

# 人脐带血内皮祖细胞体外培养和鉴定\*\*\*

方立建<sup>1</sup>, 宋鄂<sup>2</sup>, 栾瑛<sup>2</sup>, 陆成伟<sup>2</sup>, 杨威<sup>2</sup>, 石慧<sup>2</sup>, 毕明超<sup>2</sup>

## Culture and identification of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood *in vitro*

Fang Li-jian<sup>1</sup>, Song E<sup>2</sup>, Luan Ying<sup>2</sup>, Lu Cheng-wei<sup>2</sup>, Yang Wei<sup>2</sup>, Shi Hui<sup>2</sup>, Bi Ming-chao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Fangshan District Liangxiang Hospital, Beijing 102401, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Fang Li-jian ★, Master, Physician, Department of Ophthalmology, Fangshan District Liangxiang Hospital, Beijing 102401, China

Correspondence to: Song E, Professor, Doctoral supervisor, Department of Ophthalmology, First Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China songe23@163.com

Supported by: the Doctor Center Foundation of Jilin Province, No. 2007018311\*; the International Cooperation Program of Committee of Science of Jilin Province, No. 20050705-3\*

Received: 2010-05-15  
Accepted: 2010-09-14

### Abstract

**BACKGROUND:** The method of traditional immunomagnetic beads sorting endothelial progenitor cells (EPCs) shows complicated operation, with high cost and low cell obtaining rate. Moreover, the proliferation and differentiation of EPCs are limited.

**OBJECTIVE:** To elucidate a method for *in vitro* induction and identification of EPC from human cord blood monocytes (CBMC), to realize EPC transplantation, and to provide enough cell source for improving blood vessel function.

**METHODS:** CBMCs were isolated by Percoll density gradient centrifugation from cord blood, *in vitro* induced to differentiate and amplified, and then identified by immunohistochemical and immunofluorescent staining and flow cytometry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** During culture, the cells became spindle-shaped and displayed cobble-stone morphology with outgrowth. On day 7, immunostaining of adherent cells was positive for the cell markers CD31 and vWF. (83.0±4.3)% of attached cells were positive for the double marker Dil-acLDL/FITC-UEA- I. The red fluorescence of Dil-acLDL-labeled EPCs lasted for over 6 weeks *in vitro*. On day 7, flow cytometric analysis showed positive staining of attached cell for CD34, CD133 and KDR (17.8±3.7)%, (22.1±4.4)% and (81.5±5.0)%, respectively. Results indicate that the mononuclear cells from CBMC differentiate into EPCs. It can differentiate into endothelial cells by *in vitro* amplification.

Fang LJ, Song E, Luan Y, Lu CW, Yang W, Shi H, Bi MC. Culture and identification of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(45): 8450-8454. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 传统免疫磁珠法分选内皮祖细胞的方法操作复杂、费用大, 细胞获得率较低, 且内皮祖细胞的增生及分化受限。

**目的:** 尝试改良人脐带血内皮祖细胞体外诱导分化及鉴定的方法, 为实现内皮祖细胞移植、改善血管功能提供足量细胞来源。

**方法:** 采用密度梯度离心方法获得人带血单个核细胞, 体外进行诱导、分化和扩增, 通过免疫组织化学、免疫荧光和流式细胞仪等技术对脐血来源的内皮祖细胞进行鉴定。

**结果与结论:** 脐带血单个核细胞在培养过程中出现梭形贴壁和铺路石样等形态; 在细胞培养至第 7 天, 免疫组织化学显示: CD31、vWF 在体外培养过程中的表达阳性; 免疫荧光染色表明: (83.0±4.3)% 的贴壁细胞双染呈阳性, 并且 Dil-acLDL 标记的内皮祖细胞红色荧光在体外可以持续 6 周以上; 第 7 天贴壁细胞流式细胞仪分析显示: CD34、CD133 和 KDR 分别为 (17.8±3.7)%、(22.1±4.4)%、(81.5±5.0)%。结果提示, 实验成功从脐带血单个核细胞中分离培养出内皮祖细胞, 在其体外可扩增并向为内皮细胞方向分化。

**关键词:** 内皮祖细胞; 细胞培养; 细胞移植; 人脐带血; 诱导分化  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.45.021

方立建, 宋鄂, 栾瑛, 陆成伟, 杨威, 石慧, 毕明超. 人脐带血内皮祖细胞体外培养和鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(45):8450-8454. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

## 0 引言

内皮祖细胞是指出生后机体中存在能特异性归巢于血管新生组织并分化成内皮细胞的一群干细胞, 包括从成血-血管干细胞到完全分化的内皮细胞之间一定阶段的细胞群体, 它不仅参与胚胎时期血管生成, 还与损伤的血管内皮的愈合和血管新生密切相关<sup>[1-4]</sup>。此前学者们分离内皮祖细胞多是采用免疫磁珠分离CD133阳性或CD34阳性细胞, 再从中进一步诱导、培养内皮祖细胞, 由于目前还没有发现内皮祖细胞的特异表面标志, 因此, 在利用某个表面标志分离时, 不仅分离难度增加而且可能丢失大量

的内皮祖细胞。实验尝试用密度梯度离心的方法, 直接从脐带血中分离单个核细胞, 进一步培养诱导出具有内皮祖细胞特性的细胞, 并观察其在体外增生、分化过程中细胞表面标志的表达情况, 为将来治疗缺血性疾病的实验研究与大规模临床应用提供充足的细胞来源。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 实验于2006-06/2008-06在吉林大学基础医学部病理学实验室完成, 实验室为教育部重点实验室, 生物安全的防护水平P2。

## 材料:

试剂及仪器	来源
M199 培养基、胎牛血清	美国 Gibco
血管内皮生长因子 (vasoendothelial growth factor, VEGF)	美国 Peprotech 公司
碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)	美国 Cytolab 公司
人纤维连接蛋白(FN)	美国 Chemicon 公司
牛脑提取物、异硫氰酸荧光素标 记的荆豆凝集素(FITC-UEA- I)	美国 Sigma 公司
荧光 Dil 标记乙酰化低密度脂 蛋白(Dil-acLDL)	美国 Molecular Probes 公司
phyco erythrin (PE) -CD133	德国 Miltenyi Biotec 公司
FITC-CD34 单克隆抗体	美国 R&D 公司
FITC-血管内皮细胞生长因子 受体(KDR) 单克隆抗体	美国 BD Pharmingen 公司
Percoll 分离液	美国 GE Healthcare 公司
CD31 单克隆抗体、兔血管性血 友病因子(vWF)单克隆抗体、 免疫组织化学试剂盒	中国 迈新公司

**实验方法:** 经患者本人及家属知情同意, 选取6例足月健康产妇, 剖宫产胎盘取出后, 采集50 mL胎盘端脐带血行脐带静脉血单个核细胞的分离培养, 分离单个核细胞方法参照文献<sup>[5-7]</sup>。简言之, 6%羟乙基淀粉(HES)沉降法和 Percoll 非连续性密度梯度离心法联合应用分离脐血中单个核细胞。按比例1:4将6% HES和新鲜脐血混合, 4 °C静置60 min, 收集上层富含白细胞的血浆层, 离心弃上清液, 重悬细胞于磷酸盐缓冲液中, 按6:4比例将细胞悬液平铺于Percoll 表面, 400 g去离心20 min, 小心吸取中间白膜层单个核细胞细胞, 磷酸盐缓冲液洗2次后, 用锥虫蓝拒染法测定细胞存活率>99%, 然后将分离的单个核细胞以 $3 \times 10^6$ 个/cm<sup>2</sup>的密度分别接种于包被和未包被纤维连接蛋白2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的孔板中, 培养于M199培养基(含体积分数为20%的胎牛血清、VEGF 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、bFGF 20  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、BPE 15 mg/L、青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL), 饱和湿度, 置于37 °C含体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 第3天半量换液, 此后每3 d全量换液1次。

高倍倒置显微镜对内皮祖细胞进行形态学观察。将细胞接种到培养皿后, 第2天观察部分细胞开始贴壁, 第3天贴壁细胞开始变为短梭形, 由于在第7天时贴壁细胞已牢固贴壁, 大部分非贴壁细胞通过换液去除, 因此培养7 d时, 高倍倒置显微镜下随机选取6个视野, 计数铺有

纤维连接蛋白孔与未铺纤维连接蛋白孔中贴壁细胞的数量。从接种到一次性培养瓶中开始观察细胞形态, 直到贴壁细胞已达培养瓶面积80%以上时传代细胞, 观察贴壁细胞到40 d。

免疫组织化学、免疫荧光染色以及流式细胞分析对内皮祖细胞进行鉴定。培养细胞第0天做细胞涂片, 并分别在细胞爬片(盖玻片上铺有纤维连接蛋白)第7天观察CD31、vWF抗原的表达情况。免疫组织化学显示阳性细胞胞浆染成棕黄色, 对照组不显色。在奥林巴斯倒置显微镜下随机选择6个视野计数阳性细胞的百分率。用免疫荧光对内皮祖细胞进行鉴定, 参照文献<sup>[8-9]</sup>。将分离出的单个核细胞接种于24孔板中, 培养1周后将细胞与24  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的Dil-acLDL, 37 °C孵育4 h, 检测内皮祖细胞对Dil-acLDL的摄取, 然后用20 g/L多聚甲醛固定细胞10 min, 磷酸盐缓冲液浸洗, 将10  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的FITC-UEA- I 加于上述标本中, 37 °C孵育1 h, 激光共聚焦显微镜鉴定, 随机选取6个视野, 计算贴壁细胞中双染色阳性细胞的百分率; 另取一部分细胞仅与含有24  $\mu\text{g}/\text{L}$  Dil-acLDL的培养液37 °C孵育4 h, 换液后用激光共聚焦显微镜观察内皮祖细胞对Dil-acLDL的摄取情况, 继续置于培养箱中培养, 每3 d避光换液1次, 6周后再次观察其红色荧光表达情况。分别在细胞培养至第7天和第14天, 收集细胞, 制成单细胞悬液后分别与FITC-CD34、PE-CD133、FITC-KDR等抗体反应4 °C 30 min, 磷酸盐缓冲液清洗后, 用500  $\mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液悬浮细胞后流式细胞仪检测。

**主要观察指标:** ①倒置显微镜观察培养细胞形态。②细胞免疫组织化学DAB染色观察。③共聚焦显微镜观察培养细胞。④流式细胞仪检测细胞CD133、CD34和KDR的表达率。

**设计、实施、评估者:** 实验设计为第一作者, 实施者为第一、三、四、五、六作者, 评估由通讯作者, 所有作者均受过专业培训。

**统计学分析:** 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由第一作者采用SPSS11.0统计软件进行t 检验。

## 2 结果

**2.1 倒置显微镜观察培养的细胞形态** 倒置显微镜下, 刚分离的单个核细胞呈圆形, 细胞形态小, 不均匀地悬浮分布于培养皿底部; 48 h后可见细胞贴壁; 3 d后贴壁细胞有微小集落形成, 周围的细胞以集落为中心, 呈发芽式向

<sup>1</sup>北京市房山区良乡医院眼科, 北京市 102401; <sup>2</sup>吉林大学第一临床医院眼科, 吉林省长春市 130021

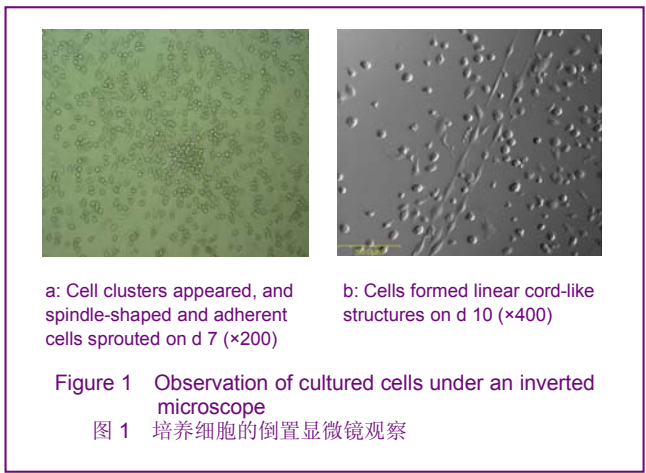
方立建★, 男, 1982年生, 山东省莱芜市人, 汉族, 2008年吉林大学白求恩医学部毕业, 硕士, 医师, 主要从事眼科临床工作。

通讯作者: 宋鄂, 教授, 博士生导师, 吉林大学第一临床医院眼科, 吉林省长春市 130021 songe23@163.com

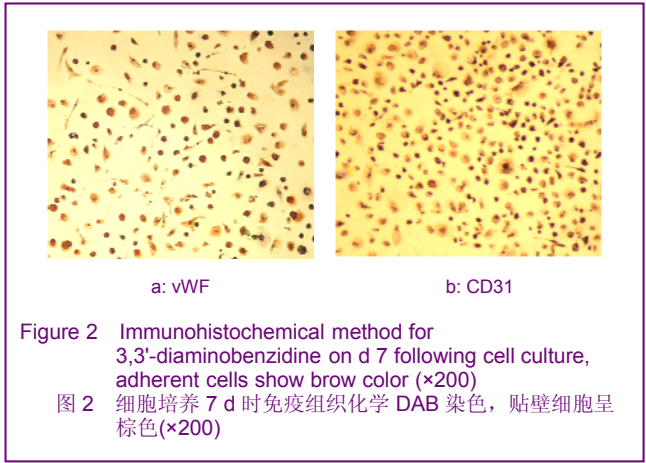
中图分类号: R394.2  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2010)45-0845-05

收稿日期: 2010-05-15  
修回日期: 2010-09-14  
(20100515015/W · Q)

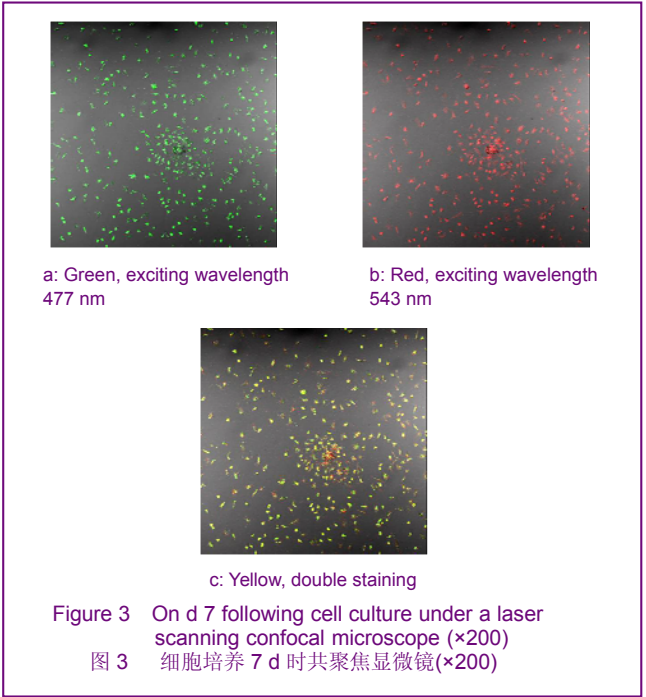
外生长, 7 d时, 形成中央主要为圆形细胞, 周围为梭形细胞的典型集落(图1a); 10 d时, 梭形细胞出现典型的线样排列结构(图1b); 相邻的细胞簇之间相互连接形成血管网样结构。培养至14 d长梭形细胞逐渐缩短并逐渐变为菱形, 在培养28 d时贴壁细胞逐渐呈现出典型铺路石样改变。7 d时, 在高倍镜下, 分别在铺有纤维连接蛋白和未铺纤维连接蛋白培养板中随机选取6个视野, 计数视野内的细胞数, 细胞数为(90.0±10.1)和(48.5±11.1)个细胞, 两者比较, 孔内细胞密度差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。



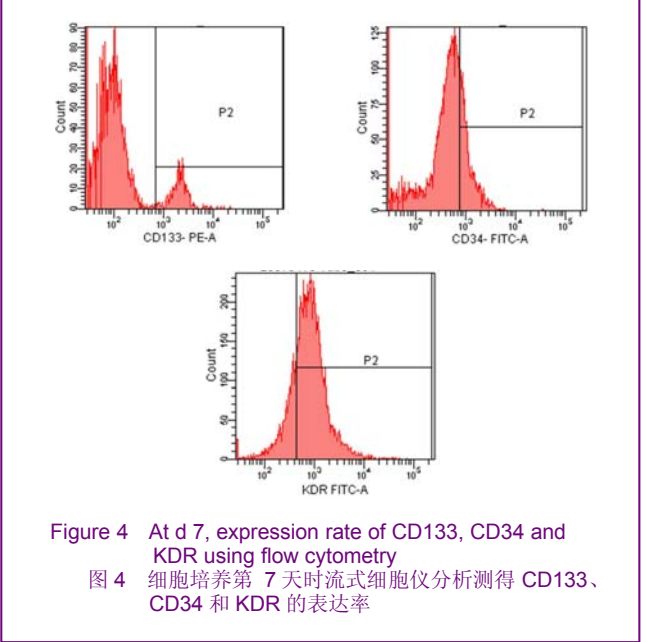
2.2 免疫组织化学DAB染色观察细胞结果 细胞培养第0天, 细胞涂片CD31、vWF抗原免疫组织化学染色呈阴性, 细胞浆不显色; 细胞培养至第7天, 细胞爬片CD31、vWF抗原免疫组织化学染色阳性, 细胞浆呈棕黄色, 空白对照不显色。vWF阳性表达率为(73.3±4.2)%, 见图2a, CD31阳性表达率为(92.7±2.2)%, 见图2b。



2.3 共聚焦显微镜观察培养细胞 细胞培养至第7天的双荧光染色结果表明, 培养贴壁细胞中绝大部分细胞呈 Dil-acLDL/ FITC-UEA- I 双阳性, 双阳性率平均为(83.0±4.3)%, 阴性对照不显色。细胞吞噬Dil-acLDL 后6周, 共聚焦显微镜下观察, 仍有较强红色荧光表达。见图3。



2.4 流式细胞仪检测CD133、CD34和KDR的表达率 细胞培养第7天时流式细胞仪分析表明, CD133、CD34和KDR表达率分别为(17.8±3.7)%、(22.1±4.4)%、(81.5±5.0)%。第14天时流式细胞仪分析表明, CD133、CD34和KDR表达率分别为(0.37±0.12)%、(18.1±6.4)%、(92.5±4.2)%。见图4。



3 讨论

1997年Asahara等<sup>[10]</sup>从外周血中分离培养出内皮祖细胞, 并证明内皮祖细胞参与出生后的血管生成, 可以通过动员、体外扩增以及移植内皮祖细胞来促进

血管修复和血管新生, 这一发现为缺血性疾病的治疗提供了新的治疗途径。在糖尿病患者<sup>[11-13]</sup>、心血管病患者体内循环内皮祖细胞的数量和质量均发生了不同程度的变化<sup>[14-17]</sup>, 而且与全身并发症有密切联系。因此有学者认为, 内皮祖细胞将来可能是治疗心肌缺血疾病有效而又安全的方法<sup>[18]</sup>, 及时补充功能正常的内皮祖细胞可能有益于此类疾病的恢复。Lam等<sup>[19]</sup>也证实了, 自体内皮祖细胞移植可以保护肺内血管内皮细胞的功能和维持肺泡内血气屏障的完整性。有研究发现, 内皮祖细胞在肺癌组织血管形成的过程中起重要作用<sup>[20]</sup>, 体内移植内皮祖细胞可能会加重肿瘤患者的病情<sup>[21]</sup>。骨髓起源的内皮祖细胞参与视网膜新生血管的形成<sup>[22]</sup>; 自体内皮祖细胞可被神经营养因子(neurotrophic factors)激活和动员, 从而促使糖尿病视网膜病变患者眼底病理性新生血管的形成<sup>[23]</sup>。因此, 体外移植内皮祖细胞是否有利于糖尿病视网膜病变患者病情的改善仍有待于进一步证实, 这也是本实验进一步的研究方向。

由于传统免疫磁珠分选内皮祖细胞的方法操作复杂、费用较大, 细胞获得率较低以及单独培养时缺少其他细胞的相互作用而导致内皮祖细胞增生及分化受限, 在一定程度上制约了临床的广泛应用。内皮祖细胞主要存在于骨髓、脐血和外周血等组织中, 三者内皮祖细胞含量之比约为15:10:1。与骨髓和外周血相比, 脐带血来源丰富、再生能力强、免疫源性相对较弱, 其内淋巴细胞相对不成熟, 可用于人类白细胞抗原(HLA)配型不符者之间的输注<sup>[24]</sup>, 并且, 随着全国各地脐带血库的建立, 将来用自身脐带血提取内皮祖细胞治疗缺血性疾病就不存在免疫排斥反应问题了。因此, 本实验利用内皮祖细胞贴壁生长的特点, 采用直接贴壁培养人脐血单个核细胞(MNC)获取内皮祖细胞, 简化了培养方法, 降低了实验成本, 为今后的临床研究和应用奠定了基础。

目前还没有统一的标准来鉴定内皮祖细胞, 在早期的研究中, 人们一直用CD34和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)标记鉴定内皮祖细胞<sup>[10]</sup>, 但两者也表达在造血干细胞和血管内皮细胞上, 因而无法将混杂的造血干细胞和血管内皮细胞分开, 而且有学者从CD34<sup>-</sup>单核细胞中也能获得经诱导分化后成为内皮细胞的内皮祖细胞, 这给内皮祖细胞的分选带来了困难。后来, Yin等<sup>[25]</sup>发现了可以特异性区别内皮祖细胞和成熟内皮细胞的表面标志CD133, 随着内皮祖细胞的分化成熟, CD133转为阴性。因此, 有人用CD133来鉴别内皮祖细胞和成熟内皮细胞。本实验对新鲜分离的单个核细胞进行细胞涂片, 免疫组织化学法测定其表面标志CD31和vWF的阳性率为0; 而细胞培养至第7天, 免疫组织化学法结果显示多数细胞CD31和vWF表达阳性, 培养后成熟内皮细胞的特异性分子标志明显增加, 这表明脐带血中含有的内皮细胞很少, 经过含有VEGF等因子的培养基诱导

后内皮祖细胞逐渐向成熟内皮细胞方向分化, 并表达内皮细胞的特异性分子标志CD31和vWF。流式细胞仪分析单个核细胞经诱导分化7 d后, 内皮祖细胞的这3种表面标志都有所表达, 而在细胞培养至14 d时, CD133阳性率几乎为零, CD34阳性率亦有下降, 而VEGFR2的阳性率则略有升高, 如上所述, CD133只在细胞培养早期表达, 因此, 可以推断内皮祖细胞不是单一一种细胞, 而是介于祖细胞与成熟内皮细胞之间的一类细胞。有些学者将其分为两大类: 早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞, 而两种细胞在生物学特性上有明显差异<sup>[26-28]</sup>。

细胞培养至第7天, 用Dil-acLDL/FITC-UEA-I双荧光染色鉴定细胞, 由于目前内皮祖细胞无明确的细胞表面标志, 因此, 利用其功能特征来对其进行鉴定显得尤为重要, 双荧光染色正是利用内皮祖细胞即能吞噬AcLDL又能绑定UEA的特征, 本实验证实所培养的细胞群体中大部分是正在分化中的内皮祖细胞<sup>[29]</sup>; 用Dil-acLDL标记细胞后继续培养内皮祖细胞至第6周, 仍有较强荧光表达, 并且此方法简单、可靠, 不容易被污染, 因此, Dil-acLDL可以作为体内移植内皮祖细胞的示踪物, 为进一步研究内皮祖细胞在体内循环中的黏附、增生情况提供了可靠的方法。

纤维连接蛋白作为细胞外基质成分之一, 含有能够被细胞整合素识别的RGD序列, 其支架和黏附等作用, 并调节细胞间及细胞与细胞外基质之间的作用, 纤维连接蛋白在细胞的早期识别与黏附中有重要的作用<sup>[30]</sup>。纤维连接蛋白可以促进VEGF诱导的CD34<sup>+</sup>细胞分化为内皮细胞, 而且纤维连接蛋白和VEGF对提高内皮祖细胞迁移和分化的能力还具有协同刺激作用<sup>[31]</sup>。本实验分别将分离的单个核细胞铺在包被和未包被纤维连接蛋白的培养皿中培养, 在包被纤维连接蛋白的孔板中细胞黏附、增生明显比未铺纤维连接蛋白的多。因此, 纤维连接蛋白是内皮祖细胞的体外培养不可或缺的条件之一。

本研究结果显示, 经过VEGF培养、诱导的单个核细胞均不同程度的表达CD133、CD34、KDR、CD31和vWF等内皮祖细胞的相关表面标志, 并可吞噬Dil-acLDL和结合FITC-UEA, 因此, 羟乙基淀粉沉降和Percoll非连续性密度梯度离心联合法可以分离、培养出内皮祖细胞, 为将来治疗缺血性疾病的实验研究提供方法和移植细胞的来源。

#### 4 参考文献

- [1] Miall H, Wolfgang F, Peter CW, et al. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1185-1189.
- [2] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003; 9: 702-712.
- [3] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004; 95(4): 343-353.

- [4] Yasuharu M, Volker A, Claudia W, et al. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J*. 2009;30(3):346-355.
- [5] Juliane E, Stefanie K, Gergely J, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003; 58: 478-486.
- [6] Fadini GP, Albiero M, Cignarella A, et al. Effects of androgens on endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(10):355-364.
- [7] 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: 288-293.
- [8] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(9): 2140-2146.
- [9] Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilization after hindlimb ischaemia reperfusion injury in rats. *Diabetologia*. 2006;49(12):3075-3084.
- [10] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275: 964-967.
- [11] Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*. 2007;50(10):2156-2163.
- [12] Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106(22): 2781-2786.
- [13] Chen LL, Liao YF, Zeng TS, et al. Number and function of circulating endothelial progenitor cell in diabetics with different vascular complications. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(18): 1234-1239.
- [14] Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, et al. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):274-277.
- [15] Hu CH, Li ZM, DU ZM, et al. Human umbilical cord-derived endothelial progenitor cells promote growth cytokines-mediated neovasculization in rat myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(5):548-555.
- [16] Pelliccia, MD, PhD, Cianfrocca C. et al. Role of Endothelial Progenitor Cells in Restenosis and Progression of Coronary Atherosclerosis After Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol Intv*. 2010;3: 78-86.
- [17] De Winter RJ, Klomp M. Understanding the Role of Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disease, Coronary Artery Lesion Progression and In-Stent Restenosis. *J Am Coll Cardiol Intv*. 2010;3: 87-89.
- [18] Sekiguchi H, Li M, Losordo DW, et al. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *J Cell Physiol*. 2009;219(2):235-242.
- [19] Lam CF, Liu YC, Hsu JK, et al. Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits. *Anesthesiology*. 2008;108(3):392-401.
- [20] Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, et al. Endothelial Progenitor Cells Control the Angiogenic Switch in Mouse Lung Metastasis. *Science*. 2008;319:195-198.
- [21] Le Bourhis X, Romon R, Hondermarck H. Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120(1):17-24.
- [22] Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002;8: 607-612.
- [23] Liu X, Li Y, Liu Y, Luo Y, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) mobilized and activated by neurotrophic factors may contribute to pathologic neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol*. 2010;176(1):504-515.
- [24] Maitra B, Szekeley E, Gjini K, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33:597-604.
- [25] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90:5002-5012.
- [26] Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res*. 2008; 314(3):430-440.
- [27] Hua-Xin Duan, La-Mei Cheng, Jian-Wang, et al. Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Cell Biology International*. 2006;(30):1018-1027.
- [28] Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics*. 2010; 3:18.
- [29] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3422-3427.
- [30] Hirschi SD, Gray SD, Thibault SL. Fibronectin: an interesting vocal fold protein. *J Voice*. 2002;16:310-316.
- [31] Errol S, Wijelath SR, Jacqueline M, et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells. *J Vasc Surg*. 2004;39:655-660.

来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 吉林省博士点基金(2007018311), 课题题目: 内皮祖细胞眼内移植示踪方法的研究; 吉林省科委国际合作(20050705-3), 题目: 高糖对内皮前体细胞影响的研究。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** 利用相对简介而且经济的方法, 培养诱导出 EPC, 不仅节约了试验成本而且得到较多的细胞数量, 为今后大规模临床应用提供细胞来源, 并且本文仅是本课题其中的一部分, 为接下来的动物体内移植提供实验基础和方法。

**课题评估的“金标准”:** 对于 EPC 的鉴定, 国内外均是通过多种细胞表面标志以及其功能特性来综合鉴定, 目前没有发现其特异性的表面标志。本课题亦通过分析 EPC 细胞的多种表面标志的表达情况以及其同时吞噬 AcLDL 和绑定 UEA 的特征来对其进行鉴定。

**设计或课题的偏倚与不足:** 由于条件和时间的原因, 本实验只是分别检测了培养细胞 CD133、CD34、KDR、CD31 和 vWF 等表面标志的表达情况, 对于同一细胞同时表达这些抗原的阳性率没有进行检测分析, 而且, 还需要更长时间的观察其细胞特性及其分化方向。

**提供临床借鉴的价值:** 经乙基淀粉沉降和 Percoll 非连续性密度梯度离心联合法可以分离、培养出 EPC, 为将来治疗缺血性疾病的实验研究提供方法和移植细胞的来源。