

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.10.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210118.1750.071.html\(2021-01-19\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210118.1750.071.html(2021-01-19))

## 组织工程学内皮祖细胞膜片制备及生物学功能研究\*

薛奋龙<sup>1</sup>, 简锴陶<sup>2,3△</sup>

(1. 天津市第一中心医院心血管外科 300192; 2. 天津市胸科医院心血管外科 300051;

3. 上海德达医院心血管外科 200336)

**[摘要]** **目的** 制备大鼠骨髓来源内皮祖细胞(BM-EPCs)组织工程学细胞膜片并行生物学功能研究。**方法** 建立大鼠 BM-EPCs 培养体系,获取培养至 14 d 的 EPCs。应用流式细胞术行细胞表面标志物检测并 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的荆豆凝集素-1(FITC-UEA-1)共同染色方法鉴定 BM-EPCs。应用 Nunc UpCell Surface 培养皿制备 BM-EPCs 组织工程学细胞膜片,测量膜片厚度并应用 CCK-8 法检测膜片中细胞代谢功能,体外血管形成实验检测内皮分化功能,间接酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测细胞膜片旁分泌基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子(VEGF)、表皮细胞生长因子(EGF)水平。**结果** 通过建立大鼠 BM-EPCs 培养体系并成功获得 EPCs 膜片。体外实验结果显示,与 EPC 单细胞组比较,EPC 膜片组具有更强的增殖能力及血管形成能力,且具有更强的旁分泌 SDF-1 $\alpha$ 、VEGF 作用,差异均有统计学意义[(4.86 $\pm$ 0.09)pg/mL vs. (5.32 $\pm$ 0.12)pg/mL,(162.88 $\pm$ 0.96)pg/mL vs. (194.72 $\pm$ 6.53)pg/mL, $P$ <0.01]。两组细胞 EGF 水平比较,差异无统计学意义[(281.50 $\pm$ 9.96)pg/mL vs. (294.16 $\pm$ 8.98)pg/mL, $P$ >0.05]。**结论** EPCs 膜片具有更强的细胞增殖能力、血管形成能力及旁分泌作用,可为干细胞移植方式提供参考。

**[关键词]** 细胞膜片;内皮细胞;干细胞;血管生成;组织工程学

**[中图分类号]** R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)10-1647-06

## Tissue engineering endothelial progenitor cell sheet preparation and its biological function research\*

XUE Fenlong<sup>1</sup>, JIAN Kaitao<sup>2,3△</sup>

(1. Department of Cardiovascular Surgery, Tianjin Municipal First Central Hospital, Tianjin

300192, China; 2. Department of Cardiovascular Surgery, Tianjin Municipal Chest Hospital,

Tianjin 300051, China; 3. Department of Cardiovascular Surgery, Shanghai

DeltaHealth Hospital, Shanghai 200336, China)

**[Abstract]** **Objective** To prepare the endothelial progenitor cell (EPC) sheet of rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells (BM-EPCs), and to study its biological function. **Methods** The rat BM-EPCs culture system was established. EPCs cultured for 14 d were obtained. The flow cytometry was used to conduct the cell surface marker detection. BM-EPCs was identified by the co-staining method with Dil-acLDL and FITC-UEA. The Nunc UpCell Surface culture dish was used to prepare the BM-EPCs tissue engineering cell sheet, the thickness of the sheet was measured and the CCK-8 method was used to detect the cell metabolism function in the cell sheet, the in vitro angiogenesis test was used to detect endothelial differentiation function and the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of paracrine factors (SDF-1 $\alpha$ , VEGF and EGF) in the culture supernatant. **Results** The culture system of BM-EPCs was established and the EPC sheet was successfully obtained. The in vitro experiments results showed that compared with the EPCs single-cell group, the EPCs sheet group had stronger proliferative capacity and angiogenic

\* 基金项目:天津市自然科学基金项目(16JCYBJC23300)。 作者简介:薛奋龙(1986-),主治医师,硕士,主要从事心血管外科临床及基础研究。 △ 通信作者,E-mail:wavejiankt@hotmail.com。

ability ( $P < 0.05$ ), moreover had stronger effects of paracrine SDF-1 $\alpha$  and VEGF factors, and the differences were statistically significant [(4.86  $\pm$  0.09) pg/mL vs. (5.32  $\pm$  0.12) pg/mL, (162.88  $\pm$  0.96) pg/mL vs. (194.72  $\pm$  6.53) pg/mL,  $P < 0.01$ ]. There was no statistically significant difference in the EGF level between the two groups [(281.50  $\pm$  9.96) pg/mL vs. (294.16  $\pm$  8.98) pg/mL,  $P > 0.05$ ]. **Conclusion** The EPCs sheet has stronger cell proliferation ability, angiogenic ability and paracrine effect, which provides a reference for stem cell transplantation.

**[Key words]** cell sheet; endothelial cells; stem cells; angiogenesis; tissue engineering

目前,缺血性心脏病(IHD)仍然是全世界病死率最高的疾病。对于 IHD 导致的慢性心力衰竭的治疗已经有了长足的进步,包括  $\beta$ -受体抑制剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体抑制剂等的药物治疗,以及再同步化疗<sup>[1]</sup>。终末期慢性心力衰竭患者也可以进行左心室辅助装置和心脏移植治疗。虽然这些治疗方法对于 IHD 所导致的慢性心力衰竭发挥了重要的作用,但是药物治疗非常有限,预后不佳,左心室辅助装置受设备和医疗水平限制,无法广泛的开展,同时心脏移植受供体和受体条件所限,受益人群有限。因此,对于 IHD 慢性心力衰竭的治疗方法仍需要不断的发展和探索。应用干细胞治疗 IHD 是过去 20 年间逐步发展的新策略,自体干细胞移植治疗 IHD 的临床研究已经开展并时有报道<sup>[2-3]</sup>。可以选择的干细胞移植种类虽然很多,但无论应用何种干细胞,移植的方式在干细胞治疗方案中发挥着至关重要的作用。目前临床中应用的移植方式主要是在外科手术时心肌内注射或者通过导管冠状动脉内注射。但通过这些途径移植的治疗效果有限,原因可能与心肌内注射后干细胞只作用在局部区域和注射部位心肌损伤造成移植干细胞生存条件更加恶化有关,导管内冠状动脉注射干细胞后干细胞随血流到达损伤部位的干细胞数量有限,治疗作用不理想。因此,有学者选择应用干细胞膜片进行移植,干细胞膜片具有不破坏细胞连接结构,具有更加强大的旁分泌效应<sup>[4-5]</sup>。干细胞膜片的种类很多,包括心肌干细胞、骨骼肌干细胞、基质干细胞、脂肪干细胞等,但制备和应用内皮祖细胞(EPCs)膜片治疗 IHD 的动物和临床实验鲜有报道。本实验研究大鼠 EPCs 的制备方法并探讨 EPCs 膜片的生物学功能,以为 EPCs 膜片移植治疗 IHD 提供参考依据及实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1)实验动物。清洁级同种系成年雄性 Wistar 大鼠 15 只,8 周龄,体重 200~250 g,购自军事医学科学院动物中心。(2)主要试剂及仪器。内皮细胞基础培养基及生长因子套装(EBM-2 Basal Medium)购自美

国 Lonza 公司;淋巴细胞分离液(Histopaque 1083)、大鼠血浆来源玻连蛋白、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的荆豆凝集素 1(FITC-UEA-1)均购自美国 Sigma 公司;羊抗大鼠 CD34 流式抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗大鼠 CD133 流式抗体购自美国 Bioss 公司;VE-cadherin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;KDR 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自美国 Molecular probes 公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)购自瑞士 Roche 公司;大鼠基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、大鼠血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒及大鼠表皮细胞生长因子(EGF)ELISA 试剂盒均购自泉州市科诺迪生物科技有限公司。CO<sub>2</sub> 孵育箱购自美国 Thermo 公司,Nunc UpCell Surface 培养皿购自美国 Thermo Scientific 公司,荧光倒置显微镜(IX71)购自日本 Olympus 公司,流式细胞仪购自美国 BD FACS Calibur 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建立大鼠骨髓来源 EPCs(BM-EPCs)培养体系

大鼠 BM-EPCs 培养体系建立同前期试验所述<sup>[6]</sup>,断头处死雄性大鼠 1 只,75%乙醇浸泡 2 遍,分离股骨和胫骨,用注射器吸取适量的匀浆冲洗液冲洗髓腔至无色,收集悬液到合适离心管中,反复吹打成单细胞悬液,70  $\mu$ m 细胞筛过滤,2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加细胞稀释液重悬细胞,调整细胞浓度至  $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$  /mL 备用,15 mL 离心管加入与骨髓单细胞悬液等量的淋巴细胞分离液 Histopaque 1083,缓慢加入细胞悬液,2 100 r/min 离心 30 min,离心后分四层,取第二层棕黄色单核细胞于 15 mL 离心管,加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)混匀清洗,1 400 r/min 离心 10 min,EBM-2 培养基重悬细胞,接种至纤维连接蛋白包被的培养皿中。在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。4 d 后首次全量换液,弃去未贴壁细胞,以后每 3 天更换新鲜培养液,所有细胞均培养至第 14 天。

### 1.2.2 大鼠 BM-EPCs 表面抗原流式细胞术鉴定

弃去培养液, PBS 洗涤细胞, 0.25% 胰酶消化培养至 14 d 贴壁细胞, 1 000 r/min 离心 3 min, PBS 重悬, 1 000 r/min 离心 3 min, 细胞计数, PBS 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 取 200  $\mu$ L 单细胞悬液。设空白对照管、CD34、CD133、KDR、VE-cadherin 管, 分别加入 PBS、CD34、CD133、KDR、VE-cadherin 一抗, 室温孵育 2 h, 流式洗液洗涤 1 次, 加入二抗 Alexa Fluor488, 室温避光孵育 1 h, 流式洗液洗涤后行流式细胞仪检测。

### 1.2.3 EPCs 吞噬功能鉴定

将培养至 14 d 的细胞中加入 1 mL 完全培养基稀释的 10 mg/L 的 Dil-acLDL, 37  $^{\circ}$ C 温箱孵化 4 h 后, PBS 洗涤 3 次, 2% 甲醛室温下固定 20 min, 再加入 1 mL 浓度为 10 mg/L FITC-UEA-1 室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 最后加入 1 mL 完全培养基稀释的 10 mg/L 的 DAPI 于 37  $^{\circ}$ C 温箱孵育 15 min, 荧光显微镜下观察 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-1 双阳性细胞。

### 1.2.4 EPCs 膜片建立

取培养至 7 d 的  $1.5 \times 10^6$  个 BM-EPCs 接种至包被有玻连蛋白的 Nunc UpCell Surface 培养皿中, 37  $^{\circ}$ C 温箱继续培养 7 d 后, 迅速放置于 25  $^{\circ}$ C 恒温箱中避光孵育 30 min, 获得大鼠 BM-EPCs 膜片。

### 1.2.5 细胞膜片厚度测定

弃掉培养至 7 d 的 Nunc UpCell Surface 培养皿中的培养液, 加入 20 mL 预冷至  $-20^{\circ}$ C 的甲醇液, 4  $^{\circ}$ C 孵育 10 min,  $1 \times$  PBS 洗 1 次, 含 10% 羊血清的 PBS 室温下封闭 40 min, PBS-T 稀释一抗 Col I 共 3 mL, 室温孵育 4 h, PBS-T 洗 3 次, 每次 5 min, PBS-T 稀释 Alexa Fluor 488 二抗共 3 mL, 室温避光孵育 1 h, PBS-T 稀释 DAPI 共 3 mL, 室温避光孵育 3 min, PBS-T 洗 3 次, 每次 5 min。荧光显微镜下观察细胞膜片, 计算膜片厚度。

### 1.2.6 CCK8 法检测细胞膜片中细胞代谢

分别制备培养至 14 d 的 BM-EPCs 单细胞及 BM-EPC 膜片  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液, 分别设为 EPC 单细胞组及 EPC 膜片组。  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 每组细胞至少接种 6 个孔, 放入培养箱中继续培养, 分别在 12、24、48、72 h 时用 CCK8 法检测细胞活性, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK8 检测液, 在细胞培养箱中孵育 4 h 后, 用酶标仪测定每孔细胞在 450 nm 处的吸光度(A)。分别绘出 EPCs 单细胞及 EPC 膜片的生长曲线。

### 1.2.7 细胞膜片内皮分化功能检测

4  $^{\circ}$ C 过夜融化 Matrigel, 用 M199 基础无添加培

养基按 1:1 稀释 Matrigel, 于 96 孔板中每孔均匀铺置 50  $\mu$ L Matrigel 后, 37  $^{\circ}$ C 温箱孵育 30 min 使其凝固。分别重悬 BM-EPCs 单细胞及细胞膜片, 制作成  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬浮液。分别加 100  $\mu$ L 单细胞悬液于 Matrigel 表面上, 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 显微镜下观察各组细胞形成血管网状结构, 应用 Wimasis image analysis 软件分析总的血管环数。

### 1.2.8 ELISA 法检测细胞膜片旁分泌 SDF-1 $\alpha$ 、VEGF、EGF 水平

分别取 BM-EPCs 单细胞及细胞膜片培养上清液, 1 000 r/min, 离心 10 min 去除颗粒物及漂浮细胞。按照 ELISA 检测试剂盒操作说明设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50  $\mu$ L; 样本孔分别加入两组培养上清液 50  $\mu$ L; 立即加入 50  $\mu$ L 的生物素标记的抗体。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37  $^{\circ}$ C 温育 1 h。甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100  $\mu$ L, 用封板膜封住反应孔, 37  $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 60 min, 弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满  $1 \times$  洗涤液, 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50  $\mu$ L, 15 min 内, 在 450 nm 波长处测定各孔的 A 值。

### 1.3 统计学处理

数据采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 大鼠 BM-EPCs 培养体系建立

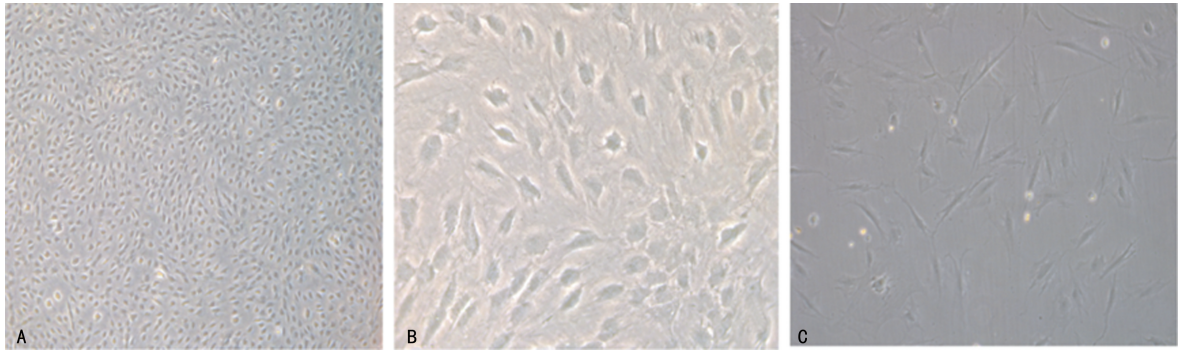
培养 14 d 的 BM-EPCs 在显微镜下呈鹅卵石样排列, 局部可见细胞岛状排列, 细胞以锤状、梭形细胞为主, 中央区多见多边形细胞; 个别细胞呈线性排列, 细胞呈典型纺锤状, 见图 1。

### 2.2 大鼠 BM-EPCs 鉴定

流式细胞术检测细胞表面抗原, 结果显示分离培养的 BM-EPCs CD34、CD133、KDR、VE-cadherin 阳性率分别为 85.43%、59.30%、51.83%、38.78%, 见图 2。BM-EPCs 吞噬功能鉴定显示, BM-EPCs 结合 Dil-acLDL 后呈红色, 结合了 FITC-UEA-1 的细胞呈绿色, 结合了 DAPI 的细胞核呈蓝色, 双阳性细胞呈黄色, 表明其具有 EPCs 增殖特性, 见图 3。

### 2.3 BM-EPCs 膜片建立及膜片厚度测定

单层 BM-EPCs 膜片的厚度约 15  $\mu\text{m}$ , 3~4 层膜片的厚度约 60  $\mu\text{m}$ , 见图 4。



A: 鹅卵石样排列( $\times 100$ ); B: 局部细胞岛状排列( $\times 200$ ); C: 梭形排列( $\times 200$ )。

图 1 体外培养 BM-EPCs 的形态学图像

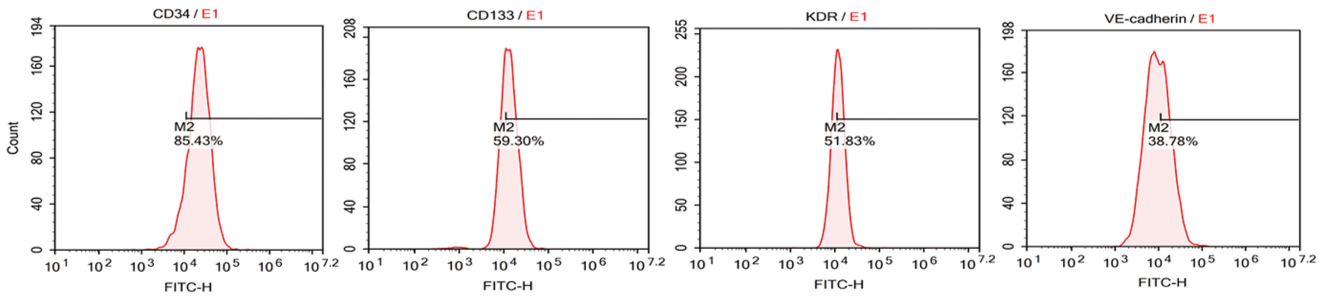
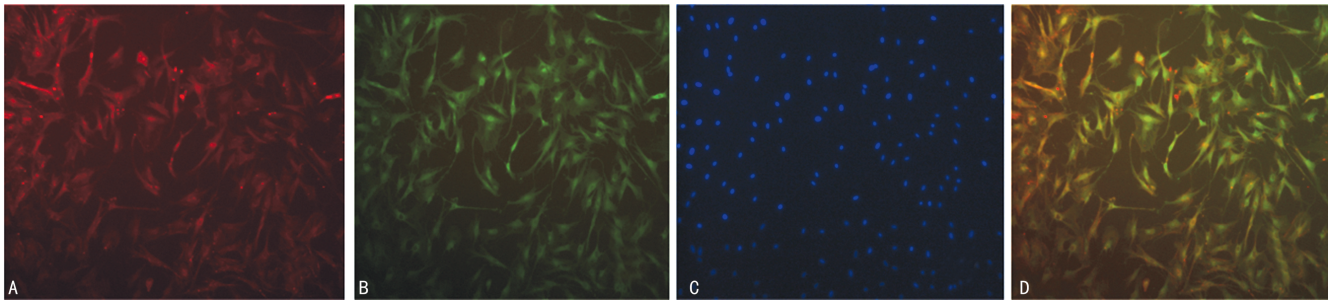
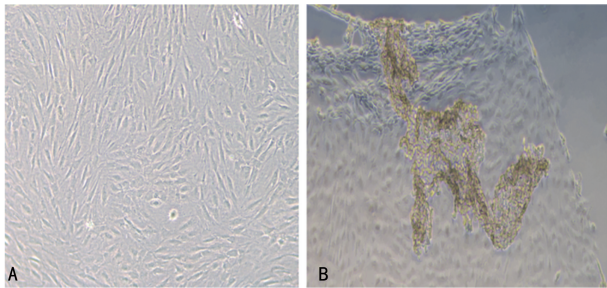


图 2 BM-EPCs 细胞表面抗原流式细胞术鉴定



A: 吞噬 Dil-acLDL 的 EPCs; B: 吞噬 FITC-UEA-1 的 EPCs; C: 结合了 DAPI 的 EPCs 核; D: 吞噬 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-1 的双阳性 EPCs。

图 3 BM-EPCs 吞噬功能鉴定( $\times 200$ )



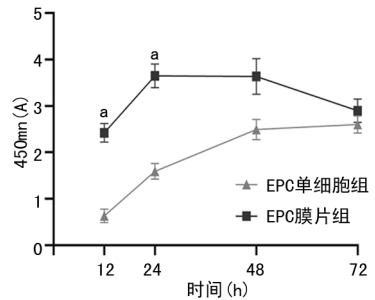
A: 细胞连接更加紧密的膜片镜下结构( $\times 200$ ); B: 细胞膜片形态( $\times 100$ )。

图 4 BM-EPC 细胞膜片的大体形态

### 2.4 CCK8 法检测细胞膜片中细胞代谢

24 h 之内, 与 EPC 单细胞组比较, EPC 膜片组中细胞增殖更快 ( $1.59 \pm 0.17$  vs.  $3.65 \pm 0.25$ ,  $P < 0.01$ ); 24 h 以后, 由于 EPC 膜片组中细胞长满 96 孔

板, 生长停滞继而开始凋亡, 见图 5。

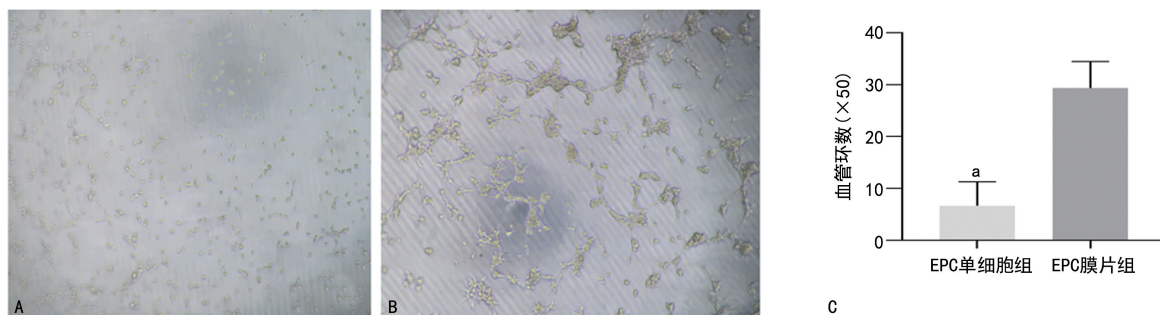


<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 EPCs 比较。

图 5 不同时间点两组细胞的增殖情况比较

### 2.5 内皮分化功能检测

体外血管形成实验结果显示, 与 EPC 单细胞组比较, EPC 膜片组血管形成能力更强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。



A: EPC 单细胞组( $\times 100$ ); B: EPC 膜片组( $\times 100$ ); C: 两组细胞血管环数比较( $n=6$ ); <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 EPC 膜片组比较。

图 6 两组细胞体外血管形成能力情况

## 2.6 ELISA 法检测细胞膜片旁分泌因子 SDF-1 $\alpha$ 、VEGF、EGF 水平

与 EPC 单细胞组比较, EPC 膜片组细胞旁分泌 SDF-1 $\alpha$  和 VEGF 的能力更强( $P < 0.05$ ), 而两组细胞旁分泌 EGF 的能力比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 两组细胞旁分泌因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

项目	EPC 单细胞组	EPC 膜片组	F	P
SDF-1 $\alpha$	4.86 $\pm$ 0.09	5.32 $\pm$ 0.12	50.79	0.00
VEGF	162.88 $\pm$ 0.96	194.72 $\pm$ 6.53	116.41	0.00
EGF	281.50 $\pm$ 9.96	294.16 $\pm$ 8.98	4.45	0.06

## 3 讨论

血管 EPCs 主要存在于骨髓及外周血中, 不同来源 EPCs 生物学特征不同。骨髓中含有丰富的 EPCs, 正常生理条件下 BM-EPCs 逐步分化为成熟 EPCs 到外周血中, 通过内皮化和新生血管化参与机体血管损伤修复和维持体内 EPCs 的内平衡<sup>[2]</sup>。当内皮细胞发生损伤时, BM-EPCs 被动释放入外周循环, 在不同细胞因子介导趋化下聚集到损伤部位, 进行血管再生从而达到修补损伤的作用。自然条件下通过动员自身骨髓, 迁移至损伤部位的 EPCs 数量有限, 因此, 通过不同的移植方式, 增加局部 EPCs 是促进局部组织修补的有效方法。目前动物实验和临床中应用的移植方式主要是在外科手术时心肌内注射或者通过导管冠状动脉内注射, 移植效果欠理想。因此, 应用 EPCs 进行缺血心肌治疗时, 移植方式起到关键性作用, 所以, 寻求一种有效的干细胞移植方式至关重要<sup>[5,7-8]</sup>。有研究表明, EPCs 在修复组织损伤过程中, 可以通过旁分泌机制分泌一些抗炎、促血管生成的因子发挥重要作用, 如 SDF-1 $\alpha$ , VEGF, EGF 等<sup>[9-10]</sup>。由干细胞形成的干细胞膜片具有完整的细胞桥接结构, 具有更强的旁分泌机制。目前应用最广泛的制备干细胞膜片的技术为温度感应细胞培养板, 利用细胞培养皿表面特殊的温度反应材料在温差明显

的条件下形成完整片状结构<sup>[4]</sup>。多项体外实验研究表明, 间充质干细胞等细胞膜片在皮肤损伤, 骨损伤修复及心肌梗死修复表现出理想的结果<sup>[11-12]</sup>。为达到更佳的治疗效果, 通过组织工程学方法建立的细胞或干细胞膜片研究逐渐成为临床研究热点。

本实验通过组织工程学方法, 获得 EPCs 膜片, 比较 EPCs 膜片与 EPCs 生物学功能的不同。研究结果显示, EPCs 膜片在 24 h 内, 细胞增殖速度比 EPCs 快, EPCs 膜片比 EPCs 血管生成能力强。局部心肌梗死发生后, 细胞坏死并发生炎症反应, 释放大量的 SDF-1 $\alpha$ , BM-EPCs 通过 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 体系轴, 具有向 SDF-1 $\alpha$  定向迁移的功能<sup>[13]</sup>。干细胞在发挥细胞生物学作用时, 除了细胞自身发挥作用外, 细胞之间的相互作用也非常重要, 旁分泌信号通路是细胞间相互联系最基本也是最重要的组成部分<sup>[14-15]</sup>。在 EPCs 膜片中, 细胞相互间通过旁分泌细胞因子刺激, 增强了细胞生物学功能, 与大鼠 BM-EPCs 单细胞相比, EPCs 膜片中细胞旁分泌 SDF-1 $\alpha$ , VEGF 等重要因子的作用更强, 这些关键因子进一步激活下游信号通路介导并强化相应细胞生物学功能。本研究初步确定了 EPCs 膜片生物学功能优势, 可为进一步的研究提供了参考。但本研究还存在一些不足, 今后将对更多的旁分泌的关键因子及其发挥作用的关键信号通路进行深入研究。

## 参考文献

[1] YU H, LU K, ZHU J Y, et al. Stem cell therapy for ischemic heart diseases[J]. Br Med Bull, 2017, 121(1): 135-154.

[2] BIANCONI V, SAHEBKAR A, KOVANEN P, et al. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: a controversial paradigm in cell therapy[J]. Pharmacol Ther, 2018, 181: 156-168.

- [3] HAIDER K H, AZIZ S, AL-RESHIDI A M. Endothelial progenitor cells for cellular angiogenesis and repair: lessons learned from experimental animal models[J]. *Regen Med*, 2017, 12(8): 969-982.
- [4] LI M X, JUN M, GAO Y B, et al. Cell sheet technology: a promising strategy in regenerative medicine[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(1): 3-16.
- [5] RUI G, MORIMATSU M, TIAN F, et al. Stem cell-derived cell sheet transplantation for heart tissue repair in myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 19.
- [6] 薛奋龙, 陈庆良, 简锴陶, 等. 缺氧预处理对骨髓来源内皮祖细胞生物学功能的影响[J]. *天津医药*, 2014, 42(3): 231-234, 296.
- [7] JIAN K T, SHI Y, ZHANG Y, et al. Time course effect of hypoxia on bone marrow-derived endothelial progenitor cells and their effects on left ventricular function after transplanted into acute myocardial ischemia rat[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(6): 1043-1054.
- [8] CHONG M S, NG W K, CHAN J K. Concise review: endothelial progenitor cells in regenerative medicine: applications and challenges[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(4): 530-538.
- [9] PATRY C, STAMM D, BETZEN C, et al. CXCR-4 expression by circulating endothelial progenitor cells and SDF-1 serum levels are elevated in septic patients[J]. *J Inflamm*, 2018, 15(1): 10.
- [10] SHUDO Y, COHEN J E, MACARTHUR J W, et al. Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle Cell-Endothelial progenitor cell Bi-Level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 2013, 128(11 Suppl 1): S59-68.
- [11] HUAN L, YANG J, WEI Z, et al. Endothelial progenitor cells improve the therapeutic effect of mesenchymal stem cell sheets on irradiated bone defect repair in a rat model[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 137.
- [12] OLIVA J, FLORENTINO A, BARDAG-GORCE F, et al. Engineering, differentiation and harvesting of human adipose-derived stem cell multilayer cell sheets[J]. *Regen Med*, 2019, 14(3): 151-163.
- [13] MIN C, KAI H, ZHOU J L, et al. A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 81: 49-53.
- [14] GE Q H, ZHANG H W, HOU J X, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 17: 1667-1675.
- [15] MICHLER R E. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease[J]. *J Card Surg*, 2018, 33(9): 520-531.

(收稿日期: 2020-05-28 修回日期: 2020-12-22)

(上接第 1646 页)

- [15] YE T, SHI H, PHAN-THIEN N, et al. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation[J]. *Biomech Model Mechano-biol*, 2020, 19(3): 943-955
- [16] LIU Z W, ZHAO J J, PANG H G, et al. Vascular endothelial growth factor A promotes platelet adhesion to collagen IV and causes early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(10): 1726-1733
- [17] 章平衡. 基于 FAK/Calpain 通路探讨新风胶囊抑制血小板活化改善类风湿关节炎肺功能机制[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [18] 郑丽娟, 朱原, 徐榆林, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠血小板 PDK1/Akt Thr308 通路的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(4): 1-4.
- [19] 黄曼婷, 吴焕林, 徐丹苹. 柚皮素通过 PI3K/Akt 通路靶向抗血小板聚集的体外研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(3): 517-522.
- [20] 盛杰霞, 邓旭, 包军, 等. 华蟾酥毒基通过 FAK/PI3K/Akt 传递抑制食管癌 Kyse-520 细胞迁移和侵袭[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(1): 139-145.
- [21] WEI Y, ZHOU J, YU H, et al. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation[J]. *Biosci Biotechn Biochem*, 2019, 83(3): 429-435.

(收稿日期: 2020-10-31 修回日期: 2021-04-02)