

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00545

内皮前体细胞功能与临床应用

黄亚莉¹, 汪 燕¹, 陆 彤^{2*}

1. 解放军 411 医院干部病房科, 上海 200081

2. Department of Internal Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA

[摘要] 从骨髓释放的循环血内皮前体细胞(EPCs)具有内分泌、血管内皮修复和血管再生功能,对动脉粥样硬化的发生、发展起重要作用。然而,循环内皮前体细胞的数量和功能在心血管疾病患者中明显下降。这些细胞的数量和功能不仅受许多生理和病理因素的影响,包括衰老、糖尿病、高血压、高血脂等;也与个人的生活方式,如:运动、体质量、吸烟等心血管疾病危险因素密切相关。本文着重讨论循环血内皮前体细胞的功能及影响因素,并对其在心血管疾病中的临床应用前景作一展望。

[关键词] 内皮前体细胞; 心血管疾病; 危险因素; 治疗应用

[中图分类号] R 54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0545-04

Endothelial progenitor cells: functions and clinical application in cardiac and vascular diseases

HUANG Ya-li¹, WANG Yan¹, LU Tong^{2*}

1. Cader's Ward, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China

2. Department of Internal Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA

[Abstract] Circulating endothelial progenitor cells (EPCs) derived from bone marrow are capable of endocrine, reendothelialization of injured blood vessels and neovascularization of ischemic lesions; besides, they also play a major role in the pathogenesis of atherosclerosis. However, the number and functions of circulating EPCs are greatly declined in patients suffering from cardiovascular diseases. Functions of EPCs are associated with not only pathophysiological factors such as aging, hypertension, diabetes and hyperlipidemia, but also personal lifestyle such as exercise, body weight and smoking, which directly influence the development of cardiovascular diseases. In this review, we mainly focus on the relationship between EPCs and cardiovascular risk factors and the potential roles of EPC therapy for cardiovascular diseases.

[Key words] endothelial progenitor cells; cardiovascular diseases; risk factors; therapeutic uses

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):545-548]

内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)一般存在于骨髓内,但在某些特殊刺激条件下,如药物诱导、缺血损伤及运动等,均可被释放到外周血液循环中,迁移到生理或病理条件下的新血管形成位点或内皮损伤部位上,原位分化为成熟内皮细胞,促进血管新生和内皮修复^[1-2]。自源的EPCs移植是血管再生和损伤内皮修复的有效方法,对心血管疾病的发生、发展、临床治疗、预后评估有着重要的意义^[1-3]。本文就其来源、分离、鉴定、功能及与心血管危险因素的关系、生理病理意义和临床应用前景作一综述。

1 外周血循环 EPCs 的来源、分离和鉴定

动物骨髓抑制模型研究发现,参与血管新生的 EPCs 来源于骨髓的占 5%~25%,在肿瘤的血管新生中,该比例还要高,为 35%~45%^[1-2]。EPCs 也可能存在于血管壁、脂肪组织、肝脏、脾脏、肾脏和小肠。在对 EPCs 的基础研究或临床

应用中,对 EPCs 的分离、培养和鉴定尤为重要。

1.1 EPCs 分离和培养 EPCs 的分离和培养与外周静脉淋巴细胞相似。采集外周静脉血 100 ml,肝素抗凝,用配制好的生理盐水(含 1 mmol/L EDTA 和 0.5% BSA) 1:2 稀释,再置入含 Ficoll-Paque Plus 浓度重力离心管(Amersham Biosciences Corp)重力离心^[3],分选出 CD4⁺ 的单个核细胞群。然后在覆有纤维素的培养基中,用板中含有牛血清的培养基(RPMI 1640, DMEM)进行细胞培养,7~10 d 后用吹打或少量胰酶消化的方法收集贴壁梭形细胞。

1.2 EPCs 的鉴定 EPCs 具造血干细胞和成熟内皮细胞的特点,可用造血干细胞和成熟内皮细胞的细胞标志物进行确认。前者的细胞标志物包括 CD34、CD117 和 CD133;后者有 CD31、血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)和内皮钙黏分子(VE-cadherin)。初次筛选时,一般各选一种造血干细胞和成熟内皮细胞的细胞标志物,例如最常用的 CD34⁺/VEGFR-

[收稿日期] 2009-10-12 **[接受日期]** 2009-12-30

[作者简介] 黄亚莉,硕士,主任医师. E-mail: alia01127@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-56669611, E-mail: lutong1988@yahoo.com.cn

2⁺或 CD133⁺/VE-cadherin⁺等组合,先将分离的单核细胞与 CD34 抗体孵化,通过细胞培养或流式细胞技术,将 CD34⁺ 细胞分离,再将 CD34⁺ 的细胞与 VEGFR-2 抗体进行第二次孵化。CD34⁺/VEGFR-2⁺ 细胞可初步认为是 EPCs。目前对哪些细胞标志物更具特征性还有争议,例如,CD34⁺ 细胞不仅局限于干细胞,也存在于成熟内皮细胞。因此推测 CD133⁺/VEGFR-2⁺ 细胞更具 EPCs 倾向。也有学者认为,CD133⁺ 细胞多为造血干细胞,而外周循环血液中的 EPCs 逐渐失去 CD133⁺ 特征^[4]。因此,理论上细胞标志物越多越好。

外周血液循环 EPCs 的数量极少,仅为单核细胞总量的 0.01%~0.05%。通常将新近鉴定的 EPCs 培养、增殖。在新鲜分离的 EPC 培养中可观察到 2 类细胞:一种细胞是培养 3~4 d 后仍然保持梭状和条状,且增殖缓慢,培养 2 周后,细胞进入快速增长期,但在第 4 周后停止生长;另一种细胞是在培养 3~4 周后出现少数细胞株,然后生长极快,呈指数级递增,这种细胞表面光滑,呈椭圆形,紧贴培养皿(图 1)^[5-6]。习惯上,将培养 3~4 d 存活的 EPCs 称为早期生长(early-growth)EPCs,培养 2~4 周后出现的细胞株称为后期生长(out-growth)EPCs^[7]。早期生长 EPCs 与后期生长 EPCs 的血清标志不同,前者为 CD133⁺/VEGFR-2⁺,后者是 CD34⁺/VEGFR-2⁺。它们的起源可能不同,在功能学上也有区别。

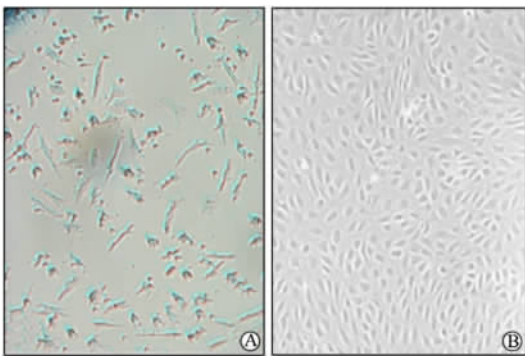


图 1 成人外周循环血液中分离的

早期生长与后期生长内皮前体细胞形态学观察

Fig 1 Morphology of early-growth and out-growth EPCs of human^[5-6]

EPCs were isolated from human peripheral blood after 4 days (A) and 4 weeks (B) culture with endothelial growth medium-2 (EGM-2, Clonetics, USA). Original magnification: ×40. The figure was adapted from papers published by He et al.^[5-6]

2 EPCs 的功能

EPCs 具有多种生物功能,其中早期生长的 EPCs 以内分泌功能为主;后期生长的 EPCs 以血管修复、再生为主。

2.1 内分泌功能 与成熟内皮细胞一样,EPCs 能分泌多种生物活性物质,并与其生物功能直接相关。这些物质包括:血管内皮生长因子(VEGF)、血小板生长因子(PDGF)、前列环素(PGI₂)、一氧化氮(NO)、血栓素-2(TXA₂)、白介素-8(IL-8)等。现已发现,EPCs 的 NO、TXA₂ 的生成较成熟内皮细胞少,但生长因子、前列环素、白介素生成较多。这些变

化直接与 EPC 中酶含量的不同有关。例如在 EPC 中,过氧化物歧化酶(SOD)、环氧酶(COXs)、过氧化物酶体增生激活受体-δ(PPAR-δ)的表达较成熟内皮细胞显著增高^[5-6]。图 2 所示为本课题组在早期生长 EPC(第 4 天)用膜片钳记录的全细胞钾离子通道。2 mmol/L 4-氨基吡啶(4-aminopyridin,4-AP)阻断 90%以上电流,由于低温度的 AA 本身无通道的激活作用,这只能提示在成人早期生长 EPC 中以电压门控型钾离子(K_v)通道为主。给予 1 μmol/L 花生四烯酸(arachidonic acid,AA)明显激活 K_v 通道电流,由于低浓度的 AA 本身无通道的激活作用,这只能提示在成人早期生长 EPC 中已含花生四烯酸的代谢酶,如脂氧合酶、前列环素合成酶、P-450 环氧酶等。

2.2 内皮修复功能 外周循环的成熟 EPCs 具趋化、黏附、迁移和整合等作用,它们能黏附到损伤的内皮细胞,并进一步分化为成熟内皮细胞^[8]。Griese 等^[9]报道,在球囊导致的颈总动脉内皮细胞损伤动物模型上,在给予自身的 EPCs 后的 4 d,就可发现这些细胞内衬于损伤的颈总动脉内皮层,其内皮修复率达 60%。He 等^[6]证实,在注射 EPCs(10⁵ 个细胞)4 周后,可明显改善去内皮颈总动脉对乙酰胆碱的舒血管反应,血管舒张功能增强。

2.3 血管再生功能 血管内皮生长因子和血小板生长因子具有很强的促进血管再生能力。在小鼠后肢缺血模型上证实,注射 EPCs 能促进血管再生、改善缺血组织的血供^[10]。在大鼠心梗模型上,缺血梗死区局部注射 CD34⁺ 细胞明显促进心肌缺血区血管再生^[11]。

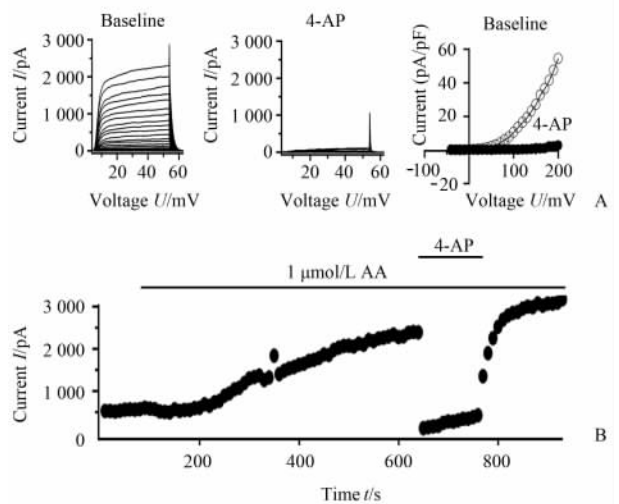


图 2 成人早期生长 EPCs 钾电流成分及花生四烯酸的激活作用

Fig 2 Activation of whole-cell K⁺ currents of human early-growth EPCs by arachidonic acid

A: Whole-cell K⁺ currents and the current-voltage relationship were obtained from human early-growth EPCs 4 days after isolation and culture with EGM-2. B: The time course of K⁺ channel activity of human early-growth EPCs was illustrated in response to 1 μmol/L AA and 2 mmol/L 4-AP (from Dr. Lu's unpublished data)

3 心血管疾病危险因素对 EPCs 的影响

心血管疾病危险因素与 EPCs 的功能、数量直接相关。冠

心病患者的外周血液循环中的 EPCs CD34⁺/KDR⁺祖细胞分别减少了 40% 和 48%, 更易衰老, 且趋化和迁移能力受损、血管再生功能减低^[12]。而给予他汀类药物治疗后, 外周血中 EPCs 数量明显增加^[13]。Huang 等^[14]报道, 在中国人患心脏 X 综合征 (cardiac syndrome X) 人群中, 外周血中 EPCs 数量明显较正常人下降。较之传统的心血管危险因素, 循环 EPCs 是血管功能的一个更好的预测指标。对年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病和血脂水平进行综合评分, 该值与血中 EPCs (CD34⁺/KDE⁺) 数量及迁移活性负相关, 可以推断 EPCs 与减少冠脉损伤有关。

3.1 年龄 EPCs 的不良功能和血管内皮的缺损也与年龄有关。在衰老动物模型上, 骨髓移植对缺血下肢的血管再生和血供恢复能力明显不如对照组^[15]。Scheubel 等^[16]报道一组行冠脉搭桥术的老年患者, 衰老引起的血管内皮生长因子减少直接导致 EPCs 数量的减少。人外周血中 EPCs 减少可能与老年人一氧化氮及血管内皮生长因子减少有关, 一氧化氮通过 PI-3-kinase/Akt 信号转导系统调节 EPCs 的生长、趋化和整合到血管壁的能力^[17]。另外, 老年人 EPCs 端粒酶 (telomerase) 减少也导致 EPCs 老化加速^[18]。

3.2 吸烟 吸烟使 EPCs 数量减少, 其原因是活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加, 一氧化氮合成减少。后者导致 EPCs 从骨髓释放减少。吸烟还使 EPCs 黏附性、趋化性及小管形成 (tube-formation) 能力减弱^[19]。因此, 吸烟是导致 EPCs 减少的独立预测因子。

3.3 运动减少 适量运动能提高 EPCs 数量、减少 EPCs 凋亡。可能与活动增加一氧化氮合成、减少活性氧生成有关。目前发现, EPCs 的超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 的表达增高, 抗氧化能力也较成熟内皮细胞强^[6]。

3.4 高血压 高血压患者的 EPCs 数量、活动能力下降。其中肾素-血管紧张素系统功能亢进及活性氧生成增加起重要作用, 临床研究转换酶抑制剂和血管紧张素 II 受体阻断剂能增加高血压患者的内皮前体细胞数量和预后^[20]。

3.5 脂代谢异常 高胆固醇、高低密度脂蛋白血症降低 EPCs 数量和功能。氧化型低密度脂蛋白还能加快 EPCs 老化, 破坏 EPCs 的黏附及趋向性和小管形成能力^[21]。其作用机制可能与减少一氧化氮生成和增加活性氧有关。高密度脂蛋白和他汀类药物能明显改善 EPCs 功能。

3.6 糖尿病、肥胖和代谢综合征 无论 I 型还是 II 型糖尿病患者的 EPCs 数量和功能都明显降低。有报道指出 EPCs 在糖尿病患者中活性不足, 直接与活性氧族生成增加有关, 导致血循环中 EPCs 的黏附和迁移能力下降^[22]。这些情况也发生在肥胖和代谢综合征患者中。目前发现, 糖毒性和脂毒性都使一氧化氮合成减少、活性氧生成增加。过氧化物酶体增生激活受体- γ (PPAR- γ) 增强组织对胰岛素的敏感性。给予 PPAR- γ 激活剂能增加糖尿病患者 EPCs 数量^[23]。

4 临床试验性应用

EPCs 在心血管疾病中的治疗潜力已被公认, 自身回输骨髓干细胞和移植 EPCs 治疗在美国已进入了临床试验阶

段。EPCs 在促进缺血组织中新血管形成和受伤血管重新内皮化过程中有很重要的作用。

4.1 心肌梗死 已有 811 例心梗患者在接受 PCI 伴支架植入手术的同时, 给予自身骨髓干细胞或 EPCs 回输治疗^[3], 虽然目前对细胞治疗心梗的疗效尚无定论, 但发现在接受自身骨髓干细胞或 EPCs 治疗的心梗患者术后 3~6 个月的随访中, 梗死区毛细血管密度增高, 通过抑制过分纤维化, 降低心肌细胞的凋亡, 使梗死面积缩小, 提高左室功能^[24-26]。Seiler 等^[27]对 21 例不宜行搭桥手术的病变广泛的冠心病患者, 每日皮下注射粒细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 10 mg/kg, 2 周后有创性侧支循环指数 (CFI) 明显增加, 心电图显示心肌缺血改善。

4.2 EPCs 涂层支架 经皮腔内血管成形术 (PTA) 后再狭窄仍是目前困扰其远期疗效的主要原因。有报道使用 CD34 抗体包被支架, 通过抗原-抗体反应从而选择性捕捉 EPCs, 增殖分化为成熟血管内皮细胞, 使受损内皮快速修复, 有效减少新生内膜增生, 使主要心脏事件发生率分别降为 30 d 的 4.2% 和 6 个月的 5.8%^[28]。

4.3 扩张型心肌病 Erbs 等^[25]首次报道用自身骨髓干细胞治疗扩张型心肌病。接受治疗的 24 例患者在术后 6 个月左室射血分数明显提高 5.4%, 3 个月心内膜活检发现心肌中毛细血管密度增加。

4.4 外周血管阻塞性疾病 目前多项临床试验已证实了 EPCs 在严重肢体缺血患者治疗中的可行性、安全性和有效性。多项临床数据显示, 给予骨髓干细胞和 EPCs 能改善肢体的功能。包括提高踝-臂血压指数 (ankle-brachial pressure index)、提高氧饱和度和血氧分压 (transcutaneous oxygen pressure)、增加无痛行走时间、增加外周血液循环、增强内皮依赖的血管扩张反应^[29-30]。

5 展望

21 世纪对心血管疾病的治疗寄希望于血管修复及血管新生疗法的临床应用, 骨髓干细胞和 EPCs 的研究应用在该领域中有至关重要的地位。但对 EPCs 的认识仍存在许多不足, 如 EPCs 的起源、分化、迁移和归宿问题目前仍无明确定论。不同时期 EPCs 的特点也在进一步认识中。在临床上应用前还需解决有些问题, 如骨髓干细胞的体内及体外定向分化、减少肿瘤样生长, 仍然是干细胞研究的关键。EPCs 目前没有统一的鉴定标准, 还缺乏完善的分离、纯化方案。将 EPC 用于组织工程或血管新生修复仍面临着伦理问题, 而且体外获得、培养 EPCs 用作临床治疗的例数仍较少, 且过程复杂、昂贵, 还需进一步深入基础研究和优化产品功效, 因此大规模临床应用仍有较长的路要走。

[参考文献]

- [1] Pacilli A, Pasquinelli G. Vascular wall resident progenitor cells: a review[J]. Exp Cell Res, 2009, 315: 901-914.
- [2] Sirker A A, Astrouklakis Z M, Hill J M. Vascular progenitor cells and translational research: the role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodeling in the adult[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116: 283-299.

- [3] Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor cells; implications for cardiovascular disease[J]. *Cytometry A*, 2009, 75: 25-37.
- [4] Hristov M, Erl W, Weber P C. Endothelial progenitor cells; isolation and characterization[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13: 201-206.
- [5] He T, Lu T, d'Uscio L V, Lam C F, Lee H C, Katusic Z S. Angiogenic function of prostacyclin biosynthesis in human endothelial progenitor cells[J]. *Circ Res*, 2008, 103: 80-88.
- [6] He T, Smith L A, Harrington S, Nath K A, Caplice N M, Katusic Z S. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries[J]. *Stroke*, 2004, 35: 2378-2384.
- [7] Hur J, Yoon C H, Kim H S, Choi J H, Kang H J, Hwang K K, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 288-293.
- [8] Umemura T, Higashi Y. Endothelial progenitor cells; therapeutic target for cardiovascular diseases[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108: 1-6.
- [9] Griese D P, Ehsan A, Melo L G, Kong D, Zhang L, Mann M J, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts; implications for cell-based vascular therapy[J]. *Circulation*, 2003, 108: 2710-2715.
- [10] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization[J]. *Nat Med*, 1999, 5: 434-438.
- [11] Kocher A A, Schuster M D, Szabolcs M J, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function[J]. *Nat Med*, 2001, 7: 430-436.
- [12] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2001, 89: E1-E7.
- [13] Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher A M, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2001, 103: 2885-2890.
- [14] Huang P H, Chen Y H, Chen Y L, Wu T C, Chen J W, Lin S J. Vascular endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X[J]. *Heart*, 2007, 93: 1064-1070.
- [15] Shimada T, Takeshita Y, Murohara T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse[J]. *Circulation*, 2004, 110: 1148-1155.
- [16] Scheubel R J, Zorn H, Silber R E, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42: 2073-2080.
- [17] Thum T, Hoerber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth D O, Galuppo P, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1[J]. *Circ Res*, 2007, 100: 434-443.
- [18] Beauséjour C. Bone marrow-derived cells; the influence of aging and cellular senescence[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(180): 67-88.
- [19] Michaud S E, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187: 423-432.
- [20] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 999-1007.
- [21] Zhou B, Ma F X, Liu P X, Fang Z H, Wang S L, Han Z B, et al. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of Ox-LDL-treated endothelial progenitor cells[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48: 518-527.
- [22] Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes[J]. *Diabetes*, 2007, 56: 666-674.
- [23] Redondo S, Hristov M, Gumbel D, Tejerina T, Weber C. Biphasic effect of pioglitazone on isolated human endothelial progenitor cells; involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and transforming growth factor-beta1 [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97: 979-987.
- [24] Liu J F, Wang B W, Hung H F, Chang H, Shyu K G. Human mesenchymal stem cells improve myocardial performance in a splenectomized rat model of chronic myocardial infarction[J]. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107: 165-174.
- [25] Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich K W, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study[J]. *Circ Res*, 2005, 97: 756-762.
- [26] Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355: 1210-1221.
- [27] Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet P A, Windecker S, et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-stimulating factor in patients with coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2001, 104: 2012-2017.
- [28] Aoki J, Serruys P W, van Beusekom H, Ong A T, McFadden E P, Sianos G, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34; the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45: 1574-1579.
- [29] Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results; the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: 2350-2351.
- [30] Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia[J]. *Circulation*, 2004, 109: 1215-1218.