DOI:10.16016/j.1000-5404.201501143

论著

干扰 Nrf2 基因后骨髓间充质干细胞移植对大鼠心肌梗死后心肌凋亡的影响

龙仙萍,邓文文,赵然尊,王冬梅,郑小宇,石 蓓 (563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院心内科)

[**摘要**] **目的** 观察干扰核因子相关因子2(Nrf2)的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)注射大鼠心肌梗死局部后细胞凋亡情况及对心功能的影响。**方法** 建立心肌梗死大鼠模型,随机分为:①干扰 Nrf2 基因的 MSCs 移植(Nrf2 干扰组)组;②空载慢病毒修饰的 MSCs 移植(Nrf2 正常组);③生理盐水注射对照组(对照组,$n=12$)。心肌梗死细胞移植后 7 d,细胞免疫荧光法检测心肌局部 caspase3 蛋白的表达;移植后 28 dHE 染色评价梗死后心肌组织病理变化,TTC 染色评估梗死面积;采用蛋白印迹法(Western blot)检测心肌梗死区 Nrf2 和凋亡蛋白 Bcl2、Bax 的蛋白表达水平。**结果** 心梗细胞移植后 7d,心肌梗死区域有 EGFP 标记的 MSCs,部分 EGFP 表达位置检测到 Caspase3 表达阳性,Nrf2 干扰组凋亡蛋白 Caspase3 的荧光强度强,Nrf2 正常组 Caspase3 的荧光强度弱,对照组无 EGFP 表达;细胞移植后 28 d,HE 染色结果显示,与 Nrf2 正常组比较,Nrf2 干扰组心肌组织肌纤维排列紊乱,炎性细胞浸润明显,而 Nrf2 正常组细胞排列整齐,炎性细胞浸润减少;心肌 TTC 染色结果显示,Nrf2 干扰组的心肌梗死面积为(35.30±0.41)%,较 Nrf2 正常组[(25.07±0.15)%]明显增加($P<0.05$),与对照组[(35.40±0.70)%]比较无差异($P>0.05$);Western blot 结果显示,与 Nrf2 正常组比较,Nrf2 干扰组心肌中 Nrf2 蛋白和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降,而促凋亡蛋白 Bax 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$),Nrf2 干扰组与对照组比较,各蛋白表达无差异性($P>0.05$);心功能改善方面,Nrf2 干扰组 EF[(40.83±2.67)%]较 Nrf2 正常组[(52.35±1.58)%]降低($P<0.050$ 而心室容积较[(LVDd,(1.090±0.061),LVDs(0.750±0.062)]较 Nrf2 正常组[(LVDd,(0.790 0±0.024 5),LVDs(0.610±0.026)]增加。**结论** 移植干扰 Nrf2 的 MSCs 后,心肌梗死区凋亡相关蛋白表达增加,降低了外源性 MSCs 对梗死心脏的修复能力。

[**关键词**] NF-E2 相关因子2;siRNA;心肌梗死;骨髓间充质干细胞;凋亡
[**中图法分类号**] R329.24; R459.9; R542.22 [**文献标志码**] A

Effect of silencing Nrf2 gene on myocardial apoptosis after rat myocardial infarction with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation

Long Xianping, Deng Wenwen, Zhao Ranzun, Wang Dongmei, Zheng Xiaoyu, Shi Bei (Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) after RNA-interfered nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) on myocardial apoptosis and cardiac function in rats after myocardial infarction (MI). **Methods** The established MI rat models were randomly divided into MSCs transplantation group with Nrf2 gene silence (Nrf2 interference group, $n=12$), MSCs transplantation group with no-load lentivirus modification (Nrf2 normal group, $n=12$), and normal saline injection group (control group, $n=12$). On the 7th day after cell transplantation, the expression of caspase 3 in myocardial tissue was observed with cell immunofluorescence assay. On the 28th day after cell

[**基金项目**] 国家自然科学基金(81360021);贵州省科学技术基金(黔科合J字号LKZ[2012]29号)
[**通信作者**] 石 蓓,E-mail: shibei2147@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150629.1431.001.html(2015-06-29)

transplantation, pathological changes in myocardial tissues after infarction was evaluated after HE staining, the infarct size was evaluated with TTC staining, the protein expression of Nrf2, Bcl2 and Bax in MI region was detected by Western blotting. **Results** On the 7th day after cell transplantation, the immunofluorescence results showed that the fluorescence intensity of protein caspase 3 in myocardial tissue was significantly increased in $MSCs^{Nrf2-/-}$ group than $MSCs^{Nrf2+/-}$ group, and no fluorescence was observed in the control group. On the 28th day after cells transplantation, HE staining results showed that there were obvious myocardial tissue muscle fibers in disorganized arrangement and filaments breakage and infiltration of inflammatory cells in the Nrf2 interference group but the myocardial tissue muscle fibers were well-arranged and less infiltration of inflammatory cells were seen in the Nrf2 normal group. Myocardial TTC staining showed that the myocardial infarct size was (35.30 ± 0.41)% in the Nrf2 interference group, which was significantly higher than that in the Nrf2 normal group [(25.07 ± 0.15)%, $P<0.05$], but had no significant difference with the control group [(35.40 ± 0.70)%, $P>0.05$]. Western blot results showed that the expression levels of Nrf2 and anti-apoptotic protein Bcl-2 were decreased, while that of pro-apoptotic protein Bax was increased in the Nrf2 interference group than the Nrf2 normal group ($P<0.05$), but no difference was found in the expression of above molecules between the former group and control ($P>0.05$). The Nrf2 interference group had obviously lower ejection fraction (EF) and larger ventricular volumethan the Nrf2 normal group [EF: (40.83 ± 2.67)% *vs* (52.35 ± 1.58)%, $P<0.05$; left ventricular end diastolic diameter: 1.090 ± 0.061 *vs* 0.790 0 ± 0.024 5, left ventricular end systolic diameter: 0.750 ± 0.062 *vs* 0.610 ± 0.026]. **Conclusion** Transplantation of Nrf2-interfered MSCs suppresses the expression of anti-apoptotic protein while promotes that of pro-apoptotic protein in myocardial infarction zone, and reduces the repair ability of exogenous MSCs for infarcted heart.

[**Key words**] nuclear factor erythroid 2-related factor 2; siRNA; myocardial infarction; bone mesenchymal stem cells; cell apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81360021) and the Science and Technology Foundation of Guizhou Province (J-LKZ-2012-2).
Corresponding author: Shi Bei, E-mail: shibei2147@163.com

近年来,有关骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)移植在心肌梗死(myocardial Infarction,MI)后组织修复等方面的研究带来了曙光[1]。基础研究显示,心肌梗死后移植或局部注射 MSCs 可在梗死交界区域存活并分化为心肌、血管内皮血管,改善心室重构,提高梗死后左心室功能[2-3]。但目前对移植细胞低生存率的原因仍不清楚。核因子相关因子 2(Nrf2)是抗氧化应激反应重要的因子 。当发生氧化应激时,Nrf2 与 Keap1 分离并转位至核内与抗氧化反应元件结合,启动抗氧化反应元件介导的抗氧化酶蛋白和Ⅱ相解毒酶基因转录和表达,发挥抗氧化应激保护细胞作用[4]。但也有不一致的文献报道,Ichihara 等[5]研究显示,Nrf2 基因缺失能通过提高机体组织炎症反应而促进缺血组织的血管形成。这提示激活 Nrf2 对机体是不利的。那么 Nrf2 在机体中的作用是有力还是不利呢? 而 Nrf2 在 MSCs 中作用如何,Nrf2 是不是抵御恶劣外环境并使其存活的关键因子呢? 本课题组前期通过干扰 MSCs 中 Nrf2 的作用,观察到干扰细胞中 Nrf2 后,细胞增殖分化和迁移能力均下降,细胞凋亡率增加。为了进一步观察干扰 Nrf2 的 MSCs 在体内的作用,本研究应用干扰 Nrf2 的 MSCs 移植至心肌梗死的大鼠模型,观察其在心肌梗死后微环境中凋亡的情况及 对梗死后心功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器

沉默 Nrf2 基因(siRNA-Nrf2-EGFP-LV)和空载体携带 EGFP 的慢病毒载体(siRNA-EGFP-LV)购自南京凯基生物公司。DMEM 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清均购自 HyClone 公司。兔抗大鼠 Nrf2 抗体、HO-1 抗体、caspase3 抗体、Bcl-2 抗体、Bax 抗体、GAPDH 抗体和 HistoneH3 抗体均购自 Abcam 公司;Masson 和 TTC 染色试剂盒均购自南京奥多福尼生物科技有限公司。图像处理系统为德国莱卡公司的 Leica Qwin Plus。

1.2 实验动物和分组

2~3 个月龄清洁级 SD 大鼠 60 只,雌雄不限,体质量 200~250 g,购自中国人民解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心[合格证号:SCXK(渝)2012-

0005]。构建心肌梗死模型,利用随机数字表进行分组①siRNA-Nrf2-EGFP-LV 转染 MSCs 移植组(Nrf2 干扰组);②siRNA-EGFP-LV 转染 MSCs 移植组(Nrf2 正常组);③注射等体积 PBS 作对照(对照组 $n=12$)。实验过程中如有动物死亡,则按同样方法补充相应的动物。

1.3 MSCs 的培养、鉴定及慢病毒转染及 Nrf2 表达检测

参考课题组前期实验方法[1,6]培养细胞,采用全骨髓贴壁法培养获得大鼠骨髓 MSCs。第 3 代(P3)细胞用于实验。

细胞转染方法参考课题组前期实验方法,细胞转染后 72 h,应用流式细胞仪检测转染后细胞凋亡率,荧光显微镜观察转染细胞形态[1,6]。在缺氧状态下,细胞转染 siRNA-Nrf2-EGFP-LV,转染 PBS 作为对照,应用 Western blot 检测病毒转染后 6 h(预实验得结果)MSCs 中 Nrf2 蛋白的表达,最后使用奥德赛软件测出条带的积分光密度值(IOD),使用目的蛋白 IOD 与内参蛋白 IOD 的比值,进行统计学分析。重复转染细胞,细胞转染后 72 h,胰蛋白酶消化细胞,以无血清 DMEM 制成 MSCs 细胞悬液用于细胞移植。

1.4 建立大鼠心肌梗死模型及细胞移植

参照课题组前期实验建立大鼠心肌梗死模型,通过观察心室心肌局部心肌颜色变化及心电图 ST 段判断模型是否建立成功[1]。10 min 后,采用胰岛素注射针在梗死交界区注射 2×10^6/0.3 mL 的细胞。逐层关胸,待大鼠转为苏醒状态时清除气管内分泌物,缓慢拔出器官插管并缝合。若出现提前死亡,及时补足各组大鼠数量。

1.5 心功能的测定

心肌梗死细胞移植后 28 d 再次麻醉大鼠,剃毛后用频率为 10 MHz 的超声探头,置于大鼠胸骨左缘第 4、5 肋间,测量左室舒张末期内径(LVDd)和收缩末期内径(LVDs),并计算射血分数(EF)值。心功能检测完毕处死动物行相关病理学检查。

1.6 组织病理学检查

在心肌梗死细胞移植后 28 d 处死大鼠立即取出心脏,沿梗死交界区中部垂直于长轴的方向切去厚约 5 mm 的心肌组织存放于 10% 多聚甲醛缓冲液中固定,常规脱水,透明,石蜡包埋。常规 HE 染色,并在普通显微镜下观察心肌组织结构。

1.7 TTC 染色检测心境梗死面积

心肌梗死细胞移植后 28 d 行心肌 TTC 染色。麻醉、消毒大鼠后打开大鼠胸腔,将 1 mL 新鲜配制的 0.1% TTC 溶液用 1 mL 注射器由下腔静脉逆行缓慢注入,保持心脏跳动 3 ~ 4 min 后,摘取心脏并用生理盐水洗净心脏中的残留血液,迅速置于 -80 ℃冰箱冻存 10 min,切片并置于4% 多聚甲醛固定 20 ~ 30 min,使用计算机图像分软件计算心肌梗死面积并测量室壁厚度。

1.8 组织免疫荧光检测心肌梗死区心肌凋亡蛋白 caspase3 的表达情况

取 -20 ℃梗死心肌切片,由于切片冻存前已经冰丙酮处理,故置于室温复温后直接加入 1% BSA 液封闭 2 h,加兔抗大鼠 caspase3 抗体(1∶200),4 ℃湿盒过夜,PBS 冲洗后加羊抗兔二抗 37 ℃避光孵育 1 h,PBS 冲洗后加入 DAPI 染核 10 min。用防荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下拍片并计算荧光强度。

1.9 Western blot 检测梗死交界区 Nrf2、Bcl-2、Bax 的蛋白表达情况

心肌梗死细胞移植后 28 d,取梗死交界区心肌组织,加入适量的裂解液和 PMSF(100∶1)后在冰上低温快速研磨匀浆、离心后取上清液。应用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取样品上样行 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙酰胺凝胶电泳,再将电泳蛋白转移至硝酸纤维素膜上,以 5% 脱脂奶粉溶液于室温下封闭 2 h,加入一抗于 4 ℃摇床孵育过夜,加二抗于室温下避光孵育 1 h。使用奥德赛软件测出条带的积分光密度值(IOD),使用目的蛋白 IOD 与内参蛋白 IOD 的比值,进行统计学分析。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件统计并分析本实验数据、,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞及病毒转染后增强型绿色荧光蛋白的表达情况

镜下可见 P3MSCs 细胞形态呈长梭形状,分布均匀。慢病毒转染 MSCs 后 72 h 可见大量 MSCs 稳定表达绿色荧光,细胞形态未见明显改变,仍呈长梭形外观。

2.2 干扰 siRNA 对 MSCs 内 Nrf2 蛋白表达的情况观察

细胞转染 siRNA-Nrf2-EGFP-LV 并在缺氧状态下预处理 6h,Western blot 检测结果显示,Nrf2 干扰组 Nrf2 核蛋白(0.573 ± 0.032)较对照组(0.104 ± 0.051)表达显著降低($P<0.05$),表明 Nrf2 siRNA 可成功干扰 Nrf2 的表达。

2.3 心肌梗死区移植细胞凋亡情况

心梗细胞移植后7 d,梗死心肌区域检测到标记EGFP的MSCs存在,MSCs表达的区域caspase3表达阳性,从图中可见Nrf2干扰组EGFP及caspase3表达增加,Nrf2正常组caspase3表达降低,对照组未检测到EGFP表达(图1)。梗死同一区域EGFP和caspase3表达阳性,表明携带GGFP的MSCs移植后在梗死局部发生凋亡。

2.4 组织形态学病理学变化

正常心肌组织HE染色显示结构完整,纤维排列整齐,细胞核、细胞质清晰可见,细胞间连接存在;心肌梗死细胞移植后28 d,Nrf2干扰组和对照组梗死交界区肌纤维排列稀疏紊乱,肌纤维断裂、间质充血水肿,并可见大量炎性细胞浸润;而Nrf2正常组上述病理改变均明显减轻。TTC染色显示,正常心肌染成砖红色,梗死心肌染成白色。心肌梗死细胞移植后28 d,TTC染色显示对照组梗死面积为(35.40 ± 0.70)%,Nrf2正常组为(25.07 ± 0.15)%,Nrf2干扰组为(35.3 ± 0.41)%。Nrf2干扰组与Nrf2正常组比较心肌梗死面积增加($P<0.05$),而与对照组比较,梗死面积无差异性($P>0.05$,图2)。

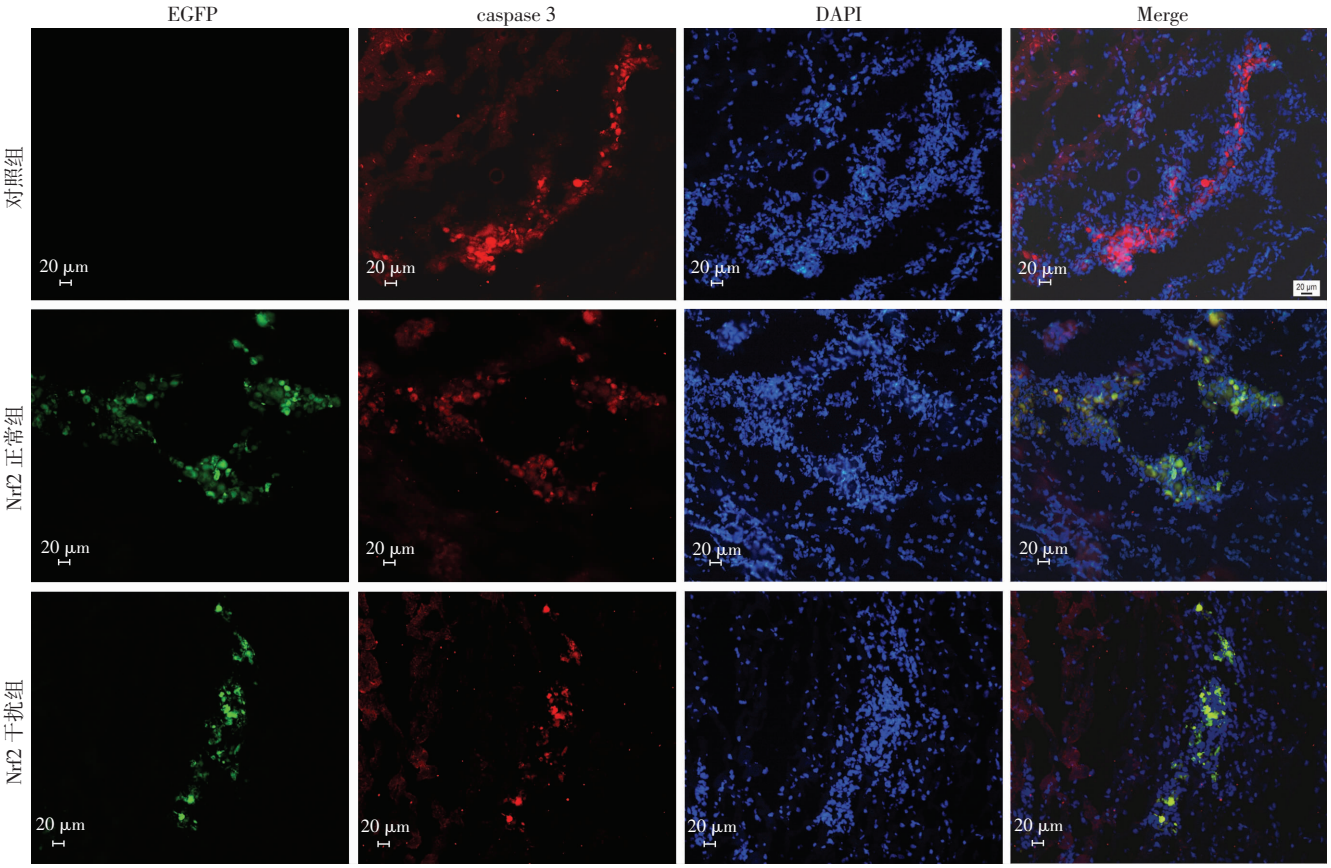
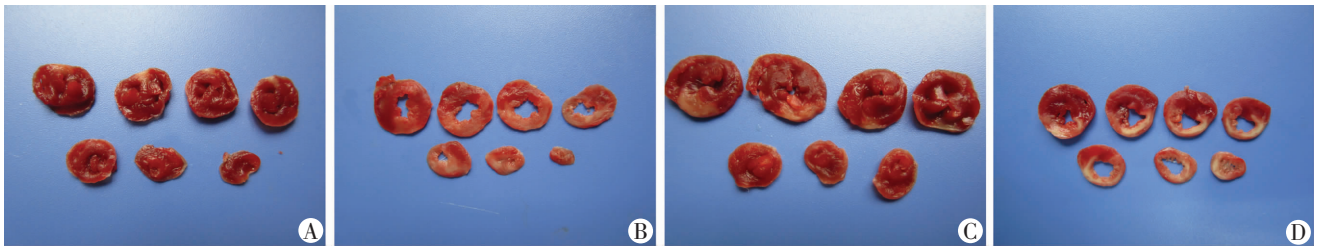


图1 大鼠心肌梗死并干扰Nrf2的MSCs移植后7 d免疫荧光检测心肌梗死局部EGFP和caspase3表达 (×200)

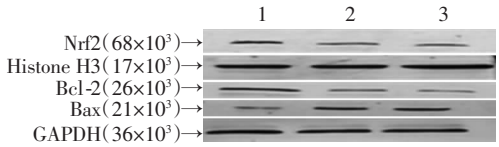


A:正常心肌;B:对照组;C:Nrf2正常组;D:Nrf2干扰组

图2 大鼠心肌梗死并干扰Nrf2的MSCs移植后28 d TTC染色观察大体标本

2.5 沉默 Nrf2 对各组梗死心肌中 Nrf2 及凋亡相关蛋白的表达情况

心梗细胞移植后 28 d，采用 Western blot 检测各组大鼠左室心肌组织梗死交界区核蛋白 Nrf2 和凋亡相关蛋白表达，Bcl-2 是促细胞生存，抗细胞凋亡基因，而 Bax 是促细胞凋亡基因，通过测定两种基因变化来评价 Nrf2 对细胞应激的影响。Western blot 结果显示：与 Nrf2 正常组比较，Nrf2 干扰组 Nrf2、Bcl-2 蛋白表达下降，Bax 表达增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）；上述蛋白表达情况在 Nrf2 干扰组组与对照组相似，两组差异无统计学意义（$P>0.05$，图 3）。



1：Nrf2 正常组；2：Nrf2 干扰组；3：对照组

图 3 大鼠心肌梗死并干扰 Nrf2 的 MSCs 移植后 28 d Western blot 检测梗死心肌 Nrf2 及凋亡相关蛋白表达

2.6 心功能指标检测结果

心肌梗死细胞移植后 28 d，超声心动图检测心功能结果显示，与对照组比较，siRNA-Nrf2 转染 MSCs 移植组中 LVDd 和 LVDs 数值增大（$P<0.05$），EF 值降低（$P<0.05$），差异均有统计学意义；而 shRNA-Nrf2 转染 MSCs 移植组与对照组比较，其 LVDd 和 LVDs 值均缩小（$P<0.05$），EF 值增加（$P<0.05$，表 1）。

表 1 心肌梗死后 28 d 各组心功能指标 EF、LVDd 和 LVDs 的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	LVEF(%)	LVDd(mm)	LVDs(mm)
Nrf2 正常组	52.35±11.580	0.79±0.025	0.61 ±0.026
Nrf2 干扰组	40.83±2.666[a]	1.09±0.061[a]	0.75±0.062[a]
对照组	39.78±1.370	1.07±0.105	0.72±0.040

a：$P<0.05$，与 Nrf2 正常组比较

3 讨论

近年来，有关 MSCs 移植在心肌梗死后组织修复等方面的研究提供了令人兴奋的结果[1-3]。我们前期动物实验研究也显示：基因修饰后的 MSCs 移植可改善心肌梗死后心脏功能并减轻血管成形术后再狭窄的发生[6]。然而，细胞移植低生存率仍是限制细胞疗效的关键[7]。细胞疗法导致细胞低生存率的确切机制目前仍不清楚。一方面可能与细胞从骨髓中分离出后，细胞不可避免地暴露在应激情况下，如低血清、缺氧、氧化应激。另一方面，由于炎症、化学损伤和炎症因子释放使凋亡蛋白表达增加。因此增加 MSCs 抵御恶劣微环境来增加细胞的治疗疗效是很有必要的。目前正在研究一些策略来改变细胞的生物特征和功能效应，例如，把细胞捕获在特殊的生物支架上，移植细胞预处理，改变细胞遗传学等。近来也有以下研究利用一些保护因子过表达在 MSCs 上增加细胞的生存能力。

Nrf2 是内源性抗氧化应激的重要因子，当细胞损伤时 Nrf2 发挥重要的细胞保护作用，如缺血再灌注损伤[8]和炎症反应[9-10]。同时，过表达 Nrf2 可减少心肌缺血再灌注损伤[11]。Mohammad 等[12]在 MSCs 中过表达 Nrf2 后细胞死亡和细胞凋亡率明显减少，且在缺氧及氧化应激环境，MSCs 中过表达 Nrf2 增加 SOD 和 Ho-1 的活性。在生理条件下，Nrf2 与其胞浆抑制剂 Keap1 结合并呈低水平表达。当发生氧化应激时，Nrf2 与 Keap1 分离并转位至核内从而诱导大量抗氧化和抗炎症基因表达[7]。但众所知之，细胞在缺氧、无血清及氧化应激情况下会发生死亡[13]。且多项研究显示：移植细胞仅仅有很低的生存率[14-15]。再结合 Barajas 等[16]和 Ichihara 等[5]研究显示过度激活 Nrf2 对机体不利的作用。那么 Nrf2 究竟对细胞抗氧化应激的保护作用如何呢？

为了观察 Nrf2 对细胞的保护作用，前期课题组利用干扰 Nrf2 的慢病毒转染 MSCs 来干扰细胞中 Nrf2 的表达，观察到细胞中 Nrf2 被消弱后，细胞增殖、分化及迁移能力均减弱，同时细胞抗氧化基因 HO-1 表达明显减弱，MSCs 对氧化应激环境的耐受能力明显降低，而 Bcl-2 表达显著下降，Bax 表达显著增。进一步从反面证实了 Mohammad 等[12]将 MSCs 过表达 Nrf2 对细胞应对氧化应激的保护作用。为了在体内进一步验证体外结果。本实验利用转染 siRNA-Nrf2 的干细胞注射至心肌梗死大鼠的梗死交界区，观察移植细胞凋亡情况及对梗死后心功能的修复作用。结果显示：心肌梗死细胞移植后 7 d，Nrf2 正常组及 Nrf2 干扰组梗死心肌组织局部均可见 Caspase3 蛋白表达，但 Nrf2 正常组可见大量绿色荧光标记的 EGFP 表达，而 Nrf2 干扰组绿色荧光表达少，对照组未见荧光表达，提示梗死后细胞注射仍有部分细胞存活。心梗细胞移植后 28 d，HE 染色显示 Nrf2 干扰组梗死交界区心肌纤维排列紊乱，间质可见充血水肿明显可见大量炎性细胞浸润；而 Nrf2 干扰组心肌组织排列有序，间质充血减少炎性细胞浸润降低。TTC 染色提示，Nrf2 干扰组心肌梗死面积（35.3±0.41）% 与 Nrf2 正常组（25.07±0.15）% 比较明显增加（$P<0.05$），与对照组（35.40±

0.70)%比较无差异性($P>0.05$)。细胞移植对梗死后心功能的影响,Nrf2 干扰组 EF(40.83±2.67)%,LVDd,(1.09±0.061),LVDs(0.75±0.062),与 Nrf2 正常组 EF(52.35±1.58)%,LVDd,(0.79±0.0245),LVDs(0.61±0.026)比较($P<0.05$),与对照组(EF,39.78%)(LVDd,1.07 mm)(LVDs,0.72 mm)比较,Nrf2 干扰组对不能改善梗死后心功能($P>0.05$)。由此可见,干扰 MSCs 中的 Nrf2 基因后,MSCs 移植对梗死心脏无修复作用。

Bc1-2 家族作为凋亡通路中的重要因子,在细胞凋亡过程中扮演了促凋亡和抗凋亡两个截然不同的角色,可分为以 Bax 为代表的促细胞凋亡因子和以 Bc1-2 为代表的抗细胞凋亡因子。Bcl-2/Bax 比值对调控细胞凋亡有很重要的意义。本实验结果发现,心肌梗死细胞移植后 28d,与 Nrf2 正常组比较,Nrf2 干扰组心肌组织中 Bcl-2 表达降低,Bax 表达增高,Bcl-2/Bax 比值下降。由此可见,Nrf2 信号在 MSCs 移植治疗中能保护细胞免受损伤并使其更有效地对梗死心肌发挥修复作用。

总之,本实验通过携带 siRNA-Nrf2 的慢病毒载体转染 MSCs 干扰细胞中 Nrf2 的表达后,干扰 Nrf2 的细胞移植不能有效改善心肌梗死面积,并且移植后促凋亡蛋白 Bax 表达增加,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,不利于所移植干细胞发挥心脏修复作用,这从反面为基因修饰的 MSCs 治疗心肌梗死提供了重要实验证据和理论依据。

参考文献:

[1] Chou S H, Lin S Z, Kuo W W, *et al*. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy[J]. Cell Transplant, 2014, 23(4/5): 513-529.

[2] Shi B, Long X, Zhao R, *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cells carrying the human receptor activity-modifying protein 1 gene improves cardiac function and inhibits neointimal proliferation in the carotid angioplasty and myocardial infarction rabbit model [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(3): 356-365.

[3] Zhao Y, Li T, Wei X, *et al*. Mesenchymal stem cell transplantation improves regional cardiac remodeling following ovine infarction[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(9): 685-695.

[4] Ye M, Wang Q, Zhang W, *et al*. Oroxylin A exerts anti-inflammatory activity on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage via Nrf2/ARE activation[J]. Biochem Cell Biol, 2014, 92(5): 337-348.

[5] Ichihara S, Yamada Y, Liu F, *et al*. Ablation of the transcription factor Nrf2 promotes ischemia-induced neovascularization by enhancing the inflammatory response[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(8): 1553-1561.

[6] 石蓓, 刘志江, 赵然尊, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心脏功能及损伤血管再狭窄的影响[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(32): 2269-2273.

[7] Li W, Ma N, Ong L L, *et al*. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function[J]. Stem Cells, 2007, 25(8): 2118-2127.

[8] Valen G. Extracardiac approaches to protecting the heart[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2009, 35(4): 651-657.

[9] Tang Y L, Tang Y, Zhang Y C, *et al*. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 46(7): 1339-1350.

[10] Huwer H, Welter C, Ozbek C, *et al*. Simultaneous surgical revascularization and angiogenic gene therapy in diffuse coronary artery disease[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 20(6): 1128-1134.

[11] Lee T M, Lin S Z, Chang N C. Antiarrhythmic effect of lithium in rats after myocardial infarction by activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77: 71-81.

[12] Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, *et al*. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity[J]. Cell Stress Chaperones, 2012, 17(5): 553-565.

[13] Zhu W, Chen J, Cong X, *et al*. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 416-425.

[14] Liu X B, Wang J A, Ji X Y, *et al*. Preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells by prolyl hydroxylase inhibition enhances cell survival and angiogenesis in vitro and after transplantation into the ischemic heart of rats[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(5): 111.

[15] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, *et al*. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2006, 355(12): 1199-1209.

[16] Barajas B, Che N, Yin F, *et al*. NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 58-66.

(收稿:2015-01-24;修回:2015-03-24)

(编辑 栾 嘉)