

大鼠骨髓间充质干细胞增殖及定向分化能力的增龄性变化

李海瑞, 郑栋, 江灿, 郭军, 张爱东, 李自成(暨南大学附属第一医院心血管内科, 广东省广州市 510630)

文章亮点:

1 在众多的供体细胞中, 骨髓间充质干细胞倍受研究者的关注, 其具有与宿主心肌细胞之间形成良好的电-机械耦连, 不存在免疫排斥反应, 无伦理道德方面争议, 取材方便等各种优势, 因此具有大规模应用于临床的潜力。但是目前对不同年龄段患者的骨髓间充质干细胞的各种特性如增殖及分化能力特别是向心肌样细胞方向的分化能力尚缺少深入的研究。

2 流式细胞仪分析细胞周期显示处于 G₀/G₁ 期大鼠骨髓间充质干细胞的百分率随年龄的增加而增加, 细胞免疫荧光技术分析显示大鼠骨髓间充质干细胞的肌钙蛋白 T 表达率亦随年龄的增加而减少, 说明大鼠骨髓间充质干细胞的增殖与定向分化能力随着年龄的增长而下降, 为骨髓间充质干细胞移植治疗心血管疾病的临床应用提供了一定的依据。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 增殖; 骨髓间充质干细胞; 定向分化; 肌钙蛋白 T; 细胞周期; 大鼠; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间充质干细胞; 肌钙蛋白 T; 细胞增殖

基金资助:

国家自然科学基金青年项目资助(81100078); 教育部科学研究重点项目资助(211207); 广州珠江科技新星资助计划项目(2012J2200063); 广东省科技厅博士启动项目资助(S2011040001392)

摘要

背景: 自体骨髓间充质干细胞移植治疗心血管疾病已经成为当前研究的热点之一, 但是患者自体骨髓间充质干细胞的增殖能力及向心肌样细胞方向分化的能力是否随年龄的改变而有所变化尚不清楚。

目的: 探讨大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的增龄性差异。

方法: 纯化培养不同年龄组 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 流式细胞仪分析其细胞周期, 同时骨髓间充质干细胞与乳鼠心肌细胞共培养, 细胞免疫荧光技术分析骨髓间充质干细胞心肌肌钙蛋白 T 的表达。

结果与结论: 流式细胞仪分析显示处于 G₀/G₁ 期骨髓间充质干细胞的百分率随年龄的增加而增加; 骨髓间充质干细胞的肌钙蛋白 T 表达率亦随年龄的增加而减少。结果表明大鼠骨髓间充质干细胞的增殖与定向分化能力随着年龄的增长而下降。

李海瑞, 郑栋, 江灿, 郭军, 张爱东, 李自成. 大鼠骨髓间充质干细胞增殖及定向分化能力的增龄性变化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1):18-23.

Age-associated proliferation and differentiation changes of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Li Hai-ru, Zheng Dong, Jiang Can, Guo Jun, Zhang Ai-dong, Li Zi-cheng (Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of cardiovascular disease has become one of the hotspots, but it is unclear whether the proliferation and directional differentiation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells varies changes with age.

OBJECTIVE: To explore the proliferation and differentiation changes of rat bone mesenchymal stem cells in different ages.

METHODS: The bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats in different age groups were purified and cultured, and then examined by flow cytometry in terms of cell cycle. Meanwhile, neonatal rat cardiomyocytes were co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells. The morphologic changes of bone marrow mesenchymal stem cells and the protein expression of troponin T were detected with immunofluorescence technique.

RESULTS AND CONCLUSION: The percentage of bone marrow mesenchymal stem cells in G₀/G₁ phase was increased with age; while the percentage of expression of troponin T proteins-positive bone marrow mesenchymal stem cells were decreased with age. These findings indicate that the proliferation and differentiation abilities of rat bone marrow mesenchymal stem cells descend with age.

李海瑞, 男, 1986年生, 广东省云浮市人, 汉族, 暨南大学第一临床医学院在读硕士, 主要从事干细胞治疗心力衰竭方面的研究。

通讯作者: 郭军, 副主任医师, 副教授, 博士, 暨南大学附属第一医院心血管内科, 广东省广州市 510630

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.01.004
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2015)01-00018-06
稿件接受: 2014-11-20

Li Hai-ru, Studying for master's degree, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Corresponding author: Guo Jun, M.D., Associate chief physician, Associate professor, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-11-20

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Troponin T; Cell Proliferation

Funding: the National Natural Science Foundation of China for the Youth, No. 81100078; the Key Science Research Project of the Ministry of Education, No. 211207; the Zhujiang Scientific New Star Plan of Guangzhou, No. 2012J2200063; the Doctoral Startup Program of Guangdong Science and Technology Commission, No. S2011040001392

Li HR, Zheng D, Jiang C, Guo J, Zhang AD, Li ZC. Age-associated proliferation and differentiation changes of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(1):18-23.

0 引言 Introduction

在众多的供体细胞中, 骨髓间充质干细胞倍受研究者的关注, 因为相比之下, 骨髓间充质干细胞具有较多优点, 如可以与宿主心肌细胞之间形成良好的电-机械耦连^[1-3], 不存在免疫排斥反应^[4-6], 无伦理道德方面争议, 取材方便等。自体骨髓间充质干细胞移植治疗心血管疾病已经成为当前研究的热点之一^[7-10]。但是, 患者自体骨髓间充质干细胞的增殖能力及向心肌样细胞方向分化的能力是否随年龄的改变而有所变化尚不清楚, 因此, 研究不同年龄段供体骨髓间充质干细胞的增殖分化能力对骨髓间充质干细胞的临床应用具有指导作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学实验研究。

时间及地点: 实验于2013年12月至2014年6月在暨南大学医学院田家炳医学实验中心完成。

材料:

实验动物及分组: SD大鼠40只, 雌雄不拘, 按年龄段分别分为青年组[三四个月龄, 体质量(200±15)g]、成年组[七八个月龄, 体质量(375±10)g]、中年组[13-15月龄, 体质量(486±15)g]及老年组[24月龄以上, 体质量(570±25)g], 每组10只, 均由暨南大学医学院实验动物中心提供。

大鼠骨髓间充质干细胞增殖及定向分化实验所用试剂与仪器:

试剂与仪器	来源
DMEM、胶原酶、胰蛋白酶	Sigma
胎牛血清	Hyclone
荧光染料DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、TRITC标记的羊抗小鼠IgG	Gibco
小鼠抗大鼠Troponin T单克隆抗体	Neomarkers
荧光显微镜、倒置相差显微镜	Olympus

实验方法:

骨髓间充质干细胞的培养^[11]: SD大鼠乙醚麻醉后浸泡于体积分数为75%乙醇中, 5 min后取股、胫骨, 剪开两端, 1 500 r/min离心5 min冲出骨髓, 弃上清, 加入培养基(H-DMEM、体积分数为10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素G、100 g/L链霉素、85 mg/L两性霉素B), 吹打成悬液, 按 1×10^8 L⁻¹细胞浓度接种于35 mm塑料培养皿, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱培养, 24 h后换

液, 以后每3 d换1次液, 待细胞接近70%融合时用0.25%胰蛋白酶+0.04%EDTA消化, 制成单细胞悬液, 按1:3传代, 通过不断的换液与传代逐渐纯化扩增骨髓间充质干细胞, 共传4代。

细胞生长曲线的检测^[12]: 取接种于24孔板中培养的第4代骨髓间充质干细胞, 每隔2 d取3孔细胞, D-Hank's液洗涤3次, 去除未贴壁的细胞, 加入0.125%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化液消化贴壁细胞, 收集细胞悬液, 1:10 000稀释, 用细胞计数板进行细胞计数, 计数每孔细胞总数, 取3孔细胞数均值, 绘制细胞生长曲线。

流式细胞仪(FACS)分析骨髓间充质干细胞的细胞周期^[13]: 取第4代处于对数生长期的骨髓间充质干细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成细胞悬液置于EP管中离心5 min(1 200 r/min); 重悬后用体积分数为70%乙醇固定, RNA酶处理, PI(1 g/L)染色30 min后上机检测。

心肌细胞的分离培养, 建立体外心肌微环境^[14]: 于无菌操作下, 将乳鼠的心室肌剪成1 mm³大小的碎块, 弃去带血的上清液, 组织碎块中加入含0.125%胰蛋白酶, 0.1%胶原酶消化, 37 °C, 每次4 min。首次消化液弃去, 细胞悬液转移到含有20 mL DMEM培养液的无菌试管中, 并以1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 细胞沉淀再次用培养液重悬。细胞悬液置于平皿中37 °C静置。1 h后, 小心吸出细胞悬液, 接种到另一培养皿中, 细胞浓度为 1×10^7 L⁻¹, 3 d后用于实验。

核荧光染料标记骨髓间充质干细胞: 用DAPI(25 mg/L)标记拟做共培养的第4代骨髓间充质干细胞, 2 h后将DAPI标记的骨髓间充质干细胞用D-Hank's液小心的洗10遍, 在荧光显微镜下用紫外光激发(激发波长340-380 nm), 观察标记效果。

心肌细胞与骨髓间充质干细胞混合培养^[15]: 消化DAPI标记的骨髓间充质干细胞(DAPI-MSCs)与未标记的培养第3天的心肌细胞, 吹打成细胞悬液, 计数板计数, 将DAPI标记的骨髓间充质干细胞与心肌细胞按细胞数量比1:2混匀, 按 5×10^7 L⁻¹接种于覆盖有盖玻片的24孔板。

免疫细胞化学技术分析^[16]: 在共培养的第6天对混合培养的细胞做免疫荧光化学分析, 取出盖玻片, PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)洗3遍, 冷甲醇固定30 min, 1% TritonX-100破膜, PBS振荡3次, 1%牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min, 然后加入相应的一抗(小鼠抗大鼠Tn T 1:50单克隆抗体), 4 °C孵育过夜, 二抗用TRITC连接山羊抗小

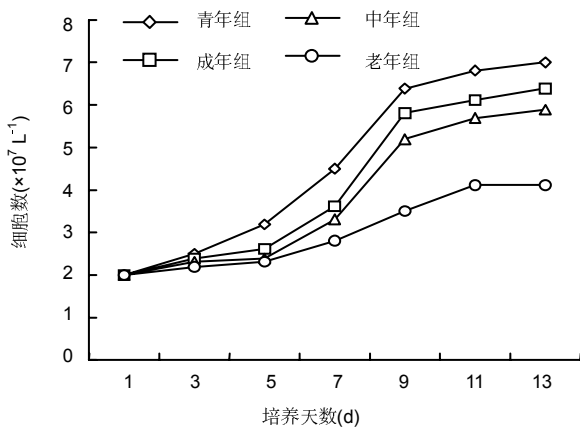


图3 不同年龄组第4代骨髓间充质干细胞生长曲线图

Figure 3 Growth curves of passage 4 bone marrow mesenchymal stem cells from different age groups

鼠IgG, 缓冲甘油封固, 荧光镜下观察。每组随机取12个非重叠视野($\times 100$), 计数胞浆发出红色荧光的蓝色胞核(即表达TnT的DAPI标记的骨髓间充质干细胞)的数量及所有发蓝色荧光的细胞核(即DAPI标记的骨髓间充质干细胞)的数量, 两者相比取平均值即为DAPI标记的骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的百分率。

主要观察指标: 骨髓间充质干细胞形态、生长曲线、细胞周期、向心肌细胞分化率。

统计学分析: 用SPSS 11.0软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析。

2 结果 Results

2.1 观察骨髓间充质干细胞生长情况 原代细胞接种后24 h换液换掉大部分非贴壁细胞, 倒置相差显微镜下可见稀少的呈长梭形的贴壁细胞。3 d后梭形贴壁细胞开始增多, 集落周围的贴壁细胞逐渐开始融合(图1), 进入对数生长期, 8-12 d达到80%的融合, 10-12 d后基本进入细胞生长的平台期。

传代细胞增殖更加迅速, 8-10 d即可长满整个皿底。随着换液与传代的次数增加, 骨髓间充质干细胞逐渐得到纯化, 表现为圆形和不规则形细胞明显减少, 三四代后基本除尽, 镜下可见以梭形为主, 大小均一的贴壁骨髓间充质干细胞(图2)。

青年组大鼠的骨髓间充质干细胞增殖能力强于对照组, 具体表现为无论是原代或是传代细胞的贴壁时间均缩短, 细胞集落形成早且集落较多, 细胞形态较规则, 形成细胞单层的时间缩短, 每六七天即可传代1次, 从第4代骨髓间充质干细胞生长曲线来看, 青年组较其他组骨髓间充质干细胞提前2 d左右进入对数生长期, 老年组第4代骨髓间充质干细胞对数生长期表现相对不甚明显, 进入平台期的细胞数量亦随年龄的增加而降低(图3), 并且细胞体形较大, 部分细胞呈不规则形, 经过6代以后的长期传代容易老化(图4)。

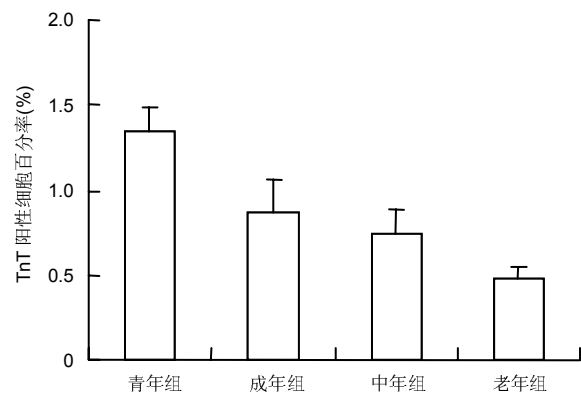


图6 不同年龄组大鼠第4代骨髓间充质干细胞成心肌样分化率

Figure 6 Cardiomyocyte differentiation ratio of bone marrow mesenchymal stem cells at passage 4 from different age groups

图注: 不同年龄组骨髓间充质干细胞成心肌样分化率存在明显差异(青年组>成年组>中年组>老年组), 说明骨髓间充质干细胞成心肌样分化率随供体年龄增大而下降。

2.2 骨髓间充质干细胞的细胞周期检测结果 与其他各组比较, 老年组骨髓间充质干细胞的G₀/G₁期细胞百分率显著升高($P < 0.01$), S期、G₂/M期细胞百分率及增殖指数较其他各组显著降低($P < 0.01$); 总的说来, 骨髓间充质干细胞处于G₀/G₁期的细胞百分率随年龄的增加而增加, 增殖指数随年龄的增加而减少($P < 0.01$), 见表1, 图5。

2.3 混合培养后骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的测定 DAPI的激发光波长为358 nm, 发射光波长为461 nm, 荧光激发下发蓝光; TRITC的激发光波长为550 nm, 发射光波长为570 nm, 荧光激发下发红光, 两者的激发光谱并不重合。通过在同一视野下转换激发光, 查找有TnT表达的DAPI标记的骨髓间充质干细胞, 镜下可见部分蓝色细胞核周围的胞浆发出红色荧光。高倍镜下, 部分发生向心肌细胞分化的骨髓间充质干细胞可见较清楚的心肌细胞的肌丝结构, 有的可见较清楚的心肌细胞特征性横纹结构; 这些心肌细胞特异性蛋白表达阳性的骨髓间充质干细胞均与相邻心肌细胞直接接触。

在混合培养的第6天青年组骨髓间充质干细胞的TnT阳性率为(1.35±0.14)%, 显著高于其他组($P < 0.01$), 成年组与中年组TnT阳性率差异无显著性意义($P > 0.05$), 老年组骨髓间充质干细胞的TnT阳性率为(0.47±0.08)%, 显著低于其他各组, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。总的来看, 各组骨髓间充质干细胞的成心肌样细胞的分化率随年龄的增长而减少(图6)。

3 讨论 Discussion

近年来人们提出了细胞水平心肌移植术, 即用细胞移植的手段增加心肌细胞的数量, 修复坏死的心肌, 从而改善心功能, 降低病死率。在众多的供体细胞中, 骨髓间充质干细胞倍受研究者的关注, 因为与其他替代细胞如成纤维细胞、骨骼肌卫星细胞、胎心细胞、胚胎干细胞等相比,

骨髓间充质干细胞具有较多优点如可以与宿主心肌细胞之间形成良好的电-机械耦连, 不存在免疫排斥反应, 无伦理道德方面争议, 取材方便等各种优势, 因此具有大规模应用于临床的潜力^[1-6]。这种细胞能向心肌细胞分化的特性为自体移植治疗某些心血管疾病提供了实验论据^[17-21]。但是目前对不同年龄段患者的骨髓间充质干细胞的各种特性如增殖及分化能力特别是向心肌样细胞方向分化能力的改变尚缺少深入的研究。

本实验采用全骨髓培养并通过不断的换液与传代的方法逐渐纯化细胞, 传至第4代就可以获得纯度较高的骨髓间充质干细胞。本实验发现随着供体年龄的增加, 体外培养骨髓间充质干细胞的状态逐渐发生改变, 具体表现为老年组骨髓间充质干细胞的集落出现时间晚而少, 细胞形态较大, 出现不规则形; 而青年组骨髓间充质干细胞的集落出现早而多, 细胞形态规则, 多为长梭形。在细胞生长曲线中发现青年组骨髓间充质干细胞较其他组提前2 d左右进入对数生长期, 而老年组骨髓间充质干细胞的对数生长期不明显。在流式细胞周期分析中发现处于S期即合成期的细胞百分率随着年龄的增加而降低, G₀/G₁期即静止期的细胞百分率随着年龄的增加而增加, 这进一步表明骨髓间充质干细胞的增殖能力随着供体年龄的增加而下降。

近年来有越来越多的研究表明心肌微环境是诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞的天然诱导剂^[22-26]。虽然其分化机制尚不确切, 但可以肯定的是骨髓间充质干细胞所处的微环境对其分化起决定作用。Fukuhara等^[23]通过体外细胞培养实验证实了骨髓间充质干细胞与心肌细胞直接的电-机械刺激是骨髓间充质干细胞心肌环境依赖性分化的必要条件, 他们发现随着共培养时间的增加, 骨髓间充质干细胞表达心肌特异性蛋白的阳性率也随之增加。本实验通过体外微环境诱导的方法促使骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 研究发现青年组骨髓间充质干细胞成心肌样分化率为(1.35±0.14)%, 较老年组分化率[(0.47±0.08)%]显著增高, 骨髓间充质干细胞的定向分化能力明显呈现出随着供体年龄的增加而下降的趋势。目前关于年龄因素影响骨髓间充质干细胞成骨化方向的分化能力方面有所报道^[27-29], 但有关年龄影响骨髓间充质干细胞增殖及成心肌样分化能力的机制尚不清楚, 作者推测可能是因为随着供体年龄的改变, 骨髓间充质干细胞定居的骨髓微环境如骨髓基质分泌的细胞因子亦随之发生改变, 从而对骨髓间充质干细胞的生物学特性产生了影响^[30-31], 骨髓间充质干细胞的增殖能力减退也有可能是细胞本身的端粒酶活性发生了变化^[32-34], 这些推测有待于后续实验的进一步证实。

最近, 有学者认为, 干细胞的多向分化性和可塑性可能是细胞融合的结果, 干细胞有自发和其他细胞融合的趋势^[35-36]。如果发生融合, 杂合细胞亦可表达DAPI或TnT阳性, 但亦有报道细胞融合的发生率为1/(10⁴-10⁵)^[37], 这个数值远远低于本实验TnT阳性的最低值。因此, 即使存在

细胞融合现象, 对本实验结果的影响也是微乎其微的。

根据以上实验结果总的来说, 骨髓间充质干细胞的增殖和定向分化能力随着供体年龄的增加而下降, 青年组供体的骨髓间充质干细胞具有良好的增殖及定向分化能力, 最适合作为心肌修复的种子细胞。本实验通过对不同年龄段大鼠骨髓间充质干细胞的增殖及定向分化能力进行对比研究, 证实了年龄是影响骨髓间充质干细胞生物学特性的重要因素之一, 这为骨髓间充质干细胞移植治疗心血管疾病的临床应用提供了一定的依据。

作者贡献: 实验设计及审校为通讯作者, 实验实施及成文为第一作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第二、第三作者, 第一作者对本文负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

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

学术术语: 细胞水平心肌移植 (cellular cardiomyoplasty, CCM)-即用细胞移植的手段增加心肌细胞的数量, 修复坏死的心肌, 从而改善心功能, 降低病死率。

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] Ma Z, Liu Q, Liu H, et al. Cardiogenic Regulation of Stem-Cell Electrical Properties in a Laser-Patterned Biochip. *Cell Mol Bioeng.* 2012;5(3):327-336.
- [2] Ma Z, Liu Q, Liu H, et al. Laser-patterned stem-cell bridges in a cardiac muscle model for on-chip electrical conductivity analyses. *Lab Chip.* 2012;12(3):566-573.
- [3] Peters NS, Wit AL. Gap junction remodeling in infarction: does it play a role in arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2000;11(4):488-490.
- [4] Qi BD, Meng BX, Yang Y, et al. Study of immuno-tolerance mechanism of the third-party bone marrow-derived mesenchymal stem cells in allogeneic transplantation. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2011;27(3):207-212.
- [5] Wang Y, Liu J, Xu C, et al. Bone marrow transplantation combined with mesenchymal stem cells induces immune tolerance without cytotoxic conditioning. *J Surg Res.* 2011;171(1):e123-131.
- [6] Pan H, Zhao K, Wang L, et al. Mesenchymal stem cells enhance the induction of mixed chimerism and tolerance to rat hind-limb allografts after bone marrow transplantation. *J Surg Res.* 2010;160(2):315-324.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [8] Qayyum AA, Mathiasen AB, Kastrup J. Stem cell therapy to treat heart ischaemia: implications for diabetes cardiovascular complications. *Curr Diab Rep.* 2014;14(12):554.
- [9] Yamawaki-Ogata A, Hashizume R, Fu XM, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of aortic aneurysms. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):278-287.

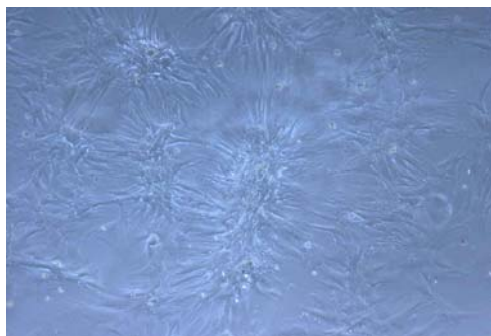


图 1 原代培养第 3 天的青年组 SD 大鼠骨髓间充质干细胞形成的集落, 呈“太阳光芒样”(×200)

Figure 1 Colonies of primary-cultured mesenchymal stem cells at 3 day, presenting with the sunray-like morphology (×200)

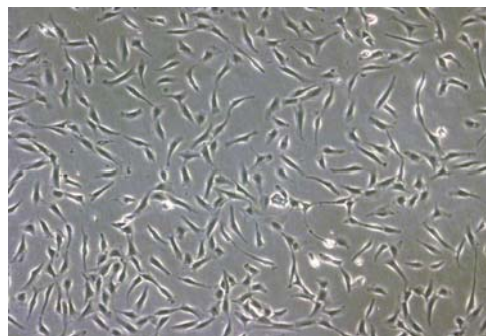


图 2 形态较单一, 纯度较高的青年组 SD 大鼠第 4 代骨髓间充质干细胞(×200)

Figure 2 Highly purified passage 4 bone marrow mesenchymal stem cells with homogenous morphology in the young group (×200)

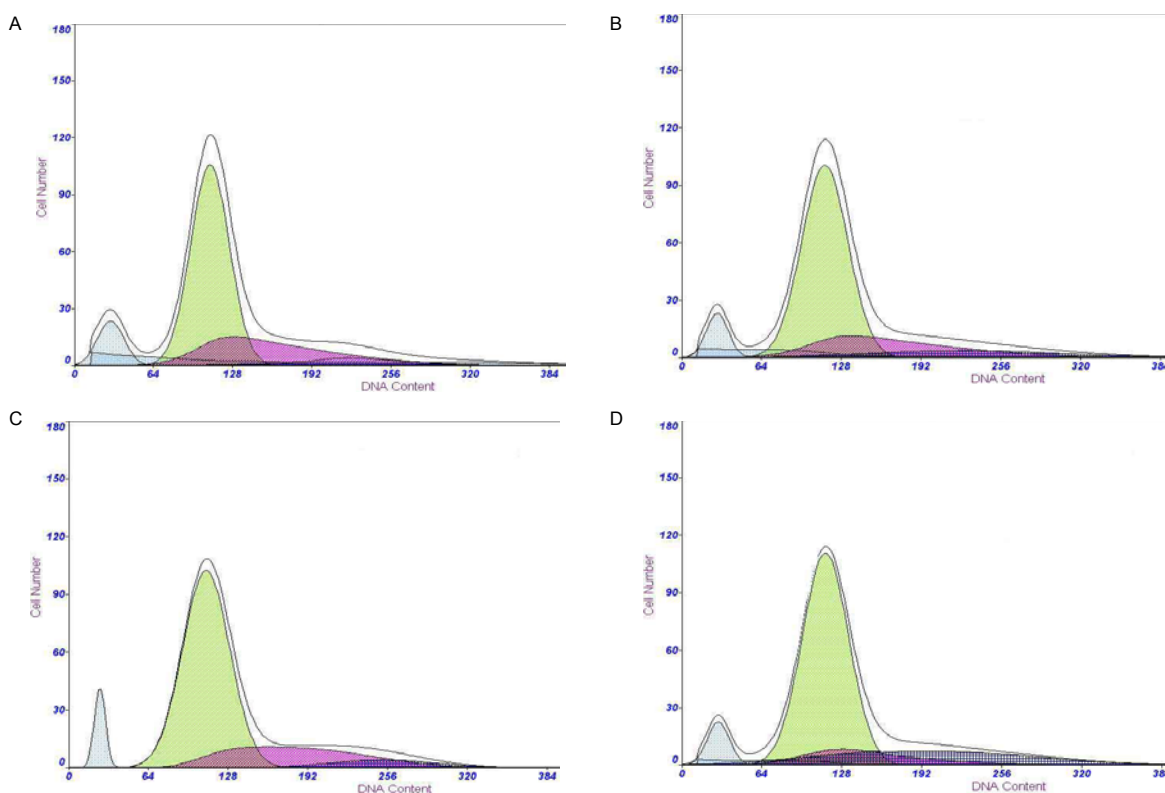


图 5 流式细胞仪检测各组骨髓间充质干细胞的细胞周期

Figure 5 Cell cycle analysis of bone marrow mesenchymal stem cells from different age groups by flow cytometry

图注: A 为青年组; B 为成年组; C 为中年组; D 为老年组。

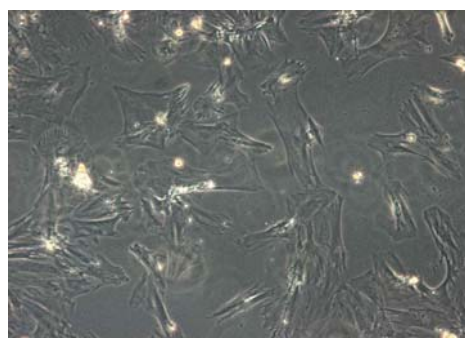


图 4 传 6 代以后老化的骨髓间充质干细胞(×200)

Figure 4 Bone marrow mesenchymal stem cells at passage 6 or above became senescent (×200)

表 1 流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞的细胞周期 (x̄±s, %)

Table 1 Cell cycle of bone marrow mesenchymal stem cells by flow cytometry

组别	标本数	细胞周期			增殖指数
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
青年组	10	65.2±3.4	26.4±3.2	8.4±1.6	34.8±1.3
成年组	10	68.5±2.2 ^a	23.6±2.7 ^a	7.9±2.5	31.5±2.7 ^a
中年组	10	73.4±3.5 ^{ab}	21.5±1.4 ^{ab}	5.1±2.2 ^b	26.6±2.0 ^b
老年组	10	80.5±2.6 ^{bc}	13.8±1.5 ^{bc}	5.7±1.2 ^c	19.5±1.4 ^{bc}

表注: 与青年组比较, ^aP<0.01; 与成年组比较, ^bP<0.05; 与其他各组比较, ^cP<0.01。

- [10] Liu B, Duan CY, Luo CF, et al. Effectiveness and safety of selected bone marrow stem cells on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol.* 2014;177(3):764-770.
- [11] Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 2009;4(1):102-106.
- [12] Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17(4):761-773.
- [13] Wang C, Xu Y, Song WG, et al. Isolation and culture, phenotype detection of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2007;23(5):466-468.
- [14] Ehler E, Moore-Morris T, Lange S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp.* 2013;(79):e50154.
- [15] Song YH, Pinkernell K, Alt E. Stem cell induced cardiac regeneration: fusion/mitochondrial exchange and/or transdifferentiation? *Cell Cycle.* 2011;10(14):2281-2286.
- [16] Makkar RR, Price MJ, Lill M, et al. Intramyocardial injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005;10(4):225-233.
- [17] Yin N, Lu R, Lin J, et al. Islet-1 promotes the cardiac-specific differentiation of mesenchymal stem cells through the regulation of histone acetylation. *Int J Mol Med.* 2014;33(5):1075-1082.
- [18] Hou J, Lü AL, Liu BW, et al. Combination of BMP-2 and 5-AZA is advantageous in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into cardiomyocytes. *Cell Biol Int.* 2013;37(12):1291-1299.
- [19] Cheng Z, Ou L, Zhou X, et al. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther.* 2008;16(3):571-579.
- [20] Cheng Z, Liu X, Ou L, et al. Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2008;22(5):363-371.
- [21] Ripa RS, Haack-Sørensen M, Wang Y, et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2007;116(11 Suppl):I24-30.
- [22] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(1):124-132.
- [23] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125(6):1470-1480.
- [24] Qu Z, Xu H, Tian Y, et al. Atorvastatin improves microenvironment to enhance the beneficial effects of BMSCs therapy in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(2):380-389.
- [25] 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.
- [26] 郭军, 贾光宏, 林国生, 等. 体外模拟心肌微环境下骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. *心脏杂志*, 2004, 16(6): 501-504.
- [27] Stenderup K, Rosada C, Justesen J, et al. Aged human bone marrow stromal cells maintaining bone forming capacity in vivo evaluated using an improved method of visualization. *Biogerontology.* 2004;5(2):107-118.
- [28] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem.* 2001;82(4):583-590.
- [29] Zaim M, Karaman S, Cetin G, et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol.* 2012;91(8):1175-1186.
- [30] Wu J, Niu J, Li X, et al. TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev Biol.* 2014;14:21.
- [31] Lu Y, Liu JJ, Bi XY, et al. Pyridostigmine ameliorates cardiac remodeling induced by myocardial infarction via inhibition of the transforming growth factor- β 1/TGF- β 1-activated kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(5):412-420.
- [32] Bischoff DS, Makhijani NS, Yamaguchi DT. Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells. *Biores Open Access.* 2012;1(6):273-279.
- [33] Madonna R, Taylor DA, Geng YJ, et al. Transplantation of mesenchymal cells rejuvenated by the overexpression of telomerase and myocardin promotes revascularization and tissue repair in a murine model of hindlimb ischemia. *Circ Res.* 2013;113(7):902-914.
- [34] Madonna R, Willerson JT, Geng YJ. Myocardin enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. *Stem Cells.* 2008;26(1):202-211.
- [35] Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002;416(6880):542-545.
- [36] Haneef K, Naeem N, Khan I, et al. Conditioned medium enhances the fusion capability of rat bone marrow mesenchymal stem cells and cardiomyocytes. *Mol Biol Rep.* 2014;41(5):3099-3112.
- [37] Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002;416(6880):545-548.