

缺血心脏成纤维细胞构建工程化心肌样组织的研究

董悦 张雷* 邵素霞 尹青 陈炜 赵春芳

(河北医科大学组织胚胎教研室, 石家庄 050017)

摘要 采用 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导 Wistar 大鼠缺血心脏成纤维细胞(fibroblasts of ischemia myocardium, FIMs)分化为心肌样细胞, 利用抗心肌特异性肌钙蛋白(cardiac Troponin T, C-TnT)和抗 α -横纹肌肌动蛋白(α -sarcomeric actin, α -SA)间接免疫荧光标记, 透射电镜以及 Real-time PCR 检测血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)mRNA 含量, 鉴定诱导分化的心肌样细胞。采用扫描电镜鉴定两种不同支架组织(脱细胞大肠肌膜和脱细胞胶原膜), 将心肌样细胞分别接种于两种支架组织上生长 5~7 天, 利用抗 C-TnT, α -SA 间接免疫荧光和扫描电镜, 观察工程化心肌样组织生长情况。结果发现, 诱导分化的心肌样细胞胞质内含有丰富的肌微丝, 对抗 C-TnT 和 α -SA 间接免疫荧光标记反应阳性, Real-time PCR 检测显示心肌样细胞内 AGT 和 BNP mRNA 表达明显高于对照组 FIMs, 差别有显著性($P < 0.05$)。在两种不同支架组织上生长, 心肌样细胞呈多边形有突起或柱状分支状片状平铺排列, 对抗 C-TnT 和 α -SA 反应阳性, 细胞胞浆内可见肌微丝。研究表明, FIMs 能诱导分化为心肌样细胞, 在不同支架组织上生长, 构建工程化心肌样组织。

关键词 成纤维细胞; 心肌样细胞; 支架; 组织工程

成纤维细胞是心脏间质内主要的细胞成份, 在调节正常心脏功能, 修复因高血压、心梗和心衰引起的不良心肌损伤中起着重要作用^[1]。急性心肌缺血是导致急性心梗最直接的原因, 心梗发生后通常在 24 h 内由成纤维细胞增生进入心梗区^[2], 瘢痕修复心肌损伤。本研究探讨缺血心脏成纤维细胞(fibroblasts of ischemia myocardium, FIMs), 诱导成为心肌样细胞, 在不同支架组织上生长, 构建工程化心肌样组织。

1 材料与方法

1.1 FIMs 的获取与诱导

1.1.1 FIMs 的获取培养 10 只 Wistar 成年雄性大鼠, 清洁级, 250 g (河北医科大学实验动物中心提供, 合格证编号: 912095)。1 ml 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉动物, 从第二肋间开胸后小心取出心脏, 用 2-0 手术缝线结扎升主动脉, 造成左右冠脉缺血。结扎后迅速放回心脏, 关闭胸腔。心脏缺血 5min 后, 再次开胸取出心脏, 浸泡在 1%PBS 中。无菌条件下分离心室肌组织, 分切为 2 mm \times 2 mm \times 2 mm 大小的组织块, 静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内 2 h 后, 加入含 20% 胎牛血清的 α -MEM 培养基(HyClone 公司)(含 10⁵U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)。每 2 天换液 1 次, 第 5 天细胞开始爬出, 18 天细胞融合生长约 70%,

以 0.25% 胰蛋白酶消化后, 收集细胞以 2 \times 10⁶ 个/ml 细胞浓度, 差速贴壁培养于 50 ml 培养瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内 60 min, 弃细胞悬液后, 留在瓶底的细胞为 FIMs。细胞培养传至第 3 代, 进行鉴定。

1.1.2 FIMs 的鉴定 取 FIMs 的细胞爬片, 丙酮固定。分别采用抗波形蛋白(Vimentin, ab28028, 1:50), 抗心肌特异性肌钙蛋白(Cardiac Troponin T, C-TnT, ab8295, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)和抗 α -横纹肌肌动蛋白(α -sarcomeric Actin, α -SA, ab28052, 1:50)单克隆抗体(Abcam 公司), 室温温育 30 min, IgG/TRITC 或 IgG/FITC 标记的 1:50 二抗(北京中山生物技术有限公司)室温避光温育 30 min, DAPI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(Roche 公司)复染细胞核 15 min, 丙三醇封片。OLYMPUS FLUOVIEW FV-1000 型激光共聚焦荧光显微镜下观察。

1.1.3 FIMs 的诱导培养 FIMs 鉴定后, 分为诱导组与对照组。诱导组在含 20% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza, 培养 1 周, 撤药后继续培养 1 周。对照组不加入任何试剂, 仅用含 20% 胎牛血清的 α -MEM 培养基培养。

收稿日期: 2010-03-25 接受日期: 2010-05-26

河北省自然科学基金(No.C2008001030)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-86266719, E-mail: zhanglei@hebm.edu.cn

1.2 心肌样细胞(cardiomyocyte-like cells, CLCs)的鉴定

1.2.1 间接免疫荧光标记 取诱导分化后的CLCs爬片, 丙酮固定, 分别滴加抗 Vimentin (ab28028, 1 : 50); 抗 C-TnT (ab8295, 1 μ g/ μ l)和抗 α -SA (ab28052, 1 : 50)单克隆抗体(Abcam 公司), 方法同上。

1.2.2 透射电镜观察 CLCs 以 1×10^7 个/ml 细胞浓度悬浮培养于 10 ml 玻璃离心管中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内 24 h 后, 2.5% 戊二醛固定过夜, 离心形成细胞团块。丙酮逐级脱水, 1% 锇酸后固定, Epon 812 包埋, 超薄切片, 柠檬酸铅和醋酸双氧铀复染, 日立 H-7500 透射电镜观察。

1.2.3 Real-time PCR 检测 从 GenBank 中检索大鼠血管紧张素原(angiotensinogen, ATG), 脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP)和大鼠 β -actin 基因的 cDNA 序列。应用 Primer Express Software Version 3.0 软件(AB Applied Biosystem 公司)设计引物。

采用 TRIzol Reagent (Invitrogen 公司)提取 FIMs 与 CLCs 细胞总 RNA, 各取总 RNA 3 μ g 加入 20 μ l 体系(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1621, Fermentas 公司)中合成 cDNA。Real-time PCR 反应体系 20 μ l, 包括 Power SYBR Green PCR Master Mix (AB Applied Biosystem 公司)10 μ l、cDNA 1 μ l (1 μ g)、上下游引物各 1 μ l (300 nmol/L)(上海生工生物技术有限公司合成)、DEPC 水补足 20 μ l。Real-time PCR 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 预热 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min 之后, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s; 63 $^{\circ}$ C 退火 20 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 31 s; 40 个循环。每样本设 3 个孔, 在 7500 Real Time PCR System (AB Applied Biosystem 公司)中进行扩增。数据自动进入电脑, 生成扩增曲线(Amplification Plot)和溶解曲线(Melt Curve); 临界循环数(threshold cycle values, C_T) $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学采用 SPSS13.0 统计软件, 对两组样本数据进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性, 具有统计学意义。

1.3 工程化心肌样组织的构建

1.3.1 支架组织的制备与鉴定

1.3.1.1 支架组织的制备 8 只 Wistar 成年雄性大鼠, 清洁级, 250 g(河北医科大学实验动物中心提供, 合格证编号: 912095)。1 ml 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉动物后, 打开腹腔留取从回盲部起始的近端结肠组织 40 mm。剪开肠腔后清水冲洗干净, 无菌纱布反复搓擦, 浸泡于 1% PBS 液中 3 h 后, 经 0.25% 胰酶消化 24 h, 双蒸水漂洗; 0.5% SDS 处理 24 h, 再经含 0.1% 过氧乙酸的 20% 乙醇浸泡 10 h, 双蒸水反复漂洗, 制备成脱细胞大肠肌膜(acellular colon muscle film, ACMF); 经冻干机(CHRIST, 德国)冷冻干燥 48 h 后, 密封包装, 放入 100% 环氧乙烷气体灭菌器内(3M Steri-VacTM Sterilizer/Aerator Model 8XL, 美国)55 $^{\circ}$ C 灭菌 20 h, 室温保存 6 个月备用。脱细胞胶原膜(Bio-Gide/Bio-Gide Perio)[瑞士盖氏制药有限公司, 生产标准编号: YZB/Geistlich-002-2005, 注册号: 国食药监械(进)字 2008 第 3461465 号] 购于北京盖思特利商贸有限公司。

1.3.1.2 支架组织的鉴定 ACMF 和 Bio-Gide 两种支架组织分别在 4 $^{\circ}$ C 下固定于 1% 戊二醛中 1 h, 梯度乙醇逐渐脱水, 75%、100% 叔丁醇干燥, 日立 IB-3 型离子喷镀仪喷金, 日立 S-3500N 型扫描电镜观察。

1.3.2 支架组织上 CLCs 的接种与培养 ACMF 和 Bio-Gide 支架组织, 大小分别为 15 mm \times 15 mm \times 2 mm, 浸泡于含 10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 α -MEM 培养基中 2 h, 然后分别放置于培养皿内。将 CLCs 浓度调整为 1×10^7 个/ml, 分别接种在两种支架组织上, 4 h 后加入含 20% 胎牛血清的 α -MEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内培养 5~7 天。

1.4 工程化心肌样组织的鉴定

1.4.1 间接免疫荧光标记 分别取 ACMF 和 Bio-Gide 支架组织上生长 5 天的工程化心肌样组织, 固定于 10% 福尔马林中, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 切片厚度 4 μ m。抗 C-TnT (ab8295, 1 μ g/ μ l)和抗 α -SA 单克隆抗体(ab28052, 1 : 50)(Abcam 公司)室温下温育 30 min, IgG/TRITC 或 IgG/FITC 标记的 1 : 50 二抗(北京中山生物技术有限公司)室温避光温育

Table 1 Primers used for real-time PCR assay

Primers	Sequence (5' \rightarrow 3')	Length (bp)	%GC
AGT	P ₁ : TGG CTT CCC GTC ACT CCT T	19	57.89
	P ₂ : TCA GTT AGC GCC ATC TCC AA	20	50.00
BNP	P ₁ : ACA ATC CAC GAT GCA GAA GCT	21	47.62
	P ₂ : TCT CTG AGC CAT TTC CTC TGA CT	23	47.83
β -actin	P ₁ : CCA GTT CGC CAT GGA TGA C	19	57.89
	P ₂ : ATG CCG GAG CCG TTG TC	17	64.71

30 min, DAPI (50 $\mu\text{g/ml}$)(Roche 公司)复染细胞核 5 min, 丙三醇封片。OLYMPUS FLUOVIEW FV-1000 型激光共聚焦荧光显微镜下观察。

1.4.2 扫描电镜观察 分别取 ACMF 和 Bio-Gide 支架组织上生长 7 天的工程化心肌样组织, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定于 1% 戊二醛中 1 h, 方法同上。日立 S-3500N 型扫描电镜下观察。

2 结果

2.1 FIMs 的鉴定

FIMs 呈梭形, 细胞核椭圆形, 位于细胞中央, 细

胞束状排列。在 α -MEM 培养基中对照培养 2 周后, 细胞形态没有发生改变。间接免疫荧光标记发现, FIMs 对 TRITC 标记的抗 Vimentin 呈红色荧光反应(图 1A), 对 FITC 标记的抗 C-TnT 和 TRITC 标记的抗 α -SA 反应阴性(图 1B, 图 1C)。

2.2 CLCs 的鉴定

诱导分化的 CLCs 胞体宽大, 有突起; 细胞平铺分布, 细胞突起之间有连接。间接免疫荧光标记发现, CLCs 对 TRITC 标记的抗 Vimentin 呈红色荧光反应(图 2A); 对 FITC 标记的 C-TnT 呈绿色荧光反应(图 2B), 对 TRITC 标记的抗 α -SA 呈红色荧光反应(图 2C)。

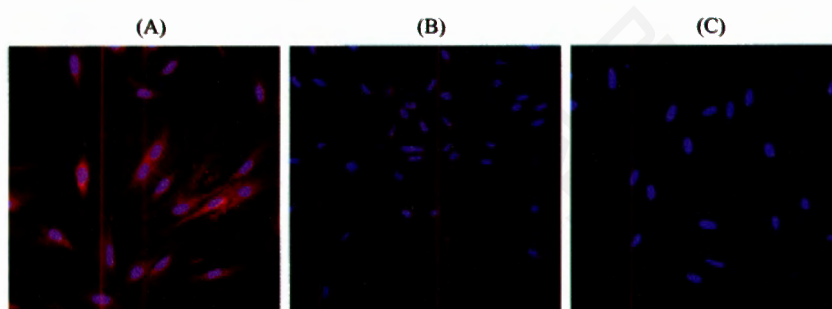


Fig. 1 Observation of FIMs by indirect immunofluorescence staining

A: FIMs showed red fluorescence for Vimentin (400 \times); B: FIMs were negative for C-TnT (400 \times); C: FIMs were negative for α -SA (400 \times).

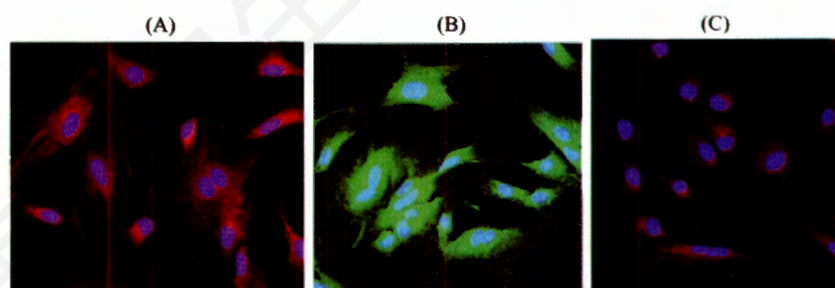


Fig. 2 Observation of CLCs by indirect immunofluorescence staining

A: CLCs showed red fluorescence for Vimentin (400 \times); B: CLCs showed green fluorescence for C-TnT (400 \times); C: CLCs showed red fluorescence for α -SA (400 \times).

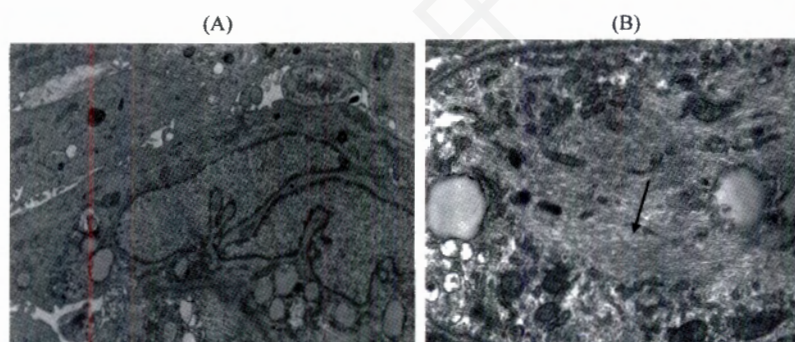


Fig. 3 Observation of CLCs ultrastructures by TEM

A: CLCs showed elongated type with myofilaments and lysosomes in the cytoplasm (8 000 \times); B: CLCs contained rich myofilaments (arrow) in the cytoplasm (15 000 \times).

透射电镜观察发现, CLCs 呈多边形或柱状有分支(图 3A), 胞质内含有大量肌微丝, 肌微丝与细胞长轴平行排列(图 3B)。胞质内还可见数量不等的线粒体和溶酶体。

Real-time PCR 检测数据, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法分析相对基因表达差异。结果发现, CLCs 的 AGT 和 BNP mRNA 表达明显高于对照组 FIMs(图 4-1, 图 4-2, 表

1, 表 2), 差别有显著性($P < 0.05$)。

2.3 支架组织的鉴定

扫描电镜观察发现, ACMF 支架组织中肌层浅面出现不规则裂隙(图 5A), 表面有少量纤细的纤维交织成网状(图 5B)。Bio-Gide 支架组织由粗细不匀的胶原纤维组成, 纤维呈束状排列, 纤维之间有大小不等的孔隙(图 5C, 图 5D)。

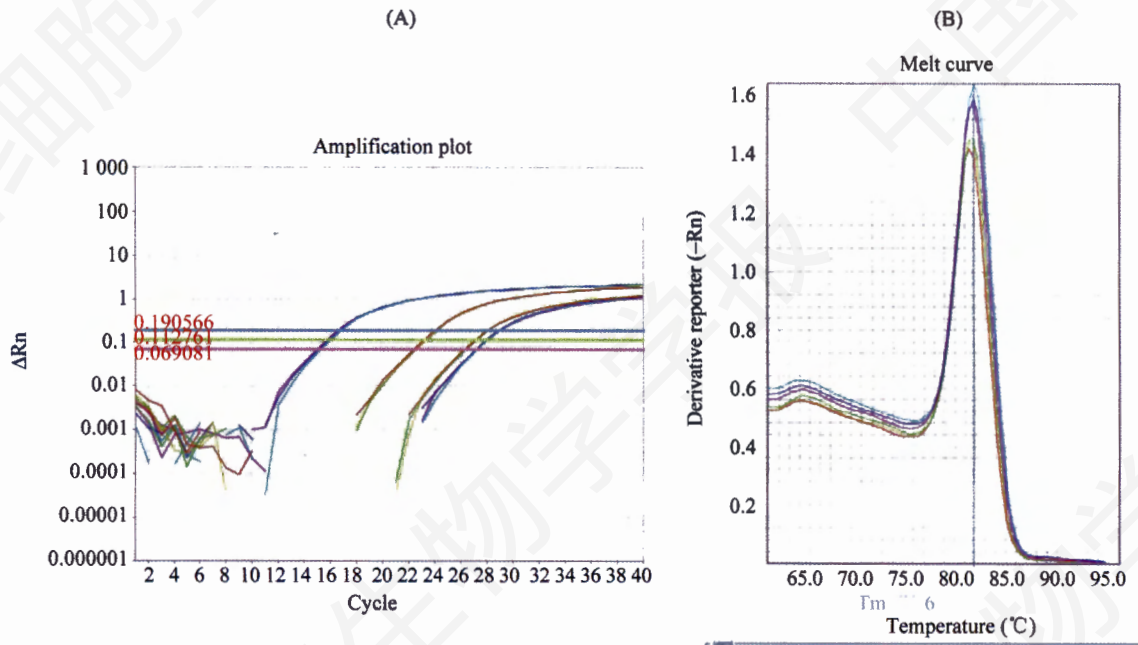


Fig. 4-1 Real-time PCR of AGT

A: amplification plot of AGT mRNA expression; B: melt curve of AGT primer showed single peak.

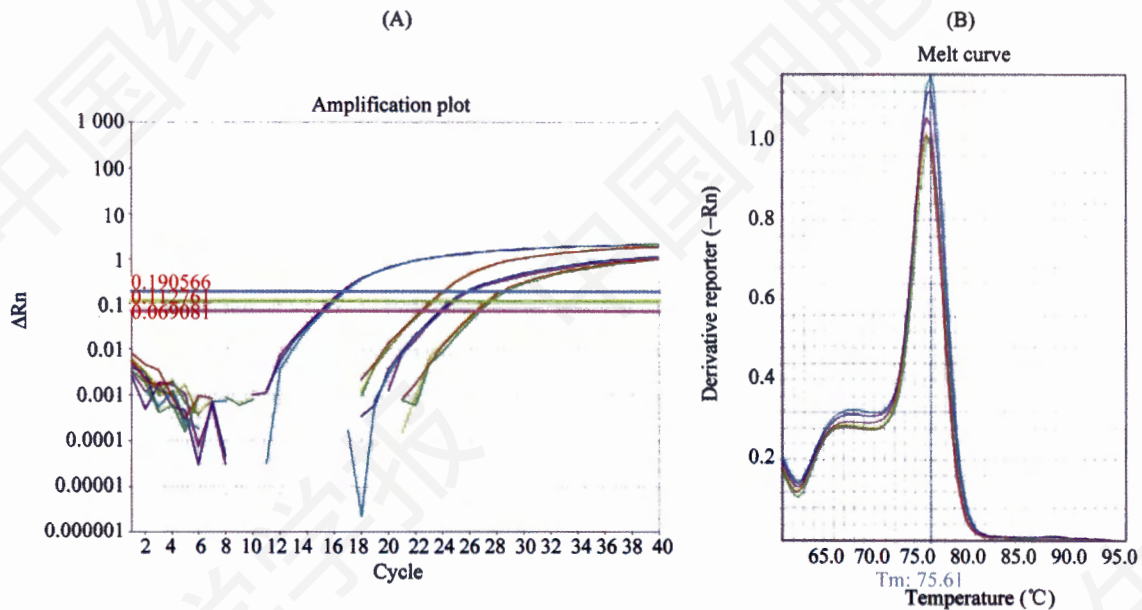


Fig. 4-2 Real-time PCR of BNP

A: amplification plot of BNP mRNA expression; B: melt curve of BNP primer showed single peak.

Table 1 Real-time PCR results of AGT

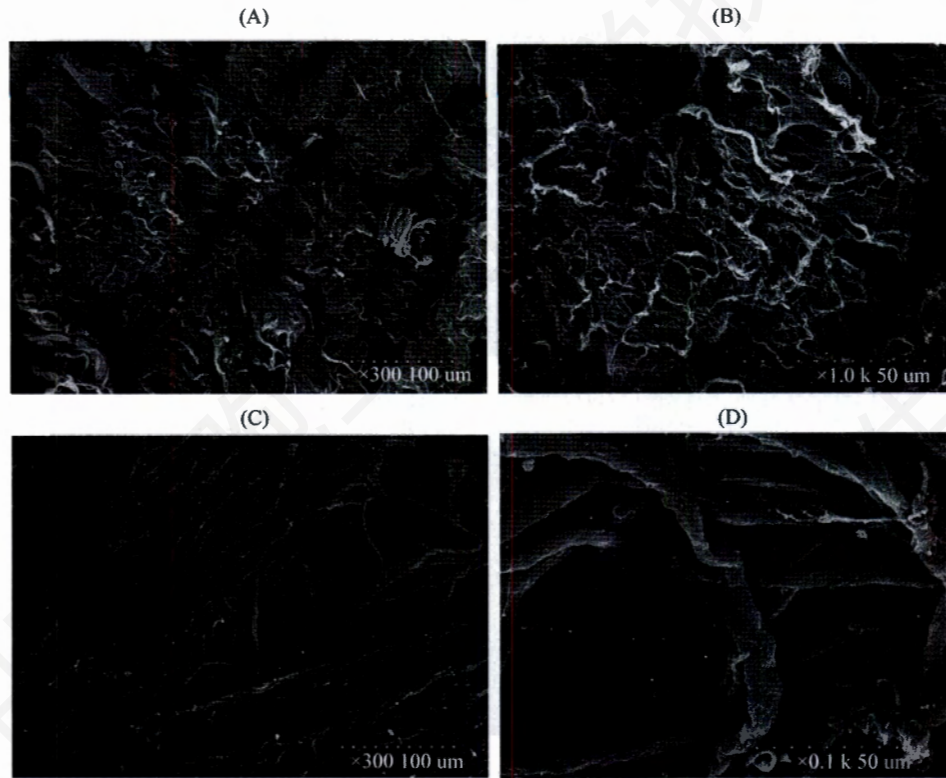
Cell	n	AGT (Ave. C_T)	β -actin (Ave. C_T)	Normalized AGT Exp. (ΔC_T)*	Calibrated AGT Exp. ($\Delta\Delta C_T$)	Fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
FIMs	3	27.92±0.04	16.67±0.09	11.25±0.04	0.00±0.04	1.0
CLCs	3	27.05±0.06	24.05±0.09	3.00±0.06	-8.25±0.06	304.3

*Significant difference of AGT mRNA expression between FIMs and CLCs ($P<0.05$).

Table 2 Real-time PCR results of BNP

Cell	n	BNP (Ave. C_T)	β -actin (Ave. C_T)	Normalized BNP Exp. (ΔC_T)*	Calibrated BNP Exp. ($\Delta\Delta C_T$)	Fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
FIMs	3	23.76±0.08	16.67±0.09	7.09±0.08	0.00±0.08	1.0
CLCs	3	26.48±0.18	24.05±0.09	2.43±0.12	-4.66±0.12	25.1

* Significant difference of BNP mRNA expression between FIMs and CLCs ($P<0.05$).

**Fig. 5 Observations of ACMF scaffold and Bio-Gide scaffold by SEM**

A, B: ACMF scaffold with cracked shallow muscle stratum formed irregular fissures (A, 300 \times), and showed some fibrous nets on the surface (B, 1 000 \times); C, D: Bio-Gide scaffold consisted of rough fibers in different diameter and arranged in bunch (C, 300 \times ; D, 1 000 \times).

2.4 工程化心肌样组织的鉴定

2.4.1 间接免疫荧光观察 生长在 ACMF 支架组织上的心肌样细胞呈片状平铺排列。细胞胞浆丰富, 对 FITC 标记的抗 C-TnT 荧光免疫反应呈翠绿色(图 6A); 在 Bio-Gide 支架组织上生长的心肌样细胞呈片状, 充满支架组织的裂隙中, 细胞胞浆丰富, 对 TRIFC

标记的抗 α -SA 呈红色荧光反应(图 6B)。

2.4.2 扫描电镜观察 在 ACMF 支架组织上生长的心肌样细胞胞体宽大, 细胞突起犬牙交错。细胞重叠呈复层, 片状平铺排列(图 7A, 图 7B)。细胞胞质内可见与细胞长轴平行排列的肌微丝(图 7C, 图 7D)。

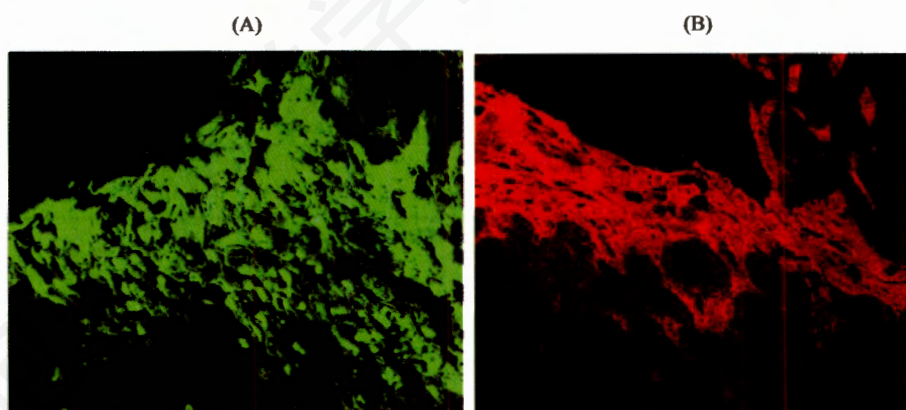


Fig. 6 Observations of myocardial-like tissue engineering by indirect immunofluorescence staining

A: CLCs on ACMF scaffold of myocardial-like tissue engineering showed green fluorescence for C-TnT (400 \times); B: CLCs on Bio-Gide scaffold of myocardial-like tissue engineering showed red fluorescence for α -SA (400 \times).

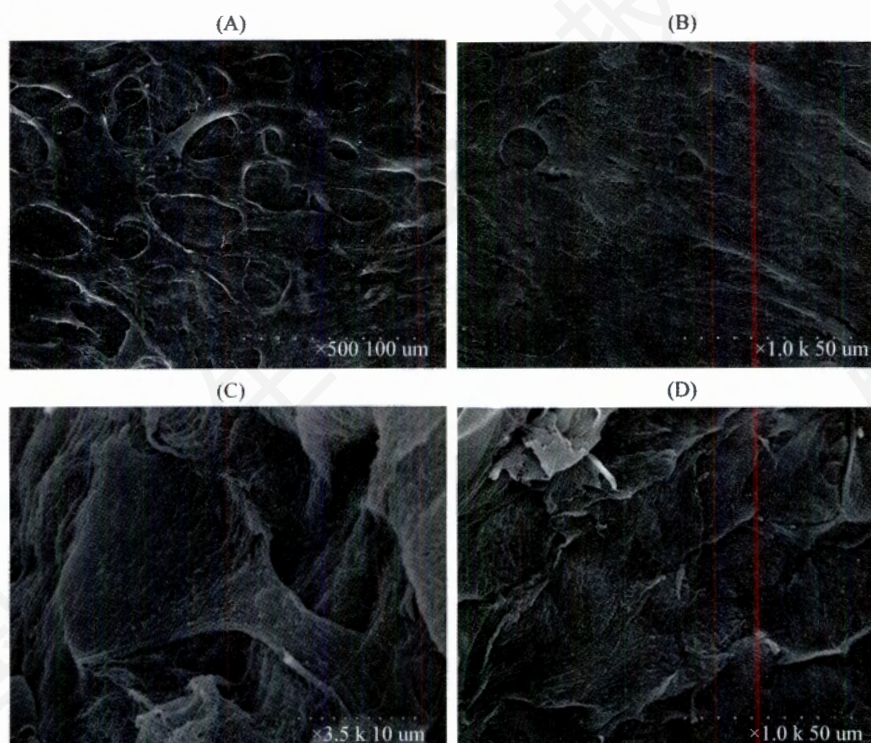


Fig. 7 Observations of myocardial-like tissue engineering on ACMF scaffold by SEM

A, B: CLCs of myocardial-like tissue engineering arranged in multilayers on ACMF scaffold (A, 500 \times ; B, 1 000 \times); C: CLCs of myocardial-like tissue engineering showed polyhedral type with process (35 000 \times); D: CLCs of myocardial-like tissue engineering stretched on ACMF scaffold with some filaments in the cytoplasm (1 000 \times).

在 Bio-Gide 支架组织上生长的心肌样细胞呈柱状有分支(图 8A, 图 8B), 片状平铺排列, 细胞胞体宽大、复层重叠, 突起之间犬牙交错(图 8C, 图 8D)。

3 讨论

工程化心肌组织或实验性心肌修复, 是目前心脏

损伤修复研究的热点。工程化心肌组织采用的种子细胞多选用骨髓干细胞^[3-6]。人类干细胞在特定条件下, 能够分化为功能性心肌细胞。由于干细胞具有的多潜能分化和可诱导性, 作为组织工程的种子细胞表现出明显的优势。此外, 内皮祖细胞, 骨骼肌母细胞也被用于诱导分化为心肌细胞^[4]。新生鼠的心

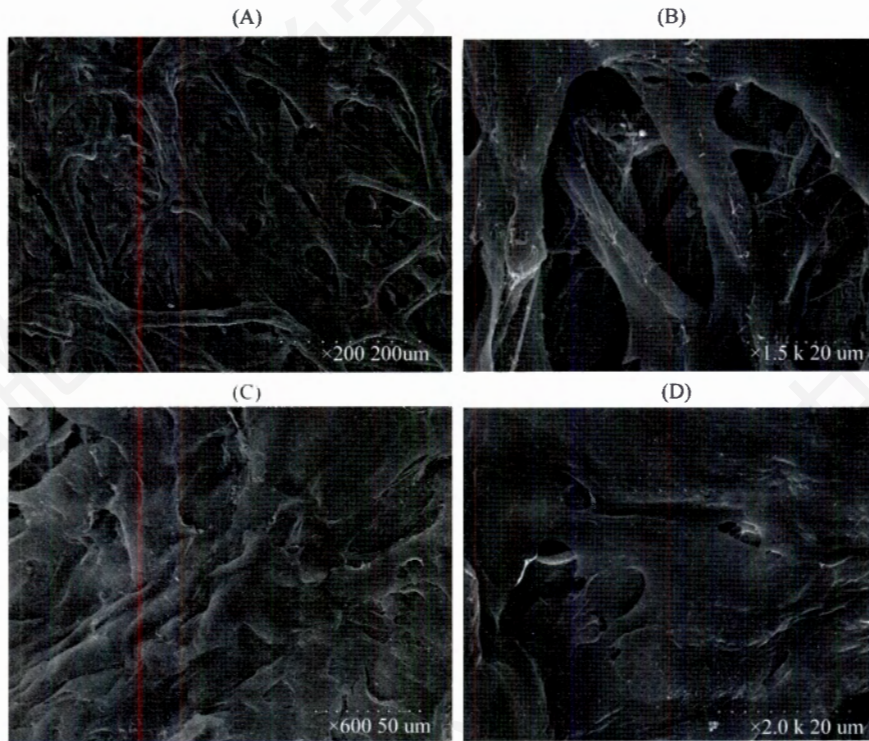


Fig. 8 Observations of myocardial-like tissue engineering on Bio-Gide scaffold by SEM

A, B: CLCs of myocardial-like tissue engineering showed elongated type with processes stretched on Bio-Gide scaffold (A, 200 \times ; B, 1 500 \times); C, D: CLCs of myocardial-like tissue engineering arranged in multilayers on Bio-Gide scaffold (C, 600 \times ; D, 2 000 \times).

肌细胞可直接作为种子细胞, 移植到成年大鼠的心梗区, 形成超微结构成熟的心肌层^[7]。在诱导干细胞向心肌细胞分化过程中, 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)的应用, 能同时提高心肌细胞分化的效率^[8-10]。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和维生素A酸(retinoic acid, RA)也用于诱导胚胎干细胞向心肌细胞的分化^[11]。近年来表明, 胰岛素生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)的应用可增强骨髓干细胞的植活能力^[12]。心脏本身含有大量成纤维细胞, 在心脏缺血状态下, 这些成纤维细胞能否诱导形成心肌样细胞, 作为工程化心肌组织的种子细胞? 关于这类研究, 目前报道较少。Etzion 等^[13]采用大鼠心梗7天的成纤维细胞, 转染人 MyoD 基因, 再植入7天的梗区内。发现植入1个月, 转染的成纤维细胞在心梗瘢痕中形成束状肌细胞, 并表达横纹肌肌动蛋白(sarcomeric actin)和快速肌球蛋白重链(fast myosin heavy chain), 少数细胞还表达缝隙连接蛋白 Connexin 43。Genovese 等^[14]在不含细胞因子的培养体系中, 采用短时电刺激诱导鼠胚胎成纤维细胞转变为心肌细胞。Yano 等^[15]采用绿色荧光蛋白标记发现, 在3天或7天的梗区内增生的心肌细胞不是来

源于骨髓的循环前体细胞, 而是来源于残存的成纤维细胞。本研究采用 5-aza 诱导缺血心脏成纤维细胞, 分化为心肌样细胞, 作为工程化心肌组织的种子细胞。研究表明, 缺血心脏成纤维细胞诱导而来的心肌样细胞, 胞体大, 呈多边形或柱状有分支, 胞浆内含丰富的肌微丝, 对心肌细胞特异性标记物的心肌特异性肌钙蛋白^[16](Cardiac Troponin T, C-TnT)和 α -横纹肌肌动蛋白(α -sarcomeric actin, α -SA)呈阳性反应。Real-time PCR 检测发现, 心肌细胞产生的血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)^[17,18]和脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP)^[19-21]在本实验的心肌样细胞中, 其mRNA的表达明显高于对照组成纤维细胞, 差别有显著性。研究表明, 诱导分化的缺血心脏成纤维细胞, 具有心肌细胞的形态特征和功能活动, 可以作为工程化心肌组织的种子细胞。

工程化心肌组织选用的支架材料种类较多。生物细胞外基质作为支架材料的如生物可降解胶原支架^[22]、含有血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)活性的纤维蛋白支架^[23]或胶原支架^[24]、透明质酸、纤维素以及天然生物组织来源的细胞外基质, 如小肠黏膜下层支架组织^[5,25]。

Singelyn等^[26]采用猪的心肌组织制成脱细胞的可注射心肌基质;无支架的细胞片,包括骨骼肌母细胞构建的组织工程细胞片,也用于心肌组织工程^[27,28]。三维的I型胶原管状支架系统将胚胎心肌细胞与骨髓干细胞共培养,不仅可以促进胚胎心肌细胞继续分化,还能诱导骨髓干细胞向心肌样细胞分化^[29]。本研究制备的大鼠脱细胞大肠肌膜(acellular colon muscle film, ACMF),在扫描电镜下观察发现,肌层浅面出现不规则的裂隙,ACMF表面有纤细的纤维网,心肌样细胞在ACMF支架组织上附着伸展,呈片状平铺排列,生长良好,对心肌细胞特异性标记物的C-TnT反应阳性;扫描电镜下可见细胞呈多边形,有较长的细胞突起,胞浆内含有肌微丝。表明ACMF支架组织适应心肌样细胞的生长,具有较好的细胞相容性。从物种来源和形态特征上与ACMF支架组织具有很大差异的脱细胞胶原膜Bio-Gide,来源于猪皮肤,胶原束粗大,胶原之间孔隙大小不规则。心肌样细胞在Bio-Gide支架组织上也能呈片状平铺排列,对心肌细胞特异性标记物的 α -SA呈阳性反应,扫描电镜观察发现,细胞呈多边形或柱状,分支犬牙交错,复层平铺排列,表明Bio-Gide支架组织同样适应心肌样细胞的生长,具有较好的细胞相容性。

总之,本研究结果表明5-aza能诱导缺血心脏成纤维细胞,分化为心肌样细胞;在不同支架组织上生长,细胞呈多边形或柱状分支状,片状平铺排列,对心肌细胞特异性标记物的C-TnT和 α -SA反应阳性,构建为工程化心肌样组织。

参考文献(References)

- Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; 123(2): 255-78.
- Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, Kohl P, Green CR. Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovasc Res* 2004; 62(2): 415-25.
- Charwat S, Gyöngyösi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, *et al.* Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: Current state of the art. *Exp Hematol* 2008; 36(6): 672-80.
- Siepea M, Akhyarib P, Lichtenberg A, Schlensaka C, Beyersdorfa F. Stem cells used for cardiovascular tissue engineering. *Eru J Cardiothorac Surg* 2008; 34(2): 242-7.
- Tan MY, Zhi W, Wei RQ, Huang YC, Zhou KP, Tan B, *et al.* Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits. *Biomaterials* 2009; 30(19): 3234-40.
- Li SC, Wang L, Jiang H, Acevedob J, Chang AC, Loudon WG.

- Stem cell engineering for treatment of heart diseases: Potentials and challenges. *Cell Biol Int* 2009; 33(3): 255-67.
- Moreno-Gonzalez A, Korte FS, Dai J, Chen K, Ho B, Reinecke H, *et al.* Cell therapy enhances function of remote non-infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47(5): 603-13.
- Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V, *et al.* Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol* 2008; 87(3): 173-84.
- Moscoco I, Barallobre J, de Ilarduya ÓM, Añón P, Fraga M, Calviño R, *et al.* Analysis of different routes of administration of Heterologous 5-Azacytidine-treated mesenchymal stem cells in a porcine model of myocardial infarction. *Transplant Proc* 2009; 41(6): 2273-5.
- Gai H, Leung EL, Costantino PD, Aguila JR, Nguyen DM, Fink LM, *et al.* Generation and characterization of functional cardiomyocytes using induced pluripotent stem cells derived from human fibroblasts. *Cell Biol Int* 2009; 33(11): 1184-93.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Guo J, Zhou QJ, Yao X, *et al.* Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Cell Biol Int* 2006; 30(4): 301-7.
- Enoki C, Otani H, Sato D, Okada T, Hattori R, Imamura H. Enhanced mesenchymal cell engraftment by IGF-1 improves left ventricular function in rats undergoing myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2010; 138(1): 9-18.
- Etzion S, Barbash IM, Feinberg MS, Zarin P, Miller L, Guetta E, *et al.* Cellular cardiomyoplasty of cardiac fibroblasts by adenoviral delivery of MyoD *ex vivo*: an unlimited source of cells for myocardial repair. *Circulation* 2002; 106(12 Suppl 1): I125-30.
- Genovese JA, Spadaccio C, Langer J, Habe J, Jackson J, Patel AN. Electrostimulation induces cardiomyocyte predifferentiation of fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 370(3): 450-5.
- Yano T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, *et al.* Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14(5): 241-6.
- Nomura RM, Cabara FR, Costa VN, Miyadahira S, Zugaib M. Cardiac troponin T as a biochemical marker of cardiac dysfunction and ductus venosus Doppler velocimetry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 147(1): 33-6.
- Cuadra AE, Shan Z, Summers C, Raizada MK. A current view of brain renin-angiotensin system: Is the (pro)renin receptor the missing link? *Pharmacol Ther* 2010; 125(1): 27-38.
- Huang D, Wang Y, Yang C, Liao Y, Huang K. Angiotensin II promotes poly(ADP-ribosyl)ation of c-Jun/c-Fos in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46(1): 25-32.
- Wasywich CA, Whalley GA, Walsh HA, Gamble GD, Doughty RN. The relationship between BNP and E/EA in patients hospitalized with acute heart failure. *Int J Cardiol* 2008; 125(2): 280-2.
- Balion CM, McKelvie RS, Reichert S, Santaguida P, Booker L, Worster A, *et al.* Monitoring the response to pharmacologic therapy in patients with stable chronic heart failure: Is BNP or

- NT-proBNP a useful assessment tool? Clin Biochem 2008; 41 (4-5): 266-76.
- 21 Jaubert MP, Armero S, Bonello L, Nicoud A, Sbragia P, Paganelli F, *et al.* Predictors of B-type natriuretic peptide and left atrial volume index in patients with preserved left ventricular systolic function: An echocardiographic-catheterization study. Arch Cardiovasc Dis 2010; 103(1): 3-9.
- 22 van Amerongen MJ, Harmsen MC, Petersen AH, Kors G, van Luyn MJA. The enzymatic degradation of scaffolds and their replacement by vascularized extracellular matrix in the murine myocardium. Biomaterials 2006; 27(10): 2247-57.
- 23 Briganti E, Spiller D, Mirtelli C, Kull S, Counoupas C, Losi P, *et al.* A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenic growth factors. J Control Release 2010; 142(1): 14-21.
- 24 Chiu LLY, Radisic M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. Biomaterials 2010; 31(2): 226-41.
- 25 Akhyari P, Kamiya H, Haverich A, Karck M, Lichtenberg A. Myocardial tissue engineering: the extracellular matrix. Eur J Cardiothorac Surg 2008; 34(2): 229-41.
- 26 Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. Biomaterials 2009; 30(29): 5409-16.
- 27 Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60 (2): 277-85.
- 28 Hoashi T, Matsumiya G, Miyagawa S, Ichikawa H, Ueno T, Ono M, *et al.* Skeletal myoblast sheet transplantation improves the diastolic function of a pressure-overloaded right heart. J Thorac Cardiovasc Surg 2009; 138(2): 460-7.
- 29 Valarmathi MT, Goodwin RL, Fuseler JW, Davis JM, Yost MJ, Potts JD. A 3-D cardiac muscle construct for exploring adult marrow stem cell based myocard regeneration. Biomaterials 2010; 31(12): 3185-200.

The Study of Myocardial-like Tissue Engineering Constructed by Fibroblasts of Ischemia Myocardium

Yue Dong, Lei Zhang*, Su-Xia Shao, Qing Yin, Wei Chen, Chun-Fang Zhao

(Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Fibroblasts of ischemia myocardium (FIMs) were obtained from the ischemia myocardium of adult Wistar rats and induced by 5-azacytidine (5-aza) to be differentiated to cardiomyocyte-like cells (CLCs), which were identified by indirect immunofluorescence against cardiac Troponin T (C-TnT) and α -sarcomeric actin (α -SA) antibodies and transmission electron microscope (TEM). Real-time PCR was performed to assay expressions of both angiotensinogen (AGT) and brain natriuretic peptide (BNP)mRNA in CLCs and FIMs. Scanning electron microscope (SEM) was used to evaluate two different scaffolds of acellular colon muscle film (ACMF) scaffold and Bio-Gide/Bio-Gide Perio (Bio-Gide) scaffold. CLCs were seeded on both ACMF scaffold and Bio-Gide scaffold and cultured for 5~7d. Indirect immunofluorescence against C-TnT and α -SA antibodies, SEM observation was done respectively to identify the myocardial-like tissue engineering. The results found that the cytoplasm of CLCs contained rich myofilaments, and were positive for C-TnT and α -SA. Real-time PCR revealed that the expressions of both AGT and BNP mRNA were much higher in CLCs than those in FIMs ($P < 0.05$). CLCs showed elongated and/or polyhedral type, arranged in multilayers and stretched on ACMF scaffold and Bio-Gide scaffold to form myocardial-like stratum displayed rich myofilaments in the cytoplasm and were positive for C-TnT and α -SA. It was suggested that FIMs could differentiate into CLCs and be constructed myocardial-like tissue engineering on the different scaffolds.

Key words fibroblasts; cardiomyocyte-like cell; scaffold; tissue engineering

Received: March 25, 2010 Accepted: May 26, 2010

This work was supported by the Nature Science Foundation of Hebei Province (No.C2008001030)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86266719, E-mail: zhanglei@hebm.edu.cn