文章编号:1000-5404(2010)09-0917-05

论著

大鼠脾脏来源内皮祖细胞对C6胶质瘤细胞增殖能力影响的体外研究

方靖琴,张伟国,马长锁 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所放射科)

[摘要] **目的** 研究体外内皮祖细胞对C6胶质瘤细胞增殖能力的影响。**方法** 取SD大鼠脾脏采用密度梯度离心法获取内皮祖细胞,通过观察其分化过程中的形态特征,激光共聚焦检测其吞噬乙酰化低密度酯蛋白(DiI-acLDL)和结合荆豆凝集素-1(FITC-UEA-1)的特异性,免疫荧光检测细胞表面抗原CD34和CD31的表达,对EPCs进行鉴定。按0、10%、20%、30%、40%、50% 6个浓度将内皮祖细胞条件培养基加至C6胶质瘤细胞的常规培养基中观测其对C6胶质瘤细胞增殖的影响;分别采用内皮祖细胞条件培养基和常规培养基孵育C6胶质瘤细胞24 h,流式细胞仪检测2组的细胞周期。**结果** 激光共聚焦鉴定DiI-acLDL和FITC-UEA-1双染色阳性细胞即为正在分化的内皮祖细胞;免疫荧光检测内皮祖细胞一致性表达CD34和CD31。随着内皮祖细胞条件培养基含量的增加,36 h和48 h各浓度组的光密度值也随着增加,且50%内皮祖细胞条件培养基组 D(490)值(2.018±0.220)、(2.388±0.448)均高于对照组(1.163±0.103)、(1.106±0.174),且差别有统计学意义($P<0.01$)。50%含有内皮祖细胞条件培养基培养的C6胶质瘤细胞的增殖率(即S+G_2/M)明显高于对照组[(34.650±1.492)% *vs* (29.587±2.504)%, $P<0.05$]。**结论** 体外内皮祖细胞条件培养基能促进C6胶质瘤细胞的增殖,其机制可能与其分泌的各种血管生成类细胞因子有关。

[关键词] 内皮祖细胞;C6胶质瘤细胞;增殖;体外
[中图法分类号] R322.21; R73-37; R730.264 [文献标志码] A

Rat spleen-derived endothelial progenitor cells promote proliferation of C6 glioma cells under co-culture system *in vitro*

Fang Jingqin, Zhang Weiguo, Ma Changsuo (Department of Radiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of endothelial progenitor cells (EPCs) on the growth of C6 glioma cells *in vitro*. Methods EPCs were obtained from the spleen of healthy SD rats with density gradient centrifugation and adherence screening. The obtained EPCs were identified through morphologic characteristics, specificity to DiI-acLDL uptaking and Lectin binding, and positive expressions of CD34 and CD31 by immunofluorescence assay. The EPCs-conditional medium was added into the convention medium of C6 glioma cells to assess its effect on the proliferation of glioma cells. After cultured for 36 or 48 h with the EPCs-conditional medium or conventional medium (control), MTT assay was employed to measure the cell proliferation and flow cytometry was used to detect the cell cycle. Results In 10 d after culture, the attached cells presented a "line-like" structure, and the adherent cells were double positive to DiI-acLDL uptaking and FITC-UEA-1 binding by direct flourescence staining under a laser scanning confocal microscope. Those cells were differentiated EPCs, and expressed wholly expressed CD34 and CD31. MTT assay showed that the OD value of each group at both the 2 time points were increased with the increasing of EPCs content in conditioned medium. The OD value of the group containing 50% of EPCs conditional medium of 36 h(2.018±0.220) and 48 h (2.388±0.448) was markedly higher than those of the control group (1.163±0.103, 1.106±0.174) with significant difference ($P<0.01$). The results of flow cytometry showed that the multiplication of experimental group is higher than control ones [(34.650±1.492)% *vs* (29.587±2.504)%, $P<0.05$]. Conclusion The EPCs can promote the proliferation of the C6 glioma cells *in vitro*, which may be through various angiogenic cytokines secreted by the cells.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; C6 glioma cells; proliferation; *in vitro*

Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSTC2007AC5014) and the Starting Fund for Returning Scholar of Third Military Medical University (2009XHG14). Corresponding author: Zhang Weiguo, Tel: 86-23-68757621, E-mail: wguo.zhang@gmail.com

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2007AC5014);第三军医大学回国人员启动基金(2009XHG14)
[通信作者] 张伟国,电话:(023)68757621,E-mail:wguo.zhang@gmail.com

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤,绝大多数为浸润性生长,常常侵犯周围正常组织间隙而与正常脑组织分界不清,影像学上多以CT、MRI增强扫描来评估肿瘤的浸润范围。然而肿瘤周边被瘤细胞所浸润和扩散的正常脑组织目前还不能被影像学所显示,因而手术切除后病灶残余和难以发现的卫星灶是脑胶质瘤治疗的难点。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种前体细胞,自1997年Asahara等[1]从外周血中成功分离出内皮祖细胞以来,其特异性归巢至肿瘤和缺血组织的生物学特性逐渐被证实。Arbab等[2]采用MRI成功显示了超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)标记的EPCs在肿瘤血管形成中的表达。MRI上利用SPIO标记的EPCs可以有助于显示胶质瘤浸润范围和卫星灶的早期诊断。然而EPCs具有促进血管形成的作用,其是否会改变胶质瘤细胞的增殖能力是其作为MRI诊断胶质瘤的靶向生物造影剂的可行性所需解决的问题。因此本研究通过观察体外EPCs条件培养基对C6胶质瘤细胞增殖能力的影响,为下一步体内实验提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

清洁健康级SD大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)。C6胶质瘤细胞购于中国科学院细胞库,大鼠淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司),0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(美国HyClone公司),DMEM培养基、DMEM/F_{12}培养基(美国Gibco公司),DiI-乙酰化低密度酯蛋白(DiI-acetylated low-density lipoprotein, DiI-acLDL,美国Invitrogen公司),荆豆凝集素-1(FITC-UEA-1,美国Sigma公司),抗鼠FITC-CD34抗体(美国Chemcon公司),抗鼠PE-CD31(美国BD公司),大鼠抗VEGF和SDF-1抗体(北京博奥森生物技术有限公司),DPBS(美国HyClone公司),噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 内皮祖细胞的分离培养与鉴定 大鼠脱臼处死,无菌条件下取大鼠脾脏,于200目细胞筛上剪碎并研磨,研磨过程中不断加DPBS冲洗。将冲洗液沿管壁缓缓加入盛有分离液的离心管内(两者体积比为2∶1),2 000 r/min离心20 min,吸取中间白色云雾层即单个核细胞层,1 500 r/min离心8 min,DPBS洗涤3次,最后弃上清加入DMEM培养基重悬。以细胞数2.5×10^6接种于培养瓶内,于37 ℃,5% CO_2培养箱内,第3天首次换液,以后第4天换液。贴壁细胞与DiI-acLDL(2.4 mg/ml)37 ℃孵育1 h以检测EPCs对乙酰化低密度酯蛋白的摄取。然后,丙酮4 ℃固定细胞10 min,DPBS冲洗2~3次,将FITC-UEA-1(10 mg/L)滴加于染色标本37 ℃孵育1 h。倒置荧光显微镜下观察并照片,激光共聚焦显微镜(LSCM)鉴定FITC-UEA-1和DiI-acLDL染色双阳性细胞为正在分化的EPCs。细胞培养约1周后,4%多聚甲醛固定20 min,PBS洗去多余固定液,分别加入10 μl抗鼠FITC-CD34和PE-CD31(0.2 mg/ml)湿盒避光孵育2 h,以PBS作为空白对照。PBS和三蒸水洗去多余抗体,60%缓冲甘油封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.2 内皮祖细胞条件培养基的制备 参照张嘉晴等[3]的方法加以改良。倒置显微镜下观察EPCs的生长情况,当细胞长满60%~70%时换液,并1 500 r/min离心8 min收集上清。换上新鲜的培养基后继续培养3~4 d后换液并收集之,将收集的同一批EPCs培养上清液混匀并经0.22 μm滤膜滤过后分装,即得到内皮祖细胞条件培养基(endothelial progenitor cells conditional medium, EPCs-CM),-20 ℃保存备用。

1.2.3 MTT比色法测C6胶质瘤细胞增殖能力 将C6胶质瘤细胞的培养分为6组:A组,常规培养基组(即只含DMEM/F_{12}完全培养基组);B组,10% EPCs-CM组(培养基中含10% EPCs-CM,90%完全培养基,以下类同);C组,20% EPCs-CM组;D组,30% EPCs-CM组;E组,40% EPCs-CM组;F组,50% EPCs-CM组。每组设4个复孔和1个调零孔,每孔加浓度为$(2\sim3)\times10^4$的C6胶质瘤细胞悬液200 μl。培养36和48 h后采用MTT比色法,酶标仪上测定490 nm处的光密度值$D(490)$,并做统计学分析比较。

1.2.4 检测EPCs-CM中VEGF和SDF-1的作用 参照唐震等[4]的方法并根据本实验实际情况进行改良。0.25%胰酶消化C6胶质瘤细胞并调细胞密度为$(2\sim3)\times10^4$接种于96孔板中,每孔200 μl,用1.2.3的实验结果中对C6胶质瘤细胞增殖促进作用最强的EPCs-CM浓度进行培养并进行不同干预。G组为空白对照;H组加入不同浓度的抗VEGF抗体(终浓度为0.5 μg/ml和5 μg/ml);I组加入不同浓度的抗SDF-1抗体(终浓度为0.5 μg/ml和5 μg/ml)。每组不同浓度设3个复孔和一个调零孔,孵育24 h后进行MTT比色法酶标仪检测。

1.2.5 流式检测C6胶质瘤细胞周期 0.25%胰蛋白酶消化C6胶质瘤细胞,DMEM/F_{12}培养基重悬并调细胞数为1×10^5,50 ml培养瓶内接种10^5细胞,实验组和对照组再分别加入等量细胞悬液体积的EPCs-CM和DMEM/F_{12}培养基,37 ℃,5% CO_2细胞培养箱内孵育24 h,每组设2个重复样本。0.25%胰酶分别消化实验组和对照组培养瓶内的细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清,留沉淀物50~100 μl,用振荡器使细胞充分分散。移液器将细胞悬液注入预冷的70%酒精内4 ℃固定过夜,隔天离心收集细胞,以1 ml的PBS洗涤细胞1次,加入500 μl PBS含50 μg/ml溴化乙锭(PI),100 μg/ml RNase A, 0.2% Triton X-100, 4 ℃避光孵育30 min,上机检测。

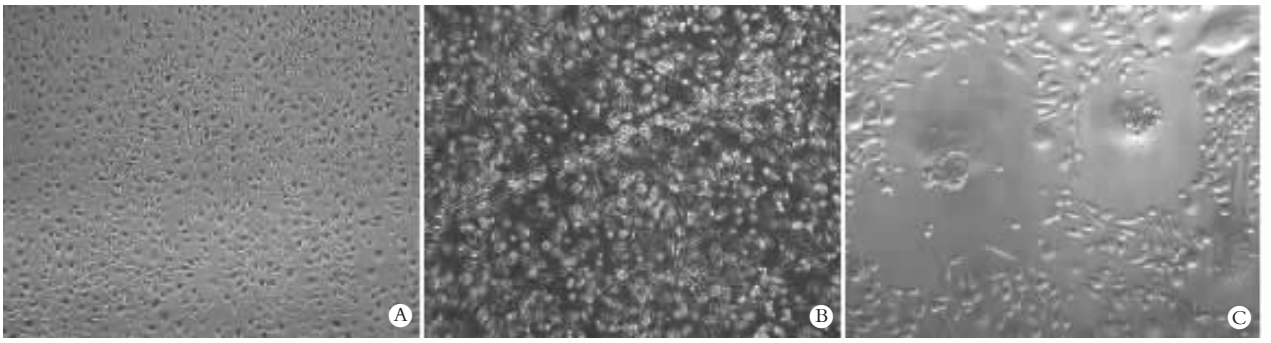
1.3 统计学方法

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行处理,各组间C6胶质瘤细胞增殖性比较和不同浓度VEGF、SDF-1的作用比较采用方差分析,2组间细胞周期增殖率比较采用两样本t检验。

2 结果

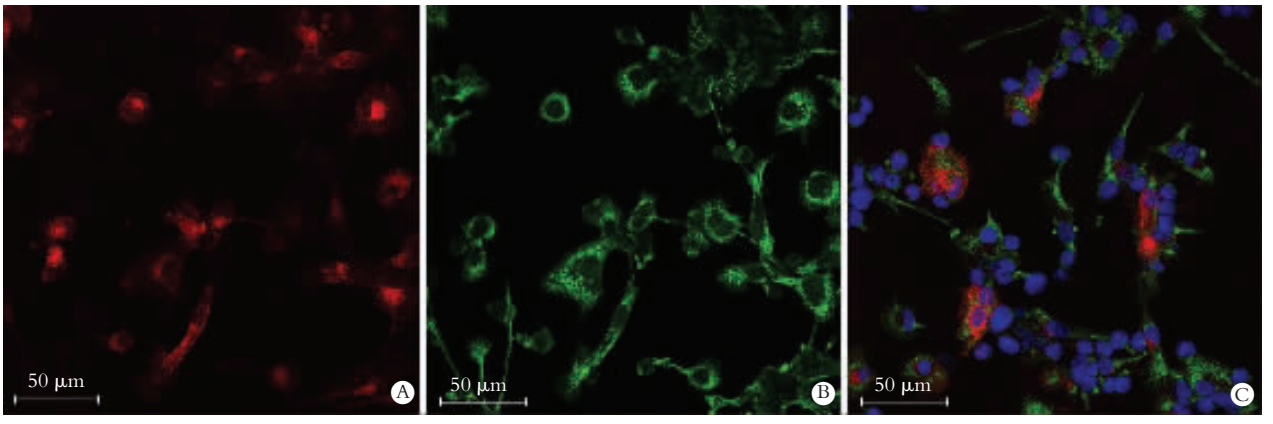
2.1 内皮祖细胞形态学特点与鉴定

刚分离的单核细胞呈圆形,培养4 d后细胞开始明显增殖,圆形细胞开始拉长伸展呈椭圆形、短梭形细胞(图1A)。培养至第10天,梭形细胞首尾相连出现“线样”结构(图1B)。培养



A:培养第 4 天(×100);B:培养第 10 天(×100);C:培养第 2 周(×200)

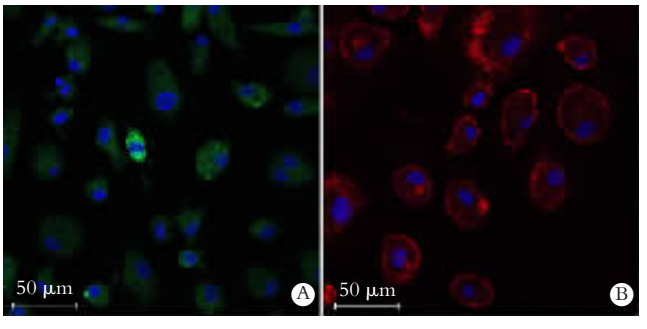
图 1　体外培养不同时间内皮祖细胞分化的形态特征观察　(倒置显微镜)



A:DiI-acLDL 染色;B:FITC-UEA-1 染色;C:双染色阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞

图 2　双荧光染色鉴定内皮祖细胞　(激光共聚焦显微镜)

约 2 周,细胞出现典型的"管腔"结构(图 1C)。用 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1 对细胞进行染色后,采用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜鉴定,红色荧光的细胞为 DiI-acLDL 摄取阳性(图 2A),绿色荧光的细胞为 FTIC-UEA-1 摄取阳性(图 2B),而共聚焦下双阳性细胞为同时摄取 DiI-acLDL 和 FITC-UEA-1,被认为是正在分化的 EPCs(图 2C)。免疫荧光显示 EPCs 中 CD34 和 CD31 均呈阳性反应(图 3)。

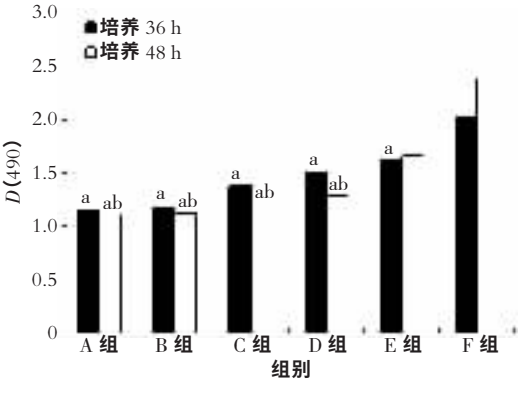


A:FITC-CD34 染色阳性细胞;B:PE-CD31 染色阳性细胞

图 3　免疫荧光染色观察内皮祖细胞表面标志物　(激光共聚焦显微镜)

2.2　MTT 比色法测 C6 胶质瘤细胞增殖能力

随着各孔 EPCs 条件培养基含量的增加,C6 胶质瘤细胞增殖速度变快(图 4)。培养 36 h 后检测 C6 胶质瘤细胞增殖能力,6 组之间差异显著($P<0.01$),且 F 组的 $D(490)$ 值明显高于其他组($P<0.01$),而 A ~ C 组之间两两比较 $D(490)$ 值无明显差异($P>0.05$),C ~ F 组之间也无明显差异($P>0.05$)。48 h 检测结果表明,6 组之间的 $D(490)$ 值有显著差异($P<0.01$),E 和 F 组的 $D(490)$ 值均显著高于其他组($P<0.01$),而 A ~ D 4 组之间两两比较无明显差异($P>0.05$)。虽然 F 组 48 h 检测的 $D(490)$ 值高于 36 h 对应组,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。



a:$P<0.01$,与 F 组比较;b:$P<0.01$,与 E 组比较

图 4　各组 C6 胶质瘤细胞培养 36、48 h 增殖能力的变化

2.3　检测 EPCs-CM 中 VEGF 和 SDF-1 的作用

与 G 组(1.879 ± 0.098)相比,H 组[0.5 μg/ml:(1.567 ± 0.667),5 μg/ml:(1.499 ± 0.090)]和 I 组[0.5 μg/ml:(1.729 ± 0.078),5 μg/ml:(1.650 ± 0.092)]低、高浓度的平均光密度值下降显著($P<0.05$),而同一组内高低浓度之间光密度值并无明显差异($P>0.05$)。

2.4 流式检测C6胶质瘤细胞周期

EPCs-CM组C6胶质瘤细胞的S期波峰与对照组相比有所增高,且EPCs-CM组的增殖率(34.650±1.492)%[即S(合成期)+G_2/M(合成后期/分裂期)]明显高于对照组(29.587±2.504)%($P<0.05$)。

3 讨论

内皮祖细胞的分离培养目前主要有磁珠筛选法和密度梯度离心法,由于磁珠筛选法获得的$CD34^+$或$CD133^+$细胞单独培养时往往增殖不良,且磁珠筛选法操作步骤复杂、费用相对较高而限制了其使用,故目前分离和获得EPCs的途径主要是通过密度梯度离心法联合贴壁培养的方法来进行。由于本实验下一步涉及到大鼠胶质瘤模型的EPCs移植,为避免免疫排斥而选择同一种属SD大鼠脾脏来源的EPCs。相对于大鼠骨髓穿刺较为困难,外周血较少的缺点而言,大鼠脾脏取材虽创伤面大但较为方便,国内外有关动物来源EPCs体外分离培养的研究主要集中在鼠和兔的骨髓和外周血,对于从大鼠脾脏获得EPCs的研究甚少。本实验通过改良赵晓辉等[5]和王博等[6]的方法成功完成了大鼠脾脏内皮祖细胞的分离、培养,发现利用同骨髓相似的体外培养方法可以获得脾脏内皮祖细胞,这也反映不同来源的EPCs可能有着相似的生物学行为。EPCs的鉴定主要有以下几种方法:①根据EPCs培养过程中的形态变化,如典型的细胞集落、铺路石样外观、细胞排列成条索状和网状结构进行鉴别。②根据定向分化过程中的EPCs具有吞噬低密度脂蛋白和荆豆凝集素的特点进行鉴别[7]。③根据EPCs表面双重特性的细胞表面标志物(既表达内皮系抗原vWF、CD31和KDR,又表达祖细胞抗原CD133、CD34)相鉴别。④通过透射电镜发现EPCs特征性的亚细胞结构(如幼稚线粒体和W-P小体)[8]。本研究主要根据EPCs分化过程中的形态学特征、其吞噬低密度脂蛋白和荆豆凝集素的特异性和细胞表面标志物CD34和CD31进行鉴定。

胶质瘤是人体血管化程度极高的肿瘤,血管生成在胶质瘤生长和侵袭过程中起重要作用,并与其恶性进展相关。肿瘤血管生成是肿瘤细胞诱发的毛细血管新生以及肿瘤中微循环网的形成,为实体瘤的后续生长及转移提供物质基础。以往认为出生后血管生成仅仅是依靠现有血管通过出芽方式生成,而大量研究表明EPCs参与肿瘤血管的生成并促进肿瘤的发生、发展[9-13]。同时,由于EPCs能特异性归巢至肿瘤部位,影像学上利用磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)扫描技术显示磁性标记的EPCs在肿瘤位点的分布,从而能够更早的对病变做出诊断,并制定更为有效的临床治疗方案。

募集至肿瘤位点的EPCs主要通过2种途径来参与形成肿瘤微血管:第一,原位分化为成熟内皮细胞整合至新生血管;第二,作为支持细胞分泌促血管生成的物质,如血管内皮生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)[14,15]、基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)[16]等。研究表明这些因子的受体在胶质瘤细胞均有表达,其促进肿瘤局部生长和侵袭转移的作用不仅仅在于其通过旁分泌机制对瘤细胞起到支持作用,还通过抑制瘤细胞自身的凋亡和直接促进瘤细胞的增殖来促进肿瘤细胞的生长[17-21]。另外,肿瘤细胞的生长还依赖于与周围基质细胞的相互作用,这些基质细胞主要是骨髓来源的内皮细胞、成纤维细胞和周细胞,其中内皮细胞是由EPCs细胞分化而来[22],这些基质细胞分泌的SDF-1也可作为一个旁分泌因子激发和维持原发与转移瘤细胞高的增殖力和生存率[23,24]。为验证EPCs存在的环境下是否会影响胶质瘤细胞的增殖能力而促进其生长,本研究采用EPCs与C6胶质瘤细胞共培养来研究其在体外是否能影响C6胶质瘤细胞增殖能力。本实验体外常规培养C6胶质瘤细胞过程中发现该细胞增殖迅速,往往传代后2 d即铺满瓶底的80%~90%。为避免细胞接触抑制作用影响检测结果,因而选择以36 h和48 h 2个时间点检测不同浓度EPCs-CM对C6胶质瘤细胞增殖能力的影响。结果表明随着EPCs条件培养基浓度的增加,相应孔的光密度值也随之增加,这一结果也间接反映了各孔C6胶质瘤细胞数目随着内皮祖细胞条件培养基浓度的增加而增加。同时本研究数据显示,2个检测时间点对应组相比,前4组48 h的光密度值均低于对应组36 h的光密度值,但差别不明显,这可能和本次研究所采用测细胞增殖的MTT比色法有关:MTT比色法测细胞增殖原理是以活细胞代谢物还原剂,作用于活细胞线粒体中的呼吸链,因而若细胞已死亡则不能与之反应,从而会影响光密度值的大小。2个检测时间点对照组与5个实验组相比较,对照组光密度值均低于实验组,且2个检测时间点的对照组与EPCs条件培养基浓度最高的组差别最显著。在此基础上本实验还采用流式细胞仪检测了常规培养基和EPCs-CM培养的C6胶质瘤细胞,检测结果表明EPCs-CM培养组的C6胶质瘤细胞其增殖率要明显高于常规培养基组,这从另一方面也反映EPCs能

在一定程度上提高胶质瘤细胞的增殖能力。为进一步验证 EPCs-CM 中 EPCs 分泌的细胞因子对 C6 胶质瘤细胞增殖的影响,我们选择了研究最为广泛的 VEGF 和 SDF-1 2 种细胞因子。实验数据显示加入两者的抗体后因抑制了 EPCs 分泌的 VEGF 和 SDF-1 与胶质瘤细胞表面相应受体的结合而抑制了其对 C6 胶质瘤细胞的促分裂增殖作用,这也提示 EPCs-CM 促进 C6 胶质瘤细胞的增殖可能与其分泌的血管生成类细胞因子有关。本实验的不足在于由于 EPCs 可以分泌的细胞因子种类较多,而本课题组只研究了具有代表性的 VEGF 和 SDF-1 2 种细胞因子的作用,没有一一检测 EPCs-CM 中可能存在的细胞因子的作用。

本实验研究了体外 EPCs 对 C6 胶质瘤细胞增殖能力的影响,结果显示体外 EPCs 能促进胶质瘤细胞的增殖,然而体内环境较体外错综复杂,各种因素均能对胶质瘤细胞的生物学行为产生影响,移植磁性标记的 EPCs 在体内是否会促进胶质瘤细胞成瘤速度及胶质瘤发展是我们下一步实验研究的重点。体外实验为活体内的实验做了铺垫,同时也为磁性标记的 EPCs 作为 MRI 生物靶向造影剂的安全性和临床可行性提供体外单纯细胞水平的依据。

参考文献:

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] Arbab A S, Frenkel V, Pandit S D, *et al*. Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis[J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 671-678.

[3] 张嘉晴, 吴昊, 项鹏. 应用胎鼠脑源性神经干细胞条件培养液诱导胚胎干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(28): 5489-5493.

[4] 唐震, 周中华, 徐晓刚, 等. 抗血管内生成类细胞因子对血管瘤内皮细胞生长的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(1): 132-133.

[5] 赵晓辉, 黄岚, 尹扬光, 等. 小鼠脾脏内皮祖细胞的分离和培养[J]. 心脏杂志, 2006, 18(5): 532-535.

[6] 王博, 王舒楠, 张伟国, 等. 人脐血内皮祖细胞体外扩增、鉴定和生物学活性[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1744-1748.

[7] Ingram D A, Caplice N M, Yoder M C. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells[J]. Blood, 2005, l06(5): 1525-1531.

[8] 李伟, 杨丽娟, 吴忠仕. 内皮祖细胞的来源及应用[J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2007, 13(2): 116-119.

[9] Dome B, Timar J, Ladanyi A, *et al*. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy[J]. Oncology hematology, 2009, 69(2): 108-124.

[10] 徐承平, 张华蓉. 陈飞兰, 等. 内皮祖细胞在胶质瘤新生血管中的募集和整合作用[J]. 重庆医学, 2008, 37(21): 2424-2426.

[11] Tamura M, Unno K, Yonezawa S, *et al*. *In vivo* trafficking of endothelial progenitor cells and their possible involvement in tumor neovascularization[J]. Life Sci, 2004, 75(5): 575-584.

[12] Bertolini F, Mancuso P, Braidotti P, *et al*. The multipersonality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer[J]. Biochimica et biophysica acta, 2009, 1796(1): 27-32.

[13] Yoder M C, Ingram D A. The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor Q1 growth: Is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process? [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(1): 50-54.

[14] Rehman J, Li J, Orschell C M, *et al*. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors[J]. Circulation, 2003, 107(8): 1164-1169.

[15] Krenning G, van-Luyn M J, Harmsen M C. Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy[J]. Trends Mol Med, 2009, 15(4): 180-189.

[16] 尹扬光, 黄岚, 赵晓辉, 等. 内皮祖细胞分泌 SDF-1 及其抗内皮祖细胞凋亡作用[J]. 心脏杂志, 2007, 19(4): 391-394.

[17] 杨英, 李少林. 血管内皮生长因子在肿瘤中的作用[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2004, 31(增刊): 18-20.

[18] Yamamoto S, Wakimoto H, Aoyagi M, *et al*. Modulation of motility and proliferation of glioma cells by hepatocyte growth factor[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(6): 564-577.

[19] Dalle S, Imamura T, Rose D W, *et al*. Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating beta-arrestin-1[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(17): 6272-6285.

[20] 张敏鸽, 李晓丽, 万德馨. SDF-1/CXCR4 与肿瘤研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(7): 600-604.

[21] 张筱岚, 屈艺, 母得志. 基质细胞衍生因子-1 及其受体 CXCR4 与肿瘤的生物学行为[J]. 生命的化学, 2008, 28(6): 708-710.

[22] Roorda B D, ter-Elst A, Kamps W A, *et al*. Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(3): 187-198.

[23] Burger J A, Kipps T J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment[J]. Blood, 2006, 107(5): 1761-1767.

[24] Ohira S, Sasaki M, Harada K, *et al*. Possible regulation of migration of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by interaction of CXCR4 expressed in carcinoma cells with tumor necrosis factor-alpha and stromal-derived factor-1 released in stroma[J]. Am J Pathol, 2006, 168(4): 1155-1168.

(**收稿**:2009-12-31;**修回**:2010-02-26)

(编辑 王 红)