

猪羊水干细胞特异向跳动心肌细胞诱导分化

陈家欢, 魏育蕾, 彭莎, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100

摘要: 为了筛选并建立一种由猪羊水干细胞向心肌细胞分化的有效方法, 以猪羊水干细胞为研究对象, 以 5-氮胞苷 (5-aza) 和维生素 C (Vc) 为诱导剂, 对猪羊水干细胞形成的类胚体 (EBs) 进行诱导分化。应用免疫荧光、RT-PCR、透射电镜技术检测跳动细胞团中心肌特异性标记的表达情况。结果显示, 在猪羊水干细胞形成的类胚体中加入心肌细胞诱导剂, 10 d 后即见到节律性跳动的细胞团, *t* 检验发现 0.1 mmol/L Vc 加 5 μ mol/L 5-aza 联合诱导组的诱导效率最高, 达 33%。免疫荧光结果显示跳动心肌细胞团表达细胞骨架蛋白 α -actin 和肌钙蛋白 Tnni3, RT-PCR 检测跳动心肌细胞团, 发现心肌细胞特异性标记分子 *Tbx5*、*Gata4*、 α -MHC、*Tnni3* 均呈阳性表达。借助透射电镜观察诱导后的跳动样细胞团, 能清晰可见其中的肌丝、糖原粒、糖原池等结构。说明 5-氮胞苷和维生素 C 可以促进猪羊水干细胞向心肌细胞的诱导分化。

关键词: 猪羊水干细胞 (pAFS), 心肌细胞, 5-氮胞苷, 维生素 C

Differentiation of porcine amniotic fluid stem cells into the beating cardiomyocytes

Jiahuan Chen, Yulei Wei, Sha Peng, and Huayan Wang

Shaanxi Center for Stem Cell Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: The aim of this research is to find an effective cardiomyocyte-induced method derived from porcine amniotic fluid stem cells (pAFS). For cardiac differentiation, the cells were formed embryoid bodies (EBs) firstly, then cultured in induced-medium including 5-azacytidine (5-aza) and vitamin C (Vc). We detected the specific markers of cardiomyocyte by immunocytochemistry, RT-PCR and transmission electron microscope. The results showed that some embryoid bodies beat rhythmically after 10 days of induction. Furthermore, analysis of *t* test revealed that the percentage of beating cardiomyocyte-like cell clusters was highest (33%) when induction using 0.1 mmol/L Vc and 5 μ mol/L 5-aza. Immunocytochemistry analysis demonstrated that cardiomyocyte-like cell clusters expressed α -actin, Tnni3. RT-PCR analysis also illustrated that *Tbx5*, *Gata4*, α -MHC and *Tnni3* were expressed positive in cardiomyocyte-like cell clusters. Especially, we observed basic structures

Received: November 25, 2010; **Accepted:** March 7, 2011

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB941002), Genetically Modified Organisms Breeding Major Project (No. 2009ZX08007-008B).

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

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB941002), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08007-008B) 资助。

of myocardium, such as myofilament, glycogen granule and so on by transmission electron microscope. In conclusion, 5-azacytidine and vitamin C could promote differentiation of pAFS into myocardium.

Keywords: porcine amniotic fluid stem cells (pAFS), cardiomyocyte, 5-azacytidine, vitamin C

目前, 有关羊水干细胞向心肌细胞诱导分化的报道不多, 而猪羊水干细胞 (Porcine amniotic fluid stem cell, pAFS) 向心肌细胞诱导分化的研究还未见有报道。同时, 猪在生物物理和生物化学上与人有很多相似之处, 因此体外诱导 pAFS 向心肌细胞分化, 对临床上进行细胞治疗与器官移植具有重要的意义。

羊水干细胞的分化能力介于胚胎干细胞和间充质干细胞之间, 具有向三胚层细胞分化的能力^[1], 可以在一定条件下, 诱导分化成为脂肪细胞^[1-3]、神经细胞^[1]等。羊水干细胞既可以从产前诊断的羊水中提取, 也可以从产后的羊水中分离得到。由于抽取羊水的过程既不会像骨髓间充质干细胞的制备那样损伤供体, 也避免了胚胎干细胞获得过程中存在的相关伦理之争^[4]。因此羊水干细胞较骨髓间充质干细胞和胚胎干细胞具有更大的优越性。

心血管疾病已成为威胁人类健康的一大杀手, 而成年哺乳动物心肌细胞再生能力极差, 心肌细胞损伤坏死后由纤维组织替代, 导致心脏的收缩舒张功能障碍, 最终导致慢性心力衰竭的发生^[5]。如何使心肌细胞在数量及功能上得到补偿, 是心血管疾病研究所面临的一个难题。有研究报道, 向受损心肌局部移植有功能的细胞, 使其在心肌梗死区增殖分化为肌组织, 可以增加有功能的肌细胞数量, 改善心肌功能^[6]。

目前, 用于研究的替代细胞主要有: 胎儿心肌细胞、成年心肌细胞、胚胎干细胞以及骨髓间充质干细胞等^[7-9]。但是这些替代细胞因来源不足 (如胎儿心肌细胞、成年心肌细胞), 对供体损伤性大 (如采集自骨髓的间充质干细胞) 和伦理学问题 (如来自早期发育的囊胚的胚胎干细胞) 而受到一定限制。因此寻找新的干细胞来源, 已成为亟待解决的问

题。本研究用不同浓度的 5-氮胞苷 (5-azacytidine, 5-aza) 和 (或) 维生素 C (Vitamin C, Vc) 诱导 pAFS 向心肌细胞分化, 并通过免疫荧光染色、RT-PCR、透射电镜等技术分析诱导得到了跳动心肌细胞团, 旨在建立一个由 pAFS 向心肌细胞分化的有效方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

α -MEM、PBS、胎牛血清 (Fatal bovin serum, FBS)、谷氨酰胺 (Gibco 公司), 胰蛋白酶、5-aza、Vc、青霉素、链霉素 (Sigma 公司), Trizol (Invitrogen 公司), 反转录试剂盒、Taq 酶 (Fermentas 公司), 一抗 anti- α -actin (Sigma 公司), 一抗 anti-Tnni3 (Abcam 公司), 绿色荧光标记二抗 Fitc 与红色荧光标记二抗 cy3 (北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 pAFS 的分离培养

从怀孕的八眉猪子宫采集样本, 带回实验室后, 在无菌环境下抽取猪羊水, 置于无菌离心管中, 1 500 r/min 离心 10 min 后去上清, 用双抗 PBS (100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素) 重悬后再次离心, 如此反复 2 次后将细胞接种至 ACM 培养液中 (α -MEM+10% FBS+2 mmol/L 谷氨酰胺+100 U/mL 青霉素+100 U/mL 链霉素)。细胞在 38 °C、5% CO₂ 条件下培养 5~12 d 后, 可见有细胞贴壁, 长到 80% 满时进行传代培养, 然后每 2 天传代一次^[10-11]。本实验中主要采用 P10 至 P15 代的细胞。

1.3 类胚体 (Embryoid bodys, EBs) 的形成

将 pAFS 细胞按 1×10^6 /mL 密度接种到直径 3.5 cm 的非贴壁塑料培养皿中 (此为第 0 天), 于 38 °C、5% CO₂ 饱和湿度悬浮培养, 每 6 h 小心摇晃吹打, 避免类胚体之间聚集和贴壁, 每隔 1 d, 半量换液。培养 3 d 后, 对形成的类胚体进行观察

拍照。

1.4 pAFS 向心肌细胞的诱导分化

为了诱导 pAFS 向心肌细胞分化,我们以 ACM 培养液为基础,制备了 5 种诱导条件培养液,包括: 1# ACM+0.1 mmol/L Vc、2# ACM+0.1 mmol/L Vc+10 μ mol/L 5-aza、3# ACM+10 μ mol/L 5-aza、4# ACM+0.1 mmol/L Vc+5 μ mol/L 5-aza-d 和 5# ACM+5 μ mol/L 5-aza。以常规 ACM 培养液作为对照组。在向心肌细胞诱导过程中,采用了两种不同的诱导方式:第一种方式,在 EBs 悬浮培养 5 d 后将 EBs 收集在离心管中,在重力作用下使 EBs 自然沉降到管底部,去除上清后,将 EBs 再次接入新的 3.5 cm 非贴壁塑料培养皿中,继续悬浮培养,此时将培养液更换为上述 1#~5#条件诱导液,继续悬浮培养 2 d 后,于体视显微镜下挑选体积较大,边缘整齐,结构紧密的 EBs 于 48 孔板中贴壁培养 (2~3 个 EBs/孔)。此时将心肌细胞诱导液更换为常规培养液 ACM,对照组则一直采用 ACM 培养液培养。第二种方式,EBs 持续在 ACM 培养液中悬浮培养,于第 7 天,将 EBs 转入 48 孔贴壁培养板培养 (2~3 个/孔),此时将培养液更换为上述 1#~5#条件诱导液。加入诱导液 2 d 后弃掉诱导液,细胞在常规培养液 ACM 中继续进行诱导分化培养。上述实验处理每组平行重复 3 次。在光学显微镜下每天观察记录培养板中是否会出现跳动的细胞团,如出现则被认为是成功分化的心肌细胞的功能标志。作为心肌细胞分化效率指标,详细记录诱导心肌细胞的跳动频率、跳动持续时间,以及不同条件下节律性跳动细胞团占总 EBs

数目的百分比。同时对跳动部位的细胞团进行显微摄像,记录其收缩情况。跳动细胞团所占比例在 3 个独立的实验中进行统计。数据采用均数和标准差表示,使用 *t* 检验进行分析。

1.5 免疫荧光检测

对发生节律性跳动的细胞团进行免疫荧光染色,采用的方法是,细胞团经 4%多聚甲醛固定 10 min 后,PBS 洗涤 3 次,然后在 0.2% Triton X-100/PBS 中处理 10 min,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后在 5% FBS/PBS 中室温封闭 0.5 h。用 1:100 稀释的一抗 (α -actin, Tnni3) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再次 PBS 洗涤,然后加入 FITC 或 cy3 标记的二抗 (1:200) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,经 Hoechst33342 (5 μ g/mL PBS) 染核 1 min 后在荧光显微镜下观察拍照。

1.6 RNA 提取和 RT-PCR

取贴壁培养 10 d 的跳动心肌细胞团,按照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂说明书,抽提总 RNA。并对所得的 RNA 进行定量测定, A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0 之间,说明提取的 RNA 纯度高,可用于实验。取 5 μ g RNA 于含 200 U *M-MuLV* 反转录酶的 20 μ L 反应体系中反转录。20 μ L 反转录产物直接用于 PCR 检测。检测心肌细胞特异性的基因包括: *Tbx5*、 α -MHC、*Tnni3*、*Gata4* 等,以 β -actin 为内参。RT-PCR 反应循环参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共计 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析并照相。实验中采用的引物见表 1。

表 1 用于本研究的 PCR 引物序列

Table1 Target primers used in this study

Target control gene	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	T_m ($^{\circ}$ C)
<i>Tbx5</i>	TTGCTGAAACCGAGAATGGGCGCTCCTTGAGGTTGAAAAG	250	55
α -MHC	AGAAGATAGTGGAACGCAGGCATCATTGAGGTTGTCTTG	147	55
<i>Tnni3</i>	GAGTGAGGATCTCTGCAGATGATGTTCTTGCGCCAGTCTC	130	54
<i>Gata4</i>	CTGTGCCAACTGCCAGACCAGGCTGACCGAAGATGCGTAG	437	55
β -actin	TACGACTGGCATTGTGCTACGACTGGCATTGTGC	360	55

1.7 电镜观察

EBs 贴壁培养 10 d 后, 选取节律性跳动心肌细胞团收集于 1.5 mL 离心管中^[12], 1 500 r/min 离心 10 min 后去上清, 自管壁小心加入 3% 戊二醛固定液, 将离心下来的细胞团固定后送往第四军医大学中心实验室, 进行透射电镜镜检, 观察细胞内超微结构。

2 结果与分析

2.1 猪 pAFS 细胞分离培养及诱导分化

从猪羊水中分离的细胞经过 5~12 d 时间培养, 出现的原代细胞形态主要为类上皮样和类成纤维样细胞 (图 1A)。随着传代次数增加, 类上皮样细胞逐渐减少直至消失, 留下的为成纤维样细胞 (图 1B), 经过细胞生物学和分析生物学检测, 这种成纤维样间质细胞为猪 pAFS 细胞^[11]。

培养 pAFS 细胞密度达 80% 以上时, 用胰酶消化后接入非贴壁的培养皿中悬浮培养 24 h, 此时形成的类胚体 (EBs) 体积较小, 结构较疏松。EBs 悬浮培养 7 d 后, 边缘整齐, 结构致密 (图 2A)。将 EBs 接到贴壁培养皿中培养, 24 h 后 EBs 呈贴壁生长 (图 2B), 5~7 d 后, 贴壁生长的 EBs 周围迁出大量长梭形细胞, 有部分细胞呈排列性生长 (图 2C)。在部分 EBs 周围可发现迁出的细胞会形成新的细胞克隆团 (图 2D)。对诱导分化形成的细胞团进行观察发现, 能够出现节律性心肌跳动现象。细胞团跳动频率从 20 次/min~110 次/min 不等, 其中大部

分细胞团跳动频率处在 60~90 次/min。频率小于 60 次/min 或多于 100 次/min 的跳动细胞团都比较少。跳动的细胞团能够持续跳动 9 d 左右。

2.2 Vc/5-aza 对 pAFS 向心肌细胞分化的影响

猪 pAFS 细胞在体外能够自发分化为心肌样跳动细胞, 但分化效率很低, 仅为 5.5%。分别用 5-aza 和 Vc 处理的 EBs, 均能得到节律性跳动的细胞团, 且跳动细胞团数量在总细胞团数量中的比例明显提高。不管是 EBs 悬浮培养还是贴壁培养阶段加入心肌诱导液, 都发现 0.1 mmol/L Vc 与 5 μ mol/L 5-aza 联合处理组诱导效果最佳, 发生节律性跳动的细胞团百分比达 30% 以上, 这表明加入心肌诱导液的时间对心肌细胞的诱导分化效率没有显著影响。另外, 0.1 mmol/L Vc 与 5 μ mol/L 5-aza 联合诱导组节律性跳动细胞团所占百分比明显高于 5 μ mol/L 5-aza 单独诱导组, 两者之间差异极显著, 说明 Vc 在 pAFS 向心肌细胞诱导过程中起着非常重要的作用。从图 3 中还发现, 0.1 mmol/L Vc 与 10 μ mol/L 5-aza 联合诱导组, 跳动细胞团所占百分比, 虽然显著高于对照组但是较 0.1 mmol/L Vc 与 5 μ mol/L 5-aza 联合诱导组明显降低, 表明 5-aza 的浓度也是影响 pAFS 向心肌细胞分化的重要因素 (图 3A、B)。同时统计每个诱导组细胞团持续跳动时间, 发现除 0.1 mmol/L Vc 处理组细胞团持续跳动时间较短 (5 d 左右) 外, 其余各处理组的细胞团持续心肌样跳动时间都在 9 d 左右 (图 3C、D)。比较不同时间段加入诱导剂对类胚体持续跳动时间的

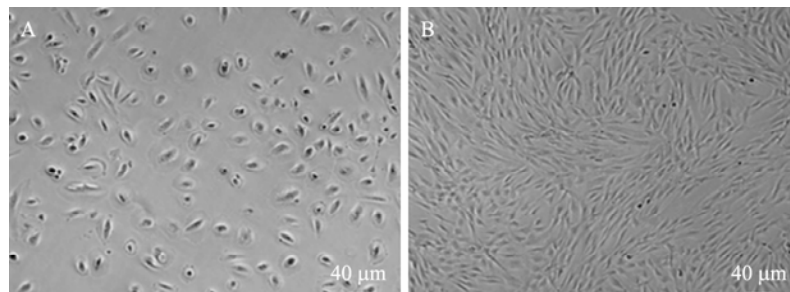


图 1 猪羊水干细胞分离培养

Fig. 1 Morphology of isolated pAFS. (A) pAFS cells in P1 (50 \times). (B) pAFS cells in P15 (50 \times).

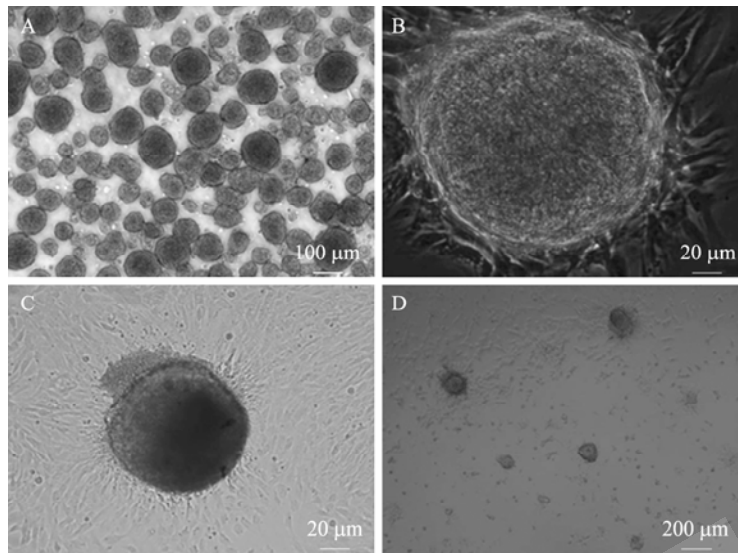


图2 猪羊水干细胞通过类胚体诱导分化

Fig. 2 pAFS cells form embryoid bodies and differentiate into cardiomyocyte like cells. (A) EBs cultured in suspension for seven days (50 \times). (B) EB cultured in adherent dish for 24 h (200 \times). (C) EB cultured in adherent dish for one week (200 \times) a lot of cells come out around EB. (D) New cell clones formed during the inducing process (4 \times).

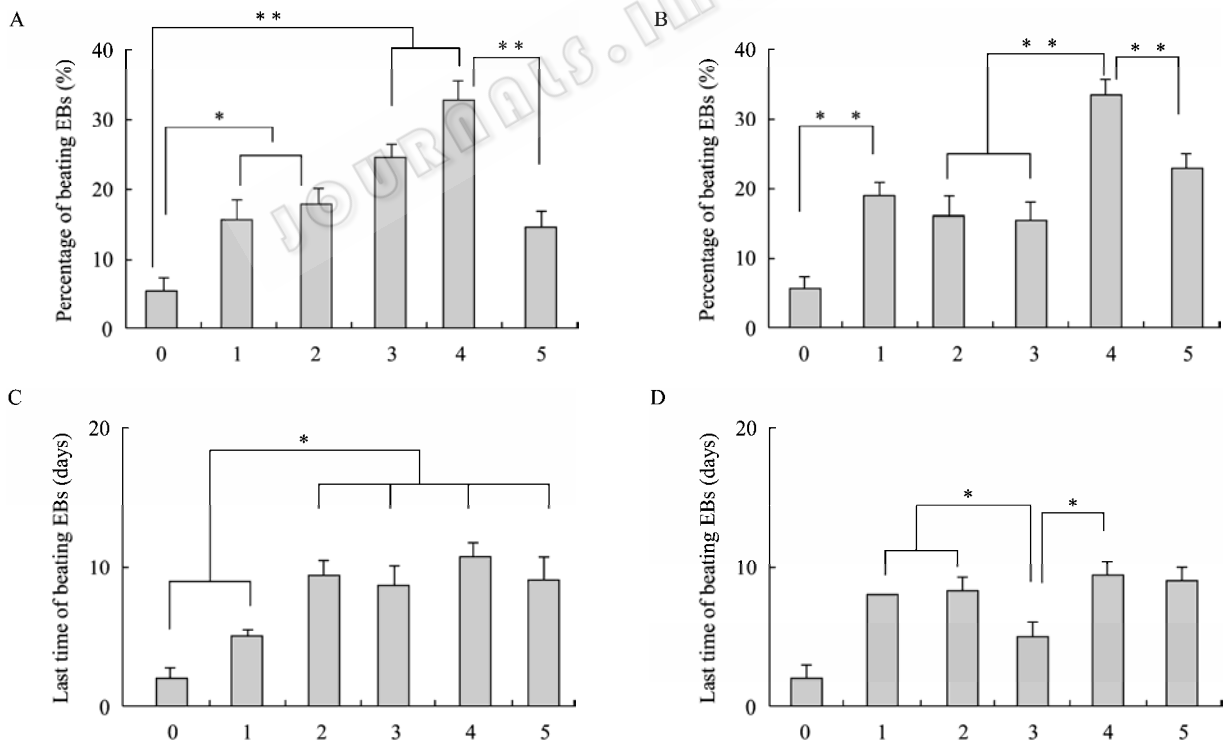


图3 节律性跳动心肌细胞团的统计分析

Fig. 3 Statistical analysis of beating cardiomyocyte-like cell clusters. (A,C) The inducing medium was added when EBs were cultured on the ultra-low attachment culture dishes. (B,D) The inducing medium was added when EBs were cultured on the adherent dishes. 0: ACM; 1: ACM+0.1 mmol/L Vc; 2: ACM+0.1 mmol/L Vc+10 μ mol/L 5-aza; 3: ACM+10 μ mol/L 5-aza; 4: ACM+0.1 mmol/L Vc+5 μ mol/L 5-aza; 5: ACM+5 μ mol/L 5-aza.

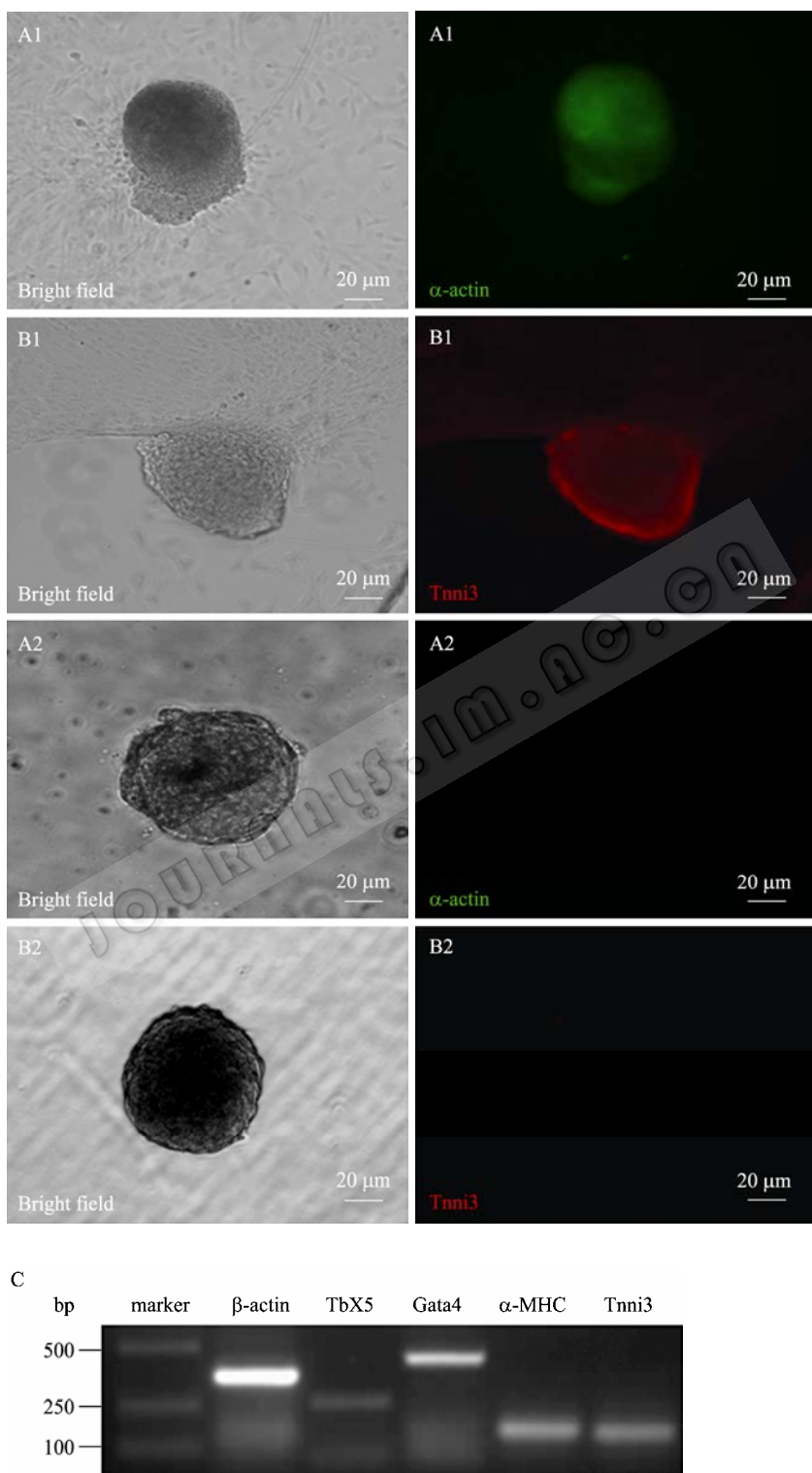


图 4 猪羊水干细胞向心肌细胞诱导分化的免疫荧光检测和 RT-PCR 检测

Fig. 4 Immunocytochemistry and RT-PCR analysis of induced cardiomyocyte derived from pAFS. (A) Cytoskeletal protein a-actin (200 \times). (B) Cardiac troponin Tnni3 (200 \times). (C) The expression of cardiomyocyte specific markers detected by RT-PCR.

影响发现, 0.1 mmol/L Vc 处理组在 EBs 贴壁阶段加入诱导剂, 细胞团持续跳动时间要比 EBs 悬浮阶段加入诱导剂组平均时间长 3 d; 相反, 在 10 μ mol/L 5-aza 处理组, EBs 贴壁阶段加入诱导剂组要比 EBs 悬浮阶段加入诱导剂组, 细胞团持续跳动时间短, 方差分析差异显著 ($P < 0.05$), 而其余各处理组类胚体持续跳动时间差异不显著。

2.3 免疫荧光、PCR 检测结果

为检测诱导分化的跳动细胞团是否含有心肌细胞特异分子标记, 对跳动细胞团进行了 α -actin 和 Tnni3 蛋白免疫荧光标记测定, 结果显示诱导 17 d 后的细胞团呈现 α -actin 和 Tnni3 阳性 (图 4A1、B1), 而诱导前的 EBs 呈阴性反应 (图 4A2、B2)。从节律性跳动的细胞团中抽提总 RNA, 进行 RT-PCR 检测, 结果发现节律性跳动的细胞团能够表达心肌细胞早期标记基因 *Tbx5* 和 *Gata4*, 同时也能够表达控制心肌收缩舒张的基因 α -MHC 和 *Tnni3* (图 4C)。这些结果证明 pAFS 经诱导可分化为心肌样细胞。

2.4 透射电镜检测结果

对节律性跳动的细胞团进行透射电镜观察, 结果表明猪羊水干细胞诱导分化的跳动心肌细胞团含有组成肌纤维的肌丝、糖原粒、糖原池等结构 (图 5A)。但是与正常猪心肌组织电镜照片比较, 未见到组成肌纤维的 Z 线和肌小结等结构 (图 5B), 说明本实验诱导得到的跳动细胞团还处于心肌发育的早期阶段。

3 讨论

有关胚胎干细胞和间充质干细胞向心肌细胞诱导分化的研究已有报道, 但是用羊水干细胞向心肌细胞诱导分化的报道还不多。2007 年 Chiavegato 等报道人羊水细胞可以诱导分化为心肌细胞^[13], 2009 年有科学家报道将人羊水细胞来源的 iPS 细胞诱导分化为心肌细胞^[14], 而关于 pAFS 向心肌细胞诱导分化的研究未见有报道。在向心肌细胞诱导分化的实验中多采用去甲基化药物, 如胞嘧啶类似物 5-氮胞苷及其衍生物^[15-17]。因为其可通过与细胞内甲基转移酶的共价结合, 使部分甲基化沉默基因去甲基化, 恢复表达活性, 同时可修饰某些基因的表达或调节细胞分化^[17-20]。目前, 5-氮胞苷主要应用于诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的研究中^[21]。亦有研究表明, 人胚胎干细胞暴露于 5-aza 中可分化为心肌细胞^[22-23]。

2009 年有报道称维生素 C 能够促进胚胎干细胞向心肌细胞分化^[12]。我们在研究中, 利用 5-氮胞苷为诱导剂的同时, 也加入了维生素 C 诱导猪羊水干细胞向心肌细胞分化, 旨在检测维生素 C 在 pAFS 向心肌细胞诱导分化的过程中是否也具有促进作用。同时我们比较了 5-aza 和 Vc 不同组合方式处理下, 心肌样跳动 EBs 的百分比。在实验中我们发现, 单独的维生素 C 或与 5-aza 的联合诱导均能够促使猪羊水干细胞形成类胚体, 并最终形成节律性跳动

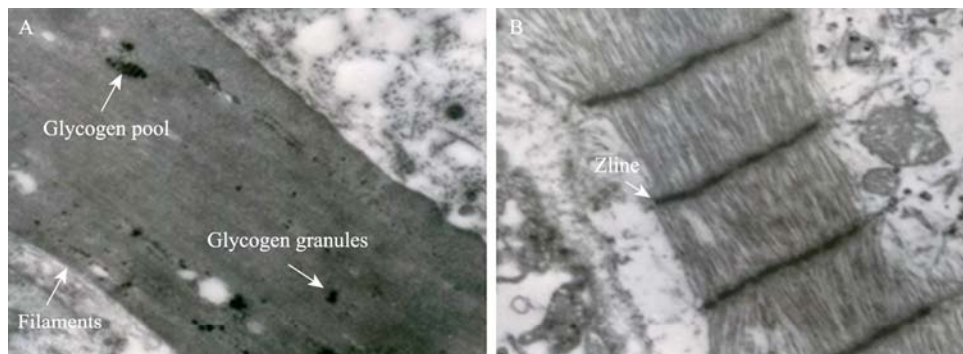


图 5 透射电镜检测

Fig. 5 Transmission electron microscope analysis. (A) Experimental group (30 000 \times). (B) Positive control (50 000 \times).

细胞团。但各处理组跳动细胞团占细胞团总数的百分比不同, 其中 0.1 mmol/L Vc 与 5 μ mol/L 5-aza 联合诱导组类胚体跳动百分比达 33%, 显著高于对照组的 5%。说明找到了 pAFS 向心肌细胞分化的一种有效方法, 同时证明了维生素 C 在心肌细胞诱导分化过程中起着非常重要的作用。这一结果与王艳霞等的报道一致^[12]。但是维生素 C 在心肌细胞诱导分化过程中的分子机理还需要进一步的研究。

Tbx5、*Gata4* 之间存在着复杂的相互作用, 在心脏发育中起主要作用^[24], 共同调控许多下游基因的表达。 α -MHC 为肌球蛋白重链, 控制心肌收缩, 在心肌细胞衰竭过程中转化为 β -MHC^[25-26]。*Tnni3* 为心肌肌钙蛋白, 在肌肉收缩和舒张过程中起重要调节作用^[26]。pAFS 分化的节律性跳动细胞团在进行 RT-PCR 分析时, 能够表达心肌细胞早期标记基因 *Tbx5*、*Gata4*; 成年期占优势的心肌细胞特异性标记基因 α -MHC、*Tnni3*。 α -actin 为细胞骨架蛋白, 在心肌细胞中特异性表达^[26-27], 实验中对 pAFS 细胞分化而来的节律性收缩的类胚体进行免疫荧光染色, 发现 α -actin 呈阳性表达。透射电子显微镜分析, 诱导的节律性跳动细胞团只具有肌丝、糖原粒等结构而不具有 Z 线和肌小结等结构, 说明贴壁诱导培养 10 d 的跳动细胞团还处于心肌发育的早期。对出现这一现象的解释可能是由于诱导分化时间还不够长。总之, 在本研究中我们对 pAFS 向心肌细胞的诱导分化做了初步探索, 找到了 pAFS 向心肌细胞分化的一种有效方法, 加之 pAFS 来源丰富, 易于获取, 有望成为较胚胎干细胞和间充质干细胞更为理想的替代细胞。因此, 对 pAFS 的分化调控以及参与诱导其向特定组织细胞分化的因子或信号分子需要进一步研究。

综上, 本研究采用免疫荧光、RT-PCR、透射电子显微镜技术检测了 pAFS 在 5-aza 和 Vc 诱导条件下分化形成的节律性跳动细胞团, 证明 pAFS 经诱导可以分化为心肌样细胞。统计分析显示 4#

ACM+0.1 mmol/L Vc+5 μ mol/L 5-aza 联合诱导组的诱导效率最高达到 33%。本研究提供了 pAFS 向心肌细胞分化的一种有效诱导方法。

REFERENCES

- [1] De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui M, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 100-106.
- [2] De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(5): 719-728.
- [3] In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-Van Der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1338.
- [4] Kolambkar YM, Peister A, Soker S, et al. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. *J Mol Histol*, 2007, 38(5): 405-413.
- [5] Wang YQ, Li YP, Wang M. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on apoptosis of normal cardiomyocytes after myocardial infarction. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2009, 13(14): 2627-2630.
王挹青, 李远鹏, 王森. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后正常心肌细胞凋亡的影响. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(14): 2627-2630.
- [6] Fukuda K. Progress in myocardial regeneration and cell transplantation. *Circ J*, 2005, 69(12): 1431-1446.
- [7] Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*, 2001, 65(9): 845-847.
- [8] Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(10): 1282-1289.
- [9] Pons J, Huang Y, Takagawa J, et al. Combining angiogenic gene and stem cell therapies for myocardial infarction. *J Gene Med*, 2009, 11(9): 743-753.
- [10] Wang H, Chen S, Cheng X, et al. Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation. *Chin J Biotech*, 2008, 24(9):

- 1582-1587.
王晗, 陈帅, 程祥, 等. 通过形成类胚体诱导人羊水多能干细胞向心肌细胞分化. 生物工程学报, 2008, 24(9): 1582-1587.
- [11] Lu ZJ, Cheng D, Li JH, et al. Porcine amniotic fluid stem cells isolation and induction into adipocytes. J Agr Biotech, 2010, 18(6): 1054-1061.
卢志娟, 成德, 李军华, 等. 猪羊水干细胞的分离培养及向脂肪细胞诱导分化. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1054-1061.
- [12] Wang YX, Chen GA, An TR, et al. Induction of differentiation of Human embryonic stem cells into cardiomyocyte-like cells. Sci China: Ser C, 2009, 39(12): 1136-1145.
王艳霞, 陈贵安, 宋天然, 等. 人胚胎干细胞向心肌细胞定向诱导分化. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(12): 1136-1145.
- [13] 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. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(4): 746-759.
- [14] Zhang JH, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res, 2009, 104(4): e30.
- [15] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-1426.
- [16] Yin Q, Zhao Y, Chen W, et al. The induction of P19 cells into myocardium cells using 5-aza cytidine *in vitro*. Acta Anat Sin, 2007, 38(3): 325-329.
尹青, 赵昱, 陈炜, 等. 应用 5-氮胞苷体外诱导 P19 细胞分化为心肌细胞. 解剖学报, 2007, 38(3): 325-329.
- [17] Li GQ, Zhang WZ, Ma L, et al. Differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells induced by 5-azacytidine. Med J Natl Defending Forces Northwest Chin, 2009, 30(5): 357-360.
李国庆, 张卫泽, 马凌, 等. 5-氮胞苷对脂肪间充质干细胞向心肌样细胞诱导分化的影响. 西北国防医学杂志, 2009, 30(5): 357-360.
- [18] Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. Circulation, 2003, 107(21): 2733-2740.
- [19] Carpenter MK, Rosler E, Rao MS, et al. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. Cloning Stem Cells, 2003, 5(1): 79-88.
- [20] Dai WD, Kloner RA. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: challenges to be overcome. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(4): 730-732.
- [21] Jiang H, Wang HS, Wang ZW, et al. Bone marrow derived from human mesenchymal stem cells induced into cardiomyocytes expressing ANP, BNP, α -skeletal actin, MLC-2v, GATA-4 and Nkx2.5. J Cardiovasc Pulm Dis, 2010, 29(1): 43-48.
姜辉, 王辉山, 汪曾炜, 等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞转化为心肌样细胞的基因表达. 心肺血管病杂志, 2010, 29(1): 43-48.
- [22] Xu CH, Police S, Rao N, et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res, 2002, 91(6): 501-508.
- [23] Hua JL, Ma YJ, Yang YA, et al. Stem cells and cardiomyocytes transplantation therapy. Chin Bull Life Sci, 2004, 16(4): 215-220, 225.
华进联, 马勇江, 杨玉艾, 等. 干细胞与心肌细胞替代治疗. 生命科学, 2004, 16(4): 215-220, 225.
- [24] Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, et al. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. Exp Cell Res, 2007, 313(4): 698-706.
- [25] Cheng ZK, Ou LL, 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.
- [26] Kurabayashi M, Tsuchimochi H, Komuro I, et al. Molecular cloning and characterization of human cardiac- α and β -from myosin heavy chain complementary DNA clones. Regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. J Clin Invest, 1988, 82(2): 524-531.
- [27] Lavon N, Benvenisty N. Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(2): 47-52.