

DOI: 10.13376/j.cblls/2023106

文章编号: 1004-0374(2023)07-0966-11

## 多能干细胞来源的内皮细胞研究及应用进展

雷 佳, 杨 隽\*

(浙江大学医学院附属第二医院生理科、心内科, 杭州 310058)

**摘 要:** 内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 为血管的内侧单层细胞, 能够维持血管壁完整性与通透性、调节血管张力、参与细胞黏附。在研究疾病机制及再生医学中都需要大量功能性的内皮细胞, 仅依靠从人体内分离的办法很难获得大量可应用的功能性内皮细胞。相比之下, 多能干细胞 (pluripotent stem cells, PSCs) 可以进行高效诱导分化成内皮细胞, 为解决当前建立包含特异性血管内皮的不同组织体外长期培养需要大量内皮细胞的难题提供方案。在此, 该文总结了利用多能干细胞定向诱导产生的内皮细胞在基础研究和疾病治疗中的最新应用进展, 为组织芯片、类器官构建等临床转化研究提供新思路。

**关键词:** 多能干细胞; 内皮细胞; 3D 建模; 细胞治疗

**中图分类号:** Q21 **文献标志码:** A

## Advances in research and application of endothelial cell derived from pluripotent stem cells

LEI Jia, YANG Jun\*

(Department of Physiology and Department of Cardiology of the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Endothelial cells (ECs) are the inner monolayer cells of blood vessels, which maintain the integrity and permeability of blood vessel wall, regulate the tension of blood vessel and participate in cell adhesion. Functional endothelial cells are necessities in the study of disease mechanisms and regenerative medicine. To obtain a large number of functional endothelial cells by isolation from human tissue is rather difficult. In contrast, pluripotent stem cells (PSCs) are feasible to be efficiently differentiated into endothelial cells, solving the current dilemma of supplying a large amount of ECs for setting up tissue culture with selective endothelial barrier for long term culture. In this review, we describe how endothelial cells induced from pluripotent stem cells be used in basic research and disease treatment, and provide advanced thoughts for the translational study such as tissue chips, organ culture etc.

**Key words:** pluripotent stem cells; endothelial cells; 3D modeling; cell therapy

血管的主要功能是将氧气和营养物质输送到身体中的各个组织, 并将组织中的废物运送到肾脏、肝脏和肠道进行新陈代谢。内皮细胞排列在与血液接触的血管内壁, 维持血管完整性<sup>[1]</sup>。内皮功能障碍与动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、高血压、糖尿病、充血性心力衰竭等多种疾病类型相关<sup>[2]</sup>。健康的功能性内皮细胞在受损组织修复和再生中的关键作用是再生医学的一个焦点。

目前, 内皮细胞可以从脂肪组织、血液中分离得到或通过诱导多能干细胞分化获得。体内分离的

内皮细胞的局限性在于细胞衰老前分裂的次数有限, 且难以获得组织特异性内皮细胞, 获取的内皮细胞数量和质量有限。相比之下, 多能干细胞具有多向分化潜能, 并在几十次传代过程中保持增殖能

收稿日期: 2023-01-31; 修回日期: 2023-03-26

基金项目: 国家重点研发项目(2021YFA1100500); 国家自然科学基金项目(81870051); 浙江大学-剑桥大学合作项目(188170+194452115/011)

\*通信作者: E-mail: yang\_jun@zju.edu.cn

力。多能干细胞通过定向诱导产生的内皮细胞成为了一种替代的、可再生的细胞来源。多能干细胞包括胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 目前已逐步建立了多种内皮细胞高效分化技术, 分化效率可达到 80% 以上<sup>[3]</sup>, 并可进一步诱导表现出动脉内皮细胞<sup>[4]</sup>和淋巴内皮细胞<sup>[5]</sup>表型, 其在体外微流控装置<sup>[6]</sup>或体内<sup>[7]</sup>可形成血流灌注稳定的血管网络系统, 且可以在体内整合到宿主血管系统中, 在移植到小鼠缺血性疾病模型后表现出血管重建能力<sup>[8-9]</sup>, 这证实了多能干细胞来源的内皮细胞在再生医学研究中的价值。本文将主要介绍 PSC-ECs 分化方法的发展及组织特异性内皮细胞的开发并对 PSC-ECs 的几种应用进行阐述, 特别关注 3D 体外建模, 包括类器官及组织工程模型, 然后讨论 PSC-ECs 在应用于疾病机制研究和细胞治疗方面的进展和挑战。

### 1 血管内皮分化方法的发展和功能鉴定

早期将多能干细胞分化为内皮细胞的方法包括与基质细胞 (通常是小鼠骨髓来源的基质细胞系, 如 OP9) 共培养或通过形成拟胚体进而分化成内皮细胞<sup>[10-11]</sup>。这两种分化方法重现早期胚胎发育过程, 但分化效率往往较低, 且内皮细胞与其他细胞类型混合。目前的分化策略主要通过向单层培养的干细胞中添加小分子活性物质, 诱导干细胞向内皮细胞

命运转变 (图 1)。使用这种策略的大多数方案可分为中胚层分化阶段和内皮细胞分化阶段。在第一阶段中, 操纵 PSCs 向中胚层分化的信号是这些单层分化系统的共同点, 常用激活素 A 和 BMP4 等生长因子<sup>[3,12-14]</sup>。在第二阶段中, bFGF 和 VEGF 是最常用的生长因子<sup>[3,15-16]</sup>。GSK-3 抑制剂, 如 CHIR99021 也常添加到培养基中以调控 Wnt 信号通路, 该通路促进中胚层向内皮谱系分化<sup>[12,14-15]</sup>。抑制 TGF-β 信号通路对于中胚层细胞的内皮谱系特化和内皮细胞的维持 (避免内皮细胞向间充质细胞转化) 至关重要<sup>[17]</sup>。因此, TGF-β 信号通路的抑制剂 SB431542 也经常被纳入分化方案<sup>[3]</sup>。为了提高内皮细胞的分化效率, 研究人员对内皮分化过程中的关键转录因子进行了筛选。如 Elcheva 等<sup>[18]</sup>进行了全面筛选, 发现了 27 个与中胚层和血管祖细胞形成有关的基因。其中, ETV2 在直接诱导内皮细胞命运中发挥重要作用。ETV2 是心脏、内皮和造血谱系发育的重要转录因子, 通过 RNA 转染或基因编辑手段过表达 ETV2 能有效诱导干细胞分化为内皮细胞<sup>[7,19]</sup>。

分化得到的 PSC-ECs 常用流式细胞术、免疫细胞化学、成管实验和移植等方法进行表型鉴定。验证特异性内皮细胞标记物是最初步的方法。CD31 是一种跨膜糖蛋白, 集中在内皮细胞连接处, 通常用于流式细胞术检测和分选内皮细胞<sup>[20-22]</sup>。CD144 建立了内皮细胞之间连接的完整性<sup>[23]</sup>。vWF 由内

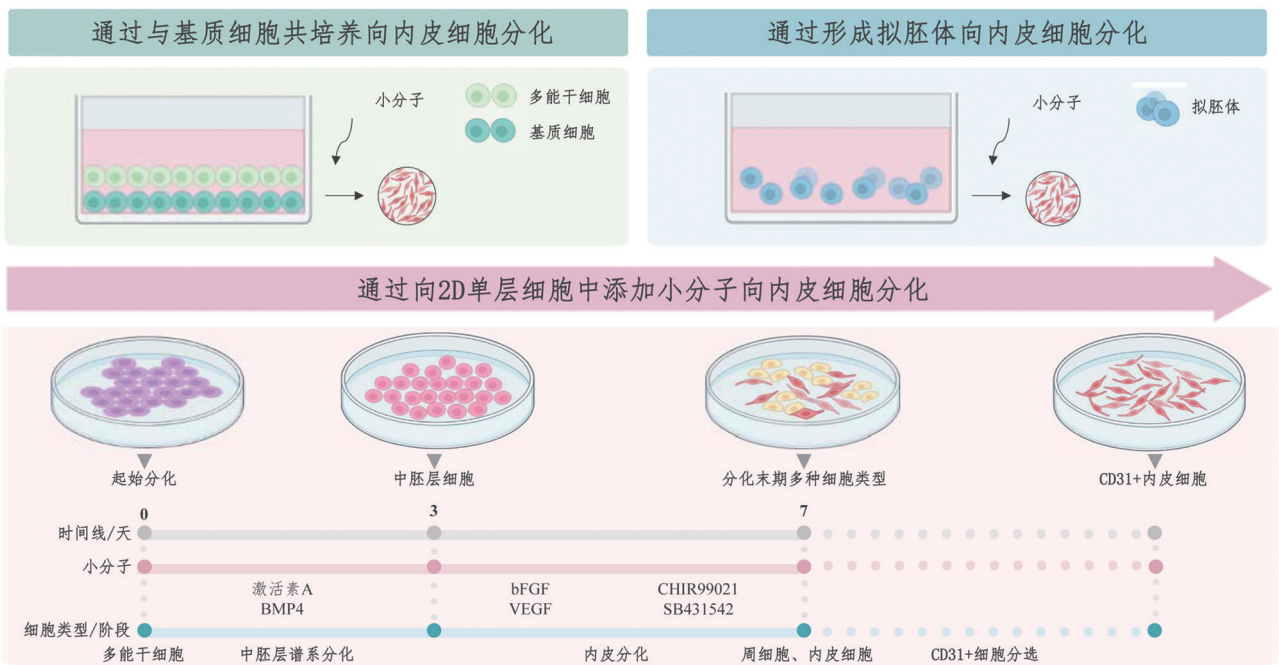


图1 多能干细胞向内皮细胞分化流程图

皮细胞分泌并促进血栓形成<sup>[24]</sup>。CD31、CD144 和 vWF 是最常用的内皮细胞标记物。乙酰化低密度脂蛋白的摄取和体外毛细血管样管形成潜力常用于内皮细胞功能验证<sup>[3]</sup>。验证内皮细胞的功能还包括使用跨内皮电阻测试单层内皮细胞的屏障能力<sup>[25]</sup>。最后,在移植时形成稳定、功能性的血管网络并与宿主血管系统相吻合常用于检测 PSC-EC 是否具有移植能力。如通过异种移植和成像进行体内研究显示, PSC-ECs 移植后,斑马鱼体内血管系统中含有内皮细胞<sup>[3]</sup>。另外,在疾病模型如肢体缺血<sup>[12]</sup>、心肌梗死<sup>[20]</sup>、急性肺损伤<sup>[21-22]</sup>和伤口愈合<sup>[26]</sup>中移植 PSC-ECs 并评估内皮细胞功能对于检测 PSC-ECs 的治疗潜力也提供了重要指标。

## 2 组织特异性内皮细胞的开发

不同血管床和器官的内皮细胞具有不同的分子标志和形态学特征以适应特定的组织器官功能<sup>[27-28]</sup>。目前,多能干细胞来源的内皮细胞大多类似于处于胚胎发育阶段的内皮细胞,更利于研究内皮的发育生物学<sup>[29]</sup>,而组织特异性内皮细胞的开发可以为研究和治疗提供更精准的系统。体外组织特异性内皮细胞的分化同样依赖于在细胞培养基中添加生长因子和小分子化合物。例如,动脉内皮细胞的特化高度依赖于 VEGF 和 NOTCH 信号的激活<sup>[30]</sup>,而静脉内皮细胞的特化则依赖于 COUP-TFII、EphB2 和 BMP/SMAD 介导的 EphB4 信号<sup>[31-32]</sup>。动静脉内皮细胞命运可以通过不同水平的 VEGF 浓度成功调节<sup>[33-34]</sup>。使用高浓度 VEGF 分化的 PSC-ECs 表达高水平的 NOTCH4、JAG1、HEY2、EFNB1、DLL4 和 CXCR4,与人脐动脉内皮细胞相似。相比之下,使用低浓度 VEGF 分化的 PSC-ECs 与人脐静脉内皮细胞非常相似,并且 NR2F2、EphB4 和 COUP-TFII 呈阳性。

但是,目前组织特异性内皮细胞分化方案都面临的一个主要挑战是大部分组织特异性内皮细胞的定义仍然模糊,使得体外分化变得困难<sup>[27]</sup>。另外,组织特异性内皮细胞的开发缺乏广度,尽管已经有多能干细胞向脑<sup>[35]</sup>、肝<sup>[36]</sup>、心脏<sup>[37]</sup>等特异性内皮细胞分化的尝试,但对多能干细胞向其他组织器官内皮分化的研究仍然缺乏。确定组织特异性内皮细胞有效分化程度的最佳方法是对每种特异性内皮细胞应该是什么样的进行完整的基因和表型描述。通过对单细胞或单个细胞核进行测序使组学分辨率进一步提高,可以详细描述组织特异性内皮细胞的异

质性以及特征基因<sup>[38-39]</sup>。内皮细胞的表型还与细胞所暴露的微环境的高度多样性密切相关<sup>[40]</sup>。因此,除了描述它们的遗传和功能特征外,还需要考虑这些细胞所处的不同环境,以描绘出调节其独特表型的外在因素。近来已有研究尝试使用人多能干细胞,在其他基质细胞(如周细胞或平滑肌细胞)或器官型实质细胞存在的情况下,分化为特异性内皮细胞<sup>[29,41]</sup>。另外,在其各自的组织内,内皮细胞暴露于机械力,如剪切应力和血液流动引起的周向拉伸力,以及生物化学因素如细胞外基质成分、旁分泌信号<sup>[42]</sup>等微环境中。只有了解影响其表型的因素,我们才能开始学习如何培养、维持和使用这些细胞。除了在体外分化面临的挑战,还必须考虑这些细胞实际应用所面临的问题,如随着 PSC-ECs 的继续成熟,其表型稳定性和增殖能力降低会导致供应不足而无法满足临床需求。但一旦开发出组织特异性内皮细胞分化的标准化程序,对 PSC-ECs 的实际应用将会产生重要影响。

## 3 内皮细胞在3D体外建模中的应用

3D 建模系统是一种体外模拟人体生理环境和功能的有前景的方法,包括类器官和组织工程技术。类器官来源于干细胞或组织特异性祖细胞,通过自组织过程形成与体内器官相似的结构和功能,是目前在体外进行生理环境模拟以及疾病模型构建的全新方法。组织工程是利用生物相容性材料来建立特定人体器官微结构和功能的技术。3D 血管化组织的形成对于构建成熟类器官具有重要的意义,实现血管化类器官是突破类器官建立后期普遍存在内部氧气、营养分布不均等问题的重要途径<sup>[43]</sup>。同时,组织工程中的一个关键挑战是,厚度大于 100~200  $\mu\text{m}$  的组织结构必须血管化,以确保组织核心区域的氧气和营养供应充足<sup>[44]</sup>。另外,体外建模的成功植入和整合需要内皮细胞快速形成脉管系统以提供营养并防止细胞死亡<sup>[45]</sup>。因此,内皮细胞对于 3D 体外建模的成熟和移植具有重要作用。目前,多能干细胞来源的内皮细胞已经成为了 3D 体外建模的一种重要的工具。

用 PSC-ECs 使类器官血管化主要有两种方法。在一种方法中, PSCs 独立分化为内皮祖细胞或组织特异性内皮细胞和组织特异性细胞类型(如神经细胞),它们进一步共培养形成的血管化类器官能够控制每个类器官中的初始细胞类型比率<sup>[46]</sup>。在另一种方法中, PSCs 向所有组织特异性细胞类型共



分化,包括通常在拟胚体形成后的内皮细胞<sup>[29]</sup>。在这种方法中,类器官自组织过程旨在模拟人类胚胎发育,但内皮细胞的百分比和类器官结构几乎无法控制。通过上述方法形成的类器官具有可灌注的内皮管网络。为了提高体外内皮细胞血管化类器官的功能,Palikuqi等<sup>[47]</sup>开发了一种适应性强的可以自组织形成可灌注血管丛的血管生成细胞——R-VECs,这种内皮细胞通过ETV2的短暂再激活具有持久的小管生成能力、可扩展性、血液灌流性,能够使正常类器官和肿瘤类器官形成有功能的血管网络并实现生理/病理功能。向类器官中递送内皮细胞还提高了类器官的体外存活率,并减少了内部细胞死亡的数量<sup>[48-49]</sup>。在体内,在大多数情况下,内皮细胞的存在使移植成功,并通过与宿主血管系统之间的吻合使类器官存活<sup>[50]</sup>。内皮细胞还促进类器官的成熟,通过分泌可溶性生长因子和细胞外基质蛋白改善其代谢和功能<sup>[51-52]</sup>。同时,相较于原代内皮细胞,PSCs来源的内皮细胞已被证明更适合于类器官成熟。两项独立研究表明,原代内皮细胞和PSC-ECs能不同程度地促进肝细胞成熟,PSC-ECs对促进肝类器官成熟更具有优势<sup>[53-54]</sup>。这可以部分解释为,这些研究中使用的PSC-ECs在类器官形成之前从PSCs分化为肝脏特异性内皮细胞<sup>[54]</sup>。其他研究表明,PSC-ECs可能具有不成熟的内皮祖细胞样表型<sup>[29]</sup>,与特定器官组织的细胞共培养诱导了内皮细胞向组织特异性内皮细胞的特化<sup>[54-55]</sup>。将PSCs来源的内皮细胞整合到类器官中可以构建功能齐全的微组织环境,提高类器官的成熟度,有助于更深入地了解人类胚胎发生及疾病发生和进展。

不同于类器官模型,另一种3D建模平台如血管微生理系统由带有微流体通道的微设备组成,使不同类型细胞与物理生化刺激(如流量和压力)紧密接触,更好地模拟了体内血管环境。为此,已建立了许多模型可用于在体外形成微血管网络。一种方法是将内皮细胞和支持细胞(如周细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞)悬浮在支架材料中,然后将支架材料置于3D微流体室中,刺激内皮细胞形成可灌注的微血管网络<sup>[56]</sup>。另外,还可通过3D打印或将细胞嵌入到水凝胶中来使细胞接种到预成型的支撑结构上,然后通过理化因素(如VEGF、缺氧等)诱导发芽形成微血管模型<sup>[56-58]</sup>。PSC-ECs已经成为微血管模型最常用的细胞类型之一<sup>[56]</sup>。这种微血管模型已被用于建立血管化微肿瘤和血管床,以研究肿瘤细胞的外渗和转移<sup>[56]</sup>以及肿瘤细胞与免疫细

胞之间的相互作用<sup>[59]</sup>。同时,也有研究使用基于3D水凝胶的微流控芯片对血脑屏障进行了建模<sup>[60]</sup>。血脑屏障由脑微血管内皮细胞组成,它们与周细胞和星形胶质细胞相互作用,动态调控了血脑屏障的通透性<sup>[60]</sup>。鉴于原代脑微血管内皮细胞产量低并易于在培养中去分化<sup>[61]</sup>,在血脑屏障模型中,PSC-ECs比原代细胞类型更具有优势。例如PSC-ECs能够组织成复杂的可灌注血管网络,并表现出血脑屏障的许多特性,包括有序紧密连接、营养转运蛋白的表达和极化外排转运蛋白活性<sup>[35,62]</sup>。另外,内皮细胞不仅在注入血脑屏障模型中发挥重要作用,在其他多器官的微流控模型中都是不可或缺的。如内皮屏障作为多组织芯片的决定性成分之一,对于组织稳态至关重要。内皮屏障使得每个组织在其自身优化的环境中培养,同时组织之间能够实现细胞因子、循环细胞和外泌体的通信。内皮细胞对于调节相关器官灌注及稳态、抗干扰和抗损伤都具有一定作用。随着多组织芯片微生理系统生物学复杂性的增加,内皮细胞的作用将更加明显<sup>[63]</sup>。除了以上微生理系统,几个研究小组已经开发出了工程心脏组织<sup>[64-65]</sup>,其通常由心肌细胞和支持性细胞类型填充的生物材料构成,其中,内皮细胞是组织血管化和正向调节心肌细胞功能所必需的。另外,在利用PSC-ECs建立的肾脏<sup>[66]</sup>、皮肤<sup>[67]</sup>等组织工程模型中也产生了可灌注的血管网络,促进了生物支架的血管化并与宿主脉管系统吻合,提高了工程组织的功能和治疗潜力。

#### 4 血管内皮细胞损伤疾病模型

血管疾病的发病机制通常与血管壁细胞的改变有关,因此血管内皮细胞往往成为研究发病机制和药物反应的靶点<sup>[68]</sup>。PSC-ECs重现了各种已知疾病的特征,如早年衰老综合征<sup>[14]</sup>、成年发病型糖尿病<sup>[16]</sup>、系统性硬化病<sup>[69]</sup>及非典型溶血性尿毒症<sup>[70]</sup>等。PSC-ECs还可被用于研究特定突变或环境因素对内皮细胞表型的影响,如AKT2敲除的PSC-ECs出现促炎基因表达上调和炎症趋化因子的增加,这可能最终导致冠状动脉疾病<sup>[13]</sup>。利用PSC-ECs作细胞材料进行研究,发现抑制MAPK14可有效降低CdCl<sub>2</sub>诱导的PSC-ECs内皮毒性<sup>[15]</sup>。但是,PSC-ECs并非源自完整的血管,而是代表了一种不成熟的表型,相比原代内皮细胞在模拟疾病表型方面是否存在差异也值得讨论。为此,Collado等<sup>[71]</sup>将PSC-ECs和血管源性内皮细胞分别在血流动力学条件下

培养后进行比较, 虽然 PSC-ECs 中 eNOs 的蛋白水平较低, 但 PSC-ECs 在血流动力学条件下培养后, 内皮和免疫标志基因表达水平与血管源性内皮细胞正相关, 低密度脂蛋白摄取试验表明 PSC-ECs 的功能成熟。另外, 两种细胞分别在具有动脉粥样硬化倾向的血流动力学条件下培养后都会产生炎症反应。这表明尽管 PSC-ECs 与血管源性内皮细胞存在一些差异, 但血流动力学培养使得 PSC-ECs 具有了与血管源性内皮细胞生理 / 病理反应的高度相似性, 这种方法为更准确地模拟罕见血管疾病和测试新的治疗方法提供了一个可行的系统, 是确保血管研究具有更高重现性的合适解决方法。

值得注意的是, iPSC-ECs 还可用于建立患者特异性疾病模型, 这些细胞可以解释由于遗传多样性、性别、种族和年龄造成的差异, 为开发个性化的药物治疗方案提供基础, 为精准医疗提供平台<sup>[72]</sup>。例如在家族性肺动脉高压这种由 BMPR2 突变引起的常染色体显性遗传病中, 只有约 20% 的人群患病, Gu 等<sup>[72]</sup>利用 BMPR2 突变携带者的 iPSC-ECs 分析确定了突变携带者未发生肺动脉高压的重要原因与 BMPR2 激活剂的增加或抑制剂的减少有关, 而生存率的提高与 BIRC3 的增加有关。iPSC-ECs 特别适合用于供体库有限的罕见遗传病, 或者通常不适合标准临床试验设计的患者群体, 从而为新疗法铺平道路。

## 5 细胞移植新进展

PSC-ECs 最初是作为通过细胞移植治疗血管疾病的一种手段而产生的。基于促进缺血组织中血管生成的细胞疗法有望重建血管系统, 为增加缺血性疾病患者的血流量提供了一种有前景的治疗策略。然而, 成人内皮祖细胞根据在体外培养的不同时间分为早期内皮祖细胞和晚期内皮祖细胞, 早期内皮祖细胞即贴壁培养 1 周的针状细胞且没有血管形成能力, 仅晚期内皮细胞即培养 2~4 周的鹅卵石样细胞直接参与新生血管网络的形成, 而通常情况下外周血中内皮祖细胞的数量是有限的, 存在心血管病危险因素者, 其内皮祖细胞数量更少<sup>[73]</sup>。在动物模型中, 移植后形成功能性血管的 PSC-ECs 成为了治疗缺血性疾病的潜在替代来源<sup>[8-9]</sup>。

目前, PSC-ECs 的治疗潜力已经在许多临床前动物模型中进行了测试。在几种肢体缺血小鼠模型中, 移植 PSC-ECs 7 d 后仍然可以检测到内皮细胞, 同时血液灌注和毛细血管密度显著增加, 促进了局

部血管生成<sup>[12]</sup>。血友病 A 是一种由 F8 基因突变导致的 FVIII 缺乏引起的出血性疾病, 由于 FVIII 主要在内皮细胞中产生, 经过 F8 基因编辑的 PSC-ECs 移植到小鼠体内后长期稳定地表达 FVIII, 因此内皮细胞移植治疗血友病 A 具有巨大的发展潜力<sup>[74-76]</sup>。急性呼吸窘迫综合征常常伴随中性粒细胞介导的炎症和内皮细胞损伤, IL8RA/B、CXCR1/2 和 CCR2/5 在中性粒细胞募集到损伤和炎症部位中起关键作用, 过表达 IL8RA/B 和 CCR2/5 的 iPSC-ECs 可以被靶向到受损动脉中的炎症部位, 防止大鼠血管损伤后炎症反应发生, 过表达 CXCR1/2 或 CCR2/5 的 iPSC-ECs 移植治疗还可减轻脂多糖诱导的急性肺损伤<sup>[21-22]</sup>。以上经过基因修饰的 PSC-ECs 移植治疗或靶向递送到受损部位的方法为血管疾病治疗提供了一种新的治疗策略。另外, 慢性伤口是血管疾病患者的主要并发症, 将 iPSCs 来源的内皮细胞和平滑肌细胞共培养并移植到小鼠皮肤伤口模型中, 促进了新生血管的形成和组织的修复<sup>[26]</sup>。这些结果突出了 iPSC-ECs 的促再生作用, 可用于伤口恢复, 并证明 iPSC-ECs 移植是促进新血管形成、组织修复、治疗难治性伤口的一种有前途的潜在疗法。另外, 临床转化还需要对大型动物 PSC-ECs 模型进行临床前优化和验证。研究表明, 从猪 PSCs 分化的内皮细胞移植到小鼠体内后, 这些猪 PSC-ECs 通过旁分泌途径改善了小鼠心肌梗死后的心脏功能, 证明它们在治疗心肌缺血方面的潜在用途<sup>[20]</sup>。这些大型动物 PSC-ECs 模型的开发进一步提高了研究人员对 PSC-ECs 的治疗潜力的认识, 并加速 PSC-ECs 治疗的临床转化。

PSC-ECs 在再生医学应用中具有很高的应用潜力, 但这种疗法的临床应用往往受到细胞活力低和细胞功能差的限制。最大化 PSC-ECs 临床效用的一个主要问题是细胞移植后的长期生存能力。直接使用裸细胞注射进行细胞移植, 功能性供体细胞的存活率在一个月后显著降低<sup>[77-78]</sup>。在后肢缺血模型中, PSC-ECs 在移植 14 d 后未显示移植细胞的生物发光信号<sup>[79]</sup>。为了解决这些限制, Tan 等<sup>[80]</sup>通过在电纺聚己内酯 / 明胶支架上培养 PSC-ECs 7 d 后将内皮细胞皮下植入小鼠体内, 使得细胞存活率显著提高, 同时促血管生成细胞因子、血管内皮生长因子和胎盘生长因子的表达显著升高。Lee 等<sup>[81]</sup>选择了一种新的可注射的自组装肽两亲性纳米基质凝胶, 并结合了细胞黏附配体 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) 和基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 可降解序列。RGDS



是一种来源于纤维连接蛋白的细胞黏附配体, 可促进细胞黏附。MMP-2 可降解序列促进纳米基质凝胶降解, 并使包封的细胞从凝胶迁移到宿主组织中。在这项研究中, 他们证明了 PSC-ECs 在缺血组织中存活超过 10 个月, 在血管重塑后的这段时间内持续动态地并入宿主血管, 有助于新血管的形成, 并且与裸 PSC-ECs 注射组相比, 显示出更好的血管再生能力。这种支架或凝胶等生物材料和 PSC-ECs 的联合疗法的发展最终有望延长细胞存活率并改善缺血性损伤后血管生成的治疗效果。

尽管 PSC-ECs 已经广泛在临床前动物模型中研究被证明具有良好的治疗潜力, 但针对内皮细胞疗法的临床试验仍然主要针对自体或异体主动脉内皮细胞、脐静脉内皮细胞及内皮祖细胞。虽然在早期的动物研究中, ESC-ECs 能快速整合到血管新生部位形成可灌注的血管内皮网络, 但目前发展到临床试验阶段的 ESCs 来源的可注射细胞产品仍然较少。另外, 由于 ESCs 的使用引起了一些伦理问题, 因此对 ESCs 来源的细胞产品的临床应用仍存在争议。与 ESCs 相比, iPSCs 来源的细胞被认为具有显著优势, 例如不存在伦理问题和免疫排斥反应。然而, 自 2006 年 Yamanaka 首次报道了 iPSCs 技术后, 该技术已发展了近 20 年, iPSCs 作为细胞疗法的应用仍面临许多实际问题, 如重编程效率低及残留在细胞群体中未分化的 iPSCs 形成畸胎瘤的可能性。各种研究描述了 iPSCs 细胞系中基因组遗传的不稳定性, 这些不稳定性是由亲代成体细胞中存在的变异以及重编程过程中质粒在基因组上的随机整合引起的<sup>[82]</sup>。为了克服这些问题, 已经建立了新的方法, 如通过引入蛋白质<sup>[83]</sup>、使用 mRNA<sup>[84]</sup> 或 microRNA<sup>[85]</sup> 以最大限度减少重编程过程中诱发突变的可能性。目前, 已使用 iPSCs 来源的视网膜色素上皮细胞 (NCT05445063)、心肌细胞 (NCT04696328) 及造血干细胞 (NCT03222453) 等多种细胞类型进行了临床试验。但 iPSCs 来源的内皮细胞的临床研究相对落后。一般来讲, iPSCs 来源的内皮细胞应用于细胞治疗需要大量内皮细胞来替代特定组织和器官中功能失调的细胞。目前, 已开发出多种能高效产生功能性内皮细胞的分化方案, 但由于许多研究中都使用了自己的方案和细胞类型, 因此需要更多的研究确定不同类型 iPSC-ECs 的表型和功能差异。同时, 在 iPSC-ECs 的持续扩增能力以及体内移植安全性方面仍需进行更多改善和评估。最后, 虽然 iPSC-ECs 有望用于治疗内皮功能障碍疾病, 但

iPSCs 诱导和内皮分化全部过程可能需要几个月才能完成, 这使得在治疗急性损伤时通常使用异体 iPSC-ECs 并通过免疫隔离装置避免异体移植带来的免疫排斥反应。一些研究人员通过省去多能干细胞这一中间过程而直接将体细胞重编程为内皮细胞<sup>[86]</sup>, 这一策略可以避免异体移植问题并缩短供体细胞的获取时间, 将有助于克服内皮细胞移植向临床转化的实际问题。此外, iPSC-ECs 的下一个挑战是开发具有组织异质性的内皮分化方案, 至今已有一些研究试图诱导 iPSC-ECs 表达相应的特征性基因<sup>[4-5]</sup>。如肝脏的微血管床由不连续的肝窦内皮细胞组成并特异性表达 LYVE1、STAB2、FVIII、CD32B 和 MRC1, 这是组织特异性内皮细胞的一个典型例子<sup>[87-89]</sup>。目前, Kouji 等<sup>[36]</sup> 已经建立了从 iPSC 诱导分化为特异性表达 LYVE1、STAB2 和 FVIII 的肝窦内皮细胞的培养系统。尽管仍存在一些障碍, 但鉴于 PSC-ECs 能够解决细胞移植所面临的细胞数量不充足的问题, 并且在前期研究中展现了良好的细胞移植潜力, 随着一些生物学上的重要问题的进一步研究, 未来 PSC-ECs 仍然是血管疾病治疗的重要细胞来源。

## 6 结语

过去十年中, 已经开发出多种方法从多能干细胞中生成功能性内皮细胞, 这些细胞被广泛用于建立 3D 体外模型和研究人类血管疾病, 并且已经在各种动物模型中测试了将 PSC-ECs 应用于再生医学的潜力 (表 1)。尽管有这些显著的进步, 但未来的研究仍然有几个重要挑战有待解决。如组织特异性内皮细胞的独特特征以及通过模拟其微环境在培养中维持内皮细胞差异表型的知识仍然有限。另外, 尚未在人类受试者中进行 PSC-ECs 移植的临床试验。积累对多能干细胞重编程效率、遗传不稳定性以及内皮细胞分化机制和质量控制的进一步研究将推动 PSC-ECs 的应用。

## [参 考 文 献]

- [1] Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20: 197-210
- [2] Guo Z, Mo Z. Regulation of endothelial cell differentiation in embryonic vascular development and its therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Life Sci*, 2021, 276: 119406
- [3] Qin K, Lei J, Yang J. The differentiation of pluripotent stem cells towards endothelial progenitor cells - potential application in pulmonary arterial hypertension. *Int J Stem*

表1 PSC-ECs在疾病模型及细胞治疗方面的应用

内皮细胞分子标志	细胞来源	诱导分化因子	分子特征	内皮结构功能鉴定	疾病模型	细胞治疗	参考文献
CD144 <sup>+</sup> 分选, CD144 <sup>+</sup> 内皮细胞	人类ESCs	CHIR99021; VEGF; bFGF	镉处理导致 MAPK 信号通路激活增强, 磷酸化MAPK14的表达水平上升	诱导内皮细胞损伤和细胞凋亡, 成管数量和长度减少, 迁移能力下降	动脉粥样硬化等血管疾病	——	[15]
未分选, 含60% CD31 <sup>+</sup> 、CD144 <sup>+</sup> 内皮细胞	人类ESCs	CHIR99021; BMP4; VEGF; 毛喉素	基因表达与人脐静脉内皮细胞相似, KDR和CD34表达水平高于人脐静脉内皮细胞	形态和功能无异常, 成管功能正常	肢体严重缺血疾病	肢体缺血小鼠模型; 内皮细胞在注射后7d可检测到, 血液灌注和毛细血管密度显著增加, 促进局部血管生成	[12]
CD34 <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 、 CD144 <sup>+</sup> 内皮细胞	人类ESCs; 人类iPSCs	BMP4; FGF2 SB431542; VEGF; 激活素A	无	形态和功能无异常, 红色荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取能力和成管功能正常	慢性伤口	小鼠伤口模型; 内皮细胞与平滑肌细胞共同移植增强了受损组织中新血管形成, 并加速伤口愈合	[26]
CD31 <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 内皮细胞	猪脂肪基质细胞来源iPSCs	BMP4; bFGF; SB431542; VEGF; 激活素A	基因表达谱与内源性内皮细胞相似	形态和功能无异常, 红色荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取能力和成管功能正常	心肌梗死	心肌梗死小鼠模型; 内皮细胞在缺血微环境中释放促血管生成和抗凋亡因子, 促进血管形成和心肌细胞存活, 改善心肌梗死后的心脏功能	[20]
CD31 <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 、eNOS <sup>+</sup> 、 vWF <sup>+</sup> 内皮细胞	大鼠成纤维细胞来源iPSCs	VEGF-A; BMP4 IL8RA/B表达水平上调	CCR2/5、CXCR1/2或IL8RA/B表达水平上调	形态和功能无异常, 呈典型单层鹅卵石形态	急性肺损伤	Sprague-Dawley大鼠急性肺损伤或右颈动脉球囊损伤模型; 内皮细胞靶向受损动脉并减少损伤诱导的炎性细胞因子表达、中性粒细胞/巨噬细胞浸润和新内膜形成	[21-22]
CD144 <sup>+</sup> 分选, CD144 <sup>+</sup> 内皮细胞	AKT2 敲除人类ESCs	Y-27632; CP21R7; BMP4; VEGF; 毛喉素	功能性AKT2下调	血管内皮细胞炎症反应	糖尿病、冠状动脉疾病	——	[13]
CD31 <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 、Tie-2 <sup>+</sup> 、 vWF <sup>+</sup> 、磷酸化- eNOS <sup>+</sup> 、Ang1/2 <sup>+</sup> 内皮细胞	HNF1A突变的 人类iPSCs	CHIR99021; VEGF; bFGF	CD144下调	TNF $\alpha$ 刺激后血管通透性显著增加, 对TNF $\alpha$ 敏感性更高	成年发病型糖尿病	——	[16]

表1 (续表)

内皮细胞分子标志	细胞来源	诱导分化因子	分子特征	内皮结构功能鉴定	疾病模型	细胞治疗	参考文献
KDR <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 、vWF <sup>+</sup> 成熟内皮	系统性硬化病患者的成纤维细胞来源iPSCs	CHIR99021; BMP4; SB431542; VEGF-A; 9-环己基-N-[4-(4-吗啉基)苯基]-2-(1-氮氧基)-9H-嘌呤-6-胺	SNAI1上调 CD144下调	成管功能缺陷, 成型良好的管的数量及面积减少、分枝点数量减少	系统性硬化病	—	[69]
CD31 <sup>+</sup> 、CD144 <sup>+</sup> 分选, CD31 <sup>+</sup> 、CD144 <sup>+</sup> 内皮细胞	早年衰老综合征患者的成纤维细胞来源iPSCs	CHIR99021; VEGF; BMP4; 聚乙炔醇; 毛喉素	CD31、KDR、vWF等基因下调	畸形外观、异常核形态、端粒缩短、复制能力降低且功能受损(红色荧光标记的乙酰化低密度脂蛋白摄取能力下降; 成管能力下降)	早年衰老综合征	—	[14]
CD31 <sup>+</sup> 、CD144 <sup>+</sup> 、vWF <sup>+</sup> 、KDR <sup>+</sup> 内皮细胞	A型血友病患者CD34 <sup>+</sup> 细胞来源iPSCs	BMP4; VEGF; bFGF	内皮特异性CD144启动子驱动的FVIII表达	形态和功能无异常, 呈典型单层鹅卵石形态, 成管功能正常	A型血友病	血友病小鼠模型; 移植的细胞沿血窦在肝脏中增殖, 并显示长期稳定的治疗性FVIII活性	[76]



- Cells, 2022, 15: 122-35
- [4] Sivarapatna A, Ghaedi M, Le AV, et al. Arterial specification of endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells in a biomimetic flow bioreactor. *Biomaterials*, 2015, 53: 621-33
- [5] Yoo H, Choi D, Choi Y. Conjugation of vascular endothelial growth factor to polylactic-co-glycolic acid nanospheres enhances differentiation of embryonic stem cells to lymphatic endothelial cells. *Anim Biosci*, 2021, 34: 533-8
- [6] Pars S, Achberger K, Kleger A, et al. Generation of functional vascular endothelial cells and pericytes from keratinocyte derived human induced pluripotent stem cells. *Cells*, 2021, 10: 74
- [7] Wang K, Lin RZ, Hong X, et al. Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba7606
- [8] Prasain N, Lee MR, Vemula S, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1151-7
- [9] Zhang F, Zhu Y, Chen J, et al. Efficient endothelial and smooth muscle cell differentiation from human pluripotent stem cells through a simplified insulin-free culture system. *Biomaterials*, 2021, 271: 120713
- [10] Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27: 559-67
- [11] Xu M, He J, Zhang C, et al. Strategies for derivation of endothelial lineages from human stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 200
- [12] MacAskill MG, Saif J, Condie A, et al. Robust revascularization in models of limb ischemia using a clinically translatable human stem cell-derived endothelial cell product. *Mol Ther*, 2018, 26: 1669-84
- [13] Roudnický F, Lan Y, Friesen M, et al. Modeling the effects of severe metabolic disease by genome editing of hPSC-derived endothelial cells reveals an inflammatory phenotype. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6201
- [14] Matrone G, Thandavarayan RA, Walther BK, et al. Dysfunction of iPSC-derived endothelial cells in human Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Cell Cycle*, 2019, 18: 2495-508
- [15] Tang L, Su J, Liang P. Modeling cadmium-induced endothelial toxicity using human pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Sci Rep*, 2017, 7: 14811
- [16] Kachamakova-Trojanowska N, Stepniewski J, Dulak J. Human iPSCs-derived endothelial cells with mutation in HNF1A as a model of maturity-onset diabetes of the young. *Cells*, 2019, 8: 1440
- [17] James D, Nam H, Seandel M, et al. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGF $\beta$  inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 161-6
- [18] Elcheva I, Brok-Volchanskaya V, Kumar A, et al. Direct induction of haematoendothelial programs in human pluripotent stem cells by transcriptional regulators. *Nat Commun*, 2014, 5: 4372
- [19] Gong W, Das S, Sierra-Pagan JE, et al. ETV2 functions as a pioneer factor to regulate and reprogram the endothelial lineage. *Nat Cell Biol*, 2022, 24: 672-84
- [20] Gu M, Nguyen PK, Lee AS, et al. Microfluidic single cell analysis show porcine induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells improve myocardial function by paracrine activation. *Circ Res*, 2012, 111: 882-93
- [21] Xing D, Wells JM, Giordano SS, et al. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Appl Physiol (1985)*, 2019, 127: 444-56
- [22] Giordano S, Zhao X, Chen YF, et al. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells overexpressing interleukin-8 receptors A/B and/or C-C chemokine receptors 2/5 inhibit vascular injury response. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 1168-77
- [23] Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 223-32
- [24] Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood*, 2011, 117: 1071-80
- [25] Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Rep*, 2014, 3: 804-16
- [26] Kim KL, Song SH, Choi KS, et al. Cooperation of endothelial and smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells enhances neovascularization in dermal wounds. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19: 2478-85
- [27] Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, et al. Vascular endothelial cells: heterogeneity and targeting approaches. *Cells*, 2021, 10: 2712
- [28] Ding S, Zhang X, Qiu H, et al. Non-cardiomyocytes in the heart in embryo development, health, and disease, a single-cell perspective. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 873264
- [29] Cakir B, Xiang Y, Tanaka Y, et al. Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods*, 2019, 16: 1169-75
- [30] Slukvin II, Uenishi GI. Arterial identity of hemogenic endothelium: a key to unlock definitive hematopoietic commitment in human pluripotent stem cell cultures. *Exp Hematol*, 2019, 71: 3-12
- [31] Kume T. Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histol Histopathol*, 2010, 25: 637-46
- [32] Neal A, Nornes S, Payne S, et al. Venous identity requires BMP signalling through ALK3. *Nat Commun*, 2019, 10: 453
- [33] Rosa S, Praça C, Pitrez PR, et al. Functional characterization of iPSC-derived arterial- and venous-like endothelial cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 3826
- [34] Zhang J, Chu LF, Hou Z, et al. Functional characterization

- of human pluripotent stem cell-derived arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E6072-8
- [35] Park TE, Mustafaoglu N, Herland A, et al. Hypoxia-enhanced blood-brain barrier chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat Commun*, 2019, 10: 2621
- [36] Kouyama Y, Kido T, Ito T, et al. An *in vitro* human liver model by iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 490-8
- [37] Mikryukov AA, Mazina A, Wei B, et al. BMP10 signaling promotes the development of endocardial cells from human pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitors. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 96-111
- [38] Hocker JD, Poirion OB, Zhu F, et al. Cardiac cell type-specific gene regulatory programs and disease risk association. *Sci Adv*, 2021, 7: eabf1444
- [39] Zhang X, Qiu H, Zhang F, et al. Advances in single-cell multi-omics and application in cardiovascular research. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 883861
- [40] Bacci C, Wong V, Barahona V, et al. Cardiac and lung endothelial cells in response to fluid shear stress on physiological matrix stiffness and composition. *Microcirculation*, 2021, 28: e12659
- [41] Linville RM, DeStefano JG, Sklar MB, et al. Human iPSC-derived blood-brain barrier microvessels: validation of barrier function and endothelial cell behavior. *Biomaterials*, 2019, 190-191: 24-37
- [42] Ricard N, Bailly S, Guignabert C, et al. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18: 565-80
- [43] Vargas-Valderrama A, Messina A, Mitjavila-Garcia MT, et al. The endothelium, a key actor in organ development and hPSC-derived organoid vascularization. *J Biomed Sci*, 2020, 27: 67
- [44] Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, et al. Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2019, 14: 3082-100
- [45] Sekiya S, Shimizu T. Introduction of vasculature in engineered three-dimensional tissue. *Inflamm Regen*, 2017, 37: 25
- [46] Pham MT, Pollock KM, Rose MD, et al. Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport*, 2018, 29: 588-93
- [47] Palikuqi B, Nguyen DT, Li G, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature*, 2020, 585: 426-32
- [48] Dye BR, Dedhia PH, Miller AJ, et al. A bioengineered niche promotes *in vivo* engraftment and maturation of pluripotent stem cell derived human lung organoids. *Elife*, 2016, 5: e19732
- [49] Asai A, Aihara E, Watson C, et al. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. *Development*, 2017, 144: 1056-64
- [50] Takahashi Y, Takebe T, Taniguchi H. Methods for generating vascularized islet-like organoids via self-condensation. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2018, 45: e49
- [51] Candiello J, Grandhi TSP, Goh SK, et al. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials*, 2018, 177: 27-39
- [52] Pettinato G, Lehoux S, Ramanathan R, et al. Generation of fully functional hepatocyte-like organoids from human induced pluripotent stem cells mixed with endothelial cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 8920
- [53] Goulart E, De Caires-Junior LC, Telles-Silva KA, et al. Adult and iPSC-derived non-parenchymal cells regulate liver organoid development through differential modulation of Wnt and TGF- $\beta$ . *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10: 258
- [54] Kouyama Y, Kido T, Ito T, et al. An *in vitro* human liver model by iPSC-derived parenchymal and non-parenchymal cells. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 490-8
- [55] Praça C, Rosa SC, Sevin E, et al. Derivation of brain capillary-like endothelial cells from human pluripotent stem cell-derived endothelial progenitor cells. *Stem Cell Rep*, 2019, 13: 599-611
- [56] Andrejcsk JW, Hughes CCW. Engineering perfused microvascular networks into microphysiological systems platforms. *Curr Opin Biomed Eng*, 2018, 5: 74-81
- [57] Natividad-Diaz SL, Browne SA, Jha AK, et al. A combined hiPSC-derived endothelial cell and *in vitro* microfluidic platform for assessing biomaterial-based angiogenesis. *Biomaterials*, 2019, 194: 73-83
- [58] Crosby CO, Valliappan D, Shu D, et al. Quantifying the vasculogenic potential of induced pluripotent stem cell-derived endothelial progenitors in collagen hydrogels. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25: 746-58
- [59] Bi Y, Shirure VS, Liu R, et al. Tumor-on-a-chip platform to interrogate the role of macrophages in tumor progression. *Integr Biol (Camb)*, 2020, 12: 221-32
- [60] Seo S, Kim H, Sung JH, et al. Microphysiological systems for recapitulating physiology and function of blood-brain barrier. *Biomaterials*, 2020, 232: 119732
- [61] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 650-61
- [62] Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 783-91
- [63] Ronaldson-Bouchard K, Teles D, Yeager K, et al. A multi-organ chip with matured tissue niches linked by vascular flow. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6: 351-71
- [64] Eder A, Vollert I, Hansen A, et al. Human engineered heart tissue as a model system for drug testing. *Adv Drug Deliver Rev*, 2016, 96: 214-24
- [65] MacQueen LA, Sheehy SP, Chantre CO, et al. A tissue-engineered scale model of the heart ventricle. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 930-41
- [66] Ciampi O, Bonandrini B, Derosas M, et al. Engineering the vasculature of decellularized rat kidney scaffolds using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 8001
- [67] Abaci HE, Guo Z, Coffman A, et al. Human skin constructs

- with spatially-controlled vasculature using primary and iPSC-derived endothelial cells. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5: 1800-7
- [68] Evans CE, Iruela-Arispe ML, Zhao YY. Mechanisms of endothelial regeneration and vascular repair and their application to regenerative medicine. *Am J Pathol*, 2021, 191: 52-65
- [69] Gholami S, Mazidi Z, Pahlavan S, et al. A novel insight into endothelial and cardiac cells phenotype in systemic sclerosis using patient-derived induced pluripotent stem cell. *Cell J*, 2021, 23: 273-87
- [70] Zhou D, Tan Y, Liu X, et al. Patient-specific iPSC-derived endothelial cells reveal aberrant p38 MAPK signaling in atypical hemolytic uremic syndrome. *Stem Cell Rep*, 2021, 16: 2305-19
- [71] Collado MS, Cole BK, Figler RA, et al. Exposure of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial and smooth muscle cells in coculture to hemodynamics induces primary vascular cell-like phenotypes. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 1673-83
- [72] Gu M, Shao NY, Sa S, et al. Patient-specific iPSC-derived endothelial cells uncover pathways that protect against pulmonary hypertension in BMPR2 mutation carriers. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 490-504
- [73] Díaz del Moral S, Barrera S, Muñoz-Chápuli R, et al. Embryonic circulating endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*, 2020, 23: 531-41
- [74] Rose M, Gao K, Cortez-Toledo E, et al. Endothelial cells derived from patients' induced pluripotent stem cells for sustained factor VIII delivery and the treatment of hemophilia A. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9: 686-96
- [75] Gage BK, Merlin S, Olgasi C, et al. Therapeutic correction of hemophilia A by transplantation of hPSC-derived liver sinusoidal endothelial cell progenitors. *Cell Rep*, 2022, 39: 110621
- [76] Olgasi C, Talmon M, Merlin S, et al. Patient-specific iPSC-derived endothelial cells provide long-term phenotypic correction of hemophilia A. *Stem Cell Rep*, 2018, 11: 1391-406
- [77] Cho HJ, Lee N, Lee JY, et al. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J Exp Med*, 2007, 204: 3257-69
- [78] Van Der Bogt KEA, Sheikh AY, Schrepfer S, et al. Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. *Circulation*, 2008, 118: S121-9
- [79] Rufaihah AJ, Huang NF, Jamé S, et al. Endothelial cells derived from human iPSCs increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: e72-9
- [80] Tan RP, Chan AHP, Lennartsson K, et al. Integration of induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells with polycaprolactone/gelatin-based electrospun scaffolds for enhanced therapeutic angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9: 70
- [81] Lee SJ, Sohn YD, Andukuri A, et al. Enhanced therapeutic and long-term dynamic vascularization effects of human pluripotent stem cell-derived endothelial cells encapsulated in a nanomatrix gel. *Circulation*, 2017, 136: 1939-54
- [82] Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Rev Rep*, 2017, 13: 7-16
- [83] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 472-6
- [84] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 618-30
- [85] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 633-8
- [86] Morita R, Suzuki M, Kasahara H, et al. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112: 160-5
- [87] De Haan W, Øie C, Benkheil M, et al. Unraveling the transcriptional determinants of liver sinusoidal endothelial cell specialization. *Am J Physiol Gastr L*, 2020, 318: G803-15
- [88] Gage BK, Liu JC, Innes BT, et al. Generation of functional liver sinusoidal endothelial cells from human pluripotent stem-cell-derived venous angioblasts. *Cell Stem Cell*, 2020, 27: 254-69
- [89] DeLeve LD, Maretti-Mira AC. Liver sinusoidal endothelial cell: an update. *Semin Liver Dis*, 2017, 37: 377-87