

microRNA499 慢病毒载体转染诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化*

张鹭鹭 刘惊今 王永顺 刘芳 于波[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院心内科 心肌缺血机理与诊疗技术省部共建教育部重点实验室(哈尔滨医科大学)

黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的 探讨 microRNA 499(miR-499)慢病毒转染对诱导大鼠骨髓来源间充质干细胞(BM-MSCs)向心肌样细胞分化的作用。**方法** 取第四代 Wistar 大鼠骨髓来源间充质干细胞进行流式细胞检测,鉴定干细胞表面特异标记物。使用符合干细胞鉴定标准的细胞批次用于后续实验。实验设置 miR499 慢病毒转染、慢病毒空白转染 2 个处理组,分别于处理后即日、1d、3d、5d、7d 收集细胞进行下列实验:实时荧光定量 PCR 检测心肌重要转录因子 GATA4、NKx2.5 和 MEF2C 的 mRNA 表达,western-blot 检测心肌特异蛋白 I(cTnI)的表达。**结果** 培养第四代 Wistar 大鼠骨髓来源间充质干细胞表达干细胞表面特异标记物,可用于实验。大鼠骨髓来源间充质干细胞 microRNA 499 慢病毒载体转染后 microRNA 499 表达明显升高,且转染后 1d、3d、5d、7d, GATA4、NKx2.5 和 MEF2C 的 mRNA 表达逐渐增强。慢病毒空白转染组未见明显变化。western-blot 检测自第 3 天开始可见 cTnI 阳性表达条带,慢病毒空白转染组未检测到明显阳性表达条带。**结论** microRNA 499 可诱导大鼠骨髓来源间充质干细胞向心肌样细胞分化。

关键词 microRNA 499;骨髓间充质干细胞;心肌样分化;慢病毒载体转染

中图分类号 Q75,Q78,R54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)26-5027-05

miR-499 Induces Cardiac Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*

ZHANG Lu-lu, LIU Jing-jin, WANG Yong-shun, LIU Fang, YU Bo[△]

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University; Key Laboratory of Myocardial Ischemia Mechanism and Treatment(Harbin Medical University), Ministry of Education, Heilongjiang, Harbin, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-499 on differentiation of cardiomyocyte-like cells from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). **Methods:** The fourth passage of rat BM-MSCs were infected with lentiviral vectors bearing miR-499 or empty lentiviral vectors as control. The expression of cardiac-specific markers, NKx2.5, GATA4, MEF2C, and cTnI in these cells were examined by real-time PCR and western blot. **Results:** The fourth passage of the cultured rat BM-MSCs express significant markers of MSCs. After transfection of microRNA 499 in rat BM-MSCs, the expression level of microRNA 499 was markedly enhanced. The mRNA expression of GATA4, NKx2.5 and MEF2C gradually increased from day 1 to day 7, the cTnI expression was detected from day 3. While there were no significant changes of GATA4, NKx2.5 and MEF2C mRNA levels in BM-MSCs infected with empty lentiviral vectors, and cTnI expression cannot be detected either. **Conclusion:** Over-expression of miR-499 rat BM-MSCs can induce rat BM-MSCs toward cardiac differentiation.

Key words: miR-499; Mesenchymal stem cells; Cardiac differentiation; Lentiviral vectors transfection

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, R54 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2012) 26-5027-05

前言

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)的研究始于 1991 年, Caplan AI 首次提出了多潜能基质细胞的概念^[1]。自此以后, MSCs 在细胞移植、再生医学等领域的应用取得了巨大的成绩。间充质干细胞是一种多潜能分化的干细胞,不但可以自我更新还可以向多方向定向分化^[2,3]。MSCs 能够得以广泛研究、应用主要取决于其以下特性: 1, 相对于其他干细胞亚群来讲, MSCs 更易于分离培养纯化; 2, MSC 具有向多种组织细胞分化

的能力; 3, MSCs 不表达 MHC II 类抗原, 具有较低的免疫原性以及一定的免疫调节功能; 4, MSCs 相对于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)等, 具有更少的伦理学羁绊。

体外培养的 MSCs 在 5-氮杂胞苷诱导下可于 1 个月左右出现向心肌样细胞的分化^[4,5], 然而, 在体内研究中, 在受损心脏实施 MSCs 移植治疗时, 后者向心肌样细胞分化的结果却缺乏强有力的证明^[6,7], 以至于很多学者认为 MSCs 移植对于受损心脏的修复主要依赖于 MSCs 旁分泌的调节作用^[8]。同时, 研究分析之所以未能看到 MSC 向心肌样细胞显著分化的效果, 可能

* 基金项目: 省部共建教育部重点实验室(哈尔滨医科大学) 开放基金项目(KF201004)

作者简介: 张鹭鹭(1983), 女, 博士研究生, E-mail: lulu.egret.white@163.com

[△] 通讯作者: 于波, 男, 博士生导师, 教授, 主任医师, 电话: 0451-86605180, E-mail: yubodr@163.com

(收稿日期: 2012-03-03 接受日期: 2012-03-26)

是由于移植入体内的 MSCs 没有足够的时间完成此分化过程^[6,7]。因此,缩短 MSCs 向心肌样细胞分化的时间将对 MSCs 更全面的发挥修复功能起到巨大的推动作用。

microRNAs (miRNAs,miRs) 能通过其 5' 端种子序列与靶 mRNA 3' 端非翻译区(3'-untranslated region,3-UTR)识别、结合并抑制靶 mRNA 的翻译,因此具有强大的调节细胞多种反应的能力^[9,10],例如细胞增殖、分化、凋亡等^[11,12],在干细胞中也是如此^[13]。心脏的发生、发育是一个极其复杂的过程,需要多层次基因表达网络的精密调控。miR 家族便是此网络中的关键一员,它们在心肌细胞分化和心脏发育过程中的重要作用越发受到国内外学者的广泛关注。近来随着研究的不断深入,研究表明 miR-1^[14], 206^[15], 24^[16], 181^[17]等 miRs 具有诱导 MSC 向心肌细胞分化的功能,同时 miR-133 向对心肌细胞分化过程具有抑制作用^[14,18]。

miR-499 是近年新发现的与心肌细胞分化密切相关的重要 microRNA,大鼠 miR-499 (no-mir-499,ID:100314091) 基因包含在心肌重链肌球蛋白 Myh7b 基因的第 18 内含子中,并且在心肌细胞中特异表达^[19-23],并调节心肌细胞的分化^[23-25]。已知 miR499 在多能诱导干细胞、胚胎干细胞和心肌干细胞等心肌分化过程中发挥重要作用,然而其在 MSCs 中的心肌细胞分化诱导作用尚未见报道。因此,本实验预通过对 MSC 进行转染 miR-499 慢病毒表达载体的方法,研究 miR-499 诱导 MSCs 向心肌样细胞分化的作用。

1 材料与方法

1.1 骨髓间充质干细胞分离培养

取清洁级 Wistar 大鼠,2-3 周龄,雌雄不限,全骨髓培养法分离骨髓间充质干细胞。大鼠断颈法处死后,酒精浸泡消毒,无菌条件下取股骨、胫骨。PBS 漂洗后以 5mL 注射器吸取完全培

养基 (DMEM/F12 (Hyclone, Logan, UT) 添加 15%胎牛血清 (FCS; Hyclone, Logan, UT)及 1%青、链霉素)冲洗骨髓腔,冲洗液离心去上清,加入新鲜培养液悬浮细胞后以 5×10^5 密度接种于 25cm² 培养瓶,置于 37℃,5% CO₂ 孵箱培养。48 小时首次换液去除未贴壁细胞,此后每 2-3 天换液,至细胞生长至 80% 到 90%融合时,胰酶消化传代。取第 3-5 代细胞进行细胞表面特异抗原流式细胞检测鉴定并应用于后续实验。

1.2 流式细胞术检测骨髓间充质干细胞表面抗原

取第 3-5 代细胞进行间充质干细胞表面抗原检测:CD29, CD90, CD44, CD45 和 CD34。细胞消化后 PBS 清洗数次后滴入下列抗体进行检测:phycoerythrin (PE)- 标记 anti-CD45, anti-CD90; Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- 标记 anti-CD44, anti-CD29 (BD Pharmingen, USA)及 anti-CD34 (eBioscience, San Diego, CA)抗体。Mouse IgG1 用作阴性同型对照。采用 FACScan™ (BD Biosciences, Franklin, NJ, USA) 进行检测,CellQuest Analysis (BD Biosciences)进行数据分析。

1.3 miR-499 慢病毒载体转染

miR-499 慢病毒载体(LV-miR-499)购自上海创翼生物有限公司(Shanghai Chuangyi Co., Ltd. China)。依据说明书以转染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 200 进行病毒载体转染操作,以慢病毒空白载体转染组(LV-miR-NC)为对照。转染 16 小时后更换为新鲜完全培养基。以实时荧光定量 PCR 检测细胞中 miR-499 的 mRNA 含量评价转染效果。引物序列见表 1。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测心肌特异性转录因子表达

分别于转染后 0、1、3、5、7 天收集细胞进行指标检测。采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中心肌特异性转录因子 Nkx 2.5, GATA 4 及 MEF2C 的 mRNA 表达水平。以 GAPDH 为检测参照,所得 Ct 值以 $2^{-\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}}$ 方式进行 mRNA 相对含量换算。引物序列见表 1。

Table 1 List of Primers for real time PCR

Genes	Forward	Reverse
Nkx 2.5	5'-CCACCTGGCGCTGTGAGACC-3'	5'-GAAGCGCCGCTCCAGCTCAT-3'
GATA 4	5'-GCCAACCTGCGAGACACCC-3'	5'-TCAGCGTTACGGCGCCACAG-3'
MEF2C	5'-AGCAGGTGCTGACGGAACAA-3'	5'-TCACAGTCGCACAGCAGCTC-3'
Mir499	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGT-3'	5'-ACACTCCAGCTGGGTAAAGACTTGC-3'
GAPDH	5'-GGCTCTCTGCTCCTCCCTGTT-3'	5'-GCGGGATCTCGCTCCTGGAAG-3'

1.5 Western-blot 检测心肌特异蛋白 cTnI 表达

分别于转染后 0、1、3、5、7 天收集细胞提取总蛋白,采用 western-blot 法检测细胞中 cTnI 表达。Cardiac Troponin I 抗体购自于 Abcam 公司 (Abcam, Cambridge, UK, ab19615), β -actin 抗体购自于中杉金桥有限公司 (Zhongshan Goldenbridge Biotechnolog Co., Ltd. China #TA-09), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)购自于中杉金桥有限公司 (Zhongshan Goldenbridge Biotechnolog Co., Ltd. China #ZB2305)。所有杂交条带采用上海天能凝胶图像处理系统(Shanghai Tanon Co., Ltd. China)进行分析定量。

1.6 统计学分析

所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,服从正态分布的连续型变量两组比较采用 t 或 t' 检验,多组分析根据是否满足方差分析的条件,采用单因素方差分析,任意两组间的比较采用 LSD (least significant difference) 检验。所有数据采用 SPSS18.0 统计软件 (version 18.0; Chicago, IL) 处理,双侧检验, $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓来源间充质干细胞生长特点及鉴定结果

MSCs 接种 48 小时后全量换液去除部分未贴壁细胞。原代培养 4 至 6 天后细胞呈长梭形克隆性生长,培养 7 天左右时

细胞生长接近汇合状态,呈放射状或旋涡状。传代后 MSCs 仍呈长梭形生长,细胞形态均一,3-5 天即达汇合状态。流式细胞检测体外培养的第 3-5 代 MSCs,结果表明 MSCs 阳性表达重

要标志物整合素家族成员 CD29 (99.0%), CD90 (88.3%) 部分表达黏附分子 CD44 (35.7%) 而造血前体细胞标志抗原 CD34 (0.8%)、白细胞标志抗原 CD45 (2.1%) 表达阴性 (图 1A-E)。

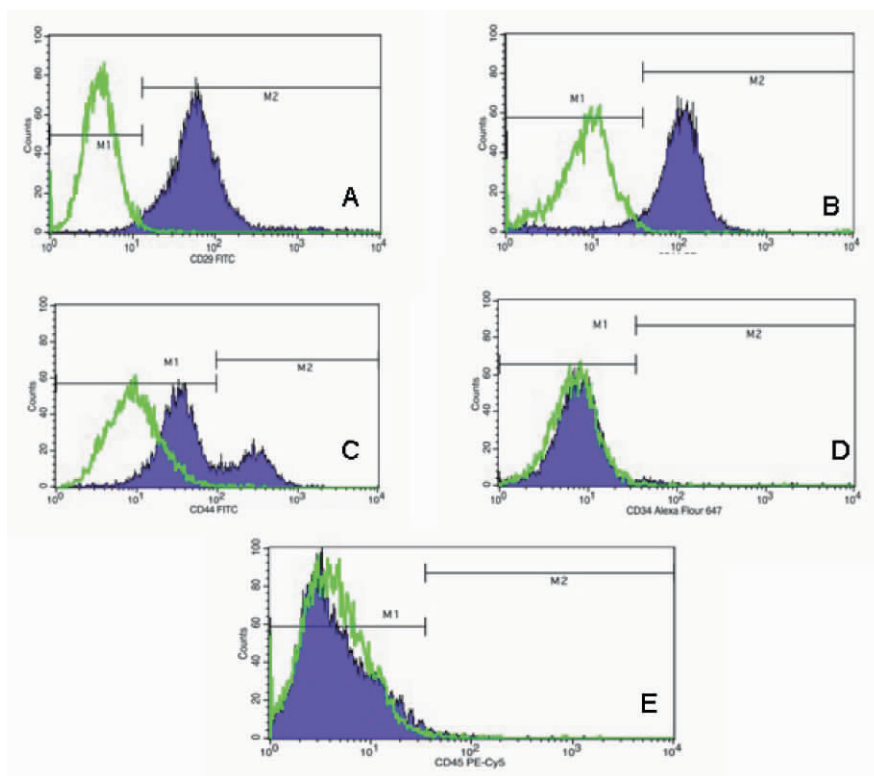


Fig.1 MSC characteristic by FACS analysis: CD29 (A), CD90 (B), CD44 (C), CD34(D), CD45(E).

MSCs were positive for CD29 (99.0%)(A), CD90 (88.3%)(B), and CD44 (35.7%)(C), but negative for CD34 (0.8%)(D) and CD45 (2.1%)(E)

2.2 LV-miR-499 转染效果检测

实时荧光定量 PCR 检测 miR499 的 mRNA 表达水平。结果显示:LV-miR-499 MSCs 中 mRNA 表达水平约是 LV-miR-NC MSCs 中的 16.5 倍(18.20 ± 0.60 vs 1.10 ± 0.07),表明转染 miR499 后, MSCs 中 miR499 表达水平明显上调, LV-miR-499 MSCs 转染成功 (图 2)。

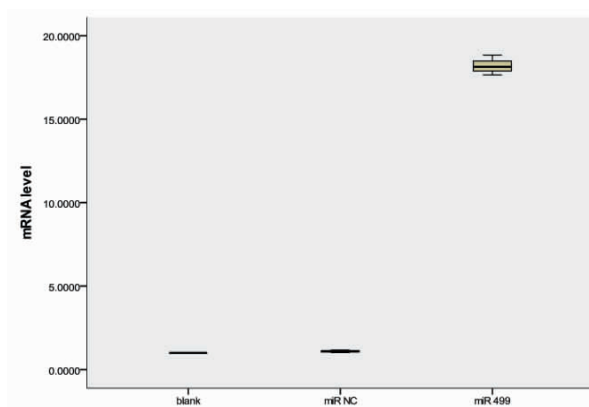


Fig.2 MiR 499 mRNA level of MSCs after LV-miR-499 transfection.

The mRNA of miR-499 in MSCs was increased by 16.5-fold when compared with cells infected with empty lentiviral vectors (18.20 ± 0.60 vs 1.10 ± 0.07)

2.3 LV-miR-499 转染促进心肌特异性转录因子表达

采用实时荧光定量 PCR 检测转染后 0、1、3、5、7 天心肌特

异性转录因子 NKx2.5, GATA4 及 MEF2C 表达。结果表明: LV-miR-499 转染组 MSCs 中心肌特异性转录因子表达逐渐增强,其中自第三天起表达逐渐明显。LV-miR-NC 转染组 MSCs 中未见明显动态递增变化 (图 3A-Q)。

2.4 LV-miR-499 转染促进心肌特异性肌钙蛋白表达

采用 western-blot 检测转染后 0、1、3、5、7 天心肌特异性肌钙蛋白表达。LV-miR-499 转染 MSCs 组自第三天起可见检测到杂交条带,并随时间逐渐加强; LV-miR-NC 转染 MSCs 组于各个时间点未能检测到杂交条带 (图 4)。

3 讨论

干细胞之所以能引起人们对它的广泛关注,是因为干细胞在成熟组织中能够更新、修复已死亡或损伤的细胞,具有向多方向分化产生不同组织细胞的能力^[23]。其中骨髓来源 MSCs 因其取材方便、异体移植排斥程度低,目前被认为是较有希望成为替代治疗的干细胞。虽然 MSC 在骨髓中的含量很低,但其在塑料表面快速贴壁的特性使其容易进行分离。本研究采用直接贴壁筛选法分离骨髓来源间充质干细胞。此方法操作简易,对细胞损伤小,污染机会少,经传代后可获得较均一的 MSCs。流式细胞术检测第 3-5 代 MSC 表达 CD 90、CD 44、CD 29 等整合素家族成员、黏附分子等,不表达 CD 34、CD 45 等造血细胞、内皮细胞相关抗原,符合流式细胞术的鉴定标准。

1995 年 Wakitani 等首先证实骨髓基质干细胞可在 5- 氮杂胞苷的诱导下分化为成肌细胞^[4], 1999 年 Makino 等应用 5- 氮

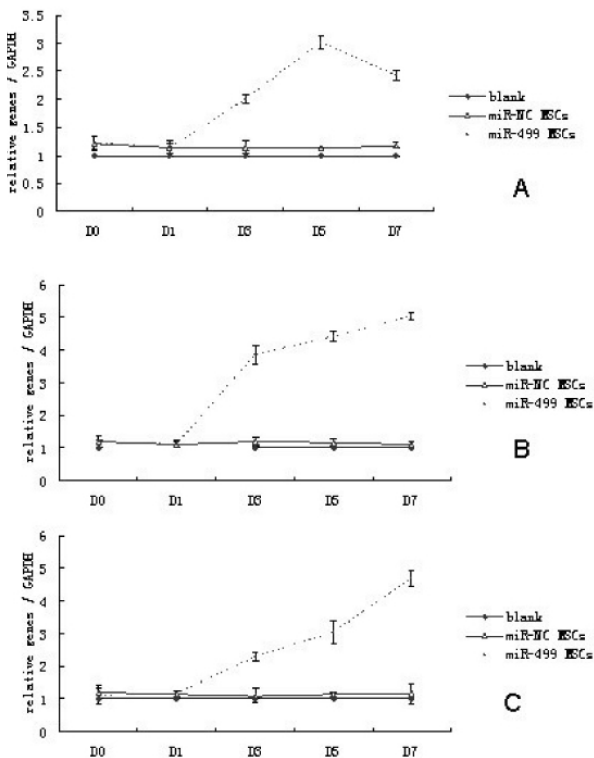


Fig.3 Cardiac specific genes level of MSCs after miR-499 transfections: NKX2.5 (3A), MEF2C (3B) and GATA4 (3C)

The mRNA levels of NKX2.5 (3A), MEF2C (3B) and GATA4 (3C) were increased gradually up to day 7 with a significant increase at day 3 post LV-miR-499 infection, respectively. mRNA level of empty lentiviral vectors transfected (LV-miR-NC) MSCs were as low as those of blank control

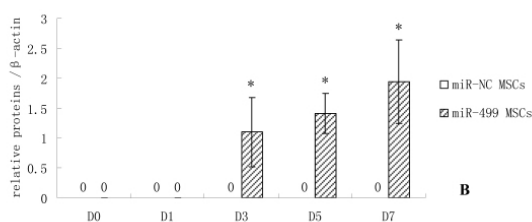
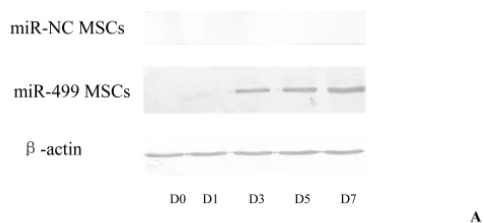


Fig.4 cTnI expression of MSCs after miR-499 transfections

4A: western-blot result. cTnI levels of MSCs were increased gradually up to day 7 with a significant increase at day 3 post LV-miR-499 infection, respectively. cTnI level before day 3 and those of LV-miR-NC MSCs cannot be detected

4B: Statistical analysis by the SPSS 18.0. #compare with LV-miR-NC MSCs, $P < 0.05$

杂胞诱导小鼠骨髓基质细胞后发现约 30%骨髓基质细胞分化成心肌样细胞^[5]。随后的一些研究也证实了 MSCs 分化为心

肌细胞的可能性^[26-28]。然而体内研究报道相对较少,虽然也有研究表明 MSCs 也具有在体内横向分化为心肌样细胞的可能性。Toma 等把人骨髓间充质干细胞注射到免疫缺陷鼠的心脏,观察到间充质干细胞分化为心肌样细胞,并表达一定的心肌标志物^[29]。Orlic 等发现移植骨髓细胞术后 9 天,部分梗死区域被新形成的心肌细胞占据,证明局部输注的骨髓细胞可以向心肌细胞分化^[30]。

近来研究表明 miR-499 可以诱导胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、心肌干细胞 (cardiac stem cells, CSCs) 等细胞心肌分化的能力^[33]。本结果表明, miR-499 可以诱导 MSCs 在体外向心肌样细胞分化。MSCs 转染 LV-miR-499 后, miR-499 表达升高,同时检测到与心肌细胞分化密切相关的早期转录因子 Nkx2.5, GATA4 和 MEF2C 以及特异性肌钙蛋白的表达。本研究结果与我们此前的预想相符,并且也与现有的国内外研究结果相一致。

microRNAs 是一类高度保守的 18 至 22 个碱基长度的非编码小 RNA。自 1993 年首次报道以来,大量 miRNAs 在不同物种相继发现。它通过降解 mRNA 或抑制蛋白质翻译而调控基因的表达。生物信息学分析表明,人类约 1/3 的基因受 miRNAs 调控。近来研究发现, miRNAs 在心血管病理、生理过程中起了非常重要的调控作用。它参与了心脏发育、心脏重塑、心律失常和血管病变等过程。miRNAs 具有丰富的调控网络,每个 miRNA 拥有众多的靶基因,同样每个 miRNA 的生成也受多个转录因子的调控。miR-499 是新近发现的与心脏发育密切相关、只在心肌、骨骼肌中表达的肌特异性表达,在心脏发育、肌分化过程中起重要调控作用的肌特异性 miRNA。其在心脏发育过程中表达逐渐上调,直至发育成熟,维持在一个高水平。

本研究首次证明 miR-499 诱导 MSCs 分化为心肌样细胞,然而这与真正意义上的心肌细胞尚有差距。本研究尚未检测细胞形态学以及电生理特性的改变。此外,本研究仅探讨 miR-499 诱导 MSCs 分化为心肌样细胞的体外作用,尚未进行其转染 MSCs 后回输体内对心肌分化作用的检测。因此, miR-499 在 MSCs 向心肌样细胞分化过程中的作用及机制尚需深入研究。研究 miR-499 对于阐述心脏发育、心肌分化具有重大的理论及临床意义。

4 致谢

本项目为心肌梗死机理与诊疗技术省部共建教育部重点实验室(哈尔滨医科大学)开放基金项目,课题编号:KF201004。

参考文献 (References)

- [1] Caplan AI. Mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1991, 9: 641-650
- [2] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276: 71-74
- [3] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. Science, 1999, 284: 1168-1170
- [4] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. 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]. J Clin Invest, 1999, 103: 697-705
- [6] Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction [J]. Ann Thorac Sur, 2005, 80: 229-236; discussion 236-237
- [7] Agbulut O, Menot ML, Li Z, et al. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res, 2003, 58: 451-459
- [8] Gnechi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy[J]. Circ Res, 2008, 103: 1204-1219
- [9] Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? [J]. RNA, 2005, 11: 1753-1761
- [10] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: The big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309: 1519-1524
- [11] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: 1290-1297
- [12] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303: 83-86
- [13] Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Exp Hematol, 2011, 39: 608-616
- [14] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 38: 228-233
- [15] Anderson C, Catoe H, Werner R. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 5863-5871
- [16] Sun Q, Zhang Y, Yang G, et al. Transforming growth factor-beta regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 2690-2699
- [17] Naguibneva I, Ameyar ZM, Poleskaya A, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8: 278-284
- [18] Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development[J]. Genes Dev, 2007, 21: 71-84
- [19] Kloosterman WP, Steiner FA, Berezikov E, et al. Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 2558-2569
- [20] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. Cell, 2007, 129: 1401-1414
- [21] Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues [J]. BMC Genomics, 2007, 8: 166-169
- [22] Reddy AM, Zheng Y, Jagadeeswaran G, et al. Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 65-69
- [23] Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30: 859-868
- [24] van Rooij E, Quat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance[J]. Dev Cell, 2009, 17: 662-673
- [25] Bell ML, Buoli M, Leinwand LA. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its Myosin Host Gene by Exon Skipping[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30: 1937-1945
- [26] Moscoso I, Centeno A, Lopez E, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation[J]. Transplant Proc, 2005, 37: 481-482
- [27] Yoon J, Min BG, Kim YH, et al. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model[J]. Acta Cardiol, 2005, 60: 277-284
- [28] Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro[J]. Exp Biol Med, 2004, 229: 623-631
- [29] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation, 2002, 105: 93-98
- [30] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001, 410: 701-705
- [31] Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, et al. Human Cardiac Stem Cell Differentiation Is Regulated by a MicroRNA Mechanism[J]. Circulation, 2011, 123: 1287-1296
- [32] Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, et al. Dynamic MicroRNA Expression Programs During Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: Role for miR-499[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3: 426-435
- [33] Fu JD, Rushing SN, Lieu DK, et al. Distinct Roles of MicroRNA-1 and -499 in Ventricular Specification and Functional Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes [J]. PLoS One, 2011, 6: 27417-27419