

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00243

• 论 著 •

兔全骨髓培养诱导分化获取内皮祖细胞

方兴根^{1,2}, 赵 瑞¹, 李子付¹, 杨鹏飞¹, 黄清海¹, 许 奕¹, 洪 波¹, 刘建民^{1*}

1. 第二军医大学长海医院神经外科, 上海 200433

2. 皖南医学院附属弋矶山医院神经外科, 芜湖 241000

[摘要] **目的** 探讨采用将兔全骨髓直接体外培养诱导分化的方法获取内皮祖细胞(EPCs), 同时观察 EPCs 的扩增能力。**方法** 新西兰兔 10 只, 对每只兔穿刺并抽取骨髓 3 ml, 用 EGM-2 培养基对全骨髓进行培养, 观察细胞生长及形态变化, 绘制细胞生长曲线并评估其扩增能力。对培养 12 d 后的贴壁细胞行 CD133、CD34、VEGFR-2 三抗原免疫组化鉴定及吞噬乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)和结合荆豆凝集素(UEA-1 lectin)的内皮细胞功能鉴定; 同时对其行 CD133 免疫磁珠分选及流式细胞术检测, 比较分选前后的 CD34⁺/VEGFR-2⁺ 和 CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ 细胞比例的差异。**结果** 全骨髓直接培养 48 h 后可见细胞呈丛状或集落样生长, 细胞呈梭形、三角形、多边形, 细胞生长曲线呈“S”型。经过 12 d 的培养, 每 3 ml 骨髓可以获得 $(1.51 \pm 0.29) \times 10^6$ 个贴壁生长的 EPCs, 细胞呈铺路石样外观; 检测发现 CD133、CD34、VEGFR-2 三抗原阳性表达, 并具有吞噬 ac-LDL 和结合荆豆凝集素(UEA-1 lectin)的内皮细胞功能。经 CD133 免疫磁珠分选后 CD34⁺/VEGFR-2⁺ 和 CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ 的细胞比例数分别为分选前的 3.38 倍和 6.14 倍。**结论** 通过全骨髓直接培养诱导分化获取兔 EPCs 的方法简单、可行。

[关键词] 骨髓; 内皮祖细胞; 干细胞; 细胞分离

[中图分类号] R 329.29

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)03-0243-06

Endothelial progenitor cells derived by culturing rabbit bone marrow

FANG Xing-gen^{1,2}, ZHAO Rui¹, LI Zi-fu¹, YANG Peng-fei¹, HUANG Qing-hai¹, XU Yi¹, HONG Bo¹, LIU Jian-min^{1*}

1. Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Neurosurgery, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To obtain endothelial progenitor cells (EPCs) by culturing total bone marrow of rabbits with EGM-2MV, and to observe the proliferation of EPCs. **Methods** Three millimeter bone marrow was obtained from each of the 10 New Zealand rabbits and was cultured with EGM-2MV medium in flasks coated with fibronectin. Morphology and growth of cells were observed under phase contrast microscope, and a growth curve was plotted to evaluate cell proliferation ability. Twelve days after culture, the attached cells were identified by immunocytochemical staining for CD133, CD34, and vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR-2). The functions of cells were tested by evaluating the incorporation ability of Dil-ac-LDL and the binding ability with FITC-UEA-1 lectin. The attached cells were also selected by CD133 immunomagnetic beads and flow cytometry. The percentages of CD133, CD34, and VEGFR-2, CD34/VEGFR-2 and CD133/CD34/VEGFR-2 antigen-positive cells were calculated and compared before and after immunomagnetic beads selection. **Results** Cluster-like or colony-like cells were grown from the bone marrow culture 48 h later; the cells were spindle, triangle or polygon in shape. The cells growth curve was “S” shaped. About $(1.51 \pm 0.29) \times 10^6$ attached EPCs were harvested from each sample after 12 days’ of culture; the cells took on a cobblestone appearance; they also incorporated Dil-ac-LDL and combined with FITC-UEA-1 lectin. Immunocytochemistry showed the cells were positive for CD34, CD133, and VEGFR-2. After immunomagnetic beads selection the percentages of CD34⁺/VEGFR-2⁺ and CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ cells were 3.38 and 6.14 times higher than those before selection, respectively. **Conclusion** Direct culture of rabbit bone marrow is a simple and effective method to obtain EPCs.

[Key words] bone marrow; endothelial progenitor cells; stem cells; cell separation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3): 243-248]

[收稿日期] 2010-12-29

[接受日期] 2011-01-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30901556, 81000495, 81000494). Supported by National Natural Science Foundation of China (30901556, 81000495, 81000494).

[作者简介] 方兴根, 博士生. E-mail: fangxinggen@sohu.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873446, E-mail: liu118@vip.163.com

通常认为血管内皮细胞的更新是通过邻近的血管内皮迁移、增殖完成的,正常血管内皮细胞增殖能力有限,而且正常的血管内皮的更新率很低^[1]。直到1997年Asahara等^[2]报道了外周血中可以分离出内皮前体细胞,这种观念才得以转变,接着不断有报道发现骨髓参与血管内皮细胞的更替^[3-4]。目前认为内皮细胞由EPCs分化而成,该发现为加深对多种疾病,如心血管疾病、糖尿病、脑卒中和肿瘤^[5-7]等的认识提供了新的线索。临床和包括组织工程种子细胞在内的基础研究均需要大量的EPCs,但由于EPCs的数量及增殖能力等原因,难以在短时间内获得大量细胞。根据文献的报道,EPCs存在于骨髓、外周血、脾脏、脂肪、大网膜、血管壁、新生儿脐带等^[8-11],通常认为主要来自骨髓。本研究首次对兔全骨髓直接培养诱导出EPCs,探讨了这种耗时短、简单、经济的EPCs获取新方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级新西兰兔10只,体质量2.2~2.5 kg,年龄10~12个月,由第二军医大学实验动物中心提供,动物饲养遵从中华人民共和国实验动物使用协议,实验通过第二军医大学伦理委员会的监管和批准。

1.2 骨髓采集及EPCs扩增 每只兔用盐酸赛拉嗪肌内注射(2 mg/kg)联合1%戊巴比妥(10~15 mg/kg)静脉注射麻醉,用16号骨穿针于髂嵴抽取骨髓3 ml,用肝素抗凝(200 U/ml),将骨髓加入涂有纤维连接蛋白的25 cm²培养瓶中(每瓶1.5 ml),与EGM-2MV培养基(PromoCell,德国)3 ml混匀,培养基内含有诱导因子:成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、氢化可的松、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、小牛血清、维生素C,置入37℃、100%湿度、5%CO₂培养箱中培养,48 h后将培养基及骨髓血性混合物弃去,留下贴壁细胞,再用PBS清洗3遍,加入EGM-2MV培养基3~5 ml继续培养,培养基每3 d更换1次。培养8 d后进行传代,每3 d传代1次,传代时利用反复贴壁法,每次去除最早20 min贴壁的细胞以除去成纤维细胞。

1.3 EPCs的生长曲线 培养8 d的贴壁细胞经过0.25%胰蛋白酶消化、离心(250×g)、用EGM-2MV培养基重悬后,以2×10⁴/ml的密度加入24孔已涂有纤维连接蛋白的培养板,每孔0.5 ml,培养基每3 d更换1次。生长曲线根据每天3孔细胞数平均计数绘制,了解细胞的扩增能力。

1.4 细胞免疫组织化学染色鉴定 培养11 d后的贴壁细胞,经过消化、离心、再重悬后种植到已经处理过的24孔板中,接种密度为1×10⁵/孔,24 h后,贴壁细胞用PBS冲洗3次,并用1:1甲醛和乙酸混合液固定10 min, PBS冲洗3次,10%山羊血清封闭30 min,并分别用CD133兔抗人、CD34兔抗人、VEGFR-2兔抗人一抗(滴度均为1:100, Santa Cruz),室温下孵育2 h, PBS冲洗后滴加FITC或TRITC标记的山羊抗兔二抗,1 h后, PBS冲洗,荧光显微镜下观察。对照用PBS替代一抗,其他处理相同。

1.5 摄取ac-LDL和结合UEA-1 lectin 培养11 d后的贴壁细胞,经过消化、离心、再重悬后接种到放有小玻片的24孔板中,接种密度为1×10⁴/孔,24 h后,更换培养基,重新加入新鲜的含有经Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL, 10 μg/ml, Invitrogen)的培养基,37℃孵育1 h,再用2%的多聚甲醛固定细胞10 min,然后用PBS浸洗3次,每次5 min,再加入经FITC标记的UEA-1 lectin(FITC-UEA-1 lectin, 10 mg/L, Sigma),37℃孵育1 h,共聚焦显微镜下观察,Dil-ac-LDL(激发波长543 nm,发射波长574 nm)发红色荧光,FITC-UEA-1 lectin(激发波长490 nm,发射波长495 nm)发绿色荧光。

1.6 CD133磁珠分选EPCs 采用免疫微珠分选系统及CD133抗体直标免疫磁珠进行分选,培养11 d后的贴壁细胞,胰酶消化后,对细胞悬液离心250×g,10 min,完全吸取上层液,沉淀用300 μl PBS混悬;加入FCR阻断剂100 μl(10⁸个细胞/100 μl),加入CD133免疫磁珠100 μl(10⁸个细胞/100 μl, Miltenyi),混匀,4℃冰箱30 min,用PBS 1~2 ml冲洗,细胞悬液离心250×g,10 min,完全吸取上层液;沉淀用PBS 500 μl混悬,准备磁铁固定架及分选柱,将细胞混悬液装柱,用3倍量的培养基洗涤;洗涤出CD133⁻细胞,柱内为CD133⁺细胞;将分选柱远离磁铁,用5 ml培养液冲洗分选柱,所得细胞悬液离心5 min;完全吸取上层液;沉淀用PBS或培养液重悬,细胞计数,继续培养观察细胞生长及增殖情况或准备行流式细胞检测。

1.7 流式细胞仪检测EPCs 培养11 d后的贴壁细胞,经过消化、离心、制成单细胞悬液,重悬于100 μl的PBS中,然后用CD34-FITC抗人、CD133-PE抗人和VEGFR-2-APC抗人的抗体(均为eBioscience)进行标记,每10⁶个细胞滴加抗体5 μl,细胞数不足10⁶个按10⁶个计,室温下孵育30 min,离心,用PBS 300 μl重悬细胞,上机检测。

磁珠分选所得CD133阳性细胞,同样方法进行

标记,重悬后上机检测。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数间比较用 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态观察 骨髓经过 48 h 的培养后,将含有 EGM-2MV 培养基和血性混合物弃去,并用 PBS 浸洗 3 遍,可见培养瓶中的贴壁细胞(图 1A、1B),细胞呈丛状或集落样生长,细胞呈梭形、三角

形、多边形和不规则形。48 h 后丛状或集落样细胞迅速增长,通常第 5 天时均表现为集落样生长,集落不断扩大,集落中心细胞密度高,周围单层细胞呈放射状排列,到第 8 天细胞集落(图 1C、1D)进一步扩大可长满培养瓶,集落中心可出现细胞坏死,按 1:2 分瓶传代,传代后 3 d 细胞低倍镜下呈所谓“铺路石样”外观,高倍镜下仍多呈梭形(图 1E、1F)。每 3~5 d 传代 1 次,未见明显细胞坏死,随着传代次数的增加,不规则形细胞有增多趋势。

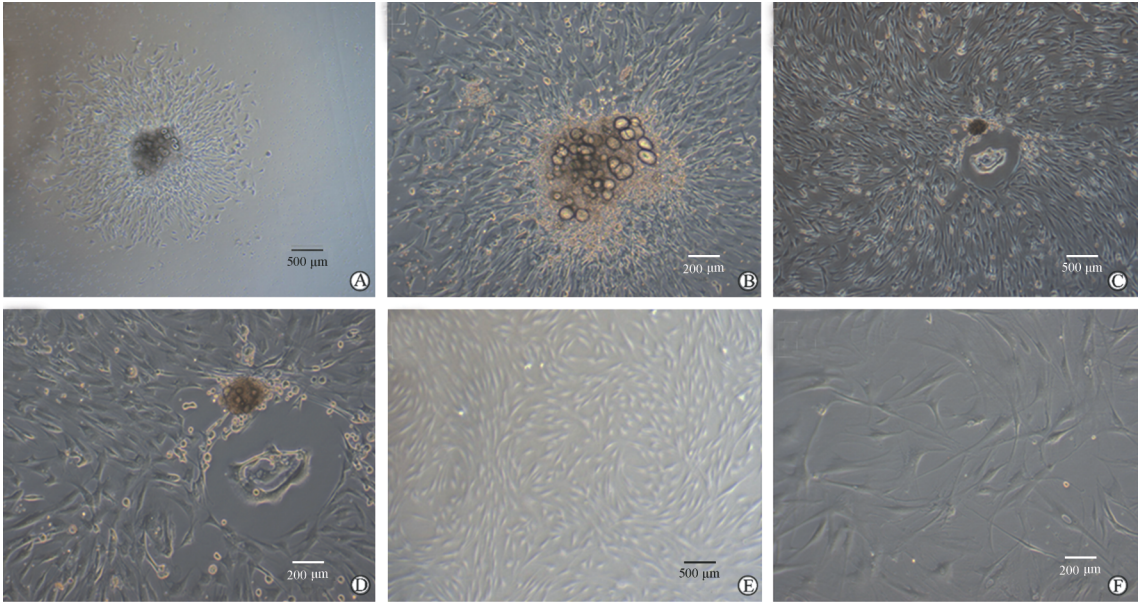


图 1 EPC 形态观察图

Fig 1 Observation of EPC morphology

Colony-like growth cells from bone marrow 48 h after culture (A), the cells were spindle, triangle or polygon in shape(B). The colony cells enlarged 8 days after culture of bone marrow (C), with the cells in the center of the colon lost (D). Three days after culture the cells showed the so-called “cobblestone” appearance (E) with low magnification; most of cells were spindle-shaped with high magnification (F)

2.2 细胞增殖能力 EPCs 传代后的第 1 天细胞数有少量减少,第 2~5 天细胞呈快速增殖,之后速度减慢,生长曲线呈“S”型(图 2)。经过 12 d 的培养,每 3 ml 可以获得 $(1.51 \pm 0.29) \times 10^6$ 个贴壁生长的 EPCs。经 CD133 磁珠分选后的阳性细胞以 $(2.2 \pm 0.26) \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度继续培养,每 3~5 d 传代 1 次,未见明显细胞坏死,传至第 12 代仍保持稳定的增殖能力。

2.3 细胞免疫组织化学染色 培养到第 12 天的贴壁细胞,再种植到 24 孔板培养 24 h 后,对贴壁生长细胞进行染色,细胞 CD34(图 3A)、CD133(图 3B)、VEGFR-2(图 3C)染色阳性。

2.4 吞噬 ac-LDL 和结合 UEA-1 lectin 的功能 $(95.6\% \pm 2.6\%)$ 的细胞具有内皮细胞样功能吞噬 Dil-ac-LDL,胞质染红色荧光(图 3D),并能结合

FITC-UEA-1 lectin,胞质染绿色荧光(图 3E),共聚焦显微镜下两者融合叠加呈黄色(图 3F)。

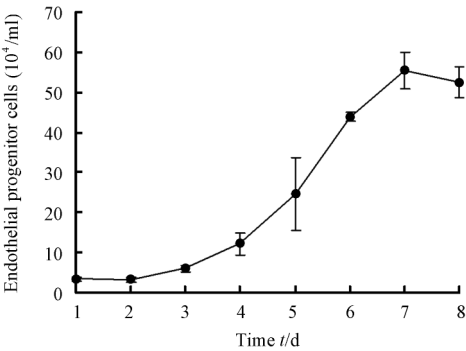


图 2 内皮祖细胞生长曲线图

Fig 2 S-shaped cell growth curve

$n=5, \bar{x} \pm s$

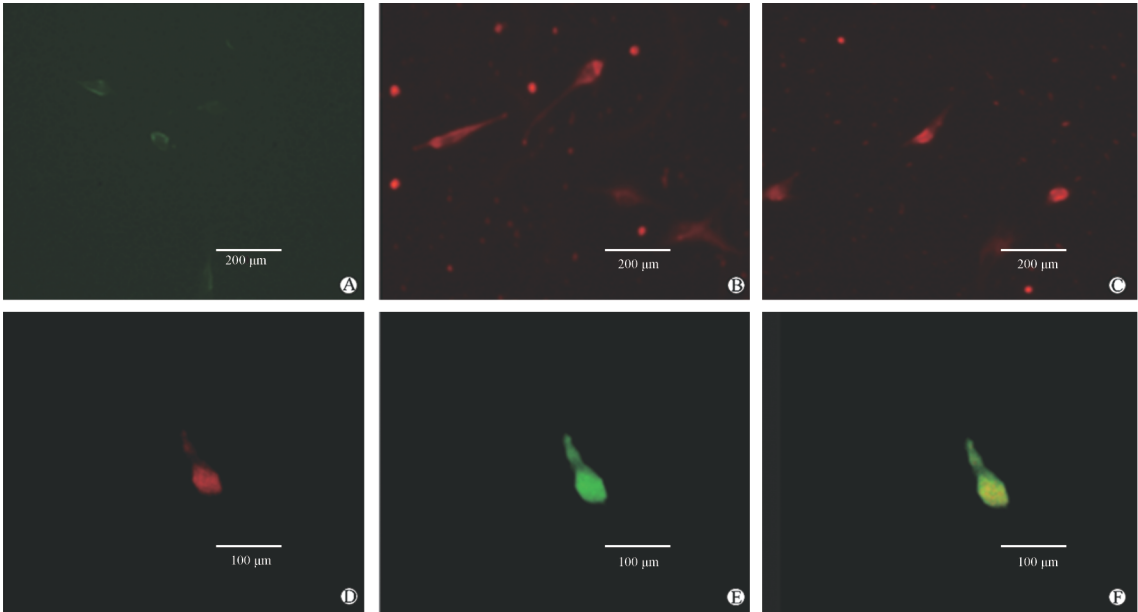


图 3 EPC 免疫组织化学及功能鉴定

Fig 3 Immunohistochemical and functional examination of EPCs

Green, red, red fluorescence illustrate cells were positively stained with CD34⁺ (A), CD133⁺ (B), VEGFR-2⁺ (C), respectively. Fluorescence confocal microscopy illustrate that EPCs incorporate Dil-ac-LDL (red) (D) and bind with FITC-UEA-1 Lectin (green) (E); F is the merge of the two results (yellow)

2.5 贴壁细胞和磁珠分选细胞的流式细胞检测 培养 12 d 的贴壁细胞流式细胞仪检测结果提示 CD133⁺、CD34⁺、VEGFR-2⁺ 细胞分别为 (3.35%±1.29%)、(3.75%±1.08%)、(37.21%±7.79%)，CD34⁺/VEGFR-2⁺ 的细胞为 (3.82%±0.93%)，CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ 的细胞为 (1.78%±0.62%)。

经单次 CD133 磁珠分选可获得 (14.83%±

4.02%)，流式细胞仪检测结果提示 CD133⁺、CD34⁺、VEGFR-2⁺ 细胞分别为 (13.02%±2.03%)、(20.1%±10%)、(16.54%±2.81%)，分别为未经分选的 3.89、5.37、0.44 倍。CD34⁺/VEGFR-2⁺ 的细胞为 (12.89%±1.72%)，为未经分选时的 3.38 倍。CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ 的细胞为 (10.93%±2.62%)，为未经分选时的 6.14 倍。具体见图 4。

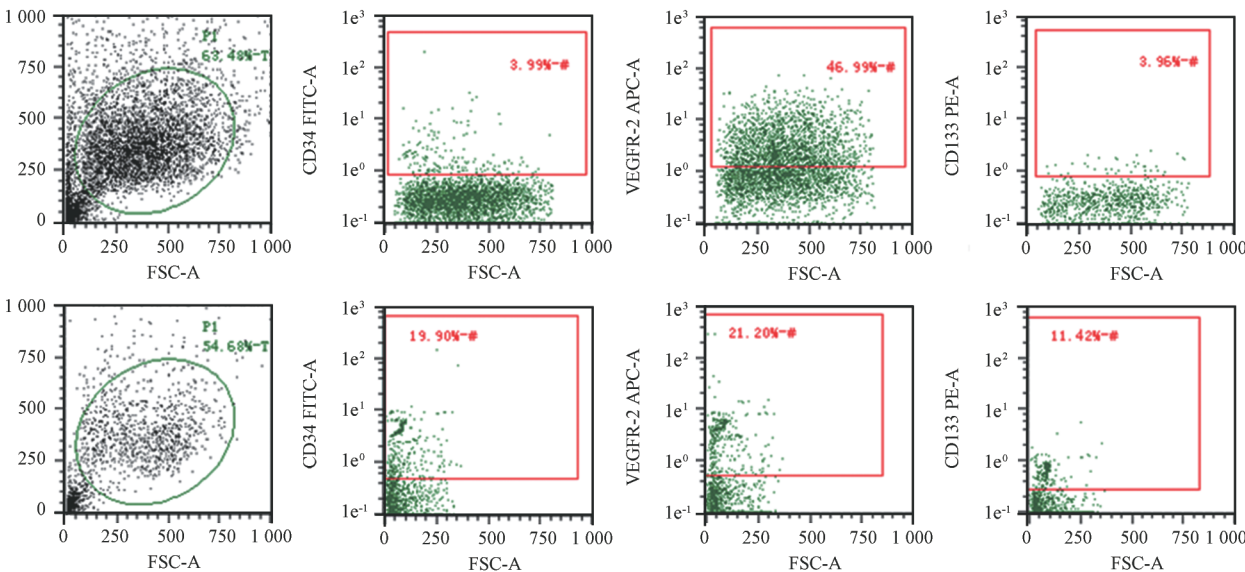


图 4 流式细胞术检测结果图

Fig 4 Results of flow cytometry

The upper row shows the percentages of CD133⁺, CD34⁺, VEGFR-2⁺ cells. The lower row shows the the percentages of CD133⁺, CD34⁺, VEGFR-2⁺ cells after CD133 immunomagnetic beads selection

EPCs 经 CD133 磁珠分选, 分选前后 $CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 的细胞比例数经 t 检验, $t = 21, P < 0.01$, 差异具有统计学意义。分选前后 $CD133^{+}/CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 的细胞比例数经 t 检验, $t = 10.4, P < 0.01$, 差异具有统计学意义。

3 讨论

一直以来, 人们认为在胚胎发育过程中, 中胚层细胞分化成血管母细胞进而形成包括内皮细胞在内的血管结构, 而出生后的血管新生及修复是由邻近的血管内皮细胞通过出芽生长、局部增殖、迁移及重塑等方式完成的^[1]。此后, 在一些对内皮损伤模型的研究中发现了细胞从损伤的边缘向内皮损伤处延伸, 但是延伸能力有限, 几个月以后在损伤的中心区域仍没有内皮细胞覆盖^[12], 直到 Asahara 等^[2]证实从成人外周血中用磁珠分选出 $CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 细胞, 经过诱导后表达内皮细胞的特性, 并参与肢体局部缺血组织的毛细血管形成, 血管内皮细胞的前体细胞的概念才有了真正意义上的突破, 使得对血管新生及修复的传统观念得以改变; 继而越来越多的临床和实验证据证实, EPCs 参与血管新生及血管修复^[13-14]。EPCs 在维护血管系统的稳定、缺血组织的再血管化、肿瘤的生长及组织工程血管种子细胞的研究中均有重要作用^[15]。目前, 多采用鼠和兔这两种实验动物对 EPCs 进行研究, 尤其兔是一些血管病的主要模型动物, 对其 EPCs 的获取尤为重要。

根据既往的研究结果, 出生后 EPCs 存在于外周血、骨髓、脐血、新生儿肝脏、脾脏、脂肪、血管壁及血管外膜等处^[8-11, 16], 大多数研究是利用外周血通过梯度离心获取单核细胞再经过诱导分化获得 EPCs, 或经过免疫磁珠分选法获得 EPCs, 所得细胞数量少是其无法克服的缺陷。本研究中, 骨髓经 12 d 的培养诱导, 每 3 ml 可获得 $(1.51 \pm 0.29) \times 10^6$ 个细胞, 这些细胞经免疫组化及流式细胞学检测三抗呈阳性, 且具备内皮细胞的吞噬功能, 从而确证为 EPCs。本实验结果显示从兔骨髓中直接获取 EPCs 更加可行, 理由有: (1) 外周血中 EPCs 多来自骨髓, 浓度较低, 获取困难, 从骨髓可以获得更多的 EPCs 细胞。(2) 可以尽可能避免与循环 EPCs 相混淆。(3) 取材的量要求比外周血少。(4) 效率相对较高, 通过直接培养和体外扩增可以短期内获得足够量的 EPCs。(5) 操作简化, 污染概率小, 不需要经过梯度离心或磁珠分选程序, 避免因密度梯度离心方法造成细胞

丢失。

EPCs 到现在为止仍没有特征性标志可以鉴别, 对于其来源及表面标志均存在许多争议。EPCs 的鉴定主要是通过多个细胞表面免疫标志共表达及能吞噬 ac-LDL 及结合 Lectin 来实现的。EPCs 代表一功能细胞群, 具有很强的增殖能力并能向内皮细胞转化的前体细胞, 一般认为其和造血干细胞具有相同的前体细胞^[17]。最初认为 $CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 细胞作为从外周血单核细胞来源的 EPCs 免疫学标志, 后来发现一些成熟内皮也表达或弱表达 CD34、VEGFR-2, 且内皮细胞成熟过程中 CD34 逐渐丢失, 而表面抗原 Von Willebrand factor 则增加。最近认为 $CD133^{+}/CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 的细胞代表更加原始的 EPCs^[18], 在分化过程中逐渐转变成 $CD133^{-}/CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 的 EPCs, CD133 在干细胞中表达, 在分化成熟的细胞不表达。本研究结果显示经过 CD133 磁珠分选后, 所得细胞数为原总数的 $(14.83\% \pm 4.02\%)$, $CD133^{+}$ 细胞比例为分选前的 3.89 倍, $CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 细胞比例为分选前 3.38 倍, $CD133^{+}/CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 的细胞比例为分选前的 6.14 倍, 分选后 $CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 和 $CD133^{+}/CD34^{+}/VEGFR-2^{+}$ 细胞比例数亦明显增加, 差异有统计学意义, 结果提示可以通过磁珠分选的方法获得纯度更高, 更加原始的 EPCs, 以满足更高要求的实验需要。

国内有采用全骨髓培养获取骨髓间充质干细胞的报道, 该方法不需要在培养基中添加诱导分化因子, 而本研究通过对兔全骨髓培养并诱导分化获取 EPCs, 这在国内尚未见报道。

通过全骨髓细胞的贴壁培养获取 EPCs, 可以除外悬浮生长的造血干细胞, 另外还需要同间充质干细胞鉴别, 间充质干细胞在体外培养也表现为贴壁生长, 其表面抗原 $CD45^{-}$ 、 $CD34^{-}$ 有助于鉴别^[19]。自 EPCs 被发现以来, 许多研究探索其培养及分离的方法, 发现其在培养诱导分化中需要 IGF、bFGF、VEGF 等细胞因子^[20], 才能获得表达相应的细胞表面标志和具有血管生成能力的 EPCs。本实验采用的 EGM-2MV 培养基含有 IGF、bFGF、VEGF 等细胞因子诱导骨髓细胞向 EPCs 分化。由于在诱导分化过程中不断有 EPCs 向内皮细胞方向转化, CD133 和 CD34 抗原逐渐减弱, 而且 EPCs 缺乏特异性的表面标志, 分离、纯化 EPCs 尚有一定难度, 如何获得更高纯度的 EPCs 以满足需要则是下一步亟待解决

的问题。

综上,本研究采用兔全骨髓直接培养诱导分化获得 EPCs,并证实该方法程序简单,耗时短,可以获得较多数量的 EPCs,并可通过培养后的进一步磁珠分选获取纯度更高的 EPCs。

[参考文献]

- [1] Reidy M A, Schwartz S M. Recent advances in molecular pathology. Arterial endothelium—assessment of *in vivo* injury[J]. *Exp Mol Pathol*, 1984, 3: 419-434.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- [3] Crosby J R, Kaminski W E, Schatteman G, Martin P J, Raines E W, Seifert R A, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation [J]. *Circ Res*, 2000, 9: 728-730.
- [4] Foteinos G, Hu Y, Xiao Q, Metzler B, Xu Q. Rapid endothelial turnover in atherosclerosis-prone areas coincides with stem cell repair in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2008, 118: 1856-1863.
- [5] Saltzman A J, Choi S W, Dabreo A, Baur W E, Weiss E, Nguyen K, et al. Endothelial progenitor cells delivered into the pericardial space incorporate into areas of ischemic myocardium[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87: 241-248.
- [6] Mohammad A, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. Endothelial progenitor cells in patients with acute cerebrovascular ischemia [J]. *Can J Neurol Sci*, 2010, 27: 797-802.
- [7] Fleitas T, Martinez-Sales V, Gomez-Codina J, Martin M, Reyes G. Circulating endothelial and endothelial progenitor cells in non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2010, 12: 521-525.
- [8] Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart J W, Fandrich F, Siebert R, et al. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia[J]. *Circ Res*, 2007, 101: 581-589.
- [9] Xue S, Zhang H T, Zhang P, Luo J, Chen Z Z, Jang X D, et al. Functional endothelial progenitor cells derived from adipose tissue show beneficial effect on cell therapy of traumatic brain injury[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 478: 186-191.
- [10] Wills T B, Heaney A M, Jane Wardrop K, Haldorson G J. Immunomagnetic isolation of canine circulating endothelial and endothelial progenitor cells[J]. *Vet Clin Pathol*, 2009, 38: 437-442.
- [11] Estes M L, Mund J A, Ingram D A, Case J. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood[J]. *Curr Protoc Cytom*, 2010, Unit 9. 33. 31-11.
- [12] Sorrentino S A, Bahlmann F H, Besler C, Muller M, Schulz S, Kirchhoff N, et al. Oxidant stress impairs *in vivo* reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone[J]. *Circulation*, 2007, 115: 163-173.
- [13] Kong D, Melo L G, Gnechchi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew C C, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries[J]. *Circulation*, 2004, 110: 2039-2046.
- [14] Hristov M, Zernecke A, Bidzhekov K, Liehn E A, Shagdarsuren E, Ludwig A, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury[J]. *Circ Res*, 2007, 101: 590-597.
- [15] Pearson J D. Endothelial progenitor cells—hype or hope[J]? *J Thromb Haemost*, 2009, 9: 255-262.
- [16] Zengin E, Chalajour F, Gehling U M, Ito W D, Treede H, Lauke H, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis[J]. *Development*, 2006, 133: 1543-1551.
- [17] Bertrand J Y, Chi N C, Santoso B, Teng S, Stainier D Y, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development[J]. *Nature*, 2010, 464: 108-111.
- [18] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, Zhu Z, Lane W J, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. *Blood*, 2000, 95: 952-958.
- [19] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
- [20] Di Stefano R, Santoni T, Barsotti M C, Armani C, Chifenti B, Guida C, et al. Different growth conditions for peripheral blood endothelial progenitors [J]. *Cardiovasc Radiat Med*, 2002, 3: 172-175.

[本文编辑] 尹 茶