文章编号:1000-5404(2009)15-1483-05

论著

外源性 gFGF-2 对大鼠骨髓内皮祖细胞体外生物学活性的影响研究

石镁虹[1],崔　驰[2],施　森[1],孙晓磊[1],宋　丽[1],何延政[1]　([1]泸州医学院附属医院血管外科,四川 泸州 646000;[2]绵阳市中心医院普外科,四川 绵阳 621000)

摘　要:目的　观察外源性糖化碱性成纤维细胞生长因子-2(glycated fibroblast growth factor-2, gFGF-2)对大鼠骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)数量及体外生物学活性的影响。**方法**　将 10 μg/ml FGF-2 同 250 mmol/L 浓度的 D-果糖于 37 ℃共同培养 48 h 制备 gFGF-2,用蛋白指纹图谱分析仪检测其糖化情况。密度梯度离心法获取大鼠骨髓单个核细胞,培养 4 d 后,分组分别用 FGF-2(150 μg/ml)、gFGF-2(150 μg/ml)继续干预培养 3 d。用免疫组织化学和免疫荧光染色作 CD34、CD133、VEGFR-2、ac-LDL 和 UEA-1 检测来鉴定 EPC。胰酶消化培养 7 d 的贴壁细胞,将细胞分别同 FGF-2 和 gFGF-2 于 37 ℃下培养 72 h,用血管生成试剂盒检测其能力。收集培养 7 d 的细胞,贴壁细胞作 EPCs 附能力测定;用改良的 Boyden 小室作 EPCs 迁移能力测定;MTT 法测定 EPCs 增殖能力;用放射性免疫法测定细胞的培养液 GM-CSF,EPO 和 IL-8 的含量。**结果**　经蛋白指纹图谱分析鉴定 FGF-2 成功糖化成 gFGF-2。EPCs 体外功能测定表明 gFGF-2 组骨髓 EPCs 比 FGF-2 组明显的黏附能力降低($P<0.05$),迁移能力降低($P<0.01$),增殖能力减弱($P<0.05$),成血管能力降低($P<0.01$);EPC 分泌的 EPO($P<0.05$)、GM-CSF($P<0.01$)和 IL-8($P<0.01$)比对照组都减少($P<0.01$)。**结论**　EPC 在 gFGF-2 的作用下数量减少且体外生物学活性降低,并且血管新生能力也减弱,推断 gFGF-2 可能是糖尿病患者体内血管新生功能降低的原因之一。

关键词:糖化碱性成纤维细胞生长因子;内皮祖细胞;糖尿病;血管新生
中图法分类号:R322.12;R329.28;R341　　**文献标识码**:A

Effects of exogenous glycated basic fibroblast growth factor-2 on the biological activity of endothelial progenitor cells originated from rat bone marrow *in vitro*

SHI Mei-hong[1], CUI Chi[2], SHI Sen[1], SUN Xiao-lei[1], SONG Li[1], HE Yan-zheng[1] ([1]Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou 646000; [2]Department of General Surgery, Central Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000, Sichuan Province, China)

Abstract: Objective　To investigate the effects of glycated fibroblast growth factor-2 (gFGF-2) on the number and the biological activity of endothelial progenitor cells (EPCs) from rat bone marrow *in vitro*. Methods　Recombinant FGF2 at the dose of 10 μg/ml was incubated with fructose at the dose of 250 mmol/L at 37 ℃ for 48 h. Glycated proteins were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry (MALDI). Total mononuclear cells (MNCs) were isolated from bone marrow by Ficoll density gradient centrifugation. After cultured for 4 d, MNCs were divided into three groups: the first group cultivated in FGF-2 (150 μg/ml), the second group cultivated in gFGF-2 (150 μg/ml), and the blank group cultivated without any growth factor for another 3 d × respectively. The shape/growth/multiplication conditions were observed by inverted phase contrast microscopy. EPCs were identified using CD34, CD133, VEGFR-2, ac-LDL, and UEA-1 by immunohistochemical and immunofluorescent stainings. The attached cells were collect at 7 d after culture by trypsinization. Then cells were incubated at 37 ℃ for 72 h with gFGF-2 (or FGF-2). The angiogenic activity was determined with an in vitro angiogenesis kit. The attachment ability of the cells at 7 d after culture was detected. The migration ability of EPCs was determined with the modified Boyden cave method. The reproductive activity was determined by MTT method. The amount of EPO, GM-CSF and IL-8 in cell culture solution was also determined by radioactivity immunization. Results　Protein fingerprint analysis showed that FGF-2 was

作者简介:石镁虹,女,福建省三明市人,硕士研究生,主要从事血管外科基础与临床方面的研究。电话:(0830)3370125,E-mail:ruby8402@21cn.com
通信作者:何延政,电话:(0830)3165012,E-mail:heyanzheng@163.com
收稿日期:2008-10-31;**修回日期**:2008-12-12

successfully glycated to gFGF-2. Test of angiogenic capability in gFGF-2 group and FGF-2 group *in vitro* indicated that glycated FGF-2 could inhibit angiogenic activity ($P<0.05$). The number, adhesion ability, migration ability, reproductive activity, EPCs secreted amount of EPO, GM-CSF, and GM-IL-8 in gFGF-2 group were lower than those in FGF-2 ($P<0.05$). **Conclusion** The decreased number, the lowered biological activity, and weakened angiogenic ability of EPCs originated from rat bone barrow in vitro after culture with gFGF-2 may suggest that gFGF-2 may be one of the factors leading to impairment of angiogenesis in diabetes mellitus patients.

Key words: glycated basic fibroblast growth factor; endothelial progenitor cells; diabetes mellitus; angiogenesis

糖尿病血管病变是多种因素作用于不同发病环节、影响多种分子机制的结果[1]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种能直接分化为血管内皮细胞的前体细胞,在生理和病理条件能够修复损伤的血管内皮细胞,参与血管新生过程[2]。实验与临床证据表明[3],糖尿病外周血 EPCs 的数量和数量都降低,这可能和糖尿病血管并发症发病机制有关。高糖环境在体外可引起健康人 EPCs 数量显著减少,且功能受损[4],从而降低糖尿病的血管再生能力。另一方面,糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)及其受体的相互作用在糖尿病血管病变的作用也受到研究者的关注。国外研究表明[5,6]在高糖环境中,除了大分子蛋白质发生糖化反应外,成纤维生长因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2)也能同还原糖发生非酶的共价结合,形成糖化成纤维细胞生长因子-2(glycated fibroblast growth factor-2, gFGF-2)。本实验主要通过制备 gFGF-2 并观察在其影响下大鼠骨髓 EPCs 数量、成血管能力以及体外各项生物学活性的变化情况,进一步明确糖尿病血管病变的机制,为防治糖尿病血管病变提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

M199 培养液培养基、FITC-UEA-I 均由美国 Sigma 公司提供,大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司,胎牛血清(FCS)由杭州四季青生物工程材料研究所提供,胰蛋白酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司,Ⅰ型鼠尾胶原、FGF-2 由 R&D 公司提供,VEGF 购自 Prospect 公司,兔抗鼠Ⅷ因子、CD133 抗体由武汉博士德公司提供,兔抗大鼠 CD34 单克隆抗体购自美国 Sant Cruz 公司,F1TC 标记 CD133 抗体、PE 标记的血管内皮生长因子受体-2 购自 BioLegend 公司,DiI-LDL 购自 Molecular Probe 公司,改良的 Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂, SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒由武汉博士德公司提供,体外血管生成分析试剂盒购自 Chemicon 公司,二甲基亚砜(MTT)购自华美生物工程公司, EPO 放射免疫分析试剂盒、IL-8 放射免疫分析试剂盒、GM-CSF 放射免疫分析试剂购自北京普尔伟业生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 糖化成纤维生长因子(gFGF-2)的制备 成年健康雄性 SD 大鼠(4 月龄)30 只,体质量(200±5)g,由泸州医学院实验动物中心提供,合格证:医动字第 24101115 号,动物级别一级。将重组鼠碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)溶解于 PBS 溶液中(pH=7.4, 最终浓度为 10 μg/ml)。然后 -70 ℃冻存备用。试验前用将 FGF-2 同 250 mmol/L 浓度的 D-果糖于 37 ℃ 共同培养 48 h。然后用蛋白指纹图谱分析仪检测其糖化情况,利用分子生物膜提纯 gFGF-2 因子,备用。

1.2.2 大鼠骨髓 EPC 分离培养与分组 SD 大鼠被处死后,用 75% 酒精浸泡消毒 10 min。于超净台中,在无菌条件下收集骨髓液并用密度梯度离心法获取单个核细胞。以 1×10^6/L 细胞数接种于加有 M199 完全培养液(含有 20% 优质胎牛血清、VEGF 20 ng/ml、bFGF 5 ng/ml)的包被Ⅰ型胶原的培养皿中,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

细胞长满后用胰酶消化(一般为 4 d),以 1×10^6 细胞数,分为 3 组($n=30$)。gFGF-2 组(实验组)M199 培养液中生长因子改用 gFGF-2 (150 ng/ml), FGF-2 组(对照组)仍用 FGF-2 (150 ng/ml),空白组不加生长因子,只用 M199 和胎牛血清。继续干预培养 3 d 后胰酶消化备用。

1.2.3 EPC 的鉴定 用胰蛋白酶消化收集培养第 7 天之原代 EPCs(即分组后培养第 3 天的 EPCs),用免疫组织化学检测 CD34;用免疫荧光检测 FITC 标记的 CD133 抗体、PE 标记的 VEGFR-2 抗体以及 FITC 标记的 UEA-1,标本在荧光显微镜下观察, 随机选择 10 个 200 倍视野,用倒置荧光显微镜对每孔内皮祖细胞进行计数。

1.2.4 EPC 体外血管生成能力测定 采用体外血管生成试剂盒检测 EPC 的血管生成能力,将 ECMatrix™ 凝胶溶液和 10× ECMatrix™ 缓冲稀释液置于 4 ℃冰箱过夜解冻。在冰上将 150 μl 的 10× ECMatrix™ 缓冲稀释液加入到 1 250 μl 的 ECMatrix™ 凝胶溶液中,将上述溶液加入预冷的 96 孔板中,每孔 50 μl,37℃孵育 1 h 成胶。消化贴壁细胞,获取分组培养后第 3 天的 EPC,并重新悬浮于培养液,调整细胞数为 5×10^4/ml。将 EPC(10 000 个/孔)接种于 ECMatrix 胶上。将细胞置于 37 ℃组织培养箱中培养,于 6、12 h 和 18 h 在倒置显微镜下观察小(血)管生成情况并照相(细胞拉长变形,长度为宽度的 4 倍以上即可被认为形成小管)。

1.2.5　EPC 黏附能力检测　　取培养 7 d 的 EPC(即分组后培养第 3 天的 EPCs)用 0.25% 胰酶 1.0 ml 消化收集细胞,悬浮于培养液中计数,然后将细胞接种至包被的 12 孔板,在 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 6 h。吸去未粘附的细胞和培养液,用 PBS 轻轻洗涤 2 次,在倒置相差显微镜下计数(×200)。每孔随机选择 6 个视野计数,取平均值。

1.2.6　EPC 迁移能力测定　　收集第 7 天贴壁细胞(即分组后培养第 3 天的 EPCs),加入无细胞因子的培养液调整细胞数 2×10^5/ml。将含有 VEGF 20 ng/ml 和 bFGF 5 ng/ml 的 M199 培养液 200 μl 加入改良的 Boyden 小室的下室。在上、下室之间放入孔径为 8 μm 的微孔滤膜。把上室置于下室上并固定,将 200 μl 细胞悬液注入上室,在 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 12 h。取出微孔滤膜,刮去滤膜上面的未移动细胞,PBS 漂洗,以 4% 多聚甲醛固定,Giemsa 染色。随机选择 3 个显微镜视野(×200)计数迁移到低层的细胞并照相。

1.2.7　EPC 增殖能力测定　　收集第 7 天贴壁细胞(即分组后培养第 3 天的 EPCs),调整细胞数为 2×10^5/ml。将细胞悬液加入包被的 96 孔板中,在 37 ℃, 5% CO_2 饱和湿度条件下孵育。在细胞覆盖率达 80% 时每孔加入用 PBS 新鲜配制的 5 mg/ml MTT 溶液 10 μl,继续在 37 ℃, 5% CO_2 饱和湿度条件下孵育4 h。弃上清液,每孔加入二甲基亚讽(DMSO)150 μl/孔,置微量震荡器上震荡 10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解。在酶标仪上选择 490 nm 为测定波长,测定光密度值[D(490)],并记录。

1.2.8　EPC 分泌功能测定　　收集第 7 天贴壁细胞(即分组后培养第 3 天的 EPCs),用 M199 培养液洗涤细胞,加入无细胞因子和血清的培养液重悬细胞,调整细胞数为 1×10^6/ml。将细胞接种在 12 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 72 h。收集细胞的培养液,离心后取上清液用放射性免疫法测定 GM-CSF, EPO 和 IL-8 的含量。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 14.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析。

2　结果

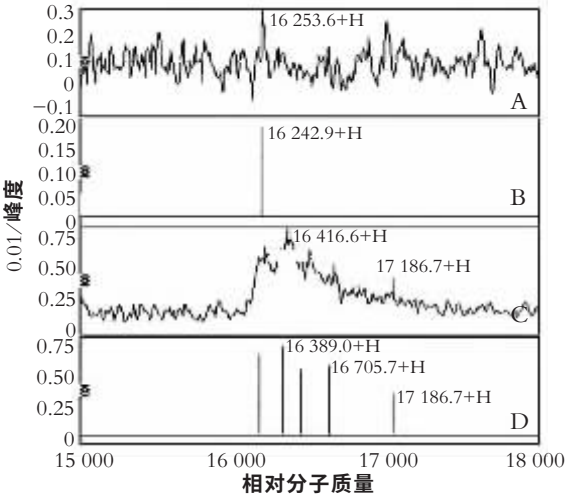
2.1　糖化 FGF-2 的鉴定

用蛋白指纹图谱分析仪,分别检测未做处理的 FGF-2 和同 D-果糖于 37 ℃共同培育 48 h 后的 FGF-2。如图 1 所示,重组 FGF-2 相对分子质量为 $16\ 242.9\times10^3$。然后将其同果糖共同培育 48 h 后其相对分子质量出现增加,为 $16\ 745.7\times10^3$。当图形回到基线时最大值为 $17\ 186.7\times10^3$,说明 FGF-2 上有糖基修饰出现。

2.2　内皮祖细胞的鉴定

2.2.1　EPC 的 CD34、CD133 和 VEGFR-2 表达　　经过 7 d 培养的 EPC 固定后进行免疫组化染色和免疫荧光染色,结果显示 CD34、CD133 及 VEGFR-2 均呈阳性反应。免疫组化染色结果表明,CD34 阳性细胞呈棕黄色,占 85% 以上。CD133 阳性细胞免疫荧光染色显示绿色荧光;VEGFR-2 阳性细胞免疫荧光染色显示红色荧光。见图 2。

2.2.2　DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 双染法鉴定 EPC 结果　　骨髓 EPC 培养第 7 天(即分组后培养第 3 天),取分别取各组贴壁细胞行 acLDL 摄取和 UEA-1 结合双荧光染色鉴定,经激光共聚焦显微镜成像显示,双染阳性细胞为 EPC (图 3),其比例占贴壁细胞总数的 95% 以上,证实绝大多数贴壁细胞为 EPCs。



A:样本 1,未做处理的 FGF-2; B:样本 1,FGF-2 的相对分子质量16 242.9;C:样本 2,糖基修饰后的 gFGF-2;D:样本 2,糖基修饰后的 gFGF-2 在 48 h 后达到 16 705.7,回到基线时最大值为 17 186.7

图 1　FGF-2 和 gFGF-2 的蛋白指纹图谱分析

2.3　EPCs 数量及体外功能的测定

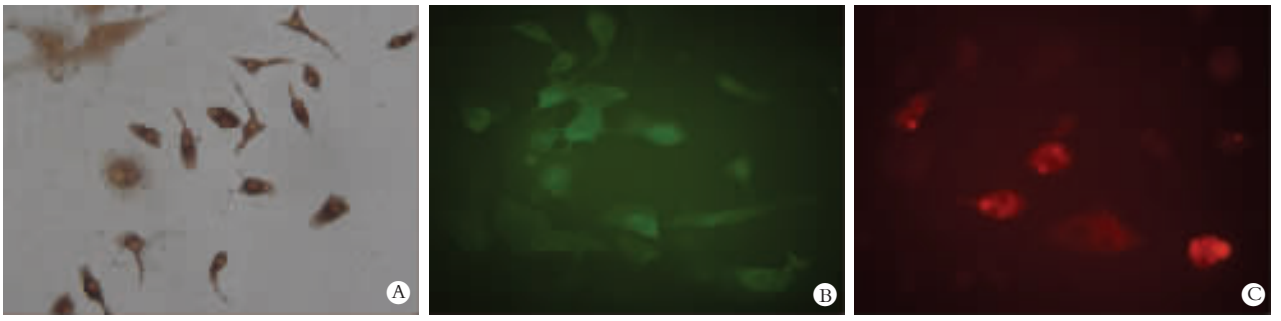
2.3.1　EPCs 数量测定　　分别取培养 7 d 骨髓 EPCs(即分组培养 3 d 后的 EPCs),用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 对细胞染色后,通过荧光显微镜观察,DiI-acLDL 和 FITC-UEA-I 双染色阳性细胞(呈黄色)被认为是正在分化的 EPCs,并计数 10 个随机选择视野(×200)的 EPCs。发现加入糖化碱性成纤维细胞生长因子(gFGF-2)组的 EPC 数目为(57.13 ± 13.27),碱性成纤维细胞生成因子(FGF-2)的对照组 EPC 数目为(71.83 ± 6.45),gFGF-2 组比 FGF-2 的 EPCs 数量明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。未加入任何因子的空白组,其 EPCs 数量最少,仅为(25.87 ± 10.04)。

2.3.2　血管能力的测定　　在分组培养细胞 3 d 后,分别取相同数目的 EPCs 用体外血管生成试剂盒测定 EPC 的体外血管生成能力。分别在 6、12、18 h 时,采用双人双盲法,每孔选 5 个不同层面观察细胞数目及条索数。结果表明实验组 EPCs 的体外血管生成能力比对照组减少($P<0.01$)。而空白组对于对照组的 EPCs 的体外血管生成能力也明显降低($P<0.01$)。见表 1、图 4。

表 1　EPC 体外血管生成能力情况($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

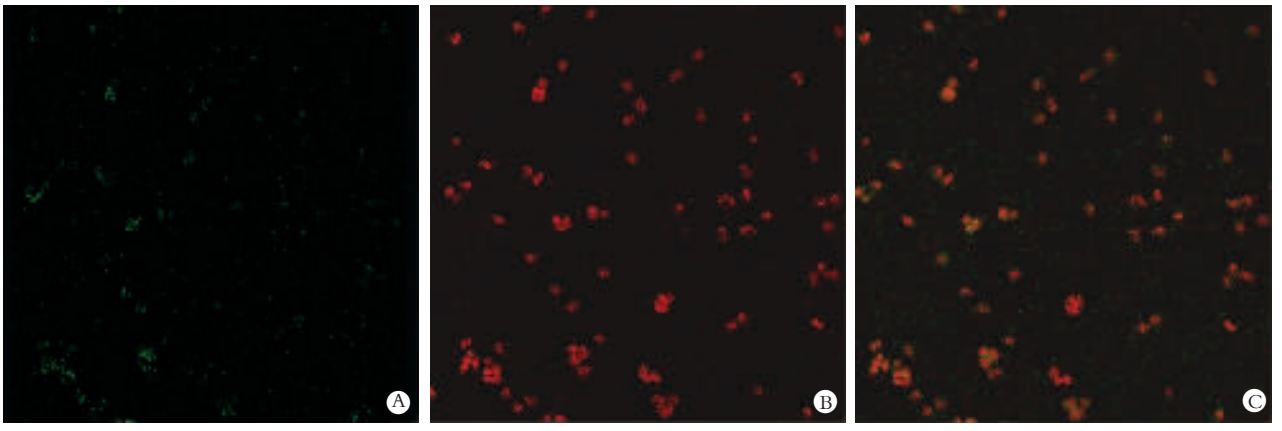
组别	6 h	12 h	18 h
空白组	0	1.30 ± 1.28	0
FGF-2 组	2.33 ± 1.51[a]	16.47 ± 2.67[b]	10.10 ± 2.18[b]
gFGF-2 组	1.53 ± 0.86	10.57 ± 2.72[b]	3.10 ± 1.47[b]

a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与空白组比较



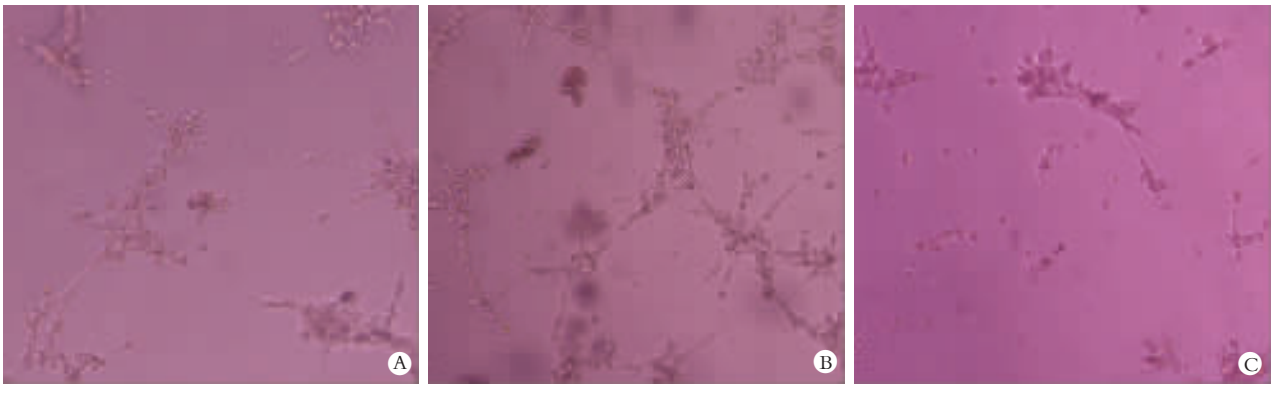
A:CD34 阳性表达　（免疫组化×100）;B:CD133 阳性表达　（荧光显微镜×200）;C:VEGFR-2 阳性表达　（荧光显微镜×200）

图2　EPC 免疫组化和免疫荧光鉴定



A:FITC-UEA-1 阳性细胞;B:DiI-acLDL 阳性细胞;C:双染阳性细胞

图3　EPC 的 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 双染法鉴定　（激光共聚焦显微镜×100）



A:FGF-2 组;B:gFGF-2 组;C:空白组

图4　培养 12 h EPCs 体外血管形成情况　（倒置相差显微镜×200）

表2　骨髓 EPC 在不同干预条件下的各项功能比较($n=30$, $\bar{x}\pm s$)

组别	黏附功能	迁移功能	增殖功能[D(490)]	分泌功能		
				EPO(pg/10^6cell)	GM-CSF (pg/10^6cell)	IL-8(ng/10^6cell)
FGF-2	51.23±4.99	17.07±1.98	0.459±0.025	261.53±7.59	401.47±11.09	35.10±3.33
gFGF-2	47.57±5.87	11.40±2.12	0.446±0.116	256.17±8.14	394.13±3.22	31.70±5.06
t	2.368	10.677	2.601	2.641	3.477	3.070
P	0.021	0.0001	0.012	0.011	0.001	0.003

2.3.3　EPCs 体外生物学功能测定　　取经过 7 d 培养的 EPCs(即分组培养后 3 d 的 EPCs)作细胞黏附功能测定、迁移功能测定、增殖功能测定、分泌功能测定,结果发现 gFGF-2 组 EPCs 黏附功能、迁移功能、增殖功能以及分泌功能均比对照组都有减弱($P<0.05$)。见表2。

3　讨论

EPCs[7]是一类具有增殖分化能力并可分化为内皮细胞的前体细胞,参与损伤血管的再生和修复。

EPC 存在于各种成年动物和人的骨髓、外周血、骨骼肌、血管软组织以及胎肝中,主要存在于骨髓。在体内,由于某些生理、病理原因,内皮祖细胞可以被细胞因子动员,从骨髓释放到外周循环,并在外周血中运行,募集、归巢到血管损伤区,通过整合进血管壁或提供生长因子两种方式来促使血管新生。动物实验和临床研究也证实新生血管中 25% 的内皮细胞是由 EPCs 分化而来的[8]。有研究表明 EPCs 可以分泌 VEGF 或 FGF-2 等细胞生长因子,通过旁分泌效应促进局部血管内皮细胞增殖,即增强血管生成效应,从而改善供血。然而在糖尿病血管病变中,EPCs 数量呈量效和时效地减少,同时 EPCs 的粘附、迁移、增殖和体外血管生成能力也受到了不同程度的影响[3]。其原因可能与细胞因子被糖基化,降低了 EPCs 的各项生物学功能,从而使其促血管新生能力下降[9]。

gFGF-2(糖化成纤维细胞生长因子-2),是由对血管新生有促进作用的 FGF-2(碱性细胞生长因子-2)发生非酶糖基化形成。它是由 Giardino 等[5]研究牛体外内皮细胞中 FGF-2 非酶糖基化作用时首先发现,gFGF-2 使内皮细胞的有丝分裂活动的减低。Duraisamy 等[6]在内皮细胞体外培养中发现 gFGF-2 组与正常的 FGF-2 对照组相比较,毛细胞血管小管的形成能力显著降低了 60% ~ 90%。Facchiano 等[10]将重组的 FGF-2 混合基胶注入小鼠体内发现 gFGF-2 明显抑制了注射部位血管新生作用。也有研究表明 EPCs 在高糖条件下培养时,降低了其增殖能力,增加了 EPCs 的衰老,损害了晚期 EPC 的迁移和管状结构形成能力[11,12],在糖尿病早期,由于机体的调节增加 FGF-2 的分泌,促进 EPCs 的动员[13],增加血管新生能力。然而在长期高糖环境中,FGF-2 渐渐被糖基化成 gFGF-2,抑制了 EPCs 的黏附、迁移、增殖、分泌功能,以及成血管能力。

本实验采用 D-果糖孵育 FGF-2 制备 gFGF-2,其糖基化结果与葡萄糖制备 gFGF-2 一致,而制备时间较葡萄糖制备短一倍[5,6,9],由于 FGF-2 在糖类物质孵育时间愈长愈易失去效能,故本实验中采用最优糖基化底物 D-果糖,而后用蛋白指纹图谱分析仪指检测出 gFGF-2 并用分子生物膜提取纯化 gFGF-2。实验表明在加入 gFGF-2 的干预组的大鼠骨髓 EPCs 的各项体外生物学功能均低于对照组,由此推断 FGF-2 被糖基化,可能是 EPCs 功能降低的重要原因,同时还能严重影响缺血部位的血管新生功能。同时提示,阻止 gFGF-2 形成或将 gFGF-2 还原 FGF-2 可能为防糖尿病微血管病变提供新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Silvestre J S, Levy B I. Molecular basis of angiopathy in diabetes mellitus[J]. Circ Res, 2006, 98(1): 4 - 6.

[2] Callaghan M J, Ceradini D J, Gurtner G C. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function[J]. Antioxid Redox Signal, 2005, 7(11 - 12): 1476 - 1482.

[3] 袁　红,陈君柱,王兴祥. 高糖对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(9): 803 - 806.

[4] Krankel N, Adams V, Linke A, *et al*. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(4): 698 - 703.

[5] Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(1): 110 - 117.

[6] Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, *et al*. Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes[J]. Angiogenesis, 2001, 4(4): 277 - 288.

[7] Gospodarowicz D. Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary[J]. J Biol Chem, 1975, 250(7): 2515 - 2520.

[8] Suzuki T, Nishida M, Futami S, *et al*. Neoendothelialization after peripheral blood stem cell transplantation in humans: a case report of a Tokaimura nuclear accident victim[J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 487 - 492.

[9] 张菲斐,王永奎,韩战营,等. 内皮培养条件下人外周血单个核细胞不同时段克隆成分的生物学特征[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008, 43(1): 53 - 56.

[10] Facchiano F, Lentini A, Fogliano V, *et al*. Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo [J]. Am J Pathol, 2002, 161(2): 531 - 541.

[11] Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, *et al*. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Circ J, 2006, 70(8): 1076 - 1081.

[12] Chen Y H, Lin S J, Lin F Y, *et al*. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms[J]. Diabetes, 2007, 56(6): 1559 - 1568.

[13] Fontaine V, Filipe C, Werner N, *et al*. Essential role of bone marrow fibroblast growth factor-2 in the effect of estradiol on reendothelialization and endothelial progenitor cell mobilization[J]. Am J Pathol, 2006, 169(5): 1855 - 1862.

(编辑　龙　亮)