

# 兔骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究

王新庄<sup>1</sup>, 和小娥<sup>1</sup>, 闫颖颖<sup>1,2</sup>, 任卫青<sup>1</sup>, 何俊丹<sup>1</sup>, 吕婧玉<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 西北农林科技大学动物医学学院, 杨凌 712100)

**摘要:** 旨在研究 5-氮杂胞苷(5-Aza)诱导兔骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)向心肌细胞分化的作用及适宜浓度。取兔股骨骨髓, 分离并培养骨髓间充质干细胞, 用 5-Aza 定向诱导向心肌样细胞分化。用倒置显微镜、免疫细胞化学法鉴定诱导后的细胞是否能表达心肌特异性蛋白  $\alpha$ -横纹肌肌动蛋白( $\alpha$ -actin)和肌钙蛋白 T(Cardiac troponin T, cTnT), 计算各组细胞向心肌样细胞的诱导分化率。结果, 5-Aza 诱导 MSCs 后, 细胞明显变宽, 诱导 1 个月后的 MSCs 呈长杆状, 走向趋于一致, 相邻细胞间连接较紧密, 相互融合。心肌细胞特异性蛋白  $\alpha$ -actin 和 cTnT 呈阳性表达, 不同浓度的 5-Aza 诱导的 MSCs 心肌细胞特异性蛋白的表达率不一样, 其中以  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组表达率最高。5-Aza 作用兔 MSCs 体外培养可以诱导其向心肌样细胞分化, 最佳浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 5-氮杂胞苷; 心肌样细胞; 兔

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1362-06

## Study of Inducing Rabbit BMSC into Cardiocyte

WANG Xin-zhuang<sup>1</sup>, HE Xiao-e<sup>1</sup>, YAN Ying-ying<sup>1,2</sup>, REN Wei-qing<sup>1</sup>, HE Jun-dan<sup>1</sup>, LV Jing-yu<sup>1</sup>

(1. College of Husbandry and Animal Medicine Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** To investigate the method by which rabbit mesenchymal stem cells(MSCs) could be induced to cardiomyocytes and effect, MSCs isolated from rabbit femoral bone marrow were cultured in cell culture medium and in medium with 5-Azacytidine(5-Aza). Whether the induced cells expressed cardiac-specific protein  $\alpha$ -actin and cardiac troponin T(cTnT) was identified by immunocytochemistry and inverted microscope, and the differentiation rate in each group was calculated. The results showed that some MSCs gradually increased in size and formed a stick-like appearance after induction in experimental group, one month after treatment, most of the long stick-like cells connected with adjoining cells and began to form myotube-like structures, the direction of the cells arraying was similar gradually. Cardiac cell-specific protein  $\alpha$ -actin and cTnT expressed positively, the expression rate of cardiac cell-specific protein was different after MSCs was induced by different concentration 5-Aza, of which  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-Aza was the optimal concentration. These results indicate that MSCs can be induced to cardiomyocytes by 5-Aza *in vitro*, and which have the characteristics of cardiomyocytes in structure. The optimal concentration of 5-Aza inducing MSCs to cardiomyocytes is  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** marrow mesenchymal stem cell; 5-azacytidine; cardiomyocyte; rabbit

过去人们认为, 心肌细胞是不可再生细胞, 一旦 受损坏死后, 不会再有功能性的心肌细胞产生。目

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 河南省基础与前沿技术 Research 计划(092300410081); 国家肉牛、牦牛产业体系(30300324)

作者简介: 王新庄(1963-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物细胞与胚胎工程的研究, E-mail: wangxinzhuan@yahooh.com.cn

前有研究表明,心肌细胞具有有丝分裂能力,可以修复微量的细胞损伤,但是对于临床上常见的心肌梗死等大面积的细胞衰亡,则收效甚微。现今,获得大量功能性心肌细胞治疗心肌梗死是这方面的研究热点,而干细胞移植被认为是修复损伤心肌、治疗心肌梗的一个很有前景的方法<sup>[1-2]</sup>。骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是一群中胚层来源的具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞<sup>[3]</sup>,在体外培养的 MSCs 经特殊处理能定向向心肌细胞方向分化<sup>[4-6]</sup>。用骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死的研究目前仍不十分深入,还存在很多问题需要进一步探索。

在本试验中,我们用 5-氮杂胞苷(5-Aza)作为诱导剂,诱导 MSCs 向心肌细胞分化,并对 MSCs 分化后的形态变化进行观察,另外从组织学和分子生物学等各方面对诱导后心肌蛋白和早期发育基因的表达进行检测,动态观察诱导后不同时间点各指标的变化规律,从而初步阐明 MSCs 体外诱导分化的规律,为进一步深入研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

5-氮杂胞苷(Sigma, 美国);L-DMEM(Gibco);胰蛋白酶(Sigma);四甲基偶氮唑盐(MTT);链霉素和素生物素复合体(SABC)、4%多聚甲醛、二氨基联苯胺(DAB)染色试剂盒、山羊血清、鼠抗  $\alpha$ -actin 单抗、鼠抗 cTnT 单抗、生物素化二抗(羊抗兔 IgG)、苏木精染液、二甲苯、乙醇、中性树胶;新西兰白兔(河南省实验动物中心提供)。

### 1.2 MSCs 的分离培养

无菌取兔股骨并去其两端,用 DMEM 液冲洗骨髓至 10 mL 离心管中,1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清。另一支离心管中加入 5 mL 1.073 g·mL<sup>-1</sup> Percoll 分离液,分离液界面上加入与分离液等量的稀释骨髓液(5 mL),3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,吸取中层乳白色絮状物,此分层液富含所分离的单个核细胞,加入到 5 mL DMEM 培养液中混匀,1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清,加入 5 mL 含 15% 胎牛血清的 DMEM 吹打混匀,转移至培养瓶,放于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。24 h 后更换培养液,去除未贴壁的细胞。以后每 1~3 d 更换 1 次培养液。待细胞融合达 80% 时进行传代,用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化,按 1:3 传代。倒置相差显微镜

逐日观察细胞的生长情况和形态特征,并拍照。

### 1.3 兔成纤维细胞的培养

无菌采取兔腹部肌肉,用温生理盐水冲洗血污,75% 酒精浸泡 2 min, PBS 反复洗涤后,将组织块剪切成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块,用眼科镊送入培养皿并用异物针均匀摆置在培养皿内,待组织块贴附后,加入培养液覆盖组织块。原代培养数天后,组织块周围细胞开始向外迁移生长,铺展开来,当单层细胞彼此相互接触融合后即可传代。

### 1.4 MTT 法检测不同浓度 5-Aza 对 MSCs 增殖活性的影响

取对数生长期的兔骨髓 MSCs,制备细胞悬液,调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  个·mL<sup>-1</sup>,接种于 96 孔板,每孔容积 200  $\mu$ L,试验组 5-Aza 浓度分别为 1、5、10、15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>,空白对照组为完全培养基,每组 36 孔,分别培养 2、4、6、8、10、12 d 后,用 MTT 法测其吸光度。每孔加入 MTT 20  $\mu$ L,继续在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h,弃上清,然后每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ L,振摇 10 min,用酶标仪在 492 nm 波长处测光吸收值(OD),以只加培养液的孔作为对照组。分析数据并绘制增殖曲线。

### 1.5 体外诱导 MSCs 向心肌细胞分化

取体外扩增的第 3 代 MSCs,以  $2.0 \times 10^5$  个·孔<sup>-1</sup> 的浓度接种到 24 孔板中,每孔内先加 1 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,用 DMEM 培养液培养 24 h,去除非贴壁细胞后,用含 5-Aza 分别为 1、5、10、15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 的 DMEM 诱导培养基孵育 24 h,去除培养基,用 PBS 冲洗,再换用不含诱导剂的 DMEM 培养基,对照组始终用完全培养基培养,不加药物。3 d 换 1 次液,共培养 12 d,每天用倒置相差显微镜观察各孔中细胞的形态学和组织学变化。

### 1.6 免疫细胞组织化学分析

分别取诱导后第 2、4、6、8、10、12 天的培养板和成纤维细胞培养板, PBS 漂洗,4% 多聚甲醛固定,用体积分数为 3% 的过氧化氢封闭 5~10 min,滴加山羊血清,室温封闭 30 min 后弃去,分别加入一抗工作液( $\alpha$ -actin、cTnT),4 ℃ 过夜,0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 洗涤液洗涤,滴加生物素标记的羊抗小鼠 IgG, DAB 显色,苏木精染色,100% 酒精脱色,二甲苯透明,然后用中性树脂封片。阴性对照用 PBS 代替一抗,试验对照用未诱导的细胞进行染色。观察诱导后细胞分化相关蛋白( $\alpha$ -actin、cTnT)的表达情况,

并与阴性对照组及试验对照组进行比较。

结果判断:显微镜下观察,以细胞中有棕黄色颗粒沉着为阳性表达。

### 1.7 心肌样细胞转化率的计算

倒置相差显微镜高倍视野下( $\times 100$ ),每一组每一时间点随机取6个非重叠视野( $\times 100$ ),计数每个视野内胞浆呈棕黄色颗粒的阳性细胞数( $N_1$ )及视野下全部细胞数( $N$ ),两者相比取平均值即为5-Aza诱导MSCs分化为心肌样细胞的转化率。

### 1.8 数据分析

所得数据用SPSS16.0软件进行统计,通过One-Way ANOVA过程进行方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。数据以“平均数±标准差”表示。

## 2 结果

### 2.1 MTT法检测不同浓度5-Aza对MSCs的损害

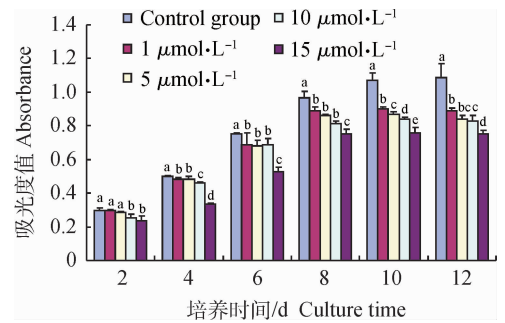
加5-Aza培养24 h后,1、5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的细胞形态变化不明显,而15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组坏死细胞多见,细胞变圆,失去贴壁能力,漂浮于培养液中。随着5-Aza浓度的增加,对MSCs产生的损害作用也随之增加,从同一时间点的吸光度来分析,空白对照组的吸光度较高,第2天以后每一时间点均与其他组差异显著( $P < 0.05$ ),在第2天时,对照组、1、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与10、15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异显著( $P < 0.05$ );第4天时,1和5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 两组差异不显著,10和15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组差异显著( $P < 0.05$ );第8和第10天时,各组差异均显著( $P < 0.05$ ),这可能是由于此时细胞已适应5-Aza的作用,开始进入快速生长期,细胞活力开始增强,进行快速增殖,见图1。

### 2.2 5-Aza诱导MSCs向心肌细胞分化的形态变化

5-Aza作用MSCs后,初始细胞增殖停滞,然后细胞形态逐渐发生变化,体积逐渐变大,细胞增殖减慢,部分细胞脱落死亡,存活细胞形态发生明显改变,以梭形和柱形为主,随后变成多角形和短柱状,类似于心肌细胞(CMG),部分细胞有分支,并逐渐互相连接,相邻细胞紧密接触,排列有一定的方向性,核一个,卵圆形,位于中央(图2)。

### 2.3 免疫组化检测结果

对照组MSCs细胞没有见到 $\alpha$ -actin和cTnT阳性细胞,不同浓度的5-Aza组以10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度为最佳,免疫组化检测结果显示 $\alpha$ -actin、cTnT在胞浆中强阳性表达(图3)。



a, b, c. 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )

a, b, c. The different letters mean significant difference between treatments ( $P < 0.05$ ), the same letter means no significant difference between treatments ( $P > 0.05$ )

图1 不同浓度5-Aza对MSCs的损害

Fig. 1 The damages of 5-Aza with different concentrations on MSCs

2.3.1 不同浓度5-Aza诱导MSCs后细胞cTnT的表达情况 由结果(图4)可以看出,在各不同时间点,不同浓度的5-Aza诱导MSCs后cTnT表达率差异显著( $P < 0.05$ )。在第2天时,各组均不表达cTnT,无显著性差异。第4天时,对照组不表达cTnT,与其他各组均差异极显著( $P < 0.01$ );1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与其他组差异显著( $P < 0.01$ ),5和15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组cTnT的表达率差异显著( $P < 0.05$ );从第4天开始,在每一时间点10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组MSCs的cTnT表达率均最高,与其他各组差异极显著( $P < 0.01$ )。结合我们前面对不同浓度5-Aza对MSCs增殖活性的研究,由图4分析表明,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组浓度为诱导MSCs向心肌细胞分化,并表达心肌特异性肌钙蛋白cTnT的最佳浓度,分析其原因,我们推测主要是由于5-Aza浓度过高对MSCs细胞增殖影响太大,造成MSCs大量死亡,而小浓度的5-Aza又不足以诱导MSCs向特定心肌细胞分化。

2.3.2 不同浓度5-Aza诱导MSCs后细胞 $\alpha$ -actin的表达情况 由图5可以看出不同浓度5-Aza诱导MSCs后,在每一时间点,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组MSCs的 $\alpha$ -actin蛋白表达率最高,与其他各组均差异极显著( $P < 0.01$ )。1、5和15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组都显著低于10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组MSCs的 $\alpha$ -actin表达率。从第6到第8天 $\alpha$ -actin表达率显著提高,这符合细胞的生长曲线,此时细胞正处于对数生长期。分析不同浓度5-Aza诱导MSCs分化后 $\alpha$ -actin表达率不同的

原因,我们认为与上述分析 cTnT 的表达率变化原因一致。

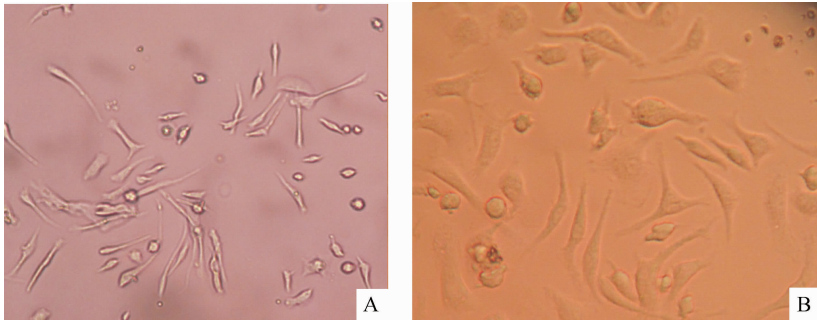
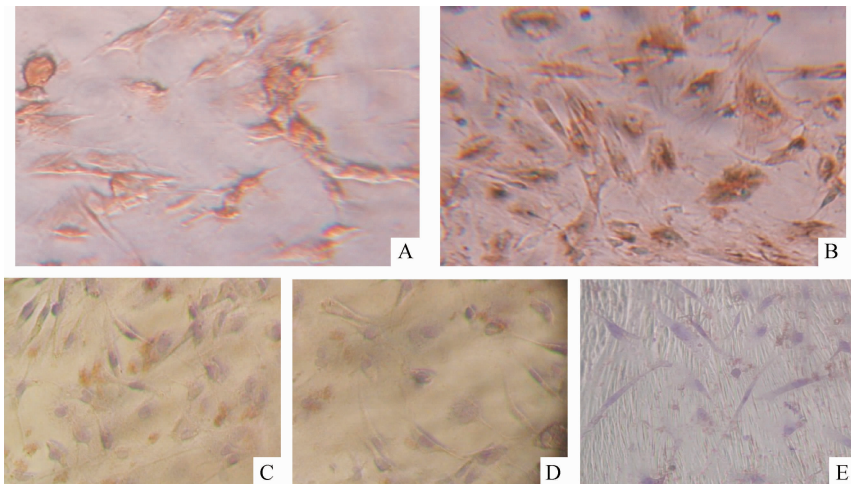


图 2 MSCs 诱导前(A)和诱导后 12 d(B)细胞形态观察( $\times 100$ )

Fig. 2 Morphology of MSCs before induction(A) and after induction for 12 d(B) ( $\times 100$ )



A. 免疫组化检测心肌特异肌钙蛋白 cTnT 阳性表达; B. 免疫组化检测  $\alpha$ -actin 表达阳性; C. 心肌特异性肌钙蛋白 cTnT 对照; D. 免疫组化检测  $\alpha$ -actin 对照; E. 成纤维细胞对照

A. Identifying cTnT by HIC; B. Identifying  $\alpha$ -actin by HIC; C. Control of cTnT; D. Control of  $\alpha$ -actin; E. Control of fibroblast

图 3 免疫组化鉴定结果( $\times 100$ )

Fig. 3 Identification by HIC( $\times 100$ )

### 3 讨论

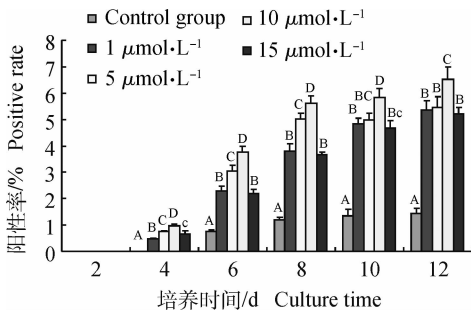
#### 3.1 5-Aza 诱导 MSCs 的机理

本试验中我们选择 5-Aza 为诱导 MSCs 定向分化为心肌细胞的诱导剂,5-Aza 是一种抑制剂,可以抑制细胞 DNA 中的甲基转移酶,该甲基化位点是决定细胞向肌细胞分化的关键位点,由于 5-Aza 使其在细胞中不能表达,从而激活其向心肌细胞分化<sup>[7-8]</sup>。5-Aza 作用于 MSCs 后,其表达心肌特异性肌钙蛋白 cTnT,表明在 MSCs 内也存在这样一个决定其向心肌细胞分化的甲基化位点,但是具体到该过程的分子调控机制及信号转导过程,由于试

验条件的限制,我们没有在这一方面进行深入的探索。需要在以后的试验过程中再深入研究,其必将对 MSCs 的临床应用产生深远影响。

#### 3.2 不同浓度 5-Aza 对 MSCs 生长的影响

现阶段的试验中,诱导 MSCs 向心肌细胞定向分化的方法主要有下面 2 种,一是用化学药物如 5-氮杂胞苷或两性霉素进行诱导<sup>[9]</sup>,二是在体外模拟心肌细胞微环境促使 MSCs 定向分化为心肌样细胞<sup>[10-11]</sup>。在本试验中我们选择的是对 MSCs 增殖作用较好的浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 5-Aza 诱导 MSCs 向心肌细胞分化。



同一时间不同浓度组间比较,字母不同者差异极显著 ( $P < 0.01$ );字母大写和小写间差异显著 ( $P < 0.05$ );字母相同者差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同

Values within a column followed by different letters are significantly different between two groups ( $P < 0.01$ ). Values within a column followed by small and capital of the same letter are different between two groups ( $P < 0.05$ ). Values within a column followed by the same letter are not different between two groups ( $P > 0.05$ ). The same as below

图4 不同浓度5-Aza诱导后细胞cTnT的表达

Fig. 4 The expression of cTnT induced by different density of 5-Aza

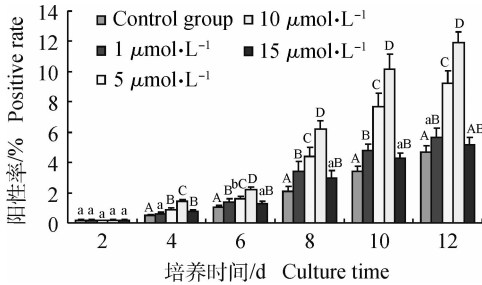


图5 不同浓度5-Aza诱导后细胞α-actin的表达

Fig. 5 The expression of α-actin induced by different density of 5-Aza

5-Aza 诱导 MSCs 向心肌样细胞定向分化的程度与 5-Aza 浓度有很大关系,低浓度 5-Aza 诱导作用不明显, MSCs 增殖不受 5-Aza 的影响,诱导后细胞形态、表达特异标志方面等都没有明显结果,但高浓度的 5-Aza 又会导致 MSCs 细胞大量死亡, MSCs 对 5-Aza 作用很敏感<sup>[12]</sup>,随着 5-Aza 浓度增大, MSCs 的活性也随之下降。

### 3.3 MSCs 在 5-Aza 诱导作用下分化过程中的形态变化

未分化的 MSCs 呈长梭形或椭圆形,细胞呈集落化、簇状、旋涡状贴壁生长,折光性好,增殖能力旺盛,可连续传代。5-Aza 诱导后,细胞形态和排列方式都发生变化,细胞胞体增大增粗,排列方向一致,

随着 5-Aza 浓度的提高,细胞增殖能力减弱,死亡细胞增多,但随着培养时间的延长细胞贴壁更加紧密,细胞增殖缓慢,并开始呈现分化特性。细胞的遮阳形态和生长特性与其他学者的研究相一致<sup>[13]</sup>。5-Aza 诱导过程中,会出现一些细胞排列紊乱,折光性差,呈放射状、不规则形状。高浓度 5-Aza 长时间的诱导培养可能会导致细胞老化或凋亡,目前对于高浓度的 5-Aza 引起 MSCs 细胞的这一变化的机理还不是很清楚,有待进一步研究。

### 3.4 5-Aza 诱导 MSCs 在分化过程中 α-actin 和 cTnT 的表达情况

经 5-Aza 诱导以后, MSCs 转化为表达心肌特异蛋白 α-actin 和 cTnT 的心肌样细胞,在鉴定 MSCs 细胞是否转为心肌样细胞时,之所以选择 α-actin 和 cTnT 这 2 种表面标志蛋白, α-actin 是存在于所有横纹肌中的收缩蛋白,在心肌细胞中也普遍存在,虽然对于鉴定心肌细胞不具有特异性,但是现在已有研究证明心肌细胞中 α-actin 和横纹肌中的 α-actin 具有完全相同的结构,因此, α-actin 也可以作为鉴定心肌样细胞的辅助鉴定标准,可以初步判断诱导后的细胞是心肌样细胞<sup>[14]</sup>。cTnT 是心肌细胞所特有的表面标志蛋白,具有高度特异性,所以根据我们的试验情况,选择这 2 种蛋白作为鉴定心肌细胞的标志。

在本试验中,不同诱导组的 MSCs 均不同程度的表达 α-actin 和 cTnT。对比每一时间点的表达情况,我们得出 10 μmol · L<sup>-1</sup> 的 5-Aza 诱导后的 MSCs,其 α-actin 和 cTnT 的表达率最高。这与 Antonitsis<sup>[15]</sup> 和 Makino<sup>[16]</sup> 等的研究结果一致。Antonitsis 等<sup>[15]</sup> 用 10 μmol · L<sup>-1</sup> 的 5-Aza 诱导人 MSCs,研究其向心肌样细胞分化的基因表型,发现诱导培养的 MSCs 中 α-肌动蛋白、β-肌球蛋白重链和 cTnT 均有表达,认为经 5-Aza 诱导培养后 MSCs 可以向具有心肌表型的细胞分化。有学者则在体外培养鼠 MSCs 时加入 5-Aza 诱导 24 h 后,发现细胞逐渐转化为类似于胎心的心肌细胞,我们的试验结果与其一致。本试验结果发现,10 μmol · L<sup>-1</sup> 5-Aza 对 MSCs 作用显著,既可以引起或促进细胞分化为心肌样细胞,又不会对兔 MSCs 的生物活性造成显著影响。

## 4 结论

本试验研究了 5-Aza 对兔 MSCs 向心肌样细胞

分化的作用与适宜的诱导浓度。通过对试验结果进行统计分析,得出以下结论:经 5-Aza 诱导后的 MSCs 表达  $\alpha$ -actin 和 cTnT,表明 5-Aza 可以诱导 MSCs 分化为心肌样细胞;而 5-Aza 浓度越高对 MSCs 细胞的伤害越大;10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 5-Aza 诱导 MSCs 后,其  $\alpha$ -actin 和 cTnT 的表达率最高,是诱导兔 MSCs 向心肌样细胞分化的最佳浓度。

#### 参考文献:

- [ 1 ] IOANNIS D, NAGY A H, MERTLE Y A, et al. Adult bone marrow derived stem cells and the injured heart: just the beginning[J]. *Europ J Cardio-thoracic Surg*, 2005,28(2):665-676.
- [ 2 ] MORITO T, MUNETAL T, HARA K, et al. Synovial fluid derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans [J]. *Rheumatology*, 2008,47(3):1137-1143.
- [ 3 ] 赵春华. 干细胞原理、技术与临床[M]. 北京:化学工业出版社,2006:63.
- [ 4 ] WANG J S, SHUM-TIM D, GALIPEAV J. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: Feasibility and potential clinical advantages[J]. *Thorac Cardio-vasc Surg*, 2000, 120:999-1006.
- [ 5 ] KEIICHI F, SHINSUKE Y. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2006,4(2):1002-1013.
- [ 6 ] TAN S C W, PAN W X, MA G, et al. Viscoelastic behaviour of human mesenchymal stem cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2008,9(3):40-47.
- [ 7 ] 陈志东,李建美. 骨髓间充质干细胞诱导为心肌样细胞的诱导剂概况[J]. *心血管病学进展*,2010,31(2):295-297.
- [ 8 ] CHIU C P, BLAU H M. 5-Azacytidine permits gene activation in a previously noninducible cell type[J]. *Cell*, 1985, 40(2):417.
- [ 9 ] WAKITANI S, SAITO T, CAPLAN A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. *Muscle Nerve*, 1995, 18(12):1417-1426.
- [10] 郭 军,贾光宏,林国生,等. 体外模拟心肌微环境下骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. *心脏杂志*,2004,15(6):501-504.
- [11] 陈 沅. 骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的分子机制及其微环境[J]. *实用儿科临床杂志*,2008,23(1):4-6.
- [12] 苏 立,陈运贞,张晓刚,等. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*,2004,29(3):292-295.
- [13] 吕铁伟,田 杰,邓 兵,等. NKx2.5、GATA-4 基因表达对骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的影响[J]. *基础医学与临床*,2005,25:40-43.
- [14] RUBENSTEIN P A. The functional importance of multiPle actin isoforms [J]. *Bioessays*, 1990, 12(7):309-315.
- [15] ANTONITSIS P, LOANNIDOU P E, KAIDOGLOU A. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. *Thorac Cardio-vasc Surg*,2008, 56(2):77-82.
- [16] MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*[J]. *J Clinic Invest*, 1999, 103(5):697-705.

(编辑 郭云雁)