

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-04-0268-05

## 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及其鉴定

王生兰<sup>1,2</sup>, 苏娟<sup>1</sup>, 徐一洲<sup>1</sup>, 谢静<sup>1</sup>, 王树人<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西基础医学与法医学院病理生理学教研室, 四川省成都市 610041;

2. 青海大学医学院病理生理学教研室, 青海省西宁市 810001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 表型转换; 体外培养;  $\alpha$ 肌动蛋白; 骨桥蛋白

[摘要] 目的 探讨体外传代培养对血管平滑肌细胞表型转换的影响, 确认体外培养的血管平滑肌细胞不同表型的最佳指标。方法 选择以未经培养传代的血管平滑肌细胞和体外培养的第4代血管平滑肌细胞作对比研究, 采用免疫组织化学法检测血管平滑肌细胞 $\alpha$ 肌动蛋白, 逆转录聚合酶链反应检测血管平滑肌细胞肌动蛋白22 $\alpha$ 、基质 $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白和骨桥蛋白各目的基因mRNA相对表达水平, 透射电镜观察血管平滑肌细胞的形态学特征, 确定其表型转换特征及各表型指标的区分效能。结果 电镜观察显示, 未经培养传代的血管平滑肌细胞胞质中肌丝分布丰富、均匀, 并可见到收缩表型血管平滑肌细胞的典型结构—密斑, 内质网、高尔基复合体等细胞器相对较少; 而体外培养至第4代时血管平滑肌细胞胞质中肌丝明显减少, 内质网、高尔基复合体明显增多。原代血管平滑肌细胞 $\alpha$ 肌动蛋白免疫组织化学染色强且广泛, 而体外培养至第4代时 $\alpha$ 肌动蛋白染色明显变浅、稀疏。第4代血管平滑肌细胞的骨桥蛋白mRNA表达量较原代血管平滑肌细胞显著增高( $P < 0.01$ ), 肌动蛋白22 $\alpha$  mRNA在血管平滑肌细胞中的表达量较原始血管平滑肌细胞降低, 但差异不大, 基质 $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白mRNA表达量较未经培养传代的血管平滑肌细胞升高( $P < 0.05$ )。结论 血管平滑肌细胞体外培养至第4代, 即可从典型的收缩表型转化为合成表型, 提示血管平滑肌细胞是一种很容易去分化的细胞。电镜形态观察 $\alpha$ 肌动蛋白和骨桥蛋白在两型血管平滑肌细胞中的差异, 可作为血管平滑肌细胞表型区分的有效标志。而肌动蛋白22 $\alpha$ 和基质 $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白的表达在两型血管平滑肌细胞中虽有一定的差异, 但重叠较大。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Phenotype Transformation of Rat's Vascular Smooth Muscle Cell During in Vitro Culture and Its Characterization

WANG Sheng-Lan<sup>1,2</sup>, SU Juan<sup>1</sup>, XU Yi-Zhou<sup>1</sup>, XIE Jing<sup>1</sup>, and WANG Shu-Ren<sup>1</sup>

(1. Department of Pathophysiology, College of Preclinical and Forensic Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pathophysiology, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Phenotype Transformation; Culture in Vitro;  $\alpha$ SM Actin; Osteopontin[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of culture of vascular smooth muscle cell (VSMC) in vitro on its phenotype transformation and to survey the best parameters for characterizing the phenotype. Methods The primary VSMC and the fourth passage of VSMC in vitro culture were compared by their morphological characteristics under electron microscope, and the  $\alpha$  SM actin expression measured by immunohistochemical staining, the osteopontin (OPN), SM22 $\alpha$ , matrix Gla protein (MGP) mRNA transcription levels measured by RT-PCR were all comparatively studied. Results The myofilament was abundant, the dense patch—a typical structure of contractile phenotype of VSMC well distributed, while the endoplasmic reticulum, Golgi's complex were less distributed in primary VSMC. The VSMC in fourth passage, however, showed scattered distribution of myofilament in cytosol, but much more endoplasmic reticulum, Golgi's complex, and mitochondria under electron microscope observation. The immunohistochemical staining showed much stronger  $\alpha$  SM actin expression in primary VSMC compared with the fourth passage ( $P < 0.05$ ). OPN mRNA level increased very significantly ( $P < 0.01$ ) in fourth passage of VSMC compared with primary ones. The transcription level of SM22 $\alpha$  mRNA in fourth passage of VSMC decreased compared with primary VSMC, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). MGP mRNA transcription levels increased in fourth passage of VSMC ( $P < 0.05$ ).

Conclusions Four passages of VSMC in vitro can transform the typical contractile phenotype into the typical synthetic phenotype, which indicated that the VSMC had the trait of easy-dedifferentiation, this may suggest some implication in VSMC research. Electron microscope observation,  $\alpha$ SM actin, OPN showed significant difference between contractile phenotype and synthetic phenotype, which may represent a good marker for distinguishing the two different phenotypes. The SM22 $\alpha$  and the matrix Gla had some difference, but overlaps were also significant between the two different phenotypes.

[收稿日期] 2007-11-08 [修回日期] 2008-04-08

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20050610050)

[作者简介] 王生兰, E-mail 为 zhw6996@163.com。通讯作者王树人, 教授, 博士研究导师, E-mail 为 wangshuren1945@yahoo.com.cn。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖是许多心血管疾病的共同病理基础, 在高血压、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 和血管成形术后再狭窄等许多血管性疾病中, 都涉及到 VSMC 的异常增殖。而 VSMC 由收缩表型向合成表型的转化是其增殖的前提<sup>[1]</sup>。VSMC 在胚胎发生期来自中胚层, 在以后的发育过程中, 逐渐分化为不同的细胞群, 并获得具有成年特征的分化表型, 即收缩表型, 此表型的 VSMC 主要执行收缩功能。但在血管损伤、重构及一些促生长因素的刺激下, VSMC 可暂时去分化、重新转变为更接近胚胎期的未分化表型, 即合成表型, 此表型的 VSMC 则显示出显著的增殖特性, 且在增殖的同时合成与分泌细胞外基质及多种细胞因子<sup>[2,3]</sup>。由于多种心血管疾病都涉及到 VSMC 的增殖及表型转化, 因此, 确认 VSMC 处于何种表型状态, 对许多涉及 VSMC 异常增殖的心血管疾病的研究具有重要意义。在 VSMC 的研究中, 体外培养 VSMC 是一种非常广泛采用的方法。但体外培养 VSMC 必定涉及取材时平滑肌细胞损伤及培养基中促生长因素的刺激, 这必然带来 VSMC 的表型转化及细胞增殖。因此, 确认待研的 VSMC 处于何种表型状态, 以及何种指标能较准确地认定 VSMC 的表型状态, 对 VSMC 的研究具有重要意义。本研究在初试的基础上, 选择以未经培养传代的 VSMC 和体外培养的第 4 代 VSMC 作对比研究, 探讨体外培养对 VSMC 表型转化的影响及确认体外培养的不同 VSMC 表型的最佳指标。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SD 大鼠由四川中药研究所提供; iv 型胶原酶、胰蛋白酶、DEME/F12 干粉状培养基购自 Gibco BRL 公司; Biozol 总 RNA 提取试剂盒和 RT-PCR 两步法试剂盒购自博瑞克公司; 兔抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体和即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; PCR 扩增引物由 Invitrogen 公司合成。引物序列: 平滑肌 22a (smooth muscle 22a, SM22a)<sup>[4]</sup> 正义 5'-AAG CCA GTG AAG GTG CCT GAG-3', 反义 5'-TTG AAG GCC AAT CAC GTG CTT-3', 扩增片段 311 bp; 基质  $\gamma$ -羧基谷氨酸蛋白 (matrix Gla protein, MCP)<sup>[5]</sup> 正义 5'-ATC CTG GCT GCG CTG GCC GTG-3', 反义 5'-GAA GTA GCG GTT GTA GGC GGC-3', 扩增片段 264 bp; 骨桥蛋白 (Os-

teopontin, OPN) 正义 5'-TGG CTT ACG GAC TGA GGT CA-3', 反义 5'-GAC CTC AGA AGA TGA ACT G-3' 扩增片段 486 bp; 内参核糖体蛋白正义 5'-CTG AAG GTC AAA GGG AAT GTG-3', 反义 5'-GGA CAG AGT CTT GAT GAT CTC-3', 扩增片段 194 bp。

### 1.2 血管平滑肌细胞的分离培养

采用雄性 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 无菌条件下分离胸腹主动脉, 移入超净台, 刀背刮去内膜, 从外膜上撕下中膜, 用 iv 型胶原酶消化分离 VSMC。消化分离的细胞接种于有一血盖片的 6 孔板中, 4 天后细胞贴壁, 盖片上的细胞用于原代细胞的免疫组织化学检测。分离培养的原代细胞按  $1 \times 10^8$ /L 细胞数接种于 75 mL 培养瓶中, 用含 20% 小牛血清 DMEM/F12 培养基培养, 传代培养至第 4 代使用。

### 1.3 $\alpha$ 肌动蛋白免疫组织化学检测

采用 SP 法对 VSMC 进行免疫组织化学染色, 贴壁于血盖片上的原代及第 4 代 VSMC 依次作以下处理: 倒去培养基, PBS 冲洗 3 次; 4% 多聚甲醛固定; 3%  $H_2O_2$  去离子水孵育; 山羊血清封闭;  $\alpha$  肌动蛋白单抗 (1:100) 孵育; PBS 冲洗; 二抗孵育; 辣根酶标记链霉卵白素孵育; DAB 显色, 淡苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。 $\alpha$  肌动蛋白阳性染色以胞质出现棕黄色或棕褐色为准。选染色均匀的区域, 在 100 倍视野下计数着色细胞占视野细胞总数的百分数 (percentage of positive cells, PP), 共计数 5 个视野, 取平均值, 按着色细胞占视野细胞总数的百分比分别计 1~4 分: 1 分为 <30%, 2 分为 30%~69%, 3 分为 70%~89%, 4 分为 90%~100%。按细胞着色强弱 (staining intensity, SI) 记 0~3 分: 0 分为不着色, 1 分为着色弱, 2 分为中等着色, 3 分为强着色。观察者单盲记分。每张切片的积分为 PP  $\times$  SI 值, 每组取 5 张切片, 取均值做统计学处理。

### 1.4 RNA 的提取

1.4.1 正常血管平滑肌 RNA 的提取 分离的主动脉除去内外膜, 中膜放于研钵中, 加液氮研磨成粉末, 用 Biozol 提取总 RNA, 方法按试剂盒说明进行。

1.4.2 第 4 代血管平滑肌细胞 RNA 提取 传代培养至第 3 代的 VSMC 以  $2 \times 10^8$ /L 接种于 50 mL 培养瓶中, 在 37℃、5%  $CO_2$  培养箱中培养至 80% 后, 用 Biozol 提取总 RNA, 方法按试剂盒说明进行。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测

1.5.1 逆转录合成 cDNA 取 RNA 模板 1  $\mu$ g, 5  $\times$  RT Buffer 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 2  $\mu$ L, super-R1 0.5  $\mu$ L, RT-Enhancer 0.5  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol/L Oligo (dT) 181  $\mu$ L, Rever Tra Ace 1  $\mu$ L, 加无 RNA 酶水至总体积为 20

μL, 42℃反应 40 min, 99℃灭活逆转录酶 5 min, 合成的 cDNA 用于 PCR 反应。

**1.5.2 PCR 反应** 取 cDNA 5 μL, 20 μmol/L 上、下游引物各 1 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总反应体积为 25 μL, 进行 PCR 扩增。扩增条件为 SM22α 94℃变性 1 min → 60℃退火 1 min → 72℃延伸 2 min; MGP 94℃变性 1 min → 62℃退火 1 min → 72℃延伸 2 min; OPN 94℃变性 1 min → 57℃退火 1 min → 72℃延伸 1 min。30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。核糖体蛋白为内参照。PCR 扩增完毕后取 5 μL 在 1.5% 琼脂糖胶中电泳分析, 分别以 SM22α、MGP、OPN 条带光密度与内参核糖蛋白条带光密度比值表示各目的基因 mRNA 相对表达水平。

## 1.6 透射电镜观察血管平滑肌细胞形态学改变

取正常 SD 大鼠胸主动脉 1 cm, 3% 戊二醛固定液固定后, 常规透射电镜样本处理及透射电镜观察。取培养于 100 mL 培养瓶中至第 4 代的 VSMC, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 在倒置显微镜下观察到细胞变圆, 倒去胰酶, 用血清终止消化, PBS 洗细胞 2 次, 加 10 mL PBS 吹打制成细胞悬液, 移至离心管中, 用 1.5~2.0 kr/min 离心 15 min, 弃上清, 用吸管沿管壁缓慢加入 0.5% 戊二醛, 4℃静置 30 min, 用 12 kr/min 离心 15 min, 弃上清, 用吸管沿管壁缓慢加入 3% 戊二醛固定液固定后, 常规透射电镜样本处理及透射电镜观察。

## 1.7 统计学分析

数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 ANOVA 进行统计学分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 体外传代培养对 α 肌动蛋白表达的影响

酶消化的 VSMC 4 天后贴壁, 原代 VSMC 的 α 肌动蛋白免疫组织化学染色显著且广泛, 呈强阳性表现, 其 PP 与 SI 乘积均值为  $8.88 \pm 2.635$ 。培养至第 4 代时 α 肌动蛋白染色显著变浅、稀疏(图 1), PP 与 SI 乘积均值为  $7.04 \pm 1.136$ , 与原代细胞免疫组织化学染色结果差异显著(P < 0.05; 表 1)。

表 1. 原代与第 4 代血管平滑肌细胞 α 肌动蛋白免疫组织化学染色阳性细胞与着色强度的积分比较( $\bar{x} \pm s$ , n = 5)

	原代 VSMC	第 4 代 VSMC
PP	$3.56 \pm 0.65$	$3.40 \pm 0.50$
SI	$2.48 \pm 0.51$	$2.08 \pm 0.28^a$
PP 与 SI 乘积	$8.88 \pm 2.63$	$7.04 \pm 1.13^a$

a 为 P < 0.05, 与原代平滑肌细胞比较。

## 2.2 体外传代培养对肌动蛋白 22α、基质 γ-羧基谷氨酸蛋白和骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

正常 VSMC 收缩表型标志分子 SM22α 高表达, 合成表型标志分子 OPN 微量表达, MGP 有少量表达, 体外培养至四代时 SM22α 表达减少, 而 MGP 表达增加, OPN 表达显著增加(表 2 和图 2)。

表 2. 体外传代培养至第 4 代时对 SM22α、基质 γ-羧基谷氨酸蛋白和骨桥蛋白 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 5)

基 因	原代 VSMC	第 4 代 VSMC
SM22α	$1.076 \pm 0.065$	$0.993 \pm 0.066$
MGP	$0.663 \pm 0.050$	$1.206 \pm 0.120^a$
OPN	$0.106 \pm 0.015$	$1.023 \pm 0.140^b$

a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与原代 VSMC 比较。



图 1. 体外传代至第 4 代时 α 肌动蛋白表达的改变 (× 100)

左为原代平滑肌细胞, 右为第 4 代平滑肌细胞。

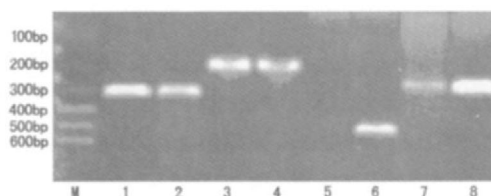


图 2. 体外传代培养对血管平滑肌细胞 SM22α、基质 γ-羧基谷氨酸蛋白和骨桥蛋白 mRNA 的影响

M 为 Marker, 1 为原始细胞 SM22α, 2 为第 4 代细胞 SM22α, 3 为原始细胞内参照核糖体蛋白, 4 为第 4 代细胞内参照核糖体蛋白, 5 为原始细胞 OPN, 6 为第 4 代细胞 OPN, 7 为原始细胞 MGP, 8 为第 4 代细胞 MGP。

## 2.3 体外培养对血管平滑肌细胞超微结构的影响

透射电镜结果显示, 未经培养传代的 VSMC 胞体中的主要组份为肌丝, 胞核小, 染色质致密, 可见密斑。体外传代培养至第 4 代时, VSMC 细胞中线粒体、粗面内质网和高尔基复合体明显增多, 肌丝显著减少, 胞核大, 染色质疏松(图 3)。

# 3 讨论

在动脉粥样硬化发生、发展的不同阶段, VSMC 表型的转换具有重要的、且可能是不同的病理生理



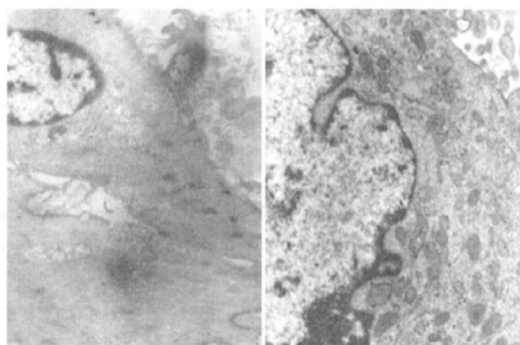


图 3. 体外培养对血管平滑肌细胞超微结构的影响 左为原代血管平滑肌细胞( $\times 6000$ ), B 为体外培养至第 4 代的血管平滑肌细胞( $\times 7500$ )。

学意义。在粥样斑块发育的过程中,增殖的 VSMC 是斑块进展、管腔狭窄的重要机制;有报道称合成表型的 VSMC 具有更高的低密度脂蛋白摄取率和更低的高密度脂蛋白结合率<sup>[68]</sup>,这可能有助于泡沫细胞的形成。而对于斑块表面形成稳定的纤维帽,避免斑块破裂、降低急性事件的发生,VSMC 的增殖和分泌功能则又可能具有重要的保护效应,事实上,血管壁损伤的最主要修复机制须依赖 VSMC 的增殖和基质分泌。Shanahan 等<sup>[11]</sup>曾报道,在斑块弥漫性发育的 VSMC 中,收缩表型的一个重要标志分子 SM22 $\alpha$  基本不表达,而已形成纤维帽的 VSMC 中,SM22 $\alpha$  高表达,如同中膜的平滑肌细胞。很显然,在粥样斑块发育的过程中,VSMC 可出现不同的表型转换。VSMC 的表型转换是一个渐进的过程,虽然整体上人们将 VSMC 分为收缩表型和合成表型,但这两种表型代表的仅是 VSMC 表型的两个极端,大量过渡状态的中间类型可共存于同一血管壁内。且 VSMC 的表型转换涉及到细胞的形态、结构、功能、组份及基因表达谱等许多改变,许多表型标志性分子并不具有唯一性,它们可同时在收缩表型和合成表型的 VSMC 中显著表达<sup>[9]</sup>。因此,VSMC 的表型认定对于动脉粥样硬化的研究具有重要的基础意义,而不同表型代表性标志指标的选择就成为表型认定的关键前提。

本实验中我们选择了以下表型代表性标志指标: 电镜形态观察。电镜下,典型的收缩表型和合成表型的 VSMC 应具有明显的形态、结构区别。前者核小、染色质致密,胞质富含收缩蛋白、肌丝,而内质网、高尔基复合体等合成、分泌性细胞器较少。后者则核大、染色质疏松,少肌丝,但却富含合成、分泌性细胞器<sup>[10,11]</sup>。本实验的原代和第 4 代传代培养的 VSMC 恰好具有了典型的收缩表型和合成表型的形

态学特征。④平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白。肌动蛋白是一典型的收缩蛋白,通常被用作收缩表型的标志<sup>[12]</sup>。本研究中,原代 VSMC 的  $\alpha$  肌动蛋白免疫组织化学染色着色明显且广泛,呈强阳性表现,而第 4 代传代培养的 VSMC  $\alpha$  肌动蛋白免疫组织化学染色显著变浅、稀疏,两者差异明显。该结果与电镜观察到的肌丝分布完全一致。⑤SM22 $\alpha$ 。SM22 $\alpha$  是一个 22 kDa 的细胞骨架蛋白,其功能还涉及 VSMC 的收缩调节<sup>[9]</sup>。对 SM22 $\alpha$  缺陷小鼠的分析表明,该蛋白并不是发育所必须,但在成年动物的 VSMC 中却有丰富的表达。SM22 $\alpha$  的缺陷还可造成粥样斑块的发育,SM22 $\alpha$  被认为是收缩表型的标志物之一<sup>[13]</sup>。本研究中,原代和第 4 代 VSMC SM22 $\alpha$  的表达出现差异,随体外传代培养,SM22 $\alpha$  的表达下调。⑥OPN。OPN 是一种分泌型的酸性磷蛋白,与骨形成、吸收、钙调节有关。但也与某些肿瘤发生、VSMC 的移行、增殖及钙化相关。被认为是合成表型的标志物之一<sup>[14,15]</sup>。本研究中,原代和第 4 代 VSMC OPN 的表达出现非常显著的差异,原代 VSMC 不表达 OPN,而第 4 代 VSMC 出现 OPN 的高表达。⑦MGP。基质糖蛋白的表达是合成表型的标志,MGP 的高表达可能与 As 发展过程中粥样斑块的钙化相关<sup>[16]</sup>。本研究中,原代和第 4 代 VSMC MGP 的表达亦出现非常显著的差异,第 4 代 VSMC MGP 的表达约为原代 VSMC 的两倍。

本研究中,VSMC 在体外培养至第 4 代时表型已发生显著变化。原代 VSMC 为典型的收缩表型,电镜下胞质中肌丝分布广泛而均匀,并可见到 VSMC 典型的结构—密斑,核致密,合成、分泌性细胞器少,且主要集中在核两端;体外培养至第 4 代时,无论电镜或  $\alpha$  肌动蛋白免疫组织化学染色都显示,VSMC 胞质中肌丝、收缩蛋白明显减少,而线粒体、内质网、高尔基复合体等合成、分泌性细胞器明显增多;基质、分泌蛋白 MGP 和 OPN 表达上调。上述结果提示,短时间的体外传代培养,即可使 VSMC 从收缩表型转化为合成表型,表明 VSMC 是一种很容易去分化,并出现形态、结构、基因表达谱改变的细胞。由于多数体外 VSMC 的研究取其 2~5 代传代细胞,因此,在结果解释应考虑表型转换对 VSMC 形态、结构、基因表达谱的影响。

本实验选择的 5 种表型标志指标在原代和第 4 代 VSMC 中的区分效能显示,电镜形态观察、 $\alpha$  肌动蛋白、OPN 在两种表型中重叠很小,而 MGP、SM22 $\alpha$  在两种表型中的表达虽有差异,但重叠较大。因此,若需对 VSMC 的表型作鉴定,我们以为电镜形态观

察、 $\alpha$ 肌动蛋白、OPN 可作为三种代表性指标。它既包含了对两种表型的总体外观检测,也分别包含了收缩表型和合成表型的典型分子标志物;区分度好,且三项指标的检测都不难,能为一般实验室所完成。

总之,VSMC 是一种很容易去分化的细胞,体外培养至第 4 代,即可从典型的收缩表型转化为合成表型。而对表型的鉴定,三项简便易行的表型标志指标,电镜形态观察、 $\alpha$ 肌动蛋白和 OPN 即可有效地对其进行区分。

#### [参考文献]

- [1] Shanahan CM, Weissberg PL. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (3): 333-338.
- [2] Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (6): 1 248-258.
- [3] Owens G, Kumar M, Wamhoff B. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, **84** (3): 767-801.
- [4] Fukuda Noboru, Hu WY, Satoh Chikara, et al. Contribution of synthetic phenotype on the enhanced angiotensin II generating system in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1999, **17** (8): 1 099-107.
- [5] Hu WY, Fukuda Noboru, Kanmatsuse Katsuo. Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2002, **20** (7): 1 323-333.
- [6] Thyberg J. Caveolae and cholesterol distribution in vascular smooth muscle cells of different phenotypes [J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, **50** (2): 185-195.
- [7] 袁中华, 杨永宗, 杨小毅, 等. 氧化低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞凋亡的泡沫化[J]. *中国病理生理杂志*, 2000, **16** (10): 986-987.
- [8] Dusserre E, Bourdillon MC, Pulcini T, et al. Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1212** (2): 235-244.
- [9] Rensen SS, Doevendans PA, Van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity [J]. *Netherlands Heart J*, 2007, **15** (3): 100-108.
- [10] Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, et al. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells [J]. *Arteriosclerosis*, 1990, **10** (6): 966-990.
- [11] 李玉光, 许端敏, 闫纯英, 等. 雷帕霉素对球囊损伤后血管平滑肌细胞表型及内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 414-416.
- [12] Engelse MA, Lardenoye JH, Neele JM, et al. Adenoviral activin a expression prevents intimal hyperplasia in human and murine blood vessels by maintaining the contractile smooth muscle cell phenotype [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (10): 1 128-134.
- [13] Susanne F, Franz H, Robert F. SM22[alpha] modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (7): 863-865.
- [14] Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, et al. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury [J]. *Clin Invest*, 2000, **106** (9): 1 139-147.
- [15] 李琦, 温进坤, 韩梅. 反义 c-jun 表达质粒对血管平滑肌细胞表型转化标志的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 6-9.
- [16] Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1993, **73** (1): 193-204.

(此文编辑 陈临溪, 文玉珊)