

过表达 Jagged1 促老龄大鼠来源内皮祖细胞增殖和迁移

朱光旭¹, 潘兴华¹, 宋明宝², 黄 岚², 庞荣清¹, 蔡学敏¹, 康华利²

(1. 成都军区昆明总医院临床实验科 云南省干细胞与组织工程中心, 云南省昆明市 650032;

2. 第三军医大学新桥医院全军心血管疾病研究所, 重庆市 430037)

[关键词] Jagged1; 内皮祖细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] 目的 探讨过表达 Jagged1 对老龄大鼠来源内皮祖细胞增殖和迁移能力的影响。方法 PBS 冲洗 1~2 月龄和 19~26 月龄 SD 大鼠股骨和胫骨骨髓, Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞, 应用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基差速贴壁法进行体外培养, 以 Dil-ac-LDL 与 FITC-UEA-1 荧光双染和 vWF 免疫组织化学染色进行鉴定。实验分为四组: 对照组 (未进行基因转染的老龄大鼠内皮祖细胞组)、PIRES2-EGFP 转染组、PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组和未转染的年轻大鼠来源内皮祖细胞组。荧光显微镜下计数 GFP 表达细胞数并计算转染效率; 免疫荧光、RT-PCR 和 Western blot 检测 Jagged1 mRNA 和蛋白表达; Transwell 培养和 MTT 法分别检测细胞迁移和增殖能力。结果 免疫组织化学、RT-PCR 和 Western blot 检测均显示转染后 Jagged1 显著增高, PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组 mRNA 和蛋白表达均较对照组显著增强 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 过表达 Jagged1 显著增强老龄大鼠来源内皮祖细胞迁移和增殖能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 过表达 Jagged1 增强老龄大鼠来源内皮祖细胞增殖和迁移能力。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Over-expression of Jagged1 Accelerates Aged Rat-derived Endothelial Progenitor Cells Proliferation and Migration

ZHU Guang-Xu¹, PAN Xing-Hua¹, SONG Ming-Bao², HUANG Lan², PANG Rong-Qing¹, CAI Xue-Min¹, and KANG Hua-Li²

(1. Department of Clinical Laboratory & Stem Cell and Tissue Engineering Center of Yunnan Province, PLA, Kunming General Hospital, Chengdu Military Area Command, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Cardiovascular Institute of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Jagged1; Endothelial Progenitor Cell; Cell Proliferation; Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Jagged1 over-expression on aged rat-derived endothelial progenitor cells migration and proliferation. **Methods** Mononuclear cells were obtained from bone marrow of young (1 to 2 month-old) and aged (19 to 26 month-old) Sprague-Dawley rats by Ficoll density gradient centrifugation and cultured with medium DMEM/F12, 48 h later, the suspending cells were translocated to be cultured in new flasks coated with fibronectin, the secondary attached cells were used to perform the further experiments. EPCs were characterized as double positive for Dil-ac-LDL uptake and lectin binding and cells were further identified by vWF expression. The experiments were divided into four groups: control group (aged rat-derived EPCs without gene transfection), PIRES2-EGFP transfection group, PIRES2-EGFP-Jagged1 transfection group and young rat-derived EPCs group in which transfection was also not performed. The GFP expression cell number was acquired through fluorescence microscope and transfection efficiency was calculated. Immunofluorescence, RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression respectively. Cell migration and proliferation were tested by Transwell culture and MTT assay respectively. **Results** Immunofluorescence showed that gene transfection markedly promoted Jagged1 expression; RT-PCR and Western blot demonstrated that Jagged1 mRNA and protein expression significantly increased in aged rat-derived EPCs ($P < 0.01$) compared

[收稿日期] 2012-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金(81170316)资助; 973 基础研究规划项目(2012CB518100)资助

[作者简介] 朱光旭, 博士, 副主任技师, 主要研究方向为干、祖细胞与血管损伤修复, E-mail 为 zhgxu2001@yahoo.com.cn。
通讯作者潘兴华, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为干细胞与组织工程, E-mail 为 xinghuapan@yahoo.com.cn。

with control; Over-expression of Jagged1 markedly enhanced aged rat-derived EPCs migration and proliferation compared with control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ respectively). rat-derived EPCs migration and proliferation.

Conclusion Over-expression of Jagged1 accelerates aged

内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)参与血管损伤修复已为大量研究证实^[1,2]。我们前期研究表明,EPC修复损伤血管具有年龄依赖特性,即年轻大鼠来源EPC较老龄大鼠来源者具有更好的增殖、迁移和分化能力^[3]。Notch信号是进化上高度保守,控制细胞增殖和迁移等细胞命运的信号系统,Notch受体为跨膜蛋白受体,通过Jagged1和Delta-like(Dll)家族配体作用激活^[4]。新近研究证实Jagged1在EPC活性调节上具有重要调节功能,应用Jagged1基因敲除小鼠研究表明,Jagged1缺乏导致EPC迁移、增殖和向内皮分化等能力减弱,并使EPC参与缺血组织血管再生能力降低^[5]。然而迄今尚不清楚Jagged1在EPC年龄依赖性生物学活性方面有何调节功能。本研究通过老龄大鼠来源EPC过表达Jagged1,探讨其在EPC年龄依赖性活性中的调节作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

SD大鼠(1~2月龄、19~26月龄大鼠,雌雄不限,无既往病史,喂养于湿度和温度适中、饮食良好的环境)由第三军医大学实验动物中心提供,所有动物实验经第三军医大学和成都军区昆明总医院伦理委员会批准。质粒PIRES2-Jagged1/EGFP由第三军医大学全军心血管研究所宋明宝博士惠赠,Jagged1 cDNA包含全长的大鼠Jagged1基因序列,PIRES-EGFP载体购自BD公司。LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司,DMEM/F12干粉培养基购自Hyclone公司,内皮细胞生长添加剂购自BD公司,优质胎牛血清购自PAA公司,Dil标记乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)购自Molecular Probe公司,FITC标记荆豆凝集素I(FITC-UEA-I)购自Vector公司,Ficoll液购自Amersham公司,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和MTT购自Sigma公司,山羊抗人假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、GAPDH、Jagged1抗体以及HRP标记的兔抗山羊IgG购自Santa Cruz公司。Transwell培养板为Corning公司产品,倒置荧光相差显微镜为Leica公司产品,HT-7000 Plus为PerkinElmer公司产品。

1.2 EPC的分离、培养及鉴定

EPC培养和鉴定参照课题组前期研究进行^[3]。脱臼处死SD大鼠,无菌取出股骨和胫骨,PBS冲洗骨髓,Ficoll液密度梯度离心(2000 r/min, 30 min)分离单个核细胞,PBS洗涤后,以含10% FBS的DMEM/F12(含内皮细胞生长添加剂100 mg/L,肝素100 mg/L,青霉素、链霉素各100 ku/L)重悬, $1.5 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种于75 cm²培养皿,37℃、5% CO₂条件培养,细胞贴壁48 h后转移未贴壁细胞悬液到新的经纤维连接蛋白包被的无菌培养瓶或培养板继续培养,使细胞再次贴壁生长,3天后弃未贴壁细胞,每3天换液一次。二次贴壁细胞在培养12天后,Dil-ac-LDL(10 mg/L)及FITC-UEA-I(10 mg/L)避光孵育,置荧光显微镜下观察。同时对培养的EPC行vWF染色:取培养细胞经PBS洗3次,每次1 min;0.04%戊醛固定15 min后室温干燥5 min,PBS洗3次,每次2 min;0.5% Triton X-100孵育20 min,PBS洗3次,每次2 min;3% H₂O₂孵育15 min,PBS洗3次,每次2 min;封闭血清(1:20)孵育20 min,吸去多余的封闭血清,抗vWF(1:100)4℃孵育过夜,PBS洗3次,每次5 min;FITC标记二抗(1:200)37℃孵育30 min,PBS洗3次,每次5 min,完毕后每孔加入50 μL PBS,以未加二抗作为阴性对照。

1.3 脂质体介导的基因转染

二次贴壁EPC培养达到70%~80%汇合时,按照LipofectamineTM 2000说明对老龄大鼠来源EPC进行转染,即用100 μL OPTi-MEM稀释Lipofectamine(6 μL)和DNA(1.5 μg),混匀,室温放置5~10 min,将脂质体-DNA复合体加入到24孔板培养的EPC后孵育6 h,PBS清洗后重新用含10% FBS的DMEM/F12培养基进行培养。转染实验分为四组:对照组(未进行基因转染的老龄大鼠EPC组)、PIRES2-EGFP转染组、PIRES2-EGFP-Jagged1转染组、未转染的年轻大鼠来源EPC组。转染18 h后,200倍倒置荧光显微镜下计数细胞数,并在同一视野在激发波长为488 nm的荧光条件下检测GFP的表达,计数5个视野表达绿色荧光的细胞数和总细胞数,计算转染细胞率。

1.4 RT-PCR检测细胞Jagged1表达

转染后72 h,按Tripure说明书进行总RNA提取,在A₂₆₀/A₂₈₀条件下进行RNA纯度鉴定和定量,

并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步确认 RNA 质量。取总 RNA 3.2 μg 逆转录合成 cDNA 后进行半定量 PCR 反应,以 GAPDH 作内参照。反应条件为 95℃ 变性 30 s $\rightarrow$ 58℃ 退火 30 s $\rightarrow$ 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后,72℃ 延伸 7 min。Jagged1 引物序列:上游 5'-GAG GCA TGG GAT TCC AGT AA-3',下游 5'-GCA GGT TTT GTT GCC ATT CT-3',目标片段 252 bp;GAPDH 引物序列:上游 5'-GGT GAT GCT GGT GCT GAG TA-3',下游 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3',目标片段 369 bp;29 个循环,退火温度 55℃。反应结束后各取 PCR 产物 4 μL 进行 1.7% 琼脂糖电泳,并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描,目的片段与 GAPDH 光密度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量。

1.5 Western blot 检测 Jagged1 表达

转染后 72 h,用 4℃ 预冷的 PBS 洗细胞 3 次,加入预制的含 PMSF 裂解液,冰上裂解 30 min,裂解后,将细胞碎片和裂解液移至离心管。4℃、16000 r/min 离心 20 min,收集上清,取少量测蛋白浓度,取等量预处理的蛋白样品上样,恒压 81 V 进行 SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉-PBST 室温封闭 1 h 后,加入山羊抗人 Jagged1 抗体(1:1000)、山羊抗人 GAPDH(1:1000),4℃ 孵育过夜,再与 HRP 标记的兔抗山羊 IgG,于 37℃ 孵育 1 h,化学发光显色后用凝胶成像系统扫描,半定量分析显影带,目的蛋白量以 GAPDH 相对量表示。

1.6 EPC 迁移能力检测

转染后 72 h,0.25% 胰酶消化,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基(含青霉素、链霉素各 100 ku/L,不含 ECG 和不加任何生长因子)1500 r/min 洗 3 次,再用该培养基配制成细胞悬液,将含 VEGF (50 $\mu\text{g/L}$) 50 μL 的 DMEM/F12 培养基(含青霉素、链霉素各 100 ku/L,不含 ECG 和不加任何生长因子)加入 Transwell 培养板下室,将配制好的 50 μL 含 2×10^4 个 EPC 的细胞悬液注入上室,培养 24 h,刮去滤膜上面未迁移细胞,将 Transwell insert 置入 95% 乙醇中固定 10 min,Giemsa 染色,高倍显微镜下每张膜上随机选择 6 个视野(200 $\times$),并拍照,计数迁移到低层的细胞数。

1.7 EPC 增殖能力检测

转染后 72 h,0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 洗 3 次,以含的 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基(含内皮细胞生长添加剂 100 mg/L,肝素 100 mg/L,青霉素、链霉素各 100 ku/L)分别配成 $10^5/\text{L}$ 细胞悬液,以每孔 100 μL 接种于纤维连接蛋白包被 96 孔板,培养

24 h 后 PBS 轻轻洗去未贴壁细胞,待生长速度最快的 EPC 铺满孔底约 90% 后,MTT 法检测细胞增殖活性,以无血清培养基培养作为空白对照,方法是:每孔加入 MTT(5 $\mu\text{g/L}$) 20 μL 后 37℃ 继续孵育 4 h,弃上清,各孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),室温震荡 10 min,以 DMEM 培养液调零,HT-7000 Plus 多孔读数仪,于 492 nm 读取光密度值。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采取双尾分布和双样本等方差假设进行 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养的骨髓 EPC 特征

经二次贴壁培养的骨髓 EPC 大多呈梭形或卵圆形,二次贴壁后第 3 天可见明显索状生长结构(图 1A),培养第 14 天细胞渐呈汇合生长状态(图 1B)。形态上年轻组 EPC 较老年大鼠来源更为均一,贴壁细胞数及细胞增殖速度均明显高于老年组。培养 12 天,免疫荧光染色可见培养的 EPC,vWF 染色后可见部分 vWF 表达(图 1C)。培养 12 天后进行了 FITC-UEA-I(图 1E)和 Dil-ac-LDL(图 1F)双荧光染色,随机挑选 5 个视野计数双染阳性细胞百分率,结果显示双染阳性率为 $80.40\% \pm 6.95\%$ 。

2.2 转染后 Jagged1 在 EPC 中的表达

转染后 18 h,荧光显微镜下观察到 PIREs2-EGFP 转染组、PIREs2-EGFP-Jagged1 转染组均见 EGFP 表达(图 2B),其中 PIREs2-EGFP 转染组、PIREs2-EGFP-Jagged1 转染组 EGFP 表达未见明显差异,而对照组未见有 EGFP 表达(图 2A),转染效率大约 40%。转染后 72 h,免疫组织化学染色显示在 PIREs2-EGFP-Jagged1 转染组 Jagged1 表达显著增强(图 2E),而 PIREs2-EGFP 转染组(图 2C)和对照组(图 2D)仅见微弱 Jagged1 表达;在未转染的年轻大鼠来源 EPC 组中可见有较强 Jagged1 表达(图 2F)。

RT-PCR 检测显示,Jagged1 mRNA 在 PIREs2-EGFP-Jagged1 转染组和未转染的年轻大鼠来源 EPC 组表达均显著高于 PIREs2-EGFP 转染组和对照组(0.92 ± 0.09 和 0.87 ± 0.01 比 0.31 ± 0.09 和 0.29 ± 0.05 , $P < 0.01$)。Western blot 检测显示,Jagged1 在 PIREs2-EGFP-Jagged1 转染组和未转染的年轻大鼠来源 EPC 组的表达显著高于 PIREs2-EGFP 转染组和对照组(0.374 ± 0.024 和 0.381 ± 0.03 比 0.139 ± 0.021 和 0.141 ± 0.012 , $P < 0.01$;图 3)。

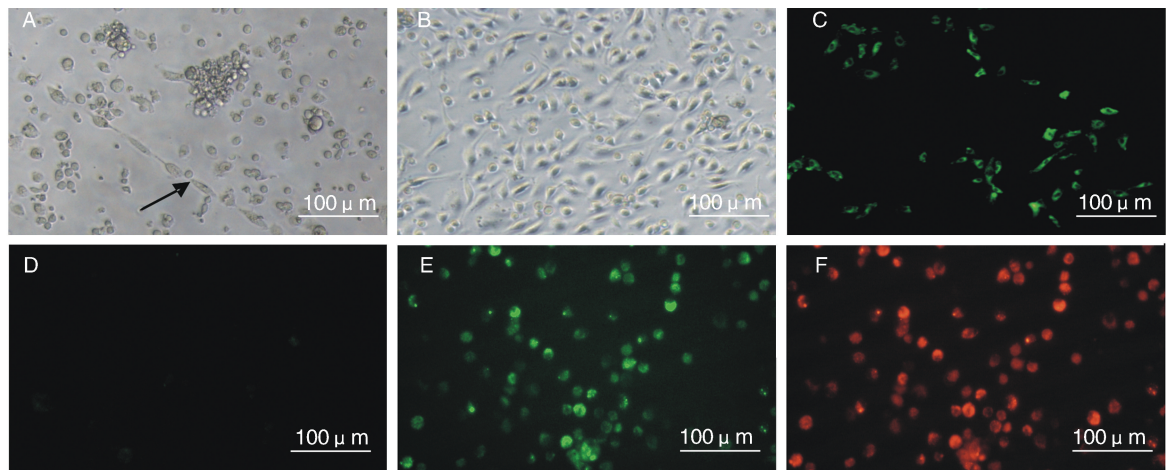


图 1. 骨髓源性 EPC 生长特征

Figure 1. Characteristics of bone marrow derived EPC

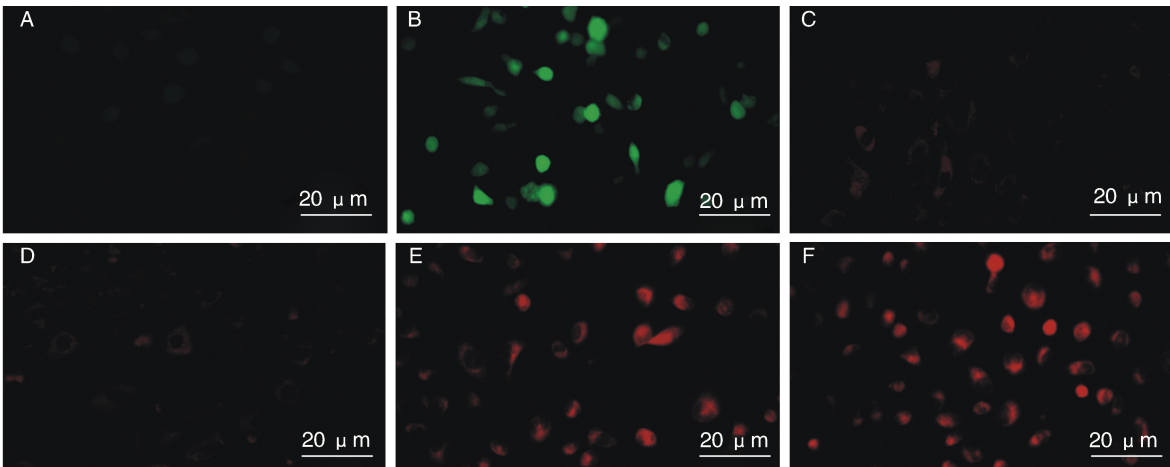


图 2. 转染后 EGFP 和 Jagged1 在 EPC 中的表达

Figure 2. EGFP and Jagged1 expression in EPC after gene transfection

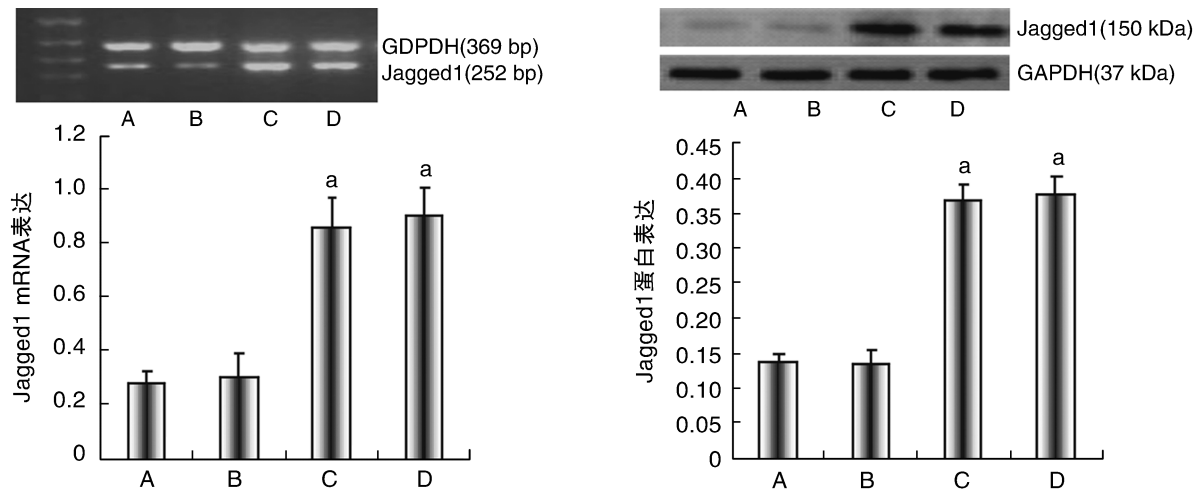


图 3. RT-PCR 和 Western blot 检测转染后 Jagged1 mRNA 和蛋白在 EPC 中的表达 ($n=4$) A 为对照组, B 为 PIRES2-EGFP 转染组, C 为 PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组, D 为未转染的年轻大鼠来源 EPC 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组和 PIRES2-EGFP 转染组比较。

Figure 3. Jagged1 mRNA and protein expression in EPC after gene transfection were detected by RT-PCR and Western blot

2.3 Jagged1 过表达增强老龄大鼠来源 EPC 迁移能力

PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组每个视野(200 ×)迁移细胞数为 48.5 ± 6.12,未转染的年轻大鼠来源 EPC 组迁移细胞数为 50.7 ± 6.12,PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组和未转染的年轻大鼠来源 EPC 组迁移细胞数显著高于而对照组和 PIRES2-EGFP 转染组(迁移细胞数分别为 31.5 ± 7.21 和 33.4 ± 6.25, $P < 0.05$),PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组与未转染的年轻大鼠来源 EPC 组间迁移细胞数未见显著差别(图 4)。

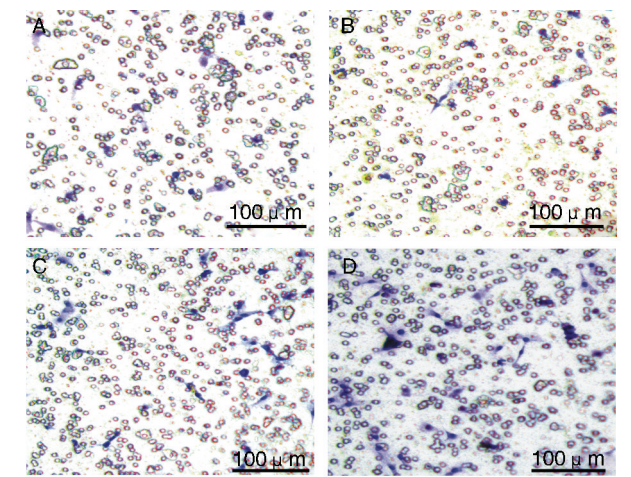


图 4. Jagged1 过表达增强老龄大鼠来源 EPC 迁移能力($n = 6$) A 为对照组,B 为 PIRES2-EGFP 转染组,C 为 PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组,D 为未转染的年轻大鼠来源 EPC 组。a 为 $P < 0.05$,与对照组和 PIRES2-EGFP 转染组比较。

Figure 4. Over-expression of Jagged1 promotes aged rat-derived EPC migration

2.4 Jagged1 转染促进老龄大鼠来源 EPC 增殖

MTT 检测显示,PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组 490 nm OD 值为 1.06 ± 0.09,显著高于对照组和 PIRES2-EGFP 转染组的 OD 值(分别为 0.66 ± 0.05 和 0.69 ± 0.08, $P < 0.01$);未转染的年轻大鼠来源 EPC 组 OD 值(1.07 ± 0.08)与 PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组未见显著差别。

3 讨论

EPC 也称内皮前体细胞,主要存在于骨髓及外周血,大量研究已证实 EPC 在组织和血管损伤时可动员入外周血,归巢至损伤部位,分化为成熟内皮细胞(endothelial cell,EC)参与血管重建和血管损伤内膜修复^[6-8]。Notch 信号是在进化上高度保守、控制细胞增殖、迁移等细胞命运的信号转导系统,Jag-

ged1 是该信号途径的配体之一,可激活细胞膜 Notch 信号受体引起受体构象改变后裂解,产生的细胞内结构域释放后转位到细胞核,在核内与转录抑制子 CBF1 结合,启动 Notch/CBF1 调节的下游基因转录,从而调控增殖和分化等细胞活性^[4]。新近研究表明,Jagged1 在 EPC 活性调节上可能具有重要调节作用。Kwon 等^[9]应用 Jagged1 基因敲除小鼠研究证实,Jagged1 缺乏可导致 EPC 参与的缺血组织血管再生能力降低,通过邻近的间质细胞过表达 Jagged1 促进 EPC 参与损伤组织内血管新生。但是目前已有的文献研究远不足以阐明 Jagged1 调节 EPC 生物学活性的详细机制。

我们的前期研究已证实,EPC 活性与供者年龄相关,年轻大鼠来源 EPC 较老龄大鼠来源者具有更好的增殖、迁移和分化等能力,其参与修复损伤血管作用具有年龄依赖性的特点^[3]。本研究使用年轻大鼠来源 EPC 作对照,同样观察到类似的结果。研究发现老龄大鼠和年轻大鼠来源 EPC 均表达 Jagged1,但是老龄大鼠来源 EPC 的 Jagged1 表达显著低于年轻大鼠 EPC。Wu 等^[10]应用培养的 EC 检测表明 Jagged1 在成熟 EC 中表达也具有类似特点,即老龄大鼠 EC 表达 Jagged1 也显著低于年轻大鼠 EC。Jagged1 在老龄大鼠来源 EPC 和 EC 表达较年轻大鼠来源者显著下降,其原因有待进一步研究阐明。现有的这些研究结果提示在 EPC 向 EC 分化修复损伤血管内膜过程中 Jagged1 可能年龄依赖性调控了 EPC 的生物学功能。本研究应用基因转染技术,以年轻大鼠来源 EPC 为对照,通过增强老龄大鼠来源 EPC 内 Jagged1 表达来探讨其对 EPC 增殖和迁移的调控作用。

转染后观察到 PIRES2-EGFP 转染组、PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组均有 EGFP 表达,荧光免疫组织化学检测显示 PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组 Jagged1 表达显著增强,表明转染后 Jagged1 已成功表达于老龄大鼠来源 EPC;mRNA 和蛋白检测进一步证实老龄大鼠来源 EPC 转染后 Jagged1 表达显著增强。研究发现 PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组 EPC 迁移细胞数显著高于对照组和 PIRES2-EGFP 转染组,表明 Jagged1 过表达可显著增强老龄大鼠来源 EPC 迁移能力。细胞增殖活性检测显示,PIRES2-EGFP-Jagged1 转染组 490 nm OD 值也显著高于对照组和 PIRES2-EGFP 转染组,说明 Jagged1 过表达可以显著促进老龄大鼠来源 EPC 增殖。同时也观察到年轻大鼠来源 EPC 在增殖和迁移能力上均显著高于老龄大鼠来源

EPC, 与我们前期研究结果一致^[3]。Jagged1 在老龄和年轻大鼠来源 EPC 表达量不同, Jagged1 过表达又显著促进老龄大鼠来源 EPC 增殖和迁移, 表明 Jagged1 年龄依赖性调控了 EPC 增殖和迁移, 老龄大鼠来源 EPC 修复血管损伤内膜较年轻大鼠来源的 EPC 能力显著减弱, 可能与 Jagged1 表达不足相关联。

EPC 修复血管损伤内膜是一极其复杂的生理过程, 受多种因素调节^[11,12]。尽管已有大量文献研究证实 EPC 可促进损伤血管内膜再生和抑制新生内膜形成, 但是有关其修复损伤血管内膜详细调节机制的文献报道并不多见。Kamei 等^[12]证实 Jagged1 在调节 EPC 相关的血管发育过程中起重要作用, 与 Jagged (-/-)EPC 相比, Jagged (+/+)EPC 不仅显示较强的促血管再生效应, 且能促进正常血管形态上的稳定性; 国内孟晓等^[13]也发现 Notch 信号活化有助于 EPC 向 EC 分化。然而在对成熟 EC 的研究中发现, Notch1 信号活化却抑制 EC 增殖和迁移^[14]; Nosedo 等^[15]研究也表明, Jagged1 激活 Notch1 后通过抑制 p21Cip1 表达阻抑 EC 增殖, 这与该信号调节 EPC 活性的相关研究结果似乎存在矛盾, 揭示 Jagged1 激活 Notch1 信号在 EPC 和 EC 活性调节中可能存在有不同的机制, 在 EPC 在向成熟 EC 分化修复损伤血管内膜过程中该信号系统存在调节功能的转变, 其机制尚需深入研究阐明。尽管本次研究显示 Jagged1 年龄依赖性调节了 EPC 增殖和迁移细胞活性, 但也仅限于离体研究结果, 尚需进一步在体的研究加以证实。

[参考文献]

- [1] Duckers HJ, Soullie T, den Heijer P, et al. Accelerated vascular repair following percutaneous coronary intervention by capture of endothelial progenitor cells promotes regression of neointimal growth at long term follow-up; final results of the Healing II trial using an endothelial progenitor cell capturing stent (Genous R stent)[J]. *EuroIntervention*, 2007, 3 (3): 350-358.
- [2] Thum T, Hoerber S, Froese S, 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 (3): 434-443.
- [3] Zhu G, Song M, Wang H, et al. Young environment reverses the declined activity of aged rat-derived endothelial progenitor cells: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Ann Vasc Surg*, 2009, 23 (4): 519-534.
- [4] Caolo V, Schulten HM, Zhuang ZW, et al. Soluble Jagged-1 inhibits neointima formation by attenuating Notch-Her2 signaling[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (5): 1 059-065.
- [5] Kwon SM, Eguchi M, Wada M, et al. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization [J]. *Circulation*, 2008, 118 (2): 157-165.
- [6] 蒋惠新, 彭仕友, 何小解. 肾毒血清对骨髓内皮祖细胞增生及血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21 (16): 1 836-840.
- [7] Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function[J]. *Circ Res*, 2002, 90 (10): E89-93.
- [8] 赵薇, 杨向红. C 反应蛋白对大鼠骨髓内皮祖细胞参与血管形成的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (2): 105-109.
- [9] Kwon SM, Eguchi M, Wada M, et al. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization [J]. *Circulation*, 2008, 118 (2): 157-165.
- [10] Wu X, Zhou Q, Huang L, et al. Ageing-exaggerated proliferation of vascular smooth muscle cells is related to attenuation of Jagged1 expression in endothelial cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77 (4): 800-808.
- [11] 王爱民, 雷闽湘, 刘泽灏, 等. 胰岛素和葡萄糖对 2 型糖尿病患者外周血内皮祖细胞分化增殖的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21 (5): 617-625.
- [12] Kamei N, Kwon SM, Ishikawa M, et al. Endothelial progenitor cells promote astrogliosis following spinal cord injury through Jagged1-dependent Notch signaling[J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29 (9): 1 758-769.
- [13] 孟晓, 宋颖, 刘云鹏, 等. 大鼠骨髓源内皮祖细胞分化过程 Notch 信号通路活化及榄香烯干预机制的探讨[J]. *肿瘤防治杂志*, 2012, 19 (7): 489-493.
- [14] Liu ZJ, Xiao M, Balint K, et al. Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1[J]. *FASEB J*, 2006, 20 (7): 1 009-011.
- [15] Nosedo M, Chang L, McLean G, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (20): 8 813-822.

(此文编辑 文玉珊)