

紫绀型先天性心脏病患儿血清 VEGF 和 SDF-1 水平与循环 EPCs 的相关性研究

刘哲亮¹, 吴忠仕¹, 胡建国¹, 杨一峰¹, 陈勇², 高华¹, 胡野荣¹

(1. 中南大学湘雅二医院胸外科, 湖南 长沙 410011; 2. 湖南省现代优生技术重点实验室, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 探讨紫绀型先天性心脏病患儿血清血管内皮生长因子(VEGF)和基质细胞衍生因子(SDF-1)的水平与循环内皮祖细胞(EPCs)数量及功能变化的关系。**方法** 采用ELISA法检测15例法洛三联症患儿(紫绀组)外周血清SDF-1和VEGF的水平;采用密度梯度离心法分离EPCs体外扩增培养;做免疫荧光鉴定及细胞计数。采用MTT比色法、改良的Boyden小室和黏附能力测定实验,观察EPCs的增殖能力、迁移能力及黏附能力。用回归分析法分析VEGF和SDF-1水平与EPCs数量及功能的相关性。单纯室间隔缺损患儿15例为对照组。**结果** 紫绀组与对照组相比,VEGF水平增高(201.42 ± 44.74 ng/L vs 113.56 ± 35.62 ng/L);SDF-1水平增高(3.45 ± 1.07 ng/L vs 1.05 ± 0.99 ng/L, $P < 0.05$)。血清VEGF与SDF-1水平呈正相关($r = 0.675, P < 0.01$)。与对照组相比,紫绀组PEPCs数目明显增多(72.2 ± 9.73)/200倍视野 vs (51.2 ± 3.83)/200倍视野, $P < 0.01$;EPCs功能明显增强,其增殖能力、迁移能力及黏附能力明显强于对照组。VEGF、SDF-1的血清水平与EPCs数量及功能变化表现出明显的一致性,相关系数分别为0.8395, 0.5491, 0.6376和0.7392。**结论** 紫绀型先天性心脏病外周血EPCs数量及功能较非紫绀组明显增加,同时VEGF和SDF-1血清水平也明显增加,上述变化存在相关性,可能共同影响着患者的一些病理、生理变化。
[中国当代儿科杂志, 2009, 11(4): 267-272]

[关键词] 紫绀型先天性心脏病;循环EPCs;VEGF;SDF-1;儿童
[中图分类号] R725.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)04-0267-06

Correlation of serum levels of VEGF and SDF-1 with the number and function of circulating EPCs in children with cyanotic congenital heart disease

LIU Zhe-Liang, WU Zhong-Shi, HU Jian-Guo, YANG Yi-Feng, CHEN Yong, GAO Hua, HU Ye-Rong. Department of Cardiothoracic Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Hu Y-R, Email: qdxyll@tom.com)

Abstract: Objective To examine the number and function of circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in children with cyanotic congenital heart diseases (CHD) and study their correlation with serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell derived factor-1 (SDF-1). **Methods** Fifteen children with tetralogy of Fallot (cyanotic group) and 15 age- and sex-matched children with ventricular septal defect (control group) were enrolled. Serum levels of VEGF and SDF-1 were measured using ELISA. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation and cultured *in vitro*. EPCs were identified by immunofluorescence and were counted under a microscope. Modified Boyden chamber assay and the MTT assay were used to measure the migration and proliferation capacities of EPCs. EPCs adhesion ability assay was performed by replating cells on fibronectin-coated dishes, and then adherent cells were counted. The correlations of serum levels of VEGF and SDF-1 with the number and function of circulating EPCs were assessed by linear regression analysis. **Results** Serum levels of VEGF (201.42 ± 44.74 ng/L vs 113.56 ± 35.62 ng/L; $P < 0.05$) and SDF-1 (3.45 ± 1.07 ng/L vs 1.05 ± 0.99 ng/L; $P < 0.05$) in the cyanotic group were higher than those in the control group. There was a positive correlation between serum levels of VEGF and SDF-1 ($r = 0.675, P < 0.01$). The number of EPCs ($\times 200$ field) in the cyanotic group significantly increased compared with that of the control group (72.2 ± 9.73 vs 51.2 ± 3.83 ; $P < 0.01$). The functional activities of EPCs, including proliferation, migration and adhesion capacities, were augmented in the cyanotic group compared with those in the control group. The increased number and function of EPCs and the increased serum levels of VEGF and SDF-1 were consistent in the cyanotic group, with a correlation coefficient of 0.8395, 0.5491, 0.6376 and 0.7392 respectively. **Conclusions** The

[收稿日期]2008-11-27;[修回日期]2009-01-14
[基金项目]湖南省自然科学基金(06JJ50031)。
[作者简介]刘哲亮,男,博士研究生,医师。主攻方向:复杂先心病诊断与治疗。
[通讯作者]胡野荣,女,硕士,主管技师,中南大学湘雅二医院胸外科,邮编:410011。

number and functional activity of EPCs as well as serum levels of VEGF and SDF-1 increased in children with cyanotic CHD. Serum levels of VEGF and SDF-1 were correlated to the number and functional activity of EPCs. Serum VEGF and SDF-1 together with circulating EPCs may play important roles in the pathology and physiology in these patients.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):267-272]

Key words: Cyanotic heart diseases; Circulating EPCs; VEGF; SDF-1; Child

近年来用自体内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)修饰带瓣管道脱细胞基质材料的研究越来越引起临床科研人员的重视^[1,2]。而直到现在,在低氧环境下关于循环EPCs的变化还没有完全阐明,在紫绀型先天性心脏病这一领域的研究也未见报道。

EPCs可以自动归巢到机体缺氧部位,并且通过分化组装形成新生血管,改善局部组织的缺氧环境^[3,4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的促血管生长因子,它的促血管生成,可能是通过EPCs参与来完成^[5]。而基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及其受体CXCR4在造血干/祖细胞归巢中起重要作用^[6]。因而我们从构建组织工程带瓣管道角度出发,结合紫绀型先天性心脏病组织缺氧的特点,探讨紫绀型先天性心脏病患儿VEGF和SDF-1的血清水平和循环EPCs数量及功能变化的关系,在分子、细胞水平阐明他们之间的联系和作用机制,有利于促进以循环EPCs作为种子细胞构建组织工程化肺动脉血管替代物研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本和临床资料 法洛四联症(TOF)患儿15例为紫绀组,入选标准:年龄<3岁,口唇明显发绀,安静状态下氧饱和度70%~85%,未合并其他复杂心脏畸形。单纯室间隔缺损(VSD)患儿15例为对照组,入选标准为:年龄<3岁,未合并肺动脉高压,安静状态下氧饱和度>98%。术前采集静脉血20 mL,12.5 U/mL肝素抗凝,30 min内分离外周血单个核细胞,以供后续实验。另留取4 mL肝素抗凝血,普通离心机1 000 r/min离心15 min,取上清液,各2 mL分装两PE管,一管用做VEGF检测,另一管再次低温高速离心4℃下10 000 r/min,离心10 min,去除血小板,用做SDF-1的检测。分离的两管血清分别做好标签均在-70℃冰箱中保存待测。

1.1.2 试剂 单个核细胞分离液、左旋谷氨酰胺、二甲基亚砷、FITC-UEA-I均购于Sigma化学药品公司。特级胎牛血清购自美国Hyclone公司。

M199培养基、牛脑垂体提取物、纤维连接蛋白、Trypsin-EDTA为美国Gibco公司产品。Dil-AcLDL为美国Molecular Probes公司产品。APC直标KDR(鼠抗人)源于美国R&D公司。PE直标CD133(鼠抗人)和Fc受体封闭剂购自德国Miltenyi公司。人SDF-1定量酶联检测试剂盒和人VEGF定量酶联检测试剂盒是上海森雄科技实业有限公司产品。

1.1.3 仪器 细胞培养用超净工作台购自苏净集团安泰公司,细胞培养箱Model 3111为美国Forma Scientific公司产品,恒温离心机Avanti™ J-25Centrifug购自美国Beckman Coulter公司,各种规格移液器产自德国Eppendorf公司,荧光显微镜Eclipse E600和倒置相差显微镜Eclipse TE300购自日本Nikon公司,酶标仪Wellscan MK2是芬兰Lab-systems Dragon公司产品,ELX800. Gene5自动分析仪为美国BioTek instruments公司产品。

1.2 方法

1.2.1 EPC分离和培养 取20 mL肝素抗凝血用0.01 mmol/L磷酸缓冲液(PBS)等倍稀释。按体积比3:1加样于人外周血单个核细胞分离液(密度1.077),25℃下2 000 r/min,离心25 min,吸取单个核细胞,用已添加20%胎牛血清,4 μg/mL牛脑垂体提取物,氨苄青霉素100 U/mL和硫酸链霉素100 mg/mL的M199培养基重悬,调整细胞密度为 2×10^6 /mL,接种至5 μg/cm²人纤维连接蛋白预铺的6孔培养板,置于37℃,5% CO₂饱和湿度培养,72 h后首次换液,弃未贴壁细胞,此后每2天换液一次。

1.2.2 EPCs鉴定 取第7天细胞用10 μg/mL Dil标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-AcLDL)培养箱孵育1 h,2%多聚甲醛25℃固定10 min,20 μg/mL FITC标记的荆豆凝集素(FITC-UEA-I)25℃避光孵育1.5 h,荧光显微镜观察双阳性细胞。另取10 d左右细胞爬片纯丙酮固定,Fc受体封闭剂孵育10 min,后续分别用PE标记CD133抗体(1:11稀释)孵育10 min,APC标记KDR抗体孵育30 min,各步均4℃避光反应,荧光显微镜观察阳性细胞。

1.2.3 EPCs数量检测 EPCs能吞噬Dil-AcLDL(红光)并吸附FITC-UEA-I(绿光),双染色阳性细胞被认为是正在分化的EPCs。用倒置荧光显微镜

对上述双染色阳性细胞进行计数(15 个随机选择的×200 视野)。

1.2.4 EPCs 功能检测

(1)迁移能力测定:0.02% EDTA 加 0.25% 胰蛋白酶消化第7 天细胞,用未添加生长因子的 M199 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/400 \mu\text{L}$,置于改良 Boyden 小室上室,其下室加入含 50 ng/mL VEGF 的 M199 培养基 600 μL ,培养箱内孵育 24 h,细胞刷刮除滤膜上层未迁移细胞,2.5% 戊二醛及 100% 甲醇分别固定,苏木素复染,200 倍显微镜随机记数 10 个视野,计数迁移细胞数。

(2)黏附能力测定:取消细胞调整浓度为 $2 \times 10^4/\text{mL}$,于 FN 预铺 4 孔板内孵育 30 min,弃未贴壁细胞,200 倍显微镜随机记数 10 个视野,计数黏附细胞数。

(3)增殖能力测定:取消细胞调整浓度为 $2 \times 10^3/100 \mu\text{L}$,于 FN 预铺 96 孔板内孵育 24 h,分别加入 15 mg/mL 噻唑蓝溶液 15 μL ,孵育 4 h,加入二甲基亚砜各 150 μL ,25℃ 震荡 10 min,酶标仪

492 nm 波长处测定 OD 值。

1.2.5 VEGF, SDF-1 血清水平检测 实验前 20 min 从冰箱取出待测血清标本和人 VEGF, SDF-1 定量酶联检测试剂盒,平衡至室温(20℃ ~ 25℃),取出 48 孔的板条,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,分别按试剂盒说明书流程操作,在 Elx 800. Gene5 仪器上检测,于 492 nm 处测吸收光值读数。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计分析软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有资料数据采用两因素的方差分析,回归分析两因素变量的相关性。统计学 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 EPCs 鉴定结果

免疫荧光鉴定结果显示 EPCs 为 CD133⁺, KDR⁺, DiI-AcLDL⁺/FITC-UEA-I⁺(图 1,2)。

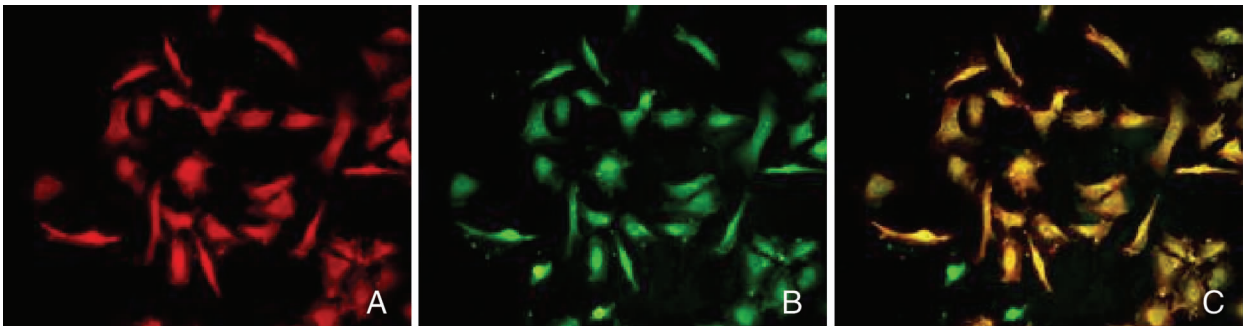


图 1 EPCs 双染色实验结果(×300) A:DiI-AcLDL⁺(红); B:FITC-UEA-I⁺(绿); C:DiI-AcLDL⁺/FITC-UEA-I⁺(黄)

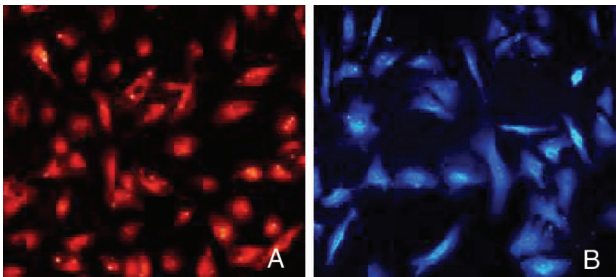


图 2 EPCs 免疫荧光鉴定(×400) A: PE-CD133⁺(红); B: APC-KDR⁺(蓝)

2.2 EPCs 数量的比较

从紫绀组外周血中,经过分离、诱导、分化培养的 EPCs 的数量显著高于对照组,分别为 $72.2 \pm 9.7/200$ 视野和 $51.2 \pm 3.8/200$ 视野, $P < 0.01$ 。

2.3 EPCs 功能的比较

从紫绀组外周血中,经过分离、诱导、分化培养的 EPCs,在其功能检查中,迁移、黏附及增殖能力均明显强于对照组外周血中的 EPCs 的功能(表 1)。

表 1 EPCs 功能变化检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)			
组别	迁移功能 (个/200 视野)	黏附功能 (个/200 视野)	增殖功能 (OD 值)
对照组	91.84 ± 8.58	112.6 ± 7.02	0.27 ± 0.01
紫绀组	140.6 ± 9.24^a	149 ± 11.58^a	0.34 ± 0.02^a

a:与对照组比较,均 $P < 0.01$

2.4 VEGF, SDF-1 血清水平的比较

从紫绀组外周血中,经离心分离得到的血清标本,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测的 VEGF, SDF-1 血清水平均明显高于对照组外周血中的 VEGF, SDF-1 血清水平(表 2)。

表 2 紫绀组与对照组 VEGF、SDF-1 血清水平的比较			
组别	例数	VEGF	SDF-1
对照组	15	113.56 ± 35.62	1.05 ± 0.99
紫绀组	15	201.42 ± 44.74 ^a	3.45 ± 1.07 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

2.5 血清 VEGF 水平与 EPCs 数量的相关性分析

对紫绀组血清 VEGF 的水平 and EPCs 数量检测的结果进行相关性分析,结果显示血清 VEGF 水平和 EPCs 数量呈正相关, $r = 0.8395$, $t = 5.174$, $P < 0.01$ (图 3)。

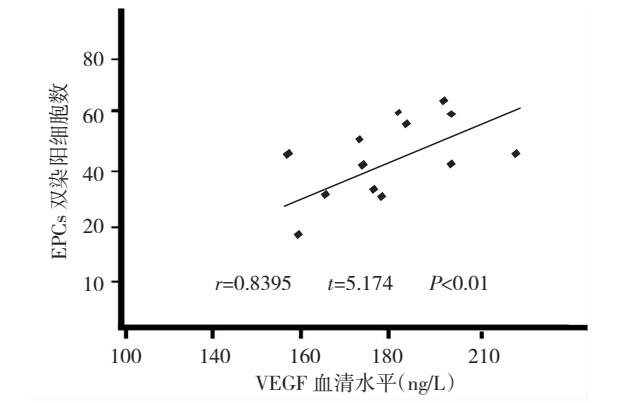


图 3 紫绀组 VEGF 血清水平和 EPCs 双染阳细胞数的相关散点图

2.6 血清 VEGF 水平与功能的相关性分析

对紫绀组血清 VEGF 的水平 and EPCs 功能检测的结果进行相关性分析,结果显示血清 VEGF 水平和 EPCs 的功能呈正相关 (图 4)。

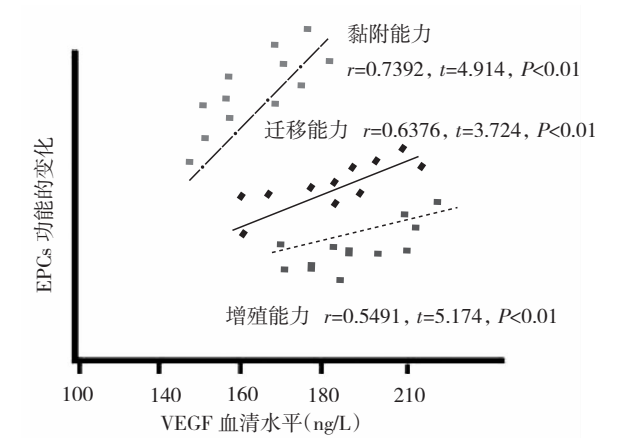


图 4 紫绀组 VEGF 的血清水平和 EPCs 功能的相关散点图

2.7 SDF-1 血清水平和 VEGF 血清水平表达相关性分析

应用 SPSS12.0 软件行相关性分析 (Bivariate 过程),在总体水平上 VEGF 与 SDF-1 两组指标数据之间存在正相关,其相关系数为 0.675, $P < 0.01$ (图 5)。

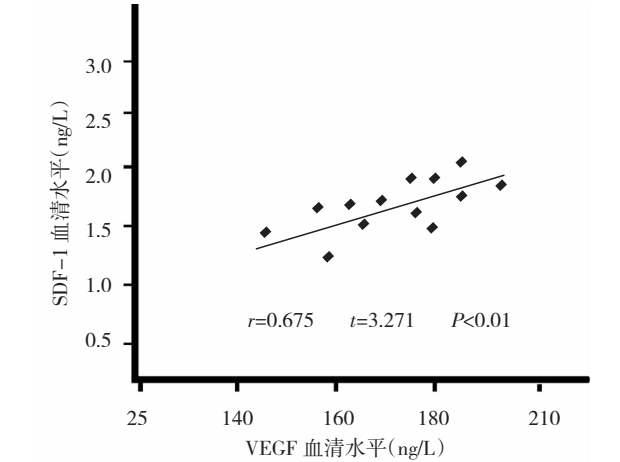


图 5 VEGF、SDF-1 血清水平表达的相关散点图

3 讨论

内皮祖细胞也叫成血管细胞,是一种成体干细胞,在出生后的个体外周血、骨髓及脐血中均存在 EPCs^[7]。传统观点认为血管生成只存在于胚胎时期的血管形成,但是近年来的证据表明血管生成亦存在于出生后的个体,即 EPCs 在出生后的组织中可以形成新生血管,目前认为血管结构可以通过内皮祖细胞迁移、分化形成,即血管发生^[8]。近年来日益增多的证据显示,通过各种途径向体内移植或动员机体自身的 EPCs 可以提高缺血组织的血管新生能力,促进损伤血管的再内皮化、抑制新生内膜的增生^[9,10],从而为组织工程化的带瓣管道材料内膜的内皮化提供了新思路。

本实验从外周血中应用梯度密度离心法和贴壁法结合分离单个核细胞,直接用添加生长因子的培养基进行诱导分化,在培养过程中先后出现纺锤形细胞、细胞集落、细胞首尾相连成条索状结构,然后细胞之间逐渐接触呈铺路石样外观,能摄取乙酰化 LDL (acLDL) 和结合 UEA-1,这些都是 EPCs 向内皮细胞分化过程中的特点,提示分离得到的贴壁细胞在生长因子的刺激下可以向内皮细胞分化^[11]。实验先鉴定具有内皮细胞系列特征的标志物 KDR,随后做干祖细胞特异性标志物 CD133 的免疫荧光鉴

定实验,以确保培养得到的混合细胞群含有大量 EPCs^[12]。

本实验观察到紫绀型先天性心脏病患儿外周血 EPCs 数量明显增加,较对照组增加了近 45%,其结果表明即使 10 mL 的外周血也可以分离出足够数量的内皮细胞和内皮祖细胞,经过约 2 周培养,细胞总数可以达到 10^8 以上。随后进一步对 EPCs 的功能进行增殖、黏附、迁移能力的检测,结果显示紫绀型先天性心脏病患儿 EPCs 的各种功能较对照组明显增强,完全可以满足血管或瓣膜组织工程对种子细胞的数量及功能要求。而且,自体血来源的内皮细胞和内皮祖细胞作为构建组织工程血管的种子细胞不存在排异反应,所以是非常理想的种子细胞来源^[13]。

为了更好地了解紫绀型先天性心脏病患儿外周血 EPCs 数量和功能变化的相关因素,根据紫绀型先天性心脏病的临床特点——体循环缺氧,我们检测了与缺氧有关的 VEGF, SDF-1 的血清水平,并进行了组间比较,进一步统计了数据之间的相关性,结果显示,在缺氧条件下,紫绀型先天性心脏病患儿血清的 VEGF 表达水平和血清的 SDF-1 表达水平明显上调,且 VEGF, SDF-1 的表达均显著高于对照组, SDF-1 的表达与 VEGF 的表达存在着明显的相关性。这一结果的得出提示 SDF-1 在发挥其生物学功能时可能直接或间接参与了血管新生。部分深入研究还发现,在 SDF-1 实现上调的过程中,同时可以伴随着 VEGF 的表达变化,这对于阐明 SDF-1 在实现造血调控中的具体机制及其在血管新生中的作用有着重要的意义,因为以往的研究已证明,VEGF 是具有代表性的血管促进因子,它可直接而特异地刺激血管内皮细胞,促使其增殖、分裂、移行,诱导新生血管的形成^[14]。由上述结果,可以推断, SDF-1 与 VEGF 之间可能构成了一个反馈调节的环路,两者之间相互影响,对各自的生物学功能起到了加强的作用,共同促进 EPCs 的数量和功能的变化^[15]。具体 SDF-1 与 VEGF 通过何种途径实现其相互影响,以及这种影响谁占据了主导地位,有待于进一步的深入研究。

本研究观察到紫绀型先天性心脏病患儿外周血 VEGF, SDF-1 的血清水平的变化与 EPCs 数量和功能变化一致,通过数据统计相关性的分析, VEGF, SDF-1 血清水平与 EPCs 数量和功能变化存在明显的相关性。导致紫绀型先天性心脏病患儿血清 VEGF, SDF-1 水平增高以及 EPCs 数量增加和功能增强确切机制尚不明确,可能包括以下途径:①在缺氧条件下,细胞内 HIF-1 降解受阻, HIF-1 在胞内

大量集聚并转移到细胞核中,通过核磷酸蛋白(重要的信号传导蛋白)将转录信号传给 VEGF,发挥其转录活性,诱导 VEGF 表达和其他一系列机体的缺氧反应,在基因水平上直接调控 VEGF 的表达,在转录水平上显著增加 VEGF 的表达和 VEGF mRNA 的稳定性,上调 VEGF 受体的表达,使得内皮对已经存在着的循环来源或旁分泌来源 VEGF 的敏感性增高,从而上调 VEGF 蛋白表达水平^[16];② VEGF 是 EPCs 的重要趋化因子,由于 VEGF 水平的升高,在 VEGF 的刺激下动员大量 EPCs 进入外周血。VEGF 是内皮细胞特异性刺激因子,对于内皮细胞或内皮祖细胞有特异性选择和促进生长作用。牛脑垂体提取物是我们应用的内皮刺激因子,其主要成分即包含 VEGF。由于 VEGF 对内皮祖细胞定向分化内皮细胞的显著作用, 10 ng/mL VEGF 培养液培养 14 d 后 63% ~ 85% 干细胞分化成成熟内皮细胞。一般认为 VEGF 通过细胞膜上的 VEGF-2 受体,激动蛋白激酶 B,再通过三磷酸肌醇激活后续的各种细胞内信号,启动细胞的生长分化。研究表明 VEGF 动员 EPCs 的机制是将内皮细胞一氧化氮合成酶磷酸化,促进骨髓内的基质细胞合成 NO, NO 的增多促使基质细胞和造血细胞分泌并激活基质金属蛋白酶-9(MMP-9),从而导致膜性干细胞因子(mKitL)转变可溶性 KIT 配体(sKitL)的释放, sKitL 推动干细胞巢内的 EPCs 进入细胞增殖周期,继而移入外周循环^[17];③研究证实:在 HIF-1 的诱导下,不仅可以出现 VEGF 的高表达, SDF-1 的表达也可以明显升高,而且增高的比例明显高于 VEGF; SDF-1 基因的表达受 HIF-1 的调控,而 SDF-1 有可能是 VEGF 的上游信号分子^[18]。由于 SDF-1 是由骨髓基质细胞及其他相关的间皮细胞和上皮细胞分泌释放的一种趋化因子,是骨髓造血微环境中参与造血调控的一个重要的细胞因子,在调控 EPCs 中具有强有力的作用, SDF-1 既参与了正常造血干祖细胞的回髓、定位、增殖,又通过与其受体 CXCR4 相互作用后,通过 Src 蛋白激酶家族、磷脂酰肌醇激酶(PI3K)等信号转导途径,介导整合素 VLA-1, VCAM-1 以及纤维黏连蛋白(FN)的相互作用,降低缺血组织氧张力,增加 CXCR4 祖细胞对缺血组织黏附、迁移、归巢,实现其调节骨髓中干/祖细胞的迁移和定位的功能^[19];④通过 VEGF/eNOS 相关通路,上调缺血组织的 VEGF 基因的表达,增加 EPCs 的增殖分化,间接动员骨髓内 EPCs 释放入外周血,促进 EPCs 从骨髓的动员和向缺血组织的趋化^[20];⑤ SDF-1 可提高 VEGF 水平和减少 EPCs 的凋亡。在缺氧状况下,上

述 VEGF 和 SDF-1 基因水平高表达,结果,VEGF 促进 EPCs 的动员,与此同时,SDF-1 促进循环 EPCs 黏附到缺血内皮并诱导 EPCs 的迁移,可显著动员骨髓 EPCs 进入外周血^[21];⑥许多研究表明 VEGF 本身就是一个促血管生长因子,它的促血管生成,可能是通过 EPCs 参与来完成;EPCs 在血管新生过程中具有重要作用,正是因为紫绀型先天性心脏病 EPCs 数量增加和功能增强,可能导致了紫绀型先天性心脏病患儿大量侧支新生血管的形成^[22]。

综上所述,紫绀型先天性心脏病患儿外周血 EPCs 数量及功能较对照组明显增加,同时 VEGF 和 SDF-1 血清水平也明显增加,上述变化存在相关性,利用循环 EPCs 的上述变化规律,结合紫绀型先天性心脏病最基本的病理特征——慢性缺氧,可以为构建组织工程带瓣管道提供自体种子细胞打下基础,这必将有助于复杂紫绀型先天性心脏病的外科治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration[J]. J Invest Med, 2003, 51(6):353-359.
- [2] Wilhelm C, Bal L, Smirnov P, Galy-Fauroux I, Clément O, Gazeau F, et al. Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled endothelial progenitor cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(26):3797-3806.
- [3] Rodriguez-Losada N, Garcia-Pinilla JM, Jimenez-Navarro MF, Gonzalez FJ. Endothelial progenitor cells in cell-based therapy for cardiovascular disease[J]. Cell Mol Biol, 2008, 54(1):11-23.
- [4] Khoo CP, Pozzilli P, Alison MR. Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications[J]. Regen Med, 2008, 3(6):863-876.
- [5] Smythe J, Fox A, Fisher N, Frith E, Harris AL, Watt SM. Measuring angiogenic cytokines, circulating endothelial cells, and endothelial progenitor cells in peripheral blood and cord blood: VEGF and CXCL12 correlate with the number of circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2008, 14(1):59-67.
- [6] Hoenig MR, Bianchi C, Rosenzweig A, Sellke FW. Decreased vascular repair and neovascularization with ageing: mechanisms and clinical relevance with an emphasis on hypoxia-inducible factor-1[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(8):754-767.
- [7] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors[J]. Nature, 2000, 408(6808):92-96.
- [8] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. Circ Res, 2004, 95(4):343-353.
- [9] Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/ endothelial nitric oxide synthase related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization[J]. Circulation, 2004, 109(20):2454-2461.
- [10] Rodriguez-Losada N, Garcia-Pinilla JM, Jimenez-Navarro MF, Gonzalez FJ. Endothelial progenitor cells in cell-based therapy for cardiovascular disease[J]. Cell Mol Biol, 2008, 54(1):11-23.
- [11] 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(5302):964-967.
- [12] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, 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(3):952-958.
- [13] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration[J]. Nat Med, 2003, 9(6):702-712.
- [14] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization[J]. Circulation, 2003, 107(9):1322-1328.
- [15] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med, 2004, 10(8):858-864.
- [16] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood, 2005, 105(2):659-669.
- [17] Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche Mmp-9 mediated release of Kit-ligand[J]. Cell, 2002, 109(5):625-637.
- [18] Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(10):2587-2597.
- [19] Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells[J]. Nat Immunol, 2005, 6(10):1038-1046.
- [20] Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes[J]. Circulation, 2003, 107(7):1024-1032.
- [21] Kortesidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells[J]. Blood, 2005, 105(10):3793-3801.
- [22] Wu H, Riha GM, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells[J]. J Surg Res, 2005, 126(2):193-198.

(本文编辑:吉耕中)