

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-03-0238-06

CXCR4 基因过表达 HUCB-late EPCs 移植对大鼠后肢缺血组织血管新生的影响

张百灵¹, 王照飞², 张航¹, 何晋¹, 郑昭芬¹, 彭建强¹

(1.湖南省人民医院心内科, 湖南省长沙市 410005; 2.长沙市第一人民医院心内科, 湖南省长沙市 410005)

[关键词] 趋化因子受体 4; 后肢缺血模型; 血管新生

[摘要] **目的** 观察转染 rAAV₆-CXCR4 和 rAAV₆-GFP 后,初步探索其是否对 HUCB-late 内皮细胞(EPCs)的体外成血管能力及体内缺血组织血管新生有影响。**方法** 用 rAAV₆-CXCR4、rAAV₆-GFP 感染 HUCB-late EPCs, Western Blot 检测 CXCR4 蛋白表达水平;应用基质胶成血管实验检测转染后细胞的体外成血管能力。构建 SD 大鼠后肢缺血模型,以一侧股动脉及分支结扎、离断的方法构建后肢缺血模型;18 只大鼠建模成功后随机摸球法分为 3 组。空白组:损伤后 6 h 于局部注射 500 μ L EGM-2;对照组:损伤后 6 h 于局部注射 500 μ L 含 1×10^6 个 HUCB-late EPCs 的 EGM-2;实验组:损伤后 6 h 于局部注射 500 μ L 含 1×10^6 个 CXCR4 过表达 HUCB-late EPCs 的 EGM-2。28 天后,HE 染色检测缺血后肢肌肉间、肌肉旁微小血管情况;免疫组织化学染色检测肌肉间、肌肉旁新生血管 CD31 阳性内皮细胞的表达情况,并计算 CD31 阳性新生微血管数量。**结果** rAAV₆-CXCR4 感染组 HUCB-late EPCs 中 CXCR4 蛋白的表达高于 rAAV₆-GFP 感染组和对照组。3 组体外成血管能力差异无统计学意义($P>0.05$)。体内实验,与空白组、对照组比较,实验组新生微血管表达的 CD31⁺ 内皮细胞明显增多($P<0.05$)。**结论** CXCR4 过表达的 HUCB-late EPCs 可以促进 SD 大鼠后肢缺血组织新生微血管的形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of revascularization on human umbilical cordblood-derived endothelial progenitor cells with CXCR4 over-expressed in hind limb ischemic tissue

ZHANG Bai-Ling¹, WANG Zhao-Fei², ZHANG Hang¹, HE Jin¹, ZHENG Zhao-Fen¹, PENG Jian-Qiang¹

(1. Department of Cardiology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Department of Cardiology, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China)

[KEY WORDS] Chemokine receptor-4; Hind limb ischemic model; Neovascularization

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the ability of capillary network formation of HUCB-late EPCs in vitro and in rat hind limb ischemic tissues, after transfected with rAAV-CXCR4 and rAAV-GFP. **Methods** HUCB-late EPCs were infected with rAAV₆-CXCR4, rAAV₆-GFP, and the expression of CXCR4 protein was detected by Western Blot analysis. In vitro, evaluate the ability of capillary network formation on Matrigel between the three groups. The mode of mouse hind limb ischemia was set up, by ligating the femoral artery and its branches. Following successful establishment, 18 rats were divided into three groups randomly: blank group were intramuscularly injected with 500 μ L EGM-2 at 6 hours following injury, and control group were intramuscularly injected with 500 μ L EGM-2 at 6 hours following injury (contain 1×10^6 non-gene transfected HUCB-late EPCs), and experiment group were intramuscularly injected with 500 μ L EGM-2 at 6 hours following injury (contain 1×10^6 CXCR4-gene transfected HUCB-late EPCs). After 28 days, capillary network in hind limb muscles and next to muscles were detected by HE stain assay, and CD31 expressed in neovascularization endothelial cells were detected by immune histochemistry assay, and calculate the number of CD31 positive neovascularization, and calculate the number of CD31 positive neovascularization. **Results** Compared with infected rAAV6-GFP and non-infected group, the expression of CXCR4 protein was up-regulated after infected rAAV₆-CXCR4. In vitro, there is no significance of tube area in unit area among three types of HUCB-late EPCs ($P>0.05$).

[收稿日期] 2016-07-22

[修回日期] 2017-01-05

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金课题(C2012-011);湖南省教育厅科研项目(15C0828)

[作者简介] 张百灵,硕士研究生,研究方向为内皮祖细胞及其基因改造,E-mail 为 47746115@qq.com。通讯作者郑昭芬,博士,主任医师、教授,研究方向为心肌缺血的再生研究,E-mail 为 zhaofenz@foxmail.com。

In the mode of mouse hind limb ischemia, compared with blank group and control group, CD31 positive cells of new capillary network in experimental group increased obviously ($P < 0.05$). **Conclusion** CXCR4 over-expression of HUCB-late EPCs could promote neovascularization in rat hind limb ischemic tissues.

血管再生(revascularization)是缺血性疾病治疗的关键。血管再生主要有两种方式:一种由血管壁中分化成熟的内皮细胞增殖、迁移而来即血管生成(angiogenesis);另一种由具有同一起来源的造血干细胞(hematopoietic stem cells)及成血管细胞(angioblasts)参与的血管发生(vasculogenesis)。早期研究认为,血管发生并不参与成体新生血管的形成。但 1997 年,研究发现一种可增殖分化为血管内皮细胞的 CD34⁺单个核细胞即内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)^[1],不仅可以通过血管发生的形式参与成体新生血管的形成^[2],而且在缺血组织的血管新生和损伤内皮的修复方面起着重要作用^[3-5]。

研究显示 CXCR4 在内皮祖细胞的增殖、迁移和黏附中起到了关键作用^[6]。因而, SDF-1/CXCR4 信号轴在动员骨髓源干/祖细胞和促进其归巢到缺血或损伤组织中可能发挥重要作用。正常人外周血有足够 CXCR4⁺EPCs,但对于冠心病的患者而言,其外周血 CXCR4⁺EPCs 含量明显减少^[7],因此,单纯内皮祖细胞移植对冠心病缺血组织的效果修复不佳。体内移植过表达 CXCR4 的人类脐带血晚期内皮祖细胞(HUCB-late EPCs)能否促进急性肢体缺血大鼠模型的组织修复值得研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

经基因改造的 HUCB-late EPCs,由本课题组前期实验合成^[8];成年雄性 SD 大鼠 18 只,体重 0.30~0.35 kg,购于上海斯莱克实验动物有限公司;Anti-CD31 兔克隆抗体购自上海艾博抗贸易有限公司, CXCR4 鼠抗人多抗购自博士德公司。DBA 试剂购自北京中杉生物技术有限公司。

1.2 实验分组

体外实验分组:①对照组(未感染病毒的 HUCB-late EPCs);②rAAV6-GFP 组(即表达绿色荧光蛋白的 HUCB-late EPCs);③rAAV6-CXCR4 组(即过表达 CXCR4 的 HUCB-late EPCs),检测 late EPCs 的 CXCR4 表达及体外成血管能力。

体内实验分组:选取 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只。①空白组(只移植 EGM-2);②对照组(移植含有 HUCB-late EPCs 的 EGM-2);③实验组(移植含有 CXCR4 过表达

HUCB-late EPCs 的 EGM-2)。检测各组肌肉间及肌肉旁微血管情况。

1.3 Western Blot 检测 HUCB-late EPCs CXCR4 表达

制备蛋白样品,按 BCA 试剂盒步骤进行蛋白定量后,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, PVDF 膜转膜后,用一抗鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体冰上孵育过夜,漂洗 3 次后用辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育,漂洗后,化学显影,胶片图像分析结果。

1.4 基质胶法检测转染后细胞的成血管能力

制作 matrigel 胶,将感染 rAAV₆-CXCR4、rAAV₆-GFP 和未感染组的 EPC 用胰蛋白酶消化后用 EGM-2 培养基重悬细胞,每孔细胞数约 3×10^4 个,每组设置 3 个复孔。37 °C 孵育 2~8 h,随时观察,倒置显微镜下,选取上下左右中 5 个视野观测微血管网形成情况,并参照 Hur 等^[9]方法应用 ImagePro Plus6.0 图像分析软件计算单位基质胶上所形成的管腔面积。

1.5 模型制备

6 周龄雄性 SD 大鼠 18 只,SD 大鼠称重后,腹腔注射 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉。参照 Yang 等^[10]方法以一侧大腿股动脉及分支结扎、离断的方法构建后肢缺血模型。

术后 6 h 后进行细胞移植,18 只大鼠建模成功后随机摸球法分为 3 组。空白组:于局部肌注 500 μ L EGM-2;对照组:于局部肌注 500 μ L 含 1×10^6 个 HUCB-late EPCs 的 EGM-2;实验组:于局肌注 500 μ L 含 1×10^6 个 CXCR4 过表达 HUCB-late EPCs 的 EGM-2。连续观测 28 天,观察各组后肢运动能力、肢体颜色、有无肢体脱落等情况。28 天后,脱颈法处死动物,立即取缺血后肢腓肠肌,4%多聚甲醛固定。

1.6 免疫组织化学染色法检测肌肉间、肌肉旁血管和新生血管内皮细胞内 CD31⁺表达

取出后腿肌肉组织,制成石蜡切片,脱蜡、水化后进行抗原修复,进行免疫反应,DAB 显色后,中性树脂封片保存。采用 Weidner 等^[11]制订的方法即确定组织孤立的棕黄色血管内皮细胞或细胞簇代表一条单独的微血管,每张片子随机选取 3 个视野,计数其中所有染色的微血管。

1.7 统计分析

采用 SPSS13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据进行正态性检验、方差齐性检验,若方差齐性用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较多个样均数,

再用 SNK 法进行多样本之间的两两比较,方差不齐采用 DunnettT3 进行多样本之间的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组 late EPCs 中 CXCR4 的表达

从图 1 和图 2 可见, rAAV₆-CXCR4 组 HUCB-late EPCs 中 CXCR4 蛋白的表达高于 rAAV₆-GFP 组和对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。rAAV₆-GFP 组与对照组相比, HUCB-late EPCs 中 CXCR4 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

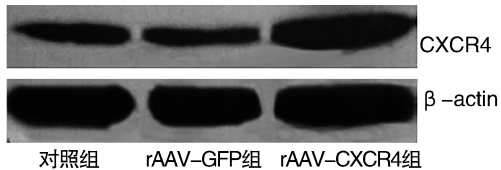


图 1. 三组 CXCR4 蛋白表达 Western Blot 结果

Figure 1. Three types of expression of CXCR4 protein by Western Blot

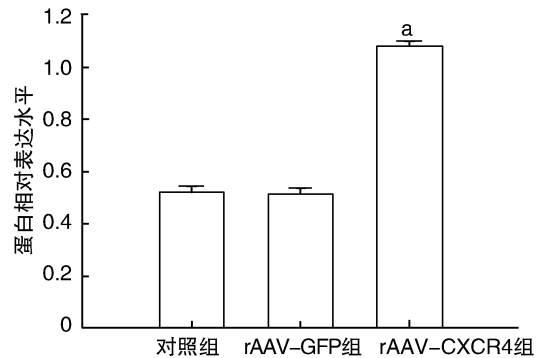


图 2. 三组 HUCB-late EPCs 中 CXCR4 的表达量 a: $P < 0.05$, 与 rAAV₆-GFP 组及对照组比较。

Figure 2. The amount of expression of CXCR4 protein in three groups of cells

2.2 各组 HUCB-late EPCs 体外成血管能力的比较

如图 3 所示, 各组 HUCB-late EPCs 均能在基质胶上成功形成血管样结构。图 4 显示 rAAV₆-CXCR4 组、rAAV₆-GFP 组、对照组在单位面积中形成的管样面积无显著差异 ($P > 0.05$), 提示三者的成血管能力无明显差别。

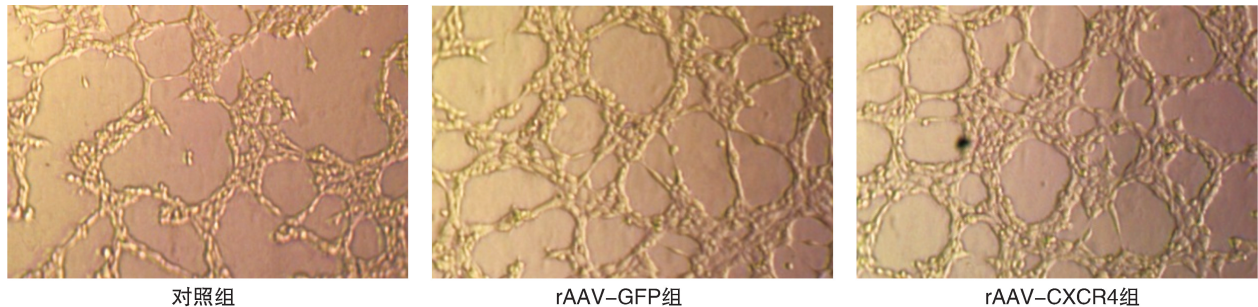


图 3. 三组细胞的体外成血管结构图 ($\times 100$)

Figure 3. Structure of three groups of cells into blood vessels in vitro ($\times 100$)

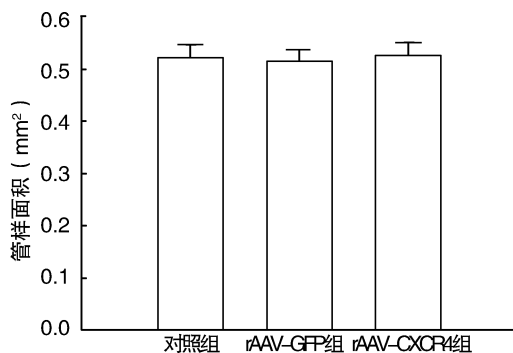


图 4. 三组细胞的体外成血管面积

Figure 4. Area of three groups of cells into blood vessels in vitro

2.3 不同处理后缺血肢体的表现改变

结扎 2 h 后, 手术侧肢体发白 (图 5A)。空白组大鼠 6 天后开始出现肢体末端发黑 (图 5B), 且手术伤口肌肉可见部分坏死, 其中 2 只大鼠于 10~14 天左右出现肢体末端脱落 (图 5C)。对照组和实验组未出现肢体末端发黑及脱落情况, 实验组手术伤口愈合早于对照组 2.6 天 (2~3 天), 14 天以后两者手术侧后肢的运动能力及颜色无明显差异。空白组手术侧肢体与非手术侧肢体比较, 手术侧肢体仍有跛行且伤口愈合不完全 (图 5D)。

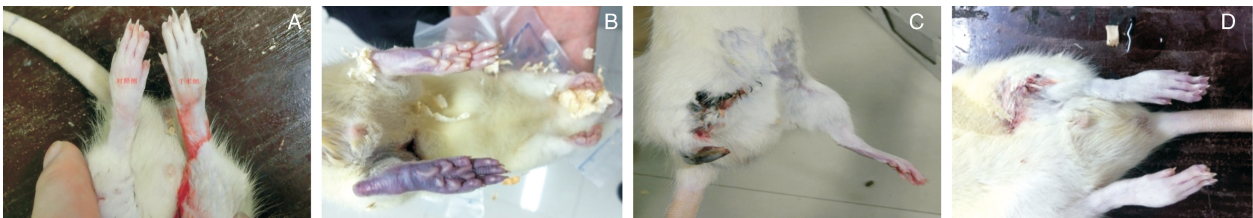


图 5. 不同处理后缺血肢体的表现改变 A: 结扎后 2 h; B: 空白组术后 6 天; C: 空白组术后 6 天; D: 空白组术后 14 天。

Figure 5. Surface appearance of ischemic limb after different treatment

2.4 各组肌肉间及肌肉旁微血管情况

HE 染色镜下可见, 实验组和对照组肌肉间和肌肉旁微血管数量比空白组多(图 6)。

2.5 各组 CD31⁺表达的新生微血管变化

CD31⁺染色呈棕褐色, 主要表达于肌肉间和肌肉旁血管内皮细胞。与空白组比较, 对照组和实验

组 CD31⁺表达的新生微血管明显增多, 实验组新生微血管表达数量较对照组多, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) 而每组肌肉旁与肌肉间比较, 肌肉旁新生血管数量明显多于肌肉间, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 7, 表 1)。

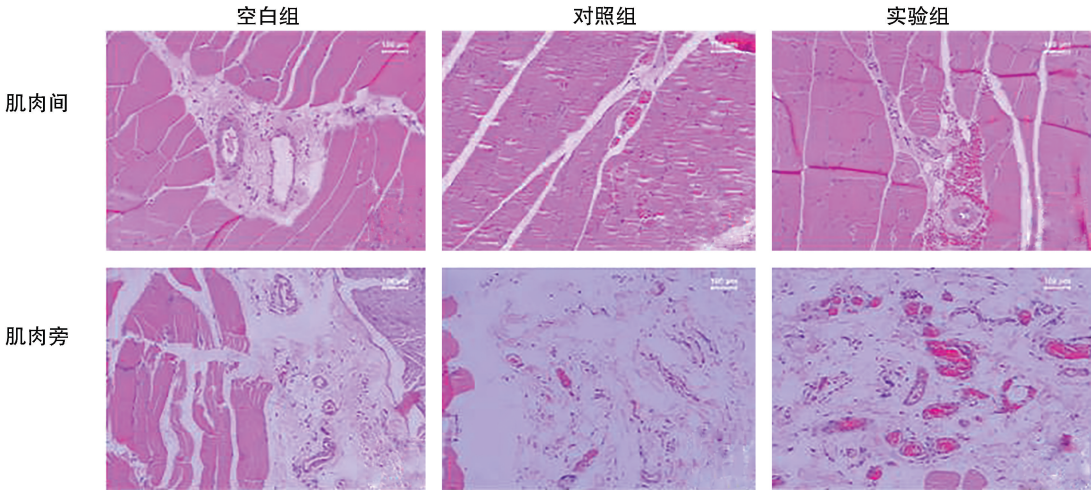


图 6. 大鼠缺血后肢肌肉间和肌肉旁微血管情况(×100)

Figure 6. The number of neovascularization in hind limb muscles and next to muscles(×100)

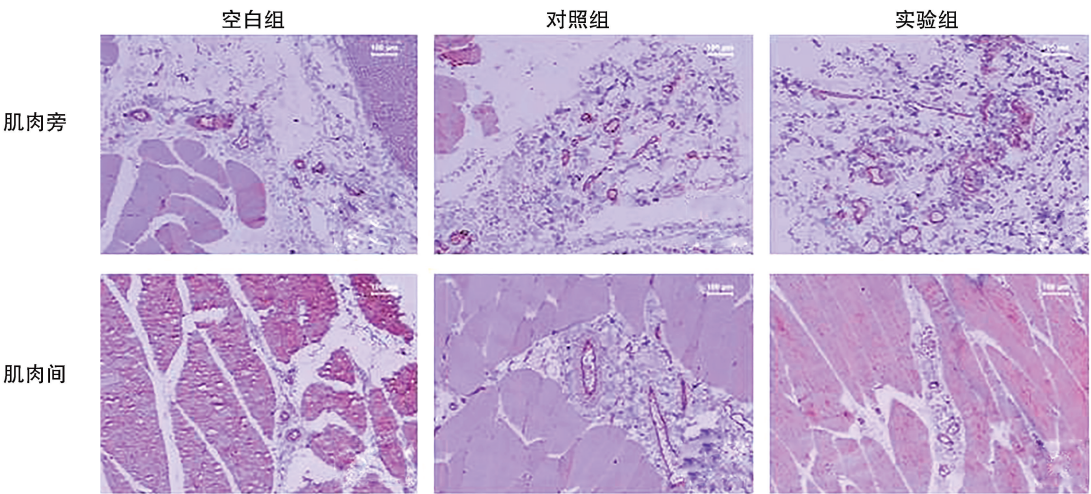


图 7. 各组大鼠缺血后肢腓肠肌及肌肉旁 CD31⁺表达的新生血管情况(×100)

Figure 7. The number of CD31 positive neovascularization in hind limb muscles and next to muscles(×100)

表 1. 三组肌肉间和肌肉旁 CD31⁺表达的新生微血管数($\bar{x} \pm s$)
Table 1. The number of CD31 positive neovascularization in hind limb muscles and next to muscles($\bar{x} \pm s$)

分组	肌肉间	肌肉旁
空白组($n=15$)	2.32 \pm 0.90 ^a	5.32 \pm 0.93 ^a
对照组($n=15$)	5.18 \pm 0.86 ^{ab}	8.12 \pm 0.95 ^{ab}
实验组($n=18$)	8.39 \pm 0.91 ^{abc}	12.45 \pm 1.01 ^{abc}

a: $P<0.05$,与同组肌肉间比较;b: $P<0.05$,与空白组比较;
c: $P<0.05$,与对照组比较。

3 讨论

趋化因子受体 4(CXCR4),也称 CD184,是基质细胞衍生因子 1(stromal derived factor-1, SDF-1)的特异性受体,具有 352 个氨基酸,是序列高度保守的 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体^[12]。SDF-1 最早是由 Nagasawa 等^[13]从小鼠的骨髓基质细胞中分离出来,为趋化因子 CXCR4 亚族。SDF-1 与 CXCR4 具有高度的亲和力,两者特异性结合后形成的 SDF-1/CXCR4 轴是其生物学功能实现的分子基础。SDF-1/CXCR4 轴在缺血性疾病中促进缺血组织血管再生和组织修复起着重要的调节作用。研究发现,在心肌梗死等急性缺血事件发生时,机体在动员骨髓干细胞释放入血的同时,梗死区 SDF-1 表达会显著升高并于短时间内达到峰值,随后迅速下降。梗死区的高水平 SDF-1 与外周血较低水平的 SDF-1 形成的 SDF-1 浓度梯度可趋化循环中 CXCR4 阳性祖细胞归巢至缺血梗死部位参与血管新生、组织和受损血管内皮的修复^[14]。SDF1/CXCR4 轴与血管新生相关,一是与内皮细胞有某种相互作用关系;内皮细胞可合成及分泌 SDF1, Tachibana 等^[15]发现 SDF-1 或者 CXCR-4 基因敲除小鼠的胃肠道血管发育存在缺陷。此外, Kanda 等^[16]研究发现 SDF-1 能够诱导内皮细胞的聚集并促进细胞间胞壁的消失,进而形成腔道。二是与内皮生长因子有关。Napoli 等^[17]总结了多个临床试验,发现 VEGF 及 CXCR-4 受体在内皮祖细胞向受损组织归巢的过程中起着不可替代的作用,SDF-1 具有促进干细胞分泌 VEGF 的能力,可促进生成新生血管,修复心肌组织。这些结果表明 SDF-1/CXCR-4 通路参与了心肌梗死后新生血管的生成。但这种自发性的细胞动员和归巢通常代偿不足,并且心肌梗死后 SDF-1 的表达存在一个明显的时间窗,若要利用 SDF-1 的效应来治疗心肌梗死,需要在心肌梗死急性期内进行细胞移植^[18]。

本课题组前期研究发现在 rAAV₁₋₉ 中, rAAV₆ 对

HUCB-late EPCs 的转染效率最高^[8],因此本研究应用 rAAV₆ 作为基因载体。对于动脉粥样硬化的危险因素共存,尤其是冠心病合并糖尿病的患者,其外周血 CXCR4⁺EPCs 含量较正常人明显减少,进而导致顺 SDF-1 浓度梯度归巢至缺血部位的 EPCs 随之减少^[7]。因此,在干细胞治疗研究中,提高 EPCs 的 CXCR4 表达具有重要意义。Western Blot 结果显示 rAAV₆-CXCR4 转染组 late EPCs 的 CXCR4 蛋白表达量明显上调,表示构建 CXCR4 过表达的 HUCB-late EPCs 成功。

为了观察 CXCR4 过表达对 HUCB-late EPCs 成血管能力的影响,本课题组先后进行了体外和体内成血管实验研究。体外 matrigel 胶成血管实验用统计分析显示 3 种 HUCB-late EPCs 的体外成血管能力无差异。研究发现,EPC 在趋化因子 SDF-1 作用后,其血管样结构的形成增强,通过 CXCR4 抑制剂 AMD3100 阻断 CXCR4 信号通路能解除 SDF-1 诱导的血管样结构的形成。这提示 SDF-1 /CXCR4 轴在调节体外 EPC 形成血管样结构中起重要作用^[19]。推测 3 组体外成血管能力无明显差异可能与机体大环境和实验环境的差异有关(均无 SDF-1 参与、培养时间较短)。而本课题组前期的迁移能力实验证实 CXCR4 过表达的 late EPCs 迁移能力明显强于普通 late EPCs 的迁移能力,这说明 CXCR4 过表达能促进 late EPCs 对 SDF-1 的应答。

为了进一步观察 CXCR4 过表达能否在机体缺血时产生的高浓度 SDF-1 作用下增 HUCB-late EPCs 的迁移,本研究用 SD 大鼠后肢缺血模型,采用局部注射的方法观察 CXCR4 过表达对 HUCB-late EPCs 在缺血组织中的作用。从动物缺血肢体的大体外观来看,实验组与对照组均未出现肢体坏疽及脱落情况,说明 HUCB-late EPCs 可能促进了缺血肢体血运重建。缺血组织 HE 染色镜下肉眼可见,实验组较对照组及空白组微血管血量多,本研究应用了对新生血管内皮特异性较高的 CD31 抗体检测肌肉间及肌肉旁的新生毛细血管密度,结果显示与空白组、对照组比较,实验组新生毛细血管的量明显增多,且各组肌肉旁新生血管数量均较肌肉间多。这可能与急性缺血使机体产生大量 SDF-1 以及 CXCR4 过表达增强了 HUCB-late EPCs 对 SDF-1 的应答有关。Chen 等^[20]发现应用 CXCR4 作为目的基因,使 EPCs 过表达 CXCR4,能有效减少糖尿病小鼠模型的缺血性脑损伤并增加内皮修复功能,而这种效应主要得益于 EPCs 迁移能力。Kuliszewski

等^[21]研究者应用 SDF-1 作为目的基因的研究中, 结果发现 EPC 介导的新生血管明显增加。急性冠脉缺血事件会刺激机体释放大量的 SDF-1, 从而刺激机体 EPCs 的骨髓动员与迁移^[22], 而缺血急性期循环血中的 EPCs 含量则与患者的预后息息相关较差^[23]。这些都说明无论是机体 SDF-1 分泌的增加还是 CXCR4 在 EPCs 表达量的增加, 均能增强 EPCs 向缺血组织迁移, 而参与新生血管的形成。

综上所述, CXCR4 过表达的 HUCB-late EPCs 对 SD 大鼠急性后肢缺血的修复有一定作用。但以结扎大鼠后肢血管建立急性缺血模型与临床慢性动脉粥样硬化急性梗死所致的急性缺血的发病机理完全不同, 需要进一步研究经基因改造的内皮祖细胞的动脉粥样硬化急性梗死所致的缺血疾病是否有意义。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-966.
- [2] Simons M. Angiogenesis: where do we stand now [J]? *Circulation*, 2005, 111(12): 1 556-566.
- [3] Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation[J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(3): 200-206.
- [4] Foresta C, De Toni L, Ferlin A, et al. Clinical implication of endothelial progenitor cells[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10(1): 89-105.
- [5] Goligorsky MS. Endothelial progenitor cells: from senescence to rejuvenation[J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34(4): 365-373.
- [6] Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood [J]. *J Exp Med*, 1997, 185(1): 111-120.
- [7] Egan CG, Lavery R, Caporail F, et al. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(7): 1 296-305.
- [8] Wang Z, Fu Q, Cao J, et al. Impact of transduction towards the proliferation and migration as well as the transduction efficiency of human umbilical cord-derived late endothelial progenitor cells with nine recombinant adeno-associated virus serotypes[J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(7): 1 073-079.
- [9] Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- [10] Yang HN, Park JS, Woo DG, et al. Transfection of VEGF (165) genes into endothelial progenitor cells and in vivo imaging using quantum dots in an ischemia hind limb model[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33): 8 670-684.
- [11] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [12] Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, et al. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(1): 232-237.
- [13] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1 [J]. *Nature*, 1996, 382(6592): 635-638.
- [14] Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction[J]. *Circ J*, 2010, 74(3): 418-423.
- [15] Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract[J]. *Nature*, 1998, 393(6685): 591-594.
- [16] Kanda S, Moehizuki Y, Kanetake H. Stromal cell-derived factor-1 α induces tube-like structure formation of endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 257-262.
- [17] Napoli C, Hayashi T, Cacciatore F, et al. Endothelial progenitor cells as therapeutic agents in the microcirculation: an update[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215(1): 9-22.
- [18] Ceradini DJ, Gurtner GC, Gurtner. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15(2): 57-63.
- [19] 童中艺, 王佐, 李雪兰. 基质细胞衍生因子 1 α 促进大鼠骨髓源性内皮祖细胞血管样结构形成[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(1): 33-36.
- [20] Chen J, Chen J, Chen S, et al. Transfusion of CXCR4-primed endothelial progenitor cells reduces cerebral ischemic damage and promotes repair in db/db diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50105.
- [21] Kuliszewski MA, Kobulnik J, Lindner JR, et al. Vascular gene transfer of SDF-1 promotes endothelial progenitor cell engraftment and enhances angiogenesis in ischemic muscle [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(5): 895-902.
- [22] Penn MS, Pastore J, Miller T, et al. SDF-1 in myocardial repair[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(6): 583-587.
- [23] Yip HK, Chang LT, Chang WN, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2008, 39(1): 69-74.

(此文编辑 朱雯霞)