

人胚胎干细胞向内皮祖细胞诱导分化及其应用研究进展*

吴琼^{1,2,3)} 习佳飞²⁾ 李亚里^{1)**} 裴雪涛^{2)**}

(¹⁾解放军总医院妇产科, 北京 100853; ²⁾军事医学科学院输血医学研究所, 北京 100850; ³⁾解放军三〇七医院妇科, 北京 100071)

摘要 近年来, 内皮细胞的应用价值不断提高, 应用领域不断拓宽, 但其来源有限, 成为研究应用的主要障碍。胚胎干细胞在体外可分化为多种组织细胞系, 有可能成为获取内皮细胞的另一来源。就人胚胎干细胞向内皮祖细胞分化、分离方法、相关分子机制及内皮祖细胞应用价值等进行阐述, 以期能够引起更多的关注, 推动其研究的进展。

关键词 人胚胎干细胞, 内皮祖细胞, 分化, 应用
学科分类号 Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00474

近年来, 内皮细胞(endothelial cells, ECs)的应用价值不断提高, 但因来源有限, 成为研究其应用的主要障碍。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞, 在缺血刺激下可增生、分化为内皮细胞, 在体内具有明显的内皮修复及促血管新生作用^[1]。1999年由Asahara等^[2]首次从人外周血中培养获得EPCs, 但这些细胞只占外周血单个核细胞的0.02%~0.1%^[3-4]。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)来源于植入前囊胚的内细胞团, 分离获得后在特定的培养条件下可以接近无限制的增殖, 并可自发分化为代表内胚层、外胚层和中胚层来源的多种组织细胞系。hESCs与其他干细胞相比具有更强的增殖能力、多能性及低免疫原性^[5], 可诱导分化为EPCs, 因而有可能成为获取内皮细胞的另一来源, 并且可以作为模型在体外研究其分化发育的调控机制。本综述关注于近期人胚胎干细胞向内皮祖细胞分化的相关研究, 探讨人胚胎干细胞向内皮祖细胞的分化途径、分离方法、相关分子机制以及内皮(祖)细胞的临床应用价值。

主要有两种, 一种为经过拟胚体(embryonic body, EB)阶段自发分化, hESCs在低黏附性细胞培养皿里形成EB, 培养9~13天后, 经过不同的消化方法, 利用CD31、CD34、Flk1等抗体分离阳性细胞, 然后在特定培养基中进一步分化培养, 得到内皮或内皮祖细胞, 即所谓的三维(3 dimensions, 3D)方法^[6-8]。另一种为不经过EB阶段, hESCs直接接种于细胞培养皿中或者与基质细胞(OP9、MEF、MS-5等)共培养, 使用有或无血清的培养基进行诱导分化, 获得内皮样细胞, 即二维(2 dimensions, 2D)方法^[9-11]。

分离阳性细胞的方法主要有荧光激活分选细胞术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和磁珠活细胞分选术(magnetic-activated cell separation, MACS)。最早hESCs衍生的EPCs来自于2002年Levenberg研究小组^[6]。他们使用FACS方法分离13天EB中CD31+细胞, 进一步培养后得到EPCs。这些细胞除表达血小板内皮细胞黏附因子1

1 胚胎干细胞诱导形成内皮(祖)细胞的关键技术

1.1 诱导分化方法

目前使用hESCs诱导生成内皮(祖)细胞的体系

* 国家高技术研究发展计划(863)领域重大项目(2006AA02A107), 北京市科委科技计划研发攻关类重大项目(D07050701350702)。

** 通讯联系人。

李亚里. Tel: 010-66938044, E-mail: li_yali@hotmail.com

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

收稿日期: 2009-08-06, 接受日期: 2009-09-14

(PECAM1、CD31)、CD34、Flk-1 (相对应人的KDR, 血管内皮生长因子受体 2)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cad)及能够摄取 Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-Ac-LDL)外, 还表达成熟内皮细胞蛋白血管假性血友病因子(vWF)。

使用相同技术, 分离不同天数 EB, 结果并不完全相同。Wang 等^[7]分离 9~10 天 EB 的 EPCs, 虽然同样表达 CD31、CD34、Flk1、VE-cad, 并能够摄取 Dil-Ac-LDL, 但是不表达成熟的内皮细胞蛋白, 如 vWF、eNOS, 以及造血祖细胞标志物 CD45。因此, 这些祖细胞被称为原始内皮样细胞。产生这些区别的可能原因是细胞来源于不同分化阶段的 EB。来自年幼 EB 的干细胞不表达成熟内皮细胞标志物, 但表达一种或所有 EPCs 标志物, 如 CD31、VE-cad 和 CD34, 而且能摄取 Dil-Ac-LDL。来自晚期 EB 的干细胞, 不仅能够表达上述标志物, 还可以表达 vWF、eNOS 等。原始内皮样细胞在使用不同培养基继续培养后, 不仅能发育为内皮细胞, 也可以发育为平滑肌细胞^[2]。

除经 EB 阶段诱导生成 EPCs 外, 另有采用饲养层细胞直接进行诱导。如 Gerecht-Nir 等^[3]将 hESCs 的单细胞悬液接种在 IV 型胶原包被的孔板中培养 6 天, 经 40 μm 滤网过滤后继续培养 10~12 天, 这些细胞表达 CD34、CD31、AC133 等标志物。Wang 等^[10]将 hESCs 以较高密度种植于小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上, 10 天后分离 CD34+ 细胞, 使用内皮细胞培养基继续培养, 可以得到有功能的内皮细胞。hESCs 与骨髓基质细胞(OP9 细胞系)共培养 8~9 天就可以得到类似的结果^[14-15]。与 MS-5、S17 等基质细胞共培养若干天后也可得到基本相同的结果。

不管何种方法和过程, 多数衍生的 EPCs 均可发育为有活性的内皮细胞, 表达类似于人脐静脉内皮细胞典型的内皮标志物, 如 VE-cad、vWF 及能够摄取 Dil-Ac-LDL 等, 而且还可显示出内皮细胞间的正常连接结构。

另有研究报道 hESCs 在多聚支架或凝胶等三维培育系统中的发育情况。利用三维培育系统, 不仅对理解真正活体内的细胞相互作用、调控细胞分化和形成复杂组织结构的多向机制很重要, 而且对于比较不同祖细胞形成血管网状结构的能力和评估其血管化作用的程度是一种有力工具。Shulamit 研究小组^[9]把 9~10 天的 EB 单细胞种植于 PLGA/PLLA(poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(L-lactic acid))

各占一半的支架上, 发现, 细胞分化和组织结构受支架影响, 在各种生长因子的作用下可以分化为不同胚层的细胞, 并可观察到血管样结构, 分化效率明显高于 EB 的自分化。当把这一结构移植入重度免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠后, 可趋向宿主血管与之桥接, 也可继续表达人类的特异蛋白。这一研究不仅为细胞生物学和发育生物学提供了培养系统, 而且为制造可用的人类组织结构提供了潜在的机制。

虽然已有了 hESCs 向内皮细胞分化的研究, 但当前最大挑战是如何获取足够的细胞数量。经过 EB 阶段诱导分化的效率很低, 只有 1%~3%^[6,8]。其主要原因是, 经过“严酷”消化后得到的单细胞活力明显下降。因而有一些研究小组绕过 EB 形成阶段或者减少分化步骤来提高分化效率^[17-18]。Wang 等^[19]将 hESCs 直接种于 MEF 上, 可得到 10%左右的 CD34+ 细胞, 而后进一步培养成为有功能的内皮细胞。Lu 等^[9]使用一种两步分化方法: 首先形成 EB, 然后把 3.5 天 EB 的单细胞接种到甲基纤维素上, 1 个 6 孔板上可以扩增到 100×10^6 个具有造血和内皮功能的原始细胞(blast cells, BCs)。

还有一些研究针对减少消化步骤, 以期获得更高的阳性细胞。Cho 等^[17]把 9 天的 EB 贴附在培养皿上继续培养 7~9 天, 机械法分离出中央区域, 可以得到 40%的 vWF+ 细胞。Kim 等^[20]使用两步消化法可明显提高分离效率: 把 5 天的 EB 细胞在明胶包被的孔板中贴壁培养 10 天, 利用外周细胞迁移速度高于中央细胞的特点, 先用胰酶-EDTA 消化外周细胞, 而后用细胞解离液收获中央细胞, 可以得到 11.52% CD31+ 和 57.2% vWF+ 细胞。

总之, 虽然目前已有一些 hESCs 向内皮细胞分化的方法, 但总体分化效率不高, 如何获取足够数量的有功能的内皮细胞仍是当前面临的最大挑战。

1.2 人胚胎干细胞来源的内皮细胞的检测方法

目前, 检测人胚胎干细胞来源的内皮细胞的方法主要分体外鉴定和体内移植两方面。体外鉴定包括: VE-cad、CD31 (PECAM1)、CD34 和 Flk-1 染色阳性, 以及对 Dil-Ac-LDL 的摄取。成熟的内皮细胞还可以被 vWF、eNOS 和内皮细胞选择素蛋白(E-selectin)选择性染色。CD31、VE-cad 分布于细胞间裂, vWF 在胞浆中高表达。这些细胞可以在 Matrigel 包被的孔板上形成网格样结构, 植入海绵后形成毛细管样结构。体内移植主要是把内皮细胞

植入 SCID 小鼠体内后, 人 CD31 和 CD34 染色阳性的细胞表现出线性排列^[10], 可以形成含有血细胞的微血管结构.

1.3 人胚胎干细胞分化成内皮细胞不同标志物的表达动力学

为了解胚胎干细胞的分化过程, 已有针对内皮细胞的基因表达图和细胞标志物的表达动力学进行研究. 因为不同研究小组选用了不同的细胞系和培养基, 各标志物出现时间和高峰时间不完全相同.

对已知信息的回顾显示^[6-7, 21-22], 未分化的 hESCs 不表达 CD45、CD31、VE-cad、GATA1、GATA2、VEGF, 也不表达或低表达 CD34、GATA3, 表达 Flk-1、Tie2、CD117、CD133、CDX4、EKLF、OCT3/4 和 PU.1. EB 分化的第 2~3 天, 细胞开始表达 CD34、SCL、GATA1 和 GATA2; 第 3~4 天开始表达 CD31、VE-cad; 第 5 天开始表达 CD41a、CD43; 第 8 天开始表达 CD45、GATA2、GATA3、SCL、PU.1、CDX4 和 EKLF 且在第 6~9 天表达达高峰; CD34、CD31 在第 10~12 天间表达达高峰; 第 13~15 天 VE-cad 表达达高峰. 分化超过 20 天后, Tie2 和 CD133 恒定表达, 而 Flk-1 表达轻微增加.

另外, 已有越来越多的研究结果明确支持内皮和造血细胞共同起源. 胚外卵黄囊血岛的形成标志着鼠胚胎血管发生和造血发育的起点. 血管和内皮细胞的同时发生, 以及它们在卵黄囊血岛内非常近似的位置, 引导出共同祖先假说, 该祖先即血液血管细胞(hemangioblast), 代表来自于未定型的中胚层第一次向造血细胞定向发育. 实际上, 拥有共同标志的内皮和造血祖先受共同通路影响, 并相互影响. 如: Lu 等^[23]首先从 hESCs 分化出原始血细胞, 这些细胞在体外具有与血液血管细胞相同的特点, 在体内能够修复受损的视网膜血管, 修复后肢局部缺血的血流, 降低急性心肌梗死的死亡率. 把这些细胞在不同培养基中继续培养, 不仅可以生成造血细胞和内皮细胞, 还能够生成平滑肌细胞.

2 内皮发育的分子调控机制

血管系统无论对胚胎发育还是成体生物都很重要, 很多疾病都与杂乱的成血管相关, 如: 癌症、动脉粥样硬化、视网膜病变、中风等, 因而研究调控内皮发育的转录因子成为近年来的焦点.

当前的研究发现, 众多的转录因子在激活和维持内皮基因表达方面扮演了重要的角色. 因为内皮

和造血有相同起源, 一些转录因子不仅对内皮发育, 而且对造血发育也起到了重要作用, 如: bHLH 转录因子 Tal1 (SCL)、锌指转录因子 GATA2. Tal1 在胚胎发育早期出现, 调控造血、内皮、神经祖细胞的发育, 敲除 Tal1 的斑马鱼在血管发育过程中会出现严重的缺陷^[24]. GATA2 对于 Flk-1+/Tal1+ 的血液血管干细胞的发育及内皮细胞特殊基因的诱导发挥了重要的作用^[25].

至少有 5 个以上的 Foxhead(Fox)亚家族转录因子在内皮或内皮祖细胞中表达, 如 FoxC、FoxF、FoxH、FoxO 等^[26]. FoxC 亚家族对血管发育非常重要, FoxC1、FoxC2 在内皮细胞早期发育中发挥重要作用, FoxC 蛋白还作为 Ets 蛋白的辅助因子共同调节内皮基因的表达^[27]. FoxH1 在血管发育中起到了抑制作用, 过表达 FoxH1 的斑马鱼损伤了血管发育, 抑制了 flk-1 的表达^[28]. 而 FoxO1 具有双向调节作用, 提示其在内皮发育过程中扮演了调控开关的角色^[29].

虽然有很多转录因子参与了内皮发育的调控, 目前有证据表明 Ets 为最重要的内皮基因表达调控因子. 所有特征性的内皮细胞增强子和启动子上都有多个 Ets 结合位点. 这些 Ets 序列在人类基因组中与内皮调控有非常重要的关联^[27]. 在 Ets 家族中, 如 Ets-1、Elf-1、Fli-1、Tel 和 Erg 等, 每一个因子在内皮基因表达中都扮演了特征性的角色, 都能与增强子结合, 并能激活众多的内皮基因表达, 如: Fli-1 在造血和内皮细胞发育非常早的时期表达. 注射 Fli-1-VP16(编码 Fli-1 固有激活子 mRNA) 诱导了 Tal1、Gata2 及其他血液血管干细胞标志物的表达, 但却不能挽回 Tal1 突变的表型; 同样, 抑制 Gata2 对 Fli-1 的表达没有影响, 而敲除 Fli-1 就没有了 Gata2 的表达, 这表明 Fli-1 在血液血管干细胞和内皮细胞 Tal1 和 Gata2 的上游发挥作用^[30]. Ets 相关的转录因子 Etv2(ER71, Etsrp71)也是在早期参与了血管发育. Etv2 缺失的小鼠在血管发生和血细胞生成方面出现严重障碍. Etv2-/- 的胚胎死于孕中期, 并且没有出现任何可探测的胚胎血管、卵黄囊内的血岛或者内皮祖细胞^[31-32]. 内皮增强子通常有呈簇状分布的多个保守型的 Ets 位点. 增强子功能发挥有赖于一个以上 Ets 位点, 很多内皮增强子被一个以上的 Ets 家族成员结合^[33].

除了对转录因子的研究, 目前有越来越多的证据表明, 特定的 miRNA 参与了造血系列的分化. 在正常的内皮细胞中, 有些 miRNA 含量较丰富,

如 let-7b、miR-16、miR-21、miR-23a、miR-29、miR-100、miR-221 和 miR-222. miR-126 在 EB 来源的 Flk-1⁺ 细胞中富集^[34-35]. miR-221 和 miR-222 发挥了抗血管生成的作用^[35].

以上结果大部分以小鼠和斑马鱼为研究对象. 而要了解人类的内皮发育过程, hESCs 无疑为我们提供了有力的工具. 虽然从 hESCs 分化为内皮细胞的具体通路尚不明确, 但已有一些相关研究在进行. Woll 等^[36]使用 dickkopf1 抑制 Wnt 通路, 明显降低了胚胎干细胞向造血-内皮细胞的转化, 因此认为 Wnt 信号通路可以提高从胚胎干细胞向造血-内皮细胞的转化率. Kelly 等^[37]发现, bFGF 和 VEGF 在人类血管发生的初始阶段没有作用. 使用外源性的 Ihh 可以提高内皮细胞的分化率. 利用 Noggin 或者 BMP4 中和抗体阻断 BMP 信号通路, 抑制了内皮细胞的形成, 而使用人重组 BMP4 可以重新启动内皮细胞的发育. 因而他们认为, Ihh 通过 BMP 信号通路提高了由 hESCs 向内皮细胞的分化率. 而 Suzuki 等^[38]认为 BMPs 通过刺激 VEGF-A/VEGFR2 和 angiopoietin-1/Tie2 信号通路, 可以提高内皮细胞的增殖和迁移能力.

3 内皮(祖)细胞的应用价值

分离和利用 hESCs 来源的内皮细胞具有潜在的治疗意义, 包括为修复缺血组织进行的细胞移植和组织工程的人造血管等. 近期的研究已证明了基于上述目的的应用. 目前注重研究与比较成人内皮细胞和胚胎干细胞来源的内皮细胞在成血管方面的潜能. 诸多证据表明, 内皮和造血细胞共祖先, 对 EPCs 的研究也许还有助于造血干细胞的鉴定和发展. 来自 hESCs 且可移植的造血干细胞对人类医学的意义, 不仅在于对血液恶性肿瘤的治疗, 还在于为预防其他胚胎干细胞来源的组织产生免疫排斥提供有效方法. 目前还有一些研究证明了 EPCs 与肿瘤血管形成及转移的关系^[39-40]. 因此, 研究 hESCs 来源的 EPCs 不仅能促进再生医学发展, 也能对肿瘤治疗起到关键作用.

在更多治疗应用方面, EPCs 有望成为关键因子. 这些应用不仅包括: 为修复局部缺血组织进行细胞移植、血管和心脏瓣膜的形成、人造血管工程、修复受损血管、组织工程中的诱导血管网等, 还有更多、更广泛的有意义的尝试.

3.1 血液病治疗

造血干细胞移植是干细胞治疗的最成功案例,

目前已取得稳定可靠的疗效, 多用于血液肿瘤的治疗. 对一些遗传性血液疾病的治疗, 目前尚无有效方法. 一些研究已经开始针对这些疾病进行. Xu 等^[41]用小鼠 iPS 细胞经过 EB 阶段诱导生成内皮和内皮祖细胞, 将其直接注射到经照射产生血友病 A 的模型小鼠肝脏, 移植后的小鼠至少可以存活 3 个月, 对照组在照射后几小时全部死亡, 移植后小鼠血中 VIII 因子蛋白质水平较野生型有 8%~12% 的提高.

3.2 神经损伤修复

神经细胞生长缓慢, 再生能力差, 损伤后的修复问题长久以来困扰着临床医生, 而 EPCs 却有望改变这一现状.

Sasaki 等^[42]将人外周血 CD133⁺ 的内皮前体细胞静脉注射到急性脊髓损伤的无胸腺小鼠体内, 观察到治疗组固有血管发生和轴突再生有明显提高, 虽然受损脊髓区域管腔形成能力下降, 但功能恢复得到明显改善, 且 VEGF 基因表达明显增强. 因而认为, 内皮前体细胞对脊髓损伤有治疗潜能, 今后有可能应用到人类脊髓损伤的治疗中.

Rauch 等^[43]将内皮细胞和神经祖细胞在可生物降解的复合材料上形成微血管网, 移植到脊髓半切除大鼠模型的损伤部位, 在有功能的血管形成方面, 共培养组比单纯损伤组、单纯材料组、材料+神经祖细胞组提高了 4 倍, 比材料+内皮细胞组提高了 2 倍. 实验组中形成的血管有半数显示为血管屏障抗原(一种血管-脊髓屏障形成的标志物)阳性, 而对照组均为阴性.

Jeong 等^[44]证实, 链脲霉素诱导的糖尿病小鼠, 其坐骨神经的运动和感觉神经在传导速度、血流、毛细血管密度等方面均有降低, 将骨髓来源的 EPCs 注射到后肢后, 上述指标均能恢复到正常水平. 大部分移植的 EPCs 非常独特地与神经滋养血管相邻, 小部分与内皮细胞在同一位置. 共注射了 EPCs 的神经细胞分泌的多种血管和神经生长因子也有显著提高. 神经细胞和内皮细胞在 EPCs 条件培养基中有更高的增殖能力. 故认为 EPCs 对糖尿病性神经损伤的治疗有革命性的意义.

以上均说明 EPCs 对神经损伤的治疗具有诱人的前景.

3.3 成骨作用

Kim 等^[45]将犬骨髓来源的骨原细胞或骨原细胞+内皮细胞种到复合支架上后, 移植到 SCID 小鼠缺损颅骨处, 8 周后观察复合移植组的骨形成较

单纯骨原细胞组有明显的提高,因而证明内皮细胞具备促进骨形成的能力.

3.4 血栓治疗

对于血栓的治疗,临床常用方法为短期内溶栓,晚期病情稳定者放置支架,而对于完全梗阻病例则尚无有效方法. Santo 等^[46]将来源于人外周血单个核细胞的 EPCs 静脉注射到下腔静脉血栓形成 2~4 天的无胸腺的裸大鼠体内,通过激光多普勒测量血流,免疫组化探测血栓内内皮形成的管腔,观察到 EPCs 显著提高了血栓内的新血管形成及血流量,巨噬细胞募集进入正在溶解的血栓内的作用也明显增强. 这似乎为真正意义上的血栓治疗提供了有力的证据.

3.5 实体肿瘤治疗

器官移植后由于需要长期服用抗排斥药,远期恶性肿瘤发生率远高于正常人群. 肿瘤的治疗虽然已经取得了长足的进展,但肿瘤的转移、复发仍是生存率徘徊不前的主要原因. Aninda 等^[47]发现,移植术后常用的抗排斥药环孢霉素 A(CsA)可以提高器官移植后小鼠体内 VEGF 的转录活性. 将小鼠 CT26 恶性肿瘤细胞接种到 MHC 不匹配的移植小鼠体内后, CsA 可明显增加肿瘤形成. 而如果同时使用 VEGF 抗体,则可以明显抑制肿瘤的生长. 这一发现证明内皮细胞参与了肿瘤的形成与生长,抑制内皮细胞功能可以降低肿瘤的生长.

3.6 临床试验

在动物模型研究基础上,目前已开展了一些相关的临床试验. Zhu 等^[48]将自体外周血来源的 EPCs 静脉注射到特发性肺动脉高压的患儿体内,12 周后观察到平均肺动脉压下降 6.4 mmHg,外周血管阻力下降 19%,心输出量增加 0.46 L/min,患儿活动能力得到改善. 说明 EPCs 可以改善特发性肺动脉高压的主要症状,具体机理有待进一步研究.

以上所述说明了内皮(祖)细胞有望在人类心血管、神经、骨骼、肿瘤等疾病的治疗上发挥重要作用. 而随着研究的进展,内皮(祖)细胞的应用价值会得到进一步的延伸和完善.

4 小结与展望

本文阐述了人胚胎干细胞可作为内皮(祖)细胞种子来源,内皮(祖)细胞在细胞治疗、组织工程中的巨大潜在治疗优势. hESC 来源的各种类型的组织细胞已经得到了越来越多的认识,为今后的细胞

治疗以及组织工程的研究奠定了基础. EPCs 的应用研究不再局限于缺血治疗及组织工程中的诱导血管网等,还包括对血友病、脊髓损伤、骨骼缺损、实体肿瘤等的治疗研究. 当前该领域所面临的最大障碍是如何获取大量有功能的内皮细胞,近期的研究已有了明显的改观. 通过对 hESC 来源的内皮(祖)细胞的阐述及深入研究,将为临床应用提供更多的支持并产生深远的影响.

参 考 文 献

- [1] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 2005, **353**(10): 999-1005
- [2] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Res*, 1999, **85**(3): 221-228
- [3] Gehling U M, Ergun S, Schumacher U, *et al.* *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 2000, **95**(10): 3106-3112
- [4] Lin Y, Weisdorf D J, Solovey A, *et al.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*, 2000, **105**(1): 71-77
- [5] Drukker M, Katchman H, Katz G, *et al.* Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(2): 221-229
- [6] Levenberg S, Golub J S, Amit M, *et al.* Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(7): 4391-4396
- [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] Li Z, Suzuki Y, Huang M, *et al.* Comparison of reporter gene and iron particle labeling for tracking fate of human embryonic stem cells and differentiated endothelial cells in living subjects. *Stem Cells*, 2008, **26**(4): 864-873
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Yamahara K, Sone M, Itoh H, *et al.* Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS ONE*, 2008, **3**(2): e1666
- [12] Ferreira L S, Gerecht S, Shieh H F, *et al.* Vascular progenitor cells isolated from human embryonic stem cells give rise to endothelial and smooth muscle like cells and form vascular networks *in vivo*.

- Circulation Research, 2007, **101**(3): 286–294
- [13] 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. *Laboratory Inv*, 2003, **83**(12): 1811–1820
- [14] Maxim A V, Jack A B, James A T, *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] Junfeng J, Kausalia V, Marc B, *et al.* OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, **26**(10): 2485–2495
- [16] Shulamit L, Ngan F H, Erin L, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(22): 12741–12746
- [17] Cho S W, Moon S H, Lee S H, *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*, 2007, **116**(21): 2409–2419
- [18] Lu S J, Feng Q, Caballero S, *et al.* Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nature Methods*, 2007, **4**(6): 501–509
- [19] Lu S J, Luo C, Holton K, *et al.* Robust generation of hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells. *Regenerative Med*, 2008, **3**(5): 693–704
- [20] Kim J, Moon S H, Lee S H, *et al.* Effective isolation and culture of endothelial cells in embryoid body differentiated from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 2007, **16**(2): 269–280
- [21] Zambidis E T, Peault B, Park T S, *et al.* Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hemoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood*, 2005, **106**(3): 860–870
- [22] Sone M, Itoh H, Yamashita J, *et al.* Different differentiation kinetics of vascular progenitor cells in primate and mouse embryonic stem cells. *Circulation*, 2003, **107**(16): 2085–2088
- [23] Lu S J, Ivanova Y, Feng Q, *et al.* Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells. *Regenerative Med*, 2009, **4**(1): 37–47
- [24] Patterson L J, Gering M, Patient R. Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood*, 2005, **105**(9): 3502–3511
- [25] Lugas J J, Chung Y S, Mills J C, *et al.* GATA2 functions at multiple steps in hemangioblast development and differentiation. *Development*, 2007, **134**(2): 393–405
- [26] Papanicolaou K N, Izumiya Y, Walsh K. Forkhead transcription factors and cardiovascular biology. *Circ Res*, 2008, **102**(1): 16–31
- [27] De Val S, Chi N C, Meadows S M, *et al.* Combinatorial regulation of endothelial transcription by Ets and Forkhead transcription factors. *Cell*, 2008, **135**(6): 1053–1064
- [28] Choi J, Dong L, Ahn J, *et al.* FoxH1 negatively modulates flk1 gene expression and vascular formation in zebrafish. *Dev Biol*, 2007, **304**(2): 735–744
- [29] Paik J H, Kollipara R, Chu G, *et al.* FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*, 2007, **128**(2): 309–323
- [30] Liu F, Walmsley M, Rodaway A, *et al.* Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol*, 2008, **18**(16): 1234–1240
- [31] Ferdous A, Caprioli A, Iacovino M, *et al.* Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(3): 814–819
- [32] Lee D, Park C, Lee H, *et al.* ER71 acts downstream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification. *Cell Stem Cell*, 2008a, **2**(5): 497–507
- [33] De Val S, Anderson J P, Heidt A B, *et al.* Mef2c is activated directly by Ets transcription factors through an evolutionarily conserved endothelial cell-specific enhancer. *Dev Biol*, 2004, **275**(2): 424–434
- [34] Ivey K N, Muth A, Arnold J, *et al.* MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(3): 219–229
- [35] Polisenio L, Tuccoli A, Mariani L, *et al.* MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 2006, **108**(9): 3068–3071
- [36] Woll P S, Morris J K, Painschab M S, *et al.* Wnt signaling promotes hemoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood*, 2008, **111**(1): 122–131
- [37] Kelly M A, Hirschi K K. Signaling hierarchy regulating human endothelial cell development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, **29**(5): 718–724
- [38] Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, *et al.* BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells *via* stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem*, 2008, **143**(2): 199–206
- [39] Dingcheng G, Daniel J N, Albert S M, *et al.* Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 2008, **319**(5860): 195–198
- [40] Peters B A, Diaz L A, Polyak K, *et al.* Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature Med*, 2005, **11**(3): 261–262
- [41] Xu D, Alipio Z, Fink LM, *et al.* Phenotypic correction of murine hemophilia a using an ips cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(3): 808–813
- [42] Sasaki H, Ishikawa M, Tanaka N, *et al.* Administration of human peripheral blood-derived cd133+ cells accelerates functional recovery in a rat spinal cord injury model. *Spine*, 2009, **34**(3): 249–254
- [43] Rauch M F, Hynes S R, Bertram J, *et al.* Engineering angiogenesis following spinal cord injury: A coculture of neural progenitor and endothelial cells in a degradable polymer implant leads to an increase in vessel density and formation of the blood-spinal cord barrier. *European J Neuroscience*, 2009, **29**(1): 132–145
- [44] Jeong J O, Kim M O, Kim H, *et al.* Dual angiogenic and

- neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation*, 2009, **119**(5): 699–708
- [45] Kim S S, Park M S, Cho S W, *et al.* Enhanced bone formation by marrow-derived endothelial and osteogenic cell transplantation. *J Biomed Mater Res A*, 2010, **92**(1): 246–253
- [46] Santo S D, Tepper O M, von Ballmoos M W, *et al.* Cell-based therapy facilitates venous thrombus resolution. *Thrombosis and Haemostasis*, 2009, **101**(3): 460–464
- [47] Aninda B, Alan G C, Dipak D, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Research*, 2008, **68**(14): 5689–5698
- [48] Zhu J H, Wang X X, Zhang F R, *et al.* Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Open-label pilot study. *Pediatric Transplantation*, 2008, **12**(6): 650–655

Progress of Differentiating Human Embryonic Stem Cells Into Endothelial Progenitor Cells and Potential Applications*

WU Qiong^{1,2,3}, XI Jia-Fei², LI Ya-Li¹**, PEI Xue-Tao²**

¹ Department of Gynecology and Obstetrics, General Hospital, Beijing 100853, China;

² Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;

³ Department of Gynecology, No. 307 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100071, China)

Abstract Endothelial progenitor cells have great prospect for treatment of many diseases. However, derivation of endothelial progenitor cells *in vitro* is a major restriction for the clinical treatment. Human embryonic stem cells (hESCs) may become an alternative source of endothelial progenitor cells because of their high proliferation capability and *in vitro* pluripotency. Although, there are many challenges for differentiating hESCs to endothelial progenitor cells *in vitro*. Current understanding of this subject from recent discoveries in this field was summarized. Future work will be needed to translate these *in vitro* findings to clinical applications.

Key words human embryonic stem cells, endothelial progenitor cells, differentiation, clinical applications

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00474

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107) and The Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission(D07050701350702).

**Corresponding author.

LI Ya-Li. Tel: 86-10-66938044, E-mail: li_yali@hotmail.com

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

Received: August 6, 2009 Accepted: September 14, 2009