

低氧条件下诱导人胚胎干细胞向血管内皮前体细胞的分化

夏振伟¹, 王纪文², 李向东², 魏国峰²(¹大连市中心医院心血管内科, 辽宁省大连市 116033; ²大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116023)

文章亮点:

该研究尝试探讨生长因子的添加联合低氧环境是否能够协同促进胚胎干细胞向内皮细胞分化。结合免疫荧光染色分析及定量 RT-PCR 检测结果发现: 血管内皮生长因子和低氧因素可协同促进人胚胎干细胞向内皮细胞分化, 显著提高分化效率, 且所获得胚胎干细胞源内皮细胞具有良好的生物学功能活性。

关键词:

干细胞; 胚胎干细胞; 低氧; 组织工程; 内皮细胞; 血管内皮生长因子; 辽宁省自然科学基金

主题词:

胚胎干细胞; 内皮细胞; 血管内皮生长因子类; 缺氧

基金资助:

辽宁省自然科学基金计划资助(2013023005, 2014023018)

摘要

背景: 种子细胞的数量和质量是制约血管组织工程研究的重要瓶颈, 而如何获取干细胞源内皮细胞是解决该瓶颈问题的关键。

目的: 探讨添加血管内皮生长因子联合低氧环境是否能够协同高效诱导胚胎干细胞向内皮细胞定向分化。

方法: 采用无血清培养基 mTeSR[®]1 维持培养人胚胎干细胞 H9。通过添加血管内皮生长因子(50 μg/L)联合低氧条件(体积分数为 5% O₂)诱导 H9 细胞向内皮细胞分化。采用免疫荧光染色技术、定量 RT-PCR 以及低密度脂蛋白摄取实验对人胚胎干细胞源内皮细胞进行表型和功能评价。

结果与结论: 添加血管内皮生长因子联合低氧培养条件可促进 H9 细胞向内皮细胞方向分化。该胚胎干细胞源内皮细胞不但高水平表达内皮细胞的标志基因(*kdr*, *pecam*)和标记蛋白 D31, 而且还能够摄取低密度脂蛋白, 形成类似微血管结构。提示血管内皮生长因子与低氧在诱导干细胞向内皮细胞分化过程中存在协同效应, 可高效获得具有理想表型和功能活性的干细胞源内皮细胞。

夏振伟, 王纪文, 李向东, 魏国峰. 低氧条件下诱导人胚胎干细胞向血管内皮前体细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7255-7259.

Differentiation of embryonic stem cells into endothelial progenitor cells under hypoxic condition

Xia Zhen-wei¹, Wang Ji-wen², Li Xiang-dong², Wei Guo-feng² (¹Department of Cardiovascular Medicine, Dalian Municipal Central Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116033, Liaoning Province, China; ²Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The quantity and quality of seed cells is a critical bottleneck of the development of vascular tissue engineering. To address this issue, stem cell-derived endothelial cells have been a hot spot in this field due to their potential in providing the ideal seed cells.

OBJECTIVE: To elucidate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) supplementation combined with hypoxic condition on the lineage-specific differentiation of embryonic stem cells into endothelial cells.

METHODS: Serum-free medium mTeSR[®]1 was applied to cultivate H9 cells *in vitro*. A conditioned medium containing 50 μg/L vascular endothelial growth factor was utilized to induce H9 cells to differentiate into endothelial cells under the hypoxic culture condition (5% O₂). The cell under normal condition (5% CO₂) with or without vascular endothelial growth factor served as controls. The phenotype and function of human embryonic stem cells-derived endothelial cells were assayed by immunofluorescence staining, quantitative RT-PCR, and low-density lipoprotein uptake experiment.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the H9 cells were induced to be differentiated into endothelial-like cells more efficiently when they were cultivated under a conditioned medium with vascular endothelial growth factor supplementation under the hypoxic condition. These differentiated cells not only expressed some important surface markers of endothelial cells, including *kdr*, *pecam*, but also took in low-density lipoprotein to form microvessel-like structures. This culture system supports a synergy effect of vascular endothelial growth factor and hypoxic environment that can efficiently promote the lineage-specific differentiation

夏振伟, 男, 1974 年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 1997 年锦州医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事心律失常、冠心病及高血压方面的研究。

通讯作者: 魏国峰, 硕士, 主任医师, 大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116023

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.45.008
<http://www.crter.org>

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)45-07255-05

稿件接受: 2014-10-03

Xia Zhen-wei, Master, Associate chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, Dalian Municipal Central Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wei Guo-feng, Master, Chief physician, Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-10-03

of embryonic stem cells into endothelial cells with good phenotype and functionality.

Subject headings: embryonic stem cells; endothelial cells; vascular endothelial growth factors; anoxia

Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2013023005, 2014023018

Xia ZW, Wang JW, Li XD, Wei GF. Differentiation of embryonic stem cells into endothelial progenitor cells under hypoxic condition. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7255-7259.

0 引言 Introduction

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)因其兼具有自我更新及全向分化潜能而成为生命科学领域尤其是再生医学工程研究中的热点^[1-3]。而血管组织工程作为再生医学的重要分支, 目前已经成为血管损伤性疾病替代治疗以及组织器官体外重建等研究的理想手段^[4-7]。值得一提的是, 由于原代血管内皮细胞的获取相对复杂, 且体外增殖能力有限, 因此越来越多的研究者倾向于选择干细胞源血管内皮细胞作为血管组织工程的种子细胞^[8]。由此, 如何高效诱导干细胞定向分化为具有理想表型和功能活性的血管内皮细胞成为该领域的关键科学问题。Levenberg等^[9]曾首次报道人胚胎干细胞能够自发性分化为血管内皮细胞, 该结果不但促进了胚胎干细胞源血管内皮细胞(或内皮前体细胞)诱导分化、分离鉴定的相关研究, 而且也为血管组织工程提供了来源充足、表型理想的种子细胞。近年来也先后有研究者报道: 通过采用细胞共培养技术或添加生长因子培养基等方法也可获得一定数量的胚胎干细胞源血管内皮细胞^[10-13]。但需要指出的是: 共培养过程中异源性细胞的掺入不但会增加病原污染的风险, 而且还使得靶细胞的分离与纯化异常困难, 由此也将严重制约其在临床治疗中的广泛应用。而相比之下, 采用添加生长因子(如血管内皮生长因子或骨形态发生蛋白4)至培养基的方法则可部分克服上述缺陷, 但其具体诱导方法仍有待优化以提高其定向分化效率。

另一方面, 新近也有研究表明, 低氧环境在哺乳动物的早期胚胎发育过程中可促进早期血管系统的形态发生及发育^[14]。虽然其具体机制尚未阐明, 但相关的研究结果均提示: 低氧诱导因子及其相关的调控分子可能参与低氧环境所产生的调控效应^[15-20]。

鉴于生长因子和低氧环境在血管内皮细胞分化过程中均具有重要作用, 本研究拟尝试探讨上述两种因素是否能够协同定向诱导胚胎干细胞分化为血管内皮细胞, 在获得理想靶细胞的基础上提高其定向诱导分化效率, 以期为实验室研究工作建立相关的技术平台, 同时也为下游血管组织工程的研究提供具有更为理想表型和功能的胚胎干细胞来源种子细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞形态学观察实验。

时间及地点: 实验于2013年8月至2014年8月在大连医科大学附属第二医院中心实验室完成。

材料:

低氧条件下诱导人胚胎干细胞分化为血管内皮前体细胞实验所用主要细胞、试剂和仪器:

细胞、试剂和仪器	来源
人胚胎干细胞系 H9, 40代	WiCell Research Center
mTeSR [®] 1 培养基	Stem Cell Technologies, USA
内皮细胞生长培养基(endothelial growth medium-2, ECM-2)、血管内皮生长因子(VEGF)、Dil-Ac-低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)	Invitrogen
Alexa Fluor647-CD31	BD Biosciences
RNA 提取试剂盒	QIAGEN
real time RT-PCR 试剂盒、CO ₂ 细胞培养箱(VWR)、ABIPrism 7000 Real-time PCR 仪	Applied Biosystems, USA
体视显微镜(Leica EZ4 D)、激光共聚焦显微镜(Leica SP2)	Germany
OLYMPUS 相差显微镜(BX51)	Japan

实验方法:

人胚胎干细胞的体外培养: 复苏H9细胞(40代, Wicell Research Center)接种于经Matrigel(BD Biosciences)包被的6孔培养板, 加入无血清mTeSR[®]1培养基(2 mL/孔, Stem Cell Tech, USA)进行去滋养层细胞培养, 培养箱条件为37 °C, 体积分数为5% CO₂。为保持其理想的未分化状态, 采用Dispase酶(1 g/L)消化后采用机械分离方法按照1:4比率进行传代。每天观察细胞的形态及生长情况并更换培养基, 体视显微镜下及时去除发生分化的细胞集落。

低氧条件下诱导人胚胎干细胞分化为内皮细胞: 应用低贴附培养皿经悬浮培养方法制备拟胚体, 拟胚体经悬浮培养5 d后转入贴壁培养阶段。期间均采用含有50 μg/L血管内皮生长因子(Invitrogen)的条件诱导培养基ECM-2(ScienCell, USA), 隔日更换培养基。将拟胚体分别接种至经0.1%明胶(Sigma)包被的细胞培养板或细胞培养盖玻片上, 待细胞充分贴壁后添加适量培养基, 继续培养至15 d, 期间隔日换液。定期观察细胞生长及分化情况。上述诱导培养过程均在37 °C, 体积分数为5%O₂低氧细胞培养箱内进行。

免疫荧光染色技术鉴定细胞表型: 收集样品, 经PBS清洗后采用体积分数为90%乙醇固定1.0-2.0 h。PBS清洗后, 再依次经0.1% Triton X-100和3%BSA处理(各15-20 min),

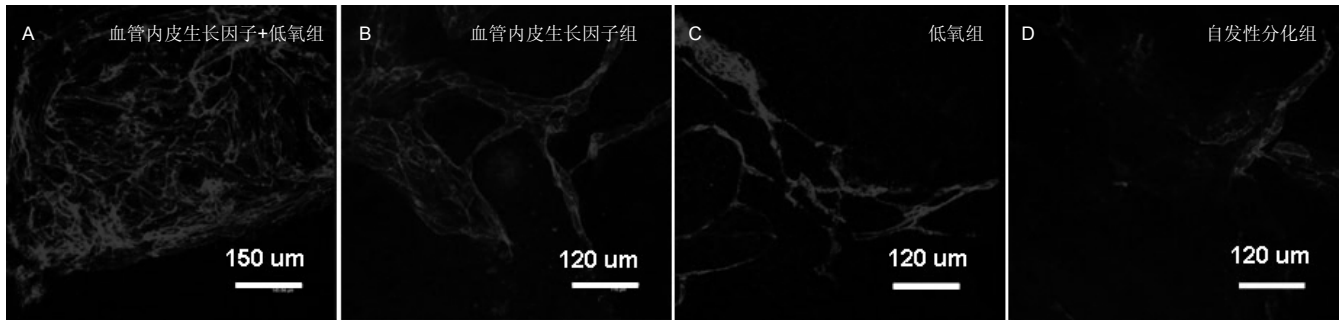


图1 免疫荧光染色鉴定人胚胎干细胞源内皮细胞

Figure 1 Immunofluorescent staining of human embryonic stem cells-derived endothelial cells

图注: A 显示血管内皮生长因子和低氧联合作用显著增加干细胞源内皮细胞的分化率, 多个类血管样结构形成; B 和 C 分别显示血管内皮生长因子单独作用组和低氧组所形成的类血管结构少于联合作用组; D 显示自发性分化组内的阳性细胞结构最少。

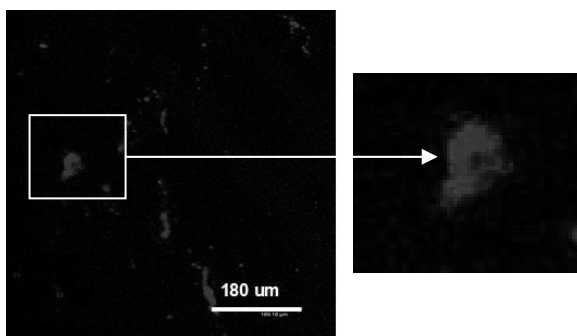


图2 人胚胎干细胞经诱导分化后部分细胞可摄取 Dil-Ac-LDL

Figure 2 Uptake of Dil-Ac-LDL after human embryonic stem cells were induced to differentiate into endothelial cells

图注: 经诱导获得的干细胞源内皮前体细胞具有摄取 LDL(红色荧光)的功能活性。

与鼠抗人抗体 Alexa Fluor647-CD31(1 : 100, BD Pharmagen)于4 °C 条件下孵育过夜, 清洗后直接进行观察检测。最后, 经DAPI复染细胞核后清洗、封固后在激光共聚焦显微镜(Leica SP2, Germany)下拍照。

Dil-Ac-LDL摄取实验: H9细胞经诱导分化后, 更换原培养基为含10 mg/L Dil-Ac-LDL(Invitrogen)的新鲜培养基, 孵育4 h后再次吸弃该培养基, 充分清洗后经体积分数为4%甲醛溶液固定30 min, 再次洗涤后直接置于激光共聚焦显微镜下检测分化细胞的摄取情况。

Real time RT-PCR检测内皮细胞基因的表达: 收集细胞样品, Trizol裂解细胞后直接进行总RNA的提取, 具体操作参照Trizol试剂(Invitrogen)说明书, 终样品测定 $A_{260/280}$ 确定RNA质量。RT反应总体系20 μ L, RNA样品各1 μ g, 反应条件依据Real time RT-PCR试剂盒说明书进行(Applied Biosystem)。PCR反应总体系50 μ L, 引物探针为: *kdr*(Hs00911700), *pecam*(Hs00169777), *gapdh*(Hs99999905, Applied Biosystems), 其中*gapdh*基因作为参照基因。以自发性分化组(无血管内皮生长因子添加, 仅应用常规细胞生长培养基)为对照组, 分别分析单纯生长因子组(有血管内皮生长因子添加, 但非低氧培养条件)和血管内皮生长因子合并低氧培养组的基因表达水平。应用

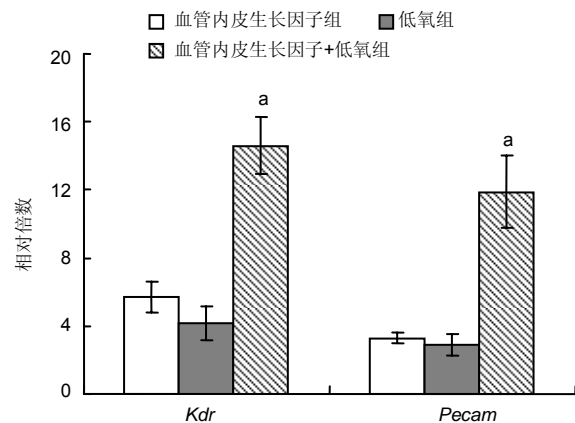


图3 人胚胎干细胞源内皮细胞的特异性基因表达水平检测分析

Figure 3 Expression levels of specific genes of human embryonic stem cells-derived endothelial cells

图注: 对比血管内皮生长因子单独作用组和低氧作用组, 血管内皮生长因子和低氧联合作用显著提高干细胞源内皮前体细胞表达特异性基因($^aP < 0.05$)。

ABI Prism 7000检测系统及相应软件对RT-PCR产物进行分析。

主要观察指标: 免疫荧光染色和Dil-Ac-LDL摄取实验鉴定人胚胎干细胞源内皮细胞功能活性; Real time RT-PCR检测人胚胎干细胞源内皮细胞的特异性基因表达水平。

2 结果 Results

2.1 人胚胎干细胞的维持培养形态 在采用无血清培养基mTeSR[®]1的培养条件下, 人胚胎干细胞经多次传代后可维持其正常的形态特征。细胞集落形状规则整齐, 中央部分因多层细胞堆积生长而隆起, 边缘界限清晰, 少见分化集落。

2.2 人胚胎干细胞源内皮细胞的鉴定

免疫荧光染色的鉴定: 经血管内皮生长因子和低氧条件诱导后, 部分分化细胞经免疫荧光检测后显示CD31染色阳性, 且表达部位集中于细胞膜, 与体内血管内皮细胞的表达方式相同, 提示该阳性染色细胞即为由体外诱导分化所获得的胚胎干细胞源内皮细胞(图1)。此外, 在血管内皮

生长因子合并低氧培养的条件下, CD31阳性细胞数目显著多于单纯血管内皮生长因子添加组和单纯低氧组, 提示二者间在促进人胚胎干细胞分化为内皮细胞的过程中可能存在一定的协同效应。此外还值得指出的是, 这些阳性染色细胞不同于平面贴壁培养的原代血管内皮细胞, 后者显示出典型的铺路石形态特征, 而前者则表现为充分伸展, 彼此连接, 并形成类似微血管结构。

Dil-Ac-LDL摄取活性: LDL摄取实验是对内皮细胞功能活性进行鉴定和评价的重要指标。经诱导分化后的部分人胚胎干细胞可主动摄取被荧光标记的LDL, 细胞质内呈现若干红色荧光颗粒(图2)。该结果进一步支持这些细胞具有与内皮细胞相似的生物学功能活性。

Real time RT-PCR检测基因表达: Real time RT-PCR的检测结果见图3。对照自发性分化组, 体外诱导组(包括单纯血管内皮生长因子组、低氧组以及血管内皮生长因子合并低氧培养组)内逐渐走向分化的人胚胎干细胞所表达的内皮细胞标志基因(*kdr*和*pecam*)水平均增高。但与单纯血管内皮生长因子组和单纯低氧组比较, 血管内皮生长因子合并低氧培养组的内皮细胞标志基因表达水平显著提高, 表明上述两因素能够协同促进人胚胎干细胞向内皮细胞分化, 显著提高定向分化效率。

3 讨论 Discussion

血管组织工程是再生医学研究中的重要学科分支。而有关其种子细胞的来源问题, 即血管内皮细胞的获取一直是制约血管组织工程深入发展的“瓶颈”。如何克服内皮细胞在体外分离培养过程中的“去分化”及“低扩增”现象, 从而解决种子细胞的数量和质量问题, 是推进血管组织工程研究与应用的关键。

干细胞诱导分化技术为解决种子细胞的来源问题提供了新的契机。通过体外定向诱导分化, 可获得具有理想表型的内皮细胞; 结合干细胞本身所具有的体外无限扩增能力, 理论上可获得理想数量和表型的干细胞源内皮细胞。而有关诱导胚胎干细胞分化为内皮细胞的研究, 近年来已取得了一些有意义的进展^[21-24]。有研究证明, 人胚胎干细胞与小鼠骨髓基质细胞(OP9或S17细胞)共培养后可被诱导分化为内皮前体细胞^[10]。该前体细胞特异性表达内皮细胞特征性的基因及蛋白, 从而区别于易于混淆的单核细胞或巨噬细胞。应该说, 共培养诱导不但不需要外源性生长因子的添加, 而且还避免了复杂的拟胚体制备过程, 从而在降低实验成本的同时也显著简化了操作步骤。但是如前所述, 共培养过程中异源性细胞的掺入会增加病原污染的风险; 此外对靶细胞进行分离、纯化也存在很大的难度。因此相比之下, 生长诱导因子(如血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白4等)的添加提供了相对优化的诱导分化方式, 但其诱导效率和经济成本并不理想。

众所周知, 哺乳动物胚胎在早期发育过程中所处的体内环境属于低氧微环境, 氧体积分数维持在1.5%–5.3%。该“生理性低氧”环境不仅在维持胚胎干细胞未分化潜能方面扮演着非常重要的角色, 而且还能够促进胚胎血管系统的发生^[25-26]。虽然“生理性低氧”效应的具体作用机制尚未阐明, 但已有研究证明, HIF相关的信号分子可直接或间接调节血管内皮生长因子或血管内皮生长因子受体的基因表达水平, 即作为低氧反应元件最终促进心血管系统的形态发生和发育^[27-32]。若小鼠胚胎干细胞缺失HIF则因不能激活低氧反应元件而导致血管畸形或发育停滞。最近, Prado-Lopez等^[33]报道了人胚胎干细胞在不同氧体积分数下的转录谱, 揭示降低氧体积分数可降低胚胎干细胞未分化因子的表达, 同时却显著上调促新生血管生成基因的表达。这进一步揭示: 低氧环境在胚胎干细胞分化为内皮细胞或相关前体细胞过程中具有关键的调控作用。

基于此, 本研究尝试探讨生长因子的添加联合低氧环境是否能够协同促进胚胎干细胞向内皮细胞分化。结合免疫荧光染色分析及定量RT-PCR检测结果发现: 血管内皮生长因子和低氧因素之间的确存在着协同效应, 可协同促进人胚胎干细胞向内皮细胞分化, 显著提高分化效率; 且所获得胚胎干细胞源内皮细胞具有良好的生物学功能活性。最近作者还尝试降低血管内皮生长因子质量浓度至25 µg/L联合低氧环境, 发现其诱导分化效率与高质量浓度血管内皮生长因子组无显著差异。这就提示: 该诱导方法可能会显著降低实验成本, 同时还避免了复杂的靶细胞分离纯化过程。虽然本研究中尚未对相关机制展开深入探讨, 但作者分析: 前面所提及的与HIF相关的低氧反应元件以及血管内皮生长因子受体通路的参与可以部分解释血管内皮生长因子与低氧环境所产生的这种协同效应。应该说, 该研究工作是对干细胞向内皮细胞诱导分化定向研究的有益探索, 后期的研究工作将集中于进一步优化该诱导分化条件并明确其调控机制, 以期获得理想质量和数量的干细胞源内皮细胞提供新技术、新方法。

致谢: 感谢大连医科大学王秀丽教授的悉心指导。

作者贡献: 实验设计、实验实施、实验评估、资料收集由第一作者完成, 由通讯作者审核并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 胚胎干细胞-当受精卵分裂发育成囊胚时, 内层细胞团的细胞即为胚胎干细胞。胚胎干细胞具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性, 是一种高度未分化的全能干细胞, 无论在体外还是体内环境, 胚胎干细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。

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] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
- [2] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000;227(2):271-278.
- [3] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*. 2004;131(7):1651-1662.
- [4] Bai H, Wang ZZ. Directing human embryonic stem cells to generate vascular progenitor cells. *Gene Ther*. 2008;15(2):89-95.
- [5] Levenberg S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(5):516-523.
- [6] Kusuma S, Gerecht S. Engineering blood vessels using stem cells: innovative approaches to treat vascular disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(10):1433-1445.
- [7] Sun G, Gerecht S. Vascular regeneration: engineering the stem cell microenvironment. *Regen Med*. 2009;4(3):435-447.
- [8] Wang ZZ, Au P, Chen T, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels in vivo. *Nat Biotechnol*. 2007;25(3):317-318.
- [9] Levenberg S, Ferreira LS, Chen-Konak L, et al. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc*. 2010;5(6):1115-1126.
- [10] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*. 2005;105(2):617-626.
- [11] Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4391-4396.
- [12] Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, et al. A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells*. 2009;27(8):1750-1759.
- [13] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(1):80-89.
- [14] Simon MC, Liu L, Barnhart BC, et al. Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:51-71.
- [15] 邹志兵, 毛淑章, 郑澜. 低氧训练大鼠骨骼肌组织低氧诱导因子1对血管新生的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(20):3654-3658.
- [16] 刘城, 吴平生, 王月刚, 等. 野生型低氧诱导因子1 α 对人微血管内皮细胞增殖、迁移及成管的影响[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2013, 19(4):261-265.
- [17] 邹多宏, 黄远亮. 低氧诱导因子1在血管形成及血管重塑中的作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 2011, 46(3):190-192.
- [18] 魏璇, 陶宇, 裴静娴, 等. 重组腺病毒三突变型低氧诱导因子-1 α 对血管新生的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(4):686-689.
- [19] 曲伟栋, 赵华强. 低氧条件下HIF-1促进血管生成作用的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2009, 25(2):234-236.
- [20] 石晓明, 吴胜春, 唐雷, 等. 缺氧对血管内皮细胞低氧诱导因子-1 α 表达及增殖能力的影响[J]. *广东医学*, 2013, 34(5):661-664.
- [21] 苏位君, 王玉, 宋祥和, 等. 改良三维条件下人胚胎干细胞向内皮细胞的分化及功能[J]. *中国医学科学院学报*, 2012, 34(6):539-544.
- [22] 高斌, 符伟国, 竺挺, 等. 二维法和三维法诱导小鼠胚胎干细胞定向分化为内皮细胞[J]. *中国临床医学*, 2012, 19(3):193-197.
- [23] 罗敏, 耿菊敏, 梁道明, 等. 人胚胎干细胞接种在鼠尾胶原包被培养板上定向分化为血管内皮细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(41):7642-7646.
- [24] 王彦, 钱德俭, 尉真, 等. 人胚胎干细胞定向分化为血管内皮细胞的初步研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2010, 6(2):66-69.
- [25] Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. 1993;99(2):673-679.
- [26] Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4783-4788.
- [27] Ramírez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells*. 2001;19(4):279-286.
- [28] 董红燕, 王强, 张中明, 等. 低氧反应元件调控缺血心肌转染hVEGF165基因表达对新生血管的影响[J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(11):704-707.
- [29] 董红燕, 姜波, 张中明, 等. 低氧反应元件对缺血心肌转染人血管内皮生长因子165基因表达的调控作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(9):1095-1097.
- [30] 姜波, 张中明, 董红燕. 低氧反应元件对缺血心肌转染hVEGF165基因表达的调控[J]. *徐州医学院学报*, 2006, 26(5):381-385.
- [31] 张宜乾, 张中明, 闫英群, 等. 低氧反应元件调控下h-VEGF165基因表达及其蛋白产物的延迟消失[J]. *生理学报*, 2006, 58(3):281-286.
- [32] 张中明, 姜波, 董红燕, 等. 低氧反应元件对低氧复氧状态下心肌细胞转染人血管内皮生长因子165基因表达的调控作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(12):1510-1512.
- [33] Prado-Lopez S, Conesa A, Armiñán A, et al. Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium. *Stem Cells*. 2010;28(3):407-418.