

综述

## 基因修饰在干细胞治疗缺血性心脏病中的应用进展

## Application of gene modification in stem cell-based therapy for ischemic heart disease

杨俊杰 综述 陈韵岱 审校  
解放军总医院 心内科, 北京 100853

**摘要:** 基因修饰将外源性基因导入目的细胞中, 使得该细胞具备过表达或静默表达某种基因的能力。在干细胞治疗缺血性心脏病领域, 基因修饰主要使干细胞过表达相关蛋白, 有助于提高细胞移植效率、保护心脏功能和协助体内示踪等。本文就基因修饰在干细胞治疗缺血性心脏病中的运用进展进行综述。

**关键词:** 基因修饰; 缺血性心脏病; 干细胞移植; 治疗

**中图分类号:** R 541.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1139(2012)06-0686-04

**网络出版时间:** 2012-02-10 16:45:53 **网络出版地址:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20120210.1645.001.html>

缺血性心脏病严重威胁人类健康。随着再生医学发展不断兴起, 干细胞治疗缺血性心脏病无论在基础研究还是临床试验都取得了巨大成果<sup>[1]</sup>。将干细胞移植入梗死心肌区域内用以保护濒死心肌、促进血管新生、改善局部炎症环境, 甚至带来后续的心肌再生, 都成为干细胞治疗缺血性心脏病的重要靶点。基础研究中, 大量新型干细胞, 例如诱导多能干细胞(iPSCs)、心脏干细胞(CSCs)等已被发现在动物心肌内具有良好的修复性能<sup>[2]</sup>。成体干细胞的临床试验也表明, 干细胞移植无论对急性心肌梗死, 还是心力衰竭, 都具有治疗作用<sup>[3]</sup>。尽管如此, 单纯干细胞移植入缺血或梗死区域, 面临细胞外基质、支持细胞或组织、氧气和营养底物的缺乏, 同时还有自由基、炎症细胞和清道夫细胞等的损伤和清除, 这些都导致移植后的早期细胞丢失, 无法真正发挥干细胞的多能保护作用<sup>[4]</sup>。基因修饰为干细胞治疗缺血性心脏病提供了一个新的契机, 无论在保护干细胞体内存活、提高干细胞输送平台效率还是在干细胞体内示踪等多方面, 基因修饰都发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。另外, 把细胞作为药物递送体, 将少量经过特殊设计能够放大旁分泌效应的细胞移植入缺血区, 可以发挥更好的生物学作用和临床疗效。通过上述方法, 将更多体内残留的干细胞动员到损伤区域参与修复, 可以更大程度提高干细胞移植修复心肌的临床效果。本文就基因修饰在干细胞治疗缺血性心脏病中的运用进展作一综述。

### 1 干细胞基因转导策略

通过基因修饰干细胞有多种方法。在选择合适的基因修饰方法时, 需要掌握各种基因转导方法的特点, 表达时限的要求, 转染效率的高低, 以及转染后细胞的增殖状态。

总的来说, 短期基因表达可通过质粒转导或腺病毒转染的方式进行, 而长期的基因表达则需要借助于腺相关病毒或逆转录病毒体系。

**1.1 质粒转导** 大量研究已经表明通过转导剂可以直接将质粒DNA导入细胞, 但是这样的转染效率非常低, 而且与转导细胞类型有很大关系<sup>[6]</sup>。同时, 导入目的基因的种类也决定了质粒转导是否有效。有的目的基因, 如分泌型的保护因子SDF-1等, 利用质粒转导方式是可行而且有效的; 但是对于那些需要在靶细胞上大量表达的分子, 如整合素等, 这样的质粒转导方式无法满足期望。

**1.2 腺病毒** 复制缺陷型腺病毒载体可以通过特有的共转染体系提高多种细胞的转染效率。腺病毒载体是去除了编码病毒基因表达序列(E1A和E1B)而无复制能力的编码框, 它可以稳定的整合入宿主细胞胞质中。由于其未与染色体整合, 瘤变率相对较低。腺病毒对感染非增殖细胞和增殖细胞的能力是相似的。在感染效率方面, 腺病毒可以提供较高的病毒滴度从而保证有效的基因转染。在表达时限方面, 腺病毒转染最多持续2周左右, 表达高峰期多位于感染第7-10天<sup>[7]</sup>。其不足则在于, 腺病毒表达时限有限, 无法保证长期目的基因表达, 同时还有一定的免疫原性。

**1.3 腺相关病毒** 腺相关病毒载体不表达任何病毒基因产物, 因此具有更低的免疫原性。虽然有轻微的炎症反应, 此类载体能够保证目的基因有效和长时间的表达。增殖或非增殖细胞都可以使用该病毒载体进行转染, 且对人体没有损害<sup>[8]</sup>。但是, 其载体搭载能力受限于目的基因大小, 并且由于很难大规模产出以及存在潜在的嵌入式瘤变可能, 使得腺相关病毒载体的运用受到一定限制。

**1.4 逆转录病毒** 逆转录病毒由于精确整合入宿主染色体, 具有稳定长期表达目的基因的能力。这类载体在体外消除具有转染能力的基因颗粒, 从而减小全身感染或宿主间传播的几率。尽管如此, 此类载体也有一定局限: 首先很难维持高浓度的病毒滴度; 其次只能转染处于增殖期的细胞; 其可能引发的逆转录病毒载体随机整合也带了了宿主

收稿日期: 2011-12-22 修回日期: 2012-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81070185)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81070185)

作者简介: 杨俊杰, 在读博士。研究方向: 心血管疾病干细胞治疗的基础和临床。Email: fearlessyang@126.com

通信作者: 陈韵岱, 主任医师, 教授。Email: cyundai@medmail.com.cn

细胞瘤变的风险。在严重的免疫缺陷型疾病患者中,利用体外逆转录病毒转染的造血干细胞移植曾被用于临床试验<sup>[9]</sup>。慢病毒载体属于逆转录病毒的一种,其既可以转染增殖细胞,也可以转染非增殖细胞。

## 2 基因修饰提高细胞移植效率

在围梗死期和缺血性心肌病期,细胞治疗的作用是不同的,因此,细胞治疗受制约的因素也是不一样的。基因治疗靶点可以着眼于细胞移植的各个阶段,协助解决制约移植治疗的多个瓶颈,包括早期存活、细胞滞留和迁移、细胞功能性聚集和基质降解等。

**2.1 干细胞归巢** 很多细胞趋化因子和生长因子具有将干细胞归巢至心肌的能力,比如间质细胞来源因子-1(SDF-1)、单核细胞趋化蛋白-3(MCP-3)、生长调节原癌基因-1(GRO-1)、肝细胞生长因子(HGF)、成纤维生长因子-2(FGF-2)和胰岛素样生长因子(IGF-1)。这些不同的干细胞归巢因子可以动员不同类型的干细胞。比如,SDF-1可以动员表达CXCR4的诸如造血干细胞(HSCs)、内皮祖细胞(EPCs)、心脏干细胞(CSCs)和特异表达该因子的间充质干细胞(MSCs)<sup>[10]</sup>,MCP-3可动员间充质干细胞<sup>[11]</sup>,GRO-1则可促使骨髓来源的EPCs归巢<sup>[12]</sup>,而HGF、FGF-2和IGF-1能激发体内残留的心脏干细胞归巢<sup>[13]</sup>。同时,新近的研究还发现,VEGF过表达可以动员VEGFR2阳性的细胞归巢并诱导原位内皮细胞增殖参与血管新生,VEGF-165修饰后的成骨细胞移植入梗死区域可以提高血管密度并改善心脏功能。

在急性心肌梗死发生后,缺血区域可以产生大量的干细胞归巢因子,进而动员多种类型干细胞定位至损伤的心肌组织周围,但是这些因子的表达只能持续非常有限的时间。例如,梗死后SDF-1表达时间不超过一周,而MCP-1则不到10d。大量研究表明,通过细胞介导的基因治疗,将SDF-1在心肌组织中的过表达时间延长,可以诱导移植细胞的定位、提高血管密度、激活和动员自体心脏干细胞,最终改善心脏功能。同时,过表达SDF-1受体CXCR4的间充质细胞或造血干细胞在梗死后24h移植入心脏,同样可以提高工程化细胞的定位并提高左室功能<sup>[14]</sup>。因此,过表达干细胞动员因子的工程化细胞可以重新激发或延长骨髓来源或心脏干细胞定位至受损心肌区域的时间和程度。相反,外源性移植入体内的干细胞也可以借助过表达相关因子的受体,提高动员细胞定位至心脏组织的效率。

**2.2 干细胞迁移和植入** 黏附分子和整合素被用于提高干细胞的迁移和植入。利用蛋白酶类物质调节干细胞在受损心肌组织中的迁移,改善结缔组织微环境从而提高干细胞的植入效率。

多种蛋白酶类可以协助干细胞在心脏组织中迁移和植入,这些也是干细胞移植前基因调控的重要靶点。现在发现,上调纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的表达,组织纤溶酶活性降低,粒细胞浸润以及组织降解被有效抑制,从而使左室扩张现象得到有效改善。但是有研究显示,使用序列特异性催化的DNA酶降低PAI-1表达并激活组织纤溶酶活性,可以提高外源性干细胞在梗死区域的植入能力<sup>[15]</sup>。

急性心梗后抑制PAI-1表达,不仅提高了干细胞植入能力,更有效降低了心肌细胞凋亡并改善了心功能。

内皮源性一氧化氮合酶(eNOS)的表达也被认为可以增强心梗后细胞治疗的疗效,而且存在多种机制。就迁移和植入来说,eNOS是干细胞迁移的关键<sup>[16]</sup>,前者表达可以上调金属蛋白酶(MMP-9)的表达,提高干细胞在急性心梗时期的迁移效率。有趣的是,eNOS介导MMP-9的上调是依靠雌激素来完成的,提示急性心梗的预后存在性别差异的原因。相似的是,HMG-CoA还原酶抑制,由于可提高eNOS表达,被发现可以提高干细胞迁移<sup>[17]</sup>。这也揭示了他汀治疗使急性心梗患者收益的一个潜在机制。有研究已经显示,利用基因工程上调干细胞中的eNOS表达可以改善干细胞的迁移能力,而上述结果是通过修复SDF-1介导的干细胞迁移来实现的。将eNOS的cDNA直接导入心肌,也可以提高猪慢性缺血模型中原位内皮细胞的增殖并改善血流灌注。因此采用基因修饰技术,使用合适干细胞载体将eNOS引入梗死区域可以提高干细胞治疗的疗效。

整合素是位于细胞表面的重要细胞表面受体,它介导了干细胞的动员和迁移,每个细胞表面受体都是干细胞移植前使用基因增强的靶点,同时也是观察冠心病和慢性心力衰竭等慢性炎症性疾病是否降低这些干细胞表面抗体的研究靶点。干细胞整合素表达的基因调控有多种形式,短暂的表达可以提高干细胞植入效率,提高在受损心肌区域的细胞旁分泌功能,以及配合其他分子途径诱导长期的细胞植入。相反,长期的整合素表达是干细胞远期植入效率提高和功能改善的必要条件。整合素和关键受体是具有细胞特异性的。现在发现,EPCs主要依靠SDF-1和CXCR4这个系统,而CD18和ICAM-1也是其重要的细胞表面整合素<sup>[18]</sup>。整合素类相关酶(ILK)可以上调EPCs的ICAM-1表达,而在缺氧条件下,ILK被热休克蛋白(HSP-90)所保护,而上述保护机制是通过NF $\kappa$ B和HIF-1 $\alpha$ 等介导的信号传导引发的。因此,在正常细胞中,单纯提高ILK的表达足以诱导ICAM-1表达,提示这是调节整合素介导的细胞黏附和迁移的重要上游靶点。而间充质细胞并不完全依赖于SDF-1/CXCR4这个系统,同时也有MCP-3/CCR1,2的参与。有趣的是,间充质细胞的迁移是通过整合素 $\beta$ 1来实现的,而不是整合素 $\beta$ 1和 $\alpha$ 4,后者主要在造血干细胞来源种群干细胞中表达<sup>[19]</sup>。

**2.3 细胞外基质的介导** 优化干细胞植入后的细胞外基质,也可以提高细胞治疗的疗效。通过组织工程优化心肌移植物的研究,发现了一些诱导细胞外基质形成或重构并最终提高干细胞植入能力的关键因子,比如腱糖蛋白-C(Tenascin-C, TN-C)、松弛素(relaxin)和骨膜蛋白(periostin),这些都可以并已经被用于干细胞介导的基因转导研究。

TN-C是一种细胞外基质类分子,急性心梗后的梗死组织愈合过程中可见上述分子表达。但是该分子长期表达可导致慢性心力衰竭的发生,醛固酮类药物可以通过下调该分子的表达改善心室重构。但是,该分子在围梗死期中的表达被认为是正常修复的关键。肌成纤维细胞植入梗死

区后, TN-C 出现了表达上调。而体外研究发现, TN-C 可以提高成纤维细胞的迁移和特异性蛋白  $\alpha$ -SMA 的表达<sup>[20]</sup>。

松弛素是一种激素类物质, 包括胰岛素样肽在内的松弛素超家族可以作用于血管和心脏, 通过释放一氧化氮起到扩张血管的作用。有研究在猪的缺血再灌注模型中的再灌注期间静脉使用松弛素, 发现心肌坏死、凋亡和受损心肌区域白细胞浸润等现象明显改善。接受松弛素过表达细胞移植后的动物, 与对照组相比, 可以显著提高血管密度和改善心脏功能<sup>[21]</sup>。

骨膜蛋白是一种分泌性的细胞外基质蛋白, 在心脏的多种病理环境中发挥影响心室重构、干细胞植入和分化等作用。在受损后的成纤维细胞中正常表达, 该类蛋白参与调节心肌细胞的肥厚。利用骨膜蛋白阴性表达的小鼠, 研究者发现心脏破裂发生率增高, 但是存活下来的小鼠发生较少的心脏纤维化并保存相对较好的心功能。将骨膜蛋白注射入梗死区域, 可以提高心肌细胞增殖, 降低心梗面积, 促进血管新生并最终改善心脏功能<sup>[22]</sup>。这些基质蛋白或基质降解的调节物为基因介导技术提高干细胞移植疗效提供了潜在的独特分子靶点。

**2.4 干细胞存活和移植疗效** 在梗死区域的存活是干细胞移植改善心功能的重要条件。早期研究利用 P-Akt、Bcl-2 和 HO-1 等因子过表达, 都可以提高间充质干细胞在移植区域的存活, 降低心梗面积。但是干细胞基因修饰后尽管带来了干细胞存活和心功能的改善, 却并不认为是单纯细胞数量增多的结果。有趣的是, 单纯使用修饰后细胞的培养上清注射入梗死区域, 也可以同样降低心梗面积并改善心脏功能<sup>[23]</sup>。这些结果支持了心肌修复的旁分泌假说, 不仅扩大了干细胞治疗基因修饰的潜在价值, 还提示心肌直接修饰可以带来与细胞治疗相似的疗效。

通过不同的序列分析, 可以发现 p-Akt 过表达后的干细胞在多个细胞因子方面都有上调表达, 这些细胞因子也被认为是基因修饰干细胞发挥强大旁分泌保护作用的原因。其中, 诸如 VEGF、FGF-2、HGF 和 IGF-1 等细胞生长因子, 可以诱导心脏干细胞激活和迁移, 并其在技术上都可以对干细胞进行基因修饰从而完成移植<sup>[24]</sup>。胸腺蛋白  $\beta$  4, 可以与 ILK 以及 PINCH 形成复合体, 激活处于梗死周边区域心肌内部的 Akt 信号通路<sup>[25]</sup>。分泌型卷曲相关蛋白 2 (Sfrp 2) 是介导心肌存活和修复的重要干细胞分泌型蛋白。当该蛋白被抑制时, Akt 过表达的间充质干细胞移植后的心肌保护作用明显减弱。同样, Sfrp 2 本身具备保护缺氧受损的心肌细胞, 参与其中的机制包括核内及胞内连环素等物质水平的上调和激活 Wnt 抗凋亡信号通路等<sup>[26]</sup>。

**2.5 细胞间连接** 机械-电偶联的保持和恢复, 也是心肌梗死干细胞治疗的一个重要靶点。心脏猝死被认为是环路所致心律失常的结果, 而瘢痕组织的产生程度与后者密切相关。相关研究发现, 连接蛋白表达程度与心律失常程度密切相关。骨骼肌成纤维细胞和基因修饰后的骨骼肌成纤维细胞虽然可以提高心脏功能, 由于缺乏连接蛋白的表达, 具有潜在致心律失常作用。这些数据提示细胞治疗的电生理作

用和机械作用很可能是相互独立的。过表达连接蛋白, 如 (connexin 40, 43 或 45), 间充质干细胞移植后的致心律失常作用可以显著降低。通过基因修饰干细胞移植, 也许在将来可以取代或提高组织消融治疗恶性心律失常的疗效<sup>[27]</sup>。

**2.6 心肌细胞定向分化** 研究干细胞定向分化的机制, 并利用基因工程促进干细胞定向分化, 是未来干细胞治疗心脏疾病的重要前沿。目前对于诸如胚胎干细胞等在内的多种干细胞, 都发现存在促进其定向心肌分化的机制和干预因素。对成体细胞而言, 5-氮胞苷已经被公认为是体外诱导分化心肌的重要干预手段, 进一步研究其中的具体机制, 肯定有助于发现具体参与其中的关键因子和信号通路, 并可以通过基因工程化手段, 优化干细胞移植入体内的向心肌分化和功能改善<sup>[28]</sup>。此外, 利用细胞通透肽类物质 (CPP) 形成复合体, 将目的基因 (如 GATA-4) 导入干细胞内, 可以提高目的基因表达时限, 提高在梗死区域的干细胞再生效率, 从而进一步改善心脏功能<sup>[29]</sup>。

### 3 基因修饰在干细胞携带下过表达保护心脏

此类方法也被称为细胞介导的基因转导, 实际上利用细胞体外转染后植入或注射入体内发挥该目的基因对心脏的保护, 并不只适用于干细胞, 但是由于干细胞具有较好的旁分泌和分化潜能, 目前倾向于使用各类前体细胞携带过表达目的基因治疗缺血性心脏病。尤其在电-机械偶联障碍等方面, 通过导入起搏相关的基因, 比如  $\beta$ -肾上腺素能受体类蛋白, 可有助于诱发产生起搏细胞<sup>[30]</sup>。而导入电压门控通道蛋白相关基因, 如特异性超极化激活的环核苷酸通道 (HCN), 亦可诱导植入细胞发挥起搏功能<sup>[31]</sup>。

### 4 干细胞移植后的活体示踪

干细胞移植后的活体示踪是干细胞生物学的重要研究领域, 由于其避免处死动物以及能够实现在同一动物体内的动态追踪, 具有巨大的研究和运用前景。一般来讲, 活体示踪需要借助无创影像工具, 例如 PET、冷激光发射接收器和 MRI 等。目前主要的标记方式有直接标记和间接标记两种<sup>[32]</sup>, 直接标记主要针对细胞的表面标记, 其受外界因素干扰较大, 示踪的时间窗也较短。报告基因技术属于间接标记, 其主要利用基因转导技术, 将特异性报告基因片段插入细胞染色体内, 使其稳定表达该报告基因蛋白, 后者在一定化学或物理条件下激发产生可接受的信号, 从而达到细胞示踪的目的。报告基因技术只特异性标记活体细胞, 且不受细胞增殖影响。相关研究已经可以利用核医学成像原理、荧光蛋白激发以及核磁信号捕捉等技术, 在 PET、冷激光发射接收器和 MRI 上分别实现了对干细胞移植后的动态示踪<sup>[33]</sup>。从运用范围来讲, 由于冷激光发射接收器穿透性能较弱, 仅适用于小动物体内; 而 MRI 信号捕捉过程中的细胞标记过程较为繁琐, 且敏感度受限; PET/CT 虽能准确定位和量化, 但花费较为昂贵。尽管如此, 利用基因修饰进行干细胞示踪研究, 是明确干细胞定位、体内滞留规律以及移植后疗效量化的重要手段。

### 5 结语

临床前研究已经确定了干细胞治疗缺血性心脏病的几

个关键事件:干细胞定位、植入、存活、旁分泌和分化等,这些都是干细胞基因修饰的潜在靶点。干细胞基因工程技术的不断发展可以协助确认多种保护性因子,并进一步将后者结合干细胞移植提高治疗效果。同时,利用基础研究研制新的报告基因并修饰干细胞,有助于优化活体示踪,甚至达到体内细胞分化特异性水平。另外,开发出非病毒型转染方式结合心脏组织工程技术运用于心脏的因子治疗或系统疗法,也是未来干细胞基因修饰的发展方向。总之,随着研究的深入,相信会有更多的基因靶点和基因工程技术应用于缺血性心脏病的干细胞治疗领域。

#### 参考文献

- 1 Krishna KA, Krishna KS, Berrocal R, et al. Myocardial infarction and stem cells [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 3 (2): 182-188.
- 2 Takamiya M, Haider KH, Ashraf M. Identification and characterization of a novel multipotent sub-population of Sca-1 cardiac progenitor cells for myocardial regeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e25265.
- 3 Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease [J]. *Nature*, 2008, 451 (7181): 937-942.
- 4 Anversa P, Leri A, Rota M, et al. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (3): 589-601.
- 5 Bonaros N, Rauf R, Schachner T, et al. Enhanced cell therapy for ischemic heart disease [J]. *Transplantation*, 2008, 86 (9): 1151-1160.
- 6 Gray SJ, Samulski RJ. Optimizing gene delivery vectors for the treatment of heart disease [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8 (7): 911-922.
- 7 Deglurkar I, Mal N, Mills WR, et al. Mechanical and electrical effects of cell-based gene therapy for ischemic cardiomyopathy are independent [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17 (11): 1144-1151.
- 8 Chaanine AH, Kalman J, Hajjar RJ. Cardiac gene therapy [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 22 (2): 127-139.
- 9 Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, et al. Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3 (97): 97.
- 10 Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy [J]. *Lancet*, 2003, 362 (9385): 697-703.
- 11 Schenk S, Mal N, Finan A, et al. Monocyte chemoattractant protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (1): 245-251.
- 12 Koehler AA, Schuster MD, Bonaros N, et al. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40 (4): 455-464.
- 13 Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, et al. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352 (3): 635-641.
- 14 Zhang D, Fan GC, Zhou X, et al. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44 (2): 281-292.
- 15 Xiang G, Schuster MD, Seki T, et al. Downregulated expression of plasminogen activator inhibitor-1 augments myocardial neovascularization and reduces cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46 (3): 536-541.
- 16 Wong JC, Fiscus RR. Essential roles of the nitric oxide (no) /cGMP/protein kinase G type-Ialpha (PKG-Ialpha) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP) /cGMP/PKG-Ialpha autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112 (3): 829-839.
- 17 Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells [J]. *Coron Artery Dis*, 2004, 15 (5): 235-242.
- 18 Assmus B, Honold J, Schachinger V, et al. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (12): 1222-1232.
- 19 Ip JE, Wu Y, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXCR4 chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18 (8): 2873-2882.
- 20 Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (8): 962-969.
- 21 Nistri S, Cinci L, Perna AM, et al. Relaxin induces mast cell inhibition and reduces ventricular arrhythmias in a swine model of acute myocardial infarction [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 57 (1): 43-48.
- 22 Sato A, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K, et al. Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47 (11): 2319-2325.
- 23 Gnecci M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement [J]. *FASEB J*, 2006, 20 (6): 661-669.
- 24 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, et al. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120 (Pt 10): 1791-1800.
- 25 Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair [J]. *Nature*, 2004, 432 (7016): 466-472.
- 26 Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (5): 1643-1648.
- 27 Yankelson L, Feld Y, Bressler-Stramer T, et al. Cell therapy for modification of the myocardial electrophysiological substrate [J]. *Circulation*, 2008, 117 (6): 720-731.
- 28 Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, et al. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells [J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87 (3): 173-184.
- 29 Bian J, Kiedrowski M, Mal N, et al. Engineered cell therapy for sustained local myocardial delivery of nonsecreted proteins [J]. *Cell Transplant*, 2006, 15 (1): 67-74.
- 30 Brinks H, Boucher M, Gao E, et al. Level of G protein-coupled receptor kinase-2 determines myocardial ischemia/reperfusion injury via pro- and anti-apoptotic mechanisms [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (9): 1140-1149.
- 31 Robinson RB. Engineering a biological pacemaker: in vivo, in vitro and in silico models [J]. *Drug Discov Today Dis Models*, 2009, 6 (3): 93-98.
- 32 Pearl J, Wu JC. Seeing is believing: tracking cells to determine the effects of cell transplantation [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 20 (2): 102-109.
- 33 Ly HQ, Frangioni JV, Hajjar RJ. Imaging in cardiac cell-based therapy: in vivo tracking of the biological fate of therapeutic cells [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2008, 5 Suppl 2: S96-S102.