

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.18.004

氨基修饰的纳米纤维对人和大鼠 MSCs 增殖分化的影响 *

吕兰欣^{1,2} 杨红宁¹ 颜晓庆¹ 胡书群¹ 燕宪亮^{1,2} 许 铁^{1,2Δ}

(1 徐州医科大学卫生应急研究所 江苏 徐州 221002; 2 徐州医科大学附属医院急救中心 江苏 徐州 221002)

摘要 目的:探讨氨基修饰后的静电纺丝纳米纤维对大鼠和人骨髓来源的间充质干细胞(Rat and human bone marrow mesenchymal stem cells, rMSCs and hMSCs)增殖及成骨分化的影响。**方法:**采用静电纺丝法制备聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 纳米纤维,用氨气等离子体处理其表面来接枝氨基;通过测量 PLGA 纳米纤维(NF)及氨基修饰后的纳米纤维(NF-NH₂)接触角来证明修饰效果;将 rMSCs 和 hMSCs 分别接种于 NF 和 NF-NH₂,用 CCK-8 试剂盒检测接种后 1, 3 (4), 7 天的细胞增殖;接种后的 21 天,用茜素红 S 染色 (ARS) 法检测细胞成骨分化情况。**结果:**氨气等离子体处理后纳米纤维接触角从 81.28 ± 0.33 降低至 53.99 ± 0.79,说明氨基修饰后的 PLGA NF 亲水性增加;CCK-8 结果显示氨基修饰增加了 rMSCs 的黏附,接种 24 h 后 rMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 上的检测吸光值分别为 0.096 ± 0.011 和 0.175 ± 0.014 ($P < 0.001$),而对 hMSCs 黏附和增殖没有影响,接种 24 h 后 hMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 上的检测吸光值分别为 0.237 ± 0.004 和 0.238 ± 0.006 ($P > 0.05$);ARS 染色结果显示氨基修饰后 rMSCs 成骨分化增多(在 NF 和 NF-NH₂ 表面 ARS 染色区域比例分别 13.147 ± 3.223% 和 36.677 ± 5.230%),而 hMSCs 在修饰前后的纳米纤维上均有表达(修饰前后 ARS 染色比例分别为 50.283 ± 2.942% 和 38.254 ± 3.272%)。**结论:**氨基修饰的 NF 可以促进大鼠来源的 MSCs 黏附增殖以及成骨分化,而对人骨髓来源的 MSCs 没有显著影响,这提示我们 MSCs 的增殖分化行为可能具有种属依赖性。

关键词:纳米纤维;氨基修饰;成骨分化;间充质干细胞**中图分类号:**R-33;R331.2;R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)18-3420-05

The Effect of Amino-group Modified Nanofibers on Proliferation and Differentiation of MSCs derived from Human and Rat Bone Marrow*

LV Lan-xin^{1,2}, YANG Hong-ning¹, YAN Xiao-qing¹, HU Shu-qun¹, YAN Xian-liang^{1,2}, XU Tie^{1,2Δ}

(1 Institute of Health Emergency, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China;

2 Emergency Center, the Affiliate Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of ammine group modified electrospinning nanofibers on the proliferation and osteogenic differentiation of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells (rMSCs, hMSCs). **Methods:** Electrospun technique was employed to fabricate poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofibers, whose surface was grafted with amino-group through ammonia plasma treatment; Contact angle was measured on the PLGA nanofibers (NF) surface and amino-group modified (NF-NH₂) surface; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to test the proliferation of rMSCs and hMSCs after seeded onto NF and NF-NH₂ for 1, 3(4), and 7 days; Alizarin Red S (ARS) was used to detect the osteogenesis of rMSCs and hMSCs after seeded 21 days. **Results:** The contact angle was reduced from 81.28 ± 0.33 to 53.99 ± 0.79 by ammonia plasma treatment, which indicated that after modified by amino-group the surface of NF became hydrophilic. CCK-8 results showed that more rMSCs attached to NF-NH₂ surface. After 24 h seeded onto surfaces, the absorbance data of rMSCs on PLGA NF and NF-NH₂ was 0.096 ± 0.011 and 0.175 ± 0.014 respectively ($P < 0.001$). However the NF-NH₂ had no effects on the adhesion and proliferation of hMSCs. After 24 h seeded onto surfaces, the absorbance data of hMSCs on PLGA NF and NF-NH₂ was 0.237 ± 0.004 and 0.238 ± 0.006 respectively ($P > 0.05$). It can be seen from the ARS staining results that hMSCs produced calcium deposit equally on both NF and NF-NH₂ surfaces, while NF-NH₂ enhanced osteogenic differentiation of rMSCs (the ARS staining area was increased from 13.147 ± 3.223% to 36.677 ± 5.230%). **Conclusion:** NF modified by amino-groups can enhance rMSCs' adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. The same phenomenon didn't happened on hMSCs, indicating that MSCs have a species dependent response.

Key words: Nanofibers; Amino-group modification; Osteogenesis; Mesenchymal stem cells**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R331.2; R318 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)18-3420-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81271267);江苏省高校自然科学研究面上项目(16KJB310018);徐州市科技计划项目(KC16SY156)

作者简介:吕兰欣(1984-),博士研究生,主要研究方向:骨组织工程,E-mail: lvlanxin1982@xzhmu.edu.cn

Δ 通讯作者:许铁(1958-),博士生导师,教授,主要研究方向:心脑血管疾病,E-mail: xutie889@163.com,电话:051685806067

(收稿日期:2018-04-22 接受日期:2018-05-18)

前言

21 世纪是各类干细胞基础研究与临床探索的 " 盛世 " [1-3]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 由于取材和应用不存在伦理道德方面的争议, 在骨缺损修复领域具有广阔的临床应用前景 [4,5]。诱导干细胞成骨分化的方法有很多, 其中生物化学诱导剂效果显著但是限制其临床应用 [6,7], 有一些研究者将目光转向了基底材料本身特性对 MSCs 分化的影响, 如基底表面的官能团、软硬度以及形貌等 [8-10]。也有些研究者研究了脂肪及骨髓来源的 MSCs 分化行为的差异性 [11], 但是目前很少有研究关注不同种属来源 MSCs 成骨分化的差异性。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA) 有良好的生物相容性和生物降解性能且降解速度可控, 目前已被制作为人工导管、药物缓释载体、组织工程支架等, 在生物医学工程领域有广泛的用途 [12-14]。其中 PLGA 静电纺丝纳米纤维具有高孔隙率和高比表面积, 被广泛应用于组织工程研究中。但是由于 PLGA 的疏水性, 不利于细胞的黏附和增殖, 因此对其表面进行适当改性至关重要 [15]。氨气等离子体处理技术是一种安全有效快捷的表面修饰技术, 可以在高分子材料表面引入氨基基团对其进行改性 [16]。本研究中采用大鼠和人骨髓来源的间充质干细胞为研究对象, 以氨基修饰的纳米纤维为基底, 来探讨基底材料特性及种属差异性对干细胞成骨分化的影响, 以期对 MSCs 在骨组织工程中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用大鼠 MSCs 为本实验室提取, 所用人 MSCs 由英国基尔大学 ISTM 研究所提供; 胎牛血清、 α -MEM、青链霉素、0.25 % 胰酶购自英国 Lonza 公司; 成骨诱导液自行配置, 所需试剂均购自 Sigma 公司; 细胞培养耗材购买自美国 NUNC 公司; PLGA、茜素红 S 购买自 Sigma 公司; 静电纺丝仪器为自行搭建; 氨等离子体处理机为德国生产 (Diener electronic, Plasma-Surface-Technology, Germany); 接触角使用奥林巴斯相机以及 ImageJ 软件分析测量; CCK-8 试剂盒购自 VICMED 公司; 光学显微镜购自德国 Leica 公司; 全波长酶标仪购自美国 Bio-tek 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 按照以前我们报道的方法从大鼠骨髓中提取 MSCs [17]。步骤为: 将 4 周龄 SD 大鼠的胫骨和股骨分离出来, 浸泡在 75 % 的乙醇中, 转入超净工作台内, 用培养液清洗 3 次后沿骨垢剪掉骨的两端, 暴露出骨髓腔, 用无菌注射器吸取 10 mL 细胞生长培养液冲洗骨髓腔, 将骨髓冲出, 转移至 25 cm² 细胞培养瓶中, 在 37 °C, 5 % CO₂ 条件下培养。提取后培养 24 小时首次换液, 以后每三天换液一次。约一周后悬浮细胞经换液大部分被除去, 贴壁生长的即 MSCs。8-10 天后, MSCs 达到 80 % 融合, 去除培养液, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗细胞后 0.25 % 的无 EDTA 的胰酶 37 °C 消化 5 分钟, 然后加入 3 mL 培养液终止消化。吹打均匀后的细胞悬液以 1:2 传代到新的细胞培养瓶中。人 MSCs (hMSCs) 从液氮罐中取出, 迅速放入 37 °C 水浴箱中复温解冻, 待 hMSCs 解冻后, 用吸管吸出冻存液, 加入装有培养液的培养瓶中, 吹打混匀, 于 37 °C 5

% CO₂ 培养箱中培养, 第二天换液, 当 MSCs 90 % 融合时按上述方法消化传代。

1.2.2 PLGA 纳米纤维制备、修饰及表征 将 0.3 g PLGA 溶解于 7.5 mL 二氯甲烷中充分搅拌溶解, 加入 2.5 mL N, N- 二甲基甲酰胺溶液, 通过磁力搅拌器搅拌 1 小时充分混匀。将制备好的静电纺丝溶液置于注射器中, 注射器一端连接 6 # 不锈钢针头 (内径为 0.5 mm), 另一端与注射泵相连, 泵的推进速度为 1.5 mL/h。铝箔作为 PLGA 纳米纤维 (nanofibers, NF) 的接收端。针头和收集端的距离为 20 cm, 并施加 12 kV 的高压直流电, 其中针头接正极, 收集端接负极。制备的所有纤维都放入真空干燥箱中 60 °C 24 小时去除有机溶剂残留。将待修饰的 PLGA NF 置于等离子体处理机中, 接通氨气, 设置反应条件为 21 mbar-50 mbar, 5 分钟。将足量的 NF 和 NF-NH₂ 样品转移至超净工作台, 75% 酒精浸泡 2 小时后 PBS 清洗 3 次备用。取 NF 以及氨基修饰的 NF (NF-NH₂) 样品用于接触角测量, 在各样品表面加 4 μ L 超纯水并于 30 秒内拍照。每一样品表面于不同位点测量 3 次取平均值作为该样品的接触角。取等离子体处理前后的 PLGA 纳米纤维进行扫描电子显微镜 (SEM, ultra plus Zeiss, Germany) 观察。

1.2.3 实验分组 实验分为 4 组, 分别为 rMSCs 接种于 NF, rMSCs 接种于 NF-NH₂, hMSCs 接种于 NF, hMSCs 接种于 NF-NH₂。各组接种浓度均为 2×10^4 /cm²。在普通培养基中培养 7 天后, 换成成骨诱导液继续培养。

1.2.4 CCK-8 实验 在细胞接种后 1, 3(4), 7 天, CCK-8 溶液以 1:10 稀释于 α -MEM 培养基中混匀, 每个样品加入 220 μ L 稀释液后于 5 % CO₂ 培养箱中 37 °C 孵育 2 h, 然后每孔取 100 μ L 液体转移到 96 孔板中, 在酶标仪上读取 450 nm 波长处吸光值。样品中剩余含 CCK-8 的培养液弃去, 加入新鲜培养液继续培养, 可连续测数天的吸光值。实验重复 3 次, 每次每样品设置 6 个重复 [18]。

1.2.5 ARS 染色实验 在更换成骨诱导液的第 21 天, 使用茜素红 S (Alizarin red S, ARS) 染色来观察钙结节的产生。接种细胞的样品用 PBS 漂洗一遍后用 70% 乙醇于室温中固定 1 小时, 接着, 用 40 mM 茜素红 S-PBS 溶液染色 20 分钟。染色后, 样品用纯水冲洗 5 遍后用倒置显微镜明场观察。

1.3 统计学分析

实验数据使用 Sigma STAT32 统计软件进行分析, 分析结果均以 " 均数 $\pm$ 标准差 " 表示。统计采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA); 两组比较时采用 Student's T-test, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 SEM 观察氨等离子体处理前后 PLGA 纳米纤维

图 1 所示可见与处理前相比, 经等离子体刻蚀后单根 PLGA 纳米纤维表面粗糙度有所增加, 但是整体形貌并未发生显著变化, 纤维没有出现断裂、熔化等情况。修饰前后纳米纤维直径分别为 440 ± 92 nm 和 464 ± 125 nm, 纤维直径略有增加。

2.2 氨气等离子体处理能够改变 PLGA NF 表面亲水性

PLGA NF 经过氨气等离子体处理后进行接触角检测发现氨基修饰可以使 NF 表面亲水性增加 ($P < 0.001$), 处理前 NF 接触角为 81.28 ± 0.33 , 处理后 NF-NH₂ 接触角减小到 53.99 ± 0.79 。见图 2。

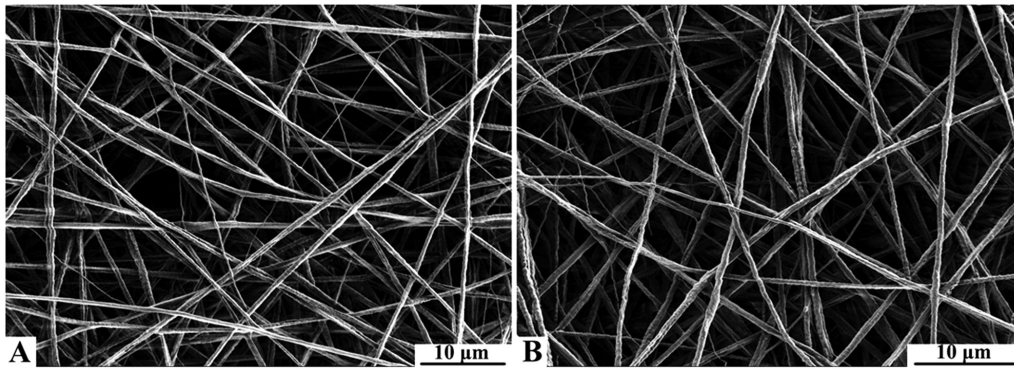


图1 氨气等离子体处理前后 SEM 观察 PLGA 纳米纤维形貌

(A)PLGA NF 图片;(B)PLGA NF-NH₂ 图片

Fig. 1 The morphology of PLGA nanofibers observed by SEM before and after ammonia plasma treatment

(A) Image of PLGA NF; (B) Image of PLGA NF-NH₂

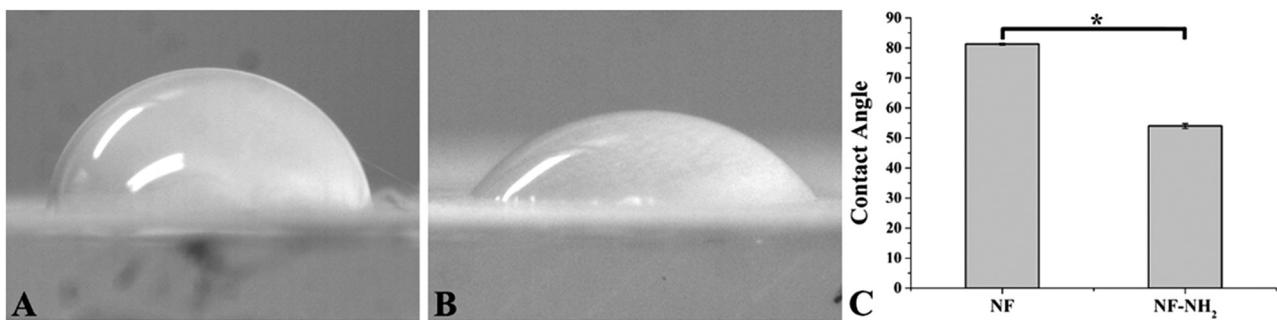


图2 PLGA 纳米纤维表面氨等离子体处理前后接触角比较

(A)NF 表面水滴图片;(B)NF-NH₂ 表面水滴图片;(C)接触角统计数据

Fig. 2 Comparison of the contact angles of PLGA NF before and after ammonia plasma treatment

(A) Water drop image on NF; (B) Water drop image on NF-NH₂; (C) contact angle analyzed by ImageJ.

Note: Data are expressed as mean± SD, n=3. *P<0.001.

2.3 PLGA NF-NH₂ 可促进 rMSCs 黏附增殖

有研究表明,亲水性表面更有利于细胞的黏附^[6]。为了检测不同种属来源的 MSCs 对微环境的敏感性,我们将大鼠和人骨髓来源的 MSCs 分别接种到 PLGA NF 和 NF-NH₂ 表面,并在 1、3、(4)、7 天用 CCK-8 对其活性进行检测。结果表明,氨基修饰的 NF 表面可以显著促进鼠源 MSCs 的黏附以及增殖

($P<0.05$)(图 3.A), 接种 24 h 后 rMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 上的检测吸光值分别为 0.096 ± 0.011 和 0.175 ± 0.014 ($P<0.001$); 然而,人源 MSCs 对于基底表面基团敏感性较弱,氨基修饰前后 NF 表面细胞黏附无差异,接种 24 h 后 hMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 上的检测吸光值分别为 0.237 ± 0.004 和 0.238 ± 0.006 ($P>0.05$),增殖差异不大 ($P>0.05$)(图 3.B)。

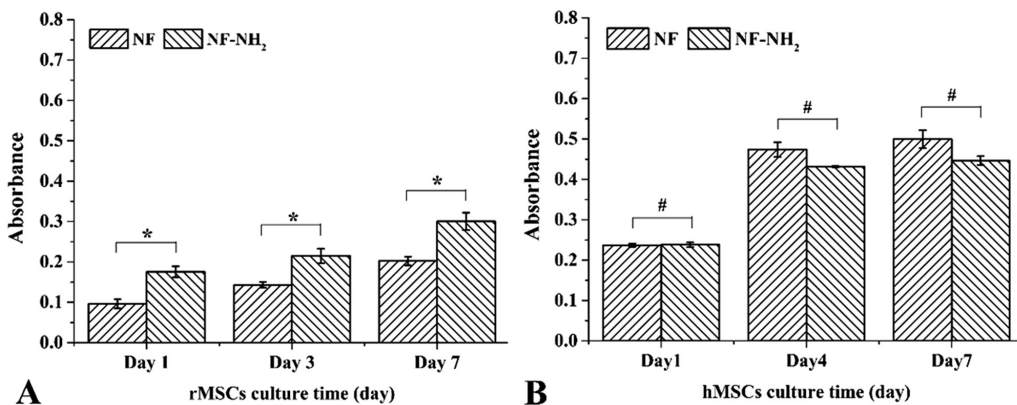


图3 rMSCs 和 hMSCs 在 NF、NF-NH₂ 上黏附增殖比较

(A) rMSCs 在 NF、NF-NH₂ 上黏附(Day1)、增殖(Day1, 3, 7)结果;(B)hMSCs 在 NF、NF-NH₂ 上黏附(Day1)、增殖(Day1, 4, 7)结果。

Fig.3 Comparison of the attachment and proliferation of rMSCs and hMSCs on NF and NF-NH₂ surfaces

(A) The attachment (Day1) and proliferation (Day1, 3, 7) of rMSCs on NF and NF-NH₂ surfaces; (B) The attachment (Day1) and proliferation (Day1, 4, 7) of hMSCs on NF and NF-NH₂ surfaces.

Note: Data are expressed as mean± SD, n=6. *P< 0.05, #P>0.05.

2.4 PLGA NF-NH₂ 可促进 rMSCs 成骨分化

有研究表明,材料表面基团的变化能够影响干细胞成骨分化^[8]。本研究中的 ARS 染色结果显示,鼠源 MSCs 在 NF-NH₂ 表面(图 4.B,(36.68 ± 5.23)%)ARS 染色明显多于 NF 表面(图 4.A,(13.15 ± 1.22)%),而人源 MSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 表面

ARS 染色均比鼠源 MSCs 多,hMSCs 在氨基修饰的表面 RAS 染色比未修饰表面少(图 4.C,D)。hMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 表面 ARS 染色占总面积的比例分别为 (50.28 ± 2.94) %和(38.25 ± 3.27) % (图 4.E)。

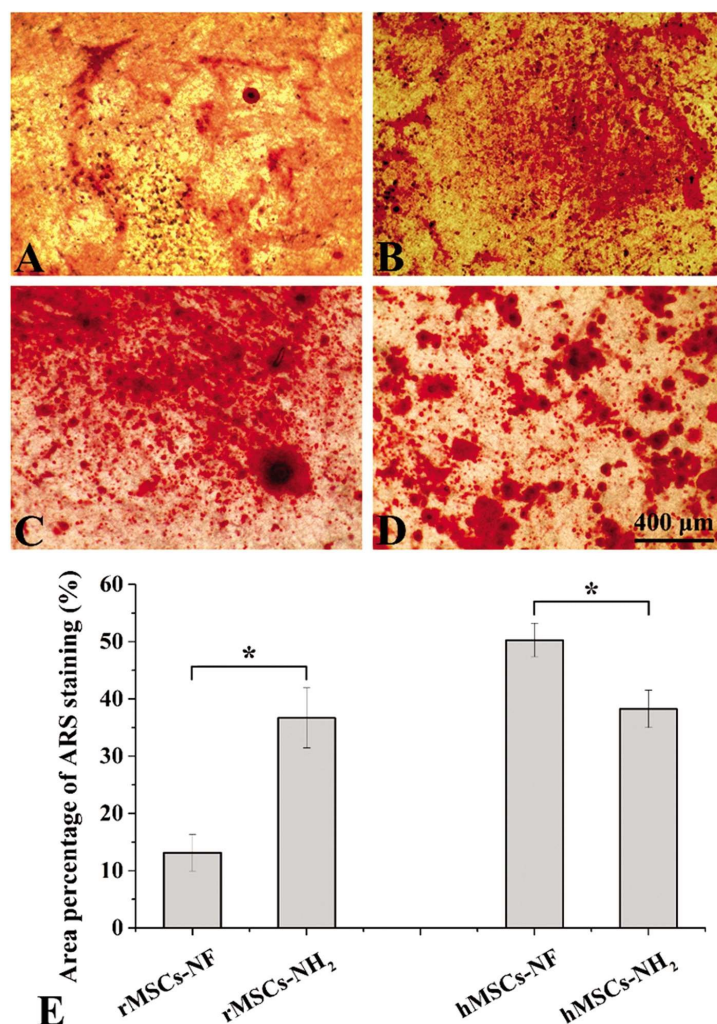


图4 各组钙结节 ARS 染色情况比较

(A) rMSCs 在 NF 表面钙结节染色图; (B) rMSCs 在 NF-NH₂ 表面钙结节染色图; (C) hMSCs 在 NF 表面钙结节染色图; (D) hMSCs 在 NF-NH₂ 表面钙结节染色图; (E) 各组钙结节染色量化图

Fig.4 Comparison of the ARS staining of calcium deposit on each experimental group

(A) Calcium deposit staining image of rMSCs on NF surface; (B) Calcium deposit staining image of rMSCs on NF-NH₂ surface; (C) Calcium deposit staining image of hMSCs on NF surface; (D) Calcium deposit staining image of hMSCs on NF-NH₂ surface; (E) The quantification results of ARS staining of each group.

Note: Data are expressed as mean ± SD, n=3. *P<0.05.

3 讨论

静电纺丝纳米纤维是一种极具应用前景的组织工程支架,具有高孔隙率(大于 80%)、高比表面积和连通性等优点,可模拟细胞外支架结构^[19]。PLGA 纳米纤维支架较多的应用于骨、血管等组织工程研究中,具有降解速率可调、组织相容性好等优点^[19-22]。本文中,我们采用 PLGA 静电纺丝纳米纤维为基底,并对其进行氨气等离子体处理,使得 PLGA NF 表面接枝氨基基团,提高了 NF 的亲水性。这与我们以前的研究结果一致。本课题

组前期研究膜状基底表面改性时发现经过氨等离子体处理后材料表面亲水性增加,接触角显著降低^[16]。

很多研究证实,静电纺丝纳米纤维支架有利于细胞的黏附增殖,这主要归功于其高孔隙率和高比表面积^[23]。Feng 等研究者发现,氨基修饰的纳米纤维能够促进神经细胞的黏附以及增加突触密度^[24]。本文中,我们采用氨等离子体处理在 PLGA NF 表面接枝了 -NH₂ 基团,增加其亲水性,发现鼠源 MSCs 在 -NH₂ 修饰后的表面的黏附和增殖均有所增加,而人源 MSCs 在修饰前后的表面黏附和增殖没有显著差别,但是总体黏附和

增殖效率明显高于鼠源 MSCs。在我们以前的研究中发现,相比于膜状支架和微米纤维支架,静电纺丝纳米纤维支架除了利于 rMSCs 的黏附和增殖外,还可以维持间充质干细胞的形态;通过统计细胞长径比发现纳米纤维表面的干细胞呈现出梭形,而膜和微米纤维表现细胞向四周伸展,更多的呈现出方形^[23]。这表明细胞对不同基底类型的响应不同,平面膜作为二维支架,不能很好的模拟体内细胞外基质结构,不能为 MSCs 提供模拟体内的微环境;而微米纤维对于体积较小的 rMSCs 来说表面也相对平整,接近二维支架;纳米纤维支架则可以很好的模拟细胞外基质结构,为细胞提供很好的微环境。综合分析本文的结果与以前的实验研究,我们分析认为,相较于鼠源 MSCs,人源 MSCs 体积较大,PLGA 纳米纤维基底更接近体内细胞外基质结构,能够更好的模拟体内微环境,因此在 NF 表面也有较高的黏附率;而鼠源 MSCs 由于体积较小,在相同直径的 PLGA 纳米纤维基底上,其响应可能介于二维表面和三维支架之间,不易黏附伸展;而氨基修饰后其表面亲水性增加,同时氨基本身也为细胞黏附提供结合位点^[29],这些特点决定了 rMSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 表面黏附的差异性以及 rMSCs 与 hMSCs 对 PLGA 纳米纤维支架的响应差异性。

MSCs 在骨组织工程中应用广泛,很多研究通过不同方法实现了体外自主调节 MSCs 向成骨细胞分化^[10,17]。Dalby 等研究者发现具有纳米孔洞排列(介于高度规则与完全无规则之间)的基底上, MSCs 可以在不加化学诱导剂的情况下定向分化为成骨细胞^[26];Oh 等人将 MSCs 接种于竖直排列的二氧化钛纳米管上,发现当纳米管直径较小(约 30 nm)时显著促进细胞的粘附而非分化;当纳米管直径较大时(70-100 nm) MSCs 分化成成骨样细胞^[27];Curran 等人发现表面修饰 -NH₂ 的基底可以促进 MSCs 的成骨分化^[8]。但是这些研究都是针对人源 MSCs 进行的,而没有考虑不同种属 MSCs 的差异性。也有部分研究者研究了不同组织来源的 MSCs,如脂肪来源与骨髓来源 MSCs,在与内皮细胞(HUVECs)共培养时的差异性,他们发现,两种不同组织来源的 MSCs 与 HUVECs 共培养后,其成血管能力没有显著差异,并且体内研究表明两实验组中新生血管均可以与宿主血管相吻合^[4]。本文中,我们分别将大鼠和人骨髓来源的 MSCs 接种到 NF 和 NF-NH₂ 表面,来研究间充质干细胞的种属差异性对不同基底的响应敏感性。我们发现,不同种属来源的 MSCs 成骨分化差异性较大,对基底官能团的敏感性也存在差异。相比于未修饰的 NF-NH₂ 修饰的 PLGA NF 可以显著提高 rMSCs 矿化,说明 rMSCs 对于基底官能团差异性更敏感。而人源 MSCs 在 NF 和 NF-NH₂ 表面均有明显的钙结节产生,甚至 NF 表面稍多,说明 hMSCs 对基底官能团特性不太敏感,而成骨诱导液对其成骨分化作用更为显著。

综合以上研究结果和分析,我们认为本研究提出的 MSCs 种属差异性的问题值得关注,其相关机制尚需进一步研究,如能揭示其差异性的原因将对干细胞临床研究和应用具有一定现实意义。

参考文献(References)

[1] Kong L, Zheng LZ, Qin L, et al. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment [J]. Journal of orthopaedic translation, 2017, 9: 89-103

[2] Lee WY, Wang B. Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives [J]. Journal of orthopaedic translation, 2017, 9: 76-88

[3] Liu L, Hindieh J, Leong DJ, et al. Advances of stem cell based-therapeutic approaches for tendon repair[J]. Journal of orthopaedic translation, 2017, 9: 69-75

[4] Lin L, Lin H, Bai S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration [J]. Neurochemistry international, 2018, 115: 80-84

[5] Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions [J]. Cell stem cell, 2012, 10: 709-716

[6] Attia N, Mashal M, Grijalvo S, et al. Stem cell-based gene delivery mediated by cationic niosomes for bone regeneration [J]. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine, 2018, 14: 521-531

[7] Lopez-Ruiz E, Jimenez G, Kwiatkowski W, et al. Impact of TGF-beta family-related growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from lipoaspirates and infrapatellar fat pads of osteoarthritic patients [J]. European cells & materials, 2018, 35: 209-224

[8] Curran JM, Chen R, Hunt JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate[J]. Biomaterials, 2006, 27: 4783-4793

[9] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. Cell, 2006, 126: 677-689

[10] Xiao QR, Zhang N, Wang X, et al. Oriented Surface Nanotopography Promotes the Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells[J]. Adv Mater Interfaces, 2016, 4: 1600652

[11] Ma J, Yang F, Both SK, et al. In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures [J]. Bio-fabrication, 2014, 6: 015005

[12] Mir M, Ahmed N, Rehman AU. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery [J]. Colloids and surfaces B, Biointer-faces, 2017, 159: 217-231

[13] Zhao W, Li J, Jin K, et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering [J]. Materials science & engineering C, Materials for biological applications, 2016, 59: 1181-1194

[14] Ramazani F, Chen W, van Nostrum CF, et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges [J]. International journal of pharmaceuticals, 2016, 499: 358-367

[15] Maenz S, Hennig M, Muhlstadt M, et al. Effects of oxygen plasma treatment on interfacial shear strength and post-peak residual strength of a PLGA fiber-reinforced brushite cement [J]. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2016, 57: 347-358

[16] Wang YY, Lü LX, Shi JC, et al. Introducing RGD Peptides on PHBV Films through PEG-Containing Cross-Linkers to Improve the Bio-compatibility[J]. Biomacromolecules, 2011, 12: 551

[17] Zhang N, Xiao QR, Man XY, et al. Spontaneous osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on electrospun nanofibrous scaffolds[J]. Rsc Advances, 2016, 6: 22144-22152 (下转第 3434 页)

- binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(11): 2277-2285
- [11] Sigurdsson V, Ingthorsson S, Hilmarsdottir B, et al. Expression and functional role of sprouty-2 in breast morphogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60798
- [12] Joshi S, Platanias LC. Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes[J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(3): 321-33
- [13] Bassols J, Moreno-Navarrete J, Carreras-Badosa G, et al. Placental sprouty 2 (SPRY2): relation to placental growth and maternal metabolic status[J]. *Neonatology*, 2014, 106(2): 120-125
- [14] Yu SM, Kim SJ. The thymoquinone-induced production of reactive oxygen species promotes dedifferentiation through the ERK pathway and inflammation through the p38 and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(2): 325-332
- [15] Wang X, Tanino Y, Sato S, et al. Secretoglobin 3A2 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation through inhibition of ERK and JNK pathways in bronchial epithelial cells [J]. *Inflammation*, 2015, 38(2): 828-834
- [16] Xing X, Yang J, Yang X, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 23;8(12): e85032
- [17] Wang L, Xu F, Zhang XJ, et al. Effect of high-fat diet on cholesterol metabolism in rats and its association with Na/K-ATPase/Src/pERK signaling pathway [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(4): 490-494
- [18] Jiao P, Feng B, Li Y, et al. Hepatic ERK activity plays a role in energy metabolism[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 375(1-2): 157-166
- [19] Han QA, Yan C, Wang L, et al. Urolithin A attenuates ox-LDL-induced endothelial dysfunction partly by modulating microRNA-27 and ERK/PPAR- γ pathway [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(9): 1933-1943
- [20] Wang Z, Zhang J, Li B, et al. Resveratrol ameliorates low shear stress induced oxidative stress by suppressing ERK/eNOS Thr495 in endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 1964-1972
- [21] Xing X, Yang J, Yang X, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85032
- [22] Kujiraoka T, Satoh Y, Ayaori M, et al. Hepatic extracellular signal-regulated kinase 2 suppresses endoplasmic reticulum stress and protects from oxidative stress and endothelial dysfunction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(4): e000361

(上接第 3424 页)

- [18] Lu LX, Zhang XF, Wang YY, et al. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells in vitro and bone regeneration in vivo[J]. *ACS applied materials & interfaces*, 2013, 5: 319-330
- [19] Kwon GW, Gupta KC, Jung KH, et al. Lamination of microfibrillar PLGA fabric by electrospinning a layer of collagen-hydroxyapatite composite nanofibers for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials research*, 2017, 21: 11
- [20] Rosa AR, Steffens D, Santi B, et al. Development of VEGF-loaded PLGA matrices in association with mesenchymal stem cells for tissue engineering[J]. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 2017, 50: e5648
- [21] Shin YC, Kim J, Kim SE, et al. RGD peptide and graphene oxide co-functionalized PLGA nanofiber scaffolds for vascular tissue engineering[J]. *Regenerative biomaterials*, 2017, 4: 159-166
- [22] An G, Zhang WB, Ma DK, et al. Influence of VEGF/BMP-2 on the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells on PLGA/gelatin composite scaffold [J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2017, 21: 2316-2328
- [23] Lu LX, Wang YY, Mao X, et al. The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Mater*, 2012, 7: 015002
- [24] Feng ZV, Chen WS, Keratithamkul K, et al. Degradation of the electrospun silica nanofiber in a biological medium for primary hippocampal neuron - effect of surface modification [J]. *International journal of nanomedicine*, 2016, 11: 729-741
- [25] Wang YY, Lu LX, Feng ZQ, et al. Cellular compatibility of RGD-modified chitosan nanofibers with aligned or random orientation[J]. *Biomed Mater*, 2010, 5: 054112
- [26] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 6:997-1003[J]. *Nature Material*, 2008, 6: 997-1003
- [27] Oh S, Brammer KS, Li YS, et al. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106: 2130-2135