

加味丹参饮体外诱导骨髓间充质干细胞向 心肌样细胞分化的实验研究

韩析言

(上海市浦东新区东方医院, 上海 200120)

【摘要】 目的 探讨加味丹参饮体外诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells BMSCs)向心肌样细胞分化的实验研究。**方法** 采用贴壁法获取大鼠 BMSCs, 流式细胞术检测细胞表面抗原。MTT 法检测加味丹参饮对 BMSCs 最大无毒浓度, 用第 3 代细胞分组诱导: 正常对照组, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组, 应用 western blot 检测各组细胞结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC), 心肌肌钙蛋白 T(cTnT) 蛋白表达, RT-PCR 法检测各组细胞 GATA-4, 缝隙连接蛋白 43(CX43)及 Nkx2-5 mRNA 表达。**结果** 大鼠 BMSCs 表面 CD90 阳性率高于 95%, CD34 及 CD45 阳性率低于 5%。加味丹参饮对 BMSCs 最大无毒浓度为 0.625 g/L。与正常对照组比较, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量上调, GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量上调, GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 加味丹参饮能够诱导 BMSCs 向心肌样细胞转化, 与 5-氮胞苷联合给药具有协同作用。

【关键词】 加味丹参饮; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞; 5-氮胞苷; 分化

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0043-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.008

Experimental study of Jiawei Danshen Yin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardium-like cells in vitro

HAN Xi-yan

(The Oriental Hospital of Pudong, Shanghai 200120, China)

【Abstract】 Objective To explore experimental study of Jiawei Danshen Yin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into myocardium-like cells in vitro. **Methods** Rat BMSCs were isolated by adherent method, and their surface antigen were detected by flow cytometry. The maximal non-toxic concentration of Jiawei Danshen Yin was measured by MTT method. The isolated and purified BMSCs were divided into four groups: normal control group, Jiawei Danshen Yin group, 5-azacitidine group, Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The expression of desmin, α -myosin heavy chain (α -MHC) and cardiac troponin T (cTnT) protein was detected by western blot. The expression of GATA-4, gap junction connexin 43 (CX43) and Nkx2-5 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The percentage of

CD90 positive cells in the rat BMSCs was higher than 95% , and the proportions of CD34 positive and CD45 positive cells was lower than 5% . The maximum toxic concentration of Jiawei Danshen Yin on BMSCs was 0.625 g/L. Compared with the normal control group, the expression of desmin, α -MHC and cardiac cTnT protein was up-regulated, the expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA was up-regulated in Jiawei Danshen Yin group, 5-azacitidine group and Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with Danshen Yin group or 5-azacitidine group, the expression of desmin, α -MHC and cardiac cTnT protein was up-regulated, the expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA was up-regulated in Jiawei Danshen Yin plus 5-azacitidine group. The difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Jiawei Danshen Yin could induce BMSCs differentiation into myocardium-like cells, which had a synergistic effect with 5-azacitidine.

【Key words】 Jiawei Danshen Yin; Bone marrow mesenchymal stem cells; Myocardium-like cells; 5-azacitidine; differentiation

冠心病是危害人类健康的世界性问题,在治疗中所产生的心肌缺血再灌注,使得心肌损伤严重,心肌细胞数量减少,并最终发展为缺血性心力衰竭甚至死亡^[1-4]。近年来研究发现骨髓间充质干细胞(BMSCs),胚胎干细胞等外源性干细胞对于心肌、肝、肾等器官缺血再灌注损伤具有显著的治疗效果^[5-7]。其中 BMSCs 是一种来源于中胚层的间充质干细胞,1976 年由 Friedenstein 等发现,1991 年由 Caplan 正式命名。BMSCs 存在于骨髓、肝脏、脐带及胎盘等组织器官中,具有自我更新,多向分化潜能,亦具有低免疫源性,易获取、易扩增、易保存等特点,可以在不同诱导因子及环境下分化为心肌细胞,软骨细胞,成骨细胞,脂肪细胞,神经元细胞等多种组织细胞,可塑性极强^[5-7]。同时近年来研究还发现三七总皂苷,黄芪甲苷,加味丹参饮,淫羊藿苷等中医药能够与 BMSCs 共培养,从而提高 BMSCs 的诱导分化能力,并且二者在移植过程中发挥了减毒增效的作用^[5,7]。其中加味丹参饮是黄政德教授在清代陈念祖《时方歌括》中丹参饮药方中演化出来的,临床上已用于治疗血瘀证不稳定心绞痛,缺血性心肌病并等^[8-9],药理实验也表明加味丹参饮诱导的 BMSCs 移植能显著改善大鼠心肌缺血再灌注损伤(IRI)^[10-11]。而结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC),心肌肌钙蛋白 T(cTnT),GATA-4,缝隙连接蛋白 43(CX43)及 Nkx2-5 是心肌特异性蛋白,促进上述蛋白的表达,能一定程度上的恢复心肌细胞形态及数量。

1 材料和方法

1.1 实验动物

100 $\pm$ 20 g 的 SD 雄性大鼠 20 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012 -

0002】。所有大鼠均在同济大学附属东方医院动物实验室【SYXK(沪)2016 - 0001】清洁环境下饲养观察,适应性喂养 1 周后使用。

1.2 主要试剂及仪器

5-氮胞苷购自美国 sigma 公司;兔抗结合蛋白(Desmin), α -肌球蛋白重链(α -MHC)多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗心肌肌钙蛋白 T(cTnT)多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;FITC 标记 CD34,CD45,CD90 抗体购自加拿大 Cedarlane 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),胎牛血清,DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;BCA 试剂盒,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司;trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪购自北京六一仪器厂;ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司;Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 公司。

1.3 大鼠骨髓来源的 MSCs 的分离、培养及纯化^[12-14]

将 SD 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠进行麻醉后脱颈处死,75% 乙醇消毒体表,PBS 冲洗后置于超净台,取下胫骨和股骨,并剔除周围结缔组织,PBS 冲洗。组织钳剪掉胫骨和股骨的骨端,使骨髓腔暴露,利用 7 号针头穿刺,反复用含 DMEM 培养基冲洗骨髓腔,收集冲洗液,1500 r/min,离心 10 min,并用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬,以 1×10^6 /mL 密度接种于 50 cm² 培养瓶中,在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。48 h 首次换液,去除未贴壁细胞,以后每隔 3 d 换液,并每日于倒置显微镜下观察细胞生长状态及拍照。重复上述操作,当细胞生长密度达到 80% ~ 90% 的时候,进行 1:2 传代,传代到第

3 代。

1.4 BMSCs 表面抗原鉴定

取生长密度达到 80 ~ 90% 的第 3 代 BMSCs 细胞, 0.25% 胰酶消化后配制成单细胞悬液, 将 Falcon 管编号, 并按顺序加入 FITC 荧光标记的 CD34, CD45, CD90 单克隆抗体 20 μ L, 室温孵育 20 ~ 30 min, PBS 洗涤未标记抗体, 并离心, 最后 1 mL PBS 重悬细胞, 并用 4% 多聚甲醛固定, 在流式细胞仪上检测上述抗原表达。

1.5 加味丹参饮提取物的获取^[10]

加味丹参饮由丹参 20 g, 檀香 6 g, 川芎 6 g, 当归 6 g, 红花 6 g, 赤芍 10 g, 生地黄 12 g 组成。所有药材均由我院药剂科提供。将上述药材按比例称取 250 g, 并回流提取 2 次, 时间依次为 2 h, 1 h, 提取液于 37℃ 恒温水浴箱中浓缩, 并 1200 r/min, 离心 15 min, 同时于无菌条件下, 用 0.22 μ m 膜过滤, 收集滤液, 并用培养基调整生药浓度为 1 g/mL, 4℃ 冰箱保存备用。

1.6 MTT 法检测加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性

取生长密度达到 80% ~ 90% 的第 3 代 BMSCs 细胞, 0.25% 胰酶消化后配制成单细胞悬液, 并以 5×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 实验组分别每孔加入 20 μ L (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019) g/L, 后加入含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 180 μ L, 另设细胞对照组, 只含细胞及 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L, 同时设空白对照组, 不含细胞, 只有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L。每个浓度设 4 个复孔。培养 48 h 后, 加入 50 μ L $1 \times$ MTT, 4 h 后弃上清液, 每孔加 150 μ L DMSO, 在 570 nm 波长处检测每孔的光密度 (OD 值), 细胞增殖抑制率 = (细胞对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / (细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.7 实验分组

将第 3 代的 BMSCs 诱导分组: 总共 4 组, 第 1 组为正常对照组 (只含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基), 第 2 组为加味丹参饮组 (加味丹参饮提取物最大无毒浓度), 第 3 组为 5-氮胞苷组 (5-氮胞苷 10 μ mol/L), 第 4 组为 (加味丹参饮提取物最大无毒浓度 + 5-氮胞苷 10 μ mol/L)。24 h 去除培养基, PBS 洗涤后, 按上述分组进行诱导培养, 72 h 后, 进

行 western blot 及 RT-PCR 实验。

1.8 Western blot

按“1.7”分组诱导细胞后, 收集细胞, 加入 RAPI 裂解液裂解细胞 30 min, 1200 r/min 离心 10 min, 收集的上清液即是蛋白样品。BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白煮沸变性 10 min, 定量, 上样, 进行 SDS 凝胶电泳 1 ~ 2 h, 湿法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。次日加二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 并滴加 ECL 曝光液, 于凝胶成像系统曝光。用“Quantity one”软件分析各蛋白灰度值。

1.9 RT-PCR

按“1.7”分组诱导细胞后, 收集细胞, 参考 trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 并利用紫外分光光度计检测 RNA 纯度。采用一步法 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA, 接着扩增, 最后将获得的扩增产物用于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并拍照。引物分别加入 25 μ L PCR 反应体系中, 反应条件为 94℃ 变性 45 s, 59℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 35 个循环。引物如下, GATA-4 上游引物: 5'-CCAACTGCCAGACTACCACC-3', 下游引物: 5'-CAAACCCAGCACCTTATCC-3'。CX-43 上游引物: 5'-CTATGTGATGCGAAAGGA-3', 下游引物: 5'-AGGAAACAGTCACCTGA-3'。Nkx2-5 上游引物: 5'-CCGAGCTCCAGGAGAAGGCGAGA-3', 下游引物: 5'-GCTCTAGAGGTCCTGTTGGGTCCGT-3'。GAPDH 上游引物: 5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3', 下游引物的: 5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.10 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析, 并用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间经 *t* 检验显著性差异, 以 $P < 0.05$ 作为有显著性差异。

2 结果

2.1 BMSCs 形态学变化

原代细胞刚接种时呈圆形亮点, 悬于培养液中, 24 h 大部分贴壁。48 h 首次换液, 去除未贴壁细胞, 此时细胞形态不一, 有小突起, 呈多角形, 短梭形或者多边形。5 ~ 6 d 细胞增殖迅速, 大部分呈扁平状。10 ~ 12 d 细胞融合呈单层。传代到第 3 代, 细胞形态较为一致, 呈纺锤形, 并平行样或漩涡样生长 (如图 1 所示)。

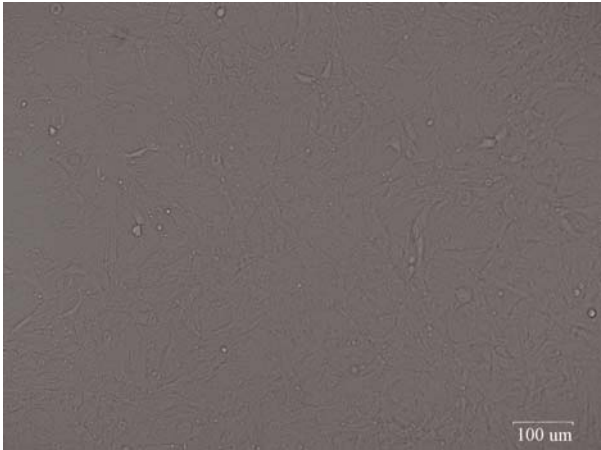


图 1 BMSCs 形态学(第 3 代)
Fig. 1 The morphology of BMSCs (the third-passage)

2.2 BMSCs 表面抗原鉴定

如图 2 所示,经流式细胞术检测结果表明细胞表面抗原 CD90 阳性率高于 95%,CD34 及 CD45 阳性率低于 5%,从而说明本实验获得高纯度的

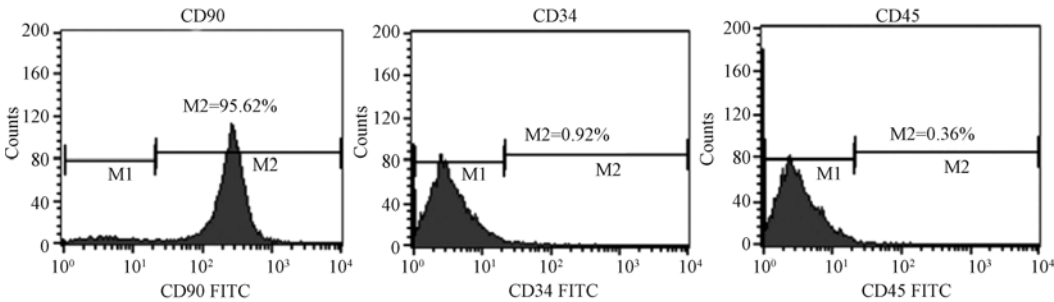


图 2 BMSCs 表面抗原鉴定
Fig. 2 Results of BMSCs surface antigen identification

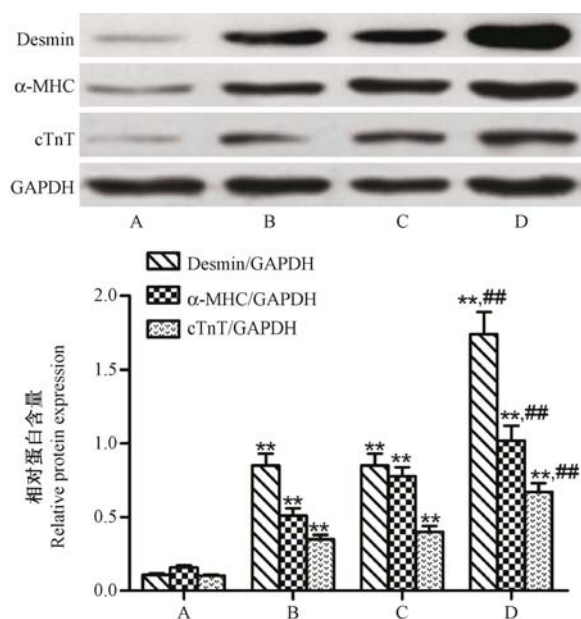
表 1 加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Cytotoxicity of BMSCs by Jiawei Danshen Yin ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度(g/L) Drug dose (g/L)	OD 值 OD value	抑制率(%) Inhibitory rate (%)
10	0.6429 ±	45.93
5	0.8024 ±0.0129	31.37
2.5	0.9347 ±0.0313	19.30
1.25	1.0463 ±0.0320	9.11
0.625	1.1632 ±0.03046	-1.55
0.312	1.2534 ±0.04727	-9.78
0.0156	1.2373 ±0.03962	-8.31
0.078	1.2042 ±0.0274	-5.29
0.039	1.1826 ±0.0195	-3.65
0.019	1.7305 ±0.03901	-3.32
细胞对照组 cell control group	1.1462 ±0.0296	0
空白对照孔 blank control group	0.0504 ±0.0049	-

BMSCs,能用于后续实验。
2.3 加味丹参饮对 BMSCs 的细胞毒性
如表 1 所示,当加味丹参饮提取物浓度高于 1.25 g/L,且随着药物浓度的增高,细胞增殖抑制率逐渐提高,而当加味丹参饮提取物浓度低于 0.625 g/L,且随着药物浓度降低,细胞增殖抑制率降低,且在此浓度时,细胞增值率为 -1.55%,即为加味丹参饮提取物对细胞无毒性最大浓度。
2.4 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白的表达

如图 3 所示,与正常组比较,加味丹参饮组,5-氮胞苷组及加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著提高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较,加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著提高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注: A: 正常对照组; B: 加味丹参饮组; C: 5-氮胞苷组; D: 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组。与正常对照组比较, $^{**}P < 0.01$; 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

图 3 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 Desmin, α-MHC 及 cTnT 蛋白的表达

Note: A: normal control group; B: Jiawei Danshen Yin group; C: 5-azacitidine group; D: Jiawei Danshen Yin + 5-azacitidine group. Compared with normal control group, $^{**}P < 0.01$; Compared with Jiawei Danshen Yin group or 5-azacitidine group, $^{##}P < 0.01$

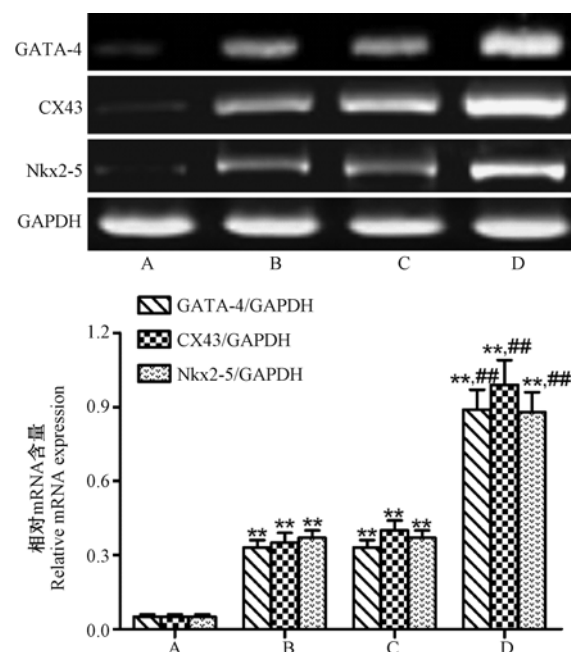
Fig. 3 Expression of Desmin, α-MHC and cTnT protein in BMSCs of each group

2.5 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 的表达

如图 4 所示, 与正常组比较, 加味丹参饮组, 5-氮胞苷组及加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 表达量显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤在中医学中归属于“胸痹心痛”“真心痛”等范畴。因此许多学者将中医药同 BMSCs 等干细胞相结合, 借助中药多靶点, 毒副作用小, 在 BMSCs 的增殖, 分化及移植过程中发挥减毒增效作用, 通过提高 BMSCs 体外存活率, 促进 BMSCs 增殖, 并诱导 BMSCs 定向分化, 减少 BMSC



注: A: 正常对照组; B: 加味丹参饮组; C: 5-氮胞苷组; D: 加味丹参饮 + 5-氮胞苷组。与正常对照组比较, $^{**}P < 0.01$; 与加味丹参饮组或 5-氮胞苷组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

图 4 加味丹参饮诱导后 BMSCs 中 GATA-4, CX43 及 Nkx2-5 mRNA 的表达

Note: A: normal control group; B: Jiawei Danshen Yin group; C: 5-azacitidine group; D: Jiawei Danshen Yin + 5-azacitidine group. Compared with normal control group, $^{**}P < 0.01$; Compared with Jiawei Danshen Yin group or 5-azacitidine group, $^{##}P < 0.01$.

Fig. 4 Expression of GATA-4, CX43 and Nkx2-5 mRNA in BMSCs of each group

移植过程中的毒副作用及不良反应^[5, 7]。中医药如三七总皂苷, 丹酚酸 B, 淫羊藿苷, 黄芪甲苷, 加味丹参饮在 BMSCs 定向分化为心肌细胞中起重要作用^[5-7]。其中加味丹参饮是黄政德教授结合自身经验, 并参考清代经典名方《时方歌括》中的丹参饮从而演化出来的, 其方主要包括丹参入血, 檀香行气化滞, 生地黄, 当归正濡养之本, 全方具有行气活血, 通络止痛之功效。临床上已证实加味丹参饮对血瘀证不稳定心绞痛具有显著改善作用^[8], 此外黄政德教授课题组还发现加味丹参饮能够联合动员大鼠骨髓干细胞, 从而提高心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌功能及治疗作用, 另外还发现加味丹参饮血清诱导的 BMSCs 移植对于心肌缺血再灌注大鼠具有显著的治疗作用, 与促进大鼠坏死心肌组织心肌特异性蛋白表达有关^[10-11]。从而说明加味丹参饮能够通过诱导 BMSCs 向心肌细胞分化, 进而恢复坏死

心肌细胞数量,达到心肌 IRI 治疗作用。

本研究首先通过贴壁法培养纯化大鼠 BMSCs,并通过流式细胞术检测 BMSCs 纯度,流式细胞术结果显示造血前体细胞标志抗原 CD34 及白细胞标志抗原 CD45 阳性率皆小于 5%,而 CD90 阳性率高于 95%,说明我们获得了高纯度的 BMSCs,可以用于后续的实验研究。我们采用 MTT 法检测不同浓度加味丹参饮[(10,5,2.5,1.25,0.625,0.312,0.156,0.078,0.039,0.019)g/L]对 BMSCs 的细胞毒性,结果表明 0.625 g/L 是加味丹参饮提取物对 BMSCs 的最大无毒性浓度,所以此浓度被我们用于后续研究。同时 5-氮胞苷是国内外通用的 BMSCs 定向诱导成心肌细胞的诱导剂,其是一种去甲基化合物,在一定剂量范围能显著的诱导 BMSCs,并移植到缺血心肌,从而提高 BMSCs 向心肌迁移及分化的能力^[15-17]。因此 5-氮胞苷被我们用来作为阳性对照。

Desmin, α -MHC, cTnT, CX43 是心肌特异性蛋白,其中 Desmin 是一种中间丝蛋白,是肌细胞中肌丝的主要成分,在肌纤维形态,细胞核与细胞膜连接,及肌小节信号间传递中起重要作用。 α -MHC 是肌球蛋白的重链,其表达水平是 BMSCs 等干细胞分化成心肌细胞的重要标志^[18]。cTnT 是心肌胶原纤维主要的收缩调节蛋白,能够调节粗、细肌丝的滑行,是检测心肌源性细胞的特异标志物。CX43 主要存在于心房及心室内,能够与桥粒,中间连接组成闰盘,当 CX43 呈阳性表达,说明心肌细胞具有闰盘结构,能够维持细胞间化学信号传递及信息交流,并能维持心肌细胞电生理活动,对心肌功能的发挥起重要作用^[19]。因此检测上述心肌特异性蛋白的表达,能一定程度上反映加味丹参饮诱导 BMSCs 分化成心肌细胞的能力,western blot 及 RT-PCR 结果表明与正常对照组比较,加味丹参饮组,5-氮胞苷组及加味丹参饮+5-氮胞苷组 Desmin, α -MHC 及 cTnT 蛋白表达量显著上调, CX43 mRNA 表达量显著上调,且联合作用组优于单独给药组,说明加味丹参饮具有显著诱导 BMSCs 向心肌细胞分化的能力,且与 5-氮胞苷具有协调作用。

另外 GATA-4 是与心脏发育密切相关的转录因子,最早在心前期中胚层表达,后表达于心内膜和心肌中,对心肌细胞的发生分化起调节作用。有研究显示 GATA-4 阳性表达是胚胎干细胞向心肌细胞分化的启动因素,是心肌细胞发育的前提条件,是心肌前体细胞最早标志之一^[20]。Nkx-2.5 也是心

肌前体细胞的标志基因之一,与 GATA-4 之间存在相互调控作用,能共同调节心脏发育,心肌发生等过程^[21]。有研究证实外源性表达 Nkx2-5 基因能够诱导 P19 细胞向心肌细胞分化,同时上调 GATA-4, α -MHC, cTnT 等心肌特异性蛋白表达^[22]。因此本研究进一步通过 RT-PCR 检测 GATA-4 及 Nkx-25 mRNA 表达,结果证实加味丹参饮及 5-氮胞苷单独或者联合诱导皆能上调 GATA-4 及 Nkx-25 mRNA 表达。

参考文献:

- [1] 郭东梅,胡蓉.冠心病新的危险因素研究进展[J].重庆医学,2011,40(24):2462-2465.
- [2] 邱少波,梁燕.中药复方防治心肌缺血再灌注损伤作用机制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2012,19(11):102-105.
- [3] 李宁,李应福,谢兴文,等.中药诱导骨髓间充质干细胞的定向分化:研究与进展[J].中国组织工程研究,2016,20(1):135-139.
- [4] 刘金峰,凌斌.骨髓间充质干细胞对心肌梗死治疗的研究进展[J].中国医学科学院学报,2015,37(1):108-112.
- [5] 王艳,王海萍,吕洋.中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化[J].中国组织工程研究,2014,18(1):155-160.
- [6] 唐梅森,黄政德,向忠军,等.加味丹参饮联合西药治疗冠心病心绞痛心血瘀阻证 68 例疗效观察[J].中医杂志,2015,56(5):395-397.
- [7] 杨春花,王庆高,何晓琳.加味丹参饮防治缺血心肌损伤研究概况[J].广西中医药大学学报,2013,16(4):73-75.
- [8] 吴若霞,汪云鑫,陈辉,等.加味丹参饮含药血清诱导 BMSCs 移植 IRI 大鼠对心肌 bFGF 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):238-242.
- [9] 李鑫辉,黄政德,葛金文,等.加味丹参饮对心肌 IRI 大鼠骨髓干细胞动员作用的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(6):723-725.
- [10] 王佳南,张晓刚,汤为学,等.大鼠骨髓间充质干细胞的原代培养条件[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(14):2740-2745.
- [11] Su X, Ling Y, Liu C, et al. Isolation, Culture, Differentiation, and Nuclear Reprogramming of Mongolian Sheep Fetal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells [J]. Cell Reprogram, 2015, 17(4): 288-296.
- [12] Liu HJ, Hu RY, Dai WJ, et al. Culture and Identification of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Enhanced Green Fluorescent Protein-transgenic Rats [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2016, 38(1): 9-15.
- [13] Pirayei A, Soleimani M, Heidari MH, et al. Ultrastructural maturation of human bone marrow mesenchymal stem cells-derived cardiomyocytes under alternative induction of 5-azacytidine [J]. Cell Biol Int, 2015, 39(5): 519-530.

(上转第 5 页)

- p1.5[J]. Anim Genet, 1993, 24(2): 129-131.
- [5] Larsen N J, Nielsen V H. Apa I and Cfo I polymorphisms in the porcine growth hormone gene[J]. Anim Genet, 1993, 24(1): 71.
- [6] 王玉珏, 岳敏, 顾阳, 等. 西藏小型猪 GH 基因部分序列的 SNP 分析[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(1): 50-54.
- [7] 杨晓静. 猪骨骼肌生长及肌纤维类型分布的分子机理研究[D]. 南京, 南京农业大学, 2004.
- [8] Magri K A, Adano M, Leroith D, *et al.* The inhibition of insulin action and glucose metabolism by porcine growth hormone in porcine adipocytes is not the result of any decrease in insulin binding or insulin receptor kinase activity[J]. Biochem J, 1990, 226(1): 107-113.
- [9] 单艳菊, 束婧婷, 徐文娟, 等. 不同鸭种胚胎期和出雏早期生长轴 GH、GHR 和 IGF-I 基因 mRNA 差异表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 421-427.
- [10] 闫云峰, 杨华, 杨永林, 等. 萨福克羊 GH 和 IGF-I 基因组织表达水平的分析[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(4): 18-28.
- [修回日期] 2016-07-12

(下接第 48 页)

- [14] 洗绍祥, 杨忠奇, 秦佳佳, 等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化及黄芪甲苷的协同作用(英文)[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10): 1861-1865.
- [15] 郑学峰. 5-氮胞苷诱导脐带间充质干细胞分化为心肌细胞表达 cTnI 的研究[J]. 现代预防医学, 2012, 39(23): 6264-6265.
- [16] 魏晋, 牟晓宁, 马跃, 等. 一种新的分化心肌细胞筛选策略: 稳定表达 α MHC-Bla ~ r-2A-EGFP-Rex-mCherry-2A-neo 融合基因的人胚胎干细胞系的建立及其向心肌细胞定向分化的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 276-282.
- [17] Chen XP, Lu SJ, Huang K, *et al.* Effects of Ang perfusion on transmural heterogeneous of Cx43 in acute myocardial ischemia reperfusion[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(1): 96-99.
- [18] Xu M, Millard RW, Ashraf M. Role of GATA-4 in differentiation and survival of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 111: 217-241.
- [19] Gao XR, Tan YZ, Wang HJ. Overexpression of Csx/Nkx2.5 and GATA-4 enhances the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation after myocardial infarction[J]. Circ J, 2011, 75(11): 2683-2691.
- [20] 张金平, 王慧娟, 史玉兰, 等. Nkx2-5 基因诱导 P19 细胞分化中心肌标志物的表达[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(12): 2658-2662.
- [21] Peterkin T, Gibson A, Patient R. GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation[J]. EMBO J, 2003, 22(16): 4260-4273.
- [22] Jamali M, Karamboulas C, Rogerson PJ, *et al.* BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis[J]. FEBS Lett, 2001, 509(1): 126-130.
- [修回日期] 2016-05-23