

内皮祖细胞与骨折愈合：培养与移植中的问题

孟新民¹, 孙晓雷¹, 马剑雄¹, 马信龙² (¹天津市天津医院骨科研究所, 天津市 300211; ²天津市天津医院, 天津市 300211)

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 血供不足是骨不愈合和延迟愈合的主要原因, 前人研究表明伴随血管损伤的骨折患者骨折延迟愈合和不愈合的发生率较高。近年来, 由于血管内皮祖细胞具有良好的血管化能力, 越来越多的研究者开始对其进行研究。

2 文章增加的新信息: 基于大量的研究, 内皮祖细胞的血管化能力以及促进骨折愈合的能力已经被证明。对于临床来说, 使用内皮祖细胞进行大规模治疗仍然存在许多问题, 比如内皮祖细胞体外大量扩增的问题, 如何使用一个合适的方法分离培养内皮祖细胞并保证体内一定的安全性, 移植细胞数量的问题以及移植细胞所需要的支架材料的选择问题等。

3 临床应用的意义: 局部应用内皮祖细胞来治疗骨折延迟愈合、不愈合是可行的, 其应用前景相当广泛。

关键词:

干细胞; 移植; 内皮祖细胞; 血管形成; 骨折愈合; 间充质干细胞; 血管内皮生长因子; 促红细胞生成素

主题词:

内皮细胞; 间质干细胞; 血管内皮生长因子类; 血管生成诱导剂

基金资助:

天津市卫生局科技基金(2011KZ57); 天津市中医药管理局(13123)

摘要

背景: 近年来, 人们意识到血供可能是影响骨折愈合的一个因素, 基于内皮祖细胞具有良好的血管化能力, 将其应用于临床促进骨折愈合具有良好的应用前景。

目的: 介绍内皮祖细胞在骨折愈合中的研究情况。

方法: 以“内皮祖细胞、骨折、血管化、血管形成”为中文关键词, 以“endothelial progenitor cell, fracture, neovascularization, angiogenesis”为英文关键词, 采用计算机检索 1980 年 1 月至 2014 年 9 月 CNKI 数据库、万方数据库和 PubMed 数据库相关文章, 选择 48 篇内皮祖细胞与骨折愈合血管化相关的文章进行分析。

结果与结论: 大量的研究证明内皮祖细胞具有血管化能力以及促进骨折愈合的能力, 因此将内皮祖细胞应用于组织工程支架可能会增强支架在体内的存活率, 从而挽救一大部分骨折延迟愈合与不愈合患者。但是对于临床来说, 使用内皮祖细胞进行大规模治疗仍然存在许多问题, 如内皮祖细胞体外分离培养、扩增, 移植细胞数量以及移植细胞所需要的支架材料的选择等, 这些问题的解决依赖于更进一步的研究。

孟新民, 孙晓雷, 马剑雄, 马信龙. 内皮祖细胞与骨折愈合: 培养与移植中的问题[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7353-7357.

Endothelial progenitor cells in fracture healing: problems about culture and transplantation

Meng Xin-min¹, Sun Xiao-lei¹, Ma Jian-xiong¹, Ma Xin-long² (¹Institute of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; ²Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

Abstract

BACKGROUND: With the development of biochemistry and cell biology, fracture has being study deeper, blood supply has been known to be an important factor influencing the fracture healing. Endothelial progenitor cells with good ability of angiogenesis will have a good clinical prospect in fracture healing.

OBJECTIVE: To review the recent research of endothelial progenitor cells in fracture healing.

METHODS: A computer-based online search of CNKI, Wanfang, PubMed databases was performed to collect articles published between 1980 and 2014 with the key words “endothelial progenitor cell, fracture, neovascularization, angiogenesis” in Chinese and English. A total of 48 articles addressing endothelial progenitor cell for angiogenesis in fracture healing were included in result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Increasing evidence has shown that endothelial progenitor cells have great ability of neovascularization and angiogenesis. Endothelial progenitor cells used in tissue engineering scaffolds can promote the survival rate of scaffolds *in vivo*, which is appropriate to a great part of delayed union and nonunion patients. However, the large-scale treatment with endothelial progenitor cells still has many problems, such as isolation, culture and amplification of endothelial progenitor cells *in vitro*, the number of transplanted cells and selection of scaffolds for transplanted cells, which need further research.

孟新民, 男, 1990 年生, 山西省介休市人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 主要从事骨科相关基础研究。

通讯作者: 马信龙, 天津市天津医院, 天津市 300211

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.025
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)45-07353-05
稿件接受: 2014-10-25

Meng Xin-min, Studying for master's degree, Institute of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Corresponding author: Ma Xin-long, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Accepted: 2014-10-25

Subject headings: endothelial cells; mesenchymal stem cells; vascular endothelial growth factors; angiogenesis inducing agents

Funding: the Science and Technology Fund of Tianjin Health Bureau, No. 2011KZ57; the Project of Tianjin Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 13123

Meng XM, Sun XL, Ma JX, Ma XL. Endothelial progenitor cells in fracture healing: problems about culture and transplantation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7353-7357.

0 引言 Introduction

骨具有再生和修复能力^[1], 其独特的再生过程需要成骨和成血管的相互配合^[2]。骨折愈合是最常见的骨再生修复形式^[1]。尽管骨再生可以通过自身形成微小骨痂来完成, 仍然有一部分骨折难以愈合^[3]。

近年来, 由于血管内皮祖细胞具有良好的血管化能力^[4-5], 越来越多的研究者开始对其进行研究。血管内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞, 是出生后机体主要的血管形成干/祖细胞类型^[6], 在1997年被Asahara等^[7]在*Science*杂志上首次报道。大量的实验研究表明, 血管内皮祖细胞在治疗血管损伤性疾病中表现出了良好的应用前景^[8-9], 但是其促血管化的机制还没有明确^[10], 本文就内皮祖细胞在骨折愈合方面的研究进展做一综述。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 以“内皮祖细胞、骨折、血管化、血管形成”为中文关键词, 以“endothelial progenitor cell, fracture, neovascularization, angiogenesis”为英文关键词, 采用计算机检索1980年1月至2014年9月CNKI数据库, 万方数据库和PubMed数据库相关文章。

1.2 资料筛选及评价

纳入标准: 涉及内皮祖细胞的鉴定及其与骨折愈合相关的文章。

排除标准: ①综述、社论、评论、书信、摘要、会议论文、科技成果、短篇报道、报刊文章等非正规一次文献。②中文数据库中的英文文献。③重复文献。④不符合本次研究目的的文献。

1.3 资料提取与文献质量评价 共检索到英文文献111篇, 中文文献12篇, 最后纳入48篇。

2 结果 Results

2.1 骨折愈合的血供 早在1763年, 就有人提出血管对于骨的再生和修复有极为重要的作用^[11]。骨折位点的血管生长在骨折后骨再生和愈合过程中扮演一个很重要的角色^[12-13]。新鲜血液把氧气和营养物质运送给新陈代谢活跃的愈伤组织, 并且作为炎症细胞、软骨细胞、骨祖细胞到达损伤处的通道^[2,14]。血供不足是骨不愈合和延迟愈合的主要原因^[15], 前人研究表明伴随血管损伤的骨折患者骨折延迟愈合和不愈合的发生率高达46%^[16]。

2.2 内皮祖细胞

2.2.1 内皮祖细胞的起源及鉴定 在胚胎发育早期, 血

液血管系统的形成是胚胎进一步发育的前提。胚胎时期血管的形成有两种相延续的方式: ①血管发生(vasculogenesis), 即由中胚层衍生的血管母细胞迁移、聚集、分化在原位形成大小相同的原始毛细血管网^[17]。②血管新生(angiogenesis), 即在原先存在的血管基础上血管内皮细胞增殖、迁移并重塑形成新的成熟血管^[18]。最新的研究发现这种过程也可以发生在成熟生物体内。

1997年, Asahara等^[7]首次证明出生后循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 作者把这些细胞称为内皮祖细胞。在后来的文献中有大量关于这类细胞起源和表面标记的描述^[19], 现普遍认为, 内皮祖细胞与造血干细胞共同起源于胚胎期胚外中胚层的血岛, 两者来源于同一前体细胞, 即血液血管母细胞。内皮祖细胞可以被定义为一类骨髓来源的拥有分化成内皮细胞潜力的能够促进新血管形成的一类细胞, 可以从骨髓中动员向外周血并且种植到靶器官如肝脏、脾脏、心脏、肌肉以及脂肪组织^[20]。

Yoo等^[4]研究发现, 人牙髓细胞在体外可以诱导为CD34⁺的细胞, 并且具有血管化能力, 他们使用小鼠后肢缺血模型和心肌梗死模型进行了验证, 发现由人牙髓细胞诱导分化来的内皮祖细胞很好地整合进新生血管中, 并且通过直接或间接旁分泌作用诱导新生血管的形成。

早期的研究发现, 内皮祖细胞表面表达造血干细胞标志物CD34与内皮细胞标志蛋白血管内皮生长因子受体2(VEGFR2, 即KDR)^[21]。由于CD34在造血干细胞表面和成熟的内皮细胞上都有不同程度的表达, 因此对于内皮祖细胞而言CD34并不具有特异性^[22]。Gehling等^[23]发现, 纯化的CD133阳性祖细胞可以在体外分化为成熟的内皮细胞, 而进一步研究发现, CD133是早期造血干细胞上一种高度保守的抗原标志物, 在成熟的内皮细胞上并不表达, 可以此与内皮细胞相鉴别。因此, 内皮祖细胞既可以表达早期造血干细胞的标志CD34与CD133, 同时又可以表达内皮细胞上的表面标志物VEGFR2。

但是对于内皮祖细胞表面标记物的特异性鉴定仍然存在很大的争议^[24]。现在比较公认的是内皮祖细胞能够来源于骨髓^[21], 并且CD133/VEGFR2阳性的细胞可以被看做具有内皮祖细胞功能的细胞群。今后的研究重点应该明确内皮祖细胞的鉴定, 使之标准化、规范化, 以便在临床、科研中有一个共同的研究标准^[25-26]。

2.2.2 内皮祖细胞的动员和趋化作用 骨髓中干细胞的动员决定于局部微环境的变化, 包括成纤维细胞、成骨细胞和内皮细胞^[27]。文献报道缺血可以上调血管内皮生长因子和基质细胞衍生因子1的表达^[28], 并且会通过基质金属蛋白酶9依赖的机制反过来抑制内皮祖细胞和基质细胞的相互作用, 从而使内皮祖细胞从骨髓动员向外周血^[29]。

2.2.3 内皮祖细胞与一氧化氮、血管内皮生长因子、促红细胞生成素的作用 从20世纪60年代开始, 有大量研究证明细胞因子在血管生成和骨愈合中扮演着很重要的角色, 例如一氧化氮、血管内皮生长因子和促红细胞生成素等^[30-32]。

一氧化氮, 即内皮来源血管舒张因子, 在血管内皮平滑肌的舒张作用中起调控作用, 从而引起平滑肌舒张, 血流量上升^[33]。内皮型一氧化氮合酶具有合成一氧化氮来调节血管张力、抑制平滑肌收缩和血小板聚集的作用。研究表明, 基质金属蛋白酶9可以被一氧化氮激活, 并且参与内皮祖细胞从骨髓向外周血的动员^[34]。因此, 内皮型一氧化氮合酶缺陷可能不利于内皮祖细胞从骨髓动员, 从而影响缺血环境下的血管再生。

血管内皮生长因子是一种在新血管形成中起重要作用的信号蛋白, 能够穿透血管壁, 并且可能具有促进内皮细胞增殖、分化、成熟并抑制内皮细胞凋亡的作用。此外, 它也可能具有其他的功能例如诱导血管平滑肌细胞迁移、促进基质金属蛋白酶的合成和分泌、诱导炎症因子的趋化作用, 从而促进新生毛细血管的形成。研究表明, 血管内皮生长因子在促进内皮祖细胞的分化和成熟中有重要的作用^[35]。

促红细胞生成素: 是一种调控红细胞生成的糖蛋白激素, 研究表明, 促红细胞生成素可以促进内皮细胞有丝分裂, 增强缺血组织的成血管作用^[36]。此外, 促红细胞生成素和血管内皮生长因子在血管形成中同等重要, 在对内皮细胞成血管潜力的作用中表现相似。

2.2.4 内皮祖细胞与血管再生 内皮祖细胞在血管形成中起着重要的作用, 并且具有增殖、分化成内皮细胞的能力, 这使得它们成为一种理想的选择来治疗血管相关性疾病, 现在的技术已经可以通过体外扩增内皮祖细胞并移植到缺血部位来实现。例如, 有研究表明, 使用外周血来源的内皮祖细胞、骨髓单个核细胞或者纯化的CD34(+)细胞进行灌注治疗, 可以增强血管再生能力、修复心肌功能^[8]。

2.3 内皮祖细胞与骨折愈合 血管新生需要一系列复杂的生物过程。Ma等^[37]通过检测不同时间点24例长骨骨折患者外周血中内皮祖细胞的含量发现, 创伤性骨折患者外周血中内皮祖细胞的含量明显高于同年龄同性别的健康人群, 并且在伤后3 d达高峰; 不同性别与不同创伤严重性之间差异无显著性意义; 但是在年轻患者中

早期内皮祖细胞的含量高于老年患者。说明创伤可能会诱导内皮祖细胞动员向外周血, 而外周血内皮祖细胞的升高可能会促进新生血管形成并促进骨折愈合。

Li等^[38]将接种有内皮祖细胞的明胶海绵支架移植入F344大鼠部分骨缺损模型体内, 第10周内皮祖细胞治疗组所有7只大鼠骨折愈合良好, 而对照组出现了骨折不愈合的缺陷。Micro-CT分析证明了这一点, 生化检测发现内皮祖细胞治疗组的骨抗扭强度和刚度都明显高于对照组。这个实验说明内皮祖细胞治疗可以明显强化骨折愈合, 增强骨再生。

也有人研究内皮祖细胞在体内的分布问题。Lee等^[39]研究了牵拉骨形成和骨折愈合中内皮祖细胞的比例变化, 研究动员的内皮祖细胞是否能够迁移到骨再生位点参与新生血管形成。作者在研究中使用了鼠胫骨骨折和牵拉骨形成模型, 相对于非手术对照组, 骨折组外周血内皮祖细胞水平在骨折后3 d增加了将近7倍。在牵拉骨形成模型中, 内皮祖细胞比例在截骨术后3 d明显上升, 随后逐渐下降到基础水平。有趣的是, 相对于截骨术后不进行牵拉固定的组别来说, 牵拉骨形成组内皮祖细胞数量在牵拉和固定期明显增多。作者发现牵拉期近截骨间隙的相对血流会增加, 并一直持续到牵拉期结束, 而且在固定期达峰值。作为这个研究的一部分, 体外扩增并标记的内皮祖细胞经静脉被移植入牵拉骨形成动物模型中来研究这些细胞的作用。研究发现移植的细胞首先在脾脏富集, 这种现象产生的原因可能与脾脏的免疫功能有关。Lee等指出, 尽管在骨再生位点只有少量移植细胞, 他们仍观察到移植细胞数与牵拉间隙细胞数有明显的数量依赖关系, 同时在对侧非手术胫骨中并没有检测到标记的内皮祖细胞。

有没有什么方法可以促进内皮祖细胞在骨再生位点的归巢呢? Sun等^[40]使用大鼠后肢缺血模型以及股骨骨折模型研究发现, 岩藻糖基化可以促进路易斯蛋白(SLex)在内皮祖细胞的表达, 从而增加缺血位点内皮祖细胞的归巢, 增强缺血部位血流量和血管化水平。路易斯蛋白是选择蛋白(selectin)的一种, 在介导的细胞相互作用中相当重要, 可以促进细胞的迁移和趋化^[41]。

近3年来, 关于内皮祖细胞与骨折愈合的研究逐渐由动物转向人, 逐渐向其促血管、促进骨形成的机制进行深入研究, 甚至出现了临床应用细胞进行治疗的案例。Kuroda等^[42]报道了第1例接受自体来源的、通过粒细胞集落刺激因子动员的CD34⁺细胞来治疗胫骨骨折不愈合的病例, 3D-CT检查发现术后3个月患者骨折愈合, 此时患者已经可以完全负重并且没有任何不适。Fukui等^[43]的研究发现CD34⁺细胞比人外周血单个核细胞具有更优良的成血管能力。

2.4 内皮祖细胞与间充质干细胞相互作用 随着内皮祖细胞生物学和其作用机制的研究越来越深入, 有一些证据

表明这些细胞具有促血管化和促成骨两方面的作用, 分别影响内皮细胞和成骨细胞的分化过程。此外, 内皮祖细胞还可以通过旁分泌的作用释放生长因子和细胞因子来促进血管化和成骨作用。

Li等^[44]将种植有内皮祖细胞的明胶海绵支架植入骨缺损大鼠体内, 结果发现, 第10周内皮祖细胞移植组大鼠骨折完全愈合, 而对照组出现骨不愈合情况, 骨形态发生蛋白2 mRNA表达量在第1, 2, 3周都明显高于对照组, 并且在第1周达峰, 随后逐渐下降, 第10周已经与对照组没有差异。这个结果的出现, 可能会对进一步理解内皮祖细胞促进骨愈合的机制有所帮助。Kaigler等^[45]发现将内皮祖细胞与间充质干细胞在体外进行接触式共培养, 可以显著增强间充质干细胞的成骨分化能力, 而调控机制可能是由于内皮祖细胞分泌产生骨形态发生蛋白2促进间充质干细胞向成骨方向分化。Raida等^[46]也通过实验进一步证实, 骨形态发生蛋白2是内皮祖细胞与间充质干细胞两者之间进行Cross-talk的重要“信使”。

最近还有研究表明外周血来源的内皮祖细胞在间充质干细胞作用下可以促进成骨分化, 间充质干细胞可以促进内皮祖细胞增殖并在内皮祖细胞网中起固定作用^[47]。Aguirre等^[48]研究了体外共培养体系中骨髓来源内皮祖细胞和间充质干细胞之间的物理、生化作用。数据表明, 骨髓来源内皮祖细胞和间充质干细胞之间通过旁分泌作用和直接的细胞接触机制进行相互作用, 并共同作用于血管化反应。作者指出这两种细胞之间的相互作用可能会增强骨折点的骨愈合。

尽管内皮祖细胞与间充质干细胞之间的作用机制还需要进一步阐明, 但毫无疑问这些研究的出现为联合使用内皮祖细胞与间充质干细胞促进骨愈合提供了依据, 也为今后组织工程应用提供了一个新的方向。

3 问题与展望 Problems and prospects

内皮祖细胞之所以能引起研究者的注意, 就是因为它具有良好的血管形成能力, 而血管化是所有组织工程材料大量进入临床所必须解决的问题。基于大量的研究, 内皮祖细胞的血管化能力以及促进骨折愈合的能力已经被证明^[8-9, 38], 因此将内皮祖细胞应用于组织工程支架可能会增强支架在体内的存活率, 从而挽救一大部分骨折延迟愈合与不愈合患者。

对于临床来说, 使用内皮祖细胞进行大规模治疗仍然存在许多问题, 比如内皮祖细胞体外大量扩增的问题, 如何使用一个合适的方法分离培养内皮祖细胞并保证活体内一定的安全性, 移植细胞数量的问题以及移植细胞所需要的支架材料的选择问题等等。这些问题的解决依赖于更进一步的研究。

致谢: 感谢天津市天津医院骨科研究所生物力学研究室马

剑雄老师、孙晓雷老师的指导, 感谢天津市天津医院骨科研究所、天津市天津医院的大力支持。

作者贡献: 第一作者构思并设计本综述, 收集和分析相关资料, 孙晓雷审校, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 内皮祖细胞-为血管内皮细胞的前体细胞, 是出生后机体主要的血管形成干/祖细胞类型, 在1997年被Asahara等在*Science*杂志上首次报道。大量的实验研究表明, 血管内皮祖细胞具有良好的促血管形成能力, 目前其促血管化的机制还没有明确。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Einhorn TA, Lee CA. Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9(3):157-165.
- [2] Segar CE, Ogle ME, Botchwey EA. Regulation of angiogenesis and bone regeneration with natural and synthetic small molecules. *Curr Pharm Des.* 2013;19(19): 3403-3419.
- [3] Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury.* 2008;39 Suppl 2:S45-57.
- [4] Yoo CH, Na HJ, Lee DS, et al. Endothelial progenitor cells from human dental pulp-derived iPS cells as a therapeutic target for ischemic vascular diseases. *Biomaterials.* 2013;34(33): 8149-8160.
- [5] Zhang S, Ma X, Yao K, et al. Combination of CD34-positive cell subsets with infarcted myocardium-like matrix stiffness: a potential solution to cell-based cardiac repair. *J Cell Mol Med.* 2014;18(6):1236-1238.
- [6] Doyle B, Metharom P, Caplice NM. Endothelial progenitor cells. *Endothelium.* 2006;13(6):403-410.
- [7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275(5302):964-967.
- [8] Li T, Ma Q, Ning M, et al. Cotransplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in a rabbit model of myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2014;387(1-2):91-100.
- [9] Zhang S, An Q, Li Q, et al. Therapeutic benefit of bone marrow-derived endothelial progenitor cell transplantation after experimental aneurysm embolization with coil in rats. *PLoS One.* 2014;9(2):e90069.
- [10] Kanzler I, Tuchscheerer N, Steffens G, et al. Differential roles of angiogenic chemokines in endothelial progenitor cell-induced angiogenesis. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(1): 310.
- [11] Haller A. Experimentorum de ossium formatione. *Opera Minora.* 1763;2:400.
- [12] Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003;8(21):980-989.
- [13] Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S82-89.

- [14] Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, et al. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011;42(6):556-561.
- [15] Yamagiwa H, Endo N. Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing. *Clin Calcium*. 2009;19(5):627-633.
- [16] Dickson KF, Katzman S, Paiement G. The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures. *Contemp Orthop*. 1995;30(6):489-493.
- [17] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
- [18] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626): 671-674.
- [19] George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, et al. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol*. 2011;4:24.
- [20] Alev C, Li M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(4):949-965.
- [21] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109(3):337-346.
- [22] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95(4):343-353.
- [23] Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95(10):3106-3112.
- [24] Yoder MC, Ingram DA. Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neoangiogenesis in the murine system. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(4):269-273.
- [25] Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, et al. Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. 2008;26(3):819-830.
- [26] Bompais H, Chagraoui J, Canron X, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103(7):2577-2584.
- [27] Mund JA, Ingram DA, Yoder MC, et al. Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies. *Cytotherapy*. 2009;11(2):103-113.
- [28] Lassaletta AD, Elmadhun NY, Burgess TA, et al. Microvascular notch signaling is upregulated in response to vascular endothelial growth factor and chronic myocardial ischemia. *Circ J*. 2014;78(3):743-751.
- [29] Morancho A, Hernández-Guillamon M, Boada C, et al. Cerebral ischaemia and matrix metalloproteinase-9 modulate the angiogenic function of early and late outgrowth endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17(12): 1543-1553.
- [30] Geiger F, Bertram H, Berger I, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res*. 2005;20(11):2028-2035.
- [31] Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, et al. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci*. 2007;80(10):893-900.
- [32] Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, et al. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res*. 2009;27(1):8-14.
- [33] Segal MS, Sautina L, Li S, et al. Relaxin increases human endothelial progenitor cell NO and migration and vasculogenesis in mice. *Blood*. 2012;119(2):629-636.
- [34] Huang PH, Chen YH, Wang CH, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1179-1184.
- [35] Li R, Nauth A, Li C, et al. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):689-692.
- [36] Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, et al. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective. *Int J Cardiol*. 2014;171(2):116-125.
- [37] Ma XL, Sun XL, Wan CY, et al. Significance of circulating endothelial progenitor cells in patients with fracture healing process. *J Orthop Res*. 2012;30(11):1860-1866.
- [38] Li R, Atesok K, Nauth A, et al. Endothelial progenitor cells for fracture healing: a microcomputed tomography and biomechanical analysis. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):467-471.
- [39] Lee DY, Cho TJ, Kim JA, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*. 2008;42(5):932-941.
- [40] Sun S, Liu Z, Zhou H, et al. The role of fucosylation in the promotion of endothelial progenitor cells in neovascularization and bone repair. *Biomaterials*. 2014;35(12):3777-3785.
- [41] Zarbock A, Ley K, McEver RP, et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*. 2011;118(26): 6743-6751.
- [42] Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, et al. Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant*. 2011;20(9): 1491-1496.
- [43] Fukui T, Mifune Y, Matsumoto T, et al. Superior Potential of CD34-Positive Cells Compared to Total Mononuclear Cells for Healing of Nonunion Following Bone Fracture. *Cell Transplant*. 2014 May 2. [Epub ahead of print]
- [44] Li R, Nauth A, Gandhi R, et al. BMP-2 mRNA expression after endothelial progenitor cell therapy for fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2014;28 Suppl 1:S24-27.
- [45] Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, et al. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J*. 2005;19(6):665-667.
- [46] Raida M, Heymann AC, Günther C, et al. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med*. 2006;18(4):735-739.
- [47] Fedorovich NE, Haverslag RT, Dhert WJ, et al. The role of endothelial progenitor cells in prevascularized bone tissue engineering: development of heterogeneous constructs. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(7):2355-2367.
- [48] Aguirre A, Planell JA, Engel E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400(2): 284-291.