

· 论 著 ·

人胚胎干细胞来源巨核细胞衍生微囊泡促进血管新生

唐 轩^{1,2}, 吴旭敏², 陈可一^{1,2}, 胡 亮², 李基晟², 刘传丽², 覃金华², 张博文², 李艳华²

(1. 河北大学化学与材料科学学院, 河北 保定 071002; 2. 军事医学研究院, 北京 100850)

摘要:目的 建立人胚胎干细胞(hESCs)来源巨核细胞(MKs)及其衍生微囊泡的制备体系,评价巨核细胞微囊泡(MKMPs)对血管新生的促进作用。方法 ① 干细胞来源 MKs 的制备:将 hESCs 接种于基质胶包被的培养板中,通过贴壁培养法进行诱导,添加第一阶段诱导培养基培养 2 d 后将细胞诱导至中胚层祖细胞,添加第二阶段诱导培养基培养 3 d 后将细胞诱导至生血内皮/造血祖细胞。随后将细胞消化成单细胞并接种至低吸孔板,通过悬浮培养再诱导 8 d。通过细胞形态观察、流式分析各阶段特征分子标志物[hESCs: TRA-1-60、唾液酸糖脂阶段特异性胚胎抗原 4(SSEA4);中胚层祖细胞:brachyury;生血内皮细胞/造血祖细胞:CD34、CD43;MKs:CD41a、CD42b],细胞免疫荧光染色 β 微管蛋白(β 1-tubulin)、血管性血友病因子(VWF)、Friend 白血病病毒整合位点 1(FLI1)、CD42 鉴定 MKs 的特征蛋白;② MKMPs 收集和验证:通过差速离心法收集 MKMPs,利用纳米颗粒跟踪分析实验(NTA)检测粒径,透射电镜观察形态及超微结构,蛋白免疫印迹法检测特征蛋白 CD41、肿瘤易感基因 101(TSG101)及 CD9 的表达水平;③ MKMPs 生物学功能分析:将 MKMPs 和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分别用 CD41a-PE 及 CD34-APC 抗体标记后进行孵育,结合活细胞成像观察培养 3 h 后细胞吞噬 MKMPs 的现象;以 HUVECs 为实验对象分别开展管腔形成实验和细胞迁移实验,以血小板微囊泡(PMPs)作为阳性对照,评估 MKMPs 对内皮细胞迁移及血管新生的作用。实验分为未添加微囊泡组($0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照组)及添加不同浓度微囊泡组(1 、 5 、 10 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 实验组),对细胞在基质胶内培养 5 h 后形成管腔的结点数进行计数,并分析 6 h 细胞迁移率;ELISA 检测微囊泡中血管内皮生长因子(VEGF)浓度。结果 ① 流式检测结果表明分化前细胞表达多能性标志物 SSEA4 及 TRA-1-60,诱导至第 2 d 的细胞表达中胚层祖细胞标志 brachyury;诱导至第 5 d 的细胞表达生血内皮标志 CD34 和早期造血细胞标志物 CD43;诱导至第 13 d 的细胞表达 MKs 标志物 CD41a 和 CD42b。分化第 13 d 细胞表达 MKs 特征蛋白 CD42、 β 1-tubulin、VWF 及 FLI1;② MKMPs 具有典型双层膜状结构,NTA 分析表明该囊泡粒径为 $(164.3 \pm 14.0) \text{ nm}$,且表达 TSG101、CD9 及 CD41 等标志蛋白;③ 荧光标记的 MKMPs 与 HUVECs 共培养 3 h 后, HUVECs 能够摄取 MKMPs;与对照组相比,添加 MKMPs 能够显著提高 HUVECs 的管腔形成能力及迁移能力,其中 MKMPs $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理促进管腔形成及细胞迁移能力最强,其促进细胞迁移及管腔形成的能力均显著高于 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PMPs 处理组;与 PMPs 相比, MKMPs 中 VEGF 的含量显著升高。结论 hESCs 来源 MKs 具备产生微囊泡的能力, MKMPs 具有促进血管新生的作用。

关键词: 人胚胎干细胞; 巨核细胞; 巨核细胞微囊泡; 人脐静脉内皮细胞; 血管新生

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2025)07-0500-11

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2025.08289

巨核细胞(megakaryocytes, MKs)是由造血干细胞发育而来的血小板前体细胞,可维持生理状态下血小板数量恒定,在体内发挥重要生理功能^[1-2]。

基金项目:国家自然科学基金(82270132);国家自然科学基金(32470788)

作者简介:唐 轩,硕士研究生,主要从事人胚胎干细胞向造血细胞诱导分化研究, E-mail: tx99524@163.com

通信作者:李艳华, E-mail: shirlylyh@126.com; 张博文, E-mail: bowen_0901@126.com

研究表明,输注 MKs 有望成为临床输注血小板的替代治疗策略,用于缓解和治疗血小板减少症。本团队前期建立了诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)定向分化 MKs 体系,且证实 hESCs 分化的 MKs 具有与天然 MKs 相似的生物学表型及产生血小板的功能^[3-4]。hESCs 分化的 MKs 是体外进一步人工制备血小板制剂的新型种子细胞,同时也是探索 MKs 生物学功能的必要种子细胞。有研究表明 MKs 可通过释放巨核细胞微囊泡

(megakaryocyte microparticles, MKMPs) 来实现相邻细胞间的通讯或通过体液循环实现生理调节信号的跨组织传递^[5-6]。文献报道,血液内 70%~80% 的微囊泡都可能由 MKs 及血小板释放的,这些微囊泡表达 MKs 和血小板关键分子标志物 CD41a 和 CD61,并携带大量血小板源细胞因子及 MKs 特有的核酸类物质^[7-9]。近年来,MKMPs 及血小板微囊泡(platelet microparticles, PMPs)在调控干细胞分化^[8-10]、促进损伤组织修复再生^[9]和调节机体免疫^[11-12]等方面展现出独特生理功能受到广泛关注。微囊泡输注作为一种非细胞治疗手段的备选策略,在血管损伤性疾病等多种复杂疾病的治疗中展现出良好应用前景^[11-13]。

有研究表明,血小板可释放血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子 1 α 和肝细胞生长因子等细胞因子,以及溶血磷脂酸、鞘氨醇-1-磷酸等信号磷脂和 microRNA-22、microRNA-185 等核酸物质,从而在促进 MKs 生成^[10]、促进损伤修复^[14]、血管新生^[15]及维持内皮稳态^[16]中发挥作用。PMPs 作为关键递送载体介导了上述生物学效应。而 MKs 是血小板的前体细胞,其产生的微囊泡同样具有促进 MKs 生成的作用^[7]。但 MKMPs 是否与 PMPs 同样对内皮细胞产生影响,尚未报道。

本研究首先构建了 hESCs 向 MKs 定向分化体系并明确分化细胞表型^[3-4];然后富集 hESCs 分化的 MKs 及其释放的 MKMPs,并对其特性进行分析^[5, 7-8];并分析 MKMPs 对内皮细胞形成管腔的能力及细胞迁移能力的影响^[17],初步探究 hESCs 分化 MKs 释放的 MKMPs 的生物学功能。旨在揭示 MKs 释放 MKMPs 的表型及功能,为探索其应用提供实验数据支撑。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

hESCs,购自美国 Wicell 研究中心、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein vascular endothelial cells, HUVECs),购自北京中生奥邦生物科技有限公司,由本实验室保存。

mTeSRTM1 培养基(货号 85850),加拿大 STEM-CELL Technologies 公司;hESCs 培养的基质胶(货号 354277),HUVECs 管腔形成实验的基质胶(货号 356231),美国 Corning 公司;Y27632(货号

S6390)、CHIR99021(货号 S2924)和 SB431542(货号 S1067),美国 Selleck 公司;TrypLE Select(货号 12604021)、L-丙氨酰-谷氨酰胺(货号 35050-061)、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基/营养混合物 F-12 培养基(货号 11320-033)、含 L-丙氨酰-谷氨酰胺添加剂的 Iscove 改良杜氏培养基(货号 31980030)、F12 培养基(货号 31765035)、无蛋白杂交瘤细胞培养基(货号 12040077)、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(货号 41400-045)、蛋白定量检测试剂盒(货号 23225),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;4% 多聚甲醛溶液(货号 G1101-500ML)和磷酸盐缓冲溶液(PBS)(货号 G4202-500ML),武汉赛维尔公司;L-抗坏血酸-2-磷酸三钠(货号 A8960)、牛血清白蛋白(货号 A3311)、亚麻酸(货号 L2376)、亚油酸(货号 L1376)、 α -硫代甘油(货号 M6145-25ML)、曲拉通 X-100(货号 T8787)、凝血酶(货号 T7009)、氯化钙(货号 C7902)和胆固醇(货号 S-5442),美国默克公司;人骨形态发生蛋白 4(bone morphogenic protein 4, BMP4)(货号 314-BP)、激活素 A(activin A)(货号 338-AC)、VEGF(货号 293-VE)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)(货号 291-G1)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(货号 100-18C)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)(货号 255-SC)、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)(货号 288-TP)、FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L)(货号 308-FK)和白细胞介素 3(interleukin 3, IL-3)(货号 203-IL-050/CF),美国 R&D 公司;IL-11(货号 218-IL)美国 Peprotech 公司;CD61 磁性分选试剂盒(货号 130051101),德国 Miltenyi Biotec 公司;驴血清(货号 SL050)和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(货号 C0065),北京索莱宝科技有限公司;唾液酸糖脂阶段特异性胚胎抗原 4(sialyl glycolipid stage-specific embryonic antigen 4, SSEA4)(货号 560461)、TRA-1-60-PE(货号 562711)、brachyury-PE(货号 IC2085P)、CD34-PEcy7(货号 560710)、CD43-BV421(货号 562916)、CD42b-APC(货号 551061)、CD41a-PE(货号 557297)、CD34-APC(货号 555824)、Hoechst33342 染料(货号 561908)、固定和透化溶液(货号 554722),美国 Becton Dickinson 公司;小鼠抗 CD42b 抗体(货号 ab61402)、Friend 白血病病毒整合位点 1(friend leukemia integration 1, FLI1)

抗体(货号 ab153909)、Alexa Fluor® 555 标记的驴抗小鼠 IgG 抗体(货号 ab150106)、Alexa Fluor® 488 标记的驴抗兔 IgG 抗体(货号 ab150106)、肿瘤易感基因 101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)(货号 ab125011)、兔抗 CD9 抗体(货号 ab236630)和兔抗 CD41 抗体(货号 ab134131),英国 Abcam 公司;β1 微管蛋白(β1-tubulin)抗体(货号 A12289),武汉爱博泰克生物科技有限公司;血管性血友病因子(von Willebrand factor, VWF)抗体(货号 00044197),美国 Proteintech 公司;全自动蛋白表达分析试剂盒(货号 SMW004-1; PS-ST01EZ-8),美国 Protein Simple 公司;EGM-2 培养基(货号 CC-3162),瑞士 LONZA 公司;VEGF 检测试剂盒(货号 EK0539),武汉博士德生物工程有限公司。

BNC-1360 超净工作台,哈尔滨东联公司;5922 离心机,日本久保田公司;3111 CO₂ 恒温细胞培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;7622 细胞涂片机,美国 Wescor 公司;Guava easy Cyte 12HT 流式细胞仪,美国 Luminex 公司;CKX31 光学显微镜,日本 Olympus 公司;CSIM100 共聚焦荧光显微镜,浙江 SUNNY TECHNOLOGIES 公司;Zeta View® 纳米颗粒分析仪,德国 Partice Metrix 公司;H-7650 透射电镜,日本 HITACHI 公司;Abby 全自动蛋白表达分析仪,美国 Protein Simple 公司。

1.2 细胞传代与培养

hESCs 培养于 mTeSR1 培养基。待细胞生长汇合至 90% 以上时使用 TrypLE Select 将 hESCs 消化为单细胞,并按 1:10 传代比例将细胞接种至包被后的 6 孔板中继续培养。

HUVECs 培养于 EGM-2 培养基。待细胞生长汇合至 90% 以上,采用 TrypLE Select 将细胞消化为单细胞,按照 1:3 传代比例将细胞接种至新的培养瓶中继续培养。

1.3 hESCs 向 MKs 诱导分化

将 hESCs 消化为单细胞,用含 5 μmol·L⁻¹

Y27632 的 mTeSR1 培养基重悬,按照每孔 1.5×10⁵ 个细胞密度接种在基质胶包被的 6 孔板。培养 24 h 贴壁后,将培养基更换为含 25 μg·L⁻¹ BMP4、25 μg·L⁻¹ 激活素 A、25 μg·L⁻¹ bFGF 及 2 μmol·L⁻¹ CHIR99021 的 BEL 培养基(第一阶段培养基)。培养 48 h 后将培养基更换为含 50 μg·L⁻¹ VEGF、20 μg·L⁻¹ bFGF 和 2 μmol·L⁻¹ SB431542 的 BEL 培养基(第二阶段培养基)。培养 72 h 后将细胞用 TrypLE Select 消化成单细胞,以每瓶 1.2×10⁶ 个细胞密度接种在低吸附 T75 瓶,并向培养基中额外补充含 10 μmol·L⁻¹ Y27632、50 μg·L⁻¹ SCF、40 μg·L⁻¹ TPO、20 μg·L⁻¹ IL-3、20 μg·L⁻¹ Flt-3L、20 μg·L⁻¹ VEGF、20 μg·L⁻¹ IGF-1、10 μg·L⁻¹ bFGF、20 μg·L⁻¹ IL-11 和 5 μmol·L⁻¹ SB431542 的 BEL 培养基(第三阶段培养基)培养 24 h。随后,将培养基更换为新鲜的第三阶段培养基,该阶段培养时长为 8 d 并隔天更换新鲜培养基(图 1)。BEL 培养基的配制方法参见文献^[4,18]。收集培养基中的悬浮细胞并通过 70 μm 细胞筛网过滤,用 CD61 磁珠分选试剂盒纯化 MKs。

1.4 巨核细胞免疫荧光染色

MKs 悬液经甩片、固定及破膜后孵育一抗并置于 4 °C 过夜,一抗稀释比分别为 CD42(1:100)、VWF(1:200)、FLI1(1:100)和 β1-tubulin(1:100);经洗涤后加入 Alexa Fluor® 555 标记的驴抗小鼠 IgG 抗体和 Alexa Fluor® 488 标记的驴抗兔 IgG 抗体,二抗稀释比为 1:400,室温避光孵育 1 h;洗涤后加入 DAPI 溶液(稀释比为 1:500)室温避光孵育 5 min;封片后在共聚焦荧光显微镜下观察细胞染色情况。详细操作步骤见文献^[4]。

1.5 流式细胞术检测细胞表面标志物

将 1.3 分化的各个阶段的细胞重悬至 PBS 中制成单细胞悬液,将其密度调整至 5×10⁹~10×10⁹ L⁻¹,各检测均设置空白组。表面抗原检测:向 100 μL 细胞悬液中加入流式抗体 SSEA4、TRA-1-60、CD34、CD43、CD41a 和 CD42b,抗体稀释比为 1:100,4 °C

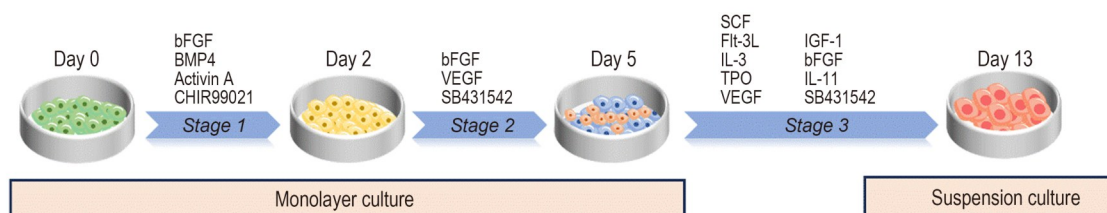


Fig. 1 Scheme of the stepwise differentiation process of human embryonic stem cells (hESCs) into megakaryocytes (MKs) *in vitro*. The differentiation process was divided into three sequential stages using specific cytokine and small molecule cocktails. The initial two stages involved monolayer culture while the final stage shifted to suspension culture to facilitate MKs differentiation. bFGF: basic fibroblast growth factor; BMP4: bone morphogenic protein 4; VEGF: vascular endothelial growth factor; SCF: stem cell factor; Flt-3L: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand; IL: interleukin; TPO: thrombopoietin; IGF-1: insulin-like growth factor 1.

避光孵育 30 min;胞内抗原检测:采用固定破膜液对细胞进行固定和破膜后加入流式抗体 brachyury,抗体稀释比为 1:100,4 °C 避光孵育 30 min。细胞洗涤后采用流式细胞分析仪检测,并用 FlowJo 软件分析标志物阳性细胞的百分比。

1.6 MKMPs 收集及其生物学特征分析

将 1.3 分化获得的 MKs 重悬于含 SCF 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TPO 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BEL 培养基中继续培养 48 h。收集培养基并 300 $\times g$ 、4 °C 离心 20 min 去除细胞沉淀。上清 2 000 $\times g$ 、4 °C 离心 20 min 去除细胞碎片。第 2 次离心上清(38 000 $\times g$ 、4 °C、2 h)后收集沉淀,用 PBS 重悬并用相同条件再次离心收集沉淀,即获得 MKMPs,用 PBS 重悬后分装并保存于 -80 °C。

采用蛋白定量检测试剂盒测定 MKMPs 溶液中蛋白质浓度;取 10 μL MKMPs 溶液并根据蛋白浓度用 PBS 稀释 1 000~10 000 倍后进行纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测,测定其数量及粒径;取 10 μL MKMPs 溶液,用磷钨酸溶液染色后在透射电镜下观察其超微结构;将 MKMPs 溶液蛋白浓度调整至 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,使用全自动蛋白表达分析试剂盒及 Abby 全自动蛋白表达分析仪检测溶液中 MKMPs 特征蛋白 CD9、CD41 和 TSG101 水平。

1.7 PMPs 收集

收集人脐血血浆(北京市脐带血造血干细胞库),2 000 $\times g$ 离心 20 min 弃去上清,得到血小板。用 10 mL 4 °C 预冷的 PBS 将其重悬,加入 200 μL 氯化钙(1×10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、100 μL 凝血酶(1×10^5 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$),37 °C 孵育 10 min,充分激活血小板;2 000 $\times g$ 离心 20 min 去沉淀,上清移入离心管,4 °C、20 000 $\times g$ 离心 2 h 后收集沉淀,用 PBS 重悬后分装并保存于 -80 °C。

1.8 HUVECs 对 MKMPs 吞噬作用分析

将 HUVECs 接种到明胶预包装的共聚焦小皿,待细胞贴壁后吸弃培养基,添加抗人 CD34-APC 抗体(稀释比为 1:100)进行细胞染色;同时用抗人 CD41a-PE 抗体(稀释比为 1:100)对 MKMPs 进行染色。将染色后的 MKMPs 加入 HUVECs 的培养上清,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养 3 h,在共聚焦显微镜下对细胞中 MKMPs 荧光定位情况进行观察。

1.9 HUVECs 管腔形成实验

在 96 孔板中每孔加入 50 μL 基质胶,将孔板放置于 37 °C 培养箱静置 30 min。将 HUVECs 悬液以 3×10^4 每孔的密度加入 96 孔板中,待细胞贴壁后,将孔中培养基更换为含 0、1、5、10 和 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

5 种不同浓度 MKMPs 或 PMPs 的 EGM-2 培养基 MKMPs 或 PMPs 的溶液的 EGM-2 培养基,每组设置 4 个复孔,其中添加与微囊泡溶液等体积的 PBS 作为对照组,即 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。继续孵育 5 h 后,在倒置显微镜下观察孔内内皮细胞形成管腔的情况,并在每孔中随机选择 3 个视野进行血管生成结点计数并取总和进行统计分析。

1.10 细胞划痕实验

取生长至完全汇合状态的 HUVECs,用 10 μL 枪头垂直于培养板底部均匀划线,随后吸弃培养基并更换为添加 0、1、5、10 和 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 种不同浓度 MKMPs 或 PMPs 的 EGM-2 培养基继续孵育,每组均设 6 个复孔。分别在孵育前及孵育后 6 h,在倒置显微镜下观察拍照,并使用 Image J 软件对初始划痕面积及终点划痕面积进行统计分析并计算迁移率。迁移率%=(A_0-A_{6h})/ $A_0\times 100\%$, A_0 表示初始划痕面积, A_{6h} 表示 6 h 后的残留面积。

1.11 ELISA 检测微囊泡内 VEGF 含量

将冻存的 MKMPs 和 PMPs 反复融冻进行裂解,16 000 $\times g$ 离心 20 min 收集上清,稀释 5 倍得待检测样品。按照人 VEGF ELISA 试剂盒说明书操作步骤检测样品浓度,将所得数值与稀释倍数相乘即为样本初始浓度。

1.12 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8 软件进行作图和分析。多组样本比较采用双因素方差分析,两两比较使用 Tukey 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hESCs 向 MKs 定向分化体系构建及分化细胞鉴定

hESCs 经第一阶段[第 0 d~第 2 d(D0~D2)]及第二阶段(D2~D5)的贴壁培养及诱导分化,细胞形态逐渐由上皮样转变为间质样并形成铺路石样细胞形态。在第三阶段(D5~D13)悬浮培养过程中,诱导细胞聚集成多个细胞球,其周围逐渐产生大量悬浮的圆形细胞(图 2A)。

采用流式细胞术对各阶段分化细胞的分子标志物进行检测。结果显示,分化前 hESCs 高表达 SSEA4 和 TRA-1-60,表明起始细胞具有良好的多能性。诱导至 D2,分化细胞高表达中胚层祖细胞标志蛋白 brachyury;诱导至 D5,分化细胞中可检测到 CD34 阳性(CD34⁺)内皮细胞和 CD34⁺CD43⁺造血

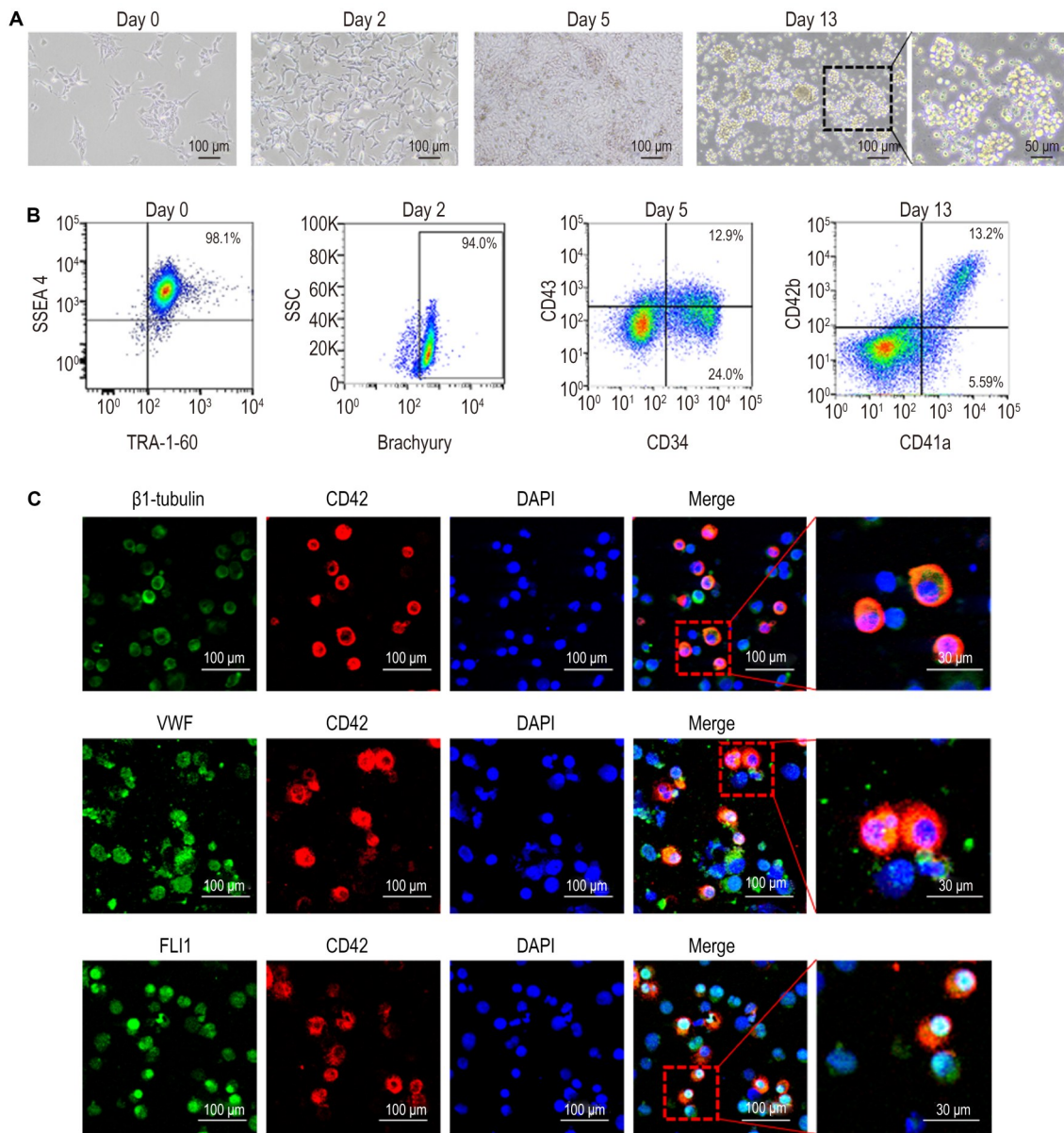


Fig.2 Characterization of hESC-derived megakaryocytes generated through a three-stage differentiation protocol. A: brightfield microscopy images of cell morphology during the differentiation of hESCs into MKs on day 0, day 2, day 5, and day 13; B: representative results of flow cytometry showing the expression of hESCs markers [sialyl glycolipid stage-specific embryonic antigen4 (SSEA4) and TRA-1-60] on day 0, mesodermal progenitor cells marker (brachyury) on day 2, hemogenic endothelium cells markers (CD34 and CD43) on day 5, and MKs markers (CD41a and CD42b) on day 13; C: immunofluorescence analysis of β 1-tubulin, von Willebrand factor (VWF), friend leukemia integration 1 (FLI1), and CD42 in hESC-derived MKs on day 13.

祖细胞。诱导至 D13, 分化细胞中 $CD41a^+$ MKs > 15%, 其中 $CD41a^+CD42b^+$ 标记的成熟 MKs > 10% (图 2B), 表明本体系可将 hESCs 定向分化为 MKs。

为进一步对 hESCs 分化的 MKs 进行鉴定, 采用 CD61 磁珠富集了 MKs, 并通过免疫荧光染色技术对 MKs 特征蛋白的表达情况进行检测。结果显示, MKs 除特异性表达 MKs 标志物 CD42 外, 还表达 MKs 核心转录因子 FLI1、血小板源细胞因子 VWF, 以及与血小板产生相关的细胞骨架蛋白 β 1-tubulin (图 2C)。

2.2 hESCs 来源 MKMPs 的富集及鉴定

对分化获得的 MKs 进行透射电镜观察发现, 在细胞周围存在大量含有膜结构的囊泡状物质 (图 3A)。进一步采用磁珠分选法富集 $CD61^+$ MKs 并观察其释放微囊泡的超微结构, 结果显示 MKMPs 呈圆形且具有双层膜状结构 (图 3B)。

MKMPs 的粒径为 50~500 nm, 平均粒径为 (164.3 ± 14.0) nm (图 3C), 每毫升培养上清中含有 5×10^9 个 MKMPs。且 MKMPs 能够同时表达 MKs 特征膜蛋白 CD41 以及囊泡的特征结构蛋白

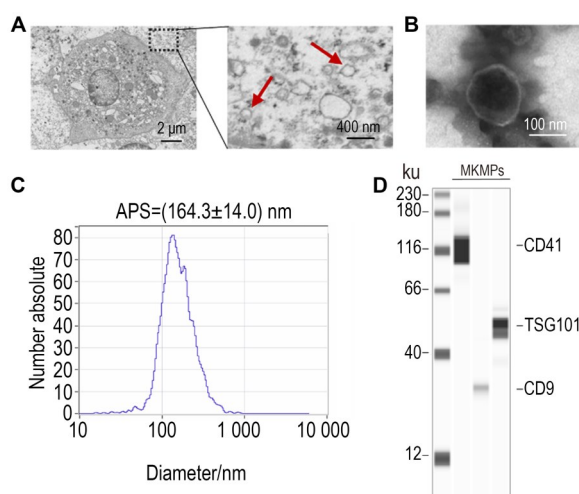


Fig.3 Characterizations of MK microparticles (MKMPs).

A: representative transmission electron micrographs of hESC-derived MKs on day13; B: representative transmission electron micrograph of MKMP; C: aerodynamic particle size (APS) distribution of MKMPs measured by nanoparticle tracking analysis (NTA); D: digital Western blotting analysis of the expression levels of CD41, tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and CD9 in MKMPs.

TSG101 和 CD9(图 3D)。表明 hESCs 分化的 MKs 释放的微囊泡,具备典型的微囊泡蛋白表达特征。

2.3 微囊泡对 HUVECs 成管及迁移能力的影响

HUVECs 和 MKMPs 分别标记 CD34 和 CD41a

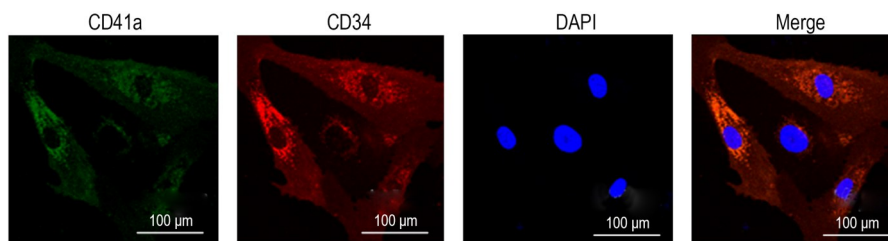


Fig.4 Live-cell immunofluorescence analysis of HUVECs uptake of CD41⁺ MKMPs. HUVECs were cultured in confocal dishes and labeled with CD34 antibody. After labeling with CD41a, MKMPs were added to the confocal plates. Live-cell imaging was performed 3 h after co-culture.

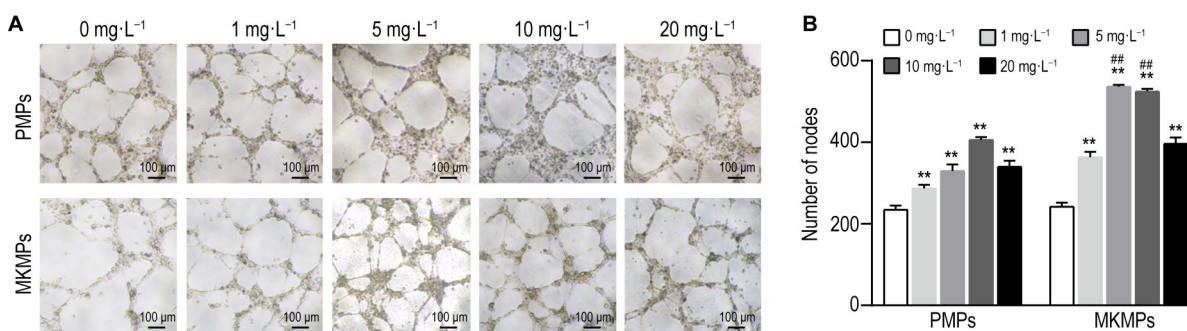


Fig.5 Effects of MKMPs and PMPs on tube formation capacity of HUVECs. HUVECs were cultured in 96-well plates and treated with varying concentrations of MKMPs and PMPs. After 5 h of culture, microscopic images were captured, and the number of nodes was calculated. A: microscopy images showing the effects of MKMPs and PMPs on tube formation in HUVECs; B was the quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with the normal control group (0 mg·L⁻¹ MKMPs or PMPs); ### $P<0.01$, compared with PMPs group at the same concentration.

荧光偶联抗体,37 °C共孵育 3 h,CD41a 荧光信号出现在 HUVECs 胞内,表明 MKMPs 能够被 HUVECs 快速吞噬(图 4)。

如图 5 所示,与对照组相比,HUVECs 管腔数量随添加微囊泡浓度提高逐渐增加,其中 MKMPs 5 mg·L⁻¹ 处理组管腔形成数量约为对照组 2 倍($P<0.01$),表明 MKMPs 在一定浓度范围内可提高 HUVECs 的管腔形成能力。PMPs 也可促进内皮管腔形成,实验结果显示在 10 mg·L⁻¹ 浓度下管腔形成数量最多,可达到 0 mg·L⁻¹ 的(1.7±0.1)倍($P<0.01$),但其成管数量依然比浓度为 10 mg·L⁻¹ 的 MKMPs 的成管数量少($P<0.01$)

划痕实验结果(图 6)表明,与对照组相比,添加微囊泡组的 HUVECs 迁移面积增加,细胞迁移率显著提高。其中 MKMPs 5 mg·L⁻¹ 组 HUVECs 迁移率最大,是对照组的(2.3±0.7)倍($P<0.01$),且显著高于同浓度 PMPs 处理组(图 6)。

结果表明, MKMPs 中 VEGF 浓度(249±11.4) ng·g⁻¹ 显著高于 PMPs(22±6.16) ng·g⁻¹(图 7)。

3 讨论

本研究结合单层贴壁法培养和细胞球悬浮培

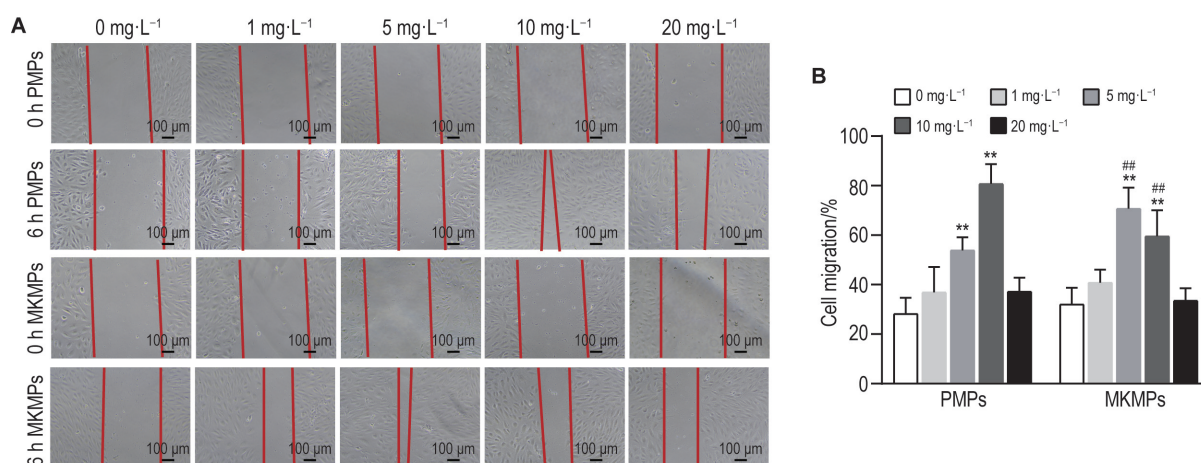


Fig.6 Effects of MKMPs and PMPs on migration of HUVECs using the scratch healing assay. HUVECs were cultured in 6-well plates until reaching 80%–90% confluency. Scratches were performed before different concentrations of MKMPs and PMPs were added to the suspension. After 6 h of incubation, microscopic images were acquired, and the scratch widths were measured. A: representative images showing the effects of MKMPs and PMPs on HUVECs migration; B: quantitative analysis of HUVECs migration in response to varying concentrations of MKMPs and PMPs. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with the normal control group (0 mg·L⁻¹ MKMPs or PMPs); ## $P<0.01$, compared with PMPs group at the same concentration.

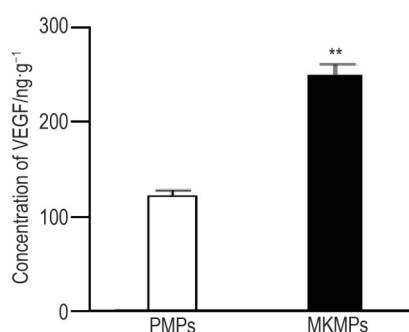


Fig.7 Contents of vascular endothelial growth factor (VEGF) in MKMPs and PMPs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with PMPs group.

养方法,设计了一套三阶段程序化诱导体系,通过分步添加不同的小分子化合物和细胞因子模拟胚胎造血发育不同时期微环境,使 hESCs 经历中胚层祖细胞、生血内皮细胞、造血祖细胞等中间阶段,最终分化为 MKs^[3-4]。通过磁珠分选将 MKs 细胞富集,收集其培养上清,利用差速离心法收集获得 MKMPs,透射电镜分析、NTA 结果表明其具有微囊泡的典型特征结构,全自动蛋白表达分析表明 MKMPs 表达微囊泡特征蛋白及 MKs 特征蛋白。MKMPs 与 HUVECs 的共培养结果表明, MKMPs 能够进入 HUVECs 细胞内,且可促进 HUVECs 的管腔形成能力,并增加 HUVECs 的迁移率。MKMPs 富含调节内皮细胞功能的关键因子 VEGF。

MKs 主要存在于机体的骨髓当中,占骨髓有核细胞的 0.05%,难以分离,因此通过谱系重编程途径或干细胞正向分化途径制备诱导型 MKs 就成为

获取该细胞的理想途径^[2-4, 19-20]。hESCs 是具有近乎无限自我更新能力的细胞,它具有向内、中、外 3 个胚层组织细胞分化的能力,是一种理想的诱导获得 MKs 的种子细胞来源^[21-22]。多年来,通过优化诱导因子组合、添加基质细胞饲养层、构建三维动态培养环境、对多能干细胞进行遗传修饰等途径,研究人员已成功构建出 hESCs 向 MKs 定向诱导分化的体系^[3-4]。然而,从潜在临床应用的角度考虑,开发出一套可实现规模化制备、无外源基因修饰或改造、不依赖异源饲养细胞的 hESCs 向 MKs 分化体系以满足临床应用需求,依然具有十分重要的研究价值。大量研究提示激活的血小板可释放细胞因子等生物活性成分,在血管内皮修复再生过程发挥重要作用^[23-24]。作为血小板的前体细胞, MKs 所释放出的微囊泡可能具有相似的效果。本研究利用 MKs 的制备体系,在前期分化阶段采用单层贴壁诱导体系,以实现细胞在诱导分化过程中最大限度的增殖;随后在 MKs 产生阶段,通过将细胞构筑成球进行悬浮诱导,为造血祖细胞向 MKs 分化提供内皮细胞、间质细胞等基质细胞微环境。获得 MKs 并收集上清后,通过差速离心法收集到的微囊泡和文献中所报道的 MKMPs 标志物具有相似的蛋白表达特征^[7, 25]。研究证据表明, MKs 分化的“废弃物”具有许多独特的生物学功能。例如, MKMPs 能够通过其表面蛋白被造血干细胞摄取,通过其内含的 microRNA 或蛋白质调控造血干细胞向 MKs 分化潜能^[7]。研究证实 MKMPs 中 microRNA-486-5p 和 microRNA-22-3p 甚至可以在 TPO 缺乏的情况下实

现造血干/祖细胞向 MKs 的分化^[8]。同时, MKMPs 中蕴含丰富的 VEGF^[26]。有研究表明, 激活的 PMPs 中存在大量促血管生成的细胞因子, 同样与 VEGF 及其下游信号传导相关^[27]。在本研究中, MKMPs 与 PMPs 具备相似的促进 HUVECs 成管和促迁移功能, 提示其可能具有促进体内受损血管新生的功能。此外, 与细胞因子或小分子化合物作用相比, 微囊泡通过配体受体的识别被特定靶细胞内吞, 可实现特定调控信号向目的细胞的定向传递^[7,13]。同时, MKs 中存在的 miR-486-5p 等活性物质, 同样也被证明与血管新生密切相关^[8,28-29]。此外, 研究结果显示, 微囊泡促进内皮细胞的功能仅在特定浓度范围内呈现剂量依赖效应, 过多摄入反而不利于管腔形成, 这可能与细胞对微囊泡吞噬时消耗能量以及细胞膜表面受体的承载能力有关^[30-31]。在后续研究中, 可以进一步尝试通过能量代谢、体内动物模型、并结合纳米药物搭载等复合治疗路径, 为 MKs 衍生物的应用方案以及血管新生的机制开拓新的思路。

综上所述, 本研究建立了 hESCs 向 MKs 的定向分化体系, 完成对 hESCs 来源 MKs 及其微囊泡生物学特征的分析, 证实 MKMPs 具有促进管腔形成、促进细胞迁移等生物学功能。本研究为拓展 hESCs 来源 MKs 及其衍生物的应用提供了新的思路和实验证据。

作者贡献: 唐轩负责实验操作、数据分析和论文撰写; 吴旭敏、陈可一、胡亮、李基晟和刘传丽负责实验操作、数据分析整理及统计学分析; 覃金华负责论文修改和经费支持; 张博文负责实验设计及论文撰写; 李艳华负责研究方案设计、论文修改和经费支持。

利益冲突: 所有作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] Li JJ, Liu JK, Li YE, *et al.* Differentiation route determines the functional outputs of adult megakaryopoiesis[J/OL]. *Immunity*, 2024, 57(3): 478-494. e6 (2024-03-05) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38447571/>. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.02.006.
- [2] Butov KR, Osipova EY, Mikhalkin NB, *et al.* *In vitro* megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool[J]. *Platelets*, 2021, 32(7): 928-935.
- [3] Wu XM, Zhang BW, Chen KY, *et al.* Baffled-flow culture system enables the mass production of megakaryocytes from human embryonic stem cells by enhancing mitochondrial function[J/OL]. *Cell Prolif*, 2023, 56(12): e13484 (2023-04-23) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37088551/>. DOI: 10.1111/cpr.13484.
- [4] Zhang B, Wu X, Zi G, *et al.* Large-scale generation of megakaryocytes from human embryonic stem cells using transgene-free and stepwise defined suspension culture conditions[J/OL]. *Cell Prolif*, 2021, 54(4): e13002 (2021-02-21) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33615584/>. DOI: 10.1111/cpr.13002.
- [5] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, *et al.* Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles[J]. *Blood*, 2009, 113(5): 1112-1121.
- [6] Wang TJ, Jacoby MA, Duncavage EJ, *et al.* Exome analysis of treatment-related AML after APL suggests secondary evolution[J]. *Br J Haematol*, 2019, 185(5): 984-987.
- [7] Jiang JL, Kao CY, Papoutsakis ET. How do megakaryocytic microparticles target and deliver cargo to alter the fate of hematopoietic stem cells?[J]. *J Control Release*, 2017, 247: 1-18.
- [8] Kao CY, Jiang J, Thompson W, *et al.* miR-486-5p and miR-22-3p enable megakaryocytic differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells without thrombopoietin[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5355 (2022-05-11) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35628168/>. DOI: 10.3390/ijms23105355.
- [9] Kim HK, Song KS, Chung JH, *et al.* Platelet microparticles induce angiogenesis *in vitro*[J]. *Br J Haematol*, 2004, 124(3): 376-384.
- [10] Qu MY, Zou XJ, Fang F, *et al.* Platelet-derived microparticles enhance megakaryocyte differentiation and platelet generation via miR-1915-3p[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4964 (2020-10-02) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33009394/>. DOI: 10.1038/s41467-020-18802-0.
- [11] Sun G, Gu Q, Zheng J, *et al.* Emerging roles of extracellular vesicles in normal and malignant hematopoiesis[J/OL]. *J Clin Invest*, 2022, 132(18): e160840 (2022-09-15) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36106632/>. DOI: 10.1172/JCI160840.
- [12] Barone M, Ricci F, Sollazzo D, *et al.* Circulating megakaryocyte and platelet microvesicles correlate with response to ruxolitinib and distinct disease severity in patients with myelofibrosis[J]. *Br J Haematol*, 2019, 185(5): 987-991.
- [13] Wang W, Zuo B, Wang Y, *et al.* Megakaryocyte-and

- platelet-derived microparticles as novel diagnostic and prognostic biomarkers for immune thrombocytopenia[J/OL]. *J Clin Med*, 2022, 11(22): 6776 (2022-11-16) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36431253/>. DOI: 10.3390/jcm11226776.
- [14] Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, *et al*. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression[J/OL]. *Blood*, 2013, 121(19): 3908-3917, S1-26 (2013-03-14) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23493781/>. DOI: 10.1182/blood-2012-10-461798.
- [15] Walsh TG, Metharom P, Berndt MC. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis[J]. *Platelets*, 2015, 26(3): 199-211.
- [16] Xiao H, Siddiqui RA, Al-Hassani MH, *et al*. Phospholipids released from activated platelets improve platelet aggregation and endothelial cell migration [J]. *Platelets*, 2001, 12(3): 163-170.
- [17] Ren L, Zhang XF, Tang SY. Effects of extracellular vesicles from various cell types on angiogenesis[J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2019, 44(12): 1423-1429.
- [18] Ng ES, Davis R, Stanley EG, *et al*. A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 768-776.
- [19] Qin JH, Zhang J, Jiang JA, *et al*. Direct chemical reprogramming of human cord blood erythroblasts to induced megakaryocytes that produce platelets[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1229-1245.e7 (2022-08-04) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35931032/>. DOI: 10.1016/j.stem.2022.07.004.
- [20] Baigger A, Blasczyk R, Figueiredo C. Towards the manufacture of megakaryocytes and platelets for clinical application[J]. *Transfus Med Hemother*, 2017, 44(3): 165-173.
- [21] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology[J]. *Cell*, 2008, 132(4): 631-644.
- [22] Zhu ZX, Li CL, Zeng YW, *et al*. PHB associates with the HIRA complex to control an epigenetic-metabolic circuit in human ESCs[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(2): 274-289.e7 (2020-02-06) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32032527/>. DOI: 10.1016/j.stem.2020.01.001.
- [23] Ofosu FA. The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2002, 67(1): 47-55.
- [24] Cecerska-Heryć E, Goszka M, Serwin N, *et al*. Applications of the regenerative capacity of platelets in modern medicine[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64: 84-94.
- [25] Rausch L, Flaskamp L, Ashokkumar A, *et al*. Phosphatidylserine-positive extracellular vesicles boost effector CD8⁺T cell responses during viral infection [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(16): e2210047120 (2023-04-18) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37040405/>. DOI: 10.1073/pnas.2210047120.
- [26] Mazure NM, Brahimi-Horn M C, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis[J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(7): 531-541.
- [27] Andersson Y, Fleten KG, Abrahamsen TW, *et al*. Anti-angiogenic treatment in pseudomyxoma peritonei-still a strong preclinical rationale[J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(11): 2819 (2021-06-05) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34198773/>. DOI: 10.3390/cancers13112819.
- [28] Fan MH, Zhang XZ, Jiang YL, *et al*. Exosomes from hypoxic urine-derived stem cells facilitate healing of diabetic wound by targeting SERPINE1 through miR-486-5p[J/OL]. *Biomaterials*, 2025, 314: 122893 (2024-10-15) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39418849/>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2024.122893.
- [29] Lu YJ, Wen HC, Huang JJ, *et al*. Extracellular vesicle-enclosed miR-486-5p mediates wound healing with adipose-derived stem cells by promoting angiogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(17): 9590-9604.
- [30] van Niel G, Carter DRF, Clayton A, *et al*. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(5): 369-382.
- [31] Wang YZ, Lou P, Xie YJ, *et al*. Nutrient availability regulates the secretion and function of immune cell-derived extracellular vesicles through metabolic rewiring[J/OL]. *Sci Adv*, 2024, 10(7): ead1290 (2024-02-14) [2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38354238/>. DOI: 10.1126/sciadv.adj1290.

Microparticles from human embryonic stem cell-derived megakaryocytes promote angiogenesis

TANG Xuan^{1,2}, WU Xuming², CHEN Keyi^{1,2}, HU Liang², LI Jisheng², LIU Chuanli², QIN Jinhua²,
ZHANG Bowen², LI Yanhua²

(1. College of Chemistry & Materials Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: OBJECTIVE To establish a preparation system for megakaryocytes (MKs) derived from human embryonic stem cells (hESCs) and MK microparticles (MKMPs), and to assess the pro-angiogenic efficiency of these microparticles. **METHODS** ① hESCs were induced to mesodermal progenitor cells via monolayer culture with the first-stage induction medium for 2 days before the cells were induced to hemogenic endothelial/hematopoietic progenitor cells by culturing with the second-stage induction medium for another 3 days. Then, the cells were dissociated into single cells, seeded into the third-stage induction medium, and cultured using the suspension method for 8 days to obtain MKs. The specific characters of differentiated cells were identified through morphological observation and flow cytometry before stage-specific marker proteins in different periods were analyzed [hESCs: TRA-1-60, sialyl glycolipid stage-specific embryonic antigen4 (SSEA4)]; mesodermal progenitor cells: brachyury; hemogenic endothelial/hematopoietic progenitor cells: CD34, CD43; MKs: CD41a, CD42b), and immunofluorescence staining [β 1-tubulin, von Willebrand factor (VWF)], [friend leukemia integration 1 (FLI1), CD42]. ② MKMP collection and verification: MKMPs were collected via differential centrifugation. The concentration and size of these MKMPs were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA), and both the morphology and ultrastructure were examined by transmission electron microscopy (TEM). Besides, the MKMPs-specific proteins [CD41, tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and CD9] were detected by Western blotting analysis. ③ Biological function of MKMPs: MKMPs were stained with CD41a-PE antibodies and co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) labeled by CD34-APC for 3 h. Live-cell immunofluorescence was employed to find out whether HUVECs could absorb MKMPs. To find out whether MKMPs could affect the role of HUVECs in angiogenesis and cell migration, platelet microvesicles (PMPs) were used as positive controls. The experimental groups were added with different concentrations of microparticles (1, 5, 10 and 20 mg·L⁻¹) while the control group was given no microparticles (0 mg·L⁻¹). The number of nodes that formed the lumen after 5 h of incubation in Matrigel was counted, and the size of healing of the scratch area was analyzed after 6 h. To elucidate the mechanism through which MKMPs impacted angiogenesis, ELISA was used out to quantitatively detect the concentration of proteins in microparticles. **RESULTS** ① A three-stage differentiation cultural system was established to develop hESCs into MKs. Flow cytometry revealed progressive loss of pluripotency markers SSEA4 and TRA-1-60, while the mesodermal progenitor marker brachyury peaked at d 2. Subsequently, hemogenic endothelial/hematopoietic progenitor markers CD34 and CD43 emerged at d 5, followed by megakaryocytic markers CD41a and CD42b at d 13. Immunofluorescent images further demonstrated that MKs expressed specific proteins CD42, β 1-tubulin, von VWF and FLI1 at d 13. ② Microparticles were collected via differential centrifugation. Transmission electron microscopy revealed that their substructure exhibited a typical double-layered membrane. Nanoparticle tracking analysis indicated that the size was (164.3±14.0) nm. The result of WB demonstrated that the microparticles expressed specific markers, including TSG101, CD9 and CD41. ③ MKMPs were absorbed after being co-cultured with HUVECs for 3 h and enhanced the ability of

HUVECs to form tubes and migrate. Notably, the treatment of $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MKMPs was more effective than $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PMPs treatment. The results of ELISA showed that the content of VEGF from MKMPs was higher than from PMPs, which may be the key factor in regulating endothelial biological function.

CONCLUSION MKs derived from hESCs can generate functional microparticles which can promote angiogenesis.

Key words: human embryonic stem cells; megakaryocytes; megakaryocyte microparticles; human umbilical veinvascular endothelial cells; angiogenesis

Foundation item: Nature Science Foundation of China (82270132); and Nature Science Foundation of China (32470788)

Corresponding author: LI Yanhua, E-mail: shirlylyh@126.com; ZHANG Bowen, E-mail: bowen_0901@126.com

(收稿日期: 2024-10-22 接受日期: 2025-01-13)

欢迎投稿 欢迎订阅

《中国药理学与毒理学杂志》是由军事科学院主管,军事科学院军事医学研究院主办的学术性刊物,国内外公开发行。1986年创刊,现为月刊。本刊主要刊登药理学和毒理学研究成果,同时特别欢迎生物药、小分子药物和化学成分明确的新药研究论文,设有前沿论坛、论著、实验方法和综述等栏目。

本刊荣获首届优秀学术期刊二等奖、优秀国防科技期刊二等奖、中国学术核心期刊(A)、全军优秀医学期刊、全军医学学术质量优秀期刊等。近年来,连续被评为中国科技精品期刊(第5~8届)。2020-2024年间,本刊刊出的20余篇论文被科技部领跑者5000(F5000)项目评选为中国精品科技期刊顶尖学术论文。

本刊已被国内外多个重要索引数据库收录,北大中文核心期刊《中文核心期刊要目总览》、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心库(2017)、RCCSE中国核心学术期刊、世界期刊影响力指数(WJCI)报告;荷兰Scopus、荷兰EMBASE、美国Ulrich、美国CA、波兰IC、日本JST和菲律宾WPRIM等。

遵照上级部门有关规定,本刊目前暂停收稿件处理费和版面费。

本刊主要通过邮局订阅,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。

网址: <https://cjpt.magtechjournal.com>

电话: (010)66931617, (010)66930636

E-mail: cjpt518@163.com