

猪iPSCs来源的血管内皮细胞对小鼠下肢缺血的修复作用研究

于杨 李怡美 伟人悦 柴梦佳 刘忠华* 张宇*
(东北农业大学, 黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 该研究利用小鼠下肢缺血模型以及动物活体成像、HE染色、免疫组化、TUNEL染色和Real time-PCR技术, 探讨了病理条件下猪诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)来源的血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)的组织修复功能。研究结果显示, 猪iPSC-ECs的分布范围在移植初期迅速减小, 7天后仅个别小鼠能够检测到荧光示踪信号; 细胞移植28天后, 猪iPSC-ECs处理组的组织形态良好, 总血管密度为(7.66±1.28)%, 显著高于猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFFs)处理组和EGM-2培养液处理组, 缺血组织的凋亡细胞比例为(25.83±2.32)%, 显著低于另外两组; 体外研究表明, 低氧条件下猪iPSC-ECs的促血管生成和抗凋亡基因的表达水平多高于PFFs, 其表达模式与内源性猪血管内皮细胞(aortic endothelial cells, AOCs)类似。由此可见, 猪iPSC-ECs在修复小鼠下肢缺血的过程中, 不仅参与了受损组织的血管生成, 还可能通过旁分泌机制发挥抗凋亡、促修复的作用。猪血管内皮细胞的获得及其功能研究不仅能够为人类血管内皮细胞移植提供实验数据, 也将为心血管药物筛选平台的建立、血管内皮分化和功能障碍的机制研究提供有益参考。

关键词 猪; 血管内皮细胞; 下肢缺血; iPSC细胞; 血管再生

Effect of Porcine Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells on Hind-Limb Ischemia of Mice

YU Yang, LI Yimei, WEI Renyue, CHAI Mengjia, LIU Zhonghua*, ZHANG Yu*

(Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract In this study, the repairing ability of porcine iPSC-ECs (iPSC-derived endothelial cells) was studied by using mouse hind-limb ischemia model, *in vivo* imaging, HE staining, immunohistochemistry, TUNEL staining and Real time-PCR. The results showed that PKH26-labeled iPSC-ECs decreased sharply at the early stage of cell transplantation, and the positive signal could seldom be observed after 7 days. Porcine iPSC-ECs treated group had organized morphology after 28 days of cell transplantation, and its total vessel density was (7.66±1.28)%, which was significantly higher than those of PFFs (porcine fetal fibroblasts) and EGM-2 treated groups. The apoptotic cell percentage of iPSC-ECs treated group was (25.83±2.32)%, which was significantly lower than those of the other two groups. *In vitro* study showed that, under hypoxic condition, the expression levels of pro-angiogenesis and anti-apoptotic genes of porcine iPSC-ECs were higher than those of PFFs, which was similar to porcine AOCs

收稿日期: 2021-07-04

接受日期: 2021-09-06

国家重点研发项目(批准号: JFYS2016ZY05002032)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55101729, E-mail: liu086@126.com; Tel: 0451-55101729, E-mail: yuzhang@cau.edu.cn

Received: July 4, 2021

Accepted: September 6, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No. JFYS2016ZY05002032)

*Corresponding authors. Tel: +86-451-55101729, E-mail: liu086@126.com; Tel: +86-451-55101729, E-mail: yuzhang@cau.edu.cn

(aortic endothelial cells). These results suggest that porcine iPSC-ECs not only promote angiogenesis by fusion, but maybe play a role in anti-apoptosis and pro-angiogenesis by paracrine mechanism as well. Studies on porcine iPSC-ECs, on one hand, provide us experimental data for human endothelial cell transplantation, on the other hand, are beneficial for the establishment of cardiovascular drug screening platform and the understanding of endothelial differentiation and cardiovascular dysfunction.

Keywords pig; endothelial cells; hind limb ischemia; iPS cells; angiogenesis

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)具有预后差、高致残致死等特征,严重影响人们的生活质量。近年来,全球的CVD患病人数逐年增加,从1990年的2.71亿增至2019年的5.23亿^[1]。2019年的中国心血管健康与疾病报告显示,我国CVD患者数为3.3亿^[2]。血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)具有维持血管壁完整、调节血管透性和张力等功能,其功能失调是CVD的主要致病因素之一^[3-4]。此外,随着CVD的进展,血管腔中的ECs逐渐耗尽,随之就会出现非灌注和组织缺血等问题,如动脉粥样硬化、缺血性心脏病等^[5]。

1997年,ASAHARA等^[6]证实从人外周血分离的内皮祖细胞或经过进一步培养得到的内皮细胞具有临床治疗价值。自体CD34⁺细胞移植可以改善缺血组织的灌注和功能,并降低严重肢体缺血患者的截肢率^[7-8]。患者自体内皮细胞来源有限或本身存在病变,这是阻碍内皮细胞自体移植用于临床治疗的重要因素。诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的出现从理论上解决了上述问题,此后,iPSCs向内皮细胞定向诱导的研究越来越多^[9-10]。2009年有研究表明,人iPSCs来源的ECs的形态功能与人胚胎干细胞来源的ECs高度一致,均表达内皮标记基因、吸收低密度脂蛋白、形成血管网络等,但其分化效率相对较低^[10-11]。2017年,科研人员通过激活WNT信号通路启动多能性干细胞向中胚层分化,再通过调控MAPK、PI3K信号通路促使其进一步分化为内皮祖细胞,该方法得到的CD31和CD144双阳性细胞高达96%^[12]。

从遗传学角度,相对于啮齿类小型实验动物,猪的心血管系统在解剖结构、脂类代谢、药物反应等方面更接近于人类,寿命又相对较长,因此被认为是研究人类心血管及代谢性疾病的良好模型^[13-15]。然而,相对于人和小鼠,猪血管内皮细胞的相关研究报道十分有限。早期研究中,科研人员主要从猪间充质干细胞诱导获得血管内皮细胞^[16-17]。2013年,GU等^[18]

首次将猪脂肪间充质细胞来源的iPSCs通过拟胚体诱导法获得ECs,并证明该细胞可以通过旁分泌的方式改善心肌梗死动物的心功能。2020年,本实验室首次报道了猪iPSCs定向诱导为ECs的无血清单层细胞培养方法,并通过实验证实获得的细胞具有良好的体内外成血管功能^[19-20]。

本研究基于实验室前期结果,利用小鼠下肢慢性缺血模型研究了病理条件下猪iPSCs来源的血管内皮细胞的组织修复功能及其可能机制。猪血管内皮细胞的获得及其功能研究不仅能够为人类血管内皮细胞移植提供实验数据,也将为心血管药物筛选平台的建立、血管内皮分化和功能障碍的机制研究提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 大白猪iPSCs、大白猪iPSC-ECs和大白猪胎儿成纤维细胞(porcine embryonic fibroblasts, PFFs)为本实验室现存细胞。AOCs购买自Abmgood公司。

1.1.2 实验动物 制备饲养层细胞所用的C57BL/6N雌鼠、DBA/2雄鼠,制备下肢缺血模型所用的非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)雄鼠均购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物的饲养及模型制备严格按照东北农业大学实验动物福利与伦理标准(编号:NEAUEC20)执行。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 猪iPSCs培养在MX无血清培养液中,每天更换培养液,IV型胶原酶消化传代。MX培养液含有38% KO-DMEM、24% DMEM/F12、24% Neurobasal、10% KOSR、0.5% NEAA、0.25 mg/mL BSA、0.25% N2、0.5% B27、0.145 mg/mL L-Glutamine、3.9 μg/mL β-mercaptoethanol、5 ng/mL hLIF、8 ng/mL hFGF2和1%双抗。

PFFs用含有15%胎牛血清的DMEM培养液培养, 胰蛋白酶消化传代。猪iPSC-ECs的诱导分化方法见实验室前期报道, 该细胞能够表达血管内皮细胞特异性基因、吸收低密度脂蛋白并具有良好的体内外成血管能力^[19-20]。猪iPSC-ECs和AOCs培养在含有50 ng/mL血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的EGM-2培养液中。

为了研究不同氧含量对细胞成血管及抗凋亡相关因子表达情况的影响, 将PFFs、猪iPSC-ECs和AOCs分别在正常氧(20%)和低氧(5%)条件下培养24 h, 并检测其促血管生成和抗凋亡基因表达水平。

1.2.2 活细胞示踪 选用PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kits进行活细胞标记。根据生产商提供的操作流程进行实验: 将样本消化为单个细胞, DPBS清洗后800 r/min离心5 min, 弃上清, 1 mL Diluent C重悬细胞; 另取1 mL Diluent C加入4 μ L PKH26乙醇染料溶液, 使其浓度为 4×10^{-6} mol/L; 将细胞悬液与染料溶液混匀, 室温孵育3 min, 加入等体积(2 mL)血清孵育1 min终止染色, 800 r/min离心10 min, 弃上清; DPBS充分清洗后1 200 r/min离心5 min, 弃上清, 200 μ L DPBS重悬细胞, 使用FACSCalibur流式细胞仪分选标记细胞, 使用Flowjo软件分析染色效率。

1.2.3 小鼠下肢缺血模型的构建 选用7周龄非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)雄鼠构建下肢缺血模型, 并将其随机均分为3组: EGM-2培养液处理组、PFFs处理组和猪iPSC-ECs处理组。

小鼠禁食处理12 h后, 于其左下肢内侧使用脱毛膏彻底清除毛发。腹腔注射即用型麻醉剂三溴乙醇阿佛丁0.2 mL/10 g, 待小鼠完全麻醉后, 将其仰卧绑定并用碘伏消毒手术部位。小鼠左下肢内侧沿股动脉切开一个1 cm长的切口, 股动脉近端处用医用丝线(上海浦东金环医疗用品有限公司, 货号F416)双扣结扎, 股动脉远端内收肌部位多点注入细胞或EGM-2。使用PGA快吸收缝线(上海浦东金环医疗用品有限公司, 货号KCR731)缝合外部伤口, 涂双抗, 待小鼠完全苏醒后归笼饲养。

1.2.4 活体成像 分别于术后1天、3天、7天和14天利用动物活体成像系统(BERTHOLD, 型号Night-owl LB983)监测细胞的定位及数量。小鼠麻醉后仰卧绑定于荧光成像区域, 使用IndiGO2软件操作系统完成图像采集及数据处理。待小鼠完全恢复后归笼饲养。

1.2.5 石蜡包埋与HE染色 术后28天处死小鼠, 收集内收肌组织并置于4%多聚甲醛中固定24 h, 浓度梯度酒精(30%、50%、70%、80%、90%、100%、100%)各脱水30 min, 酒精和二甲苯1:1透化10 min, 二甲苯透化2次, 每次10 min至组织透明, 浸蜡2次, 每次1 h, 石蜡包埋。使用切片机(Leica, 型号RM2235)切片, 厚度为7 μ m。石蜡切片在65 $^{\circ}$ C的烘箱中烘片1 h, 二甲苯中脱蜡后将其依次转入浓度梯度酒精(100%、90%、80%、70%)中复水, 苏木精染色3 min后水洗, 0.5%盐酸乙醇分化20 s, 伊红染色30 s后水洗, 迅速放在80%、90%、100%的浓度梯度酒精中脱水。使用中性和树胶封片, 在Nikon 80i显微镜下观察染色情况。

1.2.6 免疫组化 石蜡切片脱蜡、复水(同1.2.5)后, 用3% H_2O_2 处理15 min, 以灭活内源性酶及封闭内源性生物素。室温透膜、封闭后, 于4 $^{\circ}$ C一抗(CD31, Abcam, 货号ab28364; Vimentin, Sigma, 货号V6630)孵育过夜。次日, DPBS清洗, 37 $^{\circ}$ C二抗孵育1 h, DPBS清洗。Hoechst 33342染细胞核2 min, DPBS清洗, 滴入防荧光淬灭剂, 封片。在Nikon Ti-S荧光显微镜下观察染色情况。

1.2.7 实时定量PCR Trizol法提取样本总RNA, 使用反转录试剂盒High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI, 货号4368814)获得cDNA。Real-time PCR采用SYBR Green Real time PCR Master Mix-Plus试剂(TaKaRa, 货号RR420A)和ABI7500实时定量PCR操作系统进行。数据使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析, 引物信息见表1。

1.2.8 TUNEL染色 使用TUNEL Bright Green Labeling Mix Apoptosis Detection Kit(Vazyme, 货号A112-01)进行实验。石蜡切片脱蜡、复水(同1.2.5)后, 用终浓度为20 μ g/mL的Proteinase K处理15 min。DPBS润洗3次, 每次5 min, 滴加1 \times Equilibration Buffer覆盖样本待检测区, 室温孵育30 min。避光配制染色液50 μ L(34 μ L ddH₂O、10 μ L 5 \times Equilibration Buffer、5 μ L Bright Green Labeling Mix、1 μ L Recombiat TdT Erzyme)并将其滴加至覆盖样本待检测区, 37 $^{\circ}$ C湿盒中避光孵育1 h。DPBS清洗后Hoechst 33342染2 min, DPBS清洗, 滴加防荧光淬灭剂, 封片。在Nikon 80i显微镜下观察并拍照。

1.2.9 统计分析 为了评估猪源细胞的血管融合能力, 我们对不同处理组的组织切片进行了抗CD31(同时与小鼠和猪源细胞结合)及猪特异性抗

表1 实时定量PCR引物信息表
Table 1 Real time-PCR primer information

基因 Gene	上游引物 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	下游引物(3'→5') Primer sequence (3'→5')	长度/bp Length /bp
<i>VEGFA</i>	GCG AGG CAA GAA AAT CCC TG	TTA ACT CAA GCT GCC TCG CC	130
<i>IL10</i>	ACC TGG AAG ACG TAA TGC CG	GGG CAG AAA TTG ATG ACA GCG	125
<i>TIMP1</i>	AGC TGG ACA ACT GTG GAA CG	GCA GGG AAA CAC TGT GCA TT	142
<i>TIMP2</i>	CTC CAG GTG CAT TGA TCA GG	ACT GGA TCC GTT TGA TGG GG	93
<i>GATA4</i>	GCT CTC TGT CCC AGA CCT TCT	CTG ACC GAA GAT GCG TAG CC	112
<i>CSF3</i>	AAT TTC CTC CCA GGC CTC CA	GCA GCT GCA GGG CCA TC	143
<i>ANGPT1</i>	CCA GGA ACT GAA AAA GCA ATT GAA C	CCT CCC TTT AGT AAA ACA CCT TCT	135
<i>ANGPT2</i>	GCT AAG CAC TCC CTT GTT GC	ATG TCG CAG TAA GCC TTG GT	143
<i>BCL2</i>	TCT TTG AGT TCG GTG GGG TC	CAA GGAA AAT TCA AGT AAT CCA GCC	155
<i>IFNA1</i>	TGA AGA ATT GGA AAG AGG AGA GTG A	TGC TCC TTT GAA TGG CCT GG	111
<i>TNF</i>	GCC CAA GGA CTC AGA TCA TCG	ATT GGC ATA CCC ACT CTG CC	108
<i>FGFR2</i>	GTA ACA GCA AGA GAG CCC CG	TTC CCG TTT TTC AGC CAC CT	145
<i>GAPDH</i>	GCA AAG TGG ACA TTG TCG CCA TCA	TCC TGG AAG ATG GTG ATG GCT T	160

vimentin(仅与猪源细胞结合)抗体双重染色, Image J 软件用于分析总血管密度(CD31阳性)、猪源细胞形成血管密度(CD31和vimentin双阳性)及猪源细胞血管嵌合度(CD31和vimentin双阳性/CD31阳性)。每个样本随机检测6个视野, 其结果用于统计分析。

统计分析所使用的软件是SPSS 21.0版本, 不同处理间的差异采用ANOVA分析方法, $P < 0.05$ 认为存在显著差异。

2 结果

2.1 小鼠下肢缺血模型的建立及细胞移植

将7周龄的NOD/SCID雄鼠随机分为3组, 结扎其左下肢股动脉近端构建下肢缺血模型, 并于其股动脉远端内收肌多点注射 1×10^6 个猪iPS-ECs、PFFs和相同体积的EGM-2培养液(图1A和图1B)。PKH26标记的猪iPS-ECs呈现红色荧光, 流式分析显示其阳性率为 $(99.07 \pm 1.32)\%$ (图1C和图1D)。

2.2 移植细胞在小鼠体内的定位

细胞移植1天、3天、7天和14天后, 我们通过动物活体成像系统检测了荧光标记细胞在小鼠缺血下肢的定位及范围。结果显示, 随着观察时间的延长, 细胞荧光信号逐渐减弱, 移植7天后, 仅有个别小鼠能够检测到PKH26阳性信号, 移植14天后, 其阳性信号完全消失(图2)。

2.3 移植细胞对缺血组织的血管修复作用

为了比较不同处理对小鼠缺血组织的修复作

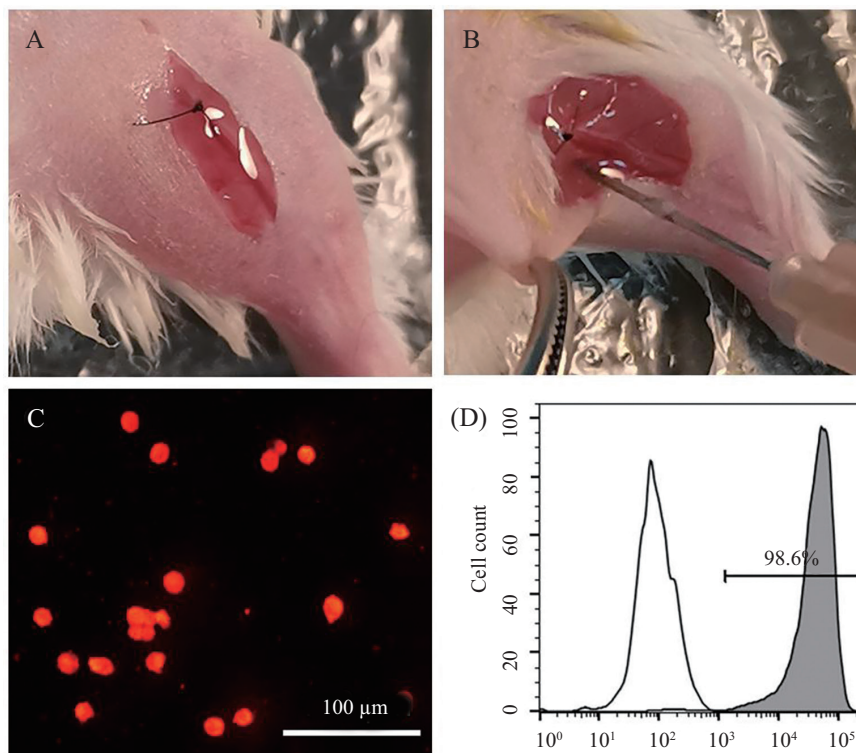
用, 术后28天, 我们首先进行了基于HE染色的组织学鉴定。结果显示, EGM-2处理组的肌肉组织部分溶解、坏死, 并伴有炎性细胞浸润; PFFs处理组相对完整, 但可见纤维化的组织结构; 猪iPSC-ECs处理组形态良好, 并有少量微血管样结构生成(图3A~图3C)。进一步的免疫组化检测结果显示, EGM-2处理组可见少量CD31阳性的血管样结构; PFFs和猪iPSC-ECs处理组CD31阳性的血管样结构相对较多, 且部分来源于移植细胞(图3D~图3O)。统计分析结果显示, 猪iPSC-ECs处理组的总血管密度为 $(7.66 \pm 1.28)\%$, 显著高于PFFs处理组 $(4.24 \pm 0.68)\%$ 和EGM-2处理组 $(1.94 \pm 0.73)\%$, 且三组间均存在显著差异; 血管样结构中, 猪iPSC-ECs处理组的移植细胞占比 $(54.59 \pm 8.05)\%$, PFFs处理组的移植细胞占比 $(41.37 \pm 8.13)\%$, 两者没有显著差异(图3P~图3R)。

2.4 猪iPSC-ECs移植对缺血组织的抗凋亡作用

细胞移植28天后, 我们检测了缺血下肢的组织凋亡情况。TUNEL染色结果显示, 3个处理组的内收肌组织均存在大量凋亡细胞(图4A~图4C)。统计学结果表明, EGM-2处理组凋亡细胞占比为 $(42.67 \pm 4.55)\%$, PFFs处理组细胞凋亡占比为 $(38.5 \pm 4.81)\%$, 二者皆显著高于猪iPSC-ECs处理组 $(25.83 \pm 2.32)\%$ 。

2.5 低氧对猪iPS-ECs的成血管及抗凋亡相关因子表达的影响

考虑到小鼠体内移植细胞的短期存留与其促



A: 股动脉近端双扣结扎; B: 股动脉远端内收肌多点肌内注射; C: PKH26标记猪iPSC-ECs; D: 流式细胞分析PKH26标记细胞的阳性率。
A: femoral artery proximal ligation by double knots; B: injection of cells or medium control into adductors at the distal end of femoral artery; C: porcine iPSC-ECs are labeled with PKH26; D: flow cytometric analysis of PKH26 positive cells.

图1 小鼠下肢缺血模型的建立及细胞移植

Fig.1 Establishment of mouse model of hind limb ischemia and cell transplantation

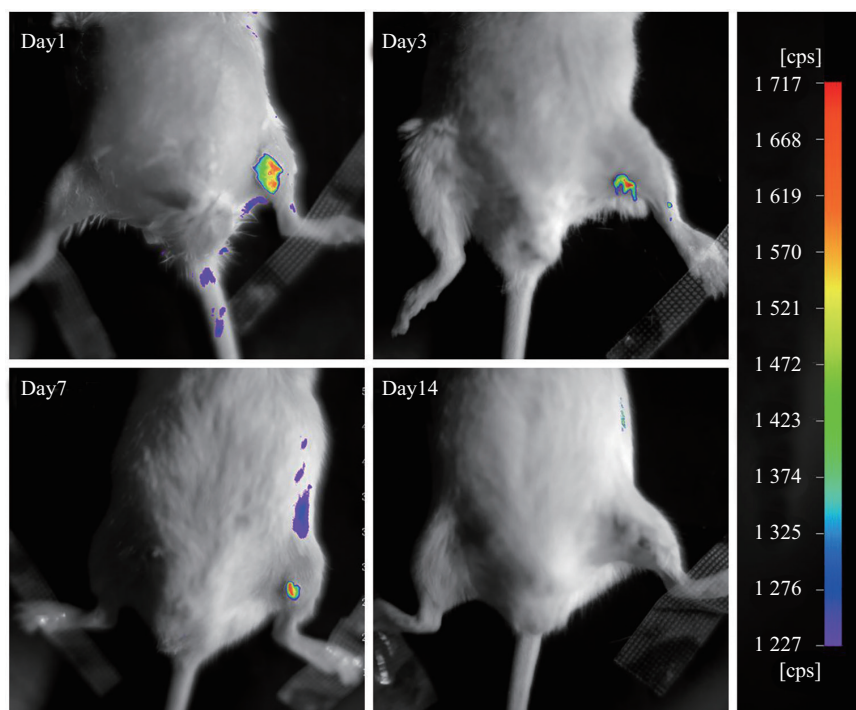
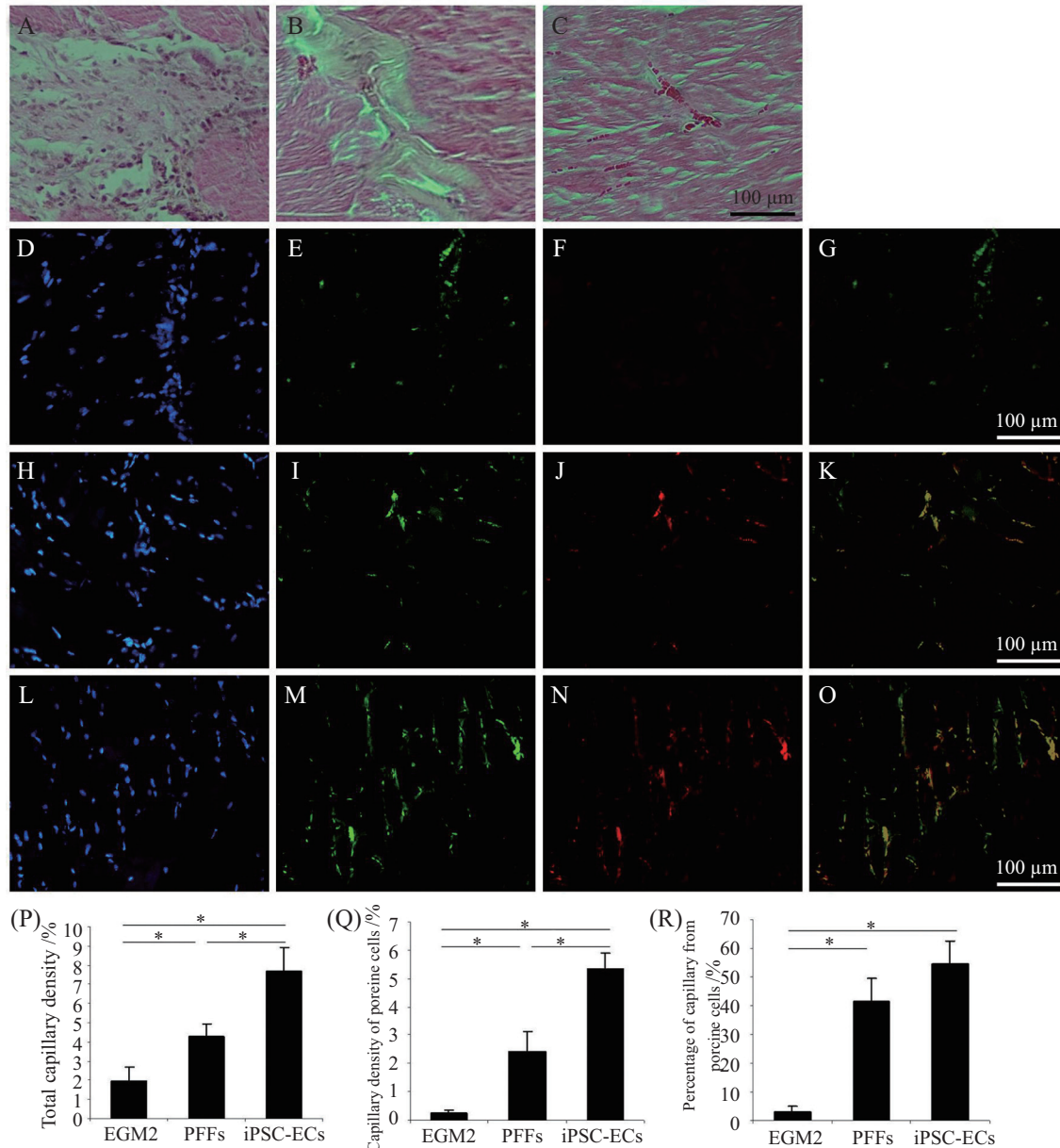


图2 猪iPS-ECs在小鼠缺血下肢的荧光成像

Fig.2 Fluorescence imaging of porcine iPSC-ECs in the ischemic hind limb of mice



A~C: EGM-2(A), PFFs(B)及猪iPSC-ECs(C)处理小鼠的组织形态学观察; D~O: EGM-2(D~G)、PFFs(H~K)及猪iPSC-ECs(L~O)处理小鼠的血管形成检测, 其中D、H、L是Hoechst 33342标记的细胞核, E、I、M是CD31抗体染色, F、J、N是猪特异性Vimentin抗体染色, G、K、O分别是E和F、I和J、M和N的叠加图片; P~R: 不同处理组血管形成能力的定量分析, 其中P是总血管密度分析, Q是猪源细胞形成血管密度分析, R是猪源细胞血管嵌合度分析, $n=6$, $\bar{x}\pm s$, $*P<0.05$ 。

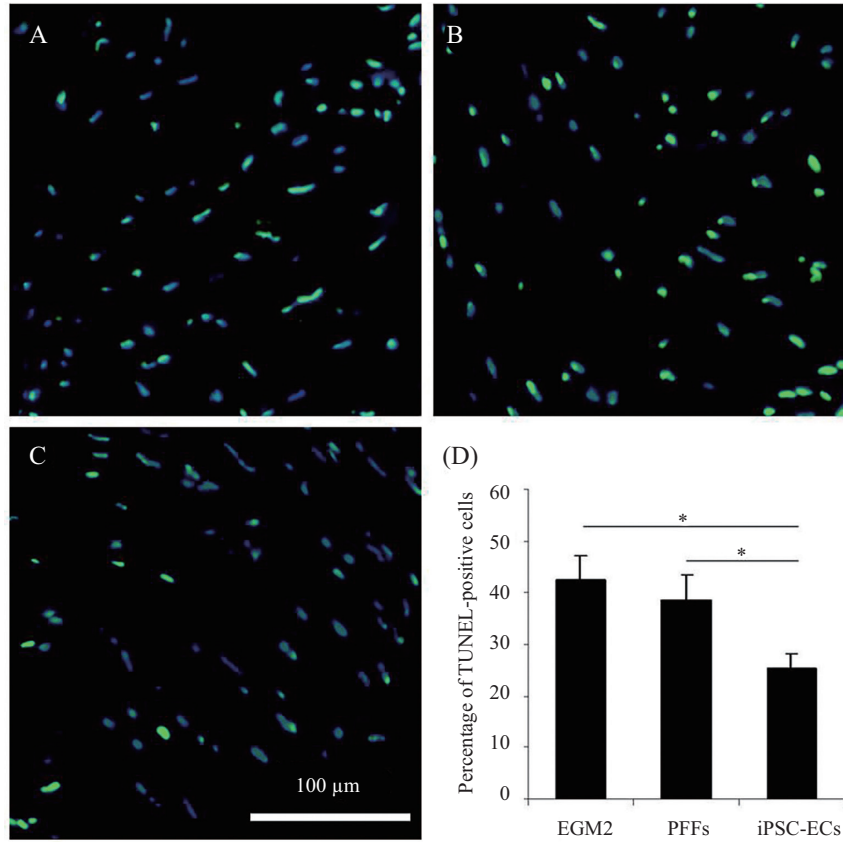
A-C: histomorphological observation of EGM-2 (A), PFFs (B) and porcine iPSC-ECs (C) treated mice. D-O: angiogenesis of EGM-2 (D-G), PFFs (H-K) and porcine iPSC-ECs (L-O) treated mice. Blue fluorescence represents the nuclei labelled by Hoechst 33342 (D,H,L). Green fluorescence represents CD31 expression (E,I,M). Red fluorescence represents porcine specific vimentin expression (F,J,N). Merged images of E&F, I & J and M&N (G,K,O). P-R: quantitative analysis of angiogenesis in different groups. Total capillary density (P). Capillary density of porcine cells (Q). Percentage of capillary from porcine cells (R). $n=6$, $\bar{x}\pm s$, $*P<0.05$.

图3 细胞移植28天后小鼠内收肌的组织形态学观察及血管形成检测

Fig.3 Histomorphology and angiogenesis of adductors after 28 d of cell transplantation

血管生成、抗组织凋亡的长期效果, 我们推测移植细胞或许也通过旁分泌发挥作用。鉴于此, PFFs、猪iPSC-ECs和AOCs分别在正常氧(20%)和低氧(5%)条件下培养24 h, 并对其促血管生成和抗凋亡基因

表达水平进行检测。结果显示, 与正常氧处理组相比, 低氧条处理组的PFFs的基因表达多呈下调趋势, 而猪iPSC-ECs和AOCs的基因表达多呈上调趋势; 猪iPSC-ECs和AOCs的促血管生成和抗凋亡基因的表达

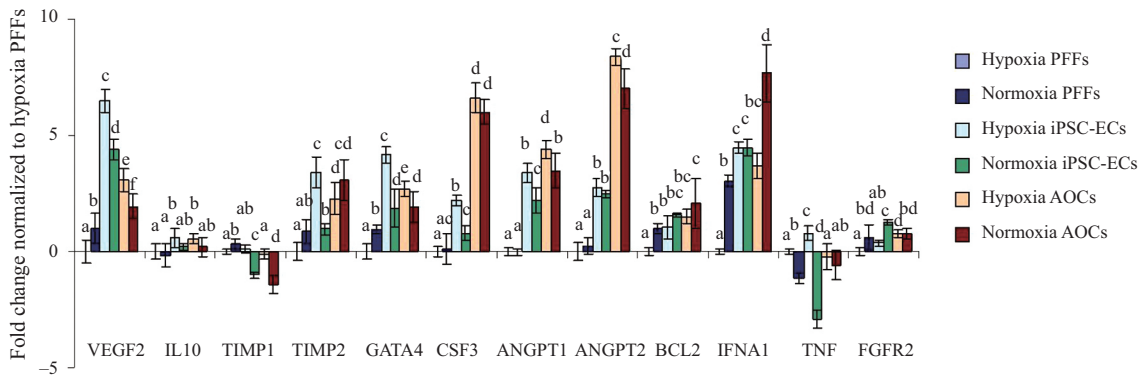


A~C: EGM-2(A)、PFFs(B)及猪iPSC-ECs(C)处理小鼠的TUNEL染色, 其中蓝色显示Hoechst 33342标记的细胞核, 绿色显示TUNEL染色阳性的细胞核; D: 不同处理组TUNEL染色阳性细胞百分比, $n=6, \bar{x}\pm s, *P<0.05$ 。

A-C: TUNEL staining of EGM-2 (A), PFFs (B) and porcine iPSC-ECs (C) treated mice. Blue fluorescence represents the nuclei labelled by Hoechst 33342. Green fluorescence represents TUNEL positive nuclei. D: percentage of TUNEL positive nuclei in different groups. $n=6, \bar{x}\pm s, *P<0.05$.

图4 细胞移植28天后小鼠内收肌组织的TUNEL染色

Fig.4 TUNEL staining of adductors after 28 d of cell transplantation



组间标注不同字母代表差异显著($P<0.05$)。 $n=4, \bar{x}\pm s$ 。

The bars without the same letter are significantly different ($P<0.05$). $n=4, \bar{x}\pm s$.

图5 低氧及正常氧含量下PFFs、猪iPSC-ECs和AOCs的成血管及抗凋亡相关因子的表达情况

Fig.5 Expressions of proangiogenic and antiapoptotic factors by PFFs, porcine iPSC-ECs and AOCs under hypoxia and normoxia

水平多高于PFFs, 尤其在低氧条件下; 促血管成熟的关键调控因子VEGFA、ANGPT1和ANGPT2在2种不同来源的血管内皮细胞中呈现差异表达——AOCs的ANGPT1和ANGPT2表达水平高于猪iPSC-ECs, 而猪

iPSC-ECs的VEGFA表达水平高于AOCs(图5)。

3 讨论

研究发现, 猪iPSC-ECs的分布范围在细胞移植

初期迅速减小,然而28天后的组织形态学、免疫组化及TUNEL检测结果显示,猪iPSC-ECs移植组的组织修复情况和微血管数量优于其他两组,缺血组织的凋亡细胞相对较少。体外研究表明,低氧条件下猪iPSC-ECs的促血管生成和抗凋亡基因的表达水平多高于PFFs,与内源性猪血管内皮细胞AOCs相似。

血管内皮细胞是排列在血管内表面的单层细胞,发挥着维持血管功能的作用。ECs的丧失或功能障碍常会导致动脉粥样硬化、中风等疾病。血管内皮病变的传统药物治疗效果有限,干细胞研究的快速发展为内皮细胞替代治疗提供了可能。已有研究表明,自体ECs及其前体细胞移植可以改善缺血心脏的功能,荧光分子断层扫描技术进一步证实移植的细胞具有促进缺血组织血管新生的作用^[21-22]。然而,内源性的ECs难以获取且来源有限,iPSCs作为一种替代选择,不完全重编程和供体特异性表观遗传记忆一度被认为会影响其分化能力^[23-24]。然而,近期研究显示,iPSCs来源的ECs具有良好的可塑性,并且适用于基于细胞的研究,这对于探索内皮发育特征和病变机理具有重要意义^[25]。

既然移植的血管内皮细胞可以改善缺血组织的血液循环,那么这些细胞是如何发挥作用的呢?研究表明,心肌缺血后,移植的骨髓来源的内皮祖细胞可以在外周循环系统内增殖,并结合到受损心肌参与血管新生^[26-27];人iPSCs来源的内皮祖细胞具有整合和修复受损视网膜脉管系统的功能,并参与血管的形成^[28]。由此可见,移植的ECs可以通过与受体细胞或血管融合的方式直接参与血管新生。我们的体外实验结果显示,低氧条件下猪iPSC-ECs比PFFs表达更高水平的抗凋亡和促血管生成因子,其中9个是分泌型细胞因子(VEGFA、IL10、TIMP1、TIMP2、CSF3、ANGPT1、ANGPT2、IFNA1、TNF),3个是细胞膜受体或转录因子(GATA4、BCL2、FGFR2)——在细胞因子下游发挥信号转导作用。CHO等^[26]发现,移植的内皮祖细胞在1周内数量持续减少,但多种细胞因子持续上调2周以上,远远超过供体细胞的分泌能力,与此同时,可以观察到毛细血管数量增加、心肌细胞增殖以及心肌细胞凋亡减少。另有研究显示,相对于成纤维细胞转分化获得的ECs,人iPSCs来源的ECs可以产生更多的细胞因子,通过旁分泌的方式促进小鼠缺血再灌注损伤的修复^[29]。由此可见,移植的ECs还可以通过旁分

泌的方式促进血管生成与组织修复。其实,除了内皮细胞,现已证明多种细胞可以通过旁分泌机制发挥作用,例如:骨髓间充质干细胞的外泌体含有的生长因子、细胞因子、信号分子和黏附分子已被证明有助于血管生成^[30];多发性骨髓瘤细胞的外泌体可以将miR135b转移到内皮细胞,直接抑制缺氧诱导因子-1抑制因子(factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1, FIH-1),并通过HIF-FIH信号通路促进内皮细胞迁移、增殖和血管生成^[31]。

前期研究表明,移植的iPSC-ECs在血管离断或结扎的组织损伤中都具有一定的修复能力,这种修复能力与组织损伤和细胞移植是否同步没有直接关系^[32-34]。本实验采用血管结扎与细胞移植同步的方法主要考虑到可以更准确地定位移植部位,便于后续的样本收集检测。

猪的解剖结构和生理特征与人类相似,猪iPSC-ECs的获得及其功能研究对于人类内皮细胞移植在临床上具有重要意义,这不仅体现在诱导技术、移植方式的选择上,更体现在移植效果的短、长期评价上^[35-36]。我们的实验尽管有些令人鼓舞的结果,但还需要进一步的研究来明确自体移植的有效性、免疫耐受情况以及细胞旁分泌发挥作用的具体机制。此外,通过开展大型动物模型实验,进一步确认猪iPSC-ECs在不同物种间的技术参数及效果差异,从而完善临床前的动物实验。

综上所述,我们通过无血清单层培养系统成功地获得了猪iPSCs来源的ECs,并利用小鼠下肢缺血模型研究了病理条件下该细胞的组织修复能力,结果发现,猪iPSC-ECs不仅能够融合到受损组织参与血管生成,还可能通过旁分泌机制发挥抗组织凋亡、改善局部血液循环的作用。猪血管内皮细胞的获得及其功能研究不仅能够为人类血管内皮细胞移植提供实验数据,也将为心血管药物筛选平台的建立、血管内皮分化和功能障碍的机制研究提供有益参考。

参考文献 (References)

- [1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019 update from the gbd 2019 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2019概要[J]. *中国循环杂志(Editorial Board of Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in china 2019: an updated summary [J]. Chinese Circulation Journal)*, 2020, 35(9): 833-54.

- [3] FURCHGOTT R F, ZAWADZKI J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. *Nature*, 1980, 288(5789): 373.
- [4] POBER J S, SESSAW C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 803-15.
- [5] 谢林润, 李骊华. 血管内皮生长因子在心血管疾病中的作用[J]. 国际心血管病杂(XIE L J, LI L H. The role of vascular endothelial growth factor in cardiovascular diseases [J]. *Int Cardiovasc Dis*), 2019, 46(4): 219-22.
- [6] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-6.
- [7] LOSORDO D W, HENRY T D, DAVIDSON C, et al. Intramyocardial, autologous CD34⁺ cell therapy for refractory angina [J]. *Circ Res*, 2011, 109(4): 428-36.
- [8] LOSORDO D W, KIBBE M R, MENDELSON F, et al. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34⁺ cell therapy for critical limb ischemia [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012, 5(6): 821-30.
- [9] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76.
- [10] TAURA D, SONE M, HOMMA K, et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1100-3.
- [11] CHOI K D, YU J, SMUGA-OTTO K, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3): 559-67.
- [12] HARDING A, CORTEZ-TOLEDO E, MAGNER N L, et al. Highly efficient differentiation of endothelial cells from pluripotent stem cells requires the MAPK and the PI3K pathways [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(4): 909-19.
- [13] NIELSEN K L, HARTVIGSEN M L, HEDEMANN M S, et al. Similar metabolic responses in pigs and humans to breads with different contents and compositions of dietary fibers: a metabolomics study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99(4): 941-9.
- [14] WERNERSSON R, SCHIERUP M H, JORGENSEN F G, et al. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 70.
- [15] LUNNEY J K. Advances in swine biomedical model genomics [J]. *Int J Biol Sci*, 2007, 3(3): 179-84.
- [16] PANKAJAKSHAN D, KANSAL V, AGRAWAL D K. *In vitro* differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(11): 911-20.
- [17] COLAZZO F, CHESTER A H, TAYLOR P M, et al. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells [J]. *Heart Valve Dis*, 2010, 19(6): 736-44.
- [18] GU M, NGUYEN P K, LEE A S, et al. Microfluidic single-cell analysis shows that porcine induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells improve myocardial function by paracrine activation [J]. *Circ Res*, 2012, 111(7): 882-93.
- [19] WEI R Y, LÜ J W, LI X C, et al. Derivation of endothelial cells from porcine induced pluripotent stem cells by optimized single layer culture system [J]. *J Vet Sci*, 2020, 21(1): e9.
- [20] LI X C, YU Y, WEI R Y, et al. *In vitro* and *in vivo* study on angiogenesis of porcine induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells [J]. *Differentiation*, 2021, 120: 10-8.
- [21] OKADA M, PAYNE T R, ZHENG B, et al. Myogenic endothelial cells purified from human skeletal muscle improve cardiac function after transplantation into infarcted myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(23): 1869-80.
- [22] LIM S, YOON H Y, PARK S J, et al. Predicting *in vivo* therapeutic efficacy of bioorthogonally labeled endothelial progenitor cells in hind limb ischemia models via non-invasive fluorescence molecular tomography [J]. *Biomaterials*, 2021, 266: 120472.
- [23] HOCKEMEYER D, JAENISCH R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(5): 573-86.
- [24] GODINI R, LAFTA H Y, FALLAHI H. Epigenetic modifications in the embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Gene Expr Patterns*, 2018, 29: 1-9.
- [25] ADAMS W J, ZHANG Y, CLOUTIER J, et al. Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2013, 1(2): 105-13.
- [26] CHO H J, LEE N, LEE J Y, et al. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(13): 3257-69.
- [27] QUAN Z, WANG Q L, ZHOU P, et al. Thymosin β 4 promotes the survival and angiogenesis of transplanted endothelial progenitor cells in the infarcted myocardium [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(6): 1347-56.
- [28] PARK T S, NHUTTO I, ZIMMERLIN L, et al. Vascular progenitors from cord blood-derived induced pluripotent stem cells possess augmented capacity for regenerating ischemic retinal vasculature [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 359-72.
- [29] CLAYTON Z E, YUEN G S, SADEGHIPOUR S, et al. A comparison of the pro-angiogenic potential of human induced pluripotent stem cell derived endothelial cells and induced endothelial cells in a murine model of peripheral arterial disease [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 234: 81-9.
- [30] LAI R C, TAN S S, THE B J, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome [J]. *Int J Proteomics*, 2012, 2012: 971907.
- [31] UMEZU T, TADOKORO H, AZUMA K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1 [J]. *Blood*, 2014, 124(25): 3748-57.
- [32] SUZUKI H, SHIBATA R, KITO T, et al. Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 72.
- [33] PARK J J, KWON Y W, KIM J W, et al. Coadministration of endothelial and smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells as a therapy for critical limb ischemia [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(3): 414-26.
- [34] LIAN W, HU X, PAN L, et al. Human primary CD34⁺ cells transplantation for critical limb ischemia [J]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(8): e22569.
- [35] CRICK S J, SHEPPARD M N. Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure [J]. *J Anat*, 1998, 193(Pt1): 105-19.
- [36] SONG G, LI X, SHEN Y, et al. Transplantation of iPSc restores cardiac function by promoting angiogenesis and ameliorating cardiac remodeling in a post-infarcted swine model [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(3): 1463-73.