

大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究*

刘 畅¹ 于玲范² 刘宏宇¹ 张庆芳³ 姜雪松² 刘文华²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院心外科 黑龙江 哈尔滨 150001

2 哈尔滨医科大学附属第二医院心外监护中心 黑龙江 哈尔滨 150086

3 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:研究体外不同诱导条件下大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)向心肌细胞分化的潜能。方法:取 Wistar 大鼠股骨和胫骨骨髓,分离培养 MSCs,采用第二代或第三代 MSCs,以 5-氮杂胞苷(5-aza)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及两者联合作用,作为分化诱导剂,连续观察三周,相差显微镜下观察其形态变化。免疫细胞化学方法鉴定心肌特异性蛋白 T(Troponin T, cTnT)、连接蛋白 43(Connexin43)、 α -横纹肌动蛋白(α -Sarcomeric Actin)的表达,应用半定量 RT-PCR 技术分析 Nkx2.5、GATA-4、TGF- β 等相关调控基因在分化过程中的表达。结果:免疫细胞化学显示 cTnT、Connexin43、 α -Sarcomeric Actin 诱导前无表达,单纯 bFGF 诱导组及对照组未发现 cTnT、Connexin43、 α -Sarcomeric Actin 染色阳性细胞,单纯 5-aza 诱导组诱导后上述三种蛋白阳性细胞表达比例分别为 22%、28%、32%,5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后上述三者阳性细胞表达比例分别为 28%、33%、40%,联合诱导组诱导后细胞阳性率明显高于单纯 5-aza 诱导组,两组相比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。RT-PCR 检测结果显示,GATA-4、Nkx2.5、TGF- β 在诱导前的 MSCs 有低表达,单纯 5-aza 诱导组及 5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后 3 周,这三种基因有较强的表达,单纯 5-aza 诱导组诱导检测结果显示,GATA-4、Nkx2.5、TGF- β 在诱导前的 MSCs 有低表达,单纯 5-aza 诱导组及 5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后 3 周,这三种基因有较强的表达,单纯 5-aza 诱导组诱导前后相比较,差异有显著性意义($P < 0.05$),5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导前后相比较,差异也有显著性意义($P < 0.05$),单纯 5-aza 诱导组与 5-aza 和 bFGF 联合诱导组诱导后两组之间相比较,差异亦有显著性意义($P < 0.05$),表明单纯 5-aza 诱导及 5-aza 与 bFGF 联合诱导均可使 MSCs 向心肌细胞转化,联合诱导可以使更多的 MSCs 向心肌细胞方向转化。单纯 bFGF 诱导组诱导前后无显著性差异。结论:5-aza 及 bFGF 联合诱导,可以作为更好的促进 MSCs 向心肌细胞分化的条件。

关键词:骨髓间充质干细胞;细胞分化;5-氮杂胞苷;碱性成纤维细胞生长因子;心肌细胞

中图分类号:R **文献标识码:**A

Effects of Different Conditions on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes in Vitro

LIU Chang¹, YU Ling-fan², LIU Hong-yu¹, ZHANG Qing-fang³, JIANG Xue-song², LIU Wen-hua²

(1 Department of Intensive Care Unit of Cardiac Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China;

2 Department of Intensive Care Unit of Cardiac Surgery, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;

3 Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate, under the different inducing conditions, the potentiality of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) differentiating into cardiomyocytes in vitro. **Methods:** Wistar rat MSCs were isolated and cultured from rat bone marrow. MSCs derived from the second and the third passages were cultured for 21 days. During the inducing process, 5-azacytidine, base fibroblast growth and 5-aza + bFGF were used as inducing factors. The MSCs differentiation was observed under phase-contrast microscope. The immunohistochemical technique was used for the expression of Troponin T (cTnT), Connexin43, and α -Sarcomeric Actin. The expression of Nkx2.5, GATA-4 and TGF- β were examined by semi-quantitative PCR. **Results:** MSCs showed spindle-like morphology, but the shape and arrangement changed after induction. The 5-aza group and 5-aza + bFGF group induced MSCs to change their morphology to that of cardiomyocyte type. The cTnT, Connexin43, and α -Sarcomeric Actin had no expression before induction and after the induction of bFGF. The rate of positive cells after 5-aza + bFGF induction was higher than the induction of 5-aza ($P < 0.05$). The expression levels of Nkx2.5, GATA-4 and TGF- β genes after the induction of 5-aza and 5-aza + bFGF were significantly higher than that before induction and the induction of bFGF ($P < 0.05$). The expression levels of these genes after induction of 5-aza + bFGF were higher than that of 5-aza. **Conclusion:** The effect of 5-aza plus bFGF is the better factor in inducing MSCs to differentiate into cardiomyocytes.

Key words: Marrow mesenchymal stem cell; Cell differentiation; 5-azacytidine; Base fibroblast growth factor; Cardiomyocytes

* 基金项目:黑龙江省科技计划项目(G004C30103)

作者简介:刘畅,(1977-),女,黑龙江哈尔滨人,医师,硕士,从事干细胞和分子生物学研究工作。

Tel: 13836057870; E-mail: liuchang000@126.com

通讯作者:于玲范,哈尔滨医科大学附属第二医院, E-mail: yulingfan@163.com

(收稿日期:2006-06-20 接受日期:2006-07-26)

心肌坏死是心血管系统的常发病,其显著特征是功能性心肌细胞大量死亡。一般认为,成熟的心肌细胞是终末分化细胞,缺乏再生能力^[1,2]。有研究表明^[3],少数成体心肌细胞在终末分化之后还具有分裂能力,但由于数量极少,不能达到修复损伤心肌的目的。因此,只有增加心肌细胞或心肌样细胞的数量,才能改善此类病人的心功能。目前,利用间充质干细胞(MSCs)治疗心肌损伤,正成为一种具广泛发展前景的应用手段。如何促进 MSCs 扩增及向心肌细胞转化,就具有重要的现实意义。本实验对 Wistar 大鼠 MSCs 进行培养,并采用 5-aza 及 bFGF 体外诱导其向心肌细胞分化,努力寻找出比较理想的诱导 MSCs 向心肌细胞分化的条件,为受损细胞的细胞移植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器:

DMEM/F12-1:1 培养基(美国 Hyclone 公司),优质胎牛血清(天津 TBD 公司),5-氮杂胞苷(Sigma 公司),鼠单克隆 Troponin T IgG 抗体、兔单克隆 Connexin-43 抗体(Neomarkers 公司),兔八因子相关抗原多克隆抗体、鼠 α -横纹肌肌动蛋白单克隆 IgM 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),PCR 引物(Takara 公司),D-37520 Osterode 型高速低温离心机(德国),倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),透射电镜(JEM-1220 型日本电子公司),凝胶图像分析仪(Promega 公司)。

1.2 MSCs 的提取:

采用未成年 Wistar 大鼠,出生 8-12 天,体重约 30-70 克,由哈医大二院实验动物中心提供。将 Wistar 大鼠颈椎脱臼处死后,体积分数 75%乙醇浸泡 5 分钟,无菌条件下取双侧股骨及胫骨,显露骨髓腔,用不含胎牛血清的 DMEM/F12 液冲洗骨髓腔获取骨髓细胞,将冲洗液收集于离心管中,1500r/m 离心 5 分钟,弃上清,细胞沉淀中加入适量含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,小心吹打成细胞悬液,进行细胞计数,接种于 50ml 培养瓶中,37℃,5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 MSCs 的分离和培养

采用贴壁筛选法,每 3 天更换新鲜培养液,在细胞接近 80%铺满瓶底时,用 2.5g/L 胰酶和 EDTA 进行 1:2 消化传代。

1.4 MSCs 的分组诱导

取体外培养的第二代或第三代 MSCs,以 $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的

密度接种于放置有无菌处理的盖玻片的 24 孔板中,培养至第 3 天,分组诱导,每组 8 个孔,分别培养 21 天。单纯 5-aza 诱导组:加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 的 DMEM/F12 培养基孵育 24 小时,用 PBS 冲洗,再换用正常培养基,每周两次换液。5-aza 与 bFGF 联合诱导组:加入含 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 和 2ng/ml bFGF 的 DMEM/F12 培养基,孵育 24 小时后,用 PBS 冲洗,再换用含 2ng/ml bFGF 的 DMEM/F12 培养基,每周两次换液。单纯 bFGF 诱导组:换用含 2ng/ml bFGF 的 DMEM/F12 培养基,每周两次换液。对照组(未诱导组):正常培养基常规换液,传代。

1.5 分化的心肌细胞鉴定

1.5.1 显微镜下观察:每天用倒置相差显微镜观察每组各孔中细胞的形态变化,连续 3 周。

1.5.2 免疫细胞化学鉴定:利用免疫细胞化学技术,将诱导、未诱导的 MSCs 在培养板里的盖玻片上培养 3 周后,取出盖玻片,用 PBS 清洗 3 次,用甲醛固定 30 分钟, PBS 充分冲洗,在中央部位加 0.1% TritonX-100 浸泡 20 分钟, PBS 充分冲洗,3%过氧化氢封闭 10 分钟, PBS 充分冲洗,山羊血清室温封闭 10 分钟,分别滴加一抗 cTnT、Cx43、 α -横纹肌肌动蛋白,4℃过夜,加入生物素标记的二抗,室温 10 分钟,再加入辣根酶标记卵白素,室温孵育 10 分钟, DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片。在光镜下随机选择 8 个视野,分别计算阳性细胞所占比例。数据采用 SPSS13.0 统计软件,测量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,作成组比较 t 检验。

1.5.3 半定量 RT-PCR 检测:通过 RT-PCR 检测未诱导及诱导 3 周后的 MSCs 的基因 GATA-4、Nkx2.5、TGF- β 的表达。步骤:①采用 Trizol 试剂提取总 RNA 测定 OD 值计算总 RNA 纯度②按 RT-PCR 试剂盒进行逆转录制备 cDNA③以 cDNA 为模板,在反应体系中加入目的基因和内参照基因的引物,设定反应参数,进行目的基因的扩增。

扩增条件为:总循环数 35,

预变性 94℃ 4min

变性 94℃ 40s,

退火 60℃ ~ 62℃ 40s,

延伸 72℃ 60s。

特异引物序列为:

将扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,并采用凝胶图像分析系统分析结果。测量数据以均数 $\pm$ 标准差($\pm s$)表示,采用成组设计资料的方差分析。

附表 RT-PCR 引物序列

基因	上游引物 FWD	下游引物 REV
β -肌动蛋白	5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	5'-ACGGGCGGACTCGTCATACT-3'
TGF- β	5'-GCCCTGGATACCAACTATTG-3'	5'-GCAGGAGCGCACAATCATGTT-3'
Nkx2.5	5'-CAGTGGAGCTGGACAAAGCC-3'	5'-TAGCGACGGTTCTGGAACCA-3'
GATA-4	5'-CTGTCATCTCACTATGGGCA-3'	5'-CCAAGTCCGAGCAGGAATT-3'

2 结果

2.1 MSCs 的特性

细胞接种后 24 小时可见少数细胞开始贴壁生长,细胞形态呈梭形,而大部分悬浮在溶液中的细胞呈圆形,主要是造血细胞和造血干细胞。第五天可见较多的贴壁细胞,首次换液,去除非贴壁细胞(图 1)。7 天后细胞迅速增殖,10 天后出现细胞融合及重叠,约 14 天可传代。首次传代采用 1:2,传代后的

细胞于 24 小时内完全贴壁,待细胞长至 80%铺满瓶底时再次传代。

2.2 MSCs 体外定向诱导后的形态变化

相差显微镜下观察,诱导前表现为长梭形,单纯 5-aza 诱导组诱导后细胞形态发生明显变化,1 周时见细胞体积增大,呈不规则形或扁平多角形(图 2),2 周后集落内部细胞之间和邻近集落细胞之间出现连接,排列方向渐趋一致(图 3),3 周时开始出现肌管样结构(图 4)。5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱

诱导细胞形态变化与单纯 5-aza 诱导组相似,但细胞增殖速度明显加快,诱导后第三天,视野内的细胞开始增多,第 6 天细胞明显增多,同时体积增大,呈不规则多角形,细胞间出现连接(图 5-7)。单纯 bFGF 诱导组诱导后第三天,细胞开始增殖,第 6 天增殖明显,但细胞形态无明显变化,呈长梭形,集落中心的细胞密集,周围细胞成放射状或漩涡状排列,以后集落间细胞出现重叠(图 8)。对照组,常规传代换液,细胞形态无明显变化。

2.3 免疫细胞化学鉴定

Connexin43 阳性表现为胞膜及胞浆内出现棕黄色颗粒。 α -横纹肌动蛋白(Actin)在胞浆中呈细丝状。cTnT 表达与 Connexin43 相近。对照组未发现 cTnT、Connexin43、 α -横纹肌动蛋白阳性细胞,单纯 5-aza 诱导组诱导后 cTnT、Connexin43、 α -横纹肌动蛋白阳性细胞表达比例分别为 22%、28%、32%,5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后上述三种蛋白阳性细胞表达比例分别为 28%、33%、40%,联合诱导组诱导后细胞阳性率明显高于单纯 5-aza 诱导组($P < 0.05$),两组相比较差异有显著性意义(见图 9-12,表 1),表明 5-aza 与 bFGF 联合诱导能使更多的 MSCs 向心肌细胞转化,效果更好。单纯 bFGF 诱导组诱导前后及对对照组未发现上述三种蛋白染色阳性细胞。

2.4 相关调控基因的表达

RT-PCR 检测结果显示,GATA-4、Nkx2.5、TGF- β 在诱导前的 MSCs 有低表达,单纯 5-aza 诱导组及 5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后 3 周,有较强的表达,以 β -actin 作为内对照,将各基因净条带的面积 $\times$ 强度与同时电泳的 β -actin 净条带的面积 $\times$ 强度对比进行相对量分析。进行三次独立实验取其平均值(结果如表 2,3),由表可见,单纯 5-aza 诱导组诱导前后相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导前后相比,差异也有显著性意义($P < 0.05$),单纯 5-aza 诱导组与 5-aza 和 bFGF 联合诱导组诱导后两组之间相比较,差异亦有显著性意义($P < 0.05$),表明单纯 5-aza 诱导及 5-aza 与 bFGF 联合诱导均可使 MSCs 向心肌细胞转化,并且 5-aza 与 bFGF 联合诱导能使更多的 MSCs 向心肌细胞转化,效果优于单纯 5-aza 诱导组。单纯 bFGF 诱导组诱导前后无显著性差异(图 13,14)。

表 1 不同诱导组免疫组化结果分析($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Percentage of positive expressions of different groups

组别	cTnT	Connexin43	Actin
单纯 5-aza 诱导组	0.22 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.05
5-aza 与 bFGF 联合组	0.33 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.06
P 值	0.005	0.013	0.008

表 2 不同诱导组诱导后 Nkx2.5、GATA-4、TGF- β 基因的表达

Tab 2 Gene expressions of different groups after induction

组别	Nkx2.5	GATA-4	TGF- β
1 组(单纯 5-aza 组)	0.417 $\pm$ 0.015	0.410 $\pm$ 0.026	0.333 $\pm$ 0.015
2 组(联合组)	0.473 $\pm$ 0.025	0.487 $\pm$ 0.035	0.380 $\pm$ 0.020
3 组(单纯 bFGF 组)	0.220 $\pm$ 0.030	0.273 $\pm$ 0.031	0.190 $\pm$ 0.021
4 组(对照组)	0.233 $\pm$ 0.031	0.270 $\pm$ 0.020	0.180 $\pm$ 0.020

表 3 各不同诱导组诱导后 Nkx2.5、GATA-4、TGF- β 基因表达的组间比较

Tab 3 Comparison of gene expressions in different groups

基因表达	1 与 2 组	1 与 3 组	1 与 4 组	2 与 3 组	2 与 4 组	3 与 4 组
Nkx2.5	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$
GATA-4	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$
TGF- β	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$

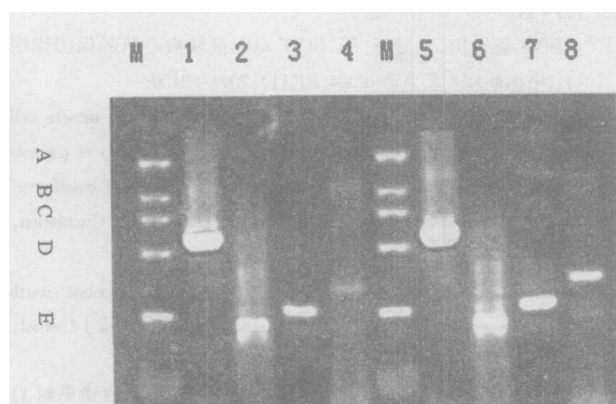


图 13

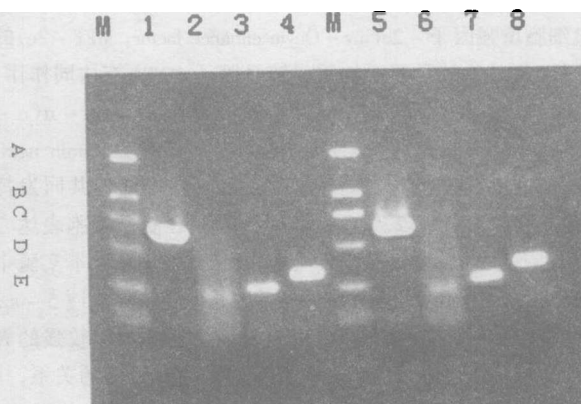


图 14

图 13、14 RT-PCR 检测心肌特异性因子的表达,图 13:1、2、3、4 为单纯 5-aza 诱导组,5、6、7、8 为 5-aza 与 bFGF 联合诱导组;图 14:1、2、3、4 为单纯 bFGF 诱导组,5、6、7、8 为未诱导组即对照组;M 为分子量标准,A:2000bp,B:1000bp,C:750bp,D:500bp,E:250bp;1、5 为 β -肌动蛋白,624bp;2、6 为 Nkx2.5,216bp;3、7 为 GATA-4,275bp;4、8 为 TGF- β ,313bp。

Fig. 13,14 RT-PCR analysis of expression of cardiomyocyte-specific genes Fig. 13 1,2,3,4 are the induced groups after 5-aza; 5,6,7,8 are the induced groups after 5-aza and bFGF. Fig. 14 1,2,3,4 are the induced groups after bFGF; 5,6,7,8 are the uninduced groups. M: marker; A: 2000bp; B: 1000bp; C: 750bp;

D:500bp; E: 250bp; 1,5: β -actin, 624bp; 2,6: Nkx2.5, 216bp; 3,7: GATA-4, 275bp; 4,8: TGF- β , 313bp.

3 讨论

MSCs 具有向多胚层组织分化的干细胞特性,体外不同培养条件可以调控 MSCs 的分化行为。目前为止,诸多实验证实 5-aza 可以诱导 MSCs 向心肌细胞转化^[4]。其他方法,如二甲亚砜(DMSO)可以诱导人 MSCs 向心肌细胞分化^[5],但 DMSO 具有细胞毒性,限制了其体内应用。

而 bFGF 是正常体内的一种内源性多肽生长因子,有促进中胚层和神经外胚层细胞有丝分裂的作用^[6],有利于 MSCs 的临床应用。已有很多实验研究表明,bFGF 可促进 MSCs 增殖,使细胞集落直径增大,DNA 合成增加^[7-8]。芦丽莉等的研究还证实^[9]bFGF 可显著促进大鼠急性心肌梗死早期心肌细胞内 bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 的表达。提示 bFGF 可减少急性心肌梗死时心肌细胞的凋亡,具有心肌保护作用。临床研究中,Flugelman 等^[10]和 Hasdai 等^[11]发现冠心病患者血清 bFGF 水平升高。本实验将 5-aza 和 bFGF 联合起来对 MSCs 进行诱导,研究结果也显示 bFGF 可以促进 MSCs 增殖,并能提高 5-aza 诱导 MSCs 向心肌细胞的转化率。

实验中选用 Connexin43、cTnT、 α -横纹肌动蛋白三种心肌特异性蛋白鉴定 MSCs 向心肌细胞的转化。心肌细胞之间的缝隙连接是心脏电生理一致性的基础,Connexin43 是心肌细胞缝隙连接的特征性蛋白,本实验中未诱导的 MSCs 的 Connexin43 表达为 0,5-aza 诱导后的阳性率为 28%,联合诱导后的阳性率为 34%。肌钙蛋白 cTnT 仅在心肌细胞中表达,是鉴定心肌细胞的特异性蛋白。未诱导的 MSCs 中无 cTnT 表达,单纯 5-aza 诱导后有 22% 阳性表达,联合诱导后表达 33%。 α -横纹肌动蛋白对心肌和骨骼肌肌动蛋白特异识别,未诱导组阴性表达,单纯 5-aza 诱导后表达 32%,联合诱导后表达 39%。单纯 bFGF 诱导前后都是阴性表达。

基因的表达在 MSCs 向心肌细胞转化的过程中具有更重要的意义。目前已经基本明确心脏特异转录因子如 Nkx2.5、GATA4 在心脏胚胎发育过程中起主要作用。Nkx2.5 是进化上保守的包含同源区的转录因子。在分化过程中,Nkx2.5 除激活肌细胞增强因子-2c(myocyte enhance factor, MEF-2c)的表达外,与其他转录因子如锌指转录因子 GATA 有协同作用。GATA 调控许多基因表达,包括心脏肌球蛋白重链- α (α -myosin heavy chain, α -MHC)、cTnT、ANP 和脑钠素(brain natriuretic protein, BNP)^[12]。Nkx2.5 和 GATA4 互相依赖共同发挥作用。已经证明 Nkx2.5、GATA4 能诱导鼠胚胎干细胞表达心脏 α -肌动蛋白(cardiac α -actin, ACA)mRNA^[13]。本实验中 Nkx2.5、GATA-4、TGF- β 在诱导前有弱表达,在单纯 5-aza 诱导组及 5-aza 与 bFGF 联合诱导组诱导后 3 周有较弱的表达,推测结构基因的表达与心肌蛋白的表达有密切的关系,并

进一步证明 MSCs 向心肌细胞的转化。

可以设想:MSCs 中含有心肌源性的多能干细胞群,即心肌干细胞,具有潜在的分化为心肌细胞的能力,bFGF 可以促进 MSCs 的增殖,亦可促进心肌干细胞的增殖,在与 5-aza 的共同作用下,提高了向心肌细胞的转化率。因此,5-aza 与 bFGF 联合诱导,可以作为更好的促进 MSCs 向心肌细胞转化的条件,具有良好的临床应用前景。其确切机制还需进一步探讨,将为 MSCs 应用于临床奠定基础。

参考文献

- [1] Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, et al. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1998,116:744-751
- [2] Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation [J]. Nat Med, 1998,4:929-933
- [3] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction [J]. N Engl J Med, 2001,344:1750-1757
- [4] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro [J]. J Clin Invest, 1999,103:697-705
- [5] 史剑慧,胡昕雯,牛玉宏,等.二甲亚砜诱导人骨髓间充质干细胞心肌分化中的基因表达[J].复旦学报(医学版),2004 Sep, 31(5)
- [6] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. Artif Organs, 2001,25:187-193
- [7] Kotev-emeth S, Savion N, Pri-chen S, et al. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor [J]. Bone, 2000,27(6):777-783
- [8] Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, et al. Expression of the developmental markers stro-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptor1-4 [J]. Bone, 2000,27(2):185-195
- [9] 芦丽莉,陈吉田,王丹峰,等. bFGF 对大鼠缺血心肌的保护作用 [J]. 中国病理生理杂志,2004,20(11):2098-2100
- [10] Flugelman M Y, Virmani R, Correa R, et al. Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina: a clue to the mechanism of transformation from the stable to the unstable clinical state [J]. Circulation, 1993,88(6):2493-500
- [11] Hasdai D, Banak V, Leibovitz E, et al. Serum basic fibroblast growth factor levels in patients with ischemic heart disease [J]. Int J Cardiol, 1997,59(2):133-138

(图 1-12 请见封 3)

大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究

刘 畅¹ 于玲范² 刘宏宇¹ 张庆芳³ 姜雪松² 刘文华²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院心外科 黑龙江 哈尔滨 150001

2 哈尔滨医科大学附属第二医院心外监护中心 黑龙江 哈尔滨 150086

3 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科 黑龙江 哈尔滨 150086)

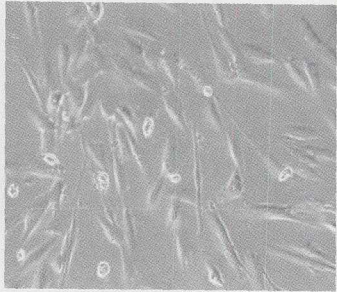


图 1 原代骨髓干细胞的形态, 200 倍
Fig.1 The primary cells of bone mesenchymal stem cells in vitro (×200)

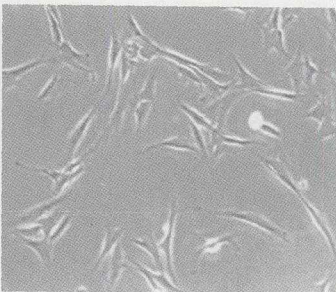


图 2 单纯 5-aza 诱导 1 周后细胞的形态, 200 倍
Fig.2 Morpbological changes 1 week after induction with 5-azacytidine (×200)

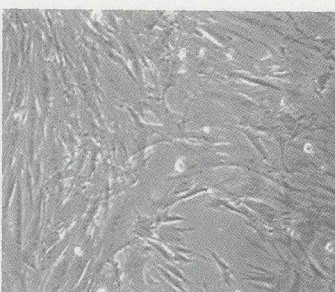


图 3 单纯 5-aza 诱导组诱导 2 周后的形态, 200 倍
Fig.3 Morpbological changes 2 week after induction with 5-azacytidine (×200)

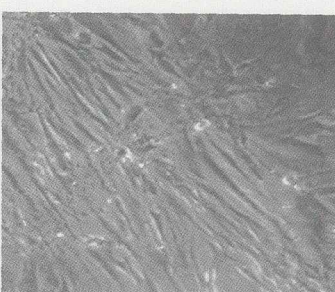


图 4 单纯 5-aza 诱导组诱导 3 周后的形态, 200 倍
Fig.4 Morpbological changes 3 week after induction with 5-azacytidine (×200)

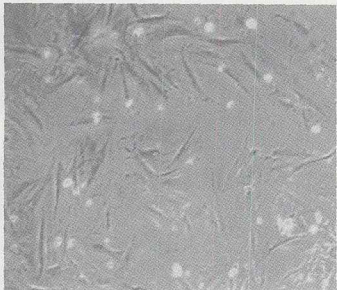


图 5 5-aza 与 bFGF 联合诱导后 6 天, 200 倍
Fig.5 Morpbological changes 6 days after induction with 5-azacytidine and bFGF (×200)



图 6 5-aza 与 bFGF 联合诱导后 2 周, 200 倍
Fig.6 Morpbological changes 2 weeks after induction with 5-azacytidine and bFGF (×200)

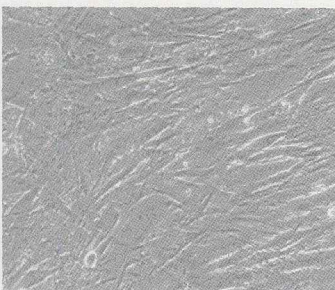


图 7 5-aza 与 bFGF 联合诱导后 3 周, 200 倍
Fig.7 Morpbological changes 3 weeks after induction with 5-azacytidine and bFGF (×200)

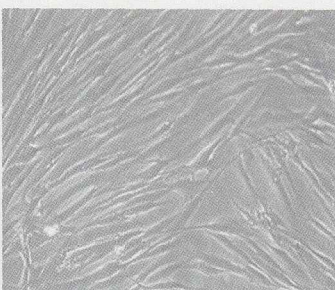


图 8 单纯 bFGF 诱导后 6 天的形态, 200 倍
Fig.8 Morpbological changes 1 week after induction with bFGF (×200)

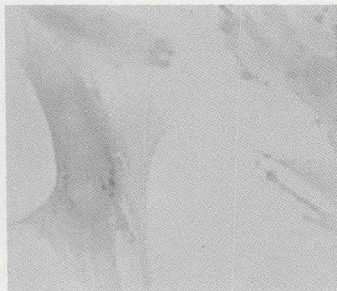


图 9 MSCs 诱导后 α -横纹肌动蛋白表达阳性, 400 倍
Fig.9 The positive expression of Actin in bone mesenchymal stem cells (×400)

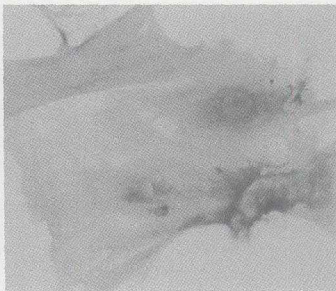


图 10 MSCs 诱导后 Connexin43 表达阳性, 400 倍
Fig.10 The positive expression of Connexin43 in bone mesenchymal stem cells (×400)

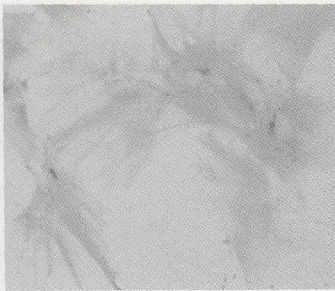


图 11 MSCs 诱导后 cTnT 表达阳性, 400 倍
Fig.11 The positive expression of cTnT in bone mesenchymal stem cells (×400)



图 12 对照组 MSCs 诱导后 Actin 表达阴性, 400 倍
Fig.12 The negative expression of Actin in bone mesenchymal stem cells (×400)