non-deletion Duchenne muscular dystrophy (DMD) by linkage polymerase chain reaction analysis [J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(4): 345-349.
[6] 杜文津. DMD基因突变检测技术的回顾与展望[J]. 国外医学:遗传学分册, 2001, 24(6): 326-331.
[7] 吴有光, 匡渤海, 冯 微, 等. DMD的产前基因诊断小结[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(2): 106-107.
[8] 钟昌高, 李麓芸, 卢光琇. 应用连锁分析对杜氏/贝氏肌营养不良症家系进行快速携带者检测和产前基因诊断[J]. 湖南医科大学学报, 2002, 27(6): 573-574.
[9] 胡冬贵, 黄艳仪, 黎 青, 等. DMD基因和SRY基因单细胞三重及四重套式PCR技术的建立及其可靠性研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 1999, 7(5): 13-16.
[10] HUSSEY N D, DONGGUI H, FROILAND D A, *et al*. Analysis of five Duchenne muscular dystrophy exons and gender determination using conventional duplex polymerase chain reaction on single cells [J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(11): 1089-1094.

(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)24-2468-01

不同细胞生长因子组合对培养的内皮祖细胞集落形成及黏附能力的影响

季亢挺[1],张怀勤[2],杨鹏麟[1],李海鹰[2],杨德业[2] (温州医学院:[1]附属第二医院心血管内科,[2]附属第一医院心血管内科,温州 325000)

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是出生后机体中存在的能特异性归巢于缺血损伤部位进一步分化为血管内皮细胞的一群前体细胞。大量的研究显示,EPCs可促进血管新生[1],修复损伤内膜并可用于制备组织工程血管[2],在冠心病的防治上有巨大的潜力。EPCs进一步临床应用的前提是培养出足量、功能良好的细胞。本实验观察不同细胞生长因子组合对内皮祖细胞培养中集落形成能力、黏附能力及收获细胞数量的影响,以筛选一个高效而经济的培养体系。

1 材料与方法

1.1 人脐血EPCs培养及分组

参照文献[3]的方法,取脐血50 ml,以密度梯度离心法分离脐血单个核细胞,以$5\times10^6/cm^2$密度接种于包被有纤维连接蛋白的24孔培养皿中,每皿加入1 ml包含有20%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)及链霉素(100 U/ml)的M199培养液,将各孔细胞按随机数字表分为对照组(未加细胞因子)、V组(加VEGF 10 ng/ml)、VE组(加入VEGF 10 ng/ml及ECGS 150 μg/ml),每组6孔,置37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。3 d后,洗去未贴壁细胞,添加培养液继续培养待用。

1.2 EPCs鉴定[2,3]

贴壁细胞以0.25%胰酶消化后,制成1×10^6/ml的单个细胞悬液,加入荧光标记的CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2或AC133 10 μl(1 mg/ml),流式细胞仪分析细胞CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133的表达。

1.3 细胞集落计数

单个核细胞培养第4天,倒置显微镜下可观察到典型细胞团,以大于50个细胞的细胞团为1个集落,在培养皿上下左右中5个方位各随机取1个视野(×40)计数集落数,取均值。

1.4 黏附能力测定[4]

各组细胞培养6 d后消化,行细胞计数后以相同细胞数接种,置37 ℃培养箱中培养30 min,洗去未贴壁细胞,选取10个视野(×200),倒置显微镜下计数黏附细胞。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 10.0统计软件,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 EPCs鉴定

培养3 d洗去不贴壁细胞及碎片后,在倒置显微镜下可见典型细胞集落:呈白色半透明,略高于培养平面,中间为大量的圆形细胞,外周为纺锤形细胞,呈向外扩散状(图1)。培养6 d后流式细胞仪分析示细胞表达CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133,其中CD_{34}、VE-Cadherin、VEGFR-2及AC133阳性细胞比例分别为(65.09±11.89)%、(44.69±9.74)%、(30.46±9.23)%与(19.68±0.81)%。

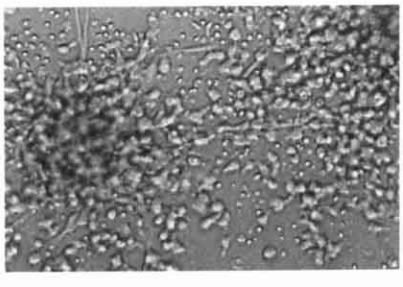


图1 VE组典型集落 (倒置显微镜×100)

2.2 不同细胞生长因子组合对EPCs功能的影响

2.2.1 不同细胞生长因子对EPCs集落形成能力的影响

与对照组相比,V组VEGF显著增加集落数,差异显著[分别为(11.53±1.72)、(5.87±0.55),$P<0.01$];VE组集落数(13.10±2.09)较V组略高,但无显著性差异($P>0.05$)。

(下转2471页)

基金项目:温州市科技基金资助项目(Y2005B031);浙江省自然科学基金资助项目(303648)
Supported by the Sci & Tech Fund of Wenzhou (Y2005B031) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (303648)
作者简介:季亢挺(1967-),男,浙江省青田县人,硕士,主治医师,主要从事冠心病防治研究方面的研究。电话:(0577)88892658
收稿日期:2005-11-15;修回日期:2006-05-20

对于本组资料，Q_{max}、$PdetQ_{max}$ 和 A-G 数的 AUC 都在 0.8 以上，都具有较高的诊断价值；取敏感性和特异性曲线交点作为诊断阈值可以使敏感性或特异性达到均衡。考虑到不同指标的不同作用，也可以根据其对敏感性或特异性的不同需求进行取值。例如：进行筛查性诊断时，宜选取敏感性较高的诊断阈值，以减少漏诊。本组资料中，取 $Q_{max} \leq 22$ ml/s、$PdetQ_{max} \geq 24.5$ cmH_2O 或 A-G 数 ≥ -2.6 时都有 90% 以上的敏感性。而进行确定诊断和诊疗决策时，宜选取特异性较高的诊断阈值，以减少误诊误治。本组资料中，取 $Q_{max} \leq 11$ ml/s、$PdetQ_{max} \geq 37$ cmH_2O 或 A-G 数 ≥ 10.2 时都有 95% 以上的特异性。

总之，本研究显示，女性患者的 $PdetQ_{max} \geq 28.5$ cmH_2O、$Q_{max} \leq 15$ ml/s、A-G 数 ≥ 1.1 时 BOO 可能性大。

参考文献：

[1] CHAIKIN D C, BLAIVAS J G. Voiding dysfunction: definitions[J]. Curr Opin Urol, 2001, 11(4): 395 - 398.

[2] MASSEY J A, ABRAMS P H. Obstructed voiding in the female[J]. Br J Urol, 1988, 61(1): 36 - 39.

[3] FARRAR D J, OSBORNE J L, STEPHENSON T P, *et al*. A urodynamic view of bladder outflow obstruction in the female: factors influencing the results of treatment[J]. Br J Urol, 1975, 47(7): 815 - 822.

[4] 夏同礼，梁德江. 实用下尿路梗阻诊疗学[J]. 北京：科学出版社，2003：209 - 210.

[5] CHASSAGNE S, BERNIER P A, HAAB F, *et al*. Proposed cutoff values to define bladder outlet obstruction in women[J]. Urology, 1998, 51(3): 408 - 411.

[6] 李　静，王觉生. 循证医学如何评价和应用诊断性试验[J]. 中国临床医生，2000，28(8)：61 - 62.

[7] 王吉耀. 诊断试验与循证医学[J]. 中国医师杂志，2002，4(5)：451 - 457.

[8] NITTI V W, TU L M, GITLIN J. Diagnosing bladder outlet obstruction in women[J]. J Urol, 1999, 161(5): 1535 - 1540.

[9] CORMIER L, FERCHAUD J, GALAS J M, *et al*. Diagnosis of female bladder outlet obstruction and relevance of the parameter area under the curve of detrusor pressure during voiding: preliminary results[J]. J Urol, 2002, 167(5): 2083 - 2087.

[10] LEMACK G E, ZIMMERN P E. Pressure flow analysis may aid in identifying women with outflow obstruction[J]. J Urol, 2000, 163(6): 1823 - 1828.

[11] DEFRETTAS G A, ZIMMERN P E, LEMACK G E, *et al*. Refining diagnosis of anatomic female bladder outlet obstruction: comparison of pressure - flow study parameters in clinically obstructed women with those of normal controls[J]. Urology, 2004, 64(4): 675 - 679.

[12] KUO H C. Urodynamic parameters for the diagnosis of bladder outlet obstruction in women[J]. Urol Int, 2004, 72(1): 46 - 51.

[13] 李龙坤，宋　波，熊恩庆，等. 女性膀胱流出道梗阻的压力 - 流率测定的诊断价值[J]. 第三军医大学学报，2003，25(22)：1992 - 1994.

（编辑　王　红）

（上接 2468 页）

2.2.2　不同细胞生长因子对 EPCs 黏附能力的影响　　V 组的黏附细胞数高于对照组但差异无显著性（$P > 0.05$）；VEGF 与 ECGS 合用显著提高 EPCs 黏附能力，与 V 组相比差异显著［分别为（55.53 ± 18.32）、（24.92 ± 4.31），$P < 0.01$］。

3　讨论

内皮祖细胞培养中，集落形成能力及黏附能力是细胞的 2 个主要功能。集落形成能力代表了细胞的增殖能力，集落越多越大则意味着细胞增殖能力越强，收获的细胞将越多；黏附能力越强则细胞贴壁越好，收获的细胞也将越多。VEGF 是目前作用最强大的促血管新生因子，也是培养的最常添加细胞因子。EPCs 体外培养中，VEGF 通过其高亲和力受体特异性地作用于 EPCs，促进其分裂、增殖、迁移和分化[5]。本验结果显示，VEGF 显著增强培养 EPCs 的集落形成能力，与国外报道相似。ECGS 是内皮类细胞培养的添加剂，提供内皮细胞生长的必需营养，在内皮细胞培养中广泛使用。鉴于 EPCs 与成熟内皮细胞同属内皮谱系，我们推测 ECGS 对 EPCs 的体外培养可能有益。实验结果显示，VEGF 与 ECGS 合用显著提高 EPCs 黏附能力，效果优于 VEGF 单用。由于 VEGF 与 ECGS 合用对集落形成能力并无影响，EPCs 数量的增加主要归功于 ECGS 对 EPCs 黏附能力的提高。在其他实验室报道的培养方案中，曾添加多种细胞因子，考虑到多种细胞因子合归功于 ECGS 对 EPCs 黏附能力的提高。在其他实验室报道的培养方案中，曾添加多种细胞因子，考虑到多种细胞因子合用会大大增加 EPCs 培养费用，我们认为，在 EPCs 体外培养时，添加 VEGF 与 ECGS 组合是一种经济有效的方法，可显著改善 EPCs 功能，增加 EPCs 收获数量。

关键词：血管内皮细胞生长因子；内皮祖细胞；细胞培养
中图法分类号：R329.24　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] KAWAMOTO A, TKEBUCHAVA T, YAMAGUCHI J, *et al*. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia[J]. Circulation, 2003, 107(3): 461 - 468.

[2] WERNER N, JUNK S, LAUFS U, *et al*. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury[J]. Circ Res, 2003, 93(2): e17 - e24.

[3] 张怀勤，胡盛寿，杨德业，等. 脐血来源的人类内皮前体细胞培养的实验研究[J]. 中国循环杂志，2003，18(6)：456 - 457.

[4] WALTER D H, RITTIG K, BAHLMANN F H, *et al*. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2002, 105(25): 3017 - 3024.

[5] ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, *et al*. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Embo J, 1999, 18(14): 3964 - 3972.

（编辑　陈聪连）