

小鼠诱导多能干细胞体外分化为心肌细胞的实验研究

熊挺淋¹ 张丽莎¹ 刘涛^{1*} 王浩宇¹ 赵超美¹ 周振宇¹ 赵霞² 杨梁²

(¹南充市中心医院心内科·川北医学院第二临床医学院, 南充 637000;

²重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

摘要 观察血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和维生素C对小鼠诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)体外分化为心肌细胞的诱导作用。采用直接悬浮培养法使iPSCs形成拟胚体(embryoid bodies, EBs), 分别以VEGF和维生素C作为诱导剂, 自然分化作为阴性对照组, 加入1%二甲亚砜诱导剂为阳性对照组。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 记录跳动的拟胚体出现的时间和数目, 计算心肌细胞分化率, 细胞免疫荧光检测心肌特异性蛋白cTnT的表达, RT-PCR检测心肌特异性基因 β -MHC mRNA的表达。在LIF条件下, iPSCs在饲养层上成集落状生长; 未分化的iPSCs中Oct-4及AKP呈阳性表达; 与自然分化组相比, 二甲亚砜、VEGF和维生素C均能提高iPSCs的心肌细胞分化效率($P<0.05$); 分化的心肌细胞可自发搏动, 同时分化细胞中表达心肌特异性蛋白cTnT以及心肌特异性基因 β -MHC。VEGF和维生素C可以促进iPSCs向心肌细胞分化。

关键词 诱导多能干细胞; 血管内皮细胞生长因子; 维生素C; 诱导分化; 心肌细胞

Research of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate into Cardiomyocytes *in vitro*

Xiong Tinglin¹, Zhang Lisha¹, Liu Tao^{1*}, Wang Haoyu¹, Zhao Chaomei¹,

Zhou Zhenyu¹, Zhao Xia², Yang Liang²

(¹Department of Cardiology, Nanchong Central Hospital; The Second Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; ²Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing 400016, China)

Abstract To observe the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vitamin C on the cardiomyocytes differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) *in vitro*. Embryoid bodies (EBs) was generated from iPSCs by direct suspension culture, with VEGF and vitamin C as inducers, natural differentiation without any inducer was negative control group and 1% dimethyl sulfoxide was added as positive control group. Cells were observed under inverted microscope, and the time of beating embryonic bodies appeared and numbers were recorded and the differentiation rate of cardiomyocyte was calculated. cTnT expression of cardiac-specific protein was detected by immunofluorescence and β -MHC mRNA expression of cardiac-specific gene were detected by RT-PCR. iPSCs showed colony-like growth on feeder layer cells in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF). Undifferentiated iPSCs expressed Oct-4 and alkaline phosphatase (AKP). Compared with the natural differentiation group, dimethyl sulfoxide, VEGF and vitamin C all improved cardiomyocytes differentiation rate of iPSCs ($P<0.05$). Cardiomyocytes derived from iPSCs beated spontaneously and expressed cardiac-specific protein cTnT and cardiac-

收稿日期: 2013-01-29 接受日期: 2013-04-01

重庆市卫生局医学科学技术研究重点项目(批准号: 2009-1-51)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0817-2258604, E-mail: nclt456@sina.com

Received: January 29, 2013 Accepted: April 1, 2013

This work was supported by the key Project of Medical Science and Technology Research of Chongqing Municipal Health Bureau (Grant No.2009-1-51)

*Corresponding author. Tel: +86-817-2258604, E-mail: nclt456@sina.com

网络出版时间: 2013-05-31 13:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130531.1339.002.html>

specific gene β -MHC. VEGF and vitamin C can promote iPSCs into cardiomyocytes.

Key words induced pluripotent stem cells; vascular endothelial growth factor; vitamin C; induced differentiation; cardiomyocyte

干细胞能分化为心肌细胞,但存在一些难解决的问题。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)容易获得、容易体外增殖扩增,但目前还没有直接的证据显示MSCs可以分化为具有完整功能的心肌细胞,仅仅是心肌样细胞^[1]。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有全能分化性,可分化为三个胚层各种类型细胞。体外实验可分化为心脏起搏细胞、心房细胞、心室细胞或蒲氏细胞等多种心肌组织细胞^[2]。但胚胎干细胞用于移植治疗一直存在着免疫排斥及伦理难题。

2006年, Yamanaka等^[3]从24个候选基因中筛选出4个与ESCs多能性密切相关的基因*Oct-4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*,并将它们通过逆转录病毒导入到小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)和鼠尾成纤维细胞(tail tip fibroblast, TTF),成功地将它们重编程为多能性细胞——诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。iPSCs无论在细胞形态、生长特点、表达的标志物以及形成畸胎瘤等方面均与ESCs非常相似。国内科学家将iPSCs培育出活体小鼠,表明iPSCs拥有和ESCs相似的全能性。研究表明,维生素C和VEGF可以提高ESCs体外分化为心肌细胞的效率^[4-6],目前运用较多的化学诱导剂如二甲亚砜、5-氮胞苷等有一定的毒性,限制了其以后的临床运用。因此,本实验主要观察了维生素C和VEGF对小鼠iPSCs体外分化为心肌细胞的诱导作用,以期建立一种高效安全的体外诱导iPSCs分化为心肌细胞的实验方法,为将来干细胞移植治疗缺血性心脏病打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和动物 绿色荧光蛋白(GFP)转基因(*Oct-4*)小鼠来源的iPSCs株购自中国科学院动物研究所北京干细胞库。受孕13.5天的鼠由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 高糖DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶(Hyclone公司);非必需氨基酸、二甲亚砜(Sigma公司); β -巯基乙醇(天津TBD公司)、丝裂霉素

C(Roche公司)、VEGF(Invitrogen公司)、维生素C(北京博奥森生物技术有限公司);白血病抑制因子(LIF,上海欣百诺生物技术有限公司);BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒(碧云天生物技术研究),山羊来源的cTnT一抗、TRITC标记的兔抗羊荧光二抗(Santa Cruz公司)。Trizol、逆转录酶、Tap聚合酶(TaKaRa公司),RT-PCR引物(Invitrogen公司),S1000™ Thermal cycler逆转录系统(Bio-Rad公司),Gold view(Genview公司);倒置显微镜、荧光显微镜(Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)饲养层的制备 孕13.5天的昆明小鼠在无菌条件下,取出胎鼠,去其头、尾、四肢、内脏, PBS充分洗涤后剪成1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,以0.05%胰酶在37℃条件下消化20 min,终止消化,吸取上悬液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,以MEF培养基(高糖DMEM, 10% FBS)重悬细胞,接种于培养皿,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,隔天换液,待细胞生长至80%~90%时,传代。取第3-4代MEF细胞,用含浓度10 μ g/mL丝裂霉素C的MEF培养基处理2 h, PBS洗涤5次后做饲养层,多余细胞冻存。

1.2.2 iPSCs的培养和传代 iPSCs复苏后培养在预先制备好的MEF饲养层细胞上,培养基为含10% FBS、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、1 000 IU/mL LIF、0.1 mmol/L L-谷氨酰胺以及1%非必需氨基酸的DMEM-H培养基,置于37℃、5% CO₂的饱和湿度培养箱中培养,1~2 d换一次液。用0.05%胰酶消化传代,细胞重悬液接种在新的不含MEF饲养层细胞的培养板里,半小时后吸取上清液(采用差异贴壁法去掉老化的MEF饲养层细胞),并接种到新的MEF饲养层细胞上。

1.2.3 iPSCs的碱性磷酸酶(alkali phosphatase, AKP)染色 取对数生长期的iPSCs细胞, PBS洗涤后加入适量4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗涤3次,每次5 min,根据BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒说明书配置染色工作液,加入适量工作液覆盖细胞,室温避光孵育15 min,显微镜下观察,染色适度后用PBS洗涤2次终止反应。

1.2.4 悬浮法制备拟胚体(embryoid bodies, EBs)以及

表1 RT-PCR所用引物序列
Table 1 The sequences of RT-PCR primers

目的基因	基因序列(5'→3')	退火温度(°C)	引物大小(bp)
Target gene	Primer sequence(5'→3')	Tm(°C)	Primer size(bp)
<i>β-MHC</i>	F: act gtc aac act aag agg gtc atc	54	430
	R: ctt cag agt cat caa tgg agg c		
<i>β-actin</i>	F: ata tcg ctg cgc tgg tcg tc	58	517
	R: agg atg gcg tga ggg aga gc		

诱导EBs向心肌细胞分化 实验分4组, 分别为自然分化组、二甲亚砷组、VEGF组和维生素C组。自然分化组所用分化培养基为去除LIF的iPSCs培养基(高糖DMEM, 10% FBS, 0.1 mmol/L β -巯基乙醇, 1% 非必需氨基酸), 其余各组培养基依次为含1%二甲亚砷、20 μ g/mL VEGF和 1×10^{-4} mol/L维生素C的iPSCs分化培养基。0.1%胰酶消化对数生长期的iPSCs, 制成单细胞悬液, 置于塑料培养皿中37 °C、5% CO₂孵育1 h, 以差速贴壁去除MEF, 吸取细胞悬液直接接种于100 mm细菌培养皿进行悬浮培养, 每皿加入10 mL的去除LIF的iPSCs培养基, 置于37 °C、5% CO₂培养, 每天轻轻吹吸EBs数次以防止EBs贴壁, 每隔1 d半量换液一次, 持续培养5 d。将悬浮培养5 d的EBs在体视学显微镜下吸出并接种于96孔培养板(1-2个/孔)中, 分别加入上述4种分化培养基, 比较各组(每组50个EBs)之间心肌细胞的诱导效率, 每天更换一次培养基。

1.2.5 倒置显微镜下观察细胞跳动情况 每天在倒置显微镜下观察EBs生长情况, 并观察记录细胞搏动出现的时间, 搏动的EBs数量, 心肌细胞分化率=搏动的EBs数/EBs总数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞免疫荧光检测 细胞收获时用PBS洗涤3次, 然后用4%多聚甲醛在室温条件下固定30 min, 固定后, PBS洗3次, 然后加入血清封闭液, 封闭30 min后, 甩掉多余的封闭液(不要冲洗), 加入用PBS稀释(1:100)的cTnT一抗, 37 °C孵育2 h后, PBS洗3次, 加入用PBS稀释(1:100)的TRITC标记的荧光二抗, 37 °C孵育1~2 h后, PBS洗3次, 最后抗淬灭剂封片以及用荧光显微镜照相。

1.2.7 RT-PCR检测心肌特异性基因 β -MHC mRNA的表达 细胞的总RNA采用TRIzol提取, 提取的RNA保存在-80 °C冰箱中。cDNA的合成采用RNAiso Plus逆转录试剂盒以及S1000™ Thermal cycler逆转录系统。为了分析 β -MHC基因的表达, PCR采用标准的25 μ L扩增体系, 扩增条件为: 94 °C变性30 s, 退火

30 s, 72 °C延伸30 s, 共循环30次。 β -MHC以及内参(β -actin)的引物序列及退火温度见表1。PCR产物用2%琼脂糖做凝胶电泳分离条带并用Gold view显色, 结果采用Quantity one凝胶电泳仪进行图像分析和数据处理。

1.2.8 统计学处理 使用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析比较各组间心肌细胞分化率有否差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iPSCs形态观察及鉴定

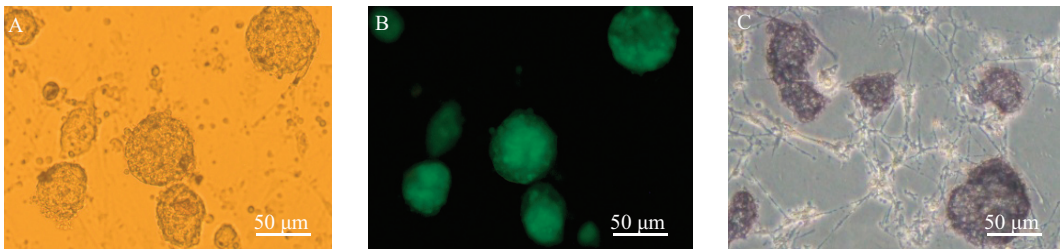
小鼠iPSCs在饲养层细胞上成集落状、隆起的圆形或者椭圆岛状生长, 细胞团内细胞排列紧密, 界限和形态不易区分, 周围折光性强(图1A)。GFP转基因(*Oct-4*)小鼠来源的iPSCs在荧光显微镜下观察, 呈现出与光学显微镜对应的集落状绿色细胞团(图1B), 表明Oct-4蛋白在iPSCs中成阳性表达。未分化的iPSCs中AKP染色呈阳性, 显示为紫黑色, 而AKP染色阴性的iPSCs和全部的成纤维细胞不着色(图1C)。

2.2 iPSCs分化过程中的形态学观察

去除MEF饲养层和培养基中的LIF。经过5 d的悬浮培养后, iPSCs聚集而形成大小不一的EBs, 肉眼可见。在一个35 mm细菌培养皿中大约可形成100~200个的EBs(图2A)。随着分化天数的增加, EBs体积逐渐增大, 少量EBs出现融合。贴壁后, EBs铺开生长, 在外围分化出上皮样形态细胞, 最早在第8天, 出现搏动区域, 表现为个别EBs局部的搏动, 频率较快, 约40~80次/min(图2B)。随着分化天数的增加, 各组出现搏动的EBs逐渐增多, 搏动区域也逐渐增多, 在分化的第14~20天, 各组出现搏动的EBs数达到高峰, 搏动区域的搏动频率降低, 渐趋一致, 约20~30次/min(图2C)。

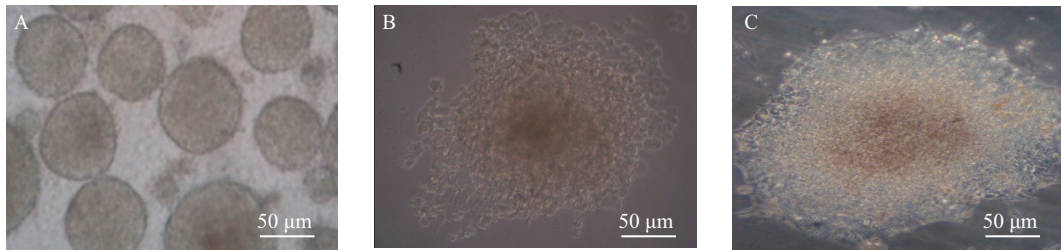
2.3 各组心肌细胞分化率的比较

未添加任何诱导剂的自然分化组, 其EBs直到



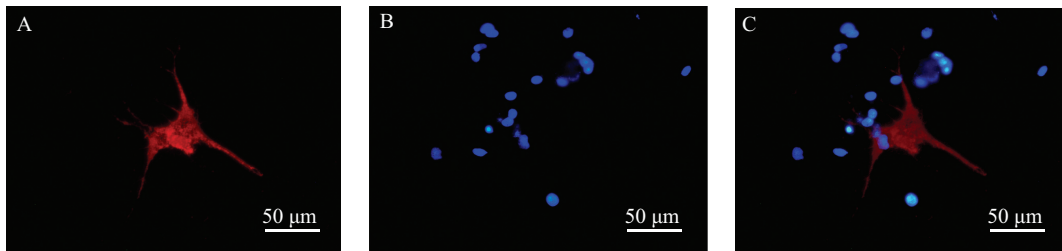
A: iPSCs在MEFs上呈克隆样生长; B: iPSCs在荧光显微镜下发绿色荧光; C: iPSCs的AKP染色。
A: iPSCs colonies on inactivated MEFs; B: iPSCs showed green fluorescence under fluorescence microscope; C: alkaline phosphatase staining of iPSCs.

图1 iPSCs形态观察及鉴定
Fig.1 Morphologic observation and identification of iPSCs



A: 悬浮培养的EBs; B: 分化第8天的贴壁EBs; C: 分化第14天的EBs。
A: embryoid bodies in suspension culture; B: adherent embryoid bodies on day 8 in differentiation culture; C: embryoid bodies on day 14 in differentiation culture.

图2 iPSCs分化过程中的形态观察
Fig.2 Morphology changes during iPSCs differentiation



A: 分化心肌细胞cTnT免疫荧光染色; B: 细胞核被DAPI染成蓝色; C: 图A和图B的叠加。
A: iPSCs-dirived cardiomyocytes were stained with anti-cTnT; B: nuclei were stained with DAPI; C: merge of A and B.

图3 免疫荧光检测心肌特异性蛋白cTnT的表达情况
Fig.3 Specific protein cTnT expression of cardiomyocyte was detected by immunofluorescence

贴壁的第10天才有部分EBs出现搏动, 而二甲亚砷组、VEGF组和维生素C组分别在第6天、第6天和第7天出现搏动的EBs。在贴壁的15~21天, 各组出现的搏动的细胞团达到高峰, 以后搏动的细胞团数未见增加。二甲亚砷组、VEGF组和维生素C组的心肌细胞分化率均显著高于自然分化组($P<0.05$), 而VEGF组与维生素C组间的心肌细胞分化率无明显差异($P>0.05$)(见表2)。

2.4 iPSCs诱导分化的心肌细胞中cTnT蛋白的表达
自然分化组及各个诱导分化组在分化第21天收集细胞行免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察, 分化

细胞中心肌特异性蛋白cTnT表达阳性, 呈红色荧光(图3A和3C), 表现为较典型的多边形形态。细胞核用DAPI染色, 可见分化细胞核以及其他细胞核均被染成蓝色(图3B和3C)。

2.5 不同诱导组中心肌特异性基因 β -MHC mRNA的表达结果

分化培养第21天的各诱导组细胞中, 均可见 β -MHC mRNA的表达, 而加水对照组未见表达。VEGF组、维生素C组、自然分化组和二甲亚砷诱导组的 β -MHC/ β -actin灰度比值分别为 0.98 ± 0.05 、 0.96 ± 0.11 、 0.62 ± 0.11 、 1.14 ± 0.07 。统计学分析可知,

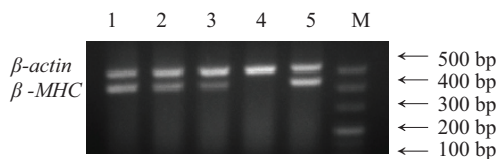
二甲亚砜组明显高于VEGF组、维生素C组以及自然分化组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而VEGF组与维生素C组之间没有显著差异($P>0.05$)(图4)。

表2 各组分化率的比较($n=3, \bar{x}\pm s$)
Table 2 Compare of differentiation rate of each group($n=3, \bar{x}\pm s$)

分组	心肌细胞分化率(%)
Group	Differentiation rate of cardiomyocytes(%)
Natural differentiation group	6.39 ± 2.01
Methyl-sulfoxide group	57.07 ± 3.22^a
VEGF group	46.26 ± 1.18^{ab}
Vitamin C group	44.00 ± 3.20^{abc}

^a $P<0.05$, 与自然分化组相比; ^b $P<0.05$, 与二甲亚砜组相比; ^c $P>0.05$, 与VEGF组相比。

^a $P<0.05$ vs natural differentiation group; ^b $P<0.05$ vs methyl-sulfoxide group; ^c $P>0.05$ vs VEGF group.



1: VEGF组; 2: 维生素C组; 3: 自然分化组; 4: 空白对照组; 5: 二甲亚砜组; M: marker。

1: VEGF group; 2: vitamin C group; 3: natural differentiation group; 4: blank control group; 5: methyl-sulfoxide group; M: marker.

图4 RT-PCR检测 β -MHC mRNA的表达

Fig.4 RT-PCR analysis of β -MHC mRNA expression

3 讨论

心肌细胞是一种终末分化细胞, 心肌梗死或其他因素导致心肌细胞死亡后, 心脏以纤维组织增生为主要修复形式。心肌梗死后的干细胞移植治疗存在分化效率低、分化细胞不单一、移植细胞不能和周围心肌组织很好融合、形成畸胎瘤以及伦理学争论等诸多缺点^[2,7]。而成体细胞逆分化而来的iPSCs成功解决了胚胎干细胞用于移植治疗时存在的免疫排斥及伦理道德难题。

在本研究中, iPSCs在MEF饲养层细胞和LIF存在的条件下, 保持未分化状态, 不断增殖, 呈克隆样生长, 克隆团在荧光纤维镜呈绿色荧光, AKP染色呈紫黑色。本研究采用的iPSCs为Oct-4启动子下转入绿色荧光蛋白的细胞系, 发绿色荧光表明Oct-4的表达。Oct-4主要在全能干细胞中表达, 对于维持其自我更新是必要的, 与细胞的多能性有关^[8]。而AKP

在早期胚胎的细胞中含量较高, 而在已分化的细胞中活性明显降低^[9]。去除LIF后, iPSCs即开始分化, EBs能基本模拟ESCs和iPSCs细胞体内的发育过程, 对细胞发育的启动至关重要。

体外促进干细胞向心肌细胞分化的方法有很多, 包括化学诱导剂、共培养等。由于化学诱导剂价格低廉, 剂量浓度易于控制, 成为了最为常用的诱导方法。但常用的包括二甲亚砜^[10]、5-氮胞苷等本身具有毒性作用, 限制其应用。维生素C是人体必需的维生素, 和其他化学诱导剂相比, 更加安全可靠, 因此, 采用这种方法诱导分化产生的心肌细胞能为以后的干细胞临床应用打下良好的基础。Takahashi等^[4]的研究表明, 维生素C显著提高胚胎干细胞分化为搏动心肌细胞的效率, 分化率随着维生素C浓度的升高而逐渐升高, 但当浓度升至 1×10^{-4} mol/L以上时, 心肌细胞分化率未见明显升高。VEGF是以二硫键相连的寡二聚体糖蛋白, 其生物活性主要为诱导血管生成。研究表明, 在胚胎发育早期使VEGF失活会导致心肌缺陷^[11]。Chen等^[5]用VEGF诱导胚胎干细胞向心肌细胞的分化, 发现VEGF能提高心肌特异因子如cTnT、Nkx2.5的蛋白表达, 当VEGF浓度为20 μ g/mL时, 促进作用最为明显。根据以上研究结论, 本研究采用20 μ g/mL的VEGF和 1×10^{-4} mol/L的维生素C作为诱导剂, 观察其对iPSCs分化为心肌细胞的诱导作用。结果表明, 该浓度的维生素C和VEGF也能提高iPSCs的心肌细胞分化率, 其诱导效率相当。在iPSCs向心肌细胞的分化过程中, 同时伴随着心肌细胞特异性蛋白cTnT以及特异性基因 β -MHC的表达, 从而在蛋白及基因水平鉴定了iPSCs细胞分化而来的心肌细胞。本研究结果表明, 各诱导组的心肌细胞特异性基因 β -MHC的表达量与各组心肌细胞分化率高低保持一致。

VEGF的受体包括Flt-1、Flk-1和Flt-4。VEGF通过与这三类酪氨酸受体结合而发挥作用。Flk-1是最早形成内皮细胞和血细胞的表面标志物, 也是中胚层干细胞的表面标志物^[12-13]。研究表明, Flk-1在心脏分化和形成具有收缩功能的心肌中发挥作用^[14]。Yamashita等^[15]采用一个二维培养系统诱导并提纯ESCs细胞分化的Flk-1+细胞, 再培养, 诱导出可自主搏动的心肌细胞, 并确立Flk-1+细胞是ESCs细胞分化过程中的心肌祖细胞。采用同样的方法, 可以成功从iPSCs中诱导出与ESCs源心肌细胞类似的心肌

细胞^[16]。我们推测在本实验中, VEGF可能通过分化早期与其受体Flk-1结合, 激活下游信号传导通路, 进而激活心肌特异性转录因子, 从而促进iPSCs向心肌细胞的分化, 但有待进一步的实验研究。

维生素C提高全能干细胞的心肌细胞分化率的具体机制目前还不清楚, 但最近Esteban等^[17]的研究发现, 维生素C可以极大促进鼠或人的成体细胞重编程为iPSCs的效率, 他们发现维生素C在重编程过程中可以下调p53基因水平的表达, 并且减缓了细胞的衰老进程, 虽然此作用与维生素C的抗氧化作用并无太大关系。组蛋白脱甲基酶对胚胎干细胞核心转录因子Nanog的表达有重要作用, 而维生素C可能促进组蛋白脱甲基酶的生物活性, 从而在重编程过程中促进了这种代表干细胞全能性的基因的表达。因此, 我们猜测在iPSCs向心肌细胞分化的进程中, 细胞也经历着一个从年轻到衰老的过程, 维生素C能减缓这种过程, 使得iPSCs活性提高, 上调某种干细胞全能性基因的表达, 使得在诱导分化的过程中有更多的全能干细胞参与进来, 从而提高能向心肌细胞分化的细胞数量, 提高分化的效率。但由于条件的限制, 本研究并未能对此猜测进行更加深入的研究。

本文并未探讨不同浓度的维生素C和VEGF、以及在EBs培养的不同时间点加入诱导剂, 对iPSCs向心肌细胞分化影响的研究。除此之外, 尚有以下不足及需要解决的问题: 本研究只从分化细胞的搏动性、表达特异性基因及蛋白层面鉴别了心肌细胞, 未能检测更多的心肌细胞特异性基因、蛋白、信号通路等, 也未检测分化心肌细胞与原代心肌细胞的差异性。以上不足以及当分化心肌细胞用于移植治疗是否安全等方面是我们今后需要继续研究的内容。

参考文献 (References)

- Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes *in vitro*. *Stem Cells* 2008; 26(11): 2884-92.
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002; 91(3): 189-201.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, *et al.* Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107(14): 1912-6.
- Chen Y, Amende J, Hampton TG, Yang Y, Ke Q, Min JY, *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(4): H1653-8.
- Song YH, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X, Matthias N, *et al.* VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(4): 999-1003.
- Zhang Y, Wang D, Chen M, Yang B, Zhang F, Cao K. Intramyocardial transplantation of undifferentiated rat induced pluripotent stem cells causes tumorigenesis in the heart. *PLoS One* 2011; 6(4): e19012.
- Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Etoposin expression of OCT-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005; 121(3): 465-77.
- 胡显文, 陈绍烈, 黄培堂. 人胚胎干细胞的研究. *生物技术通讯* (Hu Xianwen, Chen Shaolie, Huang Peitang. Research on human embryonic stem cells. *Letters in Biotechnology*) 2000; 11(2): 135-40.
- 王秀丽, 王常勇, 虞星炬, 郭希民, 段翠密, 赵云山. 二甲基砒诱导胚胎干细胞分化伴随凋亡发生. *解剖学杂志* (Wang Xiuli, Wang Changyong, Yu Xingju, Guo Ximin, Duan Cuimi, Zhao Yunshan. Dimethyl sulphoxide induces cell differentiation and apoptosis in mouse embryonic stem cells. *Chinese Journal of Anatomy*) 2005; 28(6): 609-14.
- Haigh JJ, Gerber HP, Ferrara N, Wagner EF. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* 2000; 127(7): 1445-53.
- Yamaguchi T, Dumont D, Conlon R, Breitman M, Rossant J. Flk-1, an fli-1-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993; 118(2): 489-98.
- Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Tsuchida K, Kodama H, Kunisada T, *et al.* Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ* 1997; 39(6): 729-40.
- Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T. Identification of cardiac stem cells with FLK 1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J* 2005; 19(3): 371-8.
- Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Peishi Y, Yanagi K. Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 2005; 19(11): 1534-6.
- Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, *et al.* Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; 118(5): 498-506.
- Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-9.