

Kultur Primer Sel Endotelial Asal Darah Tepi Berinti Tunggal pada Beruk (*Macaca nemestrina*)

The Culture of Endothelial Primary Cell Derived from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Pig Tailed Macaque (*Macaca nemestrina*)

Mariya S^{1*}, Lydwina², Permanawati¹, Iskandriati D¹, Pamungkas J¹

¹*Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Institut Pertanian Bogor*

²*Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jalan Jenderal Sudirman 51, Jakarta 12930*

*Koresponden: mariyasilmi@gmail.com

Abstract. The technique of animal cell culture has long been used for biomedical research. This technique can reduce the use of animal models which are often hampered by ethical issues and animal welfare. Endothelial cells have been used in biomedical research for in vitro assay but availability is limited and it is difficult to culture. The objective of this research was to obtain the culture of endothelial primary cells from peripheral blood mononuclear cells of *Macaca nemestrina*. Mononuclear cells were grown using specific endothelial media. Cell population showed endothelial-like in morphology, which was successfully subcultured to passage 3 and expressed the endothelial cells antigen specific gene markers such as CD31, vWF, and VE-cadherin. Collectively, these results indicate that our cell culture is a reliable model for acquiring a population of cells with endothelial properties, and that it can be used for further research for bioactive compound assay.

Key words: *endothelial cells, Macaca nemestrina, peripheral blood mononuclear cells*

Pendahuluan

Teknik kultur sel hewan merupakan cara yang telah banyak digunakan dalam penelitian, khususnya biomedis. Penggunaan teknik kultur sel hewan, dapat dijadikan sebagai alternatif pengganti hewan model penelitian yang dalam penggunaannya sering dihadapkan masalah etika kesejahteraan hewan (animal welfare). Aplikasi kultur sel hewan dalam bidang biomedis, dengan teknik *in-vitro* tersebut di antaranya untuk menguji toksisitas suatu senyawa bioaktif yang nantinya diharapkan dapat menjadi obat ataupun vaksin. Sel endotelial banyak digunakan dalam uji toksisitas senyawa bioaktif yang berkaitan dengan angiogenesis dan pembuluh darah. Ketersediaan sel endotelial masih sedikit dan cukup sulit didapatkan. Sumber sel endotelial yang umum digunakan adalah pembuluh darah vena tali pusat manusia dan *American Type Culture Collection* (ATCC). Namun kedua sumber tersebut memiliki kendala dalam hal waktu dan biaya. Progenitor sel endotelial (endothelial progenitor cell/EPC) dapat dijadikan sebagai alternatif sumber sel endotelial, karena progenitor sel endotelial dapat dikembangkan menjadi sel endotelial matang, serta dapat diperoleh dari darah tepi (Lachman *et al.* 2012).

Satwa primata banyak digunakan sebagai hewan model penelitian, karena memiliki persamaan anatomi dan fisiologinya. Oleh karena itu, kultur sel endotelial asal satwa primata dapat mewakili ketersediaan endotelial asal manusia untuk kepentingan uji senyawa

bioaktif yang nantinya akan diaplikasikan untuk pengembangan pengobatan pada manusia (Bailey 2005). Tujuan penelitian ini untuk memperoleh kultur primer sel endotelial darah tepi berinti tunggal pada beruk (*Macaca nemestrina*), yang nantinya dapat ditransformasikan menjadi stok kultur sel endotelial dan dapat digunakan untuk uji senyawa bioaktif kandidat obat.

Materi dan Metode

Isolasi darah tepi *M. nemestrina*

Darah tepi dikoleksi dari vena femoralis (pangkal paha) dalam tabung darah dengan antikoagulan EDTA. Koleksi darah dilakukan dokter hewan mengikuti prosedur yang telah disetujui Komisi Pengawasan Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian, Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat IPB KPKPHP PSSP IPB No. 06-A003-IR (Adendum).

Isolasi dan kultur sel punca mesenkimal darah tepi

Sampel darah tepi sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan EDTA, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 700 x g selama 15 menit. Plasma dikoleksi, kemudian lapisan *buffy* yang mengandung sel berinti diambil. Kemudian diresuspensi menggunakan 10 mL PBS steril, lalu ditambahkan pada larutan Ficoll dengan metode *overlay*. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 1100 x g selama 30 menit. Lapisan cincin putih yang mengandung sel-

sel berinti tunggal diambil dan dipindahkan ke tabung baru, serta ditambahkan media tanpa serum, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 700X g selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan ke dalam pelet sel ditambahkan media tanpa serum. Tabung kembali disentrifugasi dengan kecepatan 700X g selama 10 menit. Supernatan dibuang kembali. Pelet sel ditambahkan 5 mL media tanpa serum, kemudian jumlah sel dihitung menggunakan hemasitometer. Sel ditumbuhkan pada pelat kultur jaringan 6 sumur dengan konsentrasi 10⁷ sel per sumur dalam media endotelial (Lonza™). Sel diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 5%.

Subkultur sel

Subkultur sel dilakukan setelah kultur mencapai 80% konfluensi. Media dibuang dan sel dicuci dengan 2 mL PBS. Ke dalam setiap sumur ditambahkan 1 mL tripsin 0,25% untuk melepaskan sel dari sumur. Pelat kultur diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 5% hingga sel lepas. Ditambahkan 1 mL media pertumbuhan untuk menginaktivasi tripsin. Sel diresuspensi

Ekstraksi mRNA sel punca mesenkimal

Ekstraksi mRNA dilakukan menggunakan kit Rneasy (Qiagen, USA) mengacu pada prosedur perusahaan.

PCR sampel sel punca mesenkimal

Reverse transcriptase. Proses reverse transcriptase dilakukan untuk memperoleh cDNA sampel RNA yang sudah dimurnikan, dengan menggunakan kit Superscript III RT (Invitrogen, USA) yang mengacu pada prosedur perusahaan.

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Amplifikasi PCR dilakukan untuk melihat ekspresi gen sel endotelial, yaitu CD31, vWF, VE-cadherin, VEGFR-2, Flk-1. Ekspresi gen gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase (GAPDH) digunakan sebagai kontrol cDNA dari masing-masing sampel. Disiapkan pereaksi PCR yang terdiri atas penyangga PCR 10x, MgCl₂ 50mM, dNTPs, *Taggold*, air bebas nuklease, primer (forward dan reverse) dan sampel cDNA. Daftar primer yang digunakan terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1 Sekuens dan suhu penempelan primer penanda permukaan sel endotelial

Primer	Sekuens (5' - 3')	Suhu Annealing (°C)	Referensi
CD31	F CAACGAGAAAATGTCAGA	50	Gerecht-Nir <i>et al.</i> 2005
	R GGAGCCTTCCGTTCTAGAGT		
vWF	F AGGCAGCTCCACTCGGCACAT	58	Kaufman <i>et al.</i> 2003
	R AGCAAACAGTGGTAAAGAGGAGGAC		
VE-cad	F ACGGGATGACCAAGTACACG	54	Levenberg <i>et al.</i> 2010
	R ACACAGTTTGGGTCGGTAGG		
VEGFR-2	F AACAAAGTCGGGAGAGGA	58	Ricoisse-Roussanne <i>et al.</i> 2004
	R TGATAAGAAGTACCAGAAGA		
Flk-1	F ATGCACGGCATCTGGGAATC	58	Kaufman <i>et al.</i> 2003
	R TGACTTCTCCTGCATGCACT		
GAPDH	F CACCATCTTCCAGGAGCGAG	58	Tian <i>et al.</i> 2010
	R TCACGCCACAAGTTTCCC		

dan dipindahkan seluruhnya ke dalam tabung sentrifuse 15 mL. Suspensi sel disentrifugasi pada kecepatan 700x g selama 10 menit. Supernatan dibuang lalu pelet sel diresuspensi menggunakan media pertumbuhan. Sel dihitung dengan hemasitometer. Sel ditumbuhkan kembali dengan konsentrasi 10⁶ sel per sumur, sedangkan sisa sel ditampung pada tabung mikro. Suspensi sel pada tabung mikro disentrifugasi pada kecepatan 4000x g selama 1 menit. Supernatan dibuang lalu ke dalam tabung mikro tersebut ditambahkan 1 mL PBS untuk mencuci sisa media dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 4000x g selama 1 menit. Proses pencucian sel dilakukan sebanyak dua kali. Pelet sel disimpan pada suhu -20°C untuk proses ekstraksi mRNA.

Pertama dilakukan proses pre-PCR yang bertujuan mengaktifkan enzim polimerase pada suhu 94°C selama 10 menit. Kemudian dilanjutkan tahapan PCR yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 54°C selama 30 detik; dan elongasi pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahapan amplifikasi PCR diulang sebanyak 40 siklus. Setelah siklus terakhir selesai, ditambahkan proses elongasi selama 10 menit pada suhu 74°C.

Setelah proses amplifikasi selesai, dilakukan proses visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa konsentrasi 2% mengandung etidium bromida 0,1 µg/mL. Marker DNA 100 bp dan hasil PCR ditambahkan penyangga *loading* (1:5), kemudian dimasukkan

ke dalam sumur gel. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik 100 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan Gel Doc.

Analisis data

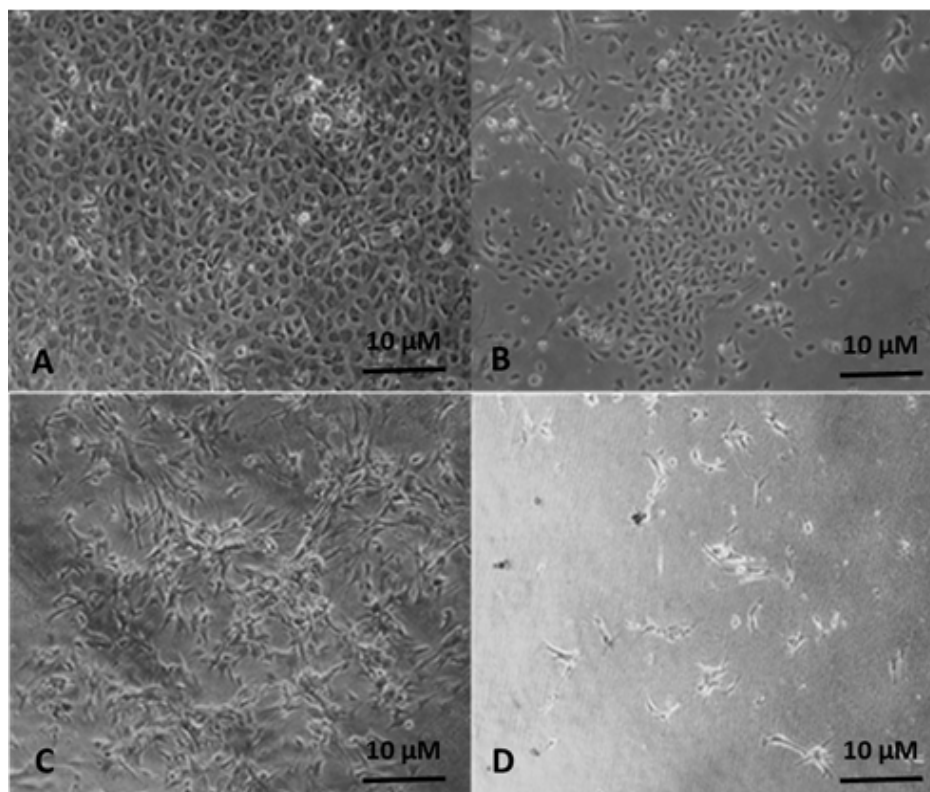
Analisis data yang dilakukan meliputi morfologi dan deteksi ekspresi gen penanda permukaan sel endotelial.

Hasil dan Pembahasan

Sel endotelial telah berhasil diisolasi dari darah tepi beruk dan ditumbuhkan dalam media endotelial. Sel mulai tumbuh dan dapat diamati menempel pada substratnya pada hari ke 12. Pertumbuhan sel pada Pasase 0 telah menunjukkan morfologi *endothelial-like* dengan bentuk menyerupai *cobblestone* (Gambar 1). Subkultur dilakukan setelah

penurunan jumlah sel. *Senesens* juga dipacu kerusakan DNA, induksi stres dan kondisi kultur. Salah satu faktor yang mempengaruhi *senesens* dalam kultur sel adalah konsentrasi oksigen. Terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat terjadi karena tinggi oksigen yang diketahui dapat memacu *senesens*, sebaliknya kultur dengan konsentrasi oksigen lebih rendah dapat memperlambat proses *senesens* (Guadamillas *et al.* 2011).

Bersamaan dengan pasase sel, sebagian sel dijadikan pelet yang digunakan untuk deteksi molekul penanda permukaan sel endotelial. Ekstraksi mRNA dilakukan untuk pelet sampel sel dari setiap pasase. Hasil ekstraksi mRNA kemudian ditranskripsi balik agar menghasilkan cDNA yang merupakan DNA utas ganda, salinan dari mRNA tersebut. cDNA tersebut diamplifikasi menggunakan primer spesifik penanda permukaan sel endotelial, yaitu CD31



Gambar 1 (A) Sel endotelial Pasase 0, (B) Pasase 1, (C) Pasase 2 dan (D) Pasase 3. Morfologi sel kuboid, tetapi jumlah sel pada setiap pasasenya menurun

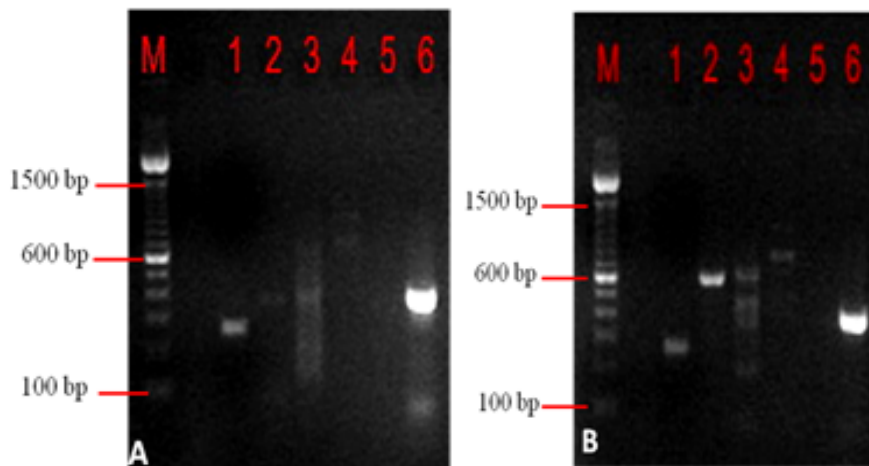
sel mencapai konfluensi 80% dan berhasil disubkultur sampai Pasase 3. Populasi sel pada Pasase 3 menunjukkan pertumbuhan yang lambat dan tidak dapat mencapai konfluensi 80%, diduga sel ini mengalami *senesens*, suatu peristiwa pada sel yang tidak tertransformasi mengalami pemendekan telomer, karena tidak aktifnya enzim telomerase, sehingga mengakibatkan apoptosis yang mempengaruhi

(256 bp), vWF (582 bp), VE-cad (597bp), VEGFR-2 (585 bp), dan Flk-1 (537 bp), serta GAPDH (352 bp) yang digunakan sebagai kontrol cDNA.

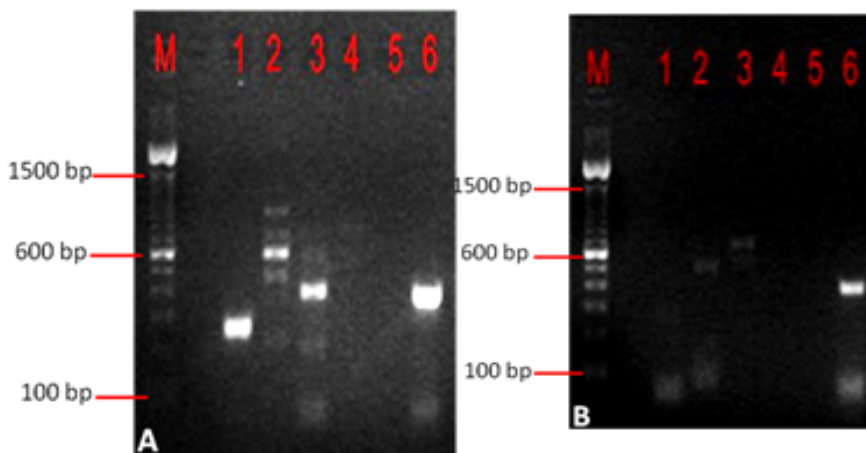
Pada Pasase 0, hasil visualisasi menunjukkan ekspresi CD31 dan VE-cad, sedangkan vWF, VEGFR-2, dan Flk-1 tidak diekspresikan (Gambar 2A). Ekspresi CD31, vWF, dan VE-cad tampak pada visualisasi

produk PCR sampel sel endotelial Pasase 1, sedangkan VEGFR-2 dan Flk-1 tidak diekspresikan (Gambar 2B). Seperti pada Pasase 1, ekspresi penanda permukaan CD31, vWF, dan VE-cad juga tampak pada visualisasi hasil PCR sampel sel Pasase 2 dan 3, sedangkan VEGFR-2 dan Flk-1 kembali tidak diekspresikan pada kedua pasase ini (Gambar 3). Ekspresi GAPDH muncul pada visualisasi semua pasase sampel sel (Gambar 2 dan 3).

sel endotelial. *Growth factor* yang terkandung dalam media sel endotelial tersebut, di antaranya *vascular endothelial growth factor*, *epidermal growth factor*, *fibroblast growth factor-b*, *insulin like growth factor*, serta *fetal bovine serum*. Dengan adanya *growth factor*, sel-sel selain sel endotelial yang terdapat dalam sel darah tepi berinti tunggal tidak dapat bertahan hidup, sehingga hanya sel endotelial yang dapat tumbuh dan berkembang.



Gambar 2 Visualisasi produk PCR sel endotelial sampel sel Pasase 0 (A) dan Pasase 1 (B). Penanda 100 bp (M), CD31(1), vWF (2), VE-cad (3) VEGFR-2 (4), Flk-1 (5), GAPDH (6)



Gambar 3 Visualisasi produk PCR sel endotelial sampel sel Pasase 2 (A) dan Pasase 3 (B). Penanda 100 bp (M), CD31(1), vWF (2), VE-cad (3) VEGFR-2 (4), Flk-1 (5), GAPDH (6)

Sel-sel darah tepi berinti tunggal dari beruk yang diisolasi dengan menggunakan teknik sentrifugasi gradien, sel darah akan terpisah berdasarkan densitasnya dan sel darah berinti tunggal akan berada pada satu lapisan yang sama (Koerner et al. 2006).

Sel darah tepi berinti tunggal yang mengandung progenitor sel endotelial ditumbuhkan pada media endotelial yang mengandung beberapa faktor tumbuh (*growth factor*) guna membantu seleksi dan pertumbuhan

Pada penelitian ini, sel endotelial yang berasal dari darah tepi berhasil dikulturisasi. Berdasarkan pengamatan mikroskopik, koloni sel endotelial Pasase 0 baru mulai tampak setelah hari ke-12 inkubasi. Pertumbuhan sel ini tergolong lambat. Hal ini karena jumlah progenitor sel endotelial dalam darah tepi cukup sedikit, sekitar 0,01%. Selain itu, adanya perubahan lingkungan tumbuh yang awalnya *in vivo* menjadi *in vitro* menyebabkan sel harus beradaptasi, sehingga proliferasi sel lebih lambat (Smadja et al. 2007). Namun populasi sel yang

tumbuh menunjukkan morfologi *endothelial-like* dengan bentuk *cobble stone* (Gambar 1A). Setelah sel mencapai 80% konfluensi, sel disubkultur menjadi Pasase 1. Morfologi sel pada Pasase 1 juga menunjukkan morfologi *endothelial-like*. Pasase 2 yang merupakan hasil subkultur Pasase 1 menunjukkan perubahan morfologi sel, sebagian populasi sel tampak memanjang. Selain itu, proliferasi sel menjadi lebih lambat dan hampir tidak menunjukkan pertumbuhan, Hal ini dapat dilihat dari koloni sel yang tidak membesar ataupun bertambah. Koloni sel yang tumbuh mengalami penuaan tanpa penambahan jumlah sel, sehingga dilakukan subkultur sel dari Pasase 2 menjadi Pasase 3. Jumlah sel yang ditumbuhkan pada Pasase 3 menjadi lebih sedikit, karena sel pada Pasase 2 jumlahnya sedikit dan sebagian dijadikan pelet untuk proses uji PCR. Populasi sel pada pasase ini akhirnya mengalami *finite* ditunjukkan dengan menurunnya kemampuan proliferasi sel dan justru malah mengalami kematian. *Finite* sel terjadi, karena sel yang ditumbuhkan merupakan kultur primer, sehingga belum stabil pertumbuhannya, serta jumlah sel yang sedikit dapat menyebabkan pertumbuhan menjadi terhambat. Namun dari sel yang masih tersisa pada Pasase 3 tetap menunjukkan morfologi *endothelial-like*. Seluruh sel pada Pasase 3 dipanen dan dijadikan pelet untuk diuji penanda sel endotelialnya.

Selain pengamatan mikroskopik, dilakukan juga uji deteksi penanda permukaan sel endotelial, yaitu CD31, vWF, VE-cad, VEGFR-2, Flk-1, dan GAPDH sebagai kontrol cDNA, dengan menggunakan teknik PCR untuk sampel sel endotelial Pasase 0 sampai 3. Penanda permukaan CD31 diekspresikan pada seluruh pasase sel. CD31 sering disebut juga *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1). CD31 merupakan penanda permukaan sel endotelial matang yang berperan dalam pelekatan-pelekatan sel endotelial dan dalam proses migrasi leukosit melalui jaringan interseluler sel-sel endotelial (Woywodt *et al.* 2006). Von Willebrand Factor (vWF) merupakan glikoprotein yang dapat dilibat dalam hemostasis primer. vWF berfungsi sebagai mediator penempelan (adhesi) platelet pada subendotelium yang rusak dan berperan dalam proses koagulasi darah. Ekspresi vWF hanya terbatas pada sel endotelial dan megakariosit. Oleh karena itu vWF sering digunakan sebagai penanda untuk membedakan sel endotelial dari sel tipe lainnya (Wang *et al.* 2004). Hasil deteksi vWF menunjukkan bahwa vWF diekspresikan pada Pasase 1, 2, dan 3,

sedangkan pada Pasase 0, pita hasil amplifikasi vWF tidak muncul. Hal ini karena vWF yang merupakan penanda permukaan sel endotelial matang belum diekspresikan pada Pasase 0 dan sel bersifat belum matang sepenuhnya. VE-cadherin bersama dengan CD31 merupakan molekul transmembran spesifik untuk kontak antar sel endotelial. VE-cadherin disebut juga *cadherin-5* diekspresikan secara selektif oleh sel endotelial pada seluruh pembuluh darah. VE-cadherin mampu memediasi pelekatan homofilik antarsel pada sel yang telah ditransfeksi (Lampugnani *et al.* 1995). Ekspresi VE-cadherin tampak pada semua pasase, namun pita yang menunjukkan ekspresi VE-cad ini masih sangat tipis dan muncul pita lain yang tidak spesifik (non target). Pita yang tipis dan munculnya pita yang bukan target karena primer yang digunakan masih kurang spesifik dan suhu penempelan primer yang belum optimum. *Vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) dikenal juga sebagai *Kinase Insert Domain Receptor* (KDR). VEGFR-2 memiliki peranan sebagai mediator utama dalam stimulasi proliferasi, migrasi, dan pembentukan pembuluh darah baru (Sills *et al.* 2006). *Fetal liver kinase-1* (Flk-1) dikenal juga sebagai VEGFR-2. Namun pada penelitian ini, digunakan primer yang berbeda antara VEGFR-2 dengan Flk-1. Kedua penanda permukaan sel endotelial ini tidak diekspresikan pada semua pasase sel. Tidak adanya ekspresi VEGFR-2 dan Flk-1 ini dimungkinkan, karena sel yang ditumbuhkan tidak mengalami vaskularisasi dan tidak terbentuknya reseptor VEGFR-2 sebagai respon terhadap VEGF sehingga proses translasi protein tidak terjadi. Menurut Shibuya (2006), VEGFR-2 tergolong dalam *early marker* dari progenitor sel endotelial, ekspresi molekul penanda ini akan menurun berkebalikan dengan peningkatan kematangan sel endotelial, dan juga dinyatakan bahwa ekspresi VEGFR-2 terbatas pada sel endotelial secara *in vivo*. Ekspresi kontrol cDNA, yaitu GAPDH yang merupakan *housekeeping gene*, muncul pada semua pasase sel, artinya pelet sel setiap pasase benar mengandung sel, dan proses ekstraksi mRNA serta transkripsi balik menjadi cDNA berhasil dilakukan. Perbedaan ketebalan pita ekspresi GAPDH pada setiap pasase terjadi, karena adanya perbedaan jumlah sel yang diekstraksi. Hal ini dapat berpengaruh pada ketebalan pita ekspresi penanda-penanda permukaan sel endotelial. Semakin sedikit jumlah mRNA, maka jumlah molekul protein penanda permukaan juga semakin sedikit, dan sebaliknya.

Simpulan dan Saran

Sel endotelial asal sel darah tepi berinti tunggal pada beruk berhasil diisolasi dan dikulturasikan. Sel endotelial tersebut menunjukkan morfologi *endotelial-like* menyerupai *cobble Stone*. Populasi sel yang dikulturasikan juga menunjukkan ekspresi penanda permukaan spesifik sel endotelial, seperti CD31, vWF, dan VE-cad.

Populasi sel endotelial masih harus diperbanyak dengan mengkulturkan populasi sel tersebut menggunakan matriks ekstraseluler, yang dapat mendukung pertumbuhan sel endotelial, sehingga dapat dihasilkan sel yang banyak untuk kepentingan uji senyawa bioaktif in-vitro.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai dan difasilitasi Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Institut Pertanian Bogor (PSSP, LPPM-IPB).

Daftar Pustaka

- Bailey.** 2005. Non human primates in medical research and drug development: a critical review. *Biog Amine*. 19: 235-255
- Gerecht-Nir S, Osenberg S, Nevo O, Ziskind, Coleman R, Itskovitz-Eldor.** 2005. Vascular development in Early Human Embryos and in Teratoma Derived Human Embryonic Stem Cells. *Biol Reprod*. 71:2029-2036
- Guadamillas MC, Cerezo A, del Pozo MA.** 2011. Overcoming anoikis – pathways to anchorage independent growth in cancer. *J Cell Sci* 124:3189-3197
- Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET, Auerbach R, Plendl J, Thomson JA.** 2003. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic. *Blood* 103: 1325-1332
- Koerner J, Nasic D, Romero JD, Brehm W, Varlet PM, Grogan SP.** 2006. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 24: 1613-1619.
- Lachman R, Lanuti P, Miscia S.** 2012. Characterization of circulating endothelial cells (CECs) in peripheral blood. *Cytometry Part A* 81(7): 549–551.
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, Dejana E.** 1995. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 129:203-217
- Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, Kraehenbuehl TP, Langer R.** 2010. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 5(6):1115-26.
- Ricousse-Roussanne SL, Barateau V, Conteres J, Boval B, Karaus-Berthier L, Tobelem G.** 2004. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovasc Res* 62:176-184.
- Shibuya M.** 2006. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* 13(2): 63-69.
- Sills AD, Blunden MJ, Mawdsley J, Bastin AJ, McAuley D, Griffiths M, Rampton DS, Yaqoob MM, Macey MG, Agrawal SG.** 2006. New flow cytometric technique for the evaluation of circulating endothelial progenitor cell levels in various disease groups. *J Immunol Methods* 316:107-115.
- Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P.** 2007. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* 23: 223–239.
- Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma H, Ma PX, Atala A, Zhang Y.** 2010. Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 31: 870–877.
- Wang X, Peng Y, Ma Y, Jahroudi N.** 2004. Histone H1-like protein participates in endothelial cell-specific activation of the von Willebrand factor promoter. *Blood* 104:1725-1732.
- Woywodt A, Kirsch T, Haubitz M.** 2006. Immunomagnetic isolation and FACS competing techniques for the enumeration of circulating endothelial cells. *Thromb Haemost* 96:1-2.