

脐血源性间充质干细胞与人心肌细胞共培养条件下对心肌细胞凋亡的抑制*☆

杨水祥¹, 黄景玲²

Inhibitory effects of co-culture of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and human cardiomyocytes on cardiomyocyte apoptosis

Yang Shui-xiang¹, Huang Jing-ling²

Abstract

BACKGROUND: Umbilical cord blood (UCB)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) have multi-differentiation potentials, and can repair myocardial tissue following homing or implantation into the heart. However, transplantation safety and whether the transplantation can inhibit apoptosis of human cardiomyocytes under coculture of human cardiomyocytes deserve further investigations.

OBJECTIVE: To study the safety and apoptosis inhibition of the UCB-derived MSCs with co-culture on human cardiomyocytes.

METHODS: Human UCB-derived MSCs were collected at the time of delivery, and treated with 5-azacytidine for 24 hours and further introduced differentiation into cardiomyocytes. Cells at passages 3-5 and induced cells were obtained to detect the telomerase activation, tumor-related gene RNA levels, chromosome karyotype G typing, cell surface antigen expression, tumor formation in nude mice, and cell apoptosis under coculture.

RESULTS AND CONCLUSION: MSCs derived from UCB were differentiated into cardiomyocytes *in vitro* following induced by 5-azacytidine. Telomerase activity, p53, cyclin A, cdk2, β -actin, c-fos, h-TERT and c-myc expression was similar before and after induction. No abnormal chromosomal karyotypes were observed. Immunophenotype did not significantly change. Cells were negative for CD34, but positive for CD44 and CD90 (Thy-1). There was no tumor formation in nude mice. UCB-derived MSCs significantly inhibited apoptosis of human cardiomyocytes under co-culture conditions compared with cardiomyocytes ($P < 0.05$). Results have suggested that human UCB-derived MSCs are a valuable safe and effective source of cell-transplantation treatment, and can inhibit the apoptosis of human cardiomyocytes under co-cultured conditions.

¹Department of Cardiology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China; ²School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Yang Shui-xiang[☆], Doctor, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China
sxyang68@163.com

Yang SX, Huang JL. Inhibitory effects of co-culture of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and human cardiomyocytes on cardiomyocyte apoptosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(27):4979-4983. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Supported by: the President Foundation of Beijing Shijitan Hospital, No. 2005-02*

摘要

Received:2010-02-20
Accepted:2010-03-25

背景: 脐带血来源的间充质干细胞有多系分化的潜能, 其归巢或植入心脏后能够修复心肌组织, 但其移植治疗的安全性, 以及在与人心肌细胞共培养情况下, 能否抑制人心肌细胞凋亡仍有待观察。

目的: 观察人脐血间充质干细胞与人心肌细胞共培养条件下对人心肌细胞凋亡的抑制作用, 以及移植治疗的安全性。

方法: 人脐血源性间充质干细胞来源于分娩孕妇脐血, 经 5-氮杂胞苷处理 24 h 向人心肌细胞诱导分化。分别取体外培养 3~5 代细胞以及诱导后细胞, 检测其端粒酶活性及肿瘤相关基因 RNA 水平的表达、染色体核型 G 带分型、细胞表面抗原表达、裸鼠体内成瘤情况、共培养条件下细胞凋亡情况。

结果与结论: 脐血源性间充质干细胞经 5-氮杂胞苷体外诱导能分化成心肌细胞, 诱导前后其端粒酶活性及 p53, cyclin A, cdk2, β -actin, c-fos, h-TERT, c-myc 等肿瘤相关基因的表达均基本相似; 均未发现异常染色体核型; 免疫表型无明显变化, CD34 呈阴性, CD44 及 CD90(Thy-1)呈阳性。脐血源性间充质干细胞接种裸鼠体内未见肿瘤生长。与单纯心肌细胞比较, 共培养情况下脐血间充质干细胞能够显著抑制心肌细胞的凋亡($P < 0.05$)。结果提示人脐血间充质干细胞用于细胞移植治疗安全有效, 与心肌细胞共培养时具有明显抑制心肌细胞凋亡的作用。

关键词: 脐血; 间充质干细胞; 5-氮杂胞苷; 心肌细胞; 凋亡; 安全性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.27.009

¹北京世纪坛医院心内科, 北京市 100038; ²兰州大学生命科学院, 甘肃省兰州市 730000

杨水祥[☆], 男, 1957 年生, 陕西省扶风县人, 汉族, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事心血管病的临床及基础研究。
sxyang68@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225
(2010)27-04979-05

收稿日期: 2010-02-20
修回日期: 2010-03-25
(20100220007/M·Q)

杨水祥, 黄景玲.脐血源性间充质干细胞与人心肌细胞共培养条件下对心肌细胞凋亡的抑制[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27):4979-4983. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前, 如何从多种组织中获得最佳来源的间充质干细胞已受到越来越多的关注^[1]。一般认为, 脐带血中含有造血干细胞, 而这些细胞在孕妇分娩时很容易得到。研究证实从脐带血分离得到的间充质干细胞有多系分化的潜能^[2-4]。然而, 脐血间充质干细胞分化后的细胞安全性尚未定论。

心肌细胞凋亡可发生于多种心血管疾病, 而且凋亡是心肌功能发生恶化时的重要表现。干细胞归巢或移植入心脏后能够使心肌组织再生, 能够取代失去功能的心肌细胞以及抑制心肌细胞凋亡^[5-8]。但尚无脐血间充质干细胞与人心肌细胞共培养条件下, 抑制人心肌细胞凋亡的相关报道。因此本实验旨在探讨脐带血来源的间充质干细胞的安全性以及对人心肌细胞凋亡的抑制作用。

1 材料和方法

设计: 细胞学体内外观察。

时间及地点: 实验于 2005-06/2007-12 在北京大学第九临床医学院, 北京世纪坛医院和中国科学院遗传研究所相关实验室完成。

材料:

脐带血: 源于 10 名分娩孕妇, 产妇及其家属知情同意, 由北京世纪坛医院妇产科提供。

实验动物: 6 周龄体质量 16~20 g 的雄性 BALB/c 裸鼠从国家动物实验中心上海分中心获得, 小鼠在无病原菌的条件下喂养。实验所进行的动物实验得到了国家动物实验中心动物保护与使用委员会上海分中心动物保护与应用委员会的批准。

主要试剂:

| 主要试剂 | 来源 |
|----------------------|--|
| DMEM/F12 胎牛血清 | Hyclone 兰州国家胎牛血清生物 工程有限公司 |
| HbFGF | TECR Incorporated, US |
| 5-氮杂胞苷(5-AZA) | Sigma |
| TRAPENE 端粒酶检测试剂盒 | CHEMICON |
| 反转录酶单链 cDNA 克隆合成试剂盒 | Invitrogen |
| 秋水仙碱 | Sigma 中国北京分公司 |
| FACSC alibur | Becton-Dickinson, Bei- jing branch, China |
| 人心肌细胞 | ScienCell San Diego, US |
| CardioTACS 原位凋亡检测试剂盒 | R&D Systems, Minne- apolis, USA |

实验方法:

脐血间充质干细胞的分离和培养: 获得知情同意后自健康产妇获取脐血细胞, 从中分离获得单个核细胞, 继而以 1.077 g/cm^3 的 Ficoll-paque 密度梯度离心分离细胞, 并种植于无包被的组织培养瓶中, 在 37°C 、体积分数为 $5\%\text{CO}_2$ 和体积分数为 95% 空气中培养。过夜培养后, 换培养液并弃去未贴壁的细胞, 之后每周进行两次培养液更换。培养液由以下成分构成: DMEM/F12 (DMEM : F12=1 : 1) 和体积分数为 2% 的胎牛血清(包含 $10 \mu\text{g/L}$ 人碱性成纤维细胞生长因子, 100 U/mL 青霉素以及 100 mg/L 链霉素)。

培养与细胞扩增: 一旦贴壁细胞达到 $50\%\sim 60\%$ 的融合, 便以含 2.5 g/L 胰蛋白酶的 EDTA($0.02\%\text{EDTA}$) 消化洗脱细胞, 并用 PBS(pH 7.4) 洗两次后以 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min , 以 $1 : 3$ 的比例在同样条件下传代培养。

端粒酶活性检测: 为了诱导脐带血来源的间充质干细

胞分化为心肌细胞, 实验将传至 3~5 代的细胞加入 $10 \mu\text{g/L}$ 5-氮杂胞苷的 DMEM/F12 诱导 24 h 。随后利用荧光抗体 CD34, CD44, CD90 (购自美国 BD Pharmingen 公司) 进一步分选。4 周左右可获得心肌细胞。选择培养至 3~5 代的细胞(1×10^6) 利用 TRAPEZE Telomerase Detection Kit(按说明书操作) 来检测其端粒酶的活性。

RNA 提取和 RT-PCR 分析: 为了检测获得的间充质干细胞是否具有促癌作用, 首先选择培养至 3~5 代的脐血间充质干细胞以及 5-氮杂胞苷(5×10^6) 诱导后的间充质干细胞(1×10^6) 分别用 TRIZOL 提取 RNA(按说明书操作), 然后使用 Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit(按说明书操作) 将获得的 mRNA 反转录为 cDNA。最后 cDNA 在 PCR 仪(ABI GeneAmp PCR System, MJ, PTC100 US) 上进行扩增。具体参数为: 94°C 40 s , 56°C 50 s , 72°C 60 s , 初变性后共 35 个循环。

扩增所使用的引物:

| 引物 | 序列 | 产物 |
|----------------|--|--------|
| β -actin | Sense: 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3' Antisense: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3' | 250 bp |
| h-TERT | Sense: 5'-TCT ACC GGA AGA GTG TCT GGA GCA A-3' Antisense: 5'-GCG CCC ACG ACG TAG TCC ATG TTC A-3' | 151 bp |
| c-myc | Sense: 5'-TGG TCG CCC TCC TAT GTT G -3' Antisense: 5'-CCG GGT CGC AGA TGA AAC TC-3' | 151 bp |
| p53 | Sense: 5'-TGG TTG CAG TCT AGC GAC C-3' Antisense: 5'-TCA GGA AGA CAA GCA TCT GGG -3' | 223 bp |
| c-fos | Sense: 5'-CCA CCC GAA CAG TCT CTC CT-3' Antisense: 5'-AGA AGC CCA AAA GCC ATA GGT-3' | 115 bp |
| cdk2 | Sense: 5'-GGC CCG GCA AGA TTT TAG TA-3' Antisense: 5'-CTA TCA GTC GAA GAT GGG-3' | 102 bp |
| cyclin A | Sense: 5'-GCA TTG CAG CAG ACG GCG CT-3' Antisense: 5'-TGG CTG TTT CTT CAT GTA ACC CAC-3' | 451 bp |

染色体核型及 G 带显带检测分析: 为检测染色体核型的 G 带显带形式, 将培养至 3~5 代的脐血间充质干细胞以及 5-氮杂胞苷诱导后的间充质干细胞(5×10^6) 分别在加入 0.3 mg/L 秋水仙碱的 DMEM/F12 中处理 4 h , 此时细胞分裂中期的染色体延伸, 之后使用 trypsin-Giemsa 染色进行标准的 G 带显带, 染色体将会形成一个染色体核型。

裸鼠接种及促发肿瘤试验: 为检测间充质干细胞是否具有促肿瘤发生作用, 使用裸鼠进行体内试验。将培养至

3~5 代的脐血间充质干细胞以及 5-氮杂胞苷诱导后的间充质干细胞(5×10^6) 分别以 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 的浓度在无菌 PBC(pH 7.4) 溶液中重悬。随后分别在每只裸鼠的右前肢皮下注射 0.2 mL 的细胞悬液, 每种细胞类型注射 6 只。

流式细胞仪检测: 为了检测每个细胞表面的抗原表型, 将培养至 3~5 代的细胞分离成单细胞, 然后进行荧光素或是 PE 偶联的抗体染色, 最后在 FACSC alibur 上进行分析。使用 AnnexinV 和 PI 双染来对细胞的凋亡进行分析。

TUNEL 检测: 为了检测脐带血来源的间充质干细胞对凋亡的抑制作用, 将脐带血来源的间充质干细胞和人心肌细胞在 6 孔板中共培养, 12 mm 的无菌盖玻片置于 6 孔板的底部。用膜分隔为 2 个小室, 上层小室为间充质干细胞悬液, 下层小室为含混合细胞的培养基。对照组细胞在普通 6 孔板中培养。载玻片上的凋亡细胞用 CardioTACS in situ apoptosis detection kit 进行检测。为了区别凋亡的细胞与坏死的细胞, 将样品进行染色在形态学上验证凋亡。

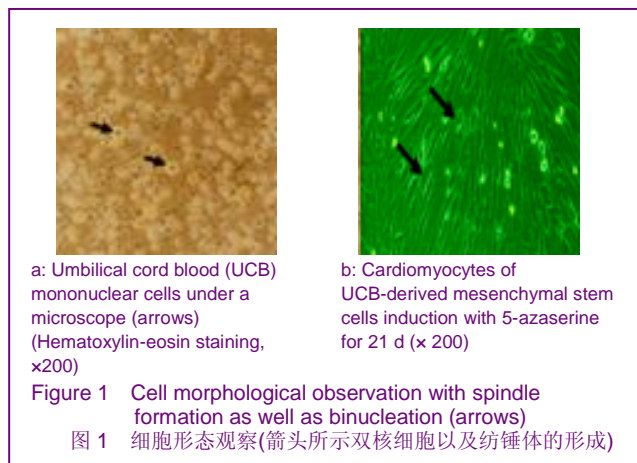
主要观察指标: 诱导前后干细胞端粒酶活性及 p53, cyclin A, cdk2, β -actin, c-fos, h-TERT, c-myc 等肿瘤相关基因的检测, 干细胞表面抗原表达 CD34, CD44 及 CD90(Thy-1) 检测, 诱导分化的心肌细胞 TnI 的检测等。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二作者, 资料收集、实施为第二作者, 资料评估为第一作者, 采用双盲法进行评估。

统计学分析: 由第一作者通过 SPSS 11.3 版本软件进行 *t* 检验来实现。

2 结果

2.1 细胞形态观察 脐带血单个核细胞形态见图 1a。脐带血来源的间充质干细胞经 5-氮杂胞苷诱导 21 d 后分化而成的心肌细胞见图 1b, 可以观察到纺锤体的形成以及双核的形成。



2.2 间充质干细胞端粒酶活性以及肿瘤相关基因的 RNA

水平检测结果 培养 3~5 代脐血间充质干细胞与经 5-氮杂胞苷诱导后的间充质干细胞相比, 端粒酶活性非常相似, 而脐血单个核细胞几乎没有检测到端粒酶活性, 见图 2。

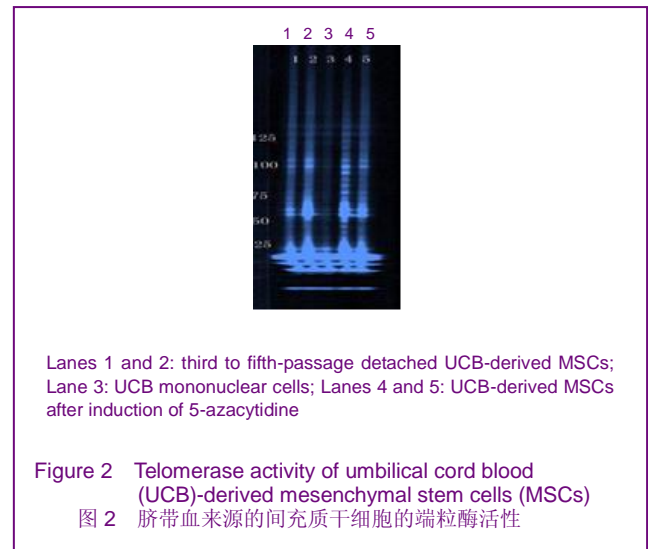
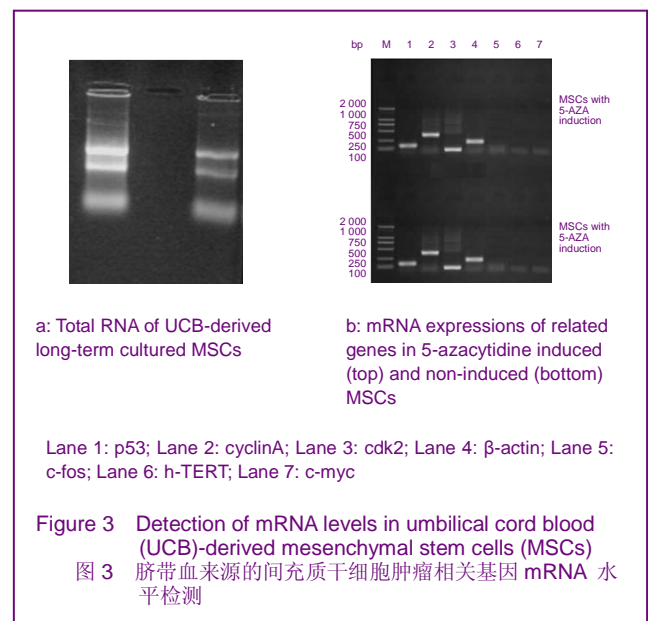


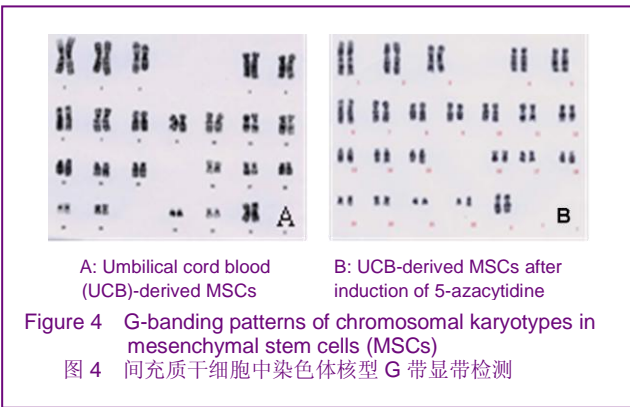
图 3a 显示的是长期培养的间充质干细胞中提取的总 RNA, 图 3b 显示的是经 5-氮杂胞苷处理后的间充质干细胞肿瘤相关基因的 mRNA 表达情况。检测多种信号通路后发现, 5-氮杂胞苷诱导前后脐血间充质干细胞 p53, cyclin A, cdk2, β -actin, C-fos, h-TERT 和 c-myc 表达情况相似。



2.3 间充质干细胞中染色体核型的 G 带显带检测结果 培养 3~5 代的脐血间充质干细胞与经 5-氮杂胞苷诱导分化后的细胞均有正常的雌性二倍体染色体核型, 见图 4。

2.4 5-氮杂胞苷诱导前后脐带血来源的间充质干细胞免疫表型变化 与诱导前比较, 脐血间充质干细胞经 5-

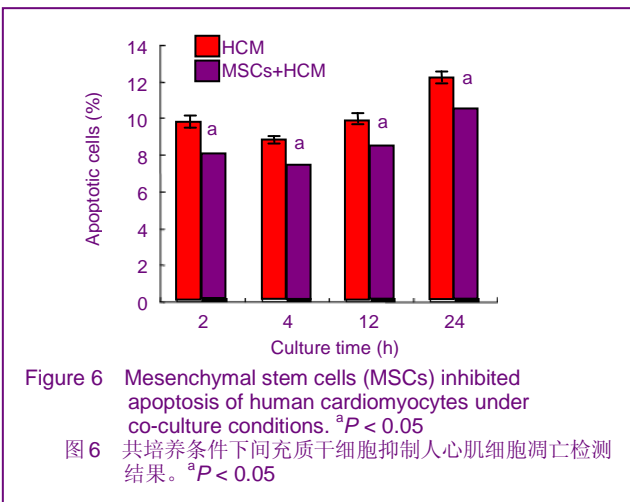
氮杂胞苷诱导后免疫表型和纯化结果没有变化。流式细胞计数结果发现, CD34 呈阴性, 而基质受体 CD44, CD90(Thy-1)阳性的纤维母细胞样、快速分裂的细胞大量扩增。



2.5 间充质干细胞输注后裸鼠体内成瘤情况 输入间充质干细胞 10 周后, 裸鼠仍健康存活, 在输入部位周围未观测到实体肿瘤, 见图 5。石蜡组织切片后, 苏木精-伊红染色显示为正常的皮下组织。



2.6 间充质干细胞抑制心肌细胞凋亡结果 在共培养情况下, 间充质干细胞能够显著抑制心肌细胞的凋亡, 见图 6。



3 讨论

间充质干细胞是组织再生的重要来源, 尤其对心肌细胞成形术后的心肌再生有至关重要的作用^[9-11]。然而这些细胞的来源尚未确定。间充质干细胞最重要的是能够进行增殖分化, 但是这种能力会随着年龄的增长而逐渐降低^[12-13]。而多数脐带血来源的间充质干细胞的供者比较年轻, 所以脐带血可以获得非常理想的间充质干细胞。目前研究证实脐带血来源的间充质干细胞可以作为一种新的极具价值的间充质干细胞的重要来源。

与骨髓来源的间充质干细胞相比, 实验发现脐带血来源的单个核细胞更易获得(图 1), 而且可以避免骨髓穿刺给供者带来的痛苦。此外, 与骨髓来源的间充质干细胞相比, 脐带血来源的间充质干细胞经 5-氮杂胞苷诱导后分化成为心肌细胞的比例更高而且过程更容易^[14], 这可能是由于脐带血间充质干细胞供者较为年轻的缘故^[15-16]。

实验结果证实无论是否经过了 5-氮杂胞苷的处理, 脐带血来源的间充质干细胞端粒酶活性没有发生明显变化。一般认为端粒酶活性在无限增殖细胞系中特异性表达, 例如癌细胞和生殖细胞, 在这些细胞 DNA 复制的过程中端粒缩短, 复制完成后可稳定的维持端粒的长度。因此, 在多潜能干细胞中端粒酶的活性可能在维持细胞再生和细胞分化发挥着至关重要的作用^[17]。经 5-氮杂胞苷诱导后, 脐带血来源的间充质干细胞可以发现明显的端粒酶活性, 这可能意味着这些细胞具有多潜能细胞的特征以及进一步扩增的能力; 由于与未经处理的间充质干细胞无明显差异, 可以认为 5-氮杂胞苷诱导是安全的。

通过诱导脐带血来源的间充质干细胞可以得到心肌细胞, 但用于临床治疗的安全性还值得商榷^[18-19], 尤其是用于心肌细胞成形术。实验进一步研究了间充质干细胞诱导前后的促肿瘤发生作用: 包括 p53, cyclinA, cdk2, c-fos, β -actin, h-TERT 和 c-myc 的表达情况; 染色体核型的改变, 以及裸鼠体内成瘤实验。

实验结果证明脐血间充质干细胞诱导前后均无明显的肿瘤相关基因的表达(图 3); 5-氮杂胞苷诱导前后无异常染色体核型(图 4)。在活细胞分裂过程中, 染色质逐渐浓缩, 此时可以看到染色体。一般而言, 染色体的数量、形状以及结构是稳定的, 但是多种影响因素均可改变其染色体核型, 因此肿瘤细胞中往往有异常的染色体核型。但 5-氮杂胞苷诱导后的间充质干细胞输入到裸鼠体内未形成肿瘤。上述结果说明脐带血来源的间充质干细胞进行移植治疗是安全的。

在以前的研究中确定了脐带血来源的间充质干细胞的细胞表面分子标记^[20]。因此可以使用流式细胞仪来

分选间充质干细胞。利用流式细胞计数及荧光抗体可确定增殖的细胞群中表面分子的存在情况, 然后根据阴性或阳性进行流式分选。流式细胞分析结果表明这些细胞表达 CD34(造血干细胞标志)阴性, 而人类间充质干细胞标志 CD44、CD90 阳性, 这与骨髓来源的间充质干细胞的结果一致, 说明脐带血来源的间充质干细胞具有间充质干细胞的特征^[21-22]。

有研究证实干细胞归巢或移植至心脏后可导致新的组织形成, 能够取代失去功能的心肌以及抑制心肌细胞的凋亡, 最终改善受损心肌的功能^[5-8]。值得关注的是, 实验结果证实在人心肌细胞与脐血间充质干细胞共培养的条件下, 脐血间充质干细胞能够抑制人心肌细胞的凋亡(图6)。这可能是脐血间充质干细胞通过旁分泌机制灭活心肌细胞释放的因子, 从而抑制了凋亡信号的产生; 同时促进细胞生存的信号通路来抑制细胞凋亡^[23-24], 从而减少心肌细胞的损失。因此这些结果能够证明一种新的机制, 并提供了一种治疗机体衰弱疾病十分有价值的新方法, 如心肌梗死时, 可以有有效的减缓心衰的进展。由于在心血管疾病的发生过程中凋亡是一个已知的机制, 因此脐带血来源的间充质干细胞可作为干细胞的另一来源, 能够用来治疗心血管疾病。然而目前的实验结果还不完善, 还需要进一步的研究来明确这些细胞分化为其他细胞类型的能力以及抑制凋亡的具体机制。

4 参考文献

- [1] Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation*. 2009;87(9 Suppl):S49-53.
- [2] Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, et al. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2009;5(1):36-50.
- [3] Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, et al. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell Transplant*. 2007;16(6):579-585.
- [4] Martins AA, Paiva A, Morgado JM, et al. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry. *Transplant Proc*. 2009;41(3):943-946.
- [5] Sordi V. Mesenchymal stem cell homing capacity. *Transplantation*. 2009;87(9 Suppl):S42-45.
- [6] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):206-216.
- [7] Dimitriou H, Perdikogianni Ch, Martimianaki G, et al. Are mesenchymal stromal cells from children resistant to apoptosis? *Cell Prolif*. 2009;42(3):276-283.
- [8] Schwartz LM, Gao Z, Brown C, et al. Cell death in myoblasts and muscles. *Methods Mol Biol*. 2009;559:313-332.
- [9] Walther G, Gekas J, Bertrand OF. Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: promises and premises. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2009;73(7):917-924.
- [10] Derval N, Barandon L, Dufourcq P, et al. Epicardial deposition of endothelial progenitor and mesenchymal stem cells in a coated muscle patch after myocardial infarction in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(2):248-254.
- [11] Chiu RC. MSC immune tolerance in cellular cardiomyoplasty. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;20(2):115-118.
- [12] Wagner W, Bork S, Horn P, et al. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*. 2009;4(6):e5846.

- [13] Riekstina U, Muceniece R, Cakstina I, et al. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*. 2008;58(3):153-162.
- [14] Huang JL, Yang SX. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(47):9367-9370. 黄景玲, 杨水祥. 人脐血源性间充质干细胞向心肌细胞的诱导分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(47):9367-9370.
- [15] Stolzing A, Jones E, McGonagle D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(3):163-173.
- [16] Tokalov SV, Gruener S, Schindler S, et al. A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats. *Mol Cells*. 2007;24(2):255-260.
- [17] Wei LL, Gao K, Liu PQ, et al. Mesenchymal stem cells from Chinese Guizhou minipig by hTERT gene transfection. *Transplant Proc*. 2008;40(2):547-550.
- [18] Cragg MS, Harris C, Strasser A, et al. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(5):321-326.
- [19] Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biol Int*. 2007;31(6):645-648.
- [20] Yang SX, Xu J, Xu GY, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2009, 13(10):1969-1972. 杨水祥, 徐静, 徐桂玉, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗心肌梗死6例4年随访[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(10):1969-1972.
- [21] Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009;27(3):670-681.
- [22] Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, et al. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):11-16.
- [23] Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, et al. TNFR1 signaling resistance associated with female stem cell cytokine production is independent of TNFR2-mediated pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(4):R1124-1130.
- [24] Nagaya N, Kitamura S. Regenerative medicine for heart failure. *Nippon Rinsho*. 2008;66(5):978-983.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 北京世纪坛医院院长基金资助(2005-02)。

致谢: 感谢北京世纪坛医院妇产科李红霞主任、于莎莎主任提供脐带血的帮助; 感谢中国科学院院遗传研究所戴建伍研究员对本课题的支持与帮助。

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。

课题的创新点: ①脐血源性间充质干细胞经 5-氮杂胞苷体外诱导能分化成心肌细胞。②诱导前后其端粒酶活性及 p53, cyclin A, cdk2, β -actin, C-fos, h-TERT, c-myc 等肿瘤相关基因的表达均基本相似。③均未发现异常染色体核型。④免疫表型无明显变化, CD34 呈阴性, CD44 及 CD90(Thy-1) 呈阳性。⑤脐血源性间充质干细胞接种裸鼠体内未见肿瘤生长。理论创新: ①与心肌细胞共培养情况下脐血间充质干细胞能够显著抑制心肌细胞的凋亡。②人脐血间充质干细胞用于细胞移植治疗安全有效。

课题评估的“金标准”: 肿瘤相关基因的检测、干细胞表面抗原表达、诱导分化的心肌细胞 Tnl 的检测均为金标准。本课题均有应用。

提供临床借鉴的价值: 对脐血干细胞的临床应用, 特别是心肌梗死的治疗有一定的指导价值。