

## 自体内皮祖细胞促进组织工程骨血管化的体内外实验研究\*

吴莉<sup>1</sup>, 赵娴<sup>2</sup>, 柯腾飞<sup>1</sup>, 陈泽谷<sup>3</sup>, 陆林<sup>1</sup>, 魏韩笑<sup>2</sup>, 张承磊<sup>4</sup>, 刘流<sup>2△</sup>

(1. 昆明医科大学第一附属医院医学影像科 650032; 2. 昆明医科大学第一附属医院整形外科 650032; 3. 中南大学湘雅医学院附属海口医院放射科, 海口 570208; 4. 昆明医科大学第一附属医院血管外科 650032)

**[摘要]** 目的 探讨自体内皮祖细胞(EPCs)在体内、外促进组织工程骨血管化的能力。方法 将兔自体外周血 EPCs 及骨髓间充质干细胞(BMSCs)按联合培养时细胞增殖率最大时配比(EPCs: BMSCs=1: 2)体外培养(联合培养组), 在体外采用实时定量 PCR 方法检测成骨相关细胞因子 Osteonectin、Osteopontin、Col-1 及成血管相关细胞因子血管内皮生长因子(VEGF)表达, 于培养 3、7、14 d 观察表达量的变化并与单纯 EPCs 及 BMSCs 组比较; 将单纯 EPCs、BMSCs 及联合培养组的组织工程骨移植到兔四肢肌袋内, 于移植后 2、4、8 周观察组织工程骨生长情况, 同时制成组织切片行 CD34、CD105、ZO-1 免疫组织化学染色, 采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件, 测量光密度值, 比较 3 组工程骨表达量变化。结果 3、7、14 d Osteonectin、Osteopontin、Col-1、VEGF 各组表达均逐渐增高, 其中联合培养组增高最明显, 且各时间点表达量最高( $P < 0.01$ ); 2、4、8 周兔四肢肌袋内的组织工程中联合培养组细胞复合的工程骨随时间延长成骨增加最明显, 新生血管长入最多, 免疫组织化学显示 CD34、CD105、ZO-1 表达最明显( $P < 0.01$ )。结论 自体 EPCs 与 BMSCs 相互作用, 在体内、体外均可促进组织工程骨血管化。

**[关键词]** 干细胞; 内皮, 血管; 间充质干细胞; 新生血管化, 生理性; 组织工程骨**[中图分类号]** R318.08**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)02-0159-05**Autologous endothelial progenitor cells promote the neovascularization of tissue engineering bone in vitro and vivo\***Wu Li<sup>1</sup>, Zhao Xian<sup>2</sup>, Ke Tengfei<sup>1</sup>, Chen Zeguo<sup>3</sup>, Lu Lin<sup>1</sup>, Wei Hanxiao<sup>2</sup>, Zhang Chenglei<sup>4</sup>, Liu Liu<sup>2△</sup>

(1. Department of Medical Imaging, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 2. Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 3. Department of Radiology, the Affiliated Haikou Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, China; 4. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** Investigate the ability of autologous endothelial progenitor cells (EPCs) in promoting the neovascularization of tissue engineering bone in vitro and vivo. **Methods** Co-culture EPCs derived from autologous peripheral blood and mesenchymal stem cells derived from bone marrow (BMSCs) at the best proportion of 1: 2 which was the largest cell proliferation rate in vitro, osteogenesis related cytokines Osteonectin, Osteopontin, Collagen Type 1 (Col-1) and angiogenesis related cytokine VEGF in vitro by using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), and compared with pure EPCs and BMSCs groups at 3rd, 7th and 14th day; the tissue engineering bone seeded with EPCs, BMSCs and co-culture cells (EPCs: BMSCs=1: 2) were transplanted into rabbit limbs muscle, the growing states of tissue engineering bone were observed at 2, 4 and 8 weeks after transplantation, at the same time the expression of CD34, CD105 and ZO-1 were detected with immunohistochemistry staining. **Results** The mRNA expression of Osteonectin, Osteopontin, Col-1 and VEGF were gradually increased when detected at 3rd, 7th and 14th day with real-time PCR, and the co-culture cells group increased most obviously in the three groups in vitro at the same period time ( $P < 0.01$ ); The microvascularization of the engineering biological bone were observed in vivo with immunohistochemistry, and neovascularization of co-culture cells group was also the most obvious group in three groups, immunohistochemical showed that CD34, CD105 and ZO-1 was also higher than the other two groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Autologous EPCs interact with BMSCs could promote vascularization of tissue engineering bone both in vivo and in vitro.

**[Key words]** stem cells; endothelium, vascular; bone marrow mesenchymal stem cells; neovascularization, physiologic; tissue engineered bone

近些年来组织工程技术研究在骨缺损修复中显示出巨大的潜力, 组织工程骨移植入体内, 骨的血管化、成骨破骨细胞再生、骨端融合是移植骨成活的 3 个重要环节, 其中血管化是前提, 是组织工程骨内复合的干细胞存活、增殖、转化为成骨组织

替代支架的决定因素。目前组织工程骨的血管化不足、缺乏功能性血管已成为其发展进入临床应用的障碍<sup>[1]</sup>。国内外学者采用多种方法加快组织工程骨内部血管网的形成使新生血管或血管网与宿主血管沟通, 如改善或改造支架结构、成分,

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
Osteonectin	5'-CTCCAGCTGGACTACATCG-3'	5'-CTCCATGGGGATGAGTGGT-3'
Osteopotin	5'-GCTCAGCACCTGAATGTACC-3'	5'-CTTCGGCTCGATGGCTAGC-3'
Col I	5'-TCAACGGTGTCTCTGGTGAAG-3'	5'-GGACCTGGCTACCCTGAGAA-3'
VEGF	5'-GAAGAAGGAGACAATAAACCC-3'	5'-ACCAGAGGCACGCAGAA-3'

干细胞移植时加入血管生成因子及将内皮细胞与成骨细胞共同培养等方法<sup>[2]</sup>,但均不能生成保证细胞存活的足够密度的微血管网。

研究报道,内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)不仅可以促进新生血管生成,还可促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)成骨<sup>[3]</sup>。因此本研究将自体来源的EPCs与骨髓MSCs(BMSCs)直接共培养形成共培养体系,体外与单纯培养的EPCs与BMSCs两组细胞比较成血管相关细胞因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)及成骨细胞因子(Osteonectin,Osteopotin,Col-1)的表达差异;将上述3组细胞复合到包被纤维粘连蛋白的部分脱蛋白生物骨(partially deproteinised bone,PDPB)上于兔四肢肌袋内培养,不同时间大体观察及免疫组织化学检测成骨及微血管化能力的差异,了解EPCs在BMSCs成骨中的促进作用。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验仪器** 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养箱购自 Thermo Scientific 公司,低温离心机购自北京医用离心机厂,RT-PCR 仪购自 Bio-Rad 公司,倒置相差显微镜购自 Olympus 公司;L-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶、Trizol 购自 Takara 公司,PDPB 由本实验组自制<sup>[4]</sup>,自体外周血 EPCs 及 BMSCs 由本实验组自行分离培养鉴定后冻存,本次实验为采用复苏后第三代细胞,兔 CD34、CD105、ZO-1 一抗购自北京博奥森公司,逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程有限公司,引物设计由宝生物工程有限公司完成,Loading Buffer、DNA 分子标记物购自 Fermentas 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 外周血 EPCs 促进 BMSCs 成骨细胞因子及成血管能力的体外检测** 取本实验组分离培养鉴定后<sup>[5]</sup>冻存的自体第 3 代 EPCs 及 BMSCs 复苏后培养 3 d,将单纯 EPCs(EPCs 组)、BMSCs(BMSCs 组)及共培养细胞(EPCs:BMSCs=1:2,联合培养组)<sup>[5]</sup>3 组细胞种植于 9 块 6 孔板,每孔加 1.5 mL 含 15% FBS 的 L-DMEM 培养基,置培养箱培养,每 3 天换 1 次液。第 3、7、14 天分别取 3 块板,Trizol 法进行总 RNA 的提

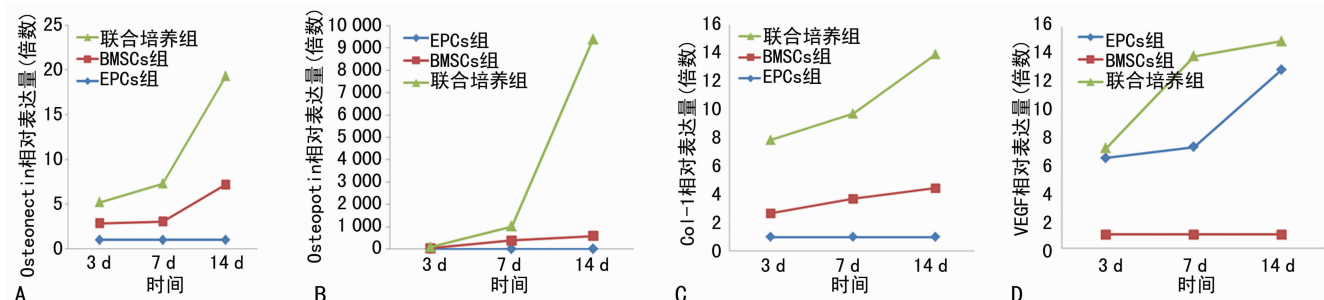
取,将总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应,引物见表 1,以上步骤按试剂盒说明书进行操作。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 Osteonectin、Osteopotin、Col-1、VEGF 的相对表达量,以实验组与对照组表达量差异倍数=实验组  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ /对照组  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

**1.2.2 复合 3 组种子细胞的组织工程骨体内实验** 取本实验组冻存的自体第 3 代 EPCs 及 BMSCs 复苏,将 3 组细胞复合在 4 °C 冰箱储存的包被纤维粘连蛋白大小为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 的 PDPB 上;将 PDPB 置于装有 DMEM 的培养皿中预湿后加入 3 组细胞,细胞浓度均为  $0.5 \times 10^6$  /mL,总量为 20  $\mu$ L,培养箱内培养 4 h,后置 96 孔板中,加完全培养基至总量为 100  $\mu$ L 后培养箱中培养,隔天换液,第 4 天将复合 3 组细胞的组织工程骨异位移植到兔四肢肌袋内(移植兔即为复苏的第 3 代 EPCs 及 BMSCs 的宿主,从而确保了自体移植),分别于 2、4、8 周观察工程骨与周围软组织的变化。各时间点每组取 3 块工程骨制作成切片,每块组织取中心部分连续切片 3 张,免疫组织化学染色 CD34、CD105、ZO-1,每张切片随机拍 3 个视野,用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件,得到阳性细胞平均光密度值,比较各组工程骨内随时间变化 CD34、CD105、ZO-1 表达量变化。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用两独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 体外 3、7、14 d Osteonectin、Osteopotin、Col-1、VEGF 表达变化** 采用实时荧光半定量分析,计算 Osteopotin、Osteonectin、Col-1 的表达量,此时以 EPCs 组为对照组,联合培养组及 BMSCs 组为实验组,结果显示随着时间延长 Osteopotin、Osteonectin、Col-1 3 个指标相对表达量逐渐增加,各时间点以联合培养组增加最明显,14 d 为最高;计算 VEGF 时以 BMSCs 组为对照组,EPCs 组及联合培养组为实验组,结果显示 VEGF 随时间延长,各时间点相对表达量值明显增大,以联合培养组最明显,14 d 为最高。见图 1。



A:Osteonectin ;B:Osteopotin ;C:Col-1 ;D:VEGF;用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算相对表达量,以实验组/对照组相对比值为计算倍数。

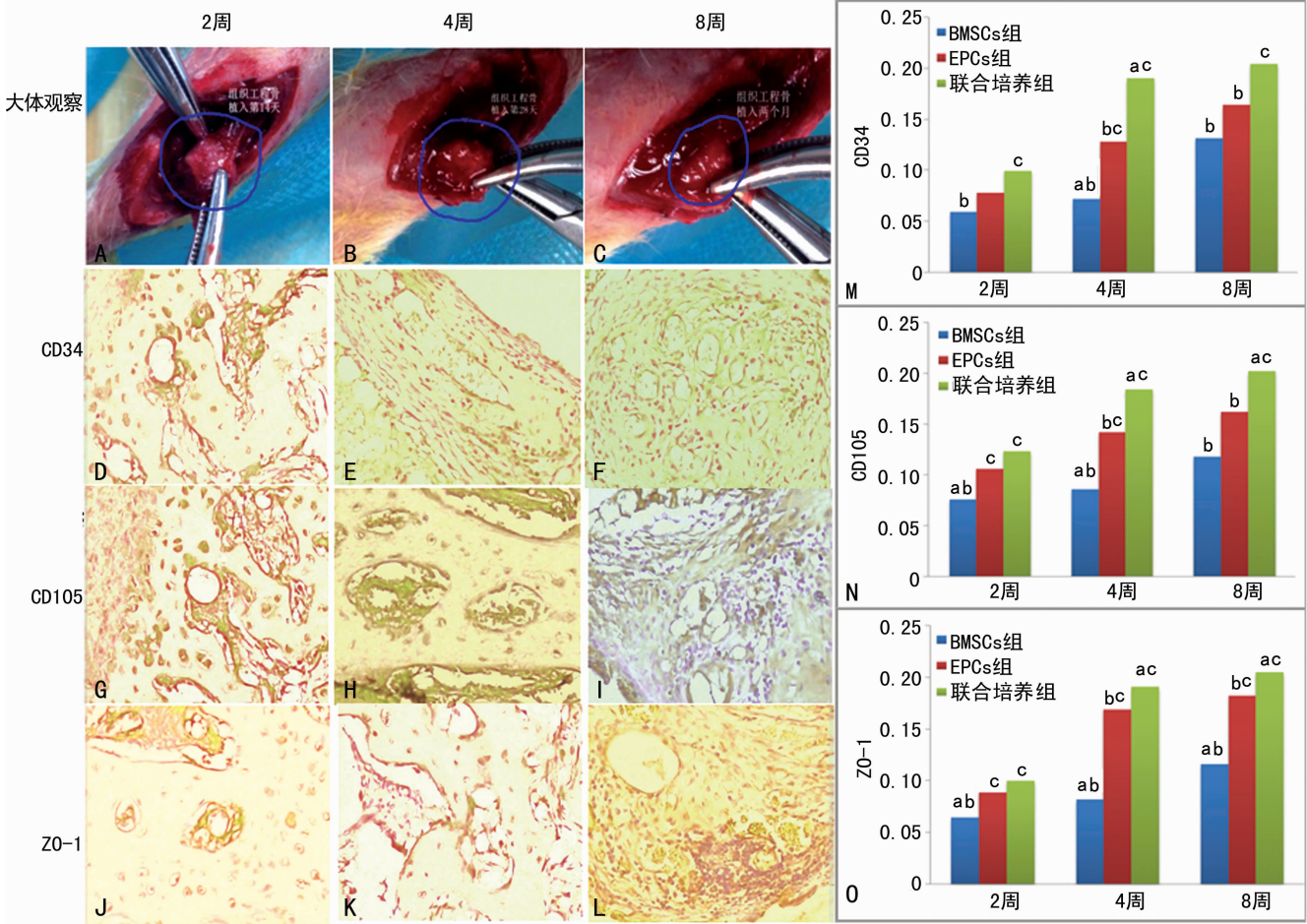
图 1 体外 3、7、14 d Osteonectin、Osteopotin、Col-1、VEGF 表达变化 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ , 倍数)

**2.2 第 2、4、8 周组织工程骨异位移植大体观察及免疫组织化学染色检测 CD34、CD105、ZO-1 表达情况**

**2.2.1 第 2、4、8 周异位移植骨大体观察情况** 第 2 周见肌袋边缘软组织包裹组织工程骨,与工程骨局部相连,但组织工程骨边缘锐利,切面可见明显工程骨孔隙;第 4 周包绕工程骨软组织增多,工程骨表面变红软组织增厚,边缘变钝,部分切面孔隙内见鲜红软组织填充;第 8 周软组织进一步包裹工程骨,与其分界不清,工程骨边缘圆润,切面大部分孔隙由鲜红软组织填充,以上现象联合培养细胞组最明显(图 2A~C),其次为 BMSCs 组。

**2.2.2 第 2、4、8 周 CD34、CD105、ZO-1 表达情况** 随着时间

延长,组织内表达 CD34、CD105、ZO-1 的阳性细胞均增多,第 2 周 EPCs 及联合培养细胞组见少量阳性细胞,BMSCs 组未见阳性细胞;第 4 周逐渐围成管腔形成新生血管,少量管腔内可见红细胞;第 8 周,见明显新生血管管腔且部分与宿主血管沟通。见图 2D~L。采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件测量阳性细胞光密度值,第 2、4、8 周 3 组间用单因素方差分析进行比较: $F_{2周} = 5.537, P_{2周} = 0.008, F_{4周} = 24.167, P_{4周} = 0.000, F_{8周} = 6.541, P_{8周} = 0.004$ ,均  $P < 0.01$ ,第 2、4、8 周各组间差异均有统计学意义,其中联合培养组阳性细胞光密度值在各时间点最高,进一步两两比较见图 2M~O。



A~C:联合培养细胞组生长大体观察;D~F:联合培养细胞组 CD34( $\times 200$ );G~I:联合培养细胞组 CD105( $\times 200$ );J~L:联合培养细胞组 ZO-1( $\times 200$ );M~O:联合培养细胞组第 2、4、8 周 CD34、CD105、ZO-1 表达分析图;\*, $P < 0.05$ ,与 EPCs 组比较;\*, $P < 0.05$ ,与联合培养组比较;\*, $P < 0.05$ ,与 BMSCs 组比较。

**图 2 2、4、8 周组织工程骨异位移植联合培养细胞组大体观察及免疫组织化学 CD34、CD105、ZO-1 表达情况**

**3 讨 论**

组织工程骨重建是个复杂的过程,不仅涉及骨生成,还涉及血管生成。组织工程骨技术中种子细胞复合到可降解的生物载体上及时形成功能性血管才能保证种子细胞的存活<sup>[1]</sup>。在细胞和分子水平了解骨和血管生成机制及其相互关系和作用,有助于组织工程骨的存活及与宿主骨的整合,从而修复骨缺损<sup>[6]</sup>。BMSCs 有高度自我更新及多向分化潜能,在体内、体外不同的微环境下均可诱导分化为成骨细胞、成软骨细胞和破骨细胞,又由于其独特的免疫调节作用,取材容易,不涉及伦理

道德等特点,是组织工程应用最多的种子细胞<sup>[7]</sup>。但只使用一种细胞作为种子细胞诱导成骨有一定的局限性,很多时候复合在组织工程支架内的细胞即使同时移植了成骨所需因子,由于未形成与宿主的有效血液循环,没有营养物质供应,在植入后很短时间就会死亡<sup>[2]</sup>,组织工程支架上的种子细胞只有在有氧代谢、细胞灌注充足,保证合理的营养物质供应和代谢产物的排出才能存活<sup>[8-9]</sup>。研究显示移植复合一种种子细胞的支架结构后,周围宿主血管内营养物质的扩散深度仅约 150  $\mu\text{m}/\text{h}$ <sup>[10]</sup>,尤其对于体积较大的工程骨,营养物质无法很快进

入支架内部,从而使中心复合的干细胞坏死,无法成骨。研究者曾采用人脐静脉内皮细胞、内皮细胞与间充质细胞联合移植促进组织工程骨的血管化,但由于上述两种细胞分化能力较差,会出现明显的移植后凋亡,因此并未被广泛应用。EPCs 是内皮细胞的前体细胞,与造血干细胞表达相同表面标志物,存在于脐带血、骨髓及外周血中,骨髓是其最主要的来源,在前炎症因子等的刺激下,可迁移到外周血及组织中,分泌 VEGF,其与 EPCs 上的 VEGF 受体特异性结合,活化受体细胞内段偶联的络氨酸激酶,催化下游的信号蛋白从而促使 EPCs 增殖并定向向内皮细胞分化<sup>[11]</sup>,促进新生血管管腔形成,在新生血管生成中起重要作用<sup>[12]</sup>。有研究将 VEGF165 基因通过腺病毒载体转染至内皮祖细胞,不仅提高了内皮祖细胞分泌 VEGF 效率,同时也提高了 EPCs 自身增殖能力<sup>[13]</sup>,从而表明 VEGF 是 EPCs 促进血管生成中最重要的因子。有研究证明<sup>[14]</sup>粒细胞集落刺激因子(G-CSF)可动员外周血 EPCs 细胞,提高 VEGF 和基质细胞衍生因子 1(SDF-1)的表达,增强 EPCs 增殖能力和归巢能力。

BMSCs 通过旁分泌分泌多种可溶性细胞因子如 VEGF、G-CSF、骨形成蛋白-2(bone morphogenetic proteins-2, BMP-2)等参与 EPCs 促进新生血管管腔形成过程,VEGF 及 G-CSF 可被 EPCs 利用,进一步促进 EPCs 新生血管及形成血管管腔<sup>[15]</sup>。有报道显示<sup>[16]</sup> BMSCs 与 EPCs 通过直接接触和旁分泌信号表达相互作用,促进血管和骨的形成:直接接触改变共培养环境,上调黏附蛋白、生长因子等细胞因子的分泌,其中 BMP-2 与 VEGF 间的相互作用起着很重要的作用<sup>[17]</sup>。本实验将自体 EPCs 及 BMSCs 按照最佳比例(1:2)共同培养形成联合培养体系并复合在组织工程支架上,体外培养 3、7、14 d 检测显示,联合培养细胞组成骨相关因子 Osteopontin、Osteonectin、Col-1 表达量较 BMSCs 组及 EPCs 组明显增加( $P < 0.01$ ),14 d 最高,可见将两种细胞联合培养促进了骨及新生血管的生成。另有报道显示 BMSCs 可在低氧环境中释放多种血管生成因子及抑制 BMSCs 细胞向脂肪细胞及成骨、破骨细胞转化,在这里起主要作用的调节因子是作为转录因子的低氧诱导因子(hypoxia-inducing factor 1, HIF-1),它可以通过活化内皮生长因子调节血管形成。在低氧条件下,HIF-1 的  $\alpha$  亚型呈指数上调,刺激了多种血管形成蛋白如 VEGF 等级联式地增加,从而促进组织工程骨内新生血管的形成<sup>[18-19]</sup>。BMP-2 既可由 BMSCs 分泌,其亦是 EPCs 分泌的重要生长因子<sup>[20]</sup>,在移植后 15 min 内即可促进 BMSCs 成骨分化<sup>[21-23]</sup>,将 EPCs 与 BMSCs 采用 Transwell 小室间接共培养,可明显提高 BMSCs 的干性功能、增殖和分化能力及成骨能力,温丽<sup>[24]</sup>认为是 EPCs 旁分泌的细胞因子所起的作用,即在 EPCs 旁分泌因子的作用下,BMSCs 增加了 VEGF 及 BMP-2 等的分泌,从而促进了新生血管的形成及成骨。

本实验将联合 3 组种子细胞的组织工程骨移植至兔四肢肌袋内使其生长分化,观察其变化,培养 2 个月后,联合培养细胞体系复合的组织工程支架未出现排异反应,且逐步降解,由胶原、骨小梁及新生骨替代,且其内见大量表达 CD34、CD105、ZO-1 的血管内皮细胞、部分形成血管腔结构且与周围软组织内血管沟通,代表组织工程骨移植成功且血管化良好,认为 EPCs 可加快组织工程骨内新生血管及血管网的形成,增加 BMSCs 的存活数量,提高其增殖和成骨转化能力。CD34 是特

异性的血管内皮细胞标记物,能突出显示较小的不成熟的微血管和单个内皮细胞,然而成熟的血管内皮细胞 CD34 也可表现为阳性;本研究还采用新生血管特异性标记 CD105,其是研究肿瘤、组织工程移植及血管病变治疗后探讨新生血管生长能力的重要指标。ZO-1 是紧密连接蛋白,其表达代表血管为功能性血管,可见流动血流通过,ZO-1 与 CD105 阳性说明新生血管为功能性血管,具有携带营养物质带走代谢产物的功能<sup>[25]</sup>。

本实验将两种细胞共同培养形成联合培养体系,无论在体内、体外均增加了成骨和成血管因子的表达水平,说明 EPCs 不仅促进组织工程骨血管化的形成,还促进 BMSCs 成骨,认为这是在两种细胞直接或间接相互作用基础上形成的,尽管本研究显示了这一结果,但两细胞相互作用的确切分子机制还没有完全明确,有待于进一步研究。本次实验结果为自体细胞复合的组织工程骨应用于临床提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(9): 1507-1515.
- [2] Kampmann A, Lindhorst D, Schumann P, et al. Additive effect of mesenchymal stem cells and VEGF to vascularization of PLGA scaffolds[J]. *Microvasc Res*, 2013, 90(1): 71-79.
- [3] Berendsen AD, Olsen BR. Regulation of adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells by vascular endothelial growth factor A[J]. *J Intern Med*, 2015, 277(6): 674-680.
- [4] 王福科, 刘流, 李彦林, 等. 骨髓基质干细胞与 PDPB 体外构建组织工程骨的适宜条件[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(33): 6401-6405.
- [5] 韩雪松. 自体种子干细胞体内成骨研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
- [6] Song X, Liu S, Qu X, et al. BMP2 and VEGF promote angiogenesis but retard terminal differentiation of osteoblasts in bone regeneration by up-regulating Id1[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(10): 796-804.
- [7] Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair[J]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013: 132642.
- [8] Schumann P, Tavassol F, Lindhorst D, et al. Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo[J]. *Microvasc Res*, 2009, 78(2): 180-190.
- [9] Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, et al. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(6): 1991-2001.
- [10] Ebrahim NA, Leach L. Temporal studies into attachment, VE-cadherin perturbation, and paracellular migration of

- human umbilical mesenchymal stem cells across umbilical vein endothelial monolayers[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(4):426-436.
- [11] Everaert BR, Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, et al. Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144(3):350-366.
- [12] Pedersen TO, Blois AL, Xing Z, et al. Endothelial microvascular networks affect gene-expression profiles and osteogenic potential of tissue-engineered constructs [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(3):52.
- [13] 王伟, 刘德红, 李卓成, 等. 转染 VEGF 基因对内皮祖细胞生长的影响研究[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(3):355-358.
- [14] 白丽萍, 赵志红, 陈冲, 等. 正常成人粒细胞集落刺激因子动员外周血内皮祖细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(32):5190-5196.
- [15] Wang QR, Wang F, Zhu WB, et al. GM-CSF accelerates proliferation of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells in vitro [J]. *Cytokine*, 2009, 45(3):174-178.
- [16] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(2):284-291.
- [17] Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, et al. PIGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24872.
- [18] Melchiorri AJ, Nguyen BN, Fisher JP. Mesenchymal stem cells: roles and relationships in vascularization[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(3):218-228.
- [19] Wang JA, Chen TL, Jiang J, et al. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*. 2008, 29(1):74-82.
- [20] Chen J, Xavier S, Moskowitz-Kassai E, et al. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(3):973-983.
- [21] Overman JR, Farré-Guasch E, Helder MN, et al. Short (15 minutes) bone morphogenetic protein-2 treatment stimulates osteogenic differentiation of human adipose stem cells seeded on Calcium phosphate scaffolds in vitro [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(3/4):571-581.
- [22] Chou YF, Zuk PA, Chang TL, et al. Adipose-derived Stem cells and BMP2; Part1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects[J]. *Connect Tissue Res* 2011, 52(2):109-118.
- [23] Zuk P, Chou YF, Mussano F, et al. Adipose-derived stem cells and BMP2; Part2. BMP2 maynot influence the osteogenic fate of human adipose-deriveds tem cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(2):119-132.
- [24] 温丽. 血管内皮祖细胞对大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性调控作用的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2013.
- [25] Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(4):385-395.

(收稿日期:2015-09-10 修回日期:2015-10-10)

(上接第 158 页)

- signaling in human CD14<sup>+</sup> monocytes[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(7):1439-1445.
- [12] Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(2):361-370.
- [13] Yang SS, Li R, Qu X, et al. Atorvastatin decreases Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human monocytic leukemia cells[J]. *Cell Immunol*, 2012, 279(1):96-102.
- [14] 孙雪芳, 王洪新, 梁灵君, 等. 黄芪多糖通过 TLR4/NF-κB 信号通路抑制脂多糖诱导的大鼠心肌细胞肥大[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2):208-212.
- [15] 秦鑫, 秦蕾, 刘又宁. 全氟化碳通过下调 TLR4/NF-κB 信号通路抑制脂多糖刺激 A549 细胞分泌 TNF-α 的研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2015, 9(1):84-87.
- [16] Teitelbaum I. Ultrafiltration failure in peritoneal dialysis: a pathophysiologic approach[J]. *Blood Purif*, 2015, 39(1/3):70-73.
- [17] Cho Y, Johnson DW, Badve S, et al. Impact of icodextrin on clinical outcomes in peritoneal dialysis: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(7):1899-1907.

(收稿日期:2015-09-18 修回日期:2015-10-14)

# 欢迎投稿

# 欢迎订阅