

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0191-04

## 血管内皮生长因子促进小鼠胚胎干细胞生成 CD34<sup>+</sup> 细胞的研究

李 府, 沈柏均, 刘星霞, 侯怀水, 时 庆, 马秀峰 (山东大学齐鲁医院低温医学研究室, 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)体外促进小鼠胚胎干细胞系 ES-D3 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞的能力。方法: 将 ES-D3 形成拟胚体, 将拟胚体细胞转入含不同浓度的 VEGF 和 VEGF + 干细胞因子(stem cell factor, SCF)的培养基中。实验分 6 组, 分别为 VEGF 5 μg/L 组、VEGF 10 μg/L 组、VEGF 20 μg/L 组、VEGF 5 μg/L + SCF 组、VEGF 10 μg/L + SCF 组、VEGF 20 μg/L + SCF 组, 同时设不加因子的自发分化对照组。RT-PCR 检测 CD34 mRNA 的表达, 流式细胞仪检测 CD34<sup>+</sup> 细胞的比例, 甲基纤维素半固体培养法检测生成造血集落的能力。结果: 经过 1 周的诱导培养, 实验组生成的细胞可以表达 CD34 mRNA, CD34<sup>+</sup> 细胞的比例也升高, 并可形成造血祖细胞的集落。从 CD34 mRNA 的表达水平、诱导生成 CD34<sup>+</sup> 细胞的比例和生成的集落数量看, VEGF 20 μg/L + SCF 组和 VEGF 10 μg/L + SCF 组的诱导效率最高。结论: VEGF 能够促进 ESC 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞, 尤以与 SCF 合用时, 其诱导效率更高。

[关键词] 胚胎干细胞; 血管内皮生长因子; 拟胚体; CD34<sup>+</sup> 细胞

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A

## The Promoting Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on the Generation of CD34<sup>+</sup> Cells from Mouse Embryonic Stem Cells

LI Fu, SHEN Bai-jun, LIU Xing-xia, HOU Huai-shui, SHI Qing, MA Xiu-feng (Department of Cryomedicine, Qilu Hospital, ShanDong University, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To study the promoting effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the generation of CD34<sup>+</sup> cells from mouse embryonic stem cell (ESC) *in vitro*. **Methods:** ES-D3 cells were allowed to grow on mouse fetal fibroblast feeder layer to form embryoid bodies (EB), then EB cells were transferred into medium supplemented with different concentration of VEGF and VEGF + SCF for 1 week. Six groups were designed, i. e. VEGF 5 μg/L, VEGF 10 μg/L, VEGF 20 μg/L, VEGF 5 μg/L + SCF, VEGF 10 μg/L + SCF and VEGF 20 μg/L + SCF. The group of spontaneous differentiation without cytokine(s) was served as control. The expression of CD34 mRNA was detected by RT-PCR. The content of CD34<sup>+</sup> cells in each group was measured by flow cytometry. The cells derived from ESC were incubated in semisolid methycellulose cultures. The numbers of total colony-forming units in culture (CFU-C) were counted by reverse microscope. **Results:** ES-D3 grew and formed EBs at day 4. VEGF gave the stimulatory effects on the expression of CD34 mRNA, the generation of CD34<sup>+</sup> cells and CFU-C in EB as a single factor. The effects of VEGF + SCF were the most effective in the experimental groups according to the percent of CD34<sup>+</sup> cells and the numbers of hematopoietic colonies. The most highest inducing efficacy were achieved when VEGF 20 μg/L or VEGF 10 μg/L combined with SCF were used. **Conclusion:** VEGF can promote the differentiation of ESC into CD34<sup>+</sup> cells *in vitro*. The strongest effects were achieved when VEGF was used in combination with SCF.

[Key words] embryonic stem cell; vascular endothelial growth factor; embryoid body; CD34<sup>+</sup> cells

\* 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是从早期胚胎细胞分离的,能在体外长期培养的、高度未分化的细胞<sup>[1-2]</sup>。ESC 具有发育的全能性,在体外可被诱导分化为各种类型的细胞。ESC 体外诱导分化技术不但为移植提供了一种新的干细胞来源,而且有可能在体外

[基金项目] 国家自然科学基金部分资助(30271248)

[作者简介] 李府(1970-),男,山东临沂人,博士,主治医师,主要从事儿科血液肿瘤疾病治疗的研究

[通讯作者] E-mail: lifu1970@sina.com

“工厂化”地大批量生产干细胞或定向发育为组织或器官,解决移植过程中供体来源短缺的难题。在所有关于 ESC 诱导分化的研究中,其向造血系统的诱导分化有可能成为 ESC 研究与应用的突破口<sup>[3]</sup>。研究表明 flk-1 信号转导在原始及定向造血发育中起重要作用,因此 ESC 的成血诱导分化可能依靠 flk-1 配体, flk-1 是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的受体之一,因此 VEGF 对 ESC 诱导造血祖细胞的发育起重要的作用<sup>[4,5]</sup>。本实验研究了 VEGF 体外促进 ESC 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞的能力,并对生成的细胞进行造血祖细胞集落培养,以证明其造血的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系、动物、试剂

ES-D3 细胞系购自中国科学院上海细胞生物学研究所;昆明种小鼠由山东大学实验动物中心提供;ES 细胞培养基:DMEM(葡萄糖含量为 4 500 mg/L, Gibco 公司),加入 20% 胎牛血清(Hyclone 公司)、1% 非必需氨基酸、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇(2-ME)、2 mmol/L 谷氨酰胺、青霉素、链霉素各 100 U/ml;鼠血管内皮生长因子(VEGF)和鼠干细胞因子(SCF)均购自 Pepro Tech Ec Ltd 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的大鼠抗小鼠 CD34 单克隆抗体为美国 Pharmingen 产品;Trizol 试剂购自 Gibco 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;引物由上海生工生物工程公司合成;商品化的造血祖细胞集落培养基(成分:0.9% 甲基纤维素,30% 胎牛血清,1% 牛血清白蛋白,0.1 mmol/L 2-巯基乙醇,2 mmol/L L-谷氨酰胺,50 mg/L rSCF,20 μg/L rGM-CSF,20 μg/L rIL-3,20 μg/L rIL-6,20 μg/L rG-CSF,3 U/ml rEpo)购自 StemCell Tech 公司。

1.2 原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF)制备及 ES-D3 的复苏、培养<sup>[6,7]</sup>。

为保持 ES-D3 细胞的未分化状态,ES-D3 维持在经丝裂霉素-C 处理(10 mg/L, 37°C 2 h)的小鼠的 PMEF 上。

### 1.3 拟胚体(Embryoid body, EB)的形成

0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化在 PMEF 上成鸟巢样生长的 ES 克隆为单个细胞,然后在无 PMEF 的 ESC 培养液中培养,接种密度为 10<sup>5</sup>/ml,在 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度下培养 4 d,在倒置显微镜下观察。

### 1.4 造血细胞诱导分化培养体系

将诱导生长的拟胚体细胞经胰酶-EDTA 消化后,吹打制成单细胞悬液。实验分组:VEGF 5 μg/L 组, VEGF 10 μg/L 组, VEGF 20 μg/L 组, VEGF 5 μg/L +

SCF 组, VEGF 10 μg/L + SCF 组, VEGF 20 μg/L + SCF 组。SCF 浓度 100 μg/L,同时设不加细胞因子的对照组。接种的细胞浓度为 1 × 10<sup>5</sup>/ml,在 37°C, 饱和湿度下, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中诱导培养 1 周。

### 1.5 RT-PCR 检测 CD34 mRNA

抽提上述诱导 1 周的各组细胞的总 RNA,用 RT-PCR 检测 CD34 mRNA 的表达。PCR 扩增引物序列:CD34 上游引物:5'-TGGAATCCGAGAAGTGAGG-3', 下游引物:5'-GGAAATAACCACTGCTGC-3', 扩增片段长度为 398 bp; β-actin:5'-ATGGATGACGATATCGCT-3' 和 5'-ATGAGGTACTCTGTCAGGT-3', 扩增片段长度为 569 bp。

### 1.6 流式细胞仪检测 CD34<sup>+</sup> 细胞

采用美国 Becton Dickinson 公司 FACScan 型流式细胞仪,用单色直接免疫荧光标记法,每 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞给予抗体 20 μl, 37°C 避光反应 20 min,用 CellQuest-Plot 软件分析样本中标记阳性细胞百分率。

### 1.7 造血祖细胞集落培养

采用甲基纤维素半固体培养法,将 2 × 10<sup>5</sup> 个诱导培养 1 周的各组 EB 细胞接种在 Methocult<sup>TM</sup> GF4435 培养基中,每孔 1 ml,复种 3 孔,37°C,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养 14 d,倒置显微镜下计数集落形成单位总数(total colony-forming units in culture, CFU-C)的数目。

### 1.8 统计学处理

数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两个样本均数比较采用 *t* 检验。所有分析过程均采用 SPSS10.0 统计软件。

## 2 结果

### 2.1 拟胚体的形成

ES-D3 在 PMEF 上增殖旺盛,呈鸟巢状生长,边缘清晰,表面光滑,结构致密(见图 1)。消化后的 ESC 克隆在去除饲养层后 4 d 形成拟胚体,为圆形,呈团状生长(见图 2)。

图 1 ES 细胞在 PMEF 上形成的克隆(20 ×)

Fig. 1 Colony of ES cells on a feeder layer of PMEF(20 ×)

### 2.2 CD34 mRNA 表达的检测

未分化的 ESC 及自发分化对照组不表达 CD34 mRNA, EB 细胞及各实验组可检测到 CD34 mRNA 的表达,其中以 VEGF 10  $\mu\text{g/L}$  + SCF 组和 VEGF 20  $\mu\text{g/L}$  + SCF 组表达最强(见图 3)。

图 2 培养第 4 天形成的拟胚体(20 $\times$ )  
Fig. 2 Formation of the embryoid bodies at fourth day after culture

图 3 CD34 mRNA 表达检测的结果

Fig. 3 The expression of CD34 mRNA in each group  
M: Marker; 0:  $\beta$ -actin; 1: Undifferentiated ES cells; 2: EB cells; 3: VEGF 20  $\mu\text{g/L}$  group; 4: VEGF 10  $\mu\text{g/L}$  group; 5: VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  group; 6: VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  + SCF group; 7: VEGF 10  $\mu\text{g/L}$  + SCF group; 8: VEGF 20  $\mu\text{g/L}$  + SCF group; 9: Control group

### 2.3 CD34<sup>+</sup>细胞的检测

EB 细胞开始出现 CD34 的表达,单用 VEGF,随着所用 VEGF 的剂量增加,诱导生成的 CD34<sup>+</sup>细胞也有轻微增加。同时合用 SCF 则可明显增加 CD34<sup>+</sup>细胞数,其中以 VEGF 20  $\mu\text{g/L}$  + SCF 组和 VEGF 10  $\mu\text{g/L}$  + SCF 组 CD34<sup>+</sup>细胞百分数最高,而未加因子的对照组则几乎检测不到 CD34<sup>+</sup>细胞(见表 1,图 4)。

### 2.4 造血祖细胞集落培养

各组生成的 CFU-C 数目的比较(见表 2)。

## 3 讨论

ESC 是来源于早期胚胎细胞的高度未分化的细胞,它具有向各种组织细胞分化的潜能。在 ESC 向各种细胞分化的研究模型中,向造血细胞的定向诱导分化是最理想的模型,也是报道最多的一种细胞类型。目前国内外采用的方法有将 ESC 形成拟胚体,再诱导拟胚体生成造血细胞,也有不经过拟胚体阶段而直接诱导 ESC 生成造血细胞<sup>[8-11]</sup>。一系列研究表明,ESC

表 1 各组 CD34<sup>+</sup>细胞的比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 1 Comparison of the percentages of CD34<sup>+</sup> cell in each group

Groups	Percentages of CD34 <sup>+</sup> cell( % ) /2 $\times 10^5$ cells
Control	0.38 $\pm$ 0.10
EB cells	3.15 $\pm$ 0.56
VEGF 5 $\mu\text{g/L}$	3.22 $\pm$ 0.70
VEGF 10 $\mu\text{g/L}$	4.03 $\pm$ 0.44
VEGF 20 $\mu\text{g/L}$	4.22 $\pm$ 0.85
VEGF 5 $\mu\text{g/L}$ + SCF	6.34 $\pm$ 1.27 $\Delta$
VEGF 10 $\mu\text{g/L}$ + SCF	9.54 $\pm$ 0.80* $\blacktriangle$
VEGF 20 $\mu\text{g/L}$ + SCF	10.39 $\pm$ 1.35* $\blacktriangle$

$P < 0.01$ , compared with the control group;  $\Delta P < 0.05$ , compared with the group of EB, VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  and VEGF 10  $\mu\text{g/L}$ ; \*  $P < 0.05$ , compared with the group of VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  + SCF;  $\blacktriangle P < 0.01$ , compared with the group of EB, VEGF 5  $\mu\text{g/L}$ , VEGF 10  $\mu\text{g/L}$  and VEGF 20  $\mu\text{g/L}$

表 2 各组 CFU-C 数目的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of the numbers of CFU-C in each group

Groups	Numbers of CFU-C/2 $\times 10^5$ cells
Control	0
EB cells	17.33 $\pm$ 12.74
VEGF 5 $\mu\text{g/L}$	20.67 $\pm$ 8.30
VEGF 10 $\mu\text{g/L}$	29.00 $\pm$ 11.79
VEGF 20 $\mu\text{g/L}$	37.00 $\pm$ 15.87 $\Delta$
VEGF 5 $\mu\text{g/L}$ + SCF	54.33 $\pm$ 16.56 $\#$
VEGF 10 $\mu\text{g/L}$ + SCF	112.67 $\pm$ 37.09* $\blacktriangle$
VEGF 20 $\mu\text{g/L}$ + SCF	121.00 $\pm$ 51.50* $\blacktriangle$

$\Delta P < 0.05$ , compared with the group of EB and VEGF 5  $\mu\text{g/L}$ ;  $\#P < 0.05$ , compared with the group of EB, VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  and VEGF 10  $\mu\text{g/L}$ ; \*  $P < 0.05$ , compared with the group of VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  + SCF and VEGF 20  $\mu\text{g/L}$ ;  $\blacktriangle P < 0.01$ , compared with the group of EB, VEGF 5  $\mu\text{g/L}$  and VEGF 10  $\mu\text{g/L}$

在体外有分化成多个血细胞系细胞的能力,细胞因子对 ESC 向不同细胞系的分化起一定的调控作用。细胞因子是通过与被诱导的细胞表面受体结合而介导细胞的诱导分化,不同的细胞因子或细胞因子组合会改变成血分化的方向,且细胞因子的成血调控作用与加入

的细胞因子的浓度有关。近年来研究发现, VEGF 对

ESC 诱导造血祖细胞的发育可能起重要的作用<sup>[4-5]</sup>。

图 4 CD34<sup>+</sup> 细胞流式细胞术检测结果

Fig. 4 Result of flow cytometry analysis of CD34<sup>+</sup> antigen on the cells

A: EB cells 3.17% ; B: VEGF5 μg/L group 3.25% ; C: VEGF 10 μg/L group 4.00% ; D: VEGF 20 μg/L group 4.20% ; E: VEGF 5 μg/L + SCF group 6.31% ; F: VEGF 10 μg/L + SCF group 9.96% ; G: VEGF 20 μg/L + SCF group 10.25% ; H: control 0.31%

本实验采用先将 ESC 形成拟胚体,再诱导拟胚体生成造血细胞,通过 RT-PCR 和流式细胞仪检测造血干/祖细胞的特异抗原 CD34,并对诱导生成的细胞进行造血祖细胞集落培养,证实 ESC 在此条件下可向造血细胞分化,说明所建立的 VEGF 或 VEGF + SCF 诱导分化体系诱导 ESC 生成的细胞中含有造血干/祖细胞。

实验比较了不同用量的 VEGF 单用及联合 SCF 时对 ESC 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞的影响,结果显示 VEGF 的用量对诱导 ESC 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞有一定的影响。我们所建立的体系诱导生成的细胞可检测到 CD34 mRNA 的表达,流式细胞仪检测则发现随着 VEGF 浓度的增加,其产生 CD34<sup>+</sup> 细胞的能力也有所增加,但却低于 VEGF 联合 SCF 的诱导效率。与此相对应,VEGF 联合 SCF 时其诱导生成的细胞产生造血集落的能力也明显高于 VEGF 单用组。尤其是 VEGF 10 μg/L + SCF 组或 VEGF 20 μg/L + SCF 组,无论是 CD34<sup>+</sup> 细胞的比例,还是产生造血祖细胞集落的能力均明显高于其它各组。这说明此种浓度的 VEGF 联合 SCF 其成血分化的效率较高。

本实验证实 VEGF 或 VEGF + SCF 可以促进 ESC 生成 CD34<sup>+</sup> 细胞,为体外研究造血干细胞的发育和诱导 ESC 生成造血干/祖细胞提供实验基础。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[ J ]. Nature, 1981, 292( 5819 ): 154-156.

[ 2 ] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[ J ]. Science, 1998, 282( 5391 ): 1145-1147.  
[ 3 ] 朱玉珍, 王惠琴, 孙卫民. 肿瘤干细胞研究进展[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11( 1 ): 72-74.  
[ 4 ] 武 婕, 马文丽, 郑文岭. 以血管内皮生长因子受体 KDR 为靶的肿瘤治疗的研究进展[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10( 3 ): 214-215.  
[ 5 ] Nakayama N, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic stem cell generation from embryonic stem cells *in vitro*[ J ]. Blood, 2000, 95( 7 ): 2275-2283.  
[ 6 ] 都同功, 陈系古, 刘兰英, 等. 小鼠胚胎干细胞的培养[ J ]. 中国实验动物学报, 1999, 7( 1 ): 26-29.  
[ 7 ] 都同功, 黄冰, 钟女奇, 等. 不同条件下培养小鼠胚胎干细胞[ J ]. 中国病理生理杂志, 2001, 17( 2 ): 190-192.  
[ 8 ] Hole N, Graham GJ, Menzel U, et al. A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonic stem cell differentiation *in vitro*[ J ]. Blood, 1996, 88( 4 ): 1266-1276.  
[ 9 ] 徐 令, 乔春平, 黄绍良, 等. 体外定向诱导胚胎干细胞为造血细胞[ J ]. 科学通报, 2000, 45( 8 ): 815-820.  
[ 10 ] 赵惠萍, 卢光琇, 王绮如. 骨髓内皮细胞条件培养液促进小鼠胚胎干细胞向造血分化[ J ]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11( 2 ): 109-114.  
[ 11 ] Palacios R, Golunski E, Samaridis J. *in vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92( 16 ): 7530-7534.

[ 收稿日期 ] 2003 - 08 - 01

[ 修回日期 ] 2003 - 10 - 15