

# 胚胎干细胞分化为血管内皮细胞的分子调控机制

钟 贞 宋后燕\*

(复旦大学分子医学教育部重点实验室, 上海 200032)

**摘要** 胚胎干细胞在不同的诱导条件下具有多向分化的潜能, 多种胞内外信号途径参与其分化过程的调控。现就胚胎干细胞向血管内皮细胞分化的诱导条件及分子机制做一综述, 并阐明不同阶段的内皮前体细胞所表达的不同分子标志, 同时提出胚胎干细胞在再生医学中的应用前景。

**关键词** 胚胎干细胞; 血管内皮细胞; 分化

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)是来自于囊泡阶段的内细胞团(inner cell mass, ICM)的多能性细胞系。ES 细胞具有两个最主要的特性, 其一为以对称性分裂方式增殖保持未分化的状态即自我更新, 其中白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、骨形态发生蛋白受体(bone morphogenetic protein receptor, BMPR)、Nanog、OCT3/4 以及纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)等信号通路在维持 ES 细胞自我更新中起重要的调控作用<sup>[1]</sup>。其二为通过不对称分裂而具有多向分化的潜能, 包括分化为中胚层(如造血干细胞, 血管内皮细胞)、外胚层(如神经细胞, 表皮细胞)和内胚层(如肝脏, 胰腺及肠上皮细胞), 成为进行细胞替代、移植治疗的理想资源。目前, 许多科研机构都致力于体外干细胞分化的研究从而促进再生医学的发展。ES 细胞体外分化模型的建立还有助于干细胞分化的细胞与分子机制的研究。近来, 研究的重点主要是 ES 细胞向神经、内皮以及肝脏细胞等的分化, 本文主要综述 ES 细胞向血管内皮细胞分化过程及其分子机制和前景展望。

## 1 内皮细胞的分化

通过建立拟胚体(embryonic body, EB)和单层细胞分化系统, 不仅能够得到相对较纯的内皮细胞, 而且还能最终形成三维血管结构<sup>[2]</sup>。在胚胎的发育过程中, 原肠胚期后不久, 在内胚层和外胚层之间开始形成独立的中胚层, 血管主要组织被认为来自中胚层。血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR-2, 鼠中又称 Flk-1)被认为是侧板中胚层的标志, 也是最早的血管内皮细胞和血细胞的功能分化标志<sup>[3]</sup>。EB 分化体系中内皮细胞的自发分化通过 RT-PCR 检测能按时依次显示血管内皮细胞标志表达: Flk-1 出现在分化

的第 3 天, 在第 4 天开始变得明显, 而 CD31 和 tie-2 在第 4 天开始出现, tie-1 和血管内皮钙黏着蛋白(vascular/endothelial cadherin, VE-cadherin)在第 5 天开始出现。免疫荧光检测内皮标志蛋白比相应的 mRNA 出现晚 1 天左右。整个分化体系能通过添加内皮生长因子等提高内皮细胞的分化比例, 并致血管结构的出现。CD31<sup>+</sup>/VE-cadherin<sup>+</sup> 的血管结构在生长因子作用下于分化的第 11 天开始在 EB 内部形成<sup>[4]</sup>。通过单层细胞分化体系, Flk-1<sup>+</sup> 细胞于第 4 天开始产生, 这与 EB 分化系统的 Flk-1<sup>+</sup> 细胞出现时间几乎一致。进一步研究表明在纯化的 Flk-1<sup>+</sup> 细胞分化过程中, 部分细胞失去了 Flk-1 的表面标志, 开始表达血管壁细胞的标志, 包括平滑肌肌动蛋白, 血小板来源的生长因子受体  $\beta$  等。而那些未失去 Flk-1 表面标志的细胞开始共同表达其他的内皮细胞表面标志, 如 CD31、VE-cadherin 等<sup>[5]</sup>。Flk-1<sup>+</sup> 细胞成为多种血管细胞包括血细胞、内皮细胞以及血管壁细胞的祖细胞。

Flk-1<sup>+</sup> 细胞继续通过 *Scf* 调控限定性向造血内皮细胞(hemangioblast)分化, *SCL*<sup>-</sup> 的 ES 细胞失去了分化为造血细胞的潜能仅仅分化为内皮细胞和血管壁细胞。Choi 等<sup>[6]</sup>研究发现, 造血细胞和内皮细胞的分化是来自同一始祖细胞——造血内皮细胞。然而, 这个发现却与 Nishikawa 等<sup>[7]</sup>的发现造血细胞来源于内皮细胞系相矛盾。Fujimoto 等<sup>[8]</sup>进一步研究表明: 在 ES 细胞的分化过程中, Flk-1<sup>+</sup> 造血内皮细胞能分化为 GATA-1<sup>+</sup> 和 GATA-1<sup>-</sup> 两群细胞。GATA-1<sup>+</sup> 细胞将产生原始红细胞、巨噬细胞和部分限定性红细胞, 但失去了分化为内皮细胞的潜能。而 GATA-1<sup>-</sup> 将直接分化为 VE-cadherin<sup>+</sup> 血原性内皮细胞(hemogenic EC), 以及由此群细胞分化来的多种限

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-21

\* 通讯作者。Tel/Fax: 021-64033738 E-mail: hysong@shmu.edu.cn

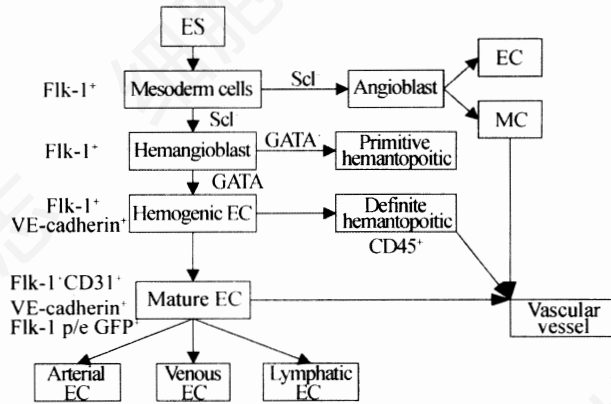


Fig.1 Differentiation of vascular endothelial cells from ES cells<sup>[10]</sup>

定性造血细胞,表明造血细胞有造血内皮细胞和血原性内皮细胞两个分化来源,很好地解决了这个矛盾,并阐明了造血细胞与内皮细胞间分化关系。

Hirai 等<sup>[9]</sup>系统研究了 Flk-1 启动子/增强子(p/e)在造血内皮细胞发育中起到进一步的限定性作用。通过 Flk-1 p/e 诱导绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达,发现 GFP<sup>+</sup> 细胞出现在 VE-cadherin 标志出现后一天, GFP<sup>+</sup>/VE-cadherin<sup>+</sup> 细胞具有分化为造血细胞和内皮细胞的潜能,而 GFP<sup>+</sup>/VE-cadherin<sup>+</sup> 细胞仅仅单一分化为内皮细胞。这说明 Flk-1 p/e 在造血内皮细胞的造血和内皮分化分支点上具有很重要的调节作用。见图 1<sup>[10]</sup>。

## 2 ES细胞分化为内皮细胞的分子调控机制

### 2.1 血管内皮生长因子及其受体在血管发生中的作用

血管内皮生长因子(VEGF)是胚胎发育过程中一个重要的血管形成调节因子。对于血管内皮细胞的分化和发育有很重要的作用。VEGF(即 VEGFA)与不同的酪氨酸激酶受体包括 VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(Flk-1 鼠源/KDR 人源)、VEGFR-3(Flt-4)以及 NRP-1 和 NRP-2 等结合,产生一系列复杂的生理功能。VEGFA 通过与 VEGFR-2 结合,经特异的 PLC $\gamma$ -PKC 信号转导通路,活化 raf-1,激活 MAPK,最终调控与内皮细胞分化及增殖有关的基因<sup>[11]</sup>。Flt-1 在胚胎发育过程中阻止 VEGF 与 VEGFR-2 结合,对内皮分化以及血管形成起负性调控作用,在 Flt-1<sup>-/-</sup> 小鼠中堆积大量的内皮细胞,扰乱了正常血管发育构型,最终导致胚胎死亡。而当 NRP 与 VEGFR-2 共表达时具有促进 VEGF 与 VEGFR-2 结合,促进内皮分化和血管形成。另外,VEGFC 和 VEGFD 与 Flt-4 的相互作用在淋巴管的形成中起重要的调节作用<sup>[12]</sup>。多种刺激因素,包括生长因子(EGF, IGF-1, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , FGF 等),炎症因

子(IL-1 $\alpha$ , IL-6 等),雌激素, p53 突变体以及 NO 等与低氧一起协同调节 *vegf* 转录与表达。其中低氧转录调控最为重要:在低氧的情况下,低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)HIF1 $\alpha$  和 HIF2 $\alpha$  二聚化,在核定位信号(NLS)作用下进入核内,与 HIF $\beta$  结合通过低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)(VEGF 启动子区)促进 VEGF 的转录<sup>[13]</sup>。

### 2.2 Notch-1 与 BMP 在血管形成中的调节作用

Notch 编码约 300 kDa 跨膜受体,该受体胞外部分含上皮生长因子样结构域,胞内部分含转录活化结构域。哺乳动物的 4 种 Notch 受体(Notch1~Notch4)已经克隆。这些受体通过与 5 种配体(Delta-like 即 Dll 1、Dll 3、Dll 4 以及 Jagged 1、Jagged 2)结合发挥作用。由于 Notch 配体和受体都包含跨膜结构,因此信号转导通过关联细胞相互作用而产生。配体受体的相互作用导致胞外片段脱落,紧接着可调控的二次膜蛋白水解使胞内片段脱落,脱落的片段转入核内,与转录因子重组信号序列蛋白(在哺乳动物内为 CBF-1/RJbk,在果蝇中为 Su[H])结合从而调控目的基因如 HES 和 HES 抑制因子(HERP 家族,也称 Hey/Hesr/Hrt/CHF/gridlock)的转录。HES 和 HESR 为特异性的螺旋-环-螺旋转录因子,它们进一步负性调节下游转录因子,特异性地抑制内皮细胞的迁移和毛细血管网的形成<sup>[14,15]</sup>。

Notch-1 基因剔除小鼠在胚胎的 9.5 天及 10 天间因心血管系统紊乱而死亡。然而该基因剔除鼠能够形成最主要的血管网,表明 Notch-1 对于血管形成并不是必须的,但在血管重构中起非常重要的作用<sup>[16~18]</sup>。对于 Notch 的其他 3 个受体 Notch2、Notch3、Notch4 的基因剔除试验却未见到明显的效果。一个有趣的现象:Notch4 剔除小鼠未见有任何异常,但 Notch1 和 Notch4 共剔除却显示比单剔除 Notch1 更加严重的血管紊乱<sup>[19]</sup>,原因有待研究。

在小鼠胚胎发育过程中,原位杂交显示 Notch 持续表达在血管网中,包括动脉和静脉,然而,从胚胎 12.5 天开始,Notch 开始集中于动脉和毛细血管网内皮细胞,到 13.5 天静脉内皮细胞中 Notch 几乎没有表达。这显示了 Notch 在内皮细胞特化中的重要作用(详见内皮细胞的特化)<sup>[20]</sup>。

BMP-4,像其他 TGF $\beta$  家族成员一样,通过结合 I 型、II 型丝/苏氨酸受体二聚体,进一步磷酸化激活受体调节成员 R-SMAD(Smad1, Smad5, Smad8),与 Smad4 形成异二聚体进入核内调节基因转录。在无血清的条件下, BMP-4 通过活化 Smad1/Smad5 路径诱导 FLK-1 的表达。bmp 基因缺陷的小鼠由于不能形成中胚层死于胎龄 7.5~9.5 天; I 型

BMP 受体基因缺陷的小鼠由于不能形成原肠胚, 胎龄不超过 7 天; 而 *Smad1/Smad5* 基因缺陷的小鼠, 在造血和血管的形成方面都显示出严重的缺陷<sup>[21,22]</sup>。在内皮细胞, BMP 通过激活 *Id* 基因的转录, 促进内皮的迁移和血管形成<sup>[23]</sup>。近来发现 BMP 能特异地促进 Notch 下游基因 *HERP* 的转录, 于是 BMP 与 Notch 之间在共同的下游蛋白 *HERP* 上找到了联系<sup>[24]</sup>。Notch 与 Smad 共同作用于 *RBPjk/CBF1*, 诱导 *herp2* 基因表达, 而 *herp2* 蛋白能够通过抑制 *Id* 基因的表达转而抑制 Smad 介导的内皮细胞的迁移<sup>[25]</sup>。

### 2.3 *Scl/Tal-1* 在成血管细胞发育中的作用

*Scl/Tal-1* 是螺旋-环-螺旋结构(HLH)转录因子家族中的一个成员, 对于内皮以及造血的分化调控也起重要作用。通过基因剔除试验研究表明, *Scl/Tal-1* 对于造血体系的发育以及卵黄囊中主要毛细血管丛的正确形成是必需的<sup>[26]</sup>。在体外, *Scl/Tal-1*<sup>-/-</sup> ES 细胞的分化表明它们不能产生血管细胞来源的母细胞集落<sup>[27]</sup>。*Scl* 在 *Flk-1*<sup>+</sup> 细胞向造血内皮细胞(hemangioblast)的限定性分化上起决定性作用。*FLK-1* 与 *Scl* 共表达将导致 ES 细胞分化为内皮和造血细胞, 而 *Flk-1*<sup>+</sup>/*Scl*<sup>-</sup> 的细胞失去了分化为造血细胞的潜能而仅分化为内皮和壁细胞<sup>[28]</sup>。由 *Scl* 赋予的 *Flk-1*<sup>+</sup> 的造血细胞分化潜能也具有一个限制的时间窗, 在 *Scl* 缺陷型 ES 细胞里, 用他莫西芬(tamoxifen)诱导 *Scl* 表达的挽救体系, 只有当 *Scl* 诱导表达在 *Flk*<sup>+</sup> 的中胚层阶段才能挽救造血细胞的分化潜能, 而在稍晚的阶段诱导表达不能挽救<sup>[29]</sup>。

*Scl* 的调节机制尚不清楚。*Scl* 的 HLH 结构将其他转录因子聚集在一起, 发挥成核因子的作用。*Scl* 通过 E 蛋白, 如 *E2A*, 结合到 E 盒(CANNTG), 作为核心连接其他带有 LIM 元件的分子, 如 *Lemo2*、*Ldb1* 等共同构成复合物, 这个复合物再同结合有 *GATA-1*或*GATA-2* 的 *GATA* 调控元件连接发挥转录调节作用<sup>[30]</sup>。

其他转录因子, 如 *GATA* 家族、*Lemo2*、*Runx1* 等在内皮分化过程中也起到重要作用, 它们的调节机制有待进一步研究。

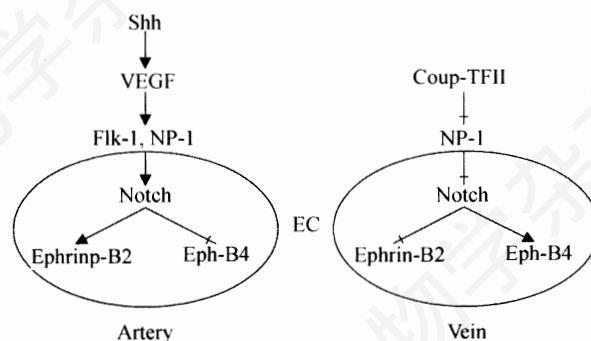
### 3 内皮细胞的特化

近来已经发现了不同的特异性内皮细胞分子标志, 例如酪氨酸激酶受体 *ephrin receptor B4*(*Eph-B4*) 及其配体 *ephrin-B2* 分别为静脉和动脉内皮细胞的分子标志<sup>[31]</sup>, 这一对受体与配体间的相互作用在动静脉的形成中起非常重要的作用。不同的动脉、静脉内皮细胞分子标志见表 1<sup>[32]</sup>。

2002 年, Lawson 等<sup>[32]</sup>提出动静脉的特化是由

**Table 1** Molecular marker of arterial and venous endothelial cells<sup>[32]</sup>

	Arterial endothelium	Venous endothelium
Mouse	<i>ephrin-B2</i> , <i>neuropilin-1</i> , <i>connexin</i> -40, <i>Bmx</i> , <i>Notch1</i> , <i>Notch3</i> , <i>Notch4</i> , <i>Delta-like4</i> , <i>Jagged1</i> , <i>Jagged2</i>	<i>Eph-B4</i>
Chick	<i>ephrin-B2</i> , <i>neuropilin-1</i>	<i>neuropilin-2</i> , <i>tie-2</i>
Zebrafish	<i>Notch5</i> , <i>gridlock</i> , <i>ephrin-B2a</i>	<i>Flt4</i> , <i>Eph-B4</i>



**Fig. 2** Molecular control of arterial-venous endothelial cells<sup>[34]</sup>

成形素(Sonic hedgehog, Shh)起始调节。在这个分子模型中, 体节细胞在发育的大动脉周围分泌 Shh, 并作用于相邻细胞使其分泌 VEGF, 血管内皮接受 VEGF 信号开始上调 Notch 的表达。内皮细胞分子标志 *Eph-B4/ephrin-B2* 是处于 Notch 信号通路的下游分子。在斑马鱼中, Notch 唯一表达于动脉内皮, 因此在动脉内皮, 通过 Notch 信号通路诱导下游的 *ephrin-B2* 的表达, 保持了其动脉特性。同时, Notch 在动脉内皮细胞中对于抑制静脉内皮细胞特异基因 *Flt-4* 和 *Rtk5*(*Ephb4* 在斑马鱼中的同源基因) 的表达也是必须的<sup>[33]</sup>。静脉内皮细胞通过 *COUP-TFII* 转录因子作用于 Notch 信号通路的上游, 通过抑制 Notch 而抑制了 *ephrin-B2* 表达, 从而相对增强了 *Eph-B4* 的表达, 从而保持静脉内皮特性<sup>[34]</sup>。见图 2<sup>[34]</sup>。

### 4 人 ES 细胞与小鼠 ES 细胞在内皮细胞分化上的差异

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES 细胞)于 1998 年开始成功建株<sup>[35]</sup>, EB 来源的内皮细胞的分化<sup>[36]</sup>、单层培养的内皮细胞分化方法<sup>[37]</sup>也已经建立。hES 细胞与小鼠 ES 细胞在内皮细胞分化的总体特征相似, 但也存在一定的差异。与小鼠 ES 细胞相比, hES 细胞的分化周期更长, 几乎为小鼠 ES 细胞分化时间的两倍, 同时, *VEGFR2* 的表达模式也不同, 未分化的 hES 细胞能见到 *VEGFR2* 的

表达, 经过 4 天的诱导分化, VEGFR2 消失, 于 8 天后开始重新出现<sup>[38]</sup>。Gerecht-Nir 等<sup>[39]</sup>在发育 4 周的 hES 细胞形成的 EB 中通过大规模的基因筛选发现了特定的与血管发育相关的上调基因, 包括血管生长因子如 VEGFA、VEGFC、FIGF (VEGFD)、ANG1、ANG2、TGF $\beta$ 3、PDGFB、相关受体如 Flt-1、Flt-4、PDGFRB、TGF $\beta$ R2、TGF $\beta$ R3; 转录因子 TAL1、GATA2、GATA3 以及其他分子标志如 CD34、VCAM1、PECAM1、VE-CAD。这些研究进展为人们进行相关的发育遗传和再生移植治疗研究打下基础。

ES 细胞在向血管内皮细胞分化过程中受 VEGF、Notch、BMP 等多种信号分子调节, 这些信号通路既独立, 又相互联系, 共同完成内皮细胞分化的调控。同时, 不同阶段的内皮前体细胞有不同的分子标志, 有助于人们进一步掌握和控制内皮细胞分化的过程。内皮细胞系分化体系能提供无限量分化细胞, 但是在对于如何控制分化过程, 获得成熟的纯化的内皮细胞株尚有困难。目前常用流式细胞仪对特异的细胞表面分子标志结合其他标志基因的上游调控元件所启动绿色荧光蛋白表达以及抗性基因来对分化体系进行筛选纯化, 如用 Flk-1 启动子/增强子(p/e)<sup>[13]</sup>以及 VE-cadherin 启动子/增强子(p/e)<sup>[40]</sup>组合, 筛选 ES 细胞分化的血管内皮细胞, 并诱导外源目的基因特异性表达于成熟内皮细胞阶段。ES 细胞来源的血管细胞的确能够促进胚胎内的血管形成<sup>[6]</sup>。这些进展推进了血管组织移植治疗以及发育生物学的研究, 显示了再生医学具有广阔的前景。

## 参考文献 (References)

- [1] Rao M *et al. Dev Biol*, 2004, **275**: 269
- [2] Kearney JB *et al. Methods Enzymol*, 2003, **365**: 83
- [3] Yamashita J *et al. Nature*, 000, **408**: 92
- [4] Vittet D *et al. Blood*, 1996, **88**: 3424
- [5] Hirashima M *et al. Blood*, 1999, **93**: 1253
- [6] Choi K *et al. Development*, 1998, **125**: 725
- [7] Nishikawa SI *et al. Immunity*, 1998, **8**: 761
- [8] Fujimoto T *et al. Genes Cells*, 2001, **6**: 1113
- [9] Hirai H *et al. Blood*, 2003, **101**: 886
- [10] Yamashita JK. *Int J Hematol*, 2004, **80**: 1
- [11] Shibuya M. *Cell Struct Funct*, 2001, **26**: 25
- [12] Tammela T *et al. Cardiovasc Res*, 2005, **65**: 550
- [13] Artavanis-Tsakonas S *et al. Science*, 1999, **284**: 770
- [14] Mumm JS *et al. Dev Biol*, 2000, **228**: 151
- [15] Weinmaster G. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, **8**: 436
- [16] Iso T *et al. J Cell Physiol*, 2003, **194**: 237
- [17] Swiatek PJ *et al. Genes Dev*, 1994, **8**: 707
- [18] Conlon RA *et al. Development*, 1995, **121**: 1533
- [19] Krebs LT *et al. Genes Dev*, 2000, **14**: 1343
- [20] Villa N *et al. Mech Dev*, 2001, **108**: 161
- [21] Winnier G *et al. Genes Dev*, 1995, **9**: 2105
- [22] Mishina Y *et al. Genes Dev*, 1995, **9**: 3027
- [23] Valdimarsdottir G *et al. Circulation*, 2002, **106**: 2263
- [24] Iso T *et al. J Cell Physiol*, 2003, **194**: 237
- [25] Itoh F *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 541
- [26] Elefanty AG *et al. Blood*, 1997, **90**: 1435
- [27] Faloon P *et al. Development*, 2000, **127**: 1931
- [28] Ema M *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 380
- [29] Endoh M *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 6700
- [30] Cantor AB *et al. Oncogene*, 2002, **21**: 3368
- [31] Wang HU *et al. Cell*, 1998, **93**: 741
- [32] Lawson ND *et al. Dev Cell*, 2002, **3**: 127
- [33] Thomson JA *et al. Science*, 1998, **282**: 1145
- [34] You LR *et al. Nature*, 2005, **435**: 98
- [35] Adams RH. *J Anat*, 2003, **202**: 105
- [36] Levenberg S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 4391
- [37] Gerecht-Nir S *et al. Lab Invest*, 2003, **83**: 1811
- [38] Sone M *et al. Circulation*, 2003, **107**: 2085
- [39] Gerecht-Nir S. *et al. Dev Dyn*, 2005, **232**: 487
- [40] Hisatsune H *et al. Blood*, 2005, **105**: 4657

## Molecular Mechanisms Regulating the Differentiation of Embryonic Stem Cells into Endothelial Cells

Zhen Zhong, Hou-Yan Song\*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education of China, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Embryonic stem cells (ES cells) are pluripotent cells capable of differentiating into almost all the cell types under different inductive conditions. Multiple signaling pathways participate in regulating the differentiation process. We reviewed the inductive conditions and molecular mechanisms regulating the differentiation of ES cells into endothelial cells and elucidated the molecular markers in different developmental stages of endothelial progenitors based on the current research results. Furthermore, the application perspective of ES cells in regenerative medicine is discussed.

**Key words** embryonic stem cells; endothelial cells; differentiation