



徐清波, 浙江大学特聘教授, 英国伦敦大学讲座教授; 主要从事干细胞与血管病的研究, 其领导的研究小组在国际上最早发现血管壁干/祖细胞的存在; 共发表SCI论文300多篇, 被SCI杂志引用约21 000次, H-index为90; 担任ATVB等多个知名国际杂志主编或编委。

干细胞在血管重塑中的作用

陈开 徐清波*

(浙江大学医学院, 浙江大学附属第一医院心内科, 杭州 310003)

摘要 血管壁和周围脂肪组织的干细胞被认为在血管发育和疾病进展中起着关键作用。越来越多的证据表明, 血管干细胞参与动脉硬化和血管损伤的修复, 在血管重塑中起着关键作用, 并且其参与血管重塑的比例很可能是由血管损伤严重程度决定的。该文通过对国内外血管干细胞研究进行历史回顾, 总结了干细胞参与血管重塑过程的最新研究进展, 重点结合最新相关研究成果, 希望能理清在这一系列血管疾病中干细胞发挥的重要作用, 为将来干细胞的研究方向提出一些建设性意见。

关键词 血管干细胞; 血管重塑; 动脉粥样硬化; 血管移植

Roles of Stem Cells in Vascular Remodeling

CHEN Kai, XU Qingbo*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Abstract Stem/progenitor cells in the vessel wall and surrounding adipose tissue are important in vascular development and disease progression. Accumulating evidences show that these cells are involved in the repair of vascular injury and the process of vascular remodeling. It is likely that the proportion of their participation in vascular remodeling is determined by the severity of vascular injury. This article reviews the history of vascular stem cell research, and summarizes the latest progress of its involvement in the process of vascular remodeling. Furthermore,

收稿日期: 2021-01-24 接受日期: 2021-03-18

国家自然科学基金(批准号: 82030008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87236889, E-mail: qinbo_xu@zju.edu.cn

Received: January 24, 2021 Accepted: March 18, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82030008)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87236889, E-mail: qinbo_xu@zju.edu.cn

the relevant research results of current research were focused, aiming to clarify the different roles of stem cells in vascular diseases and put forward some constructive suggestions for future research directions.

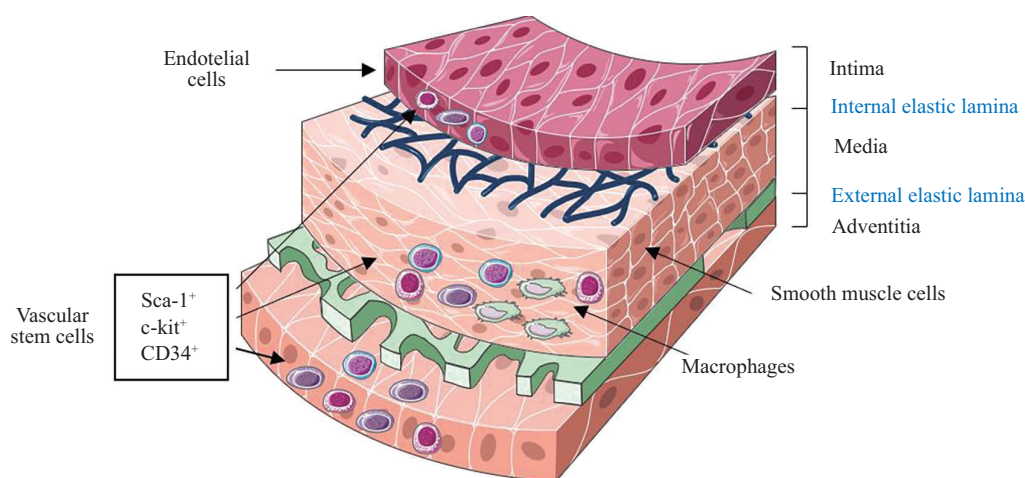
Keywords vascular stem cells; vascular remodeling; atherosclerosis; vascular transplantation

血管壁和周围脂肪组织被认为在血管发育和血管疾病进展中起着关键作用。最近的研究表明,血管壁和脂肪组织存在着丰富的干/祖细胞(stem/progenitor cells, SPCs),这些SPCs具有增殖和分化为特定终末细胞的能力^[1]。越来越多的证据表明,血管干细胞在血管重塑中起着关键作用^[2-3]。成人血管壁SPCs在正常情况下是静止的,一旦在病理状态下被特定分子(如细胞因子)激活,就会分化为如平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)和内皮细胞(endothelial cells, ECs)等细胞,同时向管腔侧迁移促进内膜增生。此外,血管周围SPCs还可以通过其他途径调节血管疾病,包括但不限于旁分泌效应、基质蛋白调节和微血管形成等。血管SPCs由于具有分化为血管细胞和再生血管结构的能力,也被认为具有治疗潜力。本文重点结合最新的相关研究成果,并通过对国内外血管干细胞领域的研究进行历史回顾,希望能为将来干细胞领域的研究提出一些方向性的建议。

1 血管干细胞研究的历史回顾

2001年, ALESSANDRI等^[4]通过对11~12周龄人类胚胎主动脉环的体外培养发现了外层新生

毛细血管样结构,同时从这些血管丛中分离出了CD34⁺/CD31⁻细胞并证实其具有分化为ECs的能力。紧接着在2003年, TINTUT等^[5]也在动脉壁上观察到一群类似于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)并在体外具有多种分化潜能的细胞。同年, MAJAKA等^[6]分离了存在于成人骨骼肌中的血管干细胞,之后将其植入血管并使其分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞。这一系列研究都提示了血管壁自身可能存在常驻的多功能干细胞。2004年,徐清波课题组^[7]首次提供了血管前体细胞存在于成人血管壁外膜层的证据,并阐述了CD34分子、干细胞抗原-1(stem cell antigen-1, Sca-1)、血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2, 又称Flk1)和c-kit蛋白作为其表面标记的重要作用,其中外膜Sca-1⁺细胞能够在体内分化为平滑肌细胞,并参与新生内膜的形成。在接下来的十余年中,这一研究发现被大量国内外的实验室证实(图1)^[3,8-10],例如,在人类大隐静脉中, CAMPAGNOLO等^[11]观察到CD34⁺细胞分布在外膜血管周围,显示出克隆性和多向分化能力。同样, INGRAM等^[12]证明,位于脐静脉和主动脉血管内膜的内皮干细胞可以促进内皮细胞的形成,并且在人



在血管内外三层结构中均可以发现干细胞表达Sca-1、c-kit以及CD34等标志物,部分干细胞甚至表达不止一种标志物。

Stem cells expressed Sca-1, c-kit, CD34 and other markers in three layers of blood vessel, and some stem cells even expressed more than one marker.

图1 干细胞在血管壁上的分布

Fig.1 The presence of resident stem/progenitor cells in the vessel wall

静脉曲张大隐静脉内表面也可检测到MSCs, 这些细胞在体外可分化为软骨细胞、脂肪细胞和成骨细胞。除此以外, PASQUIELLI等^[13]和SAINZ等^[14]分别证实了人胸主动脉内MSCs的存在, 并在血管中层分离出了一组具有Sca-1⁺/c-kit^{-low}/LIN⁻/CD34^{-low}特征的干细胞, 其可以分化为内皮和平滑肌细胞, 也可以形成血管样分支结构。ZENGIN等^[15]也发现, CD34⁺/CD31⁻内皮干细胞存在于成人血管中膜与外膜之间的区域, 具有向成熟内皮细胞、造血细胞和巨噬细胞分化的能力。TORSNEY等^[16]则在动脉粥样硬化的新生内膜和外膜中发现了表达Sca-1、CD34和c-kit标记物的前体细胞, 并认为这些细胞可能是形成动脉粥样硬化病变的平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞的来源。值得一提的是, 原始的血管迷路起源于与造血干细胞同源的內皮干细胞, 而后原始內皮丛通过血管发芽、修剪和重塑逐渐扩张成高度组织化的血管网, 已有大量文献关注在发育过程中参与血管生成的重要血管干细胞^[17-19]。由于本篇文献的重点在于分析血管干细胞与血管重塑之间的关系, 对于发育部分相关的血管干细胞没有进行深入分析, 我们主要介绍成人血管中富含的原位驻留干细胞, 希望能从血管疾病相关角度帮助大家理清思路。

1.1 血管內皮干细胞

血管干细胞可大致分为血管內皮干细胞、血管平滑肌干细胞、血管间充质干细胞、血管髓系干细胞等。早在2004年, YODER等^[12]就利用单细胞沉积测定法证明了人脐静脉內皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)和人主动脉內皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC)中有高克隆性和增殖潜能的內皮干细胞(endothelial progenitor cell, EPCs), 并在后续进行了大量的深入工作验证了这一发现^[12,20-21]。同样, 2012年HISAMICHI等^[22]通过Hoechst方法也成功分离出了成熟血管內壁上的具有集落形成能力的EPCs, 虽然这类细胞在稳定状态下会休眠, 但当被移植到缺血性病变中时会产生大量ECs并重新构成长期存活的新生血管。除了提取EPCs并研究其分化能力以外, 研究者们也将谱系示踪技术大量运用到了EPCs亚群研究中。例如, 很多关于c-kit细胞的示踪研究已证实了这一干细胞标志物在EPCs上的表达, 这类细胞能在体外扩增成为大量的子代內皮细胞并参与新生血管的形成过程^[8]。

另外, PATEL等^[9]通过钙黏蛋白5(Cadherin 5, Cdh5)和SRY-box转录因子18(SRY-box transcription factor 18, Sox18)示踪小鼠证实了CD31⁻/Flk1^{lo}內皮细胞群的分化潜力, 并阐明了Sox18/SoxF对其分化的调控作用。在基础领域将EPCs独立于其他ECs进行功能探索和机制研究, 可以帮助临床医生更好地认识內皮干细胞在各类血管疾病中的作用, 也为临床治疗提供了新的靶点。

1.2 血管间充质干细胞

MSCs是一组从脐带、骨髓和脂肪组织中分离出来的, 具有组织特异性并可以分化成包括成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞在内的多能干细胞^[23]。在治疗血管疾病领域, 理解MSCs分化的机制是近年来研究的热门, 迁移、动员和归巢这类细胞具有潜在的临床应用价值。

位于脂肪组织中的MSCs不仅因为其易于分离和含量相对丰富的特性, 也因为其与血管壁干细胞之间的密切关系而一直是血管领域研究热点, 故阐明其与其他组织来源的MSCs的性质差异十分重要。从分化角度来说, 在2008年TANG等^[24]就已证实脂肪来源的MSCs表达Sca-1与CD34, 并且可分化为白色脂肪组织。同样, PLANAT-BENARD等^[25]从人体皮下脂肪组织中分离出来特殊亚型(CD34⁺/CD13⁺与CD45⁻/CD14⁻/CD144⁻/CD31⁻)的MSCs, 并证明其在体外可以分化为脂肪细胞或ECs。上述研究表明, CD34⁺脂肪MSCs具有很强的分化能力, 但也有研究表明其可维持干性长达20周^[24], 这就意味着虽然细胞培养提供了一个很好的研究方法, 但是研究脂肪MSCs的分化、迁移和增殖更需要模拟它们在体内的生物学环境。例如, JOE等^[26]就用细胞分选器从基质血管中筛选并纯化出Sca-1⁺/CD34⁺且带有绿色荧光标记的细胞, 同时将其包埋在凝胶里移植到野生型小鼠体内, 最终使其分化为携带GFP的成熟脂肪细胞。同时, OLEA等^[27]更进一步在兔后肢严重缺血模型中注入同种异体腹部脂肪来源的干细胞, 从而增加了小动脉密度, 减少了缺血诱导的肌肉病变, 这显示出了血管MSCs的保护作用。除此以外, MIRANVILLE等^[28]也报道了CD34⁺CD31⁻间质血管分型细胞可以分化为內皮细胞表达CD31等。这些体内MSCs的应用实验说明了其可通过分化各类血管细胞而参与到血管重塑的相关进程中。

在血管周围, 除了上文提到的脂肪细胞外, 周

细胞也是另一类作为MSCs内源性来源的重要前体细胞。与脂肪细胞类似,从不同组织分离培养的周细胞也可以分化为多种细胞类型,包括成骨、成软骨和脂肪细胞系^[29]。此外,周细胞也能产生滤泡树突状细胞^[30]和骨骼肌细胞^[31]。值得一提的是,2017年,GUIMARAES-CAMBOA等^[32]使用诱导型T-box蛋白18(T-box protein 18, Tbx18)谱系示踪技术永久标记了多个器官的周细胞和血管平滑肌细胞,但研究结果表明这些标记的周细胞仍然是周细胞,并不像干细胞那样分化成其他细胞系,这一结果挑战了目前认为周细胞是组织驻留的MSCs的观点。对于这些不一致的发现,有几种可能的解释。第一,该研究中观察到的谱系追踪结果的差异可能是因为构成(platelet-derived growth factor receptor-Cre, PDGFR-Cre)的并非以往实验中用到的 β -Cre示踪动物,同时PDGFR可在多个细胞系中表达,其启动子不适合追踪周细胞的后代;第二,移植细胞的分化潜能可能会受到体外操作的影响,因此可能不等同于真正的体内追踪研究^[33]。相比之下,EVANS等^[34]的TBX18-CreERT2谱系追踪标记^[32]是可诱导的,因此Cre活性更易受控制。除此之外,谱系示踪周细胞若依赖于单个标记物,则血管周围细胞(如周细胞或成纤维细胞)之间的区分就会较为困难,我们相信随着改进后的遗传谱系追踪技术和单细胞测序的出现,人们对周细胞来源的血管干细胞的理解将会更全面更深入。

1.3 心脏中的血管干细胞

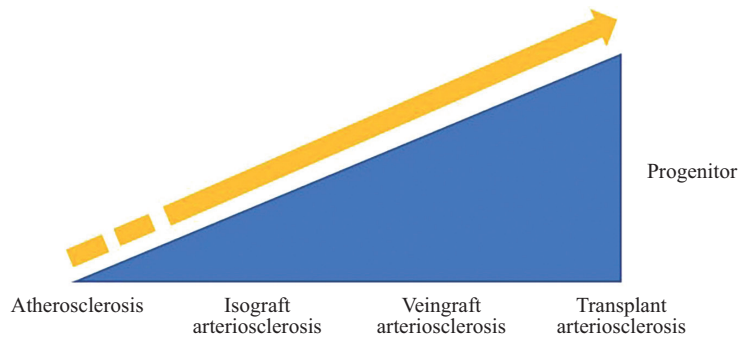
众所周知,2018年哈佛大学ANVERSA等的撤稿事件在干细胞领域引发了一场地震。早在2003年,该团队^[35]从成年大鼠心脏中提取出一类以c-kit为标志物的具有多向分化潜能的细胞群,并证明其能分化为心肌细胞。紧接着在2007年,该团队^[36]从人成体心脏分同样分离出了c-kit干细胞,并证明其具有改善小鼠心梗后左室功能的作用。但在此后的十余年中,很多实验室对这一结果提出了质疑。例如,有研究团队就指出,c-kit心脏干细胞本质为肥大细胞,并且其自我更新速度极慢,更重要的是研究人员通过谱系示踪技术发现,c-kit心肌干细胞无论在生理状态下还是在病理进程中都很难向成熟心肌细胞分化^[37]。尤其在2018年,周斌团队^[38]通过更为精准的遗传谱系示踪技术,利用双同源重组技术同时标记心肌细胞和所有非心肌细胞进一步验证了这一论点。

尽管ANVERSA等的撤稿问题对心血管系统干细胞研究领域产生了负面效应,且骨髓细胞或成体心脏原位干细胞分化再生心肌的理论也已被否定,但将血管干细胞应用于心肌修复领域仍有着巨大的潜力。不同部位的血管细胞具有来源差异。例如,在发育过程中体节起源的细胞迁移到背主动脉,并在中膜形成内皮和平滑肌^[39],而冠状血管则来自于心外膜祖细胞^[40-41]。我们完全可以假设,血管壁中的一些细胞在成年后保持其干细胞性质并且有能力分化为其他类型的成熟细胞,如心肌细胞。最近的一项研究显示,血管干细胞具有分化为心肌细胞的潜力,MEKALA等^[42]确认Flk1⁺CD34⁺Sca-1⁻CD44⁻主动脉外膜细胞在没有任何遗传操作的情况下是自发搏动心肌细胞的细胞来源,该团队同时证明这些细胞确实存在于人类血管的外膜中。在小鼠模型中,该群体被激活增殖并分化获得心肌细胞表型,这在既往研究证明外膜相当一部分Flk1⁺CD34⁺细胞在体外具有向CD31⁺内皮细胞和巨噬细胞分化的能力的基础上加深了我们对于心脏中干细胞的理解,同时进一步的功能测试显示,血管干细胞来源的心肌细胞对 β 肾上腺素能刺激有反应,这与成熟的心肌细胞相似,这些发现都提示血管壁中的干细胞具有向心肌细胞分化的潜能。

2 血管干细胞在血管重塑中的作用

2.1 干细胞在动脉硬化中的作用

血管重塑是在1989年由BAUMABCH和HEIS-TAD^[43]提出的,当时用于描述直径小于100 μ m的小动脉血管形态改变,而后引申到由于血管的舒缩改变、管腔内的血流分布及机体代谢差异所导致的与血管动力学、体液分布和内分泌因素相适应的血管结构适应性变化。在各类血管重塑中,血管干细胞在动脉硬化中的作用一直是血管疾病领域的研究热点,其主要包含了四类血管疾病:动脉粥样硬化、移植动脉硬化、血管成形术引起的再狭窄和静脉移植动脉硬化^[44-45]。在2011年,徐清波课题组^[2]总结了大量前期研究成果,并提出了一种假说:血管干细胞在这一系列动脉硬化疾病中发挥的作用是由血管损伤的严重程度决定的,即血管病变越严重干细胞发挥的作用越大,如移植动脉硬化,反之例如在自发的动脉粥样硬化这类慢性炎症疾病中则主要由平滑肌细胞起作用。目前关于动脉粥样硬化中SPCs的研究大部



血管损伤越严重,干细胞参与血管重塑的比例越高。而在动脉粥样硬化等由慢性炎症和脂质浸润导致的血管疾病中,则主要由平滑肌参与血管重塑。

The more severe the vascular injury, the higher the proportion of stem cells involved in vascular remodeling. In vascular diseases caused by chronic inflammation and lipid infiltration, such as atherosclerosis, smooth muscle mainly involves in vascular remodeling.

图2 血管干细胞参与各类血管硬化比例由血管损伤严重程度决定(假说)

Fig.2 The proportion of SPCs involved in arteriosclerosis is determined by the severity of vascular injury (hypothesis)

分佐证了这一假说^[2](图2)。

传统观点认为,动脉粥样硬化始动因素脂质和血流介导的内皮功能障碍或死亡共同启动了炎症反应,随后平滑肌细胞迁移和增殖,形成新的内膜病变^[46]。已有研究表明,动脉粥样硬化的重要诱导因素——高脂血症可导致外膜 SPCs 的生物学功能障碍,又考虑到这类细胞重要的内皮修复功能,明确其在粥样斑块形成过程中的角色十分重要^[47]。KOKKINOPOULOS等^[47]利用单细胞测序技术分析野生型和 *ApoE* 敲除小鼠原代外膜 *Sca-1*⁺ 细胞,发现 *Sca-1*⁺ 血管干细胞在高胆固醇水平可以表现出更高的迁移能力,但其向平滑肌和内皮细胞分化的能力减弱。最新的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, *LDLR*) 敲除小鼠体内研究也表明,在动脉粥样硬化过程中, *Sca-1*⁺ 干细胞很难向平滑肌细胞分化^[48]。此外,关于动脉粥样硬化中的炎症细胞,传统上认为单核细胞跨内皮层迁移是巨噬细胞的主要来源,但 PSALTIS 等^[49-50]最近的研究证明,造血干细胞存在于小鼠成年动脉的外膜,这构成了罕见的多谱系 SPCs 并阐述了动脉粥样硬化中巨噬细胞的另一重要来源。这一结果说明了外膜 *Sca-1*⁺ *CD45*⁺ 巨噬细胞前体细胞可以不来源于血液循环,也不来源于骨髓或脾脏,而血管壁内的 SPCs 可能是血管壁内巨噬细胞的直接来源,并参与动脉粥样硬化中泡沫细胞的构成。

除动脉粥样硬化外,移植物血管硬化则是另一种更为严重的血管硬化疾病。如对于心衰、肾衰终末期器官衰竭的患者来说,心脏移植或肾脏移植手术可以

成功延长他们的生存时间。然而,移植后动脉硬化加速,这些患者仍面临着移植失败和随后的器官功能障碍带来的巨大生命危险^[51]。这种动脉硬化主要由急性先天和获得性免疫反应引发,至今已有研究确定了各种类型的细胞,包括骨髓或血液中的平滑肌细胞(表1)、内皮细胞、成纤维细胞和血管壁上的 SPCs,在移植物的动脉硬化中起着关键作用^[52]。这些发现随后在不同的动物和疾病模型中得到了其他小组的证实^[53]。众所周知,同种异体移植物血管病由炎症加速引起,在供体片段移植到宿主体内后,供体 ECs 很快会受到受体免疫系统的损害。随后,由供体内皮细胞表达的 I/II 类巨噬细胞集落刺激因子导致 *CD4*⁺、*CD8*⁺ T 细胞向内皮细胞浸润,产生白细胞介素-2/4/6 (interleukin-2/4/6, IL-2/4/6)、肿瘤坏死因子- α 和干扰素- γ 等细胞因子后, T 细胞可以吸引其他免疫细胞,如单核细胞和 NK 细胞^[54]。在这些过程中,内皮细胞通过上调炎症分子如细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, *ICAM-1*)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, *VCAM-1*) 和 P-选择素的基因表达来促进 SPCs 的附着^[52]。更重要的是,在所有的血管壁上,炎性细胞产生大量的趋化因子,这些趋化因子负责吸引 SPCs。在移植动脉硬化小鼠模型中,由于与大量释放的干细胞因子的相互作用,病变内宿主 *CXCR4*⁺ SPCs 的数量增加。除此之外,传统观点认为在硬化血管中增生平滑肌细胞来源于供体中膜层。然而,徐清波课题组^[55]的研究发现,将供体胸主动脉移植到平滑肌细胞被荧光标记的转基因小鼠的颈总动脉时,在新生内膜中可以检测到标记细胞。同样 HAGENSEN 等^[56]使用双移植小鼠模型,也已经证明平

平滑肌细胞来自受者血管系统。紧接着,NI等^[53]更是进一步报道了移植血管新生内膜病变中有很大比例的平滑肌细胞来源于受体c-kit⁺细胞,并发现转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)不仅在同种异体移植后的血液和新生内膜中的表达水平显著升高,还依赖己糖激酶1的代谢重编程刺激c-kit⁺细胞分化为平滑肌细胞。结合前面提到的假说推测,血管壁干细胞在慢性血管硬化中可以分化为免疫细胞,但不易向平滑肌或内皮细胞方向分化,而在严重血管硬化中则会参与这些细胞的产生从而会影响其血管重塑过程,但这一结论仍缺乏更充足的证据。

2.2 干细胞在血管损伤的修复作用

血管干细胞在血管损伤中发挥了重要的修复作用,这群细胞参与了再内皮化和平滑肌增殖的相关过程,了解其基础机制可以帮助我们理解冠脉支

架植入后再狭窄等热点问题,对于临床医生尤其是介入医生有重要意义(表2)。

众所周知,内皮损伤和内皮细胞功能障碍/凋亡是血管损伤的初始步骤。在正常动脉中,如高血压等疾病产生的高剪切应力可上调血管细胞转录因子Kruppel样转录因子2/4(Kruppel-like factor 2/4, KLF2/4),减少葡萄糖摄取和糖酵解,增加内皮细胞VE-钙黏附素的表达,抑制6-磷酸果糖-2-激酶或果糖-2,6-二磷酸酶活性,这一系列反应保持了内皮细胞低增殖率、抗炎和抗血栓特性的表型。但当血管壁细胞面对氧化型低密度脂蛋白时,病变区KLF2的表达被抑制从而导致局部炎症反应和内皮细胞屏障功能丧失,缩短了病变区^[57-58]内皮细胞的寿命。这种内皮细胞转化被认为是内皮功能障碍和脂蛋白流入病变部位的原因。

表1 移植血管中平滑肌细胞和内皮细胞的来源比例(根据参考文献[32]修改)

Table 1 The origin proportion of smooth muscle cells and endothelial cells in grafted vessels (modified from the reference [32])

细胞-种属 Cells-species	骨髓移植 BM transfer	移植术 Graft	方法 Method	受体来源比例 Percentage of recipient source	供体来源比例 Percentage of donor source	骨髓来源比例 Percentage of bone marrow source
SMCs-mouse	BM chimera	Vein/auto	LacZ	40%	60%	None
SMCs-mouse	BM chimera	Carotid/iso	GFP	0	100%	0
SMCs-mouse	BM chimera	Aorta/allo	Y-probe	Majority	None	None
ECs-mouse	BM chimera	Vein/allo	Tie2/LacZ	About 95%	None	About 30%
ECs-mouse	BM chimera	Carotid/iso	GFP	0	100%	0
SMCs-rat	Sex-mismatch	Heart/allo	Y-PCR/SMA	>95%	None	None
ECs-rat	Sex-mismatch	Heart/allo	Y-PCR	About 100%	0	<5%
SMCs-human	Sex-mismatch	Heart/allo	Y-probe	<5%	NA	NA
ECs-human	Sex-mismatch	Heart/allo	Y-probe	NA	95%	NA

GFP: 绿色荧光蛋白; Y-probe: Y染色体特异探针; NA: 无法使用。

GFP: green fluorescent protein; Y-probe: Y-chromosome-specific probe; NA: not available.

表2 不同种类干细胞在血管重塑中分化的方向

Table 2 Differentiation direction of different kinds of stem cells in vascular remodeling

干细胞标志物 Stem cell marker	干细胞种属 Category	血管位置 Vessel location	分化方向 Differentiation direction
Sca-1 ⁺	EPCs/SMPCs/MSCs/MPCs	Intima/media/adventitia/ neointima/atherosclerotic lesion	ECs/SMCs/monocytes & macrophages
CD34 ⁺	EPCs/SMPCs/MPCs	Adventitia/neointima/atherosclerotic lesion	ECs/SMCs
Flk ⁺	EPCs	Intima/media/adventitia/ atherosclerotic lesion	ECs
c-kit ⁺	EPCs/SMPCs	Adventitia/neointima/atherosclerotic lesion	ECs/SMCs
Gli1 ⁺	MSCs	Adventitia	Osteoblast/fibroblast
CD45 ⁺	MPCs	Intima/media/adventitia	Monocytes & macrophages
CD44 ⁺	MSCs	Media/adventitia	Adipocyte/myogenic cells
Nestin ⁺	MSCs	Adventitia	Pericytes/SMCs

而对于血管干细胞来说,血管损伤后的再内皮化无疑是更为重要的参与过程,再内皮化是血管为了维持内皮对血管壁的保护作用而产生的适应性生理反应,这一过程不仅需要剩余正常内皮细胞的增殖和迁移,而且更为重要的可能是血管壁SPCs与骨髓干细胞的动员。虽然先前的研究已经证明,在病理条件下循环中的内皮细胞和内皮干细胞有数量增加的趋势^[1],但有大量实验已经证实,来自血管壁SPCs的内皮细胞在血管重建方面更有效。例如,在上文已经提及ZENGIN等^[15]和CAM-PAGNOLO等^[11]成功地从人体血管中提取了原位的血管干细胞,将这些细胞注射到经基因修复的小鼠缺血肢体中后,观察到新生血管以及改善了的血液供应。也有研究证明,通过类似于诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)的基因操作技术将不同转录因子转导到血管平滑肌或成纤维细胞,使其去分化成为干细胞状态,而后定向培养可使这些细胞分化为具有内皮表面标志和生理功能的内皮细胞^[59-60]。与此同时,另一项研究发现血管壁和血管损伤后血液循环中瘦素水平上调,并通过瘦素受体依赖途径改变了Sca-1⁺细胞迁移能力从而影响了新生内膜的形成^[61]。除此以外,TOLEDO-FLORES等^[62]也发现外膜Sca-1⁺细胞具有显著的血管生成潜能,BRAS等^[63]更进一步证明了Sca-1⁺血管干细胞可以在体外分化为内皮细胞,也可通过ETV2导入体内并分化为内皮细胞。他们发现Sca-1⁺外膜细胞进入体内后血管内皮钙黏附分子(vascular endothelial cadherin)、Flk1和TIE2等早期内皮标志物水平均显著升高,同时可以通过DNA修饰酶和易位双加氧酶触发SMCs相关基因的下调。有趣的是,股动脉机械损伤后将Sca-1⁺细胞移植到其外膜,内膜增生较未移植的对照动脉明显增加,但在ETV2转导并接种Sca-1⁺细胞后动脉内膜增生减少^[63]。因此,操控血管干细胞的基因谱可能是将来临床医生修复内皮损伤尤其是促进其再内皮化的重要途径。

血管损伤后新生内膜中血管平滑肌的大量增生则是终末期的一个重要进程,传统观点认为这些细胞大多起源于血管内成熟平滑肌的表型转化,即从收缩表型转变为合成表型,然后迁移到损伤区域,最终导致新生内膜形成^[64]。然而后来的研究表明,血管SPCs也可能在这一过程中发挥作用。例

如,BENTZON等^[65]提出,局部血管壁是血管平滑肌的主要来源。HU等^[7]证明,移植的新生血管子宫内 膜病变中的平滑肌细胞不是来自骨髓,而是来自位于血管壁的宿主细胞。IWAKA等^[66]证明,骨髓细胞不分化为血管平滑肌细胞,只参与血管损伤后的炎症反应。除此之外,最近研究表明在机械损伤导致内膜增生的自然过程中,只有极少量的c-kit⁺SPCs分化为内皮细胞或平滑肌细胞,绝大多数c-kit⁺SPCs转化为参与血管重塑的炎性细胞,通过抑制剂ACK2减少c-kit⁺SPCs可减轻血管损伤后的炎症和内膜增生^[67]。TANG等^[68]最近进行了细胞基因图谱和单细胞测序分析,发现在严重的血管损伤后,动脉壁外膜中的Sca-1⁺干细胞迁移到内侧形成新生平滑肌细胞,继而比先前存在的平滑肌更有效地扩张。同时,他们使用双重组酶进行遗传谱系追踪,发现Sca-1⁺/PDGFRA⁺干细胞亚群形成平滑肌细胞,而Sca-1⁺细胞中的基因消融或YAPI基因的明显敲除显著损害了动脉的修复^[68]。这些数据提供了真正的Sca-1⁺细胞群产生平滑肌细胞的遗传学研究证据,并描述了它们在血管修复中的关键作用。

在SPCs参与血管修复机制方面,IV型胶原,整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 以及PDGF1受体都被证实参与调节血管干细胞分化^[69]。此外,细胞因子样蛋白DKK3(Dickkopf3)在调节血管干细胞分化中起着至关重要的作用。DKK3作为一种分泌型糖蛋白,在内皮细胞和平滑肌细胞中高表达,参与部分触发的多能干细胞^[70-71]的分化。已有研究证实,DKK3可以减少动脉粥样硬化的发生^[72],缺乏DKK3会导致动脉粥样硬化斑块更易破裂^[71]。WANG等^[73]也证实,DKK3可以通过启动ATF6和增强myocardin的表达来诱导SPCs分化为平滑肌细胞。此外,DKK3可以通过激活TGF/ATF6和Wnt信号通路诱导Sca-1⁺SPCs分化为SMCs。在人工血管领域DKK3也被应用于血管支架的成纤维细胞转分化,DKK3通过VEGF/miR-125a-5p/STAT3途径有效地诱导成纤维细胞直接转分化为血管内皮细胞^[74],并使其能够聚集形成与生理血管内皮相似的单细胞层,具有很好的临床应用前景。

2.3 脂肪因子通过血管干细胞影响血管重塑

MSCs等血管干细胞可通过旁分泌多种脂肪因子参与到血管重塑的进程中。例如,WONG等^[75]已证明,Sca-1⁺干细胞在西罗莫司的刺激下具有更强的迁移能力,并认为其参与了动脉粥样硬化的相关进

程。如上文已提及, XIE等^[61]发现瘦素可以通过其受体刺激Sca-1⁺干细胞迁移。他们阐明在经瘦素处理后, Sca-1⁺SPCs中CXCR5的基因表达上调, 揭示了其在瘦素诱发的信号级联反应中的预期功能, 同时证明相关通路瘦素受体STAT3-Rac1/Cdc42-ERK-FAK信号轴被激活并影响Sca-1⁺血管干细胞迁移行为, 这一研究成果为多种血管疾病提供了新的潜在治疗靶点。既往研究已经表明, 瘦素受体具有六种不同的同工型, 所有同工型均具有胞外瘦素结构域, 但其中只有瘦素受体B保留了全长细胞内结构域以进行信号转导^[76]。在机制方面, 瘦素受体与相关配体结合后可激活JAK(Janus kinase)/STAT(signal transducer and activator of transcription)^[77]、AMPK[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase]^[78]、PI3K(phosphoinositide-3-kinase)-Akt和MAPK^[79]途径, 并且在早期也可诱导STAT3、ERK1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2)和MEK1/2级联反应。同时, 瘦素受体或STAT3或ERK1/2的抑制导致体外细胞迁移减少。此外, 有研究也在瘦素敲除细胞中观察到ERK的晚期启动, 表明其他一些独立于瘦蛋白受体的上游信号级联也可能参与其中。

3 结语与展望

综上所述, 血管干细胞研究的最新进展证明了其对血管重塑包括动脉硬化和新生内膜形成的影响, 它们甚至可以分化为心肌细胞。同时这类细胞也会被脂肪因子等影响进而促进后续细胞迁移、分化和增殖的进程。这些研究成果可能为血管疾病, 特别是新生内膜/斑块相关动脉硬化的发病机制提供新的见解, 并且具有广阔的治疗应用前景。

然而, 在其中仍有不少问题有待未来的研究者们解决。第一, 需要找到特定的生物标志物以用于识别血管SPCs, 也需明确在发育过程中, 如Sca1⁺、CD34⁺或c-kit⁺等不同种类的SPCs是否为同一来源, 以及在成年后是否发生变化。第二, 尽管大量数据表明来源于非骨髓组织的SPCs在体内新生内膜增生和内皮再生模型中都起着关键作用, 但这些细胞的确切来源仍不清楚, 不同的器官/组织, 如血管壁、肝脏、心脏、肺和脾脏, 都显示含有SPCs。因此, 在研究SPCs在血管重塑过程中的作用时需要排除各种来源的干细胞干扰, 这是一大难点。在今后的研究中, 应区分不同来源或来自不同组织的SPCs, 如

果能够成功培养出组织特异性SPCs并将其应用于动物体上, 对于临床干细胞治疗领域会有重要意义。此外, 我们需要对SPCs在新生内膜病变中对ECs修复和SMCs聚集的确切作用进行深入分析并定量调查。最后, 目前有关血管干细胞的数据主要来源于动物模型。人和小鼠在血管结构和病理条件上有很大的不同。目前还不清楚在小鼠模型中观察到的结果是否可以转化并应用于人类疾病。要解决这些问题, 还需要进一步探索。我们相信, 通过采用这些新技术, 在不久的将来, 血管干细胞的研究将取得重大进展, 并为该领域的研究提供基础信息。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG L, ISSA BHALOO S, CHEN T, et al. Role of resident stem cells in vessel formation and arteriosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 122(11): 1608-24.
- [2] CAMPAGNOLO P, WONG M M, XU Q. Progenitor cells in arteriosclerosis: good or bad guys [J]? *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(4): 1013-27.
- [3] TANG Z, WANG A, YUAN F, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 875.
- [4] ALESSANDRI G, GIRELLI M, TACCAGNI G, et al. Human vasculogenesis *ex vivo*: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors [J]. *Lab Invest*, 2001, 81(6): 875-85.
- [5] TINTUT Y, ALFONSO Z, SAINI T, et al. Multilineage potential of cells from the artery wall [J]. *Circulation*, 2003, 108(20): 2505-10.
- [6] MAJKA S M, JACKSON K A, KIENSTRA K A, et al. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(1): 71-9.
- [7] HU Y, ZHANG Z, TORSNEY E, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(9): 1258-65.
- [8] FANG S, WEI J, PENTINMIKKO N, et al. Generation of functional blood vessels from a single c-kit⁺ adult vascular endothelial stem cell [J]. *PLoS Biol*, 2012, 10(10): e1001407.
- [9] PATEL J, SEPPANEN E J, RODERO M P, et al. Functional definition of progenitors versus mature endothelial cells reveals key SoxF-dependent differentiation process [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 786-805.
- [10] GREEN L, OFSTEIN R H, RAPP B, et al. Adult venous endothelium is a niche for highly proliferative and vasculogenic endothelial colony-forming cells [J]. *J Vasc Surg*, 2017, 66(6): 1854-63.
- [11] CAMPAGNOLO P, CESSELLI D, AL HAJ ZEN A, et al. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential [J]. *Circulation*, 2010, 121(15): 1735-45.
- [12] INGRAM D A, MEAD L E, MOORE D B, et al. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain

- a complete hierarchy of endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2783-6.
- [13] PASQUINELLI G, TAZZARI P L, VASELLI C, et al. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1627-34.
 - [14] SAINZ J, AL HAJ ZEN A, CALIGIURI G, et al. Isolation of "side population" progenitor cells from healthy arteries of adult mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2): 281-6.
 - [15] ZENGIN E, CHALAJOUR F, GEHLING U M, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis [J]. *Development*, 2006, 133(8): 1543-51.
 - [16] TORSNEY E, MANDAL K, HALLIDAY A, et al. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191(2): 259-64.
 - [17] DING B S, NOLAN D J, BUTLER J M, et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration [J]. *Nature*, 2010, 468(7321): 310-5.
 - [18] CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-6.
 - [19] SABIN F R. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, 11(1): 5-7.
 - [20] YODER M C. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells [J]? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(6): 1094-103.
 - [21] YODER M C. Endothelial stem and progenitor cells (stem cells): (2017 Grover Conference Series) [J]. *Pulm Circ*, 2018, 8(1): 2045893217743950.
 - [22] NAITO H, KIDOYA H, SAKIMOTO S, et al. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels [J]. *EMBO J*, 2012, 31(4): 842-55.
 - [23] ABEDIN M, TINTUT Y, DEMER L L. Mesenchymal stem cells and the artery wall [J]. *Circ Res*, 2004, 95(7): 671-6.
 - [24] TANG W, ZEVE D, SUH J M, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature [J]. *Science*, 2008, 322(5901): 583-6.
 - [25] PLANAT-BENARD V, SILVESTRE J S, COUSIN B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives [J]. *Circulation*, 2004, 109(5): 656-63.
 - [26] JOE A W, YI L, EVEN Y, et al. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10): 2563-70.
 - [27] OLEA F D, LOCATELLI P, HNATIUK A, et al. Vascular endothelial growth factor overexpression does not enhance adipose stromal cell-induced protection on muscle damage in critical limb ischemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 184-8.
 - [28] MIRANVILLE A, HEESCHEN C, SENGES C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells [J]. *Circulation*, 2004, 110(3): 349-55.
 - [29] CRISAN M, CORSELLI M, CHEN W C, et al. Perivascular cells for regenerative medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(12): 2851-60.
 - [30] KRAUTLER N J, KANA V, KRANICH J, et al. Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors [J]. *Cell*, 2012, 150(1): 194-206.
 - [31] DELLAVALLE A, SAMPAOLESI M, TONLORENZI R, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3): 255-67.
 - [32] GUIMARAES-CAMBOA N, CATTANEO P, SUN Y, et al. Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells *in vivo* [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 345-59.e5.
 - [33] CANO E, GEBALA V, GERHARDT H. Pericytes or mesenchymal stem cells: is that the question [J]? *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 296-7.
 - [34] GUIMARAES-CAMBOA N, EVANS S M. Are perivascular adipocyte progenitors mural cells or adventitial fibroblasts [J]? *Cell Stem Cell*, 2017, 20(5): 587-9.
 - [35] BELTRAMI A P, BARLUCCHI L, TORELLA D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration [J]. *Cell*, 2003, 114(6): 763-76.
 - [36] BEARZI C, ROTA M, HOSODA T, et al. Human cardiac stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(35): 14068-73.
 - [37] POULY J, BRUNEVAL P, MANDET C, et al. Cardiac stem cells in the real world [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(3): 673-8.
 - [38] LI Y, HE L, HUANG X, et al. Genetic lineage tracing of non-myocyte population by dual recombinases [J]. *Circulation*, 2018, 138(8): 793-805.
 - [39] POUGET C, GAUTIER R, TEILLET M A, et al. Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk [J]. *Development*, 2006, 133(6): 1013-22.
 - [40] OLIVEY H E, SVENSSON E C. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis [J]. *Circ Res*, 2010, 106(5): 818-32.
 - [41] ZHOU B, MA Q, RAJAGOPAL S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart [J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 109-13.
 - [42] MEKALA S R, WORDSDORFER P, BAUER J, et al. Generation of cardiomyocytes from vascular adventitia-resident stem cells [J]. *Circ Res*, 2018, 123(6): 686-99.
 - [43] FARACI F M, CHOI J, BAUMBACH G L, et al. Microcirculation of the area postrema. Permeability and vascular responses [J]. *Circ Res*, 1989, 65(2): 417-25.
 - [44] STARY H C, CHANDLER A B, DINSMORE R E, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15(9): 1512-31.
 - [45] STARY H C, CHANDLER A B, DINSMORE R E, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association [J]. *Circulation*, 1995, 92(5): 1355-74.
 - [46] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-26.
 - [47] KOKKINOPOULOS I, WONG M M, POTTER C M F, et al. Adventitial SCA-1⁺ progenitor cell gene sequencing reveals the mechanisms of cell migration in response to hyperlipidemia [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 9(2): 681-96.
 - [48] WANG H, ZHAO H, ZHU H, et al. Sca1⁺ cells minimally con-

- tribute to smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2021, 128(1): 133-5.
- [49] PSALTIS P J, HARBUZARIU A, DELACROIX S, et al. Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta [J]. *Circulation*, 2012, 125(4): 592-603.
- [50] PSALTIS P J, PURANIK A S, SPOON D B, et al. Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature [J]. *Circ Res*, 2014, 115(3): 364-75.
- [51] POBER J S, JANE-WIT D, QIN L, et al. Interacting mechanisms in the pathogenesis of cardiac allograft vasculopathy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(8): 1609-14.
- [52] XU Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis [J]. *Circ Res*, 2008, 102(9): 1011-24.
- [53] NI Z, DENG J, POTTER C M F, et al. Recipient c-Kit lineage cells repopulate smooth muscle cells of transplant arteriosclerosis in mouse models [J]. *Circ Res*, 2019, 125(2): 223-41.
- [54] PIGHI M, GRATTA A, MARIN F, et al. Cardiac allograft vasculopathy: pathogenesis, diagnosis and therapy [J]. *Transplant Rev*, 2020, 34(4): 100569.
- [55] HU Y, DAVISON F, LUDEWIG B, et al. Smooth muscle cells in transplant atherosclerotic lesions are originated from recipients, but not bone marrow progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, 106(14): 1834-9.
- [56] HAGENSEN M K, SHIM J, FALK E, et al. Flanking recipient vasculature, not circulating progenitor cells, contributes to endothelium and smooth muscle in murine allograft vasculopathy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4): 808-13.
- [57] KUMAR S, KIM C W, SIMMONS R D, et al. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10): 2206-16.
- [58] JAIN M K, SANGWUNG P, HAMIK A. Regulation of an inflammatory disease: Kruppel-like factors and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(3): 499-508.
- [59] KARAMARITI E, MARGARITI A, WINKLER B, et al. Smooth muscle cells differentiated from reprogrammed embryonic lung fibroblasts through DKK3 signaling are potent for tissue engineering of vascular grafts [J]. *Circ Res*, 2013, 112(11): 1433-43.
- [60] MARGARITI A, WINKLER B, KARAMARITI E, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(34): 13793-8.
- [61] XIE Y, POTTER C M F, LE BRAS A, et al. Leptin induces Sca-1⁺ progenitor cell migration enhancing neointimal lesions in vessel-injury mouse models [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2114-27.
- [62] TOLEDO-FLORES D, WILLIAMSON A, SCHWARZ N, et al. Vasculogenic properties of adventitial Sca-1⁺CD45⁺ progenitor cells in mice: a potential source of vasa vasorum in atherosclerosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7286.
- [63] BRAS A L, YU B, ISSA BHALOO S, et al. Adventitial Sca1⁺ cells transduced with ETV2 are committed to the endothelial fate and improve vascular remodeling after injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(1): 232-44.
- [64] ROSS R, GLOMSET J, HARKER L. Response to injury and atherogenesis [J]. *Am J Pathol*, 1977, 86(3): 675-84.
- [65] BENTZON J F, SONDERGAARD C S, KASSEM M, et al. Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Circulation*, 2007, 116(18): 2053-61.
- [66] IWATA H, MANABE I, FUJII K, et al. Bone marrow-derived cells contribute to vascular inflammation but do not differentiate into smooth muscle cell lineages [J]. *Circulation*, 2010, 122(20): 2048-57.
- [67] CHEN Q, YANG M, WU H, et al. Genetic lineage tracing analysis of c-kit⁺ stem/progenitor cells revealed a contribution to vascular injury-induced neointimal lesions [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 277-86.
- [68] TANG J, WANG H, HUANG X, et al. Arterial Sca1⁺ vascular stem cells generate *de novo* smooth muscle for artery repair and regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 81-96.e4.
- [69] XIAO Q, WANG G, LUO Z, et al. The mechanism of stem cell differentiation into smooth muscle cells [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(3): 440-8.
- [70] CHENG W L, YANG Y, ZHANG X J, et al. Dickkopf-3 ablation attenuates the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(2): e004690.
- [71] KARAMARITI E, ZHAI C, YU B, et al. DKK3 (Dickkopf 3) alters atherosclerotic plaque phenotype involving vascular progenitor and fibroblast differentiation into smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(2): 425-37.
- [72] YU B, KIECHL S, QI D, et al. A cytokine-like protein Dickkopf-related protein 3 is atheroprotective [J]. *Circulation*, 2017, 136(11): 1022-36.
- [73] WANG X, KARAMARITI E, SIMPSON R, et al. Dickkopf homolog 3 induces stem cell differentiation into smooth muscle lineage via ATF6 signalling [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(32): 19844-52.
- [74] CHEN T, KARAMARITI E, HONG X, et al. DKK3 (Dickkopf-3) transdifferentiates fibroblasts into functional endothelial cells—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(4): 765-73.
- [75] WONG M M, WINKLER B, KARAMARITI E, et al. Sirolimus stimulates vascular stem/progenitor cell migration and differentiation into smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase/beta-catenin signaling pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(10): 2397-406.
- [76] FRIEDMAN J M, HALAAS J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals [J]. *Nature*, 1998, 395(6704): 763-70.
- [77] ZABEAU L, LAVENS D, PEELMAN F, et al. The ins and outs of leptin receptor activation [J]. *FEBS Lett*, 2003, 546(1): 45-50.
- [78] MINOKOSHI Y, KIM Y B, PERONI O D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase [J]. *Nature*, 2002, 415(6869): 339-43.
- [79] FRUHBECK G. Intracellular signalling pathways activated by leptin [J]. *Biochem J*, 2006, 393(Pt 1): 7-20.