

P38MAPK 信号通路在骨形态发生蛋白 2 诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞中的作用

田 龙, 高 航

(辽宁医学院附属第一医院心内科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] P38MAPK 信号通路; 骨髓间充质干细胞; 骨形态发生蛋白 2; 心肌样细胞

[摘要] 目的 研究 P38MAPK 信号通路在骨形态发生蛋白 2(BMP-2)诱导骨髓间充质干细胞(BMSC)分化为心肌样细胞中的调控作用,探讨 BMSC 向心肌样细胞分化的可能信号机制。方法 BMSC 分离与体外培养;分 3 组:对照组、BMP-2 组(诱导剂组)和 BMP-2 + SB203580 组(阻断剂组)。倒置相差显微镜观察细胞的形态学变化;免疫细胞化学检测诱导后 BMSC 心肌特异性肌钙蛋白 T(cTnT)和连接蛋白 43(Cx43)的表达;Western blot 检测诱导后细胞内 p-P38MAPK/P38MAPK 的变化。结果 BMP-2 诱导 15 min, p-P38MAPK 蛋白呈弱表达, 30 min 达到高峰, 60 min 逐渐降低;用 P38MAPK 阻断剂 SB203580 预处理细胞后, p-P38MAPK 表达明显降低;与诱导剂组比较, 阻断剂组的 p-P38MAPK 蛋白表达减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。诱导 4 周后, 对照组 cTnT、Cx43 呈阴性表达;诱导剂组和阻断剂组呈阳性表达, 且阻断剂组 Cx43 阳性细胞数多于诱导剂组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 BMP-2 可诱导 BMSC 分化为心肌样细胞, P38MAPK 信号通路在诱导过程中发挥负性调节作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of the P38MAPK Signaling Pathway on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Cardiomyocyte-Like Cells Induced by Bone Morphogenetic Proteins-2

TIAN Long, and GAO Hang

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] P38MAPK Signaling Pathway; Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; Bone Morphogenetic Proteins-2; Cardiomyocyte-Like Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulating effects of P38MAPK signaling pathway on the differentiation of the bone marrow-derived stem cells(BMSC) induced by BMP-2 toward cardiomyocyte-like cells and to determine the possible mechanisms. **Methods** BMSC were separated and cultured in vitro. The third passage cells were divided into 3 groups: control group, BMP-2 inducer group, BMP-2 + P38MAPK blocker SB203580 group. The morphological observation was performed by the inverted phase contrast microscope, the immunohistochemical technique was used for detecting the expression of cardiac specific troponin(cTnT) and connexin 43(Cx43), Western blot was used for examining of the changes in p-P38MAPK/P38MAPK levels in BMSC after induced with the BMP-2. **Results** Expression of p-P38MAPK of BMSC could be observed at 15 min after induction with BMP-2, increased obviously at 30 min, increased increasingly from 60 min. Compared with inducer group, the expression of p-P38MAPK of blocker group decreased obviously($P < 0.05$). The expression of cardiac specific troponin(cTnT) and Cx43 were negative in control group, and positive in inducer group and blocker group. Compared with inducer group, Cx43 positive cells increased in blocker group($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-2 could induce differentiation of BMSC toward cardiomyocyte-like cells, and the P38MAPK signaling pathway plays a negative regulating role during induction.

[收稿日期] 2012-07-25

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(201202130)

[作者简介] 田龙, 研究生, 研究方向为心肌梗死的防治, E-mail 为 wstl1986@163.com。高航, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌梗死的防治, E-mail 为 gaohangybm@163.com。

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是心血管疾病中导致心力衰竭和死亡的重要原因,梗死的心肌组织被无收缩功能的瘢痕组织替代,引起心肌重构,甚至导致心力衰竭和死亡。虽然心脏中存在一种心肌前体细胞(CPC)可以分裂、增殖、修复损伤的组织,但其数量、修复损伤的心肌能力有限。目前对于急性心肌梗死的药物及手术治疗,虽然能够改善心肌缺血症状,但却不能恢复梗死心肌细胞的功能。近年来随着干细胞技术的发展,使利用干细胞分化为心肌细胞,修复受损心肌组织成为可能。由于 BMSC 具有多重分化能力、体外扩增容易、自体移植不产生伦理问题等优点,更适合于诱导后移植治疗心肌梗死及梗死后心力衰竭^[1-3]。研究显示^[4,5], BMP-2 诱导 BMSC 分化为心肌样细胞过程中涉及多条信号通路如 PI3K、Smad 等信号通路。P38MAPK 是哺乳动物丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中的一条经典途径,在细胞分化、凋亡等过程中起着重要作用;且 P38MAPK 在 BMP-2 诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化方面发挥重要作用^[6]。但关于 P38MAPK 信号通路在 BMP-2 诱导 BMSC 分化为心肌样细胞过程中的作用尚不清楚。

1 材料和方法

1.1 主要材料

清洁级 3 周龄 SD 大鼠由辽宁医学院动物实验中心提供(SPF 级,雌雄不限,体重不限)。L-DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司), 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA(美国 Hyclone 公司), BMP-2(美国 Prarmia 公司), CD44、CD90、CD34 和 CD45 抗体(北京中杉金桥公司), SB203580、磷酸化 P38MAPK 抗体(p-P38MAPK)、P38MAPK 抗体、鼠抗心肌特异性肌钙蛋白(cTnT)单抗和鼠抗连接蛋白 43(Cx43)单抗(北京博奥森), 倒置相差显微镜、荧光显微镜(Olympus)和鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), CO₂ 细胞培养箱(德国 Hera cell culture), 超净工作台(苏州净化设备有限公司), 台式高速离心机(上海医用分析仪器厂), 电子天平(上海天平仪器厂), 4℃ 冰箱和 -20℃ 冰箱(沈阳北斗星仪器有限公司), 高压蒸汽灭菌器(天津市精工医疗设备有限公司)。

1.2 大鼠 BMSC 的分离、培养和鉴定

SD 大鼠, 脱臼法处死, 75% 乙醇浸泡后剔出双侧股骨和胫骨, 然后除去骨组织周围软组织, 用 PBS 液冲洗 3 次。剪去骨两端的骨髓端, 暴露骨髓腔, 用含 10% FBS 的培养基冲洗骨髓腔, 将骨髓腔冲洗液

移至离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞为细胞悬液接种于培养瓶内, 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 于接种的第 4 天首次换液, 以后每 3 天换液 1 次。待贴壁细胞融合达 90% 以上时, 进行消化分离(37℃、2~3 min), 按 1:2 传代。取第 3 代细胞进行实验。

将第 3 代细胞制成细胞悬液(1×10^8 /L), 接种于放置有盖玻片的 24 孔培养板中, 每孔种植 1 mL, 待细胞接近长成单层, 取出盖玻片, PBS 冲洗 3 次, 95% 乙醇固定 15 min, PBS 充分冲洗, 3% 过氧化氢封闭 10 min; 滴加蛋白阻断剂室温封闭 10 min, 甩去阻断剂滴加鼠抗 CD90、CD44、CD34、CD45 单抗 4℃ 过夜; PBS 冲洗, 加荧光素标记的二抗, 室温避光孵育 30 min, PBS 冲洗, 甘油封片, 荧光显微镜下观察。倒置相差显微镜下观察 BMSC 的生长和形态。

1.3 Western blot 检测 BMSC 诱导后 p-P38MAPK 和 P38MAPK 的表达

取第 3 代细胞接种于培养瓶中, 分三组, ①对照组: 用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养; ②诱导剂组: 用 BMP-2 处理细胞, 按时间分为诱导后 15、30 和 60 min 组。③阻断剂组: 用 5 μmol/L SB203580 预处理细胞 30 min 后, 加入 BMP-2, 按时间分为诱导后 15、30、60 min 组。收集细胞, 加入蛋白裂解液, 冰上放置 15 min, 收集蛋白上清, 作 SDS-PAGE 电泳, 用湿转法将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 室温下将 PVDF 膜用含 5% BSA 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)封闭 2 h, 加入鼠抗 p-P38MAPK 抗体或 P38MAPK 抗体, 4℃ 过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:2000), 反应 2 h, 加入 ECL 试剂, 反应 1~2 min, 曝光显影, 观察 p-P38MAPK、P38MAPK 的变化。以电泳条带的灰度值作为条带的强度指标, 内参照 β-actin 条带的强度为标准, 二者比值代表条带强度的相对值, 对蛋白表达进行半定量分析; 设对照组蛋白表达量为 1, 来计算各组蛋白表达量的相对值。

1.4 免疫细胞化学染色法检测 BMSC 诱导 4 周后 cTnT 和 Cx43 的量

将第 3 代细胞接种于放置有盖玻片的培养板中, 分三组, 对照组: 用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养; 诱导剂组: 加入 10 μg/L 的 BMP-2; 阻断剂组: 用 5 μmol/L SB203580 预处理 30 min 后, 再加入 10 μg/L BMP-2。诱导培养 24 h 后, 换液移除 BMP-2 后继续培养, 培养第 4 周后, 取出盖玻片, 用 PBS 冲洗, 95% 乙醇固定 15 min, PBS 充分冲洗, 3% 过氧化氢封闭 10 min, 滴加封闭液室温封闭 10 min, 甩去封闭液: (1) 滴加鼠抗 cTnT 单抗, 4℃ 过夜, PBS 清洗,

加入荧光素标记的二抗,室温避光孵育 30 min,PBS 冲洗,甘油封片,荧光显微镜下观察。(2)滴加鼠抗 Cx43 单抗,4℃ 过夜,PBS 清洗,加入生物素化标记的二抗,室温孵育 30 min,DAB 显色,甘油封片,光学显微镜下观察。

以 Cx43 表达阳性的细胞计为分化的心肌样细胞,每组随机选取 2 张盖玻片,每张盖玻片随即取 6 个视野(×200),计算视野中细胞总数和 Cx43 阳性细胞数,心肌样细胞分化率=Cx43 阳性细胞数/细胞总数。

1.5 BMSC 经 BMP-2 诱导后细胞生长和形态观察

BMSC 经 BMP-2 诱导 4 周后,在倒置相差显微镜下分别观察对照组、诱导剂组、阻断剂组细胞的形态学特征。

1.6 统计学处理方法

采用 SPSS17.0 数据包进行统计学数据处理分

析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较用 SNK 法;计数资料应用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BMSC 的形态学观察和鉴定

原代细胞多呈圆形或椭圆形,折光性强,悬浮于培养液中;3 天后大部分细胞贴壁生长,形态多样,呈梭形、三角形、不规则形,可见伸出长短、粗细不一的突起。7 天左右,细胞迅速分裂繁殖,体积逐渐增大,数量显著增多,排列不规则,形态呈长梭形,呈集落样聚集生长。第 3 代细胞,体积增大,形态趋于一致、排列紊乱,多呈长梭形,类似成纤维细胞样(图 1)。

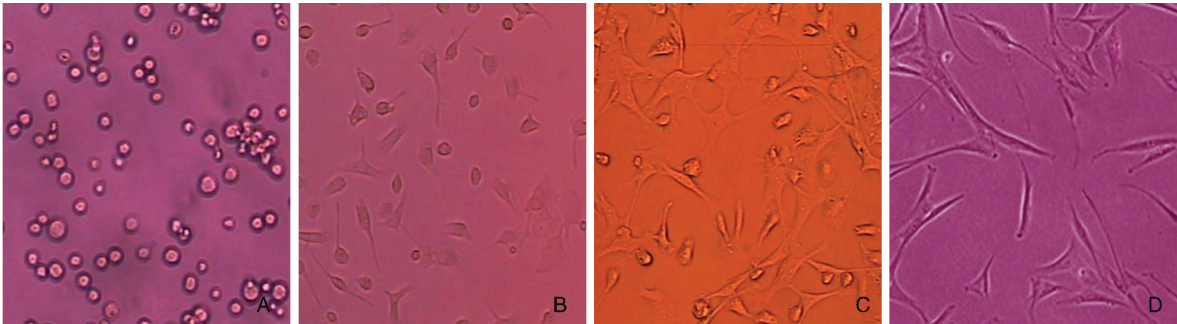


图 1. 倒置相差显微镜下 BMSC 的生长和形态观察(×200) A 为原代 BMSC,B 为培养 3 天的原代 BMSC,C 为培养 7 天的原代 BMSC,D 为第 3 代 BMSC。

Figure 1. The morphological observation of BMSC was performed by the inverted phase contrast microscope

诱导前将第 3 代 BMSC 消化成单细胞悬液,经免疫细胞荧光法检测,其表面抗原 CD90、CD44 呈阳性表达(图 2),阳性率分别为 97.64% 和 94.56%;造血干细胞的表面抗原 CD34、CD45 呈阴性表达。

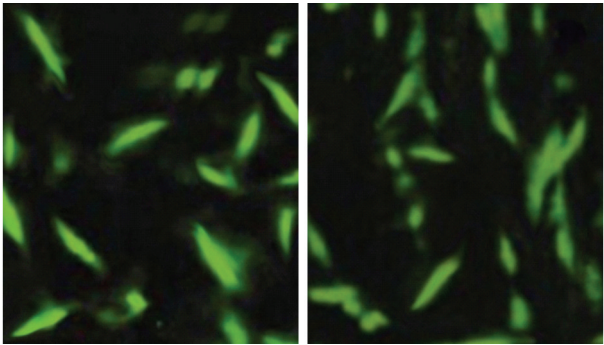


图 2. BMSC 的鉴定(×200) 左为 CD44 阳性表达,右为 CD90 阳性表达。

Figure 2. Identification of BMSC

2.2 诱导后 BMSC 的 p-P38MAPK 和 P38MAPK 水平变化

各组总 P38MAPK 蛋白表达无明显变化;诱导剂组 BMP-2 诱导 15min,p-P38MAPK 蛋白呈弱表达,30 min 达到高峰,60 min 逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。诱导剂组三个时间点 p-P38MAPK 蛋白的表达均强于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);用 P38MAPK 阻断剂 SB203580 预处理细胞 30 min 后,再用 BMP-2 诱导,诱导 15、30、60 min p-P38MAPK 蛋白均呈弱表达,差异无统计学意义($P > 0.05$),与诱导剂组对应时间点相比表达明显减弱($P < 0.05$),但强于对照组对应时间点 p-P38MAPK 蛋白的表达($P < 0.05$;表 1 和图 3)。

2.3 诱导 4 周后 BMSC 的 Cx43 和 cTnT 表达

诱导 4 周后,对照组 Cx43 呈阴性表达;诱导剂组 Cx43 呈阳性表达,心肌样细胞分化率为($11.32\% \pm 1.90\%$);阻断剂组 Cx43 也呈阳性表

达,心肌样细胞分化率为(18.73% ± 4.10%);阻断剂组 Cx43 阳性细胞数显著多于诱导剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$;图4)。

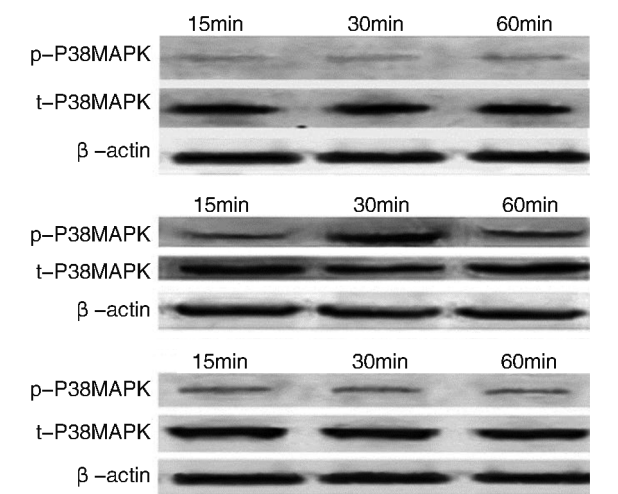


图3. BMP-2 诱导不同时间 BMSC 的 p-P38MAPK 和 t-P38MAPK 水平变化 从上至下依次为对照组、诱导剂组和阻断剂组。
Figure 3. The change of p-P38MAPK and t-P38MAPK level in BMSC in different times after induction with BMP-2

诱导4周后,诱导剂组、阻断剂组细胞内 cTnT 表达阳性(图4),呈绿色荧光,且阻断剂组的表达强

于诱导剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组呈阴性表达,无绿色荧光。

表1. 诱导不同时间点 BMSC 内 p-P38MAPK 蛋白的表达量
Table 1. p-P38MAPK level in BMSC in different times after induction

分 组	15 min	30 min	60 min
对照组	1	1	1
诱导剂组	1.53 ± 0.14 ^e	2.29 ± 0.20 ^{abc}	1.82 ± 0.22 ^{abc}
阻断剂组	1.29 ± 0.15 ^{cd}	1.33 ± 0.16 ^{cd}	1.32 ± 0.21 ^{cd}

a 为 $P < 0.05$,与本组 15 min 比较;b 为 $P < 0.05$,与本组 30 min 比较;c 为 $P < 0.05$,与对照组比较;d 为 $P < 0.05$,与诱导剂组比较。

2.4 倒置相差显微镜下 BMSC 经 BMP-2 诱导4周生长和形态观察

对照组细胞形态未发生明显改变,多为成纤维细胞样,呈长梭形;阻断剂组经 BMP-2 诱导后细胞形态特征逐渐发生变化,诱导第4周,细胞形态多呈短棒状,且明显变宽,体积增大,细胞的排列方向趋向一致,细胞连接紧密,可见肌丝样结构,部分细胞端端相连呈“竹节样”结构,开始表现出肌细胞的特征;与阻断剂组相比,诱导剂组第4周,细胞体积增大,细胞间伸出伪足相连接,但排列较疏松、方向不够一致(图5)。

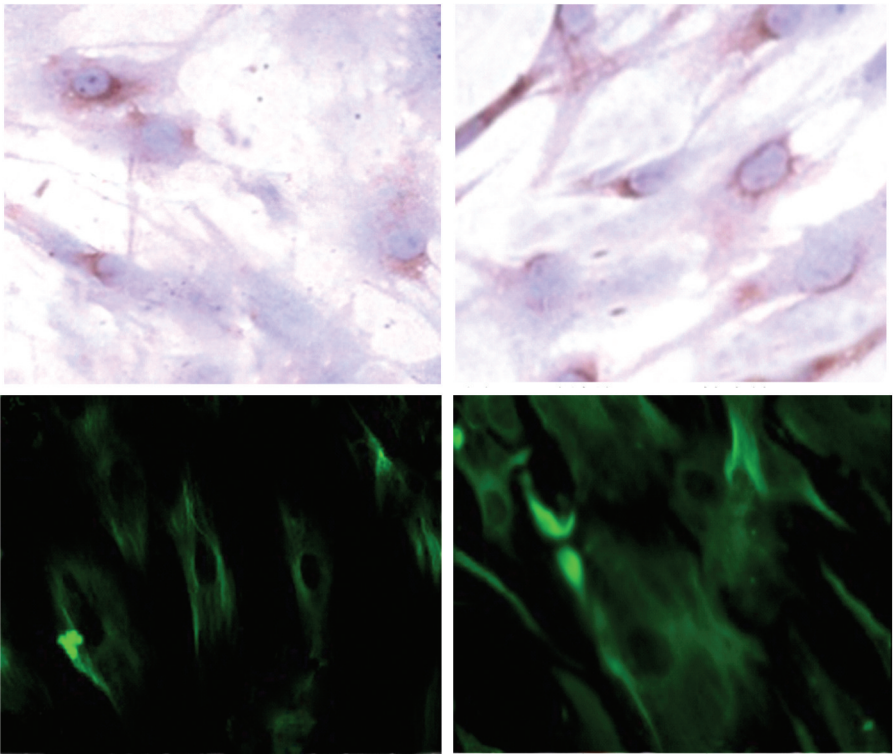


图4. 诱导4周后,心肌细胞标记物 Cx43(上图)和 cTnT(下图)的表达(×200) 左为诱导剂组,右为阻断剂组。
Figure 4. The expression of Cx43(above) and cTnT(below) at four weeks after induction

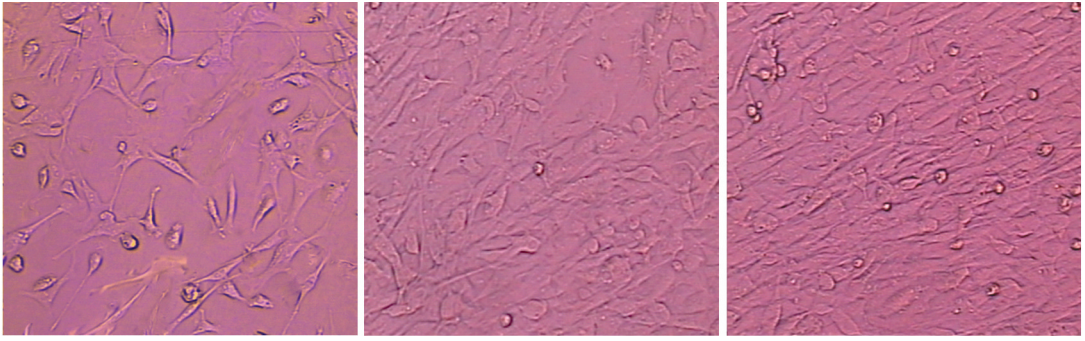


图 5. 诱导 4 周后, BMSC 的形态观察($\times 100$) 左为对照组, 中为诱导剂组, 右为阻断剂组。

Figure 5. The morphological observation of BMSC performed at four weeks after induction

3 讨论

BMP-2 属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族成员, 具有多种生物学功能, 在骨、脂肪、肾脏、骨骼、肝脏及神经系统的发育过程中起一定作用。研究发现, BMP-2 在胚胎发育的早期开始表达, 是促进心脏发育的重要因子之一^[7]。在体外心肌梗死组织裂解液可诱导 BMSC 分化为心肌样细胞, 且 BMP-2 是梗死组织裂解液发挥作用的重要成分之一^[8]。心肌梗死后, 心肌组织中的 BMP-2 含量增加, 构成心肌微环境, 对梗死周围的心肌有抗凋亡的作用^[9]。BMP-2 可诱导移植入心肌内的干细胞分化为心肌细胞, 并参与胚胎时期心脏内的心肌祖细胞向心肌细胞的分化^[10]; 移植经 BMP-2 诱导后 BMSC 能改善心肌梗死后的心功能^[11]。通过用 BMP-2 诱导 BMSC 4 周后, 与对照组相比, 诱导后的细胞在形态上发生了明显改变, 呈短棒状, 细胞体积增大、增宽, 细胞间连接增多、紧密, 可见肌管样结构形成, 且心肌标记物 cTnT 和 Cx43 呈阳性表达, 逐渐表现出成熟心肌细胞的特征。cTnT 是心肌细胞内的一种重要调节蛋白, 与心肌细胞的收缩功能密切相关, 可作为鉴定心肌细胞的指标之一。Cx43 作为心肌闰盘结构中缝隙连接的主要结构蛋白, 是细胞之间建立相互联系和同步收缩的基础。

P38MAPK 是哺乳动物 MAPK 信号通路中的一条经典途径, 在细胞分化、凋亡、迁移和增殖等过程中起着重要作用^[12]。吡啶咪唑类衍生物(如 SB203580) 是 P38MAPK 信号通路抑制剂。P38MAPK 在干细胞分化方面的作用也逐渐受到关注, 在 BMSC 分化为成骨细胞、脂肪细胞过程中均起着重要作用^[13]。研究发现, P38MAPK 在 BMP-2 诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化方面发挥重要作用^[6]。然而, 关于 P38MAPK 信号通路是否在 BMSC

向心肌样细胞分化过程中发挥作用尚不是很清楚。通过用 BMP-2 诱导 BMSC 后发现, 与对照组相比, p-P38MAPK 蛋白表达明显增加, 应用 SB203580 抑制 P38MAPK 信号通路后, p-P38MAPK 蛋白表达明显减弱; 诱导 4 周后, 诱导剂组、阻断剂组的心肌标记物 cTnT 和 Cx43 均呈阳性表达, 且阻断剂组 Cx43 阳性细胞数目较诱导剂组增多, 而细胞的形态和排列方式诱导剂组与阻断剂组无明显差别; 对照组心肌标记物 cTnT 和 Cx43 呈阴性表达, 细胞形态无明显变化, 呈成纤维细胞样。上述说明, P38MAPK 信号通路在 BMP-2 诱导 BMSC 分化为心肌样细胞过程中可能发挥负性调节作用。

在细胞分化方面涉及多条信号途径, 这些途径可以通过一定的方式构成复杂的信号网络^[14]。P38MAPK 信号通路在 BMP-2 诱导 BMSC 分化为心肌样细胞的过程中起着负性调节作用。然而, P38MAPK 信号通路被 BMP-2 激活后, 心肌标记物 cTnT 和 Cx43 的表达并没有完全阻断, 只是减弱, 说明 BMP-2 在激活 P38MAPK 信号通路的同时, 可能其它信号通路也被激活起正性调节作用减弱或抵消 P38MAPK 的作用, 促进 BMSC 向心肌样细胞分化。研究显示, Smad、P38MAPK、PI3K 三条通路在 BMP-2 促进胚胎干细胞向心肌细胞分化中发挥重要作用^[6,14,15]。王新艳^[4]、国海东^[5]等发现 BMP-2 可通过 Smad、PI3K 通路诱导骨髓源性心肌干细胞 (MCSC) 向心肌样细胞分化。然而, 是否 PI3K、Smad、P38MAPK 通路之间在 BMP-2 诱导 BMSC 向心肌样细胞分化过程中存在着某种联系, 有待于进一步研究。研究发现^[16], MAPK 信号通路中的 P38MAPK、ERK、JNK 在胚胎干细胞分化为心肌细胞中均发挥作用, 且 SB203580 并非 P38 的特异性抑制剂, 还可阻断 ERK 通路, 并呈浓度依赖性。当 SB203580 浓度小于等于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 只阻断

P38MAPK,对 ERK 通路无影响;浓度大于 15 μ mol/L 时,P38MAPK、ERK 通路均受到阻断,此时 JNK 通路起作用。通过用 BMP-2 诱导 BMSC 后,P38MAPK 通路激活,发挥负性调节作用,而心肌标记物 cTnT 和 Cx43 并未被完全阻断;用浓度为 5 μ mol/L 的 SB203580 处理细胞后,再用 BMP-2 诱导,与诱导剂组相比,cTnT 和 CX43 表达增强,且 CX43 阳性细胞数增多,此时仅 P38MAPK 通路被阻断,ERK、JNK 通路未受影响,是否 ERK、JNK 通路在 BMP-2 诱导 BMSC 分化为心肌样细胞中也起一定的作用,ERK、JNK、P38MAPK 三条通路在这个过程中存在某种平衡,有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Sylwia Bobis, Danuta Jarocho, Marcin Majka. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical application[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(4): 215-230.

[2] 徐瑾,王彬尧,何奔,等.骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死后心功能衰竭的远期疗效[J].*中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(7): 585-589.

[3] 周瀛,白小涓,王勃,等.同种异体骨髓间充质干细胞移植对扩张型心肌病心功能衰竭大鼠左心功能的影响[J].*中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(2): 117-120.

[4] 王新艳,谭玉珍,王海杰,等. Smad 信号通路在骨髓源性心肌干细胞向心肌分化中的作用[J].*解剖学报*, 2006, 37(5): 525-529.

[5] 国海东,张贵焄,王海杰,等. PI32KPAkt 信号通路对骨髓源性心肌干细胞分化的调控作用[J].*解剖学报*, 2008, 39(4): 508-513.

[6] Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx2.5 and GATA-4[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 7096-105.

[7] Emma de Pater, Metamia Ciampricotti, Florian Priller, et al. BMP signaling exerts opposite effects on cardiac differ-

entiation[J]. *Circ Res*, 2012; 110: 578-587.

[8] 海澜,高航.骨形态发生蛋白-2、梗死心肌裂解液对骨髓间充质干细胞体外诱导分化作用的研究[J].*重庆医学*, 2012, 41(14): 1366-394.

[9] Behafar A, Zingman LV, Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart[J]. *J FASEB*, 2002, 48(16): 1558-566.

[10] Tirosh-Finkel L, Zeisel A, Brodt-Ivenshitz M, et al. BMP-mediated inhibition of FGF signaling promotes cardiomyocyte differentiation of anterior heart field progenitors[J]. *Development*, 2010, 137: 2989-3000.

[11] Jozef Bartunek, Jeffrey D, Croissant, et al. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 292: H1095-104.

[12] Wang YB. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases[J]. *Circulation*, 2007, 116: 1413-423.

[13] Emilie Barruet, Ola Hadadeh, Franck Peiretti, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase controls two successive steps during the early mesodermal commitment of embryonic stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(7): 1233-246.

[14] Wijk B, Moorman A, Hoff M, et al. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74(2): 244-255.

[15] Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, NishimuraR, et al. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/Threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 33361-368.

[16] Kempf H, Lecina M, Ting S, et al. Distinct regulation of mitogen-activated protein kinase activities is coupled with enhanced cardiac differentiation of human embryonic stem cells[J]. *Stem Cell Res*, 2011, 7: 198-209.

(此文编辑 许雪梅)