

胚胎干细胞 SM22 α -EGFP 表达克隆的建立及平滑肌细胞体外发育的动态观察*

韩雅玲^{1)**} 徐 凯¹⁾ 康 建¹⁾ 闫承慧¹⁾ 田孝祥¹⁾ 李少华²⁾

(¹⁾沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110016;

²⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA)

摘要 为探讨血管发育早期血管平滑肌细胞 (VSMCs) 募集和增殖特点, 构建了含有 SM22 α 启动子序列和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 编码序列的质粒, 建立了平滑肌特异性蛋白 SM22 α 启动子控制下稳定表达 EGFP 的胚胎干细胞株 (ESCs), 以研究 VSMCs 的发育特点. 实验发现, 起源于 SM22 α -EGFP ESCs 形成的胚胎小体 (EBs) 在第 11 天开启 SM22 α 启动子并表达 EGFP. 此后 EGFP 阳性细胞持续增加, 在第 30 天达到高峰. VSMCs 多起源于 EBs 中细胞密集处, 应用免疫荧光染色及 RT-PCR 观察到 EGFP 阳性细胞表达多种平滑肌特异性标志物. 在贴壁培养的胚胎小体中 VSMCs 形态可分为纺锤形及上皮样的多角形, 慢速视频显微摄像测得纺锤形细胞迁移速度较上皮形细胞快. 以上结果表明, SM22 α -EGFP ESCs 分化形成的 EBs 可以模拟体内早期胚胎血管形成过程, 从形态学上获得 VSMCs 募集分化的证据.

关键词 平滑肌细胞, 胚胎干细胞, 分化, 迁移

学科分类号 Q254

动脉粥样硬化、再狭窄及高血压等心血管疾病的重要特点之一是血管平滑肌细胞 (VSMCs) 的异常生长及增殖^[1,2]. 在各种损伤性刺激的作用下, VSMCs 可以去分化, 由静止的收缩表型向增殖能力明显加强的合成表型转换^[3]. 然而, 目前对 VSMCs 特异分化及终末分化诱因的研究非常有限^[4], 原因之一是缺乏一种合适的 VSMCs 发育模型. 由于在体内无法获得发育早期的 VSMCs, 胚胎干细胞 (ESCs) 在体外可以自发地分化成胚胎小体 (EBs) 并可以模拟胚胎血管形成的过程^[5], 因此 ESCs 为早期 VSMCs 的谱系形成、分化及成熟机制研究提供了一种有价值的体外模型^[6,7]. 本实验通过构建平滑肌特异性蛋白 SM22 α 启动子控制下的稳定表达增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 表达载体, 转染 ESCs 株并建立平滑肌体外发育 EBs 模型, 来探讨血管发育早期 VSMCs 募集和分化的变化规律, 为进一步阐明血管成熟、血管重塑及动脉血管生成机制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

小鼠 ESC 细胞株 R1(ATCC, SCRC-1011TM)培

养于丝裂霉素 (10 mg/L, 2 h) 处理后的滋养层细胞 STO (小鼠成纤维细胞株, ATCC, CRL-1503TM)上. 细胞培养液成分包括: MEM (Hyclone 公司)、15% ESC 血清(Gibco 公司)、0.1 mmol/L 非必需氨基酸 (Sigma 公司)、0.1 mmol/L β 巯基乙醇(Sigma 公司)、1 mmol/L 丙酮酸钠(Sigma 公司)、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 1 000 U/ml 白血病抑制因子(LIF; Chemicon 公司). ESCs 在生长到亚融合状态时行传代, 每天换液以维持其未分化状态.

1.2 载体构建

541 bp 的 VSMCs 特异性 SM22 α 启动子序列^[8]由以下引物经 PCR 法获得, 正向: ttgcatagtgc-tggttg, 反向: tacaaggcttggtcgttg. 将该片段插入到 T 载体中 (Promega 公司, T-easy vector) 构成 PTSM 载体, 再经 SAC-1 及 APA-1 双酶切后, 亚克隆至无启动子的 EGFP 载体(PEGFP-1, Clontec 公司)中构成 PSME GFP 载体.

*国家自然科学基金资助项目(30370526).

** 通讯联系人. Tel: 024-23056123, Fax: 024-23911006

E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

收稿日期: 2005-11-01, 接受日期: 2005-12-28

1.3 ESCs 转染

用电穿孔法将线性化后的载体 PSMEGFP (条件为细胞池体积 0.8 ml, 电压 330 V, 电容 250 μ F) 转染到 2.5×10^7 个 ESC R1 细胞, 电击时间为 6.7 s. 将转染后的 ESCs(SM22 α -EGFP) 在含 G418 250 mg/L 的选择性培养液中培养和筛选. 将扩增后 10 天的转基因 ESCs 于解剖显微镜下用 Pasteur 枪头挑取 1.5~2 mm 的细胞克隆行扩增培养.

1.4 基因组 PCR 鉴定

应用 Taq PCR 试剂盒 (Takara) 行基因组 DNA PCR 分析. 所扩增片段为 PEGFP-1 载体中 EGFP 的 cDNA 序列. 引物: 正向, GTAAACGGCCACAA-GTTCAGCG, 反向, GATGCCGTTCTTCTGCTT-GTCG. 退火温度为 59 $^{\circ}$ C, 行 35 个循环. 420 bp 反应产物用 1.2% 琼脂糖电泳鉴定.

1.5 ESCs 分化及 EBs 模型的建立

EBs 的制备参考文献[6,9]. ESCs 细胞培养至亚融合状态, 用 0.25% 胰酶及 0.53 mmol/L EDTA 消化后, 铺于明胶包被的培养皿中, 3 h 后大部分 STO 细胞已贴壁. 将未贴壁的 ESCs 稀释后接种于细菌培养皿中, 培养液除无 LIF 外与 ESCs 培养液相同. 悬浮培养后 6 天, 将 EBs 接种于 0.1% 明胶包被的培养皿中贴壁培养, 每天换液.

1.6 免疫细胞化学染色

固定的 EBs 经 0.05 mol/L TBS 洗涤后, 在含 0.25% Triton X-100 和 0.5 mol/L NH_4Cl 的 TBS 中通透 20 min. 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后, 与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜. 抗小鼠抗体包括 SM α -actin (1:100, Sigma 公司)、Flk-1 (1:100, BD 公司)、Caspase-3 (1:200, Santa Cruze 公司) 及 SMMHC (1:200, Neomarkers 公司). 阴性对照未加一抗. 二抗为四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 或 FITC 标记抗体. 在 Olympus IX-70 荧光倒置显微镜或 Olympus FV-500 激光扫描共焦显微镜下观察记录.

1.7 RT-PCR

参照说明书用 Trizol (GIBCO) 提取不同时间点 EBs 中的 RNA. 取 1 μ g RNA 进行半定量 RT-PCR. 引物分别为: Pecam-1(CD31), 正向, TGATGAA-TGGGCAGCAACTGAC, 反向, TTGGCAGCGA-AACACTAACACG (27 个循环); SM22 α , 正向, TCCAGTCCACAAACGACCAAGC, 反向, GAA-TTGAGCCACCTGTTCCATCTG (25 个循环); myocardin, 正向, CAGTGAAGCAGCAAATGAC-TCG, 反向, TCCCAAGGAGATTCCGTGAAG

(34 个循环); EGFP 引物序列如上文所述 (27 个循环); GAPDH, 正向, TCTTCACCACCATGGA-GAAGG, 反向, GTTGTGATGGATGACCTTGG-CC (30 个循环).

1.8 慢速显微摄像技术 (time-lapse)

将 EBs 接种于 35 mm 培养皿中, 置 5% CO_2 , 37 $^{\circ}$ C 恒温小室, 在配有自动摄像装置 (CoolSNAPfx) 的倒置相差显微镜 (Olympus IX-70) 下观察细胞移行, 每隔 10 min 作序列摄影 (Image-Pro Plus 5.1), 连续拍摄 39 张, 共 6.5 h. 迁移速率采用图像分析软件 (Image-Pro Plus 5.1) 示踪程序对累积移行距离及速率实施分析测定.

2 结 果

2.1 SM22 α 启动子载体构建及阳性 ESCs 克隆筛选

以小鼠 STO 细胞 DNA 为模板扩增得到 541 bp 特异性目的基因片段, 与预期片段大小一致. 为验证插入序列正确, 分别对 PTSM 和 PSME GFP 两种质粒行 *Eco*R I 和 *Sma* I 酶切鉴定, 酶解产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析证实片段大小与理论计算相符合 (图 1).

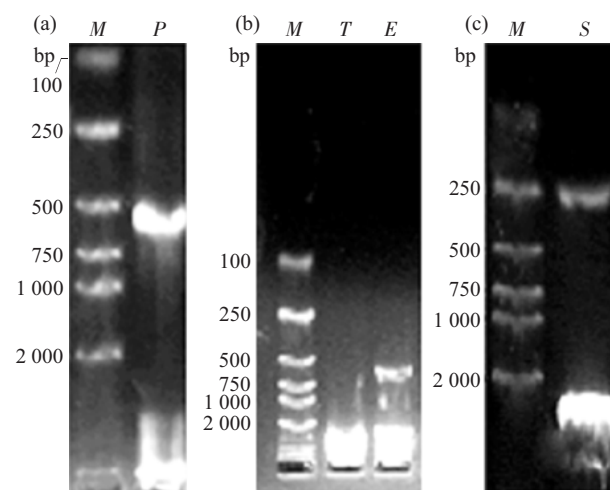


Fig. 1 Analysis of PCR-amplified DNA and restriction enzyme-digested DNA by agarose gel electrophoresis

(a) PCR products of SM22 α promoter (541bp). (b) Identification of plasmid PTSM by *Eco*R I (561 bp). (c) Identification of plasmid PSME GFP by *Sma* I (261 bp). M: DNA marker; P: PCR products; T: Plasmid PTSM without *Eco*R I; E: Plasmid PTSM digested by *Eco*R I; S: Plasmid PSME GFP digested by *Sma* I.

用电穿孔法将线性载体转染至 ESCs, 随后对转染 ESCs 实施筛选, 转染后第 6 天可见 G418 耐药性克隆. 共扩增 24 株 ESCs 细胞克隆, 有 4 株经

基因组 PCR 证实为阳性. 以下实验结果均来自 1 号克隆, 为 4 株阳性克隆之一(图 2).

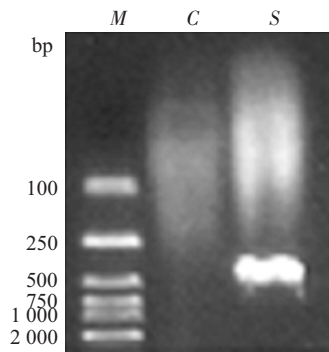


Fig. 2 Analysis of the transgene integration into genomic DNA of clone number 1 by PCR
M: DNA marker; *C*: Control (wild type ESC R1); *S*: SM22α-EGFP expressing ESCs.

2.2 EBs 模型的建立及形态特征

R1 细胞在 STO 细胞上呈团生长, 细胞致密, 边界不清. EBs 从第 3 天开始形成, 此后体积逐渐增大. 在第 6 天可见 EBs 中心部分透光性逐渐减弱, 呈黑色坏死区, Caspase-3 免疫荧光染色可见中心有大量凋亡细胞. 第 6 天 EBs 贴壁后可向四周分化延伸出各种形态细胞, 免疫荧光染色证实有 VSMCs 形成 (图 3).

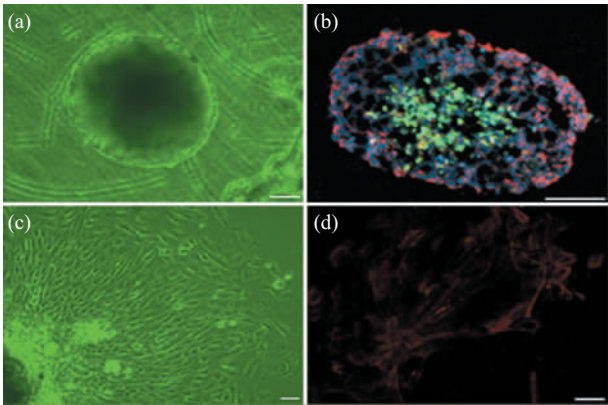


Fig. 3 Establishment of EB model
(a) EB at day 6 under transmission light. (b) Immunofluorescent staining of EB at day 6. Green showed caspase-3, red showed F-actin, blue showed nuclear. (c) Cellular outgrowth developed from the central aggregate of plated EB under transmission light. (d) Immunofluorescent staining of SM-α-actin in cellular outgrowth of EB. Bar, 50 μm.

2.3 ESCs 细胞分化过程中 VSMCs 特异性 EGFP 的表达时相

为分析 VSMCs 分化表达 SM22α-EGFP 时间变

化特征, 观察不同时间点 EBs 分化细胞中 EGFP 的表达. 发现 EBs 在第 6+5 天 (悬浮培养 6 天后贴壁培养 5 天) 细胞表达荧光, EGFP 阳性细胞随培养时间延长逐渐增多, 在第 6+24 天 (悬浮培养 6 天后贴壁培养 24 天) 达到高峰. EGFP 表达主要定位于细胞浆内 (图 4).

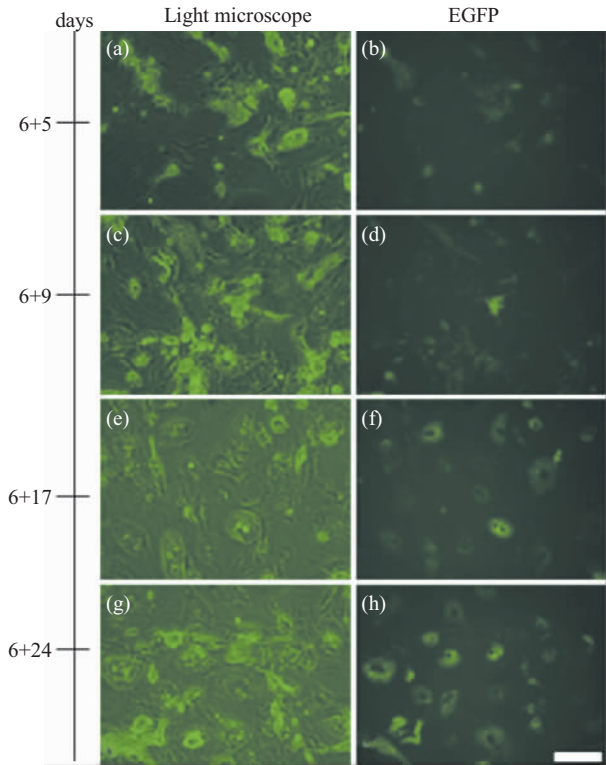


Fig. 4 The time course of smooth muscle-specific EGFP expression driven by the SM22α promoter in differentiating ESCs
(a),(c),(e),(g): Cells in outgrowth of EBs under transmission light. (b), (d),(f),(h): The same cells under fluorescence. Bar, 50 μm.

2.4 EBs 分化后分子标志物的表达

为了进一步验证 EGFP 阳性细胞系 VSMCs, 选取第 6+17 天 EGFP 阳性的 EBs. 免疫荧光染色证实 EGFP 阳性细胞 SM α-actin 及 SMMHC 染色均为阳性, 表明 SM22α-EGFP 转染 ESCs 细胞中报告基因表达具有平滑肌特异性 (图 5).

对不同时间点 ESCs 分化形成的 EBs 实施 RT-PCR 分析, 随时间的延长, EGFP 及平滑肌特异性标志物表达水平逐渐增加, 同时观察到内皮细胞特异性标志蛋白 CD31 伴有相同的表达时相, 提示在 EBs 分化过程中有内皮细胞形成. 在野生型 ESCs 分化形成的 EBs 中亦观察到 VSMCs 分化伴有内皮细胞生成 (图 6).

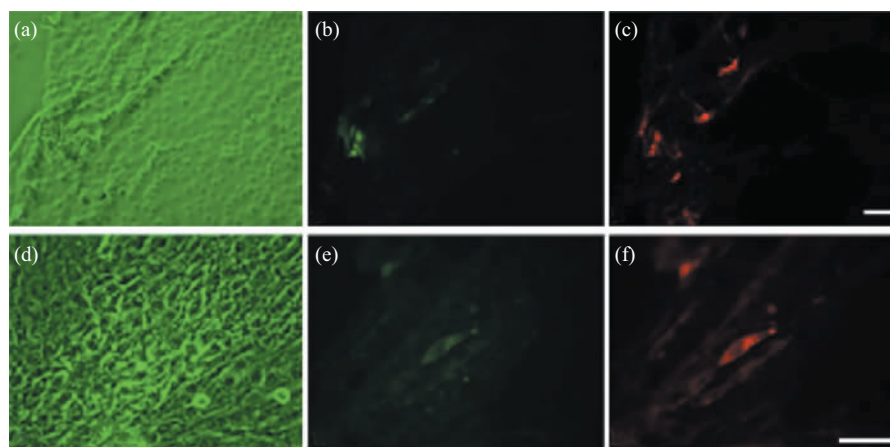


Fig. 5 Immunohistochemistry corroborated the smooth muscle nature of SM22 α -EGFP expressing EBs

Expression of EGFP in SM22 α -EGFP positive cells of day 6+17 ((a),(d): Light; (b),(e): EGFP fluorescence) was confirmed by staining with anti-SM- α -actin, SMMHC, and secondary RHODAMIN-conjugated antibody ((c),(f), red). (a),(b),(c), were the same cells, so were (d),(e),(f). Bar, 100 μ m.

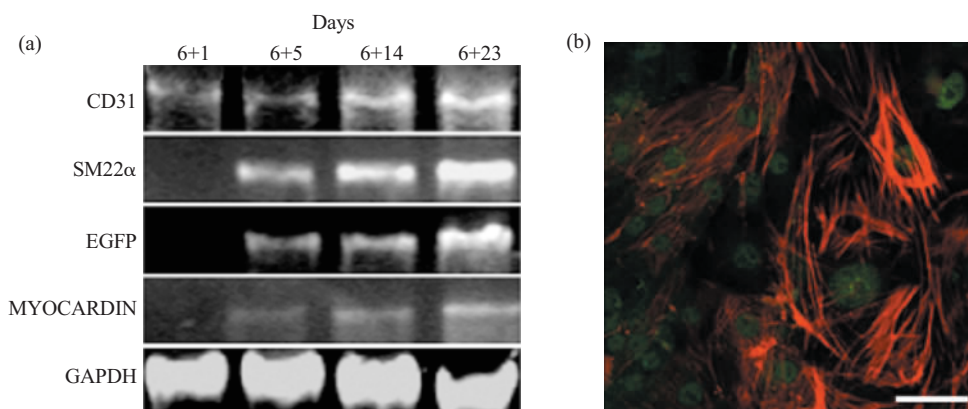


Fig. 6 Analysis of differentiation markers of VSMC and endothelial cell

(a) RT-PCR performed on total RNA extracted from EBs revealed that expressions of SM22 α and EGFP were simultaneously seen at late developmental stages. Expression of additional VSMC-selective marker, myocardin was also detected in the EBs. Endothelial specific CD31 were seen earlier than VSMC-specific EGFP. (b) Co-staining of endothelial-specific Flk-1 (green) and SM- α -actin (red) in cellular outgrowth from wildtype-ESC-derived EB at day 6+17. Bar, 50 μ m.

2.5 VSMCs 异质性

采用本模型可以观察到 VSMCs 形态呈多样性. 大致可分为两类: a. 纺锤形, 散在分布于 EBs 的延伸细胞中; b. 上皮样多角形细胞, 成群出现, 主要位于细胞密度最大的 EBs 中心部位 (图 7). 此外, 两种细胞的迁移速率不同, 前者移行伴有明显的细胞收缩变形, 后者相对维持原有细胞形态 (图 8). 纺锤形细胞的迁移速率较上皮样多角形细胞的速率快 (图 9). 形态和迁移速率的差异提示可能存在两种表型 VSMCs.

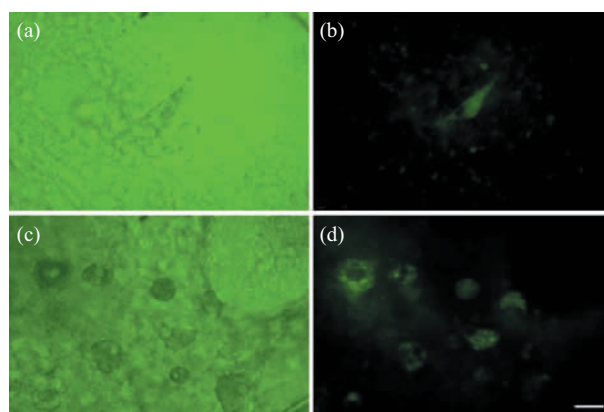


Fig. 7 Photomicrographs show morphological aspects of the different categories of VSMC cells in plating EBs

(a),(b): Spindle-shaped cells. (c),(d): Epithelioid polygonal cells. Bar, 25 μ m.

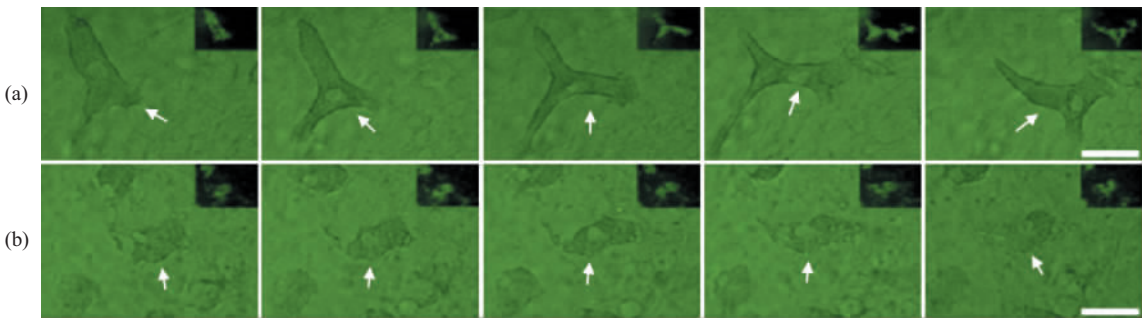


Fig. 8 Timelapse Phase contrast microscope (PCM) images of Spindle-shaped cells ((a) , arrows) and epithelioid polygonal cells ((b) , arrows) taken in 4 h with 1 h interval time
The same cells under fluorescence were shown at topright part of images. Bar, 50 μm.

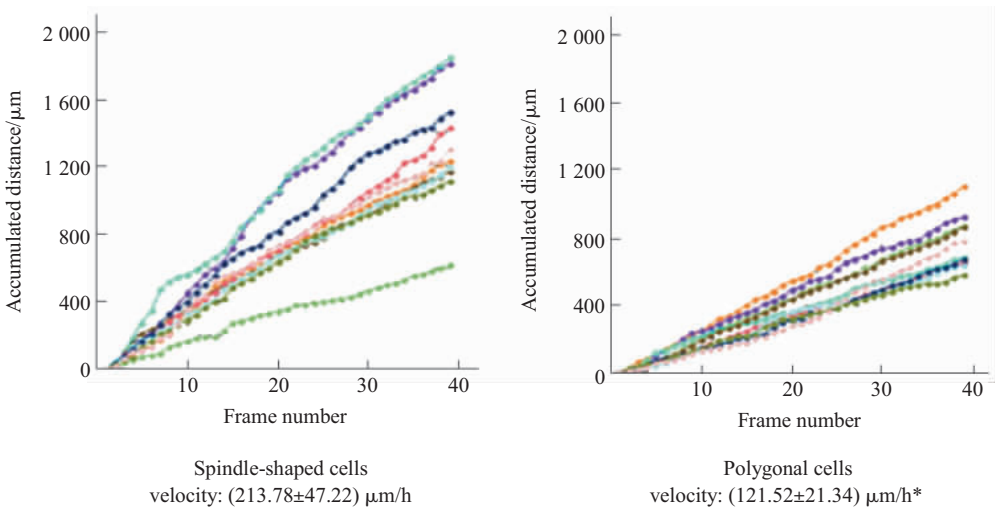


Fig. 9 Migration velocities of two different phenotype of cells
Ten cells are observed in each group. The x axe is photoes' sequence number. The migration velocity is equal to accumulated distance divided by time(6.5 h). *, Compared with spindle-shaped cells, $P<0.01$.

3 讨 论

在特殊的体外诱导培养条件下, ESCs 细胞可以定向分化为某种类型的细胞或组织. 关于 ESCs 的定向分化, 目前主要是从培养方式的改进、分化诱导因子的选择和针对不同的终末靶细胞等方面着手研究.

SM22α 启动子可在体内 VSMCs 中特异地被启动^[10]. 与肌动蛋白异构体不同^[11], SM22α 只在 VSMCs 中表达. 此外, 与钙调蛋白^[12]、肌动蛋白相关蛋白(metavinculin)^[13]及肌球蛋白重链^[14,15]不同之处是无剪接变异体. SM22α 的启动子序列较短, 更易克隆. 已有研究显示, 转录起始位点上游 441 bp 的 SM22α 启动子足以启动基因的表达^[8], 这一点

在本实验中得到了进一步证实.

本实验结果显示, 在 EBs 模型中 SM22α 启动子能启动 VSMCs 特异性 EGFP 表达, 进一步用免疫荧光染色及 RT-PCR 证实 EGFP 阳性细胞可以表达其他 VSMCs 特异性标志物, 证实这些细胞为 VSMCs, 而不是心肌或骨骼肌细胞. 先前的体内实验与本实验结果一致: SM22α 启动子只启动心血管系统 SMCs 报告基因的表达, 而内脏系统 SMCs 无报告基因表达, 提示 SM22α 控制下的报告基因具有心血管系统特异性^[16]. 获得整合有 SM22α-EGFP 序列的 ESCs 具有以下几个意义: a. 证明了 SM22α 启动子在 EBs 模型中的调控表达具有 VSMCs 特异性. 人 SM22α 启动子序列可以对骨

髓基质细胞分化而来的 SMCs 进行分选^[17]. b. 该模型可以容易地检测到 EBs 中每一个细胞中 SM22 α 启动子的活性, 而以前胚胎发育研究中沿用的报告基因多数是 lacZ (β - 半乳糖苷酶), 其分析过程较本法繁琐费时. c. SM22 α -EGFP ESC 克隆为筛选 VSMCs 分化所用诱导剂及抑制剂提供了一个较好的培养体系. d. 重组的 ESCs 可培育出 VSMCs 中有 EGFP 表达的小鼠, 用于针对 VSMCs 在各种病理条件下分化调节机制的研究.

利用整合有 SM22 α -EGFP 序列的 ESCs, 结合相关细胞因子协同的有序诱导, 能够建立一套高效诱导 ESCs 细胞分化为 VSMCs 的诱导培养体系. 先前研究^[6,7]表明, 在明胶包被的培养皿中贴壁生长的 EBs 经全反式维甲酸(atRA)及联丁酰基 cAMP (DBcAMP) 处理后, 中心细胞团中可以延伸生长出许多类型的细胞, 包括 SMCs, 它们零星地分布于 EBs 中, 偶尔成团生长, 这与本实验结果一致. 除全反式维甲酸及联丁酰基 cAMP 外, VEGF 也可以诱导 ESCs 向 SMCs 的分化^[18]. EBs 细胞经 VEGF 处理后形态学发生很大改变, CD31 阳性细胞群呈条索样排列, 并伴有 SM- α actin 表达. 然而上述研究并未阐明来源于 EBs 分化形成的 VSMCs 分化时程, 其原因之一是缺乏动态观察 VSMCs 标志物的方法. 本实验通过追踪 ESCs 分化过程中平滑肌特异性标志蛋白 SM22 α 的表达变化, 揭示了 ESCs 在体外分化逐渐演变为成熟 VSMCs 的过程. 新近文献^[19]报道, 小鼠胚胎血管生成始于 6.5 天, 第一根动脉形成约在 8.2 天, 与本实验观察到 SM22 α -EGFP 在第 6+5 天后的贴壁 EBs 中表达基本一致. 本实验还发现 EBs 模型中的 VSMCs 具有异质性, 两种 VSMCs 的形态及迁移速率均有所不同. 先前的研究显示, 体外培养的人 VSMCs 具有两种表型^[20]. 本模型中的两种不同形态细胞是否能代表成体 VSMCs 的增殖及迁移表型, 以及它们之间平滑肌特异性基因表达谱的差异, 还需进一步研究证实.

参 考 文 献

- Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115~126
- Schwartz S M, Campbell G R, Campbell J H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*, 1986, **58** (4): 427~444
- Owens G K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 1995, **75** (3): 487~517
- Kumar M S, Owens G K. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 737~747
- Feraud O, Vittet D. Murine embryonic stem cell *in vitro* differentiation: applications to the study of vascular development. *Histol Histopathol*, 2003, **18** (1): 191~199
- Sinha S, Hoofnagle M H, Kingston P A, *et al.* Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **287** (6): C1560~C1568
- Drab M, Haller H, Bychkov R, *et al.* From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model. *FASEB J*, 1997, **11** (11): 905~915
- Solway J, Seltzer J, Samaha F F, *et al.* Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem*, 1995, **270** (22): 13460~13469
- Li S, Harrison D, Carbonetto S, *et al.* Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*, 2002, **157** (7): 1279~1290
- Moessler H, Mericskay M, Li Z, *et al.* The SM 22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development*, 1996, **122** (8): 2415~2425
- Vandekerckhove J, Weber K. Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins. *Eur J Biochem*, 1981, **113** (3): 595~603
- Hayashi K, Yano H, Hashida T, *et al.* Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (24): 12122~12126
- Koteliansky V E, Ogryzko E P, Zhidkova N I, *et al.* An additional exon in the human vinculin gene specifically encodes meta-vinculin-specific difference peptide. Cross-species comparison reveals variable and conserved motifs in the meta-vinculin insert. *Eur J Biochem*, 1992, **204** (2): 767~772
- Babij P, Periasamy M. Myosin heavy chain isoform diversity in smooth muscle is produced by differential RNA processing. *J Mol Biol*, 1989, **210** (3): 673~679
- Nagai R, Kuro-o M, Babij P, *et al.* Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis. *J Biol Chem*, 1989, **264** (17): 9734~9737
- Li L, Miano J M, Mercer B, *et al.* Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1996, **132** (5): 849~859
- Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, *et al.* Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: *in vitro* differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*, 2003, **107** (16): 2078~2081
- Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, *et al.* VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn*, 2004, **230** (1): 23~33

19 Drake C J, Fleming P A. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*, 2000, **95** (5): 1671~1679

20 韩雅玲, 康 建, 张 剑, 等. 对去血清后 HITASY 细胞分子表达及

表型分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 868~873

Han Y L, Kang J, Zhang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 868~873

Establishment of Clones of SM22 α -EGFP Expressing Embryonic Stem Cells and *In vitro* Dynamic Tracing of Smooth Muscle Cells Development*

HAN Ya-Ling^{1)**}, XU Kai¹⁾, KANG Jian¹⁾, YAN Cheng-Hui¹⁾, TIAN Xiao-Xiang¹⁾, LI Shao-Hua²⁾

⁽¹⁾Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang, Institute of Cardiovascular Research of PLA, Shenyang 110016, China;

⁽²⁾Department of Pathology and Laboratory Medicine, Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854, USA)

Abstract A murine embryonic stem cell (ESC) line stably expressing the enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the transcriptional control of the smooth-muscle-specific SM22 α promoter to further characterize development of the vascular smooth muscle cells (VSMCs) differentiated from ESCs is established. In SM22 α -EGFP expressing ESC-derived embryoid bodies (EBs), a distinct sublineage of VSMCs could be identified by EGFP fluorescence. The SM22 α promoter was switched on at day 11, and EGFP-positive cells increased gradually and reached peak at day 30. The specificity of EGFP positive cells was corroborated by RT-PCR analysis and immunostaining with antibodies against known markers for VSMCs. VSMCs were heterogeneous in their morphology in plating EBs, and could be divided into two categories: spindle-shaped or epithelioid, polygonal cells. These results suggest that SM22 α -EGFP expression enables the identification of ESC-derived VSMCs by their fluorescence and morphology.

Key words smooth muscle cell, embryonic stem cell, differentiation, migration

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30370526).

**Corresponding author. Tel: 86-24-23056123, Fax: 86-24-23911006, E-mail: hanyal@mail.sy.ln.cn

Received: November 1, 2005 Accepted: December 28, 2005