· 基础研究 ·

低氧环境下黄芪甲苷促进人骨髓间充质干细胞分泌血管内皮细胞相关因子的实验研究

胡继宏[1] 贾 佳[1,2] 路 娟[1] 王秋萍[1] 赵静苗[1]
金 华[1] 靳利梅[1] 赵 翊[1] 李金娟[1]

摘要 **目的** 观察在低氧环境下,黄芪甲苷能否诱导人骨髓间充质干细胞(BMSCs)向血管内皮样细胞分化,提高 BMSCs 经血管内皮生长因子(VEGF)诱导分化后的血管内皮样细胞的功能。**方法** 将人 BMSCs 分为 4 组:对照组(单纯人 BMSCs 培养)、VEGF 组(含 VEGF 载体的腺病毒的完全培养基加入人 BMSCs)、黄芪甲苷组(含黄芪甲苷粉剂加入人 BMSCs)和联合诱导组(含黄芪甲苷粉剂和 VEGF 载体的腺病毒的完全培养基加入人 BMSCs),5% O_2 干预 2 周,对分化的细胞进行形态学观察,流式细胞仪检测细胞表型 CD31 和 CD105 的表达,ELISA 检测细胞培养上清液中 VEGF 及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)因子的含量,Real-time PCR 和 Western blot 检测内皮素(ET)和前列环素(PGI)的表达。**结果** (1)2 周后,镜下观察对照组与黄芪甲苷组细胞形态无明显变化,VEGF 组和联合诱导组细胞似铺路石子样生长。(2)流式结果显示,对照组与黄芪甲苷组细胞不表达 CD31,高表达 CD105;VEGF 组和联合诱导组细胞高表达 CD31,低表达 CD105,且 VEGF 组 CD31 表达高于联合诱导组($P<0.05$),而 CD105 低于联合诱导组($P<0.05$)。(3)ELISA 检测发现,与对照组比较,各干预组的 VEGF 及 eNOS 因子表达均增高(均 $P<0.05$),且大小顺序为 VEGF 组 > 联合诱导组 > 黄芪甲苷组。(4)RT-PCR 及 Western blot 检测发现,与对照组比较,各干预组 ET 水平均升高($P<0.05$),PGI 表达量均降低($P<0.05$);且联合诱导组 ET 蛋白表达水平最高,VEGF 组 PGI 表达量最低。**结论** 在低氧环境下,黄芪甲苷促进人 BMSCs 分泌 VEGF 相关因子;黄芪甲苷联合 VEGF 可以促进 VEGF 诱导分化后的血管内皮样细胞分泌 ET。

关键词 血管内皮生长因子; 黄芪甲苷; 低氧; 骨髓间充质干细胞; 内皮素; 前列环素; 内皮型一氧化氮合酶

Astragaloside Promoted Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Secrete Cytokine Related Vascular Endothelial Cells under Hypoxia Condition

HU Ji-hong[1], JIA Jia[1,2], LU Juan[1], WANG Qiu-ping[1], ZHAO Jing-miao[1], JIN Hua[1], JIN Li-mei[1], ZHAO Yi[1], and LI Jin-juan[1] *1 Experiment Center, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou (730000); 2 Faculty of TCM, Xi'an Haitang Vocational College, Xi'an (713000)*

ABSTRACT Objective To observe whether astragaloside could induce human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to differentiate into vascular endothelial cells (VECs), or improve the function of VECs under hypoxia condition. Methods The third passage BMSCs were divided into four groups, i.e., the blank control group (cultured with conventional culture medium), the VEGF induction group [cultured with adenovirus vector containing vascular endothelial growth factor (VEGF)], the Astragaloside group (cultured with astragaloside), and the combined group (cultured with adenovirus vector containing VEGF and astragaloside). After intervened by 5% O_2 for 2 weeks, morphologies of differentiated cells were observed. The expressions of cell phenotype CD31 and CD105 were detected by flow cy-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81260597);甘肃省高校基本科研业务费项目(No. 2012-3)
作者单位:1.甘肃中医药大学科研实验中心(兰州 730000);2. 西安海棠职业学院中医教研室(西安 713000)
通讯作者:胡继宏,Tel:0931-8765459,E-mail:hujihonghappy@163.com
DOI:10.7661/j.cjim.20180308.113

tometry. The levels of VEGF and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in supernate were detected by ELISA. The expressions of endothelin (ET) and prostacyclin (PGI) were detected by Real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. Results (1) No obvious changes occurred in the cell morphology in the blank control group and the Astragaloside group after two weeks. Cells in the VEGF group and the combined group exhibited a colony-like growth. (2) Results of flow cytometry showed that CD31 was negatively expressed in the blank control group and the Astragaloside group, but the expression of CD105 was high. However, the expression of CD31 increased, and the expression of CD105 decreased in the VEGF group and the combined group. The positive rate of CD31 was significantly higher in the VEGF group than in the combined group ($P<0.05$), and the positive rate of CD105 expression was lower in the VEGF group than in the combined group ($P<0.05$). (3) ELISA showed, as compared with the blank control group, the expressions of VEGF and eNOS increased significantly in all the intervention groups ($P<0.05$), ranked as the VEGF group > the combined group > the Astragaloside group. (4) RT-PCR and Western blot showed, as compared with the blank control group, ET level increased ($P<0.05$) and PGI decreased ($P<0.05$) in all the intervention groups. Further more, the expression of ET was the highest in the combined group, and the expression of PGI was the lowest in the VEGF group. Conclusions Astragaloside promoted BMSCs to secrete VEGF related factors under hypoxia condition. Astragaloside combined VEGF could promote the secretion of ET by VECs after VEGF induced differentiation.

KEYWORDS vascular endothelial growth factor; astragaloside; hypoxia; bone mesenchymal stem cell; endothelin; prostacyclin; endothelial nitric oxide synthase

正常的机体功能维持需要适宜的氧气供给,当微环境出现缺血、缺氧会引起组织损伤,因此新生血管生成对组织损伤修复具有重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前最强的促血管生长因子,可以诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为内皮细胞[1,2],本课题组前期的研究发现低氧环境下 VEGF 转染可以诱导 BMSCs 分化为血管内皮细胞[3]。黄芪甲苷作为黄芪的主要活性成分,临床及基础研究显示黄芪甲苷治疗缺血性心脏病疗效显著,已被国内外学者用于 BMSCs 相关研究[4-6],但有关低氧环境下黄芪甲苷是否可以诱导 BMSCs 向血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)分化或者提高 BMSCs 经 VEGF 诱导分化后的血管内样细胞功能的相关研究尚未见报道。故本实验通过形态学观察、细胞免疫表型及内皮细胞特异性分子进行综合鉴定,以 VEGF 转染和单纯细胞培养为对照,观察低氧环境中黄芪甲苷及黄芪甲苷联合 VEGF 干预后是否诱导人 BMSCs 向血管内皮样细胞分化。

材料与方法

1　细胞　1 代人 BMSCs(货号:7500)及其培养基(批号:7501)和胎牛血清(500 mL,批号:0025)均购于 ScienCell 公司。

2　药物　黄芪甲苷,每瓶 20 mg,购自于中国食品药品检定研究院,纯度≥98%,批号:100781-200613。将 20 mg 黄芪甲苷中加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO),轻轻吹匀,再加入完整培养基至 50 mL,充分溶解,0.22 μm 孔径滤膜过滤,配成 0.4 mg/mL 的母液,-20 ℃保存备用,用时等比列稀释。

3　试剂及仪器　腺病毒载体 pAd-VEGF-IRES2-EGFP(293A 细胞),病毒效价为 2×10^{10} IFU/mL(美国, Invitrogen, Life Technologies Corporation), TaKaRa Prime Script reagent Kit 试剂盒(TaKaRa Code:DRR037A, 美国 TaKaRa 公司),引物由 Invitrogen 公司合成。SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:P0015)和 BCA 蛋白测定试剂盒(批号:PC0020)均购自北京索莱宝(Solarbio)公司。CD31 FITC(批号:5090837)和 CD105APC(批号:5254722)均购自美国 BD 公司。人 VEGF ELISA 试剂盒(批号:218360343)购自联科生物有限公司,内皮型一氧化氮合酶(eNOS) ELISA 试剂盒(批号:201604)购自上海酶联生物有限公司。兔抗人内皮素(ET)单克隆抗体购自于 Abcam 公司,批号:GR215934-4;兔抗人前列环素(PGI)单克隆抗体购自于 Immunoway 公司,批号:B9001。甘油三磷酸脱氢酶(GADPH)购自于美国 GeneCopoeia 公司,货号:HQP006940。

实验中使用的倒置荧光显微镜,型号:Ⅸ81,日本 Olympus 公司;流式细胞仪,型号:FACScan,美国 BD 公司。

4 方法

4.1 BMSCs 体外培养 将冻存的人 BMSCs 置于 37 ℃水浴锅中溶化,800 r/min,离心 3 min,将上清倒掉,加入含 10%胎牛血清的完全培养基 1 mL,轻轻吹打混匀细胞,移至新培养瓶中,总液体量为 5 mL,放置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱培养,每天观察细胞生长状态,2 ~3 天换液 1 次。待细胞生长融合达 80% ~90%时,用 PBS 冲洗 2 遍,加入 0.25%胰蛋白酶 500 μL,并拍打培养瓶一侧,倒置相差显微镜下观察细胞脱落情况,若细胞间隙增大,胞质回缩,速加入等量完整培养基,以 800 r/min 离心 3 min,去上清,加入适量完整培养基吹打混匀细胞,按照 1∶3 比例进行传代。

4.2 人 BMSCs 的体外干预诱导 将第 3 代人 BMSCs 利用 SPSS 软件随机分为 4 组:对照组、VEGF 组、黄芪甲苷组和 VEGF 联合黄芪甲苷组(简称联合诱导组)。培养环境为 5% O_2 的三气培养箱中。对照组为单纯 BMSCs,进行 2 周常规培养,期间不传代;VEGF 组加入含 VEGF 因子的病毒载体诱导液进行诱导分化[3];黄芪甲苷组加入含黄芪甲苷粉剂的完全培养基[7];联合诱导组为 VEGF 诱导和黄芪甲苷干预的结合;以上 3 个干预组均 72 h 后换为普通培养液继续培养,每隔 3 天换液,并将换下的上清培养液保存 -20 ℃冰箱,培养 2 周后对分化的细胞进行鉴定。

4.3 观察指标及检测方法

4.3.1 细胞上清培养液中 VEGF 及 eNOS 的含量检测 采用 ELISA 法。诱导 2 周后,根据说明书步骤,先将细胞培养上清液离心去除沉淀,再行标准品与样品的稀释,分别加样于酶标板孔底部,温育后加入洗液进行多次冲洗,后加入酶标试剂、显色液、终止液,最后置于酶标仪下进行检测。

4.3.2 ET 和 PGI mRNA 的表达 采用 Real-time PCR 检测。诱导 2 周后,利用总 RNA 提取法收集细胞,弃去培养基,用 PBS 冲洗细胞 2 遍后加入 1 mL Trizol,使其覆盖细胞面,置于冰上裂解 5 min 后,加入相应试剂,最后将提取的 RNA 根据 TakaRa Prime ScriptTM reagent Kit 试剂盒进行反转录。引物序列见表 1。反转录:将 1 μg 样品 RNA 加入 4 μL 5×PrimeScript Buffer、1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅰ、1 μL Oligo dT Primer、1 μL Random 6 mers,补 RNase Free dH_2O 至 20 μL,以 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃保存 10 min 进行扩增。将反转录得到的 cDNA 进行 Real-time PCR,并制作熔解曲线。

表 1 引物序列表

引物名称	引物	引物长度(bp)
ET	上游:5′-TGCTCCTGCTCGTCCCTGATGGATAAAGAG-3′ 下游:5′-GGTCACATAACGCTCTCTGGAGGGCTT-3′	460
PGI	上游:5′-ACCCCCCACTGAAAAAGATGA-3′ 下游:5′-CCTTCTAAGTGGTTGGAACA-3′	162
GADPH	上游:5′-TGAAGGTCGCTGTCAACGGA-3′ 下游:5′-GATGGCATGGACTGTGGTCAT-3′	451

采用比较 Ct(ΔΔCt)法计算 mRNA 的相对表达量,计算公式如下:ΔCt = Ct 目的基因 - Ct 内参基因,ΔΔCt = ΔCt 处理样本 - ΔCt 对照样本;$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组目的基因表达量相对于对照组表达量的倍数关系。

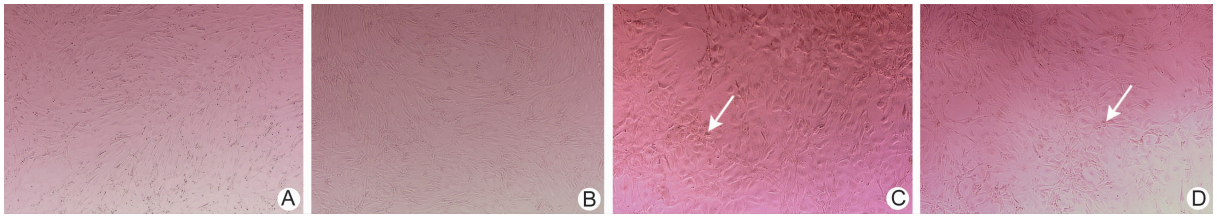
4.3.3 诱导细胞中 ET 及 PGI 蛋白的表达 采用 Western blot 检测。诱导 2 周后,收集细胞,加入裂解液冰上静置 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min后,提取上清液,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,再分别将 β-actin、PGI、ET 一抗兔用 TBST 稀释(1∶1 000)后加入 PVDF 膜,4 ℃过夜孵育,次日加入相应的二抗人,室温孵育后加入发光液,放入凝胶图像分析仪进行曝光。用目的条带的灰度值比内参 β-actin 灰度值代表蛋白相对表达量。

4.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料服从正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,并进一步用 *LSD* 做两两比较;不服从正态分布采用中位数和四分位间距表示,组间比较采用秩和检验。计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组诱导前、后 BMSCs 的形态结果比较(图 1) 正常第 3 代人 BMSCs 形态呈纺锤状,核呈椭圆形,呈成纤维样生长,且生长旺盛(图 1A);经 2 周诱导后,黄芪甲苷组细胞数量较多,呈梭形,网状交织,无明显形态改变(图 1B);VEGF 组和联合诱导组细胞多呈三角形或多边形,集落状生长,呈铺路石子样(图 1C,D)。

2 各组诱导后 BMSCs 表达 CD31 及 CD105 比较(图 2) 诱导 2 周后,对照组及黄芪甲苷组 CD31 均为阴性表达;而 CD105 为阳性表达,阳性率分别为 99.70%和 99.60%,表明细胞仍呈现 BMSCs 的表型(图 2A、B)。VEGF 组和联合诱导组 CD31 表



注：A 为对照组；B 为黄芪甲苷组；C 为 VEGF 组；D 为联合诱导组；下图同；箭头所指为阳性结果

图 1　诱导 2 周各组人 BMSCs 形态学观察　（HE，×4）

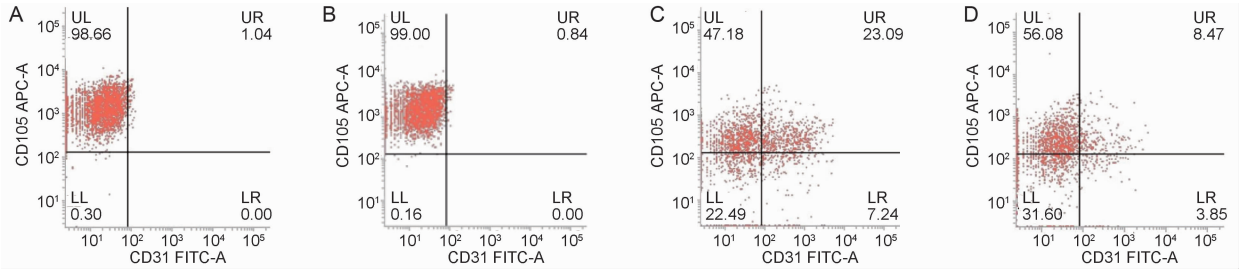


图 2　诱导后各组人 BMSCs 表达 CD31 和 CD105 比较

表 2　各组诱导后人 BMSCs 的 ET、PGI mRNA 表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

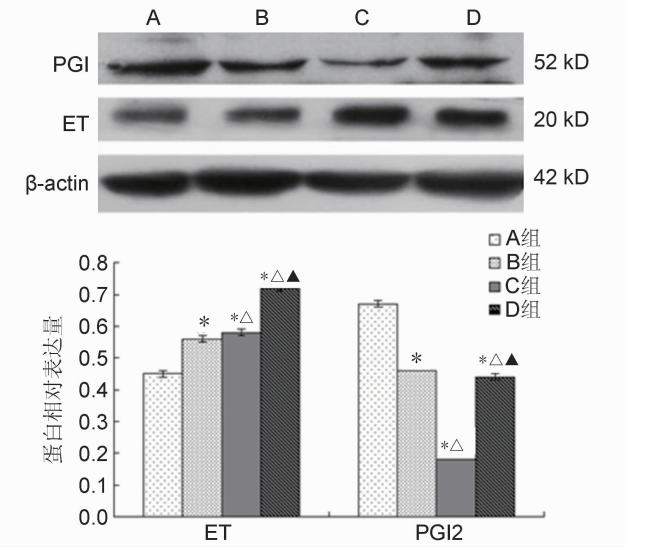
组别	n	GAPDH	ET	PGI	$2^{-\triangle\triangle Ct}$	
					ET	PGI
对照	3	16.12 ± 0.02	28.05 ± 0.28	26.84 ± 0.21	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.20
黄芪甲苷	3	15.66 ± 0.02	26.45 ± 0.03	27.38 ± 0.01	2.21 ± 0.06 *	0.39 ± 0.00 *
VEGF	3	15.43 ± 0.03	25.12 ± 0.07	27.93 ± 0.01	4.71 ± 0.24 *△	0.29 ± 0.00 *△
联合诱导	3	16.13 ± 0.03	26.59 ± 0.03	27.23 ± 0.01	3.39 ± 0.02 *△▲	0.33 ± 0.00 *△▲

注：与对照组比较，*P <0.05；与黄芪甲苷组比较，△P <0.05；与 VEGF 组比较，▲P <0.05

达均明显上升，且 VEGF 组阳性率高于联合诱导组（分别为 30.33%、10.22%，P <0.05）；CD105 表达下降，且 VEGF 诱导组阳性率低于联合诱导组（分别为 58.11%、63.47%，P <0.05），呈现典型的内皮细胞的表型（图 2C、D）。

3　各组诱导后人 BMSCs 的 ET、PGI mRNA 表达水平比较（表 2）　与对照组比较，VEGF 组、黄芪甲苷组和联合诱导组 ET mRNA 明显上调（P <0.05），而 PGI mRNA 表达均降低（P <0.05）。与黄芪甲苷组比较，VEGF 组和联合诱导组 ET mRNA 均明显上调（P <0.05），PGI mRNA 表达均下降（P <0.05）。与 VEGF 组比较，联合诱导组 ET mRNA 表达下调（P <0.05），而 PGI mRNA 表达提高（P <0.05）。

4　各组诱导后人 BMSCs 的 ET、PGI 蛋白表达比较（图 3）　与对照组比较，VEGF 组、黄芪甲苷组和联合诱导组的 ET 蛋白含量均增多（P <0.05），而 PGI 蛋白含量均减少（P <0.05）。与黄芪甲苷组比较，VEGF 组和联合诱导组 ET 含量均增加（P <0.05），而 PGI 含量均降低（P <0.05）。与 VEGF 组比较，联合诱导组 ET 和 PGI 含量均增加（P <0.05）。



注：与对照组比较，*P <0.05；与黄芪甲苷组比较，△P <0.05；与 VEGF 组比较，▲P <0.05

图 3　各组诱导后人 BMSCs ET、PGI 蛋白表达比较

5　各组诱导后细胞培养上清液中 VEGF 及 eNOS 含量比较（表 3）　与对照组比较，VEGF 组、黄芪甲苷组和联合诱导组 VEGF 及 eNOS 的含量均升

高($P<0.05$)。与黄芪甲苷组比较,VEGF 组和联合诱导组 VEGF 及 eNOS 表达含量均升高($P<0.05$)。与 VEGF 组比较,联合诱导组 VEGF 及 eNOS 表达含量均降低($P<0.05$)。

表 3 各组诱导后细胞培养上清液中 VEGF 及 eNOS 含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	VEGF(pg/mL)	eNOS(U/mL)
对照	4	450.99 ± 18.07	21.13 ± 0.94
黄芪甲苷	4	700.10 ± 39.45 *	24.01 ± 0.74 *
VEGF	4	1 008.35 ± 146.34 *△	30.46 ± 2.23 *△
联合诱导	4	976.50 ± 171.95 *△▲	27.40 ± 1.14 *△▲

注:与对照组比较,*$P<0.05$;与黄芪甲苷组比较,△$P<0.05$;与 VEGF 组比较,▲$P<0.05$

讨 论

干细胞移植后多数处于组织缺氧的微环境中,采用有效手段促进人 BMSCs 的定向分化是研究者关注的重点。VEGF 被认为是最有效的一种促血管生长因子,VEGF 基因转染人 BMSCs 可以向血管内皮样细胞诱导分化[3]。黄芪甲苷作为黄芪的主要有效成分,有研究发现黄芪甲苷不仅促进人 BMSCs 体外增殖,还促进 VEGF mRNA 的表达[8]。黄芪甲苷是否可以在低氧下诱导人 BMSCs 向 VECs 分化,是否可以提高 HBSCs 经 VEGF 诱导分化后的血管内样细胞功能是本次实验的目的。

本实验细胞形态和流式细胞结果显示,对照组和黄芪甲苷组呈现 BMSCs 细胞形态和细胞表型(CD105 高表达,CD31 阴性)特点,VEGF 组和黄芪甲苷联合 VEGF 组呈现血管内皮细胞形态和内皮细胞表型(CD105 低表达,CD31 阳性)特点,提示 VEGF 转染人 BMSCs 具有向血管内皮细胞分化的倾向。这与常氧下 VEGF 转染诱导人 BMSCs 向内皮细胞分化的结果一致[9]。CD31 是内皮细胞的特异性表面标志[10]。也有研究发现常氧下,将人 BMSCs[11,12]、鼠 BMSCs[13]或羊 BMSCs[14]与 VEGF 共培养同样可促进 BMSCs 向内皮细胞分化。

本研究还发现黄芪甲苷组并无促进人 BMSCs 向血管内皮样细胞分化,这与另一项黄芪注射液诱导人 BMSCs 后 CD31 阳性表达的研究结果不同[15],可能由于黄芪中其他有效成分促进了 BMSCs 向 VECs 分化。另外,本研究中黄芪甲苷联合 VEGF 组血管内皮细胞特异性表型标记物 CD31 阳性率低于 VEGF 组,其原因有待进一步探讨。

分化后的细胞是否具有血管内皮细胞功能,还需要相应的功能学指标进行验证,但相关的研究极少。目前仅有我们前期的实验对 BMSCs 分泌 ET 和 PGI 的情况进行研究[3]。本次实验发现相较于对照组,黄芪甲苷组、VEGF 组和联合诱导组的 VEGF 及 eNOS 表达均明显上调,说明黄芪甲苷与 VEGF 均可促进人 BMSCs 血管内皮细胞因子的表达,只是强度不同。eNOS 于血管内产生一氧化氮(NO),并协助调节血管功能。有研究发现内皮型 eNOS 表达载体转染 BMSCs 后,BMSCs 能够表达 CD31 及 VEGF 等血管内皮细胞相关分子[16]。本实验还发现,相对于对照组,各干预组 ET 升高与 PGI 降低,与前期实验结果类似[3]。正常的血管内皮细胞只有 ET 分泌增多和 PGI 分泌减少,才能维持内环境稳态而发挥功能[17],共同促进内皮细胞的正常生长[18]。目前尚未明确 BMSCs 向血管内皮细胞定向分化的诱导剂[19],本实验中,黄芪甲苷组虽无促进人 BMSCs 向血管内皮样细胞分化的潜能,但其可促进细胞因子 VEGF 的表达,这与彭小娟等[8]和沈凌[15]的研究结果一致,其具体机制有待进一步探讨。

利益冲突:无。

参 考 文 献

[1] 贾立山, 周云, 张亚, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3698 -3702.

[2] 陈毅, 刘丹平. 三种细胞因子体外联合诱导兔骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(21): 4093 -4096.

[3] 胡继宏, 贾佳, 路娟, 等. 低氧下血管内皮细胞生长因子转染人骨髓间充质干细胞向血管内皮样细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(9): 1352 -1356.

[4] 刘永琦, 李静雅, 蔡玲, 等. 黄芪多糖诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化的特性[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 60 -64.

[5] 冼邵祥, 杨忠奇, 汪朝晖, 等. 黄芪甲苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(1): 37 -40.

[6] 刘琳, 白海, 王存邦, 等. 黄芪多糖对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞增殖与细胞因子表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(10): 1873 -1877.

[7] 胡继宏, 路娟, 赵翊, 等. 黄芪主要活性成分及其提取物对鼠骨髓间充质干细胞增殖作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1070 -1072.

[8] 彭小娟, 白海, 王存邦, 等. 黄芪甲苷对人骨髓间充质干细胞体外增殖及细胞因子表达的影响[J]. 现代生物学进展, 2014, 14(8): 1452 -1455.

[9] 刘丹丹. 人骨髓间充质干细胞向内皮细胞体外诱导分化的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2004.

[10] Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Kananykhina E, et al. Role of VEGF-A in angiogenesis promoted by

umbilical cord-derived mesenchymal stromal/stem cells: *in vitro* study[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 28(7): 46-59.
[11] 杜晓, 陈小平, 张开明, 等. 人骨髓间充质干细胞体外向血管内皮细胞诱导分化的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(8): 940-941.
[12] 孔根现. VEGF 分别与 bFGF、aFGF 联合诱导骨髓间充质干细胞分化为血管内皮细胞[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
[13] 马俊伟. 骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞诱导分化的实验研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
[14] Yang LX, Xu ZY, Zhang BR, et al. *In vitro* induction of bone marrow stromal stem cells to differentiate into endothelial cells[J]. Acad J Sec Milit Med Univ, 2003, 24(12): 1300-1304.
[15] 沈凌. 黄芪对低氧环境下血管内皮细胞生长因子/基质细胞衍生因子-1 诱导人骨髓间充质干细胞分化、迁移的干预作用的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
[16] Bandara N, Gurusinghe S, Chen H, et al. Minicircle DNA-mediated endothelial nitric oxide synthase gene transfer enhances angiogenic responses of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 29(7): 48-62.
[17] 赵保明, 李凤良, 宋喜明, 等. 谷胱甘肽对糖基化终末产物环境中人脐静脉内皮细胞前列环素和内皮素-1 分泌的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2011, 46(4): 599-601.
[18] Ikhapoh IA, Pelham CJ, Agrawal DK, et al. Synergistic effect of angiotensin Ⅱ on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 26(6): 4-16.
[19] Groop PH, Forsblom C, Thomas MC. Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2005, 1(2): 100-110.

（收稿: 2017-04-30　在线: 2018-05-10）
责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑　陈可冀

副总编辑　王文健　史大卓　吕爱平　肖培根　吴伟康　沈自尹　雷　燕

顾　　问　王永炎　邓铁涛　吴咸中　辛育龄　张伯礼　陈香美　陈凯先　陈维养　唐由之　曹洪欣　韩济生

编辑委员

于德泉　王一涛　王卫霞　王宁生　王　伟　王　阶　王拥军(上海)　王拥军(北京)　王昌恩
王学美　王硕仁　王　舒　卞兆祥　方邦江　方敬爱　邓跃毅　叶文才　田金洲　史载祥　白彦萍
吕志平　吕维柏　朱　兵　朱明军　危北海　庄曾渊　刘干中　刘瓦利　刘　平　刘龙涛　刘　良
刘建平　刘建勋　刘保延　刘鲁明　齐清会　阮新民　阳　晓　孙汉董　孙　燕　苏　励　杨任民
杨宇飞　杨秀伟　李乃卿　李大金　李廷谦　李军祥　李连达　李国栋　李国勤　李　恩　李　涛
李焕荣　连　方　吴大嵘　吴万垠　吴泰相　吴根诚　吴　烈　时毓民　邱　峰　张大钊　张卫东
张永贤　张永祥　张荣华　张亭栋　张俊华　张家庆　张敏州　张敏建　陆付耳　陈士奎　陈小野
花宝金　范吉平　范维琥　林志彬　林　谦　林瑞超　郁仁存　果德安　季　光　周　俊　周霭祥
郑国庆　赵一鸣　赵伟康　赵芳芳　赵健雄　胡义扬　胡晓梅　胡镜清　侯凡凡　饶向荣　洪传岳
顾振纶　栗原　博(日本)　徐凤芹　徐　浩　殷惠军　郭　军　郭　艳　郭赛珊　唐旭东　夏城东
凌昌全　黄光英　黄　熙　黄璐琦　梅之南　曹小定　高瑞兰　崔　红　麻　柔　梁挺雄　梁　春
梁晓春　梁繁荣　董竞成　董福慧　谢竹藩　谢明村　谢　恬　蔡定芳　裴正学　廖福龙　衡先培
戴瑞鸿　Yung-chi CHENG(美国)　Sheng-xing MA(美国)　Qun-hao ZHANG(美国)

(以上名单按姓氏笔画为序)