

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.046

## 细胞联合培养在血管构建中的作用\*

叶菁 王勤涛<sup>△</sup>

(第四军医大学口腔医学院牙周黏膜病科 陕西 西安 710032)

**摘要:**组织工程三大要素为种子细胞、支架材料和信号分子,干细胞因其多分化潜能成为热门的种子细胞。血管化问题是制约工程化组织应用于临床的问题之一。利用干细胞构建组织工程血管的手段之一是在分离培养得到足够的种子细胞后,通过生长因子、细胞外基质、外力作用、其他细胞等的调控实现内皮向分化。只有实现了成功的血管构建,工程化组织才能正常的发挥作用。近年来不少国内外专家学者通过细胞联合培养的方法,观察细胞间的相互作用对血管构建的影响,结果表明,细胞联合培养在血管的形成、存活、稳定方面起到了重要的作用,为组织工程血管化提供了有效的途径,本文就部分细胞联合培养在血管构建中的作用作一综述。

**关键词:**细胞联合培养;血管化;组织工程

**中图分类号:**R318.08;Q2-33;R78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3373-04

## The Effect of Cells Co-culture for Vascularization\*

YE Jing, WANG Qin-tao<sup>△</sup>

(Department of Periodontics and Oral Medicine, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT:** Tissue engineering comprises seed cells, scaffold material and information factors. Stem cells with multiple-directional differentiation potential have been widely studied. Using stem cells to construct tissue-engineering blood vessels is an important mean which can realize endothelial differentiation through growth factors, extracellular matrix, mechanics environment, other cells et al after isolating and culturing enough seed cells. The vascularization of tissue engineering is one of the key problem which restricts clinical application. Only achieve successful vascularization, can engineered tissue works normally. In recent years, many scholars have been using different techniques to improve the vascularization. The results showed that cells co-culturing plays a key role in the formation, surviving and stability of blood vessels. What's more, it improves an effective means for tissue engineering vascularization. This paper just reviews part of these publication.

**Key words:** Cells co-culture; Vascularization; Tissue engineering

**Chinese Library Classification(CLC):** R318.08; Q2-3; R78 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)17-3373-04

1987年美国科学基金会提出了“组织工程”的概念,其被定义为利用工程学和生命科学的原理发展能恢复、保留或提高组织功能的生物替代品<sup>[1]</sup>。对组织工程的研究几乎涉及了生命科学的每个领域,但截至目前能真正应用到临床的组织工程产品并不多且使用寿命不长久,而缺乏足够的血供是目前制约组织工程发展的主要原因之一,因为稳定的血管构建是移植后人工组织存活的前提之一。一般认为血管构建存在两种机制:一是从中胚层前体细胞中新生形成的原始血管网状结构称为血管生成,二是在原有血管基础上通过血管内皮细胞增殖、游走、芽生、血管分裂而形成新的毛细血管网称为血管再生。近年来有不少研究者应用细胞联合培养的技术,观察不同细胞之间的相互作用对血管构建的影响,因此本文就细胞联合培养在血管构建中的应用做一综述。

### 1 参与血管构建的细胞

血管构建过程中种子细胞的选取是关键步骤之一,目前已研究的能用于血管构建的细胞有内皮细胞及可分化为该类细胞或改善其性能的前体细胞、干细胞等。

#### 1.1 内皮细胞

内皮细胞是血管构建中最重要的调节器<sup>[2]</sup>。它能分解和合成细胞外基质的组成成分,如胶原、层粘连蛋白、凝血酶敏感蛋白和纤维粘连蛋白等<sup>[3]</sup>。内皮细胞还能通过自分泌、旁分泌途径来分泌细胞因子和生长因子,促进自身的增殖。活化的内皮细胞能上调细胞黏附分子和蛋白水解酶类的表达,并且可以和细胞外基质紧密结合。内皮细胞的上述特性都有利于血管构建的形成。现代内皮细胞的研究起始于七十年代初,当时应用氘胸腺嘧啶摄取的研究第一次记录了内皮细胞分裂和增殖的能力<sup>[4]</sup>。1978年,Herring<sup>[5]</sup>等报道了将已植入内皮细胞的涤纶人工血管植入狗的动脉系统,实验结果表明血管材料内皮化能明显改善

\* 基金资助:国家自然科学基金项目(81271137)

作者简介:叶菁(1989-),女,硕士,研究方向:牙周膜干细胞的血管化研究, E-mail:shirley19891207@163.com

△ 通讯作者:王勤涛,教授, E-mail:yznmbk@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-10 接受日期:2013-12-30)

植入后的血管通畅率,这是内皮细胞在组织工程中的首次应用。经过长期探索,人们发现血管损伤后,内皮细胞具有抗血栓形成和促进平滑肌细胞增生的作用,并且能有效提高血管通畅率。随着血管内皮细胞快速培养技术的突破,内皮细胞得到了更广泛的研究和应用,目前自体内皮细胞的主要来源有两个:①自体非必须的血管;②腹膜或皮下脂肪组织。

**1.1.1 脐静脉内皮细胞** 多数情况下,对于人血管内皮的研究都是在体外培养的工具细胞的基础上进行的,而对于人自体血管内皮细胞的各项研究大多数是利用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)。选择脐带作为内皮细胞取材来源的原因归结为两点:①作为分娩过程的一件废弃物,其来源丰富,容易获取;②脐带血管没有分支,便于操作,有着理想的长度,能够保证收集足量细胞。Kadner<sup>[9]</sup>等对脐动脉、脐静脉、整条脐带分离增殖培养的细胞进行了细胞增殖、生物学特性、机械性能等方面的研究,并与大隐静脉分离培养的细胞进行了比较,结果表明脐带细胞在各方面的性能更优良,是理想的自体来源种子细胞。

**1.1.2 脂肪来源的内皮细胞** 1983年,Kern<sup>[7]</sup>等从人的脂肪组织中分离培养出微血管内皮细胞。脂肪组织中的血管基质成分具有很强的血管生成能力,脂肪来源的内皮细胞生长增殖能力较好,对血管切应力抵抗能力较强。其优越性具体体现在:①脂肪细胞容易获得,对机体损伤小,可多次抽取;②细胞数量多,体外增殖速度快,且具有较高的生存率,能在短时间内获得足量的细胞,因此具有广阔的应用前景。

## 1.2 前体细胞/祖细胞

在内皮细胞生物学上的一个里程碑是在1997年,Asahara<sup>[8]</sup>等人第一次从成人体内成功分离出内皮祖细胞(EPCs)。前体细胞/祖细胞是能进行分裂而产生两个分化细胞的未分化或具有部分分化功能特征的细胞,与干细胞的区别在于其无自我更新能力。内皮祖细胞是内皮细胞的前体,是一种多能干细胞,与造血前体细胞有相似的特征,主要来源于骨髓,外周血,脐血等。早期存在于骨髓的内皮祖细胞表达3种蛋白:CD133, CD34和VEGFR-2。当祖细胞进入外周血时,开始表达CD31, vWF, Flk-1和血管内皮钙黏蛋白。内皮祖细胞作为良好的种子细胞来源,现已被广泛应用于组织工程的血管构建中。

## 1.3 干细胞

作为组织工程的种子细胞,干细胞因其增殖能力强并且具有多向分化潜能成为研究的热点。利用干细胞构建组织工程血管的重要手段是在分离、培养得到足够数量的种子细胞后,通过干预和诱导,使其分化为所需的目的细胞。干细胞的分化受多条件的影响,诸如生长因子、细胞外基质等等。因此通过这些因素单独作用或联合作用,使干细胞向内皮细胞和平滑肌细胞分化,对于血管构建有着重要的意义。目前已用于组织工程血管构建的干细胞有造血干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞、外周血干细胞等。

## 2 影响血管构建的因素

### 2.1 细胞因子

**2.1.1 VEGF 血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)** 是 Ferrara<sup>[9]</sup>等于1989年在牛垂体星状细胞体外

培养液中分离出的一种糖蛋白。VEGF属于血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)家族,是由血管内皮细胞邻近的细胞所产生,通过旁分泌 VEGF 与血管内皮细胞内的酪氨酸酶的受体结合后引起了受体自主磷酸化和血管内皮细胞内的信号转导,促进体内新生血管生成,增加血管通透性<sup>[10]</sup>,因此又被称为血管通透因子。除此之外还可促进蛋白水解酶的合成,分解妨碍血管新生的多余基质成分<sup>[11]</sup>。在缺氧环境中 VEGF 基因表达水平上调,成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor, FGF)、肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)可以从不同水平调节 VEGF 的表达。在人脐静脉内皮细胞和牙周膜成纤维细胞联合培养的实验中,在 VEGF 和 bFGF 存在的条件下第七天就形成了毛细血管样的结构,而无 VEGF 和 bFGF 加入的共培养组第七天没有毛细血管样结构的形成<sup>[12]</sup>。缺少 VEGF 的存在,单独的内皮细胞几乎不能形成血管样结构<sup>[13]</sup>。

**2.1.2 Ang-1、Ang-2/Tie2 促血管生成素 -1、-2 及其受体 Tie2 (Angiopoietin-1、Angiopoietin-2/tyrosine Kinase Receptor 2, Ang-1、Ang-2/Tie2)** 是近年来发现的一种除血管内皮生长因子(VEGF)之外的一条新的血管生成信号转导通路<sup>[14]</sup>。Ang-1在体外不能直接促进内皮细胞生长,这可能与新生血管的启动机制不同,但其在新生血管管腔形成过程中起作用,促进血管结构稳定<sup>[15]</sup>。有研究认为 Ang-2 可以竞争性地阻断 Ang-1 的效应,有促进内皮祖细胞移行的作用,可能是新生血管形成的始动环节<sup>[16]</sup>,但其具体机制还有待进一步研究。VEGF 和 Ang-1 在胚胎形成过程中有协同作用,VEGF 促进内皮细胞增殖分化并形成不成熟的血管,而 Ang-1 则诱导血管稳定。

**2.1.3 其他调控因子** 除上述两种因子外,还有基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor 1, SDF-1),是趋化因子 CXC 家族中的成员,对成熟单核细胞、造血干细胞及祖细胞有潜在的化学趋化作用,并通过其特异性受体-CXCR4 发挥作用<sup>[17]</sup>。有文献报道 SDF-1 通过趋化造血干细胞来促进 VEGF 诱导血管生成<sup>[18]</sup>。另外还有胰岛素样生长因子、神经生长因子、缺氧诱导因子-1 等也是影响血管构建的因子。

## 2.2 支架材料

在血管构建中,支架材料是种子细胞粘附、生长、新陈代谢的三维空间。支架材料按照来源大致可以分为天然材料、人工材料和复合材料三大类。Bergland<sup>[19]</sup>等采用戊二醛交联 I 型胶原作为支架,使构建的人工血管机械强度大大增强。1998年,Shinoka<sup>[20]</sup>等首先报道了以聚羟基乙酸制成管状支架,将羊血管壁细胞种植于支架上,在体外培养后植入羊肺动脉,通过与自体肺动脉的对比,被证明是一种具有自我生长、修复功能的活血管。此外能用于细胞外基质替代物还有聚乳酸、聚羟丁酸等。潘勇<sup>[21]</sup>等将聚羟基乙酸和胶原纤维混合构建血管支架材料,研究证明有利于内皮细胞贴附生长。因此在组织工程血管化构建中应用具有良好生物相容性及可塑性,来源广泛的支架材料显的尤为重要。

## 3 不同细胞培养模式对血管形成的影响

### 3.1 血管内皮细胞的单独培养

在较早的研究中,Walter<sup>[22]</sup>等曾在体内和体外将主动脉内皮细胞和支架混合观察对构建血管结构的影响。实验对照组采

用的是平滑肌细胞、骨骼肌细胞与支架混合,结果表明含主动脉内皮细胞的支架中新生毛细血管的数量,淋巴管样结构的数量明显增多。可能的机制是内皮细胞直接参与新血管的生成,也可能是内皮细胞提供了一些信号分子如生长因子,胞外基质等促进主血管的生成。这一研究表明内皮细胞接种到支架上对于血管构建是可行的。

以前大部分对于脂肪来源细胞的研究都是培养来源于年轻健康人体脂肪组织的内皮祖细胞并观察其在血管组织工程中的潜能,而 Harris<sup>[23]</sup>等对糖尿病、晚期肾病及外周血液疾病患者皮下脂肪组织来源的内皮祖细胞进行培养,在实验中证实有血液疾病的患者脂肪组织来源的内皮祖细胞仍然具有分化成内皮样细胞的能力,并参与血管构建的过程,在 Matrigel 基质胶上能形成比较稳定的血管网络。同时脂肪来源的内皮祖细胞容易获得,所以脂肪组织会成为组织工程种子细胞的重要来源之一。

种子细胞不仅仅来自动脉和脂肪组织,来源于牙周膜的成纤维细胞克隆增殖后形成的细胞具有间充质干细胞、内皮细胞、平滑肌细胞的特性,利用球形聚集实验形成细胞团然后接种到 I 型胶原支架上,结果表明有血管样的结构形成,并且能表达内皮细胞标记物。因此在牙周再生中牙周膜组织的成纤维细胞系或能成为构建血管系统的前体细胞<sup>[24]</sup>。

### 3.2 细胞联合培养

虽然细胞单独培养在血管构建中取得了一定的进展,但形成的血管结构稳定性不高,内皮细胞易凋亡,因此研究者也在不断探索如何改善这一情况。那么通过细胞联合培养对血管构建有怎样的影响呢?细胞联合培养是将不同类型的细胞混合培养,通过细胞间存在的精细的相互调控关系,促进细胞的生长和分化。大量研究表明,细胞联合培养可防止构建形成的血管中的内皮细胞脱落和凋亡,使新生的血管网络更加稳定。因此细胞联合培养技术被越来越多的应用到实验中,特别是多细胞作用的组织工程的血管构建中。

#### 3.2.1 内皮细胞和间充质干细胞联合培养

Cristina Correia 等<sup>[25]</sup>将人间充质干细胞和人脐静脉内皮细胞在不同条件下共培养,结果表明两者共培养能产生新生的毛细血管网,研究还表明人脐静脉内皮细胞形成的毛细血管样结构只有在人间充质干细胞存在下才能稳定。郭英等<sup>[26]</sup>分离培养鼠骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞并体外构建鼠骨髓间充质干细胞和鼠肾血管内皮细胞直接接触培养血管化人工骨,以间接接触三维培养体系和两种细胞单独培养体系作为对照,建立鼠骨髓间充质干细胞和肾血管内皮细胞的三维培养体系。因动物实验无法构建间接培养组,故进一步实验只比较带有内皮细胞和不带有内皮细胞组,将两种细胞直接接触组材料和骨髓间充质干细胞单独培养组的材料分别植入鼠左右腿肌肉内,通过软 X 射线摄影和苏木精-伊红染色检测分析不同植入方法的血管形成和成骨能力。体内实验表明在血管化人工骨中的软 X 射线骨密度,血管数量和新形成的骨量均高于对照组。提示在两种细胞混合培养时骨髓间充质干细胞的成骨能力可以被细胞因子和细胞膜蛋白质调节,和传统的人工骨比较,血管化人工骨能加速骨髓间充质干细胞分化、增加局部的血管微循环生存率、加速成骨和增加抗感染能力。而间充质干细胞在其中所起的作用一方面

作为外膜细胞来稳定血管网络,另一方面作为成骨祖细胞来形成矿化骨基质。

#### 3.2.2 内皮细胞和成骨细胞联合培养

在人的正常生理活动中,骨髓中的成骨细胞和毛细血管内皮细胞会彼此接触。张健等<sup>[27]</sup>将兔的血管内皮细胞与成骨细胞复合后与支架材料外消旋聚乳酸共同植入兔的背阔肌下,对照组只用成骨细胞,4 周后组织学观察成骨细胞组可见骨组织形成,材料周围有小血管长入,而成骨细胞与血管内皮细胞复合组可见支架内部有大量毛细血管形成,支架周围成骨细胞活跃,成骨能力较强,在体内成骨能力及血管化程度均高于单纯成骨细胞组。因此内皮细胞的存在有利于血管化的形成,促进组织工程骨的再生和稳定。Wang<sup>[28]</sup>等的实验证实,共培养时成骨细胞可持续表达 VEGF mRNA,并可通过产生 VEGF 刺激内皮细胞增殖;而活化的内皮细胞则产生成骨因子,增加骨细胞的增殖分化。表明成骨细胞和内皮细胞联合培养可以促进成骨和成血管的协同效应。而 Wenger<sup>[29]</sup>等在形成球形聚集团块的人脐静脉内皮细胞中加入人成骨细胞共同培养,观察到两种细胞在类球体上形成了特殊的空间结构,与单独培养人脐静脉内皮细胞相比,其成血管能力有所抑制。这似乎与人成骨细胞能产生促血管生成因子相矛盾,所以对骨血管化的调控机制、细胞之间、细胞与材料之间等关系还需要更多的研究。

#### 3.2.3 内皮细胞和成肌细胞联合培养

血管在联合了外周细胞或平滑肌细胞后会变得稳定,而内皮细胞能诱导未分化的间充质细胞向平滑肌细胞分化。Levenberg<sup>[30]</sup>等将内皮细胞和成肌细胞联合培养,结果表明可以形成管腔样结构。通过 RT-PCR 结果可以看出,内皮细胞和成肌细胞联合培养,其 VEGF mRNA 的表达量增加。同时本实验还实现了内皮细胞、成肌细胞、胚胎成纤维细胞的三维联合培养,胚胎成纤维细胞起到了稳定血管的作用,与单纯的内皮细胞和成肌细胞联合培养相比,内皮细胞的总面积和形成管腔的数量和大小都明显增加,并且 VEGF mRNA 的表达明显上调。由此可见,多种细胞联合培养为血管化提供了更合适的途径。

#### 3.2.4 内皮细胞和成纤维细胞联合培养

Wenger<sup>[31]</sup>等应用三维球形共培养模式培养人脐静脉内皮细胞和人原代成纤维细胞,并种植于固相载体材料,血管形成的水平相对于脐静脉内皮细胞单独培养虽然有所降低,但是共培养的细胞类球体仍能形成管腔样的毛细血管样结构。48h 后用 ELISA 法检测 DNA 碎片评估细胞凋亡情况,结果表明由于成纤维细胞的存在,内皮细胞的凋亡水平明显降低。据此推测,成纤维细胞可能具有稳定血管内皮细胞,抑制其凋亡的作用。

陈欣<sup>[32]</sup>等观察了同种血管内皮细胞和成纤维细胞移植对人工真皮血管化的促进作用。在大鼠背部造成全层皮肤缺损创面,将血管内皮细胞和成纤维细胞混入等量纤维蛋白胶后,按  $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$  的密度喷洒于移植床,结果表明同种血管内皮细胞和成纤维细胞移植可促进创面愈合过程中的血管新生,加速人工真皮移植后血管化过程,促进类真皮组织的成熟。另外, Liu<sup>[33]</sup>等通过三维共培养人真皮成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞发现联合培养有力地增强了血管化的形成,研究指出虽然内皮细胞在 VEGF 存在的情况下也能形成血管化,但是形成的管腔短且不稳定,而在有成纤维细胞存在的情况下能形成网络状

的管腔样结构,并且成纤维细胞能有效的替代外源性 VEGF 的作用。

Nobuhiro Nagai<sup>[12]</sup>等采用细胞片层技术(cell sheet engineering)<sup>[33]</sup> 处理的人牙周膜成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞共培养,收获的细胞是含有细胞外基质的一层完整的片状结构,并且含有离子通道、生长因子受体和连接蛋白等重要的细胞表面蛋白。因此,应用细胞片层技术构建的组织结构更接近于正常组织。采用 CD31 抗体染色表明有较稳定的毛细血管样的结构生成,细胞联合培养可能在延长细胞寿命,维持细胞功能方面起到积极的作用。

#### 4 展望

综上所述,细胞联合培养参与了机体多个器官组织的血管构建过程,为血管形成提供了一种新模式、新思路,而多种信号分子的参与对于血管构建的过程也是十分必要的,在未来的研究中,随着实验的不断深入扩展及研究方法的改进更新,细胞联合培养在组织工程血管构建的过程中有着广阔的应用前景,对组织工程血管构建将起到一定的推动作用。

稳定的血管构建是移植后人工组织存活的前提之一,同样牙周组织再生与良好的血管化息息相关,而细胞联合培养在管腔的形成,血管的稳定方面可以起到重要的作用,在实验中如运用这种细胞培养模式,为牙周组织工程的血管化提供更有效实用的途径,促进牙周血管化骨的再生。

#### 参考文献(References)

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering [J]. Science, 1993, 260(5110): 920-926
- [2] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. Nature, 1997, 386(6626): 671-674
- [3] Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control [J]. Apmis, 1997, 105(6): 417-437
- [4] Schwartz SM, Benditt EP. Aortic endothelial cell replication. I. Effects of age and hypertension in the rat [J]. Circ Res, 1977, 41(2): 248-255
- [5] Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium[J]. Surgery, 1978, 84(4): 498-504
- [6] Alexander K, Gregor Z, Christine M, et al. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 25(4): 635-641
- [7] Kern PA, Knedler A, Eckel RH, et al. Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue [J]. J Clin Invest, 1983, 71(6): 1822-1829
- [8] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967
- [9] Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161(2): 851-858
- [10] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1029-1039
- [11] Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. Pharmacol Rev, 2004(56): 549-580
- [12] Nobuhiro N, Ayumi H, Nao O, et al. Development of tissue-engineered human periodontal ligament constructs with intrinsic angiogenic potential[J]. Cells Tissues Organs, 2009, 190(6): 303-312
- [13] Hua L, Bo C, Brenda L. Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1[J]. Angiogenesis, 2008, 11: 223-234
- [14] Lund EL, Hag A, Olsen MWB, et al. Differential regulation of VEGF, HIF1, and angiopoietin-1, -2, and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma [J]. Int J Cancer, 2004, 108(6): 833-838
- [15] Jianhua H, Makoto I, Mamoru H, et al. Sendai viral vector mediated angiopoietin-1 gene transfer for experimental ischemic limb disease [J]. Angiogenesis, 2009, 26(12): 243-246
- [16] Gill KA, Brindle NP. Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(2): 392-396
- [17] Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract [J]. Nature, 1998, 393(6685): 591-594
- [18] Ruiade AC, Lutttun A, Carmeliet P. An SDF-1 trap for myeloid cells stimulates angiogenesis [J]. Cell, 2006, 124(1): 18-21
- [19] Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, et al. A biological model for collagen-based tissue engineered vascular constructs[J]. Biomaterials, 2003, 24(7): 1241-1254
- [20] Shinoka T, Shum Tim D, Ma PX, et al. Creation of viable pulmonary artery autograft through tissue engineering [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 115(3): 536-545
- [21] 潘勇, 艾玉峰, 黄蔚, 等. 体外组织工程血管支架内皮化的实验研究 [J]. 中国美容医学, 2002, 11(4): 300-303  
Pan Yong, Ai Yu-feng, Huang Wei, et al. Endothelial linings in tissue engineering blood vessel [J]. Chinese Journal of aesthetic medicine, 2002, 11(4): 300-303
- [22] Holder WD, Gruber HE, Roland WD, et al. Increased vascularization and heterogeneity of vascular structures occurring in polyglycolide matrices containing aortic endothelial cells implanted in the rat [J]. Tissue Eng, 1997, 3(2): 149-160
- [23] Harris LJ, Zhang P, Abdolahi H, et al. Availability of adipose-derived stem cells in patients undergoing vascular surgical procedures [J]. J Surg Res, 2010, 163(2): e105-112
- [24] Naoto O, Akira I, Tadashi I, et al. Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K activation-dependent manner [J]. J Vasc Res, 2010, 47(5): 369-383
- [25] Cristina C, Warren LG, Miri P, et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis [J]. Plos One, 2011, 6(12): e28352
- [26] 郭英, 马卫东, 陈小冬, 等. 血管化人工骨的体外构建和体内异位成骨 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3611-3615  
Guo Ying, Ma Wei-dong, Chen Xiao-dong, et al. Construction of vascularization artificial bone in vitro and ectopic osteogenesis in vivo [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(20): 3611-3615

## 参考文献(References)

- [1] Huang Xiao-hua, Jain PK, El-Sayed IH, et al. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles [J]. *Lasers Med Sci*, 2008, 23(3): 217-228
- [2] Tian Qi-wei, Tang Ming-hua, Sun Yan-gang, et al. Hydrophilic flower-like CuS superstructures as an efficient 980 nm laser-driven photothermal agent for ablation of cancer cells [J]. *Adv Mater*, 2011, 23(31): 3542-3547
- [3] Tian Qi-wei, Jiang Fei-ran, Zou Ru-jia, et al. Hydrophilic Cu<sub>9</sub>S<sub>5</sub> nanocrystals: a photothermal agent with a 25.7% heat conversion efficiency for photothermal ablation of cancer cells in vivo [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(12): 9761-9771
- [4] Ke Heng-te, Wang Jin-rui, Dai Zhi-fei, et al. Gold-nanoshelled microcapsules: a theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(13): 3017-3021
- [5] Dickerson EB, Dreaden EC, Huang Xiao-hua, et al. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 57-66
- [6] Chen Jing-yi, Glaus C, Laforest R, et al. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment [J]. *Small*, 2010, 6(7): 811-817
- [7] Li Yue-bin, Lu Wei, Huang Qian, et al. Copper sulfide nanoparticles for photothermal ablation of tumor cells [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(8): 1161-1171
- [8] Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method [J]. *Chem Mater*, 2003, 15(10): 1957-1962
- [9] Wang Xue-ying, Fang Zhen, Lin Xiu. Copper sulfide nanotubes: facile, large-scale synthesis, and application in photodegradation [J]. *J Nanopart Res*, 2009, 11(3): 731-736
- [10] Dobson K, Fisher I, Hodes G, et al. Stabilizing CdTe/CdS solar cells with Cu-containing contacts to p-CdTe [J]. *Adv Mater*, 13(19): 1495-1499
- [11] Yu Xue-lian, Cao Chuan-bao, Zhu He-sun, et al. Nanometer-sized copper sulfide hollow spheres with strong optical-limiting properties [J]. *Adv Funct Mater*, 2007, 17(8): 1397-1401
- [12] Zhang Shu-sheng, Zhong Hua, Ding Cai-feng. Ultrasensitive flow injection chemiluminescence detection of DNA hybridization using signal DNA probe modified with Au and CuS nanoparticles [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(19): 7206-7212
- [13] Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy [J]. *Bioconj Chem*, 2011, 22(10): 1879-1903
- [14] Zhou Min, Zhang Rui, Huang Miao, et al. A chelator-free multifunctional [64Cu]CuS nanoparticle platform for simultaneous micro-PE-T/CT imaging and photothermal ablation therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(43): 15351-15358
- [15] Sanhai WR, Sakamoto JH, Canady R, et al. Seven challenges for nanomedicine [J]. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3(5): 242-244
- [16] Zha Zheng-bao, Wang Shu-min, Zhang Shu-hai, et al. Targeted delivery of CuS nanoparticles through ultrasound image-guided microbubble destruction for efficient photothermal therapy [J]. *Nanoscale*, 2013
- [17] You Jian, Zhang Guo-dong, Li Chun. Exceptionally high payload of doxorubicin in hollow gold nanospheres for near-infrared light-triggered drug release [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(2): 1033-1041
- [18] Zha Zheng-bao, Zhang Shu-hai, Deng Zi-jian, et al. Enzyme-responsive copper sulphide nanoparticles for combined photoacoustic imaging, tumor-selective chemotherapy and photothermal therapy [J]. *Chem Commun*, 2013, 49(33): 3455-3457
- [19] Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, et al. Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1996, 14(1): 35-42
- [20] Shulamit L, Jeroen R, Mara M, et al. Engineering vascularized skeletal muscle tissue [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(7): 879-884
- [21] Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, et al. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering [J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 181(2): 80-88
- [22] 陈欣, 副岛一孝, 野崎翰弘. 血管内皮细胞和成纤维细胞混合移植对人工真皮血管化的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(6): 452-455
- [23] Chen Xin, Soejima K, Nozaki M. Influence of mixed grafting of vascular endothelial cells and fibroblasts on the angiogenesis of artificial dermis [J]. *Chinese Journal of Burns*, 2006, 22(6): 452-455
- [24] Okano, T. Cell sheet engineering [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2006, 46(11): 795-798
- [25] Zhang Jian, Zhang Wen-yi, Hu Min. Prefabricate a tissue-engineering bone by compounding of vascular endothelia cells [J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2007, 17(3): 205-208
- [26] Wang DS, Miura M, Demura H, et al. Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factor produced by endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(7): 2953-2962
- [27] Wenger A, Stahl A, Weber H, et al. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering [J]. *Tissue Engineering*, 2004, 10(9-10): 1536-1547

(上接第 3376 页)