

• 组织工程与细胞培养 •

27nt-miRNA 对间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化的影响

沈凤¹, 杨鹏¹, 陶晓静¹, 颜渊鸳¹, 李丹¹, 欧和生^{1,2}

1 广西医科大学 药学院, 广西 南宁 530021

2 广西中医药大学附属广西国际壮医院, 广西 南宁 530001

沈凤, 杨鹏, 陶晓静, 等. 27nt-miRNA 对间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化的影响. 生物工程学报, 2019, 35(2): 290–297.

Shen F, Yang P, Tao XJ, et al. Effect of 27nt-miRNA on the differentiation of mesenchymal stem cells into vascular smooth muscle cells. Chin J Biotech, 2019, 35(2): 290–297.

摘要: 为探讨 27nt-miRNA 对间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化影响, 构建 27nt-miRNA 过表达、反义序列 Anti-27nt-miRNA 以及阴性对照的表达质粒, 慢病毒包装后分别转染人脐带间充质干细胞 (hUCMSC), 加入 IV 型胶原诱导 hUCMSC 定向分化为血管平滑肌细胞。四唑盐 (MTT) 比色法检测分化后细胞活力, 免疫细胞化学染色法检测分化后细胞 SM22 α (兔抗平滑肌 22 α , smooth muscle 22 α) 的表达, Western 印迹法和 RT-PCR 检测分化后细胞内的 SMA (兔抗平滑肌肌动蛋白, smooth muscle actin) mRNA、SM 22 α mRNA 及其蛋白质表达情况。经检测, 27nt-miRNA 过表达分化组与阴性对照组相比, 细胞活力下降 20.48% ($P<0.05$), SMA mRNA、SM22 α mRNA 及其蛋白质表达量明显升高 ($P<0.05$); 而 Anti-27nt-miRNA 分化组细胞活力上升了 18.07% ($P<0.05$), SMA mRNA、SM22 α mRNA 及其蛋白质表达量下降 ($P<0.05$)。综上所述, 27nt-miRNA 能够促进间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化, 并且抑制分化后的细胞活力。

关键词: 27nt-miRNA, 间充质干细胞, 血管平滑肌细胞, SM22 α , SMA

Effect of 27nt-miRNA on the differentiation of mesenchymal stem cells into vascular smooth muscle cells

Feng Shen¹, Peng Yang¹, Xiaojing Tao¹, Yuanyuan Yan¹, Dan Li¹, and Hesheng Ou^{1,2}

1 College of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

2 The Affiliated Guangxi International Zhuang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China

Abstract: To investigate the effect of 27nt-miRNA on the differentiation of mesenchymal stem cells into vascular smooth muscle cells. The highly expression plasmids of 27nt-miRNA and anti-27nt-miRNA, and negative control plasmids were

Received: June 16, 2018; **Accepted:** October 8, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81373403).

Corresponding author: Hesheng Ou. Tel: +86-771-3376878; E-mail: 2676611767@qq.com

国家自然科学基金 (No. 81373403) 资助。

constructed, packaged with lentivirus and transfected into human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs). Collagen IV was added to induce hUCMSCs differentiation into blood vessel smooth muscle cells (VSMCs). The cell viability was measured by MTT assay. The expression of SMA, SM22 α at mRNA and protein levels was determined by RT-PCR, immunocytochemical staining and Western blotting. Compared with the negative control group, the viability of the 27nt-miRNA overexpression group was decreased by 20.48% ($P<0.05$), and the expression of SMA mRNA and SM22 α mRNA and protein was significantly increased ($P<0.05$); the viability of Anti-27nt-miRNA group was increased 18.07% ($P<0.05$), and the expression of SMA mRNA and SM22 α mRNA and protein was decreased ($P<0.05$). In summary, 27nt-miRNA promotes mesenchymal stem cells differentiation into vascular smooth muscle cells and inhibits cells viability.

Keywords: 27nt-miRNA, mesenchymal stem cells, vascular smooth muscle cells, SM22 α , SMA

血管组织工程是一门利用血管组织中相关细胞和对应的细胞外基质,通过人工制取并重建形成三维血管组织的科学,它为临床心血管疾病的细胞治疗、移植治疗开辟了新的方向。获取种子细胞、构建合适种子细胞支架并成功种植是血管组织工程的3个关键步骤。血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMCs)位于血管中膜,在血管舒缩功能的维持及血管相关疾病如高血压、缺血性心脑血管疾病、动脉粥样硬化等疾病的诊疗中发挥重要作用^[1-2]。此外,VSMC是构建血管组织工程中的重要种子细胞^[3]。目前,用于构建组织工程的VSMC主要来源于成体血管组织和成体干细胞^[4],但从成体血管分离的成熟血管平滑肌细胞体外增殖能力有限,很难满足血管组织工程中的种子细胞数量。因此,可以高效分化为有功能的VSMC的干细胞,在血管组织工程具有良好的应用前景。

干细胞具有无限增殖能力、多分化潜能的优点,成为血管组织工程的理想种子细胞来源。根据来源不同,干细胞大致分为胚胎干细胞和成体干细胞。间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是成体干细胞中的一种,它来源中胚层,易于分离培养,增殖速度快,异体排斥反应小,具有多向分化潜能。在特定的诱导环境下,MSCs可以定向分化为骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、心肌细胞等。据报道,MSCs还可以分化为VSMC,成为研究VSMC分化的理想模型^[5]。

微小RNA(MicroRNAs, miRNAs)是真核生

物中一类长度约为22个核苷酸的非编码小分子RNA,它们在序列和结构上多样化,参与基因转录后水平调控。近年来研究发现,miRNAs通过调节基因的表达参与干细胞自我更新和分化过程的调控,在干细胞定向分化过程中起重要作用^[6-7],更重要的是某些miRNAs通过调节干细胞定向分化过程为心血管疾病治疗提供新策略^[8]。27nt-miRNA来源于内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因第4内含子中的27碱基重复序列,它在心血管疾病的诊疗中已被广泛研究,内含子源性27nt-miRNA可以抑制内皮细胞的增殖、迁移,同时可以调节内皮细胞代谢产物一氧化氮(Nitric oxide, NO)的产生和释放^[9],但其在干细胞定向分化为VSMC的研究尚未见报道。因此,本研究的目的是探讨27nt-miRNA对间充质干细胞向血管平滑肌细胞分化影响,其结果可能为干细胞在心血管相关疾病的预防和治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人脐带间充质干细胞hUCMSCs(上海华雅思创生物科技有限公司);血清替代品(PALL,美国);培养基(LONZA,美国);DMEM培养基(Gibco公司);胎牛血清(Lonsera公司);胰蛋白酶消化液(Gibco公司);IV型胶原(Thermo Fisher);四甲基偶氮唑盐(MTT)(索莱宝科技有限公司);RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);RT试剂盒(MBI);PCR试剂盒(天根生化

科技有限公司);慢病毒载体(上海吉凯基化学技术有限公司);兔抗平滑肌 22 α 单抗 (Smooth muscle 22 α , SM22 α)、内参 GAPDH 抗体 (Proteintech);兔抗平滑肌肌动蛋白单抗 (Smooth muscle actin, SMA) (Abcam, 美国);酶标二抗山羊抗兔 IgG (Proteintech);超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天);免疫组化通用性试剂盒 (中杉)。

超净工作台 (新加坡艺思高科技有限公司);倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);CO₂ 饱和湿度培养箱 (美国 Thermo Forma 公司);酶联免疫检测仪 Model-450 (美国 Thermo Forma 公司);低速离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌锅 (海博讯实业有限公司医疗设备厂);-80 °C 冰箱 (Haier 公司);蛋白电泳仪、蛋白质转膜仪 (Bio-Rad, 美国);Alpha 化学发光凝胶成像系统 Fluor Chem HD2 (美国 Protein Simple 公司);ABI7700 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 27nt-miRNA 病毒的构建和鉴定

以 eNOS 第 4 内含子中 27 碱基重复序列 (5'-GA AGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG-3') 为设计根据,以 Ubi-MCS-SV40-EGFP-IRES-puromycin 为载体,用 Age I /Nhe I 进行酶切,转染 293FT 细胞后,浓缩得到 27nt-miRNA 过表达慢病毒颗粒,同时根据发夹结构构建反义序列 Anti-27nt-miRNA 和阴性对照病毒 NC。病毒载体上带有绿色荧光并含有嘌呤霉素抗性,绿色荧光可用来识别慢病毒是否成功转染,加入嘌呤霉素进行筛选,建立稳定细胞株。

1.2.2 人脐带间充质干细胞 (hUCMSC) 的培养和转染

hUCMS 用含 2% 血清替代品、2% 谷氨酰胺和 1% 青霉素/链霉素的培养基进行培养,放置 37 °C、5% CO₂ 恒温饱和湿度培养箱中培养,待细胞密度大于 90% 时,倾去培养液,用 PBS 洗涤细胞。加

入 0.15% 胰蛋白酶进行消化传代。选择生长状态良好的第 3-5 代细胞转染,按 5×10^5 细胞/孔的浓度接种 6 孔板,混匀后正常静置培养 24 h。3 种慢病毒以 MOI=70 分别感染 hUCMS,置于培养箱孵育 48 h,在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况,加入嘌呤霉素 (8 μ g/mL) 进行筛选。实验分为 3 组:27nt-miRNA 组、NC 组、Anti-27nt-miRNA 组。

1.2.3 hUCMSC 分化

转染后的 3 组细胞进行消化传代,将吹打成单细胞的 hUCMSC 接种到 IV 型胶原 (5 g/mL) 包被的细胞培养瓶中,添加分化培养液 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基),连续培养 14 d,根据情况 2-3 d 换液。

1.2.4 MTT 法检测细胞活力

诱导分化 14 d 后的 3 组细胞,以每孔 6×10^3 个细胞接种到 96 孔板中,放置 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。12 h 后更换无血清的 DMEM 培养基继续培养。于 24 h 后更换成含 PDGF-BB (5 ng/mL) 的 5% FBS/DMEM 培养 24 h 后加入 MTT 培养 4 h,使用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测每孔 OD 值。

1.2.5 免疫组化检测 VSMC 分化标志物 SM 22 α 的表达

采用免疫组化检测。将转染成功的 3 组 hUCMSC 接种到 IV 型胶原包被的盖玻片上进行分化培养。第 14 天时,取出玻片,PBS 冲洗 3 次,中性树脂粘片,4% 甲醛固定。用 Triton X-100 (10 min) 和 3% 过氧化氢 (30 min) 处理后双蒸水冲洗 3 次,敷一抗、二抗后显色剂显色。显微镜观察、拍照,并计算细胞阳性率。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞 SM A mRNA、SM22 α mRNA 的表达

分化第 14 天时,收集 3 组细胞样本,根据 TRIzol 试剂盒说明书提取各组细胞的总 RNA,利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成 SMA、SM22 α 和 GAPDH 的引物,见表 1。分别取各组细胞 RNA

表 1 引物序列
Table 1 The primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')
SM22α-F	CTTGAAGGCAGCTGAGGATTAT
SM22α-R	CAAACCTGCCCAAAGCCATTAC
SMA-F	AGGGAGTGATGGTTGGAATG
SMA-R	GGTGATGATGCCGTGTTCTA
GAPDH-F	GATGACATCAAGAAGGTGGTGA
GAPDH-R	ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC

1 μg, 加入 1 μL (0.5 g/L) Oligo(dT)₁₈ Primer, 70 °C 变性 5 min 后立即放置冰上冷却。加 4 μL 反应缓冲液 (5×), 1 μL Ribo Lock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/μL), 2 μL 10 mmol/L dNTP Mix, 37 °C 温育 5 min, 加入 1 μL 逆转录酶, 42 °C 反应 1 h, 之后 70 °C 孵育 10 min 终止反应, 得到 cDNA 第一条链。PCR 扩增反应: 94 °C 预变性 5 min 后, 开始 30 个循环 (94 °C 30 s、56 °C 1 min、72 °C 1 min), 最后 72 °C 5 min, 终止反应。取 5 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.7 Western blotting 检测细胞内 SMA 和 SM22α 蛋白表达

分化第 14 天时, 收集 3 组细胞样本, 分别用 RIPA 缓冲液裂解, 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 取上清。分别取各组的蛋白 30 μg 进行 SDS-PAGE (10%) 分离并转移到 PVDF 膜上。用脱脂奶粉封闭 1 h 后加入 SMA (1 : 1 000)、SM22α (1 : 1 000)

一抗湿盒过夜 (4 °C)。第二天用 TBST 冲洗 3 次 (每次 10 min), 然后加入酶标二抗山羊抗兔 IgG (1 : 2 000) 孵育 2 h, 重复用 TBST 冲洗 3 次 (每次 10 min)。加入显色剂, 利用 Alpha 化学发光凝胶成像系统分析。实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, 实验重复 3 次, 数据均用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 27nt-miRNA 高表达、Anti-27nt-miRNA、NC 转染效果

分别将 3 种慢病毒以 MOI=70 分别感染 hUCMS, 48 h 后在荧光电子显微镜下观察转染效率 (显微镜下观察到的绿色荧光代表成功转染慢病毒的细胞), 结果如图 1 所示, 3 种慢病毒转染效率达 90% 以上, 用嘌呤霉素进行筛选, 用于后续实验。

2.2 27nt-miRNA 对分化后 VSMC 的活力影响

各组细胞分化 14 d 后, 用 MTT 法检测 27nt-miRNA 对 PDGF-BB 诱导分化后细胞活力的影响 (图 2)。与阴性对照 NC 组比较, 27nt-miRNA 组的 OD 值下降 20.48% (0.66±0.06 vs. 0.83±0.03,

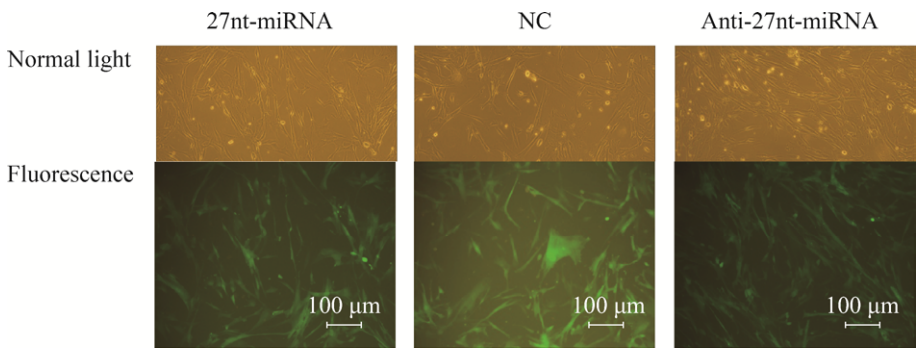


图 1 显微镜下观察到 hUCMS 的转染情况
Fig. 1 Transfection of hUCMS was observed under the microscope.

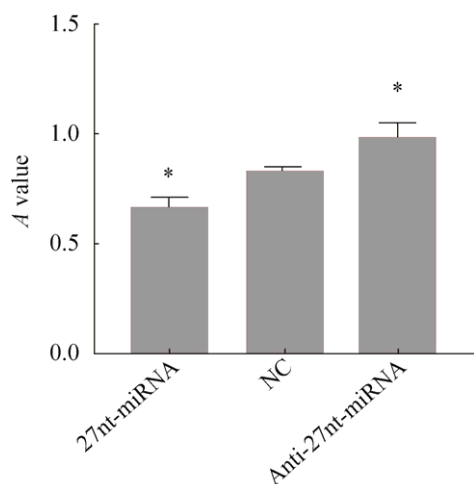


图2 MTT检测27nt-miRNA对细胞活力影响

Fig. 2 MTT detects the effect of 27nt-miRNA on cell viability. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$ vs. NC.

$P<0.05$), 而 Anti-27nt-miRNA 组升高 18.07% (0.83 ± 0.03 vs. 0.98 ± 0.07 , $P<0.05$)。以上结果提示, 27nt-miRNA 抑制 hUCMSC 分化后细胞的活力。

2.3 27nt-miRNA 对 VSMC 分化标志物 SM22 α 表达的影响

用免疫细胞化学染色方法 (ICC) 检测分化后各组细胞中的 VSMC 特异性蛋白 SM22 α 的表达量, 如图 3 所示, SM22 α 蛋白主要表达于细胞胞浆, 阳性染色呈棕黄色颗粒。运用 IPP6.0 软件对 SM22 α 蛋白表达量进行计算: 平均光密度 (Mean optical density) 越大, SM22 α 蛋白表达越高。与阴性对照 NC 组比较, 27nt-miRNA 组 SM22 α 表达量增加 63.64% (0.22 ± 0.02 vs. 0.36 ± 0.04 , $P<0.05$); 而 Anti-27nt-miRNA 组 SM22 α 表达量下降 36.36% (0.22 ± 0.02 vs. 0.14 ± 0.03 , $P<0.05$)。结果提示, 27nt-miRNA 促进了 VSMC 分化标志物 SM22 α 表达。

2.4 RT-PCR 检测 27nt-miRNA 对 SMA mRNA 和 SM22 α mRNA 的影响

用 RT-PCR 检测分化后各组细胞的 SMA mRNA、SM22 α mRNA 的表达水平 (图 4)。与阴

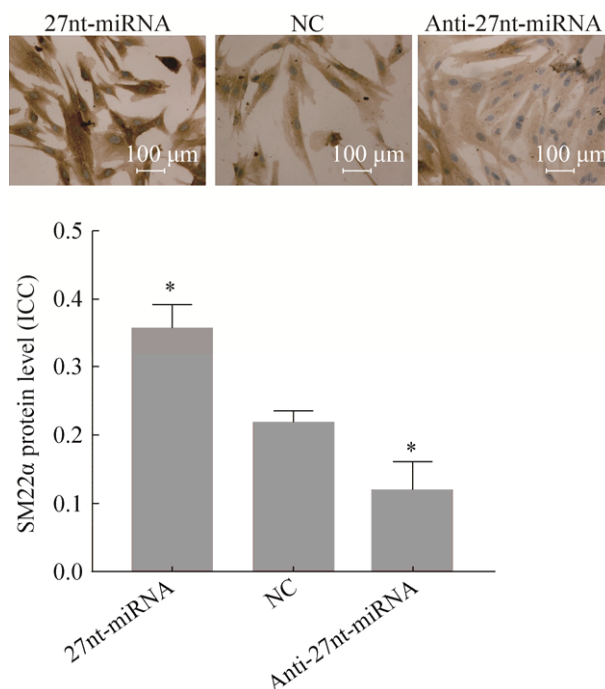


图3 免疫组化检测27nt-miRNA对细胞SM22 α 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of 27nt-miRNA on the protein expression of SM22 α was detected by immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P<0.05$ vs NC.

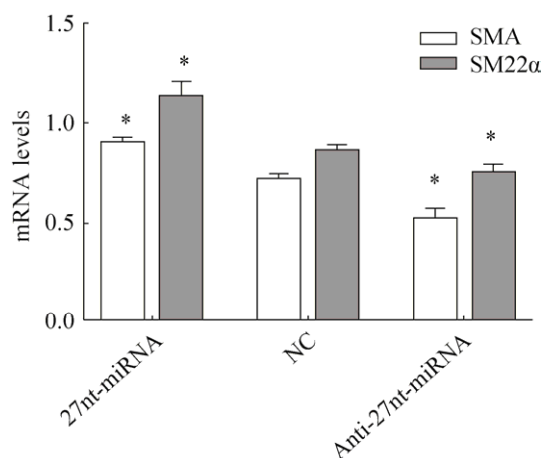


图4 RT-PCR检测27nt-miRNA对SMA mRNA和SM22 α mRNA表达的影响

Fig. 4 Effect of 27nt-miRNA on the mRNA expression of SMA mRNA and SM22 α mRNA was detected by RT-PCR. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$ vs NC.

性对照 NC 组比较, 27nt-miRNA 组的 SM22 α mRNA 表达量增加 31.40% (0.86 ± 0.03 vs. 1.13 ± 0.08 , $P<0.05$)、SMA mRNA 表达量上升 25.00% (0.72 ± 0.03

vs. 0.90 ± 0.03 , $P < 0.05$); 而 Anti-27nt-miRNA 组 SM22 α mRNA 表达量降低 12.80% (0.86 ± 0.03 vs. 0.75 ± 0.04 , $P < 0.05$)、SMA mRNA 表达量下降 27.78% (0.72 ± 0.03 vs. 0.52 ± 0.05 , $P < 0.05$)。结果提示, 27nt-miRNA 促进了 SMA mRNA、SM22 α mRNA 的转录。

2.5 Western blotting 检测 27nt-miRNA 对 SMA、SM22 α 蛋白质表达的影响

用 Western blotting 检测分化后各组细胞的 SMA、SM22 α 蛋白质的表达水平, 如图 5 所示。与阴性对照 NC 组比较, 27nt-miRNA 组的 SM22 α 表达量增加 28.33% (0.60 ± 0.03 vs. 0.77 ± 0.04 , $P < 0.05$)、SMA 表达量上升 30.00% (0.40 ± 0.02 vs. 0.52 ± 0.04 , $P < 0.05$); 而 Anti-27nt-miRNA 组 SM22 α 表达量降低 18.33% (0.60 ± 0.03 vs. 0.49 ± 0.03 , $P < 0.05$)、SMA 表达量下降 22.50% (0.40 ± 0.02 vs. 0.31 ± 0.03 , $P < 0.05$)。结果提示, 27nt-miRNA 促进 SMA、SM22 α 的表达。

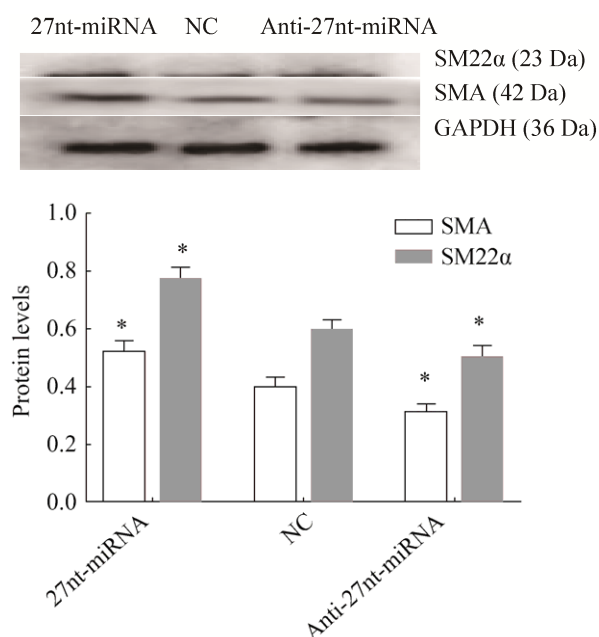


图 5 Western blotting 检测 27nt-miRNA 对 SMA 和 SM22 α 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of 27nt-miRNA on the protein expression of SMA and SM22 α by Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$ vs NC.

3 讨论

本研究通过向 hUCMSCs 分别转染 27nt-miRNA 过表达、反义序列 Anti-27nt-miRNA 及阴性对照 NC 三种慢病毒后, 定向分化为 VSMCs, 结果发现 27nt-miRNA 可以促进 hUCMSCs 向 VSMCs 分化, 表现为 VSMCs 分化标志物 SMA、SM22 α 表达增高, 同时抑制分化后细胞的增殖。SMA 是 VSMCs 最常用的分化标志物, 但它特异性不强, 在胚胎期的心肌、成纤维细胞、内皮细胞及多种肿瘤细胞中均有表达^[10]。为提高研究的可信度, 我们还增加了 SM22 α 分化标志物, 它的特异性比 SMA 高, 仅表达于内脏平滑肌和 VSMCs^[11]。SMA、SM22 α 在 27nt-miRNA 过表达组均显著提高, 表明 27nt-miRNA 可特异性促进 VSMCs 分化。

干细胞的多向分化潜能及可塑性已经得到普遍的认可, 是组织工程中的理想种子细胞。研究发现, 干细胞在诱导条件下可以定向分化为神经样细胞, 在神经退行性疾病和神经细胞保护中发挥重要作用^[12]; 在一定条件下, 干细胞定向分化为脂肪细胞, 为自体脂肪移植的临床应用提供新思路^[13]; 此外, 干细胞还可以分化为成骨细胞, 促使成骨细胞和破骨细胞趋于平衡^[14]。更令人感兴趣的是, 干细胞在心血管疾病中也起了重要作用^[15]。心血管疾病已成为威胁人类健康的重要疾病之一, 高血压、心肌梗死、先天性心脏病等心血管疾病发病率及病死率逐年升高。VSMCs、内皮细胞及心肌细胞的功能改变及其凋亡与这些疾病发生发展有着密切的联系, 因此, 找到理想的种子细胞是关键。来自于人类脐带间充质干细胞 (MSCs) 可能是 VSMCs 新来源, 因为它们表现出非常低的同种免疫反应和致癌风险^[16-17]。研究表明, 间充质干细胞可以定向分化为内皮细胞^[18]、心肌细胞^[19]及血管平滑肌细胞^[20], 其分化 VSMCs 的条件有 TGF- β 、PDGF-BB、IV 型胶原、高浓度的血清等^[21-22]。本研究中采用了 IV 型胶原作为诱

导剂, MSCs 分化过程中出现 VSMCs 分化标志物 SMA、SM22 α , 表明分化成功。

miRNAs 在心血管疾病和干细胞分化的关键调节作用获得越来越多的关注, 并被认为是治疗心血管疾病的新靶点。Wu 等^[23]研究发现, miR-214 通过靶向结合 QKI 蛋白促进胚胎干细胞分化为 VSMCs; Gu 等^[5]研究发现 miR503 通过靶目标 SMAD7 促进间充质干细胞分化为 VSMCs, 而 miR-222-5P 通过 ROCK2 抑制 VSMCs 分化。这些 miRNAs 在干细胞定向分化 VSMCs 起到重要作用。据我们所知, 27nt-miRNA 在心血管系统发挥重要作用^[9,24], 但是它的表达和生物功能在干细胞定向分化 VSMCs 中的调控作用尚不清楚。本研究中 hUCMSCs 定向分化 VSMCs 模型中分别转染被病毒包装的 27nt-miRNA 过表达、反义序列 Anti-27nt-miRNA 以及阴性对照 NC 质粒, 分化 14 d 后发现 27nt-miRNA 过表达组的 SMA、SM22 α 表达量明显增高, 表明 27nt-miRNA 可以促进 hUCMSCs 定向分化 VSMCs, 并且可能是通过调控 SMA、SM22 α 基因从而影响 VSMCs 分化。但是 VSMCs 的分化机制十分复杂, 涉及到多个不同层面的调节, 包括表观遗传学修饰、基因转录和转录后水平、翻译以及翻译后调节等^[25], 这些 VSMCs 分化机制问题有待今后深入探讨。

综上, 本研究初步明确 27nt-miRNA 可以促进 hUCMSCs 定向分化 VSMCs, 并且能够抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖, 这一作用对于组织工程血管的构建有重要意义, 可能为其提供 VSMCs 种子细胞。但是, 本研究也存在一些不足之处, 例如, VSMCs 分化是一个多因素调节的过程, 不是单一分子或基因所调控, 可能还通过其他通路起作用。此外, 没有明确分化成功 VSMCs 的表型, 这些问题都有待进一步探讨。

REFERENCES

[1] Wadey K, Lopes J, Bendeck M, et al. Role of smooth

muscle cells in coronary artery bypass grafting failure. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 601–610.

[2] Hays TT, Ma B, Zhou N, et al. Vascular smooth muscle cells direct extracellular dysregulation in aortic stiffening of hypertensive rats. *Aging Cell*, 2018, 17(3): e12748.

[3] Row S, Peng HF, Schlaich EM, et al. Arterial grafts exhibiting unprecedented cellular infiltration and remodeling *in vivo*: the role of cells in the vascular wall. *Biomaterials*, 2015, 50: 115–126.

[4] Espagnol N, Guilloton F, Deschaseaux F, et al. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(1): 104–114.

[5] Gu WD, Hong XC, Le Bras A, et al. Smooth muscle cells differentiated from mesenchymal stem cells are regulated by microRNAs and suitable for vascular tissue grafts. *J Biol Chem*, 2018, 293(21): 8089–8102.

[6] Feng L, Shi L, Lu YF, et al. Linc-ROR promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by functioning as a competing endogenous RNA for miR-138 and miR-145. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 345–353.

[7] Khosravi M, Azarpira N, Shamdani S, et al. Differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to hepatocyte cells by transfection of miR-106a, miR-574-3p, and miR-45. *Gene*, 2018, 667: 1–9.

[8] Li B, Meng XM, Zhang LB. microRNAs and cardiac stem cells in heart development and disease. *Drug Disc Today*, 2018, doi: 10.1016/j.drudis.2018.05.032.

[9] Luo XL, Chen W, Mo GJ, et al. The regulation of 27-nt miRNA on vascular endothelial cells eNOS expression/activity and the impact of its metabolites. *Progr Mod Biomed*, 2017, 17(8): 1442–1447 (in Chinese).

罗雪兰, 陈伟, 莫国君, 等. 27nt-miRNA 对血管内皮细胞 eNOS 表达/活性的调节及其代谢产物的影响. *现代生物医学进展*, 2017, 17(8): 1442–1447.

[10] Kennedy E, Hakimjavadi R, Greene C, et al. Embryonic rat vascular smooth muscle cells revisited - a model for neonatal, neointimal SMC or differentiated vascular stem cells? *Vasc Cell*, 2014, 6(1): 6.

[11] Solway J, Seltzer J, Samaha FF, et al. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene,

- SM22 α . *J Biol Chem*, 1995, 270(22): 13460–13469.
- [12] Aikins AR, Hong SW, Kim HJ, et al. Extremely low-frequency electromagnetic field induces neural differentiation of hBM-MSCs through regulation of (Zn)-metallothionein-3. *Bioelectromagnetics*, 2017, 38(5): 364–373.
- [13] Wang Q, Wang X, Lai DF, et al. BIX-01294 promotes the differentiation of adipose mesenchymal stem cells into adipocytes and neural cells in Arbas Cashmere goats. *Res Vet Sci*, 2018, 119: 9–18.
- [14] Ren G, Sun J, Li MM, et al. MicroRNA-23a-5p regulates osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting mitogen-activated protein kinase-13. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4554–4560.
- [15] Forte A, Finicelli M, Mattia M, et al. Mesenchymal stem cells effectively reduce surgically induced stenosis in rat carotids. *J Cell Physiol*, 2008, 217(3): 789–799.
- [16] Shende P, Subedi M. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 693–706.
- [17] Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R. Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3982–3999.
- [18] Khaki M, Salmanian AH, Abtahi H, et al. Mesenchymal stem cells differentiate to endothelial cells using recombinant vascular endothelial growth factor-A. *Rep Biochem Mol Biol*, 2018, 6(2): 144–150.
- [19] Dai FJ, Du PZ, Chang YW, et al. Downregulation of MiR-199b-5p inducing differentiation of bone-marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) toward cardiomyocyte-like cells via HSF1/HSP70 pathway. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2700–2710.
- [20] Pajooesh M, Naderi-Manesh H, Soleimani M. MicroRNA-145-based differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(11): 1975–1981.
- [21] Jin M, Wu YT, Wang YM, et al. MicroRNA-29a promotes smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting YY1. *Stem Cell Res*, 2016, 17(2): 277–284.
- [22] Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 2002, 20(3): 205–214.
- [23] Wu YT, Li ZB, Yang M, et al. MicroRNA-214 regulates smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting RNA-binding protein QKI. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19866–19878.
- [24] Li YM, Wang H, Zhang WY, et al. Intronic miRNA regulates human endothelial nitric oxide synthase gene and proliferation of endothelial cells by the transcription factor AP1. *Chin J Arterioscl*, 2017, 22(7): 649–654 (in Chinese).
- 李玉媚, 王辉, 张文宇, 等. 内含子源性 miRNA 通过转录因子 AP1 调节内皮型一氧化氮合酶表达及血管内皮细胞增殖作用. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 22(7): 649–654.
- [25] Xie C, Ritchie RP, Huang H, et al. Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(7): 1485–1494.

(本文责编 陈宏宇)