

Klotho 基因转染骨髓间充质干细胞移植对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响

王欢¹, 杨晓华¹, 李慧萍¹, 朱向情², 尹娜¹, 杨静¹, 潘兴华², 魏玲¹

(1. 成都军区昆明总医院地方干部病房, 云南省昆明市 650011;

2. 云南省干细胞工程试验室, 云南省昆明市 650032)

[关键词] Klotho 基因骨髓间充质干细胞; 心力衰竭; 心肌纤维化

[摘要] **目的** 观察 Klotho 基因(抗衰老基因)修饰的骨髓间充质干细胞(BMSC)移植对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响。**方法** 分离、培养、扩增大鼠骨髓间充质干细胞。慢病毒介导 Klotho 转染至 BMSC 中, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 BMSC 中 Klotho mRNA 的表达。制备大鼠慢性心力衰竭模型, 随机分为正常对照组、模型对照组、增强型绿色荧光蛋白-BMSC 组(EGFP-BMSC 组)、EGFP-Klotho-BMSC 组。细胞移植 28 天后多普勒超声检测心功能, 荧光显微镜观察细胞存活及分布, HE 染色观察心肌组织病理变化。Masson 染色检测心肌胶原沉积含量和心肌纤维化程度。**结果** Klotho 转染 BMSC 后, BMSC 中 Klotho mRNA 表达明显增多($P < 0.05$)。移植 28 天后超声心动图结果显示, 与 EGFP-BMSC 组及模型对照组比较, EGFP-Klotho-BMSC 组左心室射血分数(LVEF)提高($P < 0.05$)。EGFP-BMSC 组及 EGFP-Klotho-BMSC 组心肌纤维化程度较模型对照组减轻($P < 0.05$), EGFP-Klotho-BMSC 组较 EGFP-BMSC 组心肌纤维化改善更为明显($P < 0.05$)。**结论** Klotho 基因联合 BMSC 治疗可进一步抑制心肌纤维化, 减少心肌间质胶原沉积, 改善心功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transfected with Klotho gene on myocardial fibrosis in rats with heart failure

WANG Huan¹, YANG Xiao-Hua¹, LI Hui-Ping¹, ZHU Xiang-Qing², YIN Na¹, YANG Jing¹, PAN Xing-Hua², WEI Ling¹

(1. Wards for Civilian Cadres, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan 650011, China; 2. Stem Cell Engineering Laboratory of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

[KEY WORDS] Klotho gene; Bone marrow mesenchymal stem cells; Heart failure; Myocardial fibrosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Klotho gene modified bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) transplantation on myocardial fibrosis in rats with heart failure. **Methods** Isolation, culture and amplification of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Klotho transfection to BMSC and RT-PCR detection of Klotho mRNA expression in BMSC. The rat model of chronic heart failure were randomly divided into normal group, saline group, EGFP-BMSC group and EGFP-Klotho-BMSC group, with 6 rats in each group. The cardiac function was detected by Doppler ultrasound after 28 days of cell transplantation. The survival and distribution of the cells were observed by fluorescence microscope. The pathological changes of myocardial tissue were observed by HE staining. Masson staining was used to detect the content of myocardial collagen deposition and the degree of myocardial fibrosis. **Results** Klotho combined with BMSC treatment can better inhibit myocardial fibrosis, reduce myocardial interstitial collagen deposition and improve cardiac function.

Conclusion Klotho gene combined with bone marrow mesenchymal stem cells could attenuate cardiomyocytes hypertrophy and restrain collagens hyperplasy in the progression of myocardial fibrosis.

[收稿日期] 2016-09-26

[修回日期] 2016-12-13

[基金项目] 973 计划项目(2012CB518100)

[作者简介] 王欢, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为心血管病基础与临床, E-mail 为 1007942905@qq.com。通讯作者魏玲, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病的基础与临床研究, E-mail 为 weiling43@163.com。

心肌纤维化 (myocardial fibrosis) 是指心肌组织中基质过度沉积, 胶原容积分数及浓度显著增加, 各型胶原比例失调及排列紊乱^[1], 是各种心血管疾病如心律失常、充血性心力衰竭及心源性猝死的重要诱发因素^[2-3]。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSC) 是具有多向分化及高度自我更新的成体干细胞, 在心肌微环境下能向心肌细胞、浦肯野细胞及内皮细胞分化, 并分泌各种细胞因子及生长因子, 抑制心肌细胞凋亡, 减少基质胶原沉积, 改善心肌纤维化^[4-5]。Klotho 基因是 1997 年 Kuro 等^[6] 研究自发性高血压大鼠时偶然发现的新型抗衰老基因。Klotho 基因具有抗氧化应激、减少炎症反应、抑制心肌细胞及血管内皮细胞凋亡、改善心肌微环境、抑制心肌纤维化的作用^[7-8]。本研究采用分子生物学技术将重组慢病毒 (lentiviral vector, LV) 介导的 Klotho 基因转染至骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC), 并移植到大鼠心肌中, 探讨 Klotho 基因联合 BMSC 移植治疗对慢性心衰大鼠心肌纤维化的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 其中 24 只大鼠鼠龄约 3 月, 体重 300 ± 30 g, 另外 6 只大鼠为 1 月龄, 体重 100 ± 20 g, 用于提取骨髓间充质干细胞。所用动物由昆明医科大学动物实验中心提供 [动物许可证号 SCXK(滇)2011-0005]。实验动物置动物房适应性喂养 1 周, 自由摄食及饮水, 实验前 12 h 禁食。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM-F12 细胞培养基 (北京 HyClone 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 BI 公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 青霉素、链霉素抗生素 (北京 Solarbio 公司); SD 大鼠 BMSC 成骨、成脂诱导分化培养基 (广州赛业生物科技有限公司), 盐酸异丙肾上腺素注射液 (上海禾丰制药有限公司); Masson 染色试剂盒 (武汉谷歌生物科技有限公司); LV-增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因, 慢病毒载体 LV-EGFP-Klotho 基因 (上海吉凯生物有限公司)。

1.3 BMSC 的分离、培养、扩增

采用颈椎脱臼法处死大鼠 (6 只), 无菌条件下去大鼠双侧股骨及胫骨, 清除骨表面筋膜及肌肉, 剪断骨髓端, 暴露骨髓腔, 用 10 mL 无菌注射器吸取

无 FBS 的 DME-F12 培养基反复冲骨髓腔, 将骨髓液收集至离心管中, 1200 r/min, 离心 5 min, 反复吹打成单细胞悬液, 弃上清, 用含 FBS 的 DME-F12 完全培养基重悬稀释, 移至 T75 细胞培养瓶中, 置 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养, 48 h 后首次换液, 去除未贴壁细胞, 根据细胞生长速度, 每 2~3 天换液 1 次, 待细胞融合度达 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 按 1:3 传代, 继续培养。

1.4 Klotho 基因转染 BMSC

取第 3 代 BMSC 以 5×10^5 个/孔铺于 48 孔板, 至细胞覆盖率达 70% 时, 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 0、50、100、150、200 加入慢病毒 LV-EGFP 病毒液, 每个 MOI 值设置 3 个复孔, 感染 3 天后, 荧光显微镜下观察 EGFP 阳性的干细胞数, 当 MOI=150 时表达 EGFP 的干细胞数与 MOI=200 时无明显差异。因此 MOI 值为 150 为最佳感染复数, 并进行慢病毒 LV-EGFP-Klotho 基因转染 BMSC 正式实验。

1.5 逆转录-聚合酶链反应检测细胞 Klotho mRNA 表达

病毒转染 1 周后检测各组 BMSC (未转染 BMSC 组、EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组) 中 Klotho mRNA 的表达。Trizol 法提取 BMSC 总 RNA, 测定 RNA 浓度, 按照反转录试剂盒说明书取 $1 \mu\text{g}$ RNA 反转录获得 cDNA, 并以 cDNA 为模板, 扩增目的片段, PCR 引物由上海生工生物有限公司合成。大鼠 Klotho 上游引物: $5'$ -CAA TGG CTT CCC TCC TTT ACC T- $3'$, 下游引物: $5'$ -TTC TCT TCT TGG CTA CAA CCC C- $3'$ 。大鼠内参 GAPDH 上游引物: $5'$ -TTC CTA CCC CCA ATG TAT CCG- $3'$, 内参 GAPDH 下游引物: $5'$ -CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT- $3'$ 。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 反应条件为预变性 95°C 、10 min, 再一步变性 95°C 、15 s, 退火延伸 60°C 、60 s, 共 40 个循环。PCR 结束后获取 Ct 值, 并计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 分析表达差异。

1.6 大鼠心力衰竭模型制备及分组

18 只大鼠腹腔给予异丙肾上腺素注射, 每天 3 mg/kg , 共 14 天, 以建立慢性心衰大鼠模型^[8], 造模成功后依照随机数字表法将 18 只 SD 模型大鼠分为 3 组: EGFP-Klotho-BMSC 组 (尾静脉注射 EGFP-Klotho-BMSC, 5×10^9 个/L, 1 mL/只)、EGFP-BMSC 组 (尾静脉注射 EGFP-BMSC, 5×10^9 个/L, 1 mL/只)、模型对照组 (尾静脉注射 1 mL 生理盐水), 每组 6 只大鼠。正常对照组大鼠 (6 只) 腹腔注

射等体积生理盐水,共 14 天,正常对照组未给予任何干预。

1.7 大鼠心功能及心肌组织学检测

各组大鼠在造模前后及细胞移植治疗 4 周后进行超声心动图检测使用探头频率为 12 MHz 彩色多普勒超声心动仪(Philip 公司,美国)检查,检测指标为左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。实验结束后称取大鼠体重并处死大鼠,打开胸腔,称取心脏湿重,计算心重/体重指数(HW/BW)。心肌组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后连续切片,切片厚度为 5 μm ,进行 HE 及 Masson 染色,各组另取心肌组织标本进行 OCT 包埋及冰冻切片,在荧光显微镜下观察移植的 BMSC 存活率及分布情况。

1.8 统计学分析

应用 SPSS18.0 统计学软件对实验结果进行分析,实验数据计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,心重指数应用单因素方差分析检验,多个样本均数间的两两比较用 LSD 检验。两变量相关性采用 Pearson 相关分析,以相关系数评价相关性。其显著性检验设置为 95% 可信区间,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态观察

培养 48 h 可见短小梭形、三角形的间充质干细胞贴壁生长,4 天后可见明显的集落形成,细胞体积增大,多呈长梭形。随着换液及培养,原代细胞 10 天左右达 90% 以上融合,细胞为均一分布漩涡状排列的长梭形细胞群。传代后细胞增殖时间明显缩短,细胞形态为成纤维样,平均 5 天达 85% 以上融合(图 1)。

2.2 Klotho 基因转染 BMSC 转染效率的观察

慢病毒介导 Klotho 基因转染 BMSC 48 h 后荧光显微镜下可见到携带增强型绿色荧光蛋白的干

细胞。表达 EGFP 的干细胞阳性率随着 MOI 值的增加而增加,MOI 值为 150 时,荧光显微镜观察到表达 EGFP 的干细胞阳性率约 80% (明视野贴壁细胞数/暗视野转染细胞数),细胞形态及增殖速度未见明显改变。MOI 值为 200 时表达 EGFP 的干细胞数与 MOI 值为 150 时无显著差异(图 2)。

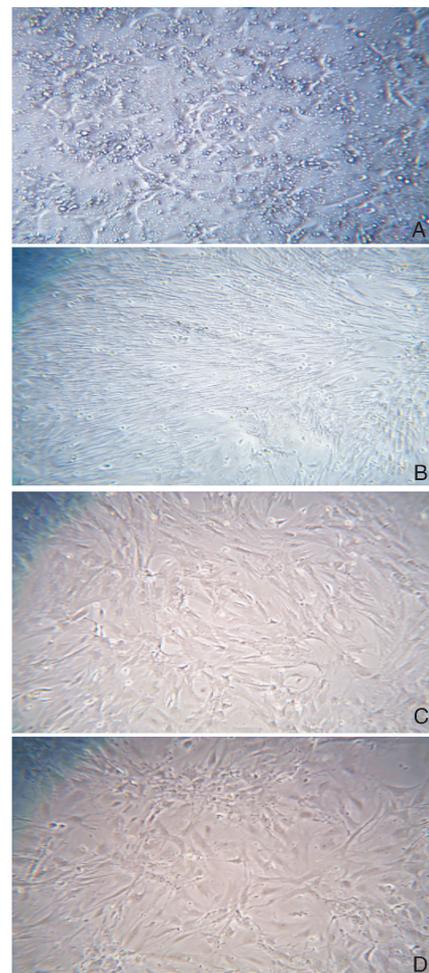


图 1. 骨髓间充质干细胞形态观察($\times 100$) A 为培养 48 h 原代,B 为培养第 10 天原代,C 为培养第 2 代,D 为培养第 3 代。

Figure 1. Morphological observation of bone marrow mesenchymal stem cells

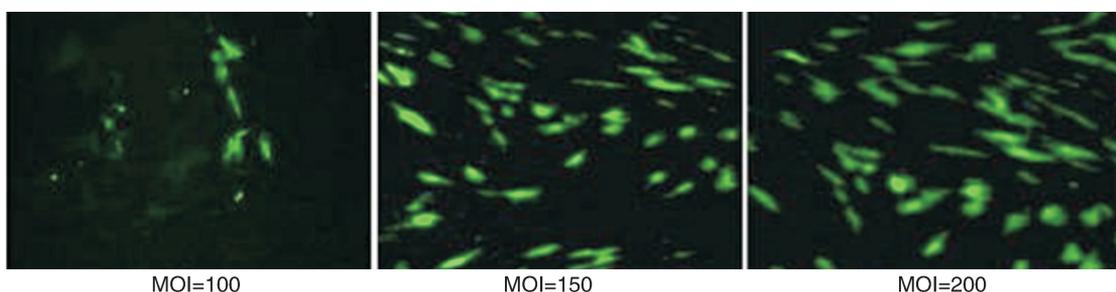


图 2. 重组慢病毒 Klotho 转染大鼠骨髓间充质干细胞的荧光结果($\times 100$)

Figure 2. Fluorescence results of recombinant lentiviral vector carrying Klotho transfected rat bone marrow mesenchymal stem cells

2.3 RT-PCR 检测转染后 BMSC 中 Klotho mRNA 的表达量

与未转染 BMSC 组和 EGFP-BMSC 组比较, EGFP-Klotho-BMSC 组中 BMSC 的 Klotho mRNA 相对表达量明显增加($P < 0.05$; 图 3)。

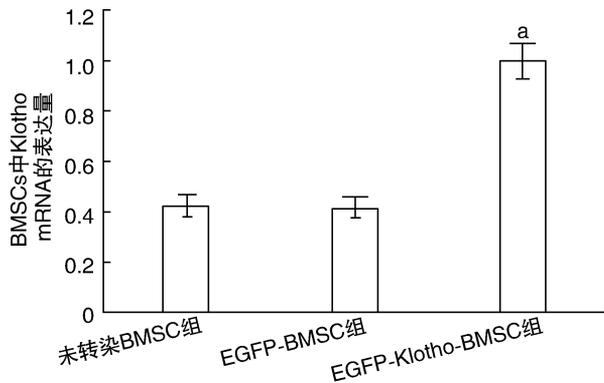


图 3. 各组 BMSC 中 Klotho mRNA 表达的比较 a 为 $P < 0.05$, 与其他两组比较。

Figure 3. Comparison of Klotho mRNA expression in BMSC of each group

2.4 各组大鼠心肌组织绿色荧光分布情况

Klotho 基因转染 BMSC 治疗 4 周后, 荧光显微镜下仍可见到 EGFP-Klotho-BMSC 组和 EGFP-BMSC 组 EGFP 标记的干细胞在心肌分布, 并且 EGFP-Klotho-BMSC 组干细胞数量明显多于 EGFP-BMSC 组, 而模型对照组和正常对照组未可见绿色荧光表达分布(图 4)。

2.5 各组大鼠心重指数(HW/BW)及心功能结果分析

模型对照组、EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组心重指数(HW/BW)明显高于正常对照组($P < 0.01$)。但 EGFP-Klotho-BMSC 组、EGFP-BMSC 组明显低于模型对照组($P < 0.01$), EGFP-Klotho-BMSC 组低于 EGFP-BMSC 组($P < 0.01$; 图 5)。

超声心动图结果显示: 与正常对照组比较, 模型对照组、EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组大鼠左室射血分数明显降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较, EGFP-BMSC 组和 EGFP-Klotho-BMSC 组大鼠左室射血分数明显升高($P < 0.01$), 与 EGFP-BMSC 组比较, EGFP-Klotho-BMSC 组 LEVF 明显升高($P < 0.05$; 图 6)。

2.6 Klotho 基因转染 BMSC 治疗 4 周后 Masson 染色结果

从图 7 可见, 正常对照组心肌组织纤维排列整齐, 仅可见少量的胶原纤维增生。模型对照组心肌纤维化明显, 大量心肌细胞坏死被胶原纤维替代,

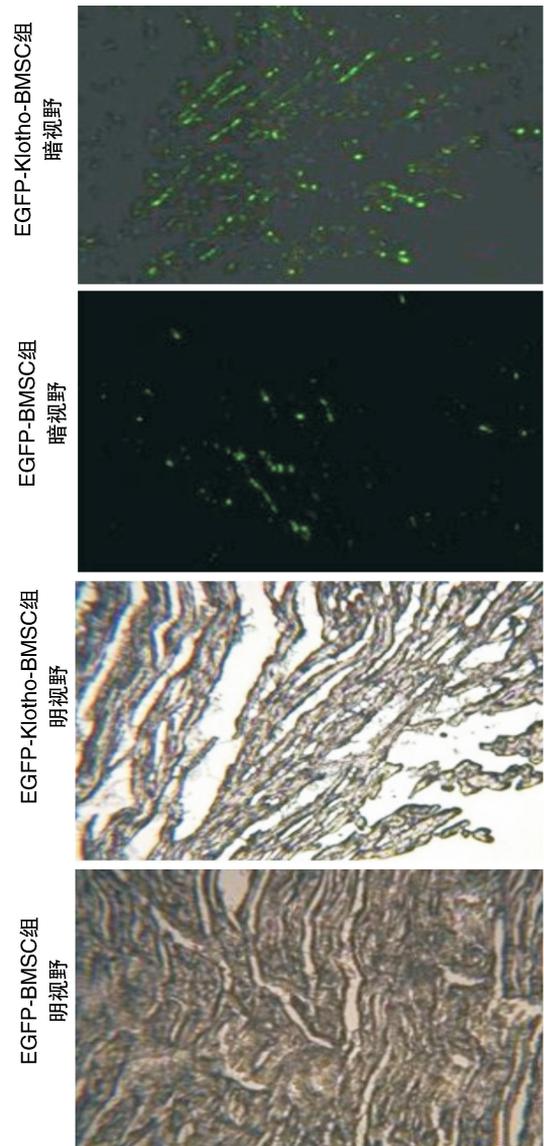


图 4. EGFP 标记的大鼠骨髓间充质干细胞在心衰大鼠心肌内的分布情况($\times 100$)

Figure 4. Distribution of EGFP-labeled rat bone marrow mesenchymal stem cells in myocardium of heart failure rats ($\times 100$)

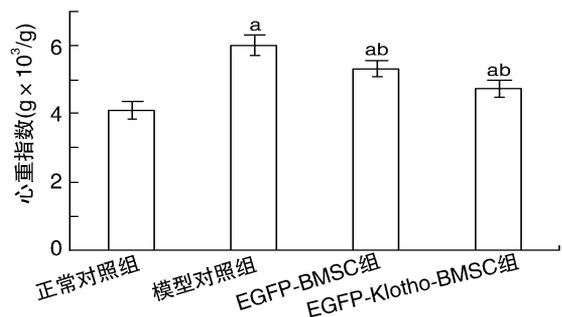


图 5. 各组大鼠心重指数(HW/BW)的比较 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型对照组比较。

Figure 5. Comparison of heart weight index (HW/BW) of rats in each group

残留的心肌细胞排列紊乱。EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组胶原纤维较正常对照组增加,但较模型对照组有明显的改善。

与模型对照组比较,正常对照组、EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组胶原容积比(CVF%)显著降低($P<0.01$)。与正常对照组比较,EGFP-BMSC 组和 EGFP-Klotho-BMSC 组胶原容积比明显升高($P<0.01$)。与 EGFP-BMSC 组比较,EGFP-Klotho-BMSC 组胶原容积降低更加明显($P<0.01$;图 8)。

2.7 Klotho 基因转染 BMSC 治疗 4 周后 HE 染色结果

模型对照组、EGFP-BMSC 组、EGFP-Klotho-BMSC 组大鼠心肌组织 HE 染色可见心肌细胞坏死,坏死区心肌纤维化伴炎性细胞浸润,心肌细胞间隙增大伴水肿,正常对照组大鼠心肌组织心肌纤维排列整齐,细胞形态正常,未见上述病理改变(图 9)。通过比较发现,EGFP-Klotho-BMSC 组大鼠心肌

纤维化程度、重构程度以及心肌细胞坏死程度均较模型对照组、EGFP-BMSC 组低。

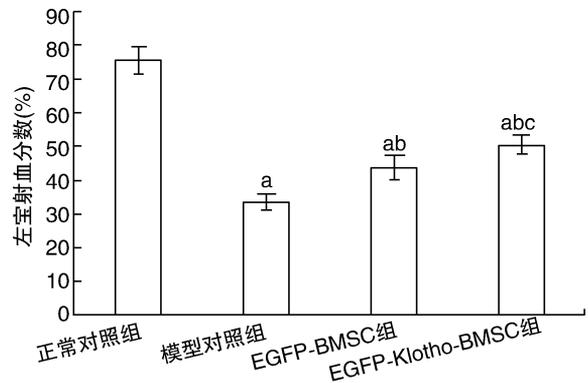


图 6. 各组大鼠左室射血分数的比较 a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.01$,与模型对照组比较;c 为 $P<0.05$,与 EGFP-BMSC 组比较。

Figure 6. Comparison of left ventricular ejection fraction in rats

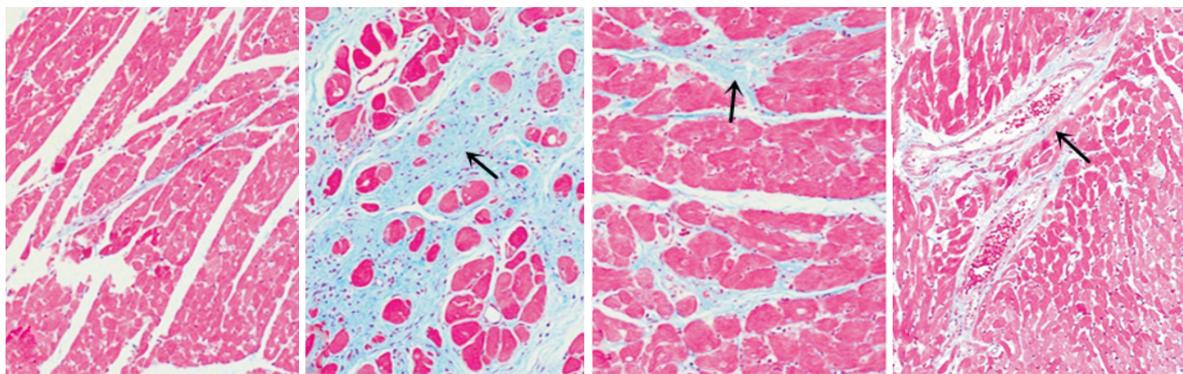


图 7. 各组大鼠心肌组织 Masson 染色($\times 200$) A 为正常对照组,B 为模型对照组,C 为 EGFP-BMSC 组,D 为 EGFP-Klotho-BMSC 组。箭头为心肌间质胶原纤维染色呈蓝色。

Figure 7. Masson staining of myocardial tissue in rats($\times 200$)

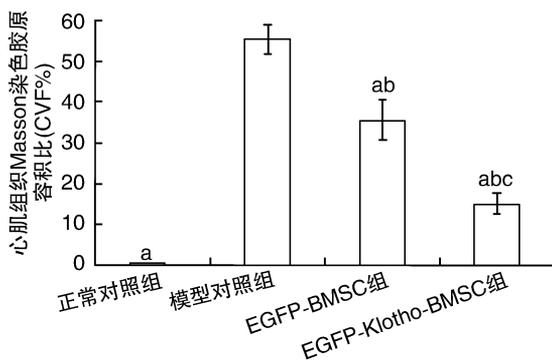


图 8. 各组心肌组织 Masson 染色胶原容积比的比较 a 为 $P<0.01$,与模型对照组比较;b 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;c 为 $P<0.01$,与 EGFP-BMSC 组比较。

Figure 8. Comparison of collagen volume ratio of Masson staining of myocardial tissue in each group

3 讨论

骨髓间充质干细胞(BMSC)是原始间充质干细胞在胚胎发育过程中迁移至骨髓腔而来,其具有自我更新及高度增殖能力,能自体移植,移植入宿主体内无免疫排斥反应^[9],无伦理道德问题,能向多种组织分化并且具有修复受损组织的潜能^[10-11]。王永等^[12]研究发现 BMSC 移植能改善犬急性心肌梗死后心肌纤维化,其心肌间质胶原含量随着时间呈减少趋势。徐燕等^[13]研究证明 BMSC 也能治疗扩张型心肌病大鼠,细胞移植 4 周后大鼠心功能明显改善,心肌胶原含量减少,心肌 MMP-2 及 MMP-9 的表达降低,心肌纤维化明显改善^[13]。本研究与上述实验结果类似,结果显示 BMSC 移植治疗慢性心力衰竭大鼠 4 周后,大鼠心重/体重指数减小,心功

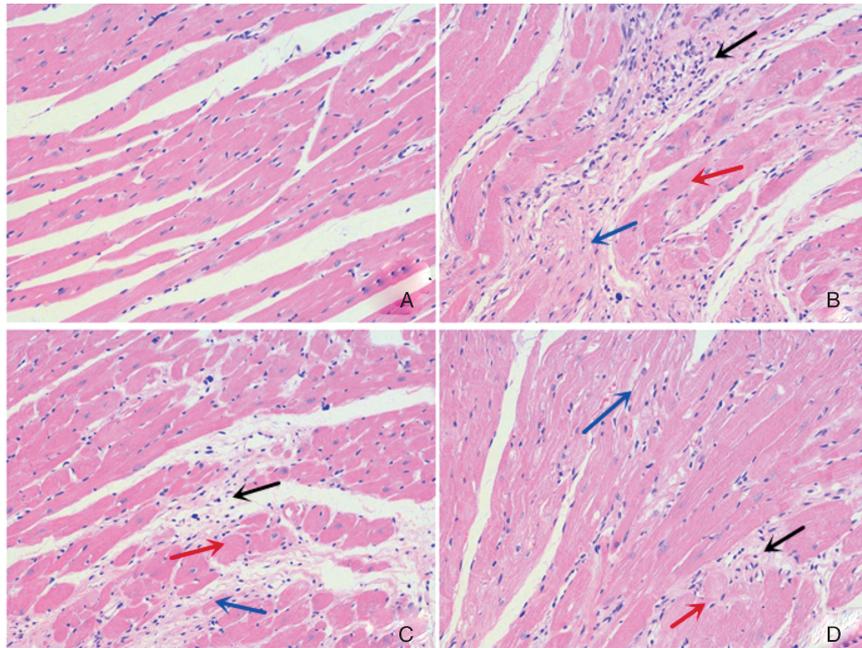


图9. 各组大鼠心肌组织 HE 染色($\times 200$) A 为正常对照组, B 为模型对照组, C 为 EGFP-BMSC 组, D 为 EGFP-Klotho-BMSC 组。黑色箭头为心肌局部组织坏死, 炎性细胞浸润; 红色箭头为细胞广泛水肿; 蓝色箭头为局部可见带状纤维化。

Figure 9. HE staining of myocardial tissue in rats($\times 200$)

能明显改善, 心肌细胞变性坏死程度及胶原纤维含量较模型对照组明显减少。提示骨髓间充质干细胞移植具有抗慢性心衰大鼠心肌纤维化的作用。然而, 尽管众多试验表明 BMSC 在治疗心肌纤维化及心肌重构方面具有不可超越的优势, 但移植的 BMSC 在缺血心肌中低存活率仍是其治疗心肌纤维化的难点^[14-15], 并限制了其临床应用。

Klotho 基因是 1997 年研究自发性高血压大鼠时偶然发现的新型抗衰老基因, 其具有抑制血管紧张素 II 诱导的活性氧簇的产生、抑制细胞衰老及凋亡、抗炎反应、维持内皮细胞完整性、促进 NO 的产生、改善动脉顺应性, 改善心肌重构及纤维化的作用^[16-18]。本实验将 Klotho 基因转染至 BMSC, 并成功移植到慢性心衰大鼠心肌中, 荧光显微镜下可见 EGFP-Klotho-BMSC 组较 EGFP-BMSC 组心肌组织中的干细胞存活率明显增加, 提示转染 Klotho 可显著提高干细胞移植存活率; HE 染色及 Masson 染色见 EGFP-Klotho-BMSC 组较模型对照组及 EGFP-BMSC 组大鼠心肌细胞变性坏死减少, 心肌间质炎性细胞及纤维瘢痕组织减少, 心肌胶原纤维沉积减轻。EGFP-Klotho-BMSC 组(干细胞转染 Klotho 基因组)较 EGFP-BMSC 组(单纯的干细胞治疗组)治疗慢性心衰大鼠, 其心肌纤维化改善更明显($P < 0.05$)。提示干细胞转染 Klotho 基因治疗慢性心衰大鼠可以起到进一步减轻心肌纤维化、改善显著重构

及心功能的作用。其可能机制是: ①通过转染 Klotho 基因, 使 BMSC 中 Klotho 表达增加, 内在的发挥 Klotho 基因抗细胞凋亡的作用, 从而提高了干细胞的存活率、增加了 BMSC 在心肌内的数量、进一步促进了干细胞的分化及旁分泌功能。②Klotho 本身具有抗心肌纤维化的作用, 与 BMSC 联合治疗进一步改善心肌纤维化。

本实验首次证实了 Klotho 联合 BMSC 能更有效地改善心肌纤维化, 改善心功能, 为 BMSC 移植有效治疗心肌纤维化的新策略提供了理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] Davide L, Ornella R, Paolo G, et al. From left ventricular hypertrophy to dysfunction and failure [J]. *Circulation J*, 2016, 80(3): 555-564.
- [2] 吴丹, 李丽, 吴丽玲. 脂肪因子对心肌纤维化作用的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2015, 46(6): 401-407.
- [3] 田倪妮, 魏玲, 李宏键, 等. 慢性心力衰竭患者心肌热休克蛋白 47 的表达及其与纤维化的相关性研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 6(23): 579-583.
- [4] Mazo M, Arana M, Pelacho B, et al. Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: a bench to bedside roadmap [J]. *Stem Cells International*, 2012, 2012(2): 21-32.
- [5] Takuya Narita, Ken Suzuki, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure

- [J]. *Heart Fail Rev*, 2015, 20(1): 53-68.
- [6] Kuro M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *Klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. *Nature*, 1997, 390 (6655): 45-51.
- [7] 贾政, 魏玲, 刘茜, 等. 重组腺病毒介导 *Klotho* 基因转导对大鼠心力衰竭心肌重构的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(3): 219-226.
- [8] Ikushima M, Rakugih I, Shikawa K, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of *klotho* on vascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(3): 827-832.
- [9] Yin W, Zhang P, Huang JH, et al. Stimulation of Kappa-opioid receptor reduces isoprenaline-induced cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 607 (1-3): 135-142.
- [10] 牛红星, 穆军升, 张建群, 等. 骨髓间充质干细胞向心肌分化的实验研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2013, 32 (3): 357-360.
- [11] Tang J, Xie Q, Pan G. et al. Paracrine mechanism in adult stem cell signaling and therapy [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1 204-219.
- [12] 王永, 范家伟, 方五旺. 犬自体骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后胶原纤维含量影响的实验研究[J]. *医学综述*, 2010, 16(23): 3 656-659.
- [13] 徐燕, 张瑶, 李丽丽. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠扩张型心肌病[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (14): 2 576-580.
- [14] Franchi F, Ezenekwe A, Wellkamp L, et al. Rein inhibition improves the survival of mesenchymal stromal cells in a mouse model of myocardial infarction [J]. *Cardiovasc*, 2014, 7(6): 560-569.
- [15] Fu WW, Huaiyu Z, Zhaoxia D, et al. Cytoprotective effect of melatonin against hypoxia/serum deprivation-induced cell death of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro [J]. *Eur J of Pharm*, 2015, 748: 157-165.
- [16] Semba RD, Cappola AR, Sun K, et al. Plasma *Klotho* and cardiovascular disease in adults [J]. *Am Geriatr Soc*, 2011, 59(9): 1 596-601.
- [17] Yang K, Nie L, Huang Y, et al. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cells dysfunction by *klotho* protein [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215 (2): 77-83.
- [18] Six I, Okazaki H, Gross P, et al. Direct acute effects of *Klotho* and *FGF23* on vascular smooth muscle and endothelium[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93 423.
- (此文编辑 朱雯霞)