

高效诱导人胚胎干细胞成为内皮祖细胞*

房芳 张博文 何丽娟 周军年 王静雪 岳文 谢小燕** 裴雪涛**

(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, 北京 100850)

摘要 血管的发生和发育不仅对胚胎形成中各器官的发育分化十分重要, 并且对成体的创伤修复和生殖功能也具有重要意义。血管内皮细胞是形成心血管封闭管道系统的形态基础, 体外多种细胞可经诱导分化产生出内皮祖/内皮细胞(endothelial progenitor/endothelial cells, EPCs/ECs), 但是存在一些不足。鉴于人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)诱导分化的全能性和长期增殖能力, 为 EPCs/ECs 提供了新的来源。现有文献报道, hESCs 诱导分化为 EPCs/ECs 的比例较低, 为了提高该诱导分化效率, 我们使用分阶段的二维诱导方法, 首先将细胞接种在超纯层粘连蛋白(Matrigel)上, 之后通过在不同阶段添加不同的因子, 最终获得 CD31⁺KDR⁺ 细胞的比例可以达到 16%。进一步内皮诱导分化的结果显示, 获得的 EPCs/ECs 的比例可以达到约 32%, 这些细胞具有在 Matrigel 上形成血管样结构的能力, 可结合植物凝集素。实时定量 PCR 的结果显示, 诱导分化所得的细胞表达众多内皮相关基因, 并且免疫荧光的结果也表明部分细胞表达内皮细胞特异性表面标志 CD31。

关键词 人胚胎干细胞, 内皮祖/内皮细胞, 诱导分化

学科分类号 R322.1, R654.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00032

外周动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD)不仅存在致残的风险, 而且该类患者将来发生心肌梗死、脑梗死或者血管性死亡的危险性明显增加。心肌梗死等疾病则是心血管疾病致残致死的主要原因。目前对该血管类疾病的治疗策略包括使用内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)进行的细胞治疗。近年来, 一些相关报道表明, 由骨髓来源的单个核细胞^[1]、血液来源的祖细胞^[2]、间充质干细胞定向诱导分化而成的内皮祖细胞^[3]等用于细胞移植都已显示出广泛的治疗前景和意义。但是这些细胞用于替代治疗依然存在缺陷。举例来说, 单个核细胞和间充质干细胞存在分化效率低、移植的长期效果不显著等问题^[4], 血液来源的 EPCs 分化能力有限, 且起始细胞的数量受限, 难以满足治疗的需要量。因此, 如何寻找到一种高效、快速的内皮细胞(endothelial cells, ECs)分化方案是科学家们致力解决的难题, 而干细胞的发现为组织器官再生治疗提供了新的希望, 借助干细胞的多向分化潜能, 将干细胞分化成所需的特定细胞, 不仅可能为临床移植提供种子细胞, 而且深入研究其发育分化的调控机理对治疗也有很高的指导价值。

人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)作为一种具备自我更新和长期增殖潜能的多能性细胞, 其向 ECs 分化的可能性为心血管疾病和四肢缺血的治疗提供了令人兴奋的前景。近年来, 不断有研究证实, hESCs 具有分化成不同发育阶段内皮祖/内皮细胞(endothelial progenitor/endothelial cells, EPCs/ECs)的能力。通过与小鼠的基质细胞共培养^[5-6]、诱导形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)并添加促血管发育因子^[7-8]或与特殊的二维介质共培养^[9]等策略营造内皮发育微环境, 目前, 已有多个研究小组从 hESCs 中分化、分离到了 EPCs/ECs。近期的研究结果显示, hESCs 来源的 ECs 能形成新的血管, 提高梗死心脏的功能, 是细胞替代治疗中新的细胞来源^[10]。虽然取得了这

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)领域主题项目(2011AA020109, 2012AA020503)和国家自然科学基金(31071303)资助项目。

** 通讯联系人。

谢小燕. Tel: 010-66931974, E-mail: alpha131313@gmail.com

裴雪涛. Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2013-01-16, 接受日期: 2013-04-24

些成果, 但是由于以 hESCs 为起始进行诱导分化的策略不同, 导致诱导分化的比例存在较大差异。例如, 使用 EBs 并添加内皮相关诱导因子进行诱导分化, 不同批次实验操作所培养的 EBs 大小不同, 其大小对于最终诱导分化效率会产生明显影响。而与基质细胞共培养又会造成不同种属之间的交叉污染, 使用基质胶添加因子来诱导分化产生 EPCs 的操作过程复杂, 并且诱导分化比例相对较低。可见, 如何高效快速地诱导 hESCs 向 EPCs/ECs 进行诱导分化, 依然是难以解决的问题。

为进一步提高 hESCs 为起始细胞向 EPCs 的分化效率, 同时消除基质细胞的污染, 我们使用了分阶段与超纯层纤连蛋白(Matrigel)共培养的二维诱导分化模型诱导 hESCs 分化。对于所获得的细胞则通过流式细胞术和实时定量 PCR 进行了内皮相关基因的检测, 通过血管样结构形成实验、植物凝集素实验和免疫荧光的方法验证所获得的细胞中含有相对高比例的 EPCs。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚胎干细胞 H1 及 H9 购自 ATCC; 小鼠成纤维细胞(mouse fibroblasts cells, MEF)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由军事医学科学院全军干细胞与再生医学重点实验室保存; D-MEM/F-12 基本培养基、Knockout 血清替代物(Knockout Serum substitute, KSR)、L-谷氨酰胺、胰岛素铁硒传递蛋白购自 GIBCO 公司; β -巯基乙醇、非必需氨基酸(nonessential amino acids, NEAA)、TRIzol 购自 Invitrogen 公司; mTESR 购自 STEM CELL 公司, 超纯层纤连蛋白(Matrigel)购自 BD 公司; EGM2 培养基购自 Lonza 公司; CD31 抗体和 KDR 抗体购自 BD 公司; 重组人碱性成纤维生长因子(recombinant human basic fibroblast growth factor, rhbFGF)购自 Millipore 公司; 重组人内皮生长因子(recombinant human vascular endothelial growth factor, rhVEGF)购自 Perprotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. H1 及 H9 细胞置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中, 使用 ES 培养基进行培养。ES 培养基的组成为: 78% DMEM-F-12 添加 20% KSR, 1% NEAA, 1 mmol/L L-谷氨酰胺, 0.1 mmol/L β -巯基乙醇和 5 μ g/L rhbFGF。MEF 置于 37℃、5% CO₂

孵箱中使用高糖 DMEM 添加 15% FBS 培养基进行培养。HUVECs 置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中使用 EGM2 培养基进行培养。诱导分化的基础培养基为 75% IMDM 添加 25% F12 培养基、1% 胰岛素铁硒传递蛋白、0.05% BSA 和 1% NEAA。

1.2.2 免疫荧光实验. 培养的单层细胞弃旧培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 使用 2 周内新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 洗涤 3 次, 使用 0.1% Triton-X-100 破膜 10 min, PBS 洗 2 次后, 用二抗来源的血清室温封闭 30 min。根据抗体说明书加入适当比例稀释的抗体, 于湿盒中 4℃ 过夜处理。12 h 后弃一抗, 使用 PBS 洗 3 次, 加入适当比例稀释的荧光二抗, 室温避光处理 30 min, PBS 洗 3 次。最后加入适当比例的 DAPI 染核 2 min, PBS 洗 3 次, 便可于荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 实时定量 PCR(quantitative PCR, Q-PCR). 用 TRIzol 提取 hESCs、诱导分化不同阶段细胞及 HUVECs 总 RNA, 各取 0.8 μ g 总 RNA 进行反转录得到相应的 cDNA。采用 SYBR Green 法实时定量 PCR 检测内皮相关基因的表达。所用引物序列为: CD31 上游引物, 5' ATCATTTCTAGCGCA-TGGCCTGGT 3', CD31 下游引物, 5' ATTTGT-GGAGGGCGAGGTCATAGA 3'; CD34 上游引物, 5' AAATCCTCTTCCTCTGAGGCTGGA 3', CD34 下游引物, 5' AAGAGGCAGCTGGTGATAAGGG-TT 3'; KDR 上游引物, 5' CCTCTACTCCAGT-AAACCTGATTGGG 3', KDR 下游引物, 5' TGT-TCCCAGCATTTTCACTATGG 3'; eNOS 上游引物, 5' AAGATCTCCGCCTCGCTCA 3', eNOS 下游引物, 5' GCTGTTGAAGCGGATCTTA 3'; VE-cadherin 上游引物, 5' TGGAGAAGTGGCATC-AGTCAACAG 3', VE-cadherin 下游引物, 5' TC-TACAATCCCTTGCAAGTGTGAG 3'; GAPDH 上游引物, 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3', GAPDH 下游引物, 5' TTGATTTTGGAGGGATC-TCG 3'。各组 PCR 均重复 3 次。数据用 BIO-Rad 软件进行处理, 显示结果为与 GAPDH 计算之后的结果。

1.2.4 血管样结构形成实验. 于 48 孔板中铺 15~20 μ L/孔 Matrigel, 将孔板于 37℃ 静置 30 min, 使其凝固为薄薄的一层, 之后将第二阶段诱导分化结束的细胞接种至孔板中, 使用 EGM2 培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置过夜培养, 48 h 后观察血管样结构形成情况。

1.2.5 植物凝集素实验. 待诱导分化的细胞形成血管样结构之后, 将细胞固定, 加入 $2.4 \mu\text{g}$ 植物凝集素于 $100 \mu\text{l}$ PBS 中, 孵育 0.5 h 后弃 PBS 并洗涤 3 次, DAPI 染核后, 于荧光显微镜下观察植物凝集素的结合情况.

1.2.6 流式细胞术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS). 将诱导分化结束的细胞进行消化, 之后用 PBS 重悬细胞. 根据抗体说明书, 将 $4 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$ 细胞重悬于 $100 \mu\text{l}$ PBS 中, 添加相应的抗体, 抗人 CD31-APC 和抗人 CD309-PE (又称为血管生长因子受体 2, KDR). 充分混匀细胞与抗体, 并将离心管置于旋转混合仪上进行流式抗体的孵育, 时间为 40 min. 之后重复洗涤细胞 3 次, 用 $300 \sim 500 \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞, 直接上机检测或者

是 2% 多聚甲醛固定后 4°C 避光保存.

1.2.7 统计学处理. 定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 9.1.3 统计软件进行统计分析. 用 t 检验对平均值进行两两 (hESCs 与第二阶段诱导结束所得细胞、进一步诱导分化后所得细胞与 HUVECs) 比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 以 hESCs 为起始分阶段诱导 EPCs 分化方案的确定

根据前期的摸索, 我们将诱导分化方案定为二维两阶段的诱导分化模型, 诱导分化方案显示如图 1.

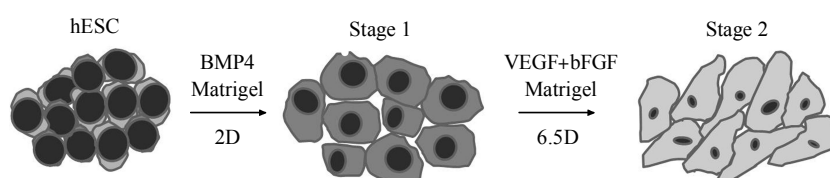


Fig. 1 The flowchart of hESC endothelial induction procedure

Human ES cells were cultured on Matrigel and induced by basic medium supplemented with BMP4 in order to get stage 1 cells. Subsequently, these cells were treated with VEGF and bFGF for 6.5 days to derive endothelial progenitor cells.

在进行内皮诱导分化前, 将生长状态及干性维持良好的 hESCs (Oct4、Sox2、SSEA3 及 Nanog 表达阳性, 图 2) 传代至无饲养层的 Matrigel 上, 用 mTeSR 培养基进行培养. 细胞在无饲养层上传代 2~3 代完全去除饲养层细胞后, 可以进行 EPCs 的诱导分化.

体外诱导分化 hESCs 成为内皮细胞分 2 个步骤. 首先 hESCs 在无饲养层上进行传代处理, 将克隆消化成大小合适的团块 (每个克隆含十几~几十个细胞), 贴附到 Matrigel 包被的平板上, 之后在诱导分化基础培养基中添加 $25 \mu\text{g/L}$ 重组人骨形态发生蛋白 4 (recombinant human bone morphogenetic protein, rhBMP-4) 进行第一阶段 48 小时的诱导分化.

48 h 后, PBS 洗细胞 3 次, 然后更换为第二阶段的诱导分化培养基. 培养基的组成为基础培养基中添加 $50 \mu\text{g/L}$ rhVEGF 及 $50 \mu\text{g/L}$ rhbFGF. 用第二阶段的培养基培养细胞 6.5 天后, 细胞生长至接近孔板密度的 90% 以上.

在开始进一步诱导分化之前, 第二阶段诱导分

化结束的细胞用 0.25% 胰酶, 按照 1:2 或 1:3 的比例进行传代处理. 传代后的培养基为 EGM2 培养基, 在第 6 天时进行流式细胞术及 Q-PCR 的相关检测.

2.2 诱导分化第二阶段 EPCs 诱导分化效率检测

在诱导分化到第二阶段结束后, 收集未分化的 hESCs 及分化完成的细胞, 进行流式细胞水平检测、Q-PCR 及免疫荧光检测. 从 FACS 结果中可以看出, 同未分化的 hESCs (CD31 和 KDR 的表达极低) 相比, 诱导分化至第二阶段的细胞, 其内皮细胞相关表面标志 CD31 和 KDR 的表达明显上调 (图 3a), $\text{CD31}^+\text{KDR}^+$ 及 CD31 单阳性细胞亚群的出现说明细胞已经向 EPCs 进行分化. 平均多次重复实验, EPCs 诱导分化效率表现为 KDR^+ 亚群的比例约为 45%, CD31^+ 亚群的比例约为 15%. 进一步 Q-PCR 的检测结果表明, 内皮相关基因, 包括 CD31、KDR、CD34 及 VE-cadherin 的表达都明显上调 (图 3b), 免疫荧光的结果也显示部分细胞于膜上表达内皮特异性表面标志 CD31 (图 3c).

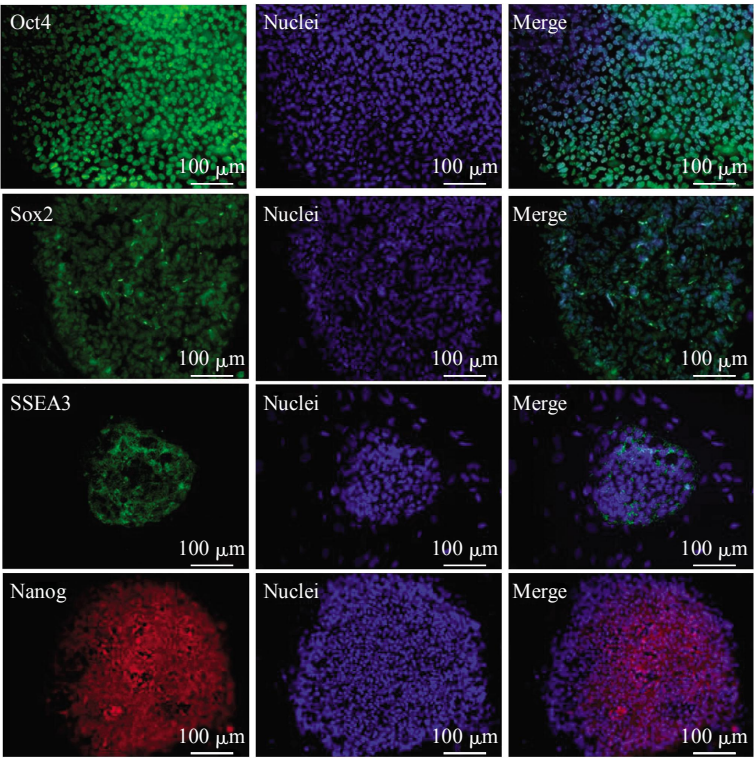


Fig. 2 Immunofluorescence staining of undifferentiated hESCs

Human ES cells were cultured on Matrigel to get rid of feeder layer. The expression of stemness markers, including Oct4 (green), Sox2 (green), SSEA3 (green) and Nanog (red) were detected by immunofluorescent staining. Nuclei were co-stained with DAPI (blue).

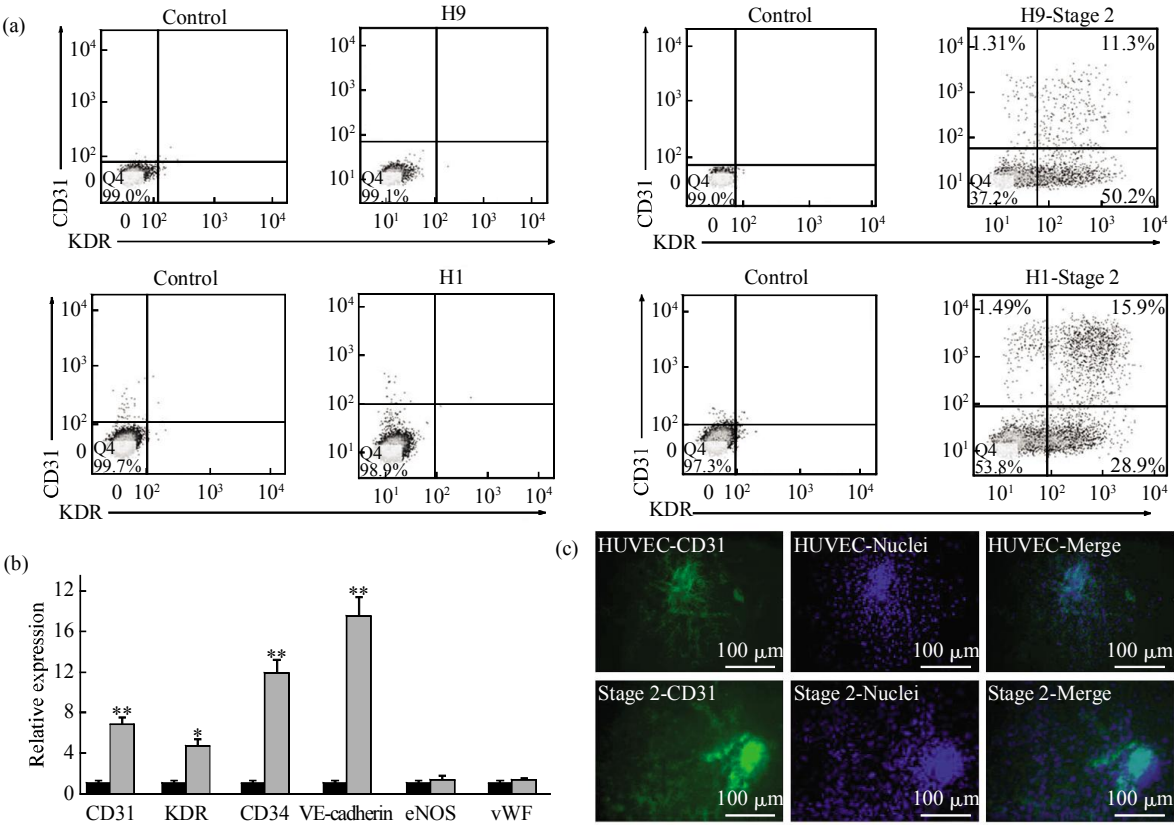


Fig. 3 The endothelial property detection of hESC-derived cells at induction stage 2

(a) FACS shows the percentage of CD31⁺ and KDR⁺ populations of H1 and H9 derived cells at the stage 2 differentiation. (b) Q-PCR indicates the expression of endothelial related genes. ■: hESC; □: Derived cells at stage 2. *P < 0.05, **P < 0.01 compared to undifferentiated hESCs. (c) Immunofluorescence demonstrates the expression of CD31 on HUVECs and hESC-derived EPCs.

2.3 hESCs 来源的 EPCs 体外功能检测

内皮细胞的一个重要功能是参与血管的形成, 在体外培养的 EPCs 可以形成血管样结构. 我们将第二阶段诱导分化结束的细胞进行消化后, 将其接种至 Matrigel 上, 添加 EGM2 培养基, 48 h 后观察血管样结构的形成.

由于植物凝集素可以作为内皮细胞特殊类型的

标记, 所以我们在细胞形成血管样结构之后添加植物凝集素, 观察诱导分化所得的细胞对于植物凝集素的结合情况(图 4). 结果显示, 诱导分化的细胞可以形成明显的血管样结构, 并且可以结合植物凝集素. 这些结果进一步表明诱导分化所得的细胞具有 EPCs 的特性.

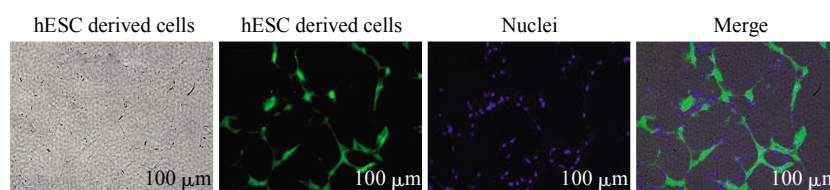


Fig. 4 Tube formation and fluorescein griffonia (*bandeiraea*) simplicifolia lecti II (fluorescein GSL II) binding capability of stage 2 derived cells

Human ES cell derived cells at stage 2 were seeded on Matrigel for tube formation, followed by the treatment of fluorescein GSL II.

2.4 进一步诱导 hESC 来源的 EPCs 分化成熟

我们将第二阶段诱导分化的细胞进行消化, 并用 EGM2 培养基培养 6 天, 之后进一步检测诱导分化所得的细胞同 HUVECs 的区别. 从 FACS 的检测结果可以看出, 随着在 EGM2 中的进一步培养, 不论是 H1 还是 H9 细胞诱导分化所得的细胞进一步分化成熟后, CD31 单阳性细胞亚群的比例明显增加. 由于经过 EGM2 培养基进一步诱导分

化获得的细胞相对成熟, 所以较早期的内皮细胞亚群, 如 CD31⁺KDR⁺ 和 KDR 单阳性细胞的比例会有所降低, 并且鉴于 H1 和 H9 细胞诱导分化效率的不同, 诱导所得细胞的比例还是存在一定差异(图 5a). 通过 Q-PCR 检测可以看出, 较为早期的内皮相关基因 KDR 和偏成熟的内皮特异性基因 eNOS 的表达与 HUVECs 的差异并不明显(图 5b).

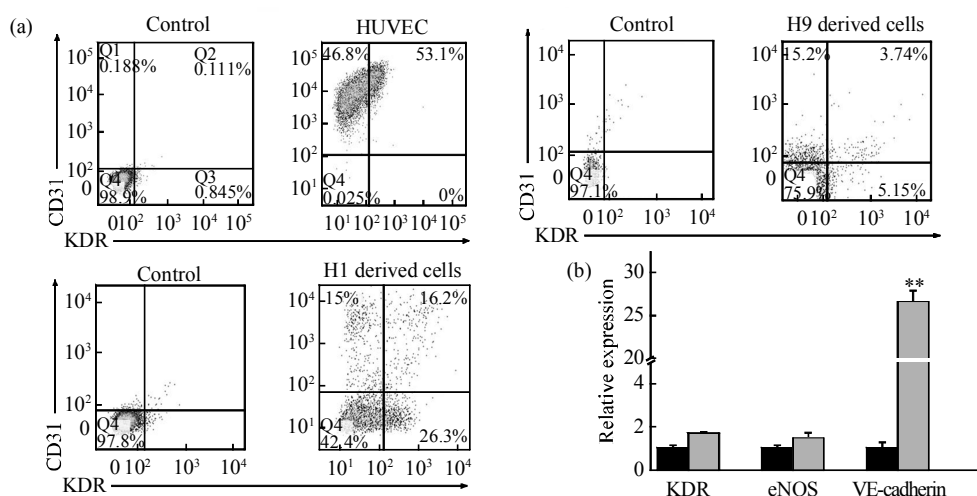


Fig. 5 The endothelial property detection of hESCs derived EPCs/ECs after extended induction

(a) FACS shows the percentage of CD31⁺ and KDR⁺ populations of HUVECs and H1/H9 derived cells. (b) Q-PCR indicates the expression of endothelial related genes by induced cells and HUVECs. ■: Induced cells; □: HUVECs. ***P* < 0.01 compared to control.

3 讨 论

血管内皮细胞袂衬在整个心血管系统的内表面, 为单层扁平上皮, 是血管壁与血液之间的分界细胞, 是形成心血管封闭管道系统的形态基础. 其在组织的动态平衡、纤维蛋白溶解和凝集、血液-组织分子交换、血管收缩调控、正常和肿瘤组织的血管化以及生理和病理条件下血细胞的活化和迁移中都发挥了重要作用. 同时, 研究决定内皮细胞分化和表型的分子机制对于阐明血管发生发育的原理、对梗死或损伤组织的血管新生治疗、抗肿瘤治疗及 EPCs/ECs 应用于其他相关疾病的治疗都有重要的理论指导意义.

文献报道, 以 hESCs 为起始向 EPCs/ECs 进行诱导分化的常用方法有三维培养法和二位培养法. 三维培养法将 hESCs 进行 EBs 培养, 模拟分化的立体空间及细胞间的相互作用进行 EPCs/ECs 诱导分化^[11-12]. 二维培养法则一般使用 hESCs 与基质细胞, 包括小鼠骨髓细胞 S17^[13]、OP9 及 MS-5 细胞^[14] 共培养, 或者是与基质胶共培养进行 EPCs/ECs 诱导分化^[15]. 也有文献使用三维和二维培养相结合的方法, 先使用 EBs 方法进行初步的诱导分化, 再使用 1.5 g/L 胶原作为基底层, 进行进一步的 EPCs/ECs 诱导分化^[16]. 但是, 目前这些方法均存在不足: 使用 EBs 进行三维诱导分化对于 EBs 的大小要求较高, 否则诱导分化的效率会有较大差异; 由于进行二维培养时使用的基质细胞都是小鼠来源的, 所以容易造成不同物种间的污染; 使用基质胶共培养进行诱导分化的过程较为繁琐, 有的诱导分化过程还会添加血清, 并且诱导分化的效率也相对较低. Wang 等^[17]的诱导分化策略是先将 hESCs 向内皮进行二维诱导分化, 获得约 10% 的 CD34⁺ 细胞, 再将细胞分选后进行内皮的相关分析. 相比而言, 我们的实验采用与基质胶共培养的二维诱导分化模式, 整个诱导分化的过程未添加血清. 这种诱导分化的策略不仅避免了对于操作的较高要求(EBs 大小的控制), 也避免了种属间的交叉污染, 从结果中可以看出 EPCs 的分化效率也很高.

在诱导分化的过程中, 我们使用的是与基质胶共培养的分阶段诱导分化模式. Matrigel 是一种可溶性的基底膜基质, 主要成分包括: 层黏连蛋白、胶原 IV 等, 同时含 TGF- β 成纤维细胞生长因子及组织纤维酶原活化因子等. Matrigel 可以有效地帮助包括血管内皮细胞多种类型细胞的附着和分化,

所以我们采用 Matrigel 作为基底层辅助诱导分化的进行. 从发育的角度讲, 以 hESCs 为起始向 EPCs/ECs 进行诱导分化要经过中内胚层、中胚层、内皮/造血共祖细胞和 EPCs/ECs 等阶段. 所以采用分阶段的方式进行诱导分化, 可以避免因子的错误使用, 并且提高了诱导分化的效率. 有文献报道, BMP4 处理 1.5 天可以诱导 hESCs 向中内胚层进行分化^[18], 而生长因子 VEGF 及其细胞表面受体 KDR 对于胚胎发生过程中血管的形成有重要作用, VEGF 基因的缺失可以造成小鼠胚胎血管发育异常^[19], 并且 VEGF 过表达还可以促进 hESCs 向内皮祖细胞的诱导分化^[20]. bFGF 则可以作为血管生长因子, 通过调控内皮细胞内游离 Mg^{2+} 的浓度, 实现对血管发生的重要调控作用^[21], 同时 bFGF 还可以刺激血管内膜各类细胞的增殖及迁移, 进而促进血管的新生. 在我们的实验诱导分化体系中, 参考了前期的诱导分化策略, 结合预实验结果发现, 添加 25 μ g/L BMP4 处理 2 天, 再使用 50 μ g/L VEGF 和 bFGF 作用 6.5 天时, 可以获得较高比例的 EPCs 表面标志 CD31⁺KDR⁺ 双阳性细胞, 并且所获得的细胞具有形成血管样结构的能力, 可以结合植物凝集素并表达内皮相关基因.

在以 hESCs 为起始细胞向 EPCs/ECs 诱导分化的过程中, 会经历内皮/造血共祖细胞阶段. Yu 等^[22]的研究表明, 以 EBs 为起始进行诱导分化, 之后添加 100 μ g/L 的 VEGF 和 bFGF 处理 4 天, 可以获得早期内皮/造血共祖细胞, 并且获得的 KDR⁺PDGFR^{- α} 细胞的比例可达 85% 以上, 该细胞既可以向内皮细胞进行分化也可以向造血细胞进行分化. 在我们的诱导分化中, 存在有利于内皮分化的 Matrigel 和对于内皮生长分化有重要作用的 VEGF 和 bFGF 这些因子. 我们发现, 使用这种二维的诱导体系, 并且将第二阶段的诱导分化时间适当延长为 6.5 天, 则更有利于进一步培养获得高效率的 CD31⁺KDR⁺ 细胞的比例, 并且诱导分化 6.5 天的细胞已经可以在体外条件下形成血管样结构, 可以结合植物凝集素, Q-PCR 水平也检测到了内皮相关基因的表达, 这些都是内皮细胞所具有的特点.

在实验的最后阶段, 我们使用 HUVECs 与进一步诱导分化所得的细胞进行对比, 发现诱导分化所得的细胞, 其 CD31⁺KDR⁺ 细胞的比例及 CD31⁺ 细胞比例相对于第二阶段的诱导分化有明显提高. 但是从 Q-PCR 的检测中可以看出, VE-cadherin 基

因的表达同 HUVECs 还是有所区别, 可能是由于诱导分化所得的细胞仍处于分化的偏早期阶段, EPCs 的比例相对较高, 所以较为成熟的内皮相关基因的表达仍偏低。同时, 由于诱导分化所得的细胞并未进行流式分选, 所以还混杂有非内皮细胞, 故 CD31 和 KDR 的比例和 HUVECs 相比仍有差异。这些结果提示, 所获得的混杂诱导分化的细胞已经明显有大量的 EPCs/ECs, 特别是 EPCs 存在, 但是纯度并不是 100%。如果按照文献报道^[10]将细胞进行分选后再进行相关检测, 结果会更明显。

综上所述, 我们建立了一种新的、在二维体系下高效诱导 hESCs 向 EPCs/ECs 进行诱导分化的体系, 并且诱导所得的细胞具有形成血管样结构的能力, 可结合植物凝集素及表达内皮相关基因。这一工作有利于进一步对参与内皮分化的相关信号通路及分子进行研究, 也为 hESCs 来源的 EPCs/ECs 应用于临床治疗提供了新的前景。

参 考 文 献

- [1] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**(9331): 427-435
- [2] Lenk K, Adams V, Lurz P, *et al.* Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusiv disease and critical limb ischaemia. *Eur Heart J*, 2005, **26**(18): 1903-1909
- [3] Silva G V, Litovsky S, Assad J A R, *et al.* Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 2005, **111**(2): 150-156
- [4] Young P P, Vaughan D E, Hatzopoulos A K. Biological properties of endothelial progenitor cells (EPCs) and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, **49**(6): 421-429
- [5] Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L, *et al.* Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(19): 10716-10721
- [6] Vodyanik M A, Bork J A, Thomson J A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 2005, **105**(2): 617-626
- [7] Wang L, Li L, Shojaei F, *et al.* Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 2004, **21**(1): 31-41
- [8] Zambidis E T, Peault B, Park T S, *et al.* Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood*, 2005, **106** (3): 860-870
- [9] Gerecht-Nir S, Ziskind A, Cohen S, *et al.* Human embryonic stem cells as an *in vitro* model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest*, 2003, **83** (12): 1811-1820
- [10] Li Z, Wu J C, Sheikh A Y, *et al.* Differentiation, survival, and function of embryonic stem cell derived endothelial cells for ischemic heart disease. *Circulation*, 2007, **116**(11_suppl): I-46-54
- [11] Schukur L, Zorlutuna P, Cha J M, *et al.* Directed differentiation of size-controlled embryoid bodies towards endothelial and cardiac lineages in RGD-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Adv Healthc Mater*, 2013, **2**(1): 195-205
- [12] Zambidis E T, Peault B, Park T S, *et al.* Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood*, 2005, **106** (3): 860-870
- [13] Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L, *et al.* Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(19): 10716-10721
- [14] Vodyanik M A, Bork J A, Thomson J A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived CD34 cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 2005, **105**(2): 617-626
- [15] Gerecht-Nir S, Ziskind A, Cohen S, *et al.* Human embryonic stem cells as an *in vitro* model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest*, 2003, **83** (12): 1811-1820
- [16] Li Z J, Hu S J, Ghosh Z, *et al.* Functional characterization and expression profiling of human induced pluripotent stem cell- and embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells Dev*, 2011, **20**(10): 1701-1710
- [17] Wang Z Z, Au P, Chen T, *et al.* Endothelial cells derived from human embryonic stem cells form durable blood vessels *in vivo*. *Nature Biotech*, 2007, **25**(3): 317-318
- [18] Zhang P, Li J, Tan Z, *et al.* Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood*, 2008, **111**(4): 1933-1941
- [19] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, **380**(6573): 435-439
- [20] Rufaihah A J, Haider H K, Heng B C, *et al.* Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived CD133⁺ endothelial progenitor cells for cardiac repair. *Regen Med*, 2010, **5**(2): 231-244
- [21] 洪炳哲, 李胜范, 王江宁, 等. bFGF 诱导血管形成中 Mg²⁺ 重要作用的研究. *中国药理学通报*, 2007, **5**(6): 629-634
- [22] Hong B Z, Li S F, Wang J N, *et al.* Chin Pharmacol Bull, 2007, **5**(6): 629-634
- [22] Yu C, Liu Y X, Miao Z C, *et al.* Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood*, 2010, **116**(23): 4786-4794

Efficiently Induce Endothelial Progenitor Cells From Human Embryonic Stem Cells*

FANG Fang, ZHANG Bo-Wen, HE Li-Juan, ZHOU Jun-Nian,
WANG Jing-Xue, YUE Wen, XIE Xiao-Yan**, PEI Xue-Tao**

(Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Vasculogenesis and angiogenesis are fundamental processes for the formation and restoration of circulatory system, which plays important role in embryonic organ development, adult wound healing and reproduction. Vascular endothelial cells are the foundation of cardiovascular systems. Although it has been proved that several kinds of stem cells could be induced to generate endothelial cells *ex vivo*, there are still some shortages in these cell sources. Depending on the multipotency and infinitive reproductive capability, human embryonic stem cells (hESCs) become the new sources. However, the efficiency for deriving endothelial progenitor/endothelial cells (EPCs/ECs) from hESCs is low. To increase endothelial induction efficiency, we used a two-stage induction protocol. By the treatment of different cytokine cocktails at different stages and the using of Matrigel matrix, we obtained about 16% CD31⁺KDR⁺ cells from hESCs. The following endothelial induction stage with EGM2 medium showed approximate 32% subgroup of EPCs/ECs. The derived cells had the capability for tube-like structure formation on Matrigel and the ability to cohere with fluorescein griffonia (bandeiraea) simplicifolia lectin II. Q-PCR indicated that the induced cells express endothelial specific genes. Immunofluorescence detection indicated the expression of endothelial specific marker-CD31. Taken together, we have successfully derived EPCs/ECs from human embryonic stem cells with a modified method.

Key words hESCs, EPCs/ECs, differentiation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00032

*This work was supported by grants from The National High Technology Research and Development Program of China (2011AA020109, 2012AA020503) and The National Nature Science Foundation of China (31071303).

**Corresponding author.

XIE Xiao-Yan. Tel: 86-10-66931974, E-mail: alpha131313@gmail.com

PEI Xue-Tao. Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: January 16, 2013 Accepted: April 24, 2013