

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00068

· 论 著 ·

## 同步诱导培养兔骨髓源性内皮祖细胞和平滑肌祖细胞

张永珍<sup>1,2</sup>, 李文芳<sup>3</sup>, 樊新生<sup>1</sup>, 马小华<sup>1</sup>, 吴绪敏<sup>1</sup>, 张传森<sup>2\*</sup>

1. 泰山学院体育学院理论教研室, 泰安 271000

2. 第二军医大学基础部人体解剖与组织胚胎学教研室, 上海 200433

3. 泰安市妇幼保健院儿童保健科, 泰安 271000

**[摘要]** **目的** 采用兔骨髓来源的单个核细胞同步诱导分化为兔内皮祖细胞(EPCs)和平滑肌祖细胞(SPCs),研究其生物学特性,评估其作为组织工程化静脉瓣种子细胞的可能性。**方法** 梯度密度离心法获取兔骨髓血单个核细胞沉淀,分别用含5%胎牛血清(FBS)的EGM-2完全培养液向EPCs方向诱导培养;用含20 ng/mL血小板源性生长因子BB、5%FBS,不含血管内皮生长因子(VEGF)的EBM-2培养液向SPCs方向诱导培养。鉴定两种细胞的分化情况。**结果** 诱导的EPCs培养至10 d左右,细胞单层融合呈“铺路石”状;表达血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR-2)、血管性血友病因子(vWF)、CD133,不表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA);透射电镜可见细胞质内特征性Weibel-Palade小体;细胞生物学功能检测可见EPCs在基质胶上呈现血管状生长。诱导的SPCs培养至14 d左右呈现血管平滑肌细胞“峰-谷”样生长特性;表达CD34、 $\alpha$ -SMA,不表达vWF和VEGFR-2;在透射电镜下可见细胞内含有与细胞纵轴平行排列的肌丝;在基质胶上不规则生长。**结论** 兔骨髓血梯度密度离心得到的单个核细胞可同步诱导分化为EPCs和SPCs,为构建组织工程化静脉瓣提供了经济且可简便获取的种子细胞。

**[关键词]** 内皮祖细胞;平滑肌祖细胞;组织工程化静脉瓣;组织工程**[中图分类号]** R 329.29; R 543 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0068-06

### Synchronous culture of rabbit bone marrow-derived endothelial progenitor cells and smooth muscle progenitor cells

ZHANG Yong-zhen<sup>1,2</sup>, LI Wen-fang<sup>3</sup>, FAN Xin-sheng<sup>1</sup>, MA Xiao-hua<sup>1</sup>, WU Xu-min<sup>1</sup>, ZHANG Chuan-sen<sup>2\*</sup>

1. Department of Theory, College of Sports, Taishan University, Taian 271000, Shandong, China

2. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of Child Health Care, Maternity and Child Health Hospital, Taian 271000, Shandong, China

**[Abstract]** **Objective** To induce synchronous differentiation of rabbit bone marrow-derived mononuclear cells into endothelial progenitor cells (EPCs) and smooth muscle progenitor cells (SPCs), and to study their biological properties and the possibility of them as seed cells for tissue-engineered venous valves. **Methods** Gradient density centrifugation was used to obtain bone marrow blood mononuclear cells, which were separately cultured with EGM-2 complete medium containing 5% FBS for differentiation of EPCs and with EBM-2 medium without vascular endothelial growth factor (VEGF) containing 5% FBS and 20 ng/mL platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) for differentiation of SPCs. The differentiation of EPCs and SPCs was identified by various methods. **Results** EPCs were cultured for 10 days and the cells fused into monolayer, showing a “stepping stone” appearance and expressing VEGF receptor-2 (VEGFR-2), von Willebrand factor (vWF) and CD133, but not  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA); Weibel-Palade bodies were seen within the EPCs cytoplasm under the transmission electron microscope. Biological function tests showed visible EPCs growing on the matrigel in a blood vessel-like form. SPCs were cultured for 14 days and showed the specific features of the vascular smooth muscle growth, namely, the “peak-valley” growth way. SPCs expressed CD34 and  $\alpha$ -SMA but not vWF and VEGFR-2. Myofilaments, paralleling with the cell longitudinal axis, were seen under the transmission electron microscope. SPCs could not form vessel-like structures on the matrigel. **Conclusion** Mononuclear cells can be obtained through gradient density centrifugation of the bone marrow blood, which can be synchronously induced into EPCs and SPCs, providing economical and easy seed cells for tissue-engineered venous valves.

**[收稿日期]** 2013-06-07 **[接受日期]** 2013-07-30**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672045). Supported by National Natural Science Foundation of China (30672045).**[作者简介]** 张永珍, 博士, 讲师. E-mail: zyz7356@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870952, E-mail: chuansenzhang@126.com

[Key words] endothelial progenitor cells; smooth muscle progenitor cells; tissue-engineered venous valve; tissue engineering  
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1): 68-73]

内皮细胞(endothelial cells, ECs)和平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)是构建组织工程化静脉瓣重要的种子细胞。种子细胞的性能决定着组织工程化静脉瓣的功能,如何在短期内获取大量高性能的种子细胞是构建组织工程化静脉瓣面临的问题。早期组织工程化静脉瓣研究采用的种子细胞来源于血管组织<sup>[1]</sup>,但细胞增殖能力低,很难在短期内获得大量纯度较高的种子细胞。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是 ECs 的前体细胞,存在于骨髓和外周血等组织内,可在体内外分化为 ECs<sup>[2]</sup>。温昱等<sup>[3]</sup>利用犬骨髓来源的多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)和 EPCs 作为种子细胞构建组织工程化静脉瓣,并完成了在体效用性的观察,发现从骨髓获得的种子细胞活性好、增殖能力强、表型稳定。但由于 EPCs 和 MAPCs 的获用采取的是全骨髓培养免疫磁珠分选术,操作过程复杂、分选难度大、易污染、费用高,而且分别培养两类种子细胞,耗费时间久,在时间上不能很好地满足构建组织工程化静脉瓣需求。本研究从兔骨髓中分离出单个核细胞,同步诱导培养出 EPCs 和平滑肌祖细胞(smooth muscle progenitor cells, SPCs),并鉴定 EPCs 和 SPCs 的生物学特性,探索一种操作简便、经济、高效地获取组织工程化静脉瓣种子细胞的方法,并为其他心血管组织工程构建提供借鉴。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 清洁级新西兰大白兔 10 只,雌雄不限,体质量 2.3~2.5 kg,购自第二军医大学实验动物中心,合格证号: SCXK(沪)2011-0011。EGM-2 和 EBM-2 培养基购自美国 Lonza 公司;兔淋巴细胞分离液购自美国 Pharmacia 公司;胰酶消化液购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司;重组人血小板源性生长因子 BB(PDGF-BB)购自美国 Pepro Tech 公司;兔抗人 CD133 单克隆抗体和小鼠抗人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗人 CD34 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;兔源血管性血友病因子(vWF)多克隆抗体和兔抗人血管内皮生长因子受体 2(VEGFR-2)抗体购自美国 Santa Cruz 公司。基质胶(matrigel)购自美国 Becton Dickinson 公

司。EPCs 诱导培养液为 EGM-2 完全培养液,含 5% FBS 及 1 ng/mL 血管内皮生长因子(VEGF)、5 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及 1 ng/mL 胰岛素样生长因子 1(IGF-1)等细胞生长因子;SPCs 诱导培养液为含 5% FBS、20 ng/mL PDGF-BB,不含 VEGF 的 EBM-2 培养液。

1.2 兔骨髓单个核细胞获取及诱导培养 用 3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 经兔耳缘静脉麻醉动物。电动剃毛器剪去兔单侧髂部毛发,用碘酊消毒术区皮肤,乙醇脱碘,铺盖无菌孔巾,骨髓穿刺针在髂嵴前 0.5 cm 处缓缓进针,抽取骨髓血 2 mL 于 400 U 肝素润壁的 10 mL 注射器中,用 PBS 以 1:2 的比例稀释。将密度为 1.077 的兔淋巴细胞分离液加入 50 mL 无菌离心管中,缓慢注入稀释的骨髓液,使骨髓液浮于兔淋巴细胞分离液面之上,二者体积之比为 5:3,2 000 r/min 离心 20 min。离心后管内液体分 4 层,最上层是血浆,含部分血小板;第 2 层为薄薄的白膜层,主要含单个核细胞;第 3 层为淋巴细胞分离液;第 4 层为红细胞及细胞沉淀。吸取紧贴在血浆下的白膜层细胞,即为单个核细胞(示意图见图 1)。将吸取的单个核细胞用 10 mL PBS 吹打漂洗,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清后将细胞沉淀再次用 10 mL PBS 漂洗,各取一半 PBS 细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min,将细胞沉淀分别用 EPCs 诱导培养液和 SPCs 诱导培养液 2 mL 重悬,吸入 25 cm<sup>3</sup> 培养瓶中,再加上对应的诱导培养液 3 mL。将细胞培养瓶置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度的细胞培养箱中进行培养,第 48 小时后换培养液,此后每日更换培养液,倒置显微镜下观察细胞形态变化并摄片。

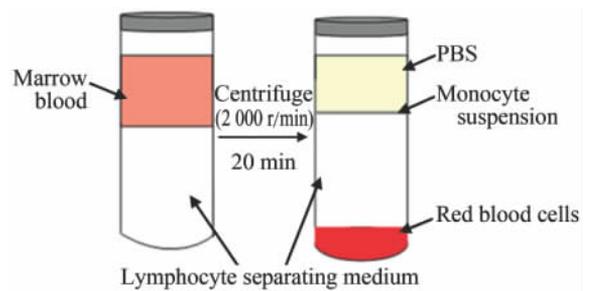


图 1 梯度密度离心前后骨髓血的液体分层

Fig 1 Marrow blood layers before and after gradient density centrifugation

1.3 细胞免疫荧光和免疫细胞化学染色鉴定 (1) 细胞免疫荧光检测 vWF 和  $\alpha$ -SMA 表达: EPCs/SPCs 培养第 10 天, 制备爬片细胞, PBS 洗涤后用 2% 山羊血清封闭 40 min; 分别加入抗体稀释液稀释的 1:100 的兔抗人 vWF 多克隆抗体、小鼠抗人  $\alpha$ -SMA 抗体 50  $\mu$ L (阴性对照以抗体稀释液代替一抗), 放入湿盒, 4 $^{\circ}$ C 过夜。取出湿盒, 室温下复温 30 min, PBS 漂洗, 5 min $\times$ 3 次; 滴加对应的荧光二抗 IgG, 室温下放置 30 min; PBS 洗 5 min $\times$ 3 次; 封片, 荧光显微镜下观察 vWF/ $\alpha$ -SMA 的表达情况。(2) 免疫细胞化学染色 DAB 显色检测 CD34、CD133、VEGFR-2、 $\alpha$ -SMA 的表达: PBS 清洗细胞爬片 3 次, 每次 3 min; 3%  $H_2O_2$  阻断内源性过氧化物酶 10 min; PBS 清洗 3 次, 每次 3 min; 分别加兔抗人 CD34、CD133、VEGFR-2 抗体及鼠抗人  $\alpha$ -SMA 抗体 (滴度均为 1:100) 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 分别加入 HRP 标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 清洗后 DAB 显色 10 min, 苏木精衬染 1.5 min, 甘油明胶封片; 显微镜下观察拍照。

1.4 透射电镜检测细胞超微结构 将培养第 10 天的 EPCs 和 SPCs 经 0.25% 胰蛋白酶 + 0.01% EDTA 消化后, 1 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, PBS 漂洗细胞沉淀 2 次, 1 000 r/min 离心 6 min。收集沉淀到 Eppendorf 管中, 2.5% 戊二醛固定 (4 $^{\circ}$ C) 2 h, 1% 锇酸后固定 2 h (pH 7.3); 再用缓冲液漂洗 20 min, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片 (70 nm), 染色后拍照。

1.5 细胞在基质胶上成血管实验 基质胶 4 $^{\circ}$ C 解冻备用, 24 孔板置于冰上预冷, 将呈液态状的基质胶铺在 24 孔板上, 每孔 200  $\mu$ L; 将铺好的 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。将培养 1 周的 EPCs 和 SPCs 分别消化、离心, 细胞沉淀分别用 EPCs 培养液和 SPCs 培养液重悬, 每孔加 1 mL 细胞悬液, 细胞数约  $6 \times 10^5$ /孔, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。当细胞融合度达 80%~90%, 在倒置显微镜下摄片。

## 2 结果

2.1 EPCs、SPCs 细胞形态的变化 分离的单个核细胞用诱导培养液重悬后, 镜下观察细胞悬浮于培养液中, 大小不一, 细胞透光度高 (图 2A)。48 h 后

首次换液培养, 换液前观察到部分细胞已贴壁, 细胞大小不一, 呈圆形, 饱满, 有突起 (图 3A), 此时从形态上看两类细胞无明显区别。EPCs 原代培养 4 d 后有克隆形成, 细胞克隆中间为细胞团, 细胞团向周围“发出”短梭形、三角形、多角型细胞, 呈放射冠样 (图 2B); 传代后, EPCs 体积增大呈椭圆形, 胞质丰富 (图 2C); 培养 10 d 左右, EPCs 排列致密, 单层融合呈“铺路石”状 (图 2D)。SPCs 原代培养 6 d 后, 以细胞克隆团为中心向外呈放射性生长, 周围细胞形态呈长梭形 (图 3B)。传代后 SPCs 呈长梭状, 细胞增殖迅速, 需 2 d 传代 1 次 (图 3C)。培养 14 d 左右, SPCs 生长融合时呈“峰-谷”状 (图 3D), 多层细胞交叉重叠生长而形成“峰”, 两“峰”之间细胞呈单层或层数少为“谷”。

2.2 EPCs 和 SPCs 细胞免疫荧光、免疫细胞化学染色鉴定 EPCs 表达 vWF (图 4A)、VEGFR-2 (图 4B)、CD133 (图 4C), 不表达  $\alpha$ -SMA (图 4D); SPCs 表达  $\alpha$ -SMA (图 5A、5B)、CD34 (图 5C), 不表达 vWF (图 5D) 和 VEGFR-2。

2.3 透射电镜检测 EPCs、SPCs 的超微结构 透射电镜下, EPCs 呈不规则的扁平形, 细胞核呈卵圆形, 细胞核周围胞质丰富, 胞质内可见大量吞噬小泡 (图 6A), 有 ECs 特征性的 Weibel-Palade 小体 (W-P 小体, 图 6B); SPCs 内含有与细胞纵轴平行排列的肌丝, 分布在细胞核的周围, 数量不等 (图 6C、6D)。

2.4 细胞在基质胶上成血管实验 将 EPCs 和 SPCs 分别接种在基质胶上培养 24 h, EPCs 在基质胶上生长时呈血管网状 (图 7A), SPCs 在基质胶上生长比较均匀, 呈现不规则形态 (图 7B)。

## 3 讨论

ECs 和 SMCs 是组织工程化静脉瓣重要的种子细胞, 以往构建组织工程化静脉瓣时获取种子细胞采用组织块贴壁培养法和酶消化法。贴壁法获取的是成熟的种子细胞, 细胞活性低, 增殖能力有限, 而酶消化法会改变细胞表面分子的特性。EPCs 是一类具有高增殖潜能的前体细胞, 它不同于多向分化潜能的干细胞, 介于干细胞和成熟细胞之间, 在一定条件下可分化为成熟的 ECs, 具有生成血管的能力<sup>[4]</sup>。在脐带血、外周血、骨髓中均有 EPCs 存在, 但前者中的 EPCs 被证实均来源于骨髓<sup>[5]</sup>。SPCs 是

SMCs 前体细胞, 在体内外能直接分化为血管平滑肌细胞, 在成体骨髓、外周血、动脉外膜、心脏及骨骼

肌等外周组织中均存在<sup>[6-9]</sup>, 但 SPCs 的起源尚未完全清楚<sup>[10]</sup>。

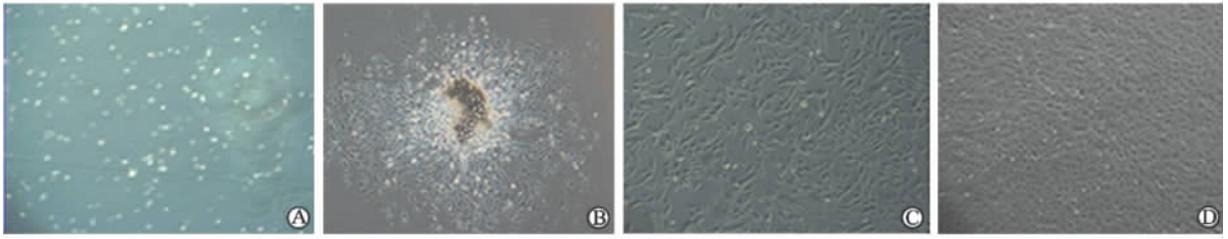


图 2 EPCs 显微镜下形态

Fig 2 Microscopic morphology of endothelial progenitor cells (EPCs)

A: Newly isolated mononuclear cells; B: Colony-like growth of EPCs 4 d after culture; C: The EPCs was round and grew much bigger after subculture; D: The EPCs showed the so called stepping-stone appearance. Original magnification:  $\times 10$  (A,B,D);  $\times 20$  (C)

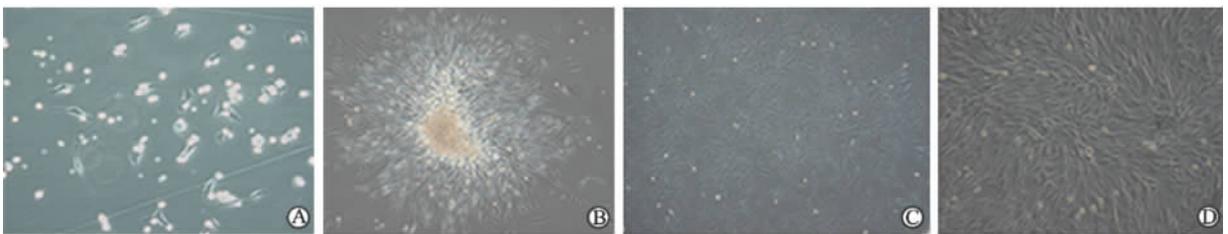


图 3 SPCs 显微镜下形态

Fig 3 Microscopic morphology of smooth muscle progenitor cells (SPCs)

A: Mononuclear cells 48 h after culture; B: Colony-like growth of SPCs 6 d after culture; C: The SPCs were spindle-shaped; D: The SPCs showed the "peak-valley" appearance. Original magnification:  $\times 10$  (B,C);  $\times 20$  (D);  $\times 40$  (A)

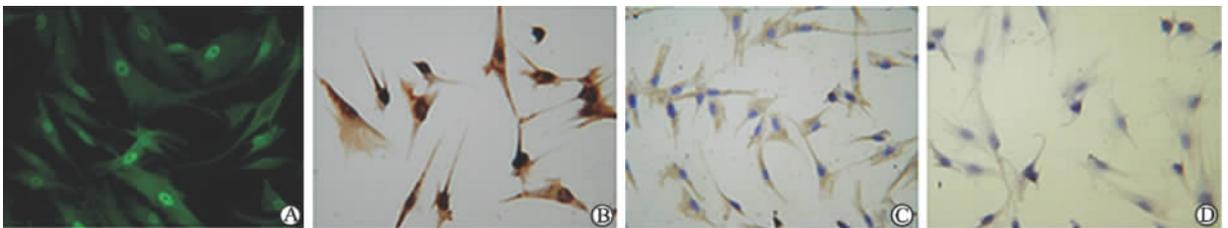


图 4 EPCs 免疫荧光(A)和免疫细胞化学染色(B-D)鉴定

Fig 4 Immunofluorescence (A) and immunocytochemistry (B-D) identification of endothelial progenitor cells (EPCs)

EPCs were illustrated positive for von Willebrand factor (vWF) (A), vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) (B), and CD133 (C); negative for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (D). Original magnification:  $\times 40$

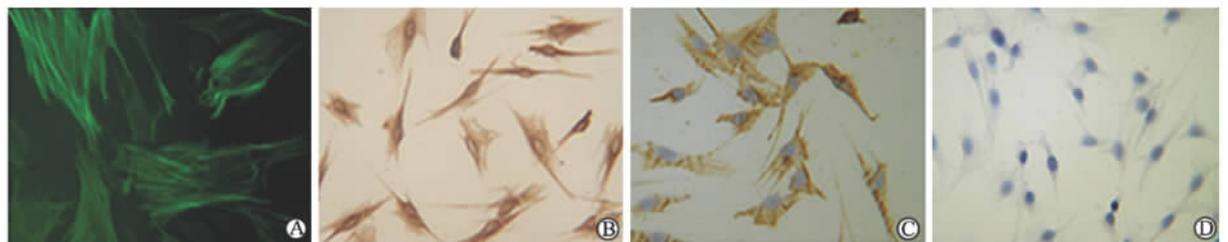


图 5 SPCs 免疫荧光(A)和免疫细胞化学染色(B-D)鉴定

Fig 5 Immunofluorescence (A) and immunocytochemistry (B-D) identification of smooth muscle progenitor cells (SPCs)

SPCs was illustrated positive for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (A,B) and CD34 (C), negative for von Willebrand factor (vWF) (D). Original magnification:  $\times 40$

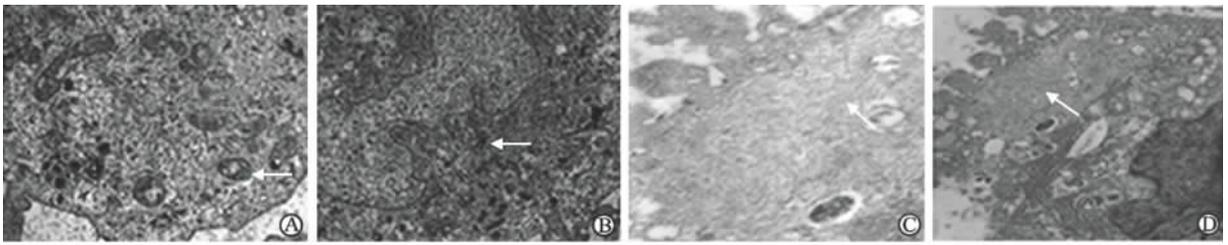


图 6 透射电镜下 EPCs(A,B) 和 SPCs(C,D) 的超微结构

Fig 6 Ultrastructure of EPCs (A,B) and SPCs (C,D) by transmission electron microscopy

EPCs; Endothelial progenitor cells; SPCs; Smooth muscle progenitor cells. A; The arrow indicates phagocytic vesicles in cytoplasm of EPCs; B; The arrow indicates Weibel-Palade bodies of EPCs; C,D; The arrows indicate myofilaments paralleling with the cell longitudinal axis in SPCs. Original magnification;  $\times 10\ 000$  (A, D);  $\times 20\ 000$  (B, C)

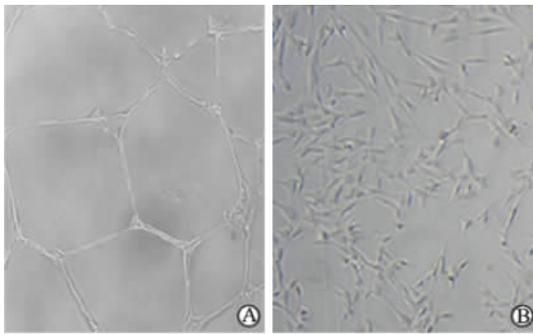


图 7 EPCs (A) 和 SPCs (B) 在基质胶上的生长状态

Fig 7 Growth state of EPCs (A) and SPCs (B) on matrigel

EPCs; Endothelial progenitor cells; SPCs; Smooth muscle progenitor cells. A; EPCs grew on the matrigel in blood vessel-like form; B; SPCs grew on the matrigel in an irregular growth state. Original magnification;  $\times 20$

目前,诱导培养 EPCs/SPCs 种子细胞的方法主要为离体扩增培养法。在离体扩增培养法中细胞生长因子是诱导细胞分化的主要因素。诱导单个核细胞向 EPCs 分化的细胞因子主要是 VEGF, VEGF 与 EPCs 表面的 VEGFR-2 结合,诱导 EPCs 增殖,并分化为 ECs。诱导 SPCs 分化的细胞因子不一,转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )、雌激素、PDGF-BB 都可诱导干细胞分化成 SMCs<sup>[11-13]</sup>。其中 PDGF-BB 是一种强烈的细胞丝裂原,可通过激活多条信号通路而调节功能蛋白的磷酸化状态和相互作用,最终抑制或激活靶基因的表达。将人外周血单个核细胞接种到含 PDGF-BB 的 EBM-2 培养液中,培养出的细胞呈梭型,这类细胞表达成熟 SMCs 特异性标记如  $\alpha$ -SMA、肌球蛋白重链等,还表达祖细胞的标记 CD34,提示 SPCs 可能起源于这类 CD34 阳性的细胞<sup>[14]</sup>。另有研究发现 EPCs 可诱导为 SPCs<sup>[15]</sup>,说明 ECs 的前体细胞可能也是 SMCs 的前体细胞,因后

天的微环境不同而分化为不同组织。已有报道人外周血 EPCs 在 PDGF-BB 作用下能分化为 SMCs<sup>[16]</sup>,以上研究提示 ECs/SMCs 可能来源于同一祖细胞,启发我们在诱导培养兔骨髓来源的 EPCs 时,同时向 SPCs 方向诱导分化,以便同步获取两类种子细胞。

本研究采用梯度密度离心分离了兔骨髓血单个核细胞,用含 VEGF 的 EGM-2 诱导培养后细胞扁平,呈现“铺路石”状排列,而经含 PDGF-BB 的 EBM-2 诱导培养,细胞呈梭形外观。尽管这些细胞在形态上存在差异,但仅通过形态并不能将 EPCs 与 SPCs 区分开来,我们采用了综合鉴定的方法,最大可能地对 ECs 和 SMCs 进行鉴定。实验分别选用了 EPCs 和 SPCs 的表面标记物 CD133、vWF、CD34、VEGFR-2、 $\alpha$ -SMA 进行细胞鉴定,同时表达抗原 CD133、CD34、vWF 的细胞可以鉴定为 EPCs<sup>[17]</sup>。同时透射电镜下观察 2 种细胞的超微结构特征,并做了在基质胶上形成毛细血管管道的成血管实验。从实验的结果看,EPCs 体外培养早期细胞呈三角形、短梭形、多角形等多种形态,培养至 10 d 左右,呈现典型的“铺路石”样;SPCs 在培养至 14 d 左右细胞呈现“峰-谷”样 SMCs 生长状态。细胞超微结构观察发现,EPCs 胞质可见特征性 W-P 小体,SPCs 胞质周边可见散在的肌丝状结构。细胞表面标记物鉴定显示 EPCs 表达 CD133、VEGFR-2 和 vWF,不表达  $\alpha$ -SMA;SPCs 表达 CD34、 $\alpha$ -SMA,不表达 vWF 和 VEGFR-2。成血管实验显示,EPCs 在基质胶上生长时呈血管网状,而 SPCs 呈现不规则形态。

综上所述,本研究建立了从兔骨髓血分离的单个核细胞同步诱导培养 EPCs 和 SPCs 的方法,所培

养的EPCs和SPCs具有成熟ECs和SMCs的特征,又具有祖细胞的特征。所诱导的种子细胞可以快速增殖分化,短时间培养的种子细胞的性能和数量可以满足构建组织工程化静脉瓣的需要。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Teebken O E, Puschmann C, Aper T, Haverich A, Mertsching H. Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2003, 25: 305-312.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275: 964-967.
- [3] 温 昱, 李 彬, 党瑞山, 张传森, 张 喜, 刘艳春. 犬骨髓内皮祖细胞生物学特性及诱导分化[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31: 317-321.
- [4] Arany P R, Mooney D J. At the edge of translation-materials to program cells for directed differentiation[J]. *Oral Dis*, 2011, 17: 241-251.
- [5] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J]. *Circulation*, 2001, 103: 897-903.
- [6] Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita J K, Yurugi-Kobayashi J, Nonoguchi A, et al. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 2127-2134.
- [7] Huang H, Zhao X, Chen L, Xu C, Yao X, Lu Y, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 321-327.
- [8] Cesselli D, Beltrami A P, Rigo S, Bergamin N, D'Aurizio F, Verardo R, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood[J]. *Circ Res*, 2009, 104: 1225-1234.
- [9] Daniel J M, Bielenberg W, Stieger P, Weinert S, Tillmanns H, Sedding D G. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1890-1896.
- [10] Ferreira L S, Gerecht S, Shieh H F, Watson N, Rupnick M A, Dallabrida S M, 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* [J]. *Circ Res*, 2007, 101: 286-294.
- [11] Simper D, Stalboerger P G, Panetta C J, Wang S, Caplice N M. Smooth muscle progenitor cells in human blood[J]. *Circulation*, 2002, 106: 1199-1204.
- [12] Frid M G, Kale V A, Stenmark K R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation [J]. *Circ Res*, 2002, 90: 1189-1196.
- [13] Hong J H, Song C, Shin Y, Kim H, Cho S P, Kim W J, et al. Estrogen induction of smooth muscle differentiation of human prostatic stromal cells is mediated by transforming growth factor-beta[J]. *J Urol*, 2004, 171: 1965-1969.
- [14] Kurpinski K, Park J, Thakar R G, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain[J]. *Mol Cell Biomech*, 2006, 3: 21-34.
- [15] Gong Z, Niklason L E. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) [J]. *FASEB J*, 2008, 22: 1635-1648.
- [16] Tanzi M C, Farè S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2009, 6: 533-551.
- [17] Wu Y, Zhang J, Gu Y, Li J, Chen B, Guo L, et al. Expansion of canine bone marrow-derived endothelial progenitor cells and dynamic observation [J]. *Ann Vasc Surg*, 2006, 20: 387-394.