

氧化型低密度脂蛋白对骨髓源性平滑肌样 细胞粘附和迁移的影响

严鹏科¹, 段才闻², 梅峥嵘¹, 司徒冰¹, 肖国宏^{1*}

(1. 广州医学院第三附属医院药剂科, 广东 广州 510150; 2. 南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要:【目的】建立体外诱导骨髓间质干细胞分化的平滑肌细胞模型,探索骨髓间质干细胞分化的平滑肌细胞在动脉粥样硬化发生发展过程中的作用。【方法】采用贴壁法从SD大鼠骨髓中分离骨髓间质干细胞(BMSC),运用条件培养基诱导BMSC分化成平滑肌细胞(SMC),采用免疫荧光法分析骨髓间质干细胞及其分化后的细胞特异性标志物。羟脯氨酸测定法检测两种细胞合成细胞外基质能力,粘附和迁移实验检测两种细胞的粘附和迁移能力。【结果】①分离的BMSC呈长梭形,呈骨髓间质干细胞表型。经条件培养基诱导分化15 d后,诱导分化的细胞形态呈梭形平滑肌样。表达平滑肌细胞特异性蛋白标志物 α -肌动蛋白(α -SMC)和平滑肌肌球蛋白重链1(SM-MHC1),呈平滑肌细胞表型,命名为骨髓间质干细胞分化的平滑肌细胞(BMSC-SMC)。②羟脯氨酸测定结果显示,未处理BMSC-SMC合成较高量的胶原,其合成量低于VSMC的合成量,经80 mg/L ox-LDL处理72 h后,BMSC-SMC合成胶原的能力显著降低($P < 0.01$)。③细胞粘附实验结果发现,未处理BMSC-SMC有中等数量的细胞发生粘附,经80 mg/L ox-LDL处理1 h后,BMSC-SMC细胞粘附的数目少量增加,但两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$);经80 mg/L ox-LDL处理24 h后,BMSC-SMC细胞迁移的数目显著增多,与未处理BMSC-SMC比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。【结论】①经条件培养基诱导培养后,骨髓干细胞表达平滑肌特异性标志物,SM α -SMC和SM-MHC1,提示骨髓干细胞能成功分化成平滑肌细胞。②骨髓干细胞诱导成平滑肌细胞后,具有血管平滑肌细胞的一些生物学特征,如增殖能力和分泌胞外基质能力,同时保留了骨髓干细胞的一些生物学特征,如高迁移能力,为其在促进动脉粥样硬化因素作用下,跨内皮细胞层和增殖的平滑肌细胞层迁移创造了有利的条件。

关键词: 氧化型低密度脂蛋白; 骨髓间质干细胞; 诱导分化; 血管平滑肌细胞

中图分类号: R675 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2010)03-0359-06

Effect of ox-LDL on Adhesion and Migration in Smooth Muscle Cell Derived from Bone Marrow Stem Cell

YAN Peng-ke¹, DUAN Cai-wen², MEI Zheng-rong¹, SITU Bing¹, XIAO Guo-hong^{1*}

(1. Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China;

2. Institute of Pharmacology and Pharmacy, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract: 【Objective】 To establish the model of smooth muscle cell differentiated from bone mesenchymal stem cell (BMSC-SMC) in vitro and investigate the roles of BMSC-SMC in the occurrence and development of atherosclerosis (As). 【Methods】 BMSC was isolated from the femoral bone of SD rats by adherent method, and VSMC from thoracic aorta. BMSC-SMC was differentiated from BMSC by special condition medium. The specific markers of BMSC and smooth muscle cell differentiated from bone mesenchymal stem cell (BMSC-SMC) were identified by immunofluorescence (IF) staining. After treated with 80 mg/L ox-LDL for 72 h, hydroxyproline assay was performed to detect the extracellular matrix synthesis capacity, and adhesion and migration experiments were used to assay the adhesive and migratory capacity of BMSC-SMC and VSMC. 【Results】 ① The isolated BMSC present a slim-spindle appearance. The cells (BMSC-SMC) induced by condition medium containing b-FGF and TGF- β for

收稿日期: 2010-01-03

基金项目: 湖南省科技计划项目[湘(2006)06号];广东省中医药科研项目[粤中医(2008)29号];广东省医药卫生科技项目[粤卫,(2008)84号]。

作者简介: 严鹏科,医学博士,博士后,药理学副教授,硕士研究生导师,多年从事动脉粥样硬化的药物防治研究,E-mail:yanpk@tom.com; *通信作者:肖国宏,主任医师,硕士生导师,邮箱:xiaoguohong@tom.com。

15 days present slim-spindle smooth muscle-like cells. Immunofluorescence (IF) staining showed that the cells expressed smooth muscle α -actin and smooth muscle myosin heavy chain 1, which were the specific markers of SMC. The cells are named smooth muscle cell differentiated from bone mesenchymal stem cell (BMSC-SMC). ②Hydroxyproline assay showed that the amount of collagen synthesis was high in control BMSC-SMC, which was lower than that of VSMC. After treated with 80 mg/L ox-LDL for 72 h, the ability of collagen synthesis was significantly decreased in BMSC-SMC, and was also obviously decreased in VSMC. The results of cell adhesion experiment showed that the amounts of cell adhesion were medium in control BMSC-SMC, which was lower than that of VSMC. After treated with 80 mg/L ox-LDL for 1 h, the amounts of cell adhesion were rarely increased in BMSC-SMC, and were rarely decreased in VSMC. The difference was not significant compared with the control respectively. The Cell damage-repair experiment showed that the amount and distance of migration were significantly increased in BMSC-SMC compared with that of in control BMSC-SMC ($P < 0.01$). 【Conclusion】 ①BMSC expressed the specific markers of SMC, such as SM α -SMC and SM-MHC1, which indicated that BMSC had differentiated into SMC. ②BMSC-SMC have some biological characteristics that similar with VSMC, such as the ability of proliferation and secretion of extracellular matrix, but at the same time retain some biological characteristics of BMSC, such as the ability of high migration, which provides a favorable condition for its migration from endothelial cell layer and hyperplastic smooth muscle cell layer to atherosclerotic plaque layer under promote atherosclerosis factors.

Key words: ox-LDL; BMSC; induced differentiation; VSMC

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3): 359-364]

中膜血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC) 迁移到内皮下层并异常增殖或凋亡是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成的重要步骤,近年的研究发现^[1]骨髓干细胞分化而来的平滑肌细胞参与动脉粥样硬化的发生和发展,但骨髓干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)分化而来的平滑肌细胞在新生血管内膜中究竟是修复血管,还是促进了动脉粥样硬化的发生,迄今为止,尚不清楚。本研究在体外诱导骨髓干细胞分化为平滑肌细胞简称骨髓间质干细胞分化的平滑肌细胞(smooth muscle cell differentiated from bone mesenchymal stem cell, BMSC-SMC),并通过羟脯氨酸测定法检测细胞合成细胞外基质能力,粘附和迁移实验检测细胞的粘附和迁移能力,探讨 BMSC-SMC 在动脉粥样硬化发生发展中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

胎牛血清、L-DMEM、胰蛋白酶均为美国 GIBCO 公司产品;L-谷氨酰胺、油红 O、b-FGF、TGF- β 均为美国 Sigma 公司产品;羟脯氨酸测定试剂盒购自南京建成生物研究所;其余试剂均为分析纯;4~6 周 SD 大鼠由湖南农业大学动物科技学院实验动物中心提供,合格证号:scxk(湘):2003-0003。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 ①大鼠 BMSC 分离、培养、纯化:参照文献[2,3]方法,取 4~6 周 SD 大鼠体

量 100~120 g,雌雄不限。断颈处死大鼠,无菌条件下取出股骨、胫骨,并彻底清除附着其上的肌肉组织,去除股骨、胫骨两端骨髓,显露骨髓腔,用含有肝素(200 U/mL)的 PBS 冲出骨髓腔内骨髓,1 000 r/min 离心 6 min,弃去上层脂肪和上清。收集细胞沉淀,使用含 150 mL/L 胎牛血清的 L-DMEM 培养液制成均匀的细胞混悬液,按照 1×10^5 /mL 的密度接种至 50 cm² 培养瓶中,在 37℃、体积分数为 5% CO₂、饱和湿度条件下培养。②大鼠血管平滑肌细胞培养:参照本实验室方法,SD 大鼠,雌雄不限,体质量 150~200 g,4~6 周龄。腹腔麻醉后,无菌操作取出胸主动脉段,置于含 PBS 液的平皿中漂洗 3 次,将凝块洗干净后剥除外膜的纤维脂肪层,然后纵行切开血管,刮除内膜即内皮细胞迅速撕下中膜内、中层,切成约 1 mm 宽的小条,浸泡在含血清的 PBS 液中,并将切好的小组织块种植于培养瓶壁。置于 37℃ 恒温箱,2 h 左右,加入含 200 mL/L 胎牛血清的 H-DMEM 培养液,待细胞铺满瓶底后 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代,每 2~3 d 一次,即大鼠 VSMC。

1.2.2 定向诱导 BMSC 向 SMC 分化 参照文献[4]方法将含 150 mL/L 胎牛血清的 H-DMEM 中加入碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF, 2.5 ng/mL)和转化生长因子(TGF- β , 5 ng/mL),孵育第 4 代 MSC,每 2~3 d 一次。诱导 15 d,待细胞铺满瓶底后,2.5 g/L 胰蛋白酶进行消化传代。

1.2.3 免疫荧光检测分化平滑肌细胞表明标志物 细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养

板,处理结束后,每种抗原检测都分为实验组和对照组。取生长状况良好的细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗3遍,20 g/L多聚甲醛4℃固定15 min, PBS洗3次,每次5 min,0.5% Triton X-100 穿透10 min, PBS洗3次,每次5 min。30 mL/L山羊血清室温下封闭1 h,1:100加入SM α -actin和SM-MHC1小鼠抗大鼠一抗工作液,室温下孵育1 h, PBS洗3遍,每次5 min,1:500加入CY3标记二抗,室温1 h, PBS洗3遍,每次5 min,封片剂封片,荧光显微镜下观察,KAPPAImageBase 图像系统成像。

1.2.4 氧化低密度脂蛋白的制备 参照文献[5]的方法制备氧化低密度脂蛋白,正常人血浆低密度脂蛋白(密度1.040~1.063 mg/mL)采用序列超速离心法制备。将LDL置于PBS溶液中,4℃透析36 h,充分去除EDTA后,用含10 μ mol/L CuSO₄的PBS溶液(pH7.2),37℃透析20 h,进行氧化修饰。氧化修饰后的LDL(ox-LDL)置含100 μ mol/L EDTA的PBS中,4℃透析24 h,终止氧化。超滤除菌,BCA试剂定量蛋白,调蛋白浓度至1 g/L用于实验。

1.2.5 胶原含量测定实验检测 ox-LDL 对 BMSC-SMC 及 VSMC 细胞胶原合成量的影响 BMSC-SMC 及 VSMC 细胞分别以 1.0×10^5 个/mL 的密度种于6孔板,培养24 h后,再以无血清DMEM培养24 h,换成100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液,将细胞分为实验组和对照组,实验组分别用80 mg/L ox-LDL处理,对照组H-DMEM培养,培养72 h后,分别以2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,分别收集和处理细胞,具体方法参照羟脯氨酸测定试剂盒,计算羟脯氨酸量。

1.2.6 细胞粘附实验检测 ox-LDL 对 BMSC-SMC 及 VSMC 细胞粘附的影响 用无包被的6孔平底培养板和一定浓度的FN包被的6孔平底培养板,4℃静置过夜,用含热变性的牛血清白蛋白(BSA,1 mg/mL)的Tris缓冲盐冲洗30 min。胰蛋白酶消化BMSC-SMC及VSMC细胞后,将细胞分为实验组和对照组,实验组分别用含80 mg/L ox-LDL的H-DMEM培养液重悬细胞,制成细胞密度为 1.0×10^5 个/mL的细胞悬液,对照组用H-DMEM培养液重悬细胞,制成细胞密度为 1.0×10^5 个/mL细胞悬液,每孔接种100 μ L的细胞悬液,37℃温箱内静置1 h,未粘连的细胞可洗去,粘附的细胞用

40 g/L的多聚甲醛固定,HE染色,用光学显微镜观察粘附反应,按固定视野记5个高倍视野($\times 100$)的细胞数,每次实验做3孔,取均值。

1.2.7 细胞迁移实验检测 ox-LDL 对 BMSC-SMC 及 VSMC 细胞迁移的影响 BMSC-SMC 及 VSMC 细胞用2.5 g/L胰蛋白酶消化平滑肌细胞,分别收集和计数细胞,制成细胞悬液;将细胞悬液按 1.0×10^5 个/mL的密度种于6孔板中。再加入含100 mL/L胎牛血清的DMEM,放入37℃和体积分数5% CO₂的孵箱中静置培养48 h,换用无血清的DMEM培养基,培养24 h,使细胞同步化,去上清培养液,无菌PBS洗涤3次,用200 μ L的无菌Tip头沿6孔板中央迅速画一直线,用PBS清洗3次,将孔分为实验组和对照组,实验组用含80 mg/L ox-LDL的H-DMEM培养液培养细胞,对照组用H-DMEM培养液细胞,37℃温箱内静置24 h,每组重复3次;分别于24 h后取出,相差显微镜下观察,拍照。

1.3 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS13.0进行统计处理,采用两组间 *t* 检验比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨髓间质干细胞源性 SMC 和血管 SMC 表型鉴定

用免疫荧光法检测VSMC早、晚期标志物SM α -actin和SM-MHC1^[6]。结果表明,诱导的BMSC-SMC表达VSMC的早、晚期标志物SM α -actin和SM-MHC1,在胞浆内呈丝状,细胞骨架样分布,呈平滑肌细胞表型(图1 B、D)。其表达情况与VSMC相似(图1 A、C)。

2.2 骨髓间质干细胞源性 SMC 和血管 SMC 细胞合成细胞外基质能力

利用羟脯氨酸测定试剂盒,检测细胞合成胶原的含量,其原理是,羟脯氨酸在胶原蛋白中占13.4%,在弹性蛋白中占极少量,其它蛋白中均不存在。羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,根据其呈现的深浅可推算出其含量。检测结果显示,未处理BMSC-SMC合成较高量的胶原,而其合成量低于VSMC的合成量,经80 mg/L ox-LDL处理72 h

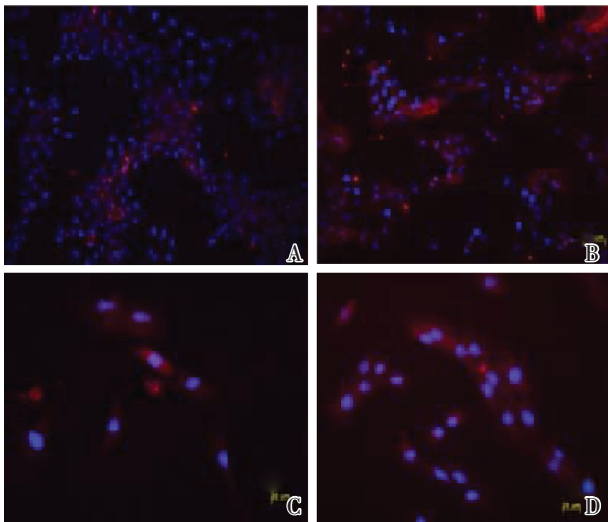


图 1 荧光显微镜显示 BMSC-SMC 和 VSMC α -SMC 与 SM-MHC1 的表达

Fig.1 Fluorescent micrographs show expression of α -SMC and SM-MHC1 in BMSC-SMC and VSMC

A: VSMC (α -SMC $\times 100$), B: BMSC-SMC (α -SMC $\times 100$), C: VSMC (SM-MHC1 $\times 200$), D: BMSC-SMC (SM-MHC1 $\times 200$).

后, BMSC-SMC 合成胶原的能力显著降低 ($P < 0.01$), 相同处理 VSMC 合成胶原的能力亦降低 ($P < 0.05$, 图 2)。

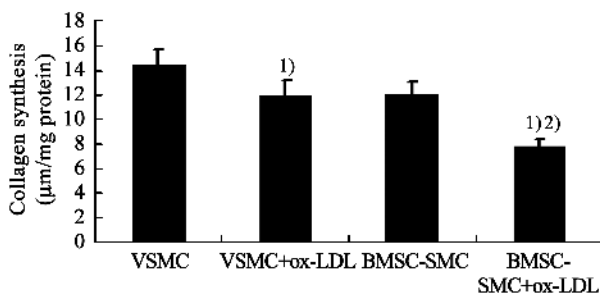


图 2 ox-LDL 对 BMSC-SMC 和 VSMC 合成胶原能力的影响

Fig.2 Effect of ox-LDL on collagen synthesis in BMSC-SMC and VSMC

Results are shown as the mean \pm SD and represent three independent experiments. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ compared to control.

2.3 骨髓间质干细胞源性 SMC 和血管 SMC 细胞粘附能力

细胞粘附实验结果发现, 细胞培养 1 h 后, 未处理 BMSC-SMC 有中等数量的细胞发生粘附(图 3C), 经 80 mg/L ox-LDL 处理 1 h 后, BMSC-SMC 细胞粘附的数目少量增加(图 3D), 但两者比较无

显著性差异 ($P > 0.05$)。同时未处理 VSMC 亦有中等数量的细胞发生粘附(图 3A), 经 80 mg/L ox-LDL 处理 1 h 后, 细胞粘附的数目有所减少(图 3B), 但两者比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

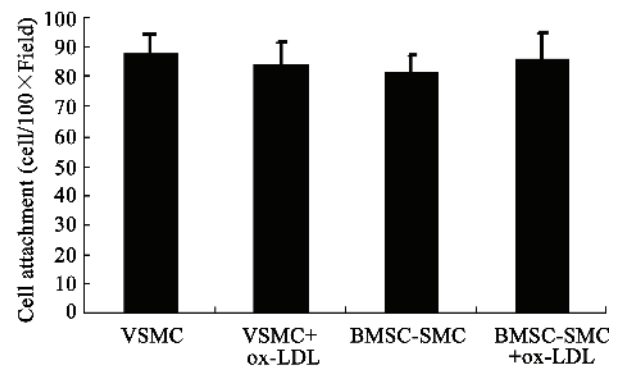
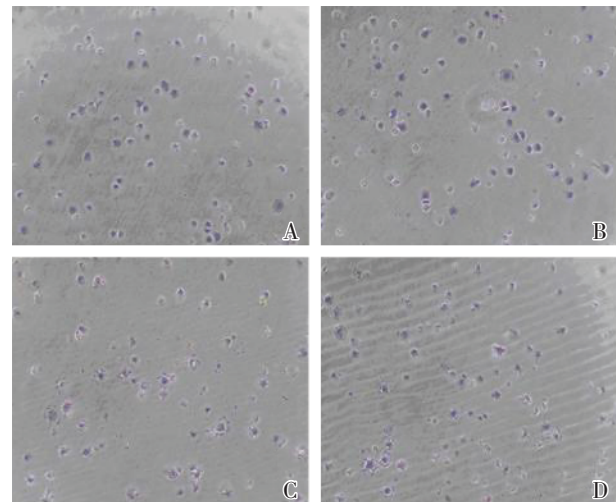


图 3 ox-LDL 对 BMSC-SMC 和 VSMC 细胞粘附能力的影响

Fig.3 Effect of ox-LDL on attachment assay in BMSC-SMC and VSMC

A: VSMC control, B: VSMC + ox-LDL, C: BMSC-SMC control, D: BMSC-SMC + ox-LDL. Results are shown as the mean \pm SD and represent three independent experiments.

2.4 骨髓间质干细胞源性 SMC 和血管 SMC 细胞迁移能力

细胞损伤-修复实验是经典的检测细胞迁移能力的实验, 检测发现, 损伤细胞 24 h 后, 未处理 BMSC-SMC 有中等数量的细胞发生迁移, 少量细胞迁移至划痕的中线, 经 80 mg/L ox-LDL 处理 24 h 后, BMSC-SMC 细胞迁移的数目显著增多, 许多细胞迁移至的划痕的中线对面, 与未处理 BMSC-SMC 比较, 具有显著性差异 ($P < 0.01$, 图 4B 和 D), 相同处理 VSMC 的细胞数目和距离亦

增强 ($P < 0.05$, 图 4F 和 H), 但增强幅度较 BMSC-SMC 小^[7]。

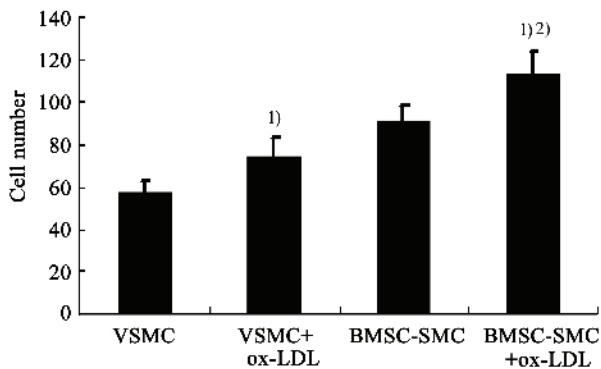
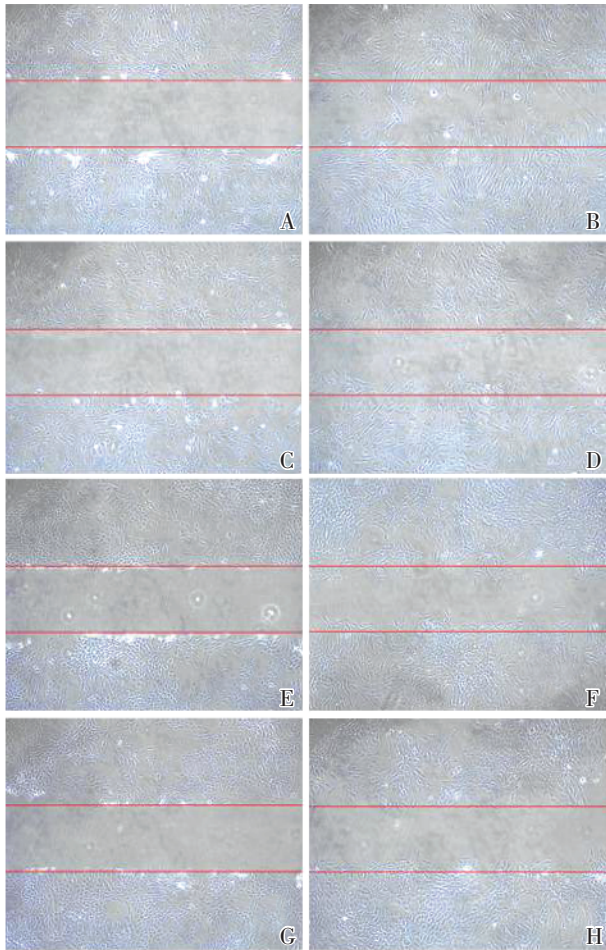


图 4 ox-LDL 对 BMSC-SMC 和 VSMC 细胞迁移能力的影响

Fig.4 Effect of ox-LDL on migration of cells in BMSC-SMC and VSMC

A: BMSC-SMC + ox-LDL 0 h, B: BMSC-SMC + ox-LDL 24 h, C: BMSC-SMC control 0 h, D: BMSC-SMC control 24 h, E: VSMC + ox-LDL 0h, F: VSMC + ox-LDL 24h, G: VSMC control 0 h, H: VSMC control 24 h. Results are shown as the mean \pm SD and represent three independent experiments. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ compared to control.

3 讨论

ox-LDL 由低密度脂蛋白(LDL)在体内氧化形成,它是 AS 发生、发展乃至不稳定斑块形成的关键因子^[8],其在 AS 中的病理作用已公认^[9-10]。目前在体外研究中用的低密度脂蛋白大多是用超速离心法制备,所制备的 LDL 要求 4 °C 避光保存,保存时间不超过 3 周,天然的低密度脂蛋白经氧化修饰形成的脂蛋白,称为 ox-LDL,用过度金属离子 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等,在体外适宜条件下与 LDL 孵育一段时间后,能使 LDL 发生氧化变构,成为 ox-LDL^[11]。

VSMC 从血管的中层向内膜下迁移,并以自分泌、旁分泌的形式分泌大量的细胞外基质、生长因子、细胞因子和血管活性物质在高血压、动脉粥样硬化、冠脉搭桥术及血管成形术后再狭窄等多种血管损伤性疾病的形成过程中起着重要的作用^[12-13]。而细胞-细胞之间以及细胞-细胞外基质之间的正常粘附是细胞生长、分化、迁移以及损伤修复的基础,并负责细胞内外信号的传递,也是心血管系统所有组成成分维持正常功能的前提条件,粘附功能的异常在心血管疾病发病机制中也起着关键的作用^[14]。VSMC 的增殖和迁移以及细胞外基质的重构在 AS 的发生发展中起重要作用^[15-17]。VSMC 从动脉血管中层到血管内皮层的迁移,使血管功能异常。VSMC 从内膜基底层移行入内膜层,导致内膜增厚,形成纤维帽,最终形成动脉粥样硬化斑块^[18]。然后局部炎症环境可以引起胶原酶的表达,抑制蛋白水解酶抑制剂的表达,从而使纤维帽变得薄弱易于破裂,进而引发血栓的形成,VSMC 增生、迁移的程度决定了预后。

BMSC 能进行自我更新,能够分化成脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞和肌细胞等不同的细胞^[19-21]。局部的环境和细胞群体决定了其分化方向^[22],在体外 TGF- β 可诱导 BMSC 分化为 VSMC^[6]。2002 年,Sata^[1]提出血液干细胞分化而来的平滑肌细胞参与动脉粥样硬化的发生和发展。

在本研究中我们对 BMSC-SMC 和 VSMC 合成细胞外基质能力、粘附能力以及迁移能力进行分析,结果显示,经 ox-LDL 处理后,BMSC-SMC 及 VSMC 合成胶原的能力都显著降低;但细胞粘附能力均无差别;BMSC-SMC 及 VSMC 细胞迁移的

数目均显著增多,并且 BMSC-SMC 的增强幅度更大。上述结果提示,在 ox-LDL 的作用下,BMSC-SMC 合成胶原能力的下降,可能与其迁移能力有关,但与其粘附能力无关,说明 BMSC 细胞在向 VSMC 细胞分化的过程中,出现了一些与 VSMC 具有相似性细胞生物学特征,同时保留了其 BMSC 细胞的一些特征。而且 BMSC-SMC 的迁移能力较 VSMC 强,为其在促动脉粥样硬化因素作用下,跨内皮细胞层和增殖的平滑肌细胞层迁移创造了有利的条件。

参考文献:

- [1] Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2002,8(4):403-409.
- [2] Feldman LJ, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Circulation*, 2001,103(25):3117-3122.
- [3] 赵岩,吴中海,赵桂玲.大鼠肠系膜细动脉血管平滑肌细胞的分离及其生理特性[J].*南方医科大学学报*,2006,26(7),954-958.
- [4] Kritharides L, Christian A, Stoudt G, et al. Cholesterol metabolism and efflux in human THP-1 macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998,18(10):1589-1599.
- [5] Schackelford RE, Misra UK, Florine-Casteel K, et al. Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NFκB in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism [J]. *J Biol Chem*, 1995,270(9):3475-3478.
- [6] Wang D, Park JS, Chu JS, et al. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation [J]. *J Biol Chem*, 2004,279(8):43725-43734.
- [7] Cherepanova OA, Pidkovka NA, Sarmento OF, et al. Oxidized phospholipids induce type VIII collagen expression and vascular smooth muscle cell migration [J]. *Circ Res*, 2009,104(5):609-618.
- [8] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. *Am Heart J*, 1999,138(9):S419-S420.
- [9] Li DY, Williams V, Liu L, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003,41(6):1048-1055.
- [10] Hiroyuki I, Yamamura S, Anthony JW, et al. Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001,281:H359-H370.
- [11] Jimi S, Sakub K, Uesugi N, et al. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1995,116:15-26.
- [12] Gottsauner-Wolf M, Moliterno DJ, Lincoff AM, et al. Restenosis — an open file [J]. *Clin Cardiol*, 1996,19(5):347-356.
- [13] Chabrier PE. Growth factors and vascular wall [J]. *Int Angiol*, 1996,15(2):100-103.
- [14] Horwitz AF. Integrins and health [J]. *Sci Am*, 1997,276(5):68-75.
- [15] Tagliafico E, Brunelli S, Bergamaschi A, et al. TGFβ/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts [J]. *J Cell Sci*, 2004,117(Pt 19):4377-4388.
- [16] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly [J]. *Circ Res*, 2002,90:251-262.
- [17] Ho HH, Hsu LS, Chan KC, et al. Extract from the leaf of *nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration [J]. *Food Chem Toxicol*. 2010,48(1):159-168.
- [18] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead [J]. *Cell*, 2001,104:503-516.
- [19] Barry F P, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004,36(8):568-584.
- [20] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999,284(9):143-147.
- [21] Zhang F, Tsai S, Kato K, et al. Transforming growth factor-beta promotes recruitment of bone marrow cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells through stimulation of MCP-1 production in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2009,284(26):17564-17574.
- [22] Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 2010,109(2):277-282.

(编辑 王晓鹰)