

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02821970.8

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年9月16日

[11] 授权公告号 CN 100540657C

[22] 申请日 2002.11.1 [21] 申请号 02821970.8

[30] 优先权

[32] 2001.11.2 [33] US [31] 60/335,332

[86] 国际申请 PCT/US2002/035278 2002.11.1

[87] 国际公布 WO2003/040319 英 2003.5.15

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.8

[73] 专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 D·S·科夫曼 R·刘易斯

R·奥尔巴齐

[56] 参考文献

ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION INDUCED BY HARP: IMPLICATION OF N OR C TERMINAL PEPTIDES. E. PAPANICOLAOU. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 274. 2000

审查员 孙彦珂

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

衍生自灵长类胚胎干细胞的内皮细胞

[57] 摘要

描述了诱导灵长类胚胎干细胞使其分化成相对均一的内皮细胞群的方法。这种 ES 衍生的内皮细胞具有内皮细胞一样的形态学以及细胞表面标记特征。在移植如体内组织时,这种 ES 衍生的内皮细胞也能够诱导和参与血管形成(或称血管形成)。本文中的灵长类胚胎干细胞不包括通过破坏人胚胎得到的人胚胎干细胞。

1. 一种引导灵长类胚胎干细胞分化成内皮谱系细胞的方法，所述灵长类胚胎干细胞不包括通过破坏人胚胎得到的人胚胎干细胞，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

(a) 在含有血管内皮细胞生长因子、基础成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子和表皮生长因子的培养基中培养胚胎干细胞的培养物；以及

(b) 传代培养具有内皮细胞形态的细胞以获得内皮细胞培养物。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述灵长类是猕猴。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述灵长类是人类。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，用于将胚胎干细胞培养成内皮细胞的培养基中还含有哺乳动物的血清。

5. 一种衍生自灵长类胚胎干细胞的细胞培养物，所述灵长类胚胎干细胞不包括通过破坏人胚胎得到的人胚胎干细胞，所述培养物主要含有具有下列特征的内皮谱系细胞：具有长形至星形的均一的形态、对于 von Willebrand 因子的存在呈阳性、吸收乙酰化 LDL 的能力呈阳性、以及在植入哺乳动物体内时，具有促进和参与血管形成的能力，其中所述培养物由权利要求 1 所述的方法产生。

6. 一种衍生自灵长类胚胎干细胞的内皮细胞培养物，其特征在于，所述培养物中 90% 以上的细胞结合荆豆凝集素 1 (UEA-1) 这种凝集素的能力呈阳性，其中所述培养物由权利要求 1 所述的方法产生。

## 衍生自灵长类胚胎干细胞的内皮细胞

### 相关申请的相互参照

本申请要求 2001-11-02 提交的美国临时专利申请号 60/335,332 的优先权。

### 关于联邦资助研究或开发工作的声明

待定。

### 发明背景

干细胞被定义为既能够自行更新，又能够分化成为一种或多种分化细胞类型的细胞。人胚胎干细胞就是从预先植入的人胚泡产生的这样的一类干细胞。人胚胎干细胞是多能性细胞，可能还是全能性细胞，也就是说它们确实能够分化成在成年人体中被证实的多种细胞类型，而且很可能分化成人体内所有的细胞类型。

胚胎干细胞(ES 细胞)也可衍生自除人以外的其他各种动物。例如，许多科学研究工作都是利用小鼠胚胎干细胞进行的。对于一种特定物种，ES 细胞培养物的制备方法一旦制定之后，就有可能从多种途径利用这种 ES 细胞以及据以制备的动物，来探索有关所研究的这种动物的遗传方面的有价值的信息资料。例如，在过去的十年间，已经有可能培养出小鼠 ES 细胞的培养物，其中每一种小鼠 ES 细胞培养物都有一个或多个特异性基因是被剔除的。已经在各种小鼠胚胎细胞系中使用的有些技术，都能够转用于其他动物种，也有多种技术则不能。例如，能够用于创立小鼠胚胎细胞培养物的几种基础技术，都不能完善地转用于多种其他动物种。对于涉及人 ES 细胞的培养和使用的各种技术的开发，由于人类与小鼠之间在种系发生方面的距离，小鼠细胞可能并不是最良好的模型。然而，在有关人 ES 细胞的培养和技术科学发展过程中，初期的研究工作都是利用非人灵长类进行的，例如，利用猕猴。已经证实，其他灵长类 ES 细胞培养物，对于能够容易地转用于人类细胞培养的各种系统，都是相当可靠的模型。举例来说，各种小鼠 ES 细胞培养物，对于维持非分化细胞的生长，要求采用白血病抑制因子(LIF)或其他 gp130/STAT3 发送信号途径，而在人和猕猴的 ES 细胞培养物方面，对于非分化细胞的生长，则不需要 LIF 参与。在进行造血作用的研究之前，先利用猕猴的 ES 细胞，来验证这一系统对于

这项技术转用于人 ES 细胞培养的可能性，进行临床前期的调查研究。

干细胞的潜在诱人的用途之一就是对于人类组织的移植。在科学研究方面热切期望能够开发出各种指导干细胞分化成能够移植入人体内以替代或增强机体组织的各种专门的细胞谱系。为此，必须开发的第一批技术，就是指导干细胞定向分化成理想的专门的细胞谱系。已经提出的各种技术包括：引导干细胞成为造血系、神经系、心肌细胞系、胰腺系以及其他各种细胞谱系。已经证实，这类技术都各具特色，自成体系，互不相关，意味着对于每一个理想的新的细胞谱系，都要求一套新的不同的技术。

在人体内，内皮细胞可构成连接血管系统、淋巴系统和形成毛细血管网的一整套网络系统。内皮细胞可支配营养物质的流通、并且可引导产生形式多样的生物学活性分子，以及对其作出种种反应。已经证实，人 ES 细胞能够分化出多种子代细胞类型，包括内皮细胞。这已经不可能是象原先那样指导产生内皮细胞谱系的可能导引不同的衍生细胞的人 ES 细胞。

### 发明概述

简言之，本发明开发了一种方法，该方法能够引导干细胞培养物分化成内皮细胞培养物。所述方法包括，在原先已知含有内皮细胞的培养基内培养胚胎干细胞，此时该内皮细胞便具有在培养过程中支持胚胎干细胞分化成内皮细胞的能力。本文中的灵长类胚胎干细胞不包括通过破坏人胚胎得到的人胚胎干细胞。

简言之，本发明还涉及衍生自胚胎干细胞的内皮细胞培养物，它具有一般内皮细胞所特有的形态学和细胞表面标记物，并且能够在体内诱导组织的血管形成。

本发明的一个特色是，由于其步骤比较简单，因而其实施相当有效。其结果是，所形成的培养物中的内皮细胞群相当均一。

通过如下的说明再配合附图内容，就更突现了本发明的其它目的、优点和特色。

### 附图简述

未提供。

### 发明详述

本发明涉及引导灵长类胚胎干细胞分化成内皮细胞的方法，并涉及制造具有相当纯度的内皮细胞群体的方法。该方法的基础是将灵长类胚胎干细胞与一种指定的蛋白质生长因子或者可诱导受处理细胞在形态学方面转变为内皮细胞的其他因子一起培养。与指导胚胎干细胞分化成其他细胞谱系的其他各种技术不同的是，采用

本文所述的这种方法从胚胎干细胞产生的内皮细胞培养物，其外观相当均一，都是由具有血管形成能力的内皮细胞所构成。

本培养方法的基础是，在含有血管内皮细胞生长因子(VEGF)、基础成纤维细胞生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子(IGF-1)和表皮生长因子(EGF)的培养基中培养未分化的灵长类胚胎干(ES)细胞。这类因子都可从市售的称为内皮细胞基础培养基(EBM-2, Clonetics/Bio Whittaker)的培养基中检出。这种培养基是原先已知的，可在培养物内维持内皮细胞生长。但是原先并不知道，这种培养基竟可用于支持ES细胞分化成内皮细胞。现已发现，这类生长因子的组合已经足以支持ES细胞分化成内皮细胞。在培养基内可能并不需要全部4种因子，至于可以免去哪一种因子，能够容易地根据经验实验方法来确定，而不至于偏离本发明的意图。

本方法与可产生包括内皮细胞在内的异类混合物的现有技术的不同之处在于，从ES细胞转化为内皮细胞的细胞培养物相当均一。曾尝试过其他各种方法，但都未能成功实现这种转化过程。例如采用佛波酯，与基质细胞加血清一起培养，并从胚状体分离内皮细胞。这些努力都未能够可复现地产生以内皮细胞为主的培养物。相反，在此介绍的这种方法却是简单而有效的，其所获得的细胞培养物中含有，在形态学方面具有类似内皮细胞特征的细胞。

本发明所制备的内皮细胞培养物具有若干特征。这种细胞的形态学特征，类似长形至星形的内皮细胞。相反，在另一类培养基上生长的ES细胞，则可形成含有各种细胞类型的异类细胞群，而没有鲜明的内皮细胞样细胞。在基质胶(TM)培养基中，内皮细胞可迅速形成管状结构。这种内皮细胞在有 von Willebrand 因子(vWF)存在时呈阳性反应。并且具有高水平的荆豆(*Ulex europaeus*)凝集素1(UEA-1)的结合，并有整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 以及表面抗原CD146的表达。这类细胞的另一个特征是，还可吸收乙酰化低密度脂蛋白(LDL)。这类细胞不能表达在一般内皮细胞表面并不经常存在的两种普通抗原CD31和VE-钙粘着蛋白。这类内皮细胞当与肿瘤细胞一起转移入SCID(重度联合免疫缺陷)小鼠体内时，具有使所形成的肿瘤体有效地出现血管形成的能力。从而证实，这种细胞在体内具有恢复和参与血管形成的双重能力。这类细胞参与血管形成的能力特别突出，因为这种特征提供了这样一种可能性，即，有可能将遗传性质改变了的内皮细胞移植入要求血管形成的组织内，使该变异的细胞在体内的血管基质中生存，从而表达插接入该细胞内的基因。

与能够从胚胎干细胞诱导形成的其他各种细胞类型不同的是，在此论述和鉴定的这种内皮细胞培养物，在其中产生的谱系中的细胞相当均一，即都是内皮细胞。这种由ES细胞产生的内皮细胞培养物都是由具有均一形态的细胞所形成的，都表

都表现出内皮细胞的特征。然而，限于现有的细胞培养技术，现在还不能肯定地认为，由 ES 细胞产生的内皮细胞培养物完全不含有其他各种细胞类型。只能认为由 ES 细胞产生的内皮细胞培养物主要是由内皮细胞组成，并且是可用作对宿主实行体内移植的内皮细胞，以促进并参与组织的血管形成的一种实用的来源。利用对于内皮细胞的特征施用的一种普通测试方法，即与凝集素荆豆凝集素 1 (UEA-1) 相结合的能力，已发现在所产生的培养物中，与这种凝集素荆豆凝集素 1 相结合的，具有再现性的细胞在 90% 以上。在本方法的若干变化中，能够与荆豆凝集素 1 结合的细胞百分率可能有所不同。但是，在此论述的本方法所制备的内皮细胞培养物中，所培养的细胞至少有 75%，更好是在 90% 以上，与凝集素荆豆凝集素 1 的结合能力呈阳性。

以下实施例都是选用猕猴进行的，用人 ES 细胞也能获得同样的过程和结果。利用衍生自 ES 细胞的人内皮细胞，就为对人类患者开发组织移植提供了可能性。内皮细胞的移植，对于需要血管形成的缺血组织是最为理想的。此外，对于需要改善血管形成的肌体部位，引入内皮细胞可能都是有用的。由于 ES 细胞的前体细胞能够以任何数量生长，这样就有可能产生大量内皮细胞以供临床实验或治疗之用。

## 实施例

### 方法

#### 细胞培养

将未分化的猕猴 ES 细胞 (R366.4 细胞系) 按前述方法 (Thomson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848 (1996)) 进行培养。简言之，将 R366.4 细胞系与经过照射的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 在含有 DMEM、20% FBS (Hyclone, Ogden UT)、2mM L-谷氨酰胺 (Sigma, St. Louis, MO)、0.1mM 2-巯基乙醇 (Sigma) 和 1% MEM 非必需氨基酸 (Invitrogen) 的培养基中共培养。未分化的细胞每日更换新鲜的培养基，并大约每 5-7 天传代于新的 MEF 上。为促进内皮细胞的分化，在接种 24 小时后除去 ES 细胞的培养基，更换含有 EGM2、5%FBS、VEGF、bFGF、IGF-1、EGF 和抗坏血酸的培养基 (EGM2) (EGM2-MV Bullet Kit, Clonetics/Bio Whittaker, Walkersville MD)。ES 细胞在 EGM2 培养基中分化 29 天，每 3-5 天更换一次培养基。分化的猕猴 ES 细胞用 0.05% 胰蛋白酶/0.53mM 乙二胺四乙酸 (EDTA) (GIBCO/BRL) 分离 5 分钟，离心，再重新放在装有 EGM2 的 10 厘米组织培养皿中，其中不含经过照射的 MEF 细胞。24 小时后除去未附着的细胞，在附着的细胞中加入新鲜培养基。猕猴 ES 细胞产生的内皮细胞 (RESDECs) 可生长至融合，并在 EGM2 培养基中连续传代和扩增。

人脐带静脉细胞 (HUVECs) (Clonetics/Bio Whittaker) 也可采用各种已知的方法在 EGM2 中生长和传代。

### 在基质胶 (Matrigel) 上形成管

在 24 孔组织培养平板的每一个孔中加入 0.2 毫升基质胶 (Becton Dickinson), 置于 37°C 下至少 30 分钟, 使其凝固。形成凝胶后, 在基质胶顶端放入 0.2 毫升含有  $5 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  RESDECs 的细胞悬浮液, 培养物在 37°C/5% CO<sub>2</sub> 下培养并在 24、48 和 72 小时观察细胞重排成管形的毛细结构。各项实验都需重复进行 3 次, 对于具有代表性的孔进行显微摄影记录。

### VEGF 和 bFGF ELISA

RESDECs 在不含 VEGF 或 bFGF 的 EGM2 内培养 3 天。在 EGM2 内补加 10% 剔除型血清置换物 (GIBCO) 以代替胎牛血清 (FBS), 或补加 10% FBS 的 DMEM。72 小时后收集条件培养基 (CM) 并离心除去死细胞。用单一的 EGM2 作为阴性对照。通过比色计 ELISA 测定分析 CM 内的 VEGF 或 bFGF (R & D 系统, Minneapolis, MN)。

### 流式细胞术

用不含 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 的 FBS 洗涤 RESDECs, 并用 0.05% 胰蛋白酶/0.53mM 乙二胺四乙酸处理 5 分钟, 将其从单层细胞层中分离出来。将分离的细胞离心, 再用补加 2% FBS 和 0.1% 叠氮化钠的含有 PBS 的 FACS 培养基洗涤处理。经用 80 微米 nitex 过滤之后, 分成若干等份称量, 再用以 FACS 培养基稀释至相应浓度的同型对照物或抗原特异性抗体进行染色处理。采用抗原特异性原代抗体, 继以荧光标记的次级抗体 (间接染色法) 或荧光结合的抗原特异性抗体 (直接染色) 分析细胞表面的抗原表达情况。同型对照物分别采用相应的未结合的小鼠和羊 IgGs (都是 Sigma), 以及 FITC-结合的小鼠 IgG (Pharmingen, San Diego, CA)。采用 FITC 标记的抗-羊 IgG 抗体 (Sigma) 来检测未标记的抗原特异性抗 flk-1 抗体 (Research Diagnostics)。采用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (Caltag) 来检测未标记的抗 VEGF 受体 1 (Flt-1) 和抗 VEGF 受体 2 (Flk-1) 的抗体 (两者都是 Sigma)。采用大鼠抗小鼠 IgG-FITC 结合的次级抗体 (Caltag) 来检测未经标记的 P1H12 抗体 (小鼠 IgG1, 由明尼苏达大学的 Robert Hebbel 博士提供)。对于该细胞还可采用生物素化的 VEGF 试剂盒 (R & D 系统) 检测 VEGF 受体的表达情况, 以及其与荆豆凝集素 1 (UEA-1) 相结合的能力 (Vector labs)。采用的直接抗体有 HLA-A、B、C-FITC (Pharmingen) 和  $\alpha$ V $\beta$ 3/c1

LM609-FITC(Chemicon)。采用人体脐带静脉细胞(HUVEC)(Clonetics)作为阳性对照。进行分析的细胞不必固定在 FACSscan 或 FACS Calibur(Becton Dickinson), 使用碘化丙锭来排除死亡的细胞。用 CellQuest 软件(Becton Dickinson)进行数据分析。

### 免疫染色

在无血清 EGM2 中用稀释的 diIaCLDL(Molecular Probes)分析乙酰化 LDL 受体。细胞用含有 diIaCLDL 的 EGM2 洗涤 2 次并培养过夜。在细胞洗涤之后, 用荧光显微镜(UV, 若丹明滤片)进行观察。采用 HUVECs 作为阳性对照。

用羊抗兔 IgG-FITC 次级抗体(Sigma)检测 von Willebrand 因子蛋白(vWF)(DAKO)的表达情况。细胞用 von Willebrand 因子蛋白固定, 并在室温下培养 1 小时, 洗涤, 再在次级抗体中培养 30 分钟。洗涤后用荧光显微镜观察细胞(UV, FITC 滤片)。仍然选用 HUVECs 作为阳性对照。

### 基质胶栓(Plug)

在一项实验中, 对于 SCID 小鼠(Balb/Scid, Harlan Sprague Dawley)经皮下注射含有  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  RESDECs 的 0.5 毫升基质胶(Becton Dickinson)。在第 2 项实验中在固化的基质胶中植入一块含有 RESDECs 的纱布。分别经 14、21、35 和 42 小时后取出该基质胶栓。在取出和固地该批栓之前数分钟, 经静脉内注射高分子量的 FITC-葡聚糖, 以观察血管生成状态。同时还制备标准的苏木紫-伊红(H/E)染色的载玻片。

### 体内研究

采用胰蛋白酶处理收集附着的 RESDECs, 与小鼠乳腺癌 C755 细胞系相混合。在 2 次分别进行的实验中, 各对一组 Balb/c-SCID 小鼠经皮下注入, 或者是  $1 \times 10^6$  C755 肿瘤细胞系, 或者是  $1 \times 10^6$  RESDECs, 或者是  $1 \times 10^6$  的肿瘤细胞和  $1 \times 10^6$  RESDECs 的混合物。自开始生长之日起, 每隔 3-5 天用卡钳对肿瘤进行测量。大约在移植之后 3 周处死全部小鼠, 以对于生长的肿瘤进行组织化学分析。在仅施用 RESDECs 的小鼠中肿瘤无法生长。

### 肿瘤的免疫组织化学染色

在第一项实验中, 将肿瘤在 10%的福尔马林中分离并固定以备制作石蜡切片。



为制备冷冻切片须将肿瘤固定在 2%多聚甲醛中。全部切片都固定在 Fisher Superfrost 载玻片上。采用标准 ABC 技术 (VetaStain Elite ABC kit, Vector labs) 处理各切片使其表达 HLA-I 级 A、B、C (W6/32 抗体, IgG<sub>2a</sub>) 和 CD31 (IgG<sub>1</sub>) (Novacatra, Vector)。以小鼠的 IgG<sub>1</sub> (Sigma) 和 IgG<sub>2a</sub> (Southern Biotechnology) 作为同型对照。采用 DAB 底物 (Vector) 来观察过氧化物酶的活性, 各份切片都采用苏木紫进行复染处理。

## 结果

### 从猕猴的 ES 细胞衍生内皮细胞

猕猴的 ES 细胞置于如材料和方法一节所述的含有 VEGF、bFGF、EGF 和 IGF 的 EGM2 培养基中生长。大约 5-10 天后, 这些 ES 细胞可变成类似长形或星形的内皮细胞的均一形态。相反, 在单纯补加 FBS 的培养基中生长的 ES 细胞则可分化成为无明显内皮细胞外观的其他异类细胞群。该类可能的内皮细胞可连续传代转种, 大约可扩增至 20 个细胞群。在内皮细胞基础培养基中生长可维持其均一的外观。对于这类内皮细胞特征的初步测试, 可将细胞放置在以基质胶为基础的培养基中, 这类细胞可迅速形成管形毛细结构。这种结构与 HUVECs 或其他内皮细胞群在以基质胶为基础的培养基中所形成的管形结构相类似。据细胞遗传学研究表明, 所有这类细胞都具有正常猕猴的 40 XY 染色体组型。此项细胞遗传学研究结果十分重要, 证实了这种细胞并不是经过长期培养之后变异而成的, 也决不可能是潜在污染的供未分化的 ES 细胞生长用的小鼠胚胎成纤维细胞所产生。

猕猴 ES 细胞产生的细胞的电子图象展示了典型的内皮细胞特征。其中包括, 多处密集的圆形或短杆形 Weibel-Palade 小体、细胞之间紧密连接、有若干细胞内/细胞外空泡。

### 免疫表型测定

然后, 据对于这类猕猴产生的内皮样细胞进行免疫组织化学染色处理表明, 这类细胞中存在着 von Willebrand 因子 (vWF)、这类细胞具有快速吸收乙酰化 LDL 的能力、并具备与凝集素荆豆凝集素-1 (UEA-1) 相结合的能力。据流式细胞计数研究证实了, 其中有高水平的荆豆凝集素-1 的结合, 以及可由 P1H12 抗体识别的整联蛋白  $\alpha v \beta 3$  和表面抗原 CD146 的表达。根据这类结果, 我们就将其称之为猕猴胚胎干细胞产生的内皮细胞 (RESDECs)。令人不解的是, 抗 VEGF 受体 flk-1 和 flt-1 并不会与这类 RESDECs 相结合, 即使与 HUVECs 的结合, 也相当微弱。然而, 据采

用生物素化的 VEGF 以及链式抗生物素蛋白-FITC 进行的试验表明了其与 RESDEC (和 HUVEC) 相结合的情况。用一种抗 VEGF 的抗体进行的阻断处理, 表明这种结合具有特异性。上述这类结果提示, 一方面, 抗人的 flk-1 和 flt-1 的抗体并不会与猕猴产生的细胞发生交叉反应; 另一方面, 这类细胞却可表达一种不同的 VEGF 受体。据 RT-PCR 研究表明, 在 RESDEC 中有 flk-1 mRNA 的表达, 这提示了各种抗体可能并无交叉反应。当然, 这很可能是, 从这种 mRNA 产生的蛋白质, 并未能完全在稀薄表面表达出来。

RESDECs 与 HUVECs 的不同之处在于, 其中缺乏 CD31 和 VE-钙粘着蛋白的表达。这是可在内皮细胞表面发现的 2 种普通的表面抗原, 但是并不均一。RT-PCR 研究验证了, 并不存在可表达该 2 种基因的 mRNA。然而, 有些对于小鼠 ES 细胞产生的内皮细胞进行的研究也表明, 在某些内皮细胞群内, 也缺乏 CD31 和 VE-钙粘着蛋白。尽管 CD31 和 VE-钙粘着蛋白可以作为内皮细胞的阳性标记物, 但是缺乏这种表达, 也并不足以排除其为内皮细胞。

### 从 RESDEC 细胞的血管形成

首先利用基质胶栓试验法评定了 RESDEC 在体内的功能。先将 RESDEC 包入悬挂在固化的基质胶层中的纱布内。然后, 将该批基质胶栓分别经皮下植入一组重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠。大约经过 28 天后, 再对小鼠经静脉内注射 FITC-葡聚糖溶液, 并取出栓进行成象处理。从而证实了, 在含有 RESDEC 的纱布周围形成强力的血管定位分布, 这就是内皮细胞所特有的一种趋化性现象。从这种血管形成作用的表现来看, 其中很可能就是小鼠对于 RESDECs 所产生的各种因子发生反应的血管形成的一个方面。确实, 其后对于 RESDECs 的上清液进行的 ELISA 分析表明, 这类细胞中果然有大量的 VEGF 的产生。不过, 由内皮细胞经常可产生的另一种血管生成蛋白质 bFGF, 在 RESDECs 上清液中, 却未能测出。

为证实由 RESDECs 所产生的新血管, 分别将均匀悬浮的  $0.5-1.0 \times 10^6$  细胞的基质胶栓经皮下植入 SCID 小鼠。再对小鼠注射 FITC-葡聚糖, 然后取出栓进行成象处理。此时, 可见到有较大的血管结构, 其后对于栓进行的组织学检验表明, 这种 RESDECs 能够促使血管形成。

然后, 选用另外一批 SCID 小鼠来验证 RESDECs 对于在体内积极参与肿瘤内血管形成方面的作用。其方法是, 将小鼠乳腺癌细胞系 C755 细胞, 单独或与等量的 RESDECs 一起, 经皮下注射。按定期间隔测量肿瘤的生长情况, 其中与 RESDECs 一起注射时, 肿瘤的生长显著加快。值得注意的是, 用量为  $10^6$  的 RESDECs 单独注射

时并未能引起任何可测量的肿瘤的生长。证明这种细胞并没有直接的肿瘤发生作用。这类肿瘤受到带有抗人特异性抗体(可与猕猴细胞发生交叉反应,而小鼠细胞则不然)的肿瘤高度的血管和免疫组织化学染色,显然表明是 RESDECs 内的内皮细胞层所起的作用。在有 RESDECs 一起注射的肿瘤内,采用抗 MHC-I 级抗体或抗 von Willebrand 因子(vWF)抗体染色时,大量内皮细胞都呈阳性反应,在单独由 C755 细胞系产生的肿瘤中的内皮细胞,对于这类抗原则都呈阴性反应。