

研究报告

# 通过形成类胚体诱导人羊水多能干细胞向心肌细胞分化

王晗, 陈帅, 程祥, 窦忠英, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100

**摘要:** 由人羊水中分离羊水多能干细胞, 通过形成类胚体诱导其向心肌细胞分化。取人羊水标本进行体外培养, 分离得到人羊水干细胞, 已连续传代培养至 42 代, 采用免疫细胞化学、RT-PCR 和流式细胞仪技术对羊水干细胞的生物学特性进行检测。取 10~15 代羊水干细胞, 悬浮培养使其形成类胚体, 进而向心肌细胞诱导分化。培养的羊水干细胞呈成纤维样, 表达部分胚胎干细胞特异标志基因, 悬浮培养可形成类胚体。类胚体碱性磷酸酶(AP)检测呈阳性, 表达三胚层特异标志基因 *fgf5*、 $\zeta$ -globin 和  $\alpha$ -fetoprotein。羊水干细胞形成类胚体后进行诱导, 得到  $\alpha$ -actin 阳性细胞, 表达心肌细胞特异标志基因 *Tbx5*、*Nkx2.5*、*GATA4* 和  $\alpha$ -MHC。试验结果表明, 从人羊水标本中可分离得到具有胚胎干细胞特性的细胞, 经初步检测确定为羊水干细胞, 并能通过形成类胚体诱导其向心肌细胞分化。

**关键词:** 人, 羊水干细胞, 类胚体, 心肌细胞, 诱导分化

## Differentiation of Human Amniotic Fluid Stem Cells into Cardiomyocytes through Embryonic Body Formation

Han Wang, Shuai Chen, Xiang Cheng, Zhongying Dou, and Huayan Wang

Northwest A & F University, College of Veterinary Medicine, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, Yangling 712100, China

**Abstract:** To isolate human amniotic fluid stem cells (hASCs) and induce hASCs into cardiomyocytes after forming the embryonic bodies. We cultivated hASCs isolated from the amniotic fluid continually for over 42 passages. The biological characteristics of hASCs were detected by immunocytochemistry, RT-PCR and flow cytometer. hASCs at 10~15th passage were suspension cultured to form embryonic bodies that were induced to cardiomyocytes. Fibroblastoid-type hASCs were obtained. Immunocytochemistry, RT-PCR and flow cytometry analysis demonstrated that hASCs were positive for some specific makers of the embryonic stem cell. hASCs could form embryonic bodies that were alkaline-phosphatase positive and expressed *fgf5*,  $\zeta$ -globin and  $\alpha$ -fetoprotein. The embryonic bodies could differentiate into cardiomyocytes showing  $\alpha$ -actin positive and *Tbx5*, *Nkx2.5*, *GATA4* and  $\alpha$ -MHC positive. We concluded that hASCs obtained from human amniotic fluid could differentiate into cardiomyocytes through the formation of embryonic bodies.

**Keywords:** human, amniotic fluid stem cells, embryonic body, cardiomyocytes, differentiation

由于胚胎干细胞的研究受到伦理道德问题的束缚与限制, 很多研究者都在尝试寻找新的干细胞来

源。2003 年, Prusa 等<sup>[1]</sup>在羊水中发现 Oct-4 阳性细胞, 提示羊水中可能存在多能干细胞。2006 年 11 月

**Received:** January 11, 2008; **Accepted:** March 24, 2008

**Supported by:** the Outstanding Talents Fund of Northwest A&F University (No. 0808061).

**Corresponding author:** Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

西北农林科技大学人才支持计划(No. 0808061)。

举行的美国心脏协会会议上, 瑞士苏黎世大学的 Dr. Simon 宣布, 他们首次用取自羊水的干细胞培育出人的心脏瓣膜。2007 年, Anthony 等<sup>[2]</sup>于 Nature Biotechnology 杂志上报道, 他们在孕中期羊水中发现少量具有胚胎干细胞特性的细胞, 并将其命名为羊水干细胞。这种细胞表达多种胚胎干细胞和成体干细胞标志基因, 体外诱导后可向三个胚层的细胞分化。目前, 虽然还不清楚羊水来源的干细胞到底能分化成多少种细胞, 但研究人员尝试分化和培育的每一种细胞都取得了成功, 且通过了功能测试。

羊水干细胞的医学应用优势和潜力在于它很容易获取, 且抽取羊水过程并不会损害母体, 也不会像胚胎干细胞研究那样造成伦理问题, 因此其研究前景较为广阔。本研究的目的是从人孕中及孕晚期羊水标本中分离羊水干细胞, 通过免疫细胞化学、RT-PCR 和流式细胞仪技术检测其生物学特性, 并通过形成类胚体诱导羊水干细胞向心肌细胞分化。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

$\alpha$ -MEM (Invitrogen), Chang Medium (IrvineScientific), 谷氨酰胺 (GIBCO), 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (GIBCO), KSR (Knockout Serum Replacement) (GIBCO), DMSO (Sigma), 兔抗人 Oct-4 抗体 (Chemicon), 兔抗人端粒酶 (hTERT) 抗体 (rockland), 兔抗人 SSEA-1/3/4 抗体 (Chemicon), 鼠抗人 CD29、34、44、45、73、105、133 抗体 (Abcam 公司), 鼠抗人  $\alpha$ -actin 抗体 (Sigma), SP 超敏试剂盒 (北京中彬金桥生物技术有限公司), DAB 显色液 (北京中彬金桥生物技术有限公司), RNA 提取试剂 Trizol (Merck), RT-PCR Kit (Fermentas), PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 羊水干细胞的原代分离与培养

从医院妇产科收集孕中期及孕晚期羊水, 4°C 保存带回实验室。先用 200 目滤纱过滤, 以除去较大的组织碎片, 然后 1000 r/min, 离心 6 min, 弃上清, 收集细胞。再加入含有 1% 青链霉素的 PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min (37°C), 然后离心, 收集细胞。最后加入羊水细胞培养液, 于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。羊水细胞培养液成份为  $\alpha$ -MEM+10% FBS+20% Chang Medium+1% 谷氨酰胺+1% 青链霉素。细胞培养 5~12 d 后, 如果有细胞贴壁, 则进行传代, 继续

培养, 待细胞生长至 80%~90% 时传代。

### 1.3 生长曲线测定

分别取第 5、10、15 代细胞, 接种于 24 孔板, 每天抽取 3 孔进行细胞计数, 计算平均值, 连续观察 8 d, 绘制生长曲线, 计算群体倍增时间, 公式为  $TD = t \times \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$  (TD: 细胞群体倍增时间,  $t$ : 培养时间,  $N_0$ : 接种后的细胞数,  $N_t$ : 培养  $t$  小时后的细胞数)<sup>[3]</sup>。

### 1.4 羊水干细胞特异标志基因的表达

#### 1.4.1 免疫细胞化学检测

取第 10、15 代细胞进行免疫细胞化学染色。4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min; 加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温作用 30 min; 加 5% BSA, 室温封闭 30 min; 分别滴加 Oct-4、hTERT、SSEA-1/3/4 抗体 (工作浓度为 1:500), CD73、CD105、CD133 抗体 (工作浓度为 1:200), 同时以滴加 PBS 组为阴性对照, 4°C 过夜; 滴加生物素标记的第二抗体, 室温下孵育 20 min; 滴加链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶, 室温孵育 20 min; DAB 显色, 苏木精复染, 镜下观察结果。

#### 1.4.2 RT-PCR 检测

取 15 代羊水干细胞, 用 Trizol 提取总 RNA, 然后通过 RT-PCR 方法检测以下基因的表达, Oct-4、Nanog、CD117、CD90、CD45、HLA-ABC、HLA-DR, 内参为 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)。

RT-PCR 反应循环参数为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 退火 60 s, 72°C 延伸 60 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析并照相。引物序列及退火温度见表 1。

#### 1.4.3 流式细胞仪检测

取第 15 代细胞, 通过流式细胞仪检测 CD29、34、44、45、105 的表达情况。

### 1.5 类胚体形成

将 10~15 代羊水干细胞, 按  $2.5 \times 10^5$ /mL 密度接种至预先用 1% 琼脂铺过的培养皿上, 用  $\alpha$ -MEM+10% KSR 的培养液悬浮培养, 每 2 天半量换液, 观察类胚体的形成。形成的类胚体接种至无饲养层的培养皿上, 待贴壁后进行碱性磷酸酶活性检测。同时, 收集悬浮培养 6 d 的类胚体, 按上述 1.4.2 方法进行 RT-PCR 反应, 检测三胚层特异标志基因 fgf5 (外胚层)、 $\zeta$ -globin (中胚层) 和  $\alpha$ -fetoprotein (内胚层) 的表达情况。引物序列及退火温度见表 1。

表 1 引物序列及参考文献  
Table 1 The primer sequences and the references

Gene	Primer sequence (5'→3')	Size	Annealing temp	Reference
Oct-4	cgtgaagctggagaaggagaagct caaggccgcagcttacacatggt	247 bp	57°C	<i>Biol Reprod</i> , 2006, <b>74</b> (3): 545-551 <sup>[4]</sup>
Nanog	gcgcggtcttggtcactgc gcctccaatcccaacaatacga	426 bp	57°C	<i>Biol Reprod</i> , 2006, <b>74</b> (3): 545-551 <sup>[4]</sup>
CD117	ggcagccagaatatacctcttac taccacggcctctctgctggttg	423 bp	60°C	<i>Mol Cell Biol</i> , 2007, <b>27</b> (1): 267-282 <sup>[5]</sup>
CD90	atgaacctggccatcagcatcgc tcacaggacatgaaatccgtgg	486 bp	68°C	<i>J Gen Virol</i> , 2004, <b>85</b> (7), 1995-2000 <sup>[6]</sup>
CD45	tgactacagcaaatgcccag aaggtaggcgtctgtactg	224 bp	61°C	<i>Chinese Medical Journal</i> , 1999, <b>112</b> (12): 1073-1076 <sup>[7]</sup>
HLA ABC	gtatttctcacatccgtgtccc gtccgccgggtccaagagcgcag	394 bp	68°C	<i>Cell Prolif</i> , 2007, <b>40</b> (1): 75-90 <sup>[8]</sup>
HLA-DR	caagcgtccaactatactccgat accctgcagtcgtaaacgtcc	273 bp	65°C	<i>Blood</i> , 2003, <b>101</b> (12): 4870- 4877 <sup>[9]</sup>
GAPDH	acaacttggatcgtggaa aaattcgtgtcataccagg	456 bp	53°C	<i>Cell Prolif</i> , 2007, <b>40</b> (1): 75-90 <sup>[8]</sup>
fgf5	tacagagtggcatcggtttc cgcggtccctgtatattaac	433 bp	55°C	<i>WIPO Patent</i> , WO/2001/025271 <sup>[10]</sup>
ξ-globin	ggctgagaggaccatcattgt tcaggacagaggatacagacc	398 bp	57°C	<i>Molecular Medicine</i> , 2000, <b>6</b> (2): 88-95 <sup>[11]</sup>
α-fetoprotein	agaacctgtcacaagctgtg gacagcaagctgaggatgtc	218 bp	54°C	<i>Nature Medicine</i> , 2004, <b>10</b> (1): 55-63 <sup>[12]</sup>
Tbx5	attgtgaaaccgagaatgg gcgctccttgaggtgaaaag	250 bp	55°C	<i>Stem Cells</i> , 2006, <b>24</b> :151-167 <sup>[13]</sup>
Nkx2.5	agcacttccgctcacttc ccgtgcacagagtggtactg	232 bp	60°C	<i>Experimental Transplantation</i> , 2005, <b>79</b> (5): 528-535 <sup>[14]</sup>
GATA4	tccctctccctcctcaaatc tcagcgtgtaaagcactctg	193 bp	54°C	<i>Nature Medicine</i> , 2004, <b>10</b> (1): 55-63 <sup>[12]</sup>
α-MHC	attgctgaaaccgagaatgg gcgctccttgaggtgaaaag	147 bp	58°C	<i>WIPO Patent</i> , WO/2007 /070964 <sup>[15]</sup>

## 1.6 羊水干细胞向心肌细胞诱导及检测

将 10~15 代羊水干细胞按  $2.5 \times 10^5$ /mL 密度接种至预先用 1%琼脂铺过的培养皿上,用 $\alpha$ -MEM+10% KSR 的培养液悬浮培养 2 d 后,换成 $\alpha$ -MEM+10% KSR+0.75% DMSO 的诱导液继续悬浮培养 2 d,然后接种至无饲养层的培养皿上,待贴壁后将培养液换为 $\alpha$ -MEM+10% FBS+1%谷胺酰胺+1%青链霉素,常规培养。

取贴壁后 0、2、4 d 细胞进行心肌细胞特异标志基因的检测:①采用上述 1.4.1 方法进行免疫细胞化学检测,鼠抗人  $\alpha$ -actin 抗体工作浓度为 1:500;②采用上述 1.4.2 方法进行 RT-PCR 检测,心肌细胞特异标志基因 Tbx5、Nkx2.5、GATA4 及 $\alpha$ -MHC 的引物序列及退火温度见表 1。

## 2 结果

### 2.1 羊水干细胞的形态及生长特性

从孕中期及孕晚期羊水收集的细胞在培养

4~12 d 后均有细胞贴壁,早期细胞形态主要表现为类上皮样(图 1A),传代培养 2~3 代后,开始出现类成纤维样细胞,而上皮样细胞逐渐减少或消失,传代培养 5~8 代后,90%以上细胞表现为成纤维样(图 1B)。目前,其中一株已传至 42 代,形态仍为成纤维样(图 1C)。细胞生长迅速,第 5、10、15 代细胞群体倍增时间分别为 33、34、39 h(图 1D)。

### 2.2 羊水干细胞特异标志基因表达情况

#### 2.2.1 免疫细胞化学检测结果

进行免疫细胞化学染色,分析结果表明,分离得到的羊水干细胞表达 Oct-4、hTERT、SSEA-1、SSEA-4、CD73、CD105,不表达 SSEA-3 和 CD133(见图 2)。

#### 2.2.2 RT-PCR 结果

通过 RT-PCR 检测结果表明,本试验分离得到的羊水干细胞表达 Oct-4、Nanog、CD117、CD90、HLA-ABC、HLA-DR;不表达 CD45(见图 3)。

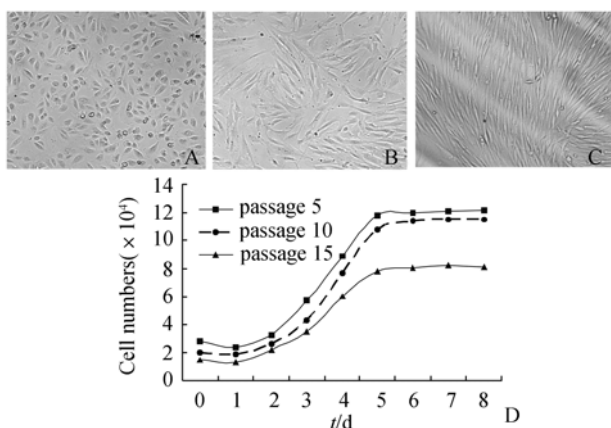


图 1 人羊水干细胞形态及生长曲线

Fig. 1 The morphology and the growth curve of the human amniotic fluid stem cells

A: the epithelioid cells (P1), 100×; B: the fibroblastoid cells (P8), 100×; C: the fibroblastoid cells (P42), 100×; D: the growth curve

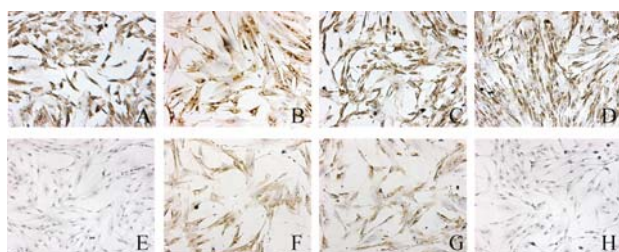


图 2 免疫细胞化学检测结果

Fig. 2 Analysis of immunocytochemistry

A: Oct-4 positive (P10), 100×; B: hTERT positive (P10), 100×; C: SSEA-1 positive (P10), 100×; D: SSEA-4 positive (P10), 100×; E: SSEA-3 negative (P10), 100×; F: CD73 positive (P15), 100×; G: CD105 positive (P15), 100×; H: CD133 negative (P15), 100×

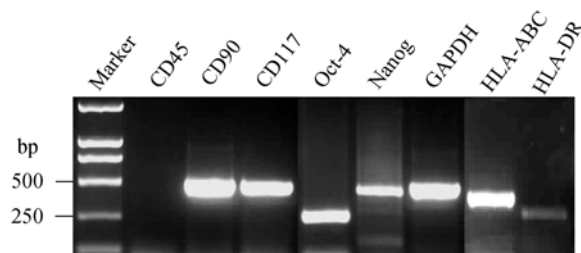


图 3 RT-PCR 结果

Fig. 3 Analysis of RT-PCR

Marker: DL 2000 DNA ladder marker; CD45: 224 bp; CD90: 486 bp; CD117: 475 bp; Oct-4: 247 bp; Nanog: 426 bp; GAPDH: 456 bp; HLA-ABC: 394 bp; HLA-DR: 273 bp

### 2.2.3 流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测结果表明, 本试验分离得到的羊水干细胞表达 CD29(99.2%)、CD44(98.5%)、CD105 (86.9%), 不表达 CD34(0.4%)、CD45(6.7%) (见图 4)。

### 2.3 羊水干细胞可形成类胚体

本试验分离得到的羊水干细胞悬浮培养 2 d 即可聚集成类胚体(图 5 A), 形态呈圆形, 折光性良好, 碱性磷酸酶(AP)检测呈阳性(图 5 B)。将悬浮培养 6 d 的类胚体进行 RT-PCR 检测, 结果表明, 类胚体中细胞表达 fgf5(外胚层)、 $\xi$ -globin(中胚层)和  $\alpha$ -fetoprotein(内胚层)三胚层特异标志基因(图 5 C)。

### 2.4 羊水干细胞向心肌细胞诱导分化

羊水干细胞悬浮诱导可形成类胚体, 贴壁培养后类胚体周围可生长出长梭形细胞(贴壁培养 1 d)

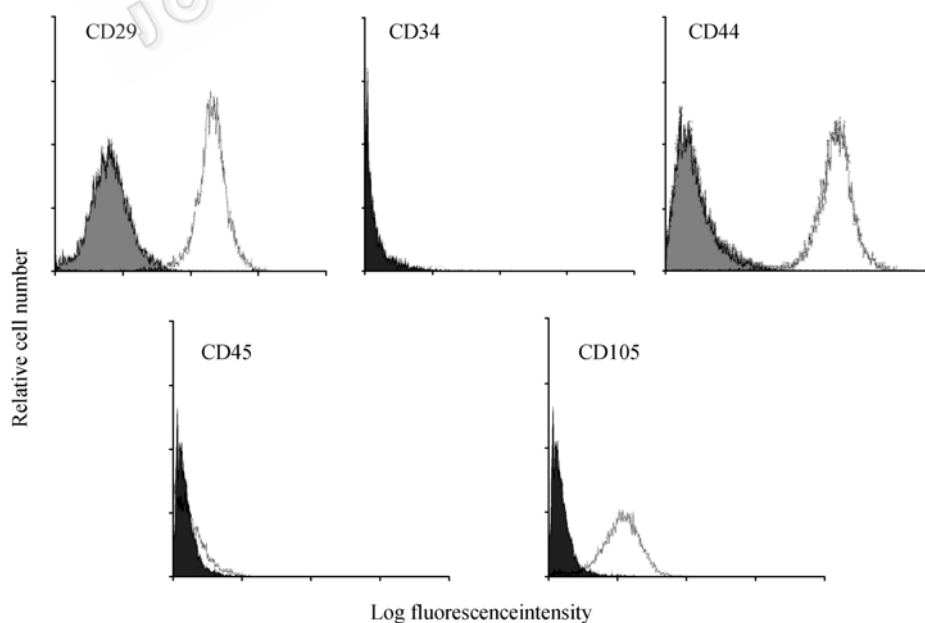


图 4 流式细胞仪检测结果

Fig. 4 Analysis of flow cytometry

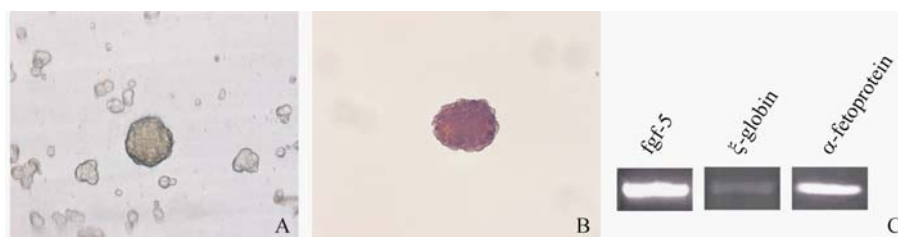


图5 人源羊水干细胞形成的类胚体及相关检测

Fig. 5 Morphology and detection of the embryonic body

A: the embryonic body, 100×; B: AP positive, 100×; C: the analysis of RT-PCR



图6 羊水干细胞形成类胚体并向心肌细胞分化

Fig. 6 Differentiation of hASCs into cardiomyocytes through the formation of embryonic body

A: the embryonic body, 100×; B:  $\alpha$ -actin positive, 100×; C: the results of RT-PCR

(图 6A), 进一步培养, 类胚体周围可出现杆状、索形、较成纤维细胞小的细胞, 类似早期心肌细胞,  $\alpha$ -actin 染色呈阳性(贴壁培养 6 d)(图 6 B), 但尚未观察到能自主性节律搏动的心肌细胞。RT-PCR 检测结果显示, 贴壁培养 4 d 后, 分化的细胞表达心肌细胞特异标志基因 Tbx5(250bp)、Nkx2.5(232bp)、GATA4(193bp)和  $\alpha$ -MHC(147bp)(图 6 C)。

### 3 讨论

2007年, Anthony 等报道在孕中期羊水中分离得到人羊水干细胞, 表达胚胎干细胞和成体干细胞标志基因, 具有像胚胎干细胞一样的自我更新能力<sup>[2]</sup>。Kim 等<sup>[8]</sup>、Tsai 等<sup>[4]</sup>也相继报道分离得到人羊水干细胞。羊水干细胞的优势在于容易获取, 既不损伤母体, 也不会伤害胚胎。有专家认为, 通过羊水提取干细胞不仅避免了关于胚胎干细胞的伦理争论, 而且为今后干细胞研究开辟了新方向<sup>[16]</sup>。本试验培养孕中期及孕晚期羊水标本, 均得到成纤维样细胞, 细胞生长迅速, 其中一株已传至 42 代, 表达 HLA-ABC, 弱表达 HLA-DR; 表达胚胎干细胞标志基因 Oct-4、hTERT、Nanog、SSEA-1、SSEA-4 等, 表达 CD117, 但不表达 SSEA-3; 表达间质细胞标志基因 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 等; 不表达

CD34、CD45 和 CD133 等造血细胞系标志基因, 其生物学特性与相关报道一致<sup>[2,4,8]</sup>, 可确定为羊水干细胞。

羊水干细胞表达 Oct-4, 且表达部分胚胎干细胞和成体干细胞标志基因, 因此 Anthony 等认为羊水干细胞处于胚胎干细胞向成体干细胞过渡的状态<sup>[2]</sup>, 那么, 羊水干细胞是否能像胚胎干细胞一样形成类胚体呢? 本试验尝试将分离培养的羊水干细胞悬浮培养, 结果发现, 羊水干细胞可以聚集成类胚体, 碱性磷酸酶检测呈阳性, 悬浮培养 6 d 的类胚体表达 fgf5(外胚层)、 $\xi$ -globin(中胚层)和  $\alpha$ -fetoprotein(内胚层)三胚层特异标志基因, 具有向三胚层分化的潜能。

Anthony 等对其分离的羊水干细胞进行诱导分化, 得到脂肪、成骨、肌肉、内皮、神经和肝细胞<sup>[2]</sup>。Kim 等<sup>[8]</sup>和 Tsai 等<sup>[4]</sup>也成功诱导羊水干细胞分化为脂肪、成骨、软骨、神经细胞。在上述几篇报道中, 研究者采用的均为直接诱导法, 即将羊水干细胞按一定浓度接种至培养皿, 然后添加不同的诱导液进行诱导。本试验发现羊水干细胞可以形成类胚体, 并表达部分胚胎干细胞标志基因, 因而尝试采用胚胎干细胞诱导分化的方法, 先将羊水干细胞悬浮培养得到类胚体, 然后诱导其向心肌细胞分化, 结果

表明可得到 $\alpha$ -actin 阳性细胞。虽然得到的 $\alpha$ -actin 阳性细胞形态尚不典型, 且也未得到自主性节律搏动的心肌细胞, 但 RT-PCR 结果显示, 诱导后细胞表达 Tbx5、Nkx2.5、GATA4、 $\alpha$ -MHC 等心肌细胞特异标志基因, 说明通过形成类胚体, 可诱导羊水干细胞向心肌细胞分化, 但得到的心肌细胞还处于分化的初期, 诱导体系还有待于进一步完善。

综上, 本试验自不同时期羊水标本中分离得到成纤维样的羊水干细胞, 经免疫细胞化学、RT-PCR 和流式细胞仪检测, 证实其生物学特性与相关报道一致。同时, 本试验发现羊水干细胞可以像胚胎干细胞一样, 通过悬浮培养聚集形成类胚体, 形成的类胚体具有向三胚层分化的潜能, 且对形成的类胚体进行诱导分化, 可得到 $\alpha$ -actin 阳性的心肌细胞, 表达心肌细胞特异标志基因 Tbx5、Nkx2.5、GATA4、 $\alpha$ -MHC。

## REFERENCES

- [1] Prusa AR, Marton E, Rosner M, *et al.* Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*, 2003, **18**(7): 1489-1493.
- [2] Paolo DC, Georg BJ, Siddiqui M, *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(1): 100-106.
- [3] Situ ZQ, Wu JZ. Cell culture. Xi'an: World Publishing Corporation, 1996, 137.  
司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 1996, 137.
- [4] Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, *et al.* Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod*, 2006, **74**(3): 545-551.
- [5] Xiang ZF, Frederike K, Jennifer C, *et al.* Neoplasia driven by mutant c-kit is mediated by intracellular, not plasma membrane, receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(1): 267-282.
- [6] Martina L, Manfred M, Thomas S. Downregulation of the cellular adhesion molecule Thy-1 (CD90) by cytomegalovirus infection of human fibroblasts. *J Gen Virol*, 2004, **85**(7): 1995-2000.
- [7] Xu XQ, Yu ZY, Qian JQ, *et al.* Expression of leukocyte adhesion molecules CD11b, L-selectin and CD45 during hemodialysis. *Chin Med J*, 1999, **112**(12): 1073-1076.
- [8] Kim J, Lee Y, Kim H, *et al.* Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*, 2007, **40**(1): 75-90.
- [9] Odeberg J, Plachter B, Branden L, *et al.* Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR  $\alpha$ -chain. *Blood*, 2003, **101**(12): 4870-4877.
- [10] Ken-Ichi H, James Y. Fibroblast growth factor-5 (fgf-5) is a tumor associated t-cell antigen. *WIPO Patent*, WO 2001/025271, 2001-04-12.
- [11] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine*, 2000, **6**(2): 88-95.
- [12] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, *et al.* Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine*, 2004, **10**(1): 55-63.
- [13] Skottman H, StrOmberg AM, Matilainen E, *et al.* Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. *Stem Cells*, 2006, **24**(1): 151-167.
- [14] Zhao P, Hirohiko I, Minoru H, *et al.* Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Experimental Transplantation*, 2005, **79**(5): 528-535.
- [15] Paul DB, Eberhard GR, Robert Z, *et al.* Direct differentiation of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *WIPO Patent*, WO/2007/070964, 2007-06-28.
- [16] Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, *et al.* Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *Mol Cell Cardiol*, 2007, **42**(4): 746-759.