

## 研究论文

# hESC衍生间充质干细胞可显著促进体外血管生成

闫永利 叶进培\*

(山西大学生物医学研究院, 太原 030006)

**摘要** 人胚胎干细胞(hESC)是具有体外无限增殖能力和多向分化潜能的一类亚全能干细胞, 在特定的条件下可被诱导分化为机体的各种细胞包括间充质干细胞(MSC)。该研究以人脂肪间充质干细胞(ADSC)和脐带间充质干细胞(UC-MSC)为对照, 对hESC衍生间充质干细胞(hESC-MSC)在体外血管生成中的作用进行了系统的研究, 包括其条件培养上清对脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的功能和向血管内皮细胞分化潜能的影响。研究发现, hESC-MSC的条件培养上清可显著促进HUVEC的增殖和迁移, 其促进HUVEC增殖的作用显著高于UC-MSC的条件培养上清; hESC-MSC经不同血管内皮细胞诱导方案诱导后均具有体外类血管网络生成的能力, 其网络长度均显著高于ADSC和UC-MSC经单一血管内皮细胞诱导方案诱导后的长度。因此, hESC-MSC可显著促进体外血管生成, 提示该细胞有望成为一种有效的治疗新型心血管疾病的细胞。

**关键词** 人胚胎干细胞; 间充质干细胞; 血管生成

## hESC-Derived Mesenchymal Stem Cells are Superior in Promotion of Angiogenesis *in Vitro*

YAN Yongli, YE Jinpei\*

(Institute of Biomedical Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** hESC (human embryonic stem cell) is a kind of pluripotent stem cells with unlimited proliferation ability and multi-lineage differentiation potential *in vitro*, which can be induced into a variety of cells including MSC (mesenchymal stem cell) under appropriate conditions. The present study systematically investigated the *in vitro* proangiogenic effect of hESC-MSC (hESC-derived mesenchymal stem cell), which was generated in this laboratory recently. The experiments included the effect of hESC-MSC' conditioned culture supernatants on the function of HUVEC (umbilical vein endothelial cell) and their potential to differentiate into vascular endothelial cells, in comparison with human ADSC (adipose-derived mesenchymal stem cell) and UC-MSC (umbilical cord mesenchymal stem cell). It was found that the CM (conditioned medium) from hESC-MSC could significantly promote the proliferation and migration of HUVEC, and the proliferation of HUVEC was significantly enhanced with the CM from hESC-MSC compared with that from UC-MSC. Moreover, the differentiating hESC-MSC could form an extensive tube-like network *in vitro* after induction of differentiation towards vascular endothelial cells by all protocols tested, and the length of putative tubing was significantly longer than that of differentiating ADSC and UC-MSC, from which the tube-like structure formation appeared only occasionally. In conclusion, hESC-MSC can

收稿日期: 2021-03-28

接受日期: 2021-06-02

\*通讯作者。Tel: 13073585249, E-mail: jinpei.ye@sxu.edu.cn

Received: March 28, 2021

Accepted: June 2, 2021

\*Corresponding author. Tel: +86-13073585249, E-mail: jinpei.ye@sxu.edu.cn

significantly promote angiogenesis *in vitro*, suggesting that this novel source of MSC may be able to become an ideal therapeutic cell type for cardiovascular diseases.

**Keywords** human embryonic stem cell; mesenchymal stem cell; angiogenesis

缺血性疾病是威胁人类健康的主要疾病之一, 在我国的发病率逐年增加<sup>[1-2]</sup>。在影响缺血性疾病治疗效果的多种因素中, 血管生成的效率起着至关重要的作用。血管生成是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉长出新的血管, 其主要过程包括血管内皮细胞的激活、增殖、迁移, 以重建形成新的血管和血管网络<sup>[3]</sup>。进行自体血管移植是一种有效的治疗方案, 但是会受到取材、自身血管病变等因素的限制<sup>[4]</sup>。因此, 目前基于细胞的促血管生成疗法, 特别是间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)疗法, 已越来越多地应用于心肌梗死、冠心病等心脑血管疾病的治疗<sup>[5-6]</sup>。

MSC广泛来源于全身各结缔组织和器官间质, 是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞<sup>[7]</sup>, 在特定的条件下可以分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等。MSC还具有旁分泌功能, 在造血支持、免疫炎症反应、血管生成等人体重要功能中起调节作用<sup>[8-10]</sup>, 在多项临床医学研究中已经显示出明显的治疗效果<sup>[11-12]</sup>, 因此MSC被认为是组织修复/再生过程中增强血管生成的最有希望的细胞来源<sup>[13]</sup>。研究表明, MSC可以通过旁分泌多种血管生成因子, 包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等而对血管生成起作用; MSC来源的条件上清可以促进内皮细胞的增殖、迁移, 并提高其管状形成能力<sup>[14-16]</sup>。也有报道, MSC在一定条件下可以分化为血管内皮细胞, 进而促进新血管的生成<sup>[17-18]</sup>。

迄今为止, 细胞生物学领域研究最广泛的间充质干细胞仍然是骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSC), 而且目前对于缺血性疾病的MSC治疗也主要集中于该细胞, 然而BM-MSC的获取对病人造成的伤害与痛苦较大, 因此寻求更有效的MSC来源尤为重要。脂肪组织在人体中储存丰富, 通过抽脂可以获得大量的脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC)<sup>[19]</sup>, 自体供给的安全性很高, 十分适合自体移植, 而且移植后不会出现排异反应。脐带间充质

干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UC-MSC)来源于新生儿出生后废弃的脐带组织, 具有容易从脐带中分离出来并培养的优势<sup>[20]</sup>。因此, 这3种细胞是目前应用最广泛的组织来源MSC。然而这些组织来源MSC的体外扩增能力均有限, 细胞存在异质性, 个体差异、年龄和健康状态等会导致细胞功能的差异, 使得组织来源的MSC难以达到统一的治疗标准。人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)是从早期发育、附植前胚胎中分离出来的一类亚全能干细胞, 具有体外无限增殖的能力和向分化的潜能<sup>[21]</sup>。在特定的条件下, hESC也可以经定向诱导而分化为MSC<sup>[22-24]</sup>; 人胚胎干细胞衍生间充质干细胞(hESC-MSC)可以无限制备, 且与在多种动物疾病模型中使用的成体来源MSC相比, 具有更好的治疗效果<sup>[25]</sup>, 因此更适合作为真正的即取型细胞药物, 可望成为理想的治疗性种子细胞。

很多研究报道了单一组织来源MSC促进血管生成的作用, 包括它们对血管内皮细胞功能的影响或者它们自身的血管内皮细胞分化潜能<sup>[26-28]</sup>, 而同时进行不同来源MSC对体外血管生成作用的系统性比较的研究报道甚少。不同来源的MSC在功能上存在一定的差异, 例如不同的培养条件、细胞活化状态以及组织来源会造成MSC免疫活性的差异<sup>[29]</sup>, 不同来源的MSC向血管内皮细胞分化潜能的不同导致其促血管生成作用存在差异<sup>[30]</sup>。hESC-MSC在促血管生成方面的研究目前还鲜有报道。为了有针对性地选择对临床适应症最有效的治疗性MSC, 需要对不同来源MSC的功能包括促血管旁分泌功能和向血管内皮分化潜能进行系统的比较研究。我们最近建立了一个高效的分化诱导方案(使hESC分化为MSC)<sup>[31]</sup>, 对该细胞促进体外血管生成的功能包括旁分泌作用和血管内皮分化潜能进行了系统性的探究, 并将该细胞与ADSC、UC-MSC进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

DMEM/F12培养液购自美国 Thermo Fisher 公司; ECM培养液购自美国 ScienCell 公司; EGM2培

养液购自瑞士Lonza公司; DKW培养液购自中国达科为生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司; Trizol试剂购自美国Invitrogen公司; 反转录试剂购自日本TaKaRa公司; CCK-8试剂购自中国上海翊圣生物科技有限公司; 结晶紫染液购自中国北京索莱宝科技有限公司; PKH26购自美国Sigma公司; VEGF、IGF-1(insulin-like growth factor-1)、EGF和bFGF等因子购自美国MCE公司; Matrigel基质胶、Transwell小室购自美国Corning公司; 流式抗体购自美国BD公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞来源与培养** 本实验室前期已经成功分离与扩增UC-MSC和脐带静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 且已成功制备并扩增培养hESC-MSC<sup>[31-32]</sup>。UC-MSC和hESC-MSC的传代培养使用DMEM/F12+10% FBS, 后续的实验选用第3~6代的UC-MSC和第10~20代的hESC-MSC细胞, 它们均为单层贴壁细胞, 成纤维样细胞形态; 经流式细胞仪检测细胞表面抗原发现, 它们均高表达CD73、CD90、CD105, 不表达CD34、CD11b、CD19、CD45和HLA-DR<sup>[31]</sup>; hESC-MSC和UC-MSC经成脂、成骨和成软骨分化培养液诱导之后均具有分化为脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞的能力, 均符合间充质干细胞在2006年的国际最低标准<sup>[33]</sup>。HUVEC的传代培养使用ECM培养液, 后续的实验选用第3~6代的HUVEC, 其为单层贴壁细胞, 呈典型的鹅卵石样细胞形态; 用流式细胞仪进行表面抗原的检测, 发现该细胞高表达CD31、CD144, 低表达祖细胞标志物CD34、CD133, 不表达CD309, 且HUVEC在Matrigel基质胶上具有良好的成管能力<sup>[32]</sup>。

本研究所涉及的人体组织和细胞生物医学研究项目均已得到了山西大学、山西医科大学学科伦理审查委员会批准。所有志愿者均签署了知情同意书。抽脂获得的脂肪样品(太原美欧华整形医院志愿者)在生物安全柜中于无菌条件下用含2×双抗(100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)的生理盐水清洗4~6次至清洗液清亮。添加等体积的胶原酶I(0.1%), 放置于恒温振荡器, 37 °C消化60 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。用DKW培养液重悬脂肪基质血管细胞成分(stromal vascular fraction, SVF), 再经孔径为100 μm的细胞筛过滤, 1 000 r/min离心5 min弃上清后将ADSC

铺至6孔板中培养(第0代), 3×10<sup>5</sup>个/孔, 每2~3天进行换液, 选用第3~6代的ADSC用于实验。其三向(成脂、成骨和成软骨)分化潜能测定方案参见本实验室前期工作<sup>[31]</sup>。

**1.2.2 流式细胞仪检测细胞表面抗原** 将融合度达到90%的细胞消化收集, 细胞计数后取细胞悬液(细胞数目为1×10<sup>5</sup>个), 过44 μm的细胞筛。1 000 r/min离心5 min。弃掉上清, 将细胞混匀, 加入3 mL FACS洗涤缓冲液[PBS+2% FBS+0.2% EDTA (0.5 mol/L)]进行重悬, 1 000 r/min离心5 min。弃掉上清, 加入200 μL FACS洗涤缓冲液重悬, 分别取100 μL加入到2个流式管中, 避光环境下分别加入相应的抗体染色30 min。染色完成后加入1 mL FACS洗涤缓冲液中和并再次离心洗涤2次, 进行流式检测。

**1.2.3 细胞增殖活力检测** 将准备好的细胞用0.05%胰酶消化, 转移到15 mL离心管中, 1 000 r/min离心5 min, 将其轻轻吹打成单细胞悬液后用细胞计数仪计数3次取平均值。将制备的细胞悬液, 按照1×10<sup>3</sup>个/孔的密度接种在96孔板中, 每孔体积为100 μL。空白对照孔中没有细胞只有培养液。每组设置3个复孔。在5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养。根据预实验摸索的条件, 在接种细胞2、4、6天后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 在此过程中避免产生气泡。继续培养2 h后, 用酶标仪检测吸光度(D)值, 测定波长为450 nm。

**1.2.4 细胞迁移实验** 采用划痕和Transwell小室2种方法来进行细胞迁移实验。取6孔培养板, 先用直尺比着Maker笔在其背面均匀划三道横线, 且横穿过孔, 用以标记位置。将生长状态良好的HUVEC按常规消化, 1 000 r/min离心5 min后弃掉上清, 用1 mL ECM完全培养基重悬细胞并将其吹成单细胞悬液, 取少部分均匀细胞悬液进行计数。在6孔培养板中加入细胞悬液, 使得每孔细胞数量为1×10<sup>5</sup>个, 置于细胞培养箱中。观察培养的HUVEC, 待细胞长满后, 用10 μL移液器的枪头比着培养板盖垂至于背面的横线划痕, 枪头尽量垂直。划痕结束后, 用PBS清洗细胞3次, 去除划落的细胞, 分别加入ECM条件上清培养基和ECM基础培养基。镜下选取划痕笔直、宽度一致的视野, 每12 h在同一位置使用倒置显微镜采集图像。

Transwell小室(小室滤膜的孔径为8 μm)内加入100 μL细胞悬液(细胞数目为1×10<sup>4</sup>个), 上层培养液采用无血清培养基, 下层培养液为800 μL含5% FBS的培

培养基。将其置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内孵育36 h。用棉签小心拭去上室内细胞后,将Transwell小室浸在4%多聚甲醛中30 min,用1× PBS洗涤3次,每次5 min。然后将Transwell小室浸在0.1%结晶紫中30 min,用1× PBS洗涤3次,每次5 min。最后在光学显微镜下取3~5个高倍视野计细胞数并拍照记录。

**1.2.5 体外成管实验** 实验前一天,将96孔板、Matrigel胶、需用到的枪头放入4 °C冰箱中进行预冷,并使Matrigel胶溶解。在冰上使用预冷的枪头吸取50 μL Matrigel胶加入到96孔板中,尽量不要产生气泡。将96孔板放入37 °C培养箱中凝胶30 min。在等待凝胶的过程中,将所需要的细胞消化,制备细胞悬液。铺细胞,每孔添加50 μL的细胞悬液,细胞数为1×10<sup>4</sup>个,同样要注意不能有气泡产生,枪头不能碰到胶。培养一段时间后拍照并对图像进行分析。

**1.2.6 CFSE、PKH26活细胞染色实验** CFSE染色:将需要进行操作的细胞(处于对数生长期)消化并进行计数;将含有5×10<sup>5</sup>个单细胞的悬浮液置于离心管中,用无血清培养基冲洗1次;细胞于1 000 r/min离心5 min后变成一个松散的球团;细胞离心后,小心移除上清液,不要移除任何细胞;即将染色之前,在PBS中制备CFSE染料溶液(1.25 μmol/L),加入0.25 μL CFSE染料溶液至1 mL PBS中,在离心管中充分混合均匀;快速加入配制好的CFSE染料溶液到25 μL细胞沉淀中,并立即用吸量管轻轻重悬细胞混合均匀;混合后的最终浓度将是1×10<sup>6</sup>个/mL和1.25 μmol/L CFSE;细胞/染料悬浮液避光37 °C孵育20 min;停止染色,加入相同体积(1 mL)的完全培养基,混匀,37 °C孵育5 min。细胞在1 000 r/min离心5 min,小心移除上清液,确保不移除细胞。加入预热的完全培养基(1 mL)重悬细胞颗粒,进行细胞计数。最后根据实验需要选择合适的细胞浓度。

**PKH26染色:**将含有2×10<sup>6</sup>个单细胞的悬浮液置于离心管中,用无血清培养液(DMEM/F12)冲洗1次;细胞于1 000 r/min离心5 min后变成一个松散的球团;然后小心移除上清液,不移除任何细胞,只留下不超过25 μL的上清液;在细胞颗粒中加入125 μL稀释剂C,制备2× 细胞悬液,温和吹吸以确保细胞完全分散;不要涡旋,且不要让细胞长时间保持在稀释剂C中;在即将染色之前,将0.4 μL PKH26乙醇染料溶液加入到125 μL稀释剂C中,并在离心管中使其充分混合均匀,以制备浓度为4×10<sup>-6</sup> mol/L的2× 染料

溶液;快速加入125 μL 2× 细胞悬液到125 μL 2× 染料溶液中,并立即将样品用吸量管混合;混合后的最终浓度将是1×10<sup>7</sup>个/mL和2×10<sup>-6</sup> mol/L PKH26;将细胞/染料混合悬液在细胞培养箱中孵育1~5 min;停止染色,加入相同体积(250 μL)的血清或其他合适的蛋白质溶液(如1%的BSA),孵育1 min,使多余的染料结合在一起。将细胞在1 000 r/min、20~25 °C条件下离心5 min,小心移除上清液,确保不移除细胞。在1 mL完全培养基中重悬细胞颗粒,然后将其转至新鲜无菌离心管中,在1 000 r/min、20~25 °C下离心5 min,用1 mL完全培养基清洗细胞颗粒2次,以确保去除未结合染料。最后清洗后,将细胞颗粒重新悬浮在1 mL的完全培养基中,根据实验需要选择合适的细胞浓度。

**1.2.7 条件上清的收集** 用上述适合的培养基正常传代培养MSCs(hESC-MSC、ADSC和UC-MSC)和HUVEC,在T75的培养瓶中传代扩增,接种密度为1×10<sup>5</sup>个/cm<sup>2</sup>,选择生长状态良好的细胞进行条件上清的收集:培养24 h后,吸除原培养MSC和HUVEC的完全培养基,PBS清洗3次,消除原有培养基中血清的影响,吸掉PBS,加入ECM基础培养基(用于培养MSC和HUVEC),每个T75的培养瓶中加入基本培养基的量为15 mL,置于饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养48 h。收集上清液并进行过滤离心后保存于50 mL无菌离心管中。封口膜封好,放在-20 °C冰箱备用。在增殖和迁移实验中,待HUVEC铺板以后,将HUVEC的培养液全部更换为3种MSC上清液进行培养,并进行后续的增殖和迁移检测。

**1.2.8 MSC向血管内皮诱导实验方案** 将hESC-MSC(P10代)、ADSC(P4代)和UC-MSC(P4代)按1×10<sup>3</sup>个/cm<sup>2</sup>接种于经0.1%明胶包被的6孔板中用基础培养基培养,24 h后更换为5种内皮细胞诱导分化培养液(见下述)。每2天换1次诱导分化培养液,汇合度达到90%时进行传代,连续诱导培养12天后将细胞进行常规消化处理并收集用于形态观察,然后进行成管功能实验、流式检测和基因表达的检测。内皮细胞诱导分化培养液:方案一(Test 1)为ECM(内皮细胞专用培养基);方案二(Test 2)为ECM-CM(培养内皮细胞获得的条件上清)<sup>[34]</sup>;方案三(Test 3)为IMDM+2% FBS+50 ng/mL VEGF+10 ng/mL bFGF+20 ng/mL IGF-1+5 ng/mL EGF+抗坏血酸+肝素<sup>[18]</sup>;方案四(Test 4)为DMEM/F12+2% FBS+50 ng/mL VEGF+2 ng/mL

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>CD31</i>	Forward: AAC AGT GTT GAC ATG AAG AGC C Reverse: TAA AAC AGC ACG TCA TCC TT
<i>vWF</i>	Forward: CCC ATT TGC TGA GCC TTG T Reverse: GGA TGA CCA CCG CCT TT G
<i>VEGFR2</i>	Forward: AAT AAT CAG AGT GGC AGT G Reverse: ACA TAA ATG ACC GAG GC
<i>GAPDH</i>	Forward: CCA CTC CTC CAC CTT TGA C Reverse: ACC CTG TTG CTG TAG CCA

IGF-1<sup>[35]</sup>; 方案五 (Test 5) 为 ECM+2% FBS+50 ng/mL VEGF+10 ng/mL bFGF+20 ng/mL IGF-1+5 ng/mL EGF+抗坏血酸+肝素(根据参考文献[18]改进)。

1.2.9 RNA提取及qRT-PCR检测 用Trizol法提取分化细胞的总RNA, 然后将其逆转录成cDNA, 用qRT-PCR检测*CD31*、*vWF*、*VEGFR2*的mRNA水平, 将*GAPDH*用作内参。引物序列见表1。

1.2.10 统计学分析 每个实验均独立重复3次, 使用GraphPad Prism软件进行统计学分析, 使用ImageJ软件进行血管长度分析。两组间数据比较采用独立样本*t*检验。\**P*<0.05为差异显著, \*\**P*<0.01为差异极显著, \*\*\**P*<0.001为差异极其显著。

## 2 结果

### 2.1 hESC-MSC上清可促进HUVEC的增殖和迁移

与UC-MSC和hESC-MSC相似, ADSC在倒置显微镜下为单层贴壁细胞, 成纤维样细胞形态; 用流式细胞仪检测ADSC表面抗原的表达, 发现其高表达CD73、CD90、CD105, 不表达CD34、CD11b、CD19、CD45和HLA-DR; ADSC经相应分化培养基体外诱导, 可出现成脂、成骨和成软骨的细胞分化现象, 符合间充质干细胞的基本要求(数据未显示)。

将hESC-MSC培养收集得到的上清用于培养HUVEC后, 检测其对HUVEC增殖的影响。结果显示, hESC-MSC的上清在培养HUVEC 2天、4天、6天后, 对HUVEC的增殖均有显著的促进作用(*P*<0.05), 且ADSC和UC-MSC的条件上清液也具有相似作用(*P*<0.05)。hESC-MSC的条件上清与ADSC条件上清在2天、4天的时候相似, 但是均比UC-MSC的条件上清液具有更强的促进HUVEC增殖的作用; 培养到6天以后, hESC-MSC的条件上清液比ADSC和UC-MSC的条件上清液

具有更强的促进HUVEC增殖的作用(*P*<0.05)(图1A)。

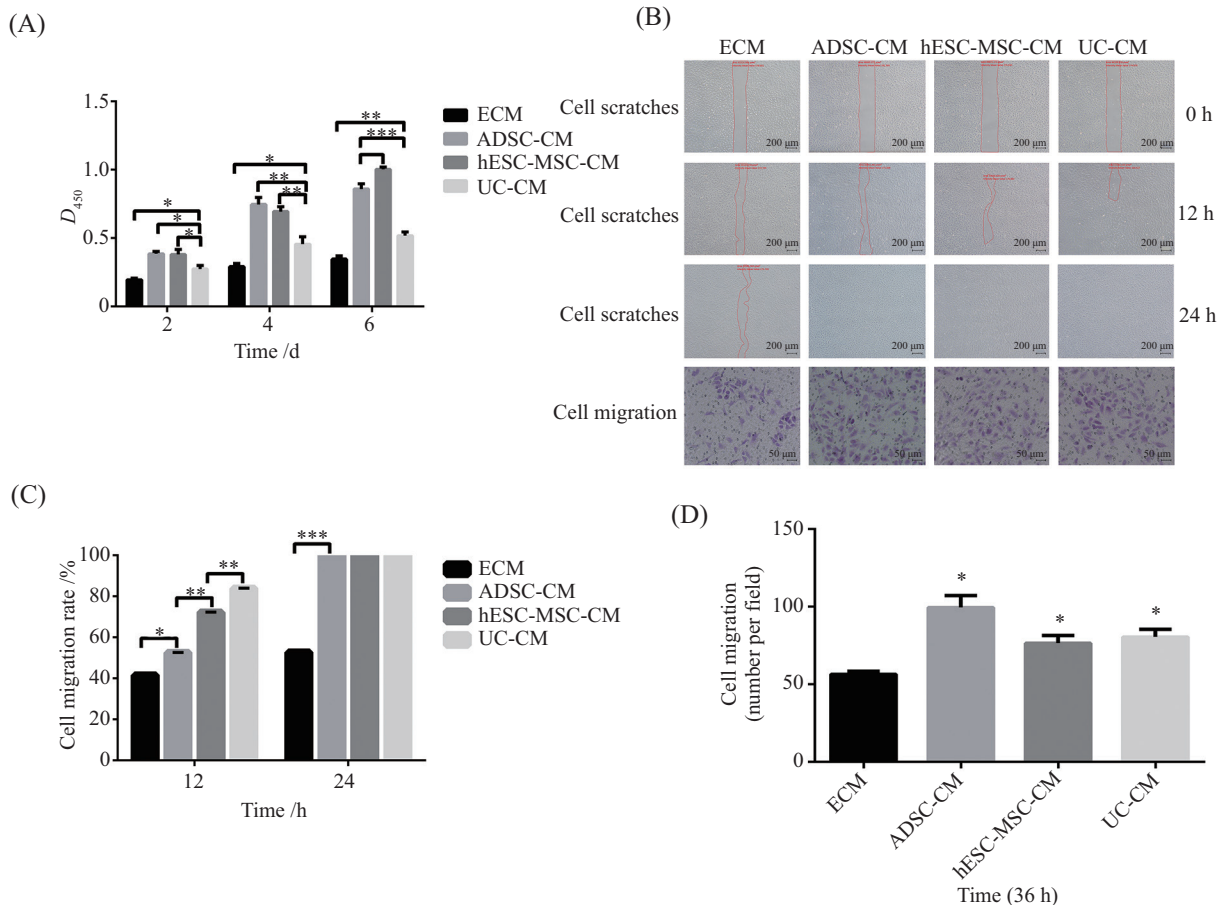
将通过培养hESC-MSC收集得到的条件上清培养液用于培养HUVEC后, 对其在HUVEC迁移中的影响进行了检测。划痕实验结果显示, hESC-MSC的条件上清在培养HUVEC 12 h和24 h后对内皮细胞的迁移有极显著的促进作用(*P*<0.01, 图1B和图1C), ADSC和UC-MSC的条件上清液也具有相似作用(*P*<0.05)。hESC-MSC的条件上清在12 h比ADSC具有更强的促进HUVEC迁移的作用, UC-MSC的条件上清在12 h比ADSC和hESC-MSC具有更强的促进HUVEC迁移的作用, 而在24 h后无差别。Transwell小室迁移结果表明, hESC-MSC的条件上清对HUVEC的迁移有显著的促进作用(*P*<0.05, 图1B和图1D), 与ADSC和UC-MSC的结果相似。

### 2.2 在Matrigel上共培养后hESC-MSC围绕在HUVEC管状结构的四周

hESC-MSC、ADSC与UC-MSC均用CFSE染色, 并分别与经PKH26染色后的HUVEC按照1:3(MSC:HUVEC, 细胞总数为 $1 \times 10^4$ 个)混合接种于Matrigel基质胶上, 培养3 h后可见有管腔样结构形成, hESC-MSC与ADSC和UC-MSC相似, 均定位于HUVEC管状结构的周围(图2A和图2B)。

### 2.3 hESC-MSC向血管内皮细胞分化诱导后分化细胞具有显著成管能力

将hESC-MSC向血管内皮细胞分化诱导12天后, 观察其细胞形态, 结果显示5种方案诱导后的hESC-MSC来源的分化细胞形态变化不一, 部分诱导后的细胞变得更加细长或扁平, 但基本形态均仍为长梭形细胞形态而非典型成熟的血管内皮细胞的鹅卵石状细胞形态, 诱导后的ADSC和UC-MSC与之相似(图3A)。然而, 接种至Matrigel上培养3 h



A: CCK-8检测HUVEC增殖情况; B: MSC条件培养基培养HUVEC后的细胞迁移图像; C: 利用划痕实验对细胞迁移能力进行定量分析; D: Transwell实验对细胞迁移能力进行定量分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: CCK-8 assay was used to evaluate HUVEC proliferation; B: the images of cell migration of HUVEC cultured in MSC conditioned medium; C: quantitative analysis of cell migration ability using Scratch test; D: quantitative analysis of cell migration ability using Transwell experiment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

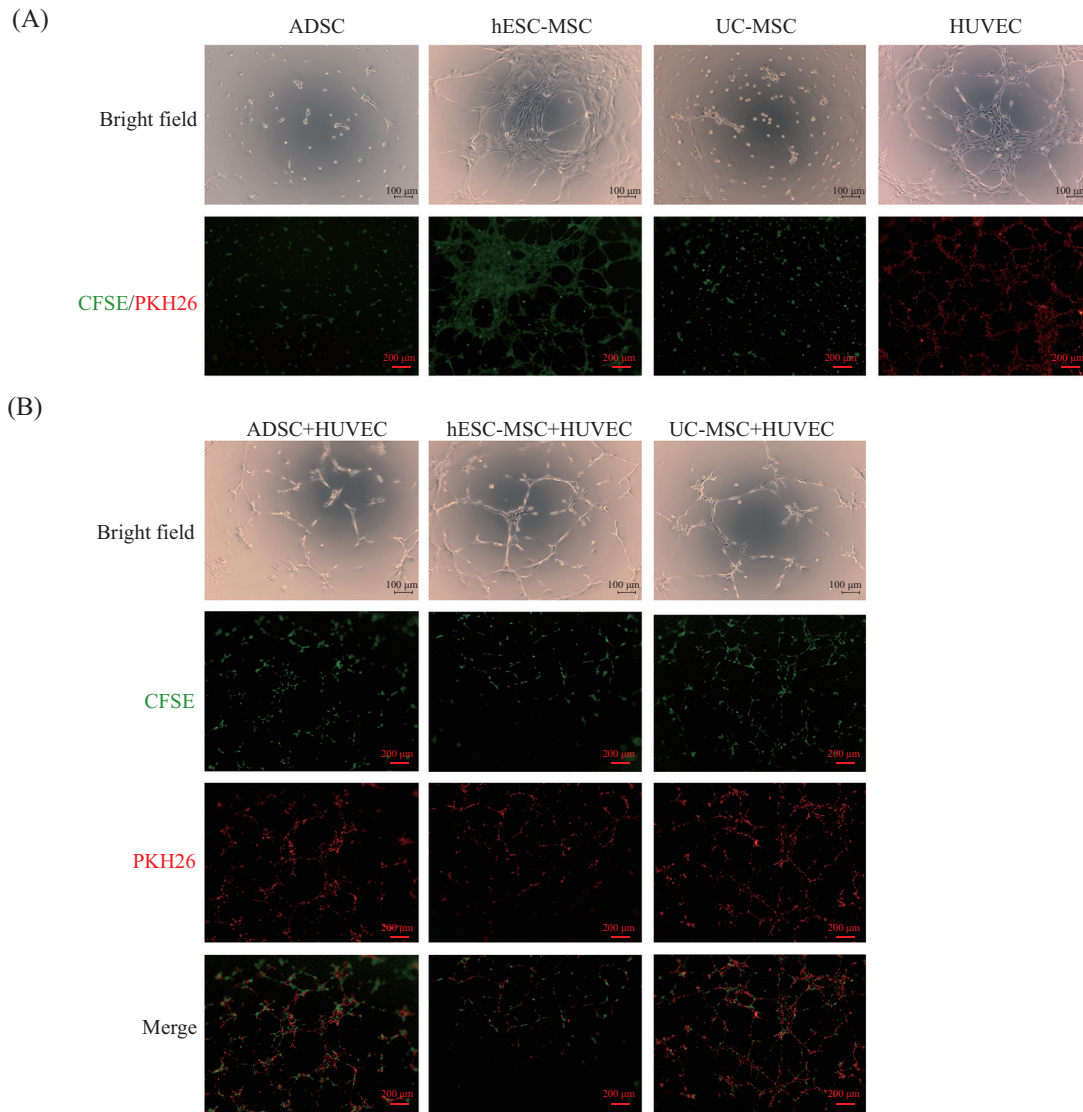
图1 hESC-MSC、ADSC和UC-MSC对HUVEC功能的影响  
Fig.1 Effects of hESC-MSC, ADSC and UC-MSC on HUVEC function

后, ADSC来源的分化细胞仅在Test 2和Test 5显示出类成管能力, UC-MSC来源的分化细胞仅在Test 2、Test 3和Test 4显示出类成管能力, 而hESC-MSC来源的分化细胞在5种诱导方案中均显示出类成管能力。分析生成的类血管网络长度表明, hESC-MSC来源的分化细胞所形成的类血管网络长度在Test 2和Test 5中均显著高于ADSC来源的分化细胞所形成的类血管网络长度( $P < 0.05$ , 图3C), 并且相似于Test 3和Test 4或显著高于Test 2( $P < 0.05$ , 图3C)中UC-MSC来源的分化细胞所形成的类血管网络长度。

#### 2.4 hESC-MSC向血管内皮细胞分化诱导后细胞表面抗原的表达

CD31又称血小板-内皮细胞黏附分子, 存在于血管内皮血小板、中性粒细胞、单核细胞和某些类型的T细胞表面, 以及内皮细胞间连接处, 参与血管生成

的过程<sup>[36]</sup>; CD144(VE-cadherin)是血管内皮细胞黏附连接的重要组成部分, 在维持血管完整性方面起着重要作用<sup>[37]</sup>; CD146也是一种细胞黏附分子, 属于免疫球蛋白超家族, 是一种促进血管生成的内皮生物标志物<sup>[38]</sup>。图4展示了ADSC、hESC-MSC、UC-MSC和HUVEC上这3种标志物的检测结果。同时用流式细胞仪对诱导后的hESC-MSC进行了这3种细胞表面抗原的检测。hESC-MSC在经过12天的诱导培养之后, 均不表达血管内皮细胞特异性抗原CD31和CD144, 表明在经过诱导之后, hESC-MSC在蛋白水平与成熟血管内皮细胞还相差较远, 与诱导后的ADSC和UC-MSC CD31和CD144表达情况相似。但是hESC-MSC的CD146在诱导前后一直保持一个很高的表达水平, 阳性表达率维持在90%以上, 与血管内皮细胞CD146的表达情况相似, 显著高于ADSC和UC-MSC以及诱



A: 对照组血管形成; B: 混合培养组血管形成。

A: tube formation in control group; B: cell tube formation in mixed culture group.

图2 在Matrigel上共培养hESC-MSC、ADSC、UC-MSC和HUVEC

Fig.2 Co-culture of hESC-MSC, ADSC, UC-MSC and HUVEC on Matrigel

导分化后的细胞(阳性表达率<50%,  $P<0.01$ )(图5)。

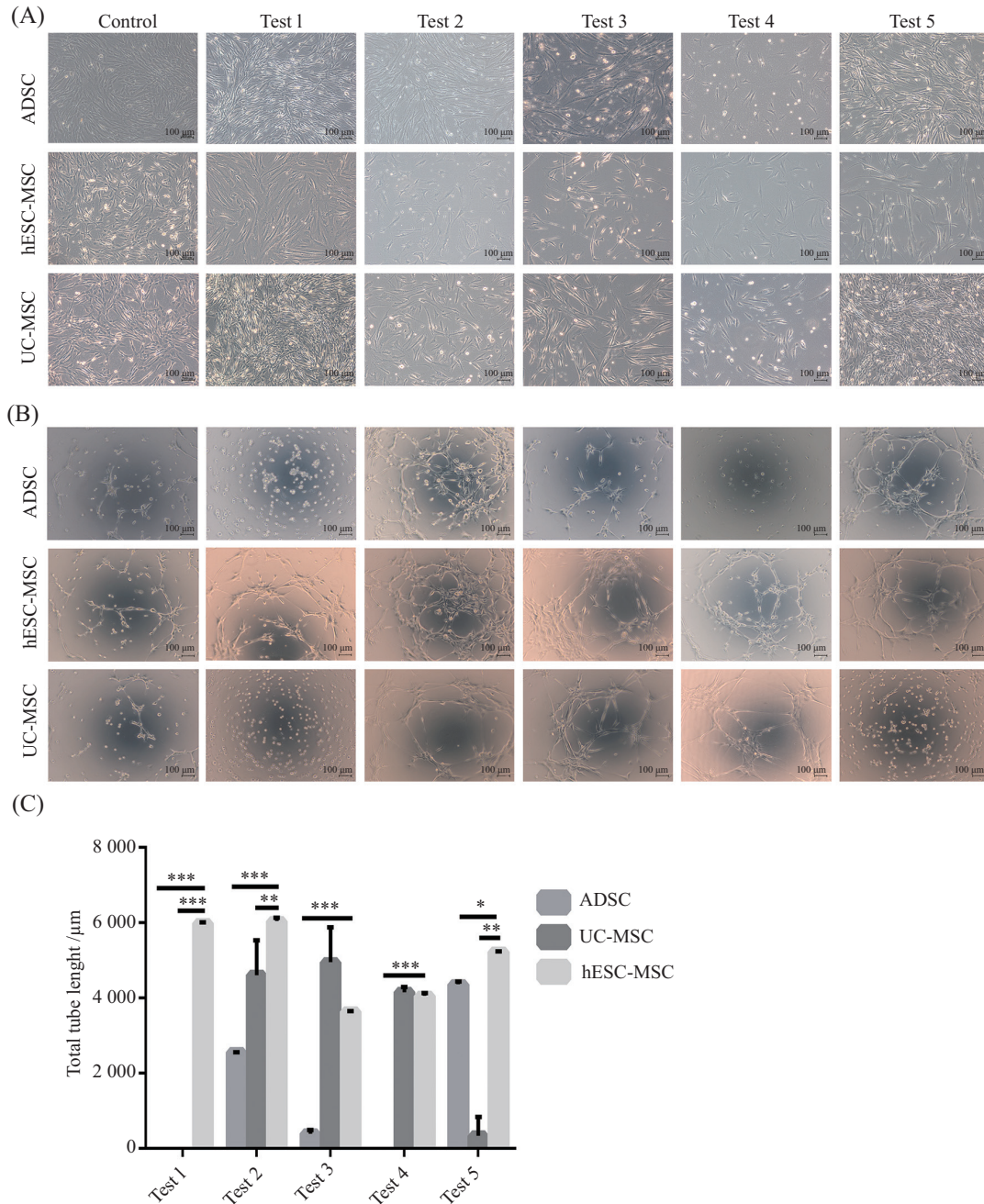
### 2.5 hESC-MSC向血管内皮细胞分化诱导后血管内皮特异性相关基因的表达显著升高

将hESC-MSC细胞向血管内皮细胞分化诱导12天后,提取hESC-MSC细胞的RNA,分别以3种未经过诱导培养的MSC和HUVEC作为对照,采用qRT-PCR检测成血管内皮相关基因 *CD31*、*vWF*和 *VEGFR2*的表达情况。结果显示,通过5种方案诱导后hESC-MSC *CD31*和 *vWF*的表达均显著高于诱导后的ADSC和UC-MSC( $P<0.05$ ,图6)。hESC-MSC的 *VEGFR2*表达在多数分化诱导方案(Test 1、3、4、5)中也显著高于ADSC和UC-MSC诱导分化后的细胞

( $P<0.05$ ,图6)。

### 3 讨论

近年来, MSC受到人们的广泛关注,随着研究的不断深入, MSC在临床上的应用价值也不断体现出来<sup>[39]</sup>。目前, MSC可治疗140多种疾病,尤其是缺血性疾病,可用于修复受损或患病的组织和器官。虽然目前针对MSC的促血管生成治疗展开了大量的研究,但是很多研究只报道了单一组织来源MSC的旁分泌作用对血管内皮细胞功能的影响<sup>[14-15]</sup>或向血管内皮细胞分化的潜能<sup>[18,40]</sup>,而同时进行不同来源MSC对体外血管生成的系统性比较研究报道很



A: 诱导后MSC形态; B: 诱导后MSC细胞成管图像; C: 诱导后MSC管状形成能力的定量分析; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A: MSC morphology after induction; B: the tube formation images of MSC after induction; C: quantitative analysis of tube formation ability of MSC after induction; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图3 诱导后MSC的形态变化和在Matrigel上的管腔形成情况

Fig.3 Morphological changes of MSC after induction and the tube formation on Matrigel

少。hESC-MSC作为一种新的MSC来源相比于组织来源的MSC具有更稳定的生物学特性, 但是其血管生成的功能研究包括其旁分泌促血管作用和向血管内皮细胞诱导分化的潜力尚未见报道。本研究对hESC-MSC在体外血管生成中的作用进行了系统性的研究, 并以ADSC和UC-MSC为对照揭示该新型来源的MSC的促血管生成潜力以及与组织来源MSC

的差异。

我们的结果表明, hESC-MSC的条件培养上清可以显著促进血管内皮细胞的增殖( $P<0.05$ ); 并且其促进血管内皮细胞增殖的能力显著高于UC-MSC( $P<0.05$ ), 也略高于ADSC。这说明, hESC-MSC可能旁分泌更多的血管生长因子或者分泌囊泡如外泌体。已有研究表明, BM-MSC分泌的外泌



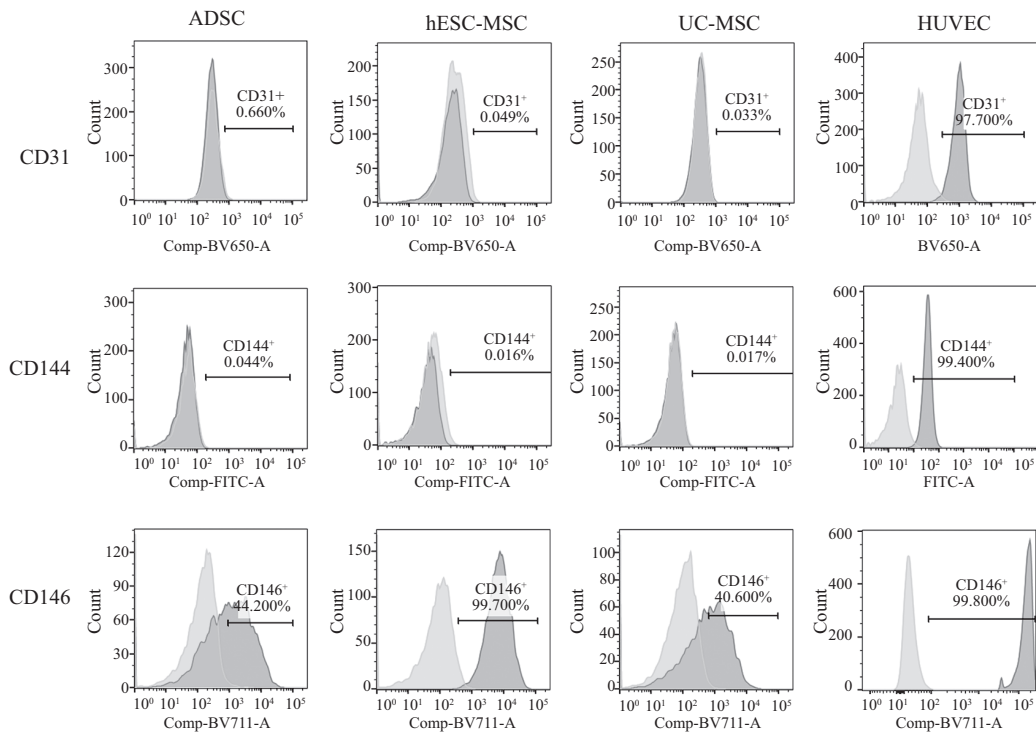


图4 流式细胞仪检测ADSC、hESC-MSC、UC-MSC和HUVEC细胞表面标志物

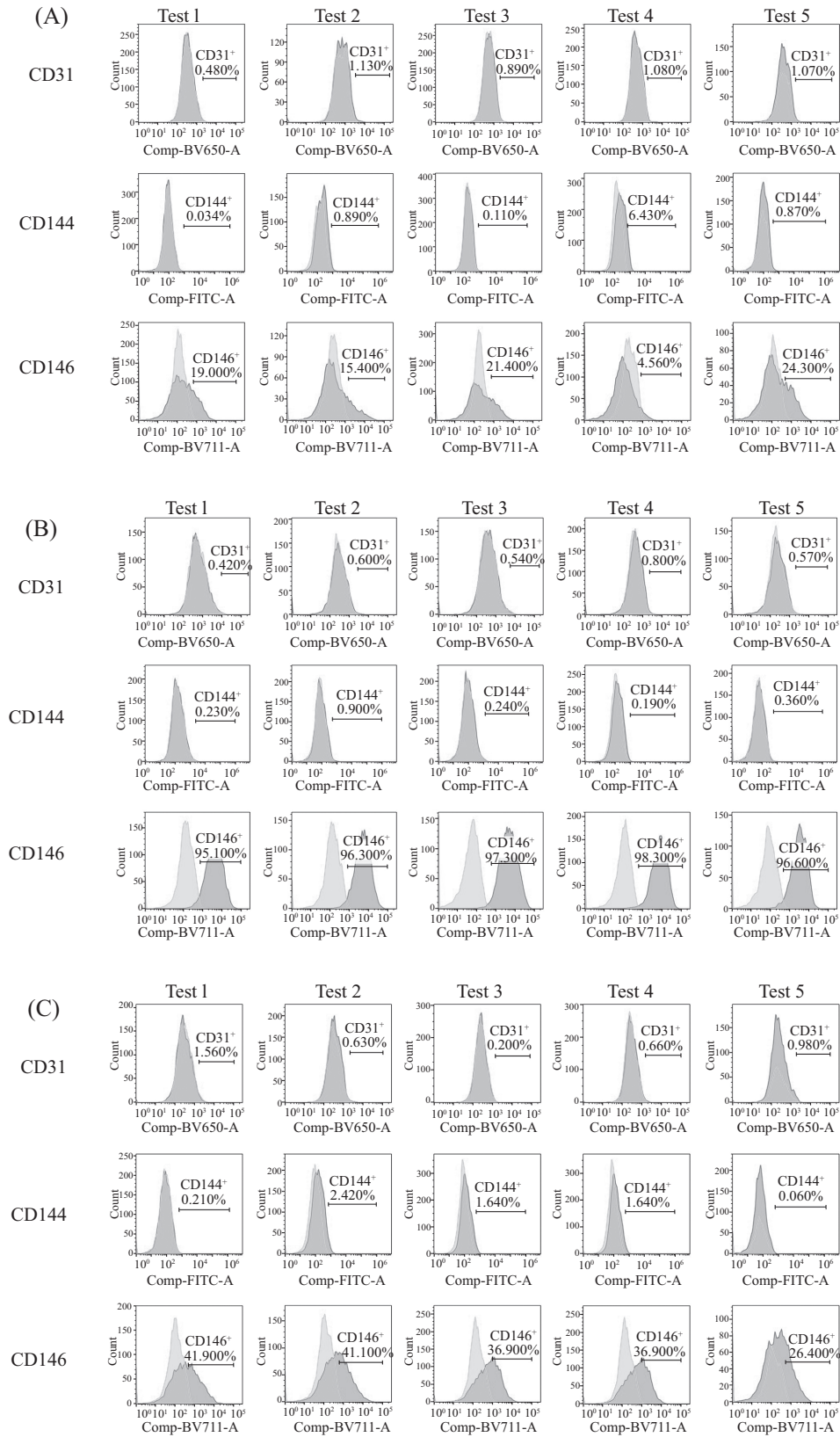
Fig.4 The cell surface markers of ADSC, hESC-MSC, UC-MSC and HUVEC detected by flow cytometry

体可以促使体外的血管生成<sup>[41]</sup>。hESC-MSC来源的条件培养上清同样也可以显著促进血管内皮细胞的迁移。hESC-MSC与HUVEC在Matrigel上混合培养之后，hESC-MSC围绕在HUVEC管状结构的周围，MSC对血管结构起到稳定作用。血管生成需要血管内皮细胞的激活、增殖、迁移，以及新的血管和血管网的形成。我们的结果充分表明，hESC-MSC具有比组织来源MSC如UC-MSC更显著的刺激血管生成作用，如内皮细胞的增殖，尽管其旁分泌的有效活性因子和分泌囊泡如外泌体的作用仍有待进一步确定。

我们的结果同时表明，hESC-MSC被所测试的5种不同血管内皮细胞诱导分化后形成的细胞均具有体外管腔样结构生成的能力，其血管内皮细胞特异性基因包括CD31、vWF和VEGFR2的表达均显著升高，并且显著高于组织来源的UC-MSC和ADSC，诱导分化后的细胞形态与表面抗原的表达没有发生明显变化这可能说明，MSC包括hESC-MSC、UC-MSC和ADSC在经过诱导分化培养之后，其血管内皮细胞特异性基因的表达在蛋白水平尚未显示，故与成熟血管内皮细胞的形态和表面抗原表达还相差甚远。值得注意的是，hESC-MSCs上CD146的表

达在诱导前后均维持很高的水平，这和血管内皮细胞的CD146表达水平相近<sup>[42]</sup>，表明hESC-MSC相比于ADSC和UC-MSC可能具有更高的干性<sup>[43]</sup>。此外，DÍAZ-FLORES等<sup>[44]</sup>于1990年发现骨骼和骨骼周围血管组织有一种细胞具有祖细胞的特性，能促进血管新生和组织修复的功能，将其鉴定为血管周细胞(pericyte)，其高表达CD146<sup>[44]</sup>。而间充质干细胞和周细胞在表面分子、细胞形态和生物学特点上有许多共性<sup>[45-46]</sup>，包括对血管生成的影响。有研究认为，血管周围细胞(perivascular cell)包括微小血管的周细胞和大血管周围的血管外膜细胞(adventitial cell)为间充质干细胞在体内的存在形式<sup>[47]</sup>。因此，hESC-MSC诱导分化后的细胞比ADSC和UC-MSC分化后的细胞具有更显著的促血管生成作用，这可能与诱导分化后hESC-MSC的CD146维持高表达和血管内皮细胞特异性基因CD31、vWF和VEGFR2的高表达有关。

综上所述，hESC-MSC分泌产物具有显著的促进体外HUVEC的增殖和迁移的作用，且比UC-MSC具有更强的促进HUVEC增殖作用；hESC-MSC经过血管内皮细胞定向诱导分化后比ADSC和UC-MSC定向诱导分化后具有更强的体外类血

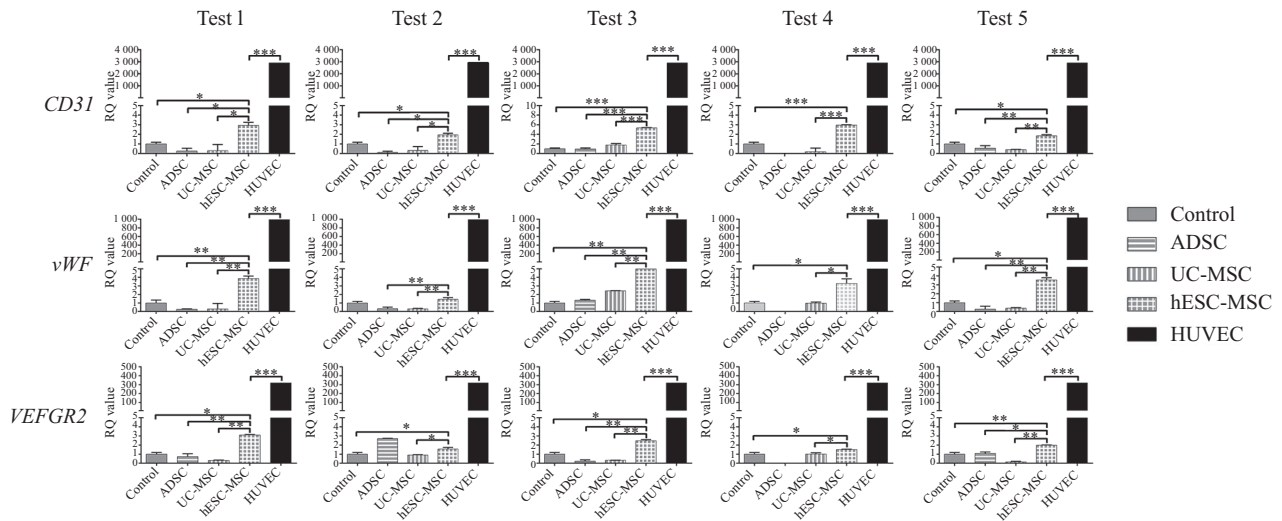


A: 诱导后ADSC表面标记的表达; B: 诱导后hESC-MSC表面标记的表达; C: 诱导后UC-MSC表面标记的表达。

A: the expression of ADSC surface markers after induction; B: the expression of hESC-MSC surface markers after induction; C: the expression of UC-MSC surface markers after induction.

图5 流式细胞仪检测诱导后细胞表面标志物结果

Fig.5 The results of cell surface markers after induction were detected by flow cytometry



RQ: 相对定量。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。  
 RQ: relative quantitative. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图6 qRT-PCR分析诱导后hESC-MSC、ADSC和UC-MSC特异基因表达情况

Fig.6 The expression of specific genes in hESC-MSC, ADSC and UC-MSC after induction was analyzed by qRT-PCR

管网络形成和表达血管内皮细胞特异性相关基因的能力。因此, hESC-MSC可显著促进体外血管生成, 提示该细胞有望成为一种有效的新型心血管疾病的治疗性细胞。

参考文献 (References)

[1] 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2014.  
 [2] 王会梅, 高荣芳, 吕金波. 中西医结合治疗下肢动脉硬化性闭塞症65例[J]. 中国中西医结合外科杂志(WANG H M, GAO R F, LÜ J B. Report of 65 cases of arteriosclerotic obliterans of lower limbs treated with integrated traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Integr Tradit West Med), 2007, 13(4): 398-9.  
 [3] CHAVAKIS E. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(6): 887-93.  
 [4] GAUVIN R, AHSAN T, LAROUCHE D, et al. A novel single-step self-assembly approach for the fabrication of tissue-engineered vascular constructs [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(5): 1737-47.  
 [5] SILVESTRE J. Pro-angiogenic cell-based therapy for the treatment of ischemic cardiovascular diseases [J]. Thromb Res, 2012, 130: S90-4.  
 [6] SUMANTH C S, VAITHINATHAN S, MAHESH T, et al. Thioredoxin-1 (Trx-1) engineered mesenchymal stem cell therapy increased proangiogenic factors, reduced fibrosis and improved heart function in the infarcted rat myocardium [J]. J Am Coll Surg, 2015, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.07.065.  
 [7] ERICES A, CONGET P, MINGUELL J J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood [J]. Br J Haematol, 2015, doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.  
 [8] 李明, 詹成, 代曦煜, 等. 间充质干细胞临床应用的研究进展[J].

复旦学报: 医学版(LI M, ZHAN C, DAI X Y, et al. Advances on mesenchymal stem cells in clinical application [J]. J Fu Dan Univ Med Sci), 2016, 43(4): 469-74.  
 [9] CHOI M, LEE H S, NAIDANSAREN P, et al. Proangiogenic features of Wharton’s jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(3): 560-70.  
 [10] GOTO T, MURATA M. Mesenchymal stem cell therapy in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Rinsho Ketsueki, 2018, 59(2): 195-4.  
 [11] TROUNSON A, MCDONALD C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges [J]. Cell Stem Cell, 2015, 17(1): 11-22.  
 [12] LAZARUS H M, KOC O N, DEVINE S M, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients [J]. Biol Blood Marrow Tr, 2005, 11(5): 389-98.  
 [13] RAHBARGHAZI R, NASSIRI S M, KHAZRAINI P, et al. Juxtacrine and paracrine interactions of rat marrow-derived mesenchymal stem cells, muscle-derived satellite cells, and neonatal cardiomyocytes with endothelial cells in angiogenesis dynamics [J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(6): 855-65.  
 [14] 郑飞, 李霞, 张蕾, 等. 间充质干细胞条件培养液对人脐静脉内皮细胞增殖、迁移和黏附的影响[J]. 中国实验血液学杂志(ZHENG F, LI X, ZHANG L, et al. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on proliferation, migration and adhesion of human umbilical vein endothelial cells [J]. J Exp Hematol), 2012(1): 154-8.  
 [15] KOLBE M, XIANG Z, DOHLE E, et al. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on micro vessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells [J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(17/18): 2199-212.  
 [16] HUANG F, FANG Z F, HU X Q, et al. Overexpression of miR-126 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells

- toward endothelial cells via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways and release of paracrine factors [J]. *Biol Chem*, 2013, 394(9): 1223-33.
- [17] OSWALD J, BOXBERGER S, BJORGENSEN S, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro* [J]. *Stem Cells*, 2010, 22(3): 377-84.
- [18] WANG C G, LI Y, YANG M, et al. Efficient differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endothelial cells *in vitro* [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2018, 55(2): 257-65.
- [19] 郭蕊, 王冰清, 王悦, 等. 脂肪干细胞在面部年轻化中的研究进展[J]. *医学综述*(GUO R, WANG B Q, WANG Y, et al. Research progress of adipose-derived stem cells in facial rejuvenation [J]. *Medical Recapitulate*), 2020, 26(15): 6.
- [20] ROMANOV Y A, SVINTSITSKAYA V A, SMIRNOV V N, et al. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2010, 21(1): 105-10.
- [21] PERA M F, REUBINOFF B, TROUNSON A. Human embryonic stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(21): 5.
- [22] CHEN Y S, PELEKANOS R A, ELLIS R L, et al. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(2): 83-95.
- [23] KIMBREL E A, KOURIS N A, YAVANIAN G J, et al. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(14): 1611-24.
- [24] LI O, TORMIN A, SUNDBERG B, et al. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stroma cells (hESC-MSCs) engraft *in vivo* and support hematopoiesis without suppressing immune function: implications for off-the shelf ES-MSC therapies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55319.
- [25] HAWKINS K E, CORCELLI M, DOWDING K, et al. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells (MSCs) have a superior neuroprotective capacity over fetal MSCs in the hypoxic-ischemic mouse brain [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(5): 439-49.
- [26] TANCHAROEN W, AUNGSUCHAWAN S, POTHACHAROEN P, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid to vascular endothelial cells [J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(2): 113-21.
- [27] SHAMOSI A, MEHRABANI D, AZAMI M, et al. Differentiation of human endometrial stem cells into endothelial-like cells on gelatin/chitosan/bioglass nanofibrous scaffolds [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, doi: 10.3109/21691401.2016.1138493.
- [28] MARTA S, JOAO C, JOAQUIM M, et al. Cultured cell-derived extracellular matrices to enhance the osteogenic differentiation and angiogenic properties of human mesenchymal stem/stromal cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, doi: 10.1002/term.2907.
- [29] CHOU C H, CHENG W T, KUO T F, et al. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real-time polymerase chain reaction [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 82(3): 757-67.
- [30] 王斯琪, 卢海源, 程腊梅. 3种不同组织来源的间充质干细胞促内皮祖细胞血管形成作用的比较[J]. *中南大学学报: 医学版*(WANG S Q, LU H Y, CHENG L M. Angiogenic ability of 3 different tissues-derived mesenchymal stem cells on endothelial progenitor cells [J]. *J Centr South Univ Med Sci*), 2018, 43(2): 184-91.
- [31] 李洁, 叶进培. hESC衍生MSC细胞对CD4<sup>+</sup>-T淋巴细胞特性具有调节功能[J]. *山西大学学报: 自然科学版*(LI J, YE J P. Immunomodulatory effect on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cell [J]. *J Shan Xi Univ Nat sci*), 2020, doi: 10.13451/j.sxu.ns.2019138.
- [32] 刘倩, 刘通海, 叶进培. 人脐带动脉与脐带静脉血管内皮细胞在体外相同培养环境下的定性研究[J]. *中国细胞生物学学报*(LIU Q, LIU T H, YE J P. Differential characterization of human umbilical artery and umbilical vein endothelial cells under same culture conditions *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(4): 114-21.
- [33] DOMINICI M, LEBLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315.
- [34] ARDERIU G, PEA E, ALEDO R, et al. MicroRNA-145 Regulates the differentiation of adipose stem cells toward microvascular endothelial cells and promotes angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2019, 125(1): 74-89.
- [35] XU Y, MENG H, LI C, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells isolated by a novel explantation technique can differentiate into functional endothelial cells and promote revascularization [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(10): 1511-22.
- [36] PARK S, SORENSON C, SHEIBANI N, et al. PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis [J]. *Clin Sci*, 2015, 129(3): 217-34.
- [37] IHSAN C, LAURA L M, BRANDT M M, et al. CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions [J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1): 75-93.
- [38] JIANG T, JIE Z, DUAN H, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2012, 120(11): 2330-9.
- [39] WANG S, QU X, ZHAO R C, et al. Clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 5(1): 19.
- [40] PARK I S, KIM S H, JUNG Y, et al. Endothelial differentiation and vasculogenesis induced by three-dimensional adipose-derived stem cells [J]. *Anat Rec*, 2013, 296(1): 168-77.
- [41] YU M, LIU W, LI J, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/eNOS pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01824-2.
- [42] BAKSH D, YAO R, TUAN R S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. *Stem Cells*, 2010, 25(6): 1384-92.
- [43] 谢静, 赵玉鸣, 饶南荃, 等. 3种口腔颌面部来源的间充质干细胞成血管内皮分化潜能的比较研究[J]. *北京大学学报: 医学版*(XIE J, ZHAO Y M, RAO N K, et al. Comparative study of differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from orofacial system into vascular endothelial cells [J]. *J Peking Univ Med Sci*), 2019, doi: 10.19723/j.issn.1671-167x.2019.05.018.
- [44] DÍAZ-FLORES L, GUTIÉRREZ R, VARELA H, et al. Microvascular pericytes: a review of their morphological and function-

- al characteristics [J]. *Histol Histopathol*, 1991, 6(2): 269-86.
- [45] CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 301-13.
- [46] MEIRELLES L D S, CAPLAN A I, NARDI N B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9): 2287-99.
- [47] CRISAN M, CORSELLI M, WILLIAM C W. et al. Perivascular cells for regenerative medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01617.x.