

论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0874-06

旁分泌机制在脂肪间充质干细胞移植治疗心肌梗死中的作用

杨德忠¹, 王伟¹, 王微¹, 彭玉兰¹, 黄海韵², 王元元³, 郭燕丽², 王红勇¹, 曾春雨¹ (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所: 心血管内科¹, 整形美容科³; 400038 重庆, 第三军医大学西南医院超声科²)

[摘要] 目的 探讨旁分泌机制在脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSC)移植治疗心肌梗死中的作用。方法 原代分离和培养人ADSC, 将经鉴定的第3~5代的ADSC用于实验。①用8~10周龄(20~24 g)的雄性C57B/L小鼠, 结扎左前降支建立心肌梗死(myocardial infarction, MI)损伤模型, 实验分假手术组, MI+DMEM/F12组和MI+ADSC-CM(conditioned medium, 条件培养液)组($n=12$)。在MI处理的小鼠心肌梗死边缘区分别注射DMEM/F12和ADSC-CM, 观察动物生存率、TTC染色测量心肌梗死面积、超声评价心功能变化、TUNEL染色检测心肌细胞凋亡等方法评价心肌梗死的治疗效果。②用H₂O₂建立乳鼠心肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVM)体外损伤模型, 观察ADSC-CM对心肌细胞的保护作用。实验分对照组, H₂O₂+DMEM/F12组和H₂O₂+ADSC-CM组($n=5$)。分别用caspase-3蛋白定量和TUNEL染色检测心肌细胞凋亡。结果 ①相较于DMEM/F12, ADSC-CM显著减少心肌梗死面积[(35.3±0.5%) vs (41.7±1.9%) $P<0.05$], 提高心功能[EF: (60.4±4.8)% vs (47.2±3.7)%, $P<0.05$], 减少梗死边缘区心肌细胞凋亡[TUNEL+心肌细胞/10⁶细胞核: (677.4±64.2) vs (867.3±67.9), $P<0.05$]; ②相对于DMEM/F12, ADSC-CM明显减少H₂O₂诱导的心肌细胞凋亡[caspase-3蛋白表达下降; TUNEL阳性率: (58.84±2.19)% vs (71.65±0.86)%, $P<0.05$]。结论 ADSC-CM通过减少心肌细胞凋亡发挥对心肌梗死的治疗作用; 旁分泌作用是ADSC移植治疗心肌梗死的重要机制。

[关键词] 脂肪间充质干细胞; 旁分泌; 心肌梗死; 心功能

[中图分类号] R329.2; R542.22; R617

[文献标志码] A

Role of paracrine mechanism in treatment of myocardial infarction by adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation in mice

Yang Dezhong¹, Wang Wei¹, Wang Wei¹, Peng Yulan¹, Huang Haiyun², Wang Yuanyuan³, Guo Yanli², Wang Hongyong¹, Zeng Chunyu¹ (¹Department of Cardiology, ³Department of Plastic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; ²Department of Ultrasonography, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the role of paracrine mechanism in adipose-derived stem cells (ADSC) transplantation-mediated treatment for myocardial infarction (MI). **Methods** Primarily cultured human ADSC (passage 3 to 5) were characterized and used in the experiments. A total of 36 male C57B/L mice, at an age of 8 to 10 weeks, with a weight 20 to 24 g were randomly and equally divided into sham operation group, MI+DMEM/F12 and MI+ADSC conditioned medium (ADSC-CM) groups. Mouse model of MI were subjected to MI injury by left descending artery ligation. DMEM/F12 and ADSC-CM were intra-myocardially injected into the infarct border zone after MI injury. To determine the therapeutic effect, the animal survival rate was observed, myocardial infarct size was measured by TTC staining, cardiac function was evaluated by echocardiography, and cardiomyocyte apoptosis was determined by TUNEL staining. An *in vitro* cell injury model was established by using neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs) with H₂O₂ treatment, and the cardioprotective effect of ADSC-CM was examined. **Results** Compared with DMEM/F12, ADSC-CM significantly reduced the infarct size [(35.3±0.5)% vs (41.7±1.9)%, $P<0.05$], improved cardiac function [ejection fraction: (60.4±4.8)% vs (47.2±3.7)%, $P<0.05$], and decreased cardiomyocyte apoptosis in

[基金项目] 国家自然科学基金(81100111, 31130029); 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC2011jjB10020); 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjz0118)

[通信作者] 曾春雨, E-mail: chunyu@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1420.012.html>(2013-03-05)

infarct border zone (TUNEL positive cardiomyocytes/ 10^6 nuclei: 677.4 ± 64.2 vs 867.3 ± 67.9 , $P < 0.05$). Compared with DMEM/F12, ADSC-CM significantly reduced NRVM apoptosis subjected to H_2O_2 injury [reduced expression of caspase-3 protein; TUNEL positive rate: (58.84 ± 2.19)% vs (71.65 ± 0.86)%, $P < 0.05$]. **Conclusion** ADSC-CM exerts therapeutic effect on MI through reducing cardiomyocyte apoptosis. Paracrine effect is an important mechanism for ADSC transplantation-mediated treatment for MI.

[**Key words**] adipose-derived mesenchymal stem cells; paracrine effect; myocardial infarction; cardiac function

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81100111, 31130029), the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjB10020) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjz0118). Corresponding author: Zeng Chunyu, E-mail: chunyu.zeng01@163.com

心血管疾病是目前人类死亡的主要原因之一,目前我国人群心血管病的患病率处于持续上升阶段^[1]。而心肌仅有有限的自我再生能力,目前的临床治疗方法只能延缓心力衰竭的发展。近年来的研究表明,干细胞移植已成为治疗心肌梗死的新策略^[2]。既往的研究提示间充质干细胞可以在体外诱导环境下、在体移植后分化为心肌细胞和血管细胞,但是近年来的进一步认识对该观点提出了挑战^[3]。不少研究认为间充质干细胞不能分化为心肌细胞和血管细胞,其治疗功能完全是旁分泌作用^[4-5]。脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSC)因易大量获取、较强增殖能力和多向分化潜能,加之免疫原性低的优势,被认为是治疗心脏病的理想干细胞来源^[6]。ADSC对心肌梗死的治疗作用明显优于骨髓来源的干细胞^[5]。而ADSC发挥治疗作用的机制仍然尚未明了。直接分化和旁分泌机制在ADSC治疗心肌梗死中的作用评估也尚少见报道。我们既往的研究发现ADSC条件培养液(ADSC-conditioned medium, ADSC-CM)具有抗超氧应激诱导的心肌细胞凋亡作用^[7]。最近的研究发现ADSC-CM促进内皮细胞的存活和迁移而影响血管新生^[8]。但这些研究均局限于细胞实验,ADSC-CM能否在动物心脏组织中促进心肌细胞存活和血管新生尚不清楚。因此,在本研究中,我们在小鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)手术后心肌内注射DMEM/F12(对照)和ADSC-CM,观察ADSC-CM对心肌梗死的影响,评估旁分泌机制在ADSC细胞治疗中的作用,并探讨ADSC-CM对在体心肌细胞存活的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 组织取材 取外科手术中的皮下脂肪5~10g,胶原酶消化法获取脂肪干细胞。

1.1.2 实验动物 SPF级雄性C57小鼠,8~12周龄(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),分为

3组:假手术组,MI+DMEM/F12组、MI+ADSC-CM($n=12$)。

1.1.3 药物及主要试剂与试剂 TTC(Sigma公司),DMEM/F12培养基(Hyclone公司),胎牛血清(Gibco公司),胰蛋白酶(Biosharp公司),I型胶原酶(Worthington公司),伊文思蓝(Sigma公司),异氟烷(山东科源制药有限公司),TUNEL凋亡检测试剂盒(罗氏公司),兔抗caspase-3多克隆抗体(Santa Cruz公司),兔抗 α -actin多克隆抗体(Sigma-Aldrich公司)。

1.2 方 法

1.2.1 ADSC的分离、培养和鉴定及条件培养液的收集 外科手术无菌条件下取人皮下脂肪组织10~15g(第三军医大学大坪医院整形美容科),用PBS冲洗3次以上去除红细胞及胶原组织,剪碎组织至 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小,用胶原酶消化法^[9-10]分离细胞后用10%FBS的DMEM/F12完全培养基重悬细胞,以 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种细胞,置于5% CO_2 、温度 37°C 的孵箱培养,每3天换液1次。细胞达到80%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化、传代。第3代时采用流式细胞仪检测特异性表面阳性和阴性标志物鉴定ADSC。

细胞长到80%~90%时,用PBS清洗2~3遍,换用无血清DMEM/F12培养基^[11],正常氧浓度,5% CO_2 培养8h,收集条件培养液。收集时对细胞进行计数,用于条件培养基收集的标准化。每只心肌梗死的小鼠注射的条件培养基收集自 5×10^6 个细胞。将收集的条件培养液加入超滤管中, $300 \times g$ 离心5min,取上清并过滤,去除混杂的细胞和细胞碎片。将上清用Millipore Amicon Ultra-15离心超滤装置(5×10^3 cut-off)将条件培养液浓缩25倍,浓缩后的条件培养液放于 -80°C 冰箱,用于后续实验。

1.2.2 NRVM分离培养及鉴定 取SD乳鼠(0~3d)用75%的酒精消毒后用断头法取出心脏,置于预冷的PBS中清洗3次,将心室剪成约 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小,用0.15%胰酶消化法^[12]消化约6次,每次10min,消化后上清丢弃第1次,收集其余消化后细胞悬液,DMEM完全培养基混悬细胞以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种细胞,置于5% CO_2 、饱和湿度 37°C 孵箱培养。培养24h内加用5-BrdU 0.1mmol/L抑制成纤维细胞生长。培养48h后可以进行实验及相关指标测定。

1.2.3 NRVM超氧应激损伤模型的建立 本研究采用 H_2O_2 诱导超氧应激建立NRVM损伤模型,类似于以往的文献^[13-14]报道。我们通过预实验摸索 H_2O_2 处理的浓度梯度和时间梯度,证明 100mol/L H_2O_2 刺激6h可导致约70%NRVM发生

细胞凋亡,体外 NRVM 氧化损伤模型成功建立。实验分为 3 组:①正常对照组;②氧化损伤模型组;③ADSC-CM 组($n=3$);其中 ADSC-CM 组在 H_2O_2 刺激前 1 h 加入 ADSC-CM 进行预处理。6 h 后提取蛋白行 caspase-3 检测或者进行细胞 TUNEL 染色。

1.2.4 心肌梗死模型的建立及心肌内注射 选取 8~12 周龄 20~25 g 的健康雄性 C57B/L 小鼠,异氟烷吸入麻醉小鼠手术显微镜下于左心耳下缘约 1~2 mm 处用 7-0 手术线结扎冠状动脉前降支,根据心电图 ST 段抬高和心肌组织颜色变化确定心肌梗死形成^[15]。在变白边缘选择 3 个点,每个点注射 10 μ L 的 DMEM/F12 或者 ADSC-CM。

1.2.5 心脏超声评价 术后 4 周,异氟烷麻醉小鼠,控制心率 7~8 次/s 于胸骨旁连续记录 3 个左心室长轴和短轴。分别记录左室舒张末期内径(LVIDd),左室收缩末期内径(LVIDs),射血分数(EF%),短轴缩短率(FS%)。

1.2.6 心肌梗死面积的检测 超声检测完毕后,2.5% 戊巴比妥钠麻醉后处死动物。暴露心脏,沿主动脉缓慢逆行灌注 1% TTC 约 1 mL,从心尖至心底切成 1.0~2.0 mm 的心室组织切片,置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 24 h。拍照^[15]后 Image J 软件计算梗死面积(TTC 染色呈白色区域)占左心室总面积的百分比。

1.2.7 心肌细胞凋亡检测 小鼠心肌内注射后 2 d,取出心脏置于 40 g/L 的甲醛溶液中固定 24 h,进行常规石蜡包埋、切片,采用原位脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞的凋亡。采取双盲法进行形态学观察并摄片,在高倍镜下每张切片任选 5 个不重叠视野,采用 Nikon 图像分析软件自动计数 TUNEL 阳性细胞核以及细胞核总量。凋亡指数 = (TUNEL 阳性细胞核/细胞核总数) \times 100%,反映各组心肌细胞凋亡的情况。

1.2.8 TUNEL 染色检测 NRVM 凋亡 NRVM 爬片后经不同因素处理进行 TUNEL 染色,按试剂盒说明书操作。荧光显微镜高倍物镜视野下任选 10 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞核数目和全部细胞核数目,心肌细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞核数/细胞核总数 \times 100%。应用 NIS-Element 3.0 软件进行计数统计。

1.2.9 免疫印迹法检测 caspase-3 蛋白表达水平 收集培养处理的细胞总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度。各组样品分别取总蛋白 50 μ g 加上样缓冲液(pH = 6.8, 100 mL/L 甘油, 10 mL/L β -巯基乙醇,0.5 mol/L Tris \cdot HCl, 10% SDS,0.1 g/L 溴芬蓝)进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,经电转印将蛋白质转移到 NC 膜上。NC 膜经漂洗、封闭后加入稀释度为 1:500 的 caspase-3 的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天用 TBST 液漂洗 NC 膜并用 1:15 000 的荧光二抗室温孵育 1 h。用 ODYSSEY-红外凝胶扫描系统处理各条带的总灰度值进行定量分析(α -actin 为内参照)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 ADSC 的分离、培养及鉴定

原代培养的 ADSC 7~8 d 后达到 70% 融合状态。ADSC 第

3 代后呈长梭形和成纤维样细胞形态,漩涡样生长(图 1)。在我们的既往工作中,已证实这些细胞表面标志物特征为 CD90⁺、CD73⁺、CD44⁺、CD105⁺、CD45⁻、CD34⁻,为 ADSC 的典型表型^[12]。

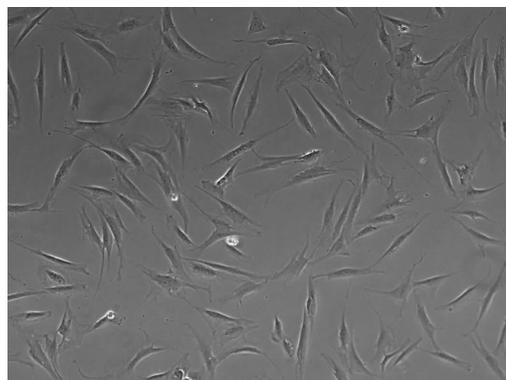
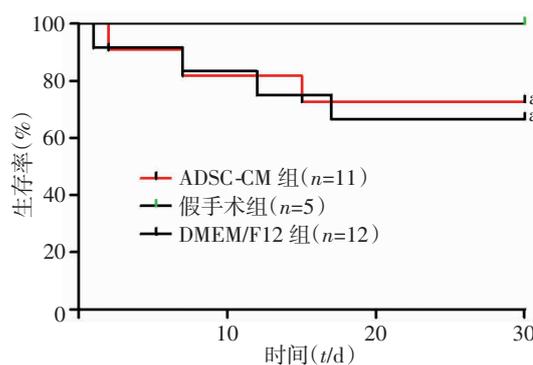


图 1 原代培养第 3 代脂肪干细胞形态 (倒置显微镜 $\times 200$)

2.2 ADSC-CM 对 MI 小鼠生存的影响

MI + DMEM/F12 组 12 只,死亡 4 只,存活率为 66.7%; ADSC-CM 组 11 只,死亡 3 只,存活率为 72.7%;假手术组未出现死亡。图 2 示 MI 小鼠的生存曲线,两个组生存率无组间统计学差异($P > 0.05$),提示注射 ADSC-CM 不能提高 MI 小鼠的存活率。



a: $P < 0.05$, 与假手术组比较

图 2 各手术组小鼠术后 4 周的生存曲线

2.3 ADSC-CM 治疗对 MI 小鼠心功能的影响

图 3 为各组小鼠 M 型超声代表图;术后 4 周超声结果显示,ADSC-CM 组的左室射血分数和短轴缩短率明显高于 DMEM/F12 组($P < 0.05$),见表 1。同时我们观察了反映心脏结构的 LVIDs 和 LVIDd(表 1),ADSC-CM 组 LVIDs 较 DMEM/F12 组 LVIDs 明显减小($P < 0.05$)。但是,ADSC-CM 组 LVIDd [(4.04 \pm 0.81) mm] 较 DMEM/F12 组 LVIDd [(3.84 \pm 0.11) mm] 无统计学差异($P > 0.05$)。各手术组较假手术组均有统计学差异($P < 0.05$)。上述结果提示 ADSC-CM 治疗可以提高 MI 小鼠心功能。

表1 各实验组小鼠术后心功能及左室形态各指标变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EF(%)	FS(%)	LVIDs(mm)	LVIDd(mm)
假手术组	5	90.82 ± 2.83	43.75 ± 1.18	1.71 ± 0.12	2.85 ± 0.32
DMEM/F12组	8	47.22 ± 3.73 ^a	19.52 ± 1.92 ^a	3.56 ± 0.23 ^a	3.84 ± 0.11 ^a
ADSC-CM组	8	60.45 ± 4.83 ^{ab}	27.63 ± 3.52 ^{ab}	2.96 ± 0.27 ^{ab}	4.04 ± 0.81 ^a

a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与 DMEM/F12 组比较

2.4 ADSC-CM 对 MI 小鼠心梗面积的影响

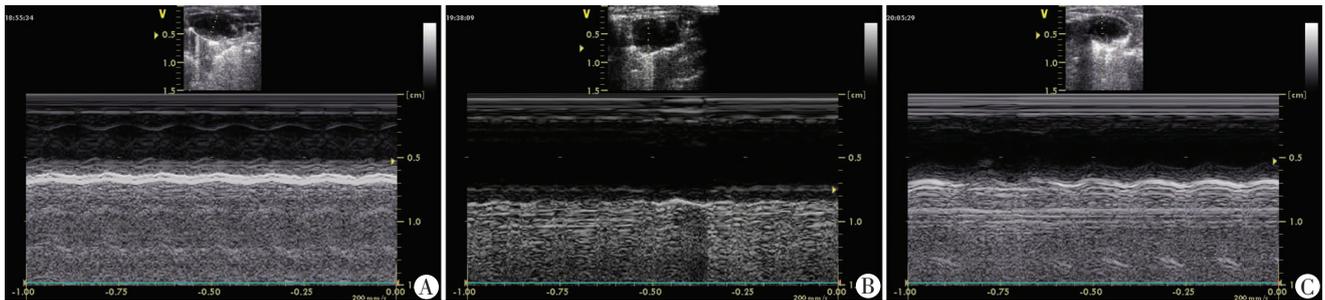
术后4周处死各组小鼠后取心脏进行TTC染色,检测MI小鼠心肌梗死面积大小。开胸后肉眼可见手术组小鼠心脏整体体积变大,左心室壁变薄。如图4,TTC染色后假手术组未见明显梗死区域,各手术组心脏可见白色梗死区域。ADSC-CM组梗死面积($35.3 \pm 0.5\%$)较DMEM/F12组($41.7 \pm 1.9\%$)明显减小($P < 0.05$);提示ADSC-CM治疗能减小MI后梗死面积。

2.5 ADSC-CM 对 MI 小鼠梗死边缘区心肌细胞存活的影响

TUNEL染色法检测MI手术后2d梗死边缘区的心肌细胞凋亡。如图5所示,TUNEL阳性的心肌细胞数量较对照组明显减少 [(677.4 ± 64.2) vs $(867.3 \pm 67.9)/10^6$ 细胞核, $P < 0.05$]。

2.6 ADSC-CM 对超氧应激诱导的心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比, H_2O_2 氧化损伤组 caspase-3 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。与 H_2O_2 氧化损伤组相比,ADSC-CM组 caspase-3 蛋白表达水平明显降低($n = 3, P < 0.05$)。见图6。TUNEL染色结果显示:ADSC-CM组TUNEL阳性率 [$(58.84 \pm 2.19)\%$]较 H_2O_2 氧化损伤组 [$(71.65 \pm 0.86)\%$]明显降低($P < 0.05$),见图7。



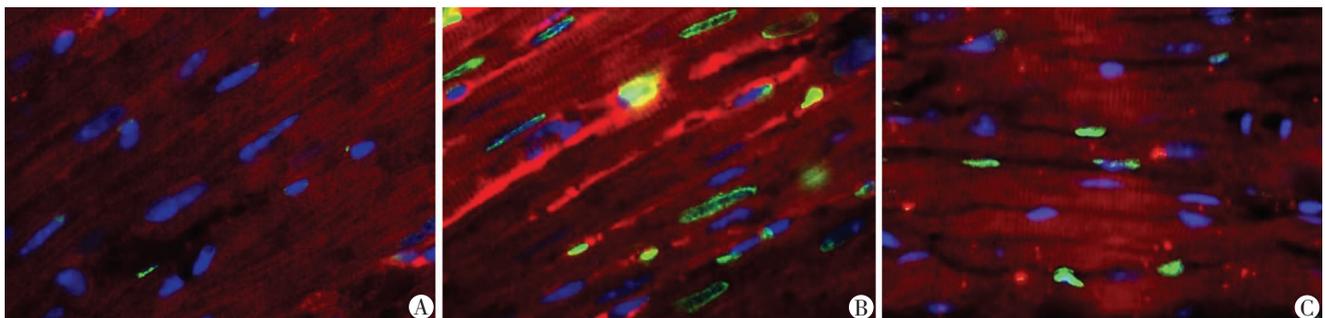
A:假手术组;B:DMEM/F12组;C:ADSC-CM组

图3 各手术组小鼠术后4周心功能情况



A:假手术组;B:DMEM/F12组;C:ADSC-CM组

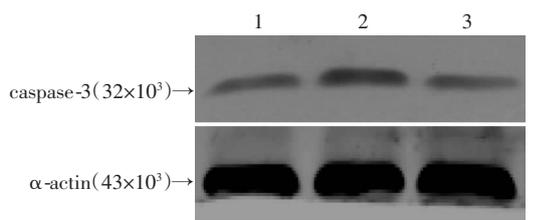
图4 TTC染色后各手术组小鼠心肌梗死面积变化的大体观察



A:假手术组;B:MI + DMEM/F12组;C:MI + ADSC-CM组

绿色:示TUNEL阳性细胞核;蓝色:示细胞核;红色:示心肌细胞标志物Tropomyosin

图5 各手术组小鼠心肌梗死边缘区心肌细胞凋亡情况 (TUNEL × 200)



1:空白对照组;2:H₂O₂氧化损伤组;3:H₂O₂氧化损伤+ADSC-CM组

图6 Western blot 检测各组细胞 caspase-3 蛋白的表达

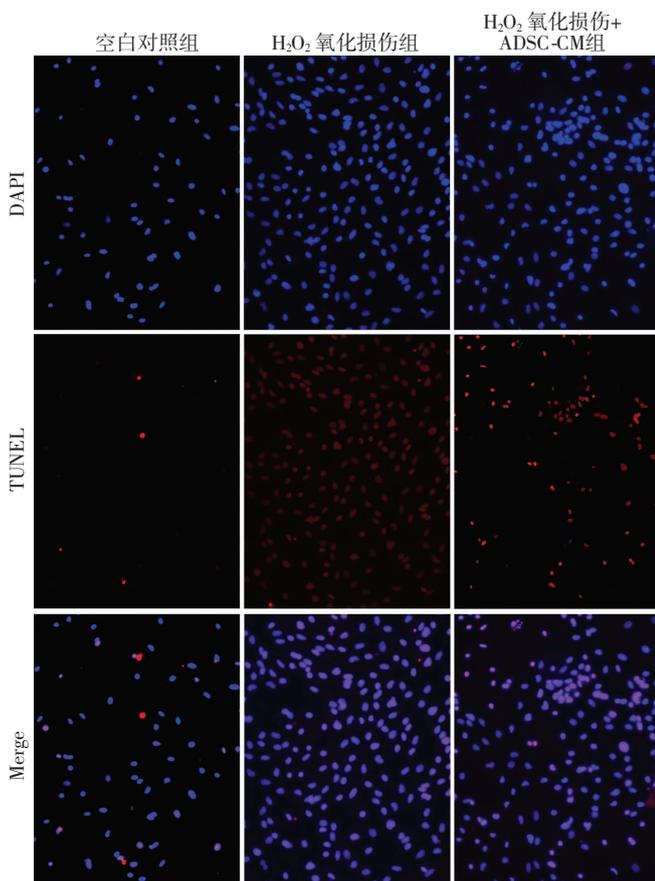


图7 TUNEL 染色观察 ADSC-CM 对超氧应激诱导的心肌细胞凋亡的影响 (×400)

3 讨论

成年间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 可以从患者自身获取,还具有低免疫原性的特点和免疫调节功能,可以减少移植免疫排斥反应,因此常被用作心肌梗死治疗的种子细胞和基因修饰的载体细胞。尽管目前关于间充质干细胞的研究已取得较大进展,但还有很多机制问题需要解决。

研究发现心肌内注射骨髓 MSC 可以改善梗死后心肌重构,并在一定程度上改善左心室的功能^[16]。尽管体外应用 5-氮杂胞苷可以将 MSC 诱导分化为表达心肌标志物的细胞,移植入动物体内的 MSC 可以在心脏内分化为心肌样细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌

细胞,但是由于定位于心肌内的移植细胞数量少,分化细胞更少,因此来源于移植 MSC 分化的有限的功能细胞很难解释心功能的改善,因此 MSC 移植修复心肌,改善心功能可能是由于 MSC 的旁分泌机制。但旁分泌机制在 MSC 治疗心肌梗死中的作用比重众说纷纭,尚无定论。作为 MSC 的一类,ADSC 因为取材方便、易于扩增、多能性好、免疫原性弱等优势,逐渐成为研究热点^[6,17]。ADSC 具有分化为心肌细胞和内皮细胞的能力^[18-21],ADSC 移植可以通过促进血管新生改善心肌重构从而提高梗后心功能^[22]。其治疗效果优于骨髓来源的干细胞^[6]。我们的前期研究证实在 H₂O₂ 介导的心肌细胞超氧应激损伤模型中,ADSC-CM 预处理明显减轻心肌细胞的凋亡^[7]。本研究进一步观察 ADSC-CM 在动物实验中对心肌梗死的治疗效果,发现 ADSC-CM 与 DMEM/F12 培养基一样,对小鼠 MI 后的生存率无明显影响,但明显减小心肌梗死面积,明显提高心功能,起到一定的治疗作用;ADSC-CM 注射能明显减少梗死边缘区的心肌细胞凋亡。

与其他干细胞一样,ADSC 可旁分泌多种细胞因子如 VEGF、HGF、IGF-1、sFrp2 等,参与各种心脏修复过程,包括减少心肌细胞凋亡,促进血管新生,增加移植细胞的存活率,减轻炎症反应,动员内源性心脏干细胞等^[23-25]。同时,近年来的研究发现干细胞还可以分泌具有生物活性的微泡 (microvesicles, MVs),携带 RNA 或 microRNA,对靶器官产生修复作用^[17,26]。本研究也证实在细胞和动物实验中,ADSC-CM 均能显著减轻心肌细胞凋亡,该心肌保护作用是由旁分泌产物中的细胞因子还是微泡占主导机制尚需进一步研究。

本实验证明 ADSC-CM 对心肌梗死有明确的治疗作用,该保护作用的机制主要 ADSC 旁分泌因子减少心肌细胞凋亡从而保护缺血心肌的功能。因为干细胞的移植缺血缺氧微环境中持续存在缺血、缺氧和炎症,导致移植的干细胞很快死亡,存活率很低^[27-28]。同时,我们应该认识到,干细胞在体内的旁分泌与体外培养是不同的。首先,干细胞所处的组织环境会诱导其向该组织类型细胞转化/分化,其分泌功能将随之发生变化;其次,干细胞中损伤部位定植后受到炎症因子的作用。这两者均会对干细胞的旁分泌特性产生显著影响,而体外培养的干细胞保持较为稳定的旁分泌特性。还有不少文献报道 ADSC 细胞移植不仅改善 MI 小鼠的心肌缺血、抗心肌细胞凋亡,而且能改善生存率。而 ADSC-CM 的治疗作用研究很少,其是否能改善生存率尚少见报道。在本实验中亦未观察到对生产率的影响作用,我们推测改善心肌缺血、抗心肌细胞凋亡与改善生存率是相互独立指标,并无因果必然联系,其他诸多

因素(比如炎症反应、心室重构)也可影响动物生存率。而对心肌缺血、心肌细胞凋亡的保护作用需到一定程度才会直接改善动物生存率;同时,ADSC-CM 的治疗作用效果或许弱于 ADSC 细胞移植,在改善生存率等方面的治疗效应有差异。由此推论,采用体外培养的干细胞旁分泌因子进行治疗的策略可能更加简便、安全和有效。因此探索一种优化的干细胞旁分泌治疗策略,或者在众多干细胞旁分泌产物中筛选关键因子等策略可能是临床上治疗心肌梗死的新思路,具有重要的研究意义和应用前景。

参考文献:

- [1] Moran A, Gu D, Zhao D, *et al.* Future cardiovascular disease in China: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china[J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2010, 3(3): 243-252.
- [2] Segers V F, Lee R T. Stem-cell therapy for cardiac disease[J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 937-942.
- [3] Atsma D E, Fibbe W E, Rabelink T J. Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(6): 645-649.
- [4] Grinnemo K H, Mansson-Broberg A, Leblanc K, *et al.* Human mesenchymal stem cells do not differentiate into cardiomyocytes in a cardiac ischemic xenomodel[J]. *Ann Med*, 2006, 38(2): 144-153.
- [5] Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, *et al.* Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction[J]. *Eur J Heart Fail*, 2008, 10(5): 454-462.
- [6] Zhu Y, Liu T, Song K, *et al.* Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC[J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, 26(6): 664-675.
- [7] 王微, 王伟, 彭玉兰, 等. 脯氨酸羟化酶2对脂肪间充质干细胞旁分泌介导的心肌保护的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2012, 20(3): 265-271.
- [8] Deveza L, Choi J, Imanbayev G, *et al.* Paracrine release from nonviral engineered adipose-derived stem cells promotes endothelial cell survival and migration *in vitro*[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(3): 483-491.
- [9] Gronthos S, Zannettino A C. Methods for the purification and characterization of human adipose-derived stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 702: 109-120.
- [10] Chen Q, Yang Z, Sun S, *et al.* Adipose-derived stem cells modified genetically *in vivo* promote reconstruction of bone defects[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(6): 831-840.
- [11] Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, *et al.* Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates *in vitro* and *ex vivo* myocardial reperfusion injury[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30(1): 95-102.
- [12] Maass A H, Buvoli M. Cardiomyocyte preparation, culture, and gene transfer[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 366: 321-330.
- [13] Li R, Yan G, Li Q, *et al.* MicroRNA-145 protects cardiomyocytes against hydrogen peroxide H₂O₂-induced apoptosis through targeting the mitochondria apoptotic pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44907.
- [14] Rothstein E C, Byron K L, Reed R E, *et al.* H₂O₂-induced Ca(2+) overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases; role for an NHE-1-dependent pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(2): H598-H605.
- [15] Ahn D, Cheng L, Moon C, *et al.* Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(3): H1201-H1207.
- [16] Nguyen B K, Maltais S, Perrault L P, *et al.* Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(5): 547-558.
- [17] Ratajczak M Z, Kucia M, Jadczyk T, *et al.* Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? [J]. *Leukemia*, 2012, 26(6): 1166-1173.
- [18] Shi Z, Neoh K G, Kang E T, *et al.* Enhanced endothelial differentiation of adipose-derived stem cells by substrate nanotopography [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, [Epub ahead of print].
- [19] Kim JH, Jung M, Kim HS, *et al.* Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(5): 383-387.
- [20] Marino G, Rosso F, Ferdinando P, *et al.* Growth and endothelial differentiation of adipose stem cells on polycaprolactone [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(3): 543-548.
- [21] Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, *et al.* Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(3): 483-491.
- [22] Mazo M, Hernandez S, Gavira J J, *et al.* Treatment of reperfused ischemia with adipose-derived stem cells in a preclinical Swine model of myocardial infarction [J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(12): 2723-2733.
- [23] Tang J M, Wang J N, Zhang L, *et al.* VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(3): 402-411.
- [24] Deuse T, Peter C, Fedak P W, *et al.* Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 120(11 Suppl): S247-S254.
- [25] Mirosou M, Jayawardena T M, Schmeckpeper J, *et al.* Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(2): 280-289.
- [26] Biancone L, Bruno S, Deregibus M C, *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(8): 3037-3042.
- [27] Tongers J, Losordo D W, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(10): 1197-1206.
- [28] Chacko S M, Ahmed S, Selvendiran K, *et al.* Hypoxic preconditioning induces the expression of pro-survival and pro-angiogenic markers in mesenchymal stem cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(6): C1562-C1570.

(收稿:2012-12-21;修回:2013-02-07)

(编辑 栾嘉)