

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00964

猪骨髓来源内皮祖细胞体外培养条件的优化

吴建国¹, 罗天航¹, 申晓军¹, 周虹², 薛绪潮¹, 毕建威¹, 方国恩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433
2. 第二军医大学长海医院血液科实验中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 优化选择猪骨髓来源内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)体外培养条件,为后续研究奠定基础。**方法** 从猪骨髓抽取骨髓,利用密度梯度离心法分离得到单个核细胞(MNC),体外培养分化为EPC。在其他培养条件相同的前提下,分别比较不同的细胞接种密度($2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 、 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 、 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 、 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$),不同基础培养液(EGM、M199、DMEM),不同FBS浓度(5%、10%、20%、30%),以及血管内皮细胞生长因子(VEGF)与不同细胞因子[碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、基质细胞衍生因子(SDF)、胰岛素样生长因子(IGF)和表皮生长因子(EGF)]组合(VEGF+bFGF、VEGF+SDF、VEGF+bFGF+SDF、VEGF+bFGF+IGF+EGF、VEGF+bFGF+SDF+IGF)对EPC细胞增殖及迁徙功能的影响;采用细胞形态观察、双荧光染色法及免疫细胞化学染色方法对培养的EPC进行鉴定。**结果** 猪骨髓EPC以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种在盛有M199,并添加10%FBS和VEGF+bFGF+SDF+IGF细胞因子的培养液时,细胞的增殖能力和迁徙率最高。每组细胞经结合DiI标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)和FITC标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-1)双色荧光染色鉴定双阳性率>76%,免疫细胞化学检测CD133、CD34、KDR均为阳性。**结论** 通过优化猪骨髓来源EPC的体外培养条件,可使细胞数量增多及功能增强,为后续研究奠定了基础。

[关键词] 内皮祖细胞;细胞培养技术;骨髓

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0964-06

Optimization of *in vitro* culture condition for porcine bone marrow-derived endothelial progenitor cells

WU Jian-guo¹, LUO Tian-hang¹, SHEN Xiao-jun¹, ZHOU Hong², XUE Xu-chao¹, BI Jian-wei¹, FANG Guo-en^{1*}

1. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Experimental Centre of Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To optimize the culture condition for porcine bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs), so as to lay a foundation for future study. **Methods** Bone marrow was collected from porcine ilium ($n = 5$). Mononuclear cells (MNCs) were separated by density centrifugation and were induced to differentiate into EPCs *in vitro*. The influences of different cell inoculation densities ($2 \times 10^3/\text{cm}^2$, $5 \times 10^3/\text{cm}^2$, $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, and $2 \times 10^4/\text{cm}^2$), basic medium (EGM, medium 199, and DMEM), FBS (5%, 10%, 20%, and 30%), and combinations of cytokines (vascular endothelial growth factor [VEGF]+basic fibroblast growth factor [bFGF], VEGF+stromal-derived factor [SDF], VEGF+bFGF+SDF, VEGF+bFGF+insulin-like growth factor [IGF]+epidermal growth factor [EGF], and VEGF+bFGF+SDF+IGF) on the proliferation and migration of EPCs were evaluated. EPCs were identified by morphology observation, fluorescent staining, and immunohistochemical method. **Results** EPCs with the highest proliferation and migration ability were obtained under following condition: at a density of $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ in M199 medium supplemented with 10% FBS and VEGF+bFGF+SDF+IGF. Furthermore, the percentage of double positive cells stained by DiI-ac-LDL and FITC-UEA-1 was higher than 76%, and these cells were also positively stained for CD133, CD34 and KDR immunohistochemically. **Conclusion** Optimization of *in vitro* culture condition of porcine EPCs can increase the cell amount and improve their functions, paving a way for future related studies.

[Key words] endothelial progenitor cells; cell culture techniques; bone marrow

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):964-969]

[收稿日期] 2010-03-21 **[接受日期]** 2010-06-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30672170)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672170).

[作者简介] 吴建国, 博士生。E-mail: wujianguo1030@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873339, E-mail: fanguoen@gmail.com

Asahara 等^[1]于1997年首次证明循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞,将其命名为血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)。EPC不仅参与胚胎的血管发生,也参与出生后的血管新生过程(angiogenesis)。动物实验和早期临床试验均表明EPC具有改善缺血肢体血供、促进心梗后侧支循环的形成、加快血管损伤后的内皮修复、抑制肿瘤血管生成,以及作为基因治疗导向载体等方面的作用,拥有广阔的应用前景^[2]。但无论从骨髓、外周血、胚胎肝或是脐血中分离培养出的EPC数量都十分有限,不能满足实验研究及临床应用的需。而且,迄今为止国内外尚没有统一的EPC培养优化方案。因此,本实验室在前期成功分离培养EPC的基础上,对猪骨髓来源EPC的培养扩增方法进行优化选择,探讨建立标准化的EPC培养方案,为后续临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 肝素钠、2%多聚甲醛购自上海第二化学试剂厂,淋巴细胞分离液(Ficoll 1.077 g/ml)购自美国Sigma公司,胰酶原液购自德国Berlin公司,EGM-2、M199、DMEM、FN、FBS培养液均购于美国Gibco BRL公司,细胞因子血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、基质细胞衍生因子(SDF)、胰岛素样生长因子

(IGF)、表皮生长因子(EGF)均购于英国Peprotech公司,Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购于美国Invitrogen公司,FITC标记的荆豆凝集素-I(FITC-UEA-I)购于美国Sigma公司,CD133、CD34一抗及二抗购于美国Santa Cruz公司,KDR一抗及二抗购于美国Upstate公司,改良的Boyden小室购于江苏海门麒麟医用仪器厂,Giensa染色液购于美国Sigma公司,PBS自配。

1.2 单个核细胞(MNC)的分离 5只健康实验用猪由第二军医大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(沪)2007-0003],体质量22~30 kg,平均(25.22±3.17) kg,实验前适应实验环境12~14 h,室温保持在20~25℃,术前常规禁食。无菌条件下在健康猪髂后上棘取骨髓,肝素钠1 ml抗凝处理,通过密度梯度离心法获得MNC,将分离得到的MNC计数后按 1.0×10^7 /ml密度接种入盛有5 ml培养液(EGM-2+10%FBS+VEGF 10 ng/ml)包被纤维连接蛋白(FN)的普通培养皿。培养48 h后收集未贴壁细胞,再次接种于同样条件的培养皿中。3 d换液1次,7~9 d可传代。

1.3 EPC培养扩增条件优化选择的设计 根据EPC培养扩增4个最主要的影响因素,各自制定出3~5个常见水平(表1),比较不同水平的培养结果。当比较某个因素时,其他因素不变[拟定水平1(L1)为标准条件],各因素逐个比较。

表1 EPC培养扩增条件的设计

Tab 1 Experiment design for culture conditions of EPCs

Item	Level				
	L1	L2	L3	L4	L5
Culture density (cm^{-2})	2×10^3	5×10^3	1×10^4	2×10^4	
Basic medium	EGM-2	M199	DMEM		
FBS concentration (%)	5	10	20	30	
Cytokines	VEGF+bFGF	VEGF+SDF	VEGF+bFGF+SDF	VEGF+bFGF+IGF+EGF	VEGF+bFGF+SDF+IGF

VEGF(vascular endothelial growth factor): 10 ng/ml; bFGF(basic fibroblast growth factor): 50 ng/ml; SDF(stromal-derived factor): 100 ng/ml; IGF(insulin-like growth factor): 50 ng/ml; EGF(epidermal growth factor): 20 ng/ml

1.4 不同条件下EPC的培养 将P1代细胞按照不同的培养条件接种入包被FN的24孔培养皿中,每3 d传代1次。细胞密度分别为 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 、 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 、 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 和 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 、基础培养基(EGM-2、M199、DMEM),FBS(5%、10%、20%、30%)和细胞因子组合VEGF(10 ng/ml)+bFGF(50 ng/ml),VEGF+SDF(100 ng/ml),VEGF+bFGF+SDF,VEGF+bFGF+IGF(50 ng/ml)+EGF(20 ng/ml),VEGF+bFGF+

SDF+IGF。

1.5 培养细胞的双荧光染色鉴定 消化培养的P1代细胞,取细胞悬液离心(4℃,300×g,6 min),离心后去上清液,加入5 ml培养液稀释并计数;在细胞悬液中加入12.5 pg(2.5 pg/ml)的Dil-ac-LDL 37℃孵育1 h,然后用2%多聚甲醛固定细胞10 min,PBS洗涤2次,每次3 min;加入50 μg(10 μg/ml)的FITC-UEA-1,37℃孵育1 h后用激光共聚焦显微镜观察。Dil-ac-LDL和FITC-UEA-1双染色

阳性细胞被认为是正在分化的 EPC,并用倒置荧光显微镜对每孔细胞计数(随机选择 15 个×200 的视野)。

1.6 培养细胞的免疫细胞化学染色鉴定 P1 代细胞铺满玻璃切片后,取出玻璃切片;PBS 洗涤 3 min×3;10%中性甲醛固定 10 min,再用 PBS 洗涤 3 min×3;在盖玻片表面滴加 Tryting-100 各 100 μl,避光保存 30 min,将玻片去酯化;再用 PBS 洗涤 3 min×3;滴加 CD133、CD34、KDR 的一抗各 50 μl,避光保存 30 min;再用 PBS 洗涤 3 min×3;滴加相应的二抗,避光保存 30 min;再用 PBS 洗涤 3 min×3;经梯度乙醇脱水干燥,并用中性树胶封片。

1.7 EPC 细胞迁徙功能、增殖能力的测定 迁徙功能:将 25 μl M199 培养液和 VEGF 50 ng 加入改良的 Boyden 小室的下室,盖过滤膜(滤膜光泽面朝下),再盖上趋化小室的上室,将 1×10⁵ 个 EPC 加入 100 μl 培养液制成细胞悬液(1×10⁵/100 μl)注入上室,在 37℃ 5%CO₂ 培养箱孵育 24 h,将穿过滤膜迁移到 Boyden 小室下层的细胞(刮去滤膜上面的未移

动细胞)用甲醇固定后 Giemsa 染色,随机选择 3 个显微镜视野(×200)行细胞计数,得出迁徙率。增殖能力:将每组细胞按 1×10⁴/孔的密度接种于标准 24 孔培养皿(1 ml 培养液/孔)内进行培养,共培养 8 d,每天均消化后计数,最后计算出 8 d 的细胞总数,并绘制出细胞增殖曲线。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件,计量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 EPC 形态特征观察 结果表明:培养 1 d 后,细胞圆形,不贴壁(图 1A);5 d 后,细胞贴壁明显增多,有集落形成(图 1B);7 d 后梭形细胞继续增多,呈特异性索条状结构;9 d 左右细胞基本铺满皿底即可消化传代,获得 P1 代 EPC。P2 代及以后的 EPC 培养 2~3 d 后,细胞呈放射状条索样结构,可基本铺满皿底(图 1C)。各培养条件下细胞的形态特征差异不明显。

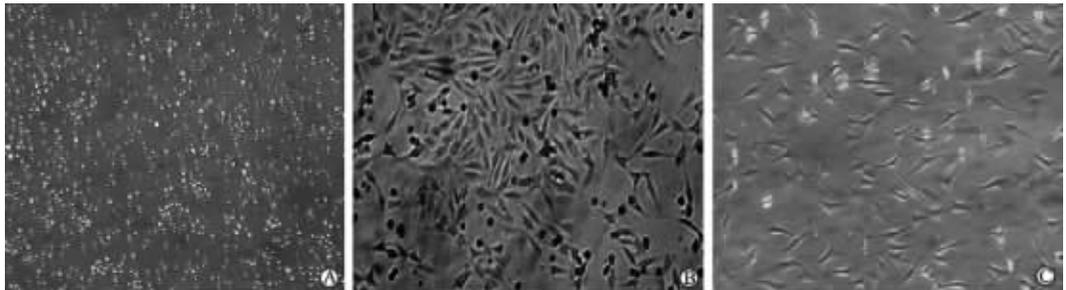


图 1 EPC 形态特征观察结果

Fig 1 Observation of morphology of EPCs

A: After 1 d culture the cells were round and non-adherent; B: After 5 d culture outgrowth colonies were formed; C: After 2 d culture the attached spindle cells (P4) nearly reached confluence. Original magnification: ×100

2.2 双荧光染色及免疫细胞化学染色鉴定结果 双荧光染色:通过共聚焦显微镜鉴定细胞对 Dil-ac-LDL 摄取的阳性细胞呈红色,能结合凝集素阳性细胞呈绿色,两者均摄取的双染色阳性细胞呈黄绿色,即是正在分化的 EPC(图 2)。各组细胞均显示双染色阳性,阳性率达 76% 以上。免疫细胞化学(图 3):胞质染成棕褐色,内有大量的颗粒状阳性信号表达,苏木精衬染的细胞核呈蓝色;每组细胞 CD133、CD34、KDR 均呈阳性表达。

2.3 EPC 迁徙功能的测定结果 结果(图 4)表明:各组细胞均具有一定的迁徙功能,但迁徙率各不相

同,其中接种密度以 1×10⁴/cm²、基础培养液以 M199、FBS 浓度以 10%、细胞因子组合以 VEGF+bFGF+SDF+IGF 时迁徙率最高,且组间差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 EPC 增殖功能的测定结果 通过对各因素不同水平细胞增殖情况观察,培养条件较好细胞增殖情况良好,达增殖高峰时间较快,增殖细胞数较多。经比较发现,接种密度中以 1×10⁴/cm²、基础培养液中以 M199、FBS 浓度以 10%、细胞因子组合以 VEGF+bFGF+SDF+IGF,其细胞增殖高峰最高(图 5)。

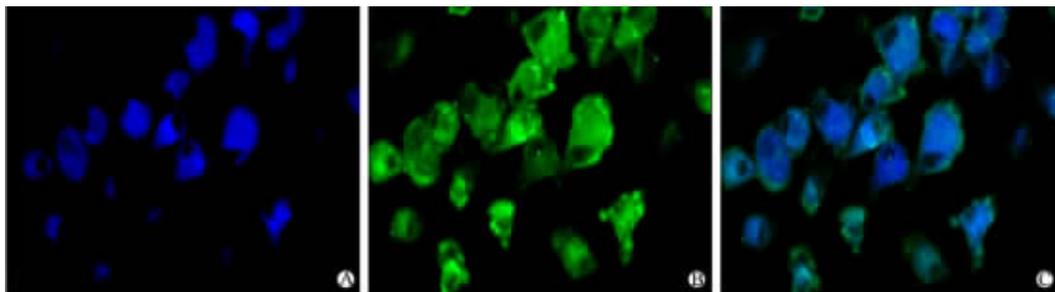


图 2 双荧光染色鉴定结果

Fig 2 Results of double fluorescence staining

Positive cells were stained red by Dil-ac-LDL(A) and green by FITC-UEA-1(B). Double-positive cells were stained yellow by both(C). Original magnification: $\times 100$

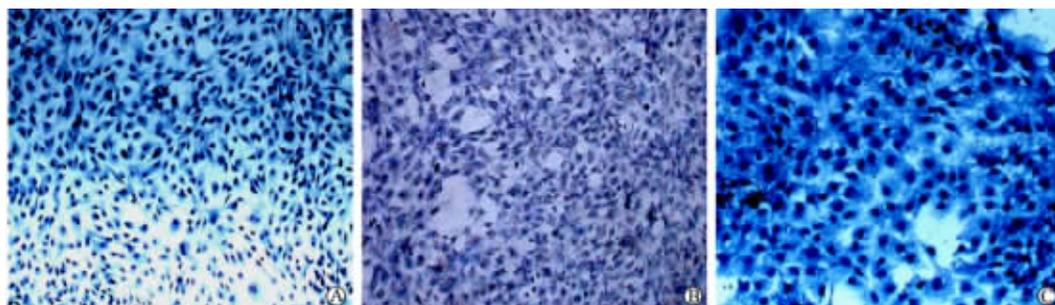


图 3 免疫细胞化学染色观察 EPC 细胞 CD133(A)、CD34(B)、KDR(C) 的表达

Fig 3 Immunohistochemistry observation of CD133(A), CD34(B), and KDR(C) expression in EPCs (Giemsa staining)

Original magnification: $\times 100$

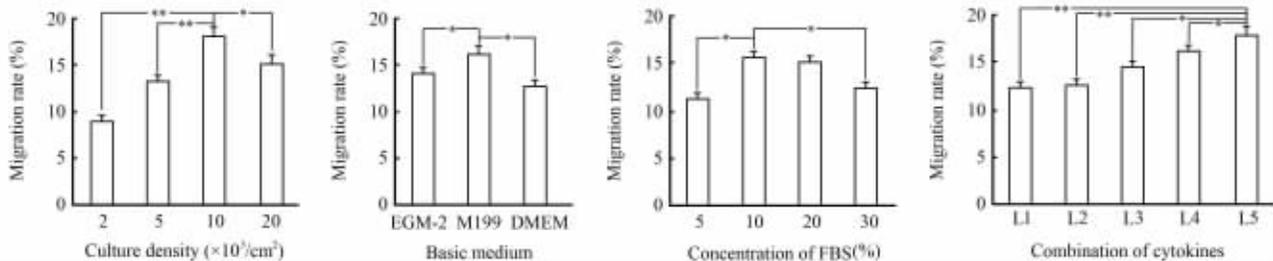


图 4 不同条件下 EPC 迁徙功能的测定结果

Fig 4 Migration abilities of EPCs under different conditions

L1: VEGF+bFGF; L2: VEGF+SDF; L3: VEGF+bFGF+SDF; L4: VEGF+bFGF+IGF+EGF; L5: VEGF+bFGF+SDF+IGF. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

虽然已成功从(人、猪、鼠、兔等)骨髓、外周血、脐血和胚胎肝中分离培养出 EPC, 并广泛用于各类实验, 但是无论何种来源其 EPC 数量均十分有限; 体外扩增培养的方法又尚未统一, 效率较低^[3]。而且, 回输 EPC 要达到生成血管及修复损伤的作用所需细胞量较大^[4]。因此, 本研究对 EPC 的培养条件进行比较优化, 尝试探讨可增加细胞数量, 增强细胞

功能的优化培养条件。细胞在体外失去了神经体液的调节和细胞间的相互影响, 容易导致细胞功能下降或衰退死亡。只有将培养条件优化, 才能给予细胞在体外最佳的生长环境, 使得细胞功能增强及数量增加。影响 EPC 体外培养的条件非常多, 由于时间、实验经费及因素间的交互作用等问题很难对每个因素进行一一分析。因此, 本研究根据文献^[5-7]报道及预实验的情况, 筛选出其中最主要的 4 种影响因素(接种密度、基础培养液、FBS、细胞因子)。

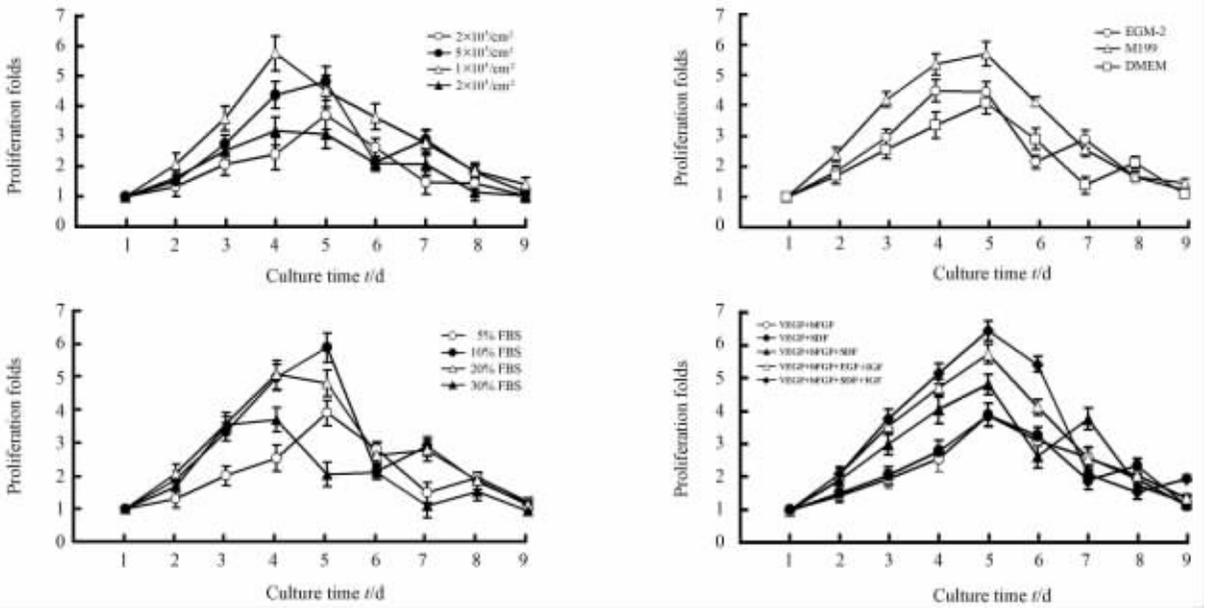


图 5 不同条件下 EPC 增殖功能的测定结果

Fig 5 Proliferation ability of EPCs under different conditions

n=24, x±s

细胞接种密度是细胞培养必须考虑的问题。接种密度的多少直接影响到细胞的生长情况,如细胞接种密度过低,细胞间相互的联系较少,可能导致相互间促进生长因子的分泌减少,细胞增殖减慢;如细胞接种密度过高,可能引起细胞营养不够,生长受阻或很快凋亡。故合适的细胞接种密度对细胞的生长十分重要。根据预实验情况,结合文献[6,8-10]资料,我们挑选了4种国内外实验室常用的接种密度($2 \times 10^3/cm^2$ 、 $5 \times 10^3/cm^2$ 、 $1 \times 10^4/cm^2$ 、 $2 \times 10^4/cm^2$)进行比较,发现以 $1 \times 10^4/cm^2$ 的密度接种细胞的增殖最快,功能最好,故为 EPC 的最佳接种密度。此密度培养应该不仅使细胞之间旁分泌增强,而且也未影响到各自细胞所要获取的营养,促使细胞更稳定、快速的生长,与预实验结果一致。

体外培养的细胞均需要通过培养液获取一定的营养环境,用于维持细胞生长。EPC 对培养液的要求较高,必须用特殊配方培养液进行体外培养。王辉等^[11]认为最佳的内皮祖细胞诱导分化条件为添加胎牛血清、血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的 M199 培养液。Gastens 等^[12]将分离的 EPC 在添加特殊生长因子(VEGF、bFGF、EGF、IGF 等)的 EGM-2 培养液中培养效果较佳。基础培养液是最基本的细胞培养媒介,基础培养液选择不当可能会引起细胞增殖能力及功能下降,故对其的选择相当重要。目前最常用的3种培养液是 M199、EGM-2、DMEM^[11-14],本研究对这3种培养液进行对

比,经分析认为 M199 是 EPC 体外培养最适合的基础培养液。动物血清也是细胞培养液中不可或缺的一种成分。绝大多数学者认为胎牛血清是 EPC 培养液中效果最好的血清类添加剂,但其浓度尚没有统一的标准。如血清浓度过低,细胞得不到充分的营养,细胞生长抑制。如血清浓度过高,不但不能促进细胞增殖,反而使培养的费用增加。胎牛血清浓度一般为 5%、10%,少数文献^[12,15]也有报道添加 20%、30% 的 FBS。本实验对以上 4 种浓度行比较分析,添加 10%FBS 时细胞的增值数量最多,功能最强;虽然 20%FBS 时细胞数量和功能与 10%FBS 比较差异无统计学意义,但是 20%FBS 时细胞培养成本较高。因此,10%FBS 是最佳选择。M199+10%FBS 可能比较接近 EPC 体内的生长环境,适合 EPC 增殖,与 Shi 等^[16]的研究结果基本一致。

在体外培养时添加各种生长因子对于促进细胞的生长及维持细胞功能具有十分重要的作用。在培养液中添加不同种类的细胞生长因子也是 EPC 体外培养所必须的。单一的细胞因子往往不能满足细胞培养的需要,导致细胞生长缓慢,甚至凋亡。联合 2 种或 2 种以上细胞因子,可明显促进细胞的分化和增殖。VEGF 是 EPC 培养中必不可少的细胞因子,与 SDF、bFGF、EGF、IGF 联合运用可能会促进细胞生长,提高培养效率。Tongers 等^[17]运用 VEGF 成功培养扩增得到 EPC; Casamassimi 等^[18]添加 VEGF+bFGF+EGF 使 EPC 的生长状态良好。本

实验通过对大量国内外文献的筛选,找出4种最常见的细胞因子组合(VEGF+bFGF、VEGF+SDF、VEGF+bFGF+SDF、VEGF+bFGF+IGF+EGF、VEGF+bFGF+SDF+IGF),经比较VEGF+bFGF+SDF+IGF是最优化的细胞因子组合。添加这4种生长因子能更好地促进EPC的定向增殖,保持细胞功能,是体外培养EPC的最佳选择。

本研究对骨髓来源的EPC体外扩增的培养条件进行了优化,获得的EPC数量及功能较前明显提高。完全可以通过这种优化方案建立内皮祖细胞系,为短时间内获取发挥治疗作用所需要的相当数量的EPC提供可能,使其程序和步骤简化,还可以节约实验费用。虽然本实验只对影响EPC培养的4个最主要的因素进行研究,且每个因素也只挑选3~5个水平,均未必全面;但本研究通过合理实验设计,在不影响整体实验结果的前提下,既减少了实验次数,节约了实验成本,又保证了实验结果的可靠有效。

总之,本研究证实以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种在添加有10%FBS和VEGF+bFGF+SDF+IGF的M199培养液中,在体外培养扩增获得的EPC数量最多,功能最强。因此,从骨髓分离得到的MNC通过本优化方案的体外扩增,可获取大量功能良好的EPC,明显提高了细胞培养的效率,为大量EPC回输治疗缺血性疾病奠定了基础,为EPC的进一步实验研究和临床运用提供了技术平台。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Bompais H, Chagraoui J, Canon X, Crisan M, Liu X H, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells[J]. *Blood*, 2004, 103: 2577-2584.

[3] Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review[J]. *Leuk Res*, 2007, 31: 439-444.

[4] Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Baragli A, Rosso A, Granata R, et al. Unacylated ghrelin rescues endothelial progenitor cell function in individuals with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2010, 59: 1016-1025.

[5] Ben-Shoshan J, George J. Endothelial progenitor cells as therapeutic vectors in cardiovascular disorders: from experimental models to human trials[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 115: 25-36.

[6] Brunt K R, Hall S R, Ward C A, Melo L G. Endothelial progenitor cell and mesenchymal stem cell isolation, characterization,

viral transduction[J]. *Methods Mol Med*, 2007, 139: 197-210.

[7] Neumüller J, Neumüller-Guber S E, Lipovac M, Mosgoeller W, Vetterlein M, Pavelka M, et al. Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells[J]. *Histochem Cell Biol*, 2006, 126: 649-664.

[8] Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D, Le Bousse-Kerdiles M C, et al. A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage[J]. *Stem Cells*, 2009, 27: 1750-1759.

[9] Hristov M, Erl W, Linder S, Weber P C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro* [J]. *Blood*, 2004, 104: 2761-2766.

[10] Sharpe E E 3rd, Teleron A A, Li B, Price J, Sands M S, Alford K, et al. The origin and *in vivo* significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168: 1710-1721.

[11] 王辉, 王岭, 李开宗, 凌瑞, 孙宝华, 马福成, 等. 人外周血内皮祖细胞的培养与鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2006, 10: 47-49.

[12] Gastens M H, Goltry K, Prohaska W, Tschöpe D, Stratmann B, Lammers D, et al. Good manufacturing practice-compliant expansion of marrow-derived stem and progenitor cells for cell therapy[J]. *Cell Transplant*, 2007, 16: 685-696.

[13] Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin K M, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58: 478-486.

[14] Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura H, Hanada S, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 521-531.

[15] Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D, et al. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1678-1685.

[16] Shi Y, Song M, Guo R, Wang H, Gao P, Shi W, et al. Knockdown of stromal interaction molecule 1 attenuates hepatocyte growth factor-induced endothelial progenitor cell proliferation [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235: 317-325.

[17] Tongers J, Losordo D W. Frontiers in nephrology: the evolving therapeutic applications of endothelial progenitor cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 2843-2852.

[18] Casamassimi A, Balestrieri M L, Fiorito C, Schiano C, Maione C, Rossiello R, et al. Comparison between total endothelial progenitor cell isolation *versus* enriched Cd133⁺ culture[J]. *J Biochem*, 2007, 141: 503-511.