因子 1 (MCP-1)、细胞间粘附因子 1 (ICAM-1) 和血管细胞粘附因子 1 (VCAM-1) 等因子的基因表达而完成的^[16]。还有学者^[9]采用了内皮细胞和骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 共同培养的方法。这些研究表明联合 VECs 共同培养体系能相互促进增殖和分化。

本研究采用 BrdU 标记 VECs 和 ADSCs 及其联合培养体系, 移植入体内来检验植入的联合培养细胞增殖和分化的能力。实验表明 BrdU 标记的种子细胞在部分脱蛋白生物骨支架上迅速增殖, 植入血管内皮细胞能既能大量增殖, 又能形成大量毛细血管促进组织工程骨血管化。这些结果可以为将来组织工程骨种子细胞研究提供理论依据。

3.2 血管内皮细胞对骨组织工程的影响

在骨组织工程中, 新生血管在骨的发育、修复

和改型中承担着重要的角色,快速血管化可以尽快为骨组织内部细胞提供营养,带走代谢产物,还可以加速支架材料的降解,从而加速新骨生成。有研究^[17]表明在骨沉积速率和营养血管的表面积之间存在密切关系,营养血管的表面积越大则骨沉积速率越快。Linda 等^[18]认为组织工程化骨在体外培养时,种子细胞并没有自己的营养血管,只能靠养分的渗透作用,而这个渗透距离一般不能超过 100~200 μm,因为一旦植入患者体内以后,材料内部的种子细胞周围的养分和氧气会在几个小时内消耗完,而营养血管不可能在短期内长入材料内部。这二问题的存在也大大限制了组织工程化骨的尺寸。如何提高植入组织的血管化程度呢?学者们提出了很多方法,其中应用 VECs 联合细胞培养是其中方法之一。

Soker 在 2000 年应用血管内皮细胞 (VEC) 联合成骨细胞 (OB) 与支架材料复合,使 VEC 作为血管生成的种子细胞,在体内成骨活跃的微环境中发生毛细血管化,使材料内形成弥漫性的内源性微血管网,并与宿主血管系统建立吻合^[19]。Kaigler 等^[20]用牛 I 型胶原蛋白修饰 60 cm 培养瓶底,然后在此瓶中培养血管内皮细胞 24 h,再向瓶中加入成骨细胞培养液,作为对照向另一瓶中加入血管内皮生长因子 (50 ng/mL)。观察发现血管内皮细胞在瓶底形成血管芽样结构,与在体内新生血管的生理过程相似。这些实验说明血管内皮细胞联合细胞培养可以有效提高组织血管化速度,提高植入物的生长速度。这些实验证明血管内皮细胞可以提高血管化的速度。

在后来的研究中, Martine 等^[21]也认为在骨折修复过程中成骨细胞及其前体细胞和内皮细胞之间存在相互作用,在骨缺损局部,血管发生和骨形成具有某种藕连关系。由此可见,血管内皮细胞用于骨组织工程骨的作用不仅限于组织的血管化程度,还有助于其它种子细胞的成骨分化和生长繁殖。联合 VECs 的联合培养体系终将促进组织工程骨的研究进程。

3.3 BrdU 作为种子细胞标记物的可行性

目前细胞标记主要有荧光染料标记 (DAPI 标记、Dil 标记)、核素标记 (3H-TdR 标记)、Y 染色体标记、基因转染 (GFP)、磁标记细胞 MRI 活体示踪成像及 BrdU 标记法等。BrdU 是一种 DNA 前体胸腺嘧啶脱氧核苷酸类似物,它能掺入 S 期细胞单链 DNA 核苷酸序列替代胸腺嘧啶。只要细胞不消亡,其在 DNA 中的存留将是永久的^[22]。有研究表明^[23]。通过 MTT 法和台盼兰染色证明, BrdU 标

记对种子细胞生长增殖基本无影响,是一种理想的安全的标记方法。

本研究中, BrdU 标记的 VECs 和 ADSCs 及其联合培养体系在体内能快速增殖,也说明 BrdU 标记对种子细胞没有明显毒性。12 周后免疫荧光染色依然能清楚看到植入细胞的增殖和分布情况,说明 BrdU 能长时间对植入细胞进行示踪。总之, BrdU 标记方法操作简单、标记率高、安全可靠,可以作为骨组织工程种子细胞标记物的方法。

组织工程骨植入 VECs 和 ADSCs 及其联合培养体系在体内能大量增殖,参与新组织和新生血管的形成。

[参考文献]

- [1] DECKERS M M, VAN BEZOOIJEN R L, VAN DER HORST G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(4):1 545 - 1 553.
- [2] VELAZQUEZ O C, SNYDER R, LIU Z J, et al. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks[J]. *FASEB J*, 2002, 16(10):1 316 - 1 318.
- [3] CHOONG C S, HUTMACHER D W, TRIFFITT J T. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(9):2 521 - 2 531.
- [4] 王福科, 刘流, 代晓明, 等. 纤维粘连蛋白对部分脱蛋白骨细胞相容性影响研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(1):9 - 14.
- [5] 周峰, 任永信, 范卫民. 纤维粘连蛋白修饰的多孔 PLGA 对大鼠骨髓间充质干细胞粘附和增殖的影响[J]. *江苏医药*, 2005, 31(7):519 - 520.
- [6] 李秀兰, 高承志. 纤维粘连蛋白影响成骨细胞增殖和 I 型胶原表达的研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2008, 22(4):392 - 394.
- [7] 王福科, 刘流, 赵德萍, 等. 大鼠脐血来源血管内皮细胞的制备和鉴定 [J]. *昆明医学院学报*, 2008, 29(5):21 - 25, 32.
- [8] 裴雪涛主编. 干细胞实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2006:83 - 100.
- [9] ROMANOV Y A D, DAREVSKAYA A N, MERZLIKINA N V, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities [J]. *Bull Exp Biology Med*, 2005, 140(1):138 - 143.
- [10] 王福科, 赵德萍, 代晓明, 等. 不同类型血清对大鼠脂肪干细胞的分离培养影响 [J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(3):4 - 10.
- [11] 王福科, 刘流, 赵德萍, 等. 体外 VECs 和 ADSCs 联合培养对细胞增殖的影响[J]. *中国组织工程研究与临床*

- 99 - 107.
- [5] 李经辉, 黄辉, 余化霖, 等. 钳夹型急性大鼠脊髓损伤模型的建立与评估[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2012, 37(6):67 - 75.
- [6] WRANA J L, ATTISANO L, CARCAMO J, et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex[J]. Cell, 1992, 71(6):1 003 - 1 014.
- [7] DING Y, YAN Q, RUAN J W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and electroacupuncture downregulate the inhibitor molecules and promote the axonal regeneration in the transected spinal cord of rats [J]. Cell Transplant, 2011, 20(4):475 - 491.
- [8] SUN T, CUI C B, LUO J G, et al. Effect of electroacupuncture on the expression of spinal glial fibrillary acidic protein, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in chronic neuropathic pain rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2010, 35(1):12 - 16.
- [9] DMITRIEV A E, FARHANG S, LEHMAN RA J R, et al. Bone morphogenetic protein-2 used in spinal fusion with spinal cord injury penetrates intrathecally and elicits a functional signaling cascade[J]. Spine, 2010, 10(1):16 - 25.
- [10] DMITRIEV A E, CASTNER S, LEHMAN RA J R, et al. Alterations in recovery from spinal cord injury in rats treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 for posterolateral arthrodesis [J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(16):1 488 - 1 499.
- [11] LI H F, JIANG X H, ZOU D Q, et al. Expression of bone morphogenetic protein receptor IA in rats after contusive spinal cord injury [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao, 2011, 31(7):1 124 - 1 130.
- [12] PARIKH P, HAO Y, HOSSEINKHANI M, et al. Regeneration of axons in injured spinal cord by activation of bone morphogenetic protein/Smad1 signaling pathway in adult neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(19):99 - 107.
- [13] DAVIES S J, SHIH C H, NOBLE M, et al. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. PLo One, 2011, 6(3):173 - 178.

(2014 - 01 - 04 收稿)

(上接第 18 页)

- 康复, 2010, 14(32):6 001 - 6 005.
- [12] LAMMERT E, CLEAVER O, MELTON D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels[J]. Science, 2001, 294(5 542):564 - 567.
- [13] PHILIPPE P, FRANK P, SIMONE M P, et al. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a macroporous ceramic in rats [J]. Plast Reconstr Surg, 2003, 111(6):1 932 - 1 941.
- [14] LAVENDER M D, PANG Z, WALLACE C S, et al. A system for the direct co-culture of endothelium on smooth muscle cells [J]. Biomaterials, 2005, 26(22):4 642 - 4 653.
- [15] HEYDARKHAN-HAGVALL S, HELENIUS G. Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(6):1 250 - 1 259.
- [16] ROSE S L, BABENSEE J E. Complimentary endothelial cell/smooth muscle cell co-culture systems with alternate smooth muscle cell phenotypes [J]. Ann Biomed Eng, 2007, 35(8):1 382 - 1 390.
- [17] PIERRE B, SAADEH, BABAK J, et al. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells [J]. Endocrinology, 2000, 141(6):2 075 - 2 083.
- [18] LINDA Q GRIFFITH, GAIL NAUGHTON. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities [J]. Science, 2002, 295(8):1 009 - 1 014.
- [19] SOKER S, MACHADOM, ATALA A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering [J]. World J Urol, 2000, 18(1):10 - 18.
- [20] KAIGLER D, KREBSBACH PH, POLVERINI P, et al. Role of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cell modulation of endothelial cells [J]. Tissue Engineering, 2003, 9(1):96 - 103.
- [21] MARTINE M L, DECKERS, RUTGER L, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A [J]. Endocrinology, 2002, 143(4):1 545 - 1 553.
- [22] 解慧琪, 杨志明, 魏人前, 等. PtsA58H质粒转化人胚腱细胞的生物学特性研究 [J]. 中华手外科杂志, 2000, 16(3):136 - 139.
- [23] 顾广祥, 施晓雷, 杭化莲, 等. BrdU作为脂肪干细胞标记示踪法的可行性[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(1):14 - 19.

(2014 - 01 - 15 收稿)