

人外周血纤维细胞的分离、培养方法*

崔磊 李学拥[△] 李跃军 李金清 吕晓星

(第四军医大学唐都医院整形烧伤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探索简便易行的外周血纤维细胞体外分离、培养方法及其生物学特征与功能。方法 采用 Ficoll 密度梯度离心分离法分离成人外周血, 所获得的白细胞在一定条件要求下体外培养, 采用流式细胞技术、细胞免疫荧光染色等对贴壁生长的成纤维样细胞进行鉴定, 在扫描电镜下进一步观察其形态结构。结果 培养至第 14 天时, 外周血纤维细胞开始分化成熟。血液来源的取材、首次换液的时间、细胞的接种密度、血清浓度等多种因素均会对外周血纤维细胞的培养造成影响。免疫荧光染色结果显示培养至 12 天时 CD34 和 COL 均为强阳性表达, 继续培养至 28 天时, 血液来源的细胞表面抗原 CD34 发生明显丢失, 免疫荧光染色几乎不能显色, 相反 COL 持续表达阳性。取培养 14 天的贴壁细胞, 经流式细胞仪分析, Col⁺ 细胞为 81.6%, 显示 PBFCs 不断向成纤维细胞分化的特性。结论 采用密度梯度离心法配合适当的培养条件, 成人外周血中存在的前体细胞经体外分离、培养可分化为外周血纤维细胞, 并保持其生物学特性。

关键词 细胞培养; 外周血纤维细胞; 免疫细胞化学; 创伤修复

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)22-4212-04

Isolation And Cell Culture of Human Peripheral Blood Fibrocytes*

CUI Lei, LI Xue-yong[△], LI Yue-jun, LI Jin-qing, LV Xiao-xing

(Department of plastic surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objectives: To establish a simple and efficient method for isolating and culturing peripheral blood fibrocytes in vitro, study the functions and relationship between the expression specific molecule makers expression and the morphological characteristics. **Methods:** Total peripheral blood leukocytes were isolated from human peripheral blood by centrifugation over Ficoll-Paque. Adhered fibroblast-like cells were detected by immunocytochemistry, flow cytometry and electron microscopy. **Results:** Cultured to day 14, peripheral blood mature fiber cells begin to differentiate. The source of blood draw, the first exchange of fluid impact on the culture of the cell inoculation density, serum concentration, and other factors will peripheral blood fibrocytes. Immunocytochemical staining of PBFCs showed that after 14 days, CD34⁺ and COL⁺ were strongly expressed, continuously cultured to 28 days, most CD34⁺ lost, oppositely, COL⁺ had strongly expressed. The result showed that PBFCs differentiated into fibroblasts sustainably. **Conclusions:** The density gradient centrifugation with the appropriate culture conditions, the existence of precursor cells in adult peripheral blood were isolated, cultured in vitro to differentiate into the peripheral blood fibroblast, and maintain their biological properties.

Key words: Cell Culture; Peripheral Blood Fibrocytes; Immunocytochemistry; Wound Healing

Chinese Library Classification: R813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)22-4212-04

前言

外周血纤维细胞(peripheral blood fibrocytes)是近年来发现的一个多分化潜能细胞,它具有成纤维细胞的特性,能分化为肌成纤维细胞同时,我课题组之前的研究表明,其还可能是血管新生过程中周细胞的重要来源之一^[1]。随着研究的不断深入,人们逐渐认识到这种由 Bucala 于 1994 年发现的细胞能够在体外培养过程中形成集落,能够在组织损伤后在炎症期迅速迁移至创面局部^[2],并在损伤部位特异性分化为成纤维细胞,进而发挥它抗原呈递、收缩创面、合成释放多种细胞因子和细胞外基质并促进创面新生血管形成等等一系列作用,这些特性使其在组织的损伤修复过程中发挥独特作用,颇为受人关注^[3,4]。

PBFCs 分离、培养的方法是将人外周血经 Ficoll 密度梯度离心法分离出血液的中以白细胞为主要成分的混合细胞群^[5],经 PBS 反复洗涤后于 DMEM 培养基中体外培养 10~12 天,采用免疫磁珠隐形筛选法,去除贴壁细胞中的 T 细胞、B 细胞、单核细胞和少量粒细胞,所获得的细胞即认为是外周血纤维细胞,但此方法面临许多问题而难以推广,如费用高昂,分离过程对细胞活性影响较大,技术设备条件要求高,方法复杂而细胞产出量少等,而在体外培养过程中,由于培养条件、接种密度等客观差异及白细胞亚群之间的相互作用,常导致 PBFCs 的培养失败。因此,本研究拟探讨简便、经济的外周血纤维细胞体外分离、培养方法,摸索合适的培养条件。

1 材料和方法

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30872679)

作者简介: 崔磊(1981-) 男 医学硕士 主要研究方向: 创伤修复 血管新生 E-mail: cuilei15@sina.com

[△]通讯作者: 李学拥 电话: 029-84777738 E-mail: yuyong@hotmail.com

(收稿日期: 2012-03-22 接受日期: 2012-04-20)

1.1 主要制剂

人淋巴细胞分离液 (Lympholyte-H): 购自美国 GE 公司; DMEM 培养液: 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清(FBS): 购自美国 Gibco 公司; 人纤维连接蛋白(Fibronectin): 购自美国 Invitrogen 公司; 兔抗人 I 型胶原蛋白(Col) 抗体: 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小鼠抗人 CD34 抗体: 购自武汉博士德生物工程公司; FITC 标记的羊抗小鼠及 TRITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗: 购自美国 Santa Cruz 公司; 硫酸链霉素、青霉素: 购自华北制药股份有限公司。

1.2 人外周血白细胞体外分离

西安西京医院血库提供的抗凝浓缩白细胞 250ml, PBS 液对倍稀释, 以 1:1 体积平铺于 1.077g/mL 的人淋巴细胞分离液上, 使其分为上下两层, 经密度梯度离心(2500r/min, 25min), 弃上清后, 小心吸取“白膜”层(buffy coat, 即淋巴细胞层)。3 倍体积的 PBS 洗涤 2 次(1000 r/min, 8min/次), 移除上清。细胞悬浮于 DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清、100 μ g/mL 链霉素和 100U/ml 青霉素) 光学显微镜下细胞计数。

1.3 人外周血纤维细胞培养及形态学观察

将分离得到的细胞按 5×10^6 /孔接种于预先铺布人纤维连接蛋白的 6 孔板中, 每孔 1.5ml, 其中两孔预先放入无菌盖玻片, 置于恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO_2) 培养。4 天后首次换液, 去除悬浮细胞, 所得贴壁细胞继续培养, 其后每 3 天换液一次, 继续培养 10 天。每次换液时用经过预热的 PBS 漂洗 2 次, 去除未贴壁细胞。

培养过程中在倒置显微镜下每天观察细胞增殖情况及形态变化, 拍照保存。

1.4 流式细胞术分析外周血纤维细胞纯度

细胞培养 14 天后, PBS 洗涤后, 流式细胞仪工作液重悬细胞, 制成细胞悬液 100 μ L, 加入兔抗人的 Col 抗体(抗体浓度 1:50), 低温孵育 1h, 1500 r/min 离心 5min, 去除一抗, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗(抗体稀释 1:100), 低温避光孵育 30 分钟, PBS 漂洗 2 次, 多聚甲醛固定细胞后, 流式细胞仪检测其纯度。以分离后未经培养的淋巴细胞亚群作为对照。

1.5 荧光免疫细胞化学染色

将培养第 12d、28d 的贴壁细胞进行荧光免疫细胞化学染色, 观察其表型变化。取出预铺在六孔板内的盖玻片, PBS 漂洗一次, 自然干燥 30min, 多聚甲醛固定 10min, PBS 清洗 3 次; 加入配好的 0.2% Triton X100 (30% Triton X100 1ml+PBS 100ml) 30min, 增加细胞的通透性, PBS 清洗, 2% 牛血清白蛋白室温封闭 60min; 加入血清稀释液稀释的兔抗人的 Col 一抗(抗体稀释 1:50), 未滴加一抗的爬片作阴性对照, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入 TRITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗(抗体稀释 1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 加入血清稀释的小鼠抗人 CD34 一抗(抗体稀释 1:100), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(抗体稀释 1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 加入 1mg/L 的 DAPI 进行细胞核染色 5min, 置于 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 荧光显微镜下观察 Col⁺ 细胞的胞质显红色, CD34⁺ 细胞的胞膜显绿色, 有蓝染细胞核的可认定为细胞。

1.6 人外周血纤维细胞的扫描电镜观察

一组细胞培养 14 天后取出, 另一组在培养至第 5d 时在培养板内加入肉芽组织匀浆液, 继续培养至第 14 天后取出, 分别并置于 3% 戊二醛内固定 2h, 用 PBS 离心漂洗 (2500r/min, 5min) 3 次, 再以 1% 锇酸溶液固定 1h, 蒸馏水洗涤 2 次; 之后分别用 30% 丙酮脱水 10min, 50% 丙酮脱水 10min, 70% 丙酮脱水 10min, 90% 丙酮脱水 10min, 100% 丙酮脱水 10min; 用 100% 乙酸异戊脂浸泡 30min, 置换丙酮, 滤纸吸净残余液体, 经 JEE-5B 真空冷冻干燥机干燥后, 用镊子将盖片贴在导电胶布上, 喷金镀膜, 在 10KV 电压下于 HITACHI S-3400N 扫描电镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 人外周血纤维细胞体外培养的生物特点

初分离得到的外周血淋巴细胞为圆形, 散在悬浮于培养液中。24h 后, 悬浮细胞大量贴壁伸展, 培养至第 4 天后不再有细胞贴壁。培养 3~4 天后, 可见大量细胞聚集形成一个集落生长, 其中有明显的纺锤形细胞出现, 但尚比较幼小, 增殖缓慢(图 1A)。培养 7 天后, 纺锤形细胞个体逐渐变大, 细胞也间隙开始加大, 而初期培养板内大量得圆形细胞及碎片不断减少其中, 体型较小的淋巴细胞、粒细胞等因为不贴壁在换液过程中被逐步清除, 体型较大的单核细胞虽然可以贴壁, 但由于培养条件的不同而逐步死亡(图 1B)。第 14 天时, 外周血纤维细胞开始分化成熟, 体型进一步变大, 充分伸展、透明, 形成典型的纺锤形、长梭形结构, 但细胞体型仍明显小于成纤维细胞(图 2A)。到第 28 天时, 外周血纤维细胞所特有的纤细胞体发生明显收缩, 部分分化出现较多触角样突起, 部分发生死亡。(图 2B)。

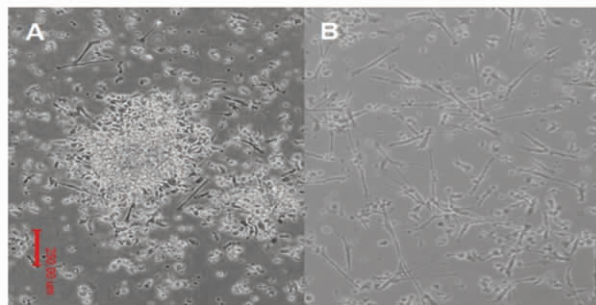


图 1 A 图示培养至第 4 天, 贴壁细胞聚集成集落式生长($\times 200$); B 图示培养至第 7 天, 可见贴壁细胞中大部分表现为长梭形, 胞体纤细, 部分呈现圆形或不规则型($\times 200$)

Fig.1-A Shows that after 4 days culture, adhered cells collected($\times 200$); Fig.1-B after 7days culture, adhered cells were became to long spindle, and has slim cell body, part of them showing round or irregular shape($\times 200$)

2.2 流式细胞术分析外周血纤维细胞纯度

在分离培养过程中, 贴壁细胞可分为多个细胞群落, 其表型会随着培养时间的延长而不断发生变化。

Phillips 等研究发现, 运用密度梯度离心法初分得到的人外周血淋巴细胞呈 CD34、CD45 弱阳性, COL⁻ 阴性^[6]; 体外培养到第 7-10 天的时候, CD34、CD45 阳性率达到高峰, 随后其表达开始发生下降, 培养至第 14 天后, 大部分贴壁细胞开始分化发育成有功能的外周血纤维细胞, 但膜表面标记 CD34 与白

细胞共同抗原 CD45 已基本不能被免疫荧光染色检出。与此相反, COL 的表达一直处于高水平, 因此更适合作为流式细胞技术分析鉴定外周血纤维细胞纯度的标志物。取体外培养到第 14 天的贴壁细胞, 经流式细胞仪分析, 其中 81.6% 的细胞表达 COL 阳性(图 3)。

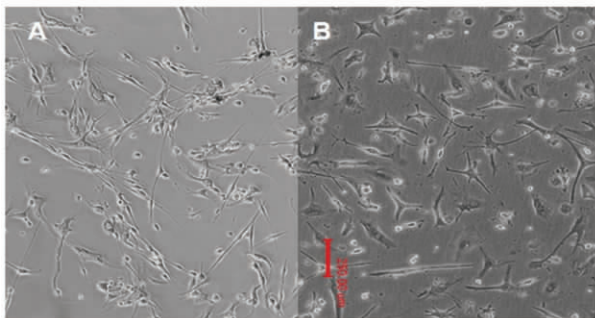


图 2 A 图示培养至第 14 天, 贴壁细胞开始分化成熟($\times 200$); B 图示培养至第 28 天, 纤维细胞体明显收缩, 部分分化出现较多触角样突起, 部分发生死亡($\times 200$)

Fig.2-A shows that after 14 days culture, adhered cells began to differentiation and maturation($\times 200$); Fig.2-B after 28 days culture, the cell body were shrunk, part of them were antennae-like protruding, the others were dead($\times 200$)

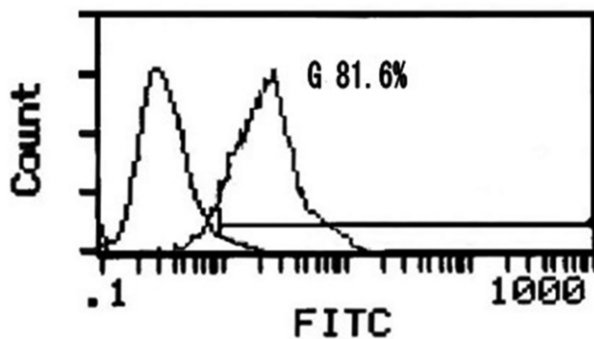


图 3 流式细胞仪分析体外培养至第 14 天的 COL + 细胞

Fig.3 Cytofluorometric analysis of the COL + cultured in vitro for 14 days.

2.3 免疫荧光染色观察培养过程中细胞表型的变化

外周血纤维细胞分离培养的第 12 天, 可见外周血纤维细胞呈长梭形、胞体纤细、伸展充分, 生长排列方式单一。CD34 分子的表达为强阳性, 大部分细胞也同时表达 COL, 此外, 还出现了部分只表达 COL 的细胞, 细胞核呈圆形均匀蓝染, 部分视野可见细胞分裂的现象(图 4)。继续培养至第 28 天, 显微镜下可见 PBFC 的纤维细胞体发生收缩, 部分分化出现较多触角样突起, 与培养至第 12 天相比, 造血来源的标记 CD34 几无法显色, 说明其表达明显减少, 而 COL 的表达持续强阳性, 且强阳性表达胶原的区域与核区几乎重合, 表达 COL + 的细胞在数量上已成为优势细胞, DAPI 核染发现细胞核形态不均、多椭圆形核大(图 5)。

2.4 扫描电镜下观察人外周血纤维细胞

扫描电镜下观察培养 14 天的外周血纤维细胞, 可见细胞呈长梭形, 细胞体突起较少并充分伸展、其表面黏附有少量淋

巴细胞, 此时期的外周血纤维细胞分化趋于成熟(图 6)。

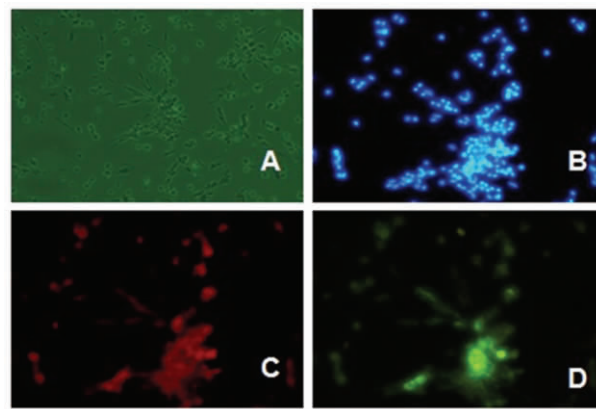


图 4 免疫荧光染色观察培养 12 天的外周血纤维细胞, 其中 A 为体外培养 12 天的 PBFCs, B 为 DAPI 核染, 细胞核形态均一, 部分视野可见细胞分裂, C 为 COL 阳性表达细胞, 多数细胞为 COL +, D 为 CD34 分子的表达呈强阳性

Fig.4 Immunocytochemical staining of 12 days cultured peripheral blood fibrocytes in vitro, Fig.4-A were 12 days cultured peripheral blood fibrocytes in vitro; Fig.4-B were stained-cell nucleus by DAPI; Fig.4-C were COL + cells; Fig.4-D show that CD34+ cells were strongly expressed

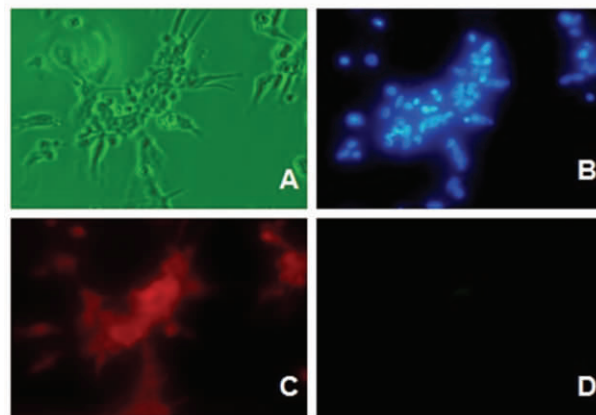


图 5 免疫荧光染色观察培养 28 天的外周血纤维细胞: A 为体外培养至 28 天的 PBFCs, B 为 DAPI 核染, 细胞核形态不均、多椭圆形核大, C 为 COL 的表达持续强阳性, 表达 COL + 的细胞在数量上已成为优势细胞, D 图中造血来源的标记 CD34 几无法显色, 说明 CD34+ 细胞显著减少

Fig.5 Immunocytochemical staining of 28 days cultured peripheral blood fibrocytes in vitro Fig.5-A were 28 days cultured peripheral blood fibrocytes in vitro; Fig.5-B were stained-cell nucleus by DAPI, which cell nucleus has different shape, Fig.5-C were COL + cells, which expressed strongly and continuously; Fig.5-D show that most CD34+ were lost which from hematopoietic sources

3 讨论

随着研究的不断深入, 人们逐渐认识到外周血纤维细胞(PBFCs)在组织损伤修复的各个环节发挥着重要作用^[7]。它不仅能够通过合成多种细胞因子、生长因子、趋化因子、波形蛋白、

像 T 细胞呈递抗原^[8]等方式参与到血管新生^[9]、抗原呈递等环节,还参与调控其他炎性细胞、内皮细胞、成纤维细胞^[10-12],同时,人们发现病理性瘢痕、硬皮病、肾源性系统纤维化的发生均与 PBFCs 有着密不可分的关系^[13-15]。

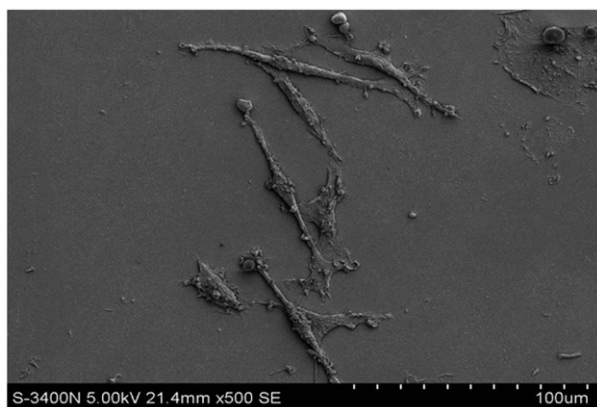


图 6 扫描电镜下观察体外培养至 14 天的外周血纤维细胞($\times 500$)

Fig.6 Peripheral blood fibrocytes examined by scanning electron microscope in vitro after 14 days($\times 500$)

由于从人外周血中分离得到的白细胞成分复杂,包括了单个核细胞、粒细胞、少量血小板和红细胞等,而少量粘附于贴壁细胞表面的淋巴细胞与能贴壁生长的外周血纤维细胞、单核细胞相互作用,影响 PBFCs 的生长分化,因此,目前就外周血纤维细胞的分离、纯化及培养尚无标准化的操作流程。有研究者报道了他们采用密度梯度离心法分离白细胞后,使用不同的培养器皿、血清浓度、首次换液时间等成功分离得到 PBFCs。

本研究发现细胞的接种密度差异对于细胞的生长分化有很大影响。如果外周血分离出来的细胞数量少、接种密度低,则难以分化出外周血纤维细胞,这说明细胞间的彼此接触和可能是 PBFCs 化的必要条件,但其具体机制还有待进一步研究。相反,如果接种密度过高虽然有利于加速细胞的分化进程,但由于缺乏充分的伸展、生长空间和大量淋巴细胞的存在,都会影响贴壁细胞像 PBFCs 分化。此外,在培养过程中过早、过频繁的更换培养液也不利于 PBFCs 生长分化,我们推测细胞间可能分泌释放某些因子促进细胞向 PBFCs 化,而过早、过频繁的换液可能降释放出的低相关因子浓度,破坏这种分化趋势。

众多研究认为在体外培养过程中 PBFC 逐渐丢失 CD34、CD45、CD14 等细胞表面标记,这些有着造血系统特点的前体细胞分化成有功能的纤维细胞,而胶原的表达则持续性增强,原来的单个核细胞越来越表现出成纤维细胞的特性^[16-18]。而在实验的培养过程中,随着 CD34 和 CD45 这两种细胞表面标记逐渐减弱,这些有着造血系统特点的前体细胞分化成有功能的成纤维细胞,并表达成纤维细胞的经典标志蛋白 COL 蛋白,通过免疫荧光染色观察培养至第 10 天与第 28 天细胞表面标记的表达情况,证实结果与目前的文献报道相一致。

在外周血纤维细胞的整个分化发育过程中,其他白细胞群的参与必不可少,而且这种参与作用可能不仅取决于其他细胞所分泌的细胞因子,而且离不开细胞间的相互接触。Riichihiro 的研究表明,T 细胞的细胞接触对 PBFCs 分化发育起到关键作

用,当 T 细胞与 CD14+ 细胞间的比例为 1:3 时,促进其分化作用的最为显著^[19]。

PBFCs 是骨髓造血干细胞来源的间充质细胞,通常以其前体细胞的形式存在于外周循环血液的 CD14+ 细胞中,有研究证明血管新生过程中的周细胞和成纤维细胞都起源于 PBFCs。在功能上,PBFCs 具有成纤维细胞的某些特点,如合成 ECM 蛋白及合成 α -SMA 直接收缩创面,同时又具有表达趋化因子受体、趋化因子等炎性细胞的特点^[20,21]。综合以上特点及其与周细胞分化的密切关系,可以认为 PBFCs 可能在血管新生、创伤修复中具有重要作用。成熟的外周血纤维细胞的分离培养方法的建立,将有助于了解 PBFCs 与其他细胞、胞外蛋白相互作用、相互影响的途径,揭示其在血管新生及创伤修复中分化、迁移、增殖、激活及功能转换的作用机制。

参考文献(References)

- [1] Xueyong L, Shaozong C, Wangzhou L, et al. Differentiation of Pericyte in Wound Healing: the precursor, the process, and the role of vascular endothelial cell[J]. Wound Repair Regen, 2008,16:346-355
- [2] Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair[J]. Molecular medicine Cambridge, Mass, 1994, 1(1):71-81
- [3] Mori L, Bellini A, Stacey MA, et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow[J]. Experimental cell research, 2005,304(1):81-90
- [4] Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors[J]. Keio J Med, 2007, 56(2):41-47
- [5] Metz CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing[J]. Cell Mol Life Sci, 2003,60(7):1342-1350
- [6] Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis [J]. J Clin Invest, 2004,114(3):438-446
- [7] Riichihiro Abe, Seamas CD, Tina P, et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites [J]. Journal of Immunology, 2003,166(12):7556-7562
- [8] Chesney J, Bacher M, Bender A, et al. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naïve T cells in situ[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94(12):6307-6312
- [9] 佐藤靖史.血管の発生[J].医学のあゆみ, 1999,191(5):305-309
Yasufumi Sato. The latest research on angiogenesis [J]. Progression of Medical, 1999,191(5):305-309
- [10] Veale DJ, Fearon U. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting [J]. Best practice & research, 2006, 20(5): 941-947
- [11] Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, et al. Angiogenesis assays: problems and pitfalls[J]. Cancer metastasis review, 2000, 19(1-2):167-172
- [12] Rouget C. Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques [J]. Arch Physiol Normale Pathol, 1873,5: 8-14
- [13] Cowper SE, Bucala R. Nephrogenic fibrosing dermatopathy: suspect identified Motive unclear[J]. American Journal of Dermatopathology, 2003,25(4):358-362
- [14] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? [J]. Nature reviews, 2007, 6(4): 273-286

(下转第 4204 页)

路的下游因子 Runx2 引导细胞向成骨成软骨方向发展,而 Osx 能最终诱导形成成骨细胞^[13]。因此三者都是成骨诱导过程中的关键转录调控因子,它们协同合作是控制细胞成骨分化的经典途径。大戟苷很可能也是通过这条途径抑制了 rMSC 的成骨分化。

总之,本研究首次发现大戟苷这种二萜类化合物对大鼠 MSC 成骨分化有明显抑制作用,可能可以应用于骨质增生等相关疾病的治疗,开辟了认识这类化合物的新途径,有利于更好地开发其资源。

参考文献(References)

- [1] Lu Z, Guan S, Li X, et al. Cytotoxic Diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71(5): 873-876
- [2] Chen H, Wang Z, Yang L. Analysis of euphornin in *Euphorbia helioscopia* L. and its cytotoxicity to mice lung adenocarcinoma cells (LA795) [J]. *Nat Prod Res*, 2011, doi:10.1080/14786419, 2011, 622275
- [3] Tao HW, Hao XJ, Liu PP, et al. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia helioscopia*[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(12): 1547-1551
- [4] 杨莉, 陈海霞, 高文远. 泽漆化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 575-577, 595
Yang Li, Chen Hai-xia, Gao Wen-yuan. Studies on the chemical constituents and its antitumor activities from *Euphorbia helioscopia* L[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2008, 20(4): 575-577, 595
- [5] Barla A, Birman H, Kultur S, et al. Secondary Metabolites from *Euphorbia helioscopia* and Their Vasodepressor Activity [J]. *Turk J Chem*, 2006, 30: 325-332
- [6] Corea G, Di Pietro A, Dumontet C, et al. Jatrophone diterpenes from *Euphorbia spp2* as modulators of multidrug resistance in cancer therapy[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2009, 8(2): 431
- [7] 李荣, 王珏, 吴慧星, 等. 猫眼草的抗氧化活性成分的分离鉴定与活性测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011(1): 25-29
Li Rong, Wang Jue, Wu Hui-xing, et al. Isolation, identification and activity determination on antioxidative components from whole plant of *Euphorbia lunulata* Bge[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2011(1): 25-29
- [8] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy[J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301-316
- [9] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): 247-256
- [10] 张蓓蓓, 戴源, 廖志新. 大戟属植物的化学成分及药理活性研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2010(1): 99-106
Zhang Bei-bei, Dai Yuan, Liao Zhi-xin. New evolve of chemical composition and pharmacological research of *Euphorbia* L[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)*, 2010(1): 99-106
- [11] Urist MR, Strates BS. Bone Morphogenetic Protein [J]. *J Dent Res*, 1971, 50(6): 1392-1406
- [12] Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells[J]. *Gene*, 2006, 366(1): 51-57
- [13] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29
- (上接第 4215 页)
- [15] Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, et al. Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2[J]. *BMC cell biology*, 2007, 8: 10-14
- [16] Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 217(2): 157-153
- [17] Yamagishi S, Imaizumi T. Pericyte biology and diseases[J]. *Int J Tissue React*, 2005, 27(3): 125-135
- [18] Mori L, Bellini A, Stacey MA, et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow[J]. *Experimental cell research*, 2005, 304(1): 81-90
- [19] Riichiro Abe, Seamas CD, Tina P, et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites [J]. *Journal of Immunology*, 2003, 166(12): 7556-7562
- [20] Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis[J]. *current opinion in oncology*, 2009, 21(1): 60-70
- [21] Roderick JP, Marie DB, Kurt H, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(3): 438-446