

P53 抑制剂诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究

燕学波 吕安林 刘博武 黄炜 侯婧 李焱

【摘要】 目的 研究 P53 特异性抑制剂对骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的影响。**方法** 分离 SD 大鼠骨髓间充质干细胞,取第 4 代骨髓间充质干细胞分为对照组(CON)和 P53 特异性抑制剂(PFT- α)组。观察骨髓间充质干细胞诱导前后细胞形态变化,流式细胞仪鉴定骨髓间充质干细胞表面抗原及诱导后心肌样细胞分化率,免疫荧光法检测诱导后 cTnI、CX-43 表达,Western Blot 法测定诱导后 cTnI、P53、P21 蛋白表达情况。**结果** 原代培养的骨髓间充质干细胞 2 周形成集落,传代诱导后细胞体积变大,呈长梭形,排列趋一致。流式细胞仪测定骨髓间充质干细胞表面抗原 CD44 阳性表达率为(89.98 \pm 1.29)%,CD45 阳性表达率为(2.14 \pm 0.22)%。心肌样细胞鉴定结果显示:诱导后 1 周,空白对照组未见 cTnI 和 CX-43 免疫荧光表达,PFT- α 组少量表达 cTnI 和 CX-43;诱导后 4 周时,可见空白对照组少量表达 cTnI 和 CX-43,PFT- α 组强表达 cTnI 和 CX-43。Western Blot 检测诱导 1 周时 PFT- α 组 cTnI 表达与对照组比较,有统计学差异($P < 0.01$)。诱导后 4 周,PFT- α 组 cTnI 表达与对照组比较,有统计学差异($P < 0.01$)。两组 cTnI 表达量 4 周与 1 周比较有统计学差异($P < 0.05$)。诱导 1 周时,PFT- α 组几乎不表达 P53 蛋白,PFT- α 组与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。诱导 4 周时,PFT- α 组与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。PFT- α 组诱导 4 周时 P53、P21 表达量与 1 周时比较均有统计学差异($P < 0.05$)。心肌细胞分化率结果显示,诱导 4 周时,PFT- α 组与空白对照组比较有统计学差异($P < 0.01$)。**结论** 通过 P53 特异性抑制剂 PFT- α 阻断 P53-P21 蛋白通路,能诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化。

【关键词】 间充质干细胞; 心肌; 肿瘤抑制蛋白质 P53; 癌基因蛋白质 P21(ras)

Experimental study of differentiating bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells by P53 inhibitor YAN Xue-bo, LV An-lin, LIU Bo-wu, HUANG Wei, HOU Jing, LI Yao. Department of Cardiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: LV An-lin, Email: lvanlin@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective Recently p53 is shown to play an important role in the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). **Methods** BMMSCs were isolated from bone marrow of SD rats by density gradient centrifugation. The fourth passage cells were divided into two groups: control group and PFT- α group. The purified BMMSCs were identified by surface antigens and the differentiation rate of BMMSCs was examined by flow cytometry analysis. The expressions of cTnI and CX-43 in BMMSCs after inductions were detected by immunofluorescence microscopy and those of cTnI, p53 and p21 were detected by Western blot Assay. **Results** BMMSCs of primary culture form colonies at 2 w, passaged cells became larger, elongated spindle, arranged the same trend. At 4 w after induction, BMMSCs represented as closely packed elongated cells with uniform morphology. The results of flow cytometry showed CD44 expression of BMMSCs was (89.98 \pm 1.29)%, CD45 positive expression rate was (2.14 \pm 0.22)%. Immunofluorescence staining showed that at 1 w after induction, no expression of cTnI and CX-43 was observed in CON group, but a little expression of cTnI and CX-43 were observed in the PFT- α group. 4 w after induction, CON group only had little expression of cTnI and CX-43, while the PFT- α group demonstrated

strong expression of cTnI and CX-43. Western blotting analysis showed that at 1 w after induction, cTnI expression in the PFT- α group, but no cTnI expression was observed in CON group. At 4 w, only a little expression of cTnI was observed in CON group, but in the PFT- α group cTnI expression were significantly increased and much higher than CON group. cTnI expression in every group at 4 w was higher than that of at 1 w. Western blotting analysis showed that at 1 w the expression of p53 and p21 in CON group were stronger compare to PFT- α group ($P < 0.05$), but no expression was observed in PFT- α group. At 4 w, the expression of p53 and p21 in CON group were still strong ($P < 0.05$). The expression of p53 and p21 in PFT- α group and CON group at 4 w were much higher than that of at 1 w ($P < 0.05$). Flow cytometry determined the differentiation rate of cardiomyocyte-like cells and the results showed that differentiation rate of PFT- α group was significant higher than CON group ($P < 0.01$). **Conclusions** These data open up new possibility of modulating p53-p21 pathway for directed differentiation of BMMSCs into cardiomyocytes, which will be valuable for cardiovascular regenerative medicine.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Myocardium; Tumor suppressor protein p53; Oncogene protein p21(ras)

心血管疾病已成为危害人类健康的主要疾患之一,尽管心血管药物治疗学及心脏介入技术不断提高,但是心血管疾病的死亡率仍居高不下^[1]。近年来干细胞移植为此带来了新的曙光^[2]。其中研究最多的是成体干细胞中的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)。大量研究表明^[3], BMMSCs 不仅可以分化为造血基质细胞,还可以向多种造血以外的组织迁移、定位并分化成相应的组织细胞,表现出多向分化的潜能,在不同的诱导条件下可以向骨、软骨、脂肪、心肌、内皮和神经等细胞分化。5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)是 BMMSCs 分化为心肌样细胞的有效化学试剂,多项动物实验研究显示,体外分离培养鼠 BMMSCs,经 5-aza 诱导后可分化为心肌样细胞^[4-5]。P53 基因是一种抑癌基因,编码的 P53 蛋白能诱导下游 P21 蛋白,P53-P21 蛋白通路不仅具有抑制细胞癌变、阻止肿瘤生长的作用,同时能抑制干细胞的分化和增殖^[6]。最新研究表明,P53 在 BMMSCs 的增殖、分化方面扮演重要角色^[7],通过阻断 P53-P21 蛋白通路,能显著提高干细胞的分化率^[6]。而 5-aza 主要通过激活 P53-P21 蛋白通路抑制细胞增殖,导致细胞凋亡^[8-9]。本实验通过 P53 特异性抑制剂(p-fifty three inhibitor- α , PFT- α)阻断 P53-P21 蛋白通路,观察其对大鼠 BMMSCs 向心肌样细胞分化的影响,进一步探索 BMMSCs 向心肌样细胞分化的机制和提高诱导效率的方法。

材料和方法

一、材料

4 周龄健康雄性 SD 大鼠,体质量(120 ± 20)g,SPF 级,由解放军第四军医大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(军)2008-012,实验过程中对动物的处置符合伦理学标准。

二、主要试剂和仪器

P53 特异性抑制剂(Cayman, USA), L-DMEM 培养基(Hyclone, USA),胎牛血清(Thermo, USA), Ficoll 淋巴细胞分离液(1.077 g/ml, TBD, CAN), CD44-FITC/CD45-PE 抗体(Biolegend, USA), Connexin-43, Troponin I 抗体(SANTA, USA), P53、P21 抗体(Thermo, USA), 倒置相差显微镜, 荧光显微镜(OLYMPUS, JPN), 流式细胞仪(BD, USA)。

三、实验方法

(一) BMMSCs 体外分离、培养和传代

采用颈椎脱臼法处死大鼠,取其下肢长骨,75%乙醇浸泡 5 min。无菌条件下分离胫骨和股骨,剪除骨骺端,显露骨髓腔,用 L-DMEM 不完全培养液彻底冲洗骨髓腔,充分混匀,制成单细胞悬液。将细胞悬液缓慢加入预置有 1.077 g/ml 的淋巴细胞分离液的离心管中,骨髓单细胞悬液与分离液的比例为 4:6, 2000 r/min(离心半径为 15 cm,下同)离心 20 min。吸取中间云雾状单核细胞层,加入 L-DMEM 不完全培养液,充分混匀后,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,加入完全培养液(L-DMEM, 体积分数为 10% 胎牛血清, 100 U/mL

青霉素,100 mg/L 链霉素,300 mg/L 谷氨酰胺,10 mmol/L HEPES),充分混匀后,调整细胞浓度为 1×10^9 /L,接种于25 cm²塑料培养瓶,置于5% CO₂、37 °C饱和湿度孵箱中培养。4 d后首次换液,除去不贴壁的悬浮细胞,以后每3 d换液1次。待细胞长到80%融合时,用2.5 g/L胰蛋白酶进行消化,按1:2的比例进行传代。体外培养至第4代备用。

(二) BMSCs 细胞形态学变化

每日在倒置显微镜下观察诱导前和诱导后细胞生长情况和形态学变化。

(三) BMSCs 细胞鉴定

取第4代 BMSCs 细胞用 PBS 清洗2遍,常温下加入2.5 g/L的胰蛋白酶1~2 ml,倒置显微镜下观察,待细胞间隙增大,细胞回缩变圆时,即弃去胰蛋白酶,加适量 L-DMEM 完全培养液终止消化,用 PBS 洗涤2次,剩余50 μl 配成浓度为 1×10^9 /L的细胞悬液。分别加入鼠抗 CD44-FITC 抗体和 CD45-PE 抗体,阴性对照加入鼠抗 IgG-FITC,4 °C,避光30 min。再次用 PBS 洗涤2次,弃上清液,对照组加400 μl 的 PBS 混匀细胞(呈单细胞悬液),测定组加300 μl 的 PBS 混匀细胞(呈单细胞悬液)。采用流式细胞仪检测细胞表面标志抗原。

(四) 实验分组及处理

取第4代 BMSCs 细胞,2.5 g/L的胰蛋白酶消化后分别接种于6孔板(WB 检测用)、24孔板中(IHC 检测用),放置于37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。次日将细胞分为两组:(1)正常对照组(CON):常规培养液培养;(2)PFT-α 组:PFT-α 在临用前溶解于 DMSO,以20 μmol/L 终浓度加入培养液,24 h后去除培养液,更换不含 PFT-α 的常规培养液继续培养;分组处理后,每4~5 d更换常规培养液。在诱导后1周、4周分别进行 IHC 及 WB 相关检测。

(五) 心肌样细胞的鉴定

1. 免疫荧光法检测各组不同时间点心肌特异性蛋白的表达:在 BMSCs 诱导1周、4周时分别测定 Troponin I 和 Connexin-43 心肌特异性蛋白的表达。吸出培养液,PBS 洗涤2次,室温下使用4%多聚甲醛固定20 min,PBS 洗涤2次,每孔加入500 μl 穿透液(0.5% Triton X-100,0.01 mol/L PBS 配制)30 min,吸去穿透液,加入正常山羊血清封闭液,140 μl/孔,轻摇,封闭30~60 min。吸干封闭血清,分组加入一抗,每组4孔,140 μl/孔,于37 °C摇床中孵育1 h(转速60 r/min)。PBS 洗涤3次,每次5~10 min。将二抗分别加到相应的孔中,140 μl/孔。37 °C、60 r/min 摇床孵育1 h(放于保湿盒内),避光吸出二抗,PBS 洗涤3次,每次轻摇10 min。吸去 PBS,加入 Hoechst 33342 染液(0.5 μg/ml),140 μl/孔,室温避光孵育30 min。吸去染液,加入 PBS 洗涤1次,10 min;最后添加 PBS,荧光显微镜观察各蛋白表达情况。

2. Western Blot 法检测各组不同时间点 Troponin I 的表达量:将待提取蛋白的细胞吸去培养基,置于冰上,加入适量预冷的 PBS 洗涤2次,吸去 PBS,加入80 μl RIPA 裂解液,冰上裂解5 min,用细胞刮刮下细胞,转移 EP 管中,12 000 r/min 离心5 min,将上清转移到新的 EP 管中。依据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的方法测定蛋白浓度,然后根据测得的蛋白浓度量调整各组上样量至相同水平,加入5 × SDS-PAGE Loading Buffer,混匀后,95 °C水浴5 min。SDS-PAGE 电泳:按照12%分离胶和5%的浓缩胶配置 SDS-PAGE,调整上样总蛋白量为30 μg,浓缩胶中80 V 电泳,分离胶中120 V 电泳。蛋白质的电转移以及膜的封闭:300 mA,湿法转膜1.5 h,取出膜,置于5%脱脂牛奶封闭液中,4 °C封闭过夜。抗原抗体反应:将稀释一抗加入到5%脱脂牛奶封闭液中,将封闭后的 PVDF 膜放入封闭袋中,加入4 ml 一抗,室温震荡孵育2 h,弃去一抗,用1 × TBS/T 洗膜4次,每次8 min,除去过量的一抗,将膜转移至另一新的封闭袋中,加入4 ml 稀释的二抗,室温振荡孵育1 h。用1 × TBS/T 洗膜4次,每次8 min,除去未结合的二抗。ECL 显色:将 A 液和 B 液以1:1(V/V)混合,室温反应1~2 min,将混合液滴加于 PVDF 膜表面,孵育1~2 min,用幻灯胶片将膜夹好,压上 X 线片后,于暗盒中曝光1 min 或更长时间,将 X 线片放入显影液中显影2~3 min,自来水中冲洗,再置于定影液中1~2 min。流水冲洗晾干,将胶片进行扫描。

(六) 心肌样细胞分化率测定

两组诱导4周时的细胞用 PBS 洗涤2次,常温下加入2.5 g/L的胰蛋白酶1~2 ml 消化,1000 r/min 离

心 5 min, 0.1% Triton X-100 孵育 10 min, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次。加一抗肌钙蛋白 I (cTnI) 抗体, 室温 1 h, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次。加入 FITC 标记的二抗工作液, 室温避光 40 min, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 1 遍。PBS 调整细胞悬液密度约 $1 \times 10^9/L$, 4% 多聚甲醛固定 20 min。上样于流式细胞仪上, 用波长 488 nm 的光波激发被标记细胞, 测定 cTnI 阳性标记的心肌样细胞占细胞总数的百分比。

(七) P53、P21 蛋白表达的测定: Western Blot 法检测各组不同时间点 P53/P21 蛋白的表达量
实验方法和过程同 Western Blot 法检测 Troponin I, 一抗为鼠抗 P53、P21 抗体。

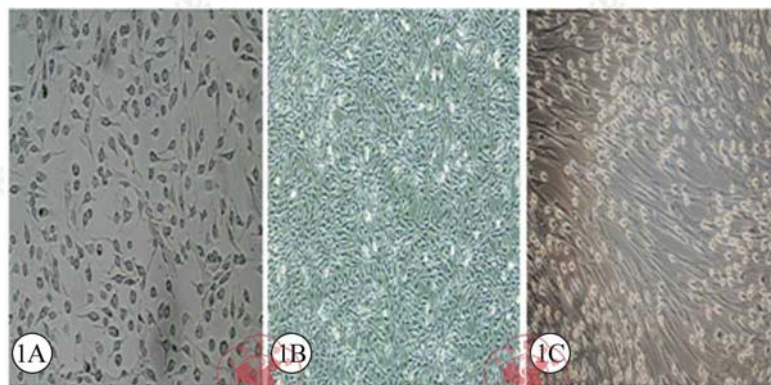
四、统计学处理

各组数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。GraphPad Prism 5 统计分析软件对各组数据进行 *t* 检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、BMMSCs 培养传代及诱导后细胞形态学变化

原代 BMMSCs 呈圆形, 折光性强。3 d 后大部分细胞贴壁, 体积较小, 形态多样, 多为椭圆形、短梭形, 也有三角形或星形细胞, 且伸出长短不一、粗细不等的胞质突起互相连接(图 1A)。5~7 d 后, 贴壁细胞迅速分裂增殖, 数量明显增多, 体积变大, 以长梭形为主, 呈放射状向四周扩展, 形成大小不一的细胞集落。传代后细胞体积较原代细胞大, 呈长梭形, 混杂少量的三角形或多角形细胞(图 1B)。诱导 4 周后, BMMSCs 紧密排列呈长梭形, 细胞形态均一, 趋向一致(图 1C)。



1A: 第3天原代BMMSCs ($\times 100$); 1B: 传代3代 BMMSCs ($\times 100$); 1C: 诱导4周后的BMMSCs ($\times 200$)

图1 BMMSCs在培养、传代、诱导过程中的形态学变化

二、BMMSCs 表面抗原鉴定结果

对传至第4代的 BMMSCs 进行鉴定, 采用流式细胞仪测定 BMMSCs 表面抗原 CD44 和 CD45, 结果显示: BMMSCs CD44 阳性表达率为 $(89.98 \pm 1.29)\%$, CD45 阳性表达率为 $(2.14 \pm 0.22)\%$ 。此结果提示: 采用联合法分离大鼠 BMMSCs, 经过传代培养扩增, 可以得到纯化的 BMMSCs。

三、不同处理组心肌样细胞的鉴定

1. 不同处理组 BMMSCs 诱导后 1 周、4 周 cTnI 和连接蛋白 43 (CX-43) 免疫荧光表达(图 2A, 2B): 诱导后 1 周, 空白对照组未见 cTnI 和 CX-43 免疫荧光表达, 实验组可见少量表达, 随着诱导后时间延长, 空白对照组逐渐可见微弱荧光表达, 而实验组 cTnI 和 CX-43 免疫荧光表达逐渐增强, 诱导后 4 周时, 可见空白对照组少量表达 cTnI 和 CX-43, 实验组强表达 cTnI 和 CX-43。

2. BMMSCs 诱导后 1 周、4 周 cTnI 定量表达: Western Blot 检测诱导后 1 周 cTnI 表达, 空白对照组未见表达 cTnI, 实验组有少量表达(图 3A), 与对照组比较, 有统计学差异 ($P < 0.01$)(图 3B)。诱导后 4 周检测 cTnI 表达, 空白对照组可见少量 cTnI 表达, 实验组有强表达(图 3A), 与对照组比较, 有统计学差异 ($P < 0.01$)(图 3B)。两组 cTnI 表达量 4 周与 1 周比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)(图 3B)。

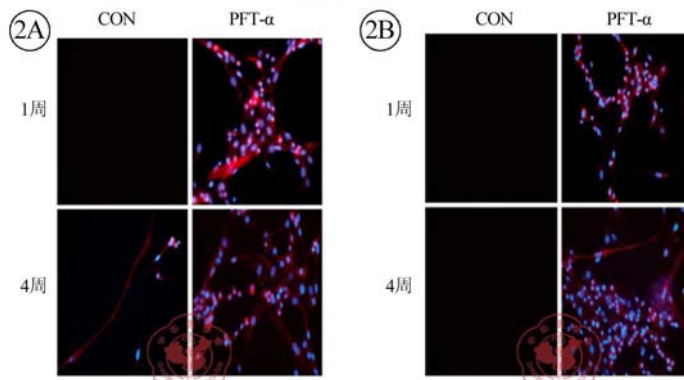
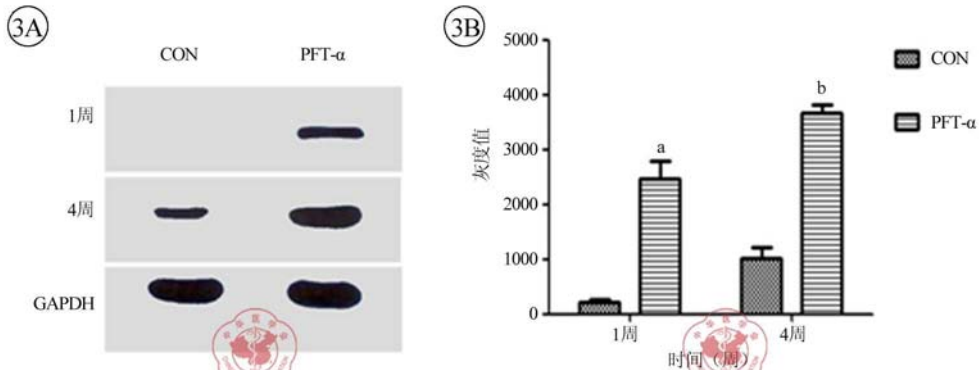


图2 诱导后BMMSCs表达cTnI (2A) 和CX-43 (2B) 的免疫荧光图片 (×400)



3A: BMMSCs诱导后cTnI表达。3B: Western Blot灰度值比较: 在诱导后1周时, 与CON组比较, *P<0.01; 诱导后4周时, 与CON组比较, *P<0.01; 组内第4周与第1周比较, P<0.05

图3 Western Blot法检测BMMSCs诱导后cTnI的表达

四、不同处理组心肌样细胞分化率测定

诱导4周后,流式细胞仪测定 BMMSCs 向心肌样细胞的分化率,PFT-α 组与空白对照组比较有统计学差异($P < 0.01$)(图4)。

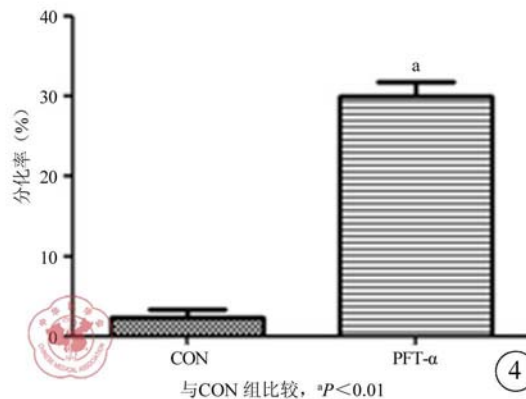
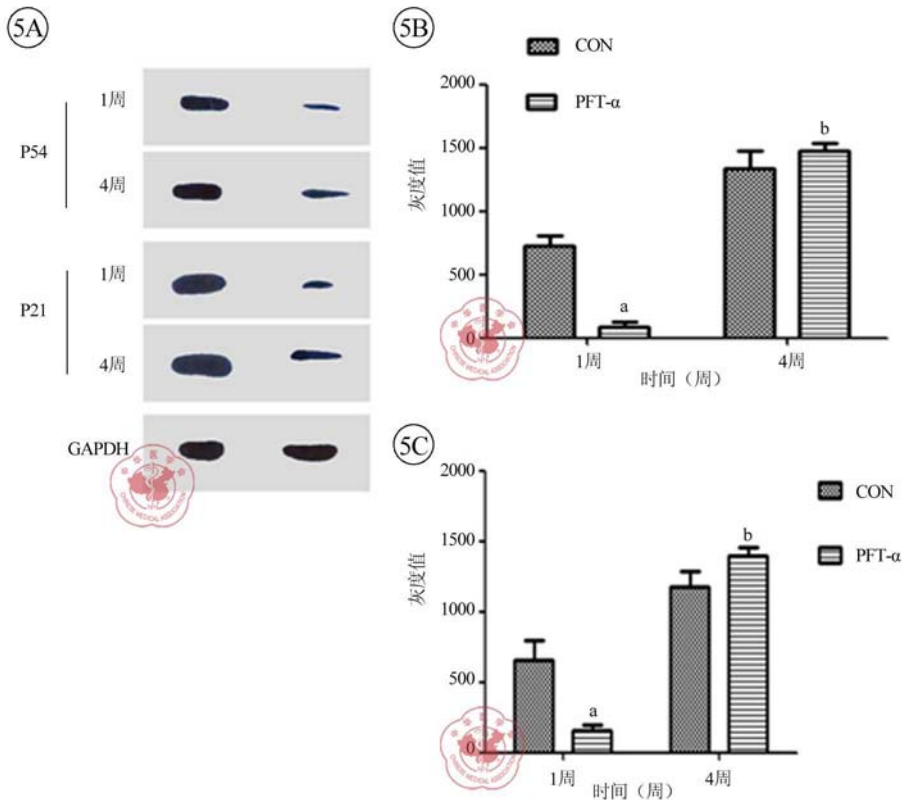


图4 BMMSCs诱导后4周时两组心肌样细胞分化率

五、不同处理组 P53、P21 蛋白表达

诱导1周时,PFT-α 组几乎不表达 P53、P21(图5A),与空白组比较有统计学差异($P < 0.05$)(图5B)。诱导4周时,两组表达较1周时有所增强(图5A),PFT-α 组与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)(图5C)。PFT-α 组诱导4周时 P53、P21 表达量与1周时比较有统计学差异($P < 0.05$)(图5B,5C)。



5A: 诱导后BMMSCs表达P53和 P21。5B: 诱导后BMMSCs表达P53灰度值定量比较分析:在诱导后1周时,与CON组比较, $^*P<0.01$; 在第4周时,与CON组比较, $^bP<0.01$; 组内第4周与第1周比较, $P<0.01$ 。5C: 诱导后BMMSCs表达P21灰度值定量比较分析:在诱导后1周时,与CON组比较, $^*P<0.01$; 在第4周时,与CON组比较, $^bP<0.05$; 组内第4周与第1周比较, $P<0.01$

图5 Western Blot法检测BMMSCs诱导后 P53和 P21表达

讨 论

心血管疾病特别是心肌梗死的发生率逐年升高。虽然有研究表明^[10],心肌细胞会缓慢地更新,但是其更新率也在缓慢地不断下降。因此心肌梗死后,坏死心肌的修复成为患者治疗成功的关键。心脏移植供体来源困难,手术技能要求高,费用昂贵,难以在临床推广。自体心肌细胞移植替代治疗用于心肌重建,因存在自体心肌细胞培养棘手,获得的心肌细胞数量有限,移植后存活率低等问题而只能取得有限的成果。近年来大量的动物实验及临床研究已经证明了 BMMSCs 移植治疗心脏疾病特别是缺血性心脏病的显著疗效^[2,11-17]。

P53 特异性抑制剂 PFT- α 最早用于研究抗肿瘤药物毒副作用^[18],Schneider 等^[19]在研究 5-aza 诱导大肠癌细胞系 HCT-116 凋亡机制中 P53 的作用时,观察了 PFT- α 对 HCT-116 的细胞毒性,当 PFT- α 浓度 $\leq 30 \mu\text{mol/L}$ 时,并不抑制 HCT-116 的生长,而当浓度 $> 30 \mu\text{mol/L}$ 时则对 HCT-116 的生长产生抑制,具有一定的细胞毒副作用。本课题组应用不同浓度 PFT- α 作用于 BMMSCs 细胞,观察其对细胞增殖的影响,发现当 PFT- $\alpha \leq 20 \mu\text{mol/L}$ 时,对于 BMMSCs 细胞的生长没有任何抑制,甚至促进细胞增殖,而当浓度达到 $40 \mu\text{mol/L}$ 时则对 BMMSCs 细胞增殖产生抑制,这种抑制效应在浓度达 $80 \mu\text{mol/L}$ 时更为显著,抑制效应呈浓度依赖性增强。因此,我们认为 PFT- α 浓度在 $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ 时对 BMMSCs 细胞的增殖无抑制,相反,能促进细胞增殖。同时,本课题组还观察了 PFT- α 对 BMMSCs 细胞凋亡的影响,结果显示,经 PFT- α 作用 24 h 后,5-aza 诱导的 BMMSCs 的凋亡率显著减少,而 BMMSCs 细胞 P53、P21 蛋白表达量显著下降。因此认为,PFT- α 是通过阻断 P53,从而抑制下游 P21 基因激活起作用的。

P53 基因位于人类染色体 17p13.1,基因全长 16~20 kb,由 11 个外显子和 10 个内含子组成,其启动子不含 CAAT 盒、TATA 盒和 GC 盒等常见启动序列。转录产生 2.5 kb mRNA,翻译生成的蛋白质由 393 个氨

基酸残基组成,分子量为 53 kD,所以称为 P53 基因。P53 属于抑癌基因,可参与细胞周期的调控,在 DNA 修复、细胞凋亡、抑制肿瘤增殖过程中起重要作用^[20]。其编码的 P53 蛋白在细胞损伤的情况下可诱导激活下游 P21 蛋白,触发 DNA 修复和细胞凋亡。最新研究表明,P53-P21 蛋白通路不仅具有抑制细胞癌变、阻止肿瘤生长的作用,同时能抑制干细胞的分化和增殖。通过阻断 P53-P21 蛋白通路,能显著提高多能干细胞的分化率^[6]。而 5-aza 主要通过激活 P53-P21 蛋白通路,抑制细胞增殖,导致细胞凋亡。PFT- α 能够特异性、可逆性地抑制 P53 活性,从而减少细胞的凋亡,提高细胞的生存率,同时又不会导致肿瘤的发生^[19,21]。本实验结果显示,阻断 P53-P21 蛋白通路能有效诱导 BMMSCs 分化为心肌样细胞,其诱导分化效率显著高于传统 5-aza 组,但其调控分化具体机制有待进一步研究。

大量研究表明^[4,22],5-aza 是诱导 BMMSCs 分化为心肌细胞的有效化学制剂。本实验通过 P53 特异性抑制剂 PFT- α 阻断 P53-P21 蛋白通路,能有效诱导 BMMSCs 分化为心肌样细胞。为进一步研究 BMMSCs 向心肌样细胞分化提供了新的基础。

参 考 文 献

- [1] Dalziel SR, Parag V, Rodgers A, et al. Cardiovascular risk factors at age 30 following pre-term birth. *Int J Epidemiol*, 2007, 36:907-915.
- [2] Cao F, Sun DD, Li CX, et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J*, 2009, 30:1986-1994.
- [3] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282:148-152.
- [4] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995, 18:1417-1426.
- [5] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103:697-705.
- [6] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 2009, 460:1132-1136.
- [7] Armesilla DA, Elvira G, Silva A. p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2009, 315:3598-3610.
- [8] Pulukuri SM, Rao JS. Activation of p53/p21/Waf1/Cip1 pathway by 5-aza-2'-deoxycytidine inhibits cell proliferation, induces pro-apoptotic genes and mitogen-activated protein kinases in human prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2005, 26:863-871.
- [9] Zhu WG, Hileman T, Ke Y, et al. 5-Aza-2, -deoxycytidine Activates the p53/p21/Waf1/Cip1 Pathway to Inhibit Cell Proliferation. *J Biol Chem*, 2004, 279:15161-15166.
- [10] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009, 324:98-102.
- [11] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42:295-303.
- [12] Wang JS, Shunr Tim D, Galipeall J, et al. Marrow Stromal cells for cellular Cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120:999-1005.
- [13] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, 106:1913-1918.
- [14] Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 2006, 367:113-121.
- [15] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004, 364:141-148.
- [16] 丁刚, 丁晓玲, 刘怡. 骨髓间充质干细胞在临床医学中的应用[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2008, 2:1195-1201.
- [17] Wang J, Xie X, He H, et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous mesenchymal stem cells transplantation for dilated cardiomyopathy. *Chin J Cardiol*, 2006, 34:107-111.
- [18] Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)*, 2000, 65:41-48.
- [19] Schneider SR, Diab AM, Rohrbeck A, et al. 5-aza-Cytidine is a potent inhibitor of DNA Methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45-and p53-Dependent Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312:525-536.
- [20] Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and P53: catch-22. *Trends in Genetics*, 2005, 21:182-187.

- [21] Liu X, Chua CC, Gao J, et al. Pifithrin- α protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286:933-939.
- [22] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103:697-705.

(收稿日期:2011-03-23)

(本文编辑:张岚)

燕学波,吕安林,刘博武,等. P53 抑制剂诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5(10):2878-2885.