

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.20.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200812.1649.006.html\(2020-08-12\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200812.1649.006.html(2020-08-12))

VEGF165、BMP2 双基因转染 SD 大鼠 BMSCs 的实验研究^{*}

温 洋¹,陈丽媛¹,沈 师²,卓乃强²

(1.四川省遂宁市中心医院骨科中心一病区 629000;2.西南医科大学附属医院
骨与关节外科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探究血管内皮生长因子 165(VEGF165)、骨形态发生蛋白(BMP2)双基因转染 SD 大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)及其基因表达与体外成骨能力。**方法** 提取 SD 大鼠胫骨骨髓,原代培养获得 BMSCs 并进行流式细胞学鉴定。通过脂质体(Lipofect-amine2000)介导 VEGF165、BMP2 基因转染 SD 大鼠 BMSCs,并分为 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组(双基因转染)、pIRES-hBMP2 转染组(单基因转染)、pIRES-hVEGF165 转染组(单基因转染)、空载转染组(空白对照)。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)、酶联免疫吸附试验、组织学染色方法评估基因转染 BMSCs 的增殖情况、基因表达及体外成骨能力。**结果** 流式细胞鉴定培养的 BMSCs 表面 Marker 示 CD44 和 CD90 标志物阳性,CD34 和 CD45 标志物为阴性,证实成功获取大鼠 BMSCs。通过荧光显微镜观察各转染组 BMSCs,24 h 后可见绿色荧光发出,表明转染成功。MTT 结果显示:随着时间的延长,各转染组 BMSCs 细胞的数量呈上升趋势,与未转染 BMSCs 的相比,细胞数量峰值无明显差异,证实转染后 BMSCs 生长情况良好。ELISA 染色结果显示:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 BMP2 蛋白及 VEGF165 蛋白水平较 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组及空载转染组显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。组织学染色观察发现 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组细胞碱性磷酸酶、骨胶原蛋白及骨钙素阳性率明显高于 pIRES-hBMP2 转染组、pIRES-hVEGF165 转染组、空载转染组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 双基因转染后的 BMSCs 目的基因的表达良好,BMP2、VEGF165 基因表达水平较单基因转染明显提高;双基因共转染 SD 大鼠 BMSCs 能够获得比单基因转染更优良的体外成骨能力。

[关键词] 骨形态发生蛋白;血管内皮生长因子;基因转染;骨髓基质干细胞

[中图法分类号] R336 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)20-3331-06

Experimental study on VEGF165 and BMP2 double genes transfecting into BMSCs in SD rats^{*}

WEN Yang¹,CHEN Liyuan¹,SHEN Shi²,ZHUO Naiqiang²

(1. First Department of Orthopedic Centre, Suining Municipal Central Hospital,
Suining, Sichuan 629000, China; 2. Department of Orthopedics and Joint Surgery,
Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) double genes transfecting into the bone marrow stromal stem cells (BMSCs) of SD rats and their gene expressions and in vitro osteogenic capability. **Methods** The SD rat tibia bone marrow was extracted, BMSCs were obtained via the primitive culture. The cytometry cytological identification was performed. The VEGF165 and BMP2 genes were mediated to transfect into BMSCs of SD rats via lipidosome(lipofect-amine2000) and BMSCs were divided into the pIRES- hBMP2-hVEGF165 transfection group (double genes tranfection); pIRES-hBMP2 transfection group (single gene transfection); pIRES-hVEGF165 transfection group (single gene transfection) and empty loading transfetion group (blank control). The proliferation, gene expression and in vitro osteogenic ability of genes transfected BMSCs were evaluated by adopting MMT, ELISA and histological staining methods. **Results** The flow cytometry identified that the surface Marker of cultured BMSCs showed the CD44 and CD 90 markers positive, CD34 and CD 45 markers negative, which verified that the rat BMSCs were successfully obtained. The green fluorescence was emitted

^{*} **基金项目:**四川省科技厅-泸州市科技局-泸州医学院联合科研课题(14JC01653-LH75)。 **作者简介:**温洋(1991—),住院医师,硕士,主要从事四肢、骨盆骨折的研究。

in each transfection groups after 24 h by fluorescence microscopic observation, indicating successful transfection. The MTT results indicated that the number of BMSCs in the transfected groups showed the increasing trend with the time prolonging, and there was no significant difference in the peak number of BMSCs in the transfection groups compared with the untransfection BMSCs groups, which confirmed that the growth of BMSCs after transfection was good. The ELISA staining results showed that the content of BMP2 protein and VEGF165 protein in the pIRES-hBMP2-hVEGF165 transfection group was significantly increased compared with the pIRES-hBMP2 transfection group, pIRES-hVEGF165 transfection group and empty loading transfection group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The histological staining observation found that the positive rates of alkaline phosphatase, bone collagen and osteocalcin in the pIRES-hBMP2-hVEGF165 transfection group were significantly higher than those in the pIRES-hBMP transfection group, pIRES-hVEGF165 transfection group and the empty loading transfection group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of BMSCs target gene after double-gene transfection is good, the expression levels of BMP2 and VEGF165 genes are significantly increased compared with the single-gene transfection. BMSCs in double genes co-transfection SD rats could obtain better osteogenic ability in vitro than those with single gene transfection.

[Key words] bone morphogenetic protein; vascular endothelial growth factor; gene transfection; bone marrow stromal stem cells

近年来,骨组织工程技术迅猛发展,为大段骨缺损修复带来了新的希望。骨组织工程技术主要包含 3 个方面:种子细胞,生长因子以及支架材料。众多研究表明,可大量增殖并具成骨诱导性的种子细胞是体外构建组织工程骨的前提条件^[1-2],因此合适的种子细胞是组织工程骨成功构建的关键因素。目前,骨组织工程技术成骨效率并不令人满意,其成骨效率取决于:(1)种子细胞的成骨活力是否能持续;(2)组织工程骨血管化程度能否为骨组织再生提供足够的血供支持。骨与血供的联合重建是提高组织工程骨成骨效率的关键。血管内皮生长因子 165 (VEGF165) 和骨形态发生蛋白(BMP2)因子在骨生成过程中相辅相成,成骨与血管化互为偶联,促进新生骨的形成。因此,本实验利用成熟的基因转染技术,将 VEGF165 和 BMP2 基因导入骨髓基质干细胞(BMSCs),使其能持续高效生成 VEGF165 和 BMP2 蛋白,实现骨与血供的联合重建,为应用于大段骨缺损动物实验提供基础。

1 材料与方法

1.1 一般资料

SD 大鼠 16 只(4 周龄,体重 75~95 g,性别不限),由西南医科大学实验动物中心提供;双基因质粒、单基因质粒、空质粒(武汉生之源生物科技公司);胎牛血清、青霉素-两性霉素 B 溶液(上海化学试剂);DMEM、Percoll 分离液、鼠 BMP2 ELISA 盒、鼠 VEGF165 ELISA 盒(中山生物科技);碱性磷酸酶(ALP)染色盒(BIOSWAMP);脂质体、磷酸盐缓冲液(PBS)(LEICA);CD90、CD34、CD44、CD45 抗体(上海博森公司);ALP 试剂盒、骨钙素试剂盒(武汉生之源生物科技);I 型胶原试剂盒(武汉华联科生物技术);0.25%胰酶(强生生物制药)。酶标仪、离心机

(韩国世阳世新);恒温培养箱、石蜡包埋机(美国 Thermo 公司)荧光显微镜(美国 OLYMPUS 公司);IMS 图像分析系统(武汉华联科生物科技);石蜡切片机(德国 LEICA 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 分离和培养

颈椎脱臼处死 16 只健康 4 周龄 SD 大鼠,75%乙醇浸泡 15 min。在超净台中将鼠双胫骨取出、PBS 液冲洗干净,注射器取 DMEM 反复冲洗髓腔,冲骨髓入器皿,转入离心管立即离心,转速 1 500 r/min,10 min,离心后去除上层清液后加入 DMEM 重悬。另取离心管,加入与骨髓悬浮液等体积的 Percoll 分离液后,向离心管滴入骨髓悬浮液,离心,1 500 r/min,30 min。离心后,观察底层是红细胞,倒数第 2 层为细胞分离液,倒数第 3 层为淋巴细胞,最上面的一层为血浆层。将倒数第 3 层吸取到新的离心管中,加入 10 mL DMEM 后,立即放入离心机离心 1 500 r/min,5 min,去除上层清液。加入含 10%胎牛血清液和 1%双抗的 DMEM 培养基进行重悬,吹打成单细胞悬液,接种至培养瓶中,将培养瓶放入温度为 37℃、5%二氧化碳培养箱中,3 d 后全量换液后,每隔 3 d 更换一半培养液,培养 10 d 后即可传代。传至第 3 代,备用。

1.2.2 BMSCs 流式细胞鉴定

以胰酶充分消化 BMSCs,以 1 500 r/min 离心,10 min 后取出离心管去除上清液,加入 DMEM 将其制备成细胞悬浮液,取出 200 μ L,然后分别取抗 BMSCs 表面分子抗体分别与之融合,37℃温度下培养 0.5 h,利用流式细胞技术测定。

1.2.3 BMSCs 成骨细胞诱导分化

向 P3 代 SD 大鼠 BMSCs 培养瓶中加入成骨细

胞诱导分化液进行培养,每 3~4 天半量换液 1 次,诱导 BMSCs 向成骨细胞分化。

1.2.4 脂质体介导 BMP2、hVEGF165 转染 BMSCs 及转染后基因表达的检测

1.2.4.1 脂质体介导各转染组质粒转染 BMSCs

pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组(双基因转染)、pIRES-hBMP2 转染组(单基因转染)、pIRES-hVEGF165 转染组(单基因转染)、空载转染组(空白对照)。将第 3 代 BMSCs 制备成细胞悬浮液,按照 $2 \times 10^5/\text{mL}$,每孔接种量为 2 mL 接种到 6 孔板,每孔细胞之间开始融合即开始转染。使 4 组不同组质粒 DNA 分别混匀在 4 组 DMEM 培养基中。向 100 μL 的不含血清 DMEM 培养基中加入 20 μL 的 Lipofectamine 脂质体,轻摇使其混匀;将两种培养基分别静置 5 min 后相互混合,轻摇使其完全混匀,再于室温下静置 0.5 h。将混合物用 DMEM 进一步稀释,使转染液的浓度为 2 ng/ μL 。将 BMSCs 加入已经稀释后的转染载体混合物,放入 37 $^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳培养箱中孵育 5 h。

1.2.4.2 转染后 BMSCs 的形态观察

在 BMSCs 完成目的基因转染后的 1、2、3、4 d 后,在荧光显微镜下对每组转染后 BMSCs 进行连续观察 20 个视野内的荧光发光情况,行转染细胞计数,计算转染率,计算方式:20 个视野内荧光细胞数量/20 个视野内的所观察到的细胞总数。

1.2.4.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)测定质粒转染后 BMSCs 的生长曲线

将每组及第 3 代普通鼠 BMSCs 细胞分别按照浓度 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 制备成单细胞悬液,接种到 96 孔板上(每孔 200 μL)。待细胞完全贴壁时改为不含血清的 DMEM 培养液,培养 24 h 后,换成 10% 胎牛血清 DMEM 培养液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)。每 2 天更换细胞液,第 1~8 天每天行 MTT 法检测。

1.2.4.4 转染后 BMSCs 细胞目的基因表达检测

于转染后 2 d 收集每组细胞培养的上清液,向已经对目的基因蛋白进行抗体包被的 96 孔板中按照每孔 50 μL 的含量加入上清液稀释液,室温下作用 2 h 后,将鼠抗 BMP2 及 VEGF165 抗体按照每孔 100 μL 加入不同的包被孔,室温下作用约 1 h 后,加入 DAB 显色液,用酶标仪进行检测,通过检测得出 OD 值,利用标准曲线计算得出上清液中 BMP2 及 VEGF165 蛋白水平。

1.2.5 转染后 BMSCs 的体外成骨能力检测

1.2.5.1 ALP 的染色观察

于转染后 1 周对各组转染后细胞涂片,用甲醛固

定,15 min 后用 PBS 冲洗 10 min。将已配制好的碱性磷酸酶检测液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行孵化,3 h 后将细胞涂片放在无菌蒸馏水下持续冲洗 5 min 后,将细胞涂片放入硝酸钴溶液中浸泡,1 min 后在持续流动水柱下冲洗,干燥后显微镜观察。

1.2.5.2 I 型胶原蛋白的检测

采用免疫组织化学法,于转染后 1 周将各组转染后细胞进行涂片,抗体为特异性抗大鼠胶原蛋白多抗。实验方法按照试剂盒说明进行。

1.2.5.3 骨钙素的检测

采用免疫组织化学法,于转染后 1 周将各组转染后细胞进行涂片,抗体为特异性抗 SD 大鼠骨钙素多抗,按 1:200 稀释抗体、实验方法按照试剂盒说明进行。

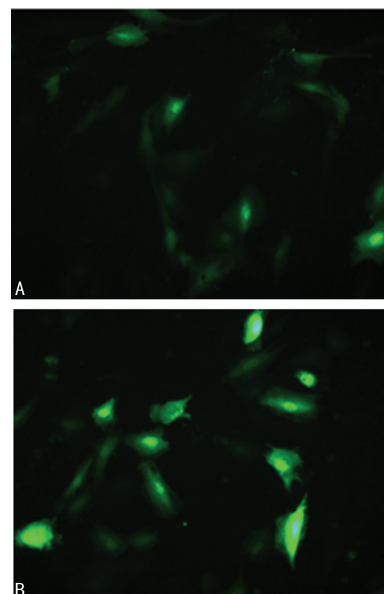
1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SD 大鼠 BMSCs 流式细胞鉴定结果

通过流式细胞技术鉴定 BMSCs 的 4 种表面标记物的表达。结果显示:CD44 和 CD90 标志物阳性,CD34 和 CD45 标志物为阴性。其中,CD44 和 CD90 为 BMSCs 透明质酸和纤连蛋白受体,CD34 和 CD45 为造血细胞和内皮细胞受体,证实成功分离培养 SD 大鼠 BMSCs。



A:转染 24 h 后;B:转染 3 d 后。

图 1 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组转染后不同时间 BMSCs 免疫荧光

2.2 SD 大鼠 BMSCs 基因转染率

除空载转染组外,通过荧光显微镜观察转染后 BMSCs,转染 24 h 后,pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组可见少量绿色荧光,证实转染成功;转染 3 d 后,

镜下荧光强度明显增强,转染率明显提高,见图 1。

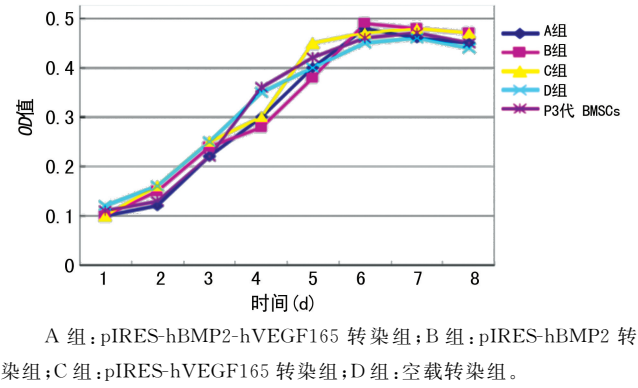


图 2 各组转染后 BMSCs 后生长曲线变化

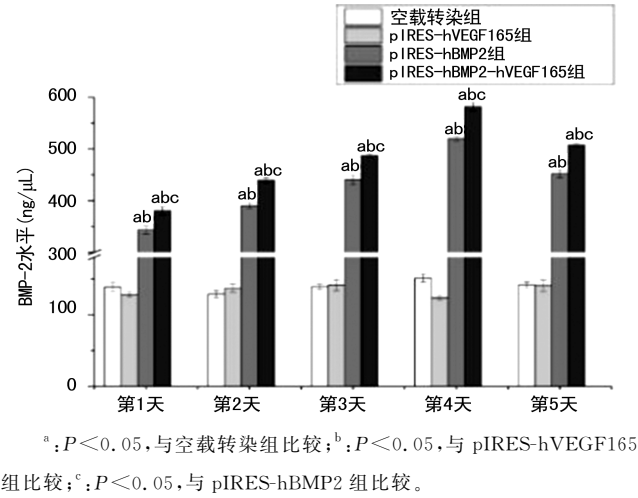


图 3 各转染组细胞 BMP2 蛋白水平

2.3 转染后 BMSCs 的生长曲线

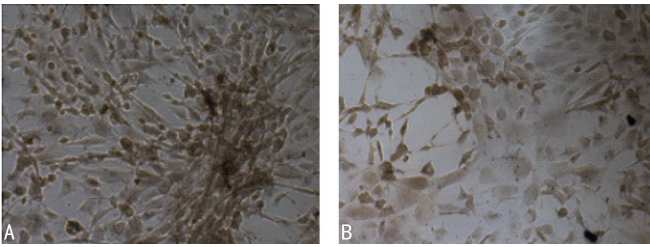


图 4 各组 ALP 染色结果(×200)

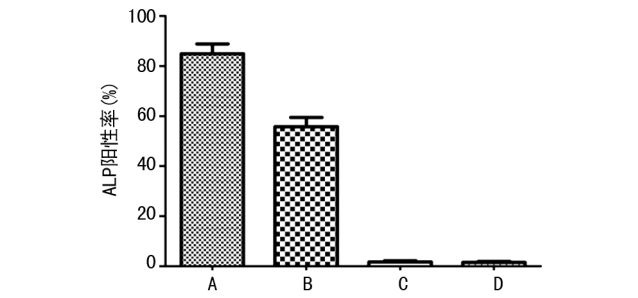


图 6 各组 ALP 染色细胞阳性率

对 各 组 转 染 后 细 胞 测 定 OD 值,pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 BMSCs OD 值在 6 d 时最高,然后逐渐降低, pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组 OD 值高峰时间和峰值与 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组无明显差异。基因转染组均比第 3 代未转染 BMSCs 的高峰出现时间稍晚,但峰值各组相差不大,见图 2。

2.4 各转染组细胞 VEGF165 及 BMP2 蛋白表达情况

各 时 间 点 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转 染 组 BMP2 蛋白及 VEGF165 蛋白水平最高,两种蛋白水平均比 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组高,差异有统计学意义($P<0.05$);空载转染组两种蛋白水平均为最低,见图 3、4。

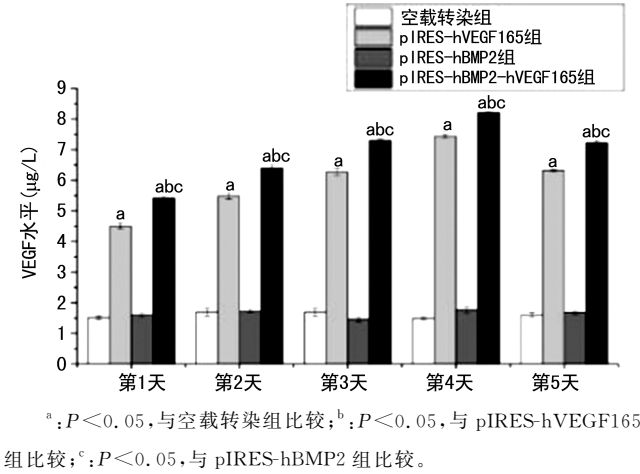
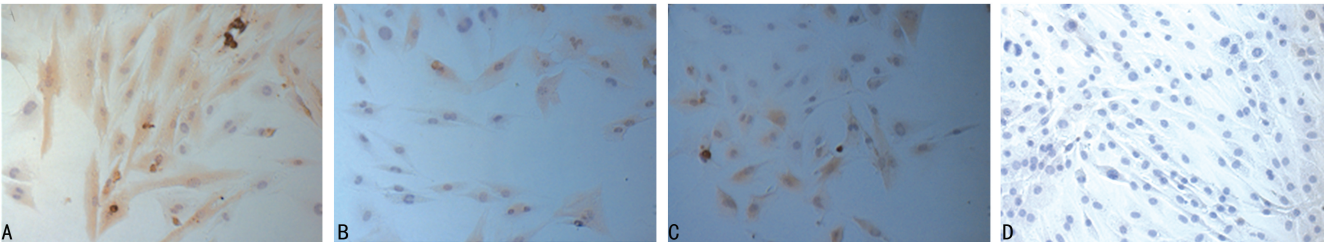


图 4 各组细胞 VEGF165 蛋白水平

2.5 基因转染后 BMSCs 的体外成骨能力检测

2.5.1 ALP 染色结果

细胞转染后 2 周,钴钙染色后镜下观察 BMSCs, pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 ALP 染色为强阳性,pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组 BMP2 染色呈弱阳性,而 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组及空载转染组 VEGF165 未见明显染色阳性细胞出现(图 5)。在 200 倍镜下,对 ALP 阳性细胞进行阳性率统计, pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组阳性率高于 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组及空载转染组,差异



A:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组;B:pIRES-hBMP2 转染组;C:pIRES-hVEGF165 转染组;D:空载转染组。

图 7 各组 I 型胶原蛋白染色结果(×200)

有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

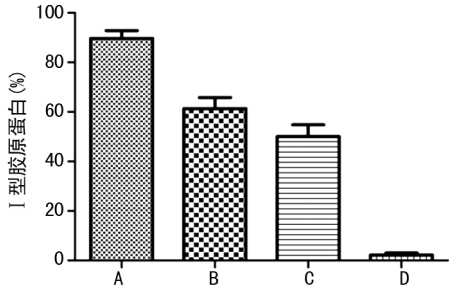
2.5.2 I 型胶原蛋白检测

细胞转染后 2 周,免疫组织化学染色后镜下观察 BMSCs 示:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 I 型胶原蛋白染色为强阳性,pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组 BMP2 及 VEGF165 染色呈弱阳性,而空载转染组未见明显染色阳性细胞出现(图 7)。在 200 倍镜下,对 I 型胶原蛋白阳性细胞进行统计,计算阳性率,pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组阳性率高于 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组及空载转染组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 8。

2.5.3 骨钙素检测结果

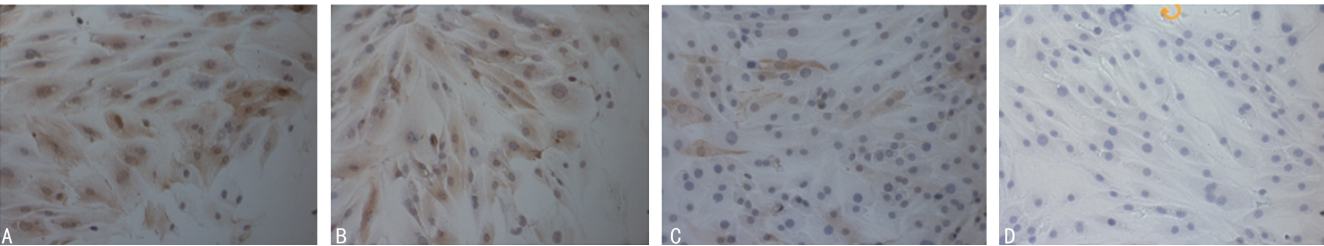
免疫组织化学染色评估 BMSCs 骨钙素生成情况显示:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组骨钙素染色

呈强阳性,pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组 BMP2 呈阳性,pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组 VEGF165 呈弱阳性,对照组呈阴性,见图 9、10。



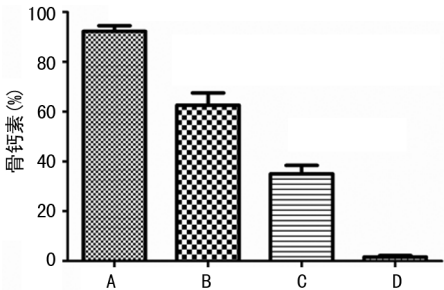
A:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组;B:pIRES-hBMP2 转染组;C:pIRES-hVEGF165 转染组;D:空载转染组。

图 8 各组 I 型胶原蛋白染色细胞阳性率



A:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组;B:pIRES-hBMP2 转染组;C:pIRES-hVEGF165 转染组;D:空载转染组。

图 9 各组骨钙素染色结果(×200)



A:pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组;B:pIRES-hBMP2 转染组;C:pIRES-hVEGF165 转染组;D:空载转染组。

图 10 各组骨钙素染色细胞阳性率统计

3 讨 论

近年来,随着组织工程逐渐发展,利用骨组织工程技术修复长段骨缺损正逐渐成为科研的热点领域。

但持续性成骨效率低及组织工程骨血管化程度低的问题仍未得到圆满解决,因此实现骨与血供联合重建至关重要^[3-4]。

成骨相关生长因子在骨缺损修复中的作用已被证明是促进骨再生的重要因素。大量研究发现,通过添加外源性生长因子,使之可以对骨生成过程进行调控,但在体内易被体液中消化降解,半衰期短,多次添加容易对机体正常细胞产生细胞毒性,若在种子细胞中转染具有成骨诱导和血管生成功能的细胞因子,并能通过种子细胞持续稳定表达,能克服外源性添加细胞因子的应用缺陷^[5-6]。本实验中,利用脂质体介导 BMP2 和 VEGF165 基因转染鼠 BMSCs,基因转染后对 BMSCs 的形态学及生物学表现无明显影响。荧光显微镜下在转染 3 d 左右可见荧光逐渐出现、增强,证

实脂质体作为基因载体能够持续稳定表达目的基因。双基因转染后细胞培养液中 BMP2 和 VEGF165 蛋白水平明显高于其他组别,证实两种目的基因在 BM-SCs 的表达相互促进,存在协同效应。众多研究表明,BMP2 与 VEGF165 两种基因的表达是相互偶联的生物化学反应,二者在反应中相互促进,BMP2 蛋白产生量与同环境中 VEGF165 蛋白水平呈正相关^[7-8]。BMP2 和 VEGF165 蛋白高表达预示着 BM-SCs 具有较强的成骨活性。ALP 能加快骨组织钙化沉积的进程,其活性程度在新生骨钙化过程中的调控作用极其重要^[9-10]。研究表明,骨组织结构中 I 型胶原蛋白是最主要的成分,含量占有机成分的九成以上,骨钙素含量占 2~3%^[11-12]。为证实其实体外成骨能力,本实验针对体外成骨通过 ALP、骨钙素及 I 型胶原蛋白进行染色观察,pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 BMSCs 以上 3 项指标染色细胞阳性率较 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组明显增强,空载转染组未见明显阳性染色细胞。提示 pIRES-hBMP2-hVEGF165 转染组 BMSCs 成骨能力明显高于 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组及空载转染组。

综上所述,BMSCs 在双基因转染后分化和增殖能力并无明显变化,且能持续稳定表达目的基因 BMP2 和 VEGF165 基因,其表达水平分别较 pIRES-hBMP2 转染组和 pIRES-hVEGF165 转染组明显提高,双基因表达呈协同促进,显著提高了体外成骨能力。BMP2 和 VEGF165 双基因修饰 BMSCs 有望成为骨组织工程中的种子细胞,下一步将完善 BMP2 和 VEGF165 双基因修饰 BMSCs 加载于同种异体骨修复动物体内骨缺损的评价。

参考文献

[1] 吴莉,赵娴,何波,等. 内皮祖细胞促进组织工程骨体内成骨[J]. 中国修复重建外科杂志,2016,30(1):95-101.

[2] LAMPERT F M,MOMENI A,FILEV F,et al. Utilization of a genetically modified muscle flap for local BMP-2 production and its effects on bone healing: a histomorphometric and radiological study in a rat model[J]. J Orthop Surg Res,2015,10(1):55.

[3] 刘兆杰,胡永成. 外源性生长因子修饰脂肪组织

来源干细胞成骨与成软骨表达的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2013,21(3):250-255.

[4] 周东生,王永会,董宏朋,等. 外源性 VEGF 复合煅烧骨修复骨缺损[J]. 山东医药,2005,45(27):11-13.

[5] 李玲慧,丁道芳,杜国庆,等. 淫羊藿苷对大鼠成骨细胞增殖及碱性磷酸酶、Runx2 蛋白表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2013,21(21):2195-2199.

[6] 张猛,张杰,张文,等. 不同力学刺激对骨性关节炎软骨 I 型胶原蛋白产生的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(13):1206-1211.

[7] KESSLER S,MAYR-WOHLFART U,IGNATIUS A,et al. The impact of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (b-FGF) on osseointegration, degradation and biomechanical properties of a synthetic bone substitute[J]. Z Orthop Ihre Grenzgeb,2003,141(4):472-480.

[8] TAN S,HUAN P. Expression patterns indicate that BMP2/4 and Chordin, not BMP5-8 and Gremlin, mediate dorsal-ventral patterning in the mollusk *Crassostrea gigas*[J]. Dev Genes Evol,2017,227(2):75-84.

[9] ZHANG C,MENG C,GUAN D. BMP2 and VEGF165 transfection to bone marrow stromal stem cells regulate osteogenic potential in vitro [J]. Medicine,2018,97(5):e9787.

[10] 管大凡,陈月芹,刘洪美,等. hBMP2/hVEGF165 双基因腺病毒修饰 BMSCs 复合 n-HA/PA66 修复骨缺损影像学观察[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(20):1881-1887.

[11] LIU Y,WANG L,FATAHI R,et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice [J]. Bone,2010,47(5):916-925.

[12] 周航宇,夏德林,甘生远,等. 骨形态发生蛋白 2 和血管内皮生长因子 165 双基因转染骨髓基质干细胞的异位诱导成骨能力[J]. 中国组织工程研究,2017,21(9):1334-1339.