

一种人诱导多能干细胞向内皮细胞定向分化方案的建立及鉴定

黄文俊^{1, 2, 3, 4, 5}, 王洁^{1, 2, 3, 4, 5}, 周亚飞^{1, 2, 3, 4, 5}, 李环^{1, 2, 3, 4, 5}, 蒋丛珊^{1, 2, 3, 4, 5}, 张艳敏^{1, 2, 3, 4, 5}, 周锐^{1, 2, 3, 4, 5}<https://doi.org/10.12307/2023.340>

投稿日期: 2022-03-24

采用日期: 2022-06-13

修回日期: 2022-07-20

在线日期: 2022-08-08

中图分类号:

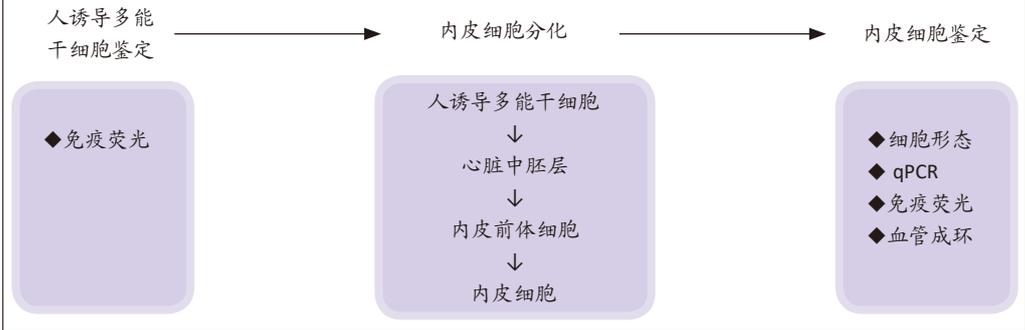
R459.9; R318; R-331

文章编号:

2095-4344(2023)10-01553-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 时序性调控信号通路将人诱导多能干细胞分化成有功能的内皮细胞



文题释义:

人诱导多能干细胞: 是一种与胚胎干细胞性状高度类似的多能干细胞, 具备三胚层分化潜能和自我更新能力。人诱导多能干细胞制备是通过将多能干细胞转录因子导入终末分化体细胞重编程获得, 从而绕开胚胎干细胞制备需使用人类胚胎引发的伦理问题, 因此具备更大的临床应用前景。

摘要

背景: 人诱导多能干细胞是一种与胚胎干细胞性状高度类似的多能干细胞, 其具备三胚层分化潜能和持续自我更新能力, 因此能够为临床细胞替代治疗提供足量目的细胞。

目的: 构建并鉴定一种高效的基于人诱导多能干细胞的内皮细胞定向分化实验方案。

方法: 采用免疫荧光技术对人诱导多能干细胞干性和增殖活性进行鉴定。采用转录因子重组蛋白和小分子化合物时序性调控系列信号通路, 即在第0, 1, 2, 5天顺序加入激活素A、GSK通路抑制剂CHIR99021/骨形态发生蛋白4、碱性成纤维细胞生长因子/血管内皮生长因子/骨形态发生蛋白4、碱性成纤维细胞生长因子/血管内皮生长因子/CHIR99021, 人诱导多能干细胞经历心脏中胚层、内皮前体细胞命运转变并最终分化成为有功能的内皮细胞。采用明场显微镜、实时定量PCR、免疫荧光动态观察不同阶段细胞形态特征和分子标记物, 采用血管成环实验验证内皮细胞的体外血管形成功能。

结果与结论: ①人诱导多能干细胞内源性高表达诱导多能干细胞干性特异标记物(OCT4、NANOG、SSEA4)和增殖标记物(Ki67); ②开始分化后的人诱导多能干细胞经历了诱导多能干细胞、心脏中胚层、内皮前体细胞、内皮细胞等阶段显著的形态改变; ③qPCR结果显示, 随着分化进展, 内皮前体细胞标记物(KDR、CD34)呈现先升高再下调趋势, 而内皮细胞标记物(VE-CADHERIN、ICAM1、PECAM1)则呈现出逐渐递增趋势, 免疫荧光在蛋白水平进一步证实了内皮细胞标记物的表达递增趋势; ④血管成环实验显示, 内皮细胞血管形成数量随血管内皮生长因子质量浓度增加而增多; ⑤综上提示: 成功建立了人诱导多能干细胞定向分化内皮细胞的实验方案, 有望为未来血管构建提供细胞基础和实验依据。

关键词: 人诱导多能干细胞; 内皮细胞; 分化; 信号通路; 内皮前体细胞

Establishment and identification of an efficient protocol for differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells

Huang Wenjun^{1, 2, 3, 4, 5}, Wang Jie^{1, 2, 3, 4, 5}, Zhou Yafei^{1, 2, 3, 4, 5}, Li Huan^{1, 2, 3, 4, 5}, Jiang Congshan^{1, 2, 3, 4, 5}, Zhang Yanmin^{1, 2, 3, 4, 5}, Zhou Rui^{1, 2, 3, 4, 5}

¹Key Laboratory of Precision Medicine to Pediatric Diseases of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ²Xi'an Key Laboratory of Children's Health and Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ³Shaanxi Institute for Pediatric Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ⁴Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ⁵Affiliated Children's Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

¹陕西省儿童疾病精准医学重点实验室, 陕西省西安市 710002; ²西安市儿童健康与疾病重点实验室, 陕西省西安市 710002; ³陕西省儿科疾病研究所, 陕西省西安市 710002; ⁴西安市儿童医院, 陕西省西安市 710002; ⁵西安交通大学附属儿童医院, 陕西省西安市 710002

第一作者: 黄文俊, 女, 1983年生, 四川省德阳市人, 汉族, 2011年四川大学毕业, 药理学硕士, 助理研究员, 主要从事基于诱导多能干细胞的遗传罕见病机制及治疗研究。

通讯作者: 周锐, 生物学博士, 副研究员, 陕西省儿童疾病精准医学重点实验室, 陕西省西安市 710002; 西安市儿童健康与疾病重点实验室, 陕西省西安市 710002; 陕西省儿科疾病研究所, 陕西省西安市 710002; 西安市儿童医院, 陕西省西安市 710002; 西安交通大学附属儿童医院, 陕西省西安市 710002

<https://orcid.org/0000-0001-7638-1442> (周锐)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(81974014), 项目负责人: 张艳敏; 西安市卫生健康委员会卫生科研人才项目(2022ms08), 项目负责人: 周锐; 西安市卫生健康委员会卫生科研人才项目(2022ms09), 项目负责人: 黄文俊; 西安市儿童医院院级课题(2021A01), 项目负责人: 周锐; 西安市儿童医院院级课题(2021B02), 项目负责人: 黄文俊

引用本文: 黄文俊, 王洁, 周亚飞, 李环, 蒋丛珊, 张艳敏, 周锐. 一种人诱导多能干细胞向内皮细胞定向分化方案的建立及鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(10):1553-1559.



Huang Wenjun, Master, Assistant researcher, Key Laboratory of Precision Medicine to Pediatric Diseases of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Xi'an Key Laboratory of Children's Health and Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Shaanxi Institute for Pediatric Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Affiliated Children's Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Zhou Rui, PhD, Assistant researcher, Key Laboratory of Precision Medicine to Pediatric Diseases of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Xi'an Key Laboratory of Children's Health and Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Shaanxi Institute for Pediatric Diseases, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; Affiliated Children's Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Similar to the human induced embryonic stem cells, human induced pluripotent stem cell is a kind of pluripotent stem cells. By virtue of the differentiation potential of three germ layers and self-renewal ability, it could serve as a means to generate a scalable source of cells for therapeutic applications.

OBJECTIVE: To establish a protocol for the directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional endothelial cells.

METHODS: The authenticity of human induced pluripotent stem cells was verified by the immunofluorescence method. Human induced pluripotent stem cells were then differentiated into cardiac mesoderm, endothelial progenitor cells and finally functional endothelial cells through the manipulation of signaling pathways using recombinant transcription factors and small molecule compounds by adding activin A, GSK pathway inhibitor CHIR99021/bone morphogenetic protein 4, fibroblast growth factor/vascular endothelial growth factor/bone morphogenetic protein 4, basic fibroblast growth factor/vascular endothelial growth factor/CHIR99021 on days 0, 1, 2, and 5 sequentially. The induced endothelial cells were characterized by the morphology and the expression of endothelial cells-specific markers using brightfield microscope, real-time quantitative PCR and immunofluorescence method. Moreover, the tube formation assay was performed to test the angiogenic ability of induced endothelial cells.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The human induced pluripotent stem cells expressed high-levels of the induced pluripotent stem cell-specific markers (OCT4, NANOG, and SSEA4) and self-renewal marker (Ki67) as well. (2) The human induced pluripotent stem cells were successfully induced sequentially into to cardiac mesoderm cells, endothelial progenitor cells and final typical endothelial cells. (3) Real-time quantitative PCR results showed that with the progression of the differentiation, endothelial progenitor cell markers (KDR and CD34) were increased, and then gradually decreased; and endothelial cell markers (VE-CADHERIN, ICAM1 and PECAM1) were gradually increased. Immunofluorescence at the protein level further confirmed the increasing trend of endothelial cell marker expression. (4) Tube formation assay showed that the number of endothelial cells-generated blood vessels increased with the increase of the concentration of vascular endothelial growth factor. (5) It is concluded that an experimental protocol for the directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into endothelial cells has been successfully established, which is expected to provide a cellular basis and experimental basis for future blood vessel construction.

Key words: human induced pluripotent stem cell; endothelial cell; differentiation; signaling pathway; endothelial progenitor cell

Funding: The National Natural Science Foundation of China, No. 81974014 (to ZYM); The Health and Scientific Research Personnel Foundation of Xi'an Health Committee, No. 2022ms08 (to ZR); The Health and Scientific Research Personnel Foundation of Xi'an Health Committee, No. 2022ms09 (to HWJ); The Natural Science Foundation of Xi'an Children's Hospital, No. 2021A01 (to ZR); The Natural Science Foundation of Xi'an Children's Hospital, No. 2021B02 (to HWJ)

How to cite this article: HUANG WJ, WANG J, ZHOU YF, LI H, JIANG CS, ZHANG YM, ZHOU R. Establishment and identification of an efficient protocol for differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2023;27(10):1553-1559.

0 引言 Introduction

内皮细胞属于上皮细胞类型, 构成整个循环血管系统的最内层, 除作为外周血液与血管管壁的屏障之外, 内皮细胞还具备分泌、代谢、合成、免疫调控等重要生理功能^[1-3], 是血管组成的最重要细胞组分之一。随着中国人口老龄化加重, 与血管病变相关的疾病包括动脉粥样硬化、胸/主动脉瘤、主动脉夹层等均呈现发病递增趋势^[4]。利用组织工程、生物材料以及3D打印等技术构建的人工血管已成为上述血管疾病的有效治疗策略之一, 而人工血管的构建离不开有功能的内皮细胞^[5-7]。因此如何寻找合适且足量的内皮细胞是当前心血管再生医学面临的一个挑战^[8]。

人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)是一种与胚胎干细胞性状高度类似的多能干细胞类型^[9-10], 2006年日本科学家山中伸弥通过导入多能重编程因子到终末分化的皮肤成纤维细胞首次实现诱导多能干细胞的重新编程^[11]。因其拥有与胚胎干细胞类似的自我更新和三胚层多向分化潜能^[12-14], 同时无伦理束缚和移植免疫排斥, 因此被广泛应用到再生医学基础研究和临床治疗试验^[15-18]。

该研究拟建立一种高效的基于人诱导多能干细胞的内皮细胞定向分化方法, 通过重组转录因子和小分子化合物手段顺序调控系列信号通路, 从而使得人诱导多能干细胞经历心脏中胚层、内皮前体干细胞阶段, 并最终实现功能相对成熟的内皮细胞分化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。以重组蛋白作用方式时序性作用到人源诱导多能干细胞, 通过动态观察细胞不同阶段形态变化、标记物表达来探讨是否可以实现高效且有功能的血管内皮细胞定向分化。实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 运用GRAPHPAD软件进行多组间one-way ANOVA分析。

1.2 时间及地点 实验于2021年6-12月在西安交通大学附属儿童医院陕西省儿科疾病研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 野生型人诱导多能干细胞系(LHYM)由课题组利用非整合仙台病毒重编程导入健康女性外周血单核细胞中获得^[19]。血液样本采集科研用途事先告知该志愿者并且签署知情同意书。该研究的实施符合西安市儿童医院伦理委员会的相关伦理要求(医院伦理批号: 2019-599)。

1.3.2 实验试剂和仪器 人诱导多能干细胞维持培养基BIOCISO(未来智人, 中国); StmePro-34 SFM培养基(Thermo, 美国); RPMI/1640培养基(BI, 以色列); EGM培养基(LONZA, 美国); Matrigel基质胶(BD, 美国); B27-添加物(不含胰岛素)(Thermo, 美国); L-谷氨酰胺(Thermo, 美国); 抗坏血酸(MCE, 美国); 硫代甘油(Sigma, 美国); 重组蛋白激活素A(Pepro Tech, 美国); 小分子化合物CHIR99021(STEMCELL, 美国); 重组蛋白骨形态发生蛋白4(Pepro Tech, 美国); 重组蛋白碱性成纤维细胞生长因子(Pepro Tech, 美国); 重组蛋白血管内

皮生长因子 (Pepro Tech, 美国); 重组蛋白人抑瘤素 M(Pepro Tech, 美国); 兔抗人一抗 SSEA(Invitrogen, 美国); 小鼠抗人一抗 NANOG(CST, 美国); 兔抗人一抗 OCT4(Invitrogen, 美国); 小鼠抗人一抗 Ki67(CST, 美国); 兔抗人一抗 VE-Cadherin (CST, 美国); 兔抗人 TBX5 一抗 (Invitrogen, 美国); 小鼠抗人一抗 CD34 一抗 (CST, 美国); 小鼠抗人一抗 CD31(CST, 美国); 山羊抗兔 Alexa Fluor Plus 555 荧光二抗 (Invitrogen, 美国); 山羊抗小鼠 Alexa Fluor Plus 488 荧光二抗 (Invitrogen, 美国); 抗淬灭封闭剂 (含 DAPI)(Invitrogen, 美国); RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 中国); cDNA 反转录试剂盒 (Takara; 日本); QuantiTect SYBR® Green PCR 试剂盒 (Takara; 日本); 共聚焦荧光显微镜 (Olympus, 日本); 倒置明场相差显微镜及拍照系统 (巴玖, 中国); 超净工作台 (Thermo, 美国); 低温台式离心机 (Gene, 美国); CO₂ 恒温培养箱 (Thermo, 美国); 引物合成 (擎科生物, 中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 人诱导多能干细胞维持培养 在经过基质胶预处理 (1 : 50 稀释比例) 的含 BIOICISO 培养基的培养皿中对人诱导多能干细胞进行培养, 每日更换新鲜培养基, 待融合度达到 70%–80%, 使用 0.02% EDTA 消化并以 1 : 4–1 : 7 比例进行传代, 或按照下游分化实验所需细胞量进行接种。

1.4.2 人诱导多能干细胞定向分化为内皮细胞 取人诱导多能干细胞 (第 40 代) 以 1.0×10^5 / 孔数量接种于基质胶预处理的 12 孔板 (1 : 30 稀释比例), 记为 -1 d, 培养基为 BIOICISO (含 10 μ mol/L Y27632 和 10 μ mol/L CHIR99021), 培养 24 h; 24 h 后开始分化 (记为 0 d): ①心脏中胚层分化阶段 (第 0 天): 以 100 μ g/L 激活素 A 作用 1 d, 基础培养基为 RPMI/1640 (含 1 \times B27- 和 100 倍稀释的基质胶); 更换含 1 μ mol/L CHIR99021 和 5 μ g/L 骨形态发生蛋白 4 的 RPMI/1640 培养基 (含 1 \times B27-), 作用 1 d。②内皮前体细胞分化阶段 (第 2 天): 更换含 300 μ g/L 血管内皮生长因子、10 μ g/L 骨形态发生蛋白 4 和 5 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子的 StmePro-34 SFM 培养基 (含 0.4 μ mol/L 硫代甘油、2 mmol/L L- 谷氨酰胺和 50 mg/L 抗坏血酸), 作用 3 d。③内皮细胞分化阶段 (第 5 天): 使用细胞消化液 (0.25% Trypsin/0.02% EDTA) 消化后以 1 : 3–1 : 4 比例接种到 0.1% 明胶包被的孔板中 (6 cm 皿), 培养基为含 20 μ g/L 血管内皮生长因子、20 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子和 1 μ mol/L CHIR99021 的 EGM, 每 2 d 更换培养基 1 次。

1.4.3 qPCR 检测内皮前体和内皮细胞标记物 取分化不同时间节点的细胞 (第 0, 5, 10, 15 天), 采用 qRT-PCR 法检测各细胞分化不同阶段标记物的表达, 使用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA, 用 Nanodrop 测量 RNA 浓度, 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 制备 cDNA。采用 TB Green Fast qPCR Mix 试剂盒进行 qPCR 反应检测基因表达。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 / 延伸 15 s, 40 个热循环。熔解曲线: 95 °C、2 min, 60 °C、20 s, 95 °C、

15 s, 从 60 °C 缓慢加热到 99 °C。以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 | qRT-PCR 引物序列

Table 1 | Primer sequences for qRT-PCR analysis

基因	方向	序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
KDR	上游	CAA GTG GCT AAG GGC ATG GA	181
	下游	ATT TCA AAG GGA GGC GAG CA	
CD34	上游	CTT TCC AGA GGG GTT GAG CAG	180
	下游	CAG ACA CAC CCA GCT AAG ACA	
VE-Cadherin	上游	CTT CAC CCA GAC CAA GTA CAC A	154
	下游	AAT GGT GAA AGC GTC CTG GT	
ICAM1	上游	TGA CCG TGA ATG TGC TCT CC	153
	下游	TCC CTT TTT GGG CCT GTT GT	
PECAM1	上游	TGA GGT CAA AGG ATC AGA CGA C	107
	下游	TGG TGG CAA GGG ACT AAG GA	
MESP1	上游	AGC CCA AGT GAC AAG GGA CAA CT	82
	下游	AAG GAA CCA CTT CGA AGG TGC TGA	
TBX5	上游	ATG CAA GAG ACC TCA GTC CC	164
	下游	TCC GGA GGA ATG AGG GTG AT	
GAPDH	上游	TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT	181
	下游	TTC CCG TTC TCA GCC TTG AC	

1.4.4 免疫荧光检测人诱导多能干细胞、心脏中胚层、内皮前体细胞以及内皮细胞标记物 在人诱导多能干细胞维持培养阶段、分化后第 2 天、第 5 天以及第 7, 12 天采用免疫荧光检测人诱导多能干细胞心脏中胚层、内皮前体细胞以及内皮细胞标记物的表达。①细胞固定: 40 g/L 多聚甲醛固定细胞, 室温作用 10 min, DPBS 洗脱 3 次, 每次 5 min; ②封闭打孔: 加入打孔封闭液 (1 \times PBS/5% BSA/0.3% Triton X-100), 室温 30 min; ③一抗孵育: 加入一抗 [兔抗人 OCT3/4 单克隆抗体 (1 : 100)、小鼠抗人 NANOG 单克隆抗体 (1 : 100)、小鼠抗人 SSEA4 单克隆抗体 (1 : 200)、兔抗人 TBX5 一抗、小鼠抗人 CD34 一抗、兔抗人 VE-Cadherin 单克隆抗体 (1 : 200)、小鼠抗人 CD31 单克隆抗体 (1 : 100)], 4 °C 孵育过夜; ④二抗孵育: DPBS 洗脱 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 [山羊抗兔二抗 Alexa Fluor555 (1 : 500)、山羊抗小鼠二抗 Alexa Fluor488 (1 : 500)], 室温避光 1 h; ⑤封固成像: 使用含 DAPI 抗淬灭剂复染封固, 共聚焦荧光显微镜观察拍照。

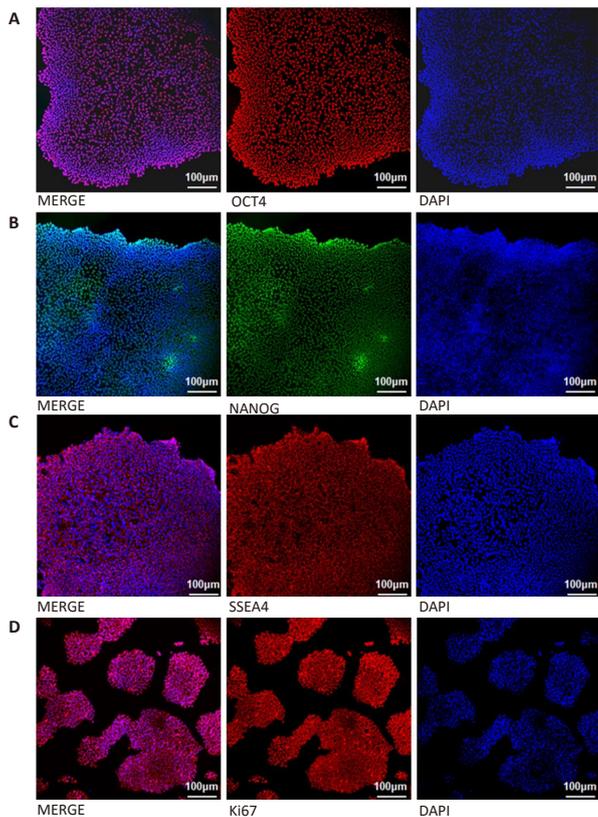
1.4.5 成环实验检测内皮细胞体外血管形成能力 分化第 15 天, 采用成环实验检测内皮细胞体外血管形成能力。①孔板预处理: 将低生长因子基质胶原液加入预冷的 24 孔板中, 350 μ L/ 孔, 室温 1 h 等待基质胶凝固; ②细胞接种: 使用细胞消化液 (0.25% Trypsin/0.02% EDTA) 将内皮细胞 (分化第 15 天) 消化成单细胞状态, 进行细胞计数并重悬细胞接种到上述孔板中, 细胞接种数量 50 000 个 /cm², 培养基为含不同质量浓度血管内皮生长因子 (50, 200 μ g/L) 的 EGM 培养基; ③观察成像: 12 h 后明场显微镜下观察并拍照^[20]。

1.5 主要观察指标 ①人诱导多能干细胞、心脏中胚层、内皮前体细胞、内皮细胞形态特征; ②利用 qRT-PCR 检测不同分化阶段细胞特异标记物; ③免疫荧光技术检测内皮细胞特异标记物; ④血管成环实验分析内皮细胞血管形成能力。

1.6 统计学分析 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 GraphPad 软件进行多组间 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过西安交通大学医学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 人诱导多能干细胞表型鉴定 免疫荧光对人诱导多能干细胞干性标记物进行检测, 荧光图片显示人诱导多能干细胞特异核转录因子 OCT4 和 NANOG 在细胞核高水平特异表达, 人诱导多能干细胞特异膜蛋白 SSEA4 在细胞膜高水平特异表达。诱导多能干细胞增殖标记物 Ki67 特异且强阳性定位在细胞核中。上述结果均符合人诱导多能干细胞特征, 见图 1。



图注: 图中 A 和 B 为免疫荧光检测人诱导多能干细胞特异细胞核标记物 OCT4、NANOG; C 为免疫荧光检测人诱导多能干细胞特异细胞膜蛋白 SSEA4; D 为免疫荧光检测人诱导多能干细胞增殖标记物 Ki67

图 1 | 人诱导多能干细胞表型鉴定

Figure 1 | Identification of human induced pluripotent stem cells

2.2 人诱导多能干细胞向内皮细胞分化过程中形态变化 基于前期内皮细胞分化文献基础之上^[21], 建立新的人诱导多能干细胞向内皮细胞定向分化实验方案, 通过依次作用激活素 A、骨形态发生蛋白 4/CHIR99021、血管内皮生长因子/骨形态发生蛋白 4/碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子/碱性成纤维细胞生长因子/CHIR99021 使人诱导多能干细胞经历心脏内胚层、内皮前体细胞, 最终分化成有功能的内皮细胞, 分化步骤示意图见图 2。明场显微镜下观察显示, 随着分化进展, 细胞形态经历了上皮到间充质样再到上皮样特征转变过程, 具体表现为第 0 天的经典上皮样人诱导多能

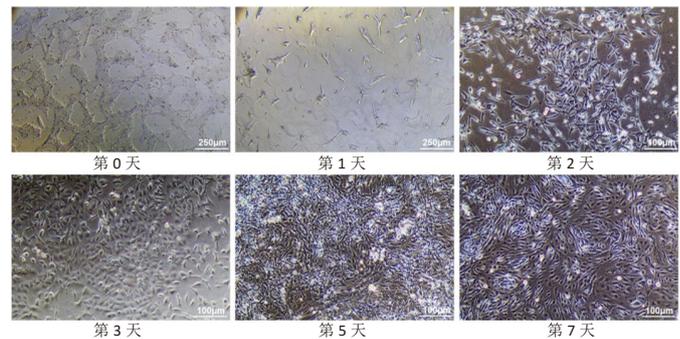
干细胞形态特征且细胞呈紧密连接样, 2 d 后的心脏内胚层细胞则呈现出经典的间充质样特征, 细胞呈现单细胞弥散分布。经过消化再接种即第 7 天的细胞又展现出经典的上皮样内皮细胞特征, 细胞呈多边形, 细胞边缘呈锯齿状且相互嵌合。上述结果初步提示内皮细胞分化成功。见图 3。



图注: BMP 为骨形态发生蛋白 4; bFGF 为碱性成纤维细胞生长因子; VEGF 为血管内皮生长因子; CHIR99021 为糖原合成酶 3 抑制剂; Y27632 为 Rho 关联卷曲螺旋蛋白激酶抑制剂; StemPro-34 SFM 为无血清造血干细胞培养基; EGM 为内皮细胞生长培养基

图 2 | 人诱导多能干细胞向内皮细胞定向分化步骤示意图

Figure 2 | Schematic protocol for differentiation from human induced pluripotent stem cells to endothelial cells



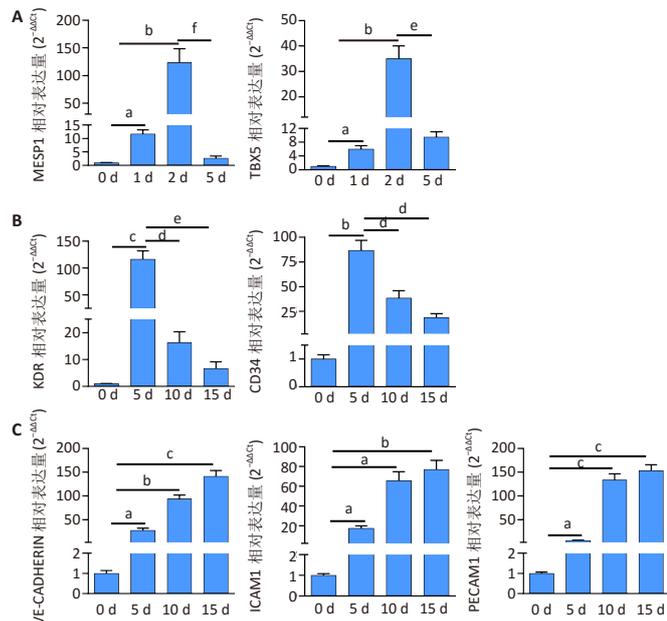
图注: 第 0 天细胞显示出经典的人诱导多能干细胞形态如高核质比、核仁明显等特征, 第 1 天细胞呈现致密连接特征, 而到第 2 天则呈现松散样连接, 在第 3, 5 天细胞快速增殖, 细胞数量显著增加, 第 7 天则呈现出经典内皮细胞形态特征, 表现为细胞呈多边形, 细胞边缘呈锯齿状且相互嵌合

图 3 | 在人诱导多能干细胞不同分化阶段动态观察细胞形态变化

Figure 3 | Dynamic observation of cellular morphology during the different differentiation stages of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells

2.3 qPCR 检测内皮前体细胞和内皮细胞特异标记物 mRNA 水平 在分化第 0, 1, 2, 5 天检测心脏中胚层标记物 (MESP1、TBX5)mRNA 转录水平, 结果显示 MESP1、TBX5 从第 0 天到第 2 天呈现表达明显递增趋势并且在第 2 天达到最高水平 (第 1 天: MESP1, $P < 0.05$; TBX5, $P < 0.05$; 第 2 天: MESP1, $P < 0.01$; TBX5, $P < 0.01$), 而从第 2 天到第 5 天其转录水平则显著下调 (第 5 天: MESP1, $P < 0.001$; TBX5, $P < 0.01$)。在分化第 0, 5, 10, 15 天 4 个时间点检测内皮前体细胞和内皮细胞特异标记物。内皮前体细胞标记物 KDR ($P < 0.001$)、CD34 ($P < 0.01$) 在第 5 天表达骤升, 随后在第 10 天 (KDR, $P < 0.05$; CD34, $P < 0.05$) 和第 15 天 (KDR, $P < 0.01$; CD34, $P < 0.05$) 较第 5 天均有明显下调, 但仍显著高于第 0 天; 内

皮特异标记物 VE-CADHERIN、ICAM1、PECAM1 在第 5 天起表达显著升高 ($P < 0.05$), 且随着时间延长其表达均呈现明显上调趋势 (第 10 天: VE-CADHERIN, $P < 0.01$; ICAM1, $P < 0.05$; PECAM1, $P < 0.001$; 第 15 天: VE-CADHERIN, $P < 0.001$; ICAM1, $P < 0.01$; PECAM1, $P < 0.001$)。上述结果进一步提示内皮细胞分化成功。见图 4。



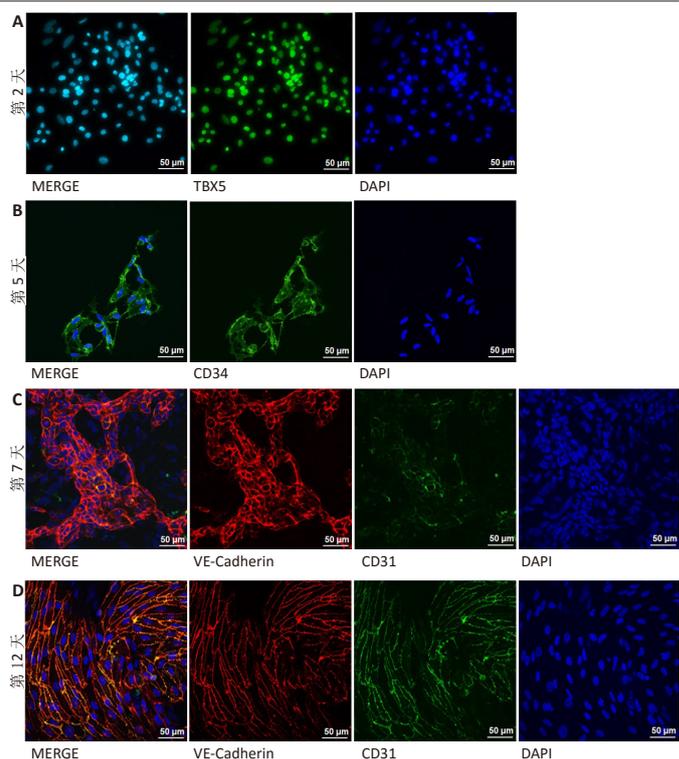
图注: 图 A 为心脏中胚层标记物 MESP1、TBX5 mRNA 水平; B 为内皮前体细胞标记物 KDR、CD34 mRNA 水平; C 为内皮细胞标记物 VE-CADHERIN、ICAM1、PECAM1 mRNA 水平。以第 0 天为对照, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$, $^c P < 0.001$; 以第 2 天 (图 A) 或者第 5 天 (图 B, C) 为对照, $^d P < 0.05$, $^e P < 0.01$, $^f P < 0.001$

图 4 | qRT-PCR 检测人诱导多能干细胞不同分化阶段内皮前体细胞和内皮细胞标记物 mRNA 水平

Figure 4 | Evaluation of mRNA levels of endothelial precursors and endothelial cell markers in different differentiation stages of human induced pluripotent stem cells by qRT-PCR

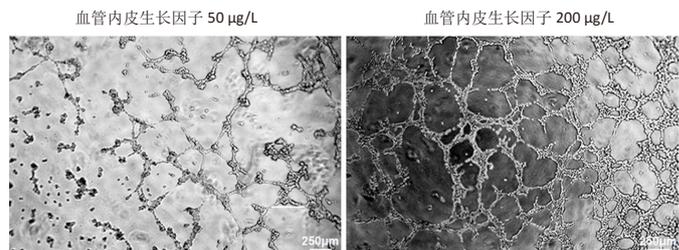
2.4 利用免疫荧光在蛋白水平验证内皮细胞特异标记物 在第 2, 5, 7, 12 天分别检测心脏中胚层标记物 (TBX5)、内皮前体细胞标记物 (CD34)、内皮细胞膜特异标记物 (VE-Cadherin、CD31), 结果显示 TBX5 强阳性且特异定位于细胞核中, 而 CD34 信号则以细胞膜为主, 同时胞浆也有表达; 内皮细胞标记物 VE-Cadherin 和 CD31 二者信号均特异定位在细胞膜上。此外, VE-Cadherin 在 2 个时间节点表达丰度无明显变化, 而与第 7 天相比, CD31 蛋白水平在第 12 天呈现显著上调, 提示内皮细胞进一步成熟。上述结果在蛋白水平证实了人诱导多能干细胞经历了心脏中胚层、内皮前体细胞并最终向内皮细胞成功定向分化。见图 5。

2.5 利用血管成环实验评价内皮细胞血管生成能力 血管形成能力是内皮细胞重要且特异的细胞功能之一, 取分化后第 15 天的细胞进行血管成环实验, 结果显示分化的内皮细胞具备较好的体外血管成环能力, 并且其成环能力对血管内皮生长因子呈现浓度依赖效应。见图 6。



图注: 免疫荧光检测不同分化阶段特异标记物蛋白。图 A 为分化第 2 天心脏中胚层标记物 TBX5; B 为分化第 5 天内皮前体细胞标记物 CD34; C, D 为第 7 天和第 12 天检测内皮细胞特异标记物 VE-Cadherin 和 CD31

图 5 | 免疫荧光在蛋白水平验证内皮细胞特异标记物
Figure 5 | Identification of endothelial cell-specific markers at the protein level by immunofluorescence



图注: 图中为分化后 15 d 的内皮细胞进行体外血管成环实验。由图可见内皮细胞显示出体外成管能力, 并且其能力对血管内皮生长因子呈现浓度依赖

图 6 | 利用血管成环实验评价分化内皮细胞的血管生成能力
Figure 6 | Evaluation of the angiogenic ability of induced endothelial cells using the tube formation assay

3 讨论 Discussion

人诱导多能干细胞具备与胚胎干细胞高度类似的形态和功能特性, 可以从成年人体方便获取制备, 而且可以规避胚胎干细胞面临的医学伦理束缚和异体移植免疫排斥, 因此被认为是细胞替代治疗最理想的种子细胞 [15-18]。该研究使用的人诱导多能干细胞具备较理想的干性和增殖活力, 前者表现为强阳性表达核转录因子 (OCT4、NANOG) 和特异膜蛋白 (SSEA4) (图 1), 后者则表现为阳性表达细胞核特异分布的增殖标记物 (Ki67)。

该研究基于人诱导多能干细胞建立了一种高效稳定的内皮细胞定向分化实验方案。通过时序性加入激活素 A、GSK 通路抑制剂 CHIR99021/ 骨形态发生蛋白 4、成纤维细胞生长因子 / 血管内皮生长因子 / 骨形态发生蛋白 4、碱性成纤维细胞生长因子 / 血管内皮生长因子 / CHIR99021, 人诱导多能干细胞经历心脏中胚层、内皮前体细胞命运转变并最终分化成为有功能的内皮细胞。细胞形态经历从上皮 (人诱导多能干细胞) 到间充质样 (心脏中胚层) 再到上皮 (内皮细胞) 的变化, 内皮前体细胞和内皮细胞标记物在转录水平也发生了与之相对应的变化过程。体外成环实验则证实了分化的内皮细胞具备体外血管生成能力。综上提示基于人诱导多能干细胞的内皮细胞定向分化方案构建成功。

决定该内皮分化实验方案的关键要点如下: ① 基于时序调控激活素 A、CHIR99021/ 骨形态发生蛋白 4 通路介导的心脏中胚层特化是决定最终内皮细胞分化成功和效率高低的核心关键。研究发现人源或者鼠源诱导多能干细胞向心脏中胚层的特化高度依赖于 Activin/Nodal 和骨形态发生蛋白信号通路^[22]。通过时序加入激活素 A、骨形态发生蛋白 4(CHIR99021 通过调控 Wnt 通路作为辅助) 能够实现高效的心脏中胚层特化^[23]。作者在前期多次预实验探索中发现, 激活素 A 浓度是决定该环节的最核心要素, 表现为过高浓度会有明显的细胞毒性, 而浓度过低则显著影响分化效率。使用不同的人诱导多能干细胞进行实验可能需要进行最适激活素 A 浓度优化。② 血管内皮生长因子是决定心脏中胚层向内皮前体细胞分化的关键要素。心脏中胚层细胞具备向心肌细胞、心内膜细胞和内皮前体细胞分化潜能, 而激活血管内皮生长因子介导的信号通路是实现内皮前体细胞特化的保证和前提^[24-27]。前期预实验提示高浓度的血管内皮生长因子 (300 nmol/L) 被证实效果最佳, 继续提高浓度则不会进一步提升内皮细胞的分化效率。

不同于以往采用的共培养和拟胚体策略^[28-31], 该研究中使用二维单层 (monolayer) 贴壁培养的策略实现人诱导多能干细胞向内皮细胞分化。以往的共培养通常将人诱导多能干细胞与鼠源间充质干细胞混合培养实现内皮细胞分化的目的, 但存在分化效率低且引入异种细胞等不足^[28-29]; 而拟胚体则是一种基于体外自组装 3D 结构中人诱导多能干细胞自发分化策略, 因此存在靶向分化效率批次差异较大等不足^[30-31]。此外, 一些分化策略也采用了单层贴壁培养, 但需要在心脏中胚层或者内皮前体细胞阶段利用流式分选纯化再进行下游分化扩增培养^[32-33]。该研究建立的分化方案则避免了分选等操作, 同时还保证了较高的分化效率。

综上, 该研究构建了一种高效稳定的基于人诱导多能干细胞向内皮细胞定向分化的实验方案。利用重组生长因子和小分子化合物手段通过时序性调控不同信号通路, 使得人诱导多能干细胞经历心脏中胚层、内皮前体细胞, 最终分化成纯度较高且功能成熟的内皮细胞, 为未来血管构建提供细胞基础和实验依据。

致谢: 感谢未来智人再生医学研究院 (广州) 王琳立老师友情赠送人诱导多能干细胞。

作者贡献: 实验设计由通讯作者周锐和第一作者黄文俊共同完成, 实验实施由第一作者黄文俊完成, 数据采集、整理、分析由共同作者周亚飞、王洁完成, 文章写作由通讯作者完成, 实验评估文章修改由共同作者张艳敏和蒋丛珊完成。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] DI BERNARDINI E, CAMPAGNOLO P, MARGARIT A, et al. Endothelial lineage differentiation from induced pluripotent stem cells is regulated by microRNA-21 and transforming growth factor β 2 (TGF- β 2) pathways. *J Biol Chem*. 2014;289(6):3383-3393.
- [2] KRÜGER-GENGE A, BLOCKI A, FRANKE RP, et al. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4411.
- [3] SENA CM, PEREIRA AM, SEIÇA R. Endothelial dysfunction- a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(12):2216-2231.
- [4] 严拓, 刘雅文, 吴灿, 等. 人工血管研究现状与应用优势 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(30):4849-4854.
- [5] 张家庆, 王武军, 闫玉生. 小口径人工血管材料应用进展 [J]. *实用医学杂志*, 2014,30(21):3520-3521.
- [6] XU L, VARKEY M, JORGENSEN A, et al. Bioprinting small diameter blood vessel constructs with an endothelial and smooth muscle cell bilayer in a single step. *Biofabrication*. 2020;12(4):045012.
- [7] SFRISO R, ZHANG S, BICHSEL CA, et al. 3D artificial round section micro-vessels to investigate endothelial cells under physiological flow conditions. *Sci Rep*. 2018;8(1):5898.
- [8] LIN Y, GIL CH, YODER MC. Differentiation, Evaluation, and Application of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(11):2014-2025.
- [9] GNECCHI M, STEFANELLO M, MURA M. Induced pluripotent stem cell technology: Toward the future of cardiac arrhythmias. *Int J Cardiol*. 2017;237:49-52.
- [10] HENDRIKS D, CLEVERS H, ARTEGIANI B. CRISPR-Cas Tools and Their Application in Genetic Engineering of Human Stem Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*. 2020;27(5):705-731.
- [11] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- [12] RAASCH M, FRITSCH E, KURTZ A, et al. Microphysiological systems meet hiPSCs technology-New tools for disease modeling of liver infections in basic research and drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;140:51-67.

- [13] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131(5):861-872.
- [14] HAN JK, SHIN Y, KIM HS. Direct Conversion of Cell Fate and Induced Endothelial Cells. *Circ J*. 2021 Nov 3. doi: 10.1253/circj.CJ-21-0703. Online ahead of print.
- [15] TANI H, TOHYAMA S, KISHINO Y, et al. Production of functional cardiomyocytes and cardiac tissue from human induced pluripotent stem cells for regenerative therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 2022;164: 83-91.
- [16] WANG J, REN H, LIU Y, et al. Bioinspired Artificial Liver System with hiPSCs-Derived Hepatocytes for Acute Liver Failure Treatment. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(23):e2101580.
- [17] MOKHAMES Z, REZAIE Z, ARDESHIRYLAJIMI A, et al. Efficient smooth muscle cell differentiation of iPS cells on curcumin-incorporated chitosan/collagen/polyvinyl-alcohol nanofibers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2020;56(4):313-321.
- [18] OKANO H, YAMANAKA S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain*. 2014;7:22.
- [19] ZHANG Y, LI H, WANG J, et al. Generation of three iPSC lines (XACHi007-A, XACHi008-A, XACHi009-A) from a Chinese family with long QT syndrome type 5 with heterozygous c.226G>A (p.D76N) mutation in KCNE1 gene. *Stem Cell Res*. 2020;45:101798.
- [20] GENTILE MT, PASTORINO O, BIFULCO M, et al. HUVEC Tube-formation Assay to Evaluate the Impact of Natural Products on Angiogenesis. *J Vis Exp*. 2019;(148). doi: 10.3791/58591.
- [21] PALPANT NJ, PABON L, FRIEDMAN CE, et al. Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2017;12(1):15-31.
- [22] KATTMAN SJ, WITTY AD, GAGLIARDI M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):228-240.
- [23] XU PF, HOUSSIN N, FERRI-LAGNEAU KF, et al. Construction of a vertebrate embryo from two opposing morphogen gradients. *Science*. 2014;344(6179):87-89.
- [24] KENNEDY CC, BROWN EE, ABUTALEB NO, et al. Development and Application of Endothelial Cells Derived From Pluripotent Stem Cells in Microphysiological Systems Models. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:625016.
- [25] YODER MC. Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(3):252-257.
- [26] NELSON EA, QIU J, CHAVKIN NW, et al. Directed Differentiation of Hemogenic Endothelial Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *J Vis Exp*. 2021;(169):10.3791/62391.
- [27] WANG K, LIN RZ, HONG X, et al. Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA. *Sci Adv*. 2020;6(30):eaba7606.
- [28] CHOI KD, YU J, SMUGA-OTTO K, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009;27:559-567.
- [29] BELAIR DG, WHISLER JA, VALDEZ J, et al. Human vascular tissue models formed from human induced pluripotent stem cell derived endothelial cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(3):511-525.
- [30] ADAMS WJ, ZHANG Y, CLOUTIER J, et al. Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013;1:105-113.
- [31] LEVENBERG S, GOLUB JS, AMIT M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7): 4391-4396.
- [32] IKUNO T, MASUMOTO H, YAMAMIZU K, et al. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One*. 2017;12:e0173271.
- [33] LIAN X, BAO X, AL-AHMAD A, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Reports*. 2014;3:804-816.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)