

人端粒酶反转录酶基因修饰人羊膜间充质干细胞移植治疗肺动脉高压

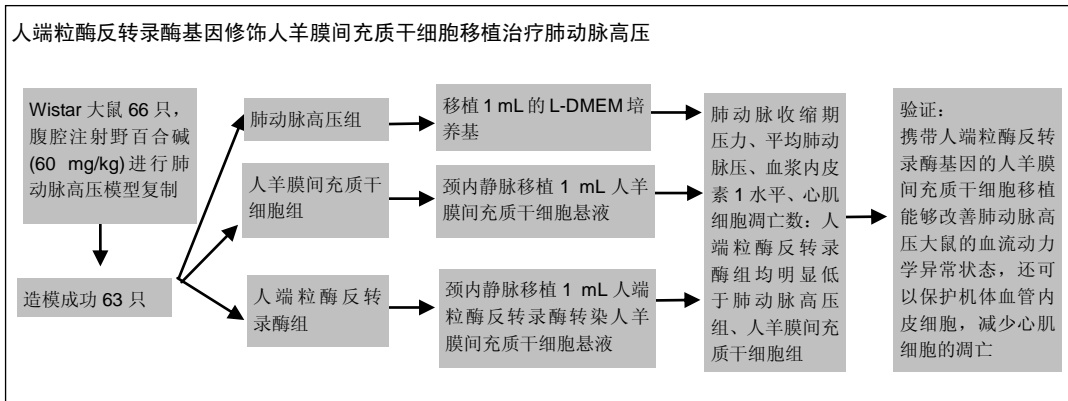
张超¹, 曹洁², 张素芳³(¹天津医科大学研究生院, 天津市津南区咸水沽医院内科, 天津市 300350; ²天津医科大学总医院呼吸科, 天津市 300052; ³天津市津南区八里台镇卫生院, 天津市 300350)

引用本文: 张超, 曹洁, 张素芳. 人端粒酶反转录酶基因修饰人羊膜间充质干细胞移植治疗肺动脉高压[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6):820-826.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.06.009

ORCID: 0000-0003-2401-0580 (张超)

文章快速阅读:



张超, 男, 1985 年生, 河北省保定市人, 汉族, 2009 年河北医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事呼吸内科研究。

通讯作者: 曹洁, 硕士, 主任医师, 天津医科大学总医院呼吸科, 天津市 300052

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)06-00820-07

稿件接受: 2016-01-09

http://www.crter.org

文题释义:

表观遗传修饰: 几十年来, DNA 一直被认为是决定生命遗传信息的核心物质, 但是近些年新的研究表明, 生命遗传信息从来就不是基因所能完全决定的, 比如科学家们发现, 可以在不影响 DNA 序列的情况下改变基因组的修饰, 这种改变不仅可以影响个体的发育, 而且还可以遗传下去。这种在基因组水平上研究表观遗传修饰的领域被称为“表观基因组学”。表观基因组学使人们对基因组的认识又增加了一个新视点: 对基因组而言, 不仅仅是序列包含遗传信息, 而且其修饰也可以记载遗传信息。

基因修饰: 主要是指利用生物化学方法修改 DNA 序列, 将目的基因片段导入宿主细胞内, 或者将特定基因片段从基因组中删除, 从而达到改变宿主细胞基因型或者使得原有基因型得到加强的作用。

摘要

背景: 随着干细胞移植治疗技术的发展及基因修饰技术的兴起为肺动脉高压的治疗提供了新的思路和方法。

目的: 观察人端粒酶反转录酶基因修饰人羊膜间充质干细胞移植对肺动脉高压大鼠的治疗效果。

方法: 66 只成年雌性 Wistar 大鼠给予野百合碱腹腔注射 (60 mg/kg) 进行肺动脉高压模型复制, 造模成功 63 只随机分成 3 组, 其中肺动脉高压组于颈内静脉移植 1 mL 的 L-DMEM 培养基, 人羊膜间充质干细胞组于颈内静脉移植 1 mL 人羊膜间充质干细胞悬液, 人端粒酶反转录酶组于颈内静脉移植 1 mL 人端粒酶反转录酶转染人羊膜间充质干细胞悬液。移植后 3 周观察对比各组大鼠血流动力学、血浆内皮素 1 水平, 以及右心室的肥大指数及心肌细胞凋亡情况。

结果与结论: ①治疗 3 周后各组间大鼠动脉血压差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 人端粒酶反转录酶组大鼠肺动脉收缩期压力和平均肺动脉压明显低于肺动脉高压组、人羊膜间充质干细胞组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。②各组大鼠右心室的肥大指数差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。③与肺动脉高压组及人羊膜间充质干细胞组相比, 人端粒酶反转录酶组大鼠血浆内皮素 1 水平显著降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。④人端粒酶反转录酶组心肌细胞凋亡数较人羊膜间充质干细胞组和肺动脉高压组明显减少。⑤结果显示携带人端粒酶反转录酶基因的人羊膜间充质干细胞移植能够改善肺动脉高压大鼠的血流动力学异常状态, 还可以保护机体血管内皮细胞, 减少心肌细胞的凋亡。

关键词:

干细胞; 移植; 人羊膜间充质干细胞; 人端粒酶反转录酶; 肺动脉高压; 内皮素 1; 血流动力学; 细胞凋亡

主题词:

羊膜; 间质干细胞移植; 高血压, 肺性; 端粒; 末端转移酶; 组织工程

Zhang Chao, Master,
Attending physician,
Department of Internal
Medicine, Xianshuigu
Hospital of Jinnan District,
Graduate School of Tianjin
Medical University, Tianjin
300350, China

Corresponding author: Cao
Jie, Master, Chief
physician, Department of
Respiratory Medicine,
General Hospital of Tianjin
Medical University, Tianjin
300052, China

Transplantation of human telomerase reverse transcriptase-transfected human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of pulmonary hypertension

Zhang Chao¹, Cao Jie², Zhang Su-fang³ (¹Department of Internal Medicine, Xianshuigu Hospital of Jinnan District, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300350, China; ²Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; ³Health Center of Balitai Town, Tianjin 300350, China)

Abstract

BACKGROUND: The development of stem cell transplantation and genetic modification technology provides new ideas and methods for the treatment of pulmonary hypertension.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effects of transplantation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-transfected human amniotic mesenchymal stem cells in pulmonary hypertension rats.

METHODS: Human amniotic mesenchymal stem cells were cultured and purified *in vitro*, and then transfected with adenovirus-mediated hTERT. Sixty-six adult Wistar rats were enrolled to prepare pulmonary hypertension models through intraperitoneal injection of 60 mg/kg monocrotaline and then 63 model rats were randomly assigned into three groups: model group treated with transplantation of 1 mL of L-DMEM *via* the jugular vein, cell transplantation group treated with transplantation of 1 mL of untransfected human amniotic mesenchymal stem cell suspension, and transfection group treated with transplantation of 1 mL of human amniotic mesenchymal stem cell suspension transfected with hTERT. Hemodynamic changes, plasma endothelin-1 level, hypertrophy index of the right ventricle and myocardial cell apoptosis were compared among different groups at 3 weeks after transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: After 3 weeks of treatment, there were no differences in the arterial blood pressure of the three groups ($P > 0.05$); however, the systolic pressure of the pulmonary artery and mean pulmonary arterial pressure were significantly lower in the transfection group than the model group and cell transplantation group ($P < 0.05$). Hypertrophy index of the right ventricle had no difference among the three groups ($P > 0.05$). The level of plasma endothelin-1 was significantly lower in the transfection group than the model group and cell transplantation group ($P < 0.05$). Apoptosis in myocardial cells was significantly reduced in the transfection group compared with the model group and cell transplantation group ($P < 0.05$). Experimental findings suggest that the transplantation of hTERT-transfected human amniotic mesenchymal stem cells can improve the hemodynamic levels in pulmonary blood vessels of pulmonary hypertension rats to protect vascular endothelial cells and reduce myocardial cell apoptosis.

Subject headings: Amnion; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Hypertension, Pulmonary; Telomerase; Tissue Engineering

Cite this article: Zhang C, Cao J, Zhang SF. Transplantation of human telomerase reverse transcriptase-transfected human amniotic mesenchymal stem cells in the treatment of pulmonary hypertension. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(6):820-826.

0 引言 Introduction

先天或后天致病原因导致的肺血管压力长期增高引起肺动脉高压, 若临床治疗不及时, 随着病程延长将导致右心室负荷升高, 严重时出现右心衰竭等不良后果^[1-3]。传统治疗方案, 如抗凝、扩张血管及抗增殖和促凋亡药物等治疗效果仍不十分理想, 均不能从根本上逆转肺血管重塑的问题^[4-5]。近期研究表明, 基因修饰技术及干细胞移植治疗有可能在肺动脉高压治疗中取得显著效果^[6-9], 人羊膜间充质干细胞是干细胞家族的重要成员, 其提取于胎儿分娩后的废弃物羊膜, 羊膜位于胎盘的最内层, 包括上皮层、基膜层和间质层, 无肌肉、血管神经和淋巴系统, 与绒毛膜较容易分离^[10-11], 研究发现人羊膜间充质干细胞也具有多向分化潜能^[12-13]。端

粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是调控细胞增殖和定向分化的首选生长因子之一, 有着多重生物学效应^[14-15]。实验探讨携带人端粒酶反转录酶基因的人羊膜间充质干细胞移植对大鼠肺动脉高压的治疗效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年1月至2015年1月在天津医科大学内分泌研究所实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级雌性Wistar大鼠66只, 2月龄, 体质量260-300 g, 购于天津医科大学动物实验室, 许

可证号: SCXK(津)20070001。

1.3.2 试剂和仪器 野百合碱(上海宝曼生物科技有限公司), L-DMEM培养基、0.25%胰酶(美国Sigma公司), 胎牛血清(美国Hyclone公司)、TUNEL凋亡检测试剂盒(Roche公司)、携带人端粒酶反转录酶基因腺质粒载体(中国医学科学院提供)、ELISA试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司)、二氧化碳培养箱(英国RS Biotech公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人羊膜间充质干细胞的培养 获取胎盘事先得得到产妇和家属的知情同意, 依据参考文献[16]方法分离获取人羊膜。采用D-Hank's液反复洗涤羊膜以清除残留血渍、黏液, 剪碎羊膜, 放入0.25%胰酶中37 °C 200 r/min消化10 min, 清除人羊膜上皮细胞, 弃去消化液, 经沉淀后填入新鲜消化液, 重复进行2次。用0.01%胶原酶及DNA酶混合液在37 °C下以200 r/min继续旋转消化1 h。待消化组织成絮状, 利用不锈钢网过滤后收集细胞悬液, 用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液重新沉淀悬浮细胞, 计数, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂饱和湿度培养箱中培育, 培养40 h后更换培养液, 弃去未贴壁细胞, 观察到贴壁细胞面积达90%时, 用0.25%胰酶消化细胞, 离心后获得人羊膜间充质干细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态。

1.4.2 人端粒酶反转录酶电转染羊膜间充质干细胞 第3代羊膜间充质干细胞在37 °C、饱和湿度、体积分数为5%CO₂培养箱中常规培养24 h。将处于对数生长期的细胞制成单细胞悬液, 利用PBS清洗并经胰酶消化, 离心收集羊膜间充质干细胞, 用电穿孔缓冲液重悬, 离心800×g, 静置5 min, 清洗细胞3次, 离心, 重悬于电转液中, 转移至电击杯, 加入20 μg质粒DNA, 混匀, 放置冰上30 min后, 以电压350 V/cm, 电容25 μF, 时间常数T为0.9 ms的电转化参数, 进行电穿孔。将转染后的羊膜间充质干细胞放置于室温30 min, 然后移入含体积分数10%小牛血清, 1%双抗的DMEM培养基中, 置于37 °C、体积分数5%CO₂孵箱内培育。

1.4.3 RT-PCR检测 细胞经过电转染处理后分为对照组(正常羊膜间充质干细胞)、空载质粒组、人端粒酶反转录酶转染组。采用Trizol法提取总RNA, 紫外分光光度计测定其含量, 严格按照反转录合成试剂盒说明书将提取的RNA进行反转录。PCR反应条件: 94 °C变性5 min, 95 °C变性30 s, 54 °C退火36 s, 72 °C延伸30 s, 循环36个周期后, 72 °C延伸6 min。于4 °C条件下保

存产物。PCR每一反应重复3次。取5 mL PCR产物进行电泳, 设β-actin为内参照。电泳后在GDSS000凝胶自动成像仪上拍照保存图像进行分析, 应用Image-Pro Plus 8.0软件, 对人端粒酶反转录酶条带与β-actin条带的相对灰度比值进行分析, 然后进行mRNA半定量分析。

引物序列:

基因	引物序列	片段长度
人端粒酶	上游: 5'-CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT-3'	111 bp
	下游: 5'-CAC ACA TGC GTG AAA CCT GTA-3'	
β-actin	上游: 5'-TAT CGG ACG CCT GGT TAC-3'	151 bp
	下游: 5'-CTC AGC CTT GAC TGT GCC-3'	

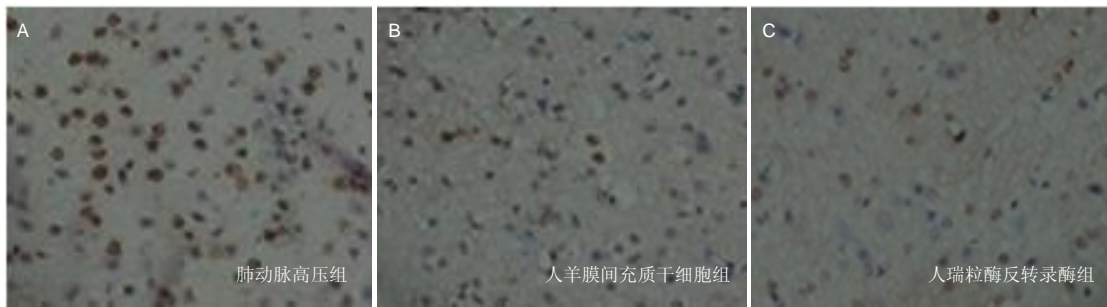
1.4.4 野百合碱诱导肺动脉高压模型制备 66只成年雌性Wistar大鼠通过一次性腹腔注射野百合碱60 mg/kg, 21 d后观察大鼠的食欲、行为等生活习性, 并通过右心导管测定肺动脉压力, 以平均肺动脉压> 35 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)为造模成功, 造模成功63只。

1.4.5 实验分组及移植 63只造模成功的Wistar大鼠随机分成肺动脉高压组、人羊膜间充质干细胞组、人端粒酶反转录酶组, 每组21只, 其中肺动脉高压组进行肺动脉高压模型复制后30 min, 于颈内静脉移植1 mL L-DMEM培养基; 人羊膜间充质干细胞组进行肺动脉高压模型复制后30 min, 于颈内静脉移植1 mL骨髓间充质干细胞悬液($1.6 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$); 人端粒酶反转录酶组进行肺动脉高压模型复制后30 min, 于颈内静脉移植1 mL人端粒酶反转录酶基因转染的骨髓间充质干细胞悬液($1.6 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$)。

1.4.6 相关功能检测 经过3周治疗后, 检测各组大鼠血流动力学水平和右心室的肥大指数[即右心室/(左心室+室间隔)], ELISA法检测血浆内皮素1水平。

1.4.7 右心室心肌细胞凋亡检测 治疗3周后分别随机取3组大鼠各5只, 麻醉满意后剖胸, 行左心室主动脉插管, 以40 g/L多聚甲醛灌流进行固定。摘取右心室标本进行石蜡切片, TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况, 按德国Roche公司试剂盒购操作。待水化、37 °C条件下蛋白酶K消化10 min, 行标记液标记后, 37 °C下经生物素化的地高辛反应30 min, 加SABC, DAB显色, 封固, 损伤区周围随机选取不重复的5个高倍视野, 对胞核含棕黄色颗粒的细胞进行计数。

1.5 主要观察指标 ①人羊膜间充质干细胞形态。②人端粒酶反转录酶mRNA表达。③大鼠肺动脉收缩期压

图3 各组大鼠右室心肌细胞凋亡情况($\times 400$)Figure 3 Apoptosis in myocardial cells of the rat right ventricle ($\times 400$)

图注: 图中 A 为肺动脉高压组凋亡细胞最多; B 为人羊膜间充质干细胞组可见较多棕黄色颗粒着染的心肌细胞; C 为人端粒酶反转录酶组凋亡心肌细胞最少。

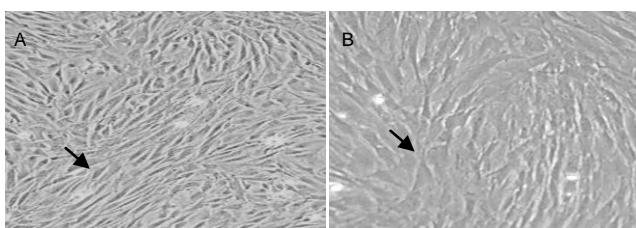


图1 人羊膜间充质干细胞形态

Figure 1 Morphology of human amniotic mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 箭头所示为呈梭形的人羊膜间充质干细胞(倒置显微镜, $\times 40$); B 箭头所示为漩涡状生长的人羊膜间充质干细胞(倒置显微镜, $\times 100$)。

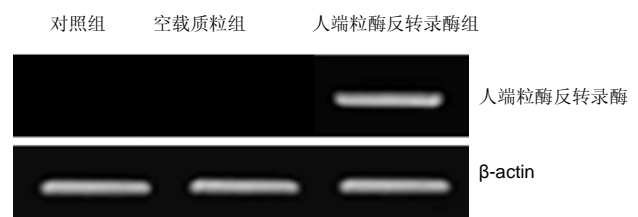


图2 人端粒酶反转录酶基因 RT-PCR 产物电泳图

Figure 2 RT-PCR gel electrophoretogram of human telomerase reverse transcriptase gene

表1 各组大鼠血流动力学水平变化

($\bar{x} \pm s$, $n=21$)

Table 1 Changes in the hemodynamic levels of rats in each group

项目	肺动脉高压组	人羊膜间充质干细胞组	人端粒酶反转录酶组
肺动脉收缩期压力(mm Hg)	46.165 \pm 7.274	45.253 \pm 6.745	36.345 \pm 5.543 ^a
平均肺动脉压(mm Hg)	31.915 \pm 1.366	31.468 \pm 1.286	25.807 \pm 1.562 ^a
动脉血压(mm Hg)	86.475 \pm 11.274	83.876 \pm 11.547	86.20 \pm 10.616

表注: 与其他 2 组比较, ^a $P < 0.05$ 。1 mm Hg=0.133 kPa。

力、平均肺动脉压、动脉血压。④右室肥大指数。⑤血浆内皮素1水平。⑥凋亡细胞数目。

1.6 统计学分析 数据经过SPSS 18.0软件统计处理, 其中计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 选用 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人羊膜间充质干细胞形态 起初培养的人羊膜间充质干细胞呈贴壁生长, 形态多样, 呈梭形、多边形、星形、纺锤形或多角形等(图1A)。传至第2代后人羊膜间充质干细胞贴壁速度加快, 8 h几乎完全贴壁, 细胞呈现均匀一致的成纤维细胞样, 细胞多呈单层放射形状

或漩涡状生长, 倒置显微镜下观察人羊膜间充质干细胞平均直径约为15 μm , 胞浆内含有丰富的中间丝, 含有中等量的高尔基复合体、线粒体和致密体, 胞浆周围有自噬空泡和胞饮小泡, 细胞或细胞突起之间可见到细胞连接结构(图1B)。

2.2 RT-PCR检测人端粒酶反转录酶基因表达 人端粒酶反转录酶基因转染人羊膜间充质干细胞48 h, 人端粒酶反转录酶组检测到人端粒酶反转录酶mRNA表达, 而对照组及空载质粒组却未检测到人端粒酶反转录酶mRNA表达, 见图2。

2.3 实验动物数量分析 66只成年雌性Wistar大鼠参与造模, 造模成功63只, 中途死亡3只。

2.4 各组大鼠血流动力学水平变化 经3周治疗后, 各组动脉血压差异无显著性意义($P > 0.05$); 人端粒酶反转录酶组大鼠肺动脉收缩期压力为(36.345±5.543) mm Hg, 平均肺动脉压为(25.807±1.562) mm Hg, 与肺动脉高压组以及人羊膜间充质干细胞组相比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

2.5 各组右室肥大指数比较 人端粒酶反转录酶组大鼠右心室的肥大指数为43.456 4±8.213 4, 肺动脉高压组右心室的肥大指数为48.231 3±8.346 7, 人羊膜间充质干细胞组右心室的肥大指数为47.854 3± 11.554 3, 3组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.6 各组大鼠血浆内皮素1水平比较 人端粒酶反转录酶组血浆内皮素1水平为(24.974 3±7.556 4)ng/L, 肺动脉高压组为(29.367 4±4.654 7) ng/L, 人羊膜间充质干细胞组为(32.897 6±7.564 5) ng/L, 人端粒酶反转录酶组与肺动脉高压组和人羊膜间充质干细胞组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.7 TUNEL检测细胞凋亡 右心室凋亡心肌细胞的细胞核内可见特异性棕黄色颗粒, 光镜下可见肺动脉高压组凋亡细胞最多(图3A), 人羊膜间充质干细胞组可见较多棕黄色颗粒着染的心肌细胞(图3B); 人端粒酶反转录酶组可见少量的棕黄色颗粒着染的心肌细胞(图3C)。

3 讨论 Discussion

肺动脉高压是一种主要表现为肺血管阻力持续升高的临床综合征, 它的确诊依据有2条: 静息状态下和平均肺动脉压 ≥ 25 mm Hg, 同时符合以上2条者可确诊肺动脉高压, 肺动脉高压可以作为一种疾病而独立存在, 更常见的是很多疾病进展到一定阶段的病理生理表现。由于肺血管重塑引起肺循环血流动力学改变, 最终可导致右心衰竭, 甚至死亡^[16-18]。其病理学改变过程为肺血管的内皮细胞受损, 肺血管结构重建, 肺血管床数量减少, 肺阻力增高, 最终导致右心室肥厚等症^[19-21]。因此, 有效保护肺血管内皮细胞, 可以阻止肺血管结构重建, 使病变肺血管床面积增大, 是降低肺循环阻力, 避免肺动脉高压发生的首要因素^[22-24]。

人羊膜间充质干细胞是间充质干细胞的一种, 具有低免疫原性、高增殖能力、强分化潜能、来源方便等独特优势^[25-26]。间充质干细胞不仅可以分化成为内皮细胞, 修复损伤部位的血管内皮细胞^[27-28], 还可以发育成为新生的血管网, 通过增加循环血管床数量进而对肺动脉高压起到治疗作用, 与此同时机体血流动力学的紊乱

状态也得到了有效的改善^[29-31]。人端粒酶反转录酶是端粒酶的催化亚单位, 经人端粒酶反转录酶基因电转染可以取得有效而持久的作用。通过荧光蛋白观察转染细胞的阳性表达率^[32-35], 随着培养时间的延长而呈现出增高表达趋势。另有实验研究发现, 用电穿孔法转染基因, 目的基因瞬时表达率高于脂质体转染方法, 因此电转染法可作为一个简单可行、有效的方法^[36-37]。

据文献研究报道, 使用间充质干细胞治疗肺动脉高压, 机体异常的血流动力学状态可以得到改善^[38-40]。实验结果发现, 人羊膜间充质干细胞移植组与肺动脉高压组大鼠的肺动脉收缩期压力和平均肺动脉压呈下降趋势, 但是差异并没有显著性意义, 这种不显著的治疗效果很可能是由单独使用人羊膜间充质干细胞造成的。端粒酶反转录酶与干细胞移植合用能够起到更强的促进细胞增殖的功效, 而且不影响血管平滑肌合成DNA。实验结果发现, 人端粒酶反转录酶基因转染人羊膜间充质干细胞组大鼠的肺动脉收缩期压力和平均肺动脉压均呈下降趋势, 同时右心室/左心室比值下调, 比较3组之间右心室肥大指数, 差异无显著性意义。由此可见, 联合应用人端粒酶反转录酶与人羊膜间充质干细胞移植治疗疗效显著, 与此同时逆转右心室肥大的趋势也得到了减缓, 这样间接地使右心功能得到改善, 减少心肌细胞的凋亡。该法较单独使用人羊膜间充质干细胞移植效果显著。各组大鼠治疗前后的动脉血压差异无显著性意义, 这说明这种治疗手段有良好的安全性。

内皮细胞可以合成一种叫内皮素1的调节肽, 它不仅加强缩血管作用, 而且还能使缩血管作用更持久, 当内皮素1与肺血管平滑肌上相应受体结合后, 成纤维细胞及血管平滑肌细胞受到刺激而增生, 这样就促进了肺动脉高压的发生与发展。人羊膜间充质干细胞携带人端粒酶反转录酶基因治疗, 能够使机体血流动力学指标得到显著改善, 并且降低了血浆内皮素1水平, 这说明联合应用更具有优势。

综上所述, 人端粒酶反转录酶基因修饰人羊膜间充质干细胞移植治疗肺动脉高压, 能显著降低肺动脉收缩期压力、平均肺动脉压力及血浆内皮素1水平, 使大鼠机体肺血管中血流动力学水平得到改善, 同时对机体的血管内皮细胞起到保护作用。

作者贡献: 实验设计为张超, 实验实施为张超、曹洁、张素芳, 实验评估为张超, 资料收集为张超、张素芳。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经天津医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 SCXK(津)20070001。实验动物在麻醉下进行所有手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 杨涛,何建国.左心疾病相关性肺动脉高压预后的研究进展[J].中国循环杂志,2013,28(3):237-239.
- [2] Zheng Y, Yang T, Chen G, et al. Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis of survival outcomes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(1): 13-21.
- [3] Kasai H, Matsumura A, Sugiura T, et al. Noninvasive assessment of pulmonary vascular resistance by echocardiography in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Respir Investig.* 2015;53(5): 210-216.
- [4] Chen G, Yang T, Gu Q, et al. Elevated plasma YKL-40 as a prognostic indicator in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* 2014; 19(4):608-615.
- [5] 徐英.携带人端粒酶反转录酶基因脐血间充质干细胞移植治疗肺动脉高压[J].中国组织工程研究,2015,19(6): 923-927.
- [6] Gurtu V, Michelakis E. Cell-Based Gene Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension: Journeys in Translational Medicine. *Circ Res.* 2015;117(7): 596-598.
- [7] Enderby CY, Burger C. Medical treatment update on pulmonary arterial hypertension. *Ther Adv Chronic Dis.* 2015;6(5):264-272.
- [8] Adir Y, Elia D, Harari S. Pulmonary hypertension in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Eur Respir Rev.* 2015;24(137):400-410.
- [9] 王秋芬,廖玉华.欧洲心脏病协会2004年肺动脉高压诊断和治疗指南简介[J].临床心血管病杂志,2005, 21(7): 385-386.
- [10] Naeije R, Vonk Noordegraaf A, Kovacs G. Exercise-induced pulmonary hypertension: at last. *Eur Respir J.* 2015;46(3):583-586.
- [11] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-3843.
- [12] 王俊东,杨达宽,李治纲,等.野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的建立[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5237-5240.
- [13] Okazaki H, Hata N, Shirakabe A, et al. Early Effects of Oral Pulmonary Vasodilators in an Elderly Patient with Critical Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Case Report. *J Nippon Med Sch.* 2015;82(4):206-210.
- [14] Avxent'eva MV, Cherniavskii AM, Piadushkina EA. Economic Evaluation of Riociguat in Patients with Inoperable or Residual Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Kardiologija.* 2015;55(3): 33-40.
- [15] Lisignoli G, Remiddi G, Cattini L, et al. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure. *Connect Tissue Res.* 2001;42(1):49-58.
- [16] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3213-3218.
- [17] Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977;91(3):335-344.
- [18] Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood.* 1997;90(9):3471-3481.
- [19] 赵科研,王辉山,侯明晓,等.不同数目骨髓间充质干细胞移植对大鼠肺动脉高压的作用及内皮素-1表达的影响[J].中国胸心血管外科临床杂志,2012,19(3):298-303.
- [20] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309): 71-74.
- [21] Barry F, Boynton R, Murphy M, et al. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):519-524.
- [22] Fiszer R, Karwot B, Chodór B, et al. Potts' shunt in a child with idiopathic pulmonary arterial hypertension - one-and-a-half year observation. *Kardiochir Torokochirurgia Pol.* 2015;12(2):170-172.

- [23] Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int*. 2008;32(9):1116-1125.
- [24] 张春曦, 黄达德, 陈敏东, 等. 间充质干细胞联合辛伐他汀对动力性肺动脉高压的影响[J]. *广州医药*, 2012, 43(6):1-3.
- [25] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999;181(1):67-73.
- [26] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004; 103(5):1662-1668.
- [27] Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, et al. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*. 2001;28(2):174-181.
- [28] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7): 2821-2827.
- [29] 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.
- [30] Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*. 2003; 134(4):551-558.
- [31] Wu GD, Nolte JA, Jin YS, et al. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*. 2003;75(5): 679-685.
- [32] Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-3729.
- [33] Wang XX, Zhang FR, Shang YP, et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(14):1566-1571.
- [34] Baber SR, Deng W, Master RG, et al. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292(2):H1120-1128.
- [35] Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, et al. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res*. 2007;8:8.
- [36] Breitbach M, Bostani T, Roell W, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 2007;110(4):1362-1369.
- [37] Collino F, Deregibus MC, Bruno S, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*. 2010;5(7):e11803.
- [38] He J, Wang Y, Sun S, et al. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(5):493-500.
- [39] 陈建英, 徐军发, 杨宇, 等. 辛伐他汀对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠IL-6和IL-8表达的影响[J]. *中南药学*, 2009, 7(7):506-510.
- [40] Bazan IS, Fares WH. Pulmonary hypertension: diagnostic and therapeutic challenges. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:1221-1233.