文章编号:1000-5404(2010)18-1953-05

论著

脂肪间充质干细胞移植对兔心肌梗死后微血管生成及心功能的影响

张卫泽[1],褚媛媛[2],陈永清[1],马 凌[1],肖立运[2] (730050 兰州,兰州军区兰州总医院心血管内科[1];730000 兰州,兰州大学第二临床医学院心血管内科[2])

【摘要】 目的 探讨脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells,ADMSCs)移植对兔心肌梗死后微血管生成的可能机制及心功能的变化情况。**方法** 30 只健康日本大耳白兔,完全随机分为假手术组、心肌梗死对照组和 ADMSCs 移植组(ADMSCs 组)。结扎兔前室间支,建立急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)动物模型,AMI 1 h 内将 4',6-二脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidio-2-phenylindole,DAPI)标记的第 3 代 ADMSCs 植入 ADMSCs 组梗死心肌,对照组及假手术组注射等量磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)。术前及术后 4 周分别做超声心动图检查其心功能变化。处死动物,取其心脏,采用免疫组织化学法检测梗死区新生血管微血管密度,RT-PCR 检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达。**结果** ADMSCs 组荧光显微镜下可以观察到 DAPI 标记细胞存在,部分分化为心肌样细胞;超声心动图证实移植后 4 周 ADMSCs 组心功能较心肌梗死对照组改善($P<0.05$);ADMSCs 组较心肌梗死对照组梗死区微血管密度明显增高[(20.00±2.65) *vs* (7.75±2.12),$P<0.05$];ADMSCs 组 bFGF 和 VEGF 的表达水平均较心肌梗死对照组明显增高[(0.590±0.028) *vs* (0.569±0.021),(0.913±0.030) *vs* (0.886±0.049),$P<0.05$]。**结论** ADMSCs 移植促进心肌梗死区微血管的生成,并改善心脏功能,其机制可能与促进 bFGF、VEGF 的表达有关。

【关键词】 间质干细胞移植;心肌梗死;血管生成;血管内皮生长因子类;碱性成纤维生长因子
【中图法分类号】 R-332;R542.22;R329.2 **【文献标志码】** A

Transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improves angiogenesis and heart function in rabbits after myocardial infarction

Zhang Weize[1], Chu Ai'ai[2], Chen Yongqing[1], Ma Ling[1], Xiao Liyun[2] ([1]Department of Cardiovascular Diseases, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu Province, 730050; [2]Department of Cardiovascular Diseases, Second Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the possible mechanisms of transplanting adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) on the angiogenesis in acute myocardial infarction (AMI) rabbits. Metheds A total of 30 health rabbits were randomly divided into 3 groups: shame-operation group, acute myocardial infarction (AMI) group, and AMI + ADMSCs transplantation group. AMI model was induced by ligating the anterior interventricular branch. 4',6-diamidio-2-phenylindole (DAPI)-labeled ADMSCs at passage 3 which were primarily cultured from rabbit greater omentum fat tissues and identified with flow cytometry for expressions of CD34, CD45, CD44 and CD71 were injected into the center and edge of infracted area of AMI + ADMSCs group with 5 sites (0.2 ml, 1×10^6/L for each site), and the same dose of phosphate buffered solution (PBS) was given to the AMI group. Echocardiography was performed to evaluate the cardiac function before operation and 4 weeks after operation. Then the animals were sacrificed and their hearts were resected. The regeneration of microvessel was examined with immunohistochemical technique for microvessel density (MVD), and the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in ischemic region were detected with transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results The labeled cells were visible in the recipient heart, and some of them were differentiated into cardiac-like cells. Echocardiography showed heart function in ADMSCs group was better than that of AMI group in 4 weeks after surgery, with obviously improved left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (FS), and significantly shorter left ventricular end-diastolic inner diameter (LVEDd) and left ventricular end-

【基金项目】 全军医药卫生科研基金(06MB094)
【通信作者】 张卫泽,电话:(0931)8994225,E-mail:zhangzwz@medmail.com.cn

systolic inner diameter (LVEDs) ($P<0.05$). AMI + ADMSCs transplantation group had an obviously higher MVD in the infarction regions than in AMI group (20.00 ± 2.65 *vs* 7.75 ± 2.12, $P<0.05$). The expressions of bFGF and VEGF in the myocardial tissue of ADMSCs group were significantly higher than those in AMI group (0.590 ± 0.028 *vs* 0.569 ± 0.021, 0.913 ± 0.030 *vs* 0.886 ± 0.049, $P<0.05$). **Conclusion** Transplantation of ADMSCs promotes the revascularization in infarcted regions, and improves the heart function by enhancing VEGF and bFGF synthesis.

[Key words] mesenchymal stem cell transplantation; myocardial infarction; vascular endothelial growth factors; basic fibroblast growth factor

Supported by the Foundation of Medical Science Research of PLA (06MB094). Corresponding author: Zhang Weize, Tel: 86-931-8994225, E-mail: zhangzwz@medmail.com.cn

有研究[1,2]证实,脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells,ADMSCs)在体外可以向多种细胞系分化,包括成骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、神经细胞及内皮细胞。亦有研究表明 ADMSCs 分泌大量的血管源性生长因子,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胎盘生长因子(placenta growth factor, PIGF)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和基质细胞来源的细胞因子(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)。加之 ADMSCs 具有高度增殖分化及自我更新能力,对维持其持久性分泌至关重要,从而更适合细胞移植和生物工程的应用。在梗死心肌及其周围,经冠状动脉内注入 ADMSCs,发现可减轻心脏功能的缺损[3],但具体作用机制有待进一步阐明。本研究采用兔前室间支结扎心肌梗死模型进行 ADMSCs 移植,观察微血管密度、并测定心肌组织中 VEGF 和 bFGF 的表达,以探讨 ADMSCs 移植的心肌保护机制,为 ADMSCs 治疗心血管疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

取健康日本大耳兔 32 只,体质量 2.2 ~ 2.8 kg,2 只用于提供脂肪间充质干细胞,30 只作为移植的受体(均由甘肃省兽医研究所提供),完全随机分成 3 组,每组 10 只:分别为假手术组、心肌梗死对照组、急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI) + ADMSCs 移植组(ADMSCs 组)。层流架饲养,自由进食。术后观察 4 周。

1.2 脂肪间充质干细胞的分离、纯化、培养及标记

无菌条件下取兔大网膜脂肪组织,用 PBS(含 200 U/ml 青霉素与 200 μg/ml 链霉素)反复清洗,眼科剪剪碎至糊状,移入培养瓶,加入 2 倍体积 0.1% 的Ⅰ型胶原酶,37 ℃、恒温水浴锅内振荡消化 60 min,此时液面分为 3 层,上层为黄色油状脂肪细胞层,中层为脂肪组织层,下层为含单个核细胞的胶原酶层。1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,加完全培养液(含 10% 胎牛血清、100 × 双抗的高糖 DMEM 培养基)吹打细胞沉淀,200 目细胞筛过滤,37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。24 h 后首次换液,生长至 70% ~ 80% 融合时,1∶1混合的胰蛋白酶与乙二胺四乙酸钠消化,传代。将终浓度为 50 mmol/L 的 DAPI(美国 Sigma 公司)加入培养至第 3 代的脂肪间充质干细胞中共同培养过夜,PBS 液洗涤,1∶1混合的胰蛋白酶与乙二胺四乙酸钠消化,离心,以 5×10^6/ml 的密度重悬于 PBS 液,置于冰上备用(不超过 1 h)。

1.3 流式细胞术鉴定

调整细胞密度 1×10^6/ml,分别吸取 FITC 标记的鼠抗兔(美国 eBioscience 公司)CD34、CD45、CD44、CD71 单克隆抗体室温避光孵育 15 min 后,上机检测。

1.4 兔心肌梗死模型的建立及细胞移植

3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉,固定于手术台,备皮。常规消毒,沿胸骨正中切口开胸,避免损伤胸膜,造成气胸。剪开心包,充分暴露心脏,用眼科小圆针穿过心肌浅层,于第一对角支下方结扎冠状动脉左室支。术前及结扎冠脉后行 12 导联心电图,以左室前壁心肌变苍白和心电图胸相关前导联出现 ST 段弓背向上抬高为手术成功[4,5]。假手术组只在同样部位穿一丝线,但不结扎。根据动物分组,MI 后采用心肌外膜直接注射法,选取梗死中央及边缘区共 5 个注射点,每个注射点 0.2 ml,注射上述细胞及 PBS 液。逐层关胸,缝合切口,术后 3 d 肌注青霉素(80 万 U/d)预防感染。

1.5 超声心动图左心室功能测定

采用 GE ViViD7 型超声显像仪,心脏探头频率为 6 MHz,在术前、术后 4 周分别进行超声心动图检查。麻醉状态下,经左侧胸壁,二维超声在左心室长轴、短轴切面观察运动情况。在短轴切面左心室乳头肌水平,超声测量乳头肌水平左心室舒张末内径(left ventricular end-diastolic inner diameter, LVEDd)及左心室收缩末内径(left ventricular end-systolic inner diameter, LVEDs),并计算短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, FS)和左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。所有数值测量连续 3 个连续心动周期,然后取其平均值。

1.6 移植细胞存活及分化情况的观察

垂直于心脏长轴将左心室分为 3 段,连续切取梗死边缘、梗死区和非梗死区心肌组织,制成 5 μm 厚的冰冻切片标本,将制好的冰冻切片于荧光显微镜下直接进行观察 DAPI 标记细胞,紫外线激发阳性细胞核呈蓝色。上述冰冻切片行心肌肌钙蛋白-Ⅰ(cardiac troponin-Ⅰ, cTnⅠ)(北京博奥森公司)免疫组化学染色,cTnⅠ免疫组化染色按试剂盒 S-P 法(北京中杉金桥公司)进行染色。荧光显微镜观察梗死区 cTnⅠ阳性细胞,同一视野紫外线激发下观察细胞核呈蓝色阳性细胞,并照相。

1.7 微血管密度检测

切片标本采用 CD34(武汉博士德公司)免疫组织化学染色[按试剂盒 S-P 法(北京中杉金桥公司)]。CD34 定位于内皮细胞细胞质,显示棕黄色或棕褐色,微血管计数参照文献[6]的方法。计数每个高倍镜视野(400×)的微血管,选取文献 3 个高倍镜视野微血管数为该份标本的平均微血管密度(microvessel density, MVD)。

1.8 RT-PCR 检测 VEGF 和 bFGF 的表达

取兔缺血区心肌组织(液氮冻存)200 mg 置于研磨钵中,加入 2 ml Trizol 试剂,严格按照说明书进行。分别取 RNA 样品,测定其 260 nm 和 280 nm 的光密度[*D*(260)和 *D*(280)],并根据 *D*(260)/*D*(280)比值评估 RNA 的纯度(正常范围:1.8~2.0),10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。取 2 μg 总 RNA,按照逆转录试剂盒(DRR014A,宝生物公司)操作说明进行逆转录,反应体系 20 μl,反应条件:65 ℃,5 min;42 ℃,30 min;95 ℃,5 min;4 ℃,5 min。以获得的 cDNA 为模版在 PCR 扩增仪(MG96G,Long Gene 公司)进行 PCR,分别扩增 GAPDH、VEGF、bFGF,反应体系 25 μl,扩增条件:94℃预变性 5 min;94 ℃变性 45 s;退火 45 s,具体见表 1;72 ℃延伸 45 s;72 ℃ 反应 10 min;30 个循环。PCR 产物经 1.5 % 琼脂糖(BBI 产品)凝胶电泳,紫外透射仪(美国 UVP 公司)观察成像。DNA Marker(DL 1 000,宝生物公司)。凝胶成像分析系统半定量分析电泳条带的光密度,结果以目的基因与 GAPDH 光密度的比值表示。实验重复 3 次。

表 1 基因序列及其引物

基因	引物	序列(5′→3′)	退火温度(℃)	产物长度(bp)
VEGF	上游	AGTACCCTGATGAGATCGAGT	57	196
	下游	TCACATTTGTTGTGCTGTAGG	57	
bFGF	上游	GGTTTCTTCCTGCGTATCCAC	59	287
	下游	GTTTCAGTGCCACATACCAGC	59	
GAPDH	上游	GACGACATCAAGAAGGTGGT	57	343
	下游	AAACTGTGAAGAGGGGCAGA	57	

1.9 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,3 组兔的总体差异用单因素方差分析,每两组之间的两两比较用 SNK 检验。每组内不同时期的比较:如移植前后采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组动物情况

共纳入 30 只兔,每组 10 只。假手术组死亡 2 只(术中气胸),心肌梗死对照组死亡 2 只(气胸、麻药过量),ADMSCs 组死亡 2 只(穿透性心肌损伤导致大出血、恶性心律失常),其余动物均存活良好。

2.2 ADMSCs 形态特征

接种 24 h 后,体积较大的细胞很多已贴壁,多呈梭形,有的呈圆形或多角形,并开始伸展,核居中,有 1~2 个核仁。48 h 后贴壁细胞开始分裂增殖,5~7 d 后,培养皿底细胞融合达 80%。传代后细胞形态渐趋一致,呈长梭形,以一点为中心向四周呈放射状排列,圆形或卵圆形混杂生长细胞随换液及传代次数增加,逐渐减少。

2.3 流式细胞术鉴定结果

流式细胞仪测定显示,造血干细胞表面标志抗原 CD34、CD45 表达阴性;MSC 相关表面抗原 CD71(84.39%)和 CD44(81.20%)阳性。

2.4 ADMSCs 移植后超声心动图结果

超声心动图测定结果见表 2。与心肌梗死对照组相比,ADMSCs 组经细胞移植治疗后,LVEF、FS 明显改善($P<0.05$),LVEDd、LVEDs 均缩小($P<0.05$),但与假手术组相比各指标均有显著性差异($P<0.05$)。

2.5 移植细胞体内存活情况

移植前 DAPI 标记 ADMSCs,荧光显微镜下观察,细胞核发出强烈蓝色荧光(图 1A)。AMI 后 4 周,ADMSCs 组心肌冰冻切片中可见 DAPI 标记的细胞,甚至迁延至心内膜下,这些细胞呈簇状或散在分布(图 1B)。在同一切片中同一视野下,还可以看到部分 DAPI 标记的细胞 cTnⅠ(DAB 显色)染色呈棕黄色颗粒的细胞(图 1C、D)。在假手术组和心肌梗死对照组未见到发出蓝色荧光的细胞核,心肌梗死对照组梗死区亦未见到 cTnⅠ染色阳性的细胞。

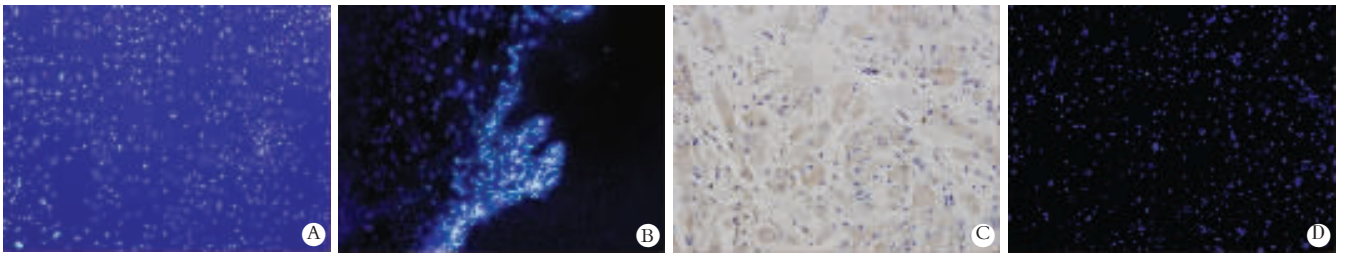
2.6 病理组织学检查及心肌梗死区血管密度计数

以 $CD34^+$ 阳性染色为血管计数(图 2A、B),ADMSCs 组心肌梗死区微血管数目明显高于心肌梗死对照组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组移植前及术后 4 周超声心动图结果及 MVD 值($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

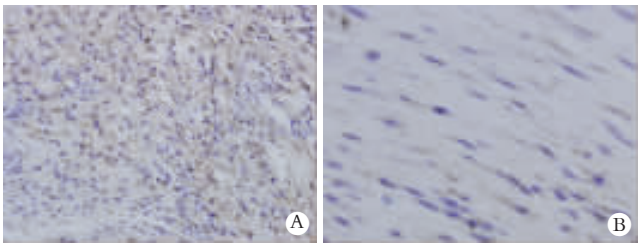
组别	LVEDs(cm)		LVEDd(cm)		EF(%)		FS(%)		MVD(个)
	术前	术后	术前	术后	术前	术后	术前	术后	
假手术组	0.60±0.06	0.58±0.07	0.94±0.13	0.94±0.13	75.13±3.91	74.13±3.72	43.25±3.41	43.50±3.16	42.50±3.42
心肌梗死对照组	0.57±0.06	0.88±0.07[a]	0.91±0.10	1.21±0.09[a]	75.63±3.89	43.13±3.72[a]	42.63±3.70	28.00±3.38[a]	7.75±2.12[c]
ADMS 组	0.56±0.05	0.72±0.04[ab]	0.92±0.12	1.07±0.12[ab]	74.75±3.01	51.75±3.37[ab]	43.25±3.62	31.87±2.03[ab]	20.00±2.65[bc]

a:$P<0.01$,与本组术前比较;b:$P<0.01$,与心肌梗死对照组比较;c:$P<0.01$,与假手术组比较



A：移植前DAPI标记的细胞(×40)；B：MI区内DAPI阳性细胞(×100)；C：MI区部分细胞cTnI阳性(×200)；D：同视野下可见DAPI阳性细胞(×200)

图1 荧光显微镜及免疫组化S-P法观察ADMSCs组ADMSCs存活及分化

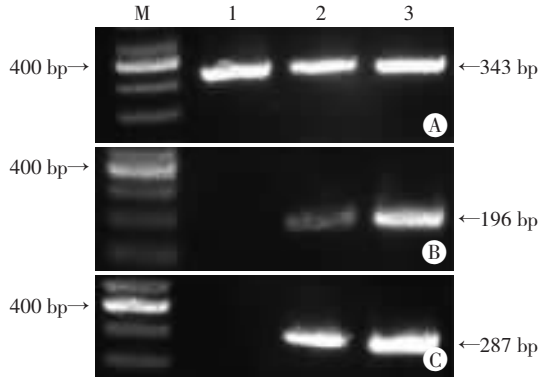


A：ADMSCs组；B：心肌梗死对照组

图2 ADMSCs组与心肌梗死对照组梗死区微血管密度观察 (S-P ×200)

2.7 兔梗死区周围bFGF mRNA和VEGF mRNA的表达

通过半定量RT-PCR法测定不同组间梗死区周围bFGF和VEGF表达量。实验结果表明，ADMSCs组bFGF mRNA和VEGF mRNA的表达量明显高于心肌梗死对照组($P<0.05$，图3，表3)。



M：DNA标准；1：假手术组；2：心肌梗死对照组；3：ADMSCs组
A：GAPDH；B：VEGF；C：bFGF

图3 RT-PCR法检测心肌梗死后4周各组VEGF和bFGF mRNA的表达

表3 心肌梗死后4周各组VEGF和bFGF mRNA的表达 ($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

组别	VEGF	bFGF
心肌梗死对照组	0.569±0.021	0.866±0.049
ADMSCs组	0.590±0.028[a]	0.913±0.030[a]

a：$P<0.01$，与心肌梗死对照组比较

3 讨论

ADMSCs正逐渐应用于缺血性心脏病的治疗中。美国学者Valina等[3]在猪急性心肌梗死模型中分别经冠状动脉内注入自体ADMSCs和骨髓单核细胞，两细胞移植组心功能均得到改善，但ADMSCs移植组左室收缩和舒张末径减小，抑制左室重构。本研究显示ADMSCs移植在一定程度上改善了心脏功能。因此，ADMSCs在缺血性心脏病的治疗作用并不亚于骨髓间充质干细胞，甚至更显著。但是，移植的ADMSCs改善心脏功能的确切机制目前还不是很清楚。到目前为止少见报道显示分化而来的心肌样细胞与宿主心肌细胞耦联，所以很难起到正常心肌细胞的功能，从而达到改善心脏功能的作用。故推断ADMSCs的心肌细胞保护作用可能是与其旁分泌作用有关。

ADMSCs的旁分泌功能包括：再生血管化、抗凋亡和促有丝分裂等作用[7,8]。Miyahara等[9]运用细胞片技术把ADMSCs移植到梗死心肌中，发现移植的ADMSCs可以通过旁分泌作用促进血管生成。DAPI是一种标记细胞核的荧光染料，对活细胞无毒性，不改变细胞器的超微结构，荧光保持时间较长，8周后仍可看到标记细胞[10]。本研究ADMSCs组采用DAPI标记移植细胞，发现仅有部分移植细胞存活，其中更小一部分存活细胞分化为cTnI阳性的细胞。但是与AMI对照组相比，ADMSCs移植组心肌缺血区微血管密度显著增高。我们认为，ADMSCs移植组心功能改善的原因可能与细胞分化无关的另一个因素相关，即与ADMSCs移植组心肌缺血区血管新生有关。

心肌微血管是循环系统的最末梢部分，既是循环的通路，又是物质交换的场所，决定心肌灌注水平。冠状动脉完全闭塞后导致心肌梗死区纤维化、瘢痕形成、毛细血管明显减少，并且造成心肌缺血区心肌壁内小冠状动脉发生重构，特点是管壁增厚，管腔变小，血管外周纤维化。这一特殊的病理生理变化进一步降低心肌血流量，影响缺血心肌的再灌注，并加剧心肌纤维化和心功能变化，可能是冠脉血管重建术后某些患者心功能无法完全甚至不能恢复的原因之一[11]。本研究表明ADMSCs移植治疗可增加心肌缺血区微血管密度，可能提高冠状动脉血流量和受损的冠状动脉流量储备，减轻心肌重构，并进一步改善心功能。Li等[12]

在猪急性心肌梗死模型中移植入骨髓间充质干细胞后心功能得到明显改善,并推测其可能与心肌缺血区毛细血管密度增高、VEGF 和 bFGF 表达量增多及心肌细胞凋亡率减少有关,但未阐述 VEGF 和 bFGF 表达量与新生毛细血管之间的关系。

国内王杰华等[13]研究显示,在大鼠脑缺血损害模型中,ADMSCs 移植可分泌多种细胞因子,包括 VEGF、bFGF,提高缺血区 VEGF、bFGF 表达进而促进缺血区血管生成。VEGF 作为一种内皮细胞的有丝分裂原和促血管形成因子,直接特异性地作用于血管内皮细胞,引起内皮细胞增殖,在血管生成过程中起着"扳机"样作用,VEGF 基因表达的上调与抑制受到缺氧诱导因子的严格控制[14]。bFGF 刺激血管生成,包括促进内皮细胞增殖、迁移、血管管型形成以及与原有血管网连接的功能,可以促使微血管的生长分化,使局部毛细血管数目增加。有研究表明 bFGF 可作为心脏疾病治疗的一种方法,可促进心肌微血管形成[15]。VEGF 和 bFGF 在正常成人和动物组织中仅有微量的表达,但在病理条件下如心肌缺血时均有过量的表达。研究报道 VEGF 保护 MSCs 免受体外细胞培养带来的细胞间应激反应、提高心肌缺血区 MSCs 活力,从而进一步改善 AMI 的治疗效果[16]。本研究结果表明,ADMSCs 移植组 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 明显高于 AMI 对照组,说明 ADMSCs 具有促进 VEGF 和 bFGF 表达的作用,表达生成的 VEGF 可能提高移植的 ADMSCs 的存活力。同时本研究发现,ADMSCs 移植后兔心肌梗死区及缺血区毛细血管生成数量与 VEGF 和 bFGF 的表达趋势一致,ADMSCs 移植后兔心脏功能改善情况亦与 VEGF 和 bFGF 的表达相同。这表明心肌梗死后心肌组织新生血管形成可能与 ADMSCs 移植后促进心肌组织中 VEGF 和 bFGF 的表达有关,梗死区的血管发生有助于改善心功能、保持冬眠心肌活力[17]及抑制交界区心肌细胞凋亡[18]。在血管闭塞 3 h 后,所供应的大部分心肌细胞即处于不可逆的损害中,其有效补救措施是通过挽救缺血区心肌细胞,即干细胞介导的抗凋亡和新生血管化。

综上所述,ADMSCs 移植能促进心肌梗死缺血区新生血管的生成及 VEGF 和 bFGF 的表达,并进一步改善心脏功能,而 VEGF 和 bFGF 均有促血管生长、保护内皮细胞的作用,由此推测 ADMSCs 移植的心肌保护作用部分是通过促进 VEGF 和 bFGF 的表达而发挥作用。但移植的 ADMSCs 在心肌组织中是否能自身分化为血管内皮细胞,是否能自分泌 VEGF 和 bFGF,有待于我们进一步探讨。

参考文献:

[1] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, *et al*. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.
[2] Planat-Benard V, Silvestre J S, Cousin B, *et al*. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives[J]. Circulation, 2004, 109(5): 656-663.
[3] Valina C, Pinkernell K, Song Y H, *et al*. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2007, 28(21): 2667-2677.
[4] Toyooka T, Kamishiro T, Fumino H, *et al*. Rabbit hearts for the critical evaluation of drugs to reduce the size of experimentally produced acute myocardial infarction[J]. Jpn Heart J, 1984, 25(4): 623-632.
[5] Abbate A, Morales C, De-Falco M, *et al*. Ischemia and apoptosis in an animal model of permanent infarct-related artery occlusion[J]. Int J Cardiol, 2007, 121(1): 109-111.
[6] 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.
[7] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, *et al*. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(12): 2542-2547.
[8] Traktuev D O, Parfenova E V, Tkachuk V A, *et al*. Adipose stromal cells—plastic type of cells with high therapeutic potential[J]. Tsitologiia, 2006, 48(2): 83-94.
[9] Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, *et al*. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction[J]. Nat Med, 2006, 12(4): 459-465.
[10] Dorfman J, Duong M, Zibatis A, *et al*. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(5): 744-751.
[11] Sorop O, Merkus D, de-Beer V J, *et al*. Functional and structural adaptations of coronary microvessels distal to a chronic coronary artery stenosis[J]. Circ Res, 2008, 102(7): 795-803.
[12] Li S R, Qi X Y, Hu F L, *et al*. Mechanisms of improvement of left ventricle remodeling by trans-planting two kinds of autologous bone marrow stem cells in pigs[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(23): 2403-2409.
[13] 王杰华, 刘楠, 杜厚伟, 等. 脂肪来源的干细胞移植对大鼠脑缺血后微血管生成及 bFGF 和 VEGF 表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(10): 958-961, 965.
[14] Kurmasheva R T, Harwood F C, Houghton P J. Differential regulation of vascular endothelial growth factor by Akt and mammalian target of rapamycin inhibitors in cell lines derived from childhood solid tumors [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(5): 1620-1628.
[15] Rosenblatt-Velin N, Lepore M G, Cartoni C, *et al*. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1724-1733.
[16] Pons J, Huang Y, Arakawa-Hoyt J, *et al*. VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376(2): 419-422.
[17] Memon I A, Sawa Y, Miyagawa S, *et al*. Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(3): 646-653.
[18] Li Z, Wilson K D, Smith B, *et al*. Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8443.

(收稿 2010-04-01 修回 2010-06-02)
(编辑 汪勤俭)