

调节 ALK5 受体活化水平优化间充质干细胞的内皮分化及组织工程血管的应用

艾文佳¹, 李杰¹, 李雯², 刘池拽¹, 王深明¹, 吕伟明^{1*}

(中山大学附属第一医院 1.血管甲状腺外科, 2.普通外科国家重点学科实验室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】目前干细胞分化内皮细胞(EC)用于血管治疗受限于分化率,既往研究提示转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)参与内皮分化的调控,其作用因受体途径及分化阶段而不同。本实验即研究 TGF $\beta 1$ 主要 I 型受体 ALK5 活化水平与间充质干细胞(MSC)的内皮细胞分化效率间的关系及分化内皮细胞应用组织工程血管的研究。【方法】采用差速贴壁及流式分选获得大鼠骨髓 CD31⁻ MSC, 以含 VEGF、bFGF 及 EGM-2 的培养基内皮诱导 2 周组作标准对照组, 实验组为分阶段添加 TGF $\beta 1$ 活化 ALK5 组、SB431542 抑制 ALK5 组;免疫荧光检测分化中内皮细胞标志蛋白 vWF、KDR 动态表达;诱导 14 d 后通过流式细胞术分析各组 CD31⁺ 百分率比较诱导效率,并检测诱导细胞体外血管形成功能,最后将分化的内皮细胞体外种植于脱细胞基质血管表面构建组织工程血管。【结果】基于 KDR、vWF 表达变化,间充质干细胞分化以第 7 天为界分为间充质干细胞分化血管祖细胞及血管祖细胞分化内皮细胞两期。早期活化 ALK5(VFT 组)、后期抑制 ALK5 组(VFS 组)其 CD31⁺ 百分率分别为(9.65±2.75)%、(2.28±0.20)%,较标准组提高 7.7 倍($P = 0.006$)、1.8 倍($P = 0.013$),差异具有统计学意义;诱导细胞具有体外成血管功能并可应用组织工程血管内膜层重建。【结论】ALK5 受体途径在骨髓间充质干细胞分化内皮细胞中呈阶段相关性;间充质干细胞分化血管祖细胞阶段活化 ALK5 促进内皮分化,血管祖细胞分化内皮细胞阶段则抑制 ALK5 促进内皮分化;提高内皮分化效率的细胞可应用组织工程血管内皮化。

关键词: ALK5 受体;间充质干细胞;内皮分化;组织工程血管

中图分类号:R654 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)02-0207-08

Regulation of ALK5 Receptor Signaling Promotes Differentiation of Endothelial Cells from Mesenchymal Stem Cells and Its Application to Tissue Engineered Blood Vessel

AI Wen-jia¹, LI Jie¹, LI Wen², LIU Chi-zhuai¹, WANG Shen-ming¹, LV Wei-ming^{1*}

(1.Division of Vascular Surgery, 2.Key Laboratory of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 Currently endothelial cells (EC) derived from stem cells for therapeutic vascularization is limited by low-efficiency, studies show that transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) participates in the regulation of differentiation of EC but is variant for diversity of receptors and context dependent. In this study, we focused on the relationship between TGF $\beta 1$ main type I receptor-ALK5 and EC differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSC) and its application to tissue engineered blood vessel (TEBV). 【Method】 CD31⁻ rBMSC were acquired by adherent cultivation and flow cytometric sorting and were induced 14 days via VEGF, bFGF, and EGM-2 BulletKit as standard control. ALK5 signaling activated by TGF $\beta 1$ or inhibited by SB431542 for different phases were treated as experimental groups; kinetics expression of endothelial cell markers like vWF, KDR were detected by immunofluorescence. Flow cytometry analysis of CD31⁺ percentage of each group to evaluated induction efficiency carried out after 14 days. In addition, vascular formation capability of EC was verified by in vitro experiment. Finally, differentiated ECs were seeded on acellular matrix vascular to construct TEBV. 【Results】 According to the expression of ECs markers, differentiation of MSC can be divided into two stages, vascular progenitor cells differentiation from MSC before the 7th day and ECs differentiation from vascular

收稿日期:2012-12-19

基金项目:广东省科技计划项目(2012B031800087)

作者简介:艾文佳,在读博士研究生,E-mail:ayx1984@126.com; *通信作者:吕伟明,博士,教授,E-mail:aikeyan1805@163.com

progenitor cells since the 7th day. Compared with the standard group, the percentages of activated ALK5 (VFT groups) at early phase and inhibited ALK5 (VFS group) at later phase were 7.7 folds ($P = 0.006$) and 1.8 folds ($P = 0.013$), respectively. Furthermore, induced cells were shown to have in vitro tube-forming potential function and could be applied to intimal layer reconstruction of TEBV. 【Conclusion】 In differentiation of EC from MSCs, ALK5 signaling is stage dependent: At early phase when MSC differentiate into vascular progenitor cells, activation of ALK5 signaling promotes differentiation; While at later phase when vascular progenitor cells differentiate into endothelial cells, inhibiting ALK5 signaling can promote differentiation. The MSC with improved differentiation efficiency into ECs could be applied to tissue engineered blood vessel endothelialization.

Key words: ALK5 receptor; mesenchymal stem cells; endothelial cells differentiation; tissue engineered blood vessel

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2):207-214]

如何获得充足兼具功能性的血管内皮细胞是治疗心血管再生及组织工程血管的长期难题。间充质干细胞因其①来源广泛,取材方便,具有自我扩增能力;②是中胚层来源的具有多向分化潜能的干细胞,能够诱导分化为骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞、神经细胞等,可分化成正常血管的三层结构中的血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞^[1-3];③免疫原性低,可行同种异体移植^[4-5];④可行基因修饰;⑤端粒酶阴性,成瘤性小^[6-7]等优点,可以作为良好的细胞源。虽然经 VEGF 及 bFGF 等细胞因子诱导可产生间充质干细胞衍生的内皮细胞^[8],但目前尚因缺高效诱导方案:血管内皮细胞分化率低,不足以支持心血管再生和组织工程血管。因此,如何提高间充质干细胞内皮细胞分化效率成为亟待解决的课题。TGF β 家族及受体在内皮细胞及壁细胞(周细胞及血管平滑肌细胞)均有表达,因配体浓度及细胞微环境不同、阶段不同而对血管生成作用不同,甚至相反^[9]。本课题拟通过 TGF β 1 及小分子 ALK5 受体抑制剂—SB431542 调控 ALK5 活化,调节胞内 Smad2/3 蛋白磷酸化水平,探索其在间充质干细胞分化内皮细胞的作用,进而提高内皮细胞分化效率以及应用于组织工程血管。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 清洁级 3~4 周龄雄性 SD 大鼠,质量 120~150 g(中山大学医学动物实验中心提供,动物质量合格证号:SCXK(广东)2009-0011),本实验通过中山大学动物实验委员会批准。

1.1.2 主要试剂 Low-glucose DEME,胎牛血清(FBS),胰酶(Gibco);成脂成骨诱导培养基

(Cambrex);ITS(Invitrogen);EGM-2 BulletKit(LONZA, Switzerland);重组大鼠血管内皮细胞生长因子(VEGF)、重组大鼠碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、重组人(氨基酸序列同大鼠重复 99%)转化生长因子 β 1(TGF β 1, Peprotech);重组鼠骨态蛋白 4、9(BMP-4, BMP-9, R&D 公司);兔抗大鼠 PE-CD31、PE-CY5-CD45(BD Pharmingen)、PE-CD34(Santa Cruz)、PE-CY7-CD29(eBioscience)、Alexa-fluor647-CD90(AbD Serotec)单克隆抗体;Alex Fluor647 CD90, PE-CD34、PE-CYTM5-CD45 and PE-CD31;兔抗大鼠-vWF 抗体、小鼠抗大鼠 KDR(abcam);羊抗鼠 Alexa-fluor488,羊抗兔 Alexa-fluor594(invitrogen);蛋白裂解液(凯基),兔抗大鼠磷酸化 Smad1/5/8,磷酸化 Smad3,磷酸化 Smad2 抗体(Cell Signaling);抗大鼠 GAPDH 一抗,HRP 偶联羊抗兔 IgG(康为世纪)。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(Thermo, 美国),Olympus 倒置相差显微镜、荧光倒置显微镜及照相系统(日本)、超净工作台(ESCO, 新加坡),Beckman 低速离心机、高速离心机(美国)、PCR 仪(Eppendorf, 德国),FACSClibur 流式细胞仪(BD 公司, 美国)。

1.2 大鼠骨髓间充质干细胞的分离及培养

取 SD 大鼠,10 g/L 戊巴比妥钠(3 mL/kg)腹腔内麻醉后颈椎脱臼处死,置于 750 mL/L 酒精浸泡 5 min,无菌条件下取出两侧股、胫骨,保留骨骺端部分不受损伤,剪去股、胫骨两端的干髓端,1 mL 无菌注射器吸含 100 mL/L FSB 及 1% 双抗的 LG-DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔及剪掉的干髓端至颜色无变化并收集骨髓液,用吸管反复轻柔吸打,将其制成分散充分的骨髓细胞悬液,收集 8 mL 细胞悬浮液直接种植于 2 瓶 25 cm² 康宁培养瓶。每天观察细胞生长情况。72 h 换液去除非贴壁造血来源细胞,此后每 3 d 换液 1 次,原代培养 7 d

融合至 80%~90% 即传代。按 1:3 传代,接种于新的培养瓶中。

1.3 流式分析和分选

流式分析:收集第 3 代(p3)细胞,分别加入 CD34-PE、CD45-PE-CY5、CD29-PE-CY7、CD90-Alexa-flour647 或 CD31-PE 兔抗大鼠单克隆抗体,置 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗 2 遍;流式分析:10 g/L 多聚甲醛重悬至 300~500 μ L 后直接行流式细胞仪分析。流式分选:PBS 重悬至 1 000 μ L 后直接行流式细胞仪分选,含培养基流式管收集 CD31(-)MSC 用于诱导。

1.4 成骨和成脂诱导

取 P3MSC 分别加入成骨、成脂诱导培养基诱导 2 周。

1.5 内皮细胞的诱导

取经流式分选并生长状态良好的 P3-P5 CD31(-)间充质干细胞,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,用含有 2% ITS(替代血清)+10 ng/mL VEGF+2 ng·mL⁻¹ bFGF 的 EGM-2 培养基作为标准诱导组,分组诱导:在标准组基础上分别添加 10 ng/mL TGF β 1 诱导 3、7、10、14 d;于 d0、d4、d8、d11 添加相应的 ALK5 抑制剂 10 μ mol/L SB431542 至 14 d 止,每 3 d 换一次液。动态检测内皮细胞特异性表面标志的表达情况。

1.6 细胞免疫荧光检测

①制备细胞爬片:取 CD31(-)间充质干细胞 100 mL/L FBS 的 LG-DMEM 培养液培养于盖玻片上,待细胞占盖玻片达 60%~70%时,按诱导分组处理细胞(2%ITS 替代血清,使细胞生长相对静止)②vWF 及 KDR 免疫荧光检测:取出盖玻片,1 \times PBS 洗 5 min \times 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定液冰上固定 15 min,1 \times PBS 洗 5 min \times 3;0.3%Triton-100 透膜处理 20 min,1 \times PBS 洗 5 min \times 3;10%正常山羊血清室温孵育 40 min 封闭;甩去多余液体,加稀释的 I 抗(vWF:1:400, KDR:1:50)4℃湿盒孵育过夜,以 1 \times PBS 代替一抗作为阴性对照;PBS 洗 5 min \times 3 次后滴加荧光素标记的 II 抗(羊抗兔,羊抗鼠 1:600)室温避光孵育 60 min;PBS 洗 5 min \times 3 次后 DAPI 染色 3~5min(显微镜下控制显色时间),PBS 洗 5 min \times 3 次后,使用防荧光猝灭剂封片,荧光显微镜观察结果并拍照,每孔连续取 5 个高倍镜视野,计算阳性细胞占总细胞的比例,以上实验重复 3 次,取其平均值做结果。

1.7 免疫组织化学

按试剂说明书。

1.8 Western-blot

①细胞全蛋白提取;②BCA 法测蛋白浓度;③按 CST 说明书行蛋白印迹电泳、转膜、封闭、抗体孵育及 ECL 曝光。④结果用凝胶图像成像系统成像及 imageJ 进行扫描定量分析蛋白质带的相对含量。

1.9 脱细胞血管基质支架的诱导分化细胞静态种植

以胎牛血清浸泡前期制备组织工程血管异种动脉脱细胞血管基质支架,细胞密度按 1×10^7 mL⁻¹,采用静态培养:最初 8 h 内每 2 h 更换支架 90° 角度,将诱导后的 MSC 接种于支架表面细胞培养箱培养 1 周。HE 染色了解支架表面细胞黏附情况,免疫组化了解血管内皮化情况。

2 结 果

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞分离与培养

原代培养:接种 24 h 后, BMSC 呈圆形,悬浮于培养液中,胞体透亮,折光性强,大小不一,不能辨认细胞核,与周边血系细胞相互混杂。24 h 后部分细胞开始贴壁,72 h 首次换液后可见大量贴壁细胞。第 4~5 天左右可见放射状排列的细胞集落,细胞完全舒展并主要呈现 2 种形态:①成纤维样细胞,长梭形,带突起约 2~3 个;②扁平的不定型细胞:三角形、多边形,形态不规则,胞质可向不同方向伸出伪足;7 d 左右细胞融合 70%~80%,呈漩涡状(图 1A)。传代培养:传代细胞比原代细胞贴壁快,接种 1~2 h 后即贴壁伸展,逐渐主要恢复为长梭形,24 h 内全部贴壁。传代后的细胞增殖速度较快,不再是集落方式生长,而是呈单一均匀、纺锤形生长,融合后呈典型的极性,漩涡状生长。传至第 3 代(p3)时,即可得到较纯化的 RBMSC(图 1B),p10MSC 形态略微宽大(图 1C),而扩增能力未见明显变化。

2.2 大鼠骨髓间充质干细胞鉴定

2.2.1 体外成骨成脂分化能力 P3MSC 经成骨诱导液诱导 2 周后发现有多数散在的钙结节形成采用碱性磷酸酶染色约 30%阳性(图 2A);而成脂诱导液诱导 2 周,油红 O 染色约 40%阳性,散在脂滴形成(图 2B)。

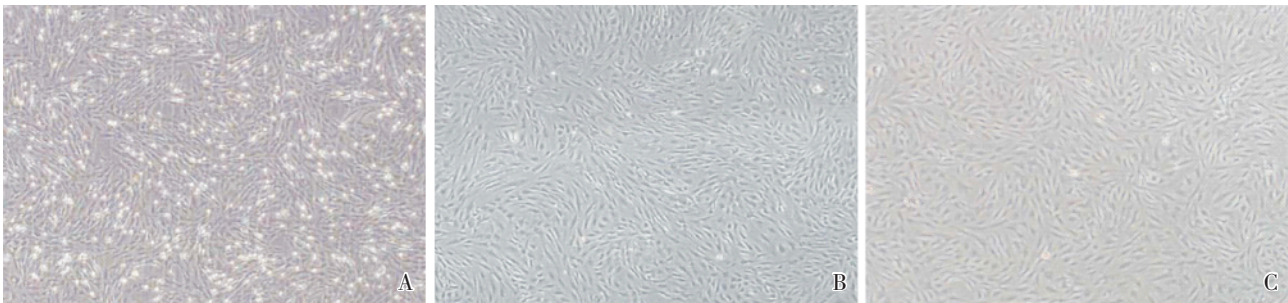


图 1 体外培养大鼠骨髓间充质干细胞形态学

Fig.1 Morphology of cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

A: P0 day7 MSC; B: P3 day3 MSC; C: P10 day3 MSC; $\times 40$.

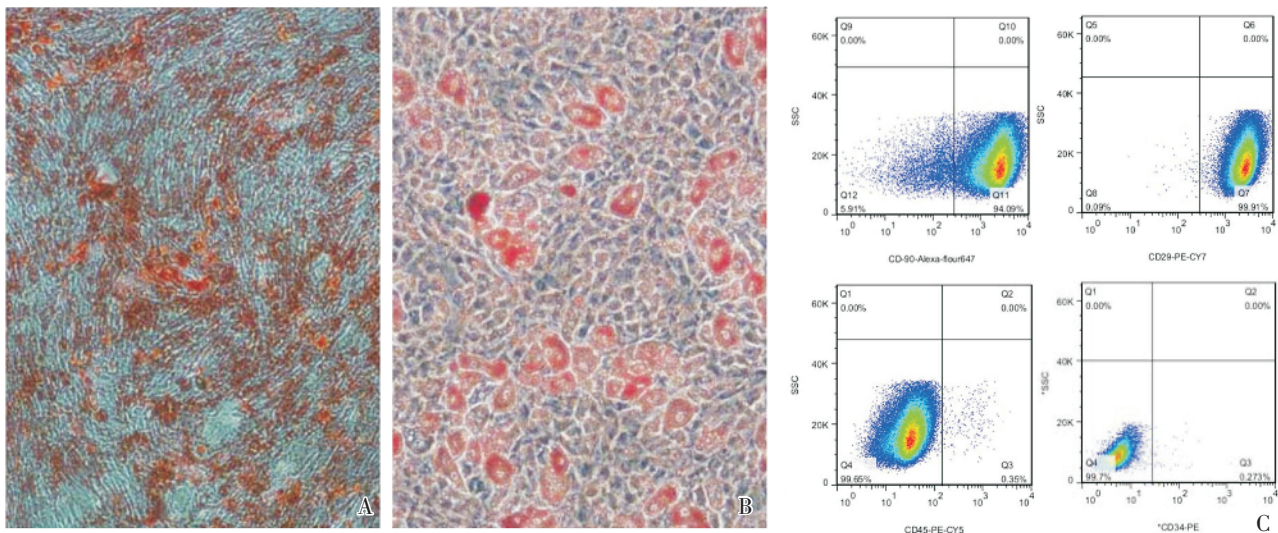


图 2 间充质干细胞鉴定

Fig.2 Identification of MSC

A: RBMSC cultured in osteogenic medium 2 weeks were stained by alkaline phosphatase ($\times 200$); B: RBMSC cultured in adipogenic medium for 2 weeks were stained by Oil-red O ($\times 200$). C: Flow cytometry analysis, CD29: 99.91%, CD90: 94.09%, CD45: 0.39%, CD34: 0.27%.

2.2.2 表型鉴定 培养的第 3 代细胞其典型造血细胞抗原 CD45, CD34 表达率均 $< 1\%$, 而超过 94% 的 CD29 和 CD90 阳性表达(图 2C), 与目前公认间充质干细胞表型相符。

2.3 诱导内皮细胞鉴定

BMSC 在诱导液中诱导, 行细胞免疫荧光染色; VEGF 受体 2 (KDR) 第 1 天即可见阳性表达, 第 7 天表达率上升至 $(95 \pm 4)\%$ (图 3 A), vWF 第 7 天见阳性表达, 第 10 天表达达高峰, 阳性率为 $(72 \pm 3)\%$ (图 3 B), 阳性表达率分析采用 image-Pro Plus。诱导 14 d 后, 细胞出现类似主动脉内皮细胞的卵圆形铺路石样改变(图 3 C), 且种植于 matrigel 胶 48 h 表现出成血管功能(图 3 D); 以上表明 MSC 能分化为内皮样细胞。

2.4 诱导分化效率及活性比较

标准组诱导分化 CD31(+) 百分率为 $(1.25 \pm 0.12)\%$ (图 4Aa), 前 7 d 添加 TGF β 1 (VFT 组) CD31(+) 百分率为 $(9.65 \pm 2.75)\%$, $P = 0.006$ (图 4Ab), 添加 ALK5 抑制剂 SB431542 未见 CD31(+) 分化(未列出); 7d 后添加 ALK5 抑制剂 SB431542 (VFS 组) CD31(+) 百分率为 $(2.28 \pm 0.20)\%$, $P = 0.013$ (图 4Ac), 显著促进 CD31(+) 分化, 即 VFT (day1 ~ 7) 及 VFS (day8 ~ 14) 组较标准组 VF 显著提高 CD31(+) 分化率。通过 western-blot 检测 TGF β 1 及 ALK5 抑制剂 SB431542 与下游 R-Smad 活化显示: TGF β 1 促进 Smad2 及 Smad3 的磷酸化, 相对标准组差异具有统计学意义; 对 Smad1/5/8 磷酸化基本不影响(图 4B); 添加 SB431542 组

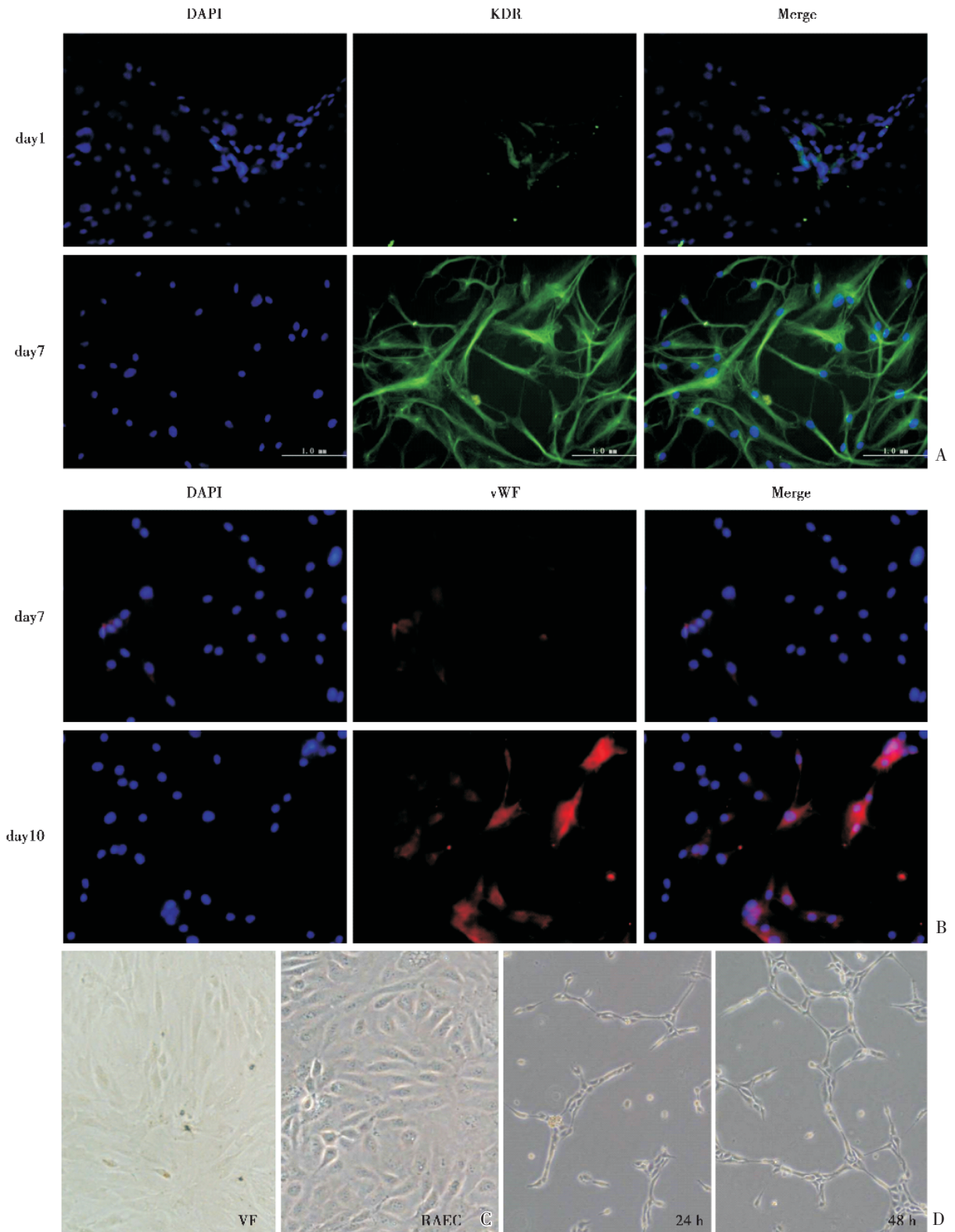


图 3 诱导细胞的内皮表型、形态及体外成血管功能鉴定

Fig.3 Identification of markers, morphology and tubular formation function in vitro

A: Expression of kinase insert domain receptor (KDR) of MSC in standard induction by immunofluorescence (× 400); B: Expression of von Willebrand Factor (vWF) of MSC in standard induction by immunofluorescence (× 400); C: VF: MSC in standard induct condition (VEGF+bFGF) after 14 d, RAEC: rat aortic endothelial cells (× 200); D: Tubular formation was observed when vascular endothelial-like cells differentiated from MSC were cultured in matrigel for 24 h and 48 h (× 100).

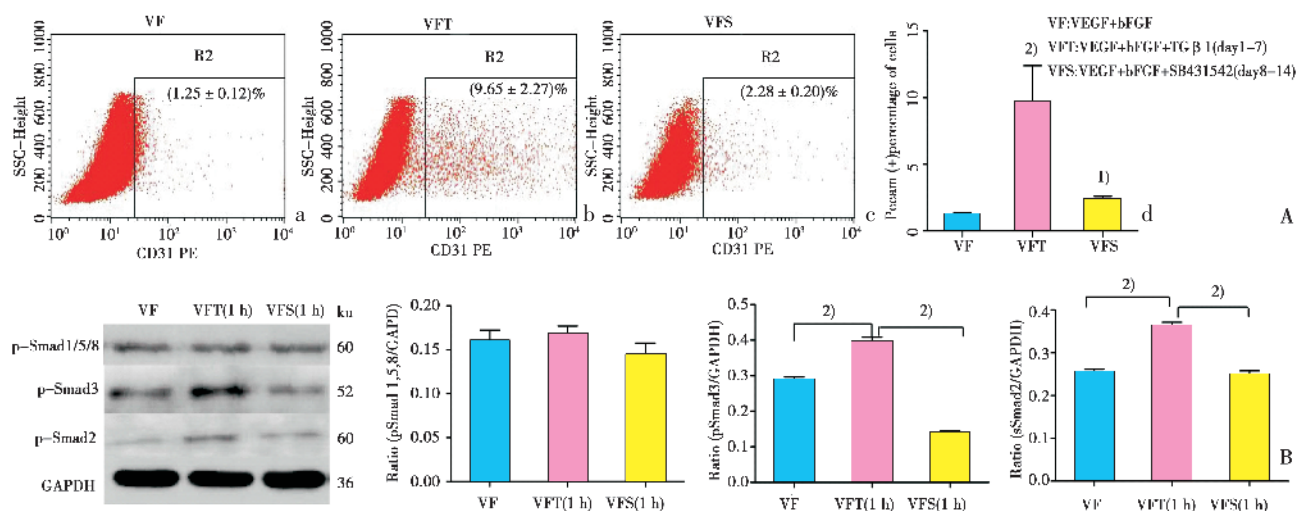


图 4 各诱导组内皮效率比较及相关受体活化 Smad 蛋白水平变化

Fig.4 Effect on EC differentiation and phosphorylation of receptor Smads of each induce group

A: The percentage of PECAM-positive cells after 14 days induction was quantified by flow cytometry, and the percentage of each group controlled to standard induct group (VF group); B: Phosphorylation of R-Smads of MSC (at induction of day 3) treated with TGF-β1, SB-431542 for the indicated hours. Data are expressed as representative images or as mean ± SEM of each group from at least three separate experiments.

VF: VEGF+bFGF; VFT: VEGF+bFGF+TGFβ1 (day0-7); VFS: VEGF+bFGF+SB431542 (day8-14); PECAM, platelet/endothelial cell adhesion molecule; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

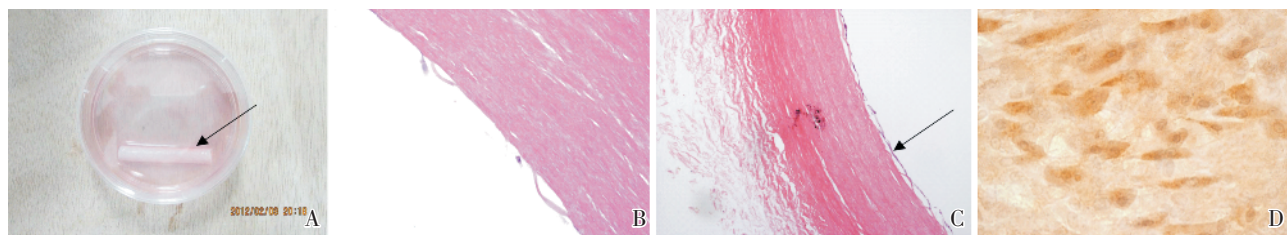


图 5 分化细胞种植支架后的检测

Fig.5 Detection of differentiated cells seeded on prosthesis

A: Acellular vascular prosthesis; B: HE stain of acellular vascular prosthesis before seeding ($\times 40$); C: HE stain of acellular vascular prosthesis after seeding ($\times 40$); D: vWF immunohistochemistry of acellular vascular prosthesis after seeding ($\times 400$).

相对添加 TGFβ1 组,主要下调 Smad2 及 Smad3 的磷酸化水平(图 4B)。

2.5 诱导分化细胞种植支架后检测

将 VFT 诱导组诱导分化的内皮样细胞静态种植于前期制备的脱细胞血管支架(图 5A),HE 染色种植前支架内壁未见细胞(图 5B);孵育 7 d 后见形成较完整的内皮细胞样单层(图 5C),组织免疫组化示约 40%vWF(+)染色(图 5D)。

3 讨论

本研究的目的在于研究 TGFβ1 受体 ALK5 活化水平与间充质干细胞的内皮分化效率之间关

系,从而提高分化效率,可应用组织工程血管等临床治疗。在体外实验中,我们发现,ALK5 受体途径对内皮分化有两种不同的效果:分化早期其活化是必需的且提高受体活化可促进 CD31(+)细胞的分化;第二阶段,抑制 ALK5 受体活化,CD31(+)细胞分化增加。分化所得细胞亦具有内皮细胞生物功能和构建组织工程血管内膜层能力。这些结果有助于大量功能性内皮细胞的获取,对心血管再生,尤其是组织工程血管治疗的实现具有较大意义。

TGFβ 超家族按其受体及下游 Smad 蛋白分为两类。骨态形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)通过 I 型受体 ALK1, ALK2, ALK3 或 ALK6 活化 Smad1/5/8; TGFβ、活化素(activins)及 nodal

作为第二类,通过 ALK4,ALK5 或 ALK7 激活 Smad2/3 蛋白^[10-11]。活化的 Smad1/5/8 或 Smad2/3 与 smad4 形成异构体穿梭进入胞核作用于不同靶基因^[12]。Activin-A、TGF β 1、BMP4 均可诱导人胚胎干细胞向中胚层分化及促进血管发生的作用^[13]。但 TGF β 1 对于胚胎干细胞的内皮分化或者是内皮细胞的血管新生作用目前研究均有争议。2002 年 Goumans 等^[14]发现对于小鼠内皮细胞,TGF β 有 ALK1 和 ALK5 两种 I 型受体途径。ALK5 途径通过活化 Smad2 抑制内皮细胞的迁移和增殖,可能介导血管成熟;而 ALK1 途径活化 Smad1/5/8 诱导内皮细胞迁移和增殖。同年,Lamouille 等^[15]却得出不同结论:在微血管内皮,大血管内皮等,ALK1 抑制内皮细胞的增殖、迁移、再粘附、播散,对血管生成的成熟阶段起到促进作用。2003 年 Watabe 等^[16]研究提出 TGF- β /activin 一方面抑制血管祖细胞向内皮细胞及壁细胞分化,非特异性减少内皮细胞数量。另一方面,通过下调内皮细胞紧密连接蛋白的表达而降低内皮细胞之间粘附性及完整性。3 年后 Mallet 等^[17]以鼠的胚胎干细胞为对象,认为在血管形成阶段,TGF β 1 通过 ALK5-Smad2/3 途径促进血管发生。但在血管内皮生成阶段即作用对象为已分化的内皮细胞(ALK1/5 都表达),这两种受体途径都表现抑制血管新生。2010 年 Bai 等^[18]研究人胚胎干细胞向血管细胞发展过程中定义 CD34⁺CD31⁺为血管祖细胞,认为 BMP4-Smad1/5/8 促进早期的胚胎干细胞向 CD34⁺CD31⁺的分化从而促进内皮分化;而 TGF β 抑制早期的胚胎干细胞向 CD34⁺CD31⁺细胞的分化。同年 James 等^[19]在优化胚胎干细胞血管内皮细胞分化的小分子生物活性物质筛选中发现传统 VEGF、bFGF、BMP4 等虽可提高分化效率,但作用是不够的,而分化后期添加 ALK5 抑制剂后分化效率可提高 36 倍。以上研究中出现结论上的分歧一方面是因为实验对象不同(胚胎干细胞、大血管及小血管内皮细胞)、TGF β 、BMP 等 TGF β 超家族因子种类、剂量及受体途径的不同;另一方面是因为对内皮分化的多阶段性以及不同研究者对血管祖细胞、血管成熟定义的不同。

KDR (FLK-1) 被认为是血管祖细胞标志,可作为内皮分化的早期标志蛋白^[20-21],而 vWF 则认为是中后期内皮标志物^[22]。本实验中,我们通过免疫荧光监测 KDR、vWF 的表达情况,发现 KDR 出

现在诱导的第 1 天和第 7 天达高峰,之后相对稳定;而相对成熟标志 vWF 则出现在诱导的第 7 天和第 10 天达高峰并较稳定表达。由此,我们将间充质干细胞分化内皮细胞初步分为两阶段:第 1 阶段为间充质干细胞分化血管祖细胞即诱导前 7 d;第 2 阶段血管祖细胞分化内皮细胞即诱导后 7 d。通过对两阶段 ALK5 受体活化水平的调节,比较诱导组 CD31(Pecam)阳性百分率,评估 ALK5 受体活化对血管内皮细胞分化的影响。由于 CD31 在未分化的间充质干细胞中表达,因此在分析 CD31 时,诱导细胞采用流式分选所得的 CD31(-)MSC,且使用 2%ITS 替代血清提供细胞基本生长营养,减少干扰。实验证明第一阶段添加 TGF β 1 活化 ALK5 激活 Smad2 和 Smad3 磷酸化(VFT 组)的 CD31(+)百分率为(9.65 \pm 2.75)%,较标准组提高约 7.7 倍,第 2 阶段添加 ALK5 抑制剂 SB431542 从而抑制 Smad2 与 Smad3 磷酸化(VFS 组)CD31(+)百分率为(2.28 \pm 0.20)%,提高约 1.8 倍;两组较标准组都有显著性差异(图 4)。体外成血管实验表明分化细胞具有内皮样成血管生物功能(图 3D)。另外,诱导分化细胞体外种植于前期制备的脱细胞血管支架可形成较完整的内皮样细胞单层(图 5),初步成功构建具备理想内皮化的组织工程血管。

本研究证明了体外环境中,rBMSC 在细胞因子 VEGF、bFGF 基础上通过不同阶段调节 ALK5 受体活化水平能极大提高内皮样细胞的分化效率,推测这种内皮样细胞诱导方案适用人间充质干细胞,但有待进一步考察和检验;ALK5 受体途径促诱导分化机制与 TGF β -Smad 通路或 non-Smad 通路如 MAPK/ERK, TAK1, Jnk 及 PI3K 相关性,靶基因定位及是否通过其他细胞因子如 VEGF 起作用,还需进一步探索。除此之外,MSC 在临床组织工程血管的治疗应用还存在其它难题,如组织工程血管细胞动态种植,体内治疗时机的选择及组织工程血管体内试验:体内更为复杂环境包括生物微环境及血流动力学等对分化内皮细胞的影响,种植内皮样细胞的生物功能检测等是下一步研究的难点与重点。

本实验通过将内皮分化过程中 ALK5 受体活化水平调节与内皮细胞的阶段性标志蛋白的监测结合发现,ALK5 作为 TGF β 1 主要受体,其活化对间充质干细胞的内皮分化具有双向性:第 1 阶段

受体激活可提高 smad2/3 磷酸化水平,从而提高 CD31 (+) 百分比,第 2 阶段抑制 ALK5 通路降低 smad2/3 磷酸化水平而促进 CD31 (+) 细胞百分比。通过该方案诱导的细胞具有内皮样细胞生物功能,种植脱细胞支架能形成较完整内皮细胞层,是组织工程血管的较理想种子细胞来源,为血管再生和组织工程血管的治疗提供理论和应用依据。

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- [3] Ripa RS, Haack-Sorensen M, Wang Y, et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial[J]. *Circulation*, 2007, 116(11 Suppl): I24-I30.
- [4] Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease[J]. *Transplantation*, 2006, 81(10): 1390-1397.
- [5] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 389-398.
- [6] Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9142-9149.
- [7] Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, et al. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells [J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 1146-1149.
- [8] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 377-384.
- [9] Ten DP, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 857-869.
- [10] Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(6): 627-644.
- [11] Valdimarsdottir G, Mummery C. Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells [J]. *APMIS*, 2005, 113(11-12): 773-789.
- [12] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.
- [13] Pardali E, Goumans MJ, Ten DP. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(9): 556-567.
- [14] Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors [J]. *EMBO J*, 2002, 21(7): 1743-1753.
- [15] Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, et al. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis [J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4495-4501.
- [16] Watabe T, Nishihara A, Mishima K, et al. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells [J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(6): 1303-1311.
- [17] Mallet C, Vittet D, Feige JJ, et al. TGFbeta1 induces vasculogenesis and inhibits angiogenic sprouting in an embryonic stem cell differentiation model: respective contribution of ALK1 and ALK5 [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2420-2427.
- [18] Bai H, Gao Y, Arzigan M, et al. BMP4 regulates vascular progenitor development in human embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(2): 363-374.
- [19] James D, Nam HS, Seandel M, et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(2): 161-166.
- [20] Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors [J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 92-96.
- [21] Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages [J]. *Dev Cell*, 2006, 11(5): 723-732.
- [22] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(1): 80-89.