文章编号:1000-5404(2006)06-0507-05

论著

基质干细胞及明胶微载体植入大鼠心脏的研究

常 静,雷 寒,贾锋鹏 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

提 要: 目的 探讨将来源于人类胚胎肝脏的基质干细胞(human fetal liver-delivered mesenchymal stem cells, HFMSCs)及明胶多孔微载体植入正常心肌组织促使心肌及微循环再生的可行性。**方法** 将SD大鼠分为细胞植入组($n=9$)、微载体植入组($n=9$)和对照组($n=4$),分别在左心室室壁内注射80~100 μl含HFMSCs的perfadex溶液、含微载体的perfadex溶液或单纯perfadex溶液。用超声心动图评定移植前后大鼠心脏功能,并分别于术后7、14 d取出心肌组织作原位杂交、HE染色、免疫组化染色及混合淋巴细胞培养(MLC)。**结果** 细胞植入7 d后,心脏功能有显著的增加,原位杂交显示,有较多细胞在心肌组织中存活,但免疫组化染色未发现植入细胞向心肌细胞方向的分化;至移植后第14天,移植细胞从心肌组织中消失,在注射局部发现大量巨噬细胞浸润,而体外MLC证实,此时HFMSCs有诱导SD大鼠内淋巴细胞增殖的效应。微载体植入7、14 d后,心脏功能无明显增加,微载体仍集中在注射部位,并保持原有形状,其上有较多细胞生长贴附,免疫组化染色显示,这些细胞既不是心肌细胞,也不是毛细血管。**结论** HFMSCs植入正常大鼠心脏组织中能短期存活并促进心脏功能增加,但因慢性免疫排斥反应,移植细胞在发生心肌分化之前在体内逐渐消失;明胶多孔微载体植入正常心肌组织后,不能促进心脏功能增加,也不能促使心肌及其微循环生长于其中。

关键词: 基骨质干细胞;明胶多孔微载体;心肌再生;微循环再生
中图法分类号: R-322;R322.11;R329.2 **文献标识码**: A

Transplantation of mesenchymal stem cells and gelatin porous microcarriers into normal rat heart tissue

CHANG Jing, LEI Han, JIA Feng-peng (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of transplantation of human fetal liver-delivered mesenchymal stem cells (HFMSCs) and porous microcarries into normal heart tissue and whether it can improve heart function and regeneration of heart tissue. **Methods** SD rats were divided into HFMSCs injection group ($n=9$), microcarrier injection group ($n=9$) and control group ($n=4$), in which 80 – 100 μl Perfadex with HFMSCs or gelatin porous microcarriers or pure Perfadex was injected into the wall of left ventricle. Heart function was evaluated by UCG before and 7 d after transplantation. On day 7, 14, the survival of HFMSCs was tested by fluorescent *in situ* hybridization (FISH), regeneration or cardiac differentiation by immunohistological staining against desmin, tropomyosin and lectin, cellular immune response by the infiltration of macrophages, and lymphocyte reaction to HFMSCs by mixed lymphocyte culture (MLC) *in vitro*. **Results** Seven days after injection, the HFMSCs survived and improved the heart function, though no sign of differentiation into cardiomyocytes was seen. On day 14, a large amount of macrophages infiltrated into injection sites, and MLC showed prominent enhancement of proliferation of lymphocytes, when no transplanted cells were detected in the myocardium. On day 7, 14, the microcarriers retained their round shape at the injection sites and were attatched by a large quantity of cells which were proven not cardiomyocytes or capilaries by immunohistological staining. **Conclusion** Transplantation of HFMSCs into normal heart improves heart function by short-period survival without

基金项目:WHO奖学金资助项目(2003)
Supported by the Scholarship of WHO (2003)
作者简介:常 静(1969-),女,山西省长治市人,博士,主治医师,主要从事心肌细胞移植方面的研究。电话:(023)89012949
通讯作者:雷 寒,电话:(023)89012949,E-mail:chang8753@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-07-04;**修回日期**:2006-01-10

differentiation, but the transplanted cells disappeared because of immune reaction. Transplantation of porous microcarriers into normal heart could not improve heart function either by regeneration of heart tissue or capilaries.

Key words: human fetal liver-delivered mesenchymal stem cells; gelatin porous microcarriers; regeneration of heart tissue; capillary regeneration

心肌梗死是心肌的一种不可逆性损害,它所致的心肌细胞减少及心室重构是心衰乃至死亡的病理基础[1],而近年来心脏的细胞疗法及心脏组织工程学的兴起为病损心脏的恢复提供了新的治疗策略。我们将来源于人类胚胎肝脏的基质干细胞(HFMSCs)及明胶多孔微载体植入正常大鼠心脏中,对比植入前后心脏功能的变化,观察细胞在体内的存活分化以及是否有新生的心肌细胞或毛细血管长入所植入的微载体中,旨在为心脏细胞疗法及心脏组织工程学的研究提供初步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 HFMSCs 的分离与培养

细胞取自 6 个胚胎,平均胎龄为 9 周(6 ~ 10 周)。经家属同意签字后,在无菌条件下真空抽吸取出胎儿,分离肝脏,去掉包膜,剪成碎块,过 100 目尼龙网,磨制成单细胞悬液。将其用 PBS 洗涤并稀释至 10^7/ml 后,采用低密度梯度离心法用密度为 1.073 g/ml 的 percoll(Amersham Pharmacia Biotech 公司,Sweden),500 × g 低速离心 30 min,取界面层重新悬浮在 PBS 中,再次 500 × g 低速离心,分离出单个核细胞。以 1.6×10^5/cm^2 接种于 75 cm^2 培养瓶中,培养液为 DMEM-LG(Invitrogen 公司,Scotland),含 10% FCS(Sigma 公司,USA),置于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的孵箱内培养 3 d 后,更换培养液,弃掉未贴壁细胞,以后每 3 ~ 4 天换液 1 次。当细胞达 80% 融合时用 0.05% 胰酶及 0.53 mmol/L EDTA(Invitrogen 公司,UK)消化,以 4×10^3/cm^2 的密度接种于培养瓶中进行传代扩增,收集第 3 ~ 7 代的细胞用于下述实验。

1.2 明胶多孔微载体的预处理

将 0.1 g 粉末状的明胶多孔微载体 CultiSpher G(直径为 40 ~ 77 μm, Percell Biolytica AB 公司,Sweden)用无钙、镁离子的 PBS 在室温下浸泡至少 1 h,115 ℃高压蒸汽灭菌 20 min。PBS 洗涤两次,DMEM-LG(Invitrogen 公司,Scotland)洗涤 1 次,最后浸泡于 10 ml DMEM-LG 中,置于 4 ℃冰箱中保存备用。

1.3 HFMSCs 及明胶多孔微载体注射前的处理

将 10^6 个细胞溶于 80 ~ 100 μl perfadex 中,置于胰岛素的专用注射器中备用;取出适量微载体,用 perfadex (pH = 7.0) 洗涤 2 ~ 3 次,然后将微载体溶于 perfadex 中,分置于 7 支胰岛素的专用注射器中备用,8 ~ 10 个单位(80 ~ 100 μl)/支。

1.4 实验动物与分组

SD 大鼠 22 只,购自 B&K University AB(Sweden),雌雄不拘,体质量为 400 ~ 450 g,分为细胞植入组(cell transplantation group, CTG, n = 9)、微载体植入组(microarrier transplantation group, MTG, n = 9)、对照组(control group, CG, n = 4)。

1.5 手术植入

取 SD 大鼠,用 dormicum (5 mg/kg, F. Hoffmann-La Roche 公司, Swizerland) 及 domitor vet(0.1 mg/kg, Orion 公司, Finland) 联合注射入腹腔予以麻醉,气管插管,Zoovent 呼吸机(CWC600AP 型,UK)支持呼吸。沿第 4 或 5 肋间隙行左外侧胸廓切开术,依此切开皮肤、皮下组织及心脏包膜,暴露心脏,从心尖处向左心室室壁内注射备好的各种 perfadex 溶液(含细胞、含微载体的或单纯 perfadex)80 ~ 100 μl,然后逐层关闭胸腔,肌肉内注射 lanexat(0.1 mg/kg, F. Hoffmann-La Roche 公司, Swizerland) 及 antisedan vet(5 mg/kg, Orion 公司,Finland) 使大鼠从麻醉状态中苏醒。观察 2 h,将它们放回笼中饲养。

1.6 手术前及手术后应用超声心动图测定心脏功能

移植前及移植后 7 d,应用超声仪(Sequoia 512 型,USA)同步进行 M 型及二维动态显示,探头频率为 8 ~ 13 MHz,扫描速度为 100 mm/s。大鼠麻醉后,置于仰卧位,二维超声心动图观察取心室长轴切面及短轴切面,了解心脏各部分结构及各节段运动情况;于二尖瓣腱索水平进行 M 型扫描,测量左室前壁、左室后壁的厚度、运动幅度、左室收缩期及舒张期内径,计算左室射血分数。因保留到移植后 14 d 的大鼠较少(每组 1 ~ 2 只,详见下述),所获得的数据难以进行统计学处理,所以未在这个时点检测超声心动图。

1.7 心脏标本的处理

手术后 7 d 进行超声心动图检查后,用脱颈椎法处死大部分大鼠(其中 CTG 组及 MTG 组分别随机留下 2 只、CG 组留下 1 只大鼠,再继续喂养 7 d 处死,处理过程相同),取出心脏。部分进行甲醛固定,石蜡包埋切片后常规脱水,分别进行荧光标记的原位杂交(FISH)及苏木精和伊红染色(HE 染色);其余部分进行冰冻切片,储存于 - 20 ℃冰箱备测免疫组化染色。另外,将经过预处理的微载体冰冻包埋,切片后用 HE 染色,作为微载体未植入前的正常对照。

1.8 FISH 检测细胞在心肌组织中的存活

石蜡切片在 60 ℃中烘烤 2 h 以脱去石蜡后,分别放在不同浓度的乙醇中脱水(95% →70% →50%)。将切片浸泡在枸橼酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 6.0)中,在微波炉中加热(750 W, 1.5 min→50 W, 4.5 min)。将切片移入温度为 37 ℃、含 0.5 ml 胃蛋白酶(Sigma 公司)的 50 ml HCl 溶液及含 0.1% Igepal (Sigma 公司)的 2 × SSC(sodiumcitrate-sodium chloride buffer)中先后孵育 18、10 min, 在温度为 20 ℃的 1% fornaldehyd/50 mmol/L $MgCl_2$/PBS 溶液及 PBS 溶液中先后孵育 10、5 min,然后在不同浓度的乙醇中(95% →70% →50%)重复脱水过程。将 3 μl FISH 探针(针对人 DNA 的荧光标记的探针, Vysis 公司)加在每张切片上,放在 74 ℃上孵育 10 min 使 DNA 变性,然后放在湿盒内置于 39 ℃孵箱内 12 h,使探针与目标 DNA 结合。经过多次重复洗涤,在切片上加入含 4′6′-二乙酰基-2-苯

基吲哚(DAPI)的 antifade，3 min 后在荧光显微镜下观察，移植细胞 DNA 被染为红色。

1.9　免疫组化染色

心肌特异性抗原肌间线蛋白及原肌球蛋白的免疫组化染色过程如下所述：自 -20 ℃冰箱中取出切片，在室温下放置 10 ~20 min使之完全干燥，2% 的多聚甲醛中固定 4 min，用 0.05% 的 Triton 和 PBS 洗涤 3 次，每次 3 min；加 5% 兔血清(DakoCytomation 公司，Denmark)封闭非特异性抗原，室温下孵育 20 min；弃去血清，分别加 1∶50 抗人 Desmin (DakoCytomation 公司，Denmark)及 Tropomyosin 抗体(Sigma 公司，USA)，室温下孵育 2 h，0.05% 的 Triton 和 PBS 洗涤 3 次，每次 3 min；滴加 1∶20 荧光标记的二抗(兔抗鼠 IgG-FITC，DakoCytomation 公司，Denmark)，孵育 1 h，0.05% 的 Triton 和 PBS 洗涤 3 次，在荧光显微镜(Olympus 公司，Japan)下观察并拍照。

毛细血管的免疫组化染色过程则为：取出冰冻切片，acetone 中固定 10 min，用蒸馏水洗涤 3 次，每次 3 min，双氧水孵育 30 min 以阻抗内源性过氧化物酶，PBS 洗涤 3 次，每次 3 min，与 1∶50 的 Griffonia Bandeiraea Simplicifolia Isolectin B4(GSL-I-B4，Vector Laboratories)室温下共同孵育 2 h，PBS 洗涤 3 次，再与 ABC 复合物孵育 30 min，PBS 冲洗 3 次后滴加 DAB 于玻片上，大约 1 h 后变成棕色，迅速用水冲洗，盖上玻片于显微镜下观察并拍照。

巨噬细胞(macrophage，MΦ)特异性抗体(抗 ENIMC341R 抗体)的免疫组化染色：通过 HE 染色寻找注射的部位，取相关切片进行巨噬细胞特异性抗体的免疫组化染色。在二甲苯中去除石蜡，在从高到低不同浓度的乙醇(95%、70%、50%)及蒸馏水中依此浸泡 2 min 使组织水化。将切片浸泡在枸橼酸盐缓冲液(10 mmol/L，pH 6.0)中，放在微波炉中加热(750 W × 1 min，然后 50 W × 5 min)，在含 0.1% igepal 的 2 × SSC 中 37 ℃下孵育 10 min，然后滴加 1∶40 的小鼠抗大鼠 ENIMC341R 抗体(Serotec，Oxford，UK)，在室温下孵育 12 h。PBS 洗涤，然后滴加 1∶20 稀释的二抗(FITC 标记的兔抗小鼠抗体，fluorescein isothiocyanate [FITC]-labeled，F0313，Dako)，室温下孵育 2 h，洗涤 3 次后在荧光显微镜下观察并拍照，MΦ 被染色为绿色圆点。

1.10　混合淋巴细胞培养(mixed lymphocyte culture，MLC)

为了检测植入的 HFMSCs 是否会在体内诱导免疫反应，我们在移植第 7、14 天处死大鼠、获取心脏标本的同时，收集大鼠外周血液，分离出淋巴细胞分别作为刺激细胞(用 X 线照射，剂量为 20 Gy)、应答细胞，在体外进行 MLC 检测，同时加入一定浓度的 HFMSCs，测定 HFMSCs 对来源于不同大鼠的外周血淋巴细胞(PBLCs)增殖反应的影响。MLC 的详细步骤见参考文献，简述如下：将 1×10^5 个应答细胞(未被照射的 PBLCs)及 1×10^5 个刺激细胞(被照射的 PBLCs)共同培养，并加入 1×10^4 个 HFMSCs；共同培养第 5 天在培养系统中加入活性为 5Ci/mmol/L 的 ^{3}H-TdR，24 h 后用细胞收集仪(Tomtec，Orange，Conn)将细胞收集在玻璃纤维滤纸上，用 β 计数器(Wallac)测定 cpm(counts per minute)值。每个大鼠 PBLCs 的 MLC 重复 3 次，结果取其平均值，而对于各种条件下的测定值则以该条件下所有大鼠测定值的平均数为准。

1.11　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 Excel 20.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　一般情况

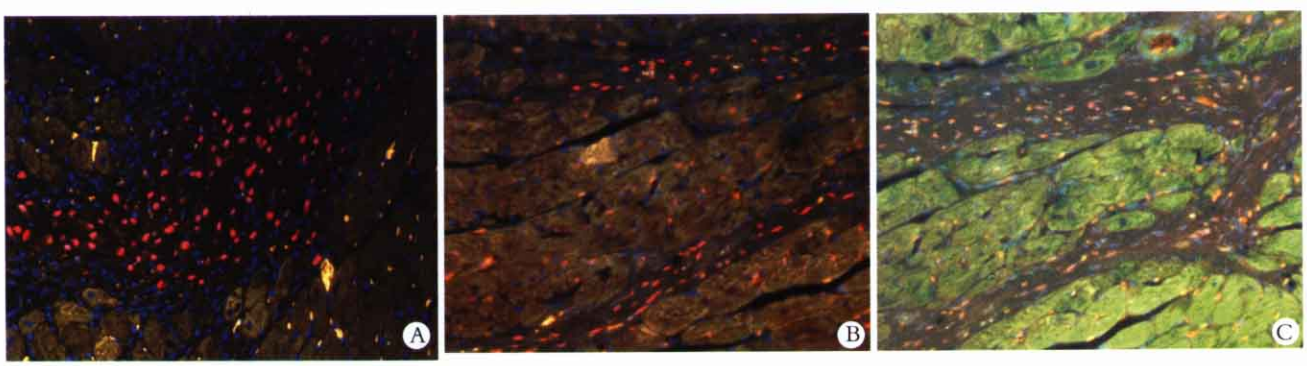
2 只大鼠在注射微载体后出现精神萎靡、站立不稳、定向力障碍及单侧肢体活动障碍等偏瘫症状，于术后 24 h 内死亡。两植入组中其余 16 只大鼠及对照组 4 只大鼠均生长良好，行走正常，反应灵敏，直至术后 7 d(15 只)及 14 d(5 只)时被处死。

2.2　手术前后心脏功能的超声心动图对比分析

细胞及微载体植入 1 周后，M 型及二维超声心动图显示心室腔大小无明显变化，但部分微载体植入的心脏心室壁出现局部增厚。与术前相比，术后 3 组射血分数(EF)均有上升趋势，但只有细胞移植组的变化具有统计学意义($P < 0.05$)，其余两组的 EF 变化均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3　移植细胞的存活及分化情况

7 d 后在所有移植了细胞的大鼠心脏组织中均发现了较多的移植细胞的存活。植入细胞主要集中在注射部位，移植细胞核显示为红色，细胞核形态规则，为圆形或卵圆形，轮廓清楚，提示细胞处于良好状态，而其周围的蓝色核为大鼠心肌细胞核(图 1A、B)。心肌特异性抗原肌间线蛋白、原肌球蛋白与 FISH 的双重染色(图 1C)显示，移植细胞上没有心肌特异性抗原肌间线蛋白及原肌球蛋白表达，提示移植细胞尚未向心肌细胞分化。14 d 后未在移植了细胞的心脏组织中发现移植细胞的存活。



A：细胞移植 7 d 后大量存活(ISH × 400)；B：原位杂交显示移植细胞的存活 (ISH × 400)；C：原肌球蛋白的免疫组化显示细胞未发生向心肌间的分化 (S-P × 400)

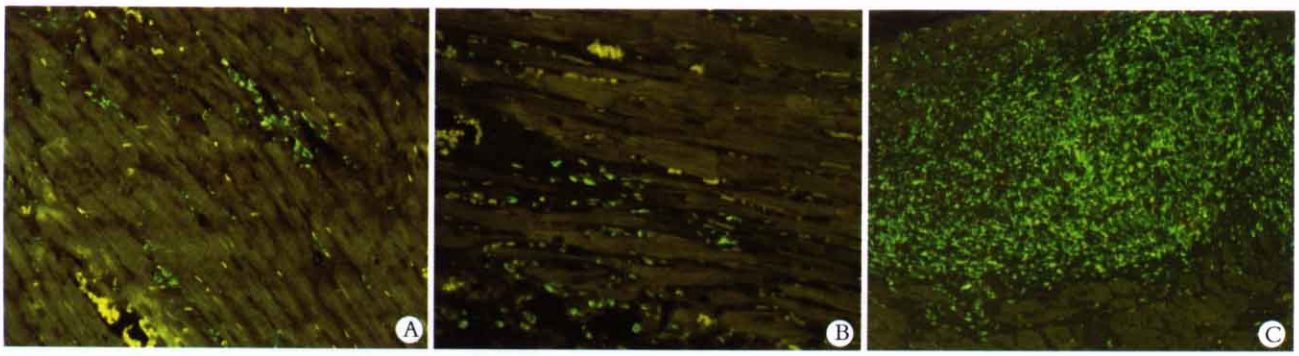
图 1　移植细胞的存活及分化情况

2.4 植入的微载体中无新生血管及心肌形成

注射前的微载体呈圆形或椭原形颗粒，其内部有大小不等的孔道彼此相连，并与微载体表面相通。微载体植入7、14 d后，在存活的大鼠心脏中都可以找到集中分布在注射局部的微载体（图2A），与周围正常心肌有较明显的分界，使局部的心肌组织失去正常的心肌结构及排列。与注射前的微载体相比，它们在体内的形态无明显变化，大部分仍保持圆形或椭圆形形态，微载体孔道内及微载体表面有较多的细胞生长。应用肌间线蛋白、原肌球蛋白以及毛细血管特异性抗原 lectin 的免疫组化染色显示，在微载体植入处，上述染色均为阴性，而与其相邻的正常心肌组织，上述染色为阳性，提示植入的微载体中无新生血管及心肌组织形成。

2.5 移植细胞在体内所诱导的细胞免疫反应

我们通过免疫组化的方法检测细胞移植处 MΦ，从而了解体内的细胞免疫状况。结果显示，在移植后第 7 天有 MΦ 出现，其数量较少，但与只注射 PBS 的对照组（图 2A）相比，其数量更多（图 2B）；至第 14 天其数量明显增加，注射局部可见大量的 MΦ 浸润（图 2C）。



A：正常对照组心脏组织，少有 MΦ 浸润；B：细胞移植 7 d 后的心脏组织，有少许 MΦ 浸润；C：细胞移植 14 d 后的心脏组织，有大量 MΦ 浸润

图 2 免疫组化染色显示细胞移植后心脏组织巨噬细胞的局部浸润 （S-P×200）

2.6 体外 HFMSCs 对 MLC 的影响

对于从移植了细胞的 SD 大鼠中分离出的 PBLCs，MLC 结果显示，HFMSCs 促进 PBLCs 的增殖反应，其促进作用在第 14 天更明显；而对于来源于对照大鼠的 PBLCs，即 PBLCs 来源于没有接受过 HFMSCs 移植的 SD 大鼠，在混合培养前 PBLCs 在体内未与 HFMSCs 接触过，MLC 结果显示，HFMSCs 对这种 PBLCs 的增殖不仅没有促进作用，反而有轻微的抑制作用。

3 讨论

1994 年，由 Soonpaa 等[2]首先报道将转基因小鼠的胚胎心肌细胞，注射到成年小鼠的正常心脏，发现移植细胞不但能长期存活，而且与正常宿主心肌细胞形成了桥粒等超微结构连结。目前国内外有大量关于移植细胞在体内存活分化、修复梗死心肌、改善心脏功能的动物实验报道[3-8]。

本实验将来源于胎儿肝脏组织的 MSCs 移植到正常 SD 大鼠中，以了解这种细胞异种移植到具有正常免疫功能的动物中后，它们所引起的免疫反应以及在体内的存活及分化情况。结果显示，在移植后第 7 天时，MLC 实验及 MΦ 特异性抗体（抗 ENIMC341R 抗体）免疫组化结果显示，宿主 SD 大鼠体内淋巴细胞已开始对 HFMSCs 发生免疫反应，注射局部已开始有少量 MΦ 浸润。在移植后第 14 天，免疫反应进一步加重，MLC 实验显示宿主淋巴细胞对 HFMSCs 的免疫反应更加明显，移植处有大量的 MΦ 浸润，提示慢性排斥反应的存在。与之相符，移植后第 7 天在宿主心脏中发现大量移植细胞存活，心脏功能较移植前有所增加，但没有发现移植细胞向心肌方向的分化。至第 14 天时，在余下的 2 只大鼠心脏内已经没有发现移植细胞存在了，尽管只有 2 只大鼠，其数量不足以得出肯定性结论，也未测定其心脏功能，但至少可以发现移植细胞逐渐减少、甚至消失的趋势。Saito[4]、Tomita 等[5]将来源于小鼠及猪的 MSCs 分别异种或异体移植到梗死心肌组织中，移植结果显示，在移植后第 7 天时，MLC 实验及 MΦ 特异性抗体（抗 ENIMC341R 抗体）免疫组化结果显示，宿主 SD 大鼠体内淋巴细胞已开始对在心脏组织中长期存活并发生向心肌细胞方向的分化。对于这种实验结果的差异，我们认为与宿主心肌是否发生梗死有一定影响，但更关键的是因为移植细胞来源于不同种属的动物。许多实验证实，MSCs 具有低抗原性及免疫抑制作用，能进行异种或异体移植。然而，Toma 等[9]将来源于人的 MSCs 移植到 CB17 SCID 小鼠体内，尽管该小鼠具有免疫缺陷，1 周后在心肌组织中发现了部分移植细胞存活分化，但大部分移植细胞在移植 1 周内从体内消失。该实验提示，鼠类动物

存在着对人 MSCs 较强的免疫反应,或者我们可以说,来源于人的 MSCs 具有与来源于其他动物的 MSCs 不同的免疫学性质。这尚需在以后的实验中进行进一步研究,为人 MSCs 的临床应用提供参考基础。

Makino 等[10]报道鼠 MSCs 在体外能在 5-氮胞苷的诱导下分化为自发跳动的心肌细胞,而本人也在体外成功诱导了 HFMSCs 向心肌方向的分化,证实了这种细胞具有向心肌方向分化的潜能。然而,在本实验中,我们没有发现移植细胞在体内向心肌方向的分化。这可能与移植细胞在体内存活时间过短有关。事实上,我们的后续研究证实,受体的免疫状态与移植细胞的存活密切相关,免疫抑制剂的使用或免疫缺陷大鼠的使用能明显延长移植细胞的存活时间,使移植细胞发生分化。另外,虽然我们选用的是注射胰岛素所用的针头,从图 1 仍能观察到注射过程所遗留的痕迹。这是否会诱发心律失常,尚未得到证实。

心肌组织工程是一个相对较新的领域,其研究不仅涉及人造心脏瓣膜[11]、人造血管[12],近年来人们开始对利用支架重建三维心肌组织及其微循环产生了浓厚兴趣[13]。Li 等[14]报道将胎儿心肌细胞接种到多孔明胶支架上,然后将此复合物移植到心肌瘢痕中,发现移植物内有广泛的新生血管形成。为了进一步研究明胶支架与 血管形成、心肌再生的关系,我们将多孔明胶微载体直接注射至正常大鼠的心室壁。实验手术过程中 2 只大鼠在微载体植入后死亡,其原因是微载体微粒被注射入心室腔导致的脑卒中所致。其余 7 只大鼠术后生长良好,7、14 d 后取出心脏,进行病理学分析及免疫组化分析。结果显示,微载体集中停留在注射部位,保持原有的圆形或椭圆形形态,微载体中有较多细胞生长。然而,与前述所报道的实验结果不同,免疫组化染色显示,这些新生的细胞既不是心肌细胞也不是毛细血管。我们尚不清楚这些细胞的性质及种类,推测可能是因所用的明胶微载体的组织相容性欠佳而导致的炎症细胞浸润,这也合理地解释了微载体植入后心脏功能无明显改善的结果。

近年来,MSCs 的心肌移植及心脏组织工程学显现出良好的治疗前景,有大量激动人心的相关报道。然而,我们的研究显示,来源于人的 MSCs 存在着与其他来源的 MSCs 不同的免疫学性质,移植仍存在免疫排斥的问题,而组织工程学也面临着支架材料的选择与改进。要将两种方法应用于临床治疗还面临许多难题,还有很长一段路要走。该实验为进一步实验研究提供参考基础,包括实验时限的设定、免疫抑制剂的使用或免疫缺陷动物的选用等,也为临床实验提供了基础的参考资料。

参考文献:

[1] ERIKSSON H. Heart failure: a growing public health problem[J]. J Intern Med, 1995, 237(2): 135 - 141.

[2] SOONPAA M H, KOH G Y, KLUG M G, *et al*. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium[J]. Science, 1994, 264(5155): 98 - 101.

[3] 赵洛沙, 杜优优, 焦昆立, 等. 经静脉骨髓基质干细胞移植治疗大鼠急性心肌梗死[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(2): 313 - 316.

[4] SAITO T, KUANG J Q, BITTIRA B, *et al*. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 74(1): 19 - 24.

[5] TOMITA S, MICKLE D A, WEISEL R D, *et al*. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123(6): 1132 - 1140.

[6] LIECHTY K W, MACKENZIE T C, SHAABAN A F, *et al*. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nat Med, 2000, 6(11): 1282 - 1286.

[7] 李志刚, 梅　举, 张宝仁. 骨髓基质细胞移植于缺血心肌的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(5): 436 - 437.

[8] LE-BLANC K, TAMMIK L, SUNDBERG B, *et al*. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex[J]. Scan J Immunol, 2003, 57(1): 11 - 20.

[9] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, *et al*. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation, 2002, 105(1): 93 - 98.

[10] MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, *et al*. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*[J]. J Clin Invest, 1999, 103(5): 697 - 705.

[11] OPITZ F, SCHENKE-LAYLAND K, COHNERT T U, *et al*. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis *in vivo*[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(4): 719 - 730.

[12] MOL A, HOERSTRUP S P. Heart valve tissue engineering—where do we stand[J]? Int J Cardiol, 2004, 95 Suppl 1: S57 - S58.

[13] NATIO H, TAKEWA Y, MIZUNO T, *et al*. Three - dimensional cardiac tissue engineering using a thermoresponsive artificial extracellular matrix[J]. ASAIO J, 2004, 50(4): 344 - 348.

[14] LI R K, YAU T M, WEISEL R D, *et al*. Construction of a bioengineered cardiac graft[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 119(2): 368 - 375.

（编辑　王　红）