文章编号:1000-5404(2009)12-1135-05

论著

周细胞在创面修复早期血管生成中的分布与意义

孙慧勤[1],冯一梅[2],章 容[1],王明科[2],郭德玉[1],阎国和[2],邹仲敏[2] (第三军医大学:[1]西南医院病理学研究所,[2]军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究周细胞在创面修复肉芽组织血管生成过程中出现、分布规律与意义。**方法** 采用常规免疫组化、双重免疫组化染色,电镜技术及形态定量分析方法观测小鼠皮肤全层切割伤模型(1~9 d),特别是早期1、3、5、7 d创面修复肉芽组织内血管生成过程中,周细胞的出现、分布规律。离体采用转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)诱导分化的周细胞前体细胞10T1/2模型,观察其在细胞外基质胶立体培养的变化。**结果** 周细胞可见于肉芽组织血管生成早期(1~7 d),且周细胞阳性染色的细胞数较内皮细胞多。肉芽组织内毛细血管和周细胞的数量在伤后持续增加,直到伤后5 d达峰值。周细胞在肉芽组织中还可形成条索状、腔样结构;离体培养的周细胞在细胞外基质胶内能够形成管腔样结构。**结论** 周细胞参与了肉芽组织早期血管生成过程并可形成腔样结构,可能在血管生成中具有主导或引导作用。

关键词: 肉芽组织;血管生成;周细胞;创面修复
中图法分类号: R329.2;R364.33;R641.02 **文献标识码:** A

Roles of pericytes in the early angiogenesis of wound healing

SUN Hui-qin[1], FENG Yi-mei[2], ZHANG Rong[1], WANG Ming-ke[2], GUO De-yu[1], YAN Guo-he[2], ZOU Zhong-min[2] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the patterns of the presence and distribution of pericytes in granulation tissue of wound repair and the related significance. **Methods** Granulation tissue samples were collected from mice suffered from full-thickness skin excision on 1, 3, 5, 7, and 9 d after injury. Single and double immunohistochemical staining, electron microscopy, and quantitative analysis of morphology were applied to study the presence and distribution of pericytes during angiogenesis of granulation tissues. Meanwhile, *in vitro* transforming growth factor-β1 (TGF-β1)-induced differentiation of 10T1/2 cell, a progenitor of pericyte, was assessed in 3-dimensional extracellular matrix (ECM) gel. **Results** Pericytes were found in the early stage of wound repair. The number of pericytes positive to staining was higher than that of endothelial cells in the new microvessels. The number of capillaries and pericytes in granulation kept increasing till 5 d after the injury. The pericytes stimulated with TGF-β1 were able to form cell cords and clumps *in vivo* and cell cord- or lumina-like structure in ECM gel *in vitro*. **Conclusion** Pericytes participate in the early angiogenesis in the wound healing and the formed cell cord or lumina structure may play a crucial or guiding role in angiogenesis.

Key words: granulation tissue; angiogenesis, pericyte; wound healing

血管生成(angiogenesis)是指从周围已经存在的成熟血管芽生出新的微血管过程,其见于许多的生理及病理过程如创面修复、肿瘤生长等,并在其中发挥了重要作用[1]。微血管主要由内衬的内皮细胞和外围的周细胞组成,血管生成涉及这2种细胞的分化、增殖、迁移和共同作用等重要过程,长期以来研究的焦点主要在于内皮细胞,对微血管壁另一细胞组分的周细胞则并未加重视。近年来随着更多周细胞标记物的发现与应用,周细胞在血管发生、血管生成、血管成熟和

基金项目:全军医学科研"十一五"计划国际合作项目(06H030);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(2006-A)
Supported by the International Cooperative Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H030) and the Open Foundation for State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (2006-A)
作者简介:孙慧勤,女,云南省昆明市人,博士,副教授,副主任医师,主要从事病理学及血管生成方面的研究。电话:(023)68771724, E-mail: huiqinsun02@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-09-22;修回日期:2009-01-17

塑型等方面的研究得以深入,其作用和意义也逐步引起关注,特别是在血管生成中的作用越来越受到重视[2-5],一些研究发现周细胞见于新生血管芽,提示周细胞在血管生成早期就发挥重要乃至主导作用[2,6]。本研究拟通过小鼠创面修复模型血管生成过程中周细胞出现及分布规律的研究,结合离体培养周细胞模型的研究,探讨周细胞在血管生成中的作用。

1 材料与方法

1.1 小鼠皮肤切割伤修复模型复制

参照本校全军复合伤研究所及 Richard 等[7,8]的方法进行:雄性健康昆明种小鼠 25 只(4 周龄,购自本校实验动物中心),体质量(20 ± 2.5) g。小鼠以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg),背部剃毛,酒精消毒,于背部沿身体长轴作一长约 1.5 cm 的皮肤全层切口,压迫止血、对合创口。术后置于干净笼内正常喂饲,注意观察记录创面出血和全身状况。于伤后 1、3、5、7、9 d 时相点取材,每时相点 5 只小鼠。取材时沿离创缘 2 mm 处环形切取组织,并分别于 10% 福尔马林,4% 多聚甲醛及戊二醛液中固定。

1.2 常规组织学

组织经 10% 福尔马林固定,进行常规石蜡包埋,行 4 ~ 5 μm 切片,HE 染色。

1.3 免疫组化

采用石蜡包埋标本进行连续 5 μm 切片,脱蜡至水,按本室常规免疫组化方法进行。部分标本采用 4% 多聚甲醛固定 4 h,20% 蔗糖过夜,OCT 包埋, -20 ℃保存。连续切片 5 μm,空气中干燥, -80 ℃保存。染色前,冰丙酮固定 15 min。

1.3.1 CD34、CD31 及平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA)免疫组化染色 每个标本各选取上述 3 张 5 μm 的连续切片,采用即用型 EnVision 二步法,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精对比染色行免疫组织化学染色。选用抗体: CD31(即用型,上海长岛公司)、CD34(即用型,福建迈新公司)、SMA(1∶100,基因公司)。阳性结果判定: 抗体阳性反应呈棕黄色,CD31、CD34 为细胞膜阳性、SMA 为细胞质阳性。

1.3.2 CD34 及 SMA 免疫双标染色 采用 DouSP™ 免疫组化双染试剂盒(福州迈新公司产品),按说明书进行。第一抗体分别为小鼠抗 CD34 单克隆抗体(即用型,福建迈新生物科技公司),兔抗 SMA 多克隆抗体(1∶100 基因公司)。阳性结果判定: 第 1 个一抗(CD34)阳性反应呈蓝黑色, 细胞膜着色;第 2 个一抗(SMA)阳性反应呈红色,细胞质着色。

1.3.3 新生微血管密度、周细胞分布及数目的测定 微血管计数:首先在 ×100 视野下选择计数部位,然后在 ×400 视野下计数 CD34 或 CD31 阳性血管数,单个内皮细胞作为一个计数单位,不以是否形成管腔或管腔内有无红细胞作为计数标准,残存血管及管腔直径 >8 个红细胞者不计数;然后计数微血管 SMA 染色表达阳性周细胞数。每例选择 4 个不重复视野计数,然后计算单位视野(×400)的平均血管数,即微血管密度(Microvasscular Density, MVD)及平均周细胞数(Pericyte Number, PN)。

1.4 电镜观察

组织以 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定,经 0.2 mol/L 蔗糖磷酸缓冲液漂洗,1% 锇酸后固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,半薄切片定位,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,在 JEM-2000EX 型透射电镜下观察、照相。

1.5 细胞培养

周细胞激活、分化的离体模型:采用已认可的周细胞的前体细胞 10T1/2 由 TGF-β1 激活分化为周细胞的模型[9,10]。10T1/2(mouse mesenchymal cells, American Type Culture Collection, No. CCL 226,由本校全军复合伤研究所保存),在含 TGF-β1(达科为公司, 5 ng/ml)的 10% FBS DMEM 液作用 3 d 后进行 SMA(Santa Cruz 1∶50)、NG2(Santa Cruz 1∶50)的免疫荧光染色以及成型实验。

成型实验:ECM 胶(Sigma 公司产品)的制备(参照说明进行),参照本室建立方法[11]进行:按 10^5 个/ml 的量将分化的 10T1/2 细胞传入于铺有 ECM 胶的 12 孔培养板(0.5 ml/孔),补加含 TGF-β1(5 ng/ml)的 10% FBS DMEM 液至 2 ml/孔,逐日观察记录细胞管腔样结构形成情况。管腔样结构数目测定:随机计数 2 d 时每一视野(×100)内的管腔结构,每孔计数 10 个视野,每组 3 孔,求均值。

1.6 数据统计分析

数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Microsoft Excel 提供的 t 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 一般组织学观察

损伤后 1 d 创面主要为渗出和出血,局部组织变性坏死,大量中性白细胞为主的炎细胞浸润。3、5 d 时有大量肉芽组织生长,血管生成活跃,其中以 5 d 时血管生成最明显,在新生的血管间可见较多的梭形细胞,散在分布,有的则形成条索状、簇状结构,这些结构中部分甚至可见腔隙。7 d 肉芽组织内新生血管已较 5 d 时减少,可见胶原形成,9 d 时血管减少及胶原增生较前更加明显。

2.2 免疫组化染色

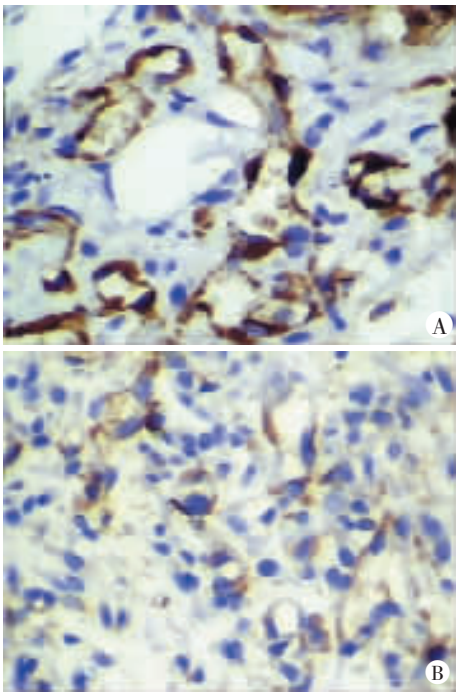
用免疫组化和免疫双标的方法对损伤修复模型血管生成的微血管构成进行观测,发现在新生血管中 SMA 阳性表达细胞多且强于内皮细胞,同时可见条索状、簇状分布的 SMA 阳性细胞。

2.2.1 CD34、CD31 及 SMA 免疫组化染色 用 CD31 或 CD34 染色标记血管内皮细胞、SMA 染色标记周细胞,显示新生微血管构成、PC 在新生血管中的位置、分布并测定微血管密度。

在血管生成明显的 3 ~ 7 d 组发现,新生微血管中 SMA 阳性细胞显示多于 CD31 或 CD34 阳性细胞(图 1);SMA 阳性细胞多位于微血管外周,符合周细胞的组织学分布特点。SMA 阳性细胞可见于新生肉芽组织中的一些点、簇状,管状和条索状结构,特别是可见与微血管相连的 SMA 阳性的条索状血管芽(图 2),提示存在着周细胞的芽生及由周细胞单一构成的新生微血管,而单个阳性的细胞可能为早期的周细胞或肌纤维母细胞。

2.2.2 CD34 及 SMA 免疫双标染色 采用内皮细胞及周细胞的标记物对新生肉芽组织中的微血管进行免疫双标,发现在

新生血管中呈蓝黑色的内皮细胞位于微血管内侧,而红色的周细胞在外侧,符合内皮细胞及周细胞的正常组织学分布定位。在数量上,呈红色的 SMA 阳性表达细胞多于蓝黑色 CD34 阳性表达细胞,同样也可见只由 SMA 阳性细胞构成的条索状、簇状分布的结构(图 3)。



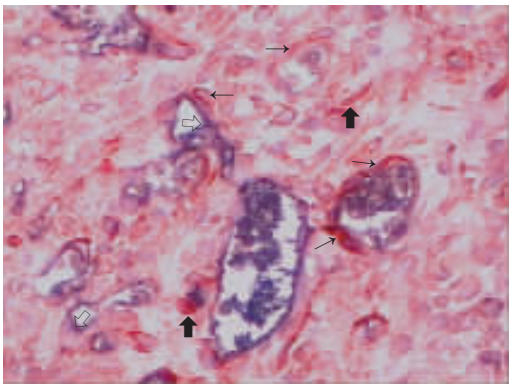
A:周细胞标记 SMA; B:内皮细胞标记 CD34

图 1　伤后 5 d 肉芽组织新生微血管免疫组化染色　(EnVision ×400)

2.2.3　新生肉芽组织中微血管密度和周细胞数量的定量分析

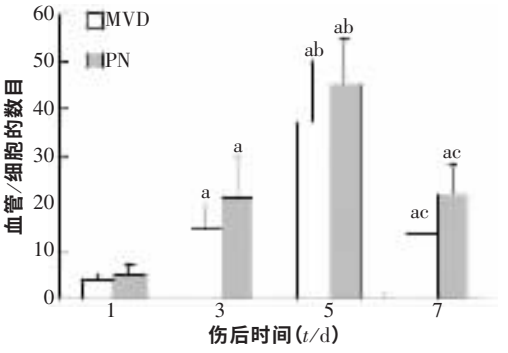
伤后 1、3、5 d 新生肉芽组织内微血管密度呈逐步增加趋势,以 5 d 为峰值,此后逐渐减少。9 d 时因多数血管已经闭塞、退化故未作染色与计数。1 d 与 3、5、7 d 比较,5 d 与 3、7 d 比较,其微血管密度均有显著性差异($P<0.01$),而 3、7 d 间差异无显著性($P>0.05$,图 4)。

如图 4 所示,微血管内周细胞的数量 1 ~5 d 呈逐步增多趋势,5 d 达峰值,此后逐渐减少。9 d 时因多数血管已经闭塞和退化,故未作染色与计数。1 d 与 3、5、7 d 比较,5 d 与 3、7 d 比较,其周细胞数均有显著性差异($P<0.01$),而 3、7 d 间差异无显著性($P>0.05$)。



⇧:内皮细胞 CD34 染色呈蓝黑色;↑:周细胞 SMA 染色呈红色;⬆:呈条索状或散在分布的 SMA 阳性细胞

图 3　伤后 5 d 肉芽组织新生微血管 CD34 及 SMA 免疫双标染色结果　(S-P ×200)

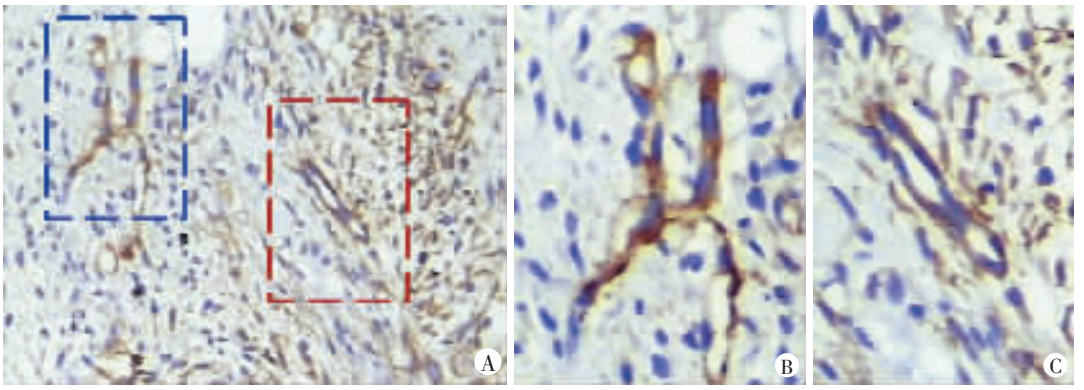


a:$P<0.01$,与 1 d 比较; b:$P<0.01$,与 3 d 比较; c:$P<0.01$,与 5 d 比较

图 4　伤后不同时间肉芽组织中 MVD 和 PN 的变化

2.3　电镜观察

伤后 3、5 d 肉芽组织内均见较多新生毛细血管形成,5 d 时更加明显。周细胞内细胞器较发达,周细胞及内皮细胞外围的基底膜可见,但不完整(图 5)。间质内有较多的成纤维细胞及胶原,5 d 较 3 d 为多。



A:SMA 阳性染色细胞多(×200);B:为 A 图蓝框部分放大(×400),可见与微血管相连的 SMA 阳性的条索状血管芽;C:为 A 图红框部分放大(×400),微血管壁 SMA 染色阳性细胞多且强

图 2　伤后 5 d 肉芽组织 SMA 免疫组化染色观察　(EnVision)



图5 伤后3 d新生毛细血管的电镜观察 (TEM)

2.4 周细胞的成型实验观测

经TGF-β1作用3 d后的10T1/2细胞,免疫荧光染色显示表达SMA和NG2(图6A、B),证实诱导后10T1/2细胞发生了向周细胞转化。该阶段的细胞用于成型实验。

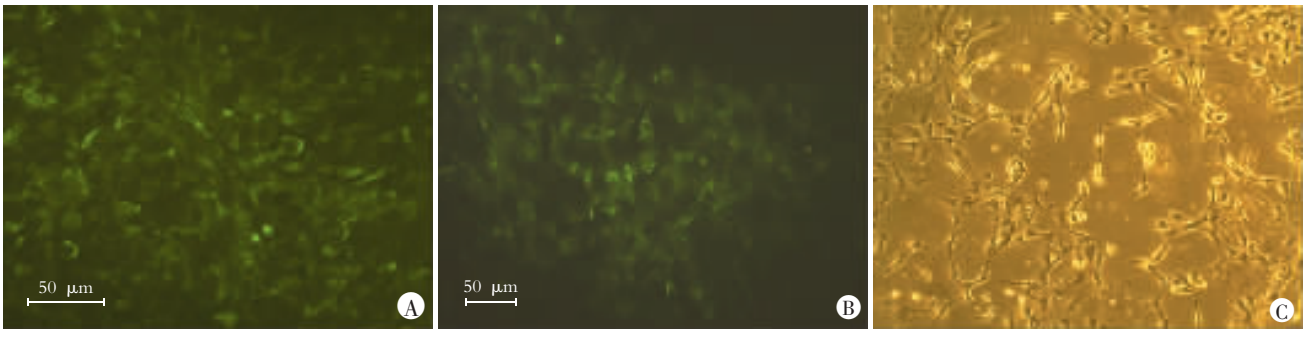
在基质胶上培养的周细胞1 d时即可见细胞拉长、相互连接,形成腔样结构,培养1~3 d均可见上述结构存在,2 d时最为明显(图6C),但表现不像内皮细胞形成的稳定,管腔样结构数目测定TGF-β1处理组(7.03±1.87)明显较对照组(1.07±0.98)为多,差异显著($P<0.01$)。

3 讨论

已有的研究认为血管生成是在缺氧等情况下促血管生成因子与抑制因子的平衡打破后启动,首先是内皮细胞激活形成血管生成表型;基质金属蛋白酶激活降解基底膜、细胞外基质成分,从而使内皮细胞迁移形成可能,进一步内皮细胞发生增殖、迁移,形成新生血管芽;此后血管芽在血流的冲击下出现管腔,同时招募间质中的周细胞贴附于新生血管,完成新生血管的塑型[1]。在此过程中,内皮细胞一直以来被认为是血管生成的主导者,而周细胞可能只是在血管生成后期参与血管塑型、维持血管稳定。而有研究发现在血管生成早期取主导作用的是周细胞,尤其是近年来得益于多种周细胞标记物的发现及应用,越来越多的研究支持这一推论。本研究采用小鼠创面修复模型动态观察了皮肤全层切割伤修复过程中,新生肉芽组织内的血管生成状况,特别是内皮细胞和周细胞的出现、分布和相互关系,以探讨周细胞在其中的可能作用。

对黄体血管生成研究揭示周细胞是第一个侵入破裂卵泡的细胞。采用几种标记见周细胞存在于血管芽,尤其是在未成熟血管簇有丰富的周细胞,并多于塑型期(此现象至少存在于发育的中枢神经系统)。血管生成的早期周细胞位于或超前于内皮细胞芽尖,由周细胞而非内皮细胞构成的血管芽的存在,提示周细胞在新生血管形成时起着引导结构的作用[2,6]。受内皮细胞释放的NO刺激,周细胞可分泌促血管生成因子bFGF、VEGF,通过这些因子招募内皮细胞的迁移并引导毛细血管襻的形成及延长[2-4,12]。这些发现提示周细胞在血管生成中的角色将发生根本的逆转[13]:周细胞能够感受血管生成刺激,引导血管芽生,是血管生成的先驱者,这种认识的变化对于如何发挥血管生成作用和抑制血管生成的治疗将具有重要的指导意义。

周细胞是一种扁而有突起的细胞,主要位于毛细血管的内皮细胞周围,2种细胞外有相连的基底膜覆盖,并存在细胞连接及相互调控作用。虽然100多年前周细胞就已被发现,但相关的研究则显著滞后于内皮细胞,特别是在血管生成中的地位和意义尚未明确或处于争论之中,主要原因是周细胞在表达、分布等方面具有显著的异质性,且缺乏有效的、特殊的标记从而制约了相关研究。近年来随着大量周细胞标记物的发现和应用对周细胞的研究有了新的认识和进展,目前常用的标记物有胞内蛋白如平滑肌抗原(SMA),结蛋白(desmin),转基因启动子XlacZ4(the promoter trap transgene XlacZ4)和G蛋白信号调节子-5(the regulator of G-protein signaling-5,RGS5);细胞表面蛋白或受体如:高分子量黑色素瘤抗原(high molecular weight melanoma antigen ,HMW-MMA)在小鼠称之为NG2(nerve/glial antigen 2),血小板源性的生长因子β受体(platelet-derived growth factor β-receptor,PDGFR-β)等[2-4]。但这些标记物中尚无一个是周细胞特异的、能够识别所有周细胞的标记,因为在不同器官和不同发育时期它们的表达都是不同的、变化的,不同种属的



A:SMA免疫荧光染色;B:NG2免疫荧光染色;C:在基质胶上培养2 d形成腔样结构(倒置相差显微镜×100)

图6 10T1/2细胞经TGF-β1(5 ng/ml)作用3 d后的观察

表达也有差异。国内王医术等[14]主要采用 αSMA 作为标记对新生血管周细胞进行了研究,证明其可作为周细胞的有用指标。本研究采用 SMA 作为周细胞的标记也表明其见于血管生成早期的周细胞,支持上述观点。

血管生成是创伤修复的重要环节,多种细胞和调控因子等参与了此过程[15],本研究在小鼠皮肤切割伤模型上发现,肉芽组织主要见于伤后 3 ~ 7 d,而其内的血管生成以 5 d 时最为明显,对新生微血管密度的测定与该病理学观察结果一致。当损伤后创面发生出血、坏死及炎症反应,导致局部促血管生成因子如 VEGF、PDGF、TGF-β、bFGF 等因子增加,从而刺激损伤周围组织的血管芽生或血管构成细胞的前体细胞转化启动血管生成过程,同时间质中的间充质干细胞激活转化为成纤维细胞、肌纤维母细胞等共同在损伤创面形成肉芽组织,达到修复创面的目的,在此过程中,血管生成以 5 d 时最为明显,此后间质中的成纤维细胞等开始产生胶原等细胞间质成分连接、稳固创面,新生微血管部分开始闭塞、数目逐步减少,这也是本实验观察见微血管、周细胞计数 1、3、5 d 时呈上升趋势,5 d 达到峰值后便呈减少趋势,使 3、7 d 时的观测呈现无差异性。有研究发现周细胞可从基底膜游离出去转分化为成纤维细胞,产生胶原基质参与创面修复、炎症等病理过程[4],更说明该细胞具有的重要性。进一步采用 SMA 作为周细胞、CD31 或 CD34 作为内皮细胞的标记物,对创面肉芽组织血管生成过程中微血管密度与构成、特别是周细胞的分布进行了观测。我们发现 SMA 作为周细胞、CD31 或 CD34 作为内皮细胞的标记物,无论是在单标还是双标情况下,免疫组化染色效果良好,在组织分布与表达位置上的定位、显示方面都准确可靠。对新生微血管密度以及周细胞在微血管壁的分布计数测定表明:二者的变化是平行的,随着微血管密度的增多,周细胞数目也呈上升趋势,周细胞与微血管数的比值以 3、5 d 时最高,至少在 1 个微血管上分布有 1 ~ 1.5 个周细胞。电镜下也见新生毛细血管周至少存在 1 个以上的周细胞,3 d 组就可见,说明血管生成早期周细胞就已经存在,且增生也较明显。另外,新生肉芽组织还存在一些 SMA 阳性呈点、簇状,管状和条索状分布的细胞,这些单个阳性的细胞可能为肌纤维母细胞或早期的周细胞,部分呈簇状、条索状和管状分布的 SMA 阳性细胞区域可见腔隙,特别是可见与微血管相连的 SMA 阳性的条索状血管芽,提示血管生成过程中存在着周细胞的芽生及由周细胞单一构成的新生微血管,周细胞可能具有引导血管生成中内皮芽生及形成血管腔(成型)的能力。为证实后者推论,我们通过采用周细胞的前体细胞 10T1/2 由 TGF-β1 激活分化为周细胞的模型,观测了其在基质胶上培养成型的情况,结果发现该细胞可形成腔样结构,虽然不似内皮细胞形成腔样结构的稳定。

上述结果显示:创面修复新生血管中周细胞的增生和程度非常明显,且有单由周细胞构成的新生微血管存在,揭示周细胞参与了肉芽组织早期血管生成过程并可形成腔样结构,初步提示周细胞在血管生成中可能具有主导或引导作用。因此重新认识或加强对周细胞作用的研究,将有利于对其在多种生理、病理状态特别是血管生成中作为治疗靶点的干预应用。

参考文献:

[1] Otrock Z K, Mahfouz R A, Makarem J A, *et al*. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms[J]. Blood Cells Mol Dis, 2007, 39(2): 212 - 220.

[2] Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(4): 452 - 464.

[3] Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2003, 314(1): 15 - 23.

[4] Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions[J]. Circ Res, 2005, 97(6): 512 - 523.

[5] Betsholtz C, Lindblom P, Gerhardt H. Role of pericytes in vascular morphogenesis[J]. EXS, 2005, (94): 115 - 125.

[6] Ozerdem U, Stallcup W B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation[J]. Angiogenesis, 2003, 6(3): 241 - 249.

[7] 屈纪富, 江德鹏, 郑怀恩, 等. 创伤早期伤口液对体外培养真皮多能干细胞增殖迁移特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(24): 2393 - 2395.

[8] Gamelli R L, He L K. Incisional Wound healing: model and analysis of wound breaking strength[M]// DiPietro L A, Burns A L. Wound healing: methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2003: 37 - 54.

[9] Darland D C, D'Amore P A. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells[J]. Angiogenesis, 2001, 4(1): 11 - 20.

[10] Darland D C, Massingham L J, Smith S R, *et al*. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival[J]. Dev Biol, 2003, 264(1): 275 - 288.

[11] 孙慧勤, 邹仲敏, 陈意生, 等. 去甲二氢愈创木酸对胶质瘤诱导的血管内皮细胞成型的作用[J]. 解剖学报, 2000, 31(4): 359 - 363.

[12] Guo P, Hu B, Gu W, *et al*. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment[J]. Am J Pathol, 2003, 162(4): 1083 - 1093.

[13] Virgintino D, Ozerdem U, Girolamo F, *et al*. Reversal of cellular roles in angiogenesis: implications for anti-angiogenic therapy[J]. J Vasc Res, 2008, 45(2): 129 - 131.

[14] 王医术, 李玉林, 朱桂彬, 等. 乳腺癌间质新生血管周细胞的形态学特点及其意义[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(3): 176 - 179.

[15] Eming S A, Brachvogel B, Odorisio T, *et al*. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model[J]. Prog Histochem Cytochem, 2007, 42(3): 115 - 170.

(编辑　吴培红)