

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.001

· 基础研究 ·

内皮细胞特异性启动子 pvWF 和 pVE 的克隆及表达 *

陈毅瑶¹ 罗莎¹ 吴涌¹ 李卓¹ 周妙金¹ 鄢玲仟¹ 梁德生^{1,2,△}

(1 中南大学医学遗传学国家重点实验室 湖南长沙 410078; 2 湖南家辉遗传专科医院 湖南长沙 410078)

摘要 目的:克隆并验证内皮细胞(Endothelial Cells, ECs)特异性启动子,为转染人胚胎干细胞(hESC)后实时监测 ECs 的定向分化情况以及利用干细胞实施血友病 A 的基因治疗研究提供基础。**方法:**通过酶消化法原代分离人脐静脉内皮细胞(HUVECs),结合 RT-PCR 和免疫荧光验证分离后的 HUVECs 表达内皮细胞特异性标志基因血管性血友病因子(vWF)和血管内皮钙粘素(VE-cadherin/CDH5)。抽提 HUVECs 的 gDNA,通过 PCR 扩增内皮细胞特异性表达基因 vWF 和 VE-cadherin 转录起始位点上游不同大小的启动子片段,将其取代报告基因载体 pEGFP-N1 中的广谱启动子 CMV,构建 4 个质粒,即 pvWF-1、pvWF-2、pVE-1、pVE-2,分别转染 HUVECs 和 hESCs,48 h 后观察并比较各启动子片段启动绿色荧光蛋白 GFP 表达情况,筛选最具特异性及转录活性的启动子片段。**结果:**通过酶消化法,本研究成功分离出具有典型上皮样细胞的 HUVECs。RT-PCR 和免疫荧光结果表明 HUVECs 特异性表达 vWF 和 VE-cadherin。酶切及测序证实所构建的 4 个含 ECs 特异性启动子片段的质粒与理论序列相符,通过核转染至 HUVECs 及 hESCs 后,48 h 后观察到所克隆的 VE-cadherin 2105bp 启动子片段具有内皮细胞表达的特异性和较强的转录活性。**结论:**本研究成功筛选出具有内皮细胞表达特异性及较强转录活性的启动子片段。

关键词:内皮细胞;人胚胎干细胞;特异性启动子;血管性血友病因子;血管内皮钙粘素;基因治疗

中图分类号:Q782 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)17-3201-06

Cloning and Expression of Endothelial Cell-specific Promoter pvWF and pVE*

CHEN Yi-yao¹, LUO Sha¹, WU Yong¹, LI Zhuo¹, ZHOU Miao-jin¹, WU Ling-qian¹, LIANG De-sheng^{1,2,△}

(1 State Key Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China;

2 Hunan Jiahui Genetics Hospital, Changsha, Hunan, 410078, China)

ABSTRACT Objective: To lay the foundation for hemophilia A gene therapy and real-time monitoring of human embryonic stem cells differentiation to endothelial cells, endothelial cell-specific promoters were cloned and its specificity was validated. **Methods:** A stable method of obtaining endothelial cells from umbilical vein was established. Then the expression of endothelial cell specific marker gene vWF and VE-cadherin were verified via RT-PCR and immunofluorescence. Promoter fragments of vWF and VE-cadherin gene were amplified using PCR. The EGFP expression vector originated from pEGFP-N1. The cloned promoters were substituted for the endogenous CMV promoter. The plasmids: pvWF-1, pvWF-2, pVE-1 and pVE-2 were constructed in total, which were then transfected into HUVECs and hESCs. In order to find the strongest and most specific promoter, the expression of GFP 48 h after transfection were observed and compared. **Results:** Endothelial cells were isolated from umbilical vein and the markers of their specific genes were detectable. Four plasmids were confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. HUVECs and hESCs were transfected by the constructed plasmids, and the GFP expression under fluorescence microscopy showed that pVE-2 promoter was of most specificity and transcription activity. **Conclusions:** An endothelial cell specific promoter with the highest GFP specificity and activity in endothelial cells was successfully cloned.

Key words: Endothelial cells; Human embryonic stem cells; Endothelial cell-specific promoter; vWF; VE-cadherin; Gene therapy

Chinese Library Classification(CLC): Q782 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3201-06

前言

在组织特异性启动子^[1](tissue-specific promoter)的调控下,基因往往只能在某些特定的器官或组织表达,并表现出发育调节的特性,这有望解决目前的基因治疗策略缺乏靶向性问题^[2]。

血友病 A 是临床上最常见的遗传病之一,为 X 连锁隐性遗传,患者由于凝血因子 VIII(FVIII)的功能缺陷导致凝血障碍。传统的蛋白替代疗法无法根治遗传性的血友病,并且存在输血污染、需要反复输注等限制^[3]。已有研究表明,在正常机体内,内皮细胞(endothelial cells, ECs)能分泌 FVIII^[4],而且能合成 FVIII 的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31071301,81000208)

作者简介:陈毅瑶(1990-),女,硕士研究生,主要研究方向:基因治疗与干细胞生物学,电话:15273139142, E-mail:chenyiyao@sklmg.edu.cn

△ 通讯作者:梁德生, E-mail: liangdesheng@sklmg.edu.cn

(收稿日期:2015-01-13 接受日期:2015-02-03)

天然载体蛋白——血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF)^[5]。vWF 可以与 FVIII 结合形成韦伯氏小体(Weibel-Palade bodies, WPBs),从而保护 FVIII 免于自发降解和酶解^[6]。此外,内皮细胞是人体最接近血流的一层细胞,释放的活性物质能经由血液循环扩散到全身,从而发挥广泛的作用,已被视为血友病 A 基因治疗的理想靶细胞。

具有多向分化潜能的人胚胎干细胞在体外可定向分化为内皮细胞,为获取足够的内皮细胞提供了保障^[7]。本研究组前期已经通过基因打靶技术将人凝血因子等治疗基因定点整合至 hESCs 基因组的 rDNA 区^[8-10]。为了获取充足的由定点整合 hESCs 分化而来的高纯度和具备特定生理功能的内皮细胞,本研究我们尝试克隆内皮细胞特异性表达基因 vWF 和 VE-cadherin 的启动子片段^[11-13],将其连接至 pEGFP-N1 真核表达载体中驱动 GFP 报告基因的表达,并以此比较各启动子片段在原代分离内皮细胞中的转录差异,从而筛选出最具内皮细胞表达特异性和转录活性的启动子片段,为利用该报告基因载体转染 hESCs 后,实时检测内皮细胞定向分化程度以及富集纯化足够数量的内皮细胞提供保证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、细菌和质粒 脐带(湖南省妇幼保健院,标本来自产房,经产妇本人同意),人胚胎干细胞株 H9 购自 Wicell,大肠杆菌 JM109 为本实验室存留,pEGFP-N1 购自 CLONTECH 公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、血清替代物(KSR)、非必须氨基酸(NEAA)、L-谷氨酰胺、人碱性成纤维生长因子(bFGF)、分散酶(Dispase)、0.25%胰酶、β-巯基乙醇、TRizol、脂质体转染试剂盒(Lipofectamine 2000)购自 Invitrogen 公司,明胶、多聚甲醛购自 Sigma 公司,EGM-2 培养基、人干细胞核转试剂盒-2 购自 Lonza 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Phusion 高保真 DNA 聚合酶、LA-Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA marker 购自 NEB、FINNZYMES、Takara 等公司,反转录试剂盒购自 Promega 公司,vWF、VE-Cadherin 抗体购自 ABCam 公司。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪购自 Applied Biosystems, 型号为 2720;电泳仪、凝胶电泳成像分析仪均购自 Tanon,型号分别为 EPS 300、1600;CO₂ 培养箱购自 Thermo Forma 公司,型号为 3111;激光共聚焦显微成像系统购自 Leica,型号为 TCS SP5;荧光倒置显微镜购自 Leica,型号为 DMI 3000B。

1.2 方法

1.2.1 脐静脉内皮细胞的分离及培养 用 PBS 多次灌注清洗脐静脉内腔,至另一端流出的液体无明显混浊,再以注射器灌注 0.05% 胰酶 +0.02% EDTA 至整个脐静脉,系紧脐带两端。置 37℃ 培养箱内消化 30 min 后,从脐静脉一端灌注 DMEM+10% FBS(约 20 mL),收集悬液至 50 mL 离心管。400×g 离心 5 min,吸尽上层清液,将细胞接种于 0.1% 明胶包被好的培养皿中,加入适量 EGM-2 培养基,置 37℃,5% CO₂,饱和湿度培养箱内培养,每 3-4 天换液一次。

1.2.2 免疫荧光鉴定内皮细胞表面标志物 将内皮细胞接种

于 0.1% 明胶包被的 24 孔培养板里的爬片上,待细胞汇合度达 80%左右时,取出爬片,4%多聚甲醛室温固定 15 min。0.1% Triton-PBS(PBST)透化处理,PBS 洗涤 3 次。5% BSA 封闭 30 min,分别加入兔抗人单克隆抗体 vWF、VE-Cadherin 室温孵育一抗 1 h。经过适当洗涤、封闭后,加入荧光标记的羊抗兔二抗,37℃ 孵育 1h。PBS 洗涤后,DAPI 染核,60%甘油封片,激光共聚焦下观察并拍照。

1.2.3 RT-PCR 检测内皮细胞特异性分子的表达 RNA 抽提和 RT-PCR 均按照反转录试剂盒的说明书进行。检测 vWF、VE-cadherin (CDH5) 两个内皮细胞特异性表达的基因,以 β-actin 为内参。反应条件为(95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,循环 32 次;72℃,10 min)。

表 1 RT-PCR 引物序列表

Table 1 Primer Sequences of RT-PCR

Gene	Primer	Sequences
vWF RT (144bp)	vWF-RT-F	5'-AGTGTGCCTGCAACTGTGTC-3'
	vWF-RT-R	5'-CCACAGGGTAGATGGTGCT-3'
CDH5 RT (185bp)	CDH5-RT-F	5'-CAGCCCAAAGTGTGTGAGAA-3'
	CDH5-RT-R	5'-CGGTCAAACAGCCCATACCT-3'
β-actin RT(151bp)	β-actin-RT-F	5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3'
	β-actin-RT-R	5'-GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

1.2.4 内皮细胞特异性启动子扩增及 GFP 报告基因质粒构建 抽提原代分离 HUVECs 的 gDNA,以其为模板 PCR,用 Phusion 高保真酶扩增 vWF、VE-cadherin 启动子片段,反应条件为(98℃ 5 min;98℃ 30 s,64℃ 30 s,72℃ 2 min,循环 30 次;72℃,10 min)。将 PCR 产物连接着 pGEM-T 载体,并进行酶切、测序鉴定。鉴定正确的阳性克隆载体和 pEGFP-N1 分别用 Ase I、Sac II 双酶切,酶切产物胶纯化后连接得到 pvWF-1、pvWF-2、pVE-1、pVE-2 四个质粒。

表 2 PCR 扩增启动子引物序列表

Table 2 Primer Sequences of promoter

Vector	Primer	Sequences
pvWF-1 (-871~457bp)	vWF1-F	5'-attaatTGGAGAAGCAGTGAGGAGGT-3'
	vWF-R*2	5'-CCACTGCATGAAGAAAAGCA-3'
pvWF-2*1 (-1750~457bp)	vWF2-1F	5'-attaatCTAGGTTGGGGGATG-GATTT-3'
	vWF2-1R	5'-GGTTGAATGGATCGGCTAAA-3'
	vWF2-2F	5'-TCAGGGTGCTTGTCTCAGTG-3'
	vWF-R*2	5'-CCACTGCATGAAGAAAAGCA-3'
pVE-1 (-1285~121bp)	VE1-F	5'-attaatAGATGCCAGCCATAAGCTGT-3'
	VE-R*3	5'-GGGATGTTTCTGTTCCGTTG-3'
pVE-2 (-1984~121bp)	VE2-F	5'-attaatGCACGTAGACCATGAGGACA-3'
	VE-R*3	5'-GGGATGTTTCTGTTCCGTTG-3'

Note: Ase I restriction enzyme site was introduced to the upstream primer.

*1: two segments (each about 1.2 kb) of which pvWF-2 were connected together via directed cloning; *2: pvWF-1 and pvWF-2 share a pair of downstream primer vWF-R; *3: pVE-1 and pVE-2 share another pair of downstream primer VE-R.

1.2.5 细胞转染及 GFP 表达比较 HUVECs 脂转。细胞的汇合度约 80 % 时可进行转染, 转染前两小时换液。取 pVWF-1、pVWF-2、pVE-1、pVE-2 四个质粒以及对照质粒 pEGFP-N1 各 4 μ g, 按脂质体转染试剂盒说明书分别转染 HUVECs 细胞。转染后置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 48 h 后荧光显微镜下观察并比较内皮细胞中 GFP 的表达差异。

hESCs 核转。将 hESCs 接种于滋养层细胞 (MEF) 上, 以 hESCs 培养基 (DMEM/F12+20% KSR+10 ng/mL bFGF+2 mM L- 谷氨酰胺 +1% NEAA+0.1 mM β - 巯基乙醇) 维持培养。转染前细胞用 dispase 按 1:1 传至 matrigel 上, 使用 MEF 条件 ES 培养基培养至接近汇合, 核转前 2 h 换液。同样取上述 5 个质粒各 5 μ g, 按人干细胞核转试剂盒 -2 说明书核转。核转后加入

500 μ L RPMI-1640, 室温静置 5 min 后加入 10 μ M Y27632, 接种于新鲜 MEF 上, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 48 h 后荧光显微镜下观察并比较 hESCs 中 GFP 的表达情况。以上实验均独立重复三次。

2 结果

2.1 内皮细胞的分离及培养

将分离的脐静脉细胞接种至 0.1% 明胶包被的 6 cm 培养皿中, 24 h 后即可在显微镜下观察到内皮样的贴壁细胞, 5 天左右细胞集落慢慢形成, 细胞呈短梭形、多角形等形态。仅需 10-14 天, 内皮细胞的汇合度可达到约 95%, 可以进行传代或冻存(图 1)。

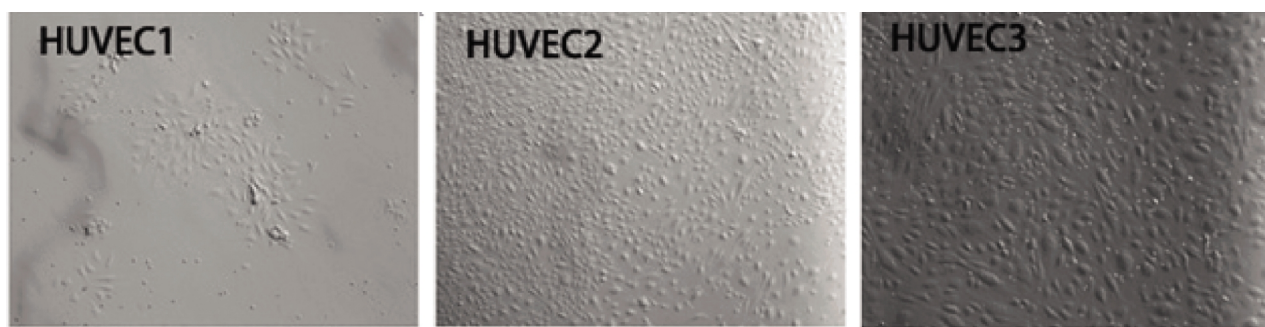


图 1 体外培养的脐静脉内皮细胞

Fig. 1 HUVECs cultured in vitro

Note: HUVEC1; In vitro culture of HUVECs, day 2(50 $\times$); HUVEC2; In vitro culture of HUVECs, day13(50 $\times$); HUVEC3; In vitro culture of HUVECs, day 13(100 $\times$).

2.2 免疫荧光验证原代分离内皮细胞

将培养的原代内皮细胞接种至爬片后, 通过免疫荧光检测, 结果显示内皮细胞的膜蛋白标志物 CDH5 能定位于细胞膜

上, 且内皮细胞表达特异性的 vWF 蛋白均匀分布于细胞质, 证实所分离的原代细胞为高纯度的内皮细胞(图 2)。

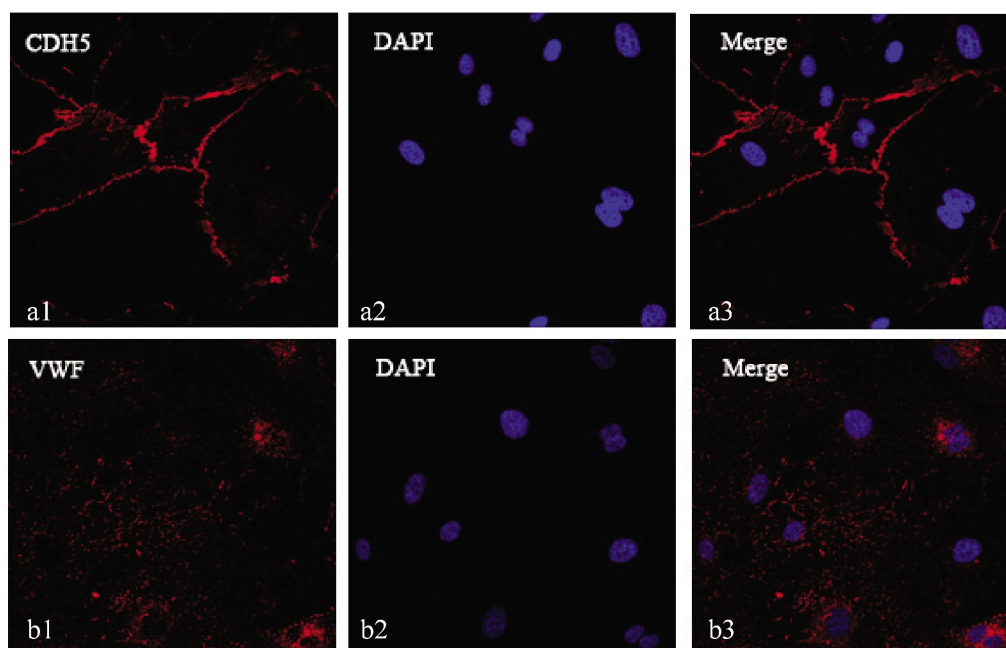


图 2 内皮细胞标志蛋白的免疫荧光检测

Fig. 2 Immunofluorescence staining of endothelial cells

Note: a1-a3 Detection of CDH5 immunofluorescence, followed by CDH5, DAPI staining, the positive signal and DAPI merge map; b1-b3 detection vWF immunofluorescence, followed by vWF, DAPI staining, the positive signal and DAPI merge map.

2.3 RT-PCR 鉴定内皮细胞特异性标志基因表达

以 β -actin 为内参基因,同时检测阴性对照(人胚胎干细胞 H9),脐血、脐静脉以及外周血来源的内皮细胞中 vWF、CDH5 的表达情况。结果显示内皮细胞标志基因 vWF、CDH5 在三类组织分离所得的内皮细胞中均有表达,但在 H9 中则检测不到 vWF、CDH5 的表达(图 3)。该结果一方面证实我们所分离 HUVECs 的纯度,另一方面也证实了 vWF、CDH5 的内皮细胞

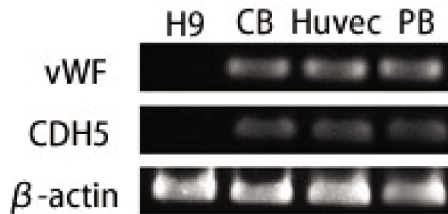


图 3 RT-PCR 检测内皮细胞 vWF 和 CDH5 mRNA 的表达

Fig. 3 mRNA expression of vWF and CDH5 in endothelial cells detected by RT-PCR

Note: 1-4 lanes showed the results of H9(neg), CB-ECs, HUVECs and PB-ECs in turn. Expression of endothelial cell-specific genes vWF and CDH5, with β -actin as control.

特异性。

2.4 内皮细胞特异性启动子重组质粒的构建及鉴定

以分离所得的内皮细胞 gDNA 为模板,通过 PCR、质粒克隆等步骤,我们共获得包含内皮细胞特异性启动子片段的四个质粒:pvWF-1、pvWF-2、pVE-1、pVE-2。酶切鉴定后结果显示启动子片段大小分别为:1328 bp、2207 bp、1406 bp、2105 bp,与理论序列大小一致。进一步测序证实扩增后的片段均与理论序列相符,未见突变(图 4)。

2.5 质粒转染细胞

将对照质粒 pEGFP-N1 和所构建的四个质粒分别转染 HUVECs 与 hESCs,48 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,结果显示对照质粒在 HUVECs 与 hESCs 中均能表达 GFP 蛋白,而所构建的含内皮细胞特异性启动子的质粒在 hESCs 细胞中均未观察到 GFP 蛋白表达;在 HUVECs 中,可观察到均有 GFP 蛋白表达,但相比其余 3 个质粒,pVE-2 具有最强的转录活性(图 5,6)。这些结果提示从 VE-Cadherin 及 vWF 两个基因克隆所得的不同启动子片段具备内皮细胞表特异性,但是不同片段长度的启动子其转录活性存在差异。

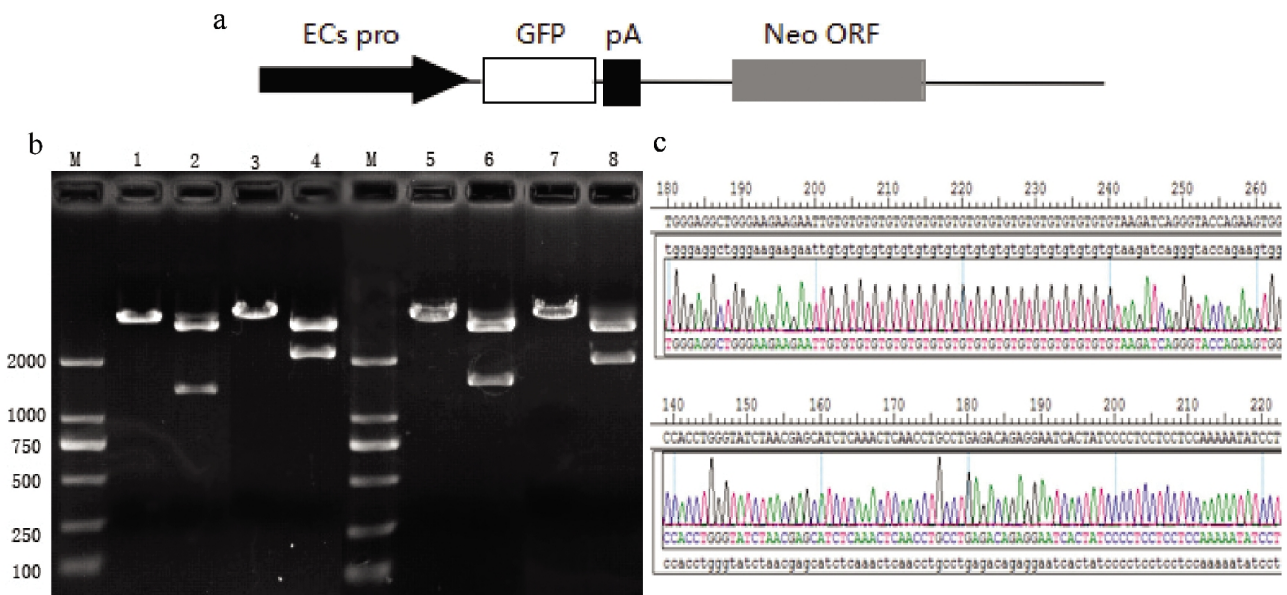


图 4 载体结构示意图、质粒酶切电泳鉴定及部分测序结果

Fig. 4 Vector map, Enzyme digestion of the plasmids and a part of sequencing results

Note: a: Vector map. ECs Pro: Endothelial cell-specific promoter pvWF-1, pvWF-2, pVE-1 and pVE-2. b: M: DL 2000 Marker. 1, 2 were pvWF-1 Ase I digestion and Ase I & Sac II double digestion, respectively; 3, 4 were pvWF-2 Ase I digestion and Ase I & Sac II double digestion, respectively; 5, 6 were pVE-1 Ase I digestion and Ase I & Sac II double digestion, respectively; 7, 8 were pVE-2 Ase I digestion and Ase I & Sac II double digestion, respectively. The plasmid digestion maps were consistent with the expected.

c: Part of the sequencing results of pvWF-2 and pVE-1.

3 讨论

在正常机体内,ECs 不仅能分泌 FVIII,而且能合成天然载体蛋白 vWF。vWF 与 FVIII 结合形成 WPBs,维持 FVIII 在血液循环中的稳定性。已有研究证实,将正常的内皮细胞输入体内,进行血友病的自体治疗是安全有效的^[14,15]。然而,ECs 存在体外

增殖能力较差、从病人自身组织分离的内皮祖细胞数量有限且有不同程度的功能障碍等缺陷,限制了其在自体干细胞治疗中的应用。近年来,研究人员已经开始尝试将人胚胎干细胞(hESCs)和人诱导多潜能干细胞(hiPSCs)定向分化成 ECs。由于 hESCs/hiPSCs 分化得来的 ECs 具有来源广泛,细胞增殖能力更强且不易于衰老的特点,已经有许多的动物实验证明

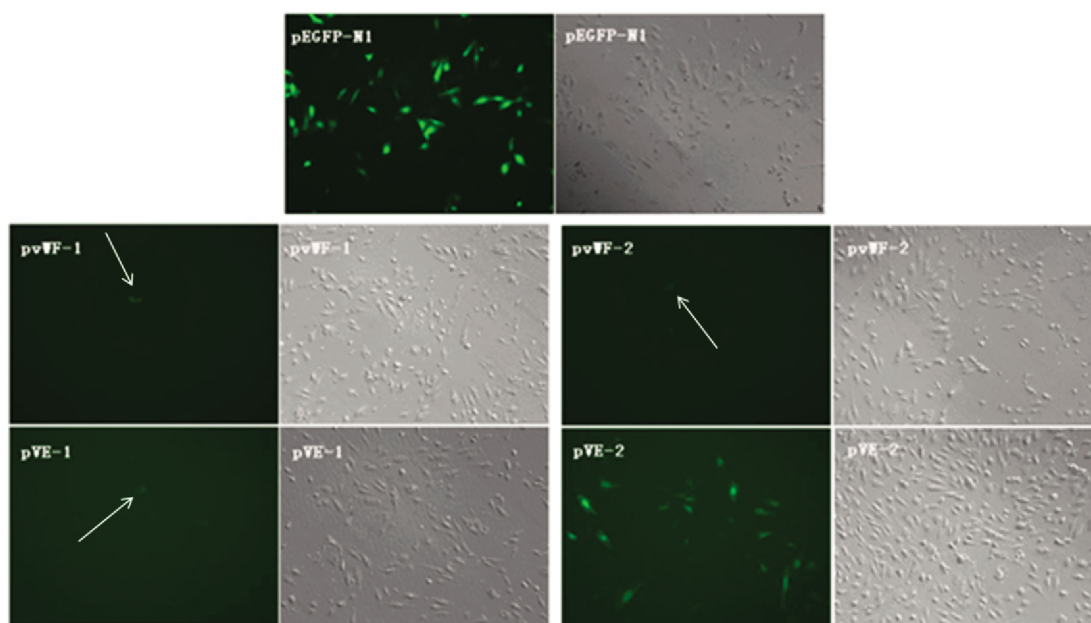


图 5 HUVECs 转染的结果

Fig. 5 Results of HUVECs transfection

Note: HUVECs under fluorescent microscope after transfection(100×).

The upper left corner showed the plasmid transfected, the arrow pointed to fluorescent cells.

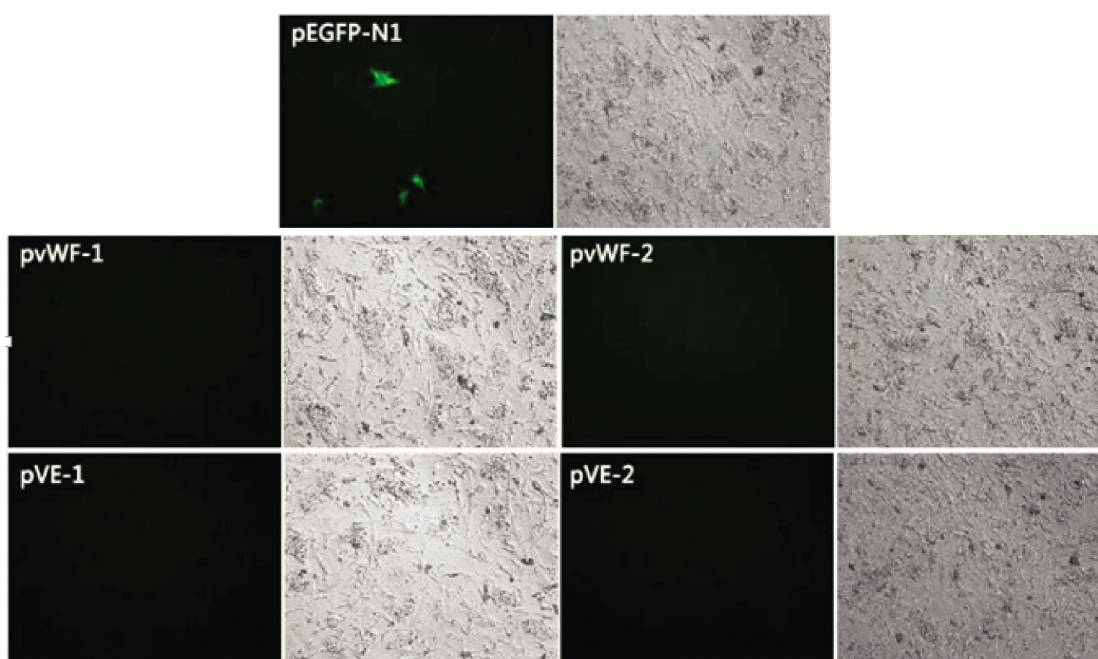


图 6 hESCs 转染的结果

Fig. 6 Results of hESCs transfection

Note: H9 under fluorescent microscope after transfection (100×). The upper left corner showed the plasmid transfected.

hESCs/hiPSCs-ECs 移植具有很大的潜力^[16-20],其中至少有 2 项已进入 I 期临床试验^[19,20]。因此,提高 hESCs/hiPSCs 定向分化为 ECs 的效率及纯度引起了诸多研究者的关注。

因此,本研究尝试克隆内皮细胞特异性表达基因的启动子,再驱动 GFP 报告基因表达,以此实时监测 hESCs/hiPSCs 向内皮细胞定向分化的程度,并借此富集纯化足够的内皮细胞。本研究原代分离 HUVECs,并双向证实了内皮细胞标志基因

vWF 及 VE-cadherin 在原代 HUVECs 中的特异性表达。再以 vWF 及 VE-cadherin 基因作为内皮细胞特异性启动子克隆的模板,构建出包含不同大小启动子片段驱动 GFP 表达的四个质粒。重复多次的转染实验证实四个内皮细胞特异性的启动子片段 pvWF-1、pvWF-2、pVE-1、pVE-2 在 hESCs 中均没有转录活性,而在内皮细胞中则具有转录活性。其中,pVE-2 的转录活性显著高于其余 3 个启动子片段,具有良好的转录活性和内皮

细胞特异性,可以作为监测内皮细胞分化过程的手段之一。而其它 3 个质粒之所以在转染后不明显表达 GFP,可能是因为这 3 个片段缺乏某些上游启动子元件或存在某些负调控元件,造成这些启动子与 RNA Pol II 的结合能力下降,下调了 GFP 的转录水平。

后续研究中,我们将利用 pVE-2 驱动 GFP 表达以实时监测 hESCs/hiPSCs 定向分化 ECs 过程,同时建立简单有效的针对内皮细胞分化后 GFP 表达的流式细胞分选技术以筛选和纯化 ECs。如果将报告基因换成治疗基因,该组织特异性启动子将能实现治疗基因在 ECs 中的特异性表达,可望有效地提高基因治疗的靶向性。

参考文献(References)

- [1] Toscano M G, Romero Z, Munoz P, et al. Physiological and tissue-specific vectors for treatment of inherited diseases [J]. Gene therapy, 2010, 18(2): 117-127
- [2] Jazwa A, Florczyk U, Jozkowicz A, et al. Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy [J]. Gene, 2013, 525 (2): 229-238
- [3] Chuah M K, Evens H, VandenDriessche T. Gene therapy for hemophilia[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013, 11(s1): 99-110
- [4] Van Den Biggelaar M, Bouwens E A, Kootstra N A, et al. Storage and regulated secretion of factor VIII in blood outgrowth endothelial cells [J]. Haematologica, 2009, 94(5): 670-678
- [5] Haberichter S L, Shi Q, Montgomery R R. Regulated release of VWF and FVIII and the biologic implications [J]. Pediatric blood & cancer, 2006, 46(5): 547-553
- [6] Lenting P J, van Mourik J A, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function [J]. Blood, 1998, 92 (11): 3983-3996
- [7] Levenberg S, Golub J S, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells[J]. Proceedings of the national Academy of Sciences, 2002, 99(7): 4391-4396
- [8] Liu X, Liu M, Xue Z, et al. Non-viral ex vivo transduction of human hepatocyte cells to express factor VIII using a human ribosomal DNA-targeting vector [J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007, 5(2): 347-351
- [9] Liu X, Wu Y, Li Z, et al. Targeting of the human coagulation factor IX gene at rDNA locus of human embryonic stem cells [J]. PloS one, 2012, 7(5): e37071
- [10] Wen L, Liang D S, Wu L Q, et al. Efficient protein expression from the endogenous RNA polymerase I promoter using a human ribosomal DNA targeting vector [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2008, 367(4): 846-851
- [11] Heng B C, Bezerra P P, Preiser P R, et al. Effect of cell-seeding density on the proliferation and gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells within ex vivo culture [J]. Cytotherapy, 2011, 13(5): 606-617
- [12] Shirodkar A V, St B R, Gavryushova A, et al. A mechanistic role for DNA methylation in endothelial cell (EC)-enriched gene expression: relationship with DNA replication timing [J]. Blood, 2013, 121(17): 3531-3540
- [13] Lagarkova M A, Volchkov P Y, Philonenko E S, et al. Efficient differentiation of hESCs into endothelial cells in vitro is secured by epigenetic changes[J]. Cell Cycle, 2008, 7(18): 2929-2935
- [14] Kren B T, Unger G M, Sjeklocha L, et al. Nanocapsule-delivered Sleeping Beauty mediates therapeutic Factor VIII expression in liver sinusoidal endothelial cells of hemophilia A mice [J]. The Journal of clinical investigation, 2009, 119(7): 2086
- [15] Matsui H. Endothelial progenitor cell-based therapy for hemophilia A [J]. International journal of hematology, 2012, 95(2): 119-124
- [16] Moon S H, Kim J S, Park S J, et al. A system for treating ischemic disease using human embryonic stem cell-derived endothelial cells without direct incorporation [J]. Biomaterials, 2011, 32 (27): 6445-6455
- [17] Su W, Wang L, Zhou M, et al. Human embryonic stem cell-derived endothelial cells as cellular delivery vehicles for treatment of metastatic breast cancer[J]. Cell Transplant, 2013, 22(11): 2079-2090
- [18] Azhdari M, Baghaban-Eslaminejad M, Baharvand H, et al. Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model [J]. Stem Cell Res, 2013, 10(3): 288-300
- [19] Abbasalizadeh S, Baharvand H. Technological progress and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8): 1600-1623
- [20] Maher KO, Xu C. Marching towards regenerative cardiac therapy with human pluripotent stem cells [J]. Discov Med, 2013, 15 (85): 349-356