

# 聚乙二醇- 聚乙烯亚胺共聚物介导体外基因传递

张璇, 潘仕荣

(中山大学附属第一医院心血管研究室, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】研究非病毒基因载体聚乙二醇(PEG)- 聚乙烯亚胺(PEI)共聚物的组成对体外介导基因传递的影响。【方法】将含 PEG 不同分子量和接枝量的 PEG- PEI 共聚物, 与 DNA 形成复合物。考察带正电荷的 PEI 与带负电荷的 DNA 的相互作用, 测定了 PEG- PEI/DNA 复合物的粒径和 Zeta 电位, 及对 HeLa 细胞的毒性和转染率。【结果】PEG 侧链并未明显影响 PEI 与 DNA 形成复合物的能力; 连接 PEG 5 000 能够明显降低复合物的粒径; 复合物的 Zeta 电位随着 PEG 接枝量的增加而降低; 细胞毒性不依赖于 PEG 的分子量的变化, 而是取决于 PEG 的接枝量; 共聚物 PEG- PEI(2- 25- 1) 被证实为较有效的介导体外基因传递的复合物。【结论】共聚物的结构组成对 DNA 复合物的理化性质、毒性和转染率都产生较大的影响。

关键词: PEG- PEI 共聚物; 非病毒基因载体; 基因转染

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)02-0131-06

## Poly(ethylene glycol)- block- polyethylenimine Copolymers as Carriers for Gene Delivery in Vitro

ZHANG Xuan, PAN Shi-rong

(Cardiovascular Laboratory, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the influence of copolymer polyethylene glycol (PEG)- polyethylenimine (PEI) composition on gene delivery in vitro. 【Methods】The PEG- PEI /DNA complexes were formed with different molecular weights of PEG and degree of PEGylation. The interaction between the positively charged PEI and the negatively charged plasmid DNA was investigated. The complex size and zeta potential of copolymer/DNA complexes were measured, and the cytotoxicity and the transfection efficiency for HeLa cells were evaluated. 【Results】The PEG side chains had no significant effect on the complex formation and protection of DNA. PEG 5 k significantly reduced the diameter of the complexes. The zeta potential of complexes reduced with increasing degree of PEG grafting. The cytotoxicity of the complexes did not change with molecular weight of PEG, but changed with the degree of PEG substitution; Copolymer PEG- PEI(2- 25- 1) was proved to be a better carrier for in vitro gene transfer. 【Conclusion】The copolymer block structure strongly influences not only the physicochemical properties of the DNA complexes, but also their cytotoxicity and transfection efficiency.

Key words: PEG- PEI copolymer; nonviral gene carrier; gene transfection

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):131- 136]

基因治疗是将外源性基因导入靶细胞内有效表达, 从而使得在基因水平治疗一些顽疾成为可能。将外源性基因导入体内必须借助于一个安全、稳定、转染率高的载体。目前, 基因载体主要分为病毒载体和非病毒载体。体内基因治疗80%采用病毒载体系统作为基因传输载体, 例如逆转录病

毒、腺病毒、腺相关病毒等, 非病毒载体包括脂质体和阳离子聚合物。病毒载体与非病毒载体相比转染率高, 但存在着一些安全隐患, 如对特异的细胞有限制性靶向性, DNA 装载量有限, 潜在的病毒重组和成本较高等问题使得它的实际应用受到限制<sup>[1]</sup>。非病毒载体如阳离子脂质体和阳离子共聚物

收稿日期: 2006-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570500)

作者简介: 张璇(1976-), 女, 河南人, 博士研究生, 主管药师; 潘仕荣, 通讯作者, 博士生导师. E-mail: gzpsr@163.com.

可克服目前病毒载体在安全性、免疫原性和价格方面等问题<sup>[2]</sup>。在目前应用的非病毒载体中,多聚阳离子共聚物聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI),在体内外都表现出高的转染率<sup>[3]</sup>。PEI的重复结构单体中每两个碳原子就连接含氮原子的伯胺和仲胺,支链型的PEI还包括叔胺,都可质子化生成正电性氨基,成为与DNA上带负电荷的磷酸根结合的作用点,形成纳米级的聚合物/DNA复合物,可被细胞摄取。另一方面,大量的阳离子电荷产生较大的毒性,限制了阳离子共聚物的体内应用。因此,许多学者研究将阳离子共聚物连接上非离子的亲水性基团,如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)<sup>[4]</sup>,聚[N-(2-羟丙基)异丁烯酰胺]<sup>[5]</sup>。这些亲水性的共聚物可提高复合物的溶解性,减少聚集,减少生理环境下与蛋白的非特异性相互作用<sup>[6]</sup>。本文采用异佛尔酮二异氰酸酯(isoporon diisocyanate, IPDI)作为偶联剂制备了含不同PEG分子量和接枝量的PEG-PEI共聚物。考察了聚合物/DNA复合物的粒径和zeta电位,还考察了转染率与PEG-PEI共聚物的毒性和结构的关系。研究PEG链长与接枝量对基因传递过程的影响和规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

聚乙烯亚胺(PEI,  $M_w$  25000, Aldrich-Sigma公司产品,支链型,无水);聚乙二醇单甲醚(mPEG,  $M_w$  为 2000 和 5000, Fluka公司);IPDI(广州市汇采涂料化学品有限公司,进口分装);二月桂酸二丁基锡(dibutyltin dilaurate, DBTL, 广东丽宝涂料助剂公司)。

### 1.2 细胞系

人宫颈癌细胞系Hela细胞(ATCC No.CCL-2.1),在100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养基中培养。血清56℃灭活30 min。

### 1.3 质粒

真核表达质粒编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, pEGFP-C1),由华西医科大学惠赠,由CMV启动子驱动,在DH5菌株中大量扩增。由QIAGEN公司的质粒大抽提试剂及纯化柱制备质粒,酶切鉴定。

### 1.4 异氰酸酯单端基聚乙二醇(PEG-NCO)的制备

定量的mPEG溶于无水氯仿中,加入过量的IPDI,溶于氯仿,再加入0.6%~0.7%的催化剂DBTL。将上述两溶液混合,75℃左右回流反应8 h,所得产物在石油醚中沉淀,沉淀用氯仿溶解,再用石油醚沉淀,此操作重复多次直至将过量的IPDI去除干净,真空干燥,得白色蜡状至粉末状固体。

### 1.5 PEG-PEI嵌段共聚物的合成

将PEI用一定量的氯仿溶解,磁力搅拌下将PEG-NCO的氯仿溶液逐滴加入PEI溶液中,再加入0.6%~0.7%的催化剂DBTL,置60℃回流反应16 h,将亮黄色溶液浓缩至约50 mL左右,再用大量乙醚沉淀,过滤,真空干燥,称质量。

### 1.6 PEG-PEI/DNA复合物的制备

根据不同的N/P比,即聚合物中的氨基基团与DNA中的磷酸基团的摩尔比,用PBS制备一定的聚合物溶液,与质粒DNA的PBS溶液混合,涡旋,室温静置30 min,以获得聚合物/DNA复合物。

### 1.7 细胞毒性测定(MTT法)

PEI、PEG-PEI共聚物在100 mL/L胎牛血清的1640培养基中配成不同浓度梯度,分别为1、3、5、10、15、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将Hela细胞接种到96孔板上,密度为5 000个细胞/孔,细胞培养24 h。吸去每孔中的旧培养液,加入不同浓度的含PEI及PEG-PEI共聚物的培养液,每孔0.2 mL,每个浓度4个复孔,37℃,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24 h后更换正常的RPMI 1640培养液继续培养48 h后,每孔加入5 mg/mL MTT 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养4 h,吸尽培养液,每孔加入DMSO溶液150  $\mu\text{L}$ ,在Bio-Tek Elx800型酶标仪490/630 nm波长处读取吸光度值(A),计算细胞活力(%)=实验组 $A_{490/630}$ /阴性对照组 $A_{490/630}$   $\times 100\%$ 。

### 1.8 琼脂糖凝胶电泳阻滞试验

为了证明正电荷的PEI与负电荷的质粒DNA之间的相互作用,采用琼脂糖凝胶电泳阻滞试验。将DNA与不同浓度的PEI、PEG-PEI共聚物按N/P比分别为0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5,在PBS中形成复合物,室温静置30 min。电泳条件:10 g/L琼脂糖(含0.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ 溴化乙锭),1  $\times$  TBE缓冲液,电压80 V,电泳时间40 min。DNA条带在紫外灯下进行观察。

### 1.9 粒径和Zeta电位测定

将DNA与不同浓度的PEI和PEG-PEI共聚

物分别按一定的 N/P 比在 PBS 中形成复合物, 使 DNA 的终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 室温静置 30 min, 在 Zetasizer Nano Series 90 粒径分析仪上, 测定粒径及 Zeta 电位。

### 1.10 细胞转染试验

将 HeLa 细胞接种到 12 孔板上, 密度为 15 000 个细胞/孔, 培养 24 h, 细胞汇合度 70%, 将 PEI、PEG-PEI 共聚物与 DNA 分别在 PBS 中配成一定浓度的溶液, 然后将两者以一定的 N/P 比混合, 涡旋, 室温静置 30 min。转染前吸去细胞培养液, 加入不含血清的 RPMI1640 培养液 1 mL, 再每孔加入 100~200  $\mu\text{L}$  的 PEG-PEI/DNA 复合物, 细胞培养箱中培养 4 h 后, 吸去转染复合物, 加入新鲜的含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 40~48 h, 转染后用 PBS 冲洗, 再用 0.25 g/L 胰酶/EDTA 消化液将细胞消化下来, 用 PBS 重悬细胞, 转染率通过在流式细胞仪上测定每 10 000 个细胞中发荧光的细胞百分数获得。

## 2 结 果

### 2.1 共聚物的合成

共聚物的合成方法参照文献 [7], PEG-PEI 共聚物中两组分的比例见表 1。

表 1 PEG-PEI 共聚物的组成及分子量

Table 1 Composition and molecular weights of PEG-PEI copolymer

Name	Reaction			Production	
	PEG(ku)	PEI(ku)	(g/g)	PEG/PEI ratio	PEI%
PEI		25	-	-	100
PEG-PEI(2-25-1)	2	25	1/9	1.89	86.88
PEG-PEI(2-25-2)	2	25	1/3	2.9	81.13
PEG-PEI(2-25-3)	2	25	1/1	10.5	54.41
PEG-PEI(5-25-1)	5	25	1/9	0.66	88.32
PEG-PEI(5-25-2)	5	25	1/3	1.8	73.53
PEG-PEI(5-25-3)	5	25	1/1	7.2	41.06

Ratios of PEG / PEI and PEI% in the copolymers were determined from  $^1\text{H-NMR}$  spectra using integral values obtained from the number of  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  protons of PEG and  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$  protons of PEI

### 2.2 细胞毒性试验

RGR (relative growth rate)为相对增值百分率, 通过细胞的存活率来推定聚合物载体内在的细胞毒性。其值越大则毒性越小。从图 1 显示结果可以

看出, 均聚物 PEI 的细胞毒性随着浓度的增高显著增加, 而共聚物在低浓度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下时未表现出明显毒性, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上时 PEG-PEI 的毒性比 PEI 明显减少, 且随着共聚物中聚乙二醇含量的增加而降低。接枝 PEG 的分子量不同, 对共聚物的毒性未见明显影响。

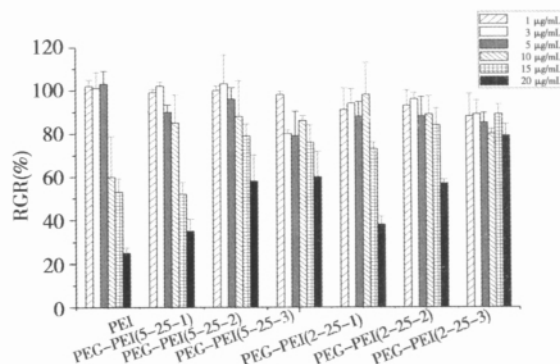


图 1 聚合物不同浓度下的毒性比较

Fig.1 Cytotoxicity of polymers at various concentrations (n=4, error bars represent standard deviation)

### 2.3 琼脂糖凝胶电泳阻滞试验

图 2 表明, PEI 均聚物在 N/P =2 时可完全和 DNA 结合, 阻止溴乙锭插入 DNA 双螺旋结构中, 故观察不到荧光, 当每个 PEI 上连接 10.5 个 PEG 2 000 即 PEG-PEI(2-25-3)和每个 PEI 上连接 7.2 个 PEG5 000 即 PEG-PEI(5-25-3)时, DNA 在 N/P 为 2.5 的时候可被完全阻滞, 说明接枝 PEG 后, 对 PEI 结合 DNA 的能力没有显著影响。

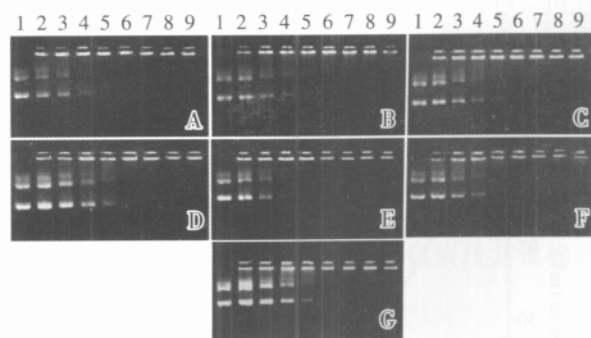


图 2 聚合物/DNA 复合物不同 N/P 比的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of copolymer/DNA complexes at various N/P ratios

Lane 1:N/P=0(plasmid only); lane2-9,N/P Ratio:0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5

A: PEI; B: PEG-PEI(5-25-1); C: PEG-PEI(5-25-2); D: PEG-PEI(5-25-3); E: PEG-PEI(2-25-1); F: PEG-PEI(2-25-2); G: PEG-PEI(2-25-3)

2.4 粒径和 Zeta 电位

许多学者研究发现,DNA/载体复合物粒径是影响转染效率的主要因素之一<sup>[8]</sup>,随着 N/P 比增加,复合物的粒径均逐渐减少,同时 PEG 5 000 能显著影响 PEG- PEI/DNA 复合物的粒径,且随着 PEG 5 000 比例的增加,粒径呈减少趋势。接枝不同分子量的 PEG 对粒径也有不同影响。当接枝分子量较小的 PEG 2 000 时,粒径相对较大(图 3)。

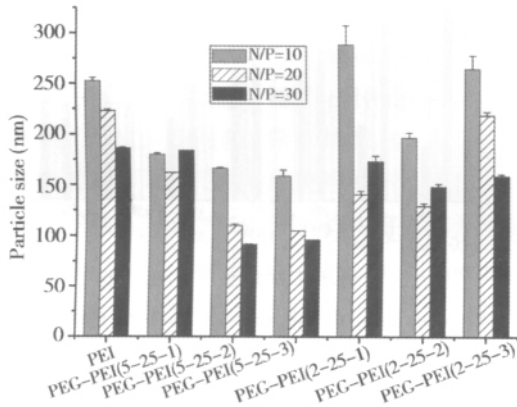


图 3 聚合物//DNA 复合物不同 N/P 比的粒径分布

Fig.3 Particle sizes of polymer/DNA complexes at various N/P ratios (n = 3)

PEG- PEI 的 Zeta 电位比 PEI 均聚物低,而且随着 PEG 含量的增加而降低。在 N/P=10 时,PEI 的 Zeta 电位约为 40 mV;当接枝的分子量为 2 000 的 PEG 时,随着 PEG 含量的增加,Zeta 电位逐渐降低,最小到达 28 mV;当接枝分子量为 5 000 的 PEG 时,随着 PEG 含量的增加,Zeta 电位下降更

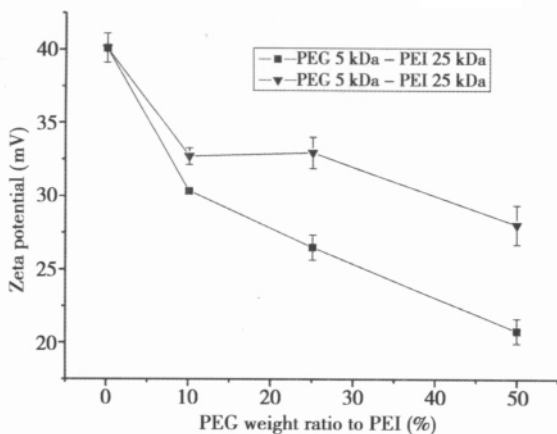


图 4 聚合物/DNA 复合物在 N/P=10 时的表面电荷

Fig.4 Surface charge of copolymer/DNA complexes at N/P ratio=10 (n = 3)

快,最终降低到 20 mV(图 4)。

2.5 转染试验

复合物的转染试验用与毒性试验相同的 HeLa 细胞研究。GFP 转染进入细胞 40~48 h 观察荧光表达(图 5)。从转染试验结果可以看出,PEI 接枝少量的 PEG 2 000 或 PEG 5 000 可使转染率提高,PEG- PEI(5- 25- 1)在 N/P 为 20、30、50 时的转染率均较 PEI 有所提高,而 PEG- PEI(2- 25- 1)的转染率提高显著,且在 N/P 比为 30 的时候达到最大值。随着 PEG 含量继续增加,PEG- PEI 的转染率与 PEI 相比有降低的趋势。由于 PEI 的毒性较大,当 N/P 比增加至 50 时,细胞死亡较多,转染率都较共聚物低(图 6)。

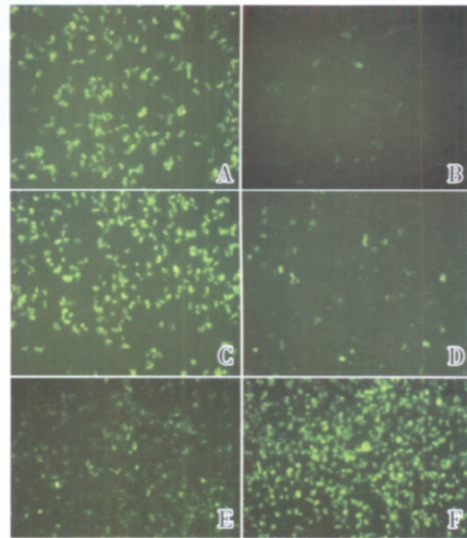


图 5 PEI 及共聚物/DNA 复合物转染率的荧光照片

Fig.5 Photograph of transfection efficiency of PEI and copolymers/DNA complexes. The green fluorescent protein (GFP) expression was observed under fluorescent microscope at 10 × magnification.

A: PEI at N/P=30; B: PEI at N/P=50; C: PEG- PEI(5- 25- 1) at N/P=30; D: PEG- PEI(5- 25- 2) at N/P=10; E: PEG- PEI(5- 25- 3) at N/P=30; F: PEG- PEI(2- 25- 1) at N/P=30

3 讨论

共聚物的合成是将线性的 PEG 接枝到支链的 PEI 大分子上,本反应需要一个既与 PEG 上的羟基反应,又与 PEI 上的氨基反应的偶联剂,异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI)符合此要求。IPDI 属脂环族二异氰酸酯,IPDI 的 2 个异氰酸基连接方式不同,活性也不同,脂链上 NCO 的活性比脂环上的

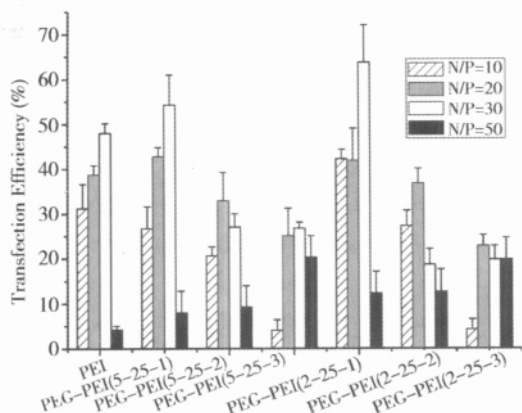


图 6 PEI 及共聚物/DNA 复合物的转染率

Fig.6 Transfection efficiency of PEI and copolymers/ DNA complexes(n=3)

NCO的活性大 8~10 倍。在预聚反应中 mPEG 被活化, 脂链上的 NCO在催化剂作用下先与 PEG 上的 -OH 反应, 脂环上的 NCO 再与 PEI 上的氨基反应, 故反应简单, 副反应少。

文献报道, 分子量较大的 PEI 毒性也较大<sup>[9]</sup>, 经无毒、抗免疫原性的水溶性大分子 PEG 修饰 PEI 后, 与 DNA 自组装成核壳结构胶束, 其芯核由 PEI 与 DNA 通过静电作用缔合而成, PEG 构成保护性的水溶性外壳, 从而使 PEI 的毒性降低。接枝 PEG 的量越多, PEI 的毒性降低的越多。接枝分子量小的 PEG 毒性降低是由于相对接枝 PEG 的条数增多所致。

琼脂糖凝胶电泳阻滞试验中, 溴乙锭插入 DNA 中可产生强烈的荧光, 而当它在溶液中游离时荧光几乎观察不到, PEI 上的带正电荷的氨基基团与 DNA 上带负电荷的磷酸基团通过电性的相互吸引结合成复合物, 通过此试验可证明带正电荷的 PEI 及 PEG-PEI 共聚物与带负电荷的 DNA 之间的结合情况。PEI 与 PEG 形成共聚物后并未明显影响其结合 DNA 的能力。同时在形成复合物的过程中, 将 DNA 高度压缩, 可掩蔽 DNA 使其不易被酶降解<sup>[10]</sup>, 从而起到对 DNA 的保护作用。

粒径和 Zeta 电位也受 PEG 的分子量及接枝量的影响, Petersen 等<sup>[11]</sup>报道降低 PEG 相对分子量, PEG-PEI/ DNA 复合物会逐渐失去其高度压缩的球形结构, 变成松散弥漫的不定形状态, 使粒径增大。而当接枝分子量较大的 PEG 时, 就可形成清晰的球形复合物。复合物的 Zeta 电位与细胞的摄取密切相关<sup>[12]</sup>, 分子量较大的 PEG 链产生较大的

屏蔽效应故使表面电荷下降较大<sup>[13]</sup>。

从以上测定结果可以分析各因素与基因转染试验的联系。接枝 PEG 后对 DNA 的浓缩能力和对 DNA 的保护作用没有较大影响, 故此两因素在本试验中对转染不会产生较大影响。接枝 PEG 后复合物的粒径在高 N/P 情况下都有所减少, PEG 的分子量不同减少的程度不同。根据文献复合物的粒径与转染率的关系尚有争议, Ogris 等<sup>[9]</sup>报道, 粒径较小的复合物(40 nm)在低盐环境下与同样条件下的大粒子(> 1 000 nm)相比转染率较低。还有报道<sup>[14]</sup>, 许多哺乳动物细胞可内吞的粒子直径要小于 150 nm 范围。故粒径大小对转染也并非决定性因素。细胞毒性对转染影响较大, 当毒性较大时, 转染率很低。接枝 PEG 可降低的 PEI 的毒性, 增加水溶性, 然而接枝较多的 PEG 会产生屏蔽效应, 阻止 DNA 复合物与细胞膜的接触, 从而使转染率下降; 高的 Zeta 电位对于体外转染是有益的, 因为高的 Zeta 电位可增加阳离子复合物与带负电荷的细胞膜的粘附, 然而过大的 Zeta 电位又会产生较大的毒性, 降低转染率。因此在本研究与 PEG-PEI/DNA 复合物转染试验的结果关系最为密切的因素为细胞毒性和 Zeta 电位, 要降低毒性而保持较高的 Zeta 电位, PEG 的接枝量是个关键。本研究结果显示, PEG-PEI(5-25-1)和 PEG-PEI(2-25-1)的转染率均较 PEI 有所提高, 尤其以 PEG-PEI(2-25-1)在 N/P=30 时的转染率为最高。毒性在高浓度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 RGR 值分别为 35%和 38%均比 PEI 的 25%高, 说明降低了毒性, 而 PEG-PEI(2-25-1)使毒性降低更多。Zeta 电位随着 PEG 量的增加而逐渐降低, 分子量较大的 PEG 链产生较大的屏蔽效应使表面电荷下降较大, 因此 PEG-PEI(2-25-1)的 Zeta 电位较 PEG-PEI(5-25-1)的 Zeta 电位大。故毒性较低, Zeta 电位较高的 PEG-PEI(2-25-1)表现出较大的转染效率。该嵌段共聚物有望成为新型非病毒基因载体材料。

参考文献:

- [1] CRYSTAL R G. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success [J]. Science, 1995, 270 (5235):404-410.
- [2] HAN S, MAHATO R I, SUNG Y K, et al. Development of biomaterials for gene therapy [J]. Mdl Ther, 2000, 2 (4):302-317.
- [3] BOUSSIF O, LEZOUALC H F, ZANTA M A, et al. A

- versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92 (16):7297- 7301.
- [4] NGYUGEN H K, LEMIEUX P, VINOGRADOV S V, et al. Evaluation of polyether - polyethylenimine graft copolymers as gene transfer agents [J]. Gene Ther, 2000, 7(2):126- 138.
- [5] FISHER K D, ULBRICH K, SJBR V, et al. A versatile system for receptor - mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression [J]. Gene Ther, 2000, 7(15):1337- 1343.
- [6] MERDAN T, KOPECEK J, KISSEL T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(5): 715- 758.
- [7] 张璇, 潘仕荣, 吕澍, 等. 聚乙二醇-聚乙炔亚胺共聚物的制备及其表征[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6):53- 57.
- [8] OGRIS M, STEINLEIN P, KURSA M, et al. The size of DNA/transferring- PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells [J]. Gene Ther, 1998, 5 (10):1425- 1433.
- [9] TANG G P, ZENG J M, GAO S J, et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent [J]. Biomaterials, 2003, 24(13):2351- 2362.
- [10] LUO D, SALTZMAN W M. Synthetic DNA delivery systems [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18 (1):33- 37.
- [11] PETERSEN H, KUNATH K, MARTIN A L, et al. Polyethylenimine- graft- poly(ethylene glycol) copolymers: influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system [J]. Bioconjugate Chem, 2002, 13(4):845- 854.
- [12] PUTNAM D, ZELIKIN A N, IZUMRUDOV V A, et al. Polyhistidine-PEG: DNA nanocomposites for gene delivery [J]. Biomaterials, 2003, 24 (24):4425- 4433.
- [13] SUNG S J, MIN S H, CHO K Y, et al. Effect of Polyethylene Glycol on Gene Delivery of Polyethylenimine [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(4):492- 500.
- [14] GUY J, DRABEK D, ANTONIOU M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor- mediated endocytosis and gene therapy [J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3):237- 248.

(编辑 黄小延)

\*\*\*\*\*

(上接第 130 页 from page 130)

- pathogenesis: corneal invasion by matrix metallo- proteinase expressing altered limbal epithelial basal cells[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(5): 695- 706.
- [10] 郝尚臣, 刘祖国. 人翼状胬肉细胞的分离和培养[J]. 眼科学报, 2006, 22(1): 25- 29.
- [11] SCHATTEMAN G C, AWAD O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors[J]. Anat Rec A, 2004, 276(1):13- 21.
- [12] 柏树令, 赵丹. CD34 抗原的生物学特性及其临床应用[J]. 解剖科学进展, 2005, 11 (1) : 54- 56, 60.
- [13] 仵敏娟, 刘善荣, 刘厚奇. 间充质干细胞特性与应用前景[J]. 生命科学, 2004, 16(3) : 135- 137.
- [14] 吴北燕, 黄绍良, 陈惠芹, 等. 胎肝造血期胎肝间充质干细胞的分离、培养及生物学特性[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(5) : 498- 501.
- [15] KRIA L, OHRIA A, AMEMIYA T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor- and tumor necrosis factor- in the pterygium [J]. Acta Histochem, 1996, 98(2) : 195- 201.

(编辑 刘清海)