

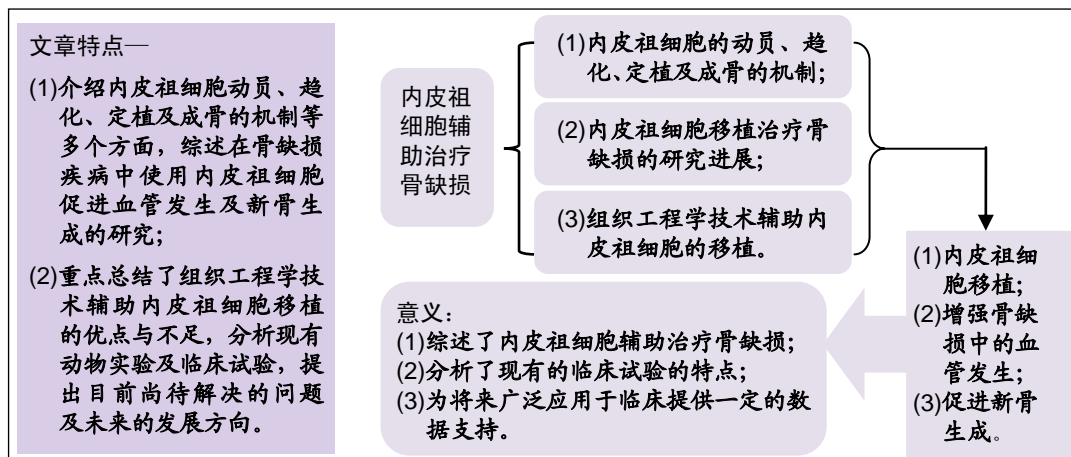
# 内皮祖细胞促进血管发生及新骨生成辅助治疗骨缺损

冯源<sup>1,2,3,4</sup>, 韩志琪<sup>1,2,3,4</sup>, 周诺<sup>1,2,3,4</sup> (1广西医科大学口腔医学院/附属口腔医院, 广西壮族自治区南宁市 530021; 2广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室, 广西壮族自治区南宁市 530021; 3广西颅颌面畸形临床医学研究中心, 广西壮族自治区南宁市 530021; 4颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室), 广西壮族自治区南宁市 530021)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2092

ORCID: 0000-0001-5481-3865(冯源)

文章快速阅读:



冯源, 女, 1994年生, 新疆维吾尔自治区博乐市人, 汉族, 广西医科大学附属口腔医院在读硕士, 主要从事颌骨牵张成骨机制的研究。

通讯作者: 周诺, 博士, 教授, 博士生导师, 广西医科大学口腔医学院/附属口腔医院, 广西壮族自治区南宁市 530021; 广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室, 广西壮族自治区南宁市 530021; 广西颅颌面畸形临床医学研究中心, 广西壮族自治区南宁市 530021; 颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室), 广西壮族自治区南宁市 530021

文献标识码:A

投稿日期: 2019-12-02

送审日期: 2019-12-06

采用日期: 2020-01-22

在线日期: 2020-03-25



文题释义:

**内皮祖细胞:** 是血管内皮细胞的前体细胞, 可在生理或病理因素刺激下, 从骨髓动员到外周血参与损伤血管的修复, 在血管内皮再生中发挥着重要作用。

**血管发生:** 在胚胎发育时从中胚层起始, 由成血管细胞发育成血管内皮细胞并最终形成血管的过程, 这是血管“从无到有”的一个生物学过程。

摘要

**背景:** 骨折是临床常见的骨科疾病, 虽然大多数骨折可以通过坚强内固定等手术治疗实现一期愈合, 但仍有相当比例的骨折愈合不良, 最终导致骨缺损, 而骨缺损部位的血管新生对骨缺损的修复起到至关重要的作用。基于内皮祖细胞促进组织血管发生的能力, 其对骨再生和修复的辅助作用逐渐成为学界关注的焦点。

**目的:** 综述骨缺损疾病中使用内皮祖细胞促进血管发生及新骨生成的研究进展。

**方法:** 遵循 PRISMA 指南, 检索 CNKI、万方数据库和 PubMed 数据库 1986 至 2019 年期间关于内皮祖细胞辅助治疗骨缺损的动物实验、临床试验及其机制的文章, 检索词分别为“内皮祖细胞, 血管生成, 血管发生, 治疗, 骨缺损”“endothelial progenitor cells (EPCs), angiogenesis, vasculogenesis, therapy/treatment, bone defect”, 最后选择 58 篇文章纳入结果分析。

**结果与结论:** ①骨缺损时可以促进内皮祖细胞的激活与归巢; ②内皮祖细胞可以促进血管发生; ③内皮祖细胞是通过促进血管发生进而促进骨再生的; ④将内皮祖细胞辅助治疗骨缺损推广至临床应用目前尚存在一些问题有待解决; ⑤需要通过进行更多的临床试验, 并且进一步深入研究内皮祖细胞参与血管发生的确切机制, 为将来的临床应用提供数据支持, 给大量骨缺损致残患者带来更好的治疗。

关键词:

内皮祖细胞; 骨缺损; 干细胞移植; 组织工程技术; 血管发生; 骨生成

中图分类号: R459.9; R394.2; R782.4

基金资助:

国家自然科学基金(81870748), 项目负责人: 周诺; 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201538), 项目负责人: 周诺; 广西医疗卫生重点科研课题(桂卫重 200525), 项目负责人: 周诺

## Endothelial progenitor cells promote vasculogenesis and osteogenesis in the repair of bone defects

Feng Yuan<sup>1,2,3,4</sup>, Han Zhiqi<sup>1,2,3,4</sup>, Zhou Nuo<sup>1,2,3,4</sup> (1College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Rehabilitation and Reconstruction, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 3Guangxi Clinical Research Center for Craniofacial Deformity, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 4Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Surgery, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Feng Yuan, Master candidate, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhou Nuo, MD, Professor, Doctoral supervisor, College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Fracture is a common orthopedic disease in clinic. Although most fractures can heal by primary bone healing through surgical treatments, such as rigid internal fixation, malunion is liable to occur in some circumstances, eventually leading to bone defects. Neovascularization at the bone defect site plays a vital role in bone healing. Based on the pro-angiogenic ability of endothelial progenitor cells (EPCs), its capacity for bone regeneration and repair has gradually become the focus of attention.

**OBJECTIVE:** To review the use of EPCs transplantation to promote vasculogenesis and osteogenesis in bone defects.

**METHODS:** With the key words of "endothelial progenitor cells (EPCs), angiogenesis, vasculogenesis, therapy/treatment, bone defect" in Chinese and English, we performed a computer-based search in CNKI, WanFang and PubMed databases for relevant articles published from 1986 to 2019. Finally, 58 eligible articles were included in result analysis. During the literature retrieval, we followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Bone defects can promote the activation and homing of EPCs. EPCs can promote vasculogenesis and further trigger bone regeneration. There are still some problems to be solved before the application of EPCs in the treatment of bone defects. More experiments need to be carried out to investigate the exact mechanism of EPCs in vasculogenesis. More clinical trials are warranted, providing data support for future clinical applications and giving better treatment to patients disabled by bone defects.

**Key words:** endothelial progenitor cells; bone defect; stem cell transplantation; tissue engineering technology; vasculogenesis; osteogenesis

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81870748 (to ZN); Technology Research and Development Program for Health Care in Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. S201538 (to ZN); Key Scientific Research Program for Health Care in Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200525 (to ZN)

## 0 引言 Introduction

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)于1997年由ASAHARA等<sup>[1]</sup>首次从成人外周血中分离出来,并被定义为“内皮细胞的始祖(endothelial cell progenitors)”,其表达内皮细胞相关标志物CD34和Flk-1并可以分化成内皮细胞。

绝大部分内皮祖细胞来源于骨髓并参与生理和病理状态下血管新生<sup>[2]</sup>。DOYLE等<sup>[3]</sup>研究表明内皮祖细胞可以从骨髓转移到外周血,定植于远处器官或组织中,最后分化为内皮细胞从而参与血管发生。血管新生分为2种类型,既可以从已存在的血管出芽而形成新血管,通过原已存在的内皮细胞原位增殖和迁移,被称为“血管生成”,也可以在没有已存在血管的条件下——例如在胚胎发育过程中形成新的血管,被称为“血管发生”<sup>[1, 4-5]</sup>。以前人们认为血管发生只在胚胎发育期间发生<sup>[6]</sup>,而ASAHARA等<sup>[2]</sup>研究表明血管发生也可以发生在成人机体中。

内皮祖细胞的发现彻底改变了人们对成人血管新生的理解,尤其在骨折组织、移植组织或缺血肢体等特别容易受到血供影响的部位,使用内皮祖细胞辅助治疗具有改善疗效的潜力。内皮祖细胞具有促进组织血管新生的能力,使其在骨科领域多种疾病中的应用范围不断扩大。基于干细胞/祖细胞的组织工程学技术在骨科手术中的应用一直在不断发展,为了将内皮祖细胞辅助治疗骨缺损进一步推广至临床应用,文章综述骨缺损疾病中使用内皮祖细胞促进血管发生及新骨生成的研究进展。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者以“内皮祖细胞,血管生成,血管发生,治疗,骨缺损”为中文检索词,以“endothelial progenitor cells (EPCs), angiogenesis, vasculogenesis, therapy/treatment, bone defect”为英文检索词,检索式为“endothelial progenitor cells

(EPCs) ” AND (“angiogenesis” OR “vasculogenesis”), “ endothelial progenitor cells (EPCs) ” AND (“therapy” OR “treatment”) AND (“bone defect”),检索CNKI、万方数据库和PubMed数据库1986至2019年相关文章。

### 1.2 入选标准

**纳入标准:** ①原创及论点论据可靠的文献; ②内皮祖细胞促进血管发生的相关文献; ③内皮祖细胞促进新骨生成的相关文献; ④在骨缺损疾病中使用内皮祖细胞的相关文献。

**排除标准:** ①无法获得全文的文献; ②重复、相关度不高的文献; ③质量较低,证据等级不高的文献。

**1.3 质量评估** 通过上述检索方式,初步检索关键词,阅读摘要,进行整理,共得到293篇文献。按照入选标准进行阅读全文筛选,排除重复、相关度不高、质量较低、证据等级不高等文献,最终纳入58篇文献进行综述,文献检索流程图见图1。

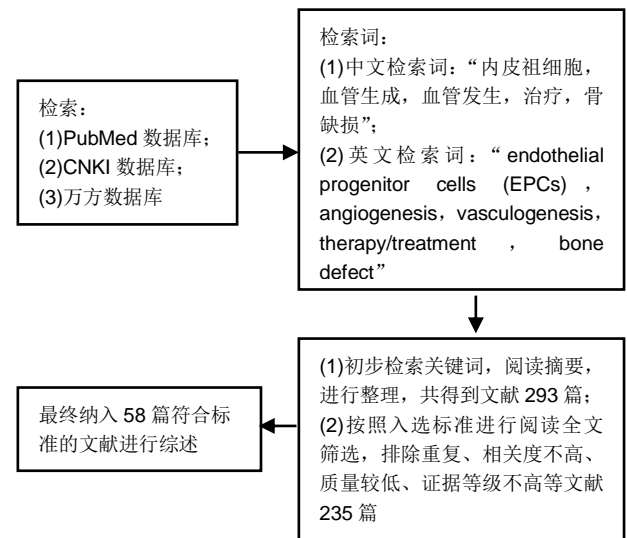


图1 文献筛选流程图

## 2 结果 Results

**2.1 骨缺损的成因与临床转归** 骨折是临床常见的骨科疾病, 骨折后经血肿形成、血肿机化、纤维性和骨性骨痂形成以及骨痂改建的过程而完全愈合, 使骨在结构与功能上恢复正常。虽然大多数骨折可以通过坚强内固定等手术治疗实现一期愈合, 但仍有相当比例的骨折(5%-10%)愈合不良, 严重影响患者的生活质量<sup>[7]</sup>, 其中无法愈合的大范围骨折将会造成骨质短缺, 称为骨缺损, 如创伤所造成的粉碎性骨折、开放性骨折导致大块骨组织缺损; 此外, 另有骨髓炎等炎症所致的骨坏死脱落分离, 骨梗死或缺血性坏死所致大片骨坏死所造成的缺损, 或因骨肉瘤等恶性肿瘤进行骨切除术导致的骨缺损等。骨缺损若处理不当可能导致肢体功能障碍, 最终导致患者伤残, 给患者造成极大的痛苦。

**2.2 骨缺损的常规治疗** 当骨缺损的长度达到骨干直径的1.5倍时, 将超过自体修复的临界状态, 常出现骨吸收或纤维愈合的情况<sup>[8-9]</sup>。目前骨缺损常通过骨粉充填或自体骨移植等方法进行手术治疗, 此外还有同种异体骨移植、异种骨移植或利用修复体如颌面部的赝复体等方式进行骨缺损修复, 但这些方法存在愈合不良、感染、免疫原反应、血源性疾病传播、组织相容性不佳等问题, 导致手术失败。此外, 即使使用上述方法积极治疗骨缺损, 仍有一部分骨缺损最终仅能转归为骨不连, 导致二次甚至多次手术, 但手术效果不确切, 部分患者反复手术也未必能够获得良好的治疗效果。

**2.3 内皮祖细胞辅助治疗骨缺损的研究与探讨** 骨再生是一个复杂的生物学过程, 涉及许多细胞因子与多种干细胞之间良好的协调作用<sup>[10-12]</sup>。有研究认为骨损伤后骨形成缺损的主要原因之一是局部血液循环被破坏, 导致相邻骨髓的缺氧和急性坏死<sup>[13-15]</sup>。骨损伤后的血管损伤及缺氧对成骨细胞也有很大的影响。另外目前学界认为动脉血管的存在是骨新生的必要条件, 没有血管的生成, 就不会有骨的新生。骨折后骨折部位周围首先形成血肿, 才有后来的骨痂形成和改建。由此推断, 骨损伤部位的血管生成可能对骨愈合起到至关重要的作用<sup>[16-18]</sup>。因此, 基于内皮祖细胞促进组织血管发生的能力, 其对骨再生和修复的辅助逐渐成为人们关注的焦点。

**2.3.1 内皮祖细胞的起源及功能** 内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞, 在血管内皮再生中发挥着重要作用。1997年, 日本学者ASAHARA等<sup>[1]</sup>首次使用免疫磁珠分选法从人外周血中分离出CD34<sup>+</sup>的内皮祖细胞, 并将其定义为一组来源于成人外周血的纯化造血祖细胞, 表达内皮相关标志物(CD34和Flk-1)且能够分化为内皮细胞。后来的研究发现CD133在内皮祖细胞中也有表达<sup>[19]</sup>, CD133是一种干细胞特殊表面标记物, 其在造血干细胞中高表达。目前人们普遍认为内皮祖细胞共同表达CD34、VEGFR2(又称KDR, Flk-1)以及CD133, 但由于

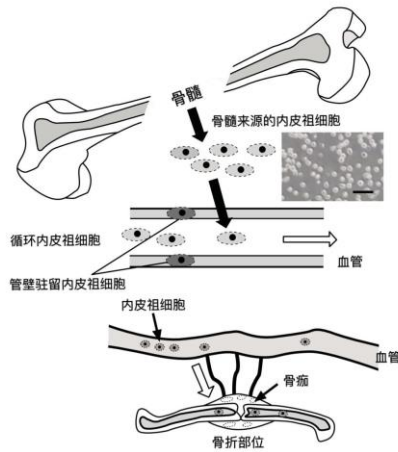
包括CD34、CD133在内的多种细胞表面抗原也在造血干细胞/祖细胞群中表达<sup>[20-21]</sup>, 如Flk-1、Tie-2、Sca-1和CD34<sup>[2]</sup>, 因此关于内皮祖细胞的表面标记物仍存在争议。

随后的研究发现内皮祖细胞不仅存在于外周血中, 还存在于骨髓、骨骼肌、胚胎、脐血、心脏、脂肪等组织中, 尤其大量存在于骨髓中。根据内皮祖细胞出现时间的差异、细胞表型及其生物学特性, 可以将其分为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞<sup>[22]</sup>。DOYLE等<sup>[3]</sup>研究表明内皮祖细胞可以从骨髓转移到外周血, 随后被远处器官或组织招募并定植, 早期内皮祖细胞可以通过旁分泌对周围内皮细胞产生作用从而参与血管生成, 晚期内皮祖细胞可以分化为内皮细胞并参与血管发生。

随着人们对细胞治疗的研究一步步向临床应用靠近, 内皮祖细胞的定义应该更加精准而严谨<sup>[23]</sup>。内皮祖细胞应根据其谱系分为造血(髓)系和内皮系两大类。专家共识提出用“髓样血管生成细胞(myeloid angiogenic cells, MACs)”来替代“早期内皮祖细胞”的说法, 用“内皮集落形成细胞(endothelial colony forming cells, ECFCs)”来替代“晚期内皮祖细胞”以明确其谱系和功能。

**2.3.2 内皮祖细胞的动员和趋化** 人内皮祖细胞主要存在于骨髓中, 外周血内皮祖细胞主要由骨髓动员而来, 并趋化至缺血部位。GILL等<sup>[24]</sup>及SHINTANI等<sup>[25]</sup>的动物实验表明血管损伤和心肌梗死后骨髓来源内皮祖细胞的动员增加, 还有一些研究表明内皮祖细胞参与新血管系统的建立<sup>[2, 26-27]</sup>。

LEE等<sup>[28]</sup>利用小鼠胫骨骨折模型和大鼠胫骨牵张成骨模型评估了骨再生过程中内皮祖细胞在外周血和脾单核细胞中所占比例的变化, 结果发现骨折后外周血和脾脏的内皮祖细胞比例增加, 在骨折后第3天达到高峰, 愈合期间恢复到基础水平。牵张成骨模型中内皮祖细胞比例增加的时间规律与骨折愈合模型相似, 但在牵张期和固定期内皮祖细胞比例再次增加。MATSUMOTO等<sup>[29]</sup>利用活细胞荧光激活细胞分选术(FACS)对骨折小鼠进行分析, 结果发现骨髓和外周血内皮祖细胞的比例在骨痂形成初期显著增加, 且内皮祖细胞增强了骨折部位的血管生成。MATSUMOTO等<sup>[29]</sup>把内皮细胞特异性Tie2启动子调控下表达LacZ的转基因小鼠骨髓来源内皮祖细胞移植到骨折的野生型小鼠中, 证实了促进骨折部位血管发生的内皮祖细胞来源于转基因小鼠骨髓。将绿色荧光蛋白阳性的外周血内皮祖细胞移植至骨折野生小鼠中并观察内皮祖细胞的迁移, 结果进一步证实了外周血内皮祖细胞被招募动员到骨折部位促进骨折愈合。这些研究结果表明, 骨折可诱导内皮祖细胞从骨髓向外周血的动员, 并将动员的内皮祖细胞招募到骨折部位, 从而促进血管发生, 为骨折愈合提供良好的环境, 在骨折愈合中发挥重要作用, 见图2。



图注：骨折修复时，骨髓来源内皮祖细胞被动员至外周血，并与管壁内皮祖细胞合流成循环内皮祖细胞，最终定植于骨折部位

图2 内皮祖细胞的动员与定植<sup>[30]</sup>

**2.3.3 内皮祖细胞促进骨再生的机制** 尽管内皮祖细胞在动物实验的骨折愈合中已显示出有效性，但内皮祖细胞促进骨折愈合的机制仍不清楚。MATSUMOTO等<sup>[5, 13]</sup>将人内皮祖细胞移植到大鼠骨折模型中，发现内皮祖细胞被招募到骨折部位，且在2周后发现骨折部位的内皮细胞和成骨细胞表达特异性标志物，证明了内皮祖细胞通过向内皮细胞和成骨细胞分化参与骨再生。此外，FORD等<sup>[31]</sup>研究观察到内皮祖细胞在兔的胫骨截骨部位形成软骨腔。MIFUNE等<sup>[32]</sup>也在体外证实了粒细胞集落刺激因子动员的外周血内皮祖细胞有向成骨细胞分化的能力，直接促进了大鼠骨折的愈合。还有研究表明，内皮祖细胞和骨髓间充质干细胞之间通过旁分泌及直接细胞接触产生协同效应，对促进骨再生起到至关重要的作用<sup>[33-34]</sup>。

然而一些研究发现在缺血组织区域并未检测到大量的内皮祖细胞存在<sup>[35]</sup>。早在1992年，FOLKMAN等<sup>[36]</sup>研究证明移植的内皮祖细胞分泌多种促血管生成的细胞因子，促进已有内皮细胞的增殖和迁移，从而促进血管生成。MIFUNE等<sup>[32]</sup>通过大鼠骨折部位血管内皮生长因子和骨形成蛋白2表达量的增加证实了人类外周血内皮祖细胞具有旁分泌作用使大鼠骨折区毛细血管和成骨细胞密度增加。LI等<sup>[37-38]</sup>将内皮祖细胞局部移植于大鼠节段性骨缺损区，发现在修复早期血管内皮生长因子和骨形成蛋白2的表达量增加，证实内皮祖细胞可能通过高表达血管内皮生长因子和骨形成蛋白2促进血管发生，从而促进骨缺损的愈合。其他研究也证明内皮祖细胞中存在各种促血管生成因子，如血管内皮生长因子、肝生长因子、血管生成素1、基质衍生因子1 $\alpha$ 、胰岛素样生长因子1、内皮一氧化氮合酶/诱导型一氧化氮合酶和血小板衍生生长因子B等<sup>[27, 37, 39-42]</sup>。

综上所述，目前认为内皮祖细胞可以直接分化为内皮细胞或成骨细胞进而直接促进骨缺损的愈合，也可以通过旁分泌多种细胞因子间接地对骨再生做出贡献。

**2.3.4 内皮祖细胞辅助治疗骨缺损的研究进展** 为了增多骨缺损区域的内皮祖细胞，大量学者尝试了多种方法，见表1。MATSUMOTO等<sup>[13]</sup>将循环内皮祖细胞、循环单核细胞及等体积生理盐水通过尾静脉注射到裸鼠股骨骨缺损模型中，通过放射学、组织学和生物力学定量评估骨愈合，结果显示内皮祖细胞组的骨愈合明显优于单核细胞组和生理盐水组。为了减少静脉注射可能产生的不利影响并探索最适细胞量，ROZEN等<sup>[43]</sup>将自体内皮祖细胞单细胞悬液局部注射于绵羊胫骨骨缺损模型中，12周以后组织学检查显示对照组以纤维化瘢痕组织为主，而内皮祖细胞移植组形成了大量的编织骨。此外，也有人将生物支架与干细胞移植相结合，MIFUNE等<sup>[32]</sup>将去端肽胶原支架包被的内皮祖细胞局部移植于鼠骨缺损模型中，比较 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  3种剂量和等量PBS对骨缺损愈合的影响，结果显示仅在 $10^5$ 组和 $10^4$ 组观察到了内皮祖细胞的成血管和成骨分化、骨缺损部位血供的增强以及骨缺损愈合的影像学和组织学证据。这些结果说明相比静脉注射较高数目内皮祖细胞，采用局部移植较低数目也可以起到相同的辅助作用。

然而，自体内皮祖细胞数量的不足一直是困扰干细胞移植临床应用的原因。内皮祖细胞在骨髓细胞中占比不足1%，在外周血单核细胞中占比不足0.01%<sup>[44]</sup>，且目前提取骨髓来源内皮祖细胞需要进行骨髓穿刺，给患者造成的伤害大，效率低，极其痛苦。为了能快速高效地获取内皮祖细胞，学者们不断优化其分离培养方法及培养体系以获得足够的细胞数量。目前研究中主要用单核细胞贴壁培养法、免疫磁珠分选法、差速贴壁培养法或差速消化分离法分离内皮祖细胞。该文章提到的研究大部分使用了单核细胞贴壁培养法，即根据细胞密度大小不同，采用不同密度的分离液(如Ficoll等)分离骨髓、外周血或脾脏中的单核细胞接种于纤维连接蛋白包被的培养皿中，用EGM-2-MV培养基培养2-7 d后通过换液去除未贴壁细胞，继续培养贴壁细胞即可得到内皮祖细胞。此方法操作简单，是目前应用最多、最成熟的分离方法。还有部分研究利用内皮祖细胞表面的特异性抗原与表面包被有相应抗体的免疫磁珠特异性结合，即免疫磁珠分选法来分选内皮祖细胞，或利用骨髓间充质干细胞与内皮祖细胞贴壁速度的不同，即差速贴壁培养法来分离内皮祖细胞。

就培养体系而言，目前通常使用含胎牛血清的培养基对分离出的内皮祖细胞进行培养扩增，并添加一些细胞因子以提高内皮祖细胞的增殖潜能。但由于胎牛血清中的营养成分会因为血清批次的不同而有所不同，且血清中含有抑制性成分(如转化生长因子 $\beta$ )，这都会对细胞的培养产生影响，加之其中的安全隐患、经济成本及道德问题等因素，学者们开始研发胎牛血清替代物及不含血清的培养基。KAWAKAMI等<sup>[35]</sup>发现在无血清培养基

表 1 内皮祖细胞移植辅助治疗骨缺损动物实验及临床试验汇总

参考文献	研究对象	细胞来源	移植方式	主要结论
MATSUMOTO 等 <sup>[13]</sup>	小鼠, 股骨	异种, 人外周血	尾静脉注射	内皮祖细胞>单核细胞>生理盐水
MIFUNE 等 <sup>[32]</sup>	大鼠, 股骨	异种, 人外周血	尾静脉注射	局部移植>静脉输注
KAWAKAMI 等 <sup>[35]</sup>	大鼠, 股骨	异种, 人骨髓	去端肽胶原支架	GM-EPCs(Hi)>GM-EPCs(Mid)>GM-EPCs(Lo)=PBS
LI 等 <sup>[37]</sup>	大鼠, 股骨	同种, 鼠骨髓	去端肽胶原支架	cEX-EPCs>EPCs(Hi)>EPCs(Lo)>PBS
LI 等 <sup>[38]</sup>	大鼠, 股骨	同种, 鼠骨髓	明胶海绵支架	内皮祖细胞>生理盐水
ROZEN 等 <sup>[43]</sup>	绵羊, 胫骨	自体, 羊外周血	局部注射	内皮祖细胞>生理盐水
ATESOK 等 <sup>[46]</sup>	大鼠, 股骨	同种, 鼠骨髓	明胶海绵支架	内皮祖细胞>生理盐水
LI 等 <sup>[47]</sup>	大鼠, 股骨	同种, 鼠骨髓	明胶海绵支架	内皮祖细胞>生理盐水
FUKUI 等 <sup>[48]</sup>	大鼠, 股骨	异种, 人外周血	去端肽胶原支架	GM-EPCs(Hi)>GM-EPCs(Lo)>PBS
FUKUI 等 <sup>[49]</sup>	大鼠, 股骨	异种, 人外周血	去端肽胶原支架	GM-EPCs>GM-MNCs>PBS
ELDESOQI 等 <sup>[51]</sup>	大鼠, 颅骨	同种, 鼠脾脏	聚乳酸/生物玻璃复合生物材料	内皮祖细胞+含 40%生物玻璃的复合生物材料>含 40%生物玻璃的复合生物材料
BEGER 等 <sup>[53]</sup>	大鼠, 颅骨	异种, 人骨髓	骨瓷支架	骨瓷+内皮祖细胞组=骨瓷组>无细胞组
XU 等 <sup>[54]</sup>	兔, 下颌骨	同种, 兔骨髓	AP40mod	AP40mod+EPCs+BMSCs> AP40mod
LIANG 等 <sup>[55]</sup>	大鼠, 牙槽骨	同种, 鼠骨髓	细胞膜片	内皮祖细胞+间充质干细胞>间充质干细胞
GILES 等 <sup>[56]</sup>	大鼠, 股骨	同种, 鼠骨髓	明胶支架	早期内皮祖细胞组>晚期内皮祖细胞组>无细胞组
KURODA 等 <sup>[57]</sup>	成人, 胫骨	自体, 人骨髓	去端肽胶原支架	实现临床和影像学愈合, 无不良反应
KURODA 等 <sup>[58]</sup>	成人, 股/胫骨	自体, 人骨髓	去端肽胶原支架	所有患者均实现临床和影像学愈合, 无不良反应

表注: EPCs: 内皮祖细胞; GM-MNCs: 粒细胞集落刺激因子动员的单核细胞; GM-EPCs: 粒细胞集落刺激因子动员的内皮祖细胞; Hi: 高剂量; Lo: 低剂量; Mid: 中剂量; cEX-EPCs: 体外培养扩增的内皮祖细胞; AP40mod: 生物活性玻璃陶瓷支架; BMSCs: 骨髓间充质干细胞。“>”表示实验结果  $P < 0.05$ , 差异有显著性意义; “=”表示实验结果  $P > 0.05$ , 差异无显著性意义

中添加血管内皮生长因子、干细胞因子、白细胞介素6、Flt-3和血小板生成素等5种生长因子培养骨髓来源内皮祖细胞7 d, 可使细胞数量增加20倍以上。将其运用于大鼠骨缺损模型中, 结果显示此种方法获得的内皮祖细胞相比普通内皮祖细胞具有更好的成管能力且骨缺损区域的血液循环恢复更好, 两种细胞都可以分化为成骨细胞, 可见无血清培养基培养自体扩增的骨髓来源内皮祖细胞移植是一种高效简单且有前景的治疗骨缺损的方案。

**2.3.5 组织工程学技术的辅助** 大量研究表明全身或局部注射内皮祖细胞无法保证缺损区内皮祖细胞的数量及浓度, 这可能是因为单细胞悬液无法长时间固定并保留在缺损区内。为了改进上述缺陷, 越来越多的学者利用生物支架或细胞膜片等辅助内皮祖细胞的移植<sup>[45]</sup>。

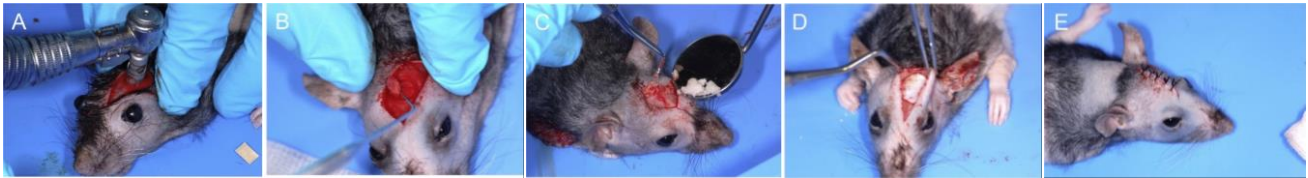
例如上文中MIFUNE等<sup>[32]</sup>将内皮祖细胞附着于去端肽胶原支架。此外, ATESOK等<sup>[46]</sup>在大鼠股骨节段性缺损模型中用明胶海绵支架局部移植内皮祖细胞, 结果显示支架组的骨再生明显增强, 骨缺损被新生骨小梁和皮质骨完全充填。LI等<sup>[47]</sup>同样使用明胶海绵支架将内皮祖细胞接种于大鼠骨缺损处, 通过X射线片、micro-CT扫描和生物力学评估, 结果提示支架组能显著促进大鼠股骨节段缺损模型的愈合。FUKUI等<sup>[48-49]</sup>将粒细胞集落刺激因子注射于捐献者体内, 4 d后从中提取外周血内皮祖细胞及单核细胞, 并利用去端肽胶原支架将其分别局部移植于大鼠骨缺损模型中, 结果表明内皮祖细胞组和单核细胞组均可增强骨缺损区域的血流恢复, 但内皮祖细胞组在影像学、组织学和功能评估方面均优于单核

细胞组, 进一步的体内和体外实验证实粒细胞集落刺激因子动员的外周血单核细胞引起的过度炎症反应可能是导致这种差异的机制之一。

生物玻璃(BG)是一种硅酸钙( $\text{CaO-SiO}_2$ ), 与天然无机骨成分相似, 具有促进生理溶液中磷酸钙形成和沉积的作用, 可增强骨基质界面强度<sup>[50]</sup>。关于含有生物玻璃的复合材料对内皮祖细胞的影响, 人们知之甚少。ELDESOQI等<sup>[51]</sup>研究了以聚乳酸为基础, 探讨含20%或40%生物玻璃(即BG20和BG40)的复合生物材料对内皮祖细胞体外分化和存活的影响, 结果表明含40%生物玻璃的复合生物材料可以显著提高体外内皮祖细胞的存活率, 并推测原因是其可以释放大量 $\text{Ca}^{2+}$ 离子, 然后以此复合材料联合内皮祖细胞移植于大鼠颅骨骨缺损模型, 结果显示含40%生物玻璃的复合生物材料联合内皮祖细胞移植可显著促进大鼠颅骨骨缺损的早期血管发生。

骨瓷是市场上最好的同种异体骨替代物之一, 例如Straumann® BoneCeramic™由60%羟基磷灰石和40%β-磷酸三钙组成, 可同时用作骨替代物及药物递送载体, 具有良好的生物相容性, 并且能够减缓和控制骨再生过程中的再吸收<sup>[52]</sup>。BEGER等<sup>[53]</sup>将大鼠颅骨骨缺损模型随机分为3组: 骨瓷组, 骨瓷+内皮祖细胞组以及空白对照组, 结果证实了骨瓷与内皮祖细胞联合移植可以显著提升骨血管化和骨再生, 见图3。

如上所述, 与金属或高分子聚合物等其他材料相比, 生物活性玻璃和陶瓷支架能与骨以化学键结合, 故其具有出色的生物相容性、可吸收性及骨诱导性。羟基磷灰石和β-磷酸三钙是临床中最常用的支架材料, 然而



图注: A: 涡轮机打孔; B: 移除骨块; C: 植入骨替代物; D: 用胶原蛋白膜覆盖骨替代物; E: 伤口关闭及缝合  
图3 大鼠颅骨缺损的手术方法<sup>[53]</sup>

羟基磷灰石不易降解,  $\beta$ -磷酸三钙的机械强度较低, 因此其应用范围受到一定限制, 而生物玻璃的加入可明显提高 $\beta$ -磷酸三钙的抗压强度。XU等<sup>[54]</sup>研发了一种新型生物活性玻璃陶瓷, 并将其命名为AP40mod。此材料提高了传统陶瓷的机械强度且降低了其过度降解率。他们应用包含内皮祖细胞与骨髓间充质干细胞的AP40mod支架成功修复了兔下颌骨骨缺损, 并提出可以通过改变AP40mod的成分、生产方式及种子细胞来适应不同类型的骨缺损。

LIANG等<sup>[55]</sup>提取大鼠自体内皮祖细胞及间充质干细胞, 制备间充质干细胞膜片及内皮祖细胞-间充质干细胞共培养细胞膜片, 并将其移植到大鼠牙槽骨缺损中, 结果显示内皮祖细胞-间充质干细胞膜片显示出更强的成骨活性, 产生连续的新骨几乎覆盖整个缺损区域, 这种共培养体系可能为骨缺损修复提供新的思路。

GILES等<sup>[56]</sup>从大鼠骨髓提取分离早期内皮祖细胞(E-EPCs)及晚期内皮祖细胞(L-EPCs), 并使用明胶支架辅助内皮祖细胞移植于大鼠骨缺损区, 结果显示早期内皮祖细胞治疗组有80%的大鼠完全愈合, 20%的大鼠部分愈合, 晚期内皮祖细胞组只有20%的大鼠完全愈合, 而无细胞对照组均为骨不连, 进一步体外实验表明, 早期内皮祖细胞比晚期内皮祖细胞释放更多的血管内皮生长因子。此外, 将内皮祖细胞与成骨细胞共培养可以刺激早期内皮祖细胞小管生成, 抑制晚期内皮祖细胞小管生成。以上表明骨髓来源的早期内皮祖细胞相对晚期内皮祖细胞可以更有效地促进骨缺损的愈合。

**2.3.6 临床试验** 基于一系列动物实验的研究成果, KURODA等<sup>[57]</sup>报道了第1例胫骨骨缺损患者在切开复位内固定术后9个月接受自体粒细胞集落刺激因子动员的内皮祖细胞与自体骨移植, 这是内皮祖细胞移植首次应用于骨缺损患者。细胞治疗和骨移植12周后, 临床和影像学均实现了良好的愈合, 未有疼痛、步态障碍等严重不良事件的发生。此个案为KURODA等<sup>[58]</sup>后来的I/IIa期临床试验奠定了基础, 即将自体粒细胞集落刺激因子动员的内皮祖细胞使用去端肽胶原支架移植于股骨或胫骨骨缺损患者的骨缺损区域( $n=7$ ), 其中有5例(71.4%)在第12周实现了影像学愈合, 而所有患者均于植骨细胞移植术后16.4周获得了临床及影像学愈合, 且在之后的1年随访中无严重不良事件发生。这些研究结果提示了内皮祖细胞有希望作为一种新的治疗方式应

用于大范围骨缺损的修复治疗。然而内皮祖细胞移植的有效性 & 安全性仍需在随机临床对照试验中进一步阐明。

### 3 总结与展望 Conclusions and prospects

综上所述, 内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞, 可以从骨髓转移到外周血, 并可能在远处组织或器官中定植, 最后分化为内皮细胞并参与血管发生。骨缺损可诱导内皮祖细胞从骨髓向外周血动员, 并将动员的内皮祖细胞招募到骨缺损部位, 从而在骨愈合过程中促进血管发生, 为骨缺损愈合提供良好的环境。目前认为内皮祖细胞可以直接分化为内皮细胞或成骨细胞进而直接促进骨缺损的愈合, 也可以通过旁分泌多种细胞因子间接地对骨再生做出贡献。

一系列动物实验和早期临床研究都展示了内皮祖细胞在辅助治疗骨缺损方向具有良好的应用前景, 但是将其推广至临床应用之前, 仍有一些问题有待解决: 首先, 内皮祖细胞表面的特异性标记尚未有统一的定论, 例如如何分离、纯化以及扩增培养以保证内皮祖细胞的质量与足够的数量; 每单位骨缺损的修复至少需要多少数量的内皮祖细胞; 如何更有效地移植内皮祖细胞从而保证缺损区内皮祖细胞的数量及浓度等。此外, 内皮祖细胞的来源广泛, 不同来源的内皮祖细胞是否具有相同的治疗潜能、如何寻求最佳来源的内皮祖细胞、是否能保证其在体内的安全性等问题也有待确定。另外值得注意的是, 内皮祖细胞是否会参与动脉粥样硬化斑块内的血管发生从而促进斑块生长导致其破裂, 是否会归巢至肿瘤血管床刺激肿瘤生长。明确上述问题对于内皮祖细胞的临床应用具有极为重要的意义。

目前的研究多数仍局限于动物实验, 未来需要进行更多的临床试验, 并且进一步深入研究内皮祖细胞参与血管发生的确切机制, 为将来的临床应用提供数据支持, 对其可行性、有效性及安全性做出更全面地观察和评价, 给大量骨缺损致残患者带来更好的治疗。即使内皮祖细胞在骨缺损治疗中的研究尚不完善, 但具有其他治疗方式不可比拟的优点, 相信随着研究的深入, 内皮祖细胞将广泛应用于骨缺损乃至其他更多缺血性疾病的治疗。

作者贡献: 第一作者负责综述构思设计、文章写作校对, 第一、

第二作者参与文献收集、分析总结, 通讯作者负责项目指导。全体作者都阅读并同意最终的文本。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81870748)”“广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201538)”“广西医疗卫生重点科研课题(桂卫重 200525)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
- ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85(3):221-228.
- DOYLE B, METHAROM P, CAPLICE NM. Endothelial progenitor cells. *Endothelium*. 2006;13(6):403-410.
- LAING AJ, DILLON JP, CONDON ET, et al. Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma. *J Orthop Res*. 2007;25(1):44-50.
- MATSUMOTO T, KURODA R, MIFUNE Y, et al. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*. 2008;43(3):434-439.
- RISAU W, SARIOLA H, ZERWES HG, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 1988;102(3):471-478.
- MARSH D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S22-30.
- SCHMITZ JP, HOLLINGER JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.
- JANG BJ, BYEON YE, LIM JH, et al. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *J Vet Sci*. 2008;9(4):387-393.
- ZIGDON-GILADI H, BICK T, LEWINSON D, et al. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells stimulate bone regeneration and mineral density. *J Periodontol*. 2014;85(7):984-990.
- LIU Y, TEOH SH, CHONG MS, et al. Contrasting effects of vasculogenic induction upon biaxial bioreactor stimulation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells cocultures in three-dimensional scaffolds under in vitro and in vivo paradigms for vascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(7-8):893-904.
- GEUZE RE, WEGMAN F, ONER FC, et al. Influence of endothelial progenitor cells and platelet gel on tissue-engineered bone ectopically in goats. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3669-3677.
- MATSUMOTO T, KAWAMOTO A, KURODA R, et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol*. 2006;169(4):1440-1457.
- LU C, MICLAU T, HU D, et al. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res*. 2007;25(1):51-61.
- EINHORN TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77(6):940-956.
- COLNOT CI, HELMS JA. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech Dev*. 2001;100(2):245-250.
- CARANO RA, FILVAROFF EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003;8(21):980-989.
- GLOWACKI J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S82-89.
- 汤文燕, 栾佐. 内皮祖细胞的生物学特性及其临床应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(10):86-93.
- ASAHARA T, KAWAMOTO A, MASUDA H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 2011;29(11):1650-1655.
- LEE JH, HAH YS, CHO HY, et al. Human umbilical cord blood-derived CD34-positive endothelial progenitor cells stimulate osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived osteoblasts. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20(5-6):940-953.
- HUR J, YOON CH, KIM HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):288-293.
- MEDINA RJ, BARBER CL, SABATIER F, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(5):1316-1320.
- GILL M, DIAS S, HATTORI K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88(2):167-174.
- SHINTANI S, MUROHARA T, IKEDA H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2776-2779.
- MASUDA H, KALKA C, TAKAHASHI T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007;101(6):598-606.
- II M, NISHIMURA H, IWAKURA A, et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circulation*. 2005; 111(9):1114-1120.
- 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.
- MATSUMOTO T, MIFUNE Y, KAWAMOTO A, et al. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):234-242.

- [30] KAWAKAMI Y, MATSUMOTO T, MIFUNE Y, et al. Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in the Field of Orthopaedics. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(1):3-13.
- [31] FORD JL, ROBINSON DE, SCAMMELL BE. Endochondral ossification in fracture callus during long bone repair: the localisation of 'cavity-lining cells' within the cartilage. *J Orthop Res*. 2004;22(2):368-375.
- [32] MIFUNE Y, MATSUMOTO T, KAWAMOTO A, et al. Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells*. 2008;26(6):1395-1405.
- [33] SEEBACH C, HENRICH D, KÄHLING C, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1961-1970.
- [34] 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.
- [35] KAWAKAMI Y, II M, ALEV C, et al. Local transplantation of ex vivo expanded bone marrow-derived CD34-positive cells accelerates fracture healing. *Cell Transplant*. 2012;21(12):2689-2709.
- [36] FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931-10934.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] KAWAMOTO A, ASAHARA T, LOSORDO DW. Transplantation of endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Cardiovasc Radiat Med*. 2002;3(3-4):221-225.
- [40] JUJO K, II M, LOSORDO DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45(4):530-544.
- [41] MIYAMOTO Y, SUYAMA T, YASHITA T, et al. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(5):627-635.
- [42] 周诺, 廖妮, 韦山良. 一氧化氮合酶在犬下颌骨牵张成骨过程中的表达和意义[J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(6):676-680.
- [43] ROZEN N, BICK T, BAJAYO A, et al. Transplanted blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) enhance bridging of sheep tibia critical size defects. *Bone*. 2009;45(5):918-924.
- [44] SMADJA DM, CORNET A, EMMERICH J, et al. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(4):223-239.
- [45] 韩志琪, 蒋伟东, 周诺. 干细胞组织工程技术辅助下颌牵张成骨的研究与进展[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(25):4037-4043.
- [46] ATESOK K, LI R, STEWART DJ, et al. Endothelial progenitor cells promote fracture healing in a segmental bone defect model. *J Orthop Res*. 2010;28(8):1007-1014.
- [47] 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.
- [48] FUKUI T, MATSUMOTO T, MIFUNE Y, et al. Local transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized human peripheral blood mononuclear cells for unhealing bone fractures. *Cell Transplant*. 2012;21(4):707-721.
- [49] 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*. 2015;24(7):1379-1393.
- [50] JELL G, STEVENS MM. Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):997-1002.
- [51] ELDESQI K, SEEBACH C, NGUYEN NGOC C, et al. High calcium bioglass enhances differentiation and survival of endothelial progenitor cells, inducing early vascularization in critical size bone defects. *PLoS One*. 2013;8(11):e79058.
- [52] BOSE S, TARAFDER S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater*. 2012;8(4):1401-1421.
- [53] BEGER B, BLATT S, PABST AM, et al. Biofunctionalization of synthetic bone substitutes with angiogenic stem cells: Influence on regeneration of critical-size bone defects in an in vivo murine model. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(9):1601-1608.
- [54] XU F, REN H, ZHENG M, et al. Development of biodegradable bioactive glass ceramics by DLP printed containing EPCs/BMSCs for bone tissue engineering of rabbit mandible defects. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019;103:103532.
- [55] LIANG Y, WEN L, SHANG F, et al. Endothelial progenitors enhanced the osteogenic capacities of mesenchymal stem cells in vitro and in a rat alveolar bone defect model. *Arch Oral Biol*. 2016;68:123-130.
- [56] GILES EM, GODBOUT C, CHI W, et al. Subtypes of endothelial progenitor cells affect healing of segmental bone defects differently. *Int Orthop*. 2017;41(11):2337-2343.
- [57] 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.
- [58] KURODA R, MATSUMOTO T, NIIKURA T, et al. Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):128-134.