

骨髓间充质干细胞定向分化为心脏瓣膜构成细胞及鉴定*★

傅杰, 蒋迎九, 姜蓉

Directional differentiation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells into structural cells for heart valves

Fu Jie, Jiang Ying-jiu, Jiang Rong

Abstract

BACKGROUND: In the component of cardiac valve, not only endothelial cells exert effects, but also fibroblasts and smooth muscle cells participate in the construction of matrix of cardiac valve.

OBJECTIVE: To establish a simple method for obtaining large quantity of endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts *in vitro*, and identify the morphology and surface markers of the obtained cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated from rats by whole bone marrow culture method, then cultured *in vitro*, and proliferated. The third passage of BMSCs was treated in special induction medium for differentiation into endothelial cells, vascular smooth muscle cells and fibroblasts. The cells were detected under an inverted microscope to examine the cell morphology every day, and then the differentiated cells were measured by immunocytochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: The cells induced from BMSCs had the characteristics of endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. Results have indicated that BMSCs could be directionally differentiated into endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts *in vitro*.

Fu J, Jiang YJ, Jiang R. Directional differentiation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells into structural cells for heart valves. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(27): 4941-4945.

[<http://www.crter.cn> <http://en.zglckf.com>]

摘要

背景: 心脏瓣膜的组成成分中不是只有内皮细胞发挥作用, 成纤维细胞、平滑肌细胞等均参与心脏瓣膜基质成分构建。

目的: 建立可以在体外获得大量内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞的简便方法, 并对获得细胞进行形态观察及表面标志鉴定。

方法: 全髓贴壁法获取大鼠原代骨髓间充质干细胞, 体外培养、扩增, 第3代细胞在特定条件下分别向内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞方向诱导分化, 每日于倒置显微镜下观察细胞生长情况, 并对诱导分化的细胞行免疫细胞化学检测。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞在特定条件下诱导培养后, 诱导后的细胞分别具有内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞的特点。提示骨髓间充质干细胞在体外可以定向分化为内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞。

关键词: 心脏瓣膜; 骨髓间充质干细胞; 定向分化; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 成纤维细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.001

傅杰, 蒋迎九, 姜蓉. 骨髓间充质干细胞定向分化为心脏瓣膜构成细胞及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27): 4941-4945. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

0 引言

瓣膜置换是治疗心脏瓣膜疾病的有效手段。理想的人工瓣膜应该具有与人体正常瓣膜相似的结构与功能, 有良好的组织相容性而无免疫原性, 不需抗凝却又能经久耐用^[1]。为了适应需要, 对组织工程心脏瓣膜(tissue engineering heart valve, HETV)的研究逐步得到开展^[2-4], 而种子细胞的选择是HETV研究的一个重要内容。目前构建HETV的种子细胞大多是利用个体外周血管分离取得, 由于外周血管的有限性及获取过程的有创性, 给向临床应用的过渡增加了难度。种子细胞最先采用的是血管内皮细胞^[5], 但后来有研究者发现心脏瓣膜的组成成分中不是只有内皮细胞在发挥作用, 成纤维细胞、平滑肌细胞等均

参与心脏瓣膜基质成分的构建^[6], 如果采用单一的细胞成分, 不利于瓣膜基质的构建, 因此, 目前多主张复合种植, 以尽量满足正常瓣膜组织成分。而骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)来源方便, 且具有多向分化潜能, 在一定条件下可以向内、中、外3个胚层的细胞分化^[7-10], 理论上可以满足构建HETV种子细胞的要求^[11]。实验通过观察大鼠BMSCs在特定条件下向内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞方向定向分化, 旨在探求理想的HETV种子细胞的新来源。

1 材料和方法

设计: 观察性实验。

时间及地点: 实验于2008-07/2009-11在

Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Fu Jie★, Master, Attending physician, Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
66610052@qq.com

Correspondence to: Jiang Ying-jiu, Associate professor, Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
jiangyinjiu@yahoo.com.cn

Supported by: the Scientific Research Program of Health Bureau of Chongqing City*

Received: 2010-03-17
Accepted: 2010-06-15

重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆市 400016

傅杰★, 男, 1978年生, 山东省高密市人, 汉族, 2010年重庆医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事胸心外科的研究。66610052@qq.com

通讯作者: 蒋迎九, 副教授, 重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆市 400016 jiangyinjiu@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225(2010)27-04941-05

收稿日期: 2010-03-17
修回日期: 2010-06-15
(20100317014/WL-Q)

重庆医科大学干细胞与组织工程研究室完成。

材料: 4周龄SD大鼠, 雌雄不拘, 由重庆医科大学动物中心提供, 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[12]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	四季青
L-DMEM	Hyclone
胰酶, 血管内皮生长因子(VEGF), 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 血小板衍化生长因子(PDGF-BB), 胰岛素样细胞生长因子(IGF)	Peptrotech Inc
CD29 抗体	Biologend
CD34 抗体, 波形蛋白抗体(Anti-Vimentin), 平滑肌肌动蛋白抗体(Anti-Actin alpha), 内皮细胞VIII因子抗体(Anti-Factor VIII), SABC 试剂盒, DAB 显色盒	北京博奥森
超净工作台	苏净集团安泰公司
CO ₂ 孵箱	FORMA, 日本
倒置相差显微镜	OLYMPUS, 日本
流式细胞仪	Becton Dickinson, 美国

实验方法:

大鼠BMSCs的原代提取、扩增和纯化: 取4周龄SD大鼠1只, 无菌条件下取出双下肢股骨和胫骨, 剔除附着于骨头上的肌肉等软组织, 以L-DMEM液反复冲洗骨髓腔, 直至髓腔发白, 将获得的冲洗液充分吹打均匀, 以200目筛网过滤, 获得单细胞悬液, 将此单细胞悬液转移到离心管中, 以1 000 r/min离心5 min, 吸除上清液, 将获得的细胞再次以L-DMEM液重悬后, 接种于塑料培养瓶中。72 h后首次换液, 以后每隔两三天换液1次, 培养体系为体积分数为10%胎牛血清+90%L-DMEM。每日于倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况, 待细胞增殖到覆盖培养瓶底的80%~90%时, 以0.25%胰酶+0.02%EDTA进行消化, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的密度进行传代培养。

BMSCs表面标志物的鉴定: 取P₃-BMSCs进行流式细胞仪检测相关抗原(CD29, CD34)。

BMSCs的体外定向分化及鉴定:

BMSCs向内皮细胞方向分化及鉴定: 消化收集P₃-BMSCs, 分为2组: 实验组和对照组。实验组P₃-BMSCs加入条件培养基L-DMEM(体积分数为20%胎牛血清+10 μg/L VEGF), 按 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于预置有玻片的24孔培养板中培养, 共培养12孔; 对照组P₃-BMSCs以

未加特殊诱导剂的L-DMEM+体积分数为10%胎牛血清培养, 以相同密度接种于预置有玻片的24孔培养板中培养, 共培养12孔。每日于倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态变化, 每两三天换液1次。培养7 d和14 d时, 分别取实验组和对照组的细胞爬片各6张进行免疫细胞化学检测VIII因子相关抗原阳性细胞率。采用SABC免疫组织化学方法, 所有步骤参照SABC试剂盒说明书进行, 以细胞浆中有棕黄色颗粒沉着为阳性表达。

BMSCs向平滑肌细胞方向分化及鉴定: 消化收集P₃-BMSCs, 分为2组: 实验组和对照组。实验组P₃-BMSCs加入条件培养基L-DMEM(体积分数为20%胎牛血清+2 μg/L PDGF-BB)培养, 按 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于预置有盖玻片的24孔培养板中, 共培养24孔; 对照组P₃-BMSCs以未加特殊诱导剂的L-DMEM+体积分数为10%胎牛血清培养, 以相同密度接种于预置有盖玻片的24孔培养板中培养, 共培养24孔。每日于倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态变化, 每两三天换液1次。第7天和第14天时, 分别取实验组和对照组的细胞爬片各12张进行免疫细胞化学检测, 检测指标为波形蛋白抗原和平滑肌肌动蛋白抗原。采用SABC免疫组织化学方法, 所有步骤参照SABC试剂盒说明书进行, 以细胞浆中有棕黄色颗粒沉着为阳性表达。

BMSCs向成纤维细胞方向分化及鉴定: 消化收集P₃-BMSCs, 分为2组: 实验组和对照组。实验组P₃-BMSCs加入条件培养基L-DMEM(体积分数为20%胎牛血清+20 μg/L bFGF), 按 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于预置有盖玻片的24孔培养板中培养, 共培养24孔; 对照组P₃-BMSCs以未加特殊诱导剂的L-DMEM+体积分数为10%胎牛血清培养, 以相同密度接种于预置有盖玻片的24孔培养板中, 共培养24孔。每日于倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态变化, 每两三天换液1次。第7天和第14天时, 分别取实验组和对照组的细胞爬片各12张进行免疫细胞化学检测, 检测指标分别为Anti-Actin alpha和Anti-Vimentin。采用SABC免疫组织化学方法, 所有步骤参照SABC试剂盒说明书进行, 以细胞浆中有棕黄色颗粒沉着为阳性表达。

数据收集: 随机选取光镜下10个视野, 计算阳性细胞占细胞总数的比例。

主要观察指标: 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 免疫细胞化学检测BMSCs向内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞的分化。

设计、实施、评估者：实验设计为第一、二作者，干预实施为第一、三作者，评估为第二作者，经过正规培训，采用盲法评估。

2 结果

2.1 BMSCs形态学观察 提取的含BMSCs的骨髓冲洗液接种于培养瓶后，4~6 h开始出现细胞贴壁，24 h后贴壁细胞逐渐变为长梭形，3 d后首次换液去除未贴壁细胞，待细胞增殖到80%~90%融合时，进行消化传代培养，培养到P₃时，细胞形态均一，细胞呈旋涡状、团簇状排列，细胞生长旺盛，见图1。

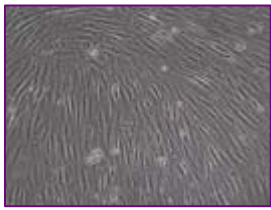


Figure 1 Morphology of the third passage of bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 100$)
图1 第3代 BMSCs 形态($\times 100$)

2.2 BMSCs表面标志物的鉴定结果 流式细胞仪检测显示，96%以上的BMSCs均表达CD29，而不表达CD34，见图2，细胞的均质性较好。

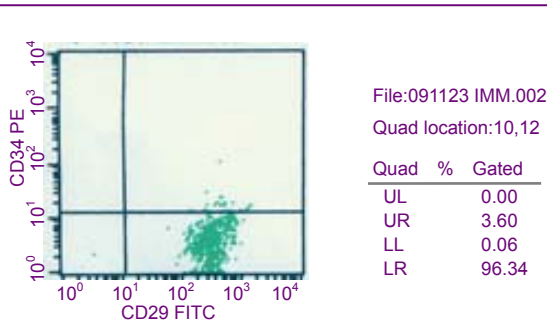


Figure 2 CD29 and CD34 expression on the third passage of bone marrow mesenchymal stem cells identified by flow cytometry
图2 流式细胞仪鉴定第3代 BMSCs 表面抗原 CD29、CD34 的表达

2.3 诱导后细胞形态变化及免疫细胞化学检测结果

向内皮细胞方向分化：经向内皮细胞方向诱导5 d后，细胞逐渐变粗大，体积增大，10 d左右倒置显微镜下出现明显的“鹅卵石”样形态，见图3。取诱导1周和2周的细胞爬片进行免疫细胞化学检测，以胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性反应，实验组1周后抗VIII因子染色阳性细胞着色率80%多，2周后阳性细胞着色率90%多，见图4，而未加诱导剂的对照组呈阴性表达。

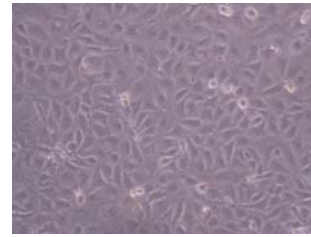


Figure 3 Bone marrow mesenchymal stem cells induced by vascular endothelial growth factor for 2 wk ($\times 100$)
图3 VEGF 诱导2周($\times 100$)

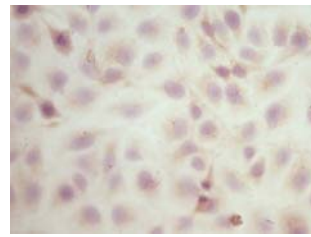


Figure 4 Following 2 wk of induction by vascular endothelial growth factor, bone marrow mesenchymal stem cells were positive for anti-VIII factor staining ($\times 200$)
图4 VEGF 诱导2周后抗VIII因子染色阳性($\times 200$)

向平滑肌细胞方向分化：向平滑肌方向诱导1周左右细胞形态发生明显变化，细胞体积逐渐变大，呈不规则梭形，密集与稀疏相交错，形成“峰-谷”状生长形态，见图5。

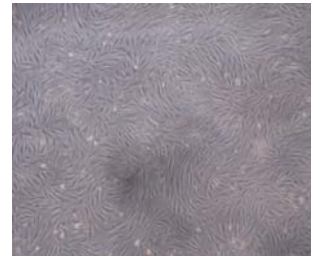


Figure 5 Bone marrow mesenchymal stem cells induced by platelet-derived growth factor-BB for 2 wk ($\times 100$)
图5 PDGF-BB 诱导2周($\times 100$)

取诱导1, 2周细胞爬片行免疫细胞化学检测(胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性)。结果诱导1, 2周实验组抗 α -SMA染色阳性细胞着色率分别接近80%, 90%，见图6。



Figure 6 Following 2 wk of induction using platelet-derived growth factor-BB, bone marrow mesenchymal stem cells were positive for anti- α -SMA staining ($\times 400$)
图6 PDGF-BB 诱导2周后抗 α -SMA 染色阳性($\times 400$)

抗Vimentin染色实验组及对照组均呈阴性表达, 见图7。

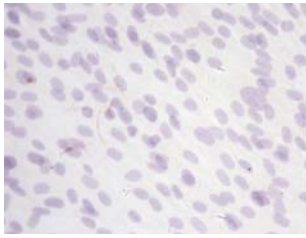


Figure 7 Following 2 wk of induction using platelet-derived growth factor-BB, bone marrow mesenchymal stem cells were negative for anti-Vimentin staining ($\times 200$)
图7 PDGF-BB 诱导 2 周后抗 Vimentin 染色阴性($\times 200$)

向成纤维细胞方向分化: 经向成纤维细胞诱导1周后, 细胞逐渐变得细长, 纺锤形, 呈束状、网状排列生长, 见图8。

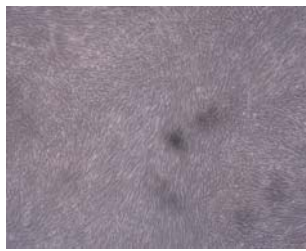


Figure 8 Bone marrow mesenchymal stem cells were induced by basic fibroblast growth factor for 2 wk ($\times 100$)
图8 bFGF 诱导 2 周($\times 100$)

取诱导1周和2周的细胞爬片进行免疫细胞化学检测, 以胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性表现。结果表明, 诱导1周后诱导组抗 α -SMA染色和抗Vimentin染色阳性细胞着色率70%多, 诱导2周后实验组抗 α -SMA染色(见图9)和抗Vimentin染色(见图10)阳性细胞着色率80%多, 而对照组抗 α -SMA染色和抗Vimentin染色均为阴性表达。



Figure 9 Following 2 wk of induction using basic fibroblast growth factor, bone marrow mesenchymal stem cells were positive for anti α -SMA staining ($\times 400$)
图9 bFGF 诱导 2 周后抗 α -SMA 染色阳性($\times 400$)



Figure 10 Following 2 wk of induction using basic fibroblast growth factor, bone marrow mesenchymal stem cells were positive for anti-Vimentin staining ($\times 400$)
图10 bFGF 诱导 2 周抗 Vimentin 染色阳性($\times 400$)

3 讨论

骨髓贴壁培养法操作简单, 耗时较短, 不需要昂贵的试剂或仪器, 易于推广应用, 因此在本实验选用骨髓贴壁法获取BMSCs, 并进行体外扩增培养, 经流式细胞仪检测, 第3代时即可获得均质性好的BMSCs, 体外培养增殖快, 可在短时间内获得足够数量的细胞。

正常心脏瓣膜表覆的完整而光滑的内皮细胞层具有抗炎、抗氧化及防止血栓形成的作用, 因此内皮细胞被公认为组织工程心脏瓣膜不可或缺的成分。而BMSCs取材方便, 易于体外培养扩增^[13], 如果以之作为构建HETV种子源细胞, 那么首先将其定向分化为内皮细胞就成为必然环节^[14]。诱导分化的条件决定BMSCs分化的方向。有研究表明^[15-18], VEGF是诱导BMSCs向内皮细胞分化的关键性因素。VEGF是一种酪氨酸激酶受体FLK-1/KDR和FLT-1的配基, 它能特异性促进内皮细胞的有丝分裂。本实验取生长状态良好的第3代BMSCs作为诱导对象, 以L-DMEM+体积分数为20%胎牛血清+10 μ g/L VEGF为诱导培养条件向内皮细胞方向诱导。本实验证明, 经上述诱导条件诱导1周和2周后, 细胞逐渐变大, 光镜下呈明显的“铺路石”样形态, 免疫细胞化学显示80%~90%的诱导后细胞表达VIII因子相关抗原, 而对照组阴性表达, 具有明显的内皮细胞特征, 说明在上述诱导体系培养下, BMSCs可成功向内皮细胞方向分化。

正常的心脏瓣膜结构中可以发现平滑肌细胞及其参与构建的基质成分, 因此构建理想的HETV需要考虑其结构中有平滑肌细胞的存在。目前已有研究显示在转化生长因子 β 、PDGF-BB、牵张力、高浓度的血清等作用下, 可以将BMSCs定向分化为血管平滑肌细胞^[19-21]。PDGF-BB是一种重要的促细胞分裂剂, 它通过组织局部的特异性受体发挥作用, 能刺激多种细胞分裂和增殖^[22]。Simper等^[23]用PDGF-BB将外周血分离的单核细胞诱导生成血管平滑肌细胞, Yamashita等^[24]实验表明, PDGF-BB在维持平滑肌细胞表型和诱导非平滑肌细胞向平滑肌细胞分化过程中起重要作用。同样取生长状态

良好的第3代BMSCs作为诱导对象, 在L-DMEM+体积分数为20%胎牛血清+2 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB的诱导体系下体外培养1周和2周后, 细胞体积逐渐变大, 呈不规则梭形, 密集与稀疏相交错, 形成“峰-谷”状生长形态^[25], 免疫细胞化学显示诱导后的细胞80%~90%表达平滑肌肌动蛋白, 而不表达波形蛋白, 说明在含PDGF-BB的条件培养基下, BMSCs成功向平滑肌细胞方向分化。

正常的心脏瓣膜结构中可以发现成纤维细胞, 因此构建理想的HETV同样需要考虑其结构中有成纤维细胞的存在。bFGF是具有促进中胚层及神经外胚层细胞增殖的生物活性物质^[26-28], 它作为重要的创伤愈合因子, 参与体内多种组织创伤修复过程。有研究表明^[29-31], bFGF在BMSCs向成纤维细胞的分化过程中起重要作用。同样选取生长状态良好的第3代BMSCs作为诱导对象, 加入条件培养基L-DMEM+体积分数为20%胎牛血清+20 $\mu\text{g/L}$ bFGF进行诱导后, 细胞逐渐变得细长, 纺锤形, 呈束状、网状排列生长, 诱导培养1周和2周后进行免疫细胞化学分析显示70%~80%的细胞表达平滑肌肌动蛋白和波形蛋白, 表明成功向成纤维细胞方向分化。

综上所述, BMSCs在一定的条件下能够定向分化为内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞, 并具有较高的分化率, 这种骨髓源性的内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞有望作为HETV种子细胞的新选择。

4 参考文献

- Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003;92(10):1068-1078.
- Engelmayer GC Jr, Sacks MS. Prediction of extracellular matrix stiffness in engineered heart valve tissues based on nonwoven scaffolds. *Biomech Model Mechanobiol*. 2008;7(4):309-321.
- Merryman WD. Development of a tissue engineered heart valve for pediatrics: a case study in bioengineering ethics. *Sci Eng Ethics*. 2008;14(1):93-101.
- Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:289-313.
- Schmidt D, Breymann C, Weber A, et al. Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells of vascular grafts. *Ann Thorac Surg*. 2004;78(4):2094-2098.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, et al. Functional Living Trileaflet Heart Valves Grown In Vitro. *Circulation*. 2000;102(19 Suppl 3):III44-49.
- Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res*. 2003;312(1):31-40.
- Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, et al. Basic fibroblast growth factor enhances PPAR γ ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett*. 2004;577(1-2):277-278.
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008;68(11):4229-4238.
- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384-1392.
- Hu X, Yu SP, Fraser JL, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):799-808.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol*. 2008;9:60.
- Xu J, Liu X, Chen J, et al. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(3):C535-543.
- Joachim O, Sabine B, Birgitte J, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-384.
- Xu J, Liu X, Jiang Y, et al. MAPK/ERK signaling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2395-2406.
- Zacharek A, Chen J, Cui X, et al. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(10):1684-1691.
- Cho SW, Park HJ, Ryu JH, et al. Vascular patches tissue engineered with autologous bone marrow derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials*. 2005;26(14):1915-1924.
- Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*. 2002;20(3):205-214.
- Dong NG, Qiu YM, Shi JW. Application of transforming growth factor-beta(1) on construction of tissue engineering heart valves: experimental in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007;87(23):1622-1626.
- Zhang S, Zhou Y, Guan SY, et al. Zhongguo Shouyi Xuebao. 2008;28(8):939-942. 张舒, 周杨, 关思宇, 等. 血小板源性生长因子(PDGF-BB)促进山羊骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(8): 939-942.
- Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003;130(20):4679-4684.
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. 2002;106(10):1199-1204.
- Yamashita J, Iton H, Hiroshima M, et al. FLK1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*. 2000;408(6808):92-96.
- Liu XP, Liu Q, Zheng YS, et al. Shantou Daxue Yixueyuan Xuebao. 2008;21(3):137-139. 刘幸平, 刘清, 郑燕珊, 等. 大鼠血管平滑肌细胞的培养与鉴定[J]. 汕头大学医学院学报, 2008, 21(3): 137-139.
- Wei XY, Liu WY, Sun GC, et al. Zhonghua Waike Zazhi. 2005;43(18):1198-1201. 卫向阳, 刘维永, 孙国成, 等. 犬骨髓间充质干细胞体外分离、诱导成纤维细胞的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(18): 1198-1201.
- Kamada Y, Yoshida Y, Saji Y, et al. Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G157-167.
- Meng CF, Zhang CL, Fan HB, et al. Xiandai Shengwuxue Yixue Jinzhan. 2007;7(3):351-352. 孟鹏飞, 张春礼, 范宏斌, 等. EGF体外诱导骨髓基质干细胞增殖分化为成纤维细胞的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(3): 351-352.
- Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, et al. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):41-49.
- Xiao L, Liu P, Li X, et al. Exported 18-kDa isoform of fibroblast growth factor-2 is a critical determinant of bone mass in mice. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3170-3182.
- Yang H, Xia Y, Lu SQ, et al. Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1. *J Biol Chem*. 2008;283(9):5287-5295.

来自本文课题的更多信息--

基金项目: 重庆市卫生局科研项目。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。