

四种诱导剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞的分化★

刘博武, 吕安林, 黄 炜, 侯 婧, 侯兆蕾, 侯 红, 达 晶, 杨 娜

Induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells by four inducers

Liu Bo-wu, Lü An-lin, Huang Wei, Hou Jing, Hou Zhao-lei, Hou Hong, Da Jing, Yang Na

Abstract

BACKGROUND: It has been rarely reported that different inducers are used to induce bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells.

OBJECTIVE: To investigate the effects of 5-azacytidine, angiotensin II, bone morphogenetic protein 2, pifithrin- α on induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells.

METHODS: Passage 3 rat bone marrow mesenchymal stem cells were divided into five groups: control, 5-azacytidine, angiotensin II, bone morphogenetic protein 2, pifithrin- α . Surface antigen expression of bone marrow mesenchymal stem cells was identified by flow cytometry. After 4 weeks of induction, Cx43 and troponin I expression was detected by western blot method and calcium transient capability of induced bone marrow mesenchymal stem cells was detected by laser confocal scanning microscopy with fluo3/AM.

RESULTS AND CONCLUSION: Cell surface antigen CD29, CD44, CD45 positive rate was 89.1%, 90.4%, 1.9% respectively. Troponin I expression appeared in each group and the expression was significantly higher in the pifithrin- α group ($P < 0.05$), as well as significantly lower in the bone morphogenetic protein 2 group ($P < 0.05$), compared with the remaining groups. Cx 43 expression appeared in each group, and the expression was significantly lower in the control group ($P < 0.05$) compared with the remaining groups. In the four experimental groups, Cx43 expression was highest in the pifithrin- α group and lowest in the angiotensin II group ($P < 0.05$). Calcium transient capability determined by fluorescence intensity was arranged as follows: angiotensin II group > pifithrin- α group > 5-azacytidine group > bone morphogenetic protein 2 group > control group ($P < 0.01$). These findings suggest that after induced by 5-azacytidine, angiotensin II, bone morphogenetic protein 2, and pifithrin- α , bone marrow mesenchymal stem cells differentiated towards cardiomyocyte-like cells and expressed myocardium-specific protein. Different inducers exert different effects on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells which occurs because of different pathways.

Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Liu Bo-wu★, Studying for master's degree, Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China lbw_113@hotmail.com

Corresponding author: Lü An-lin, Associate chief physician, Associate professor, Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China lvianlin@fmmu.edu.cn

Received: 2011-12-05
Accepted: 2012-01-12

Liu BW, Lü AL, Huang W, Hou J, Hou ZL, Hou H, Da J, Yang N. Induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells by four inducers. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2471-2476. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 不同诱导剂诱导骨髓间充质干细胞分化形成心肌样细胞功能学方面的研究未见报道。

目的: 观察 5-氮杂胞苷、血管紧张素 II、骨形态发生蛋白 2 和 P53 特异性抑制剂对骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的影响。

方法: 分离大鼠骨髓间充质干细胞, 取第 3 代细胞分为 5 组, 即正常对照组, 5-氮杂胞苷组、血管紧张素 II 组、骨形态发生蛋白 2 组和 P53 特异性抑制剂组。采用流式细胞仪技术鉴定骨髓间充质干细胞表面特定抗原表达情况, Western blot 法检测诱导 4 周后 Cx43、肌钙蛋白 I 表达情况, fluo3/AM 钙离子探针激光共聚焦检测诱导 4 周后钙瞬变能力。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞表面抗原 CD29、CD44、CD45 的阳性表达率分别为 89.1%、90.4% 和 1.9%。Western blot 结果显示, 各诱导组均有肌钙蛋白 I 的表达, P53 特异性抑制剂组较其余各组表达多 ($P < 0.05$), 骨形态发生蛋白 2 组较其余各组表达少 ($P < 0.05$)。Cx43 蛋白在各组之间均有表达, 正常对照组较各实验组明显较少 ($P < 0.05$), P53 特异性抑制剂组较其余各组表达多 ($P < 0.05$), 血管紧张素 II 组较其余各组表达少 ($P < 0.05$)。钙瞬变功能测定结果显示, 荧光强度血管紧张素 II > P53 特异性抑制剂 > 5-氮杂胞苷 > 骨形态发生蛋白 2 > 正常对照组 ($P < 0.01$)。提示不同诱导剂诱导骨髓间充质干细胞之后, 各实验组均能向心肌样细胞分化, 表达心肌特异性蛋白。而不同诱导剂发挥作用的通路不同, 从而对诱导骨髓间充质干细胞分化形成心肌样细胞的功能产生不同影响。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 诱导剂; 诱导; 分化; 心肌样细胞

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞; ANG-II: renin angiotensin-II, 血管紧张素 II; PFT- α : p-fifty three inhibitor-alpha, P53 特异性抑制剂

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.001

刘博武, 吕安林, 黄炜, 侯婧, 侯兆蕾, 侯红, 达晶, 杨娜. 四种诱导剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2471-2476. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

解放军第四军医大学西京医院心内科, 陕西省西安市 710032

刘博武★, 男, 1985年生, 陕西省西安市人, 汉族, 解放军第四军医大学在读硕士, 主要从事心脏电生理特性与医学组织工程方面的研究。
lbw_113@hotmail.com

通讯作者: 吕安林, 副主任医师, 副教授, 解放军第四军医大学西京医院心内科, 陕西省西安市
lvianlin@fmmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02471-04

收稿日期: 2011-12-05
修回日期: 2012-01-12
(2011101012/G·S)

0 引言

心肌梗死后心肌细胞的自我修复能力极其有限, 而近年来干细胞研究为坏死心肌的修复带来了新的希望。众多研究证实骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植可以改善心梗后心功能的恢复以及减少心室重构的发生率^[1-7]。对于BMSCs经过诱导分化形成心肌样细胞的研究同样众多, 有确切证据表明5-氮杂胞苷是诱导其分化的有效化学试剂^[8-9]。而骨形态发生蛋白是一种多功能糖蛋白, 是转化生长因子 β 超家族成员之一, 可促进多种细胞的生长、分化和凋亡。研究发现骨形态发生蛋白2主要通过Smad信号通路的介导作用促进骨髓干细胞来源的心肌样细胞的心肌早期转录因子和心肌特异性基因的表达^[10]。本课题组研究发现血管紧张素II (renin angiotensin- II, ANG- II) 能够诱导BMSCs分化形成心肌样细胞^[11-12], 以及P53特异性抑制剂(p-fifty three inhibitor-alpha, PFT- α)阻断P53-P21蛋白通路能够促进BMSCs增殖及分化^[13]。本实验通过观察BMSCs经过不同诱导剂诱导分化形成心肌样细胞, 从而进行不同诱导剂对心肌样细胞影响的比较, 以进一步探索提高诱导方法和途径。

1 材料和方法

设计: 细胞学水平, 对比观察实验。

时间及地点: 于2010-09/2011-10在解放军第四军医大学西京医院心内科实验室完成。

材料:

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
5-氮杂胞苷、胰蛋白酶、左旋谷氨酰胺、血管紧张素II	Sigma, USA
骨形态发生蛋白2	Peptotech, USA
Fluo3/AM	Biotium, USA
P53 特异性抑制剂	Cayman, USA
L-DMEM 培养基	Hyclone, USA
胎牛血清	杭州四季青
Ficoll 淋巴细胞分离液	天津 TBD 公司
CD29-PE	eBioscience, USA
CD44-FITC/CD45-PE	Biolegend, USA
CO ₂ 细胞孵箱	Thermo, USA
流式细胞仪	BD, USA
激光共聚焦显微镜	Olympus, JP
Cx43 多抗	GeneTex, USA
肌钙蛋白 I 单抗	Abcam, USA

实验动物: 4周龄健康雄性SD大鼠, 体质量(110 $\pm$ 20)g, SPF级, 由解放军第四军医大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(军)2008-012, 实验过程中对动物的处置符合伦理学准则^[14-15]。

实验方法:

BMSCs原代分离、培养及传代: 采用颈椎脱臼处死大鼠, 取四肢长骨放置于体积分数为75%乙醇中浸泡5 min。在超净台中无菌剔除肌肉筋膜, 分离胫骨、股骨及肱骨, 剪除骨髓端, 暴露骨髓腔, 用L-DMEM培养液反复冲洗骨髓腔, 充分混匀制成单细胞悬液并将其缓慢加入预先装有恢复到室温的1.077 g/mL的淋巴细胞分离液的15 mL离心管中, 骨髓单细胞悬液与淋巴细胞分离液的比例为1:1, 25℃, 2 000 r/min, 20 min后取出吸取云雾状细胞层, 加入L-DMEM培养液混匀, 1 500 r/min, 10 min后取出弃去上清液, 加入预先配制的完全培养液(L-DMEM, 体积分数10%胎牛血清, 300 mg/L谷氨酰胺, 100 U/mL青霉素, 100 U/mL链霉素, 10 mmol/L HEPES, 750 mg/L NaHCO₃), 充分吹打混匀后, 接种于25 cm² Hyclone培养瓶中, 于37℃, 体积分数5%CO₂饱和湿度细胞孵箱中培养。72 h后首次换液, 以后每72 h换液1次。待细胞长到80%~90%融合时用0.25%胰蛋白酶进行消化, 以1:2比例传代。培养至第3代^[16]。

BMSCs细胞形态学观察: 每日在倒置显微镜下观察细胞传代以及诱导前后生长情况和形态变化。

BMSCs细胞鉴定: 取第3代BMSCs用PBS清洗3遍, 加入预先恢复到室温0.25%的胰蛋白酶1.5 mL, 放置于倒置显微镜下观察, 等细胞间隙变大, 细胞回缩变圆时, 弃去消化液, 加入3 mL完全培养液L-DMEM终止消化。吹打混匀细胞后离心, 再用PBS洗涤2次(1 500 r/min, 10 min), 剩余50 μ L配成浓度为1 $\times$ 10¹² L⁻¹的细胞悬液。分别加入CD44-FITC抗体2.5 μ L, CD45-PE抗体5 μ L, CD29-PE抗体5 μ L, 阴性对照加入鼠抗IgG-FITC和IgG-PE, 4℃避光孵育30 min。再次用PBS洗涤2次(1 500 r/min, 10 min)后弃去上清液体, 测定组加300 μ L PBS混匀呈单细胞悬液, 对照组加400 μ L PBS混匀细胞呈单细胞悬液。采用流式细胞仪技术测定BMSCs表面特定抗原^[16-17]。

实验分组及处理: 取第3代BMSCs细胞用PBS清洗3遍, 加入预先恢复到室温0.25%的胰

蛋白酶1.5 mL, 放置于倒置显微镜下观察, 等细胞间隙变大, 细胞回缩变圆时, 弃去消化液, 加入3 mL完全培养液L-DMEM终止消化。吹打混匀呈单细胞悬液后接种于6孔板及35 mm细胞培养皿内。待24~48 h后细胞贴壁, 将细胞分为5组, 每组2孔/2皿: ①正常对照组: 加入正常L-DMEM完全培养液。②5-氮杂胞苷组: 加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的5-氮杂胞苷完全培养液进行诱导^[8]。③ANG-II组: 加入终浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的血管紧张素II完全培养液进行诱导^[11]。④骨形态发生蛋白2组: 加入终浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的骨形态发生蛋白2完全培养液进行诱导^[10]。⑤PFT- α 组: 加入终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的PFT- α 完全培养液进行诱导。各诱导组均24 h后去除诱导培养液, 更换为正常L-DMEM完全培养液继续培养^[13]。

BMSCs诱导后4周Cx43、肌钙蛋白I表达情况鉴定: 采用Western blotting法测定不同处理组诱导4周后Cx43、肌钙蛋白I蛋白表达量的变化。

BMSCs诱导后Flou3钙瞬变功能情况测定: 采用激光共聚焦扫描显微镜对不同处理组诱导4周后钙瞬变功能情况进行测定。将flou3/AM(5.0 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养液加入各处理组中避光孵育30 min(25 $^{\circ}\text{C}$), 洗涤2次后采用双激发荧光光电倍增系统检测荧光信号。激发波长为480 nm刺激各实验组细胞, 细胞内与游离 Ca^{2+} 结合的荧光物质被激发, 检测其发射光(波长526 nm)被检测。细胞内钙离子浓度的改变可通过两种波长荧光强度的变化所反映, 记录各实验组3 min时长的钙瞬变荧光强度值^[18]。

主要观察指标: ①BMSCs培养传代和诱导过程中的细胞形态变化。②流式细胞仪技术鉴定BMSCs表面特定抗原。③Western blotting法检测Cx43、肌钙蛋白I蛋白表达情况。④激光共聚焦扫描显微镜观察不同处理组钙瞬变能力。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0统计分析软件对各组数据进行方差分析和多重比较, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs培养传代及诱导后细胞形态学变化 见图1。

原代BMSCs多呈圆形或椭圆形, 折光性强, 见图1a。3 d后大部分细胞贴壁生长, 形态多样, 为短梭形, 三角或不规则星形, 且伸出长短不一、粗细不等的胞质突起相互连接, 见图1b。7 d左右, BMSCs进入指数增长期, 细胞快速分裂增殖, 数量显著增多, 形状主要为长梭形向四周呈放射状扩散, 形成大小不均的细胞集落。传代后细胞体积比原代细胞较大, 呈长梭形, 并有少量三角形及不规则星形细胞。传3代后, BMSCs生长排列紧密, 细胞形态趋向一致, 见图1c。BMSCs诱导

后4周, 细胞形态为长梭形, 并横向增宽生长, 表现出心肌样细胞形态特征, 见图1d。

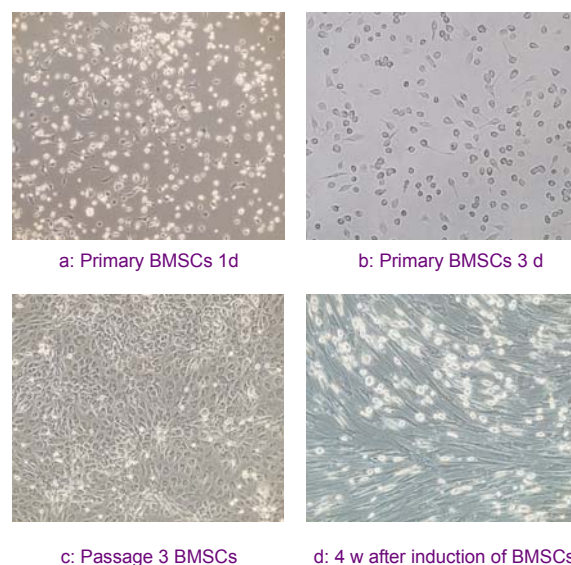
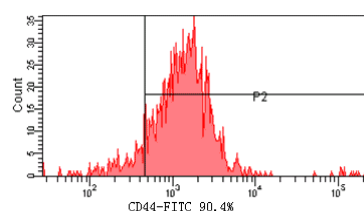


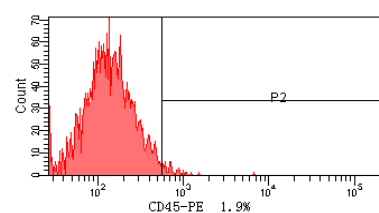
Figure 1 Morphological changes of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) during passage and after induction ($\times 200$)
图1 骨髓间充质干细胞培养传代及诱导后细胞形态学变化($\times 200$)

2.2 BMSCs表面特定抗原鉴定结果 见图2。

a: The positive expression of CD29



b: The positive expression of CD44



c: The positive expression of CD45

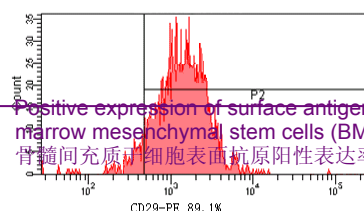
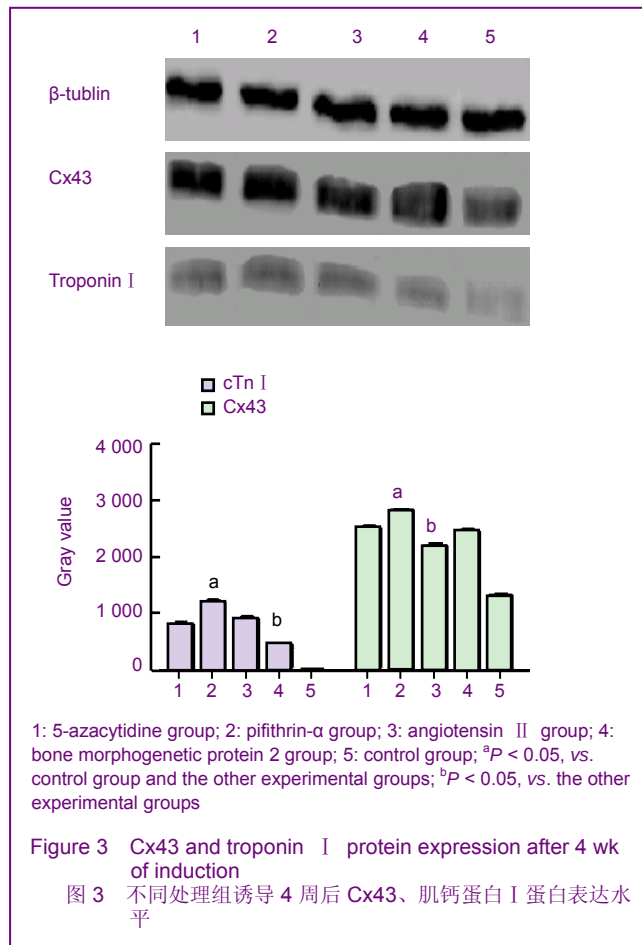


Figure 2 Positive expression of surface antigen of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)
图2 骨髓间充质干细胞表面抗原阳性表达率

对传至第3代的BMSCs进行鉴定, 采用流式细胞仪技术鉴定表面特征性抗原CD29, CD44和CD45, 结果显示, BMSCs表面特征性抗原CD29阳性表达率为89.1%, CD44阳性表达率为90.4%, 而CD45阳性表达率为1.9%。与文献报道相一致^[13]。证明采用密度梯度离心法和贴壁分离法联合分离大鼠BMSCs, 经过传代培养增殖, 可以获得纯化的BMSCs。

2.3 BMSCs诱导后4周Cx43、肌钙蛋白 I 蛋白表达量见图3。

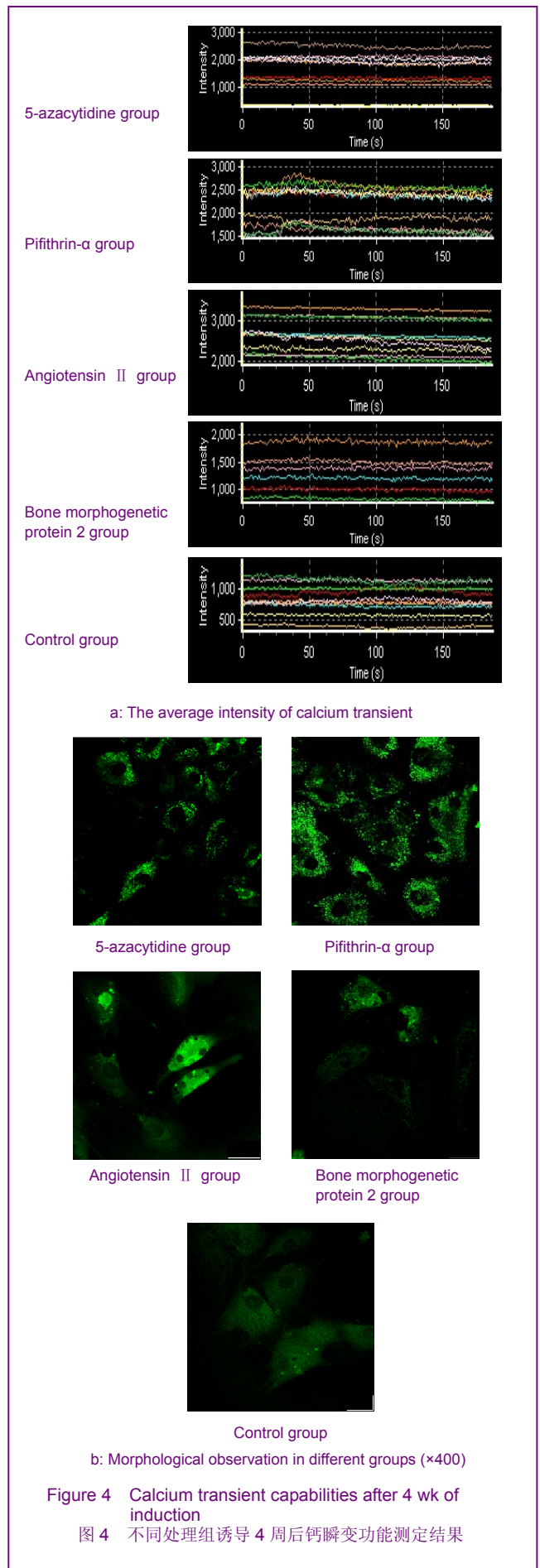


Western blotting法测定不同处理组诱导24 h后Cx43、肌钙蛋白 I 蛋白的表达量。

经统计学分析卡方检验结果显示, 除对照组外, 各组均有肌钙蛋白 I 蛋白的表达, 但PFT-α组较其余各组表达量多($P < 0.05$), 5-氮杂胞苷组与ANG-II组差异无显著性意义($P > 0.05$), 骨形态发生蛋白2组较其他实验组表达少($P < 0.05$)。

而Cx43蛋白在各组之间均有表达, 对照组较各实验组表达量少($P < 0.05$), PFT-α组较其余各组表达量多($P < 0.05$), 5-氮杂胞苷组与骨形态发生蛋白2组差异无显著性意义($P > 0.05$), ANG-II组较其余实验组表达少($P < 0.05$)。

2.4 BMSCs诱导后4周的钙瞬变功能测定结果 见图4。



激光共聚焦显微镜检测不同处理组诱导4周后钙瞬变功能, 钙瞬变平均荧光强度在5-氮杂胞苷组为 $1\ 686.177 \pm 499.122$, 在PFT- α 组为 $2\ 156.606 \pm 385.355$, 在ANG- II组为 $2\ 627.666 \pm 407.329$, 在骨形态发生蛋白2组为 $1\ 301.910 \pm 338.681$, 在对照组中为 824.928 ± 222.399 , 荧光强度ANG- II > PFT- α > 5-氮杂胞苷 > 骨形态发生蛋白2 > 对照组。

经方差分析和多重比较, 各组之间差异均有非常显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论

心肌梗死的发病率逐渐提高, 心肌梗死后坏死心肌细胞的修复是治疗效果的关键。虽然干细胞具有自我更新和分化为多种细胞系的能力, 而心肌梗死后的心肌细胞组织修复一般认为是心脏自体干细胞的动员, 但是其自身的修复缓慢, 细胞来源有限, 体外扩增技术困难, 移植后存活率低等缺点。而BMSCs提取分离, 在体外扩增, 诱导为心肌样细胞后移植, 则具有较好的可行性及疗效^[19]。而注射未经处理过的BMSCs同样具有心肌修复和提高心功能的作用^[20]。大多数关于BMSCs治疗动物心肌梗死模型或者急性心肌梗死患者的研究均显示可以有效改善心功能^[21-23]。

5-氮杂胞苷作为公认的可诱导BMSCs向心肌细胞分化的化学试剂, 其主要机制可能共价结合DNA从而导致DNA甲基在细胞分裂中进行性丢失从而去甲基化, 并启动了生肌调节因子MyoD的表达^[24]。

血管紧张素II是一种肽类激素同时也是一种生长因子, 刺激血管平滑肌细胞、成纤维细胞增生^[25-26], 其可能通过激活MAPK, 转化生长因子信号通路诱导BMSCs分化为心肌样细胞。

骨形态发生蛋白是一种多功能信号分子, 可以调节多种细胞的生长分化^[27-30]。目前认为骨形态发生蛋白2通过受体激活并经Smads、P38MAPK和PI-3K这3条信号转导通路进行心肌转录因子表达的调节, 从而诱导BMSCs的分化。

P53抑癌基因编码的P53蛋白及其下游P21蛋白具有抑制细胞癌变的作用, 同时能够抑制干细胞分化和增殖。通过特异性抑制剂PFT- α 阻断P53-P21蛋白通路, 能够显著的提高干细胞的分化率^[31]。

对于不同诱导剂诱导BMSCs分化形成心肌样细胞, 其影响不同信号通路从而可能对细胞功能产生不同的影响。本实验发现, 经过诱导后, 各实验组均有心肌特异性蛋白肌钙蛋白I表达, 其中P53组表达量最多, 5-氮杂胞苷组和ANG- II组次之, 骨形态发生蛋白2组较对照组表达量多。而在钙瞬变功能检测中发现ANG- II荧光强度最高, P53组、5-氮杂胞苷组、骨形态发生蛋

白2组荧光强度依次降低, 于心肌特异性蛋白表达量不完全一致, 提示不同诱导剂对诱导分化形成的心肌样细胞功能产生不同的影响。

另本实验仅针对不同实验组钙瞬变功能进行了检测, 尚不能完全说明诱导分化形成心肌样细胞的功能, 进一步将会采用膜片钳技术对其电生理功能进行测定, 以进一步比较不同诱导剂对BMSCs诱导分化形成心肌样细胞功能的影响。

4 参考文献

- [1] Wang H, Zhou J, Liu Z, et al. Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(5): 1044-1055.
- [2] Price MJ, Chou CC, Frantzen M, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol*. 2006;111(2):231-239.
- [3] Schueller PO, Meyer C, Brehm M, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transplantation beneficially modulates heart rate variability. *Int J Cardiol*. 2007;119(3):398-399.
- [4] Zhu H, Song X, Jin LJ, et al. Comparison of intra-coronary cell transplantation after myocardial infarction: Autologous skeletal myoblasts versus bone marrow mesenchymal stem cells. *J Int Med Res*. 2009;37(2):298-307.
- [5] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):295-303.
- [6] Xu M, Uemura R, Dai Y, et al. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):441-448.
- [7] Zhang RL, Jiang EL, Wang M, et al. Ameliorative effect of rat bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on infarcted heart function. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2009;17(2): 390-394.
- [8] Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007;6(5):593-597.
- [9] Xinyun C, Zhi Z, Bin Z, et al. Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with 5-azacytidine in vitro. *Int J Cardiol*. 2010;143(2):171-177.
- [10] Wang XY, Tan YZh, Wang HJ, et al. Jieyou Xuebao. 2006;37(5): 525-529.
- [11] 王新艳, 谭玉珍, 王海杰, 等. Smad信号通路在骨髓源性心肌干细胞向心肌分化中的作用[J]. 解剖学报, 2006, 37(5): 525-529.
- [11] Yuan Y, Lv AL, Chen D, et al. Xinzang Zazhi. 2006;18(3):258-261.
- [12] 苑媛, 吕安林, 陈丹, 等. 血管紧张素II诱导人骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 心脏杂志, 2006, 18(3): 258-261.
- [12] Xing Y, Lv A, Wang L, et al. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem*. 2011; 360(1-2):279-287.
- [13] Yan XB, Lv AL, Liu BW, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(14):2482-2486.
- [13] 燕学波, 吕安林, 刘博武, 等. P53-P21蛋白通路对5-氮杂胞苷诱导的大鼠骨髓间充质干细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(14): 2482-2486.
- [14] The ministry of science and technology of the People's Republic of China. Guidance suggestions for the care and use of laboratory animals. 2006-09-30.
- [15] Adolphe M, Parodi AL. Ethical issues in animal experimentation. *Bull Acad Natl Med*. 2009;193(8):1803-1804.
- [16] Zhang Y, Cheng JL, Li HL, et al. Zhongguo Yixue Gongcheng. 2011; 19(1):33-34,36.
- [16] 张勇, 程敬亮, 李华丽, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离与原代培养[J]. 中国医学工程, 2011, 19(1): 33-34, 36.
- [17] Li XF, Zhao JM, Su W, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(10):1721-1725.
- [17] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725.
- [18] Sun Q, Hu H, Zhou J, et al. Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao: Yixueban. 2010, 31(4):447-449.
- [18] 孙强, 胡浩, 周筠, 等. 肥胖抑制素对大鼠心室肌细胞收缩及L-型钙通道的影响[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(4): 447-449.

- [19] Cao F, Sun D, Li C, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J*. 2009; 30(16):1986-1994.
- [20] Kim YJ, Huh YM, Choe KO, et al. In vivo magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells in rat myocardial infarction; simultaneous cell tracking and left ventricular function measurement. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2009; 25(Suppl 1):99-109.
- [21] Kudo M, Wang Y, Wani MA, et al. Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(9):1113-1119.
- [22] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002; 106(15): 1913-1918.
- [23] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;108(18):2212-2218.
- [24] Geng J, Peng F, Xiong F, et al. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2009;11(7):849-863.
- [25] Endtmann C, Ebrahimian T, Czech T, et al. Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration. *Hypertension*. 2011;58(3): 394-403.
- [26] Xu J, Lin SC, Chen J, et al. CCR2 mediates the uptake of bone marrow-derived fibroblast precursors in angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(2): H538-547.
- [27] Surmacz B, Noisa P, Risner-Janiczek JR, et al. DLK1 Promotes Neurogenesis of Human and Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors Via Modulating Notch and BMP Signalling. *Stem Cell Rev*. 2011. [Epub ahead of print]
- [28] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2011; 112(12): 3491-3501.
- [29] Xu X, Browning VL, Odorico JS. Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech Dev*. 2011;128(7-10): 412-427.
- [30] Ren Y, Lee MY, Schliffke S, et al. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(3): 280-287.
- [31] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 2009;460:1132-1136.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 第一作者负责实验设计, 经导师吕安林教授修改, 实施者为第一、二作者, 评估者为第二、三、五、六作者, 资料收集者为第一、四作者, 第一作者成文, 第七、八作者审核, 第一作者对文章负责。均接受过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主及其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章概要:

文章要点: 检索 Pubmed 数据库和中国学术期刊全文数据库 2001/2010 的相关文献, 5-氮杂胞苷、血管紧张素 II、骨形态发生蛋白 2、P53 特异性抑制剂 PFT-α 均为诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞的有效化学试剂, 但对其诱导分化后形成心肌样细胞功能学方面的研究则未检索到。

关键信息: 在动物模型和临床治疗中已经证明了 BMSCs 移植治疗心肌梗死和提高心功能具有显著疗效, 但 BMSCs 或经化学诱导剂诱导分化移植到心脏之后所具备的功能尚未明确, 且目前研究尚存在其致心律失常风险的争议, 所以研究 BMSCs 经不同诱导剂分化形成的心肌样细胞功能以及其移植入心脏的安全性非常重要。

研究的创新之处: 文章首次通过比较不同化学诱导剂诱导 BMSCs 分化形成心肌样细胞后心肌特异性蛋白表达和钙瞬变功能, 以及观察不同信号通路对大鼠 BMSCs 诱导分化后的心肌样细胞蛋白表达和功能方面的作用, 证明了不同诱导剂对 BMSCs 诱导分化形成心肌样细胞的功能产生了不同影响。

SCI 收录的 Cell Calcium (《细胞钙》) 杂志介绍

英文刊名: Cell Calcium

中文刊名: 《细胞钙》

ISSN: 0143-4160

2010 年影响因子: 3.553

出版周期: 12 期/年

年发文量: 98 篇

出版公司: CHURCHILL LIVINGSTONE

收录数据库: Science Citation Index; Science Citation Index Expanded; Current Contents - Life Sciences; BIOSIS Previews

期刊网址: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623014/description#description

英文简介:

Cell Calcium covers all fields of calcium metabolism and signalling in living systems, publishing works from all branches of life science and medicine. This includes all aspects of calcium in biological systems from inorganic chemistry to physiology, molecular biology and pathology.

中文简介:

《细胞钙》刊载生命系统中钙代谢及钙调节作用, 涵盖生命科学和医学范畴, 包括相关的化学、生物学和医学等方面的研究论文和文献题录。