

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.003

大鼠肺微血管周细胞的体外培养及鉴定*

孙廉旭 王家伟 张 莎 曹 亮 王 文[△]

(空军军医大学西京医院中医科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 SD 大鼠肺微血管周细胞(rat pulmonary microvessel pericytes, RPMPC)的分离、培养与鉴定方法。**方法:**采用机械剪切、I 型胶原酶消化法和微孔过滤结合超高速离心法分离大鼠肺微血管片段,用含 15%胎牛血清(FBS)的高糖培养基(DMEM)进行培养,倒置显微镜观察原代 RPMPC 的形态及生长特性。免疫荧光法检测神经元-胶质抗原 2 (neuron-glia antigen 2, NG2), α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、结蛋白(desmin)和 CD31 相关抗原的表达,同时应用免疫细胞化学法检测血小板源性生长因子受体 β (PDGFR- β)的表达。CCK-8 测定周细胞生长曲线。通过周细胞-内皮细胞共培养成管实验检测细胞成管能力。**结果:**本方法培养获取的 RPMPC 纯度较高,并能连续传代。细胞 48 h 后爬出,呈长梭形、三角形等不规则形,8~10 d 细胞汇合,呈栅栏或漩涡状生长,无接触性抑制,前期可见有少量内皮细胞伴随生长,单核偶见双核,核呈卵圆形,胞浆丰富。PDGFR- β 、 α -SMA、NG2、desmin 染色阳性,CD31 阴性;周细胞与内皮细胞共培养形成管腔结构。**结论:**通过本方法能够获得纯度较高的肺微血管周细胞,且所获细胞具有周细胞的特性及功能。

关键词:肺微血管周细胞;原代培养;体外鉴定;大鼠

中图分类号:R-33; R329.2; Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)06-1014-06

Isolation and Identification of Pulmonary Microvessel Pericytes in Rats*

SUN Lian-xu, WANG Jia-wei, ZHANG Sha, CAO Liang, WANG Wen[△]

(Fourth Military Medical University, TCM department of xijing hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the isolation, culture and identification methods of rat pulmonary microvessel pericytes RPMPC in the lung of SD rats. **Methods:** Using mechanical shear, type I collagenase digestion and micropore filtration combined with ultra high speed centrifugation to separate the rat pulmonary microvascular fragments; using medium (DMEM) containing 15% fetal bovine serum (FBS) to culture the RPMPCs; and using inverted microscope to observe the morphology and growth characteristics of RPMPCs. Detecting the expression of neuron glia antigen 2 (NG2), alpha smooth muscle actin (α -SMA), desmin (desmin) and CD31 antigen by the immunofluorescent methods; Detecting the expression of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR- β) by immunocytochemistry. The growth curve of pericytes was determined by CCK-8. The tube formation ability of the cells was detected by coculture with pericytes and endothelial cells. **Results:** The purity of RPMPC was high and could be passaged continuously. RPMPCs climb out after 48 hours of separation, with the shape of fusiform, triangular and irregular form. After 8~10d, the cells converge and grow as a palisade or vortex, without contact inhibition. In the early stage, a few endothelial cells were found, which were mononuclear or binuclear and rich in cytoplasm. PDGFR- β , α -SMA, NG2 and desmin staining were positive, and CD31 staining was negative. The co culture of pericytes and endothelial cells leads to the formation of luminal structures. **Conclusion:** The pulmonary microvascular pericytes of higher purity can be obtained by this method, and the acquired cells have the characteristics and functions of pericytes.

Key words: Pulmonary microvascular pericytes; Primary culture; Identification; Rat

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2; Q813 **Document code:**A

ArticleID: 1673-6273(2018)06-1014-06

前言

周细胞是微血管的重要组成部分,在啮齿类动物的发育,体内微环境平衡,损伤的反应及损伤后恢复过程中起重要作用^[1,2]。肺微血管周细胞与肺的内外结构完整、功能正常具有紧密联系,其参与细胞外基质重组、微血管系统调控、维持血管壁结构的稳定、并在免疫系统中起前哨作用^[3]。经体外培养的肺微

血管周细胞具备体内周细胞的特性,可广泛用于肺血管壁的微血管病变^[3]、肺血管构型重建、肺急性损伤、纤维化、退行性病变及肿瘤的侵袭与转移等方面的研究。因此,获取纯度较高的肺微血管周细胞显得尤为关键。但目前国内外关于肺微血管原代培养的文献较少,总结前期获取肺微血管周细胞的方法主要存在两个问题:一是物理研磨造成微血管片段的损伤,降低细胞生存几率;二是选用不含血小板血清、周细胞专用培养基

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373845)

作者简介:孙廉旭,硕士研究生,研究方向:血管新生及缺血性心血管病的中医药防治, E-mail: slx132zlx@sina.com

[△] 通讯作者:王文,博士,副教授,主要研究方向:血管新生及缺血性心血管病的中医药防治研究, E-mail: jinzhou@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2017-09-18 接受日期:2017-10-17)

(PCM)、内皮细胞专用培养基(ECM),与常规 DMEM 分阶段培养,过程中容易出现污染,耗时较长,成本高昂。我们结合文献报道^[4-7]并改进分离及培养方法,利用大鼠肺微血管片段培养较高纯度的大鼠肺微血管周细胞(RPMPC),为进一步研究周细胞在微血管病变、肺急性损伤、退行性病变及肿瘤的侵袭与转移中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 SD 大鼠,清洁级,雄性,200-220 克,来源于空军军医大学动物实验中心。标准动物饲养房饲养。所有实验方案均获空军军医大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂和仪器

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),均购自美国 Hyclone 公司,青霉素-链霉素购自北京金全生物公司, I 型胶原酶、红细胞裂解液购自北京索莱宝生物公司,神经元-胶质抗原 2(neuron-glia antigen 2, NG2 ab129051)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA ab5694)、抗血小板源生长因子受体 (PDGFR- β ab32570)、结蛋白(Desmin ab32362)抗体均购自 Abcam 公司, CD31(GB13063)抗体购自谷来生物,山羊血清购自西安市壮志生物公司, CCK-8 试剂、DAPI 购自上海碧云天生物技术公司, CY3 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗、抗荧光淬灭封片剂购自谷来生物公司。眼科剪和镊子, CO₂ 细胞培养箱, 4℃ 离心机, 电控恒温水浴箱, 恒温震荡摇床, 倒置相差显微镜, 荧光显微镜。

1.3 SD 大鼠肺微血管周细胞(RPMPC)的分离和原代培养

SD 大鼠经 5% 水合氯醛溶液 (7 mL/kg) 进行腹腔注射麻醉, 75% 酒精消毒 3 遍, 移入超净台中并固定于动物手术台上, 打开腹腔, 用磷酸盐缓冲液(PBS)100 mL 经右心室进行灌注, 直至肺脏发白, 取下肺脏, 放入培养皿中; 用 PBS 冲洗 3 遍, 去除肺脏表面的脏胸膜、肺门处的主血管及较大的血管、支气管及其分支。取末梢肺组织剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小, 将组织块移入至 15 mL 离心管中, 并加入 5 mL I 型胶原酶消化液(用含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液配制而成, 终浓度为 2 mg/mL), 37℃ 震荡消化 1.5 h, 消化结束后 1000×g 离心 10 min, 弃上清, 加入 4 mL 高糖 DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清和青霉素 50 U/mL, 链霉素 50 μ g/mL)充分重悬; 1000×g 离心 10 min, 弃上清; 加入 3 mL 高糖 DMEM 培养基重悬, 经 100 μ m 不锈钢滤网过滤, 除去大组织块, 用 3 mL DMEM 培养基冲洗, 将悬液移入离心管中, 1000×g 离心 10 min, 弃上清; 在获得的小于 100 μ m 的微血管片段中加入 10 mL 红细胞裂解液重悬, 4℃ 放置 10 min; 1000×g 4℃ 离心 10 min, 移弃上清, 获得纯化的微血管片段; 加入 2 mL 高糖 DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清和青霉素 50 U/mL, 链霉素 50 μ g/mL)洗 2 次, 弃上清后重悬, 接种于 35 mm 细胞培养皿中, 置于 5% CO₂, 37℃, 湿度 95% 的细胞培养箱中培养。72 h 后首次更换培养基, 以后每 3 d 更换一次培养基, 8~10 d 后细胞基本汇合。原代培养 8~10 d 后细胞铺满约 80~90%, 加 PBS 洗 2 次, 再加胰蛋白酶和 EDTA 消化, 镜下观察, 待细胞壁出现皱缩, 细胞变圆即加入等

体积含血清培养基终止消化, 移入离心管并以 800 rpm, 离心 5 min, 弃除上清液, 加 2 mL 含 15% FBS 培养基重悬(前期我们对含 10%、15%、20% FBS, 3 个浓度的培养基进行了筛选, 发现 15% FBS 较 10% FBS 缩短原代周细胞生长周期, 20% FBS 与 15% FBS 相比未见明显差别, 遂选用 15% FBS), 接种至 T25 培养瓶中, 置于细胞培养箱中培养, 每 3 d 更换一次培养基。取第 5 代原代细胞用于细胞鉴定。

1.4 细胞鉴定

1.4.1 形态学观察 自接种开始至首次传代前, 应用倒置相差显微镜间断观察原代周细胞从微血管片段中爬出情况、细胞形态及增殖情况, 每隔 24 h 进行 1 次, 并拍照记录。

1.4.2 细胞免疫荧光鉴定 取第 5 代原代细胞, 正常消化, 接种至放有盖玻片的六孔细胞培养板中使细胞爬片, 至细胞近单层融合时, 进行免疫荧光染色实验。PBS 洗涤盖玻片 5 min×3 次; 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 5 min×3 次; 0.5% PBS-Triton-100 打孔 10 min, PBS 洗涤 5 min/次×3 次; 1% 山羊血清常温封闭 30 min, 弃山羊血清, PBS 洗涤 5 min/次×3 次; 分别加入一抗 α -SMA(1:500)、CD31(1:100)、Desmin(1:50)、NG2(1:50), 4℃ 孵育过夜; PBS 洗 5 min×3 次; 分别加荧光标记二抗, 避光, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 min×3 次, DAPI(100 μ g/mL)染色 15 min, PBS 洗涤 5 min×3 次; 抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察、拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 (IPP) 进行定量分析。

1.4.3 细胞免疫化学方法鉴定 取第 5 代原代细胞制备爬片。对细胞进行固定和打孔, 分别加入一抗 PDGFR- β 、CD31(1:100), 4℃ 孵育过夜; PBS 洗 3 min×5 次, 加入酶标二抗, 室温孵育 30 min, PBS 洗 3 min×5 次; 加 DAB 显色液 5 min, 自来水冲洗; 加苏木精染核 5 min, 自来水冲洗; 中性树胶封片。荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 cck-8 测定细胞生长曲线

取第 5 代原代细胞, 胰酶消化, 制成 2000 个/mL 的单细胞悬液, 接种于 96 孔板, 每孔加 100 μ L 细胞悬液, 每组设 5 个复孔, 共铺 9 块培养板, 置于 5% CO₂, 37℃ 细胞培养箱中培养, 于接种后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d 分别取出一块培养板(24 h 为间隔, 每组设 5 个复孔), 吸弃培养基, PBS 洗 3 min×2 次, 加用无血清培养基配置的 cck-8 溶液 100 μ L (含 cck-8 试剂 10 μ L), 37℃ 孵育 2 h, 酶标仪检测吸光值(450 nm)。

1.6 细胞功能评价

周细胞与内皮细胞共培养成管实验; ① 直接成管实验: HUVEC 与 RPMPC 按 1:5 比例直接接种于培养皿中, 镜下观察成管情况。② 基质胶成管实验: 48 孔培养板以每孔 100 μ L 基质胶包被, 37℃, 1 h 使胶凝固。将 HUVEC-cherry(红色荧光)于 RPMPC-GFP(绿色荧光)按 1:3 比例进行混合后接种, 每孔终体积 200 μ L, 每孔接种 3×10^5 个细胞, 6 h 观察成管情况。

1.7 统计学分析方法

实验数据用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行统计分析, 每张片子在镜下随机取 5 个视野, 测量细胞核数与阳性细胞数, 计算阳性细胞率(阳性细胞数/细胞核数)×100%, 结果数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 原代周细胞形态学观察

刚接种时显微镜下观察可见大量圆形,透明清亮的单个细胞和微血管片段(图 1A)。48h 后可见少量梭型及不规则型细胞爬出、贴壁生长,仍有圆形的红细胞悬浮生长(图 1B)。第 3 天首次更换培养基,去除微血管碎片和红细胞,剩下贴壁细胞继续

生长(图 1C)。每隔 3 d 更换一次培养基。4 d 后细胞逐渐增多,呈长梭形、三角形等不规则形状,以长梭形较为多见,核呈卵圆形,多居于细胞中央,多为单核,偶见双核,细胞有突起,呈栅栏或旋涡状生长,无接触抑制。原代细胞生长缓慢,8-10 d 细胞汇合(图 1D),符合传代要求,传代后细胞生长周期缩短。第 1 代至 10 代以内周细胞形态结构基本保持稳定(图 1E-K)。

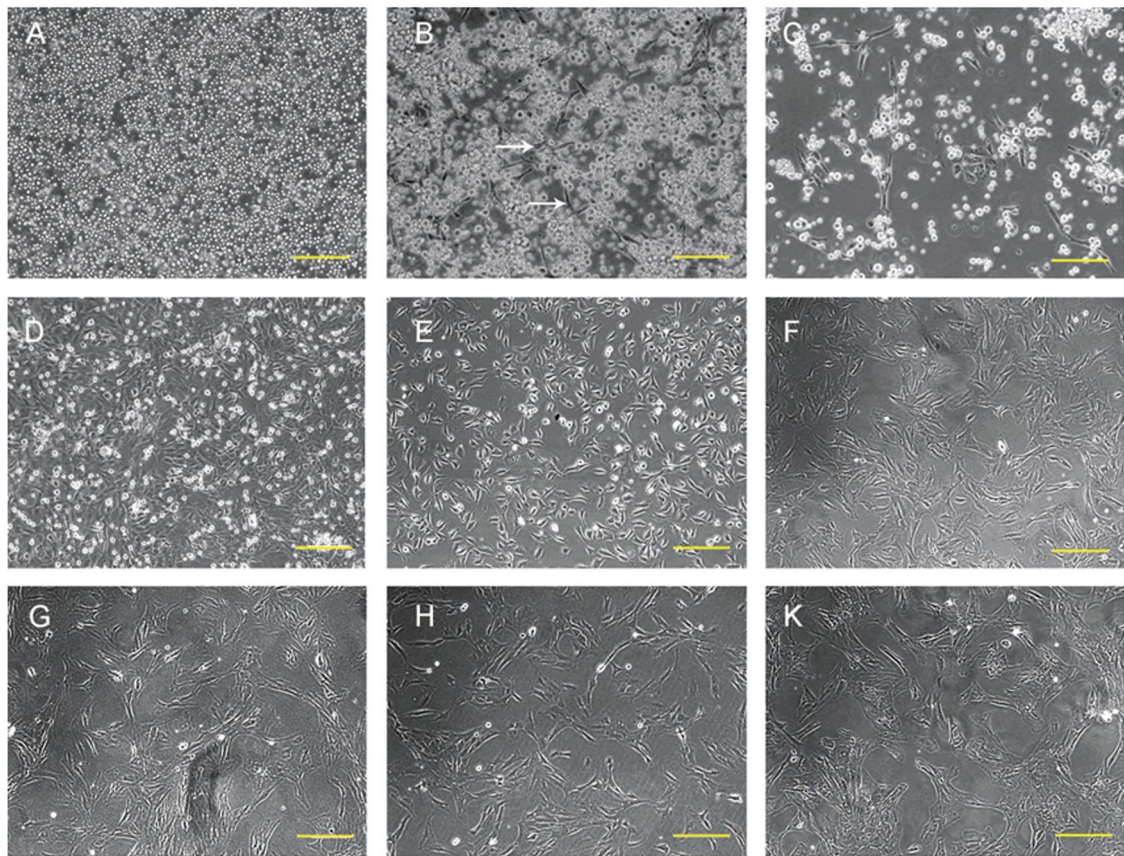


图 1 RPMPC 分离培养概况

Fig.1 Primary PMPCs of rat

A. Pulmonary capillary fragments at 0h; B. the cells migrated out from the microvessels at 48h; C. More cells migrated out with a few of contaminating cells at 72h; D. The cells reached confluence at 10d; E-K. The RPMPC will allow a more even distribution, and the passage cells form remained stable.

E. passage 1; F. passage 3; G. passage 5; H. passage 7; K. passage 10, Scale bar = 200 μm .

2.2 免疫荧光鉴定

取第 5 代原代细胞爬片进行免疫荧光鉴定,应用周细胞标记物 NG2、 α -SMA、Desmin 进行染色,可见其均呈阳性,为排除微血管内皮细胞污染应用内皮细胞特异性标记物 CD31 染色,结果呈阴性。测的结果显示,NG2 的阳性率为 $98.3\% \pm 0.8\%$, α -SMA 的阳性率为 $98.4\% \pm 0.2\%$, Desmin 的阳性率为 $96.5\% \pm 1.2\%$, CD31 的阳性率为 $0(n=5)$, (图 2)。

2.3 细胞免疫化学鉴定

取第 5 代原代细胞进行细胞免疫化学鉴定,可见 PDGFR- β (图 3 A),胞浆呈棕褐色,呈阳性。CD31 呈阴性(图 3 B)。表明分离获取的细胞无内皮细胞污染,纯度较高(图 3)。

2.4 RPMPC 生长规律

原代肺微血管周细胞为传代前生长较缓慢,8-10d 细胞基本汇合(图 4),传代后生长速度增快。

2.5 HUVEC 与 RPMPC 共培养成管

红色荧光标记的血管内皮细胞与绿色荧光标记的周细胞,以 1:3 比例接种于基质胶上进行共培养,6h 后观察到两种细胞聚合在一起,可见出芽及管腔结构形成(图 5 A、B);未标记荧光的内皮细胞与周细胞直接以 1:5 比例在未用基质胶包被的培养皿中进行共培养,4d 后观察到两种细胞聚合在一起形成网状管腔结构(图 5 C)。

3 讨论

微血管周细胞是 1873 年由 Rouget 首次发现并被称为 Rouget 细胞^[1],后在 1923 年由 Zimmermann 命名为周细胞(Pericyte, PC)。周细胞在体内分布广泛,几乎存在于所有组织、器官的微血管系统,在不同的器官中,微血管周围的周细胞覆盖范围有很大差异,在不同组织中其性质也有所不同。其核大,

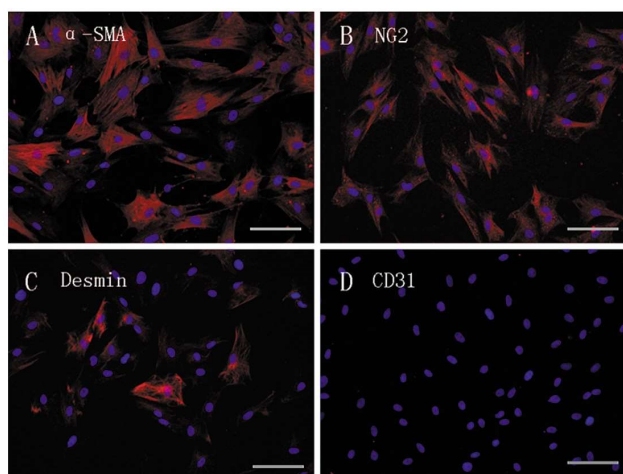


图2 细胞免疫荧光鉴定 RPMPC

Fig.2 Immunofluorescence assay to identify RPMPC

Passage 5 pericytes were identified by immunofluorescence for the pericyte marker α -SMA (A), NG2 (B), Desmin (C), the cells negatively expressed the CD31 (D); Scale bar = 100 μ m.

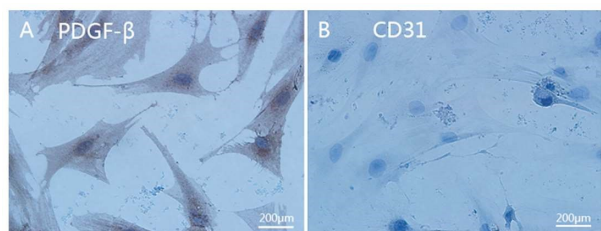


图3 细胞免疫化学鉴定 RPMPC

Fig. 3 Cyto-immunochemistry assay to identify RPMPC

Passage 5 pericytes were identified by immunocytochemistry for the pericyte marker PDGF R- β (A), the cells negatively expressed the CD31 (B). Scale bar = 200 μ m.

胞浆少,有多个细胞突起,沿微血管纵轴分布,这些突起常跨越多个内皮细胞,也会与相邻的微血管分支相连。微血管周细胞与内皮细胞共同存在与基底膜中,并形成多种直接连接形式,如紧密连接、间隙连接黏着斑和钉-槽复合体^[8]。微血管周细胞与内皮细胞不仅在解剖结构上联系密切,还能通过分泌或旁分泌信号产生重要的相互作用,如转换生长因子 β (TGF- β)、血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β)、血管生成素 1/Tie-2 等,它们对周细胞的生长发育、微血管渗透性、血管新生、肿瘤形成

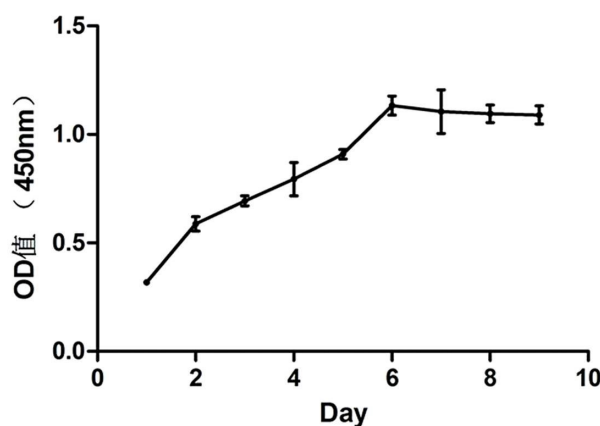


图4 RPMPC 生长曲线(CCK-8 法)

Fig. 4 RPMPC growth curve

等生理病理过程都具有重要调节作用^[9]。近年来微血管周细胞越来越多的受到关注,已作为研究微血管功能及相关疾病重要研究对象。有文献报道称周细胞与内皮细胞相互作用共同沉积与微血管基底膜并维持基底膜稳定,当周细胞与内皮细胞分离并分化为肌成纤维细胞时会导致微血管内平衡的丧失^[10-14]。周细胞能够感知血管活跃分子和神经递质,如 Ang-1, Ang-1 过度表达可以增加毛细血管直径,进而通过调节毛细血管直径来控制血流。有研究表明在炎症浸润过程中周细胞也起到重要作用,其通过自身形态变化,从而导致相邻细胞间的平均间隙大小发生变化,这些间隙位点在转移中性粒细胞与炎症因子 TNF 和 IL-1 的反应中被作为优先通道使用,这种作用似乎是通过直接刺激周细胞而产生的,因为在周细胞中发现 TNF 和 IL-1 受体的表达^[15,16]。在心血管病方面,血管周细胞在心脏中的含量非常丰富,它控制着重要的生理过程,如血管生成、血流量和血管通透性,周细胞的这种多效性的活动使其在再生医学领域的应用非常有前景;另一方面周细胞的功能障碍可能参与心血管疾病的发病机制,如动脉高血压、纤维钙化血管重建、心肌水肿和缺血后冠状动脉回流等,从治疗角度看,在小动物模型中进行的临床研究显示了周细胞移植的治疗潜力^[17-19]。众多文献报道表明周细胞具有调节血管直径、渗透压改变体内平衡,促血管生成、迁移,抗原提呈作用以及多能干细胞功能^[15,20,21],在肺血管壁的微血管病变、肺血管构型重建、肺急性损伤、纤维化、炎症、退行性病变,肿瘤的侵袭与转移,糖尿病视网膜病变,心血管疾病中的作用越来越受到关注^[1,5,20,22-24]。由此可见对周细

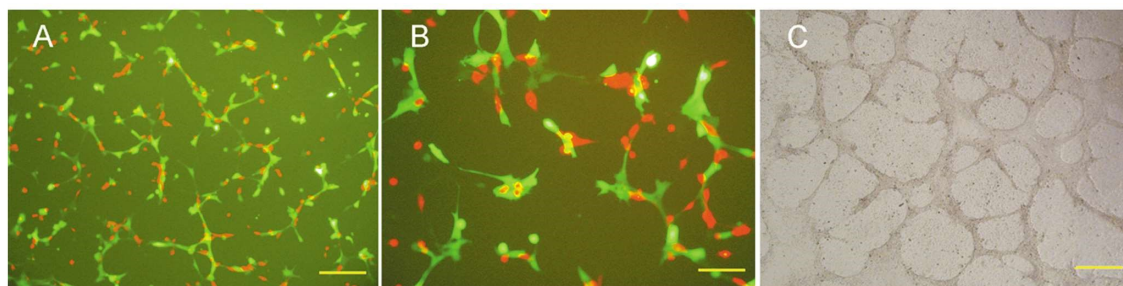


图5 HUVEC 与 RPMPC 共培养成管

Fig. 5 HUVECs and RPMRCs in co-culture

A~B. The red-labeled HUVEC and the green-labeled RPMPC were co-cultured in a 1:3 ratio in matrigel in DMEM +15%FBS for 6 hours; two kinds of cells in adsorption and form vessel-like structure; repeat the experiment 3 times; C. RPMPC and HUVEC were co-cultured in a 5:1 in DMEM+15%FBS for 4 day, RPMPC and HUVEC were mutual adsorption to form vessel-like structures. A($\times 100$), B($\times 200$), C($\times 100$)

细胞的功能研究对揭示其在微血管病变发病机制,及作为临床治疗的潜在重要靶点具有重大意义。因而建立简洁高效的获取微血管周细胞的方法的需求也显得尤为突出。

现阶段国内外关于肺微血管周细胞的分离报道较少,在视网膜微血管周细胞、脊髓微血管周细胞、脑微血管周细胞的分离稍多,其主要分离方法有机械匀浆结合酶消化法和免疫磁珠法分离法^[25-28],前者研磨力度及时间难以掌控,容易造成微血管的物理损伤,其分离的微血管片段活力差,不利于细胞爬出,细胞生存力弱;后者步骤较复杂、耗时较长,磁珠成本高,分离培养的效果不理想。本实验采用机械剪切,酶消化,筛网过滤,再经红细胞裂解液裂解后离心获得较纯的微血管片段。避免了研磨对微血管片段造成进一步的损伤,与前两种方法相比,该操作更简便,缩短了实验耗时,降低了成本,细胞易爬出,增加了细胞生存机率。通过微血管片段分离周细胞,主要面临问题是内皮细胞的污染,经反复摸索,发现延长自然纯化时间后细胞基本全部为周细胞,其原因为周细胞的生长过程中分泌 TGF- β 抑制内皮细胞生长^[22,29],进而促进周细胞纯化。

周细胞是一种多能性间质细胞,具有间充质干细胞的一些功能,并能向多种细胞分化,也有学者认为其是间充质干细胞的前体细胞^[1,20]。在体外培养能迅速分化^[30],同时也有学者认为其在传代过程中能保持一定的稳定性^[31],这为体外培养微血管周细胞提供了理论支撑。其常用表面标志物有 NG2、 α -SMA、Desmin、PDGFR- β ,上述标记物,依据于物种、组织以及发育的不同阶段表达会有所不同^[13,20,32],但 PDGFR- β 在健康的肺组织中持久存在^[1]。然而我们应该记住的是,周细胞不像内皮细胞可以通过特异性蛋白或基因的表达来识别,目前这些已知的标记物并没有一个是完全具有特异性的标记物,它们的表达是动态的,在发育的不同阶段,病理状态,体外培养等不同条件下其表达可能上调或下调^[32,33]。现阶段周细胞鉴定主要手段仍是依据形态学、同时联合应用多个标记物进行鉴定。本实验应用免疫荧光技术、免疫细胞化学法检测了 PDGFR- β 、NG2、 α -SMA、Desmin 呈阳性,CD31 呈阴性,结果显示周细胞的纯度稳定大于 95%,结合形态学特征,表明本方法成功的提取出纯度较高的微血管周细胞。研究发现在血管新生过程中周细胞依附包绕与内皮细胞,功能上调节内皮细胞的增生、血管的稳定、血管直径,二者相互作用,在血管出芽过程终发挥重要作用。成管实验结果显示,分离提取的 RPMPC 与血管内皮细胞共培养能够形成稳定的管腔结构,证明了本方法分离获得的细胞是具有完整功能的成熟周细胞。

综上所述,本研究建立了一种有效的,能广泛应用的分离和培养原代 RPMPC 的方法。具操作简便,成本节约,周期相对较短的特点。为进一步研究周细胞在生理、病理环境下的作用及其作用机制奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Barron L, Gharib S A, Duffield J S. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts [J]. The American Journal of Pathology, 2016, 186(10): 2519-2531
- [2] Karen K. Hirschi, Patricia A. D' Amore. Pericytes in the microvasculature [J]. Cardiovascular Research, 1996(32): 687-698
- [3] Sims D E. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease [J]. Can J Cardiol, 1991, 7(10): 431-443
- [4] Davies P, Smith B T, Maddalo F B, et al. Characteristics of lung pericytes in culture including their growth inhibition by endothelial substrate [J]. Microvasc Res, 1987, 33(3): 300-314
- [5] Speyer C L, Steffes C P, Ram J L. Effects of vasoactive mediators on the rat lung pericyte: quantitative analysis of contraction on collagen lattice matrices [J]. Microvasc Res, 1999, 57(2): 134-143
- [6] Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes [J]. Methods Mol Biol, 2011, 686: 49-68
- [7] 陈兵. 周细胞凋亡在肝肺综合征肺微血管扩张中的作用研究 [D]. 第三军医大学, 2014
Chen Bing. The role of pericytes apoptosis in microvascular dilatation in rat experimental hepatopulmonary syndrome [D]. Third Military Medical University, 2014
- [8] 俞晓燕, 赵玉武. 血管周细胞与间充质干细胞关系的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, (01): 85-88
Yu Xiao-yan, Zhao Yu-wu. Progress in correlation between pericytes and mesenchymal stem cell [J]. Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2014, (01): 85-88
- [9] 蒋福林, 艾冬青, 官秋玥. 周细胞概念及在血管形成信号转导通路研究中的进展 [J]. 中国组织工程研究, 2015, (46): 7504-7508
Jiang Fu-lin, Ai Dong-qing, Guan Qiu -yue. Pericyte-related signaling pathways in angiogenesis [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, (46): 7504-7508
- [10] Ricard N, Tu L, Le Hir M, et al. Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension [J]. Circulation, 2014, 129(15): 1586-1597
- [11] van Dijk C G, Nieuweboer F E, Pei J Y, et al. The complex mural cell: pericyte function in health and disease [J]. Int J Cardiol, 2015, 190: 75-89
- [12] Kloc M, Kubiak J Z, Li X C, et al. Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection [J]. Transplantation, 2015, 99(4): 658-667
- [13] Hung C, Linn G, Chow Y H, et al. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(7): 820-830
- [14] Stratman A N, Davis G E. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization [J]. Microsc Microanal, 2012, 18(1): 68-80
- [15] Probstl D, Voisin M B, Woodfin A, et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo [J]. J Exp Med, 2012, 209(6): 1219-1234
- [16] Pieper C, Galla H J. Ultra structure analysis of cell-cell interactions between pericytes and neutrophils in vitro [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445(1): 180-183
- [17] Avolio E, Madeddu P. Discovering cardiac pericyte biology: From physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease [J]. Vasc Pharmacol, 2016, 86: 53-63
- [18] Avolio E, Meloni M, Spencer H L, et al. Combined intramyocardial delivery of human pericytes and cardiac stem cells additively improves the healing of mouse infarcted hearts through stimulation of

- vascular and muscular repair[J]. *Circ Res*, 2015, 116(10): e81-e94
- [19] Katare R G, Madeddu P. Pericytes from human veins for treatment of myocardial ischemia[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, 23(3): 66-70
- [20] Kelly-Goss M R, Sweat R S, Stapor P C, et al. Targeting Pericytes for Angiogenic Therapies[J]. *Microcirculation*, 2014, 21(4): 345-357
- [21] Peppiatt C M, Howarth C, Mobbs P, et al. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes [J]. *Nature*, 2006, 443(7112): 700-704
- [22] McIlroy M, O'Rourke M, Mckeown S, et al. Pericytes influence endothelial cell growth characteristics: Role of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)[J]. *Cardiovascular Research*, 2006, 69(1): 207-217
- [23] Stratman A N, Schwindt A E, Malotte K M, et al. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization [J]. *Blood*, 2010, 116(22): 4720-4730
- [24] Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, et al. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy[J]. *EMBO J*, 2002, 21(8): 1939-1947
- [25] 刘洪雷. 免疫磁珠法原代纯化培养人视网膜微血管内皮细胞与周细胞及炎症与缺氧对其 PDGF-B/PDGFR- β 和 Ang-1/Tie2 表达的影响[D]. 第四军医大学, 2005
- Liu Hong-lei. Purified primary culture of human retinal microvessel endothelium and pericytes with magnetic beads and effects of inflammation and hypoxia on its expression of PDGF-B/PDGFR- β and Ang-1/Tie-2[D]. Forth Military Medical University, 2005
- [26] 苑晓晨, 武清斌, 李宏伟, 等. 小鼠脊髓微血管周细胞的体外培养及鉴定[J]. *基础医学与临床*, 2015, (05): 688-694
- Yuan Xiao-chen, Wu Qing-bin, Li Hong-wei, et al. Isolation and identification of mouse spinal cord microvessel pericytes in vitro[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2015, (05): 688-694
- [27] 袁永辉, 王林, 车东媛, 等. 新生大鼠肺微血管壁周细胞的培养方法及其生长特性[J]. *同济医科大学学报*, 2000, (03): 193-195
- Yuan Yong-hui, Wang Lin, Che Dong-yuan, et al. Culture Method for and Growth Characteristics of Pulmonary Microvascular Pericytes in Newborn Rats[J]. *Acta Univ Med Tongji*, 2000, (03): 193-195
- [28] 武清斌, 荆瀛黎, 苑晓晨, 等. Wistar 大鼠脑和脊髓微血管周细胞的分离、培养、鉴定及其功能差异的比较 [J]. *生物医学工程研究*, 2014, (01): 1-5
- Wu Qing-bin, Jin Ying-li, Yuan Xiao-chen, et al. Isolated, Cultivated, Identified and Comparison of Brain and Spinal Cord Microvascular Pericytes from Wistar Rats [J]. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2014, (01): 1-5
- [29] Alicia Orlidge, Patricia A, D' Amore. Inhibition of Capillary Endothelial Cell Growth by Pericytes and Smooth Muscle Cells[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1987, (105): 1455-1462
- [30] Dellavalle A, Sampaoli M, Tonlorenzi R, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3): 255-267
- [31] Helmbold P, Nayak R C, Marsch W C, et al. Isolation and in vitro characterization of human dermal microvascular pericytes [J]. *Microvasc Res*, 2001, 61(2): 160-165
- [32] Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(2): 193-215
- [33] van Dijk C G, Nieuweboer F E, Pei J Y, et al. The complex mural cell: pericyte function in health and disease [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 190: 75-89

(上接第 1136 页)

- [23] Eldin M T, Wagih K, Maher O. Study the pattern of bronchial asthma among outpatients clinic at Sohag and Akhmeem Chest Hospitals[J]. *Egyptian Journal of Chest Diseases & Tuberculosis*, 2015, 382(2): 313-323
- [24] Dong W F, Zhou X J, Hong J G. Efficacy and safety of montelukast in children with mild persistent asthma: a randomized double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Pediatrics*, 2011, 6(4): 245-249
- [25] Moeller A, Carlsen KH, Sly PD, et al. Monitoring asthma in childhood: lung function, bronchial responsiveness and inflammation [J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(136): 204-215
- [26] Martelli AG, Bianchi R, Boldrighini B, et al. Monitoring the hospital management of acute asthma: the Italian Pediatric Network experience[J]. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2016, 48(6): 228-232
- [27] Carpio-Pedroza JC, Vanghan G, del Rio-Navarro BE, et al. Participation of CD161 (+) and invariant natural killer T cells in pediatric asthma exacerbations[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2013, 34(1): 84-92
- [28] PLOS ONE Staff. Correction: Circulating Angiotensin-2 and Its Soluble Receptor Tie-2 Concentrations Are Related to Renal Function in Two Population-Based Cohorts [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (4): e0176477
- [29] Kim M, Allen B, Korhonen EA, et al. Opposing actions of angiotensin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3511-3525