

论著·基础研究

聚(左旋乳酸-己内酯)/明胶静电纺丝支架对大鼠骨髓来源内皮祖细胞成血管分化的影响

张夏, 郑雷蕾, 刘艳, 明叶, 何昊珏, 胡赟

重庆医科大学附属口腔医院, 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147

[摘要] 目的·探讨聚(左旋乳酸-己内酯)[poly(L-lactic acid caprolactone), PLCL]/明胶静电纺丝支架对内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)成血管分化的影响。方法·分离大鼠EPCs后进行培养、鉴定。制作PLCL/明胶静电纺丝支架, 进行扫描电子显微镜及水接触角测试。EPCs种植于PLCL/明胶静电纺丝支架上, CCK8法检测细胞增殖。采用RT-PCR检测成血管相关基因血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, Vegf)、激酶插入区受体(kinases insert region receptor, Kdr)表达, Western blotting技术检测VEGF蛋白表达。结果·密度梯度离心配合差速贴壁法可有效分离EPCs, PLCL/明胶静电纺丝纳米纤维高密度多孔, 亲水性能有利于细胞黏附, EPCs在支架上生长良好。PLCL/明胶组Vegf及Kdr基因的表达较对照组显著增加($P=0.000$), VEGF蛋白表达也显著增强($P=0.000$)。结论·PLCL/明胶是组织工程理想支架, 且对EPCs成血管分化有促进作用。

[关键词] 聚(左旋乳酸-己内酯); 内皮祖细胞; 分离培养; 生物学鉴定; 静电纺丝; 成血管

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.05.003 **[中图分类号]** R318 **[文献标志码]** A

Effect of poly (L-lactic acid caprolactone)/gelatin blend electrospun on angiogenesis of rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells

ZHANG Xia, ZHENG Lei-lei, LIU Yan, MING Ye, HE Hao-jue, HU Yun

Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Affiliated Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China

[Abstract] Objective·To investigate the effect of poly (L-lactic acid caprolactone) (PLCL)/gelatin electrospinning on the angiogenesis differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs). Methods·Rat bone marrow-derived EPCs were isolated and cultured, then identification was performed. After preparation of PLCL/gelatin blend electrospun scaffold, scanning electron microscopy and water contact angle test were carried out. EPCs were grown on PLCL/gelatin electrospinning and CCK8 was used to detect cell proliferation. The expression of vascular endothelial growth factor (*Vegf*) and kinases insert region receptor (*Kdr*) was observed by RT-PCR and the expression of VEGF protein was observed by Western blotting. Results·The density gradient centrifugation combined with differential adherence method could effectively isolate EPCs. PLCL/gelatin electrospun nanofibers were porous, and the hydrophilic properties were favorable for cell adhesion, and EPCs grew well on the scaffold. The expression of *Vegf* and *Kdr* gene in PLCL/gelatin group was higher than that in control group ($P=0.000$), and the expression of VEGF protein was also increased ($P=0.000$). Conclusion·PLCL/gelatin is an ideal scaffold for tissue engineering, and it can promote the angiogenesis differentiation of EPCs.

[Key words] poly (L-lactic acid caprolactone); endothelial progenitor cell; isolation and culture; biological identification; electrospun; angiogenesis

静电纺丝是一种特殊的纤维制造工艺, 聚合物溶液或熔体在电场作用下, 针头处的液滴会由球形变为圆锥形(即“泰勒锥”), 并从圆锥尖端延展得到纤维细丝。通过静电纺丝法获得的纳米纤维膜具有孔隙率高、纤维均一性高、比表面积大的特点, 且形态特征类似天然组织的细胞外基质, 其内在的多孔结构有利于细胞的渗透, 大比表面积也增强了细胞的黏附与迁移。McClure等^[1]和

Andukuri等^[2]的研究都显示静电纺丝纳米纤维材料支持内皮细胞的黏附与增殖, 并且能形成连续层样结构, 有潜力成为血管移植物。因此, 静电纺丝纳米纤维是组织工程的一个理想支架。明胶(gelatin)是由动物皮肤、骨、肌膜、肌腱等结缔组织中的胶原部分降解而成, 其氨基酸组成和胶原相似, 具有良好的生物相容性、可降解性以及低免疫原性。聚(左旋乳酸-己内酯)[poly(L-lactic acid

[基金项目] 国家自然科学基金(81470772); 重庆市医学科研项目(20141013, 2015HBRC009); 重庆市自然科学基金(cstc2015jcyj10028, cstc2016jcyjA0238)(National Natural Science Foundation of China, 81470772; Chongqing Medical Research Project, 20141013, 2015HBRC009; Chongqing Natural Science Foundation, cstc2015jcyj10028, cstc2016jcyjA0238)。

[作者简介] 张夏(1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: 522414105@qq.com。

[通信作者] 胡赟, 电子信箱: Huyuncqmu@163.com。



caprolactone), PLCL] 具有左旋聚乳酸 (poly-L-lactide, PLLA) 和聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 的优点, 具有良好的力学性能、生物可降解性以及生物相容性。Fu 等^[3] 研究显示管状 PLCL/ 胶原及 PCL/ 明胶静电纺丝纳米纤维具有良好的机械性能、润湿性, 并且可以促进细胞黏附及增殖。裸鼠皮下实验显示 PLCL/ 胶原静电纺丝可形成血管样组织。Lee 等^[4] 认为 PLCL/ 明胶静电纺丝复合物较单纯 PLCL 或明胶静电纺丝的机械性能好, 比如杨氏模量、抗张强度及断裂伸长率高, 且细胞相容性更好, 表明 PLCL 及明胶可运用于血管组织再生。

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 主要生成和存在于骨髓中, 是一类干细胞和血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 之间具有游走特性的能够自我更新和增殖分化的定向干细胞, 是组织工程的理想种子细胞。目前的研究^[5] 认为 EPCs 可以分化为成熟内皮细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和心肌样细胞。有研究^[6] 认为, 血管形成对成骨和骨折后骨的修复起着关键作用, 且血管形成先于新骨形成。与 ECs 相比, EPCs 来源广泛, 取材方便, 增殖能力强, 免疫排斥反应小, 临床运用前景广阔。本研究将 EPCs 与 PLCL/ 明胶静电纺丝纤维膜共培养, 探究静电纺丝膜对 EPCs 增殖分化的影响, 以期为临幊上血管修复提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

静电纺丝 PLCL/ 明胶材料采用静电纺丝工艺制备, PLCL (由 50% 左旋丙交酯及 50% 己内酯单体组成) 与明胶比例为 1:1, 溶剂为六氟异丙醇 (HFIP), 浓度 10%, 电压 12~15 kV, 流速 1 mL/h, 接收距离 15~20 cm。

1.2 实验动物

清洁级 SD 大鼠 10 只 (4 周龄, 体质量 80~100 g, 雌雄不拘), 由重庆医科大学实验动物中心提供, 在重庆医科大学附属口腔医院重点实验室动物房饲养, 实验前适应性喂养 2 d, 所有动物自由饮水和进食。实验处置符合动物伦理学标准。实验动物生产许可证号为 SCXK (渝) 2017-0001, 实验动物使用许可证号为 SYXK (渝) 2017-0023。

1.3 主要试剂及仪器

Percoll 细胞分离液 (GE, 美国), DMEM-F12、M199 培养基 (Hyclone, 美国), 血管内皮生长因子 (vascular

endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) (Preprotech, 美国), Matrigel 基质胶 (BD, 美国), 明胶 (Solarbio, 中国), Dil-ac-LDL (Mengbio, 中国), FITC-UEA-1 (SIGMA, 美国), CCK8 (同仁, 日本), 抗大鼠 VEGF 抗体 (义翘神州, 中国), 二抗 (Bioss, 中国), 总 RNA 提取试剂盒 (Omega, 美国), SDS-PAGE 凝胶试剂盒、BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天, 中国), 倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本), 自动成像荧光显微镜 (Life technology, 美国), 滤光片式酶标仪 (Biotek, 美国), 静电纺丝仪 (永康乐业, 中国)。

1.4 EPCs 的分离及鉴定

1.4.1 EPCs 分离和培养 骨髓单个核细胞的分离参照相关研究^[6], SD 大鼠脱颈处死, 在无菌条件下分离股骨和胫骨, PBS 冲洗骨髓腔, 直至冲洗液清亮, 骨干发白。收集骨髓冲洗液, 缓慢倒入装有 percoll 密度梯度离心液 (1.077 g/mL) 的离心管中, 以 $800 \times g$ 离心 20 min, 吸取中间白色浑浊云雾层骨髓单个核淋巴细胞, 用 PBS 洗涤 2 次。将获得的骨髓单个核淋巴细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养孵箱中培养。48 h 后无菌离心管收集培养瓶中未贴壁细胞, 200 × g 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗涤 1 次, 将获得的细胞重悬于完全培养基 (M199 培养基、20% 胎牛血清、10 µg/L VEGF、4 µg/L bFGF) 中, 接种于预先包被 1% 明胶的 25 mL 培养瓶中。4 d 后首次换液, 去除不贴壁的造血细胞, 以后每 2 d 换 1 次液, 细胞融合至 80%~90% 时进行细胞传代。观察细胞形态变化并拍照。

1.4.2 EPCs 生长曲线的绘制 原代细胞培养至融合 80%~90%, 消化离心后重悬于完全培养基中, 以 2×10^4 /mL 的细胞密度每孔加 100 µL 于 96 孔板中, 共接种细胞 40 孔。每隔 24 h 检测 1 次, 连续检测 8 次, 每次取 5 孔细胞, 每孔加入 10 µL CCK8, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 2 h 后测定其吸光度, 取其平均值作为最终值。根据所得结果, 以吸光度为纵坐标, 以时间 (d) 为横坐标绘制生长曲线。

1.4.3 EPCs 鉴定

(1) Matrigel 小管形成实验 Matrigel 4 °C 过夜, 使其完全融化。以每孔 50 µL 的量缓慢加入 -20 °C 预冷的 96 孔板中, 设置 4 个复孔, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养孵箱中孵育 1 h。取生长良好的第 3 代细胞消化离心后加入完全培养基重悬, 以每孔 4×10^4 个细胞接种于预先包被 Matrigel 的 96 孔板中, 在培养箱中孵育 5 h 后, 在倒置相差显微镜下观察小管形成情况并拍照。



(2) 双荧光染色实验 取原代培养 7 d 的细胞, 消化离心后加入完全培养基重悬, 以每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中, 设置 4 个复孔, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 24 h, 细胞贴壁完全后, 加入浓度为 2.4 μg/mL DiI-ac-LDL 避光孵育 2 h。PBS 清洗 3 次, 再用 2% 多聚甲醛于 4 °C 固定 10 min, PBS 清洗 3 次, 每次 2 min。最后加入 10 μg/mL 的 FITC-UEA-1 避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次。倒置荧光显微镜下观察染色结果。

1.5 PLCL/ 明胶静电纺丝相关检测

1.5.1 扫描电子显微镜 将 PLCL/ 明胶静电纺丝纤维膜干燥后, 喷金, 在扫描电子显微镜下进行观察扫描。

1.5.2 水接触角测试 主要用来评价材料的亲疏水性。材料越亲水, 水滴与表面的接触角越小, 反之则疏水性增加。将 PLCL/ 明胶纳米纤维膜水平固定在载玻片上, 保持表面平整, 水平放在载物台上, 调整蒸馏水液滴约为 2 μL, 滴在样品表面平整处, 5 s 内利用量角法计量液滴接触角大小。取 3 个平行样, 求平均值。

1.6 PLCL/ 明胶静电纺丝对 EPCs 增殖分化的影响

1.6.1 静电纺丝上细胞生长曲线 将支架材料连同收集载体铝箔片一起裁剪成与 24 孔板孔底直径相近小块若干份, 用眼科镊小心将静电纺丝膜揭下, 浸泡于 75% 乙醇, 紫外光照射 1 h, 加入无血清培养基孵育。第 3 代 EPCs 消化离心, 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 每孔加 500 μL 细胞悬液, 共接种细胞 40 孔。接种后每 24 h 测 1 次, 连续计数 8 d, 每次取 5 孔细胞, 加入 CCK8, 孵育 1 h 后分别取 100 μL 至 96 孔板中, 测定其吸光度。根据所得结果, 以吸光度为纵坐标, 以时间为横坐标绘制生长曲线。

1.6.2 PLCL/ 明胶静电纺丝对 EPCs 成血管化影响的相关检测

(1) RT-PCR 第 3 代 EPCs 消化离心, 用无 VEGF 的 M199 培养基重悬, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 分为 PLCL/ 明胶 +EPCs 组和 EPCs 组; 培养 7 d 后, 提取 RNA 反转录后扩增, 运用 RT-PCR 技术检测成血管相关基因的表达, 包括 *Vegf* 及激酶插入区受体 (kinases insert region receptor, *Kdr*)。在 GenBank 中找出 *Vegf*、*Kdr*、β-肌动蛋白的基因序列, 使用 Primer5 进行目标基因的引物设计 (表 1), 由南京金瑞斯生物科技公司合成。

(2) Western blotting 第 3 代 EPCs 消化离心, 用无 VEGF 的 M199 培养基重悬, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 分为 PLCL/ 明胶 +EPCs

组和 EPCs 组; 培养 7 d 后, PBS 洗 2 遍, 用加入含蛋白抑制剂 (PMSF) 的蛋白裂解液裂解细胞, 用刮匙均匀刮下细胞裂解液, 离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白电泳缓冲液。煮沸后, 进行蛋白电泳, 电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入抗 VEGF、β-肌动蛋白抗体, 按 1:1 000 稀释, 4 °C 孵育过夜, 加入 HRP 标记或荧光标记的二抗, 用化学发光法检测结果。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab 1 RT-PCR primer sequences

基因	引物序列 (5' → 3')
<i>Vegf</i>	上游引物: TTTTGCTTCCTATTCCCCCTCTT 下游引物: CTCCCTGCTACCTCTTCCTCTG
<i>Kdr</i>	上游引物: CCCAGAGTGGTGGAAATGATA 下游引物: TAGACATAAACGATGGAGGAGACA
β-肌动蛋白	上游引物: CCGCGAGTACAACCTTCTT 下游引物: GTCATCCATGGCGAACTGGTG

1.7 统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示, 运用 SPSS 19.0 统计分析软件进行分析。2 组数据比较采用 *t* 检验, 3 组数据比较采用单因素方差分析, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

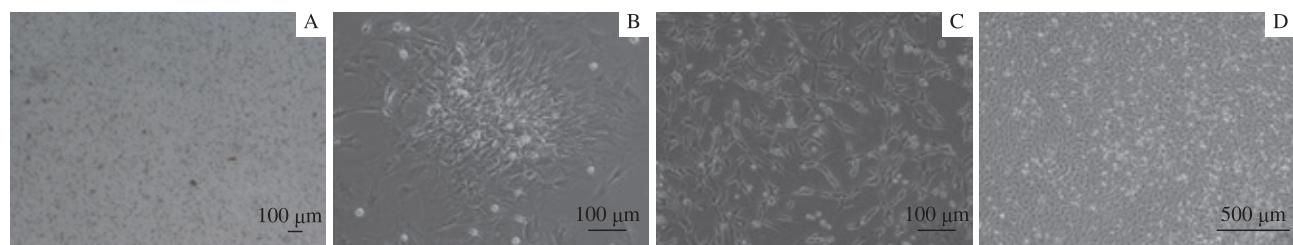
2.1 EPCs 鉴定结果

2.1.1 倒置显微镜下细胞形态 新分离的原代细胞为圆形 (图 1A); 细胞培养第 3 日, 细胞开始增殖, 可见“集落样”结构产生, 集落中央为圆形细胞, 外周为放射状排列的梭形细胞 (图 1B); 传代后梭形细胞首尾相连, 呈毛细血管样排列 (图 1C); 2 周时大部分细胞呈多角形, 细胞集落相互连接, 呈典型的“铺路石”样 (图 1D)。

2.1.2 EPCs 生长曲线 在细胞培养前 2 d 细胞生长缓慢, 从第 3 日开始细胞生长速度加快, 呈指数生长, 细胞进入对数生长期, 第 6 日时达到最高峰, 之后 2 d 缓慢下降, 细胞进入平台期 (图 2)。

2.1.3 Matrigel 小管形成实验 细胞在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 5 h 后, 倒置相差显微镜下可见细胞首尾相连, 形成小管样结构, 大量小管彼此相连形成管腔样结构, 形似血管管腔结构 (图 3)。

2.1.4 双荧光染色实验 在倒置荧光显微镜下观察到细胞与 FITC-UEA-1 结合而呈现绿色荧光, 同时, 又因为摄取 DiI-ac-LDL 呈现红色荧光, 而双染色阳性的细胞被认为是 EPCs, 重合后呈现为黄色 (图 4)。



注: A. 新分离的原代细胞; B. 细胞培养第3日; C. 细胞传代后; D. 细胞培养2周后。

图1 大鼠骨髓来源EPCs在倒置显微镜下的形态特征

Fig 1 Morphological characteristics of rat bone marrow-derived EPCs under inverted microscope

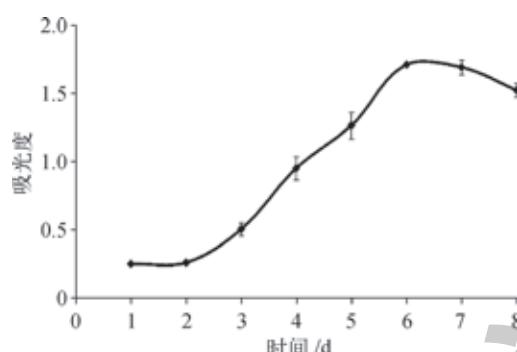


图2 大鼠骨髓来源EPCs生长曲线

Fig 2 Growth curve of rat bone marrow-derived EPCs

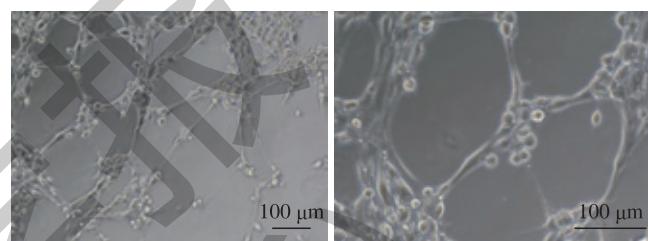
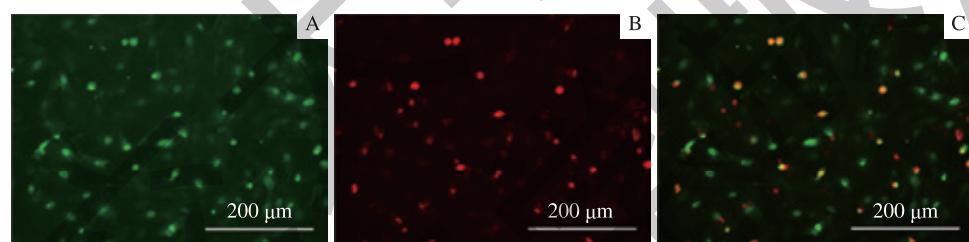


图3 大鼠骨髓来源EPCs Matrigel 小管形成实验

Fig 3 Matrigel tube formation experiment of rat bone marrow-derived EPCs



注: A. FITC-UEA-1染色; B. Dil-ac-LDL染色; C. 2种荧光图像叠加。

图4 大鼠骨髓来源EPCs双荧光染色

Fig 4 Double fluorescence staining of rat bone marrow-derived EPCs

2.2 PLCL/明胶静电纺丝相关检测

2.2.1 扫描电子显微镜 静电纺丝扫描电子显微镜下观察结果显示所得到的支架纤维交错排列, 表面具有微/纳米的类似天然细胞外基质的微/纳米结构特点, 高密度多孔, 较好地模拟了天然细胞外基质中蛋白纤维的尺寸和结构, 利于细胞的黏附生长(图5)。

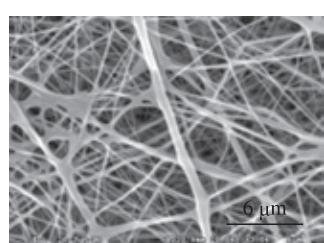


图5 PLCL/明胶静电纺丝扫描电子显微镜下图像

Fig 5 Scanning electron microscope image of PLCL/gelatin electrospun

2.2.2 水接触角测试 PLCL/明胶静电纺丝纤维膜的水接触角平均为 $42.00^\circ \pm 6.56^\circ$ (图6A), 呈亲水性; 且与单纯PLCL静电纺丝纤维膜水接触角 $88.00^\circ \pm 2.65^\circ$ (图6B)相比, 亲水性显著增加($P=0.000$)。这是由于明胶增加了其亲水性, 有利于细胞的黏附。

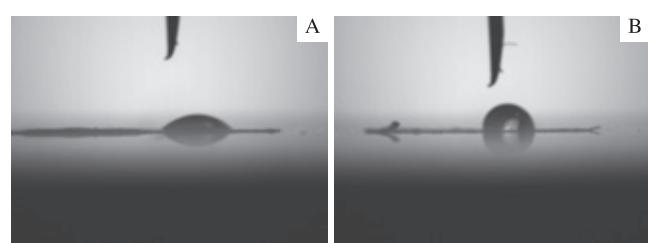


图6 PLCL/明胶(A)和PLCL(B)静电纺丝纤维膜接触角测试

Fig 6 Water contact angle of PLCL/gelatin (A) and PLCL (B) electrospun



2.3 PLCL/明胶静电纺丝对EPCs增殖和成血管化的影响

2.3.1 静电纺丝上细胞生长曲线 PLCL/明胶静电纺丝上大鼠骨髓来源EPCs的生长曲线见图7。与该细胞正常生长曲线相似，细胞生长前2 d细胞增殖较缓慢，第3日起细胞生长速度加快，呈指数生长，细胞进入对数生长期，第7日时达到最高峰，之后缓慢下降。

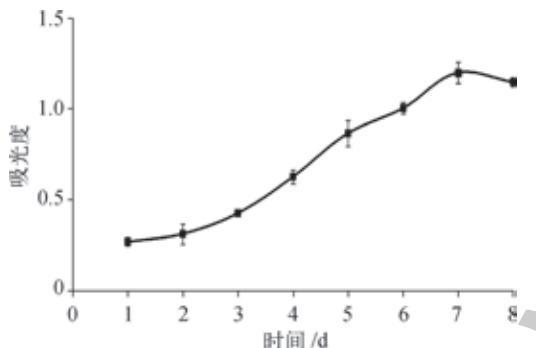
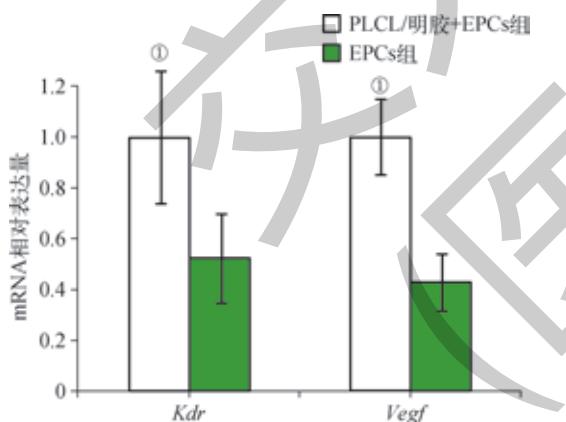


图7 PLCL/明胶静电纺丝上大鼠骨髓来源EPCs的生长曲线
Fig 7 Growth curve of rat bone marrow-derived EPCs on PLCL/gelatin electrospun

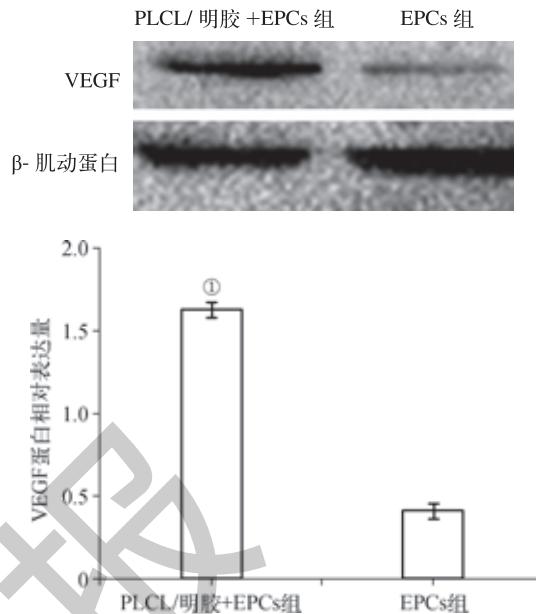
2.3.2 RT-PCR结果 培养第7日，PLCL/明胶+EPCs组*Vegf*及*Kdr*基因表达量均较EPCs组显著升高（图8），表明PLCL/明胶静电纺丝对EPCs成血管化有促进作用。



注：^① $P=0.000$ ，与EPCs组比较。

图8 *Vegf*及*Kdr*基因的相对表达量
Fig 8 Relative mRNA expression levels of *Vegf* and *Kdr*

2.3.3 Western blotting结果 培养第7日，PLCL/明胶+EPCs组VEGF蛋白表达量较对照组显著升高（图9）。



注：^① $P=0.000$ ，与EPCs组比较。

图9 VEGF蛋白的相对表达量
Fig 9 Relative expression levels of VEGF

3 讨论

循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞，即血管EPCs，因为这些细胞可以像胚胎时期的血管发育那样，由EPCs分化出成熟内皮细胞，从而参与血管发生，因此是组织工程骨血管化理想的种子细胞^[7-9]。目前，分离EPCs的方法主要有密度梯度离心法及免疫磁珠分选法。其中，免疫磁珠分选法虽然得到的细胞纯度较高，但费用高、操作复杂且分离得到的细胞量很少，对细胞活性的影响大，易污染；密度梯度离心法虽然操作简单，但分离的细胞不纯。因此，研究采用密度梯度离心法配合差速贴壁法提高细胞纯度。

本研究通过细胞形态、双荧光染色、Matrigel实验来鉴定EPCs。分离的细胞镜下呈现典型的EPCs形态，新分离的原代细胞为圆形；细胞培养第3日，细胞开始增殖，可见“集落样”结构产生，集落中央为圆形细胞，外周为放射状排列的梭形细胞，传代后梭形细胞首尾相连，呈毛细血管样排列；2周时，大部分细胞呈多角形，细胞集落相互连接，呈典型的“铺路石”样。由于EPCs能够特异性摄取Dil-ac-LDL和FITC-UEA-1^[8]，本研究对EPCs进行

了 Dil-ac-LDL 和 FITC-UEA-1 双荧光染色鉴定，在倒置荧光显微镜下显示双荧光染色阳性^[10]。Matrigel 小管形成实验是测量在体外血管生成一种快速的可量化的方法。本研究将 EPCs 接种于预先包被 Matrigel 的孔板中，显微镜下观察可见大量小管形成。

本研究所得到的 PLCL/ 明胶静电纺丝纤维支架交错排列，表面具有微 / 纳米的类似天然细胞外基质的微 / 纳米结构特点，高密度多孔，较好地模拟了天然细胞外基质中蛋白纤维的尺寸和结构，而有利于细胞的黏附生长。水接触角测试显示 PLCL/ 明胶静电纺丝水接触角呈亲水性，且与单纯 PLCL 静电纺丝纤维膜接触角相比，亲水性显著增加，这是由于明胶增加了其亲水性，有利于提高支架的生物相容性^[11]。CCK8 实验显示 EPCs 接种于 PLCL/ 明胶静电纺丝上可正常生长。

VEGF 早期也称作血管通透因子 (vascular permeability factor, VPF)，是血管 ECs 特异性的肝素结合生长因子，可在体内诱导血管新生。Asahara 等^[12]研究表明，EPCs 通过自分泌或旁分泌方式分泌的 Vegf 参与 EPCs 从骨髓向外周血的动员过程。Vegf 的受体主要有 3 种，即 VEGFR1 (FLT1)、VEGFR2 (KDR) 和 VEGFR3 (FLT4)。KDR 参与

调控细胞趋化、有丝分裂、细胞骨架再造等过程^[13]，并且在介导 VEGF 对 ECs 的增殖、迁移、分化、血管形成等方面发挥着重要的作用。在新生血管中，对于仅表达 KDR 的 EPCs 可产生分裂反应，而对于缺乏 KDR 仅表达 FLT1 的细胞则不能产生增殖反应。Dashnyam 等^[14]认为，在组织工程支架上修饰 VEGF 会促进细胞向成熟的 ECs 分化，从而有利于血管再生。此外，VEGF 及其受体 KDR 是成血管分化的重要标志。本研究中，将 EPCs 接种于 PLCL/ 明胶静电纺丝上 7 d 后 *Vegf*、*Kdr* 的基因表达升高，VEGF 的蛋白表达量也增加，表明 PLCL/ 明胶静电纺丝支架对 EPCs 的成血管分化有促进作用。

利用静电纺丝技术制备的 PLCL/ 明胶纳米纤维膜支架，结合了两者的优点，克服了各自的缺点，具有良好的生物相容性及机械性能。该复合纳米纤维 PLCL/ 明胶表面具有微 / 纳米的类似天然细胞外基质的微 / 纳米结构特点，且高密度多孔，较好地模拟了天然细胞外基质中蛋白纤维的尺寸和结构。PLCL/ 明胶静电纺丝纳米纤维膜不仅能够维持细胞的黏附，而且能促进 EPCs 的成血管分化，能进一步应用于组织工程血管的研究。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, et al. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(7): 2422-2433.
- [2] Andukuri A, Kushwaha M, Tambralli A, et al. A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants[J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(1): 225-233.
- [3] Fu W, Liu Z, Feng B, et al. Electrospun gelatin/PLCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1): 2335-2344.
- [4] Lee J, Tae G, Kim YH, et al. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(12): 1872-1879.
- [5] Takahashi M, Okubo N, Chosa N, et al. Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(3): 357-364.
- [6] Saran U, Piperni SG, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 561(2): 109-117.
- [7] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(7): 593-600.
- [8] Ii M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: isolation and characterization for myocardial repair[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 660: 9-27.
- [9] Oh BJ, Oh SH, Jin SM, et al. Co-transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves revascularization and organization in islet grafts[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(6): 1429-1440.
- [10] Asahara T, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-967.
- [11] 吴国良, 任天斌, 曹春红, 等. 静电纺丝法制备 PLCL/ 明胶与 PLCL/ 胶原引导骨组织再生膜及其结构、性能与细胞学[J]. *材料导报*, 2010, 24(s1): 385-388.
- [12] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18(14): 3964-3972.
- [13] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4): 581-611.
- [14] Dashnyam K, Jin GZ, Kim JH, et al. Promoting angiogenesis with mesoporous microcarriers through a synergistic action of delivered silicon ion and VEGF[J]. *Biomaterials*, 2017, 116(2017): 145-157.

[收稿日期] 2017-11-03

[本文编辑] 吴 洋

