文章编号:1000-5404(2013)24-2619-06

论著

骨髓间充质干细胞-脱细胞膀胱基质-聚丙烯复合网片的生物相容性和力学性能研究

杨铧琦,孙欣慰,雷 玲,徐惠成 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 观察骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stemcells,BMSCs)-猪脱细胞膀胱基质(urinary bladder matrix,UBM)-聚丙烯网片(polypropylene mesh,PM)植入大鼠体内的生物相容性与力学性能,探讨其作为替代材料用于修复和重建盆底组织的可行性。**方法** 将SD大鼠分为BMSCs-UBM-PM组、UBM-PM组、PM组、假手术组,分别将材料植于大鼠皮下腹直肌表面。第1、2、4、6周取网片及局部组织,HE染色观察组织病理学变化,免疫荧光观察BMSCs-UBM-PM组中BMSCs存活及分化情况,对第6周取材进行力学性能测试。**结果** BMSCs-UBM-PM组炎症细胞浸润少且新生血管较多。免疫荧光示BMSCs可在体内至少存活6周,部分可分化为平滑肌细胞。力学测试:BMSCs-UBM-PM组最大负荷为(0.31±0.08)kN,最大张力位移化为(0.62±0.19)mm/mm,杨氏模数为(43.36±11.83)MPa,均显著高于其他组测试结果($P<0.05$)。**结论** BMSCs-UBM-聚丙烯复合网片植入大鼠体内后有良好的生物相容性,引起的炎症反应弱,BMSCs诱导分化为平滑肌细胞后可增加复合网片的抗张力强度,因此该复合网片可作为修复和重建盆底组织的候选替代材料。

[关键词] 生物相容性;组织病理学变化;免疫荧光;力学性能
[中图法分类号] R318.01;R318.08;R711.2 [文献标志码] A

Biocompatibility and mechanical properties of bone mesenchymal stem cells-urinary bladder matrix-polypropylene composite mesh

Yang Huaqi, Sun Xinwei, Lei Ling, Xu Huicheng (Department of Obstetrics and Gynaecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the biocompatibility and mechanical properties of composite polypropylene mesh (PM) in rats, which was obtained by inoculating urinary bladder matrix (UBM) with bone mesenchymal stem cells (BMSCs), and to discuss its application as prosthetic material in repair and reconstruction of the pelvic floor tissue. **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into BMSCs-UBM-PM group, UBM-PM group, PM group, and sham-operation group. All the materials were implanted on the abdominal rectus muscle of rats separately. The composite meshes and surrounding tissues were harvested in the 1st, 2nd, 4th and 6th week after implantation. The histopathological changes were observed by HE staining. The survival and differentiation of BMSCs in BMSCs-UBM-PM group were observed by immunofluorescence staining. Six weeks after implantation, the materials were subjected to a mechanical property test. **Results** HE staining showed that infiltration of inflammatory cells was more sparse and the new blood vessels were more abundant in BMSCs-UBM-PM group. Immunofluorescence staining showed that BMSCs could survive for at least 6 weeks *in vivo* and could partly differentiate into smooth muscle cells. In the 6th week, the composite mesh of BMSCs-UBM-PM group showed the maximum load of 0.31±0.08 kN, maximum tension displacement ratio of 0.62±0.19 mm/mm, and Young's modulus of 43.36±11.83 MPa, which were significantly higher than those of other groups ($P<0.05$). **Conclusion** BMSCs-UBM-PM exhibits excellent biocompatibility after implantation and causes relatively weaker inflammatory response. BMSCs can be induced to differentiate to smooth muscle cells, thus providing higher tensile strength to the composite mesh that can be used as candidate material for repair and reconstruction of pelvic tissue.

[**Key words**] biocompatibility; histopathological changes; immunofluorescence; mechanical properties

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81170553). Corresponding author: Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: xuhuicheng1970@foxmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81170553)
[通信作者] 徐惠成,电话:(023)68765403,E-mail:xuhuicheng1970@foxmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1408.004.html(2013-10-22)

盆腔脏器脱垂是中老年妇女的常见病,约50%经产妇可不同程度罹患。盆底重建手术是治疗盆腔脏器脱垂的主要方法。传统重建手术是在已受损的薄弱筋膜、结缔组织及韧带上进行手术,复发率高。Olsen等[1]报道11.1%的79岁以上盆腔脏器脱垂女性需要手术治疗,且有30%因复发需再次手术。近年来,随着生物工程技术的发展,使用生物工程组织替代材料作为薄弱或受损盆底的支持物可更好的重建盆底正常解剖结构,从而达到功能恢复的目的。聚丙烯网片(polypropylenemesh,PM)在盆底重建手术中应用较为广泛,但易发生侵蚀、感染、挛缩、排异、疼痛、性交困难等不良反应,严重影响患者术后生活质量。对此,美国食品与药品监督管理局(food and drug administration,FDA)对合成网片的适应证有严格限制,并建议开发不良反应更少的生物材料[2]。猪脱细胞膀胱基质(urinary bladder matrix,UBM)具有良好的组织相容性及抗菌性,是目前生物材料研究领域的热点之一,其缺点是植入后降解较快,导致张力及承受能力下降。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)具有多向分化潜能,是组织工程常用的种子细胞,在一定的生物微环境中可分化为功能细胞。因此,我们构建了BMSCs-UBM-PM复合材料,以UBM为支架材料,促进BMSCs粘附与增殖,而且在UBM降解后有组织增生的PM可提供持久力学支撑。同时,我们通过观察BMSCs-UBM-PM植入大鼠腹部皮下后引起的组织病理学变化及力学性能差异,探讨其用作盆底修复和重建候选替代材料的可行性。

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取3~4周龄SD雌性大鼠,全骨髓贴壁法体外培养BMSCs,流式细胞仪进行鉴定。选取4~6月龄贵州小型猪,低渗-去污剂洗涤-核酸酶消化法进行膀胱脱细胞处理,制备UBM。

PM(美国强生公司),携带有绿色荧光蛋白(green florescent protein,GFP)基因片段的腺病毒(重庆金麦生物有限公司)。

实验动物及分组:健康、清洁级SD大鼠80只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌性,体质量190~210 g。饲养于标准实验动物房,温度为23~25 ℃,自由进水、进食,每天光照12 h。SD大鼠分为4组,每组20只,根据预植入材料的不同,分别命名为BMSCs-UBM-PM组(PM夹于负载有BMSCs的双层UBM之间)、UBM-PM组(PM夹于未负载BMSCs的双层UBM之间)、PM组(单纯PM)和假手术(sham-operated,S)组。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs在UBM上的培养 用腺病毒(携带有GFP基因片段)感染第3代的BMSCs,以2.0×10^6/mL双面种植于UBM上。每日更换细胞培养液,培养1周后植入。培养及鉴定方法参考Antoon等[3]的研究。

1.2.2 材料的植入方法和部位 将SD大鼠用5%的水合氯醛按照35 mg/kg进行腹腔注射麻醉,常规备皮,碘伏消毒铺巾,在下腹部取纵切口(长约3.5 cm),游离皮下筋膜,将BMSCs-UBM-PM、UBM-PM及PM分别置于大鼠皮下腹直肌表面并固定材料四角,假手术组不植入任何材料,其余操作步骤相同。植入材料尺寸:25 mm×20 mm。

1.2.3 组织病理学评价 手术后第1、2、4、6周分批处死大鼠,肉眼观察植入部位的大体变化,BMSCs-UBM-PM组、UBM-PM组、PM组取植入材料及周围粘连组织,假手术组取相应部位皮下肌肉组织。4%中性多聚甲醛固定标本,石蜡包埋切片(厚度5 μm),每组5~10张切片,行苏木精-伊红染色(HE染色),分别于200及400倍光学显微镜(Olympus公司)下观察。所观察到的炎性细胞(包括中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、多核巨细胞、浆细胞)、新生血管、成纤维细胞由2位病理学家参考文献[4]单盲进行定量评判,等级分为4级(-:正常,+:轻度增加,++:中度增加,+++:重度增加)。

1.2.4 免疫荧光检测 取出的BMSCs-UBM-PM组部分标本行冰冻切片(厚5 μm),小鼠抗大鼠平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(anti-alpha smooth muscle actin antibody,α-SMA)(1∶250)、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)(1∶1 000)行免疫荧光染色。染色结果于400倍激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)下观察。

1.2.5 力学性能测试 应用重庆大学生物工程学院提供的INSTRON 1011材料试验机(美国Blue Hill公司)对BMSCs-UBM-PM组、UBM-PM组及PM组第6周取材标本进行力学性能测试,取材范围包括PM及包裹其表面的组织(不包括皮肤及肌肉)。实验室参数设置:①拉伸实验;②第一横梁速度:20 mm/min;③样品标准:长20 mm,宽10 mm;④载荷程度范围:5 kN。参数设置后检测最大负荷(可承载的最大力量,单位:kN)、最大张力位移比(材料达到最大应力时与断裂时横梁位移距离的比值,值越大,材料张力越好,单位:mm/mm)、杨氏模数(材料抵抗形变能力的物理量,其大小反映材料刚性,值越大,越不易变形,单位:MPa)等拉伸力学指标,用于评价网片力学性能。

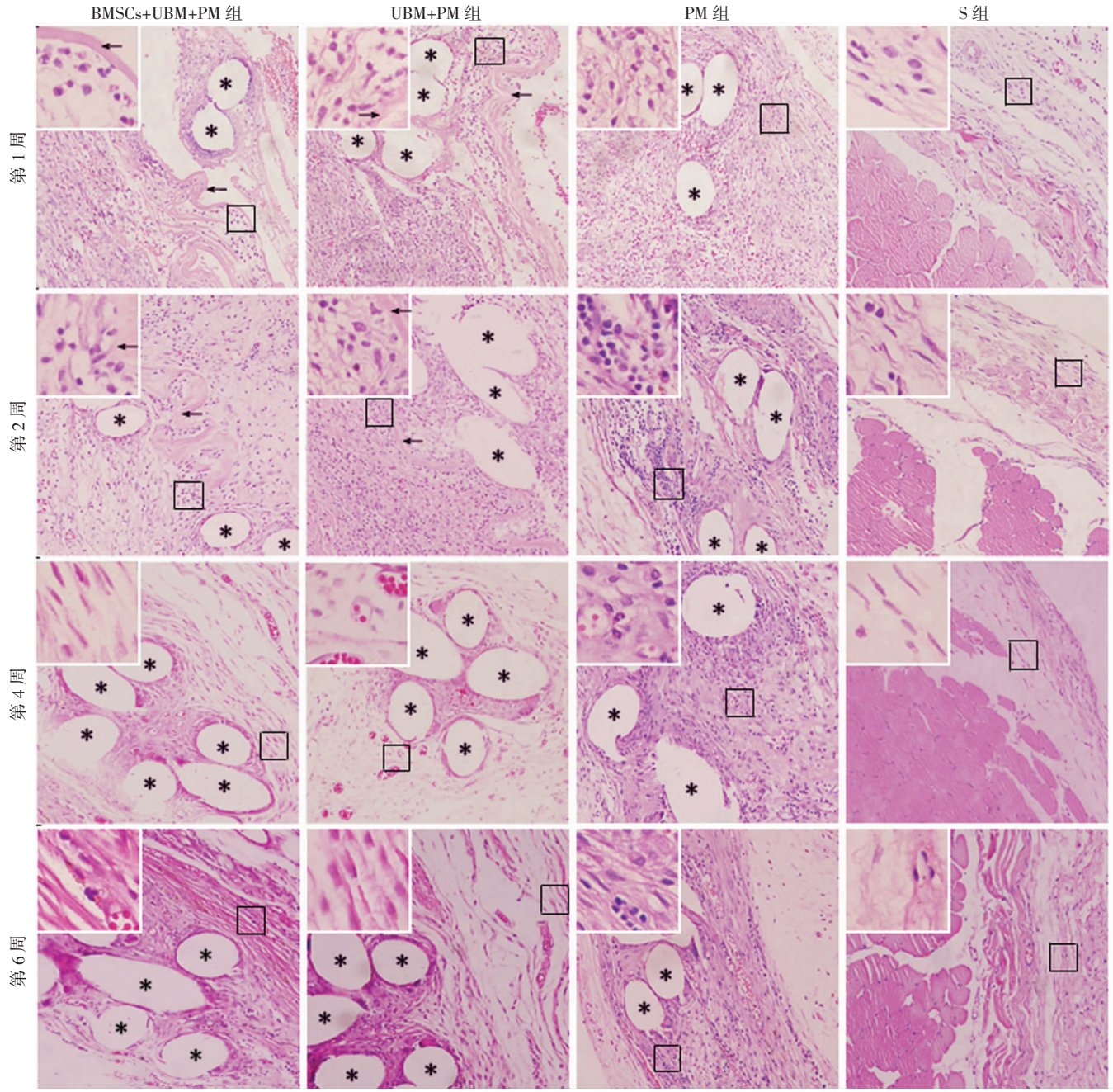
1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组间差异使用单因素方差分析。检验水准为0.05。

2 结果

2.1 肉眼观察

全部动物术后均无死亡,腹壁切口未见感染,网片未见侵蚀。BMSCs-UBM-PM组、UBM-PM组中的UBM在植入1周后未降解,PM组植入部位有组织充血症状。植入2周后UBM颜色呈淡黄色,包裹聚丙烯网片,与局部组织融合生长。植入4周后UBM 80%以上已降解,局部可见浅黄色印迹。植入6周后UBM已完全降解,无法辨认。BMSCs-UBM-PM组、UBM-PM组植入材料完全融合于局部组织中生长,表面有较多纤维组织覆盖,局部组织增生明显,厚度增加,BMSCs-UBM-PM组厚于UBM-PM组。PM组植入材料未与局部组织融合生长,界限清楚,表面有少许纤维组织覆盖。S组局部组织未见明显异常。

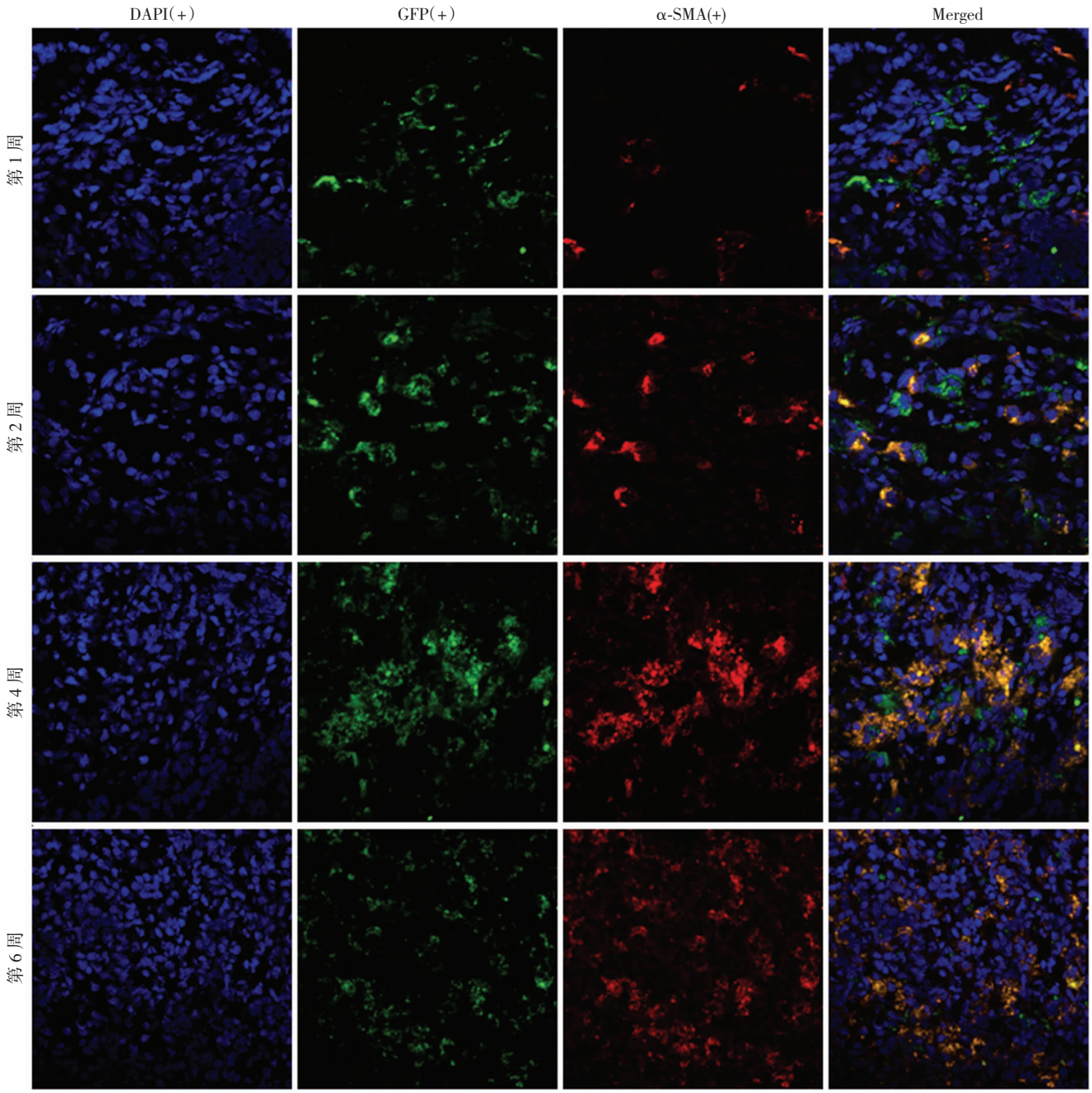


*：示聚丙烯网丝(直径 80 μm)；↑：示 UBM；小插图为黑色方框标识区域×400 镜下所见，第 1、2 周主要显示炎性细胞特点(如核呈蓝染、杆状或分叶状的中性粒细胞，核呈圆形蓝色深染的淋巴细胞，体积大、核呈肾形或马蹄形的单核细胞，核呈不规则形的巨噬细胞等)，第 4、6 周可见改建的新生血管及胶原纤维形成(其间散在梭形或纺锤形、核呈卵圆形的成纤维细胞)

图 1　HE 染色观察植入术后第 1、2、4、6 周各组大鼠植入部位组织病理学变化　(×200)

2.2　HE 染色

各组第 1、2、4、6 周取材行 HE 染色结果如图 1 所示，组织病理学定量评价结果见表 1。植入后第 1 周 BMSCs-UBM-PM 组和 UBM-PM 组以淋巴细胞浸润为主，且可见散在单核及中性粒细胞等，而 PM 组有大量中性粒细胞浸润。各组均可见新生薄壁血管及成纤维细胞，其中 BMSCs-UBM-PM 组生成更多。第 2 周各组炎症反应程度同第 1 周相似，其中 PM 组中性粒细胞减少而淋巴细胞增多。第 4 周 PM 组仍可见较多的中性粒细胞浸润，但较 2 周前有所减轻；BMSCs-UBM-PM 组和 UBM-PM 组炎症程度相似，较 2 周前明显减轻，各组可见改建的新生血管。第 6 周时 BMSCs-UBM-PM 组植入部位可见极少量淋巴细胞浸润，网片周围可见致密胶原及大量长梭状细胞(类似平滑肌细胞)；UBM-PM 组植入部位仍有少量炎性细胞浸润，胶原纤维较少；PM 组则可见较多淋巴细胞、浆细胞及少量多核巨细胞。假手术组各周炎性细胞浸润不明显。



DAPI(+):DAPI染色阳性;GFP(+):绿色荧光蛋白阳性表达;α-SMA(+):抗平滑肌肌动蛋白抗体阳性表达;Merged:橙黄色表示绿色荧光蛋白、抗平滑肌肌动蛋白抗体二者双阳性表达

图2 免疫荧光染色观察BMSCs-UBM-PM植入部位BMSCs在体内的存活分化 (×400)

表1 植入术后第1、2、4、6周各组大鼠植入部位的组织病理学定量评价

组别	第1周	第2周	第4周	第6周	组别	第1周	第2周	第4周	第6周
BMSCs-UBM-PM组					PM组				
炎症细胞	+	+	+	−	炎症细胞	+++	+++	++	++
新生血管	+++	+++	++	++	新生血管	+	+	+	+
成纤维细胞	++	++	+	+	成纤维细胞	+	+	++	++
UBM-PM组					假手术组				
炎症细胞	++	++	+	+	炎症细胞	−	−	−	−
新生血管	++	++	+	+	新生血管	+	+	−	−
成纤维细胞	++	++	+	+	成纤维细胞	+	+	−	−

2.3 BMSCs-UBM-PM 的免疫荧光结果

各周组织取材行 DAPI 染色(免疫荧光呈蓝色)可见大量细胞存活。GFP 标记的 BMSCs 在各周荧光显微镜下均观察到明显的绿色荧光。平滑肌细胞特异性标志 α-SMA 在第 4 及 6 周观察时高表达,呈红色荧光(图 2)。

2.4 力学测试

BMSCs-UBM-PM 组与 UBM-PM 组相比,最大负荷、最大张力位移比、杨氏模数有统计学差异($P<0.05$),BMSCs-UBM-PM 组与 PM 组相比,最大负荷及杨氏模数有统计学差异($P<0.05$),最大张力位移比也有统计学差异($P<0.05$)(表 2)。

表 2 BMSCs-UBM-聚丙烯复合网片的力学参数 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	最大负荷 (kN)	最大张力位移比 (mm/mm)	杨氏模数 (MPa)
BMSCs-UBM-PM 组	0.31 ± 0.08^{ab}	0.62 ± 0.19^{ab}	43.36 ± 11.83^{ab}
UBM-PM 组	0.21 ± 0.05^{b}	0.44 ± 0.03	23.79 ± 3.20
PM 组	0.12 ± 0.02	0.39 ± 0.04	19.43 ± 4.36

a:$P<0.05$,与 UBM-PM 组比较;b:$P<0.05$,与 PM 组比较

3 讨论

手术植入替代物的主要作用是给予薄弱盆底组织一定的力学支持及促进受损肌肉筋膜组织修复。理想的盆底组织替代材料应具有良好的生物相容性、力学特性及促进局部组织修复能力。组织替代材料根据材质不同可分为合成网片及生物材料。目前女性盆底手术中应用最广泛的合成网片是单丝编织的完全大孔型 PM(孔径 >75 μm),这种网片具有较好的延展性及耐久性,但可伴发感染、粘连等不良反应,影响预后疗效。目前应用最多的生物材料是猪脱细胞膀胱基质(urinary bladder matrix,UBM),其具有较强的抗菌性及吸水性,力学性能与组织相容性优良,但单纯 UBM 植入体内后降解较快,完全降解之前新生组织较少,不能维持有效张力。因此有学者尝试将其与 PM 复合作为盆底重建补片的替代材料,取得了一定的研究进展[5]。在此基础上,我们首次尝试将 BMSCs 负载于 UBM 与 PM 上,构成复合网片,发挥 BMSCs 定向分化参与组织重建的能力,来研究 BMSCs-UBM-PM 复合材料作为女性盆底障碍性疾病新型手术替代材料的独特优点。

异体生物材料植入后诱发炎症反应的程度是考察材料优良性的重要方面。我们的研究发现相对于其他各组,BMSCs-UBM-PM 植入大鼠体内后诱发的周围组织炎症反应最小。造成该现象的原因可以从两方面解释:一是植入的 UBM 属于脱细胞基质,本身抗原性较弱,其成分还可减轻周围组织中 Th1 相关促炎症细胞因子的产生,增强 Th2 介导的免疫耐受,调节机体免疫并隔离 PM 激发的炎症反应[5-6]。UBM 中同时含有Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ型等丰富的胶原蛋白,de-Tayrac 等[7]的研究显示有胶原涂层的 PM 在植入体内后诱发的炎症反应较弱,可显著减轻周围组织与网片之间的粘连,减少网片对组织的侵袭。另一方面,BMSCs 具有低免疫原性和较低的抗原提呈能力,是组织工程最常使用的种子细胞。Aggarwal 等[8]将 BMSCs 和同种异体经纯化的免疫细胞共培养,发现 BMSCs 可通过减少 Th1 细胞分泌 IFN-γ、增强 Th2 细胞分泌 IL-4、提高调节性 T 细胞的比例来诱导移植耐受,从而减轻炎症及排异反应。

本研究中,我们对 BMSCs-UBM-PM 复合材料促组织修复能力进行了研究。通过荧光蛋白标记及示踪技术,可以监测复合材料中 BMSCs 的存活及分化情况。我们的结果表明,BMSCs 在体内至少能存活 6 周,且可以表达平滑肌细胞的特异性抗体。因此我们推测,材料植入后 BMSCs 在 UBM 降解所形成的微环境中可以定向分化为平滑肌细胞,参与周围组织重建并与 PM 共同发挥力学支持作用。根据 Friedenstein 等[9]的研究显示,成功分离并培养的 BMSCs 具有多向分化潜能,通过多种刺激培养方式可使其分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞及成肌细胞等,显示了 BMSCs 具有强大的多向分化能力。Drost 等[10]的研究也表明 BMSCs 在体内特定微环境下可分化为平滑肌细胞并融合于血管壁中,同时参与受损心肌的修复。组织工程学研究表明周期性应力作用可以促进如膀胱及血管平滑肌细胞有序排列增殖,影响细胞骨架聚合和细胞生物活性物质分泌[11-12]。因此我们推测,BMSCs-UBM-PM 复合材料植入大鼠腹直肌表面后,材料将承受一定量大鼠腹部肌群的应力,随着时间延长,BMSCs 在周期性应力作用下更倾向于分化为平滑肌细胞。

我们同时还研究了 BMSCs-UBM-PM 复合材料能否发挥对组织的力学支持作用。结果显示,BMSCs-UBM-PM 复合材料的最大负荷、最大张力位移比、杨氏模数显著高于其他各组($P<0.05$),在植入后具有较好抗张力强度和抵御外界形变的能力,这也与王颖楠等[13]的部分研究结果相一致。形成这种力学特性的原因可能是多方面的。首先我们在植入后 6 周观察到 BMSCs-UBM-PM 能完全融合于周围组织中生长,HE 染色发现 BMSCs-UBM-PM 新生血管和成纤维细胞生成较多,且在 6 周后有大量致密胶原纤维形成,这些胶原纤维可增强网片及其周边组织的张力。Evseenko 等[14]的研究显示,UBM 中含有的层粘连蛋白、巢蛋白

等基质蛋白可以募集BMSCs,使其参与到随后的长时间的组织重建中来。BMSCs也可自行向组织受损区域趋化聚集,发挥类似成纤维细胞的功能,合成Ⅰ型和Ⅲ型胶原,参与组织修复和血管重建[15-18]。同时,UBM在降解过程中所释放的血管内皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、转录生长因子及一些功能未明的多肽也可促进组织重建过程中的血管生成和细胞增殖分化,使网片周围有更多的胶原沉积和纤维结缔组织生成[19-20]。其次,我们也观察到了复合网片上的BMSCs在植入后可表达平滑肌细胞特异性抗原,提示BMSCs在大鼠体内微环境及腹部周期性应力共同作用下可定向分化为平滑肌细胞,从而参与增强周围组织的弹性与可承受张力强度,也达到了优化复合网片力学特性的目的。复合网片上负载的BMSCs在分化为平滑肌细胞的同时,是否也可分化为其他类型的细胞及其对于组织修复及力学性能的影响仍值得进一步研究。

总之,BMSCs-UBM-PM复合材料可减少单纯PM的不良反应,并具有良好的组织相容性和力学性能,是未来女性盆底修复与重建材料的理想候选者。在后续的研究中,我们通过对这种新型网片材料的安全及有效性进一步验证,将逐步在临床上应用于女性盆腔脏器脱垂患者的治疗。

参考文献:

[1] Olsen A L, Smith V J, Bergstrom J O, *et al*. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence[J]. Obstet Gynecol, 1997, 89(4): 501-506.

[2] Menchen L C, Wein A J, Smith A L. An appraisal of the Food and Drug Administration warning on urogynecologic surgical mesh[J]. Curr Urol Rep, 2012, 13(3): 231-239.

[3] Antoon R, Yeger H, Loai Y, *et al*. Impact of bladder-derived acellular matrix, growth factors, and extracellular matrix constituents on the survival and multipotency of marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(1): 72-83.

[4] Zantop T, Gilbert T W, Yoder M C, *et al*. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of achilles tendon reconstruction[J]. J Orthop Res, 2006, 24(6): 1299-1309.

[5] Liu L, Li D, Wang Y, *et al*. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction[J]. Int Urogynecol J, 2011, 22(2): 221-227.

[6] Zhai Y, Ghobrial R M, Busuttil R W, *et al*. Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? [J]. Crit Rev Immunol, 1999, 19(2): 155-172.

[7] de-Tayrac R, Alves A, Therin M. Collagen-coated vs noncoated low-weight polypropylene meshes in a sheep model for vaginal surgery. A pilot study[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2007, 18(5): 513-520.

[8] Aggarwal S, Pittenger M F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.

[9] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267-274.

[10] Drost A C, Weng S, Feil G, *et al*. *In vitro* myogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for urethral sphincter muscle repair[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1176: 135-143.

[11] Liu B, Qu M J, Qin K R, *et al*. Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells *in vitro*[J]. Biophys J, 2008, 94(4): 1497-1507.

[12] Galvin D J, Watson R W, Gillespie J I, *et al*. Mechanical stretch regulates cell survival in human bladder smooth muscle cells *in vitro*[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(6): F1192-F1199.

[13] 王颖楠, 范雪梅, 赵敏, 等. 脱细胞膀胱基质复合大鼠骨髓间充质干细胞体外构建组织工程化吊带治疗压力性尿失禁的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(22): 2269-2273.

[14] Evseenko D, Schenke-Layland K, Dravid G, *et al*. Identification of the critical extracellular matrix proteins that promote human embryonic stem cell assembly[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(6): 919-928.

[15] Fathke C, Wilson L, Hutter J, *et al*. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair[J]. Stem Cells, 2004, 22(5): 812-822.

[16] Krause D S, Theise N D, Collector M I, *et al*. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. Cell, 2001, 105(3): 369-377.

[17] Liechty K W, MacKenzie T C, Shaaban A F, *et al*. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nat Med, 2000, 6(11): 1282-1286.

[18] Tepper O M, Capla J M, Galiano R D, *et al*. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells[J]. Blood, 2005, 105(3): 1068-1077.

[19] Hodde J, Record R, Tullius R, *et al*. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix[J]. Biomaterials, 2002, 23(8): 1841-1848.

[20] Hodde J P, Record R D, Tullius R S, *et al*. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization[J]. Tissue Eng, 2002, 8(2): 225-234.

(**收稿**:2013-09-09;**修回**:2013-09-23)

(编辑 吴培红)