

文章编号:1004-7220(2014)01-0060-06

流体剪切应力对晚期内皮祖细胞生物学功能的影响

成敏, 尹青令*, 崔晓栋, 张晓芸, 李鑫, 李宏, 官秀梅, 王建英

(潍坊医学院 基础医学院, 山东 潍坊 261053)

摘要:目的 研究流体剪切应力处理对晚期内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)体外及体内生物学功能的影响。方法 密度梯度离心法分离大鼠骨髓单核细胞,应用 EGM-2MV 进行体外培养。以 3~4 代的 EPCs,即晚期 EPCs 为靶细胞,对其施以 1.2 Pa 剪切应力处理。采用 EdU 标记技术、黏附能力测定实验、改良的 Boyden 小室、Annexin V/PI、 β -半乳糖苷酶检测法、Matrigel 法、荧光定量 RT-PCR 等方法分别检测剪切应力对晚期 EPCs 增殖、黏附、迁移、凋亡、衰老、体外成血管及 VEGF mRNA 表达等生物学功能的影响。应用大鼠颈动脉损伤模型及细胞原位移植等实验手段检测剪切应力预处理对晚期 EPCs 修复受损内皮的影响。结果 1.2 Pa 剪切应力处理可不同程度提高晚期 EPCs 的增殖、黏附、迁移及成血管能力($P < 0.01$),上调 VEGF 的基因表达,抑制晚期 EPCs 的衰老及凋亡($P < 0.01$);移植经剪切应力预处理的晚期 EPCs 可加速损伤内皮的修复,减缓内膜的增生。结论 流体剪切应力可改善晚期 EPCs 的功能活性,提高晚期 EPCs 修复损伤血管内皮的能力,这为 EPCs 的临床应用及剪切应力介导的细胞疗法提供了实验依据。

关键词: 剪切应力; 内皮祖细胞; 细胞黏附; 再内皮化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects of shear stress on late endothelial progenitor cell functions

CHENG Min, YIN Qing-ling*, CUI Xiao-dong, ZHANG Xiao-yun, LI Xin, LI Hong, GUAN Xiu-mei, WANG Jian-ying (School of Basic Medical Sciences, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of shear stress on late endothelial progenitor cells (EPCs) functions *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Density gradient centrifugation-isolated rat bone marrow mononuclear cells were cultured in EGM-2MV and induced into EPCs. The 3rd~4th generation of EPCs, namely late EPCs, were treated with shear stress (1.2 Pa). Then cell biological functions, such as proliferation, adhesion, migration and ability of tube formation, were assayed with EdU incorporation assay, adhesion testing, Boyden chamber assay and Matrigel, respectively. The gene expression of VEGF was analyzed by real time RT-PCR. The apoptosis and aging situation of late EPCs were assayed by FACS and senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining. The reendothelialization capacity of late EPCs treated by shear stress was evaluated by establishing models of freshly balloon-injured carotid arteries of rats and cell transplantation *in situ*. **Results** Shear stress increased proliferation, adhesion, migration and tube formation of late EPCs ($P < 0.01$), upregulated the gene expression of VEGF, inhibited EPC apoptosis and delayed EPC aging ($P < 0.01$). Transplantation of late EPCs treated by shear stress facilitated *in vivo* reendothelialization in the injured arterial segment and inhibited neointima formation. **Conclusions** Shear stress within the physiological range can improve the functions of late EPCs and enhance their therapeutic ability of repairing vascular endothelial injury, and this provides experimental basis for the clinic application of EPCs and shear stress-mediated cell therapy.

Key words: Shear stress; Endothelial progenitor cells (EPCs); Cell adhesion; Reendothelialization

收稿日期:2013-02-18; 修回日期:2013-03-18

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900290, 31270993), 国家教育部“新世纪优秀人才计划”资助项目(NCET-10-0922), 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CQ030), 山东省医药卫生科技发展计划(2011QZ024)。

通信作者:成敏, Tel:(0536)8462463, E-mail:mincheng@wfmc.edu.cn。

* 共同第一作者

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞,存在于骨髓和外周血中,具有归巢于损伤区域并能增殖、分化为成熟内皮细胞等特性,是参与出生后血管发生和血管内皮损伤后修复极其重要的细胞^[1]。研究表明,当存在心血管病危险因素和冠心病发生时,循环系统中 EPCs 数量减少,功能降低,提示血管内皮损伤修复能力下降^[2-3]。因此,提升 EPCs 的数量、改善其功能是修复内皮损伤和防治冠心病等心血管疾病的重要策略。

流体剪切应力是血管内皮细胞重要的调节因素,可引起内皮细胞结构和功能的改变,调节诸多的生理、病理过程^[4-7]。以往研究证实,作为内皮细胞的前体细胞,EPCs 在体内也受到流体剪切应力的影响^[8-10]。本课题组前期研究结果显示,1.2 Pa 剪切应力可促进晚期 EPCs 的分化,其机制与细胞外基质-整合素-细胞骨架信号系统有关^[11-12],但是有关该剪切应力对晚期 EPCs 其他体内、体外生物学特性的影响尚无全面报道。本实验利用力学加载系统,研究剪切应力加载对晚期 EPCs 体外生物学特性及体内血管修复能力的影响,以期进一步明了流体剪切应力对晚期 EPCs 功能的调节作用,为晚期 EPCs 的临床应用及剪切应力介导的细胞疗法提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

SD 大鼠(200 ~ 250 g,雌雄不限)由解放军第 89 医院实验中心提供;荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad IQ5),流式细胞检测仪(BD),5% CO₂ 培养箱(Thermo);EGM-2 完全培养基(Lonza,美国),胎牛血清(Hyclone),纤维连接蛋白(Fibronectin, FN, Roche),TRIzol 试剂, β -半乳糖苷酶检测试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司),SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR Kit II 及相关引物设计合成(大连宝生物公司),EdU 检测试剂盒(广东锐博生物科技公司),CM-DiI(Invitrogen,美国)。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的培养鉴定^[13-15]和分组 采用梯度离心法分离大鼠骨髓单核细胞,培养于 EGM-2MV 培养基。取 3 ~ 4 代细胞行 Dil-ac-LDL 及 FITC-UEA-1 染色,双阳性者为内皮型细胞。流式细胞术

检测 VEGFR2、vWF 及 CD31 等内皮细胞标记,约 85% 的晚期 EPCs 上述标记为阳性。另外,晚期 EPCs 具有较强的体外成血管能力。

以静止组(0 Pa)作为对照组,剪切应力(1.2 Pa)处理的晚期 EPCs 作为实验组。

1.2.2 层流剪切应力加载^[12] 层流剪切应力加载装置由蠕动泵、储液瓶、管道及平行板流室组成。将 3 ~ 4 代晚期 EPCs 消化传代后,接种于 FN 打底处理的载玻片上。给予细胞施加 1.2 Pa 剪切应力刺激,若无特殊说明,刺激时间为 12 h。

1.2.3 细胞黏附能力测定实验 0.25% 胰蛋白酶消化晚期 EPCs 后,离心收集细胞,EGM-2MV 培养基重悬,取 2×10^4 个细胞接种于预先包被有 FN 的 12 孔板内,5% CO₂ 培养箱孵育 30 min 后弃培养液,PBS 轻洗 3 次,显微镜下(100 倍)计每视野细胞数。

1.2.4 细胞自发性迁移能力测定 采用 Boyden 小室方法检测细胞迁移能力。将晚期 EPCs 消化(0.25% 胰蛋白酶)后,以相同细胞浓度接种于小室上层。下室放置相同培养液,小室中间为 8 μ m 聚碳酸酯微孔滤膜。置 5% CO₂ 培养箱,10 h 后取下微孔滤膜,用棉签擦除上层未迁移细胞。DAPI 染色,荧光显微镜下观察拍照,Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

1.2.5 细胞增殖能力检测 参照文献[15],采用含 EdU 的培养液原位标记细胞,经 4% 多聚甲醛固定和 0.5% Triton-100 通透处理后,Apollo[®] 荧光染料显色。荧光显微镜下观察拍照,Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

1.2.6 细胞凋亡检测 采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测细胞凋亡。按试剂盒说明书染色,流式细胞仪检测晚期 EPCs 凋亡。

1.2.7 细胞衰老检测实验 采用 β -半乳糖苷酶检测试剂盒,按说明书操作,操作完成后封片,即刻在光学显微镜下拍照、计数。衰老细胞 β -gal 染色阳性,呈蓝色。计算视野中的阳性率。

1.2.8 细胞总 RNA 提取、VEGF 的荧光定量 RT-PCR 分析 按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,溶于 DEPC 处理的去离子水中,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。荧光定量 RT-PCR 根据说明书操作。反应引物均委托宝生物设计合成,引物序列见表 1。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s,1 cycle,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s;40 cycles。实验中以超纯水(PCR 级,无 RNase)作为阴性对照。

根据 C_t 值,利用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出相对表达量。

表1 相关基因引物序列

Tab.1 Real-time PCR primers

基因	引物序列
GAPDH	下游: GGCACACTCAAGGCTGAGAATG
	上游: ATGGTGG TGAAGACGCCAGTA
VEGF	下游: GCACGTTGGCTCACTCCAG
	上游: TGGTCGGAACCAGAATCTTTATCTC

1.2.9 体外成血管能力检测^[15] 4℃下将 Matrigel 基质胶(100 μL/孔)加入 96 孔板,铺平后置 37℃ 培养箱 1 h,然后将晚期 EPCs 接种于基质胶上,37℃,5% CO₂湿化的培养箱中孵育 6~8 h,光学显微镜下观察、拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析各视野血管样结构形成的长度和面积。

1.2.10 大鼠颈动脉球囊损伤模型制备,细胞移植及内皮修复情况检测^[15] 大鼠麻醉后行肝素化处理,分离颈外动脉,插入PTCA球囊导管扩张颈总动脉,扩张时间为 30 s,间歇 60 s,重复 3 次。生理盐水冲洗内膜损伤血管段后灌注 50 μL CM-DiI 标记的晚期 EPCs 细胞悬液(2 500/mm²),孵育 30 min。为保证细胞分布的均一性,将动物左右翻转 2 次。于穿刺处结扎颈外动脉,分层缝合伤口,术后常规庆大霉素抗菌治疗。术后 14 d 取颈总动脉损伤段做病理切片,荧光显微镜下观察 CM-DiI 标记细胞在血管中的分布,HE 染色观察内膜增生情况。

1.3 统计学分析

所有实验至少重复 3 次。采用 SPSS 10.0 统计学软件处理,多组之间采用单因素方差分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 剪切应力对晚期 EPCs 黏附及迁移的影响

与对照组相比,1.2 Pa 剪切应力作用于晚期 EPCs 后可促使其与细胞外基质——FN 的黏附($P < 0.01$,见图 1)。另外,剪切应力处理可促进晚期 EPCs 的迁移($P < 0.05$),其迁移细胞数为对照组的(1.39 ± 0.16)倍(见图 2)。

2.2 剪切应力对晚期 EPCs 增殖、衰老及凋亡的影响

晚期 EPCs 经 1.2 Pa 剪切应力处理后,光镜下

可见细胞状态良好,胞核较饱满,细胞内颗粒较少。EdU 实验结果显示剪切应力处理可明显提高 EdU 阳性细胞数,提示剪切应力促进晚期 EPCs 的增殖($P < 0.01$,见图 3)。 β -gal 细胞衰老染色显示,剪切应力处理组其染色阳性细胞百分比率为(16.61 ± 2.32)%,显著低于对照组细胞(41.37 ± 3.07)%($P < 0.01$,见图 4)。收集对照组及剪切应力处理组 EPCs 行 Annexin V / PI 染色,FACS 检测细胞凋亡,设定 Annexin V (+)PI(-)细胞为凋亡细胞。结果显示剪切应力处理抑制晚期 EPCs 的凋亡($P < 0.01$,见图 5)。

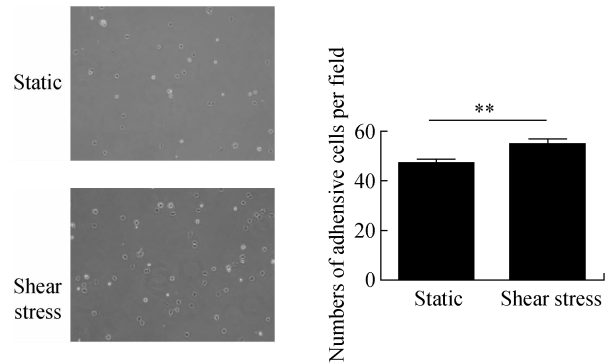


图1 剪切应力对晚期 EPCs 黏附功能的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.1 Effects from shear stress on adhesion of late EPCs

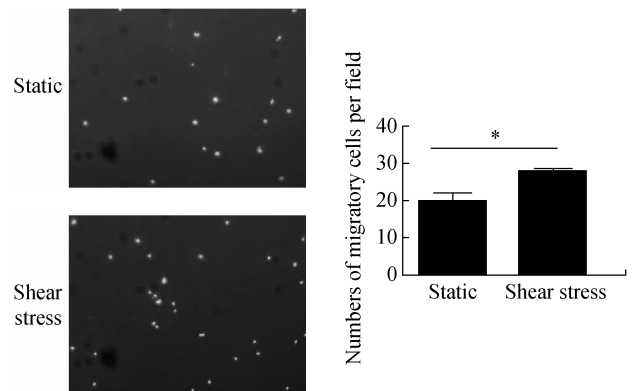


图2 剪切应力对晚期 EPCs 迁移功能的影响 (* $P < 0.05$)

Fig.2 Effects from shear stress on migration of late EPCs

2.3 剪切应力作用下对晚期 EPCs VEGF mRNA 表达的影响

1.2 Pa 剪切应力作用于晚期 EPCs, VEGF mRNA 表达显著高于对照组;剪切应力处理 3、6、12 h 后,其表达量分别为对照组的(2.25 ± 0.43)、(3.75 ± 0.57)、(2.48 ± 0.47)倍(见图 6)。

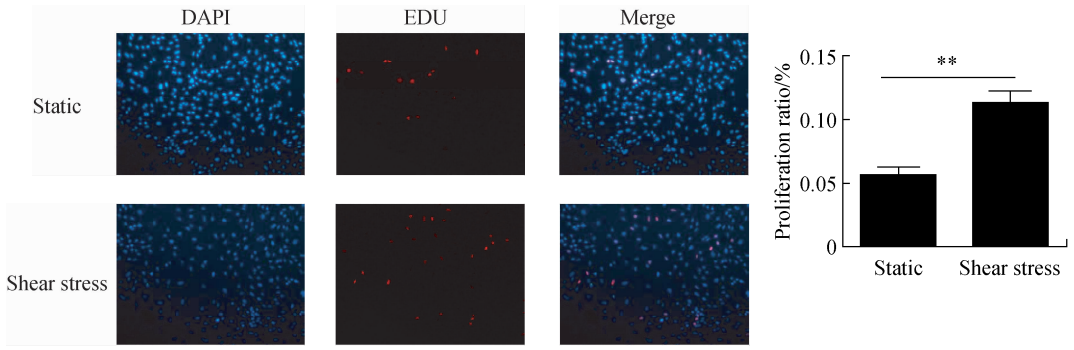


图3 剪切应力对晚期 EPCs 增殖的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.3 Effects from shear stress on proliferation of late EPCs

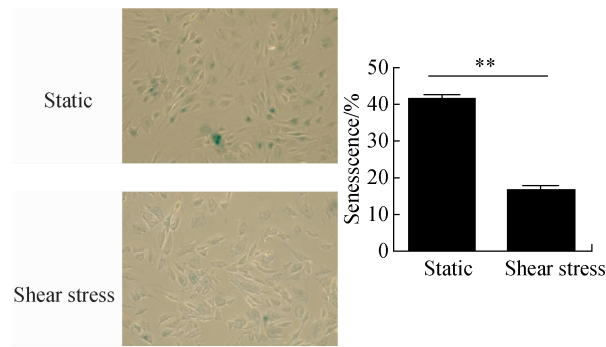


图4 剪切应力对晚期 EPCs 衰老的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.4 Effects from shear stress on aging of late EPCs

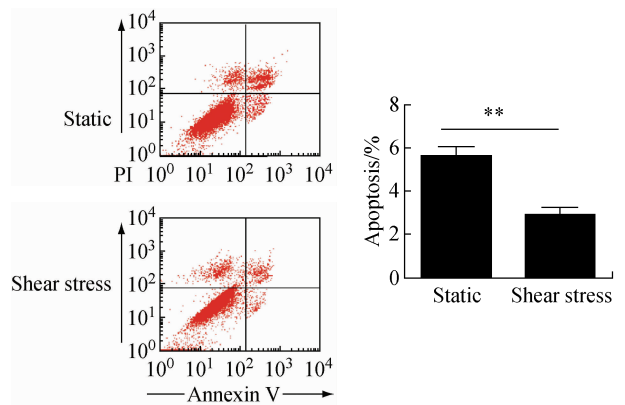


图5 剪切应力对晚期 EPCs 凋亡的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.5 Effects from shear stress on apoptosis of late EPCs

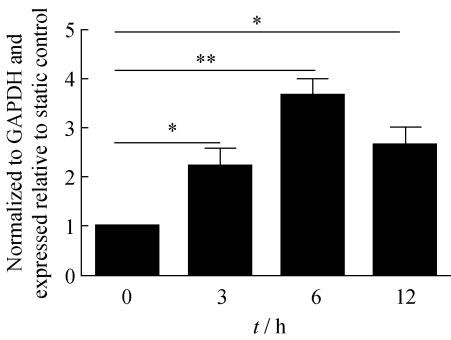


图6 剪切应力对晚期 EPCs VEGF mRNA 表达的影响

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.6 Effects from shear stress on VEGF mRNA expression of late EPCs

2.4 剪切应力对晚期 EPCs 体外成血管能力的影响

体外成血管实验显示,剪切应力可促进晚期 EPCs 在 Matrigel 上形成管腔样结构,与对照组比较,其形成血管腔数量较多,细胞连接比较紧密。图像及统计学分析结果提示,剪切应力处理组晚期

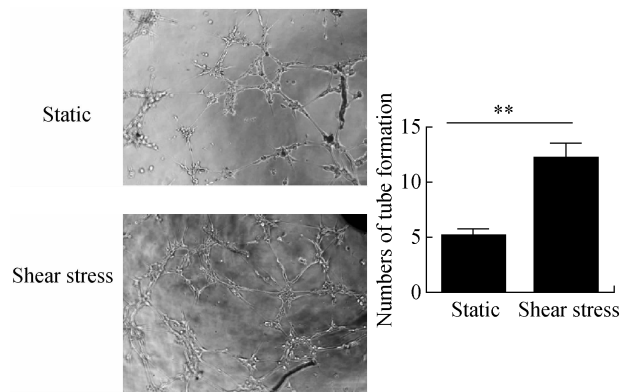


图7 剪切应力对晚期 EPCs 体外成血管能力的影响 (** $P < 0.01$)

Fig.7 Effects from shear stress on tube formation ability of late EPCs *in vitro*

EPCs 形成的血管样结构管腔数高于对照组 ($P < 0.01$, 见图 7)。

2.6 剪切应力预处理对晚期 EPCs 修复受损内皮的影响

受损血管内皮的再内皮化是血管内膜损伤修复的关键环节。本实验利用 CM-DiI 标记晚期 EPCs,

并将其局部移植至大鼠颈动脉球囊损伤处。术后14 d取颈总动脉损伤段,观察实验组和对照组晚期EPCs对损伤动脉内皮的修复能力。结果显示剪切应力预处理组的荧光强度明显高于对照组,提示CM-DiI阳性细胞数较多(见图8(a))。HE染色结果显示,移植剪切应力预处理的晚期EPCs可更有效地抑制动脉内膜的增生及血管腔狭窄,其增生内膜与中膜面积比值(N/M)为 0.53 ± 0.04 ,低于对照组 0.86 ± 0.02 ($P < 0.05$,见图8(b))。

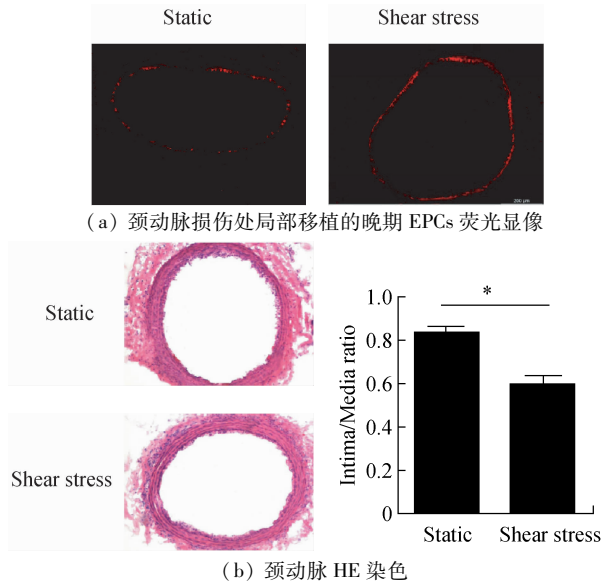


图8 剪切应力预处理对晚期EPCs修复受损内皮的影响
(* $P < 0.05$)

Fig. 8 Effects from shear stress on *in vivo* reendothelialization capacity of late EPCs (a) A fluorescent microscope was performed to detect transplanted late EPCs to the sites of vascular injury, (b) HE-stained cross-sections were analyzed for neointimal thickening

3 讨论

EPCs是血管修复及出生后新生血管形成的关键细胞,可参与动脉粥样硬化受损内膜再内皮化、心肌以及肢体缺血侧支循环重建等过程。在一定的条件下,骨髓来源的EPCs可被广泛动员到外周血中,进而在力-化学的共同作用下归巢到动脉粥样硬化、缺血性血管损伤等部位发挥其相应的功能。文献[16-17]中证实,EPCs形成的内皮细胞占血管内皮细胞的26%~45%。

近年来研究发现,根据EPCs的来源、形态、增殖能力、分化能力基因表达、功能等方面的不同,可

将EPCs分为早期EPCs和晚期EPCs两种类型^[18-19]。其中早期EPCs主要通过旁分泌作用进一步动员干细胞参与血管生成或促进受损内皮附近内皮细胞的增殖;晚期EPCs则具有很强的原位分化和黏附贴壁能力,可直接参与受损内皮的修复。因此,增加晚期EPCs的数量,改善其功能是修复内皮损伤和防治冠心病等心血管疾病的重要策略。

杨震等^[20-21]实验证实,一定大小剪切应力可以促进EPCs铜锌超氧化物歧化酶的表达,增加EPCs的抗血栓能力。本课题组前期研究亦发现,1.2 Pa的剪切应力可以促进晚期EPCs的分化,其机制与细胞外基质-整合素-细胞骨架-胞内信号有关^[11-12],提示剪切应力可能是提高EPCs功能活性的非药理学手段。本实验结果显示,1.2 Pa剪切应力可有效促进晚期EPCs的增殖、黏附及迁移,抑制其凋亡和衰老,提示剪切应力能够促进晚期EPCs黏附于损伤内皮部位,进而增殖、分化为成熟内皮细胞,发挥其生理作用。在体实验进一步证实,局部移植经剪切应力预处理的晚期EPCs可更有效地促进损伤内皮的修复,抑制动脉内膜的增生及血管腔狭窄。

VEGF是血管内皮特异丝裂原,能促进内皮细胞增殖,加快新血管的形成。VEGF在EPCs的功能调节中亦扮演重要角色,具有促进EPCs增殖,诱导其分化等作用^[22-23]。Zeng等^[24]研究证实,1.2 Pa剪切应力可激活EPCs上VEGF的对应受体Flk-2。本研究发现,同样大小的剪切应力上调晚期EPCs VEGF mRNA的表达。据此推测剪切应力除可直接调控EPCs的功能外,尚可通过促进EPCs的自分泌作用,进而调控EPCs的功能。

晚期EPCs是出生后血管再生的重要细胞。通过体外Matrigel基质胶成血管实验发现,剪切应力处理组的晚期EPCs体外成血管能力高于静止组。EPCs的成血管能力主要受细胞增殖、黏附及迁移等多种因素的影响。鉴于剪切应力作用于晚期EPCs后,其增殖、黏附、迁移能力均增高,这必将有助于晚期EPCs的体外成血管能力。

综上所述,一定的剪切应力可以提高晚期EPCs的增殖、黏附、迁移及成血管能力;上调VEGF的基因表达;抑制EPCs的衰老及凋亡;移植经剪切应力预处理的晚期EPCs可加速损伤内皮的修复,减缓内膜的增生。因此,通过流体切应力处理可上调晚

期 EPCs 功能,增强其体内移植后修复血管内皮损伤的能力,这对于以 EPCs 为基础的细胞疗法防治心血管疾病具有重要的临床价值。

参考文献:

- [1] Brixius K, Funcke F, Graf C, *et al.* Endothelial progenitor cells: A new target for the prevention of cardiovascular diseases [J]. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2006, 13(5): 705-710.
- [2] Bakogiannis C, Tousoulis D, Androulakis E, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(16): 2597-2604.
- [3] Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006, 3(2): 94-101.
- [4] Johnson BD, Mather KJ, Wallace JP. Mechanotransduction of shear in the endothelium: Basic studies and clinical implications [J]. *Vasc Med*, 2011, 16(5): 365-377.
- [5] Egginton S. In vivo shear stress response [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(6): 1633-1638.
- [6] 姜晓华,姚庆莘,姜隼,等. 切应力与血管平滑肌细胞对内皮细胞增殖的影响及 TGF β 1 与 p-Akt 信号通路在其中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5): 316-320.
Jiang XH, Yao QP, Jiang X, *et al.* Shear stress and vascular smooth muscle cells modulate the proliferation of endothelial cells via TGF β 1 and p-Akt pathways [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5): 316-320.
- [7] 崔晓萍,应大君,李黔宁,等. 流体剪切力调节内皮细胞组织因子表达的初步探讨 [J]. *医用生物力学*, 2005, 20(4): 212-215.
Cui XP, Ying DJ, Li QN, *et al.* effect of fluid shear stress on regulating the expression of tissue factor in endothelial cells [J]. *J Med Biomech*, 2005, 20(4): 212-215.
- [8] Cheng BB, Yan ZQ, Yao QP, *et al.* Association of SIRT1 expression with shear stress induced endothelial progenitor cell differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(12): 3663-3671.
- [9] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, *et al.* Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 2081-2088.
- [10] Ye C, Bai L, Yan ZQ, *et al.* Shear stress and vascular smooth muscle cells promote endothelial differentiation of endothelial progenitor cells via activation of Akt [J]. *Clin Biomech*, 2008, 23(Suppl 1): S118-S124.
- [11] Cui X, Zhang X, Guan X, *et al.* Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 419-425.
- [12] 崔晓栋,官秀梅,张晓芸,等. 细胞骨架 F-actin 在层流剪切应力诱导 EPCs 内皮分化中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2012, 27(5): 548-555.
- [13] Zhang J, Zhang X, Li H, *et al.* Hyperglycaemia exerts deleterious effects on late endothelial progenitor cell secretion actions [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2013, 10(1): 49-56.
- [14] Li H, Zhang X, Guan X, *et al.* Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, doi: 10.1186/1475-2840-11-46.
- [15] Zhang X, Cui X, Cheng L, *et al.* Actin stabilization by jasplakinolide affects the function of bone marrow-derived late endothelial progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50899.
- [16] Murayama T, Tepper OM, Silver M, *et al.* Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(8): 967-972.
- [17] Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, *et al.* Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis [J]. *Science*, 2008, 319(5860): 195-198.
- [18] Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, *et al.* Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities [J]. *BMC Med Genomics*, 2010, doi:10.1186/1755-8794-3-18.
- [19] Hur J, Yoon CH, Kim HS, *et al.* Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 288-293.
- [20] 杨震,赖光华,夏文豪,等. 流体切应力与内皮祖细胞铜锌超氧化物歧化酶基因表达及活性 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(10): 1871-1874.
- [21] Yang Z, Wang JM, Wang LC, *et al.* In vitro shear stress modulates antithrombotic potentials of human endothelial progenitor cells [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2007, 23(2): 121-127.
- [22] Autiero M, Luttun A, Tjwa M, *et al.* Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: Novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(7): 1356-1370.
- [23] Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 937-945.
- [24] Zeng L, Xiao Q, Margariti A, *et al.* HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7): 1059-1069.