

# 内皮祖细胞的生物学特性及其应用

陆腾飞, 邬杨楠, 裴文华, 马月辉\*, 关伟军\*

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

**摘要:** 内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞,随着对其培养、鉴定、归巢和分化等研究的进行,内皮祖细胞被越来越多的引入到医学、细胞生物学等相关血管疾病的研究之中,内皮祖细胞可促进创伤愈合和血管功能恢复,是构建心血管组织工程的新力量。就内皮祖细胞的生物学特性及其在动物肢体缺血模型和临床实验中的应用进行了概述,并分析了内皮祖细胞应用所面临的挑战,最后对未来的研究方向进行了展望。

**关键词:** 内皮祖细胞;体外扩增;生物学特性;血管发生;临床应用

DOI:10.19586/j.2095-2341.2017.0009

## Biological Characteristics and Applications of Endothelial Progenitor Cells

LU Tengfei, WU Yangnan, PEI Wenhua, MA Yuehui\*, GUAN Weijun\*

Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** Endothelial progenitor cells (EPCs) are the precursor cells of the vascular endothelial cells. EPCs is now being more and more introduced into the basic research in medicine, cell biology and other fields about vascular disease with the study of its culture, identification, homing and differentiation. Studies have shown that endothelial progenitor cells can promote wound healing and the recovery of vascular function, becoming a new method to construct cardiovascular tissue engineering. This paper reviewed the biological characteristics of EPCs and its application in animal ischemia models and clinical trial. The paper also analyzed the challenge of EPCs application. Finally, we prospected the research direction of EPCs in the future.

**Key words:** endothelial progenitor cell; exvivo expansion; biological properties; vasculogenesis; clinical application

1997 年,日本学者 Asahara 等<sup>[1]</sup>首次从人外周血中分离出血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)和 CD34 均为阳性的单核细胞,而且能够表达内皮细胞的特异性抗原,故命名为内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs),也称为成血管细胞(angioblast),在生理或病理等因素的刺激下,可从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复,通过迁移、归巢到靶组织并进入新生血管,定向增殖分化为成熟的血管内皮细胞,内皮细胞对维持血管内膜的稳定性起着重要作用<sup>[2,3]</sup>;此外,研究发现 EPCs 既参与血管生成,也参与机体和器官损伤后的血管修复与新生,在心脑血管疾病、外周血管疾

病、肿瘤血管形成及创伤愈合等方面均发挥重要作用,并为缺血性疾病的治疗提供了新思路,具有广阔的应用前景<sup>[4-6]</sup>。然而,EPCs 治疗仍面临诸多困难,从高龄病人分离的 EPCs 数量低、质量差,达不到理想的治疗效果<sup>[7]</sup>。本文就内皮祖细胞生物学特征及临床应用等研究概况作简要概述,以期对内皮祖细胞的应用研究提供参考。

### 1 EPCs 的生物学特性

#### 1.1 EPCs 的鉴定

内皮祖细胞在体外有两种,分早期和晚期。早期 EPCs 呈现纺锤形,晚期 EPCs 形成铺路石样

收稿日期:2017-02-22; 接受日期:2017-05-18

基金项目:国家自然科学基金项目(31672404);中国农业科学院科技创新工程项目(exgc-ias-01)资助。

作者简介:陆腾飞,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail:tengkongfeilu@163.com。\*通信作者:关伟军,教授,博士,研究方向为细胞与分子生物学。E-mail:wjguan86@iascaas.net.cn;马月辉,研究员,博士,研究方向为细胞与分子生物学。E-mail:yuehui.Ma@263.net

的椭圆形结构。单从形态学特征上无法辨认出早期 EPCs, 由于血液与血管的发生联系紧密, 其细胞也共享许多细胞表面标记。研究发现, HSCs 和 EPCs 都起源于血管干细胞, 因此他们具有相同的表面标记 (CD34、CD133)<sup>[8]</sup>。人类 EPCs 的表面标记物有 CD34、CD133、FLK-1/KDR、CXCR4 和 CD105 等, 而在小鼠中其表面标志物则为 C-kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> (KSL)<sup>[1, 9~11]</sup>, 这些细胞群在缺血条件下参与血管形成, 表明它们具有血管再生能力。现在最常用的鉴定 EPCs 的表面分子抗原组合有 VEGFR-2、CD133 和 CD34, 多数学者认为同时具有 CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 及 VEGFR-2 等表面抗原的称为 EPCs<sup>[12]</sup>, 但单独一个表面分子抗原是不具有特异性的。例如, CD34<sup>+</sup> 在骨髓来源的内皮细胞和造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 上都有所表达<sup>[13]</sup>。VEGFR-2 是胚胎血管发育时的关键受体, 是血液血管干细胞的表面标记, 在出生后也表达于早期造血干细胞和成熟血管内皮细胞上<sup>[14]</sup>。CD133 选择性地表达于早期造血细胞和胚胎肝、骨髓以及外周血的祖细胞, 在成熟内皮细胞不表达<sup>[15]</sup>。由此可见, EPCs 在不同发育阶段可能表达不同的表面标记。最近有研究显示, 起源于脐血单核细胞的 CD34<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> 或 CD34<sup>-</sup>/CD14<sup>+</sup> 的细胞也可分化为 EPCs<sup>[16]</sup>, 此外, 还能通过多种方法鉴定 EPCs, 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 也是它的特征之一<sup>[17]</sup>。通过电镜可观察到内皮细胞特有的细胞器 Weibel-palade 小体<sup>[18]</sup>, 它是一种分泌性杆状的细胞器, 含有多种生物活性分子, 如血管性血友因子 (von willebrand factor, vWF), 受到刺激后可以非常迅速的释放这些内容物, 参与止血、炎症和血管生成等生理功能。内皮细胞吞噬低密度脂蛋白是其重要的生物学功能之一, EPCs 在分化过程中能表达内皮细胞免疫表型, 且具有吞噬乙酰化低密度脂蛋白和结合荆豆凝集素的能力<sup>[19]</sup>, 可以利用这种能力对 EPCs 进行检测, 通过 Dil 标记乙酰化低密度脂蛋白和 FITC 标记的荆豆凝集素双染实验来鉴定 EPCs 表型。

非造血系 EPCs 的来源不是 HSCs, 它可能来自组织或器官, 非造血系 EPCs 通过连续培养获得, 它们具有分化为内皮细胞的能力, 这种细胞又被称为 EOCs<sup>[20]</sup>, 它们在体外培养条件下呈内皮细胞样特征, 培养 7 d 后, 汇合形成鹅卵石样单层

多角形细胞。这种 EPCs 亚型表达 CD31、CD34、CD105、CD146、VE-cadherin 和 VEGFR-2, 而不表达造血系表面标志物 CD133<sup>[21]</sup>。这类 EPCs 能形成毛细血管和产生 NO, 从而增强后肢血管的新生能力<sup>[22]</sup>。尽管这类具有血管生成潜能的 EPCs 能应用于细胞治疗, 但在培养的过程中, 它们的增殖活性减弱和逐步衰老的现象使之用于治疗受到限制<sup>[23]</sup>, 若同时考虑到分离技术和培养方法, 这些非造血系 EPCs 是不适用于临床的。

## 1.2 EPCs 的归巢和分化

EPCs 的归巢是在血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor, SDF-1) 的参与下, 使外周血中的 EPCs 迁移到组织缺血或内皮损伤部位, 黏附并结合到受损血管的过程。有学者发现将含有 VEGF 的填充物移植到缺血部位, 可引起移植部位 EPCs 的聚集, 促进血管新生, 表明 VEGF 有促进 EPCs 归巢的作用<sup>[24]</sup>。另外, 还有研究人员发现, 小窝蛋白 (caveolin) 通过 VEGF / NO 通路来调控 SDF-1 介导的 EPCs 归巢, 从而直接影响血管的新生<sup>[25]</sup>。SDF-1 是动员 EPCs 向缺血部位聚集的关键细胞因子之一, 能诱导 CD34<sup>+</sup> 细胞迁移和 EPCs 的形成。

EPCs 向缺血损伤部位归巢, 形成集群后修复损伤组织<sup>[26]</sup>。因此 EPCs 的克隆形成能力及其检测方法对于研究血管的生成是很重要的。有研究人员从外周血或脐血中分离出单个核细胞, 并培养出了内皮细胞克隆团 (colony-forming unit-endothelial cells, CFU-ECs)<sup>[27]</sup>。新的 EPCs 克隆形成 (EPCs colony forming assay, EPCs-CFA) 方法可以估计祖细胞的数量, 也能评估克隆团的质量<sup>[28]</sup>。利用 EPCs-CFA 方法可以把两种细胞群体区分开来, 即原始的 (小) EPCs 群体和成熟的 (大) EPCs 群体。这两类细胞群体各有特点, 原始的 (小) EPCs 具有高度的增殖能力, 而成熟的 (大) EPCs 具有分化和促进血管修复的能力<sup>[29]</sup>。

有学者认为 CD133/CD14 表达的丧失, 同时伴随 vWF 及其他成熟内皮特异性标志物和特征的形成就表明内皮细胞分化成熟<sup>[30]</sup>。目前的研究认为 EPCs 除了分化为成熟内皮细胞以外, 还可以分化为骨骼肌细胞、平滑肌细胞和心肌样细

胞<sup>[31]</sup>。有研究发现,PPAR $\gamma$ 受体激动剂通过上调 eNOS 的表达使 EPCs 向成熟内皮细胞分化,而抑制其向平滑肌细胞分化<sup>[32]</sup>。而用 C-反应蛋白处理 EPCs,可通过抑制 eNOS mRNA 的表达,显著抑制 EPCs 的分化,并加速其凋亡<sup>[33]</sup>。有研究发现,层流切应力促进 EPCs 向动脉 ECs 分化,而抑制其向静脉 ECs 分化。剪切力在促进 EPCs 向 ECs 分化的同时,抑制了干细胞标志物 CD133、CD34 的表达<sup>[34]</sup>。也有研究表明纤维连接蛋白促进 EPCs 分化<sup>[35]</sup>。

## 2 EPCs 的应用

### 2.1 EPCs 在动物肢体缺血模型中的应用

目前,EPCs 治疗肢体缺血疾病被广泛研究。当肢体缺血患者因为没有药物治疗,不适合手术而只能选择截肢时,EPCs 治疗给他们带来了希望。利用 EPCs 治疗动物损伤模型的治疗方法有所差异,有的学者利用新分离的细胞,也有学者利用多种细胞因子/生长因子组合培养扩增的细胞。研究人员利用鼠类和兔进行了大量的研究,外源性 EPCs 能够修复后肢缺血模型中受损的血管<sup>[36,37]</sup>。这些实验表明,EPCs 在缺血损伤时参与毛细血管生成和改善组织灌注。

由于造血干细胞和内皮祖细胞具有共同的表面标记,利用当前的技术无法将它们区分。最近,有研究表明通过 CD34 阳性分选可以得到一部分 EPCs,对肢体缺血的糖尿病小鼠局部注射 CD34<sup>+</sup>细胞,结果表明 CD34<sup>+</sup>细胞具有促进创伤愈合和促进血管生长的功能<sup>[38]</sup>。Li 等<sup>[39]</sup>发现分离自骨髓的 CD34<sup>+</sup>在移植后具有更高的募集能力。Elsharawy 等<sup>[40]</sup>将人 CD34<sup>+</sup>细胞移植到后肢缺血的糖尿病裸鼠体内,发现明显恢复了血流。

### 2.2 EPCs 在临床试验上的应用

治疗性血管生成的主要目的是强化合适的血管形成和改善组织灌注。一些理想的动物研究结果促进了早期临床试验的开展。促进肢体缺血患者的侧支血管生成和血管新生是减少组织损伤与严重缺血的主要治疗策略。

根据细胞来源,治疗方式可分为非选择性 EPCs 治疗和选择性 EPCs 治疗,非选择性 EPCs 治疗利用骨髓来源的单个核细胞(mononuclear cells, MNCs),它包括 EPCs 部分和非 EPCs 部分;

选择性 EPCs 治疗利用的是外周血(peripheral blood, PB)或 BM-MNCs 中分离和纯化的 EPCs<sup>[40,41]</sup>。纯化的 CD34<sup>+</sup>细胞能参与血管新生和内皮修复,BM-MNCs 在收到促进动员、归巢和分化的信号后,能形成成熟的内皮细胞。生理条件下循环血中的 EPCs 数量很少,粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)可以促进 EPCs 从骨髓中动员到外周血中,因此,促进 BM-MNCs 动员和归巢会增强 EPCs 介导的血管新生<sup>[42,43]</sup>。

有学者利用 BM-MNCs 治疗外周动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD),他们使用的就是细胞移植治疗血管生成方法。随机对照试验表明,肌肉注射自体 BM-MNCs 能显著改善腿部疼痛范围、溃疡大小和疼痛自由行走距离,这种良性结果能够维持至少 2 年<sup>[44]</sup>。Kawamoto 等<sup>[45]</sup>报道了一个自体移植的 I/II 期临床试验,通过 G-CSF 动员下肢严重缺血患者的 BM-EPCs, G-CSF 能有效地动员 BM-EPCs 进入血液,分离所得到的 CD34<sup>+</sup>细胞即为 EPCs。所有患者在细胞治疗 12 周后,病情得到明显改善,CD34<sup>+</sup>细胞移植后各项病理指标得到明显改善。

研究显示,将自体动员的 CD34<sup>+</sup>细胞移植到顽固性糖尿病足患者体内,I/II 期临床试验结果显示,5 例患者中 3 例未发生小截肢、复发、死亡及其他严重不良事件。另外,当以高剂量 EPC-CFU 和 CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>细胞进行治疗时,伤口愈合效果明显改善,无复发或异位溃疡<sup>[44]</sup>。这些结果表明,EPCs 的数量和血管生成潜力直接影响细胞疗法的疗效。因此,较高剂量的 EPC-CFU 和 CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>细胞是 EPCs 进行有效治疗的关键。细胞治疗对于下肢严重缺血患者基本没有限制,具有一定的安全性和可行性。

## 3 EPCs 的应用挑战

要成功地将 EPCs 介导的血管修复和血管生成应用于临床,还需要更好地理解 EPCs 的生物学特性。目前,EPCs 治疗应用主要受到数量和质量的限制。由于外周血中的 EPCs 较少,细胞分离过程中细胞质量会降低,不得不进行多次动员和分离 EPCs 从而加重了病人的负担。研究发现 PB CD34<sup>+</sup>细胞移植治疗功能性血管再生具有剂

量依赖效应<sup>[46]</sup>。

在一些特殊情况下,如高龄、糖尿病、心血管疾病和其他风险因素等都能损害 EPCs 的功能,使其迁移和归巢到靶组织的能力受到影响<sup>[47,48]</sup>。年龄的升高会减弱内皮祖细胞的功能,产生保护性细胞因子,并造成生长因子的量减少,且活性减弱,导致患心血管疾病的风险增加<sup>[49]</sup>。老龄化也与血管壁内源性的改变有关,主要是内皮细胞的流失导致了内皮功能障碍。研究发现稳定性冠心病(coronary artery disease, CAD)患者术前的循环 EPCs 随着年龄的增加而减少,随着 VEGF 水平下降而减少。而同龄人中,含较少 EPCs 的人更易患心血管疾病。多因素分析表明,EPCs 的减少预测了心血管疾病不良的预后<sup>[50]</sup>,通过减少风险因素能够恢复循环中 EPCs 的正常水平<sup>[51]</sup>。

由于糖尿病和 EPCs 功能损伤有关,糖尿病通常伴随着很多血管并发症,缺乏血管内皮再生和血管再生受损是糖尿病血管并发症的根本原因。糖尿病患者的内环境含有大量的活性氧簇,它们由活性 NADPH 氧化酶产生,NADPH 氧化酶能降低 NO 的生物学利用度,从而导致糖尿病血管并发症的发生和加重,抑制 NADPH 氧化酶的活性能恢复 CD34<sup>+</sup>细胞的迁移和归巢到靶组织的能力<sup>[52]</sup>。

由于病人内源性 EPCs 的数量少、质量差,与健康人相比自体 EPCs 移植治疗效果不好。在治疗糖尿病足患者时,PB CD34<sup>+</sup>细胞修复组比对照组的治疗效果差,老年患者 EPCs 动员数量降低,缺血性损伤可由正常人的 CD34<sup>+</sup>细胞修复,但糖尿病患者的 CD34<sup>+</sup>细胞治疗效果很差<sup>[50]</sup>。为了克服这一问题,可使用细胞和分子生物学技术增强 EPCs 的存活率和细胞增殖。此外,收集和分离细胞的漫长过程也会影响患者的康复。如前体祖细胞的增殖或前处理等步骤会造成移植时间的推迟。总之,尽管临床试验表明自体 EPCs 治疗具有安全性和有效性,但仍然需要克服一些缺陷,如:分离技术和过程、细胞功能障碍和细胞数量。

## 4 展望

内皮祖细胞以其独特的生物学特性成为再生医学领域中重要的治疗工具,在机体缺血、组织损伤、细胞因子或药物刺激下,EPCs 可从骨髓向靶

部位动员、增殖、分化,形成新生血管,在多种缺血性疾病和血管损伤方面有着广阔的应用前景。利用转基因技术将必要的基因转给 EPCs,从而增强其增殖或新生血管的能力,扩大在临床上的应用范围。此外,EPCs 在组织工程和肿瘤治疗方面也有很大的临床应用价值。但是,我们必须要先理解 EPCs 的生物学特性,并继续研究了解 EPCs 在健康和疾病中的身份和角色。这些努力将提供有价值的指导数据来指导研究者对细胞治疗进行合理的设计。

## 参 考 文 献

- [1] Asahara T, Isner J M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275 (5302): 964.
- [2] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization [J]. *Nat. Med.*, 1999, 5(4): 434-438.
- [3] Fadini G P, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use [J]. *Circul. Res.*, 2012, 110(4): 624.
- [4] Kawamoto A, Losordo D W. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration [J]. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2008, 18(1): 33-37.
- [5] Zhao Y H, Yuan B, Chen J, *et al.* Endothelial progenitor cells: Therapeutic perspective for ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci. Therapeut.*, 2013, 19(2): 67-75.
- [6] Rurali E, Bassetti B, Perrucci G L, *et al.* BM ageing: implication for cell therapy with EPCs [J]. *Mechan. Age. Dev.*, 2016, 159: 4-13.
- [7] Di S R, Felice F, Pini S, *et al.* Impact of depression on circulating endothelial progenitor cells in patients with acute coronary syndromes: A pilot study [J]. *J. Cardiovasc. Med.*, 2014, 15(4): 353.
- [8] Rufaihah A J, Haider H K, Heng B C, *et al.* Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived CD133<sup>+</sup> endothelial progenitor cells for cardiac repair [J]. *Regenerat. Med.*, 2015, 5(2): 231-244.
- [9] Lee J H, Lee S H, Yoo S Y, *et al.* CD34 hybrid cells promote endothelial colony-forming cell bioactivity and therapeutic potential for ischemic diseases [J]. *Arterioscl. Thrombo. Vasc. Biol.*, 2013, 33(7): 1622-1634.
- [10] Yang J, Li M, Kamei N, *et al.* CD34<sup>+</sup> Cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e20219.
- [11] Sekiguchi H, Li M, Jujo K, *et al.* Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28639.
- [12] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, *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] Cahill P A, Redmond E M. Vascular endothelium-Gatekeeper of vessel health[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 248: 97-109.
- [14] Wang L, Rui B, Bixel M G, *et al.*. Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow [J]. *Embo. J.*, 2013, 32(2): 219-230.
- [15] Choi S A, Wang K C, Phi J H, *et al.*. A distinct subpopulation within CD133 positive brain tumor cells shares characteristics with endothelial progenitor cells [J]. *Cancer Lett.*, 2012, 324(324): 221-230.
- [16] Sudchada S, Kheolamai P, Upratya Y, *et al.*. CD14<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> is the founding population of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells and angiogenin1 is an important factor promoting the colony formation [J]. *Ann. Hematol.*, 2012, 91(3): 321-329.
- [17] Yu J W, Deng Y P, Han X, *et al.*. Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice; [J]. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2016, 15(1): 88.
- [18] Stevenson N L. Novel regulators of Weibel-palade body biogenesis and endothelial function [R]. University College London, 2014.
- [19] 戴小珍,王兰,潘克俭,等. 大鼠骨髓来源内皮祖细胞的分离培养及鉴定 [J]. *成都医学院学报*, 2013, 8(3): 242-246.
- [20] Li Y F, Ren L N, Guo G, *et al.*. Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: an exploration from hypothesis to therapy [J]. *J. Hematol. Oncol.*, 2015, 8(1): 33.
- [21] Ge Y Z, Wu R, Lu T Z, *et al.*. Circulating endothelial progenitor cell: a promising biomarker in clinical oncology[J]. *Med. Oncol.*, 2015, 32(1): 1-10.
- [22] Perlingeiro R C R. Regulation of vasculogenesis and angiogenesis[M]. Springer, 2012, 261-270.
- [23] Masuda H, Iwasaki H, Kawamoto A, *et al.*. Development of serum-free quality and quantity control culture of colony-forming endothelial progenitor cell for vasculogenesis[J]. *Stem Cells Translat. Med.*, 2012, 1(2): 160-171.
- [24] Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, *et al.*. Detection of endothelial progenitor cells in human skin wounds and its application for wound age determination [J]. *Int. J. Legal Med.*, 2015, 129(5): 1049-1054.
- [25] Yin Y, Zhao X, Fang Y, *et al.*. SDF-1 $\alpha$  involved in mobilization and recruitment of endothelial progenitor cells after arterial injury in mice [J]. *Cardiovasc. Pathol. Official J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, 2010, 19(4): 218.
- [26] Qiu L Z, Chen L, Li C X, *et al.*. Effect of Naioxintong capsule on endothelial progenitor cell mobilization and homing following bone marrow transplantation in a mouse hind limb ischemia model[J]. *China J. Chin. Materia Med.*, 2016, 41(23): 4416-4423.
- [27] Yoder M C, Mead L E, Prater D, *et al.*. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals [J]. *Blood*, 2007, 109(5): 1801.
- [28] Masuda H, Alev C, Akimaru H, *et al.*. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential [J]. *Circul. Res.*, 2011, 109(1): 20-37.
- [29] Kamei N, Kwon S M, Alev C, *et al.*. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 365.
- [30] Liu L, Kakiuchi-Kiyota S, Arnold L L, *et al.*. Pathogenesis of human hemangiosarcomas and hemangiomas [J]. *Human Pathol.*, 2013, 44(10): 2302-2311.
- [31] Takahashi M, Okubo N, Chosa N, *et al.*. Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells [J]. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, 29(3): 357-364.
- [32] Zhou J, Chen L, Fan Y, *et al.*. Atorvastatin increases endothelial progenitor cells in balloon-injured mouse carotid artery [J]. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2014, 92(5): 369-374.
- [33] Meng S, Cao J, Wang L, *et al.*. MicroRNA 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 $\beta$  [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40323.
- [34] Cheng M, Guan X, Li H. Shear stress regulates late EPC differentiation *via* mechanosensitive molecule-mediated cytoskeletal rearrangement [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e67675.
- [35] Singh P, Schwarzbauer J E. Fibronectin and stem cell differentiation-lessons from chondrogenesis [J]. *J. Cell Sci.*, 2012, 125(16): 3703.
- [36] Burdon T J, Paul A, Noiseux N, *et al.*. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: Current perspectives and therapeutic potential[J]. *Bone Marrow Res.*, 2011, 2011: 14.
- [37] Murdoch E C, Broadway-Stringer S A, Bartkeviciute M, *et al.*. Stem cell therapies for ischemic cardiovascular diseases [J]. *Recent Patents Regenerat. Med.*, 2014, 4(3): 149-167.
- [38] Awad O, Dedkov E I, Jiao C, *et al.*. Differential healing activities of CD34<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> endothelial cell progenitors[J]. *Arterioscl. Thrombo. Vasc. Biol.*, 2006, 26(4): 758.
- [39] Li Y F, Ren L N, Guo G, *et al.*. Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: An exploration from hypothesis to therapy [J]. *J. Hematol. Oncol.*, 2015, 8(1): 33.
- [40] Elsharawy M A, Naim M, Greish S. Human CD34<sup>+</sup> stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats [J]. *Interact. Cardiovasc. Thoracic Surgery*, 2012, 14(3): 288-293.
- [41] Barthelmes D, Ling Z, Shen W, *et al.*. Differential gene expression in Lin<sup>-</sup>/VEGF-R2<sup>+</sup> bone marrow-derived endothelial progenitor cells isolated from diabetic mice [J]. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2014, 13(1): 1-10.
- [42] Diederich K, Schmidt A, Beuker C, *et al.*. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) treatment in combination with transplantation of bone marrow cells is not superior to G-CSF treatment alone after cortical stroke in spontaneously hypertensive rats [J]. *Frontiers Cell. Neurosci.*, 2014, 8: 411.

- [43] Tanaka R, Masuda H, Kato S, *et al.*. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer [J]. *Cell Transplant.*, 2014, 23(2): 167-179.
- [44] Tanaka R, Masuda H, Kato S, *et al.*. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer [J]. *Cell Transplant.*, 2014, 23(2): 167-179.
- [45] Kawamoto A, Katayama M, Handa N, *et al.*. Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11): 2857-2864.
- [46] Martin P S, Li S, Nikiforow S, *et al.*. Infused total nucleated cell dose is a better predictor of transplant outcomes than CD34<sup>+</sup> cell number in reduced-intensity mobilized peripheral blood allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Haematologica*, 2016, 101(4):499-505.
- [47] Fadini G P, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use [J]. *Circul. Res.*, 2012, 110(4): 624.
- [48] Sukmawati D, Fujimura S, Jitsukawa S, *et al.*. Oxidative stress tolerance of early stage diabetic endothelial progenitor cell[J]. *Regenerat. Therapy*, 2015, 1: 38-44.
- [49] De T L, Di N A, Magagna S, *et al.*. Altered chemokine signalling in endothelial progenitor cells from acute ulcerative colitis patients [J]. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2015, 2015 (45): 843980.
- [50] Li G Q, Yang Y, Ke D Z, *et al.*. Association of circulating endothelial progenitor cells (CD14<sup>+</sup>-EPC) with renal function in patients with coronary artery disease [J]. *Clin. Appl. Thrombo. Hemost.*, 2013, 19(6): 632.
- [51] Li Y, Ma Y, Wang Y, *et al.*. Endothelial progenitor cell therapy in stroke [M]. Springer International Publishing, 2015, 125-161.
- [52] Jarajapu Y P, Caballero S, Verma A, *et al.*. Blockade of NADPH oxidase restores vasoreparative function in diabetic CD34<sup>+</sup> cells [J]. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 2011, 52 (8): 5093-5104.