

心肌梗死后单个核细胞促间充质干细胞迁移的作用

张颖¹, 廖礼强¹, 张晓刚² (¹重庆市渝北区人民医院, 重庆市 401120; ²重庆医科大学附属第一医院, 重庆市 400016)

文章亮点:

- 1 文章的创新之处在于采用三室共培养模型观察不同细胞间的生物学影响, 在体外状态下模拟心肌梗死后炎症细胞、心肌细胞、间充质干细胞之间的生物学作用, 探讨间充质干细胞定向心肌归巢的可能机制。
- 2 结果显示, 基质细胞衍化因子 1/趋化因子受体 4 生物轴在心肌梗死后大鼠单个核细胞促间充质干细胞向心肌细胞迁移中发挥了一定作用。
- 3 不足之处在于机体是一个复杂的整体, 间充质干细胞定向心肌归巢的实现受体液中多种细胞因子的影响, 而体外实验对阐明这些细胞因子的共同作用存在局限性。

关键词:

干细胞; 移植; 间充质干细胞; 单个核细胞; 基质细胞衍化因子 1; 趋化因子受体 4; 心肌梗死; 细胞迁移

主题词:

间质干细胞; 单核细胞; 受体, 趋化因子; 心肌缺血; 细胞运动

摘要

背景: 心肌梗死后间充质干细胞定向心肌迁移的机制尚不甚明了。

目的: 探讨基质细胞衍化因子 1 和趋化因子受体 4 生物轴在心肌梗死后大鼠单个核细胞促间充质干细胞迁移中的作用。

方法: 分离培养 SD 大鼠心肌细胞及 SD 大鼠间充质干细胞。12 只 SD 大鼠其中 6 只建立心肌梗死模型, 6 只行假手术处理, 分离循环血单个核细胞, 采用三室共培养模型, 分别将 DAPI 标记的间充质干细胞、心肌细胞和单个核细胞培养于三室模型的上、中、下室内, 设立心肌梗死组、趋化因子受体 4 受体阻断剂 AMD3100 组、假手术组和空白对照组。培养 48 h 后, 荧光显微镜下观察并比较迁移细胞数目, 免疫细胞化学和免疫荧光染色分别检测心肌细胞基质细胞衍化因子 1 和迁移细胞趋化因子受体 4 的表达。

结果与结论: 除空白对照组外, 各组中室内均可见迁移细胞, 迁移细胞阳性表达趋化因子受体 4, 心肌梗死组迁移细胞数目显著高于其他各组, 加入肿瘤坏死因子 α 中和抗体和趋化因子受体 4 受体阻断剂 AMD3100 后, 迁移细胞数目明显减少 ($P < 0.05$)。各组心肌细胞阳性表达基质细胞衍化因子 1, 心肌梗死组及 AMD3100 组心肌细胞基质细胞衍化因子 1 表达灰度值显著高于假手术组及空白对照组 ($P < 0.05$)。表明基质细胞衍化因子 1/趋化因子受体 4 生物轴在心肌梗死后大鼠单个核细胞促间充质干细胞向心肌细胞迁移中发挥了一定作用。

张颖, 廖礼强, 张晓刚. 心肌梗死后单个核细胞促间充质干细胞迁移的作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1):119-124.

Mononuclear cells promote mesenchymal stem cell migration after myocardial infarction

Zhang Ying¹, Liao Li-qiang¹, Zhang Xiao-gang² (¹People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China; ²First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract

BACKGROUND: The mechanisms of mesenchymal stem cells directionally homing to infarcted myocardium post myocardial infarction are still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the role of stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) axis on mesenchymal stem cell migration promoted by mononuclear cells after myocardial infarction.

METHODS: Cardiomyocytes and mesenchymal stem cells were respectively isolated from suckling and adult Sprague-Dawley rats. Twelve healthy Sprague-Dawley rats were selected (six rats for myocardial infarction models and six for sham models), then circulating mononuclear cells were isolated. 4,6-Diamino-2-phenyl indole-labeled mesenchymal stem cells, cardiomyocytes and mononuclear cells were cultured into the upper, middle and lower layers of the tri-chamber coculture system, respectively. In this experiment, there were four groups: myocardial infarction group, AMD3100 (CXCR4 inhibitor) group, sham group and blank control group. After 48 hours, the number of migrating mesenchymal stem cells with blue-lighting nucleus was calculated under fluoroscope. Immunocytochemistry and immunofluorescent staining was used to detect SDF-1 expression in cardiomyocytes and CXCR4 expression in mesenchymal stem cells, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Migrating mesenchymal stem cells with positive expression of CXCR4 were observed in each group other than the blank control group. The number of migrating mesenchymal stem cells was higher in the myocardial infarction group than in the other groups. Tumor necrosis factor- α neutralizing

张颖, 女, 1983 年生, 四川省仪陇县人, 汉族, 2010 年重庆医科大学毕业, 硕士, 医师, 现就职于重庆市渝北区人民医院, 主要从事心肌细胞相关研究。

通讯作者: 廖礼强, 硕士, 医师, 重庆市渝北区人民医院, 重庆市 401120

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.01.020

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)01-00119-06

稿件接受: 2013-10-17

Zhang Ying, Master, Physician, People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China

Corresponding author: Liao Li-qiang, Master, Physician, People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China

Accepted: 2013-10-17

antibody and CXCR4 inhibitor AMD3100 could obviously reduce the number of migrating mesenchymal stem cells ($P < 0.05$). Cardiomyocytes in each group expressed SDF-1 positively. The gray values of SDF-1 expression in the myocardial infarction and AMD3100 groups were significantly higher than those in the sham and blank control groups ($P < 0.05$). SDF-1/CXCR4 axis plays a certain role in mesenchymal stem cells migration promoted by mononuclear cells after myocardial infarction.

Subject headings: mesenchymal stem cells; monocytes; receptors; chemokine; myocardial ischemia; cell movement

Zhang Y, Liao LQ, Zhang XG. Mononuclear cells promote mesenchymal stem cell migration after myocardial infarction. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(1):119-124.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是来源于骨髓的具有无限增殖与多向分化潜能的成体干细胞,在特定条件下能诱导分化为心肌细胞,是心肌梗死患者治疗首选的理想移植细胞^[1-5]。体内实验发现,间充质干细胞经血管途径移植后主要聚集于心脏梗死区及梗死周边区域^[6-8],这在空间上与单个核细胞(淋巴细胞、单核细胞)等炎症细胞出现的部位相同^[9]。因此,推测单个核细胞可能在促使间充质干细胞向梗死心肌迁移过程中发挥了一定作用。

作者在体外实验中发现,心肌梗死后大鼠单个核细胞分泌的肿瘤坏死因子 α 能在一定程度上增强间充质干细胞黏附性从而促进间充质干细胞向心肌迁移^[10]。但中和肿瘤坏死因子 α 并未能完全阻断间充质干细胞的迁移,基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴是否参与其中有待进一步研究。

弄清间充质干细胞心脏“归巢”的机制将有利于提高移植的成功率,促进梗死心肌的再生修复,将来在临床实践中广泛应用时有助于加快心肌梗死患者的恢复。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于2009年3月至2010年2月在重庆市神经病学重点实验室完成。

材料:

心肌梗死后单个核细胞促间充质干细胞迁移实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	美国 Gibco
胎牛血清	以色列 BioInd
兔抗大鼠 CD44 及 CD34 一抗、肿瘤坏死因子 α 中和抗体、兔抗大鼠基质细胞衍化因子1及趋化因子受体4一抗及罗丹明标记小鼠抗兔二抗	中国北京博奥森
SABC 试剂盒	中国武汉博士德
DAPI	中国上海碧云天
AMD3100	中国武汉基因美
Transwell 小室	上海 Millipore
荧光显微镜	日本 Olympus

实验动物: 二三月龄清洁级健康雄性SD大鼠13只,体重(220 $\pm$ 30)g,其中1只用于分离间充质干细胞,其余12

只用于分离单个核细胞(其中行心肌梗死手术6只,行假手术6只);1~3 d龄新生SD大鼠25只用于分离培养心肌细胞。所有实验动物由重庆医科大学实验动物中心提供,批准号:SCXK(渝):2007-0001。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。

方法:

细胞的准备: ①间充质干细胞及心肌细胞的分离培养:间充质干细胞的分离培养参照文献[11]所述方法进行,选取P3代间充质干细胞,进行DAPI标记后按 1×10^6 /孔接种于三室模型上室内避光培养。心肌细胞分离培养参照王佳南等^[12]所述方法进行,活细胞悬浮后按 2×10^6 /孔接种于三室模型中室内进行贴壁培养。②心肌梗死模型及单个核细胞准备:结扎大鼠左冠前降支建立心肌梗死模型,结扎远端心肌变苍白及体外心电图R波变宽或ST段抬高为结扎成功,术后行苏木静-伊红染色证实建模成功;假手术组只穿线不结扎。建模后第7天,无菌采取大鼠心脏血,密度梯度离心分离单个核细胞,纯化细胞按 2×10^6 /孔接种于三室模型下室内。

三室共培养模型制作及分组: 三室共培养模型的制作参照既往方法^[10]。DAPI标记的间充质干细胞、心肌细胞和单个核细胞分别培养于三室模型的上、中、下室内。实验分为4组:心肌梗死组加入心肌梗死大鼠单个核细胞 2×10^6 个;趋化因子受体4受体阻断剂AMD3100组加入 2×10^6 个心肌梗死大鼠单个核细胞和终浓度为0.1 μ g/L的AMD3100;假手术组加入假手术大鼠单个核细胞 2×10^6 个;空白对照组仅加培养液。为避免单个核细胞分泌肿瘤坏死因子 α 的影响,在心肌梗死、AMD3100及假手术组均加入终浓度为50 ng/L的肿瘤坏死因子 α 中和抗体。

间充质干细胞迁移数计算: 共培养48 h后,荧光显微镜下观察各组中间室内胞核发蓝光的细胞数目,在200倍视野下随机选3个视野计数,取平均值作为单位视野迁移细胞数。

免疫细胞荧光染色检测迁移细胞趋化因子受体4表达: 中室内迁移细胞用多聚甲醛固定,洗涤后加正常山羊血清封闭液,依次加入兔抗大鼠趋化因子受体4一抗和罗丹明标记小鼠抗兔二抗,立即荧光镜检。

免疫细胞化学染色检测心肌细胞基质细胞衍化因子1表达: 中室内心肌细胞进行多聚甲醛固定,加体积分数0.3%过氧化氢-甲醇溶液处理以消除内源性过氧化物酶的影响,洗涤后加封闭液,再依次加入兔抗大鼠基质细胞衍

化因子1和生物素标记的二抗。洗涤后加入辣根过氧化物试剂, 再加入DAB显色, 显微镜下观察着色情况适时终止反应。

主要观察指标: ①各组内迁移间充质干细胞数量。②迁移细胞趋化因子受体4表达情况。③心肌细胞基质细胞衍化因子1表达情况及表达灰度值(平均吸光度值和累积吸光度值)。

统计学分析: 统计学处理由廖礼强作者完成, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SAS 8.0软件进行统计分析。单独组间比较采用非配对Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 12只SD大鼠用于分离单个核细胞, 其中行心肌梗死手术6只, 行假手术6只, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 细胞形态学观察 原代间充质干细胞接种后24-72 h后完全贴壁, 呈现集落状生长, 传代后增殖迅速, 呈放射状、螺旋状或平行生长, 类似成纤维细胞形态(图1A)。原代心肌细胞接种24-48 h后基本贴壁生长, 呈梭形、杆状或不规则形态, 部分可见节律性收缩, 频率为30-100次/min, 免疫细胞化学染色示95%以上贴壁细胞肌钙蛋白I阳性表达(图1B)。

2.3 迁移细胞计数及趋化因子受体4免疫荧光染色 DAPI标记的间充质干细胞胞核在荧光镜下发蓝光。心肌梗死组、AMD3100组及假手术组中室内均可见胞核发蓝光的迁移细胞, 单位视野细胞迁移数分别为 13.5 ± 1.0 , 3.9 ± 0.6 及 3.7 ± 0.7 , 而空白对照组中室内未见迁移细胞。其中, 心肌梗死组单位视野细胞迁移数显著高于假手术组($P < 0.05$), 加入趋化因子受体4抑制剂AMD3100后单位视野细胞迁移数明显减少, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。迁移至中室的间充质干细胞阳性表达趋化因子受体4, 在荧光显微镜下发红光, 胞核发蓝光, 细胞形态似成纤维细胞, 呈梭形、短三角形等形态(图2)。

形、短三角形等形态(图2)。

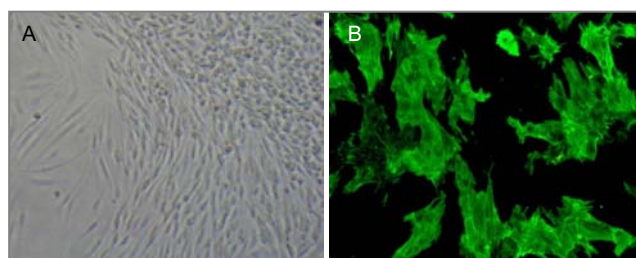


图1 大鼠间充质干细胞及心肌细胞的形态学观察结果
Figure 1 Morphology of rat mesenchymal stem cells and cardiomyocytes

图注:

(1) 图中A为P3代间充质干细胞在普通光镜下呈梭形, 呈放射状或平行生长($\times 100$)。

(2) 图中B为接种72 h的心肌细胞贴壁铺开生长, 免疫荧光染色显示细胞阳性表达肌钙蛋白I, 荧光显微镜下发绿光, 部分可见肌丝样结构, 符合心肌细胞的特点($\times 200$)。

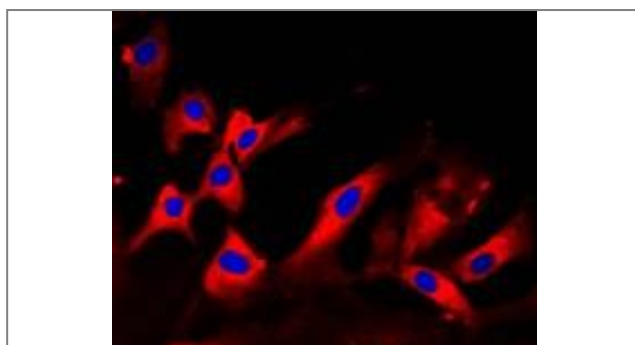


图2 免疫荧光检测迁移细胞趋化因子受体4的表达情况($\times 200$)
Figure 2 C-X-C chemokine receptor 4 expression in migrating cells detected by immunofluorescent assay ($\times 200$)

图注: 迁移至中室的间充质干细胞胞核在荧光显微镜下发蓝光, 免疫荧光染色显示迁移而来的间充质干细胞阳性表达趋化因子受体4, 在荧光显微镜下发红光。

2.4 心肌细胞基质细胞衍化因子1表达 各组心肌细胞均阳性表达基质细胞衍化因子1, 免疫细胞化学染色呈棕色(图3), 颜色越深吸光度值越高, 基质细胞衍化因子1表达量越高。其中, 心肌梗死组及AMD3100组心肌细胞基质细胞衍化因子1的平均吸光度值和累积吸光度值均显著高于假手术组和空白对照组。

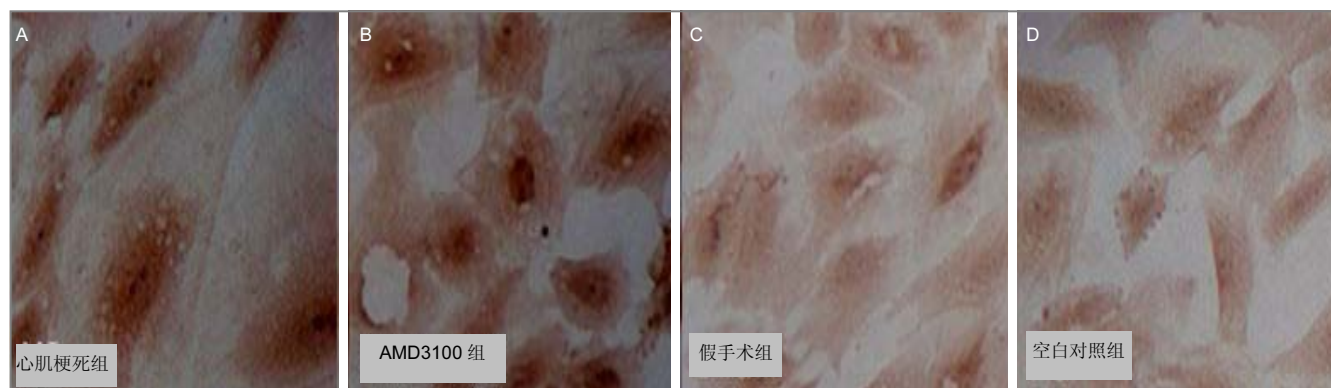


图3 免疫细胞化学染色检测各组心肌细胞基质细胞衍化因子1的表达情况($\times 200$)

Figure 3 Stromal cell derived factor-1 immunocytochemistry staining of cardiomyocytes in each group ($\times 200$)

图注: 各组内心肌细胞均阳性表达基质细胞衍化因子1, 免疫细胞化学染色后普通光镜下呈棕色, 心肌梗死组及AMD3100组心肌细胞基质细胞衍化因子1的平均吸光度值和累积吸光度值均显著高于假手术组和空白对照组。

胞衍化因子1平均吸光度值和累积吸光度值均显著高于假手术组及空白对照组($P < 0.05$)(表1), 而心肌梗死组与AMD3100组间, 假手术组与空白对照组间比较差异均无显著性意义。

表1 心肌梗死组、AMD3100组、假手术组及空白对照组心肌细胞基质细胞衍化因子1的平均吸光度值及累积吸光度值比较

Table 1 Average absorbance value and integral absorbance value of stromal cell derived factor-1 in cardiomyocytes in the myocardial infarction, AMD3100, sham, and blank control groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均吸光度值	累积吸光度值
心肌梗死组	0.50±0.02 ^a	215.02±38.60 ^a
AMD3100组	0.51±0.01 ^a	236.76±62.45 ^a
假手术组	0.39±0.04	48.09±20.17
空白对照组	0.38±0.03	51.30±16.92

表注: 结果显示, 心肌梗死组及AMD3100组心肌细胞基质细胞衍化因子1的平均吸光度值和累积吸光度值均显著高于假手术组和空白对照组($^aP < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

干细胞(包括胚胎干细胞、成体干细胞)是一类具有自我复制和多向分化能力的潜能细胞, 在一定条件下, 可以诱导分化为机体的多种功能细胞, 包括心肌细胞、神经细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、软骨或骨等, 其在诱导分化为心肌细胞中的应用, 成为近年心血管领域中研究的热点^[13-18]。其中, 以成体干细胞(包括间充质干细胞、脂肪干细胞、神经干细胞、血液干细胞等)的研究最为广泛^[19-22]。近年来, 冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率显著增高, 发生心肌梗死的患者显著增加, 成为威胁群众健康的主要疾病之一。及时开通罪犯血管恢复心肌血供是防治心肌进行性坏死的主要手段, 但相当一部分患者因错过最佳时机或无法耐受手术未能进行冠状动脉内支架置入。对这类患者, 通过干细胞治疗修复坏死心肌则成为药物治疗以外的较理想方式^[23-24]。成体干细胞尤其是间充质干细胞具有无限增殖和心肌分化潜能, 取材方便, 易于体外培养扩增, 且免疫排斥性低, 因此, 间充质干细胞移植从理论层面上是治疗心肌梗死的理想策略, 能从根本上修复坏死的心肌, 促进心肌梗死患者的康复^[25-28]。动物及人体实验证实, 通过血管途径注射、直接心肌注射、心脏贴片等技术注入体内的间充质干细胞能在一定程度上修复坏死的心肌组织, 改善心脏射血功能^[29-31]。但间充质干细胞定向归巢到心肌梗死部位的机制尚不十分明了, 弄清间充质干细胞归巢的机制将促进其在临床中的应用。

动物及人体的病理生理研究已经证实^[32], 当机体局部发生感染或损伤后, 在病变部位及周边均可发现炎症细胞(中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞)的浸润。心肌梗死后, 同样伴随着中性粒细胞及单个核细胞(淋巴细胞及单核细胞)在心肌梗死灶及周边区的聚集, 而向心肌梗死模型体内注入间充质干细胞后, 在梗死灶及周边区域检测到间充质干细胞的归巢。在神经损伤中也发现类似现象^[33]。由这种间充质干细胞和炎症细胞在相同部位出现的现象, 作者推

测, 单个核细胞在一定程度上可能具有促进间充质干细胞定向心肌迁移的能力。

作为介导炎症的重要因子, 肿瘤坏死因子 α 、趋化因子及其受体在此过程中发挥了重要作用。肿瘤坏死因子 α 促进胚胎干细胞和间充质干细胞迁移中的作用已在既往的研究中得以证实^[34-35]。在作者既往的体外实验中^[10], 发现心肌梗死大鼠单个核细胞分泌的肿瘤坏死因子 α 能在一定程度上促进间充质干细胞向心肌迁移, 但中和肿瘤坏死因子 α 并未能完全阻断间充质干细胞的迁移, 由此可见, 心肌梗死后单个核细胞促使间充质干细胞向心肌定向迁移尚存在其他机制。

趋化因子是指由白细胞和某些基质细胞分泌的、可结合在内皮细胞表面, 对中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞具有趋化和激活作用的细胞因子。趋化因子的主要作用是趋化细胞的迁移, 细胞沿着趋化因子浓度增加的信号向趋化因子源处的迁徙。趋化因子CXCL12又称为基质细胞衍化因子1, 属于趋化因子蛋白家族, 包括基质细胞衍化因子1 α 和基质细胞衍化因子1 β 两种形式, 趋化因子受体4为其特异性受体, 趋化因子受体4是由352个氨基酸组成的保守的7次跨膜G蛋白偶联受体超家族的成员, 广泛表达于间充质干细胞等多种细胞膜表面^[36-37], 它与基质细胞衍化因子1构成基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴, 参与细胞间信息传递, 在细胞侵袭、迁移中起着重要作用^[38-40]。

体外实验表明, 经过基质细胞衍化因子1预处理能增强干细胞的存活率, 增强其向梗死心肌迁移的能力^[41]。2004年Circulation上发表了Abbott等^[42]关于基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴在促进间充质干细胞向梗死心肌迁移的实验研究。他们发现将间充质干细胞通过外周血管途径注射到心肌梗死模型鼠体内后, 在梗死灶及周边区检测到相当数量的标记间充质干细胞, 梗死心肌组织高表达基质细胞衍化因子1, 而加入趋化因子受体4阻断剂后, 梗死灶及周边区检测到的间充质干细胞明显减少。动物实验表明, 上调间充质干细胞内趋化因子受体4基因的表达有利于梗死心肌血管再生及心脏功能改善, 而趋化因子受体4基因沉默将显著减弱这一效应, 同时抑制基质细胞衍化因子1降解酶对梗死心肌组织基质细胞衍化因子1的降解将明显增强上述效应^[43]。这在Dong等^[44]的研究中同样得以证实。

为了证实基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴在心肌梗死后单个核细胞促使间充质干细胞向心肌定向迁移的作用, 在本实验中, 除空白对照组外, 向其余各组加入肿瘤坏死因子 α 中和抗体以消除肿瘤坏死因子 α 的干扰。在消除肿瘤坏死因子 α 干扰的同时, 加入趋化因子受体4特异性阻断剂AMD3100阻断基质细胞衍化因子1对间充质干细胞的动员作用。采用DAPI对间充质干细胞进行标记, 通过观察中室内胞核发蓝光的活细胞数量, 并对其进行趋化因子受体4免疫荧光染色(阳性细胞在荧光镜下发红光), 判断骨髓间充质干细胞的迁移情况。中室内胞核发蓝光同时

胞膜发红光的细胞即为迁移而来的间充质干细胞。对各组心肌细胞的免疫化学染色显示MI及AMD3100组心肌细胞基质细胞衍化因子1表达量增加,表明单个核细胞能在一定程度上上调心肌细胞基质细胞衍化因子1的表达。心肌梗死组、假手术组均可见胞核发蓝光且阳性表达趋化因子受体4的迁移细胞,心肌梗死组细胞迁移数显著高于假手术组,而加入趋化因子受体4抑制剂AMD3100后单位视野细胞迁移数明显减少。表明基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴在心肌梗死后单个核细胞促使间充质干细胞向心肌迁移中起了一定作用,且基质细胞衍化因子1的表达与间充质干细胞的迁移数存在量效关系,基质细胞衍化因子1表达量增高时所诱导间充质干细胞迁移的数量显著增加。假手术组及空白对照组心肌细胞均少量表达基质细胞衍化因子1(假手术组稍高于空白对照组),假手术组可见少量迁移细胞,但空白对照组并未见迁移细胞,推测假手术组部分间充质干细胞的迁移与假手术操作损伤部分心肌导致的轻微炎症有关,这在假手术大鼠心肌组织的病理切片染色中得以证实(穿线处周围心肌间质内可见少量炎症细胞的浸润)。

综上,基质细胞衍化因子1和趋化因子受体4生物轴在单个核细胞促使间充质干细胞定向心肌迁移中起了一定作用,这一作用是通过上调心肌细胞趋化因子受体4的表达来实现的。不足之处在于,因经费原因,实验对心肌细胞基质细胞衍化因子1的表达仅通过免疫细胞化学染色进行间接的半定量分析,若能同时进行PCR和/或Western blot检测则能更进一步从基因和蛋白表达水平反映基质细胞衍化因子1的表达情况。

致谢: 感谢重庆医科大学神经病学重点实验室提供的实验仪器及实验室老师们给予的帮助。

作者贡献: 张晓刚主要负责课题的设计与指导,张颖主要负责整个实验的实施,廖礼强主要负责课题的资料整理和统计学分析,由非课题参与者进行盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

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。实验已获得渝北区人民医院伦理委员会和重庆医科大学伦理委员会批准。

学术术语: 三室共培养-将 3 种不同的细胞接种于特制的三室共培养模型内进行共同培养,研究 3 种细胞间的生物学相互影响。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Li Z, Guo J, Chang Q, et al. Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(8):1343-1346.
- [2] Buccini S, Haider KH, Ahmed RP, et al. Cardiac progenitors derived from reprogrammed mesenchymal stem cells contribute to angiomyogenic repair of the infarcted heart. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(6):301.
- [3] Mathieu E, Lamirault G, Toquet C, et al. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One.* 2012;7(12):e51991.
- [4] Houtgraaf JH, de Jong R, Kazemi K, et al. Intracoronary infusion of allogeneic mesenchymal precursor cells directly after experimental acute myocardial infarction reduces infarct size, abrogates adverse remodeling, and improves cardiac function. *Circ Res.* 2013;113(2):153-166.
- [5] Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation.* 2013;127(2):213-223.
- [6] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;108(7):863-868.
- [7] Wang T, Sun S, Wan Z, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction. *Resuscitation.* 2012;83(11):1391-1396.
- [8] Mao Y, Li SN, Mao XB, et al. Therapeutic effect of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells over-expressing Cx43 on heart failure in post-infarction rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011;91(28):1982-1986.
- [9] Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* 1978;90(1):57-70.
- [10] 廖礼强, 张晓刚, 史若飞, 等. 心肌梗死大鼠单个核细胞分泌TNF- α 对间充质干细胞迁移的影响[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(7): 807-810.
- [11] 廖礼强, 张晓刚, 史若飞, 等. 微血管内皮细胞诱导骨髓间充质干细胞心肌样分化的作用及移植可行性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40): 7811-7816.
- [12] 王佳南, 张晓刚, 汤为学, 等. 新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改良[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(5): 600-603.
- [13] Wollert KC, Drexler H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls. *Circulation.* 2005; 112(2):151-153.
- [14] 于玲范, 金丹玲, 周晶. 细胞间直接接触对骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞作用的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2006, 40(2): 124-127.
- [15] 袁岩, 陈连凤, 张抒扬, 等. 心肌细胞裂解液对骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化诱导作用的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2005; 33(2):170-173.
- [16] Wang TZ, Ma AQ, Xu ZY, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes induced by cardiomyocytes. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005;30(3):270-275.
- [17] 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):283-284.
- [18] Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture. *J Cell Mol Med.* 2008;50(1): 31-39.

- [19] 付小兵,程飏. 成体干细胞研究及其可能的临床应用[J].中华医学杂志,2005,85(27):1878-1880
- [20] Roche R, Hoareau L, Mounet F, et al. Adult stem cells for cardiovascular diseases: the adipose tissue potential. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(6):791-798.
- [21] Shim WS, Jiang S, Wong P, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(2):481-488.
- [22] Tamaki T, Akatsuka A, Okada Y, et al. Cardiomyocyte formation by skeletal muscle-derived multi-myogenic stem cells after transplantation into infarcted myocardium. *PLoS ONE.* 2008;3(3):e1789.
- [23] Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, et al. Pre-Treatment of Mesenchymal Stem Cells With a Combination of Growth Factors Enhances Gap Junction Formation, Cytoprotective Effect on Cardiomyocytes, and Therapeutic Efficacy for Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(9):933-943.
- [24] Zhang Y, Liang JL, Wang S, et al. Autologous bone marrow stromal cell trans-plantation with application of granulocyte colony-stimulating factor improves rabbit cardiac performance after acute myocardial infarction. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007;27(1):43-45, 48.
- [25] Wollert KC, Drexler H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls. *Circulation.* 2005;112(2):151-153.
- [26] Nakamura Y, Wang X, Xu C, et al. Xenotransplantation of Long-Term-Cultured Swine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2007;25(3): 612 - 620.
- [27] Forte G, Minieri M, Cossa P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(4):H1370-1377.
- [28] Wang CC, Chen CH, Lin WW, et al. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. *Cardiovasc Res.* 2008;77: 515-524.
- [29] Houtgraaf JH, de Jong R, Kazemi K, et al. Intracoronary infusion of allogeneic mesenchymal precursor cells directly after experimental acute myocardial infarction reduces infarct size, abrogates adverse remodeling, and improves cardiac function. *Circ Res.* 2013;113(2):153-166.
- [30] Rodrigo SF, van Ramshorst J, Hoogslag GE, et al. Intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived ex vivo expanded mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction patients is feasible and safe up to 5 years of follow-up. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(5): 816-825.
- [31] Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, et al. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation.* 2013;96(8):697-706.
- [32] Vela DC, Silva GV, Assad JAR, et al. Histopathological Study of Healing After Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Delivery in Myocardial Infarction in Dogs. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57: 167-176.
- [33] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 2004;22(3):415-427.
- [34] Chen Y, Ke Q, Yang Y, et al. Cardiomyocytes overexpressing TNF-alpha attract migration of embryonic stem cells via activation of p38 and c-Jun amino-terminal kinase. *FASEB J.* 2003;17(15):2231-2239.
- [35] Kim YS, Park HJ, Hong MH, et al. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium. *Front Biosci.* 2009;14:2845-2856.
- [36] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006;24(4): 1030-1041.
- [37] Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-230.
- [38] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 2007;21(12): 3197-3207.
- [39] Liu X, Duan B, Cheng Z, et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell.* 2011;2(10):845-854.
- [40] Xu X, Zhu F, Zhang M, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the wound area and promoting neovascularization. *Cells Tissues Organs.* 2013;197(2):103-113.
- [41] Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, et al. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res.* 2008;77(1):134-142.
- [42] Abbott JD, Huang Y, Liu D, et al. Stromal cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation.* 2004;110(21): 3300-3305.
- [43] Zhang D, Huang W, Dai B, et al. Genetically manipulated progenitor cell sheet with diproton A improves myocardial function and repair of infarcted hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(5):H1339-1347.
- [44] Dong F, Harvey J, Finan A, et al. Myocardial CXCR4 expression is required for mesenchymal stem cell mediated repair following acute myocardial infarction. *Circulation.* 2012; 126(3):314-324.