

AKT基因转染人脐带间质干细胞来源 exosomes的分离及鉴定

马洁 赵媛媛 曹文明 孙晓仙 孙丽 钱晖 许文荣 朱伟*

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013)

摘要 该研究构建人AKT基因重组腺病毒载体(Ad-AKT), 转染人脐带间质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hucMSC), 分离hucMSC分泌的exosomes, 检测exosomes中的成分变化, 为exosomes的临床研究提供实验基础。该实验设计含有EcoR I、Xho I的限制性酶切位点的引物, PCR扩增AKT, 将扩增产物克隆到带有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标记的穿梭质粒上。重组穿梭质粒经线性化处理, 与腺病毒骨架质粒在Stb13中重组, 筛选获得含有AKT的重组腺病毒质粒, PCR鉴定并测序。重组病毒质粒用Pac I酶切线性化, 转染293A细胞, 制备高效表达的Ad-AKT, 并转染hucMSC。结果表明, AKT基因重组腺病毒能高效转染hucMSC, hucMSC中AKT蛋白表达增多, 并且转染AKT基因的hucMSC来源的exosomes(AKT-MSC-exosomes)中AKT蛋白也增多, 说明通过基因修饰可以获得过表达目的蛋白的exosomes, 为exosomes的来源及应用研究提供可选择的方法。

关键词 AKT; 腺病毒; exosomes; 脐带; 间质干细胞

Isolation and Identification of Human AKT Gene Transfected Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes

Ma Jie, Zhao Yuanyuan, Cao Wenming, Sun Xiaoxian, Sun Li, Qian Hui, Xu Wenrong, Zhu Wei*

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract In this research, we constructed recombinant adenovirus vector containing human AKT gene (Ad-AKT), then transfected into human umbilical cord mesenchymal stem cells (hucMSC) and isolated exosomes derived from hucMSC to detect exosomes composition changes which provide experimental basis for the clinical study of exosomes. We designed the primer restriction enzyme with EcoR I, Xho I cleavage site, amplified AKT by PCR, and the product was linked into shuttle plasmid labeled by GFP. Linearized recombinant shuttle plasmid was restructured with adenovirus backbone plasmid in Stb13. The recombinant adenovirus plasmid containing AKT was identified and sequenced by PCR. The recombinant virus plasmid linearized by Pac I endonuclease was transfected into 293A cells to prepare high expression of Ad-AKT, then transfected into hucMSC. The results show that AKT gene recombinant adenovirus is efficiently transfected into hucMSC increasing the expression of AKT protein in hucMSC. AKT protein also increased in the exosomes which derived from hucMSC and the exosomes from AKT transfected hucMSC (AKT-MSC-exosomes). Thus we can obtain exosomes that over

收稿日期: 2014-04-22 接受日期: 2014-06-25

国家自然科学基金(批准号: 81270214)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0511-85033768, E-mail: zhuwei@ujs.edu.cn

Received: April 22, 2014 Accepted: June 25, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270214)

*Corresponding author. Tel: +86-511-85033768, E-mail: zhuwei@ujs.edu.cn

网络出版时间: 2014-09-22 15:31 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0137.html>

expressing target protein by genetic modification, which provides a selective method for the source and the application research of exosomes.

Key words *AKT*; adenovirus; exosomes; human umbilical cord; mesenchymal stem cells

Exosomes是一种由胞内多胞体(multive bodies, MVB)与胞膜融合后分泌到细胞外环境中的纳米级膜性小囊泡,其来源十分广泛,其特异性功能与来源细胞密切相关。Exosomes中含有丰富的蛋白质和RNA,并在细胞间交流中起着重要作用。AKT又称PKB(protein kinase B),即蛋白激酶B,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞存活和凋亡中起重要作用。研究表明,MSC来源的exosomes在组织损伤修复中起着重要的作用^[1-3]。*AKT*基因修饰的MSC在心肌梗死模型中可以抑制心肌细胞凋亡,促进心肌细胞增殖,从而增强心肌细胞的生存能力,减少梗死面积,提高心功能^[4-6]。为了寻找一个更有效的损伤修复的途径,本研究以*AKT*为目的基因,构建了绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标记的重组腺病毒表达载体并转染人脐带间质干细胞(hucMSC),提取其分泌的exosomes,为exosomes治疗组织损伤提供更为有效的途径。

1 材料与方 法

1.1 材料

质粒pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP为本实验室构建;细胞株293A细胞购自南京凯基科技发展有限公司;人脐静脉内皮细胞株EA.hy926购自中国科学院上海细胞库;人脐带间质干细胞(hucMSC)来自江苏大学基础医学与医学技术学院。

1.2 仪器设备与试剂

PCR仪购自美国BIO-RAD公司;电泳仪、水平电泳槽购自北京市六一仪器厂;UV transilluminator购自美国UVP公司;Nanosight型号为LM 10-HSBFT 14。

Gateway[®] BP Clonase[™] II Enzyme Mix、Gateway[®] LR Clonase[™] II Plus Enzym Mix购自Invitrogen公司;QIAquick Gel Extraction Kit、质粒小提试剂盒、Taq DNA Polymerase、dNTP Mix、GeneRuler[™] 1 000 bp DNA Ladder购自Qiagen公司;PrimeSTAR[™] HS DNA Polymerase、*EcoR* I、*Xho* I购自TaKaRa公司;转染试剂lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;转染混合液Opti-MEM[®] I购自Gibco公司;AKT蛋白

抗体、Bcl-2抗体、Bax抗体、GFP抗体购自SAB公司;GAPDH抗体、羊抗兔IgG(HRP标记)、羊抗小鼠IgG(HRP标记)购自CWBIO公司。

1.3 实验方法

1.3.1 引物设计 采用Primer Premier 5.0软件设计*AKT*基因的两条全长编码区扩增引物,上游引物:5'-CGG AAT TCA TGA GCG ACG TGG CTA TTG TG-3';下游引物:5'-GGC TCG AGT CAG GCC GTG CCG CTG G-3',下划线分别为*EcoR* I、*Xho* I的限制性酶切位点。

1.3.2 目的基因的克隆 PCR扩增*AKT*基因,反应体系为共50 μL: 5×Primer STARTM buffer(Mg²⁺ Plus) 10 μL, dNTP mixture(10 μmol/L) 4 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 模板DNA 1 μL, Primer STARTM HS DNA polymerase 0.5 μL, 补加ddH₂O至总体积50 μL。反应参数为: 98 °C 3 min; 98 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共30个循环; 72 °C延伸5 min。PCR产物于1%琼脂糖凝胶电泳, DNA琼脂糖凝胶电泳回收。

1.3.3 重组穿梭质粒pDown-AKT-IRES/eGFP的构建与鉴定 将胶回收的*AKT*基因片段和pDown-MCS-IRES/eGFP分别用*EcoR* I、*Xho* I双酶切,酶切体系设置如下: DNA 4 μL, 10×buffer 3 μL, *EcoR* I 2 μL, *Xho* I 2 μL, H₂O 11 μL, 总体积补足至30 μL, 37 °C酶切3 h, 10×loading buffer终止反应, 用1%的琼脂糖凝胶进行电泳并切胶回收。DNA琼脂糖凝胶电泳回收后再次电泳, 并测浓度。连接pDown-MCS-IRES/eGFP与目的片段, 连接体系设置如下: pDown-MCS-IRES/eGFP酶切回收产物76.05 ng, 目的片段*EcoR* I-AKT-*Xho* I酶切回收产物280.8 ng, 10×T4 DNA ligase buffer 2.5 μL, T4 DNA ligase 12.5 μL, H₂O 1 μL, 总体积补足至25 μL, 4 °C连接过夜。转化Stb13细菌及菌落PCR筛选阳性克隆, 把10 μL连接反应物加入到100 μL Stb13 Chemically Competent *E. coli*中, 冰上孵育30 min; 42 °C热击细胞30 s; 立即转移到冰上孵育2 min; 加入250 μL S.O.C. medium, 在37 °C、转速为225 r/min的摇床里孵育1 h; 把100 μL转化物涂到含有50 μg/mL卡那霉素的LB平板上, 37 °C孵育过夜后菌落PCR筛选阳性克隆。PCR反应体系: 灭菌水

16.1 μL , $10\times\text{Taq buffer with }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 μL , dNTP Mixture(10 $\mu\text{mol/L}$) 3 μL , MgCl_2 2 μL , 引物-F(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.2 μL , 引物-R(10 $\mu\text{mol/L}$) 1.2 μL , Taq DNA polymerase 1.5 μL , 模板DNA 2 μL , 总体积30 μL 。反应参数94 $^\circ\text{C}$ 3 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 150 s, 共29个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸1 min。挑取阳性克隆质粒测序鉴定。

1.3.4 构建重组腺病毒质粒pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP 构建重组腺病毒质粒, 反应体系为pDown-AKT-IRES/eGFP 17.61 ng, 母载体pAV.Des1d 242.13 ng, LR clonase 1 μL , TE buffer 5 μL , 加入蛋白酶K终止反应10 min, 转化反应产物到Stbl3, 菌落PCR筛选阳性克隆, 挑取阳性克隆质粒测序鉴定。

1.3.5 重组腺病毒质粒pAd-AKT的包装及扩增 将重组腺病毒质粒经Pac I酶切后, 转染293A细胞。转染前换成1 mL新鲜的含10% FBS的DMEM高糖培养基。将250 μL Opti-MEM和1 μg DNA混匀。另外将250 μL Opti-MEM和3 μL lipofectine混匀, 孵育5 min。将上述两种溶液混合, 孵育20 min。将混合液滴加到80%~90%融合的293A细胞, 混匀, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养过夜。24 h后换正常培养液继续培养, 7 d后细胞开始出现病变(cytopathic effect, CPE)。待大多数细胞发生病变后收集细胞和上清, 37 $^\circ\text{C}$ ~80 $^\circ\text{C}$ 反复冻融3次以裂解细胞、释放病毒。4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心10 min收集病毒。取适量病毒液反复感染293A细胞, 大量扩增病毒, -70 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.6 重组腺病毒Ad-AKT感染hucMSC 选择生长状态良好的第3代hucMSC, 接种于6孔培养板中, 每孔约 5×10^4 。待细胞生长至60%融合时, 按照感染复数(MOI)分别为0、10、25、50、100及200加入病毒液, 4 h后补液, 48 h后于荧光显微镜下观察GFP的表达情况。

1.3.7 收集上清, 提取exosomes 状态良好的hucMSC用无血清培养液于37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养48 h, 收集其上清, 待上清量达到实验需要时, 分离exosomes: 首先将上清液以2 000 $\times g$ 离心20 min, 去除死细胞; 然后于4 $^\circ\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心30 min, 去除细胞碎片; 将上清转移到含有30%的蔗糖重水垫的超滤管中, 4 $^\circ\text{C}$ 10 000 $\times g$ 离心3 h; 接着, 吸取蔗糖重水层到100 kDa超滤离心管(Millipore)内, 并用PBS补足到15 mL。1 000 $\times g$ 离心30 min, 吸取上层液体, 用0.22 μm 的滤器过滤除菌, 即得exosomes, -70 $^\circ\text{C}$ 存储备用。

1.3.8 Nanosight分析exosomes 将hucMSC来源

的exosomes和AKT转染的hucMSC来源的exosomes (AKT-MSC-exosomes)用PBS按1:50稀释, 总体积为500 μL , 用Nanosight分析其颗粒大小。

1.3.9 Western blot 检测AKT蛋白的表达量, 每个样品上样200 μg , 以12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 将蛋白转移到硝酸纤维膜上, 用5%脱脂奶粉封闭, 分别加AKT一抗(1:500), GAPDH (1:1 000)孵育过夜, 加入与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:1 000)室温孵育2 h。用增强化学发光(ECL)试剂盒显色温育后暗室显影, 实验重复3次。

检测exosomes中AKT蛋白的表达量, 每个样品上样量200 μg , 加AKT一抗(1:500), GFP一抗(1:500)孵育过夜, 二抗(1:1 000)室温孵育2 h, ECL显影。

为了验证AKT-MSC-exosomes中AKT具有生物学活性, 用AKT-MSC-exosomes以100 $\mu\text{g/mL}$ 处理EA.hy926, 对照组用hucMSC-exosomes以相同条件处理EA.hy926, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养24 h后提取EA.hy926蛋白, Western blot检测AKT下游蛋白Bax和Bcl-2的表达。每个样品上样量为200 μg , Bax和Bcl-2一抗(1:500)孵育过夜, 二抗(1:1 000)室温孵育2 h, ECL显影。

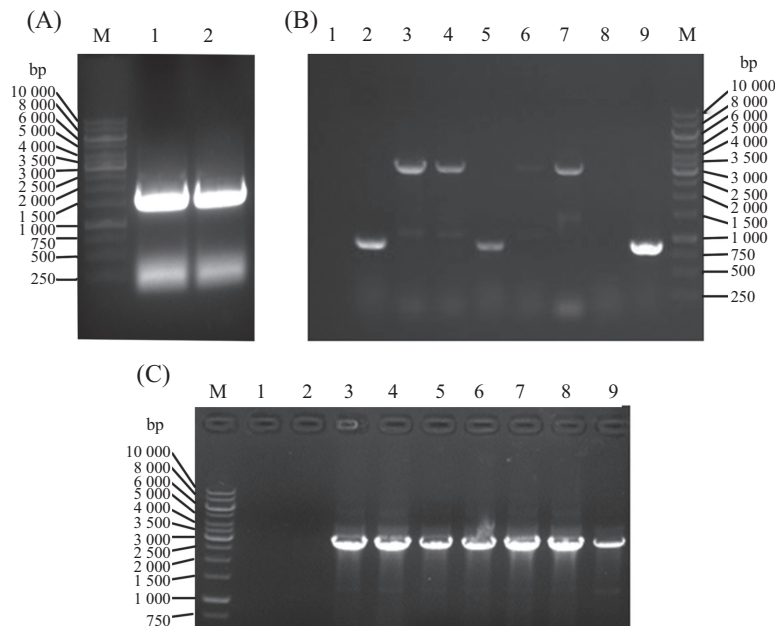
2 结果

2.1 重组腺病毒质粒的鉴定

PCR扩增目的AKT基因, 可见到1 459 bp的目的基因片段(图1A), 其大小与理论大小相符。重组穿梭质粒转化细菌后, 菌落PCR筛选pDown-AKT-IRES/eGFP, PCR产物条带理论大小为3 055 bp, 与目的条带理论大小相符的克隆即为阳性克隆(图1B)。菌落PCR筛选重组腺病毒质粒pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP, 提取菌落RNA, 经RT-PCR鉴定, PCR产物条带理论大小为2 978 bp, 与目的条带理论大小相符的克隆即为阳性克隆(图1C)。

2.2 重组腺病毒Ad-AKT的包装以及转染hucMSC

重组腺病毒质粒Ad-AKT经线性化后转染293A细胞, 8 d后显微镜下观察293A细胞, 发现细胞发生病变, GFP在细胞内得到表达(图2A)。重组腺病毒Ad-AKT转染hucMSC, 48 h后在荧光显微镜下可见>80%的细胞表达较强的GFP(图2B)。Western blot显示, 转染AKT腺病毒的hucMSC中AKT蛋白表达明显高于对照组(图2C), 说明重组AKT腺病毒成功转染到hucMSC中并得到了表达。

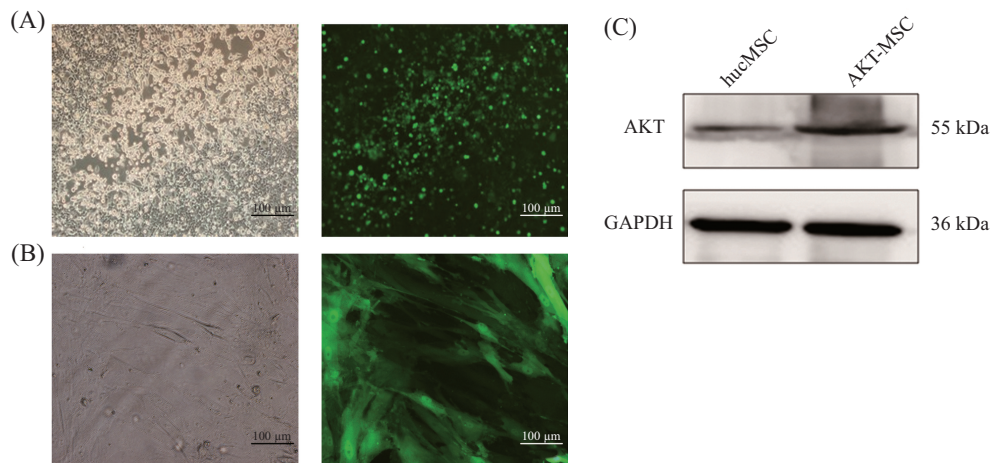


A: PCR鉴定AKT基因, Lane 1、Lane 2: *EcoRI*-AKT-*XhoI*; M: 10 000 bp DNA ladder; B: 菌落PCR筛选重组穿梭质粒pDown-AKT-IRES/eGFP; Lane 1: control; Lane 2~Lane 9: pDown-AKT-IRES/eGFP①~⑧; M: 10 000 bp DNA ladder; C: 菌落PCR筛选重组腺病毒质粒pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP; Lane 1: control; Lane 2~Lane 9: pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP①~⑧; M: 10 000 bp DNA ladder.

A: identification of *AKT* gene by PCR. Lane 1, Lane 2: *EcoRI*-AKT-*XhoI*; M: 10 000 bp DNA ladder; B: identification of recombinant shuttle plasmid pDown-AKT-IRES/eGFP by PCR: Lane 1: control; Lane 2~Lane 9: pDown-AKT-IRES/eGFP①~⑧; M: 10 000 bp DNA ladder; C: identification of recombinant adenovirus plasmid pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP by PCR: Lane 1: control; Lane 2~Lane 9: pAV.Ex1d-CMV>AKT-IRES/eGFP①~⑧; M: 10 000 bp DNA ladder.

图1 重组腺病毒质粒的鉴定

Fig.1 Identification of recombinant adenovirus plasmid



A: 重组腺病毒质粒Ad-AKT线性化后转染293A细胞, 8 d后GFP的表达; B: 重组腺病毒Ad-AKT感染hucMSC 48 h后GFP的表达; C: Western blot检测hucMSC AKT蛋白的表达。

A: the GFP expression of 293A cells after infected with linearized Ad-AKT after 8 d; B: the GFP expression of hucMSC cells after infected with Ad-AKT after 48 h; C: Western blot detected the AKT protein expression of hucMSC.

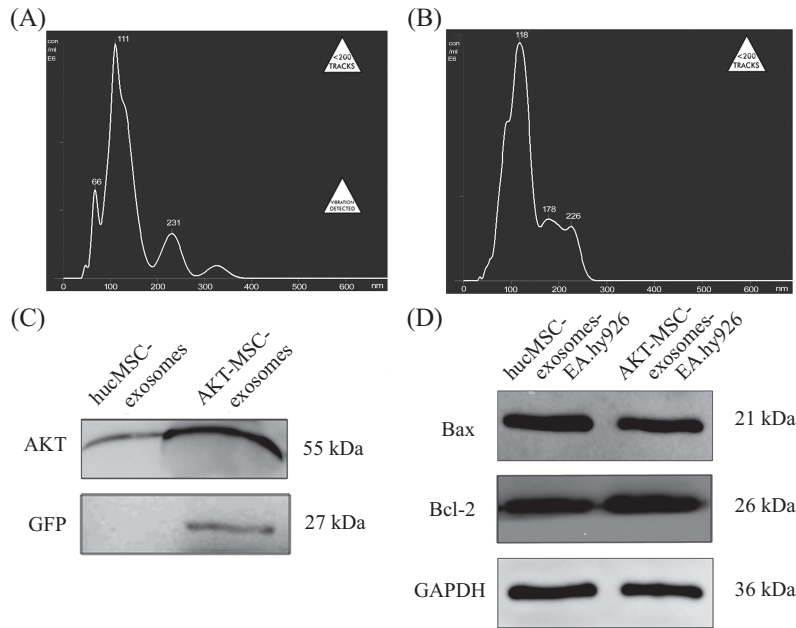
图2 重组腺病毒Ad-AKT的包装以及转染hucMSC

Fig.2 Packing recombinant adenovirus and transfect into hucMSC

2.3 Exosomes的鉴定与分析

Nanosight分析hucMSC-exosomes和AKT-MSC-exosomes, 结果显示, hucMSC-exosomes颗粒大小为

(111±60) nm, 平均值为141 nm(图3A); AKT-MSC-exosomes颗粒大小为(118±46) nm, 平均值为135 nm(图3B), 两者exosomes颗粒大小并无差异, 并与理论



A: Nanosight分析hucMSC-exosomes; B: Nanosight分析AKT-MSC-exosomes; C: Western blot检测AKT-MSC-exosomes中AKT的表达; D: Western blot检测AKT-MSC-exosomes处理的EA.hy926中Bax和Bcl-2的表达。

A: Nanosight analysis hucMSC-exosomes; B: Nanosight analysis AKT-MSC-exosomes; C: Western blot detected the AKT expression of AKT-MSC-exosomes; D: Western blot detected the Bax and Bcl-2 expression of EA.hy926 which treated with AKT-MSC-exosomes.

图3 hucMSC-exosomes的鉴定及分析

Fig.3 Identification and analysis of hucMSC-exosomes

exosomes大小值相符。Western blot显示, AKT-MSC-exosomes中AKT蛋白表达明显高于对照组的exosomes, GFP蛋白只在AKT-MSC-exosomes中得到表达, 说明重组腺病毒AKT基因在细胞中得到了表达并成功转运到exosomes中。用AKT-MSC-exosomes处理过的EA.hy926相比对照组Bax蛋白下调, Bcl-2蛋白上调, 说明AKT-MSC-exosomes中AKT作用于EA.hy926使其下游蛋白发生变化。

3 讨论

近年来, 间质干细胞在组织损伤修复研究中得到了广泛关注, MSC主要通过分泌相关细胞因子(促有丝分裂因子、促血管生成因子、抗凋亡因子等)从而发挥组织保护作用, 并取得了较好的效果^[7-9]。其中, hucMSC在干细胞治疗中应用广泛, 其优点为: 取材便捷, 体外易于分离培养扩增; 移植相关的细胞表面标记CD80/CD68/CD40表达阴性; 免疫原性弱^[10]等。但是, MSC细胞治疗组织损伤时存在移植细胞存活率低^[11]、加重狭窄^[12-14]以及存在致癌隐患等不足使得其临床应用受限, 而MSC来源的exosomes则是一种非细胞成分, 可直接与靶细胞发生融合发挥生物学效应, 克服了MSC体内存活率低, 致癌隐患等

缺点, 成为干细胞成分治疗的重要方法。

研究发现, exosomes作为细胞与细胞交流的介质在机体生理学及病理学过程中起着重要的作用, exosomes包含着能够在细胞间进行转移的RNA(mRNA及microRNAs), 通过在细胞间水平转移的方式激活靶细胞而产生一系列的生物学效应。由于exosomes的蛋白组成较为复杂, exosomes在形成过程中选择性地负载了胞浆蛋白、膜蛋白和脂质蛋白, 所以不同来源的exosomes具有不同的生物学功能。研究表明, MSC来源的exosomes对组织损伤修复起着重要作用, 例如, 2010年Gatti等^[15]研究发现, 干细胞主要通过微泡介导的基因信息传递对肾损伤起着修复作用。本实验室研究发现, hucMSC来源的exosomes对CCL₄损伤的肝细胞也起着保护作用^[1-2]。2010年, Lai等^[16]研究表明, MSC来源的exosomes可以减轻心肌的缺血损伤。这些研究表明, MSC通过分泌exosomes在细胞间进行信息传递, 进而通过旁分泌机制对受损组织进行修复。本实验室已成功分离纯化hucMSC来源的exosomes, 并对其生物学特性进行了初步分析, 为后续实验奠定了基础。

Gnecchi等^[6]研究表明, AKT基因修饰的MSC可通过旁分泌机制抑制梗死后心肌细胞凋亡, 从而增

强心肌细胞生存能力,提高心功能。AKT又称为蛋白激酶B,在细胞信号通路中处于多条信号通路重要交叉点,可调节细胞因子、生长因子等细胞生存信号,AKT信号通路在组织损伤修复中起着重要作用。有研究显示,过表达AKT的MSC生存能力增强并且有效地提高了MSC在组织再生中的作用^[17]。所以本实验以AKT作为目的基因,成功构建了AKT基因重组腺病毒,并且可以高效地转染hucMSC,48 h后荧光显微镜观察有较强的荧光,说明重组腺病毒成功转染hucMSC,GFP基因在hucMSC中得到表达,Western blot检测到AKT-MSC中AKT蛋白表达上调。本实验采用超滤及蔗糖梯度离心法分离纯化得到AKT-MSC来源的exosomes,与正常hucMSC来源的exosomes相比,其颗粒大小并无差异。AKT-MSC-exosomes中AKT蛋白明显高于hucMSC-exosomes,并且GFP蛋白只在AKT-MSC-exosomes中得到表达,说明重组的AKT所表达的蛋白被分泌到exosomes中,具有一定的特异性。另外,用AKT-MSC-exosomes处理的EA.hy926与hucMSC-exosomes处理的EA.hy926相比,EA.hy926中AKT下游蛋白Bcl-2蛋白上调、Bax蛋白下调,说明AKT-MSC-exosomes中AKT是具有生物学活性的。本研究结果表明,通过外源性基因修饰可以获得过表达目的蛋白的exosomes,从而可能改变exosomes生物学特性,为exosomes对组织损伤修复提供新的方法和思路。

参考文献 (References)

- Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev* 2013; 22(6): 845-54.
- 王冰莹,肖宇晴,蒋留留,李里明,李霞,贾浩源,等.人脐带间质干细胞来源的exosomes对肝细胞过氧化损伤的保护作用.临床检验杂志(Wang Bingying, Xiao Yuqing, Jiang Liuliu, Li Liming, Li Xia, Jia Haoyuan, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate hepatocytic oxidative damage *in vitro*. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*) 2013; 31(6): 455-8.
- Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med* 2014; 92(4): 387-97.
- 张润峰,高连如.间充质干细胞修复心肌的旁分泌效应机制.山西医科大学学报(Zhang Runfeng, Gao Lianru. The mechanism of mesenchymal stem cells paracrine effect for cardiac repair. *Journal of Shanxi Medical University*) 2010; 41(9): 840-3.
- Gnecchi M, He H, Melo LG, Noiseux N, Morello F, de Boer RA, *et al.* Early beneficial effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells* 2009; 27(4): 971-9.
- Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, *et al.* Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20(6): 661-9.
- Vassalli G, Moccetti T. Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13209.
- Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hoefler IE, Doevendans PA, *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 2007; 1(2): 129-37.
- Pfister O, della Verde G, Liao R, Kuste GM. Regenerative therapy for cardiovascular disease. *Transl Res* 2013; 163(4): 307-20.
- Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, *et al.* Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 2008; 26(11): 2865-74.
- Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Kitagawa-Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(4): 662-71.
- Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ES. Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69(3): 187-98.
- Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, *et al.* Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 2009; 4(4): e4992.
- Zhu W, Huang L, Li Y, Qian H, Shan X, Yan Y, *et al.* Mesenchymal stem cell-secreted soluble signaling molecules potentiate tumor growth. *Cell Cycle* 2011; 10(18): 3198-207.
- Gatti S, Bruno S, Dereqibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1474-83.
- Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 214-22.
- Chen J, Crawford R, Chen C, Xiao Y. The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(6): 516-28.