

整合素连接激酶过表达促进猪骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化

牡丹¹, 原晖华², 顾蓉³, 徐标³

(南京大学医学院附属鼓楼医院 1.影像科,3.心内科,江苏省南京市 210008;

2.南京医科大学附属江宁医院心内科,江苏省南京市 211100)

[关键词] 5-氮杂胞苷; 整合素连接激酶; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞

[摘要] 目的 探讨提高骨髓间充质干细胞(BMMSC)向心肌样细胞分化的方法,观察整合素连接激酶(ILK)过表达促进 BMMSC 向心肌样细胞分化的效果。方法 用包含人野生型 ILK cDNA 和绿色荧光蛋白(GFP)的重组腺病毒载体(Ad-GFP-ILK)转染体外培养的猪 BMMSC,诱导其在 BMMSC 中高表达,并用高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)的 5-氮杂胞苷(5-AZA)刺激诱导 BMMSC 向心肌样细胞分化。实验分为空白对照组(N组)、Ad-GFP 转染组(Ad组)、5-AZA 诱导组(5-AZA组)、Ad-GFP-ILK 转染组(ILK组)。用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞活力;培养至 2 周、4 周时采用免疫细胞化学染色检测心肌钙蛋白 I(cTnI)和 α 辅肌动蛋白(α -actinin)表达;4 周时提取蛋白,Western blot 检测 cTnI、缝隙连接蛋白 43(CX-43)、Caspase-3 和 ILK 的表达。结果 MTT 检测结果显示 Ad 组、5-AZA 组比 N 组、ILK 组细胞活力明显减弱($P<0.05$);但 Ad 组、5-AZA 组之间,N 组、ILK 组之间比较均无统计学差异($P>0.05$)。细胞培养至 2 周时,免疫细胞化学染色显示,5-AZA 组、ILK 组开始表达心肌特异性标记物 cTnI 和 α -actinin,而 N 组、Ad 组均没有明显阳性表达。Western blot 结果显示 ILK 蛋白在 ILK 组表达较其他组明显升高($P<0.05$)。与 N 组、Ad 组比较,5-AZA 组、ILK 组 cTnI 表达明显升高($P<0.05$);而 5-AZA 组、ILK 组之间,N 组、Ad 组之间则没有差异($P>0.05$)。CX-43 在 4 组间的表达趋势与 cTnI 相同。Caspase-3 表达在 Ad 组、5-AZA 组较其他组明显升高($P<0.05$)。结论 ILK 过表达能促进 BMMSC 向心肌样细胞分化,其分化效率和较高浓度的 5-AZA 体外刺激无差异。ILK 过表达对细胞增殖活力无影响,且有一定的抗凋亡作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Overexpression of Integrin-linked Kinase Promotes the Differentiation of Swine Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell into Cardiomyocyte-like Cell

MU Dan¹, YUAN Hui-Hua², GU Rong³, and XU Biao³

(1.Department of Radiology, 3.Department of Cardiology, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2.Department of Cardiology, Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211100, China)

[KEY WORDS] 5-Azacytidine; Integrin-linked Kinase; Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell; Cardiomyocyte-like Cell

[ABSTRACT] **Aim** To improve the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC) into cardiomyocyte-like cell; To observe the effect of integrin-linked kinase (ILK) overexpression on the differentiation of BMMSC into cardiomyocyte like cell. **Methods** Swine BMMSC was isolated and transfected by recombinant adenoviral vectors containing both human wild-type ILK cDNA and humanized recombinant green fluorescent protein (GFP) (Ad-GFP-ILK). The differentiation of BMMSC into cardiomyocyte-like cell was induced with high concentration (50 mol/L) 5-azacytidine (5-AZA). Cells were divided into 4 groups: blank control group (N group), Ad-GFP transfection group

[收稿日期] 2015-09-07

[修回日期] 2016-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金(81070195、81200092);南京市医学科技发展基金(QRX11177、ykk13064、QRX11158)

[作者简介] 牡丹,博士,研究方向为干细胞治疗心脏疾病及影像学,E-mail 为 mudan118@126.com。原晖华,硕士,研究方向为干细胞治疗心肌梗死的实验研究,E-mail 为 yhua@foxmail.com。通讯作者徐标,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为心力衰竭的发病机制,E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。

(Ad group), 5-AZA inducing group (5-AZA group) and Ad-GFP-ILK transfection group (ILK group). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the cell viability. Cardiac troponin I (cTnI) and α -actinin expressions were detected by immunocytochemistry after transfection for 2, 4 weeks. Western blot was performed to assess the expressions of cTnI, gap junction protein connexin-43 (CX-43), caspase-3, and ILK after transfection for 4 weeks. **Results** MTT results showed that cell viabilities were significantly decreased in Ad group, 5-AZA group than those in N group, ILK group ($P<0.05$), but there was no significant difference between Ad group and 5-AZA group, between N group and ILK group ($P>0.05$). When the cells were cultured for 2 weeks, immunocytochemistry staining showed that 5-AZA group and ILK group began to express cardiac specific markers cTnI and α -actinin, while N group and Ad group had no obviously positive expression. Western blot results showed that the expression of ILK protein in ILK group was significantly higher than that in the other groups ($P<0.05$). Compared with N group and Ad group, the expressions of cTnI in 5-AZA group and ILK group were significantly higher ($P<0.05$), but there was no difference between 5-AZA group and ILK group, between N group and Ad group ($P>0.05$). The expression trend of CX-43 in the 4 groups was the same as that of cTnI. Caspase-3 expressions in Ad group, 5-AZA group were significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). **Conclusions** ILK overexpression can promote the differentiation of BMMSC into cardiomyocyte-like cells, and the differentiation efficiency is not different from that of high concentration of 5-AZA stimulation in vitro. ILK overexpression has no effect on cell proliferation, and has a certain anti-apoptotic effect.

急性心肌梗死后缺血心肌发生不可逆的细胞损伤。干细胞因为有极强的增殖和分化能力受到广泛关注和研究;骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMMSC)因其容易分离、培养,有较强的增殖和分化能力以及较低的免疫原性,成为研究的重点^[1]。已有研究表明BMMSC移植治疗心肌梗死能在一定程度上改善心功能,但其分化效率较低,不足以长期维持心功能。因此需要探索体外诱导BMMSC向心肌细胞分化的方法。诱导剂体外诱导BMMSC后移植到体内能明显提高其分化效率;5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-AZA)是一种经典的体外诱导因子。但5-AZA有一定的细胞毒性,因此体外诱导细胞时多采用10 $\mu\text{mol/L}$ 的低浓度,诱导分化效率受到限制。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,调节多种细胞生物行为。目前有证据表明胎儿心脏细胞ILK基因过表达能够促进中胚层细胞向心肌样细胞分化^[2]。本实验通过对比应用基因工程使ILK基因过表达及5-AZA体外诱导对BMMSC向心肌样细胞分化效果,探索ILK过表达能否更好地促进BMMSC向心肌细胞分化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中国小型猪,雌雄不限,平均体重 20 ± 2 kg,由江苏省农业科学院六合动物科学基地提供,在鼓楼医院动物实验中心饲养。

1.2 材料

胎牛血清、低糖DMEM-LG培养基、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司);人淋巴细胞分离液(天津灏洋公司);5%盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞公司);0.5%地西洋注射液(天津金耀公司);0.5%氟哌利多(上海恒远公司);肝素钠(常州凯普公司);小鼠抗CD34、CD90、CD44、CD29、CD45单抗(eBioscience公司);藻红蛋白(PE)标记羊抗小鼠二抗IgG、多甲藻叶绿素蛋白(PerCP)标记羊抗兔二抗IgG(Multisciences公司);小鼠抗GAPDH抗体(Santa Cruze公司);兔抗ILK单抗(LifeSpan BioSciences公司);兔抗缝隙连接蛋白43(connexin-43, CX-43)单抗(Bioword公司);兔抗Caspase-3单抗(BD公司);兔抗心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)单抗(Abcam公司);羊抗兔IgG[H+L]-FITC(BD公司);兔抗 α 辅肌动蛋白(α -actinin)单抗(Abcam公司);HRP标记羊抗小鼠IgG(Santa Cruz公司);HRP标记羊抗兔IgG(Santa Cruz公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(BD公司);5-AZA(Sigma公司);噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒(Sigma公司)。

1.3 猪骨髓间充质干细胞分离和培养

体重约为 20 ± 2 kg的小型猪,麻醉后,无菌条件下,穿刺猪股骨上端,抽取骨髓60~80 mL。利用密度梯度离心选取单个核细胞层,用含10%胎牛血清的DMEM-LG完全培养基重悬置底细胞,48 h换液,10~14天后,待细胞融合度达到90%以上,进行第1次传代。BMMSC的分离培养详见本课题组前期实验方法^[3-4]。

1.4 猪骨髓间充质干细胞鉴定

选取生长状态良好的第 3~6 代细胞,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 2 次,离心 (1500 r/min, 5 min、室温);用 600 μ L PBS 重悬细胞,分为 7 个试管,每管 100 μ L,保证每管细胞数为 $(5 \sim 10) \times 10^5$ 个;其中 2 管设为同型对照,分别加入 PerCP 标记二抗和 PE 标记二抗孵育,其余 5 管分别标记为 CD34、CD90、CD44、CD29、CD45;分别加入对应一抗 1 μ L,充分混匀,室温下避光 20 min,离心 (1500 r/min, 5 min),弃去上清,加入 500 μ L PBS 重悬;避光情况下加入相应二抗各 1 μ L,室温下再避光 20 min,离心弃上清,加入 500 μ L PBS 重悬;避光上流式细胞仪检测。

1.5 ILK 重组腺病毒转染猪 BMMSC 及 ILK 表达鉴定

包含人野生型 ILK cDNA 和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的重组腺病毒载体 (Ad-GFP-ILK) 及携带 GFP 的腺病毒载体 (Ad-GFP) 由南京基因公司构建。取生长状态良好的第 3 代细胞,按本课题组前期实验方法^[3-4]进行基因转染,3~4 天后,当细胞融合度达到 >90%,消化离心,将一部分细胞悬液转入含盖玻片的 6 孔板内,细胞融合度达到 90%~95%,吸去旧培养基,PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 3 次。滴少许封片剂于载玻片上,荧光显微镜下观察 BMMSC 的 GFP 表达情况。另外一部分细胞离心后弃去上清,0.5 mL PBS 重悬。选取一瓶未经转染的第 3 代 BMMSC 作为阴性对照组。流式细胞仪检测 GFP 表达情况,确定转染效率。

1.6 MTT 细胞活力检测

胰蛋白酶消化对数生长期细胞,离心,制成细胞悬液,细胞计数,调整浓度至 $(5 \sim 10) \times 10^7$ /L。轻轻混匀,96 孔板每孔加入 100 μ L,使待测细胞的密度为 5000~10000 个/孔 (边缘孔用无菌 PBS 填充)。细胞贴壁后分成 4 组:空白对照组 (N 组)、Ad-GFP 转染组 (Ad 组)、5-AZA 诱导组 (5-AZA 组)、Ad-GFP-ILK 转染组 (ILK 组)。Ad 组、ILK 组均按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 5:1 的比例加入病毒颗粒刺激 12 h (无血清培养基),随后换成完全培养基后培养 24 h,待测。5-AZA 组加入 50 μ mol/L 5-AZA 刺激 24 h 后更换新鲜的完全培养基待测。从培养箱中取出 96 孔板,配置 1 \times MTT 溶液,每孔加入 50 μ L 1 \times MTT, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。小心吸出上清,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜,置摇

床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测量各孔的吸光度 (absorbance, A) 值。

1.7 ILK 过表达促进 5-AZA 诱导的 BMMSC 向心肌细胞分化

使用 25 cm^2 的培养瓶,取第 3 代的 BMMSC,分成 4 组,正常传代培养 (如 1.6 所述)。在 2 周和 4 周时分别将细胞转入 24 孔板制作细胞爬片,行免疫细胞化学染色。4 周后收集细胞提取蛋白质。

1.8 免疫细胞化学染色

以上 4 组细胞分别培养至 2 周和 4 周时将其转入 24 孔板中制作爬片,待细胞贴壁后从细胞培养箱中取出,弃去培养基,用 PBS 洗涤 3~4 遍,1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,0.1% Triton-X 100 破膜 5~10 min。PBS 洗涤 3~4 遍,每孔加入 1:100 cTnI 或 1:200 α -actinin 各 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光过夜。第 2 天取出 24 孔板,回收抗体,每孔加入 PBS 反复洗涤 3~4 遍。室温略干燥 5 min,用免疫组织化学笔在爬片中央标记区域。小心取出爬片置于载玻片上,平放于湿盒中,吸取少量 1:200 的 FITC 抗兔 IgG 置于爬片上,完全覆盖爬片上的细胞。然后将玻片置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中避光反应 30 min。从烘箱中取出玻片,室温复温 30 min。回收二抗, PBS 洗涤 3~4 遍, DAPI 染核 10 min, PBS 洗涤 3 遍,封片剂封片后用荧光显微镜观察并获取图像。

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

上述 4 组细胞培养 4 周后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化,离心, PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL PBS 重悬后转移至 1.5 mL 的 EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 5 min,使细胞沉淀于 EP 管底部,弃上清,加入细胞裂解液各 100 μ L,冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 20 min 后提取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。每个 EP 管加入 100 μ L 5 \times 上样缓冲液,沸水浴 30 min 使蛋白变性。每个蛋白样品上样量 30 μ g, 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h,转移至二氟化树脂膜上,加入含 5% 牛奶、0.1% Tween 的 TBS 溶液,室温下封闭 1 h。二氟化树脂膜使用一抗孵育,包括抗 ILK 抗体 (1:1000)、抗 CX-43 抗体、抗 cTnI 抗体、抗 Caspase-3 抗体及内参抗 GAPDH 抗体。用 TBST 洗膜 4 次后加入连接有辣根过氧化物酶的二抗,然后重复洗膜,加入 ECL 发光剂显色。使用凝胶或者胶片瞬变显示系统对胶片进行扫描,用 Image J 图像分析软件对目标条带的 A 值进行分析,将待测蛋白条带和同一泳道的 GAPDH 蛋白条带的 A 值比值作为实验结果。

1.10 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析。各计量资料主要统计学指标均进行正态性、方差齐性检验,正态分布的各统计指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间独立定量资料比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态及鉴定

原代细胞培养 48 h 后开始出现散在贴壁细胞,逐渐形成集落,培养到第 3 代时细胞呈长梭形,排列混乱,两极朝向不规律,细胞间形成突起相连接,成

纤维细胞样。经过多次传代,细胞形态仍和原代细胞保持相似(图 1),并且生长加速。流式细胞仪检测结果显示,培养的 P3~P6 代细胞表现出高度的均一性,大多数细胞高表达细胞表面抗原 CD29 (90.5%)、CD90 (79%)、CD44 (100%),但低表达 CD34 (3.9%)、CD45 (0.5%),提示 BMMSC 纯度较高(图 2)。

2.2 ILK 转染效率检测

荧光显微镜观察,转染 48 h 后可见 GFP 表达较强(图 3),经过细胞传代,荧光可以持续。流式细胞仪检测显示转染后 GFP 表达阳性细胞数达到 90.3%,而未转染的空白对照组的 GFP 阳性细胞数仅为 1.6%(图 4)。

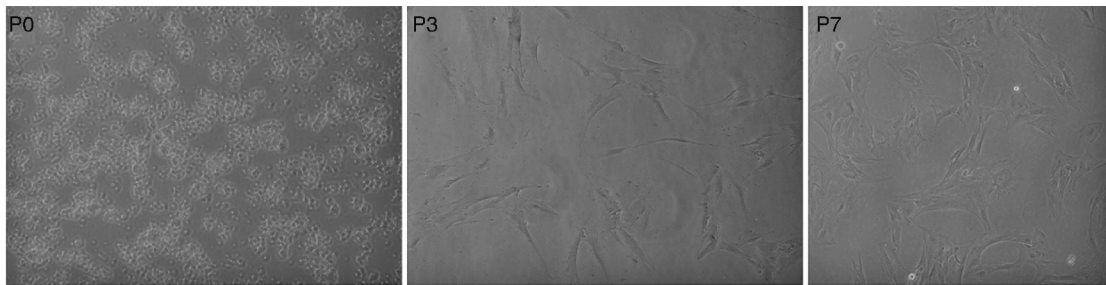


图 1. 猪 BMMSC 的形态(100×) P0 为原代细胞,P3 为第 3 代细胞,P7 为第 7 代细胞。

Figure 1. Morphology of swine BMMSC (100×)

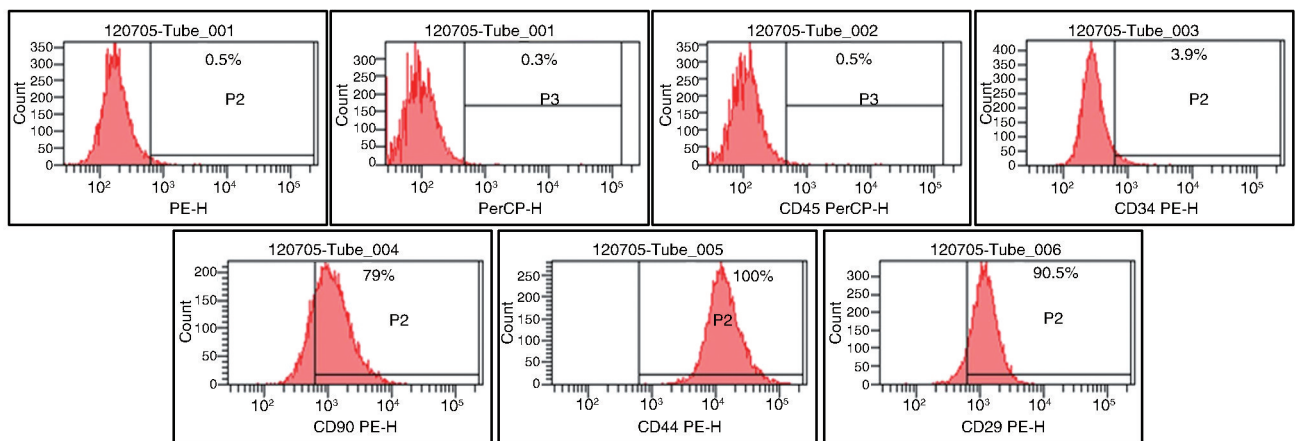


图 2. 猪 BMMSC 流式细胞仪鉴定

Figure 2. Identification of swine BMMSC by flow cytometry

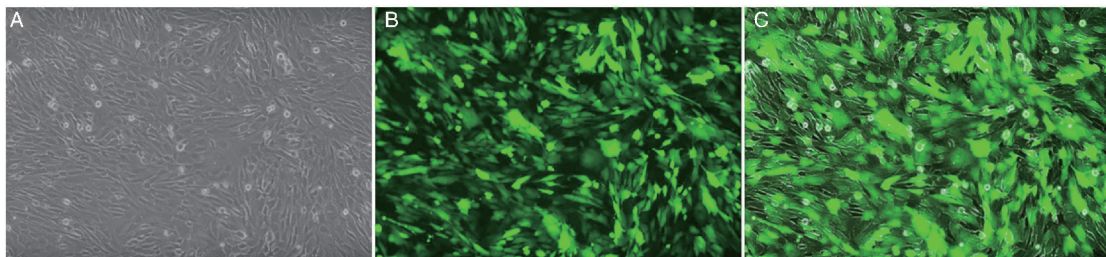


图 3. 猪 BMMSC 的 GFP 表达(100×) A 为普通光通道下观察到的细胞形态;B 为同一视野下在绿色荧光通道观察到的绿色荧光;C 为普通光和绿色荧光的融合图。

Figure 3. GFP expression of swine BMMSC (100×)

2.3 细胞活力检测

MTT 实验结果提示 Ad 组和 5-AZA 组比 N 组、ILK 组细胞活力明显减弱 ($P<0.05$) ;但 Ad 组和 5-

AZA 组间、N 组和 ILK 组间比较均无统计学差异 ($P>0.05$;图 5)。结果表明空载腺病毒和 5-AZA 对细胞有损伤作用;ILK 对细胞活力无明显影响。

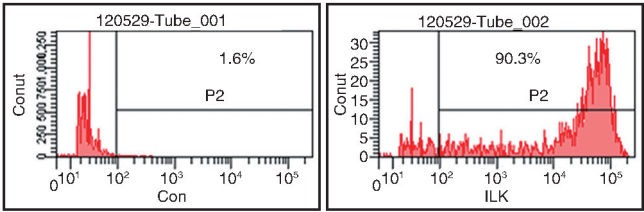


图 4. 流式细胞仪检测猪 BMMSC 的 ILK 基因转染效率
左为 N 组,右为 ILK 组。

Figure 4. Transfection efficiency of ILK gene in swine BMMSC detected by flow cytometry

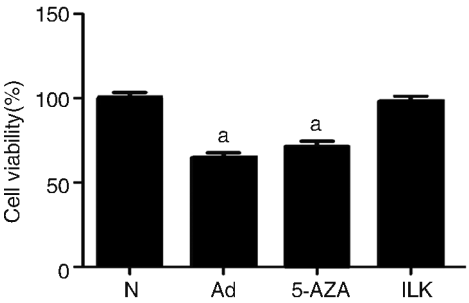


图 5. MTT 法检测细胞的增殖活力 ($n=9$) a 为 $P<0.05$,与 N 组比较。

Figure 5. The cell viability assessed by MTT ($n=9$)

2.4 免疫细胞化学染色检测心肌细胞标记物

免疫细胞化学染色结果显示,在 2 周时 5-AZA 组、ILK 组细胞开始表达心肌特异性标记物 cTnI 和 α -actinin;而 N 组、Ad 组细胞未见明显阳性表达(图

6A)。培养至 4 周时,细胞体积有所增大,形态变扁平,实验组细胞心肌特异性标记物阳性率增加,胞质中的 α -actinin 呈丝状(图 6B)。

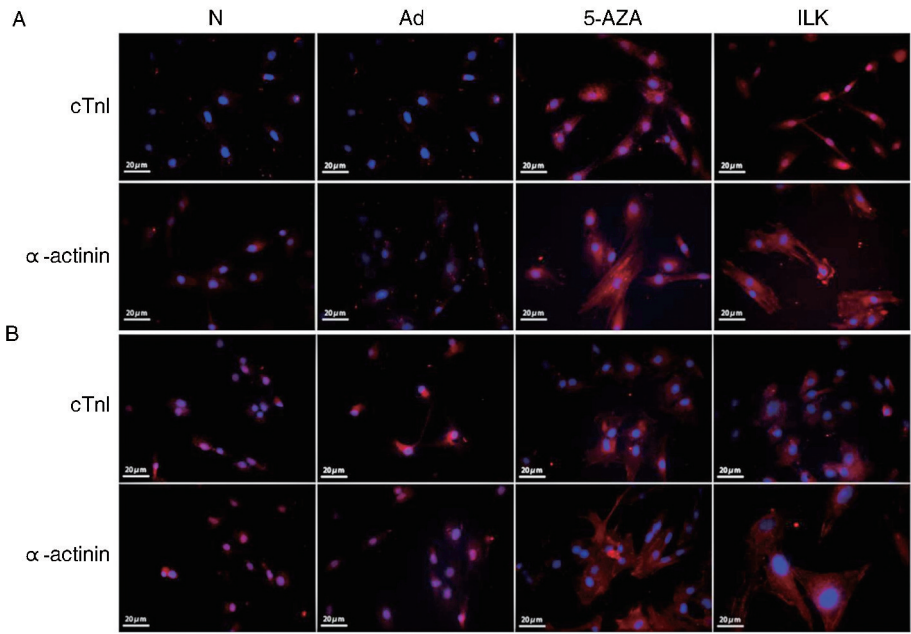


图 6. 细胞免疫荧光染色检测心肌特异性标记物 cTnI 和 α -actinin
蓝色为 DAPI 染色。

A 为 2 周时细胞免疫染色情况;B 为 4 周时细胞免疫染色情况。

Figure 6. Cardiac specific markers cTnI and α -actinin detected by cell immunofluorescence staining

2.5 Western blot 检测细胞分化及凋亡

细胞培养至 4 周时提取蛋白,Western blot 检测 cTnI、CX-43、Caspase-3、ILK 表达情况。ILK 在 ILK

组表达较其他组明显升高,提示转染后 ILK 表达被成功激活 ($P<0.05$)。5-AZA 组、ILK 组与 N 组、Ad 组比较心肌特异性标记物 cTnI 表达明显升高 ($P<$

0.05);而5-AZA组、ILK组之间无明显差异,N组、Ad组之间也无统计学差异($P>0.05$)。CX-43在4组的表达趋势与cTnI相同。Caspase-3的表达在Ad组、5-AZA组较其他组明显增高($P<0.05$;图7、8)。

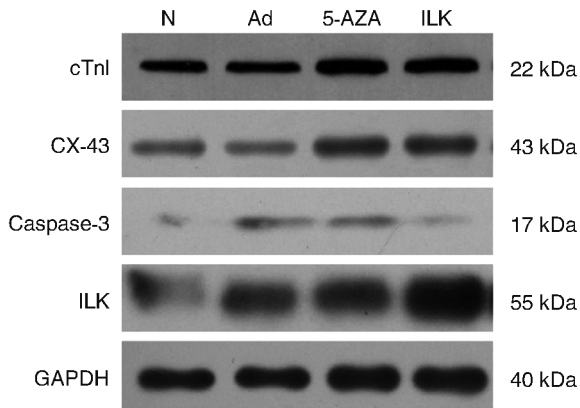


图7. Western blot检测的电泳图

Figure 7. Electrophoretogram of Western blot detection

3 讨论

已有许多动物和人体实验表明,BMMSC移植对心肌梗死后心脏功能的改善有一定的积极意义^[5-8],但是心肌梗死部位BMMSC归巢较少,分化效率较

低,远期心功能无法持续改善^[9]。因此,在移植到体内之前对BMMSC进行一些诱导,使其向心肌细胞有一定程度的特异性分化,能够改善BMMSC移植修复心肌的疗效^[10]。

关于体外诱导BMMSC特异性向心肌细胞分化的方法已经做了许多的研究,其中使用最多的诱导剂为5-AZA,其他诱导剂包括骨形态发生蛋白2^[11]、血管紧张素II^[12]、转化生长因子 β 1^[10]、心肌营养素1^[13-14]等。5-AZA是一种核苷类似物,能够抑制DNA甲基化,临床上用于治疗乳腺癌、肠癌、黑色素瘤、急性粒细胞性白血病等有一定疗效。5-AZA在体外刺激BMMSC能够一定程度地使细胞向心肌细胞分化^[15-16],经诱导分化的BMMSC移植到体内后能够提高细胞分化效率,改善心功能。但动物实验表明5-AZA体外刺激BMMSC分化通常要4-6周^[17],并且5-AZA作为一种抗肿瘤药物,有一定的细胞毒性,因此大多数实验均将其体外刺激浓度设定在10 $\mu\text{mol/l}$ ^[18]。本实验结果同样发现体外高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)5-AZA刺激对细胞活力有一定影响,Western blot检测发现5-AZA组Caspase-3表达增加也再次证明高浓度5-AZA导致细胞凋亡增多。因此找到一种安全有效的体外诱导分化方法至关重要。

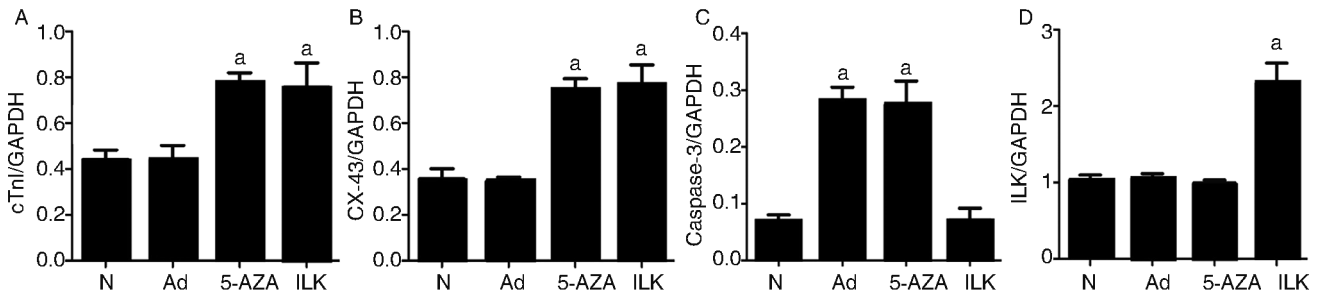


图8. cTnI、CX-43、Caspase-3、ILK表达情况($n=9$) a为 $P<0.05$,与N组、Ad组比较(A图、B图),与N组、ILK组比较(C图),与N组、Ad组、5-AZA组比较(D图)。

Figure 8. The protein expression of cTnI, CX-43, Caspase-3 and ILK ($n=9$)

ILK是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,调节关于心脏肥大、心脏收缩功能相关的信号通路,参与心脏生长发育过程,与心肌细胞增殖密切相关^[19]。我们的前期研究结果发现,通过基因工程的方法使BMMSC过表达ILK,能够促进内皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子2和胰岛素生长因子1等基因的高表达^[3]。ILK能够促进间充质干细胞的旁分泌作用,增加基质金属蛋白酶2、基质金属蛋白酶9基因表达,从而有效抑制心肌梗死后胶原

增生,逆转心室重构及心功能衰竭^[4]。高表达ILK基因的腺病毒注射到大鼠急性心肌梗死及扩张性心肌病的心肌内可以明显改善心功能及心室重构^[20-21]。Traister等^[2]研究发现,在胎儿心脏内激活ILK基因有利于中胚层前体细胞向成心肌细胞系分化,此机制可能与ILK高表达激活其下游信号分子PI3K高表达,从而激活了生长因子调节的分化信号通路及整合素 β 1调节的分化信号通路有关。本研究免疫组织化学及Western blot结果均显示体外

BMMSC 过表达 ILK 基因可以促进心肌特异性蛋白 cTnI、 α -actinin 的表达及心肌缝隙连接蛋白 CX-43 的表达,即促进 BMMSC 向心肌样细胞分化,且在不影响细胞活力的情况下,与高浓度 5-AZA 诱导分化效果无明显差异。因此,在诱导分化效果相似的情况下,鉴于 ILK 有上述积极的细胞保护作用,利用基因工程方法高表达 ILK 诱导 BMMSC 向心肌样细胞分化是一种较为理想的体外分化策略。

[参考文献]

- [1] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1): 11-20.
- [2] Traister A, Aafaqi S, Masse S, et al. ILK induces cardiomyogenesis in the human heart [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37 802.
- [3] 高见书,林承曦,毛庆,等. 高表达整合素连接激酶对大鼠骨髓间充质干细胞旁分泌功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(5): 380-384.
- [4] Mao Q, Lin CX, Liang XL, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing integrin-linked kinase attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5): 1 617-623.
- [5] Tang YL, Zhao Q, Qin XY, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. *Ann of Thorac Surg*, 2005, 80(1): 229-237.
- [6] Nagaya N, Fujii T, Iwase T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(6): H2 670-676.
- [7] Piao H, Youn TJ, Kwon JS, et al. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium [J]. *Eur J Heart Fail*, 2005, 7(5): 730-738.
- [8] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(24): 2 277-286.
- [9] Dai WD, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium short- and long-term effects [J]. *Circulation*, 2005, 112(2): 214-223.
- [10] Mohanty S, Bose S, Jain KG, et al. TGF beta 1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 163(1): 93-99.
- [11] Hou J, Lu A, Liu B, et al. Combination of BMP-2 and 5-AZA is advantageous in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into cardiomyocytes [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(12): 1 291-299.
- [12] Xing Y, Lv A, Wang L, et al. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1-2): 279-287.
- [13] Liu T, Zhang R, Guo T, et al. Cardiotrophin-1 promotes cardiomyocyte differentiation from mouse induced pluripotent stem cells via JAK2/STAT3/Pim-1 signaling pathway [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2015, 12(6): 591-599.
- [14] Chen X, Zeng Z, Zhou B, et al. Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with 5-azacytidine in vitro [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143(2): 171-177.
- [15] Supokawej A, Kheolamai P, Nartprayut K, et al. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment [J]. *Turk J Haematol*, 2013, 30(2): 115-121.
- [16] Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidogou A, et al. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 56(2): 77-82.
- [17] Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells [J]. *Cell Res*, 2006, 16(12): 949-960.
- [18] Moscoso I, Centeno A, Lopez E, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1): 481-482.
- [19] 花颖,白剑,张娜,等. 整合素连接激酶在大鼠心脏生长发育过程中的表达及意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(1): 11-15.
- [20] Ding L, Dong L, Chen X, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 120(9): 764-773.
- [21] Gu R, Bai J, Ling L, et al. Increased expression of integrin-linked kinase improves cardiac function and decreases mortality in dilated cardiomyopathy model of rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31 279.

(此文编辑 曾学清)