DOI:10.16016/j.1000-5404.201411006

论著

UBM材料上的Laminin蛋白促进负载骨髓间充质干细胞增殖和平滑肌分化

魏桂枝[1],刘晶霞[1],徐萍萍[1],倪 兵[2],刘禄斌[3],梁志清[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院妇产科[1],基础医学部全军免疫学研究所[2];400013 重庆,重庆市妇幼保健医院妇产科[3])

[摘要] **目的** 探讨猪膀胱细胞外基质(urinary bladder matrix,UBM)上的Laminin蛋白对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)增殖和向平滑肌分化的影响。**方法** 采用机械分离法、酶消化法及冷冻干燥法等方法对新鲜猪膀胱进行脱细胞处理,采用蛋白与支架共孵育,制备出UBM + Laminin及UBM + Anti-Laminin复合支架。采用贴壁法培养BMSCs,流式细胞仪鉴定BMSCs。采用P3代BMSCs,分别接种于UBM + Laminin、UBM及UBM + Anti-Laminin上。采用CCK-8检测、HE染色观察及免疫组化鉴定等方法检测Laminin蛋白对BMSCs增殖、迁移和分化的影响。**结果** 流式细胞仪鉴定BMSCs CD29阳性表达率为98%,CD31阳性表达率为4.56%,CD34阳性率为3.30%。3种材料均能支持BMSCs生长,且随共孵育时间的延长,$D(450)$值逐渐升高,其中UBM + Laminin复合材料组细胞$D(450)$最高($P<0.01$)。HE染色结果显示UBM + Laminin组细胞接种第3天形成黏附层,并向深部迁移,第14天可达材料致密层;UBM组第7天仅少许细胞向深层迁移,第14天未达基底层;UBM + Anti-Laminin组仅在支架表层生长。免疫组化检测显示UBM + Laminin组、UBM组、UBM + Anti-Laminin组细胞α-SMA表达分别呈阳性、弱阳性和阴性。**结论** UBM材料上Laminin蛋白能促进负载BMSCs增殖、迁移、并有诱导其向平滑肌方向分化的作用。

[关键词] 脱细胞膀胱;骨髓间充质干细胞;Laminin蛋白;细胞增殖;细胞分化
[中图法分类号] R318.08;R322.62;R329.2 [文献标志码] A

Laminin on urinary bladder matrix promotes proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and differentiation into smooth muscle cells

Wei Guizhi[1], Liu Jingxia[1], Xu Pingping[1], Ni Bing[2], Liu Lubin[3], Liang Zhiqing[1] ([1]Department of Obsterics and Gynecology, Southwest Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Obsterics and Gynecology, Maternal and Child Health Hospital, Chongqing, 400013, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of laminin on pig urinary bladder matrix (UBM) on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and the differentiation into smooth muscle cells. **Methods** Fresh pig bladder was decellularized by mechanical separation, enzymatic digestion, and freeze drying methods. The morphology of the obtained UBM was examined by hematoxylin and eosin (HE) staining, hematoxylin/aniline blue staining and scanning electron microscopy. The laminin + UBM material and anti-laminin + UBM material were obtained by incubation of proteins and UBM. The BMSCs were obtained with adherent method, and then seeded on the laminin + UBM material, UBM material, and anti-laminin + UBM material after *in vitro* proliferation. The BMSCs were identified by flow cytometry (FCM). The cell proliferation, migration and differentiation in different materials were compared by CCK-8 assay, HE staining and immunohistochemistry methods. **Results** FCM analysis showed that CD29-positive expression rate of the BMSCs reached 98%, while CD31- and CD34-positive expression rates were 4.56% and 3.30%,

[基金项目] 国家自然科学基金(81270683)
[通信作者] 梁志清,E-mail: zhi.lzliang@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150310.1648.006.html(2015-03-10)

respectively. CCK-8 analysis showed BMSCs could grow efficiently on the three materials. CCK-8 value was increased significantly in 9-day culture, especially when the BMSCs were seeded on the laminin + UBM material as compared with the other 2 materials. HE staining showed that the 3 materials promoted cell adhesion to the surface. On the 3th day, HE staining showed that the BMSCs formed cell layers on the UBM + laminin material, and some cells were migrated into the dense layer. In contrast, no obvious cell migration was observed on the UBM + anti-laminin material and UBM material on the 14th day. Immunohistochemistry results showed that alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) expression was detected on the UBM + laminin material, and the expression was negative on the UBM material. **Conclusion** The laminin on UBM promotes proliferation and migration of the BMSCs and induces differentiation of the BMSCs to smooth muscle cells.

[**Key words**] decellularized bladder; bone marrow mesenchymal stem cells; laminin; proliferation; differentiation

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81270683). Corresponding author: Liang Zhiqing, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)的发病机制主要与尿道内平滑肌和横纹肌的减少有关。临床上治疗SUI的最佳治疗手段是运用组织替代物进行盆底修复[1],目前用于盆底修复的组织工程支架包括合成聚合物、天然细胞外基质、脱细胞基质衍生物三大类。脱细胞基质衍生物因其组织完整性好,免疫原性低等优点被广泛运用于膀胱壁的修补和皮肤、气管的重建[2-4]。猪膀胱细胞外基质(urinary bladder matrix, UBM)属脱细胞基质衍生物的一种,近年来逐渐被运用于盆底修复[5]。但是目前无法有效控制UBM的降解周期,单纯的靠增加植入的UBM材料来缓解降解周期的方法只会导致严重的免疫排斥反应,造成手术失败。临床上一直对种子细胞——骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)寄予厚望,然而BMSCs向平滑肌分化的机制研究不足,以至于临床运用欠佳。众多研究发现UBM的基底层中含有Laminin蛋白[6],而Laminin蛋白具有促进多种成体干细胞等细胞增殖并向其他细胞分化的能力[7-9]。但在UBM材料Laminin蛋白是否具有诱导BMSCs向平滑肌细胞分化增殖的能力尚不清楚。本研究旨在对现有的UBM材料进行完善,使其具有诱导BMSCs向植入部位分化的能力,从而达到组织修复的目的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3~4周龄雌性清洁级SD大白鼠10只,体质量约120 g。封闭饲养猪(体质量约200 kg),取处死30 min以内猪的新鲜膀胱,保存于4 ℃磷酸盐缓冲液内,实验动物由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

三羟甲基氨基甲烷(Tris),苯甲基磺酰氟(PMSF),十二烷基硫酸钠(SDS),DNA酶及RNA酶(北京鼎国生物技术有限公司),DMEM-F12、双抗、胰酶购于HyClone公司,DAPI、CCK-8试剂盒购于碧云天公司,胎牛血清(FBS)购于Gbico公司,FITC标记的小鼠抗大鼠CD29、CD31和CD34抗体购于Santa Cruze公司,兔抗猪Laminin抗体、兔抗鼠α-SMA抗体购于Abcam公司,Laminin蛋白购于Sigma公司,PBS缓冲液(中杉金桥公司);冻干机,$^{60}CO\gamma$辐照仪,流式细胞仪,CO_2培养箱,CK2型倒置相差显微镜,Bio-Rad 680 XR型酶标仪等。

1.3 脱细胞材料UBM的制备

①机械分离:参照Freytes法[10],用PBS清净膀胱中残留尿,将膀胱内装满1.0 mmol/L的氯化钠,用机械分离法去除脂肪组织:浆膜层以及肌肉层,其余残留的黏膜层及固有鞘膜即UBM。②脱细胞,去污迹法,将分离下来的组织浸泡于含0.035 mmol/L PMSF的50 mmol/L Tris(pH=8.0)缓冲液中,室温下反复浸泡8次,每次12 h。酶消化,将上述处理后组织经PBS洗涤后置入含DNA酶及RNA酶的双酶消化液中,浸泡处理2次,每次12 h;使用PBS漂洗后,置入含1% SDS的TRIS缓冲液,室温反复浸泡处理4次,每次12 h。取出后用大量PBS缓冲液充分漂洗4次,每12小时更换1次。③冻干及消毒处理:上述处理后的膀胱已经成为脱细胞基质,取出后程序性降温至-80 ℃,16 h,再置于冷冻机干燥(第三军医大学药学院),$^{60}CO\gamma$射线照射灭菌(第三军医大学辐照中心),4 ℃无菌保存备用。

1.4 组织形态学观察

取成品脱细胞材料用4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片(4 μm),分别用HE及Masson染色后光学显微镜下观察。另一组材料用体积分数为2.5%戊二醛和1%锇酸固定,梯度酒精逐级脱水,置换,临界干燥后喷

金,扫描电镜学观察其脱细胞情况和纤维排列情况。

1.5 大鼠 BMSCs 的分离、培养及鉴定

大鼠 BMSCs 分离、培养采用全骨髓贴壁法,具体如下:颈椎脱臼法处死大鼠,无菌操作下取双侧胫骨、股骨,用 DMEM-F12 培养液反复冲洗骨髓腔,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用密度梯度离心法收集白色雾状细胞层,用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素和青霉素的 DMEM-F12 培养液重悬,并接种于培养瓶,置 37 ℃的 5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后首次换液,隔天换液,细胞接近 80% ~ 90% 融合时按 1∶2 ~ 1∶3 传代。应用流式细胞仪对 BMSCs 的表面分子 CD29、CD31、CD34 进行鉴定。本实验主要使用第 3 代细胞。

1.6 UBM + laminin 及 UBM + Anti-laminin 的制备

根据 Lindner 等方法[9,11]将 UBM 材料剪成直径约 1.6 cm 大小,置入 24 孔板内,加入 75% 的乙醇 1 mL,置于超净工作台上待乙醇自然彻底挥发。加灭菌 PBS 2 mL 浸泡洗涤 2 次,每次 2 h。将 Laminin 蛋白及 Anti-Laminin 抗体分别用 PBS 溶液配制成终浓度 30 μg/mL 的溶液,每孔加入 2 mL Laminin 蛋白溶液或 Anti-Laminin 溶液,无菌密封后,置于 4 ℃冰箱,孵育 12 h。

1.7 免疫组化观察 UBM 材料上 Laminin 表达

取成品脱细胞材料(UBM、UBM + Laminin 及 UBM + Anti-Laminin)用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片(8 μm)。常规脱蜡水化,PBS 漂洗后 3% 过氧化氢溶液室温孵育 20 min,PBS 漂洗后柠檬酸组织抗原修复液高压修复,待自然冷却后加兔非免疫血清(S-P 试剂盒)孵育 10 min,除去血清,每张玻片加 50 μL 兔抗猪 Laminin 抗体(1∶25 稀释),置湿盒 4 ℃过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加二抗孵育 10 min,链霉素抗过氧化物酶溶液孵育 10 min,DAB 溶液显微镜下显色,苏木精复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片后光学显微镜观察。

1.8 BMSCs 负载 UBM 材料上

将预处理的 3 组材料置于 24 孔板中,取第 3 代 BMSCs 按 $1 \times 10^5/cm^2$ 接种于不同支架上,对照组为单纯 UBM 材料。每组加 1 mL 细胞培养液,置于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度下培养,隔日换液,并观察培养液有无浑浊。分别取培养 3、5、7、14 d 的组织行 HE 染色,观察细胞迁移情况。并取 14 d 的组织行免疫组化染色,观察干细胞向平滑肌细胞分化情况。

1.9 CCK-8 法检测 BMSCs 在材料上的增殖

将预处理的 3 组材料平铺于 96 孔板,取第 3 代 BMSCs,按 3×10^3/孔接种于 96 孔板,空白对照组为单纯 UBM 材料,每孔加 120 μL 的细胞培养液,每组 5 孔,置于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度下培养,隔日换液,并观察培养液有无浑浊。分别取培养 1、3、5、7、9、12、14 d 的组织行 CCK-8 检测(在 450 nm 波长测光密度值)。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 猪膀胱细胞外基质组织结构和显微形态学观察

HE 染色观察 UBM 由质地均匀的基质和细丝状的胶原纤维构成(图 1A),Masson 染色可见 UBM 胶原结构完整(图 1B)。扫描电镜显示 UBM 的胶原构成多个三维立体的孔隙,有利于细胞的黏附(图 2)。均未发现蓝色核染样结构,表明脱细胞处理彻底。

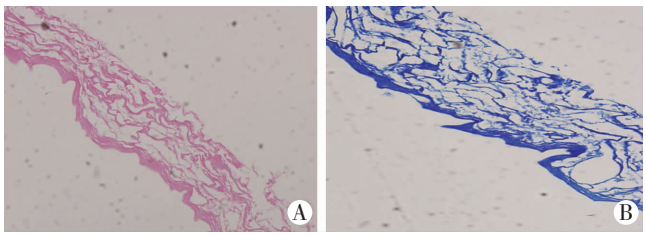
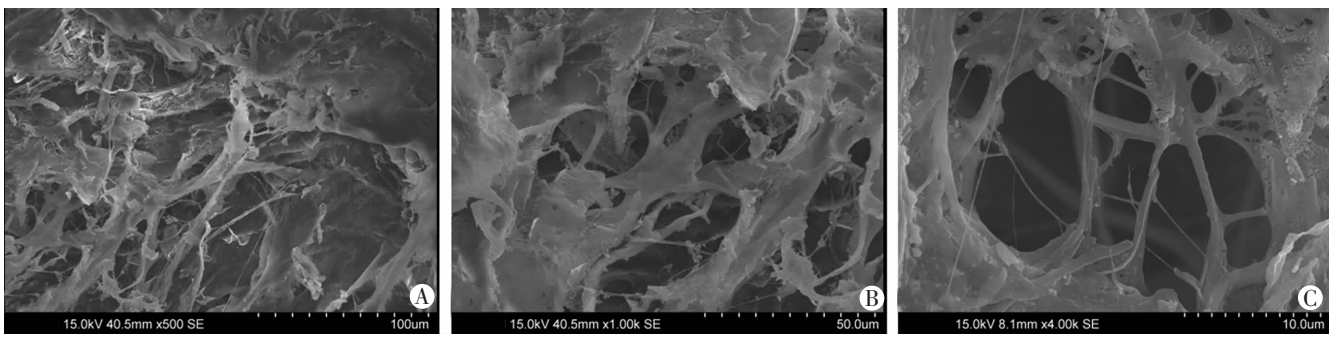


图 1 HE(A)和 Masson(B)染色观察 UBM 组织结构 (×200)



A:×500;B×1 000;C:×4 000

图 2 扫描电镜观察 UBM 组织超微结构

2.2 大鼠BMSCs的分离、培养及鉴定

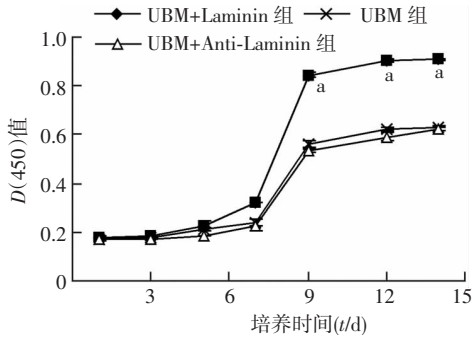
倒置显微镜下观察可见原代分离的大鼠BMSCs呈针尖样贴壁生长，培养7～8 d细胞达90%融合，细胞呈多克隆、旋涡状生长（图3A）。传代BMSCs呈较均一的长梭型，分布均匀，增殖旺盛（图3B）。流式细胞仪检测显示，BMSCs稳定表达中胚层来源细胞的CD29分子，阳性率为98%，内皮细胞的特征性表型分子CD31及造血干细胞系的特征性分子CD34表达阴性，阳性率分别为4.56%和3.30%（图3C），符合间充质干细胞的特征。

2.3 免疫组化检测3组材料上的表达

3组材料上Laminin蛋白均表达阳性，单纯UBM组基底层的黏膜面可见不连续的线状染色（图4A），UBM+Laminin组相比其他2组基底层黏膜面线条增粗，且染色加深（图4B）UBM+Anti-Laminin组黏膜面线条染色减弱，仍可见部分染色阳性的血管腔样结构（图4C）。Laminin蛋白可以复合到UBM材料上，UBM材料表面的部分Laminin可以被抗体封闭。

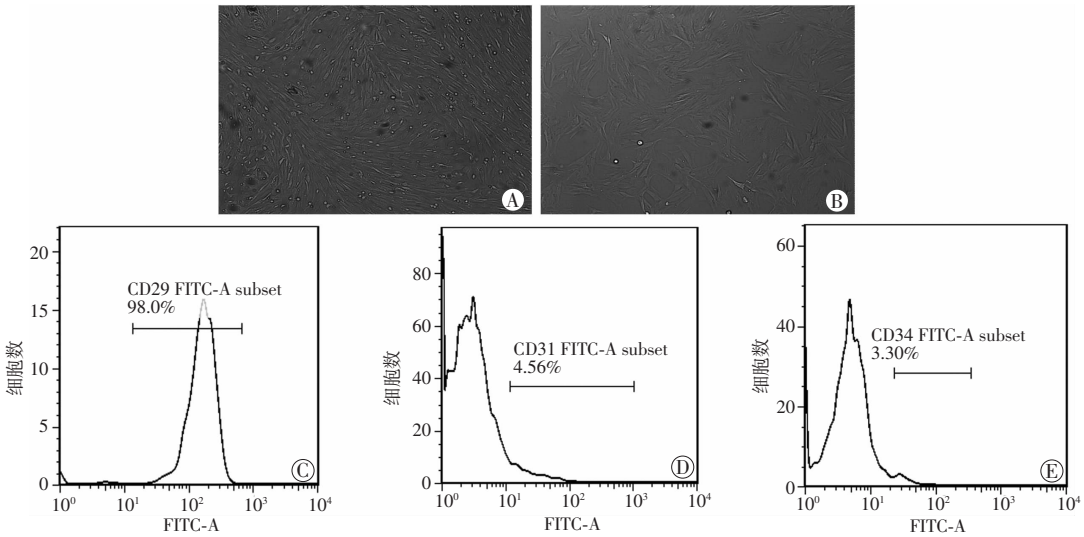
2.4 3组材料BMSCs生长情况

CCK-8法检测表明3组材料上BMSCs细胞生长曲线变化趋势类似（图5），在培养7 d内，细胞增殖不明显，处于潜伏适应期，培养7～9 d，BMSCs细胞进入对数生长期，9 d以后达到平台期。培养7 d以后，3组的增殖速度出现差异，与UBM组比较，UBM+Laminin组对BMSCs细胞增殖有显著促进作用（$P<0.01$），而UBM+Anti-Laminin组与UBM组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。



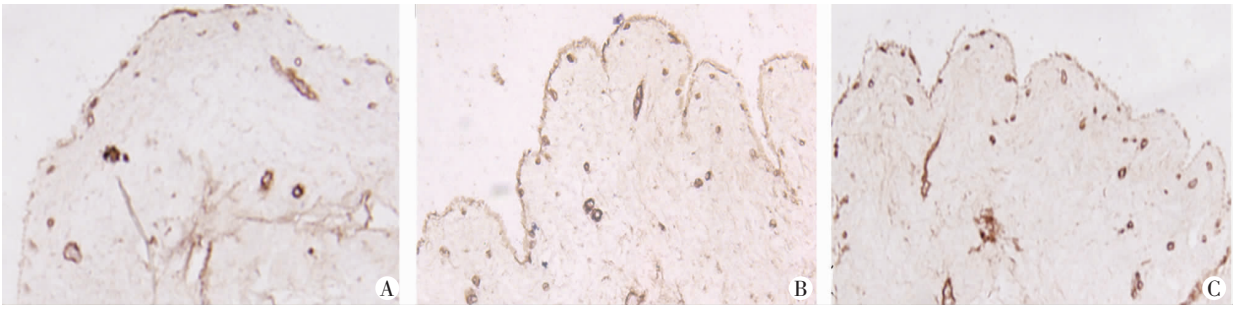
a：$P<0.01$，与UBM组比较

图5 CCK-8法检测3组材料上BMSCs细胞增殖



A：倒置显微镜下观察BMSCs P0代（×100）；B：倒置显微镜下观察BMSCs P3代（×100）；C～E：分别为流式细胞仪检测BMSCs CD29、CD31、CD24表达

图3 BMSCs的鉴定



A：脱细胞UBM；B：UBM+Laminin；C：LBM+Anti-Laminin

图4 免疫组化观察3组材料上Laminin蛋白表达（S-P ×100）

2.5 3 组材料上 BMSCs 迁移

BMSCs 负载支架上培养第 3 天,所有支架表面均有细胞生长,而 UBM + Laminin 组有多层细胞附着,并且随着接种时间的延长,明显见细胞向深层迁移,于第 14 天可到达基底层顶端,细胞与基底膜融合,细胞核拉伸延长;UBM 组绝大部分 BMSCs 依旧聚集在 UBM 内部,尚未达基底层顶端。但在 UBM + Anti-Laminin 组绝大部分 BMSCs 依旧附着在材料表面,仅有少数细胞迁移至材料内部(图 6)。

2.6 免疫组化检测 3 组材料上 BMSCs 的 α-SMA 表达

接种 14 d 的组织行 α-SMA 免疫组化检测发现,UBM + Laminin 组平滑肌标志性蛋白 α-SMA 表达呈明显阳性,单纯 UBM 组 α-SMA 表达呈弱阳性,UBM + Anti-Laminin 组 α-SMA 表达阴性(图 7)。

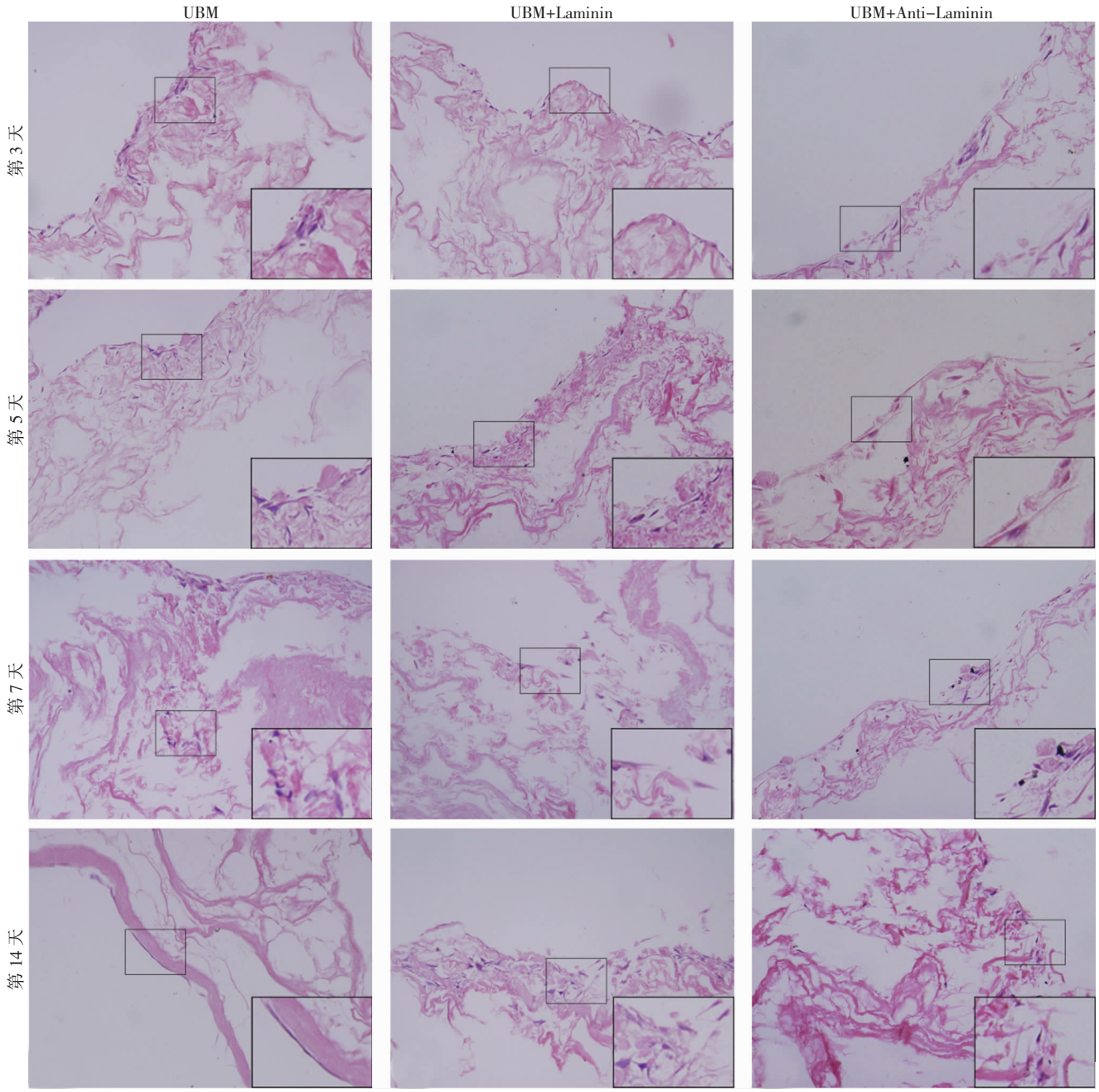
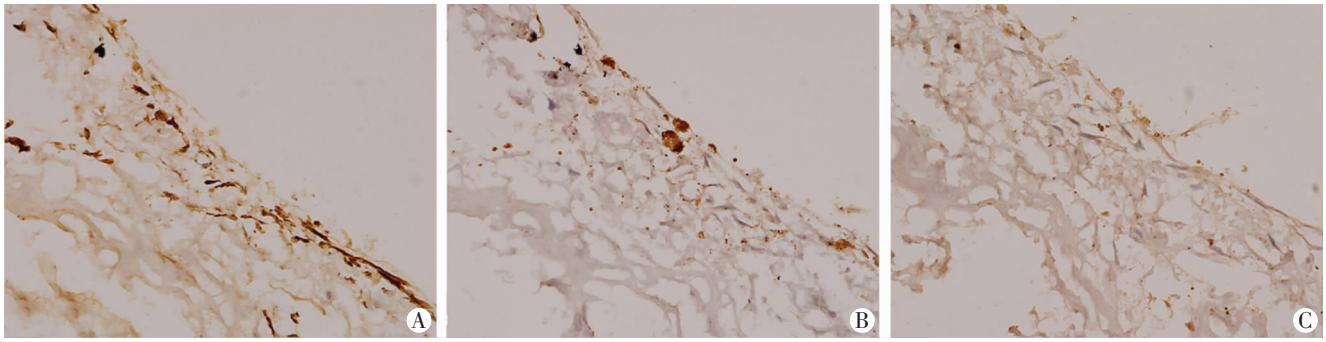


图 6 HE 染色观察 3 组材料上负载 BMSCs 迁移 (×200)



A:UBM + Laminin 组 α-SMA 染色阳性的 BMSCs; B:UBM 组 α-SMA 染色弱阳性的 BMSCs;C:UBM + Anti-Laminin 组 α-SMA 染色阴性的 BMSCs

图7 免疫组化染色检测 BMSCs 接种第 14 天 3 组材料上 α-SMA 的表达 (S-P ×200)

3 讨论

SUI 是一个普遍的社会和卫生问题，其发病率较高，严重影响患者家庭和生活质量[12]。研究表明其病因与尿道内平滑肌和横纹肌的减少有关[13]，目前针对该类疾病的治疗中，生物类材料具有诱人的前景。猪膀胱脱细胞基质易于获得和处理，保留了较多生物活性因子，如：黏附分子、层粘连蛋白(Laminin)等[6]，并具有一定的力学性能和较好的组织相容性[5]，是目前研究的热点。BMSCs 具有增殖和多项分化潜能[14]，被寄予希望在盆底功能修复和尿失禁治疗中担负重要角色，然而其向平滑肌方向分化的机制研究尚不足，以至于临床运用效果欠佳。

Laminin 蛋白是构成细胞外基质的主要成分之一，近年来多项在器官发育领域的研究报道了 Laminin 蛋白能诱导胚胎干细胞及神经干细胞等多种成体干细胞定向分化[7-8]。同时体外研究发现 Laminin 蛋白具有促进骨髓间充质干细胞增殖[11]，并且诱导其向成骨细胞等方向分化的能力[15]。但它对参与盆底修复的 BMSCs 的作用却尚不清楚。

本研究通过机械分离、酶消化、冻干及消毒获得成品 UBM 材料，脱细胞处理干净，胶原纤维保留完整，符合实验要求，且免疫组化发现在 UBM 的基底层有 Laminin 蛋白的表达，验证了 Brown 等[6]的报道。随后使用共孵育法将 Laminin 蛋白与 UBM 制成 Laminin 复合支架，同时用抗 Laminin 单克隆抗体成功封闭 UBM 材料浅层 Laminin 蛋白做对照实验组。用 CCK-8 检测并绘制出细胞生长曲线图，发现细胞在接种第 9 天后 UBM + Laminin 支架组增殖率明显高于其余 2 组，并且差异有统计学意义($P < 0.01$)。再者我们发现 UBM + Anti-Laminin 组细胞绝大多数仅在表面生长，未见明显细胞向深层迁移，并且总体细胞密度低于 UBM + Laminin 组及 UBM 组。类似的实验结果在 Badylak 及 Soiderer 等[16]的报道中也能看到。有报道 UBM 的基底层面中含有层粘连蛋白(Laminin)、胶原蛋白、串珠素等结构蛋白，这些蛋白与相应受体结合，来调节细胞生长、迁移和分化，在组织工程运用中起重要作用[17]。Laminin 蛋白通过其 LG 功能域[18]与干细胞的受体-integrin a6β1[19]结合，从而诱导干细胞定向分化。而本实验结果进一步明确了 Laminin 蛋白可以促进 BMSCs 的生长、增殖以及向材料深部迁移的作用。

新型生物材料在解决排斥反应的基础上，若能诱导潜能干细胞定向分化为修复部位细胞，则是解决问题的关键。因此，我们更进一步检测了共培养第 14 天材料上平滑肌标志性蛋白 α-SMA 的表达，结果显示在 UBM + Laminin 组细胞胞核染色呈明显阳性，UBM 组个别细胞检测阳性，而抗体封闭组检测阴性。这表明 UBM + Laminin 上 BMSCs 已有部分细胞向平滑肌细胞分化，表达平滑肌细胞标志物，所以我们认为 Laminin 也具有诱导 BMSCs 向平滑肌方向分化的能力。

综上，本研究结果表明 UBM 材料上的 Laminin 蛋白具有促进负载 BMSCs 增殖、迁移并向平滑肌分化的能力。为尝试运用 Laminin 复合 UBM 支架作为新型盆底修复材料提供了理论依据，为治疗压力性尿失禁提供了诱人前景。本研究存在的不足之处在于仅体外研究了 UBM 上 Laminin 蛋白对骨髓间充质干细胞生长的影响，下一步可将支架植入体内，观察骨髓间充质干细胞在植入部位迁移及分化情况，在体内进一步验证 UBM 上 Laminin 蛋白对骨髓间充质干细胞生长的影响，如结果与本实验结果一致，可考虑将此法进一步应用到临床试验。

参考文献：

[1] Kim C H, Kim T B, Oh J K, *et al*. Modified distal urethral polypropylene sling (canal transobturator tape) procedure: efficacy for persistent stress urinary incontinence after a conventional midurethral sling procedure[J]. Int Neurourol, 2013, 17(1): 18-23.

[2] Agrawal V, Brown B N, Beattie A J, *et al*. Evidence of innervation following extracellular matrix scaffold-mediated remodelling of muscular tissues[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2009, 3(8): 590-600.

[3] Boruch A V, Nieponice A, Qureshi I R, *et al*. Constructive remodeling of biologic scaffolds is dependent on early exposure to physiologic bladder filling in a canine partial cystectomy model[J]. J Surg Res, 2010, 161(2): 217-225.

[4] Parekh A, Mantle B, Banks J, *et al*. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix[J]. Laryngoscope, 2009, 119(6): 1206-1213.

[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, 2010, 22(2): 221-227.

[6] Brown B, Lindberg K, Reing J, *et al*. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix[J]. Tissue Eng, 2006, 12(3): 519-526.

[7] Howard C, Murray P E, Namerow K N. Dental pulp stem cell migration[J]. J Endod, 2010, 36(12): 1963-1966.

[8] Stabenfeldt S E, Munglani G, Garcia A J, *et al*. Biomimetic microenvironment modulates neural stem cell survival, migration, and differentiation [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16 (12): 3747-3758.

[9] Lindner U, Kramer J, Behrends J, *et al*. Improved proliferation and differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells cultured with basement-membrane extracellular matrix proteins [J]. Cytotherapy, 2010, 12(8): 992-1005.

[10] Freytes D O, Badylak S F, Webster T J, *et al*. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds[J]. Biomaterials, 2004, 25(12): 2353-2361.

[11] Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, *et al*. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(3): 503-508.

[12] Minassian V A, Drutz H P, Al-Badr A. Urinary incontinence as a worldwide problem[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2003, 82(3): 327-338.

[13] Fatton B. Urinary incontinence and menopause epidemiological data[J]. Pelvic Perineologie, 2007, 2(2): 149-155.

[14] McCarty R C, Gronthos S, Zannettino C, *et al*. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Phyiol, 2009, 219 (2): 324-333.

[15] 刘印，詹智，田京. 纤维蛋白原与层黏连蛋白对兔骨髓间充质干细胞在PEGDA支架中成骨作用的影响[J]. 中国医学科学院学报，2013，35(3)：265-269.

[16] Soiderer E E, Lantz G C, Kazacos E A, *et al*. Morphologic study of three collagen materials for body wall repair[J]. J Surg Res, 2004, 118(2): 161-175.

[17] Wilschut K J, Haagsman H P, Roelen B A. Extracellular matrix components direct porcine muscle stem cell behavior [J]. Exp Cell Res, 2010, 316(3): 341-352.

[18] Susman S, Soritau O, Rus-Ciuca D, *et al*. Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells[J]. Rom J Morphol Embryol, 2010, 51(4): 733-738.

[19] Carrion B, Kong Y P, Kaigler D, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis *via* their α6β1 integrin receptor[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(19): 2964-2976.

（**收稿**：2014-11-02；**修回**：2014-12-05）

（编辑　吴培红）