

· 博士之窗 ·

人参皂甙Rg1对体外微环境诱导人骨髓间充质干细胞
成血管内皮样细胞分化的影响何 威^{1,2} 杨旭辉³ 林秋雄¹ 余伟华³ 吴伟康⁴

摘要 **目的** 探讨人参皂甙Rg1在体外微环境诱导分化人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)成血管内皮样细胞的影响。**方法** 采用模拟体内微环境的半透膜隔离非接触共培养的方法体外诱导hMSCs向内皮细胞表型分化,通过RT-PCR检测内皮细胞标志物血小板内皮黏附分子-1(CD31)、血管性血友病因子(vWF)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin) mRNA的表达,免疫荧光染色检测CD31蛋白和血管内皮黏附分子-1(VCAM1)的表达。透射电镜观察诱导后细胞的超微结构鉴定诱导细胞的特征,并通过流式细胞仪检测诱导细胞CD31表达百分比。**结果** 与成熟内皮共培养的骨髓基质干细胞具有微环境依赖性向内皮分化的能力。细胞培养第2周,开始出现形态学改变,胞体回缩,呈多角形改变。细胞培养第3周,细胞增殖速度明显加快,形态学上呈卵圆形或“铺路石”样改变;在基因水平上,RT-PCR显示经典内皮细胞标志物CD31、vWF、VE-cadherin mRNA的高表达;在蛋白水平上,免疫荧光染色CD31和VCAM1表达阳性;透射电镜下诱导后细胞显示内皮细胞特有的Weibel-Palade小体;随人参皂甙Rg1剂量的增加,诱导hMSCs表达CD31百分比增加(组间比较, $P < 0.05$)。**结论** hMSCs在共培养的微环境中,可以分化成在形态上、基因和蛋白表达、超微结构等方面均显示出血管内皮细胞特征的表现。人参皂甙Rg1可促进微环境依赖性诱导hMSCs向内皮细胞系的分化。

关键词 人参皂甙Rg1; 骨髓; 间充质干细胞; 分化; 内皮细胞; 共培养

Effect of Ginsenoside Rg1 on the Microenvironment Dependent Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell to Vaso-endothelioid Formative Cells *in Vitro* HE Wei, YANG Xu-hui, LIN Qiu-xiong, et al *Guangdong People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou (510080)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rg1 on the microenvironment dependent differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) to vaso-endothelioid cells (VECs) *in vitro*. **Methods** The *in vitro* differentiation of hMSCs to VECs were established adopting the *in vivo* environment simulated semi-permeable membrane separated non-contact co-culturing method. The mRNA expressions of endothelial markers, such as platelet endothelial adhesive factor-1 (CD31), vascular hemophillic factor (vWF) and vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) were analyzed by RT-PCR; the protein expressions of CD31 and vascular endothelial adhesive factor-1 (VCAM1) were detected by fluorescence immunohistochemistry; structural identification for the endothelial characteristics of differentiated hMSCs were made under electron microscopy; and the percentage of CD31 expression in differentiated hMSCs was determined by flow cytometry to explore the effect of ginsenoside Rg1 on the differentiation. **Results** The bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with mature endothelial membrane showed a microenvironment dependent capacity for differentiating to endothelium, with the morphological changes revealed starting from the 2nd week, showing cell body contraction, polygonal-shaped change; and at the 3rd week, the markedly speedily cell proliferation with elliptic or slabstone-like change of cells. High levels of classic endothelial cell markers, such as mRNA expressions of CD31, vWF, VE-cadherin, and protein expressions of CD31 and VCAM1, were shown; the typical weibel-palade body of endothelial cell was found in the differentiated cells. Moreover, percentage of CD31 expression in the differentiated hMSCs was increased after Rg1 treatment dose-dependently. **Conclusion** Under the microenvironment

作者单位: 1. 广东省人民医院, 广东省医学科学院(广州 510080); 2. 中山大学中山医学院; 3. 中山大学干细胞与组织工程中心; 4. 中山大学中西医结合研究所

通讯作者: 何 威, Tel: 13697455679, E-mail: marinahewei@126.com

of co-culture, hMSCs could differentiate into cells presenting the characteristics of endothelial cell in aspects of the morphology and ultrastructure of cells, as well as the gene and protein expressions of cell markers; ginsenoside Rg1 can promote the microenvironment dependent differentiation of hMSCs to VECs system *in vitro*.

KEYWORDS ginsenoside Rg1; bone marrow; mesenchymal stem cells; differentiation; endothelial cell; co-culture

新血管的生成对任何损伤组织的修复都很重要。心梗、脑中风等缺血性疾病需要大量内皮种子细胞参与血管新生,改善缺血组织或器官的功能^[1, 2]。感染、创伤常并发的急性肺损伤等内皮损伤和功能障碍靠自身的修复非常缓慢,且目前的药物治疗也并不理想,而自体移植内皮前体细胞(endothelial progenitor cell)可成为新的治疗方向^[3]。因此,寻找初期分化细胞来源的内皮种子细胞已成为血管组织构建和器官修复的关键所在。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的突出特点是具有自我更新和多向分化潜能,可以将其诱导分化成特异的组织类型,修复受损的组织或器官。因此, BMSCs可成为内皮种子细胞的新的来源。

人参有大补元气、益气生津、补虚扶正、延年益寿之功效。人参皂甙是人参中最重要的有效成分,在血管内皮保护、防治心血管疾病等方面起重要作用^[4, 5]。本研究拟探讨人参皂甙Rg1在体外微环境诱导分化人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)成血管内皮样细胞中的作用。

材料与方法

1 主要材料、试剂和仪器 人参皂甙Rg1干粉(纯度: 97.7%; 生产批号: 200726, 广州市药检所药研中心提供); 改进的Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 粉培养基、胎牛血清(Hyclone); M199培养基、胰蛋白酶(Gibco); 内皮细胞生长补充因子(endothelial cell growth supplement, ECGS) (Sigma); 抗人血小板内皮黏附分子(CD31, Dako)、CD34、CD105、CD166单克隆抗体(Pharmingen); 抗人血管性血友病因子(vWF, 因子Ⅷ相关抗原)抗体(SANTA); 抗人血管内皮黏附分子-1(VCAM1, SANTA); Cy3偶联的驴抗羊IgG (H+L) (Jackson Immuno Research); R-PE偶联的山羊抗兔IgG (H+L) (Southern Biotech); Trizol、Fermentas RT-PCR system、Taq酶(Invitrogen); Ultra PURE琼脂糖(Gibco BRL); PCR引物(上海生工合成); DNA Marker (北京天为时代); Ficoll淋巴细胞分离液(Pharmacia); CO₂培养箱(Forma 371, Thermo)。超净工作台(SPEG AIR TECH); 荧光倒置显微镜(IX70型, Olympus); 离心机(德国Hettich); FACS Calibur流式细胞仪(美国Becton

Dickinson); Transwell嵌入膜(孔径8.0 μm, Corning)。

2 hMSCs的分离培养 方法参考文献[3]。经患者知情同意, 在无菌条件下, 取脊柱内固定术患者骨髓3 mL, 加入肝素, PBS充分混匀, 置于离心管, 以Ficoll淋巴细胞分离液(密度1.077 g/mL)梯度离心, 界面云雾状白膜层即为单个核细胞。将单个核细胞以 1×10^5 /mL细胞密度接种于培养瓶, 置37℃、5%CO₂培养箱中培养。培养基选用含10%胎牛血清的DMEM-LG, 72 h后去除未贴壁细胞悬液, 隔天换液1次, 2周后待贴壁细胞达90%融合时, 0.25%胰酶消化, 8×10^3 /cm²细胞密度传代; 以后每6天传代1次。倒置相差显微镜观察细胞形态。取3~8代用作实验。

3 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的原代培养 经产妇知情同意, 取新生儿脐带, 用0.125%胰蛋白酶灌注脐静脉消化内皮, 以含20%胎牛血清、75 μg/mL ECGS的M199培养基制成细胞悬液, 置于37℃含5%CO₂培养箱中培养, 待细胞长至融合状态后用0.1%胰蛋白酶消化传代, 取生长良好的2~3代内皮细胞用于实验。通过免疫荧光检测CD31和VCAM1的表达鉴定内皮细胞。

4 hMSCs与HUVECs共培养及Rg1处理 hMSCs与HUVECs的共培养采用具有通透性膜的Transwell细胞培养池, 两种细胞间不相互接触, 但培养液中的生物大分子可透过培养池底部的膜自由交换。按Corning公司说明, 取第3代hMSCs接种在6孔板中, 每1孔加2 mL L-DMEM培养基, 在37℃、5%CO₂培养箱培养2天后, 开始诱导。取细胞第2至第5代hHUVECs接种在6个Transwell (Transwell insert membrane, 孔径0.4 μm, Corning) 中, 培养基用DMEM/F12加10%胎牛血清, 在37℃、5%CO₂培养箱培养2天后, 开始和hMSCs共培养诱导。诱导体系中, hMSCs与HUVECs的比例为1:10, 每孔加2.5 mL条件培养基(M199加20%胎牛血清加100 U/mL肝素钠加2 mmol/L谷氨酰胺加50 μg/mL ECGS), 每3天换液1次。HUVECs每周传代保持一定融合度(90%左右)。第2、3周末观察细胞形态学变化并收细胞做内皮细胞相关指标检测。

用无血清培养基将人参皂甙Rg1干粉溶解成1 mg/mL, 室温振荡10 min后1 000 r/min离心1 min, 取上清过滤。按Rg1不同浓度设4个剂量组: 0、20、

40、80 ng/mL。分别使用含Rg1不同浓度的含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基在Transwell中诱导培养hMSCs 3周,通过流式细胞仪检测CD31的表达。

5 hMSCs表型分析 消化制备单细胞悬液,用不含胎牛血清的培养基悬浮细胞,调整浓度为 1×10^6 个/mL,立刻进行细胞标记。向收获的细胞中分别加入荧光素标记的抗体:FITC-anti human CD44, CD105, CD29, CD34, CD11b, CD45。摇匀,避光于4℃冰箱放置30 min,1 000 r/min离心3 min,弃去上清液,PBS洗涤2次,1%多聚甲醛固定,-20℃保存,待上机检测。所有标本均在6 h内完成检测,使用FACS Calibur流式细胞仪检测,结果用CellQuest分析软件分析。

6 免疫荧光检测CD31和VCAM1表达 培养细胞吸去培养基,0.01 mol/L PBS洗2次,1次3 min,2%正常驴血清(CD31、VCAM1)室温封闭60 min。吸弃血清后,一抗(羊抗人CD31和VCAM1)4℃过夜,室温复温30 min。0.01 mol/L PBS洗3次,每次10 min。R-PE偶联的山羊抗兔IgG(H+L,1:150),CY3偶联的驴抗羊IgG(H+L,1:150)室温孵育45 min。0.01 mol/L PBS洗3次,每次5 min。1 μg/mL Hoechst33344衬染细胞核。荧光显微镜照相系统下观察拍照。

7 RT-PCR鉴定CD31、vWF和血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin mRNA)表达 按Trizol试剂盒说明所示方法提取细胞总RNA,并在紫外分光光度计260 nm和280 nm波长处鉴定。总RNA随引物在RT-PCR试剂盒中产生cDNA,然后PCR扩增。引物见表1。PCR循环条件如下:94℃ 5 min,95℃ 30 s,55~62℃(取决于补底物)30 s,72℃ 60 s(40循环),72℃ 10 min。反应结束后,取10 μL产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,鉴定PCR产物片段大小。

8 透射电镜观察 将大约 2×10^5 诱导以后的细胞用固定液室温固定15 min,细胞刮子收集,3 000 r/min室温离心10 min送检。使细胞聚结成块状;细胞块体积约1 mm³大小。PBS缓冲液清洗后加入2%戊二醛于4℃下固定4 h以上。用PBS缓冲液充分洗涤15 min×3次后1%锇酸溶液固定2 h,之后用缓冲液洗涤3次。使用乙醇梯

度脱水,每个浓度10 min,分别为50%,70%,90%,95%,100%Ⅰ,100%Ⅱ,100%Ⅲ。再用丙酮脱水2次。使用环氧树脂Epon-812浸透、包埋处理,然后置于60℃温箱聚合8 h。经过修块、超薄切片后使用醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色。

9 流式细胞仪检测诱导hMSCs的CD31表达 收集不同浓度Rg1处理的诱导hMSCs,经胰酶消化后,PBS充分洗涤,与荧光抗体(FITC-anti human CD31)孵育,4℃冰箱放置30 min,1 000 r/min离心3 min,弃去上清液,PBS洗涤2次,1%多聚甲醛固定,-20℃保存,待上机检测。所有标本均在6 h内完成检测,使用FACS Calibur流式细胞仪检测,结果用CellQuest分析软件分析。

10 统计学方法 所有实验至少重复3次,实验中的变量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验数据采用单因素ANOVA方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 hMSCs分离培养 hMSCs原代接种培养后3~4天,显微镜下即可见有稀疏分布的单个细胞贴壁生长,形态为梭状,呈典型的成纤维细胞样外观,偶有宽大平坦的多边形细胞。细胞以分散,克隆集落方式增殖。原代培养第6天,见细胞形成多个细胞克隆样生长;第12~15天各个细胞克隆扩大直至铺满培养瓶底面。

传代培养的细胞比原代细胞增殖速度更快,传代后经过1~2天的适应期,第3天起细胞大量增加,进入对数生长期,第7天达到顶峰,以后进入平台期。

2 HUVECs原代培养 原代培养4天,在光学显微镜下观察,发现细胞贴壁呈多边形,生长汇合后细胞呈典型的铺路鹅卵石状,符合内皮细胞的形态特征。

3 Transwell半透膜非接触共培养诱导hMSCs向内皮细胞分化(图1) hMSCs与HUVECs在Transwell半透膜内共培养1周,细胞形态无明显改变;共培养2周时,诱导hMSCs胞体回缩,呈多角形;共培养3周,细胞增殖迅速,形态呈卵圆形或“铺路石”样改变。

4 hMSCs表型分析 流式细胞仪检测hMSCs表达CD29(98.64 ± 0.80)%,CD44(96.70 ± 1.50)%,CD105(2.21 ± 0.60)%,CD11b(0.80 ± 0.05)%,CD45(1.39 ± 0.13)%,CD34(1.73 ± 0.08)%。说明所分离培养的细胞比较均一,具有BMSCs的表面标志特征。

5 免疫组化检测CD31和VCAM1的表达(图2,图3) 免疫荧光检测显示原代培养的HUVECsCD31、VCAM1染色阳性,胞浆呈红色荧光。Transwell共培养

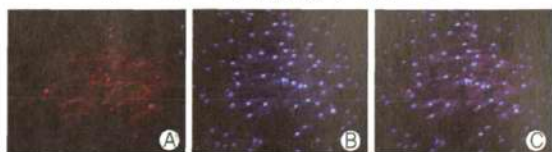
表1 内皮相关基因的引物

相关基因	引物序列	大小(bp)
vWF	5' gctctctcttlaacccggatg	556
	3' atactccttgccctgatga	
CD31	5'-TCCGATGATAACCACTGCAA-3·	297
	5'-GTGGTGGAGTCTGGAGAGGA-3·	
VE-cadherin	5'-CCACATTACGGGAATGCTT-3·	201
	5'-GAACATCTGCCCCCTCTCAG-3·	
β-actin	5' GTC GGG CGC CCC AGG CAC CA-3	540
	5' -CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3	



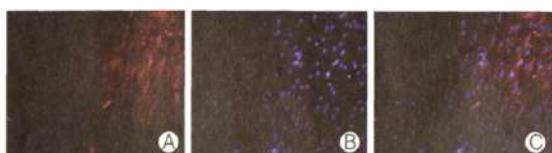
注: A 为诱导3周的内皮样细胞 ($\times 200$), B 为hMSCs ($\times 100$), C 为脐静脉内皮细胞 ($\times 100$)

图1 Transwell共培养诱导3周的hMSCs



注: A 为CD31 (红色荧光), B 为核染色heochst (蓝色荧光), C 为合成 (免疫荧光检测 $\times 200$)

图2 Transwell共培养诱导3周hMSCs的CD31表达

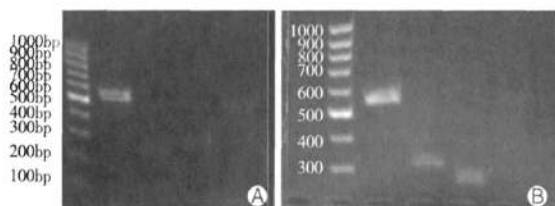


注: A 为VCAM1 (红色荧光), B 为核染色heochst (蓝色荧光), C 为合成 (免疫荧光检测 $\times 200$)

图3 Transwell共培养诱导3周hMSCs的VCAM1表达

诱导3周的hMSCs CD31、VCAM1表达阳性,胞浆呈红色荧光;未诱导hMSCs CD31、VCAM1表达阴性。

6 RT-PCR鉴定CD31、vWF、VE-Cadherin mRNA表达 (图4) 诱导3周的hMSCs经RT-PCR检测显示内皮特异性标志物CD31、vWF和VE-cadherin mRNA表达阳性,未诱导hMSCs表达阴性, HUVECs作阳性对照。



action VE CD31 vWF action VE CD31 vWF

注: A 为诱导3周的hMSCs, B 为HUVECs作阳性对照

图4 CD31、vWF、VE-cadherin mRNA RT-PCR表达

7 透射电镜观察 (图5) 细胞多呈梭形,核大,常染色质丰富,核仁明显,胞浆内少量线粒体,体小,嵴少,内质网呈短杆状,无明显扩张,糖原散在分布;部分细胞中可见Weibel-Palade小体样电子致密颗粒,周围可见张力丝缠绕。

8 诱导hMSCs的CD31表达 随Rg1浓度增加 (20~80 $\mu\text{g/mL}$) 诱导hMSCs表达CD31百分比增加。Rg1 0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组表达42.5%, Rg1 20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组表达69.34%, Rg1 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组表达73.62%, Rg1 80 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组表达83.09% (组间比较, $P < 0.05$)。



图5 透射电镜下诱导后细胞显示特有的Weibel-Palade小体 ($\times 28\ 000$)

讨论

骨髓间充质干细胞 (MSCs) 是来源于早期中胚层和外胚层的一类多能干细胞,理论上可分化为所有外、中胚层来源的细胞。内皮细胞 (endothelial cell, EC) 属于中胚层,因此MSCs具有向EC分化的可能性。

骨髓基质干细胞能在局部微环境中重新编程 (reprogramming), 分化成与其周围细胞生物学特性相似的细胞^[6], 细胞与细胞间的直接接触对hMSCs的分化不是必须的。本研究采用模拟体内诱导微环境的半透膜隔离非接触共培养的方法体外诱导hMSCs向内皮细胞表型分化,结果表明,与成熟内皮共培养的骨髓基质干细胞具有微环境依赖性向内皮分化的能力。细胞培养第2周,开始出现形态学改变,胞体回缩,呈多角形改变。细胞培养第3周,细胞增殖速度明显加快,形态学上呈卵圆形或“铺路石”样改变;在基因水平上,RT-PCR显示经典内皮细胞标志物CD31、vWF、VE-cadherin mRNA的高表达;在蛋白水平上,免疫荧光染色CD31和VCAM1表达阳性;透射电镜下诱导后细胞显示内皮细胞特有的Weibel-Palade小体。目前关于骨髓基质干细胞的分化调控机制仍未阐明,其微环境依赖性可能与周围成熟内皮细胞分泌的促内皮分化的细胞因子的诱导作用有关。这与干细胞的可塑性研究结果相一致,一些环境或局部微环境而不是细胞受体对移植的干细胞的分化是至关重要的^[7,8]。

与MSCs研究的整体水平相比,中药在这方面的研究才刚刚开始。但在MSCs的动员、扩增、定向分化的调控和移植等方面中药都可能有所作为。因为中药的治疗强调整体观念,中药既可以直接作用于体内的干细胞,促进其增殖、分化;也可以影响其微环境,促进其存活与功能建立,或者调整机体的免疫功能,减轻或消

除免疫排斥反应。

人参皂甙是人参中最重要的有效成分。人参皂甙 Rb2、Rc、Rg1 通过促进骨髓细胞的 DNA、RNA 及脂质的合成, 提高骨髓细胞向红细胞、白细胞的分裂率^[9]。王宁元等^[10]用人参皂甙 Rg1 诱导骨髓干细胞游走分化促进家兔心肌梗死后心血管内皮细胞再生, 发现治疗组心功能明显好转, 心肌梗死面积明显缩小。提示人参皂甙 Rg1 通过刺激心肌局部组织分泌 G-CSF 而诱导骨髓细胞游走至心肌组织进而向血管内皮细胞分化。

本研究通过流式细胞检测 CD31 的表达, 发现在微环境诱导 hMSCs 向内皮细胞表型分化过程中, 随人参皂甙 Rg1 浓度的增加诱导 hMSCs 表达 CD31 百分比增加, 提示人参皂甙 Rg1 能促进微环境依赖性诱导 MSCs 向内皮细胞系的分化。

人参皂甙影响骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化的机制尚不清楚, 可能与促进诱导微环境中多种调控因子和细胞生长因子的释放有关。已有研究表明, 人参皂甙 Rg1 能显著增强 HUVECs 合成血管新生最重要的促进因子——血管内皮生长因子 (VEGF), 从而促进血管新生^[11]。VEGF 也是体外诱导 MSCs 向内皮细胞表型分化的最重要的调控因子^[12]。其具体机制有待进一步研究。

综上所述, 人参皂甙 Rg1 具有促进体外微环境依赖性诱导 MSCs 向内皮细胞系的分化的作用。转化的内皮细胞在形态上、基因、蛋白表达、超微结构等方面均显示了内皮细胞的特征。

参 考 文 献

- [1] 张超纪. 组织工程化血管种子细胞研究现状[J]. 生物医学工程与临床, 2003, 7 (3): 176-180.
- Zhang CJ. Recent status of seed cells in tissue engineering vessel[J]. Biomed Eng Clin Med, 2003, 7(3): 176-180.
- [2] Lam C, Liu Y, Hsu J, et al. Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits[J]. Anesthesiology, 2008, 108 (3): 392-401.
- [3] Guilherme V, Silvio L, Joao AR, et al. Mesenchymal cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model[J]. Circulation, 2005, 111 (2): 150-156.
- [4] 李志刚, 蓝荣芳, 关丽, 等. 人参皂甙 Rg1 抗 oxLDL 诱导内皮细胞凋亡及分子机制. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2002, 11 (3): 248-252.
- Li ZG, Lan RF, Guan L, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on endothelial apoptosis induced by oxLDL and molecular mechanism [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2002, 11 (3): 248-252.
- [5] Lu J, Ma J, Yang J, et al. Ginsenoside Rg1-induced alterations in gene expression in TNF- α stimulated endothelial cells[J]. Chin Med J, 2004, 117 (6): 871-876.
- [6] Bittira B, Kuang JQ, Al-Khaldi A, et al. *In vitro* preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 74 (4): 1154-1159.
- [7] Almeida-Porada G, El Shabrawy D, Porada C, et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells[J]. Exp Hematol, 2002, 30 (12): 1454-1462.
- [8] Chen J, Wang C, Lu S, et al. *In vitro* chondrogenesis of adult bone marrow derived autologous mesenchymal stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2005, 319 (3): 429-438.
- [9] Yamamoto M, Takeuchi N, Kumagai A, et al. Stimulatory effect of panax ginseng principles on DNA, RNA, protein and lipid synthesis in rat bone marrow[J]. Arzneimittelforschung, 1977, 27 (6): 1169-1173.
- [10] 王宁元, 吕传江, 陈学海, 等. 人参皂甙 Rg1 诱导骨髓干细胞游走分化促进家兔心肌梗死后心血管内皮细胞再生的研究. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (10): 916-919.
- Wang NY, Lu CJ, Chen XH, et al. Study on effect of ginsenoside Rg1 in promoting myocardial vascular endothelial cell regeneration through induction on bone marrow stem cell's migration and differentiation in rabbits of myocardial infarction[J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med, 2005, 25 (10): 916-919.
- [11] Leung KW, Pon YL, Wong RS, et al. Ginsenoside-Rg1 induces vascular endothelial growth factor expression through the glucocorticoid receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and β -catenin/T-cell factor-dependent pathway in human endothelial cells[J]. J Bio Chem, 2006, 281 (47): 36280-36288.
- [12] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*[J]. Stem Cells, 2004, 22 (3): 377-384.

(收稿: 2010-03-29 修回: 2010-08-03)