

# 脐血单个核细胞来源红系祖细胞的诱导扩增及保存的研究

陈琳 谢小燕 习佳飞 吕洋 田宇 刘大庆  
岳文 李艳华 南雪 李思婷 范增 裴雪涛

**【摘要】** 目的 探索含多种细胞因子无血清培养基诱导脐血单个核细胞体外分化为红系祖细胞效率及红系祖细胞的保存方法。方法 利用羟乙基淀粉沉降脐血中红细胞,人淋巴细胞分离液(Ficoll)分离单个核细胞,采用含FMS样酪氨酸激酶3配体、干细胞生长因子、胰岛素样生长因子1、重组人红细胞生成素的无血清培养基进行体外诱导脐血单个核细胞向红系祖细胞分化,并将诱导的红系祖细胞用不同的冻存液进行冷冻保存,观察红系祖细胞诱导、分化能力和红系祖细胞冷冻保存效果。结果 随着诱导时间延长,细胞总数明显增多,培养14 d红系祖细胞扩增约110倍,存活率为 $(88.92 \pm 0.95)\%$ ,红系祖细胞特异性标志CD71<sup>+</sup>细胞占 $(86.77 \pm 9.11)\%$ ,CD71<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup>细胞占 $(64.47 \pm 16.67)\%$ 。诱导10 d多为中幼红细胞,可见血红蛋白表达的阳性细胞;诱导14 d开始出现晚幼红细胞,细胞沉淀呈红色。诱导7 d红系集落数为 $326.00 \pm 97.96$ ,高于诱导前 $(61.60 \pm 20.03)$ 。10%二甲亚砜(DMSO)+2%人血清白蛋白保存细胞复苏后红系祖细胞存活率、回收率分别为 $(90.32 \pm 1.80)\%$ 、 $(93.66 \pm 1.87)\%$ ,将50%自体脐血浆与10% DMSO、2%人血清白蛋白联用可获得更好的保护效果。结论 该无血清培养基可高效诱导、扩增红系祖细胞,10% DMSO+2%人血清白蛋白+50%自体脐血血浆可很好保存红系祖细胞。

**【关键词】** 胎血; 红系祖细胞; 冷冻保存; 单个核细胞

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划(863计划)(2013AA020107、2012AA021902);国家重点基础研究发展规划(2011CB964804)

**The induction and cryopreservation of erythroid progenitor cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells** Chen Lin, Xie Xiaoyan, Xi Jiafei, Lyu Yang, Tian Yu, Liu Daqing, Yue Wen, Li Yanhua, Nan Xue, Li Siting, Fan Zeng, Pei Xuetao. South China Research Center for Stem Cell & Regenerative Medicine; The Lab of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, AMMS, Beijing 100850, China

Corresponding author: Pei Xuetao, Email: peixt@nic.bmi.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To discover the techniques for ex vivo generation and cryopreservation of erythroid progenitor cells (EPCs) derived from umbilical cord blood (UCB) mononuclear cells (MNCs). **Methods** UCB was chosen as the source of EPCs. Erythrocytes were precipitated by hydroxyethyl starch (HES). MNCs were separated by Ficoll density gradient centrifugation. Erythroid progenitor cell were generated from MNC ex vivo in suspension culture supplemented with stem cell growth factor, insulin growth factor, erythropoietin, Fms-liketyrosinekinase ligand, transferrin and dexamethasone. Cell maturation was evaluated by morphologic analysis and CD71/CD235a expression profiling. In vitro induced cells were cryopreserved using different cryopreservation media. The cell survival rate, phenotype and proliferation curves were detected after cell thawing. **Results** With the extension of culture time, the total number of cells increased significantly accompanied with the elevation of CD71 and CD235 positive populations. After 14-day inducing, the cells reached to approximately 110 times of the starting number with the cell viability as  $(88.92 \pm 0.95)\%$ . The percentages of cell surface markers were  $(86.77 \pm 9.11)\%$  for

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.01.009

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院野战输血研究所, 全军干细胞与再生医学重点实验室; 军事医学科学院华南干细胞与再生医学研究中心

通信作者: 裴雪涛, Email: peixt@nic.bmi.ac.cn

CD71 and (64.47±16.67)% for CD71/CD235, respectively. With the extension of inducing time, wright-Giemsa staining showed that the middle erythroblasts appeared mostly at day 10, and the late erythroblasts were seen at day 14. The red pellets were present at day 14, which indicated the more production of hemoglobin. Colony forming assay showed that erythroid colonies at induction day 7 were higher than that for non-induced cells (326.00±97.96 vs 61.60±20.03 per 2 000 cells). With the extension of culture time, the number of erythroid colonies decreased. Induced EPCs were preserved with different cryopreservation solutions, in which 10% DMSO were better than 5% DMSO. Additionally, 10% DMSO + 2% HSA showed no different with 10% DMSO + 5% HSA. Combined 50% plasma with 2% HSA was more effective.

**Conclusions** This non-serum culture media could effectively induced and expanded EPCs, and 10% DMSO + 2% HSA + 50% plasma appeared to be a desirable cryopreservation solution for EPCs from UCB.

**【Key words】** Cord blood; Erythroid progenitor cells; Cryopreservation; Mononuclear cells

**Fund program:** National High- tech R&D Program (863 Program) (2013AA021017, 2012AA021902); National Key Basic Research Program of China (2011CB964804)

近年来,血液来源紧张及输血相关疾病的发生使人们期望寻找更为充足、安全的血液来源。随着对干细胞发育及体外诱导分化研究的不断深入,大量的研究表明干细胞在体外能够诱导分化为红系祖细胞,进而形成红细胞。红系祖细胞作为血液替代物为临床血液短缺问题带来新的希望,具有广泛的应用前景<sup>[1-2]</sup>。脐血造血干/祖细胞的保存已有较多的报道,但是对于红系祖细胞这一特定的细胞类型尚缺乏相关研究<sup>[3-9]</sup>。我们将脐血造血干/祖细胞进行体外定向诱导扩增,以获得足够数量的红系祖细胞,并观察不同冷冻保存液对红系祖细胞保存效果的影响,旨在为其临床应用奠定实验基础。

### 材料与方 法

1. 研究对象:3份脐血标本来自北京脐血库,均取自健康、足月妊娠的顺产胎儿。

2. 脐血单个核细胞的分离:将60 g/L羟乙基淀粉与新鲜脐血按一定比例混合,使羟乙基淀粉浓度为15 g/L,室温沉降红细胞30 min,小心吸取上清,离心,细胞悬于生理盐水中。将细胞悬液缓慢加入等体积的人淋巴细胞分离液(相对密度为1.077)表面,22℃条件下2 000 r/min离心25 min(离心半径为9.5 cm)。收集单个核细胞层,生理盐水洗涤,调整细胞密度为2×10<sup>6</sup>/ml。

3. 红系祖细胞诱导扩增:将获得的脐血单个核细胞接种于24孔板,每孔1 ml,培养体系为含50 ng/ml FMS样酪氨酸激酶3配体(FL,美国Peprotech公司产品)、100 ng/ml 干细胞生长因子(SCF,美国Peprotech产品)、40 ng/ml 胰岛素样生长因子1(IGF-1,美国RD公司产品)、5 U/ml 重组人红细胞生成素(EPO,日本协和发酵麒麟株式会社产品)、100 μg/ml 转铁蛋白(美国Sigma公司产品)、1 μmol/L

地塞米松(美国Sigma公司产品)的StemSpan(加拿大Stemcell公司产品)无血清培养基。37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,分别于诱导前及诱导7、10、14 d倒置显微镜下观察并计数细胞。每组设6个复孔,实验重复3次。

4. 造血集落培养:参照文献[10]方法,将体外诱导扩增不同时间的红系祖细胞与半固体培养基MethoCult<sup>®</sup> GF-H4435混合,调整细胞密度为4×10<sup>3</sup>/ml,接种于24孔板中,每孔0.5 ml,分别于诱导前,诱导7、10、14 d在显微镜下观察集落形成特征并计数造血集落。

5. 红系祖细胞鉴定:采用瑞氏-姬姆萨染色液(上海贝索生物技术有限公司产品)以及联苯胺进行对体外诱导分化红系祖细胞染色,并于显微镜下观察红系祖细胞形态和血红蛋白表达。

6. 流式细胞术检测红系祖细胞表面标志:收集诱导前及诱导7、10、14 d细胞,生理盐水洗涤后分成两管,分别加入抗人CD71-PE、CD235a-FITC抗体和对照IgG1-PE、IgG1-FITC抗体,4℃反应30 min,上流式细胞仪检测CD71、CD71/CD235a的表达。每组设4个复管。实验重复3次。

7. 红系祖细胞冻存与复苏:取诱导10 d的红系祖细胞悬液,混匀,计数,按1×10<sup>6</sup>分装不同的离心管,1 500 r/min离心5 min(离心半径为9.5 cm),弃上清。细胞沉淀混匀,分别重悬于5%二甲亚砜(DMSO)+2%人血清白蛋白(HSA)、5% DMSO+5% HSA、10% DMSO+2% HSA、10% DMSO+5% HSA、5% DMSO和10% DMSO 6种冷冻保存液中,加入冻存管并迅速转入冻存盒中。-80℃冰箱过夜,第2天转入液氮中冻存30 d,取冻存细胞置于37℃的水浴锅中速融复苏后进行细胞存活率、回收率检测;另外采用10% DMSO+2% HSA、10% DMSO+2% HSA+

20%自体血浆、10%DMSO+2%HSA+50%自体血浆、10%DMSO+50%自体血浆4种冻存液分别对体外诱导的红系祖细胞进行冻存,复苏后观察血浆对冷冻保存细胞的影响。每组设6个复管,实验重复3次。

8. 细胞存活率检测:将诱导扩增的细胞及冻存后复苏的细胞转入10 ml生理盐水中,采用Vi-Cell TMXR细胞活力分析仪(美国Beckman Coulter公司产品)测定存活率。

9. 复苏后细胞增殖能力检测:利用CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司产品)检测复苏后红系祖细胞增殖情况。采用96孔板,每孔接种 $2 \times 10^4$ 个细胞,于测定前4 h加入10  $\mu$ l CCK-8试剂,测定波长450 nm处的吸光度(A)值,绘制细胞增殖曲线。每组设6个复孔。实验重复3次。

10. 统计学处理:采用SPSS软件对多组均数比较进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 脐血来源红系祖细胞的诱导扩增:倒置显微镜观察,分离的脐血单个核细胞在红系祖细胞诱导扩增培养体系中增殖速度快,3~4 d即传代1次,细胞在培养基中可以维持较高密度生长。细胞经14 d诱导扩增能够实现约110倍的扩增(表1)。结果显示,随着体外诱导时间的延长,细胞数逐渐增加,存活率有所降低,但是培养14 d的存活率仍大于85%(表1)。

表1 体外诱导脐血单个核细胞不同时间细胞数、存活率检测( $\bar{x} \pm s$ )

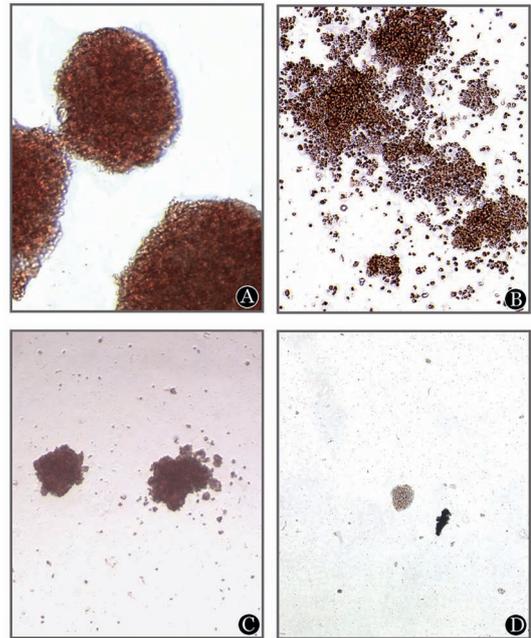
诱导时间	细胞数( $\times 10^6$ )	存活率(%)
诱导前	1.25 $\pm$ 0.01	98.72 $\pm$ 0.11
诱导7 d	1.19 $\pm$ 0.29	98.12 $\pm$ 0.53
诱导10 d	18.52 $\pm$ 1.96	96.85 $\pm$ 0.75
诱导14 d	136.53 $\pm$ 8.78	88.92 $\pm$ 0.95

注:每组设6个复孔,实验重复3次

体外诱导7 d红系集落数最多,为 $326.00 \pm 97.96$ ,而诱导前仅为 $61.60 \pm 20.03$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),随着诱导时间延长细胞逐渐分化成熟,红系祖细胞集落减少(图1)。

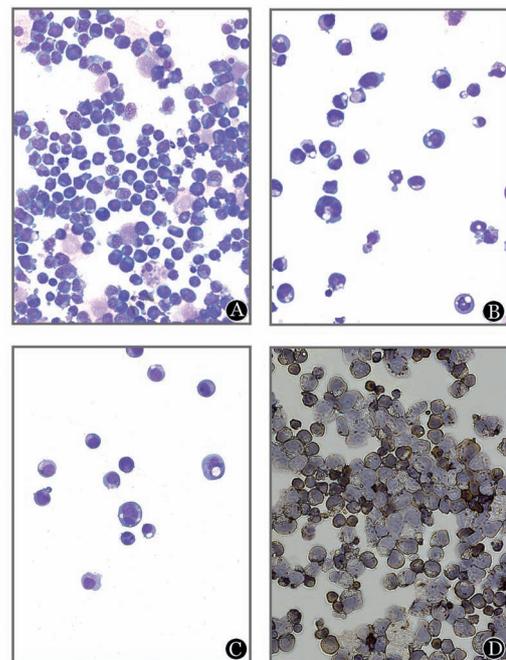
2. 红系祖细胞的鉴定:对诱导不同时间的细胞进行瑞氏-吉姆萨染色,随着诱导时间的延长,红系祖细胞核质比例下降,细胞核染色逐渐加深,胞质被染成淡蓝色,呈现典型的红系祖细胞形态,诱导7

d多为早幼红细胞,10 d多为中幼红细胞,14 d开始出现晚幼红细胞(图2A~C)。采用联苯胺对诱导10 d的细胞进行染色,部分细胞呈阳性(图2D)。诱导14 d的细胞沉淀呈红色,表达血红蛋白,向晚期红系细胞分化,而诱导前细胞沉淀为白色斑块(图3)。



A: 诱导前;B~D分别为诱导7、10、14 d

图1 造血集落半固体培养基体外诱导脐血单个核细胞不同时间红系祖细胞集落形成情况( $\times 100$ )



A~C: 瑞氏-吉姆萨染色观察诱导7、10、14 d细胞形态;D: 联苯胺染色观察诱导10 d细胞形态

图2 体外诱导不同时间红系祖细胞形态( $\times 400$ )

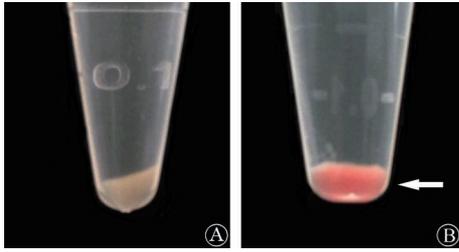


图3 诱导前(A)与诱导14 d(B)细胞沉淀外观比较

采用流式细胞术检测红系祖细胞表面标志的表达变化,结果显示在整个诱导分化过程中红系祖细胞特异性表面标志 CD71 和 CD71/CD235a 的表达均明显上调。利用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力,诱导 3 d 细胞开始增殖,5 d 后细胞增殖明显,逐渐进入增殖旺盛期(图 4)。

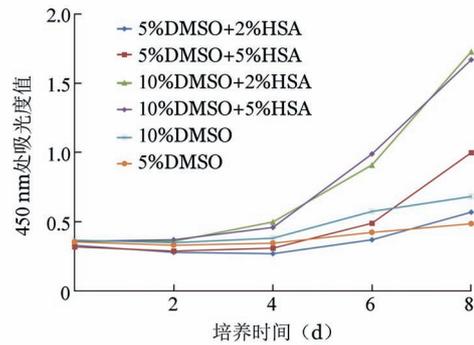
3. 不同冻存液保存红系祖细胞效果:结果见表 2,单用不同浓度的 DMSO 冻存液保存的细胞复苏后存活率均低于 50%。采用 10% DMSO+2% HSA 及 10% DMSO+5% HSA 保存细胞,复苏后细胞存活率及回收率均明显高于 5% DMSO+2% HSA 和 5% DMSO+5% HSA,提示 10% 的 DMSO 与 HSA 联用对红系祖细胞具有较好的保护作用,不同浓度的 HSA 对于红系祖细胞的保护作用差异无统计学意义。

CCK-8 结果显示,随着培养时间的延长,细胞数逐渐增加,细胞增殖旺盛,10% DMSO+2% HSA 和 10% DMSO+5% HSA 保存的细胞复苏后增殖能力明显优于 5% DMSO+2% HSA 和 5% DMSO+5% HSA,提示 10% DMSO 与 HSA 联用对红系祖细胞具有较好的保护作用。而 10% DMSO+2% HSA 和 10% DMSO+5% HSA、5% DMSO+2% HSA 和 5% DMSO+5% HSA 之间细胞增殖水平差异无统计学意义,提示 2% HSA 与 5% HSA 对于红系祖细胞的保护作用无显著差异。而单独采用不同浓度的 DMSO 作为冷冻保存剂,复苏后细胞增殖能力较弱(图 5)。

表 2 不同冻存液保存红系祖细胞复苏后细胞存活率及回收率(% , $\bar{x}\pm s$ )

冻存液	存活率	回收率
5% DMSO+2% HSA	77.22±4.55 <sup>a</sup>	80.30±4.72 <sup>a</sup>
5% DMSO+5% HSA	82.70±3.11 <sup>a</sup>	85.76±3.22 <sup>a</sup>
10% DMSO+2% HSA	90.32±1.80	93.66±1.87
10% DMSO+5% HSA	89.03±1.62	92.32±1.68
5% DMSO	30.30±0.71 <sup>a</sup>	31.42±0.74 <sup>a</sup>
10% DMSO	44.15±1.48 <sup>a</sup>	45.78±1.53 <sup>a</sup>

注: DMSO: 二甲基亚砜; HSA: 人血清白蛋白; 与 10% DMSO+2% HSA 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。每组设 6 个复管, 实验重复 3 次



DMSO: 二甲基亚砜; HSA: 人血清白蛋白

图 5 不同冻存液对复苏后细胞增殖能力的影响(每组设 6 个复孔, 实验重复 3 次)

表 3 结果显示, 10% DMSO+2% HSA+50% 自体血浆保存的红系祖细胞存活率最高。四种冻存液复苏后 CD71 阳性表达与冻存前差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而仅 10% DMSO+2% HSA+50% 自体血浆保存的细胞 CD71/CD235a 表达与冻存前相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。10% DMSO+2% HSA+50% 自体血浆保存的细胞复苏后细胞增殖能力最强(图 6)。提示血浆对细胞有较好的保护作用, 在 10% DMSO+2% HSA 的冷冻保存液中加入 50% 的血浆保存诱导分化的红系祖细胞效果更佳。

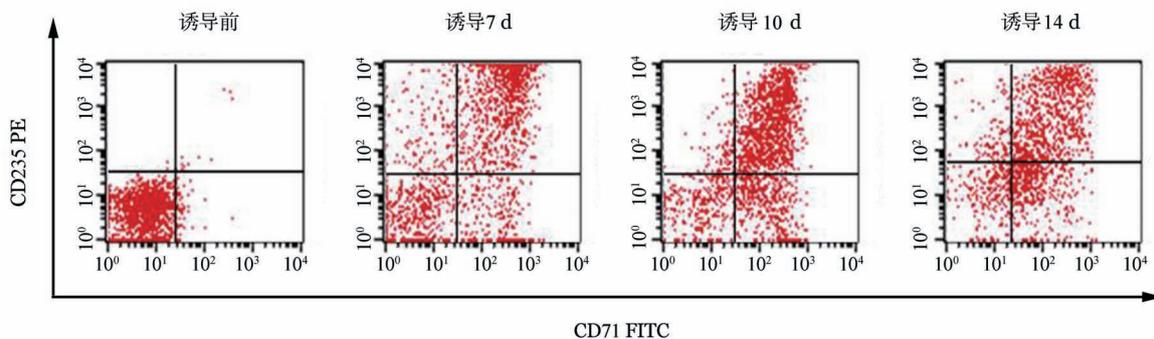


图 4 流式细胞术检测体外诱导不同时间红系祖细胞特异性标志 CD71、CD235 的表达

**表3** 含自体血浆冻存液保存红系祖细胞复苏后细胞存活率及回收率(% , $\bar{x}\pm s$ )

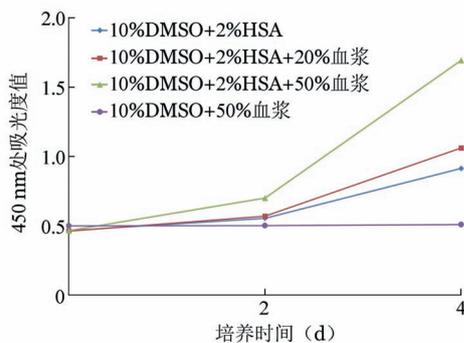
冻存液	存活率	回收率
10%DMSO+2%HSA	80.83±5.87	92.26±6.73
10%DMSO+2%HSA+20%自体血浆	83.32±2.33	95.47±2.67
10%DMSO+2%HSA+50%自体血浆	85.55±2.66 <sup>ab</sup>	98.30±3.04 <sup>ab</sup>
10%DMSO+50%自体血浆	83.41±4.60	95.58±4.40

注: DMSO: 二甲基亚砜; HSA: 人血清白蛋白; 与10%DMSO+2%HSA组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与10%DMSO+2%HSA+20%自体血浆比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。每组设6个复管, 实验重复3次

**表4** 不同冻存液保存红系祖细胞复苏后细胞表面标志表达(% , $\bar{x}\pm s$ )

组别	CD71 <sup>+</sup>	CD71 <sup>+</sup> /CD235a <sup>+</sup>
冻存前	99.96±0.07	35.80±1.48
冻存后		
10%DMSO+2%HSA	99.38±0.35	30.00±1.83 <sup>a</sup>
10%DMSO+2%HSA+20%自体血浆	99.40±0.45	29.28±2.68 <sup>a</sup>
10%DMSO+2%HSA+50%自体血浆	99.45±0.17	32.05±5.31
10%DMSO+50%自体血浆	99.92±2.18	32.18±5.14

注: DMSO: 二甲基亚砜; HSA: 人血清白蛋白; 与冻存前比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。每组设4个复管, 实验重复3次



DMSO: 二甲基亚砜; HSA: 人血清白蛋白

**图6** 不同冻存液对复苏后细胞增殖能力的影响(每组设6个复孔, 实验重复3次)

## 讨论

近年来, 血液供应紧张的矛盾日益突出, 因此迫切需要寻找有效的血液替代品, 利用干细胞体外分化获得成熟红细胞用于临床输血治疗是输血医学研究的重要内容之一。由于脐血易于获得, 免疫原性低, 脐血来源的单个核细胞中富含造血干/祖细胞, 且能够诱导分化为造血细胞, 发挥造血支持作用而受到青睐。

我们以脐血单个核细胞作为种子细胞, 诱导7 d

红系集落数最多, 随后逐渐减少, 提示单个核细胞在该培养诱导体系中, 0~7 d为造血干细胞增殖期, 随后进入红系祖细胞分化期。随着诱导时间延长, 红系祖细胞特异性标志 CD71、CD235 的表达逐渐升高, 细胞数增多。14 d细胞扩增约110倍, 存活率在85%以上, 收集的细胞沉淀呈红色。瑞氏-吉姆萨染色细胞呈典型的红系祖细胞形态, 诱导10 d多为中幼红细胞, 联苯胺染色则可见部分细胞表达血红蛋白。表明该诱导扩增体系可以特异性地诱导扩增红系祖细胞, 而其他系细胞的分化和扩增均被抑制。

红系祖细胞具有较强的体外增殖能力, 在红系祖细胞阶段的大规模扩增可有效地提高细胞总量<sup>[11-12]</sup>, 根据起始细胞数计算, 1份脐血经过体外诱导扩增将获得 $10^{10}$ 数量级的红系祖细胞, 临床输注后有望在体内增殖以改善患者贫血症状<sup>[13]</sup>。Douay<sup>[14]</sup>估计在最佳的诱导扩增条件下, 1份脐血能够获得10~50个单位的红细胞。

为了满足临床择期输血的需求, 必须储备细胞。目前市场上尚无红系祖细胞保存液的产品。而造血干/祖细胞常采用冷冻保存的方法, 保护剂多选择 DMSO<sup>[15]</sup>。Rodrigues 等<sup>[16]</sup>报道低浓度 DMSO 协同海藻糖对脐血造血干/祖细胞冷冻保存与 10% DMSO 作用相当。Rubinstein 等<sup>[17]</sup>采用 DMSO 和右旋糖苷 40 冷冻保存脐血中分离的有核细胞, 复苏后用 2.5% HSA、5% 右旋糖苷 40 洗涤细胞获得较好的结果, 其中 HSA 在冷冻复苏过程中调节渗透压发挥了一定的作用。因此本研究我们采用 DMSO、HSA 和血浆不同浓度配比, 保存脐血来源的诱导分化的红系祖细胞, 观察冻存液效果, 结果表明, 仅用 DMSO 作为冷冻保护液保存细胞, 复苏后细胞存活率低, 增殖能力弱; 而 DMSO 与 HSA 联用显示, 10% DMSO 较 5% DMSO 具更好的细胞保护作用, 且冻存液 10% DMSO、2% HSA 与 10% DMSO、5% HSA 对红系祖细胞的保护作用无显著差别; 在 2% HSA+10% DMSO 冷冻保存液中加入自体血浆保存红系祖细胞, 复苏后细胞增殖能力强, 且加入 50% 血浆效果更佳, 细胞表达与冻存前无显著差别; 但 50% 血浆单独与 10% DMSO 联用, 细胞复苏后细胞增殖能力弱, 可能与血浆成分较复杂有关。有文献报道, 脐血浆能够促进造血干细胞增殖分化<sup>[18]</sup>, 表明血浆对造血细胞有很好的保护作用。由于血浆与诱导的红系祖细胞为同一脐血来源, 两者相容性好, 将其作为冷冻保存液的添加剂, 降低了保存液的成

本、减少了浪费,因此具有很好的临床应用价值。

参考文献

[1] Olsen AL, Stachura DL, Weiss MJ. Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells [J]. Blood, 2006, 107(4):1265-1275.

[2] Dorn I, Klich K, Arauzo-Bravo MJ, et al. Erythroid differentiation of human induced pluripotent stem cells is independent of donor cell type of origin [J]. Haematologica, 2015, 100(1):32-41. doi: 10.3324/haematol.2014.108068.

[3] Nicoud IB, Clarke DM, Taber G, et al. Cryopreservation of umbilical cord blood with a novel freezing solution that mimics intracellular ionic composition [J]. Transfusion, 2012, 52(9): 2055-2062. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03547.x.

[4] Mairhofer M, Schulz JC, Parth M, et al. Evaluation of a xenofree protocol for long-term cryopreservation of cord blood cells [J]. Cell Transplant, 2013, 22(6):1087-1099. doi: 10.3727/096368912X657396.

[5] Kurtz J, Seetharaman S, Greco N, et al. Assessment of cord blood hematopoietic cell parameters before and after cryopreservation [J]. Transfusion, 2007, 47(9):1578-1587.

[6] Berz D, McCormack EM, Winer ES, et al. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. Am J Hematol, 2007, 82(6):463-472.

[7] Miura J, Minegishi M, Itoh T, et al. Quality evaluation of umbilical cord blood progenitor cells cryopreserved with a small-scale automated liquid nitrogen system [J]. Cryobiology, 2008, 57(2): 178-181. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.07.004.

[8] Son JH, Heo YJ, Park MY, et al. Optimization of cryopreservation condition for hematopoietic stem cells from umbilical cord blood [J]. Cryobiology, 2010, 60(3):287-292. doi: 10.1016/j.cryobiol.2010.01.007.

[9] Solomon M, Wofford J, Johnson C, et al. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation [J]. Transfusion, 2010, 50(4):820-830. doi: 10.1111/j.1537-

2995.2009.02491.x.

[10] Wognum B, Yuan N, Lai B, et al. Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells [J]. Methods Mol Biol, 2013, 946:267-283. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8\_17.

[11] Costa Pereira W, Alsuhaibani O, Elyamany G, et al. A novel approach for the enumeration of peripheral blood stem cells suitable for transplantation [J]. J Transplant, 2014, 2014: 473503. doi: 10.1155/2014/473503.

[12] England SJ, McGrath KE, Frame JM, et al. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus [J]. Blood, 2011, 117(9):2708-2717. doi: 10.1182/blood-2010-07-299743.

[13] Migliaccio AR, Whitsett C, Migliaccio G. Erythroid cells in vitro: from developmental biology to blood transfusion products [J]. Curr Opin Hematol, 2009, 16(4):259-268. doi: 10.1097/MOH.0b013e32832bcaa2.

[14] Douay L. From stem cell to red blood cells in vitro: "the 12 labors of Hercules" [J]. Clin Lab Med, 2010, 30(2):391-403. doi: 10.1016/j.cll.2010.02.003.

[15] 章毅, 朱华, 金焕英, 等. 液氮冻存时间对605份脐造血干细胞质量和临床移植效果的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(1):1-3. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.001.

[16] Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood [J]. Cryobiology, 2008, 56(2):144-151. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.01.003.

[17] Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(22):10119-10122.

[18] 张丽, 李倩如, 杜英, 等. 脐血浆神经生长活性蛋白对CD34+细胞增殖分化的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(6):995-996. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.06.011.

(收稿日期:2015-06-19)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

关于非法网站冒用《中华血液学杂志》名义进行征稿的特别提醒

近期我们发现一些网站冒用《中华血液学杂志》名义征稿,并承诺“职称论文权威快速代发”。为此,本刊特别提醒各位作者,向《中华血液学杂志》投稿,一定要登录中华医学会官方网站首页(<http://www.cma.org.cn/>),进入“业务中心”,在“杂志社远程稿件管理系统”中投稿,或通过本刊官方网站(<http://www.hematoline.com>)进行投稿,以免造成不必要的损失。本刊编辑部联系电话:022-27304167。

本刊编辑部