文章编号:1000-5404(2012)07-0613-05

论著

内皮祖细胞移植对大鼠短暂性大脑中动脉栓塞的治疗作用

廖少华[1],范沁林[2],吴 娅[1],王皓香[1],陈康宁[1],周振华[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经内科[2])

[摘要] **目的** 观察内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)移植在治疗大鼠短暂性大脑中动脉栓塞(transient middle cerebral artery occlusion,tMCAO)中的作用,探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在其中的可能作用机制。**方法** 培养、鉴定大鼠骨髓来源EPCs,通过颈内动脉移植到大鼠tMCAO模型。实验动物分为2组:PBS对照组、EPCs移植组,分别观察第1、3、5、7天各项指标。采用HE染色,观察大鼠缺血部位病理变化,采用TUNEL法检测嗅周皮质神经元凋亡情况、免疫组化法检测Caspase-3蛋白表达情况、Western blot检测缺血局部脑组织VEGF表达。**结果** EPCs移植后第5天,大鼠缺血嗅周皮质TUNEL阳性细胞数逐渐减少到最低值(54.68±3.12),Caspase-3蛋白表达也逐渐降低最低值(31.24±2.73),对应的局部脑组织VEGF表达则逐渐升高到最高值(0.99±0.03),EPCs移植组各时相点与PBS对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** EPCs移植tMCAO大鼠可抑制神经元凋亡,减轻缺血导致的神经损伤,部分作用机制可能是通过旁分泌VEGF降低Caspase-3活性这一途径实现的。

[关键词] 内皮祖细胞;旁分泌;血管内皮生长因子;神经元凋亡
[中图法分类号] R322.12; R617; R743.33 [文献标志码] A

EPCs transplantation in treatment of transient middle cerebral artery occlusion in rats

Liao Shaohua[1], Fan Qinlin[2], Wu Ya[1], Wang Haoxiang[1], Chen Kangning[1], Zhou Zhenhua[1] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the therapeutical effect of endothelial progenitor cells (EPCs) transplantation on transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) rats, and to investigate the potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in this process. **Methods** EPCs were isolated from the bone marrow of rats. After primary culture and identification by laser scanning confocal microscopy, they were transplanted into tMCAO rat model through internal carotid. The experimental rats were divided into 2 groups, PBS control group (CG) and EPCs transplantation group (EG). TUNEL were used to detect cell apoptosis in perirhinal cortex of rats which were collected in 1, 3, 5 and 7 d after transplantation, and immunohistochemistry and Western blotting were used to detect activated Caspase-3 and VEGF expression at the same time points. **Results** In 5 d after transplantation, EPCs transplantation resulted in a smallest number of apoptotic cells in the ischemic cortex (54.68±3.12), lowest expression of Caspase-3 (31.24±2.73), but highest expression level of VEGF (0.99±0.03). All these indexes were significantly different from those of the control group at every time point ($P<0.05$). **Conclusion** EPCs transplantation suppresses neuron apoptosis and attenuates nerve impairment after ischemia injury in tMCAO rats, which might be due to VEGF paracrine and thus decreased Caspase-3 activity.

[**Key words**] endothelial progenitor cells; paracrine; vascular endothelial growth factor; neuron apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81000671) and the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5190). Corresponding author: Chen Kangning,Tel:86-23-68754154, E-mail:ckn_640827@126.com, Zhou Zhenhua, Tel: 86-23-68765754,E-mail:exploiter001@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81000671);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5190)
[通信作者] 陈康宁,电话:(023)68754154,E-mail:ckn_640827@126.com
周振华,电话:(023)68765754,E-mail:exploiter001@126.com

脑梗死以其发病率、致残率、致死率及复发率高严重威胁人类生存及生活质量[1]，因此，脑梗死成为神经科学领域的研究热点，尤其是缺血性神经损伤机理及保护的研究。1997年，Asahara等[2]从外周血分离出CD34和FLK1阳性单核细胞，经培养可表现为内皮细胞特征，称之为内皮祖细胞（endothelial progenitor cells，EPCs）。EPCs在血管生成（angiogenesis）和血管发生（vasculogenesis）中有重要作用，还可能通过分泌细胞因子发挥神经保护作用[3]，因此在脑梗死神经元保护研究中也引起了广泛的关注。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）又称为血管通透因子，它通过与受体结合发挥促进内皮细胞增殖、加速新生血管形成、提高血管通透性等生物学作用。进一步研究表明，在神经细胞的应激状态下（如缺氧、葡萄糖缺失等），VEGF有神经保护和神经营养作用[4]。这一作用可能是通过抑制神经细胞凋亡、促进神经发生和血管发生等途径实现。但是，移植的EPCs能否通过旁分泌VEGF来发挥神经保护作用尚未得到实验证实。本实验通过建立大鼠短暂性大脑中动脉栓塞（transient middle cerebral artery occlusion，tMCAO）模型，观察EPCs移植后不同时相点VEGF、半胱氨酸蛋白酶-3（caspase-3）表达水平及其与皮质神经元凋亡的关系，旨在探讨EPCs的神经保护作用及机制，为临床脑梗死的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康成年雌性SD大鼠60只，体质量250～280 g，由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM-L培养基、胎牛血清（购自Gibco公司），VEGF、碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）（购自美国Peprotech公司），大鼠淋巴细胞分离液（购自北京灏洋公司），VEGF一抗（购自Santa Cruz公司），CD34一抗、CD133一抗、荧光二抗、DAB显色试剂盒、活化的Caspase-3抗体（购自武汉博士德生物有限公司），凋亡试剂盒（购自美国ROCHE公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组　大鼠用5%水合氯醛（6 ml/kg）腹腔注射麻醉。颈部正中切口，分离暴露右侧颈总、颈内、颈外动脉，暂时夹闭颈总、颈内动脉，结扎颈外动脉远端后电凝灼断，从颈外动脉近端血管壁上剪一小口，插入直径为0.238 mm鱼线（预先用石蜡处理头端防止刺穿血管），深度为进入颈内、外动脉分叉点18.5～19.5 cm，固定线栓，建立大鼠tMCAO模型。以大鼠麻醉清醒后左侧前爪不能完全伸展或行走时左后肢拖地为模型制备成功标志。应用随机数字表法将大鼠分为PBS对照组和EPCs移植组（移植后1、3、5、7 d），各组每个时间点分别取5只大鼠。

1.2.2 大鼠骨髓来源EPCs分离、培养与鉴定　参照Song等[5]应用的方法，取20只大鼠，分批次从骨髓分离、培养EPCs。培养基调整为DMEM-L（含10%胎牛血清，VEGF终浓度为10 ng/ml，bFGF终浓度为1 ng/ml）。取培养第6天的贴壁细胞，加入含有DiI-ac-LDL（调整终浓度为10 μg/ml）的培养基，37 ℃孵育4 h后去除培养基，PBS清洗2次，荧光显微镜观察吞噬功能。取培养第10天细胞，4%多聚甲醛固定30 min，加入3%过氧化氢作用30 min灭活内源性过氧化物酶，5%羊血清白蛋白作用30 min阻断非特异性抗原，分别加入兔抗大鼠CD34、vWF多克隆抗体，用羊血清白蛋白作为空白对照。4 ℃过夜后再分别滴加羊抗兔标记FITC或Rhodamin的荧光抗体作为二抗，激光共聚焦显微镜下观察并照相。

1.2.3 EPCs移植　取培养第7天EPCs，0.25%胰酶消化，PBS清洗后重悬，调整细胞浓度为3×10^6/ml备用。大鼠tMCAO术后1.5 h，拔除栓塞的鱼线。1 ml注射器（针尖磨钝防止刺穿血管）吸取0.4 ml PBS（含EPCs 1.2×10^6个），从线栓切口插入颈内动脉（深度为0.5 cm），控制注射速度为2 min注入0.4 ml。注射完毕后结扎颈外动脉，放开颈总动脉再灌注。对照组用等量PBS注射。

1.2.4 脑组织病理观察与标本制备　各组每个时间点分别取2只大鼠，4%多聚甲醛灌注固定，常规石蜡包埋，冠状切片。从两组标本中分别取移植第3天大鼠脑组织部分切片行HE染色，显微镜下观察照相，以切片左侧脑组织作为正常对照。其余切片进一步检测神经元凋亡和Caspase-3表达。

1.2.5 神经元凋亡变化　按照TUNEL试剂盒的步骤，石蜡切片经脱蜡、水化等处理后，滴加100 μl蛋白酶K溶液（浓度为20 μg/ml）与样本反应以增加通透性，100 μl TUNEL反应液标记DNA断裂末端，再依次与HRP工作液和DAB工作液室温反应显色（阴性对照组不加末端转移酶）。显微镜下定位，取海马CA1区对应的嗅周皮质，每张切片采集5个不重复的高倍视野，计数光镜400倍时的阳性细胞数，取其平均值[6]。用计算机图像分析系统软件Image Pro Plus 5.1分析图像。

1.2.6 Caspase-3表达变化　按照常规免疫组化步骤，石蜡切片预先经脱蜡、水化处理，Triton X-100细胞通透，过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液加热修复抗原，5%羊血清封闭非特异性抗原。加入一抗（兔抗大鼠Caspase-3多克隆抗体IgG，1∶500）孵育过夜，再加入二抗（生物素标记的羊抗兔IgG，37 ℃、30 min），DAB显色；以PBS代替一抗作为阴性对照。定位及计数方法同1.2.5。

1.2.7 脑组织VEGF表达变化　采用Western blot检测，设PBS对照组和EPCs移植组。参照张波等[7]的方法，提取缺血局部脑组织总蛋白，离心后取上清液定量，每泳道调整蛋白上样量为20 μg，以12%分离胶行SDS-PAGE，转移至PVDF膜上，封闭2 h后加入一抗（小鼠抗大鼠VEGF IgG），4 ℃过夜，TBST溶液漂洗（8 min×5 min），相应的辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶5 000）室温孵育1 h。DAB显色，化学发光底物显色法显影，分析条带吸光值×面积（Int×mm^2）。用Quantity One软件对条带进行分析，以目标条带和β-actin参照条带积分吸光度比值作为测量结果。各组每个时间点分别取3只大鼠，共重复3次。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EPCs 鉴定

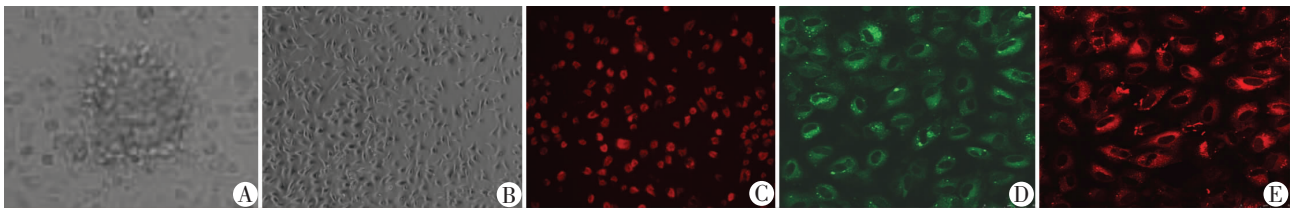
培养第 7 天左右出现典型的“血岛样”集落形态,10 d 左右出现“铺路石”样细胞形态。培养第 6 天的贴壁细胞可吞噬 DiI-ac-LDL,荧光显微镜下细胞质呈现红色荧光。CD34 和 vWF 细胞免疫荧光染色,阳性细胞胞膜分别出现红色或绿色荧光。随机选择 5 个视野,计数双荧光均表达的细胞数,平均数大于视野细胞总数的 95%(图 1)。

2.2 大鼠 tMCAO 术后皮质组织结构的病理变化

正常脑组织内细胞排列规则,神经元轮廓清晰,细胞核大而圆,位于细胞中央,核仁清楚。PBS 对照组神经元轮廓模糊,胞体着色变深,细胞核皱缩,胞质分界不清,表现为神经细胞坏死和胶质增生。EPCs 移植组细胞坏死程度减轻,坏死范围明显减小(图 2)。

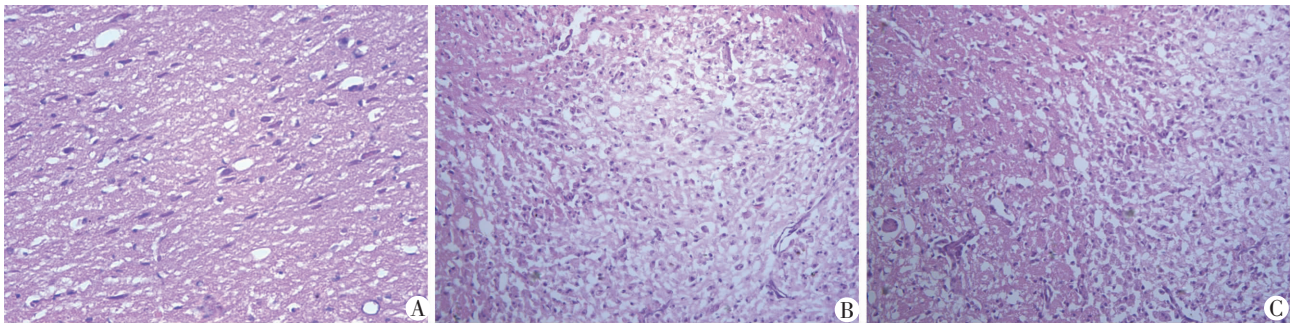
2.3 EPCs 移植后不同时间皮质神经元凋亡变化

阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色。PBS 对照组 TUNEL 阳性细胞数在 1、3、5、7 d 逐渐增加,最高为第 7 天。EPCs 组 TUNEL 阳性细胞数随时间延长(1、3、5 d)逐渐减少,最低为第 5 天($P<0.05$),与同时相点 PBS 对照组比较均显著减少($P<0.05$),第 7 天稍有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3,表 1。



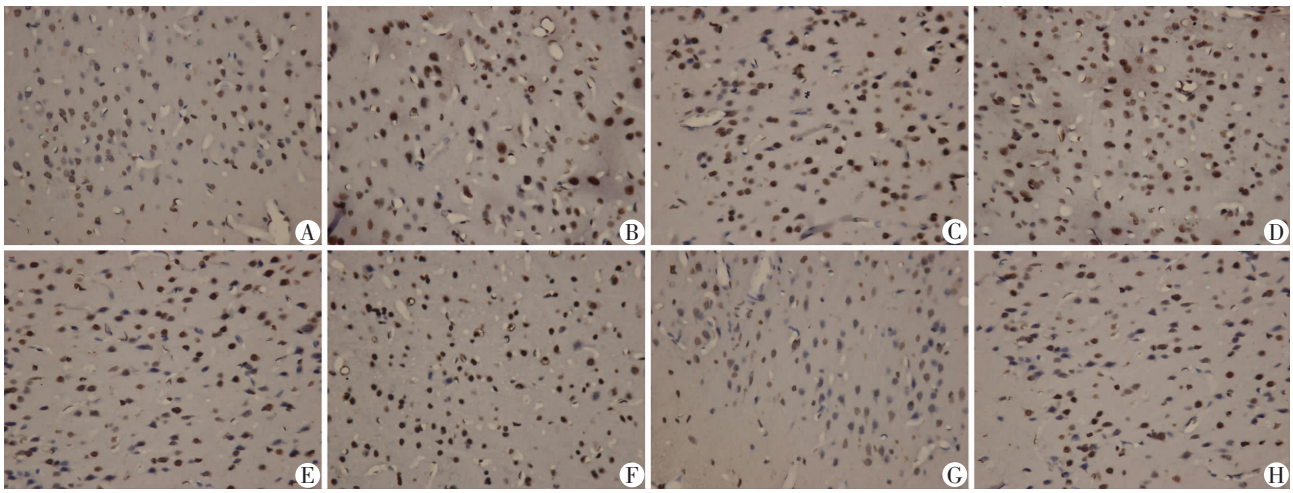
A:EPCs 第 7 天“血岛样”集落形态 (×200);B:第 10 天“铺路石”样细胞形态 (×200);C:EPCs 吞噬 DiI-ac-LDL 后细胞质显红色荧光 (×200);D:EPCs 表达 CD34 免疫荧光标记 (绿色 ×400);E:EPCs 表达 vWF 免疫荧光标记 (红色 ×400)

图 1 EPCs 的培养及鉴定



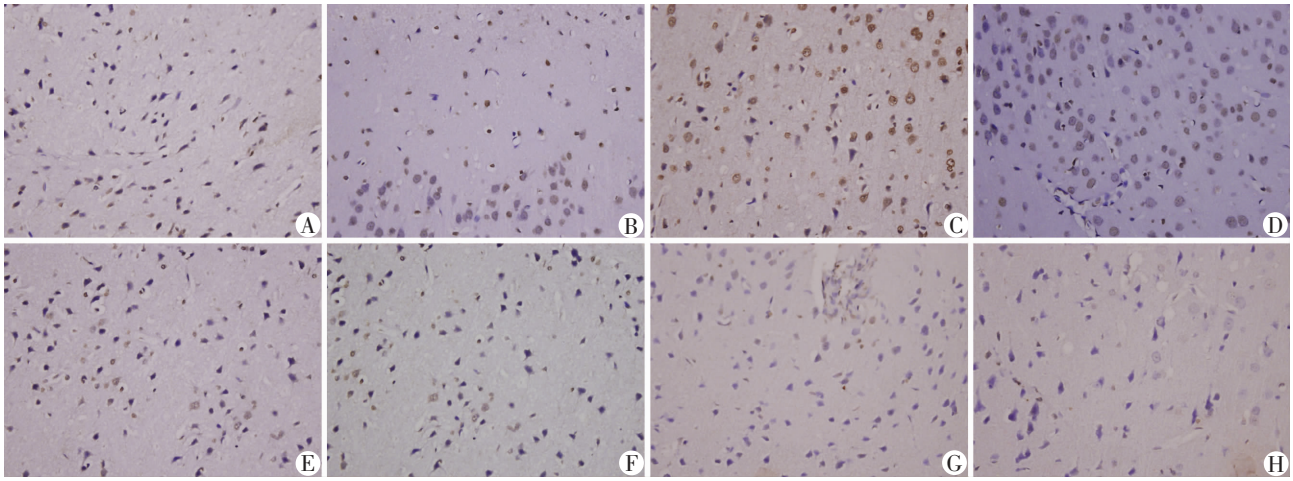
A:正常脑组织;B:PBS 对照组;C:EPCs 移植组

图 2 EPCs 移植对脑皮质病理变化的影响 (HE ×200)



A:PBS 对照组第 1 天;B:PBS 对照组第 3 天;C:PBS 对照组第 5 天;D:PBS 对照组第 7 天;E:EPCs 移植组第 1 天;F:EPCs 移植组第 3 天;G:EPCs 移植组第 5 天;H:EPCs 移植组第 7 天

图 3 EPCs 移植对大鼠皮质神经元凋亡的影响 (TUNEL ×400)



A：PBS对照组第1天；B：PBS对照组第3天；C：PBS对照组第5天；D：PBS对照组第7天；E：EPCs移植组第1天；F：EPCs移植组第3天；G：EPCs移植组第5天；H：EPCs移植组第7天

图4 EPCs移植对大鼠皮质神经元Caspase-3表达的影响 （SABC ×400）

表1 EPCs移植后不同时间tMCAO大鼠皮质TUNEL阳性细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
PBS对照组	105.72±2.69	132.96±2.88	145.12±3.22	153.76±3.11
EPCs组	91.84±3.21[a]	82.08±2.77[ab]	54.68±3.12[abc]	60.04±2.34[abc]

a：$P<0.05$，与PBS对照组比较；b：$P<0.05$，与EPCs组1 d比较；c：$P<0.05$，与EPCs组3 d比较

2.4 EPCs移植后不同时间皮质神经元中Caspase-3表达的变化

以阳性细胞数目表示Caspase-3蛋白表达量。阳性细胞表现为Caspase-3蛋白染色为棕黄色，呈颗粒状、团块状、弥漫状分布于细胞核中。PBS对照组Caspase-3阳性细胞数在1、3、5、7 d逐渐增加，最高为第7天。EPCs组Caspase-3阳性细胞数在1、3、5 d逐渐减少，最低为第5天（$P<0.05$），与同时相点PBS对照组比较均显著减少（$P<0.05$），第7天稍有增高，但无统计学意义（$P>0.05$）。见图4、表2。

表2 EPCs移植后不同时间tMCAO大鼠皮质Caspase-3阳性细胞数的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
PBS对照组	81.48±3.80	103.00±2.73	122.92±2.65	138.72±3.51
EPCs组	71.88±2.55[a]	60.84±3.06[ab]	31.24±2.73[abc]	32.84±2.88[abc]

a：$P<0.05$，与PBS对照组比较；b：$P<0.05$，与EPCs组1 d比较；c：$P<0.05$，与EPCs组3 d比较

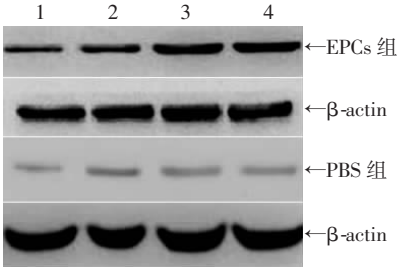
2.5 Western blot检测缺血部位脑组织VEGF表达

PBS对照组随时间延长VEGF呈现不稳定的低水平表达。EPCs组VEGF在移植后1、3、5 d表达逐渐升高（$P<0.05$），最高为第5天（0.99±0.03），且均高于同时相点PBS对照组（$P<0.05$），第7天表达量稍下降（图5、表3）。

表3 EPCs移植后不同时间tMCAO大鼠皮质缺血部位VEGF表达的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
PBS对照组	0.21±0.02	0.34±0.03	0.29±0.05	0.25±0.03
EPCs组	0.47±0.02[a]	0.56±0.01[ab]	0.99±0.03[abc]	0.87±0.05[abc]

a：$P<0.05$，与PBS对照组比较；b：$P<0.05$，与EPCs组1 d比较；c：$P<0.05$，与EPCs组3 d比较



1：1 d；2：3 d；3：5 d；4：7 d

图5 EPCs移植后不同时间对缺血局部脑组织VEGF表达的影响

3 讨论

在脑梗死治疗研究中，神经保护理论在基础研究中都取得了较好的效果，但临床试验无明显疗效。溶栓治疗可有效恢复局部脑血流供应、挽救缺血半暗带组织，但由于时间窗过短（<4.5 h）而限制了临床应用。因此，Rouhl等[8]提出了血管神经病学的理念，从保护神经血管单元的角度探讨解决脑梗死治疗的困境。

VEGF的神经保护作用在部分研究中已得到了证实。Jin等[9]通过体外培养神经元并建立缺氧模型证实，VEGF可以通过抑制Caspase-3激活，减少神经元在缺氧环境中的死亡；他们还证实，大鼠全脑缺血再灌注可以诱导皮质和海马神经元VEGFR-2表达，并激活受体下游的PI3K/Akt信号通路[10]，进而产生抗凋亡蛋白NF-κB等。

本研究通过构建大鼠tMCAO模型，经颈内动脉移植骨髓来源EPCs，应用TUNEL法检测缺血部位神经元凋亡，发现EPCs移植组阳性细胞数逐渐减少，第1、3、5天分别为（91.84±3.21）、（82.08±2.77）、（54.68±3.12），对应时相点PBS对照组呈逐渐升高趋势。通过免疫组化检测对应的缺血部位脑组织，我们发现，

EPCs 移植组神经元 Caspase-3 蛋白表达水平逐渐降低,第 1、3、5 天分别为(71.88 ± 2.55)、(60.84 ± 3.06)、(31.24 ± 2.73),对应时相点 PBS 对照组则逐渐升高。进一步应用 Western blot 检测缺血局部脑组织 VEGF 蛋白表达量,结果表明,移植后第 1、3、5 天 VEGF 蛋白表达逐渐增加,分别为 (0.47 ± 0.02)、(0.56 ± 0.01)、(0.99 ± 0.03),对应时相点 PBS 对照组呈不稳定的低水平表达。分别比较以上 3 组数据均有显著差异($P < 0.05$),说明缺血部位皮质神经元凋亡的减少,伴随有凋亡分子 Caspase-3 表达降低,这一结果与 EPCs 移植后局部脑组织 VEGF 表达增加有关。结合观察 HE 染色脑组织切片,EPCs 移植组坏死范围明显减小,进一步从病理证实其对神经元的保护作用。

结合 Jin 等[9-10]的研究结论,分析以上实验结果提示,tMCAO 大鼠移植 EPCs 后皮质神经元凋亡的减少和 Caspase-3 表达的降低,可能是由于缺血局部脑组织 VEGF 表达增加引起,而 VEGF 表达的增加是移植的 EPCs 旁分泌所致。推测其机制可能为:EPCs 旁分泌的 VEGF,通过激活其受体(主要是 VEGFR-2),一方面抑制了缺血导致的神经元 Caspase-3 蛋白表达,从而抑制了其下游蛋白(Caspase-2,6,8,10 等)进一步激活导致的细胞损伤;另一方面,激活了受体下游关联的 PI3K/Akt 信号通路,产生抗凋亡蛋白 NF-KB 等,二者的共同作用都抑制了神经元凋亡。但第 7 天实验结果与原变化趋势不尽一致, TUNEL 结果为(60.04 ± 2.34),Caspase-3 结果为(32.84 ± 2.88),与第 5 天比较无显著差异($P > 0.05$),而 VEGF 表达量为(0.87 ± 0.05),比第 5 天降低且有差异($P < 0.05$)。推测 EPCs 移植到大鼠脑缺血部位后,可能的病生理过程包括:部分分化为内皮细胞、旁分泌生长因子(如 VEGF、脑源性营养因子、胰岛素样生长因子等)、凋亡或被宿主巨噬细胞吞噬等,以上多因素影响了 VEGF 产生/消耗的变化趋势,造成其表达量于第 7 天出现下降。但神经元的凋亡受多种损伤/修复因素调控,因此其凋亡变化趋势在第 7 天出现了与 VEGF 表达量不尽一致的情况。

目前有关 EPCs 移植的研究多关注其促进血管生成和血管发生的作用。Koiwaya 等[11]建立了大鼠后肢缺血模型移植并吸引磁化的 EPCs,Hu 等[12]在大鼠急性心肌梗死模型移植人脐带血来源的 EPCs, Fan 等[13]建立了裸鼠 tMCAO 模型移植 EPCs,以上实验均证实 EPCs 移植可以诱导缺血局部组织血管新生、修复受损的血管内皮,从而改善缺血局部组织的血液供应,并改善功能预后。

我们的实验提示从颈内动脉移植 EPCs,可以抑制缺血局部皮质神经元凋亡和 Caspase-3 蛋白表达的激活,这一结果可能与 EPCs 在缺血局部脑组织旁分泌 VEGF 发挥神经保护作用有关。这一保护作用是独立于血管新生作用以外发生的,从而进一步证实,EPCs 移植治疗脑梗死,不仅包括诱导血管新生,促进局部脑血流供应恢复,还包括旁分泌 VEGF 等细胞因子,减少神经元凋亡发挥保护作用。这一结论与 Rouhl 等[8]提出的保护神经血管单元的血管神经病学理念不谋而合,可以完善 EPCs 治疗脑梗死的理论依据,并为进一步临床应用提供指导。

参考文献:

[1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153.

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

[3] Moubarik C, Guillet B, Youssef B, *et al*. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 208-220.

[4] Rosenstein J M, Krum J M, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system[J]. Organogenesis, 2010, 6(2): 107-114.

[5] Song M B, Yu X J, Zhu G X, *et al*. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats[J]. Vascul Pharmacol, 2009, 51(2/3): 205-213.

[6] 范沁林, 焦岩, 刘国军, 等. 大鼠全脑缺血再灌注后 HAX-1 蛋白与皮质神经元凋亡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 584-587.

[7] 张波, 胡俊, 焦岩, 等. 血管内皮生长因子促进少突胶质前体细胞增殖及其机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1036-1039.

[8] Rouhl R P, van-Oostenbrugge R J, Damoiseaux J, *et al*. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts[J]. Stroke, 2008, 39(7): 2158-2165.

[9] Jin K, Mao X O, Batteur S P, *et al*. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor[J]. Neuroscience, 2001, 108(2): 351-358.

[10] Jin K, Mao X O, Nagayama T, *et al*. Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat[J]. Neuroscience, 2000, 100(4): 713-717.

[11] Koiwaya H, Sasaki K, Ueno T, *et al*. Augmented neovascularization with magnetized endothelial progenitor cells in rats with hind-limb ischemia[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(1): 33-40.

[12] Hu C H, Li Z M, Du Z M, *et al*. Expanded human cord blood-derived endothelial progenitor cells salvage infarcted myocardium in rats with acute myocardial infarction[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(5/6): 551-556.

[13] Fan Y, Shen F, Frenzel T, *et al*. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice[J]. Ann Neurol, 2010, 67(4): 488-497.

(**收稿**:2011-11-22;**修回**:2012-01-04)

(编辑 王小寒)