

缺氧条件下骨髓间充质干细胞对血管内皮细胞迁移和管腔形成的影响

王雅芬, 苏静波, 王雨生, 惠延年, 郭长梅

引用: 王雅芬, 苏静波, 王雨生, 等. 缺氧条件下骨髓间充质干细胞对血管内皮细胞迁移和管腔形成的影响. 国际眼科杂志 2020;20(1):16-20

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81470655, 81570856, 81770936)

作者单位: (710032) 中国陕西省西安市, 空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介: 王雅芬, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼内血管增生性疾病。

通讯作者: 郭长梅, 女, 毕业于空军军医大学, 眼科学博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 眼内血管增生性疾病. gcm2@163.com

收稿日期: 2019-10-18 修回日期: 2019-12-04

摘要

目的: 探讨缺氧条件下骨髓间充质干细胞(BMSCs)对血管内皮细胞迁移和管腔形成的影响。

方法: 制备3种细胞的条件培养基(CM), 分别为对照组(血管内皮细胞培养基, VCM)、常氧条件下BMSCs的CM组(NCM)和缺氧条件下BMSCs的CM组(HCM)。分别用以上3种CM培养人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)和猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞(RF/6A)6~24h后, 观察血管内皮细胞迁移和管腔形成的能力。

结果: 相对于对照组和常氧组的CM, 缺氧组即HCM作用下的血管内皮细胞的迁移数目和成管数量(包括成管总长度和分支数)均显著增加(均 $P < 0.05$)。在RF/6A细胞, 对照组VCM、常氧组NCM和缺氧组HCM作用24h后, 迁移的细胞数分别为 19.00 ± 3.61 、 32.33 ± 3.06 、 114.00 ± 11.53 个($F = 153.3, P < 0.001$); 而HUVECs的3组细胞迁移个数则分别是 76.00 ± 9.54 、 122.00 ± 18.68 、 307.70 ± 25.97 个($F = 121.5, P < 0.001$)。RF/6A细胞经各组CM孵育6h后, 成管数目分别为 12.00 ± 3.00 、 37.00 ± 4.58 、 51.00 ± 3.61 个($F = 81.7, P < 0.0001$); 3组HUVECs细胞管腔形成的结果类似。

结论: 缺氧条件下BMSCs可促进血管内皮细胞的迁移和成管能力, 这种机制可能在视网膜新生血管中发挥作用。

关键词: 缺氧; 骨髓间充质干细胞; 血管内皮细胞; 迁移; 管腔形成; 视网膜新生血管

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.1.04

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia on vascular endothelial cell migration and lumen formation

Ya-Fen Wang, Jing-Bo Su, Yu-Sheng Wang, Yan-Nian Hui, Chang-Mei Guo

Foundation items: National Natural Science Foundation of China

(No.81470655, 81570856, 81770936)

Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Eye Institute of Chinese PLA, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Chang - Mei Guo. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Eye Institute of Chinese PLA, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. gcm2@163.com

Received: 2019-10-18 Accepted: 2019-12-04

Abstract

• AIM: To investigate the role of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under hypoxia on vascular endothelial cell migration and lumen formation.

• METHODS: Three kinds of conditioned media (CM) were prepared which including control group (vascular endothelial cells conditioned medium, VCM), normoxic BMSCs-CM group (NCM), and hypoxic BMSCs-CM group (HCM). Then the migration and lumen formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and monkey choroid-retinal vascular endothelial cells (RF/6A) were detected after cultured with the above three kinds of CM respectively for 6-24h.

• RESULTS: The numbers of cells migration and the tubes formation (including the total length of the tubes and the numbers of branches) in the hypoxic group (HCM) were increased significantly compared with the control group and the normoxic group ($P < 0.05$). The numbers of migrated RF/6A cells were 19.00 ± 3.61 , 32.33 ± 3.06 , and 114.00 ± 11.53 , respectively in control group (VCM), normoxic group (NCM) and hypoxic group (HCM) after treated for 24h ($F = 153.3, P < 0.001$). And the numbers of migrated HUVECs were 76.00 ± 9.54 , 122.00 ± 18.68 , and 307.70 ± 25.97 , respectively in three groups ($F = 121.5, P < 0.001$). After incubation of RF/6A cells with three different CM for 6h, the numbers of tubes formation were 12.00 ± 3.00 , 37.00 ± 4.58 , and 51.00 ± 3.61 , respectively ($F = 81.7, P < 0.0001$). The results of lumen formation of HUVECs in three groups were similar with that of RF/6A.

• CONCLUSION: BMSCs can promote the migration and lumen formation of vascular endothelial cells under hypoxia. This mechanism may play a role in retinal neovascularization.

• KEYWORDS: hypoxia; bone marrow mesenchymal stem cells; vascular endothelial cells; migration; lumen formation; retinal neovascularization

Citation: Wang YF, Su JB, Wang YS, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxia on vascular endothelial cell migration and lumen formation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(1):16-20

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是新生儿失明的主要原因之一,其发病过程包括两个阶段,首先是出生后视网膜血管生长延迟与现有血管部分消退,其次是缺氧诱导的病理性视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)生成^[1]。损伤的视网膜血管会使血管闭塞、视网膜缺血,破坏视网膜血管内皮细胞的屏障,导致血管渗漏、新生血管进入玻璃体腔,引起视网膜脱离而失明^[2]。尽管可以通过限制组织局部缺血(视网膜激光光凝术)和/或血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的过度分泌(玻璃体腔注射抗 VEGF 药物)的治疗来预防 RNV 形成,但以上治疗均有不同程度的限制性。视网膜激光光凝术存在多种并发症如视网膜出血、视功能不良等,抗 VEGF 药物治疗长期疗效和安全性也尚不确定,因此仍需深入了解 ROP 所涉及的机制,并开发新的治疗方案^[3-4]。

RNV 的形成涉及两种不同的机制,即血管发生和血管生成。前者是指由血管内皮祖细胞发育成血管内皮细胞并最终形成血管的过程;后者是指在原有的毛细血管或者微静脉基础上,通过血管内皮细胞的增殖、分化和迁移,以芽生或非芽生的形式生成新生的血管,大量研究证实眼部新生血管的形成具备上述两种方式^[5-6]。在血管发生的机制中,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)发挥着重要的作用,本课题组前期研究表明 BMSCs 可被募集到缺氧的视网膜中并分化为如血管内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞类型促进眼部新生血管的形成^[7-8]。然而缺氧条件下 BMSCs 是否也可通过血管生成的方式促进 RNV 的形成及其潜在的机制尚不清楚。因此,本研究拟采用体外细胞共培养模型,利用 BMSCs、猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞(RF/6A)和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),观察缺氧条件下 BMSCs 对血管内皮细胞迁移和血管形成能力的影响,丰富 RNV 的分子机制,为临床诊治提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(雄性、4~6周龄),购自于空军军医大学实验动物中心。实验动物的使用和处死根据中国科学技术委员会颁布的实验动物管理条例和 ARVO 规范进行。RF/6A 购自于中国科学院细胞库, HUVECs 为自主培养。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco), DME/F12 培养基(HyClone), 内皮细胞专用培养基(endothelial cell medium, ECM, ScienCell), 孔径 8 μ m 的 Transwell 小室(Millipore), Matrigel 基质胶(BD)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 的培养与鉴定 BMSCs 采用全骨髓贴壁法培养。取 4~6 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,脱颈处死,75%乙醇浸泡消毒,于超净台中取其股骨和胫骨,将骨髓冲洗到含有 10% FBS 和 1%青霉素/链霉素的 DME/F12 培养基中,过滤并铺在培养皿中。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 下于 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,每 3d 更换 1 次培养基,直至达到 80%~90%融合度后传代。将生长状态良好的第 3 代

BMSCs 悬浮于 PBS 中,并将密度调节至每 45 μ L PBS 含细胞 1 \times 10⁶ 个。细胞分为五管,其中一管用作阴性对照,其他管中分别加入 PE-CD90、PE-CD44、FITC-CD34 和 FITC-CD45 抗体,室温孵育 1h 后将细胞重悬于 PBS 中并通过流式细胞仪测定。

1.2.2 HUVECs 和 RF/6A 的培养 HUVECs 取材于空军军医大学第一附属医院妇产科,从新鲜脐带中分离。将细胞在含有 5% FBS、1%青霉素/链霉素和 1%内皮细胞生长补充剂的 ECM 专用培养基中进行培养,第 3~6 代用于研究。RF/6A 在含有 10% FBS 和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中培养,第 3~8 代用于实验。

1.2.3 BMSCs 缺氧模型的建立和条件培养基的制备 采用三气培养箱模拟物理缺氧条件。BMSCs 换液后置于 37 $^{\circ}$ C 体积分数为 1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 的三气培养箱内缺氧培养 24h。取缺氧条件下培养的 BMSCs 培养基作为缺氧组的条件培养基(conditional medium, CM)、同时取常氧条件下培养的 BMSCs 培养基作为常氧组的 CM、血管内皮细胞的正常培养基作为对照组的 CM。

1.2.4 Transwell 实验 采用 24 孔 Transwell 小室(8 μ m)进行迁移测定。将 RF/6A(2 \times 10⁴/孔)和 HUVECs(1 \times 10⁵/孔)的细胞悬浮液分别接种到 Transwell 上室中,并将 500 μ L 不同组的 CM 添加到下室,继续在培养箱中常规培养 24h。然后将小室置于 4%多聚甲醛中 20min,小心擦拭小室上腔未迁移的细胞,继续将小室用结晶紫染色 15min。PBS 洗 3 次后在显微镜下随机取 6 个视野拍照并计数。

1.2.5 管腔形成实验 Matrigel 基质胶于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜消融,1:1 稀释后加入 96 孔板(50 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C 静置 30min 使胶凝固。将 RF/6A 和 HUVECs 消化成悬液,每孔加入 5 \times 10⁴ 个细胞,再用超滤后的对照组 CM、常氧条件下 BMSCs 的 CM 和缺氧条件下 BMSCs 的 CM 补足至 200 μ L,混匀后常规培养 6h。显微镜下随机选取 3 个视野拍照, Image J 软件分析。

统计学分析:使用 SPSS17.0 统计学软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。所有研究数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较多个样本均数的差异,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养和鉴定结果 如上提取 BMSCs,第 3d 首次换液后有少许短棒状的细胞贴壁,第 6d 可见紧密排列、长梭状的细胞(图 1A,B)。首次传代后,细胞状态良好,呈多触角状生长,第 3 代细胞大部分大小相似、呈成纤维状、多触角贴壁(图 1C,D)。取生长状态良好的细胞进行流式,鉴定其特异性表面抗原标志物。结果显示 CD90 和 CD44 呈阳性(图 1E,F), CD34 和 CD45 呈阴性(图 1G,H),证明成功培养了 BMSCs,可用于后续实验。

2.2 缺氧条件下 BMSCs 的 CM 对血管内皮细胞迁移的影响 采用 Transwell 方法检测常氧和缺氧条件下的 BMSCs 对 RF/6A 迁移的影响。结果显示,对照组、常氧组和缺氧组的血管内皮迁移数量分别为 19.00 \pm 3.61、32.33 \pm 3.06、114.00 \pm 11.53 个,差异有统计学意义($F = 153.3, P < 0.001$)。相对于对照组,常氧组和缺氧组的血管内皮细胞迁移数量在 24h 后均有增加,缺氧组的迁移数量最多(均 $P < 0.01$,图 2)。同样分组和方法检测常氧和缺氧条

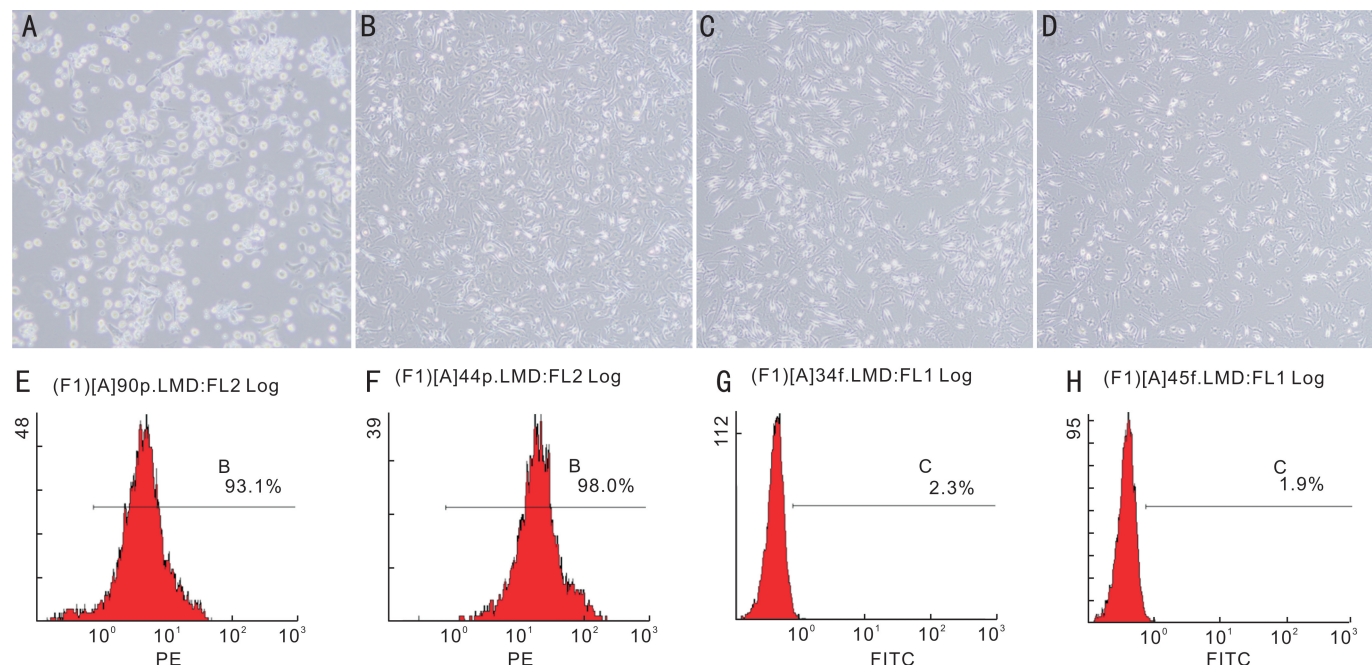


图1 BMSCs的形态观察和鉴定($\times 200$) A:第3d少许细胞贴壁;B:第6d细胞呈紧密排列、长梭状;C:第1代细胞呈多触角状生长;D:第3代细胞呈成纤维状、多触角贴壁生长;E~H:流式鉴定 BMSCs 表面标记物 CD90、CD44 阳性,CD34 和 CD45 阴性(E:CD90; F:CD44;G:CD34;H:CD45)。

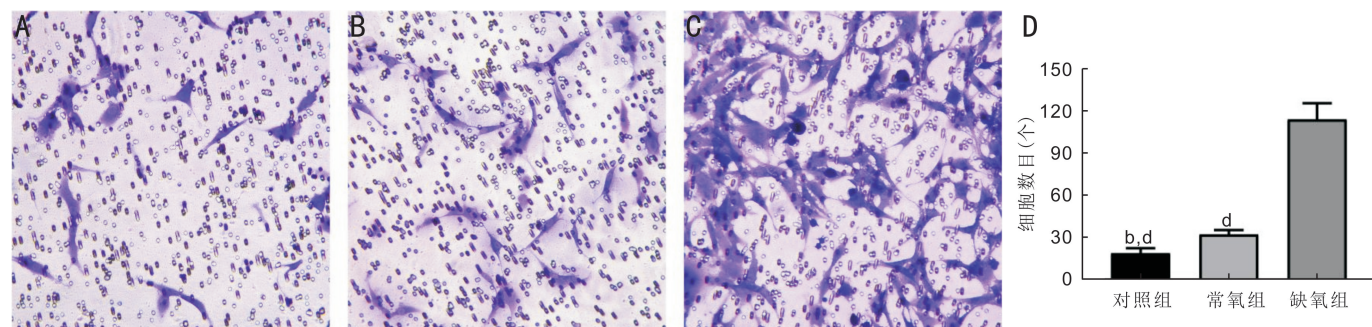


图2 Transwell 检测不同组细胞条件培养基作用24h对 RF/6A 的迁移能力($\times 200$) A:对照组;B:常氧组;C:缺氧组;D:迁移数量统计图;^b $P < 0.01$ vs 常氧组;^d $P < 0.001$ vs 缺氧组。

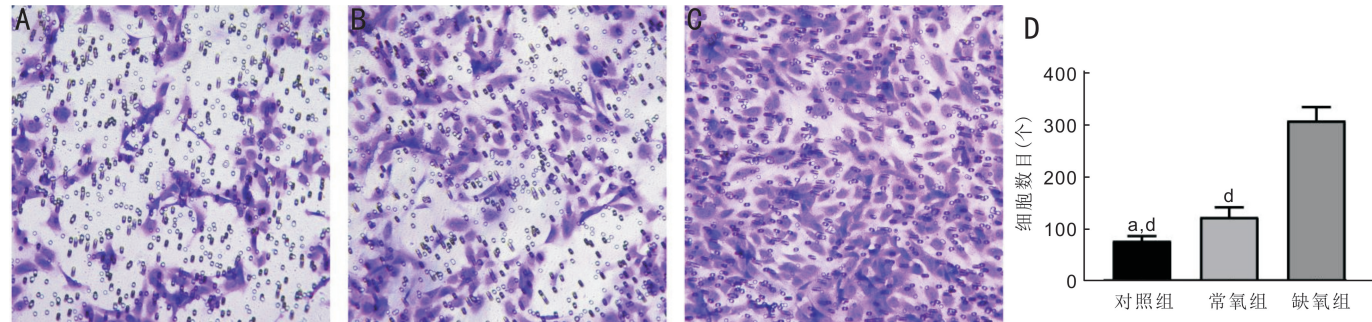


图3 Transwell 检测不同组细胞条件培养基作用24h对 HUVECs 的迁移能力($\times 200$) A:对照组;B:常氧组;C:缺氧组;D:迁移数量统计图;^a $P < 0.05$ vs 常氧组;^d $P < 0.001$ vs 缺氧组。

件下的 BMSCs 对 HUVECs 迁移的影响,结果与 RF/6A 相似,对照组、常氧组和缺氧组的 HUVECs 迁移数量分别为 76.00 ± 9.54 、 122.00 ± 18.68 、 307.70 ± 25.97 个,差异有统计学意义 ($F = 121.5$, $P < 0.001$),缺氧组处理的 HUVECs 迁移数量大于对照组和常氧组 (均 $P < 0.05$,图3)。

2.3 缺氧条件下 BMSCs 对血管内皮细胞管腔形成能力的影响 RF/6A 经各组 CM 孵育 6h 后,对照组、常氧组和缺氧组的血管内皮细胞的成管数目、成管总长度和分支数如下:(1)成管数目: 12.00 ± 3.00 、 37.00 ± 4.58 、 51.00 ± 3.61 个,差异有统计学意义 ($F = 81.7$, $P < 0.001$);(2)成管总长度:

$17.41 \times 10^3 \pm 1.45 \times 10^3$ 、 $21.48 \times 10^3 \pm 1.20 \times 10^3$ 、 $33.68 \times 10^3 \pm 2.08 \times 10^3 \mu\text{m}$,差异有统计学意义 ($F = 62.1$, $P < 0.001$);(3)分支数: 120.70 ± 6.02 、 165.70 ± 10.69 、 214.30 ± 14.57 个,差异有统计学意义 ($F = 54.41$, $P < 0.001$)。结果显示缺氧组的管腔形成能力明显上升,其成管数目、成管总长度和分支数均大于对照组和常氧组,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$,图4)。用相同刺激和方法处理 HUVECs,各组成管数目、成管总长度及分支数如下:(1)成管数目: 2.00 ± 1.00 、 6.67 ± 1.53 、 30.0 ± 03.61 个,差异有统计学意义 ($F = 124.0$, $P < 0.001$);(2)成管总长度: $8.55 \times 10^3 \pm 1.58 \times 10^3$ 、

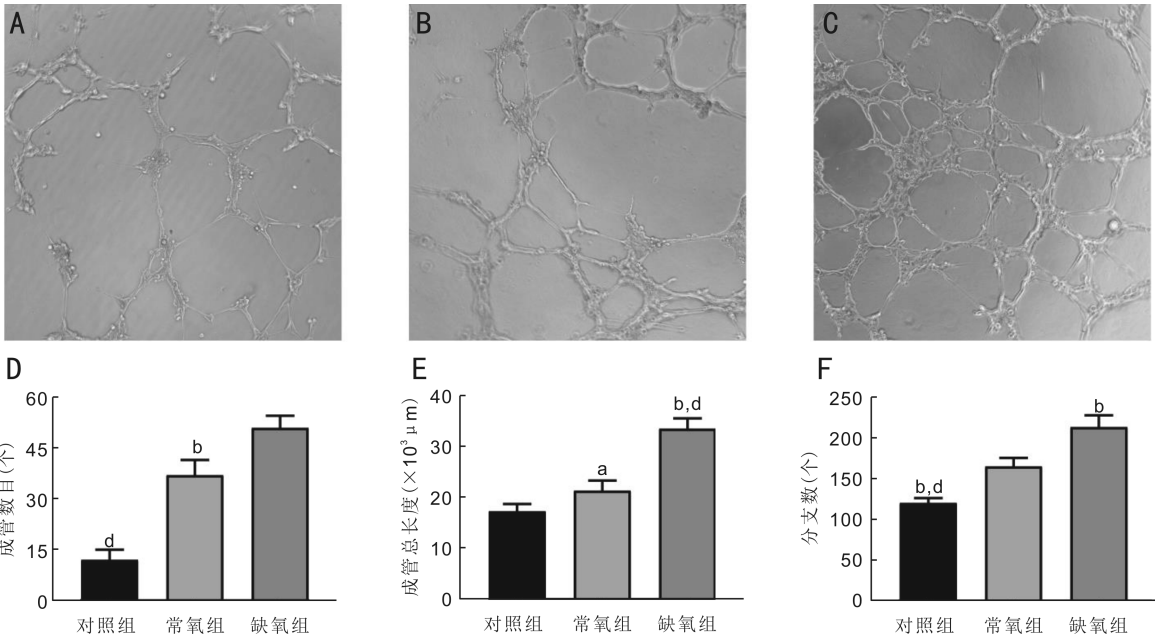


图4 管腔形成实验检测不同组细胞条件培养基作用6h对RF/6A的成管能力($\times 200$) A:对照组;B:常氧组;C:缺氧组;D:成管数目统计图(^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.001$ vs 缺氧组);E:成管总长度统计图(^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 常氧组);F:分支数统计图(^b $P < 0.01$ vs 常氧组; ^d $P < 0.001$ vs 缺氧组)。

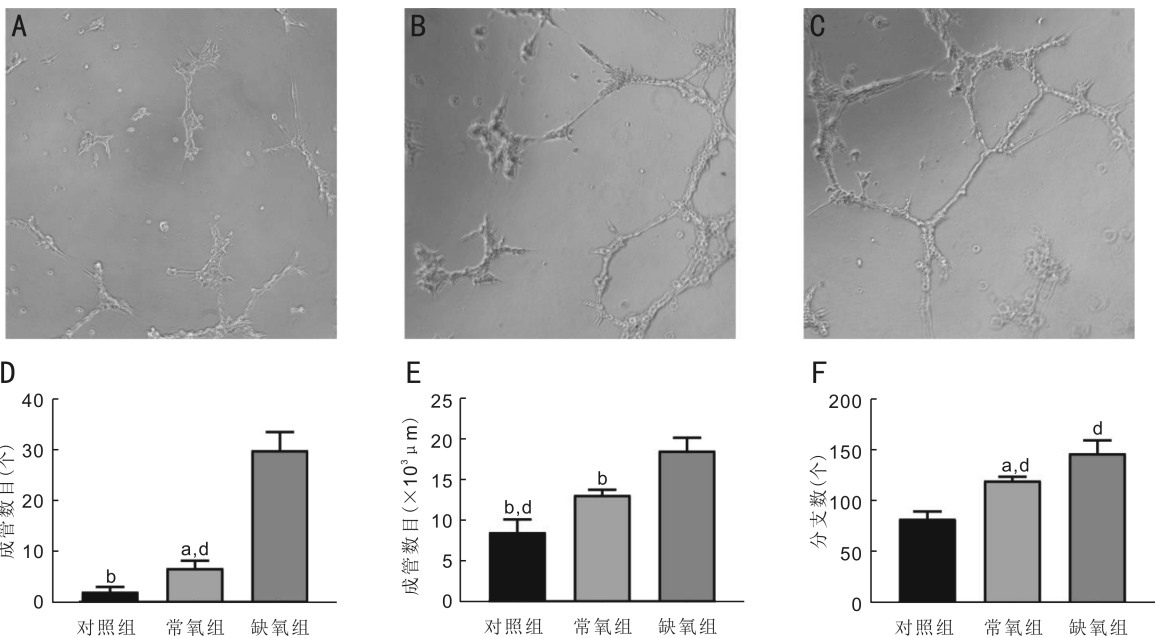


图5 管腔形成实验检测不同组细胞条件培养基作用6h对HUVECs的成管能力($\times 200$) A:对照组;B:常氧组;C:缺氧组;D:成管数目统计图(^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^d $P < 0.001$ vs 缺氧组);E:成管总长度统计图(^b $P < 0.01$ vs 缺氧组; ^d $P < 0.01$ vs 常氧组);F:分支数统计图(^a $P < 0.05$ vs 缺氧组; ^d $P < 0.01$ vs 对照组)。

$13.15 \times 10^3 \pm 0.66 \times 10^3$ 、 $18.64 \times 10^3 \pm 1.63 \times 10^3 \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($F = 41.12, P = 0.0003$); (3) 分支数: 83.00 ± 7.21 、 120.70 ± 4.04 、 147.70 ± 12.86 个, 差异有统计学意义 ($F = 40.63, P = 0.0003$)。结果也显示相对于对照组和常氧组, 缺氧组的管腔形成能力显著增加 (均 $P < 0.05$, 图5), 同RF/6A类似。

3 讨论

ROP患者出生后暴露于高氧环境时, 由于缺乏健康血管发育所必需的因素, 发生氧化应激、氧调节的促血管生成因子的下调和促炎因子的上调, 导致视网膜和脉络膜血管闭塞, 当返回常氧条件时, 形成由缺氧代偿的病理性新生血管^[9]。BMSCs是骨髓来源细胞的一种重要类型,

本组前期研究和文献表明, BMSCs可以被募集到缺氧的视网膜和脉络膜中, 通过与新生的血管芽结合或者向血管内皮细胞和平滑肌细胞等多种细胞类型的分化促进眼部新生血管的形成^[7,10-11]。Hou等^[7]将BMSCs移植到激光诱导的脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)小鼠模型中, 发现BMSCs可分化为上述多种细胞类型促进新生血管的形成。Cai等^[11]也发现, 在糖尿病小鼠CNV中, BMSCs可被募集到CNV中且VEGF和基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor-1, SDF-1)等表达上调。而缺氧条件下的BMSCs对RNV的研究较少, 因此需要深入探讨。

本研究采用常氧和缺氧条件下BMSCs的CM处理两

种血管内皮细胞 RF/6A 和 HUVECs, 观察其对 RNV 的影响。RF/6A 是视网膜和脉络膜的组合细胞, 为视网膜的特异性细胞系; HUVECs 是从人脐带静脉血管内皮细胞中分离的原代细胞, 为研究新生血管的进展提供了重要的体外血管内皮细胞模型, 在视网膜新生血管的研究中也广泛应用^[12-13]。本研究结果表明, 在两种血管内皮细胞中, 相对于对照组和常氧组, 缺氧组的 CM 能明显提高血管内皮细胞的迁移和管腔形成能力, 表现为血管内皮细胞的迁移数量增多; 成管数目、成管总长度和分支数目增多。查阅文献可发现, 也有报道将缺氧条件下的 BMSCs 与 HUVECs 共培养可促进血管内皮细胞的增殖、迁移和血管生成情况, 而除了骨髓来源的 MSCs 外, 胎盘来源的 MSCs 与 HUVECs 共培养后, 随着缺氧水平的增加, HUVECs 管状结构的稳定性和促血管生成因子的表达水平也相应增加, 这与我们的研究相似^[14-15]。而本研究结果不仅证实来源于脐带较大血管的血管内皮细胞 HUVECs 中, 在代表 RNV 病理生理学部位的毛细血管脉管系统的血管内皮细胞 RF/6A 中, 缺氧条件下的 BMSCs 也具有提高血管内皮细胞迁移和血管生成的能力。

综上所述, 本研究证明, 缺氧条件下的 BMSCs 可以促进血管内皮细胞 HUVECs 和 RF/6A 的迁移和血管形成能力, 为 BMSCs 参与 RNV 性疾病的发生发展提供了体外理论支持。但缺氧条件下的 BMSCs 是如何调控血管内皮细胞血管生成的呢, 其涉及的分子机制是什么呢? 近期有研究证实, 缺氧条件下 BMSCs 来源的外泌体及其含有的遗传物质, 如信使 RNA (mRNA) 和 micro-RNA (miRNA), 可促进 HUVECs 的增殖、迁移和血管生成情况, 外泌体中的遗传物质在细胞通讯中起重要作用, 其可在生理和病理情况下由细胞分泌到细胞外, 参与病理性血管生成、氧化应激反应、免疫应答、炎症和肿瘤的过程^[16-17]。而缺氧条件下的 BMSCs 是否也可以通过外泌体及其含有的 miRNA 调控 RNV 呢, 这有待于我们进一步去研究, 通过体外到体内研究及潜在的分子机制, 再回到临床层面的研究, 有助于全面、深入地了解 RNV 性疾病的发生机制, 为相关靶点应用于临床转化医学和可能的新药开发提供重要的依据。

参考文献

- 1 Hellstrom A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet* 2013;382(9902):1445-1457
- 2 Campochiaro PA. Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)* 2013;91(3):311-321
- 3 Mintz-Hittner HA, Kuffel RR Jr. Intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or

- posterior zone II. *Retina* 2008;28(6):831-838
- 4 Xu J, Li Y, Hong J. Progress of anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease: benefits and challenges. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(8):1550-1557
- 5 Gao F, Hou H, Liang H, et al. Bone marrow-derived cells in ocular neovascularization: contribution and mechanisms. *Angiogenesis* 2016;19(2):107-118
- 6 Gergely K, Gerinec A. A consonant construction of the hyaloid and retinal vascular systems by the angiogenic process. *Bratisl Lek Listy* 2011;112(3):143-151
- 7 Hou HY, Liang HL, Wang YS, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions. *Mol Ther* 2010;18(10):1837-1845
- 8 燕洁静, 王海燕, 王雨生, 等. 低氧/高糖环境下间充质干细胞对 RPE 生物学特性的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(4):584-587
- 9 Rivera JC, Holm M, Austeng D, et al. Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *J Neuroinflammation* 2017;14(1):165
- 10 Gao X, Wang YS, Li XQ, et al. Macrophages promote vasculogenesis of retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model in mice. *Cell Tissue Res* 2016;364(3):599-610
- 11 Cai Y, Li X, Wang YS, et al. Hyperglycemia promotes vasculogenesis in choroidal neovascularization in diabetic mice by stimulating VEGF and SDF-1 expression in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2014;123:87-96
- 12 Moleiro AF, Conceicao G, Leite-Moreira AF, et al. A Critical Analysis of the Available In Vitro and Ex Vivo Methods to Study Retinal Angiogenesis. *J Ophthalmol* 2017;2017:3034953
- 13 Sun JX, Chang TF, Li MH, et al. SNAI1, an endothelial-mesenchymal transition transcription factor, promotes the early phase of ocular neovascularization. *Angiogenesis* 2018;21(3):635-652
- 14 Hou J, Zhong T, Guo T, et al. Apelin promotes mesenchymal stem cells survival and vascularization under hypoxic-ischemic condition in vitro involving the upregulation of vascular endothelial growth factor. *Exp Mol Pathol* 2017;102(2):203-209
- 15 Choi JH, Lim SM, Yoo YI, et al. Microenvironmental Interaction Between Hypoxia and Endothelial Cells Controls the Migration Ability of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells via alpha4 Integrin and Rho Signaling. *J Cell Biochem* 2016;117(5):1145-1157
- 16 Zhu J, Lu K, Zhang N, et al. Myocardial reparative functions of exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46(8):1659-1670
- 17 Bian S, Zhang L, Duan L, et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl)* 2014;92(4):387-397