

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.10.022 [http://www.crter.org]

李旭, 王亚玲. 丹酚酸 B 及丹参酮 II A 诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(10):1849-1855.

丹酚酸 B 及丹参酮 II A 诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞*

李旭¹, 王亚玲²

1 河北北方学院, 河北省张家口市 075000

2 河北北方学院附属第一医院心内科, 河北省张家口市 075000

文章亮点:

中药丹参的主要化学成分包括以丹酚酸 B 为代表的水溶性酚酸类化合物和以丹参酮 II A 为代表的醇溶性菲醌类化合物。实验结果显示应用丹参的有效成分丹酚酸 B、丹参酮 II A 联合诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的效果优于单一诱导, 为体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞提供更为安全、高效的新方法。

关键词:

干细胞; 干细胞与中医药; 丹酚酸 B; 丹参酮 II A; 骨髓间充质干细胞; 心肌细胞; 诱导分化; 结蛋白; 肌动蛋白; 肌钙蛋白; 缝隙连接蛋白 43; 干细胞图片文章

摘要

背景: 目前大多数研究者采用 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞, 存在着一定的不良反应, 难以应用于临床。中药丹参本身在临床上广泛用于治疗心血管系统疾病, 其主要化学成分为丹酚酸 B 和丹参酮 II A。

目的: 观察丹酚酸 B 及丹参酮 II A 联合诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞的效果。

方法: 取 SD 大鼠四肢骨髓, 分离培养骨髓间充质干细胞, 应用丹酚酸 B、丹参酮 II A 及二者联合分别对第 2 代骨髓间充质干细胞定向诱导, 不加诱导剂为空白对照组。3 d 后各实验组去除诱导培养基, 用正常培养基继续培养 4 周。

结果与结论: 空白对照组细胞结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白 T 及缝隙连接蛋白 43 均为弱阳性或阴性表达。与空白对照组相比, 丹酚酸 B 组, 丹参酮 II A 组, 丹酚酸 B+丹参酮 II A 组骨髓间充质干细胞各标记物阳性表达均明显升高, 且差异有显著性意义($P < 0.01$)。其中, 二者联合诱导组各标记物的阳性率均最高。荧光免疫细胞化学鉴定可见诱导组细胞质内结蛋白的表达呈红色, 肌钙蛋白 T 的表达呈绿色, 当两者同时被观察时可见其重叠的部位变成黄色。结果显示丹酚酸 B 及丹参酮 II A 均可分别诱导骨髓间充质干细胞获得心肌分化表型, 且二者联合诱导效果最好。

李旭★, 男, 1980 年生, 山西省太原市人, 汉族, 河北北方学院在读硕士, 医师, 主要从事心血管病的基础与临床研究。
lixubfy@163.com

通讯作者: 王亚玲, 硕士, 副主任医师, 河北北方学院附属第一医院心内科, 河北省张家口市 075000

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)10-01849-07

收稿日期: 2012-05-22
修回日期: 2012-07-24
(20120522002/M·C)

Salvianolic acid B and tanshinone II A induce bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells

Li Xu¹, Wang Ya-ling²

1 Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

2 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: To date, most researchers use 5-azacytidine to induce the bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocytes, and there are certain adverse reactions which are difficult to be applied in the clinic. Chinese medicine *Danshen* is widely used in the clinical treatment of cardiovascular diseases, and its main chemical components are salvianolic acid B and tanshinone II A

OBJECTIVE: To explore the effect of salvianolic acid B and tanshinone II A in inducing bone marrow

Li Xu★, Studying for master's degree, Physician, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
lixubfxy@163.com

Corresponding author: Wang Ya-ling, Master, Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Received: 2012-05-22
Accepted: 2012-07-24

mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells of Sprague-Dawley rats were isolated and cultured from rat bone marrow, and then the second generation of bone marrow mesenchymal stem cells were induced by salvianolic acid B, tanshinone II A and their combination. The cells without inductor were considered as blank control group. After cultured for 3 days, the induction medium was removed and cultured with normal culture medium for 4 weeks.

RESULTS AND CONCLUSION: Desmin, α -sarcomeric actin, cardiac troponin T and connexin 43 in the blank control group showed weakly positive or negative expression. Compared with the blank control group, the positive expressions of desmin, α -sarcomeric actin, cardiac troponin T and connexin 43 in salvianolic acid B group, tanshinone II A group and salvianolic acid B + tanshinone II A group were significantly increased, and the differences were significant ($P < 0.01$). The positive expression rate of the markers above was highest in the salvianolic acid B + tanshinone II A group. Fluorescent immunocytochemistry staining showed that the expression of desmin in the cells of induction groups was red and the expression of cardiac troponin T was green, while the part that overlaps was yellow. The results showed that salvianolic acid B and tanshinone II A may induce bone marrow mesenchymal stem cells to acquire cardiogenic phenotype separately, and the effect of combined induction is better than single ingredient.

Key Words: stem cells; stem cells and traditional Chinese medicine; salvianolic acid B; tanshinone II A; bone marrow mesenchymal stem cells; cardiomyocytes; differentiation; desmin; α -sarcomeric actin; cardiac troponin T; connexin 43; stem cell photographs-containing paper

Li X, Wang YL. Salvianolic acid B and tanshinone II A induce bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(10):1849-1855.

0 引言

骨髓间充质干细胞是一类具有强大增殖与分化能力、容易取材,且具有良好前景的种子细胞。由于骨髓间充质干细胞的分离、培养以及纯化技术日趋成熟,目前越来越多的研究已转向如何使骨髓间充质干细胞定向分化为所需细胞。

骨髓间充质干细胞在一定的诱导条件下可定向分化为心肌细胞,目前大多数研究者采用的诱导剂是5-氮胞苷^[1-3]。但5-氮胞苷毕竟是一种化学药物,存在着一定的不良反应,难以应用于临床。中药丹参本身在临床上广泛用于治疗心血管系统疾病,其主要化学成分包括以丹酚酸B为代表的水溶性酚酸类化合物和以丹参酮IIA为代表的醇溶性菲醌类化合物,具有抗心肌缺血、抗氧化、抗凝、抗血栓及调节血脂、增加冠脉流量、改善心脏功能、抗炎等作用。

实验将采用丹酚酸B及丹参酮IIA联合对骨髓间充质干细胞进行体外诱导,使其定向分化为心肌细胞,并从形态学、蛋白表达等层面观察诱导的有效性,从而探索体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞更为安全、高效的新方法。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2011年11月至2012年4月在河北北方学院生命科学中心细胞实验室完成。

材料:

实验动物: 健康SD大鼠,2周龄,体质量15-25 g,雌雄不限,购自河北北方学院动物实验中心。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。

主要试剂:**Main reagents:**

试剂	来源
IMDM 培养基	美国 GIBCO 公司
胎牛血清	北京 Hyclone 公司
丹酚酸 B、丹参酮 II A	西安鸿生公司
α -横纹肌肌动蛋白, 结蛋白, 缝隙连接蛋白 43, 肌钙蛋白 T	北京博奥森公司
免疫细胞化学染色试剂盒	北京四正柏公司
FITC 标记的二抗, CY3 标记的三抗	北京中杉金桥生物技术 有限公司

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离培养: 2周龄SD大鼠颈椎脱臼法处死, 在体积分数为75%乙醇中浸泡10 min。无菌条件下快速取胫骨和股骨, 去除周围组织, 切除胫骨和股骨两端, 放入含有D-Hank's液/双抗(青霉素100 mg/L, 链霉素100 g/L)的缓冲液中冲洗2次。显露骨髓腔, 用培养液将骨髓腔中的骨髓冲出后收集离心, 1 500 r/min(离心半径为11.5 cm)离心5 min, 弃上清液。加入含体积分数为10%胎牛血清的IMDM培养基反复吹打, 细胞计数后以 $1 \times 10^4 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于培养瓶中, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂的培养箱中培养。24 h后换液, 此后每3 d换液1次, 贴壁细胞达90%融合时用0.5% trypsin和0.04% EDTA(1:1)消化, 以1:2接种传代。

骨髓间充质干细胞的诱导及继续培养: 第2代细胞生长48 h后加入诱导剂, 将细胞依据诱导剂分为4组, 丹酚酸B组, 丹参酮II A组, 丹酚酸B+丹参酮II A组及空白对照组, 丹酚酸B与丹参酮II A的终质量浓度分别为250 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$; 空白对照组加入不含诱导剂的培养基。3 d后各实验组去除诱导培养基, 用正常培养基继续培养4周。

骨髓间充质干细胞诱导分化的免疫细胞化学检测: 将诱导培养4周的细胞进行爬片, PBS冲洗, 40 g/L多聚甲醛固定, PBS冲洗, 体积分数为3%过氧化氢-甲醇室温10 min, 枸橼酸盐缓冲液微波炉修复15 min, 正常山羊血清室温下封闭10 min, 分别加结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白T及缝隙连接蛋白43单克隆抗体(浓度均为1:100), 4 °C过夜(加PBS作空白对照); PBS冲洗, 加生物素标记的二抗, 室温孵育60 min; PBS冲洗, 链酶卵白素-过氧化物酶, 室温孵育60 min; PBS冲洗, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固, 光镜下观察, 阳性结果为细胞质呈棕黄色, 于光镜下随机取10个非重叠视野, 计算结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白T及缝隙连接蛋白43阳性细胞百分率。

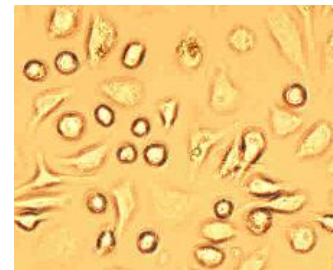
骨髓间充质干细胞诱导分化的免疫荧光细胞化学检测: 将

诱导培养4周的细胞进行爬片, 40 g/L多聚甲醛固定, 体积分数为3%过氧化氢-甲醇室温10 min, 枸橼酸盐缓冲液微波炉修复, 正常山羊血清封闭, 加desmin单克隆抗体, 4 °C过夜, PBS冲洗, 加生物素标记的二抗, 室温孵育60 min, PBS冲洗, 加CY3标记的三抗, 室温孵育60 min, PBS冲洗, 加cTnT单克隆抗体4 °C过夜, PBS冲洗, FITC标记的二抗室温孵育60 min, PBS冲洗, 甘油封固, Leica TCS-ST2激光扫描共聚焦显微镜观察。

统计学分析: 应用SPSS 13.0统计软件对资料进行分析, 各项检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 当方差分析有显著性差异时, 进一步用 q 检验作两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养与诱导 倒置显微镜下观察接种到培养瓶中的原代细胞, 多单个圆球形漂浮于培养瓶内; 接种24 h后, 出现少许贴壁细胞, 换液逐渐去除未贴壁细胞; 5 d后贴壁细胞逐渐变为纺锤形或梭形, 并伸出伪足相互连接, 见图1。



注: 取2周龄SD大鼠四肢骨髓, 分离培养骨髓间充质干细胞, 空白对照组不加诱导剂。

图1 空白对照组原代培养5 d后贴壁细胞逐渐变为纺锤形或梭形, 并伸出伪足相互连接($\times 200$)

Figure 1 After primary cultured for 5 d in the control group, the adherent cells gradually become fusiform or spindle-shaped, and extend pseudopodia and interconnected ($\times 200$)

细胞于培养的9-11 d渐渐铺满培养瓶, 进行传代。第2代细胞生长48 h后加入诱导剂, 随后细胞形态发生明显改变。丹酚酸B组诱导7 d时细胞以梭形、柱形为主, 细胞形态变长, 体积增大, 大小不等, 部分有分支, 并互相连接, 见图2。丹参酮II A组诱导10 d后细胞形态多为类长柱形, 核卵圆形, 位于中央。二者联合诱导组于诱导2周后开始出现细胞间连接, 见图3。4周时细胞体积变小, 呈条梭状排列, 可见类肌管样结构。

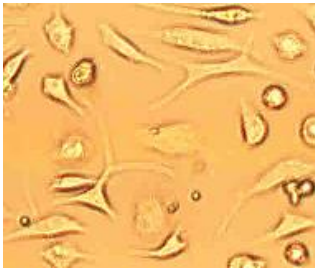


图2 第2代大鼠骨髓间充质干细胞经丹酚酸B诱导7 d时细胞以梭形、柱形为主, 细胞形态变长, 体积增大, 大小不等, 部分有分支, 并互相连接(x200)

Figure 2 The second generation of bone marrow mesenchymal stem cells were fusiform and cylindrical cells after induced with salvianolic acid B for 7 d, and the cells became longer, the size was increased and varied, some branches appeared and connected to each other (x200)



图3 第2代大鼠骨髓间充质干细胞经丹酚酸B与丹参酮II A联合诱导2周后开始出现细胞间连接(x200)

Figure 3 The second generation of bone marrow mesenchymal stem cells were connected with each other after induced by salvianolic acid B and tanshinone II A for 2 wk (x200)

2.2 免疫细胞化学鉴定 空白对照组细胞结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白T及缝隙连接蛋白43均为弱阳性或阴性表达, 见图4-7。

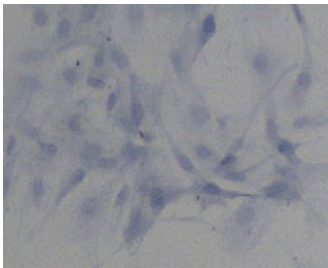


图4 不加诱导剂的空白对照组骨髓间充质干细胞结蛋白阴性表达(SP, x400)

Figure 4 Negative expression of desmin on bone marrow mesenchymal stem cells in the control group (SP, x400)

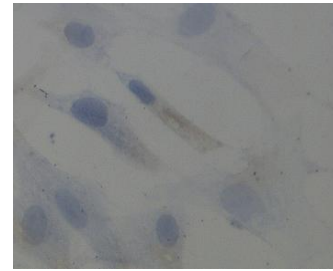


图5 不加诱导剂的空白对照组骨髓间充质干细胞 α -横纹肌肌动蛋白弱阳性表达(SP, x400)

Figure 5 Weakly positive expression of α -sarcomeric actin on bone marrow mesenchymal stem cells in the control group (SP, x400)

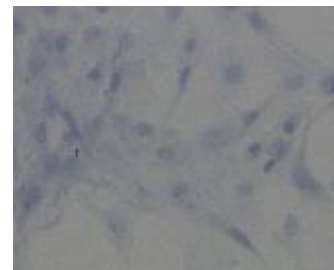


图6 不加诱导剂的空白对照组骨髓间充质干细胞肌钙蛋白T阴性表达(SP, x400)

Figure 6 Negative expression of cardiac troponin T on bone marrow mesenchymal stem cells in the control group (SP, x400)

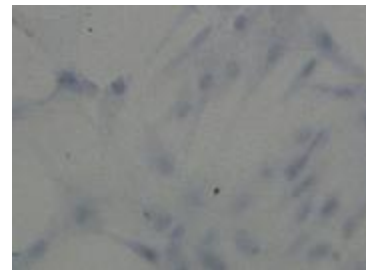


图7 不加诱导剂的空白对照组骨髓间充质干细胞缝隙连接蛋白43阴性表达(SP, x400)

Figure 7 Negative expression of connexin 43 on bone marrow mesenchymal stem cells in the control group (SP, x400)

与空白对照组相比, 丹酚酸B组, 丹参酮II A组, 丹酚酸B+丹参酮II A组骨髓间充质干细胞各标记物阳性表达均明显升高, 且差异有显著性意义($P < 0.01$)。其中, 二者联合诱导组各标记物的阳性率均最高, 见表1, 图8-11。

表 1 各组骨髓间充质干细胞 4 种标志物阳性表达率的比较

Table 1 Positive rate of desmin, α -sarcomeric actin, cardiac troponin T and connexin 43 in the bone marrow mesenchymal stem cells in each group ($\bar{x}\pm s$, %)

组别	结蛋白	α -横纹肌肌动蛋白	肌钙蛋白T	缝隙连接蛋白43
丹酚酸 B组	55.31 \pm 11.37 ^c	47.47 \pm 9.58 ^c	35.35 \pm 11.37 ^c	40.36 \pm 9.87 ^{ac}
丹参酮 II A组	51.28 \pm 10.48 ^{ac}	45.25 \pm 10.15 ^{ac}	31.87 \pm 10.26 ^{ac}	33.82 \pm 10.45 ^{bc}
丹酚酸 B+丹参酮 II A组	58.86 \pm 11.06 ^c	51.27 \pm 9.04 ^c	39.86 \pm 9.88 ^c	45.28 \pm 10.79 ^c
空白对照组	8.63 \pm 10.03 ^b	8.12 \pm 9.87 ^b	7.99 \pm 9.58 ^b	8.03 \pm 10.96 ^b

与丹酚酸 B+丹参酮 II A 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与空白对照组比较, ^c $P < 0.01$ 。



图 8 丹酚酸 B+丹参酮 II A 联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导 4 周后结蛋白阳性表达 (SP, $\times 400$)

Figure 8 Positive expression of desmin on bone marrow mesenchymal stem cell in the salvianolic acid B+tanshinone II A group after induced for 4 wk (SP, $\times 400$)

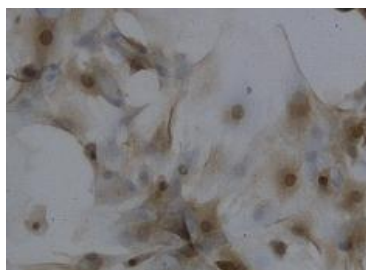


图 9 丹酚酸 B+丹参酮 II A 联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导 4 周后 α -横纹肌肌动蛋白阳性表达(SP, $\times 400$)

Figure 9 Positive expression of α -sarcomeric actin on bone marrow mesenchymal stem cells in the salvianolic acid B+ tanshinone II A group after induced for 4 wk (SP, $\times 400$)

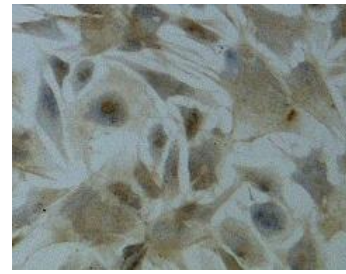


图 10 丹酚酸 B+丹参酮 II A 联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导 4 周后肌钙蛋白 T 阳性表达(SP, $\times 400$)

Figure 10 Positive expression of cardiac troponin T on bone marrow mesenchymal stem cells in the salvianolic acid B+tanshinone II A group after induced for 4 wk (SP, $\times 400$)

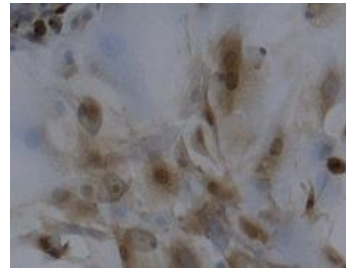


图 11 丹酚酸 B+丹参酮 II A 联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导 4 周后缝隙连接蛋白 43 阳性表达 (SP, $\times 400$)

Figure 11 Positive expression of connexin 43 on bone marrow mesenchymal stem cells in the salvianolic acid B+tanshinone II A group after induced for 4 wk (SP, $\times 400$)

2.3 荧光免疫细胞化学鉴定 荧光免疫细胞化学鉴定可见诱导组细胞质内结蛋白的表达呈红色, 肌钙蛋白T的表达呈绿色, 当两者同时被观察时可见其重叠的部位变成黄色, 见图12-14。

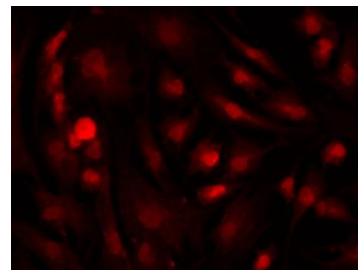


图 12 丹酚酸 B+丹参酮 II A 联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导 4 周后免疫荧光结蛋白表达红色($\times 400$)

Figure 12 Red immunofluorescence of desmin expression was observed on bone marrow mesenchymal stem cells in the salvianolic acid B+ tanshinone II A group after induced for 4 wk ($\times 400$)

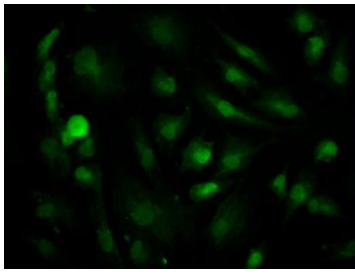


图 13 丹酚酸B+丹参酮IIA联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导4周后免疫荧光肌钙蛋白T表达绿色($\times 400$)

Figure 13 Green immunofluorescence of cardiac troponin T expression was observed on bone marrow mesenchymal stem cells in the salviaolic acid B+ tanshinone II A group after induced for 4 wk ($\times 400$)

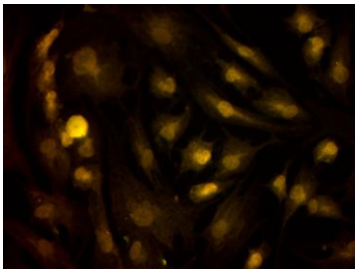


图 14 丹酚酸B+丹参酮IIA联合诱导组骨髓间充质干细胞诱导4周后免疫荧光二者重叠部位黄色($\times 400$)

Figure 14 The overlapping part of immunofluorescence staining was yellow on the bone marrow mesenchymal stem cells in the salviaolic acid B+ tanshinone II A group after induced for 4 wk ($\times 400$)

3 讨论

骨髓间充质干细胞是一种多能干细胞,具有多向分化潜能,可以分化为软骨、骨、血管内皮、神经、肝及心肌样细胞等。研究表明移植干细胞能修复心肌细胞、改善心肌灌注和心功能^[4]。丹参在临床上广泛用于治疗心血管系统疾病,其化学成分主要包括水溶性酚酸类化合物丹酚酸B和醇溶性菲醌类化合物丹参酮IIA,具有抗心肌缺血、抗氧化、抗凝、抗血栓及调节血脂、增加冠脉流量、改善心脏功能、抗炎等作用。新近研究表明,丹酚酸B具有促进骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子,促进相关基因表达,从而诱导骨髓间充质干细胞分化的作用^[5-6],丹参酮IIA单体成分也能够诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化^[7]。但目前尚未见二者联合诱导的相关报道。实验研究结果显示,

丹酚酸B组诱导7 d时细胞以梭形、柱形为主,细胞形态变长,体积增大,大小不等,部分有分支,并互相连接。丹参酮IIA组诱导10 d后细胞形态多为类长柱形,核卵圆形,位于中央。二者联合诱导2周后开始出现细胞间连接,4周时细胞体积变小,呈条梭状排列,可见类肌管样结构。这说明丹酚酸B及丹参酮IIA均可单独诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞,与上述研究结果相一致。实验结果还说明,丹酚酸B与丹参酮IIA联合诱导效果更好。

为了进一步鉴定诱导的有效性,作者对所培养的细胞进行了蛋白检测。结蛋白作为心肌细胞分化的一种标志已经得到公认,它是一种心肌细胞较早出现的细胞骨架蛋白,对维持肌肉细胞的收缩装置起重要作用^[8]。 α -横纹肌肌动蛋白是骨骼肌与心肌中细肌丝的组成成分之一。二者均是鉴定骨髓间充质干细胞向横纹肌分化的重要标记物。实验结果显示,空白对照组细胞结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白均为弱阳性或阴性表达。与空白对照组相比,丹酚酸B组,丹参酮IIA组,丹酚酸B+丹参酮IIA组骨髓间充质干细胞结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白的阳性表达均明显升高,且差异有显著性意义。其中,联合诱导组各标记物的阳性率均最高。结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白的阳性表达首先说明了骨髓间充质干细胞发生了肌源性分化。

心肌肌钙蛋白仅存于心肌中,由3个亚单位即肌钙蛋白I,肌钙蛋白C和肌钙蛋白T组成,三者之间形成复合物,共同调节心肌的舒缩运动。其中,肌钙蛋白T有较高的心肌特异性^[9]。缝隙连接蛋白43是心肌闰盘缝隙连接的主要结构蛋白,它的阳性表达表明分化后的细胞能够进行同步收缩。实验结果显示,空白对照组细胞肌钙蛋白T、缝隙连接蛋白43均为弱阳性或阴性表达。与空白对照组相比,丹酚酸B组,丹参酮IIA组,丹酚酸B+丹参酮IIA组骨髓间充质干细胞肌钙蛋白T、缝隙连接蛋白43的阳性表达均明显升高,且差异有显著性意义。其中,联合诱导组各标记物的阳性率均最高。但研究结果也显示,肌钙蛋白T及缝隙连接蛋白43的阳性率均要低于结蛋白、 α -横纹肌肌动蛋白的阳性率,说明骨髓间充质干细胞大部分是被诱导为成肌细胞,一部分分化为心肌细胞,骨髓间充质干细胞是经过成肌细胞向心肌样细胞分化而成的。实验的荧光免疫细胞化学结果也再次鉴定了诱导分化的有效性。

综上所述, 实验根据诱导后细胞的基本形态, 结合蛋白表达分析, 印证了丹酚酸B及丹参酮IIA均能单独在体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞转化, 且二者联合诱导效果更佳。诱导后分化的细胞具有心肌细胞的特性。这为骨髓间充质干细胞体外诱导向心肌细胞分化提供了一种新的思路, 具体的机制仍需要进一步实验去深入探讨。

作者贡献: 实验设计、实验评估、文章的审校均为通讯作者王亚玲副主任医师, 实验资料的收集、具体的实验实施、论文的撰写均由第一作者李旭完成。李旭对文章负责。

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。

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。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Labovsky V, Hofer EL, Feldman L, et al. Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal cells: Role of cardiac extract from neonatal rat cardiomyocytes. *Differentiation*. 2010;79(2):93-101.
- [2] Zhang Y, Chu Y, Shen W, et al. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;9(6):943-946.
- [3] Haghani K, Bakhtiyari S, Nouri AM. In vitro study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):315-320.
- [4] 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.
- [5] Chen J, Sun JC, Zou YH, et al. Jiefangjun Yixue Zazhi. 2008;33(3):276-278.
陈嘉, 孙京臣, 邹移海, 等. 丹酚酸B对骨髓间充质干细胞SCF表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(3):276-278.
- [6] Zhao GF, Fan YC, Jiang XJ. Effects of the proliferation state of the endothelial progenitor cells preconditional with salvianolic acid B and bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in acute myocardial infarction rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2012;32(5):671-675.
- [7] Lu CQ, Ran L, Zhang QB, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(47):9363-9366.
陆长青, 冉黎, 张全波, 等. 丹参诱导骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化及相关基因的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(47):9363-9366.
- [8] Chen XB, Yu ZB, Min JX, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2011; 33(10): 991-994.
陈小波, 余祖滨, 闵家新, 等. 大鼠心肌挫伤后细胞结蛋白破坏与钙超载的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10):991-994.
- [9] Zhu H. *Shiyong Yiji Zazhi*. 2008;15(14):1900-1902.
朱辉. 心肌肌钙蛋白的研究和应用[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(14): 1900-1902.