DOI:10.16016/j.1000-5404.201412261

论著

功能化自组装多肽水凝胶支架促进小鼠骨髓间充质干细胞的粘附、增殖及成骨

刘 健,侯天勇,李志强,陈贝克,邓墨渊,罗 飞,许建中 (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,组织工程国家地方联合工程实验室,重庆市再生重建医学工程技术研究中心,重庆市组织工程实验室,全军骨组织工程重点实验室)

[**摘要**] **目的** 探讨功能化自组装纳米多肽 DGEAmx 水凝胶对小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的粘附、增殖和成骨分化的影响。**方法** 原子力显微镜观察功能化自组装多肽形成的纳米级结构特征;用倒置显微镜对贴壁细胞拍照计数,对比细胞粘附情况;用 CCK-8 法检测细胞增殖;激光共聚焦显微镜观察细胞在材料表面形貌;检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、成骨分化特异性基因Ⅰ型胶原(ICAM-1)和骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)的表达来评价成骨效果。**结果** 原子力显微镜观察功能化自组装多肽 DGEAmx 可以形成纳米纤维网状结构;倒置显微镜对贴壁细胞拍照计数结果显示在 30、60、90 min 时 DGEAmx 组对比 RADA16-Ⅰ组粘附细胞数差异有统计学意义($P<0.05$);CCK-8 法检测结果显示在培养第 3、5、7 天, DGEAmx 组 MSCs 增殖较 RADA16-Ⅰ组明显增高($P<0.05$);DGEAmx 组成骨诱导 3、7、14 d 后, ALP 活性高于 RADA16-Ⅰ组($P<0.05$);Real-time PCR 结果显示成骨诱导 3、7、14 d 后 DGEAmx 组较 RADA16-Ⅰ组有更高的 ICAM-1 和 OCN 的表达($P<0.05$)。**结论** 功能化自组装多肽 DGEAmx 纳米纤维水凝胶支架能促进 MSCs 粘附、增殖和成骨分化,作为骨组织工程支架材料有良好的应用潜力。

[**关键词**] 自组装多肽;水凝胶;纳米纤维;支架材料;组织工程
[**中图法分类号**] R318.08;R322.71;R329.2 [**文献标志码**] A

In vitro functionalized self-assembling peptide hydrogel scaffold promotes adhesion, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells in mice

Liu Jian, Hou Tianyong, Li Zhiqiang, Chen Beike, Deng Moyuan, Luo Fei, Xu Jianzhong (Department of Orthopedics, Center of Orthopedic Surgery, National & Regional United Engineering Lab of Tissue Engineering, Center of Regenerative and Reconstructive Engineering Technology, Chongqing Laboratory of Tissue Engineering, Key Lab of Military Bone Tissue Engineering, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of functionalized self-assembling peptide DGEAmx, which is prepared by modifying C terminal of self-assembling peptide RADA16-I with DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala) peptide, on the cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (MSCs) in mice. **Methods** An atomic force microscope was used to detect nanostructure characteristics of the functionalized self-assembling peptide DGEAmx. An inverted microscope was employed to count adherent cells and compare cell adhesion. The proliferation of the MSCs was observed by cell counting kit (CCK)-8

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81371975);全军后勤科研"十二五"计划重点项目(BWS11C040);第三军医大学军事预研项目(SWH2013JS07)
[**通信作者**] 许建中,E-mail:xjzslw@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150324.1324.017.html(2015-03-24)

assay. Cell morphology was observed with a laser confocal microscope. Alkaline phosphatase (ALP) activity and expression of osteogenic differentiation-specific genes collagen I (ICAM-1) and osteocalcin (OCN) were detected to evaluate osteogenic differentiation of the MSCs. **Results** The atomic force microscope observation found that functionalized self-assembling peptide DGEAmx was capable of forming nanofiber network structure. Cell counting result showed that the adherent cells on the DGEAmx scaffold were more than those on the RADA16-I scaffold at 30, 60 and 90 min ($P<0.05$). CCK-8 assay results showed that the proliferation of the MSCs on the DGEAmx scaffold was significantly increased on days 3, 5 and 7 ($P<0.05$). The MSCs cultured on the DGEAmx scaffold showed higher ALP activity and higher ICAM-1 and OCN expressions compared with those on the RADA16-I scaffold on days 3, 7 and 14 ($P<0.05$). **Conclusion** The functionalized self-assembling peptide DGEAmx nanofiber hydrogel scaffold can promote the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of the MSCs, and has good potential as bone tissue engineering scaffold.

[**Key words**] self-assembling peptide; hydrogel; nanofiber; scaffold; tissue engineering

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371975), the Key Progect of "Twelfth Five-year Plan" of Military Logistic Scientific Research (BWS11C040) and the Military Pre-research Project of Third Military Medical University(SWH2013JS07). Corresponding author: Xu Jianzhong, E-mail: xjzslw@163.com

骨移植是修复骨损伤和骨缺损的常用临床治疗方法。自体骨移植是骨移植的金标准,但存在供体骨来源受限、取骨部位骨缺损和疼痛等缺点[1]。近年来,骨组织工程的快速发展,为骨组织的修复和再生带来新的希望。骨组织工程的三要素为支架材料、种子细胞和细胞因子。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),能够在体外扩增,在不同的诱导条件下,能向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞等分化[2]。骨髓间充质干细胞易于分离和培养扩增,在骨、软骨、肌肉等间充质组织的损伤修复方面有广阔的应用前景。

近年来,支架材料的研究是骨组织工程研究的热点,目前多种支架材料均存在一定的不足:同种异体移植材料相容性好,细胞粘附率高,具有骨组织的天然结构,但存在免疫反应和疾病传播的风险;人工合成高分子材料可大量合成,但存在亲水性差,细胞吸附力弱,生物相容性差等缺点,限制了他们在骨组织工程中的应用。能够集合同种异体材料和人工合成材料优点而去除缺点的新型支架材料的研发将成为骨组织工程发展的希望。

自组装多肽作为一种人工合成的、结构类似于天然细胞外基质(ECM)的凝胶支架,可以在水溶液中自发组装成网状纳米纤维,并且在与盐离子相遇时迅速成形。纤维直径10~20 nm,孔径5~200 nm,水容量>99%。与传统支架材料相比,自组装多肽纳米纤维水凝胶具有结构稳定、有良好的生物相容性、可降解、无毒性及免疫原性等优点,成为新型组织工程支架材料研究方向之一[3-5]。自组装多肽RADA16-Ⅰ(AcN-RADARADARADARADA-$CONH_2$)由天然氨基酸合成,其形成的水凝胶支架能够为细胞培养提供良好条件[6]。最近,多个有生物活性的肽序列(如RGD、SKP等)被用来修饰RADA16-Ⅰ构建功能化自组装多肽水凝胶支架。研究表明,这些功能化自组装多肽水凝胶支架较纯的RADA16-Ⅰ水凝胶支架促进了细胞的增殖和分化。Ⅰ型胶原是骨组织中的重要构成成分,是重要的骨支架来源,而其中的DGEA(Asp-Gly-Glu-Ala)序列能够与α2β1整合素受体作用,促进细胞粘附[7-8]。细胞与材料的粘附是细胞在材料表面迁移、增殖和分化的前提。基于此,我们通过固相合成法[9]将DGEA结合到RADA16-Ⅰ的C端,合成功能化自组装多肽RADA16-DGEA(AcN-RADARADARADARADA-DA-GG-DGEA-$CONH_2$),以期获得一种有良好细胞粘附效果的支架材料。预实验表明DGEA肽不能自组装成纤维结构,也不能形成水凝胶;RADA16-DGEA能组装成短纳米纤维,但纤维间不相互搭载,并且不能形成水凝胶;将RADA16-DGEA和RADA16-Ⅰ等比混合制备成的DGEAmx可以形成纤维网状结构和水凝胶。本实验将MMCs接种至RADA16-Ⅰ和DGEAmx支架上培养,研究小鼠MSCs在支架材料上的粘附、增殖和分化情况,为其进一步作为骨组织工程支架的体内研

究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

C57BL/6小鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)由第三军医大学国家-地方联合组织工程实验室提供,多肽DGEA(相对分子质量431.25)、RADA16-Ⅰ(相对分子质量1 712.76)和RADA16-DGEA(相对分子质量2 199.21)由上海强耀生物科技有限公司合成和纯化(纯度≥95%),C57BL/6小鼠骨髓间质干细胞完全培养基、C57BL/6小鼠骨髓间质干细胞成骨诱导分化培养基(广州赛业),0.25%胰蛋白酶(HyClone),14 mm圆形盖玻片(NEST),CCK-8检测试剂盒(Sigma),碱性磷酸酶检测试剂盒(建成,中国),逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒(Life technologies)。

1.2 实验仪器

低速离心机(Thermo,德国),倒置显微镜(OLYMPUS,日本),超声波清洗机(Kejingda,中国),原子力显微镜(Asylum Research,美国),激光共聚焦荧光显微镜(Nikon,日本),酶标仪(Varioskan Flash,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备自组装多肽溶液 10 mg肽粉溶于1 mL超纯水中,混匀后用超声处理30 min去除粘性,得到1%质量体积比的母液。将RADA16-DGEA母液与RADA16-Ⅰ母液按体积比1∶1混合,得到1% DGEAmx母液。

1.3.2 原子力显微镜观察自组装纳米多肽的纤维结构 将DGEA、RADA16-Ⅰ、RADA16-DGEA和DGEAmx的母液用超纯水稀释20倍,各取5 μL稀释液分别滴加到新剥开的云母片上,15 s后用100 μL超纯水冲洗3次,去除未粘附材料。待云母片上肽样品自然干燥后用原子力显微镜观察[10]。操作模式为轻敲模式,扫描探针参数为矩形基座200 μm,针高10 μm,弹性系数8 N/m,Si尖端半径为10 nm,扫描区域为2 μm×2 μm,扫描频率是1.0 Hz。

1.3.3 MSCs接种到水凝胶上 将1% RADA16-Ⅰ和DGEAmx母液分别与20%无菌蔗糖溶液等体积混合,配制成0.5%水凝胶工作液。将14 mm圆形盖玻片放置在24孔培养板孔内,100 μL工作液滴加在盖玻片上。缓慢向孔内加入1 mL完全培养基,将培养板放于37 ℃培养箱中静置40 min。凝胶成型后,更换2次培养基以平衡pH,间隔30 min,每次更换2/3~3/4体积的培养基。然后将培养板放置于37 ℃培养箱中过夜。吸净孔内培养基后,将传至第3代的间充质干细胞悬液用完全培养基重悬成1×10^5个/mL细胞悬液,每孔加入500 μL。培养板置于37 ℃细胞培养箱中,第2天换液,此后每隔1 d换液1次。

1.3.4 倒置显微镜下细胞粘附情况 在24孔板内放置盖玻片并用RADA16-Ⅰ和DGEAmx成胶。在盖玻片、RADA16-Ⅰ水凝胶、DGEAmx水凝胶上接种MSCs,分别在第10、30、60、90分钟吸净孔内培养基,PBS洗3次去除未粘附细胞,并对材料上的贴壁细胞进行拍照。随机选取视野对贴壁细胞计数。

1.3.5 CCK-8法检测水凝胶上细胞的增殖情况 在96孔培养板分别滴加50 μL RADA16-Ⅰ和DGEAmx工作液,成胶后分别在空白孔、RADA16-Ⅰ水凝胶、DGEAmx水凝胶上滴加100 μL密度为3×10^4个/mL的第3代MSCs细胞悬液。在培养的第1、3、5、7天,每组中各取1个孔加入1 μL CCK-8溶液,37 ℃孵育1 h,以酶标仪在450 nm波长处测光密度值[$D(450)$]。将各测试孔的$D(450)$减去调零孔$D(450)$。

1.3.6 激光共聚焦荧光显微镜观察MSCs在水凝胶表面的生长形态 在24孔细胞培养板中放置盖玻片,分别用RADA16-Ⅰ和DGEAmx成胶,在空白孔、RADA16-Ⅰ水凝胶、DGEAmx水凝胶上加入3×10^4个/孔的第3代MSCs。分化培养14 d后,吸尽孔内液体,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,用PBS清洗3次,0.2% Triton X-100处理10min,PBS清洗3次,5% BSA封闭1 h,PBS清洗3次,加入罗丹明-鬼笔环肽(5 U/mL)溶液浸没样本,室温孵育30 min,PBS清洗3次,用10 μg/mL的DAPI染色5 min。PBS清洗3次,滴加抗荧光淬灭封片液封片。激光共聚焦荧光显微镜观察并拍照。

1.3.7 水凝胶对MSCs成骨分化的影响 在6孔细胞培养板中分别用RADA16-Ⅰ和DGEAmx成胶,在空白孔、RADA16-Ⅰ水凝胶、DGEAmx水凝胶上加入3×10^4个/孔的第3代MSCs。分化培养3、7、14 d后,吸尽孔内液体,用PBS清洗3次,每孔加入100 μL细胞裂解液并反复吹打。镜下观察已无完整细胞结构,按ALP活性检测试剂盒说明检测ALP活性。空白管调零后在酶标仪520 nm波长测各孔光密度值$D(520)$。

将第3代MSCs按3×10^4个/孔的数量接种到6孔培养板的空白孔、RADA16-Ⅰ水凝胶和DGEAmx水凝胶上,以成骨诱导分化培养基培养,每隔1 d换液

1次。在第3、7、14天时将各组培养基去除后，PBS清洗3次，按TRIzol试剂说明书操作提取细胞总RNA，并按反转录试剂盒说明书以30 μL体系将1 μg各组RNA反转录为cDNA。随后按照TaKaRa SYBR Green一步法定量PCR试剂盒说明书操作，进行荧光定量PCR检测，体系为25 μL，95 ℃预温5 min，随后进行95 ℃ 5 s和60 ℃ 30 s共40个循环的扩增，最后72 ℃延伸2 min，并进行溶解曲线的测定。引物根据NCBI上Primer-BLAST设计并经过比对，引物序列及扩增片段长度大小为：ICAM-1 正向引物：5′-AGCGGCT-GACGTGTGCAGTAAT-3′，反向引物：5′-TCTGAGAC-CTCTGGC-TTCGTCA-3′，115 bp；OCN 正向引物：5′-CGCTACCTGTATCAATGGCTGG-3′，反向引物：5′-CTC-CTGAAAGCC-GATGTGGTCA-3′，123 bp；β-actin 正向引物：5′-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3′，反向引物：5′-AGGTCT-TTGCGGATGTCCACGT-3′，135 bp。结果以Ct值表示，β-actin为内参照，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算基因相对表达量。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 自组装水凝胶的鉴定

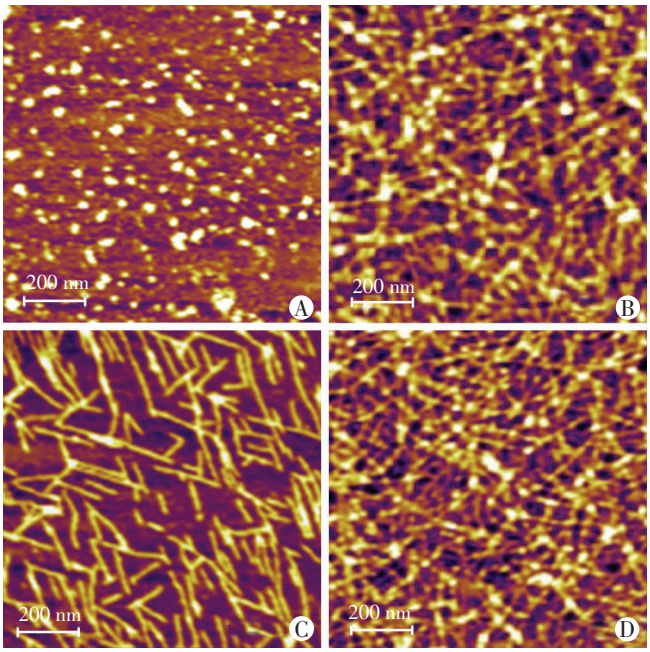
原子力显微镜下观察DGEA、RADA16-Ⅰ、RADA16-DGEA和DGEAmx自组装的结构。如图1所示，DGEA不能形成纤维结构，RADA16-DGEA自组装成短的纳米纤维且纤维之间不相互搭载，提示加入功能序列会影响到RADA16-Ⅰβ折叠结构形成，从而中断长纳米纤维的自组装[10]。当一定量的RADA16-Ⅰ加入RADA16-DGEA肽溶液，DGEAmx形成均匀的长纳米纤维。RADA16-Ⅰ和DGEAmx纤维直径为(13.6 ± 1.3) nm和(16.1 ± 1.5) nm。纳米纤维交织形成网状结构，之间有较大空隙。

2.2 自组装多肽水凝胶对MSCs粘附率的影响

将细胞计数所得数据除以盖玻片面积作为细胞密度(cell/cm^2)，细胞接种后第10、30、60和90分钟各组细胞的平均密度经统计学处理，在第10分钟时各组间无显著性差异($P > 0.05$)；第30、60、90分钟时，3组间分别有显著性差异($P < 0.05$，图2)。

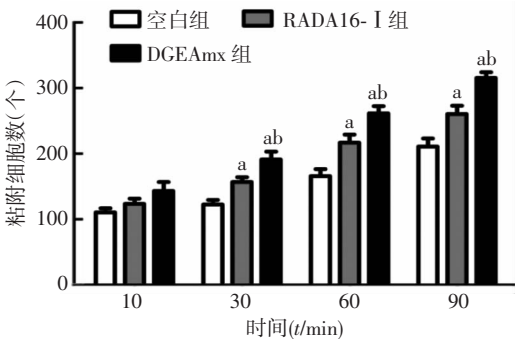
2.3 MSCs在水凝胶上的增殖检测

CCK-8检测细胞增殖结果如图3所示。经统计学处理，培养第1天各组间无显著性差异($P > 0.05$)，第3天DGEAmx组与空白组有显著性差异($P < 0.05$)，第5天各组间有显著性差异($P < 0.05$)，第7天RADA16-Ⅰ组与空白组无显著性差异($P > 0.05$)，而DGEAmx组与其他2组分别有显著性差异($P < 0.05$)。



A：DGEA；B：RADA16-Ⅰ；C：RADA16-DGEA；D：DGEAmx

图1 原子力显微镜观察不同材料的纳米级结构



a：$P < 0.05$，与空白组比较；b：$P < 0.05$，与RADA16-Ⅰ组比较

图2 细胞计数法检测不同时相点MSCs在3组材料表面的粘附细胞数变化

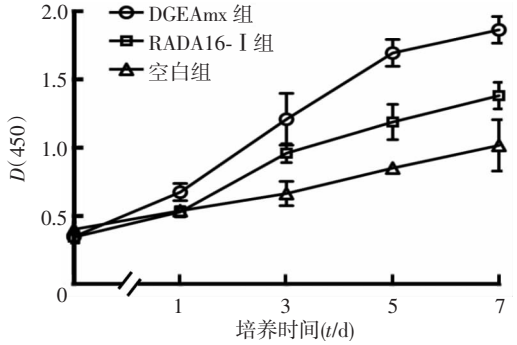
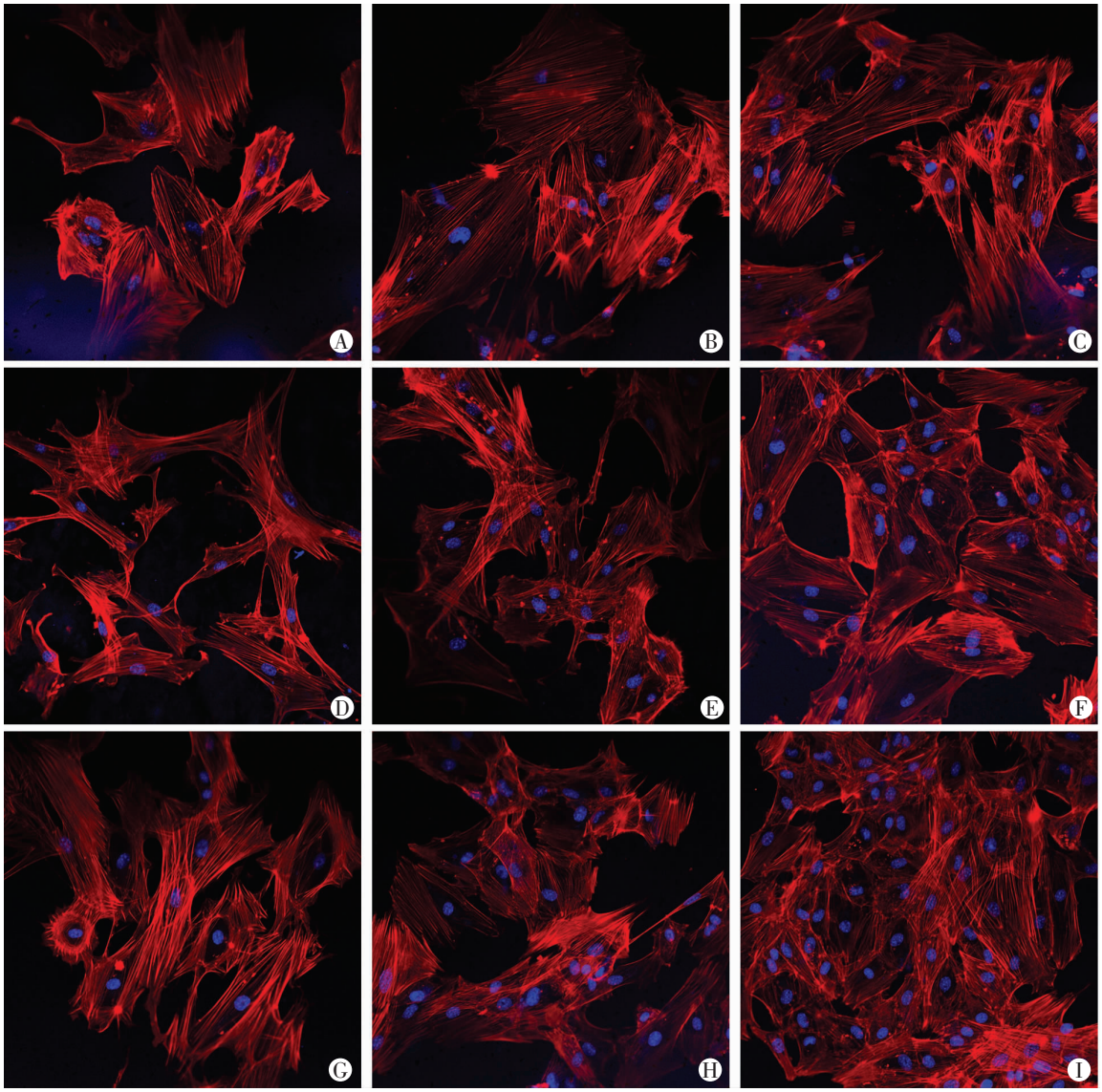


图3 CCK-8法检测MSCs在3组材料表面培养不同时间的增殖变化



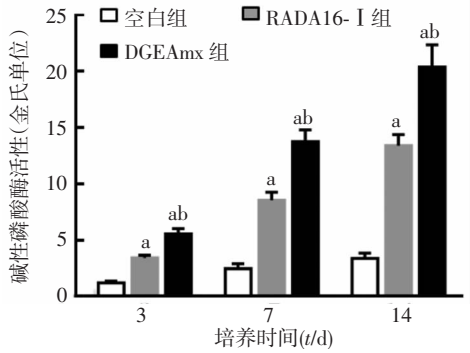
A、B、C:分别为 MSCs 在盖玻片上分化培养 3、7、14 d;D、E、F:分别为 MSCs 在 RADA16-Ⅰ水凝胶上分化培养 3、7、14 d;G、H、I:分别为 MSCs 在 DGEAmx 水凝胶上分化培养 3、7、14 d

图 4　激光共聚焦显微镜观察 MSCs 在 3 组材料表面分化培养不同时间点的生长形态　(×200)

2.4　MSCs 在水凝胶上的成骨分化

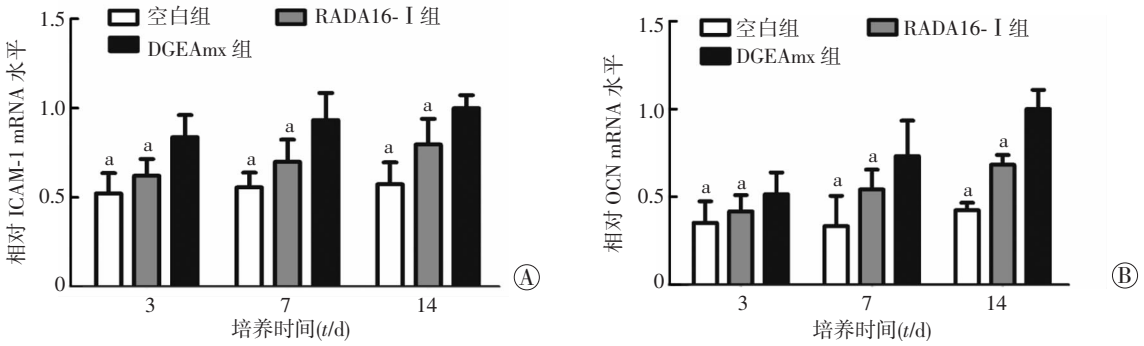
试剂盒检测 ALP 活性结果经统计学处理,在第 3、7、14 天时,各组间均具有显著性差异($P < 0.05$,图 4)。提示在 DGEAmx 凝胶支架材料表面生长的成骨细胞能够表达更高的碱性磷酸酶活性(图 5)。

Real-time PCR 结果显示,MSCs 经成骨诱导分化培养第 3、7、14 天时,对比空白组和 RADA16-Ⅰ组,在 DGEAmx 组有更高的 ICAM-1 和 OCN 的表达($P < 0.05$,图 6)。



a:$P<0.05$,与空白组比较;b:$P<0.05$,与 RADA16-Ⅰ组比较

图 5　MSCs 在 3 组材料表面培养不同时间的碱性磷酸酶活性检测结果



A:ICAM-1;B:OCN a:$P<0.05$,与 DGEAmx 组比较

图 6 Real-time PCR 检测不同时间 MSCs 在 3 组材料表面 ICAM-1 和 OCN 基因的表达

3 讨论

自组装多肽纳米纤维水凝胶支架材料在细胞培养、组织工程、再生医学等研究领域有广泛的应用前景[11-13]。自组装多肽溶解后迅速形成纳米纤维,并在接触盐离子后形成水凝胶支架材料。这种纳米纤维支架形成与细胞外基质相类似的结构,含水量高并且具有高孔隙度,是培养组织细胞的良好载体。由于这类材料是由天然氨基酸合成,降解产物没有毒性,可以避免引起炎症反应和免疫反应。相关研究已证明 RADA16-Ⅰ可以增强细胞增殖和生长因子分泌能力[14-16]。此外,还可以通过在其 C 端用肽合成固相法将具有不同功能的短生物活性多肽片段(一般不超过 15 个氨基酸片段)与其结合,构建新型功能化自组装多肽纳米纤维水凝胶支架材料,从而提高其生物学活性[5]。Horii 等[3]将功能基序 AKL、DGR 和 PRG 分别结合到 RAD16-Ⅰ C 端,并与 RAD16-Ⅰ混合制备的三维支架可增强 MC3T3-E1 细胞的粘附、增殖和成骨分化能力;Pan 等[17]用 BMP-2 相关蛋白(P24)修饰 RAD16-Ⅰ形成 RAD16-P24,再混合聚乳酸- 羟基乙酸共聚物形成复合材料,研究表明这种复合材料增强了 BMSCs 的增殖、粘附能力和异位骨形成。尽管功能化自组装多肽延长了 RADA16-I 的 C 末端后会影响自组装多肽原有的凝胶性,提示功能序列影响到 RADA16-Ⅰβ 折叠结构形成,从而中断长纳米纤维的自组装,但当其与 RADA16-Ⅰ等体积混合后,表现出与 RADA16-I 相似的凝胶特性。

细胞与材料的粘附是细胞在材料表面迁移、增殖与分化的前提。但将有粘附功能序列 DGEA 与 RAD16-Ⅰ复合并检测其对 MSCs 的快速粘附效果未见相关报道。我们将在细胞粘附中有着重要作用的 DGEA 序列与 RADA16-Ⅰ多肽的 C 末端相连,成功复合构建了自组装多肽纳米凝胶支架 DGEAmx。DGEAmx 的微观结构与经典的 RADA16-Ⅰ类似,能够模拟细胞外基质环境。本研究中,我们把小鼠 MSCs 接种到 RADA16-Ⅰ、RAD/DGEA 水凝胶支架上体外培养,观察支架材料上细胞的粘附、增殖和分化情况。在接种 MSCs 后第 30、60、90 分钟时,DGEAmx 的粘附率较 RADA16-Ⅰ有显著增强($P<0.05$)。CCK-8 法检测细胞增殖情况证实,MSCs 在 DGEAmx 上对比在 RADA16-Ⅰ上有更高的增殖速率。当在特定的分化刺激培养条件下,肽水凝胶支架支持接种的 MSCs 向成骨细胞分化。ALP 是细胞向成骨细胞分化的重要指标,其活性与成骨细胞分化呈正相关[16]。本实验相关结果提示在 DGEAmx 水凝胶上分化培养的 MSCs 的 ALP 活性及成骨相关基因 ICAM-1 和 OCN 的表达明显高于 RADA16-Ⅰ($P<0.05$)。上述结果表明,与经典的自组装多肽 RADA16-Ⅰ相比,DGEAmx 是更适合 MSCs 体外培养的支架材料。

自组装多肽纳米纤维支架能作为骨细胞和生长因子的良好载体,并且由于其力学方面的特性,作为注射材料填充不规则和微小骨缺损有明显优势[18]。但对于大段骨缺损和承重部位骨缺损难以提供有效支撑。将自组装多肽水凝胶作为修饰材料,修饰脱钙骨基质(demineralized bone matrix, DBM)、羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)等传统支架材料,构成的复合支架材料,不仅具有较强的力学性能,而且保持了自组装肽纳米纤维支架良好的生物活性,为该材料进一步的体内研究和临床应用奠定了理论基础和提供了实验依据[19-20]。

参考文献:

[1] 秦蕴豪, 张长青. 间充质干细胞促进骨再生的生物学基础

及应用[J]. 中华创伤骨科杂志, 2014, 16(6): 533 - 536.

[2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.

[3] Horii A, Wang X, Gelain F, *et al*. Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration[J]. PLoS One, 2007, 2(2): e190.

[4] Nakahara H, Misawa H, Yoshida A, *et al*. Bone repair using a hybrid scaffold of self-assembling peptide PuraMatrix and polyetheretherketone cage in rats[J]. Cell Transplant, 2010, 19(6): 791 - 797.

[5] Gelain F, Bottai D, Vescovi A, *et al*. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures[J]. PLoS One, 2006, 1(1): e119.

[6] 李志强, 侯天勇, 罗飞, 等. 自组装肽复合脱钙骨基质作为骨髓富集支架材料的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 441 - 444.

[7] Yoshimi R, Yamada Y, Ito K, *et al*. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering[J]. J Craniofac Surg, 2009, 20(5): 1523 - 1530.

[8] Yoo S Y, Kobayashi M, Lee P P, *et al*. Early osteogenic differentiation of mouse preosteoblasts induced by collagen-derived DGEA-peptide on nanofibrous phage tissue matrices [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(4): 987 - 996.

[9] Genove E, Shen C, Zhang S, *et al*. The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function [J]. Biomaterials, 2005, 26(16): 3341 - 3351.

[10] Liu X, Wang X, Wang X, *et al*. Functionalized self-assembling peptide nanofiber hydrogels mimic stem cell niche to control human adipose stem cell behavior *in vitro*[J]. Acta Biomater, 2013, 9(6): 6798 - 6805.

[11] Matson J B, Zha R H, Stupp S I. Peptide self-assembly for crafting functional biological materials[J]. Curr Opin Solid State Mater Sci, 2011, 15(6): 225 - 235.

[12] Branco M C, Schneider J P. Self-assembling materials for therapeutic delivery[J]. Acta Biomater, 2009, 5(3): 817 - 831.

[13] Degano I R, Quintana L, Vilalta M, *et al*. The effect of self-assembling peptide nanofiber scaffolds on mouse embryonic fibroblast implantation and proliferation[J]. Biomaterials, 2009, 30(6): 1156 - 1165.

[14] Mi K, Wang G, Liu Z, *et al*. Influence of a self-assembling peptide, RADA16, compared with collagen I and Matrigel on the malignant phenotype of human breast-cancer cells in 3D cultures and *in vivo*[J]. Macromol Biosci, 2009, 9(5): 437 - 443.

[15] Hamada K, Hirose M, Yamashita T, *et al*. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 84(1): 128 - 136.

[16] Tang C, Shao X, Sun B, *et al*. The effect of self-assembling peptide RADA16-I on the growth of human leukemia cells *in vitro* and in nude mice[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(5): 2136 - 2145.

[17] Pan H, Hao S, Zheng Q, *et al*. Bone induction by biomimetic PLGA copolymer loaded with a novel synthetic RADA16-P24 peptide *in vivo*[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, 33(6): 3336 - 3345.

[18] Firth A, Aggeli A, Burke J L, *et al*. Biomimetic self-assembling peptides as injectable scaffolds for hard tissue engineering[J]. Nanomedicine (Lond), 2006, 1(2): 189 - 199.

[19] Hou T, Li Z, Luo F, *et al*. A composite demineralized bone matrix——self assembling peptide scaffold for enhancing cell and growth factor activity in bone marrow[J]. Biomaterials, 2014, 35(22): 5689 - 5699.

[20] Xia Y, Peng S S, Xie L Z, *et al*. A novel combination of nano-scaffolds with micro-scaffolds to mimic extracellularmatrices improve osteogenesis[J]. J Biomater Appl, 2013, 29(1): 59 - 71.

(**收稿**:2014-12-30;**修回**:2015-01-25)

(编辑 王 红)