

## 二甲基亚砜诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化

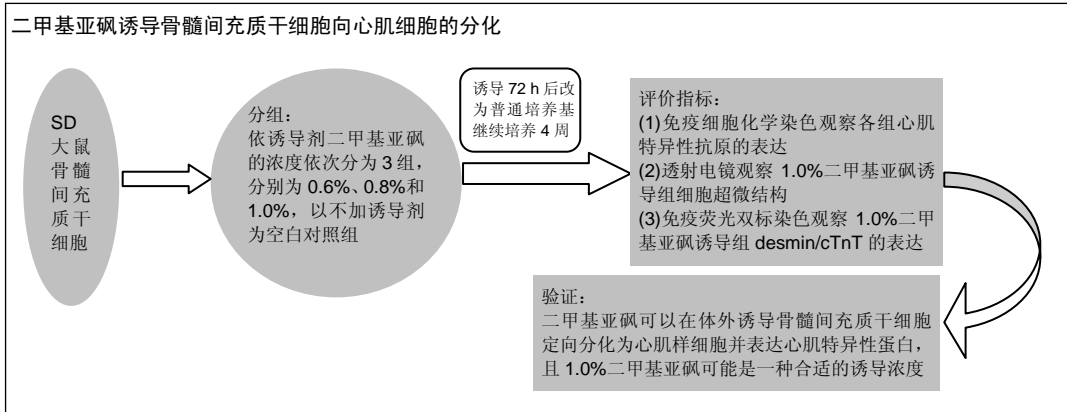
孙龙云(张家口学院, 河北省张家口市 075000)

引用本文: 孙龙云. 二甲基亚砜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, 2016, 20(1):26-30.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.01.005

ORCID: 0000-0002-8834-8321(孙龙云)

文章快速阅读:



孙龙云, 男, 1981年生, 河北省张家口市人, 汉族, 2004年河北医科大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事人体解剖与组织胚胎学方面的研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)01-00026-05

稿件接受:2015-11-13

http://www.crter.org

文题释义:

**心肌细胞特异性标志物 Desmin:** Desmin 作为心肌细胞分化的一种早期的标志已经得到公认。Desmin 是骨骼肌、平滑肌和心肌中主要的中间纤维蛋白。有研究表明, 肌肉横切片中, Desmin 呈现网状形式, 主要分布在胞浆。纵向切片中, Desmin 呈规则排列, 成狭长、珠状横带穿过肌纤维, 且延伸至肌纤维的边缘。Desmin 是横纹肌纤维中的特定组分, 在心脏浦肯野纤维中 Desmin 含量尤其丰富。Desmin 连接于 Z 线之间, 而使单个肌原纤维连接起来将收缩运动机械地整合在一起。

**二甲基亚砜:** 是一种含硫有机化合物, 是目前常用的诱导分化剂之一, 其作用机制主要是抑制 c-myc 基因的表达, 降低细胞内源性聚腺苷二磷酸核苷水平。除了诱导分化、抵抗凋亡刺激信号, 还可导致细胞周期停滞并发生细胞凋亡。

摘要

**背景:** 大量研究证明, 骨髓间充质干细胞在一定的诱导条件下可定向分化为心肌细胞。二甲基亚砜是目前常用的诱导分化剂之一, 其作用机制主要是通过抑制 c-myc 基因表达, 从而降低细胞内源性聚腺苷二磷酸核苷水平。

**目的:** 探讨二甲基亚砜诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞的可行性及最佳诱导浓度。

**方法:** 通过体外分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 并用二甲基亚砜诱导使其定向分化为心肌细胞, 依诱导剂二甲基亚砜的浓度分为 3 组, 浓度分别为 0.6%、0.8% 和 1.0%, 不加诱导剂为空白对照组。诱导 72 h 后, 去除诱导培养基, 加入不含诱导剂的普通培养基继续培养 4 周。

**结果与结论:** 形态学及免疫细胞化学检测显示二甲基亚砜可以在体外诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞并表达心肌特异性蛋白 desmin、 $\alpha$ -actin、cTnT、cTnI 和 P38MAPK, 且 1.0% 二甲基亚砜是最佳诱导浓度。免疫荧光双标染色及电镜结果均进一步证实二甲基亚砜可以诱导骨髓间充质干细胞获得心肌分化表型。

**关键词:**

干细胞; 骨髓干细胞; 二甲基亚砜; 骨髓间充质干细胞; 心肌细胞; 诱导分化

**主题词:**

二甲基亚砜; 骨髓; 间质干细胞; 肌细胞; 心脏; 细胞分化; 组织工程

### Dimethyl sulfoxide induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardial cells

Abstract

**BACKGROUND:** Numerous studies have demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells can be induced to differentiate into myocardial cells under certain conditions. Dimethyl sulfoxide is one of the commonly used inducers, and its mechanism is mainly by inhibiting the c-myc gene expression, thus reducing endogenous poly(adenosine diphosphate nucleotide) level.

**OBJECTIVE:** To study the feasibility of dimethyl sulfoxide inducing the myocardial differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and its optimal concentration.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells from Sprague-Dawley rats were isolated and cultured *in vitro*, and then induced by dimethyl sulfoxide to differentiate into myocardial cells. According to the concentrations of

Sun Long-yun (Zhangjiakou University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Sun Long-yun, Master,  
Lecturer, Zhangjiakou  
University, Zhangjiakou  
075000, Hebei Province,  
China

**Subject headings:** Dimethyl  
Sulfoxide; Bone Marrow;  
Mesenchymal Stem Cells;  
Myocytes, Cardiac; Cell  
Differentiation; Tissue  
Engineering

dimethyl sulfoxide, there were three groups: 0.6%, 0.8% and 1.0% group. Additionally, a blank control group with no induction was set up. After 72 hours of induction, induction media were removed, and cells were then cultured in normal media for 4 weeks.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Morphology and immunocytochemistry detection results confirmed that dimethyl sulfoxide could induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardial cells *in vitro*, and differentiated cells expressed desmin,  $\alpha$ -actin, cTnT, cTnI and P38MAPK. The optimal induced concentration of dimethyl sulfoxide was 1.0%. Immunofluorescence double staining and electron microscope results further confirmed that dimethyl sulfoxide could induce the myocardial differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

**Cite this article:** Sun LY. Dimethyl sulfoxide induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myocardial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(1):26-30.

## 0 引言 Introduction

近年来随着物质生活水平的提高及饮食结构的改变,以心肌梗死为代表的心血管系统疾病发病率呈上升趋势。细胞移植治疗心血管疾病已成为研究的热点之一,其中选择恰当的用于移植的种子细胞则是决定治疗成功与否的关键。骨髓间充质干细胞是存在于骨髓中除造血干细胞之外的另外一种干细胞,大量研究证明,骨髓间充质干细胞在一定的诱导条件下可定向分化为心肌细胞。二甲基亚砷是常用的诱导分化剂之一,其作用机制主要是通过抑制c-myc基因表达,降低细胞内源性聚腺苷二磷酸核苷水平。

实验探讨二甲基亚砷诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞的可行性及最佳诱导浓度,为骨髓间充质干细胞修复受损心肌组织的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2012年3月至2013年4月在河北北方学院基础医学实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** 3周龄SD大鼠50只,雌雄不限,体质量15-30 g,购于河北医科大学动物中心(合格证号为:908134)。

**试剂和仪器:** 胎牛血清(兰州民海公司);IMDM培养基(美国GIBCO公司);结蛋白(desmin)抗体、 $\alpha$ -sarcomeric actin抗体、P38MAPK抗体(博奥森公司);c-TnT抗体、c-TnI抗体(英国Abcam公司);二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo公司);透射电子显微镜H-7500(日本日立公司);L-600台式低速离心机(湖南湘仪实验仪器公司);倒置相差荧光显微镜(北京锐驰恒业仪器公司);Leica激光共聚焦扫描显微镜(德国Leica公司);BIO-RAD凝胶成像分析仪、Quantity One凝胶成像分析软件(美国BIO-RAD公司)。

1.4 实验方法

**大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养:** 将大鼠移至无菌操作间内,用无菌器械剥离出四肢长骨,保留骨骺端。用含有双抗(青霉素 $10^5$  U/L,链霉素100 mg/L)的D-Hank's液冲洗大鼠长骨两次。另取一套无菌器械去除长骨骨骺端显露骨髓腔,以IMDM培养基(含体积分数10%胎牛血清)反复

冲洗骨髓腔,收集冲洗液经无菌滤膜过滤,取一滴细胞悬液加入10  $\mu$ L 0.04%锥虫蓝混匀,血细胞计数板计数活细胞,然后调整接种细胞浓度为 $1 \times 10^4$  L<sup>-1</sup>,接种于无菌培养瓶中,置于37  $^{\circ}$ C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。12 h后半量换液,轻柔操作,仔细观察细胞贴壁情况,至24 h完全更换培养基。此后每隔2 d换液,当贴壁细胞均匀铺满瓶底90%时,即进行传代。

**骨髓间充质干细胞诱导分化:** 将生长良好、形态均一的第2代大鼠骨髓间充质干细胞培养48 h后,去除培养基,PBS洗涤2次以除净残余生长培养基,依诱导剂二甲基亚砷的浓度分为3组,分别为0.6%、0.8%和1.0%,不加诱导剂为空白对照组。诱导72 h后,去除诱导培养基,加入不含诱导剂的普通培养基继续培养4周。

**免疫细胞化学染色:** 取各组细胞爬片,0.01 mol/L PBS冲洗(3-5 s,  $\times 2$ 次, 37  $^{\circ}$ C),40 g/L多聚甲醛固定15 min,SP法进行免疫细胞化学染色。阳性率的计算:每组抗体各取5张切片,每张切片随机选取10个视野,胞质呈棕黄色为阳性,光镜下观察,分别计数每个视野内的总细胞数和染色阳性细胞数,计算骨髓间充质干细胞各标记物的阳性率,阳性率=染色阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

**免疫荧光双标染色方法:** 取各组生长旺盛、形态均一的细胞2瓶,去除培养基,PBS洗涤2次消除残余培养基,加入2 mL胰酶(5 g/L胰蛋白酶与0.04% EDTA以1:1混合)进行消化,倒置显微镜下观察直至细胞回缩变小,马上弃去消化液,加入培养基终止消化,吹打重悬后以 $1 \times 10^8$  L<sup>-1</sup>细胞浓度接种于已布好洁净盖玻片并高压蒸汽灭菌的平皿中。置于37  $^{\circ}$ C、体积分数5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养3 d。取出盖玻片PBS洗涤3次,40 g/L多聚甲醛固定30 min。去离子水洗3次,进行免疫荧光染色观察。

先用10 $\times$ 目镜,汞灯下观察标本染色情况,然后在20 $\times$ 物镜(NA=0.75)下扫描。整个实验过程增益(gain)、补偿(offset)、小孔孔径(pinhole)保持不变。FITC在Ar激光器488 nm波长下激发,Cy3在He-Ne激光器543 nm波长下激发,激发功率为10-15 mW,检测波长分别选择在500-530 nm、540-570 nm之间。 $\alpha$ -actin抗体阳性为红色,cTnT阳性为绿色。

**透射电镜观察:** 取浓度为1.0%二甲基亚砷诱导组生长旺盛、形态均一的细胞2瓶,去除培养基,PBS洗涤2次消

除残余培养基, 加入1 mL固定液吹打重悬后移入1 mL Eppendorf管, 8 000 r/min离心5 min形成细胞团块, 置于4 °C固定24 h。随后, 0.01 mol/L PBS清洗15 min×3次, 4.0%锇酸固定2 h(4 °C), 0.01 mol/L PBS清洗15 min×3次, 丙酮逐级脱水(50%, 70%, 80%, 90%, 100%×2次), 每次20–30 min, 环氧树脂与丙酮等体积混合液渗透1 h(37 °C); 环氧树脂与丙酮 3:1混合液浸透过夜; 环氧树脂包埋剂浸透过夜, 60 °C下聚合48 h, 取出包埋块, 用超薄切片剂切片, 将超薄切片置于镀膜铜网上染色, 透射电子显微镜下观察并拍照。

**1.5 主要观察指标** ①大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化过程中形态学变化。②免疫细胞化学染色观察各组心肌特异性抗原的表达。③1.0%二甲基亚砷诱导组细胞免疫荧光双标染色结果。④透射电镜观察1.0%二甲基亚砷诱导组细胞超微结构。

**1.6 统计学分析** 应用SPSS 13.0统计软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, 当有显著性差异时, 进一步用 $q$ 检验作两两比较, 率的比较用卡方、秩和检验。检验水准取 $\alpha=0.05$ ,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 原代骨髓间充质干细胞形态** 骨髓悬液中原代细胞呈悬浮状态, 大小不一, 数目较多, 并混有大量红细胞; 接种24 h后, 可见有少部分细胞贴壁, 多呈类圆形或纺锤形, 换液后去除未贴壁的细胞。此后每隔2 d换液, 贴壁细胞逐渐伸出突起, 呈扁平三角形或多边形, 核大而饱满。10 d后细胞胞体呈现典型的成纤维细胞状, 核圆形或椭圆形, 位于细胞中心, 多数细胞排布规则呈放射状生长(图1)。14 d左右细胞集落融合超过90%时即可传代。传代后的细胞生长迅速, 排列较为一致。

**2.2 诱导分化过程中骨髓间充质干细胞形态学变化** 第2代骨髓间充质干细胞经不同浓度二甲基亚砷诱导后, 细胞形态在不同的时间段存在差异。0.6%二甲基亚砷组和0.8%二甲基亚砷组诱导7 d的骨髓间充质干细胞形态变化不明显, 与对照组类似, 随后则逐渐转变成柱形。1.0%二甲基亚砷组骨髓间充质干细胞诱导7 d时形态已转变成类长柱形, 28 d时细胞体积则变小, 细胞呈片状生长, 排列一致(图2)。对照组未见类似上述改变, 随换液和传代次数增多, 对照组中细胞大部分为梭形。

**2.3 免疫细胞化学染色观察各组心肌特异性抗原的表达** 诱导后各组细胞中均可见desmin、 $\alpha$ -actin、cTnT、cTnI和P38 MAPK阳性细胞(图3–5), 而对照组以上各标记物则均呈弱阳性或阴性表达。诱导各组与对照组各标记物的阳性率差异均具有显著性意义( $P$ 均 $< 0.01$ )。各标记物的阳性率在1.0%二甲基亚砷组均最高, 显著高于0.6%二甲基亚砷组和0.8%二甲基亚砷组( $P$ 均 $< 0.05$ ), 见表1。

表1 各组心肌特异性抗原阳性细胞百分比 (%)  
Table 1 Percentage of cells positive for different cardiac-specific antigens

指标	二甲基亚砷组			对照组
	0.6%	0.8%	1.0%	
desmin	51.00 <sup>ac</sup>	52.74 <sup>c</sup>	56.96 <sup>c</sup>	0.03 <sup>b</sup>
a-sarcomeric actin	49.34 <sup>ac</sup>	51.26 <sup>c</sup>	55.94 <sup>c</sup>	0.02 <sup>b</sup>
cTnT	18.30 <sup>bc</sup>	20.12 <sup>ac</sup>	28.38 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
cTnI	30.56 <sup>ac</sup>	33.50 <sup>c</sup>	37.25 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
P38MAPK	38.75 <sup>bc</sup>	45.85 <sup>c</sup>	50.11 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>

表注: 表中数据为各组阳性细胞最高百分比。与1.0%二甲基亚砷组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

**2.4 免疫荧光双标染色结果** 分化细胞胞浆内 desmin、cTnT 呈共表达。细胞质内 desmin 的表达呈红色, cTnT 的表达呈绿色, 当两者同时被观察时可见其重叠的部位变成黄色。部分细胞只表达 desmin, 部分细胞只表达 cTnT。大部分细胞同时表达两种标记物(图6)。

**2.5 透射电子显微镜观察结果** 分化细胞的超微结构清晰完整, 胞核位于细胞中央, 呈卵圆形, 细胞器丰富而发达, 含有大量的粗面内质网和线粒体, 也有糖原和核糖体。胞质内富含平行排列的肌丝(图7)。

## 3 讨论 Discussion

**3.1 原代细胞的选择** 骨髓间充质干细胞是来源于骨髓的一类成体干细胞, 属于非造血干细胞群。大量研究表明, 骨髓间充质干细胞在体外可以诱导分化为骨细胞、肝细胞、神经元、内皮细胞、脂肪细胞、心肌细胞等多种组织细胞<sup>[1–6]</sup>。

**3.2 诱导剂的选择** 1999年Makino等<sup>[7]</sup>首次在体外经过4个月的连续传代培养获得永生化的骨髓间充质干细胞, 即建立了骨髓间充质干细胞系。将永生化的骨髓间充质干细胞暴露于3  $\mu$ mol/L 5-氮杂胞苷24 h后培养1周可见约30%的骨髓间充质干细胞分化为具有自律性搏动的球状及杆状细胞, 2周后这些细胞相互连接融合形成搏动的肌管样结构, 之后5-氮杂胞苷便成为目前使用最为广泛的经典诱导剂。

二甲基亚砷是一种含硫有机化合物, 是目前常用的诱导分化剂之一, 其作用机制主要是抑制c-myc基因的表达, 降低细胞内源性聚腺苷二磷酸核苷水平。Woodbury等<sup>[8]</sup>首次使用二甲基亚砷诱导骨髓间充质干细胞体外成功分化为神经元和神经胶质细胞。随后有学者研究二甲基亚砷和高糖环境下, 诱导成人骨髓间充质干细胞得到分泌胰岛素的分化细胞簇<sup>[9]</sup>。

近年来, 国内外的许多研究发现, 二甲基亚砷可以诱导P19细胞分化为心肌样细胞<sup>[10–11]</sup>。该实验研究结果显示, 经不同浓度二甲基亚砷诱导的骨髓间充质干细胞具有心肌样细胞的形态结构特点。

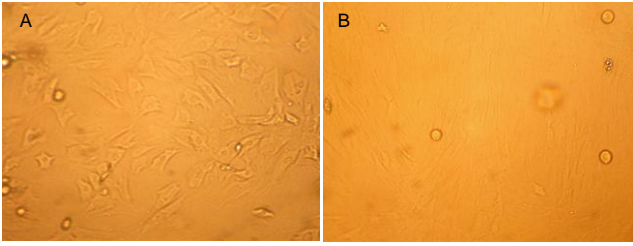


图1 原代培养3 d和10 d的SD大鼠骨髓间充质干细胞  
Figure 1 Rat bone marrow mesenchymal stem cells at 3 and 10 days of primary culture (×100)

图注: 图中A为原代培养3 d, 细胞逐渐伸出突起, 呈扁平三角形或多边形; B为原代培养10 d, 细胞胞体呈现典型的成纤维细胞状, 核圆形或椭圆形。

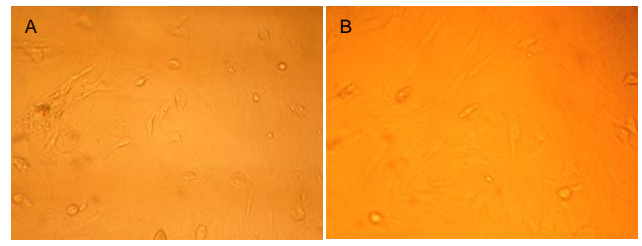


图2 1.0%二甲亚砜诱导7 d和28 d的SD大鼠骨髓间充质干细胞  
Figure 2 Rat bone marrow mesenchymal stem cells at 7 and 28 days of culture in 1.0% dimethyl sulfoxide (×100)

图注: 图中A为诱导7 d, 骨髓间充质干细胞变化不明显, 部分细胞转变成类长柱形; B为诱导28 d, 细胞体积则变小, 细胞呈片状生长, 排列一致。

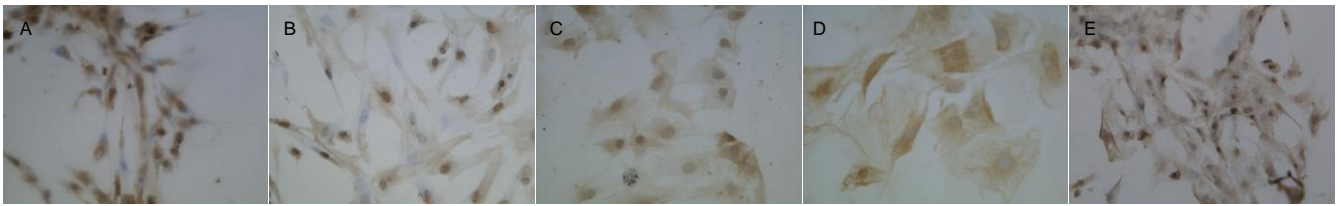


图3 免疫细胞化学染色观察0.6%二甲亚砜组心肌特异性抗原的表达(×400)  
Figure 3 Expression of cardiac-specific antigens in 0.6% dimethyl sulfoxide group (immunocytochemical staining, ×400)

图注: 图中A可见少数 desmin 阳性细胞; B可见少数  $\alpha$ -actin 阳性细胞; C可见少数 cTnT 阳性细胞; D可见少数 cTnI 阳性细胞; E可见少数 P38MAPK 阳性细胞。

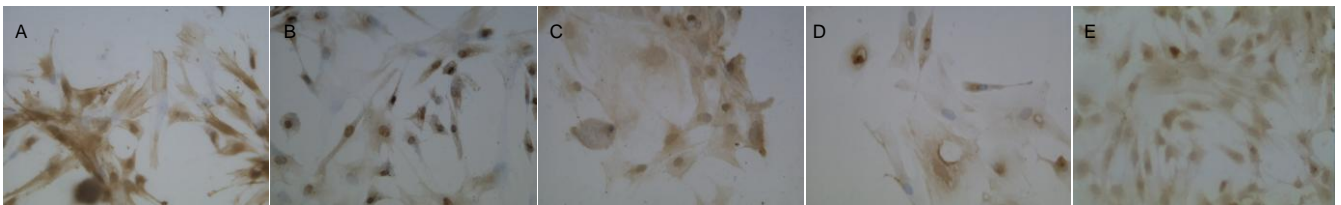


图4 免疫细胞化学染色观察0.8%二甲亚砜组心肌特异性抗原的表达(×400)  
Figure 4 Expression of cardiac-specific antigens in 0.8% dimethyl sulfoxide group (immunocytochemical staining, ×400)

图注: 图中A可见较多 desmin 阳性细胞; B可见较多  $\alpha$ -actin 阳性细胞; C可见较多 cTnT 阳性细胞; D可见较多 cTnI 阳性细胞; E可见较多 P38MAPK 阳性细胞。



图5 免疫细胞化学染色观察1.0%二甲亚砜组心肌特异性抗原的表达(×400)  
Figure 5 Expression of cardiac-specific antigens in 1.0% dimethyl sulfoxide group (immunocytochemical staining, ×400)

图注: 图中A可见很多 desmin 阳性细胞; B可见很多  $\alpha$ -actin 阳性细胞; C可见很多 cTnT 阳性细胞; D可见很多 cTnI 阳性细胞; E可见很多 P38MAPK 阳性细胞。

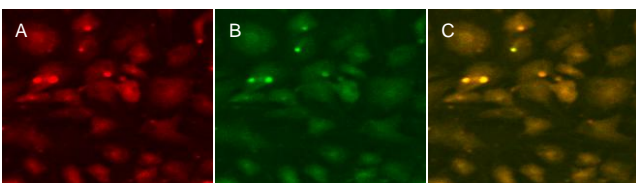


图6 1.0%二甲亚砜组细胞免疫荧光双标染色结果(×400)  
Figure 6 Immunofluorescence double staining of bone marrow mesenchymal stem cells under 1.0% dimethyl sulfoxide (×400)  
图注: 图中A可见细胞质内 desmin 的表达呈红色; B可见细胞质内 cTnT 的表达呈绿色; C可见大部分细胞同时表达两种标记物, 呈黄色。

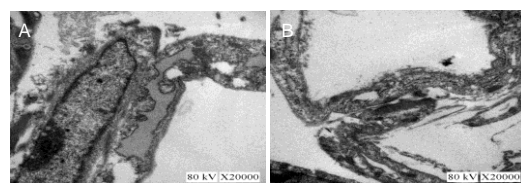


图7 透射电镜观察1.0%二甲亚砜诱导组细胞超微结构(×20 000)  
Figure 7 Ultrastructure of bone marrow mesenchymal stem cells under 1.0% dimethyl sulfoxide (×20 000)  
图注: 图中A可见细胞核位于细胞中央, 呈卵圆形, 细胞器丰富而发达; B可见细胞质内富含平行排列的肌丝。

**3.3 分化细胞的鉴定** 实验采用 desmin、 $\alpha$ -actin、P38MAPK、cTnI和cTnT对诱导细胞进行免疫学研究, 这些抗体均为当今公认的鉴定心肌细胞特异性标志物<sup>[12-14]</sup>。

实验研究结果显示, 诱导各组的骨髓间充质干细胞中均可见desmin、 $\alpha$ -actin阳性细胞, 而对照组以上两标记物均呈弱阳性表达。诱导各组与对照组desmin、 $\alpha$ -actin的阳性率差异均有显著性意义。在不同浓度的诱导组中, desmin、 $\alpha$ -actin的阳性率在1.0%二甲基亚砷组均最高, 显著高于0.6%二甲基亚砷组、0.8%二甲基亚砷组, 说明1.0%二甲基亚砷可能是一个合适的诱导浓度。

cTnT、cTnI作为心肌特异性标记物的阳性表达可以充分证实分化的有效性。在此次实验中, 诱导各组的骨髓间充质干细胞中均可见cTnT、cTnI阳性细胞, 而对照组以上两标记物均呈阴性表达。诱导各组与对照组cTnT、cTnI的阳性率差异均有显著性意义。在不同浓度的诱导组中, cTnT、cTnI的阳性率亦是在1.0%二甲基亚砷组均最高, 显著高于0.6%二甲基亚砷组、0.8%二甲基亚砷组, 再次验证了1.0%二甲基亚砷可能是一个合适的诱导浓度。同时, 荧光双标检测desmin和cTnT的阳性表达也再次证明了诱导分化的有效性。

免疫细胞化学方法检测结果显示, 诱导各组的骨髓间充质干细胞中均可见p38MAPK阳性细胞, 而对照组p38MAPK呈阴性表达。诱导各组与对照组p38MAPK的阳性率差异均有显著性意义。在不同浓度的诱导组中, p38MAPK的阳性率亦是在1.0%二甲基亚砷组均最高, 显著高于0.6%二甲基亚砷组、0.8%二甲基亚砷组。p38MAPK的阳性表达一定程度上说明了p38MAPK信号转导通路参与调节了骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞的过程。

超微结构观察到经二甲基亚砷诱导分化的细胞胞核呈卵圆形, 位于细胞中央, 细胞质内可见到平行排列的肌丝, 呈现为发育过程中的肌丝装配特征, 提示分化的心肌样细胞有发生收缩运动的结构基础。同时观察到, 细胞质含有大量的粗面内质网、线粒体、糖原和核糖体, 表现出蛋白质合成细胞的特征。以上超微结构特征说明诱导后的骨髓间充质干细胞已向心肌细胞分化。

**结论:** ①形态学及免疫细胞化学检测结果证实二甲基亚砷可以在体外诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞并表达心肌特异性蛋白desmin、 $\alpha$ -actin、cTnT、cTnI和P38MAPK, 且1.0%二甲基亚砷可能是一种合适的诱导浓度。②免疫荧光双标染色及电镜结果均进一步证实二甲基亚砷可以诱导骨髓间充质干细胞获得心肌分化表型。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估均为孙龙云。

**利益冲突:** 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进

行 3 次查重。

**文章外审:** 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

## 4 参考文献 References

- [1] Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res.* 1999;17(6):900-908.
- [2] Ouyang JF, Lou J, Yan C, et al. In-vitro promoted differentiation of mesenchymal stem cells towards hepatocytes induced by salidroside. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(4):530-538.
- [3] Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact. *J Neurosci Res.* 2004;77(2):174-191.
- [4] Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, et al. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1994-2004.
- [5] Clabaut A, Delplace S, Chauveau C, et al. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation.* 2010;80(1):40-45.
- [6] Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenit Anom (Kyoto).* 2002;42(1):1-9.
- [7] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103(5):697-705.
- [8] Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res.* 2002;69(6):908-917.
- [9] Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, et al. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest.* 2004;84(5):607-617.
- [10] 李秀华,张雷,王海萍,等. P19 细胞体外DMSO诱导向心肌样细胞分化[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(2):129-132.
- [11] Sotkis HV, Lazarenko PM, Boldyriev OI, et al. Identification of E-4031-sensitive potassium current component in murine P19 embryonic carcinoma cell line differentiated in cardiomyocytes. *Fiziol Zh.* 2006;52(1):49-61.
- [12] Moscoso I, Centeno A, López E, et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(1):481-482.
- [13] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs.* 2001;25(3):187-193.
- [14] Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44(3):205-221.