

电穿孔转染酸性成纤维细胞生长因子基因对骨骼肌卫星细胞的影响

李江华¹, 董少红², 熊玮¹, 庞新利¹, 刘启云¹, 李文君² (1深圳市人民医院心内科 暨南大学第二临床医学院, 广东省深圳市 518020; ²厦门大学医学院, 福建省厦门市 361005)

文章亮点:

- 1 课题组早期研究表明体外一定剂量酸性成纤维细胞生长因子对骨骼肌卫星细胞有增殖作用。
- 2 本实验将酸性成纤维细胞生长因子基因通过电转染骨骼肌卫星细胞, 观察骨骼肌卫星细胞转染前后的生物学特性。通过电穿孔法可以将酸性成纤维细胞生长因子基因转染进骨骼肌卫星细胞并获得高效持久的表达, 并有促进骨骼肌卫星细胞增殖及抑制分化为肌管的作用。

关键词:

干细胞; 分化; 骨骼肌卫星细胞; 基因转染; 绿色荧光蛋白; 电穿孔; 原代培养

主题词:

卫星细胞, 骨骼肌; 基因; 转染; 绿色荧光蛋白

摘要

背景: 课题组早期研究表明体外一定剂量酸性成纤维细胞生长因子对骨骼肌卫星细胞增殖有促进作用。

目的: 进一步验证电穿孔转染酸性成纤维细胞生长因子基因对骨骼肌卫星细胞生长、增殖及分化的影响。

方法: 原代培养、纯化骨骼肌卫星细胞, 将带有酸性成纤维细胞生长因子基因的质粒 pSectag-GFP-aFGF 通过电转染的方法转染大鼠骨骼肌卫星细胞, 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况并计算转染率, 以流式细胞仪分析转染后细胞周期, 绘制细胞生长曲线, 观察转染后肌管形成情况, Western Blotting 检测酸性成纤维细胞生长因子基因的表达。

结果与结论: 免疫细胞化学检测: 骨骼肌肌动蛋白呈阳性表达。转染效率: pSectag-aFGF 质粒电转染 12 h 后即可看见散在发绿色荧光的卫星细胞, 72-96 h 达高峰, 阳性表达率约 90%。细胞周期检测: 电转染后 S 期所占的百分比明显多于未转染对照组 ($P < 0.05$)。细胞生长曲线检测: 电转染细胞接种后第 3 天进入对数生长期, 第 5 天后开始减少。分化能力观察: 电转染组肌管较未转染对照组明显减少, 老化细胞较少。Western-blot: 酸性成纤维细胞生长因子基因在转染骨骼肌卫星细胞中表达。结果表明, 通过电穿孔法可以将酸性成纤维细胞生长因子基因转染进骨骼肌卫星细胞并获得高效持久的表达, 并有促进骨骼肌卫星细胞增殖及抑制分化为肌管的作用。

李江华, 董少红, 熊玮, 庞新利, 刘启云, 李文君. 电穿孔转染酸性成纤维细胞生长因子基因对骨骼肌卫星细胞的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(1):85-90.

Effects of transfection with acidic fibroblast growth factor by electroporation on skeletal muscle satellite cells

Li Jiang-hua¹, Dong Shao-hong², Xiong Wei¹, Pang Xin-li¹, Liu Qi-yun¹, Li Wen-jun² (1Department of Cardiology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China; 2Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that a certain dose of acidic fibroblast growth factor can promote skeletal muscle satellite cell proliferation *in vitro*.

OBJECTIVE: To investigate the effects of transfection with acidic fibroblast growth factor by electroporation on growth, proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cells.

METHODS: Skeletal muscle satellite cells were cultured and purified, and then transfected with plasmid pSectag-GFP-aFGF by electroporation. The expression of green fluorescent protein was observed under fluorescence microscope, and the transfection efficiency was calculated. After transfection, cell cycle was analyzed by flow cytometry to draw the growth curve of skeletal muscle satellite cells. Western blot assay was employed to measure protein level of acidic fibroblast growth factor.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Immunocytochemistry detection: The skeletal muscle satellite cells were positive for α -sarcomeric actin. (2) Transfection efficiency: At 12 hours after transfection with pSectag-aFGF, several cells showed green fluorescence, and the green fluorescent expression reached the peak at 72-96 hours after transfection with a positive rate of about 90%. (3) Cell cycle: After electrotransfection, the proportion of cells at S phase in the electroporation group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). (4) Cell growth curve: At 3 days after electrotransfection, the cells entered logarithmic growth phase but the proliferation slowed down at 5 days. (5) Differentiation capacity: There were fewer myotubes and aging cells in the electroporation

李江华, 男, 1980 年生, 湖北省京山县人, 汉族, 2008 年暨南大学大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管的诊断及治疗的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.01.015
[http://www.crter.org]

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2015)01-0085-06
稿件接受: 2014-12-05

Li Jiang-hua, Master, Attending physician, Department of Cardiology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-12-05

group than the control group. (6) Western blot assay: Acidic fibroblast growth factor protein was highly expressed in the cells transfected with target gene detected by western blot assay. These findings indicate that by using electroporation method, acidic fibroblast growth factor can be transferred into skeletal muscle satellite cells and have a high-efficiency and long-term expression, which can promote the proliferation of skeletal muscle satellite cells and inhibit formation of myotubes.

Subject headings: Satellite Cells, Skeletal Muscle; Genes; Transfection; Green Fluorescent Proteins

Li JH, Dong SH, Xiong W, Pang XL, Liu QY, Li WJ. Effects of transfection with acidic fibroblast growth factor by electroporation on skeletal muscle satellite cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(1):85-90.

0 引言 Introduction

骨骼肌卫星细胞是成体骨骼肌中位于肌细胞膜和基膜之间具有增殖分化潜能的肌源性干细胞,具有良好的增殖分化能力,且取材方便、耐缺血缺氧能力强,是对心肌梗死后心肌进行细胞移植治疗和基因治疗的理想靶细胞之一^[1]。

近年人体骨骼肌卫星细胞梗死心肌移植也逐渐应用于临床。法国人Menasche等^[2]于2000年率先将骨骼肌卫星细胞应用于临床,他对1例72岁陈旧性心肌梗死伴严重心力衰竭的男性患者进行冠脉旁路移植,同时将骨骼肌卫星细胞注射入梗死区中央及周边,随访患者症状改善,超声提示射血分数增加,心功能较前明显改善。随后国外多个干细胞研究中心将骨骼肌卫星细胞应用于临床^[3-6],也表明了骨骼肌卫星细胞的有效性、可行性及方便性,并有学者进行了长期随访^[7]。但是和其他干细胞心肌移植一样,心肌梗死后微环境为缺血缺氧状态下,局部炎症反应剧烈,移植的干细胞成活率极低^[8-9],移植后骨骼肌卫星细胞的存活率极低影响了进一步的推广及应用^[10-12]。因此使用各种手段增加干细胞的存活率方兴未艾,如移植前使用抗缺氧药物共培养、使用血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子等促新生血管形成的因子、转染质粒、转染病毒等方式提高移植存活率^[13]。

酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)是成纤维细胞生长因子家族一员,具有广泛的生物学作用,它与源自中胚层和神经外胚层的靶细胞表面受体结合后,刺激细胞合成,导致细胞分裂增殖,能影响多种细胞的生长、分化,能刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖,并诱导血管新生,具有改善心肌缺血,保护心肌的作用^[14-16]。本课题组早期研究表明体外一定剂量酸性成纤维细胞生长因子对骨骼肌卫星细胞有增殖作用^[17]。

深圳市人民医院心内科早在董少红教授的带领下于2004年就成立了干细胞心肌移植小组,在国内较早开展了骨骼肌卫星细胞心肌移植的研究,先后成功制作了大鼠及兔心肌梗死模型及进行骨骼肌卫星细胞移植,并尝试多种方法提高骨骼肌卫星细胞移植存活率。本实验将酸性成纤维细胞生长因子基因通过电转染骨骼肌卫星细胞,观察骨骼肌卫星细胞转染前后的生物学特性,从而构建一种心肌缺血后干细胞移植的种子细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

设计:单一样本观察。

时间及地点:实验于2013年4月至2014年9月在深圳市人民医院临床医学中心完成,其中电转染部分在暨南大学完成。

材料:

实验动物: SPF级1-3日龄SD大鼠乳鼠,雌雄不拘,体质量15-20 g,许可证号SYXK(粤)2010-0068,购于广东省医学实验动物中心。

电穿孔转染酸性成纤维细胞生长因子基因对骨骼肌卫星细胞生物学特性的影响实验所用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM培养基	Gibco公司
胎牛血清	Hyclone公司
胶原酶、胰蛋白酶、percoll分离液	Sigma公司
α -sarcomeric actine(骨骼肌横纹肌肌动蛋白)单克隆抗体、SABC试剂盒、DAB试剂盒	博士德公司
质粒小提取试剂盒	天根
大鼠 α -actin抗体购自博士德公司酸性成纤维细胞生长因子抗体	Abcam公司
BTX 2001电穿孔机	BTX公司
流式细胞仪	Beckman Coulter公司
酶标仪	BIO-RAD公司
质粒pSectag -aFGF	广东医学院庞时锋博士惠赠

实验方法:

骨骼肌卫星细胞的原代取材培养、纯化、扩增:取1-3日龄的SD大鼠乳鼠,雌雄不拘。在无菌条件下分离四肢肌组织,剪碎成1 mm×1 mm×1 mm大小,加入0.2%胶原酶消化60 min。弃上清,再加入0.25%胰蛋白酶消化30 min。将所得的细胞悬液1 500 r/min离心5 min,弃去上清,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞,细胞悬液依次经100目和200目滤网过滤。得到的细胞滤液接种于塑料培养瓶中,37℃、体积分数5%CO₂无菌细胞培养箱中,静置培养2 h。取15 mL无菌离心管,从下至上分别轻轻铺制60% percoll工作液2 mL,20% percoll工作液6 mL,最上层加入经初次纯化得到的含未贴壁细胞的培养基2 mL,4 000 r/min离心5 min。无菌吸管轻轻吸取60%

和20% percoll工作液交界面的乳白色混浊带约1 mL, 移至另一无菌离心管, 用无血清的培养基1 000 r/min离心清洗2次, 5 min/次, 弃去上清, 用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基重悬, 接种于培养瓶中3 d后首次换液, 以后每2 d换液1次, 待细胞长至80%-90%融合时, 0.25%胰蛋白酶消化, 按1:3比例传到培养扩增。

免疫细胞化学鉴定骨骼肌卫星细胞: 收获培养至第3代的骨骼肌卫星细胞, 消化后以 1.0×10^5 个细胞/孔接种入预铺了盖玻片的6孔培养板中, 加入生长培养基培养, 常规处理后进行 α -sarcomeric actine免疫组织化学染色, 以成纤维细胞为阴性对照。

质粒的提取及电转染骨骼肌卫星细胞: 质粒的提取按照试剂盒说明书进行, 将提取好的质粒稀释至质量浓度为0.5 g/L。将第3代处对数生长期的骨骼肌卫星细胞用0.25%的胰蛋白酶消化, 离心1 000 r/min, 离心10 min收集细胞。用预冷的PBS洗涤细胞, 离心1 000 r/min, 离心10 min收集细胞, 调整细胞数为0.5 mL约 1.0×10^7 个。细胞加至4 mm电击杯中, 再加入15 μ g质粒pSectag-GFP-aFGF, 轻轻混匀(勿产生气泡), 冰浴10 min, 电击1次, 电击条件: 电压160 V, 电容1 050 μ F, 脉冲时间12 ms。放电后电击杯冰浴10 min, 用20倍不含血清的DMEM清洗电击杯, 将清洗液转入培养瓶中, 4 h后换用体积分数10%胎牛血清的完全培养基, 37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂无菌细胞培养箱中培养。以未转染的细胞为空白对照。

荧光显微镜下观察转染率: 转染后不同时间(12, 24, 48, 72, 96, 120 h)选择490 nm为最大激发波长, 荧光显微镜下观察GFP的表达, 计数10个高倍视野中绿色荧光染色细胞, 以绿色荧光染色细胞数占总细胞数百分比代表转染效率。

流式细胞仪测量细胞周期: 收集电转染96 h的细胞, 无水乙醇固定, 冰冷PBS洗涤2次并重悬, 制成单细胞悬液, 等体积细胞悬液和PI(碘化丙啶)混合, 300目尼龙膜过滤后用流式细胞仪测定细胞周期比率。以未转染的细胞为空白对照。

细胞生长曲线的绘制: 取第3代未转染及电转染后骨骼肌卫星细胞, 以 2.0×10^4 孔接种于6孔培养板内, 常规培养, 每天取3孔细胞进行计数, 计算平均值。以培养时间为横坐标, 细胞数为纵坐标, 绘制生长曲线。

转染后细胞分化能力的观察: 当细胞融合到70%-80%以上不传代继续培养或更换分化培养基培养至7-10 d, 倒置相差显微镜下观察肌管形成的情况。

Western Blotting检测酸性成纤维细胞生长因子基因的表达: 转染96 h后常规提取总蛋白, 每孔加入20 μ L蛋白溶液, 在10%的SDS-PAGE中80 V、30 min及120 V、1 h进行电泳分离, 半干转液38 mA、90 min转入PVDF膜, 5%牛奶封闭2 h, 加入兔抗大鼠酸性成纤维细胞生长因子一抗(1:1 000)及 β -actin一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,

0.1%TBST洗10 min 3次, 加入羊抗兔二抗(1:6 000)孵育1h, 0.1%TBST洗10 min 3次, 加入ECL发光液100 μ L在Image Quant RT ECL冷CCD成像系统进行显影, 用Imagequant TL软件进行半定量分析。

主要观察指标: 免疫细胞化学鉴定骨骼肌卫星细胞。荧光显微镜下观察转染率。流式细胞仪测量细胞周期。细胞生长曲线的绘制。转染后细胞分化能力的观察。Western Blotting检测酸性成纤维细胞生长因子基因的表达。

统计学分析: 实验计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用t检验; 率用百分率(%)表示, 采用 χ^2 检验进行分析, 应用SPSS 17.0统计软件分析。

2 结果 Results

2.1 免疫细胞化学鉴定骨骼肌卫星细胞 骨骼肌肌动蛋白免疫细胞化学显示, 在骨骼肌卫星细胞胞浆内可见棕黄色沉着, 呈阳性表达(图1A)。作为对照的成纤维细胞则为阴性反应(图1B)。经计算肌动蛋白免疫细胞化学染色阳性的细胞占有所有细胞的95%。

2.2 荧光显微镜下观察转染率 在电转染后12 h即可见散在少量发绿色荧光的骨骼肌卫星细胞(图2A), 随后逐渐增多, 在72-96 h达到高峰, 阳性表达率最高约为90%(图2B)。

2.3 流式细胞仪测量细胞周期 在PI染色流式细胞术的图中纵轴Count表示细胞计数, 横轴第1个峰表示G₁期, 第2个峰表示S期。从表1, 图3可以看出, 与对照组相比, 电转染后各组骨骼肌卫星细胞的周期发生了较大的变化, S期所占的百分比也增多, 与对照组相比, 差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 细胞生长曲线 电转染后第1天电转染组所测细胞数略少于对照组, 自48 h开始, 电转染组细胞总数成对数级生长(生长曲线直线上升), 而对照组生长较缓慢, 至第5天细胞数开始下降。见图4。

2.5 转染后细胞分化能力的观察结果 两组细胞长满培养瓶后不传代继续培养, 对照组细胞即可见较多肌管形成, 肌管成长条状排列, 部分肌管可收缩, 且老化较多。电转染组肌管与对照组比肌管明显减少, 老化细胞较少, 提示电转染组细胞增殖能力强, 分化为肌管的能力较弱。见图5。

2.6 Western Blotting检测酸性成纤维细胞生长因子基因的表达 Western Blotting蛋白免疫印迹检测结果, 转染组酸性成纤维细胞生长因子蛋白表达阳性, 与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图6。

3 讨论 Discussion

3.1 骨骼肌卫星细胞联合酸性成纤维细胞生长因子移植的背景 干细胞移植治疗急性心肌梗死目前已经从动物试验阶段逐渐应用于临床, 骨骼肌卫星细胞通过多重机制

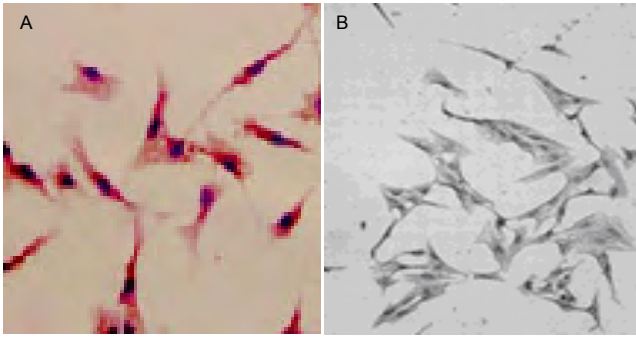


图 1 免疫细胞化学鉴定骨骼肌卫星细胞($\times 100$)

Figure 1 Immunocytochemical identification of skeletal muscle satellite cells ($\times 100$)

图注: 图 A 为骨骼肌卫星细胞内表达 α -sarcomeric actins 阳性; B 为成纤维细胞为阴性反应。

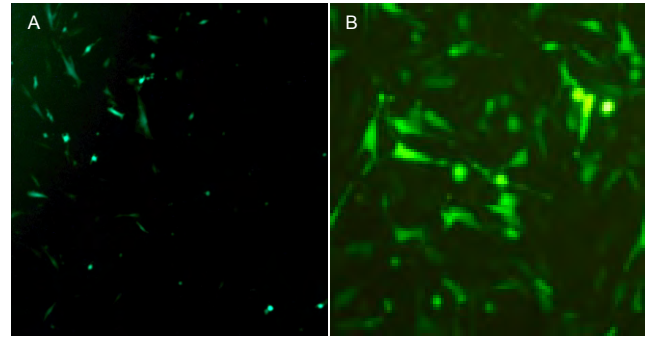


图 2 电转染后骨骼肌卫星细胞荧光显微镜下观察转染率($\times 100$)

Figure 2 Transfection efficiency of skeletal muscle satellite cells under fluorescence microscope ($\times 100$)

图注: 图 A 为电转染后 12 h 见少量绿色荧光表达; B 为电转染 96 h 绿色荧光阳性达高峰, 约为 90%。

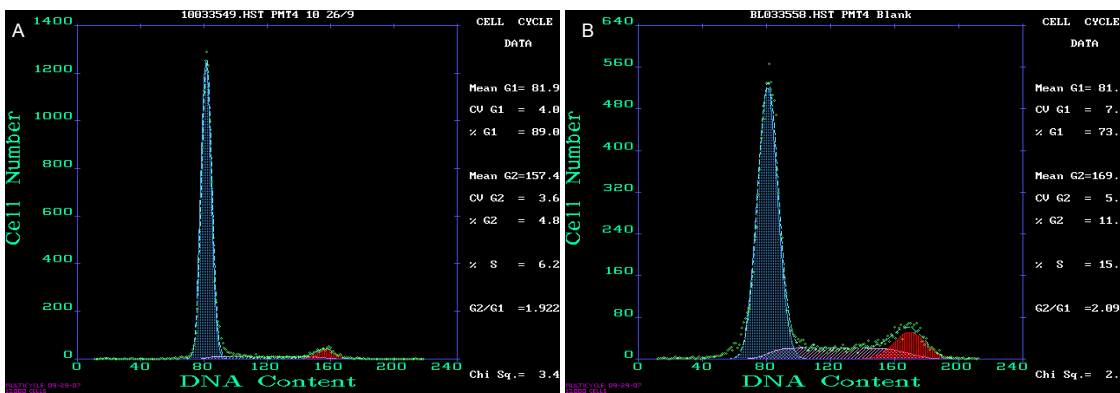


图 3 流式细胞仪测量电转染组及未转染对照组细胞的细胞周期

Figure 3 Flow cytometry detection of cell cycle in the electrotransfection and control groups

图注: 图 A 为未转染对照组流式周期图; B 为电转染组流式周期图。电转染后骨骼肌卫星细胞的周期发生了较大的变化, S 期所占的百分比也增多。

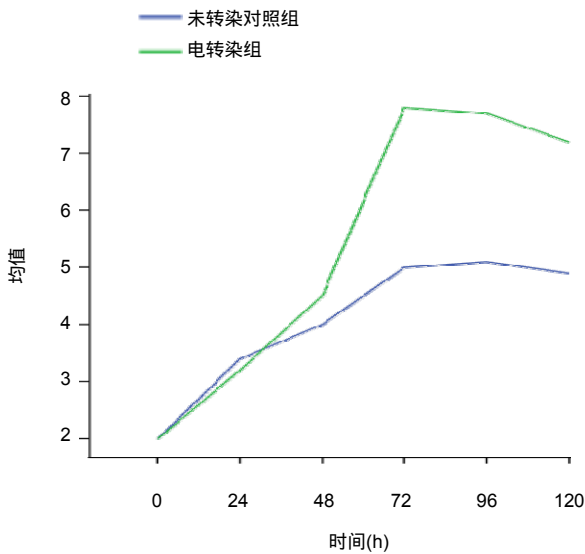


图 4 电转染组及未转染对照组细胞生长曲线

Figure 4 Growth curves of skeletal muscle satellite cells in electrotransfection and control groups

图注: 自 48 h 开始, 电转染组细胞总数成对数级生长(生长曲线直线上升), 而对照组生长较缓慢, 至第 5 天细胞数开始下降。

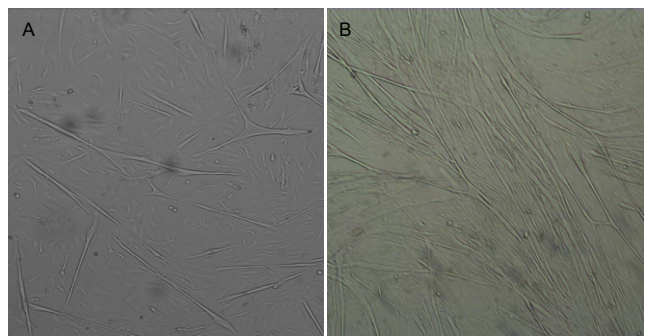


图 5 电转染组及未转染对照组细胞分化能力的观察结果($\times 100$)

Figure 5 Differentiation capacity of skeletal muscle satellite cells in electrotransfection and control groups ($\times 100$)

图注: 图 A 为电转染组; B 为未转染对照组。电转染组细胞增殖能力强, 分化为肌管的能力较弱。

表 1 电转染骨骼肌卫星细胞对细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Table 1 Effect of electrotransfection on cell cycle of skeletal muscle satellite cells

组别	G ₁	S	G ₂ /M
未转染对照组	89.0 \pm 0.5	6.2 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3
电转染组	73.1 \pm 0.6	15.8 \pm 0.3 ^a	4.8 \pm 0.2

表注: 电转染后 S 期所占的百分比明显增多, 与未转染对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

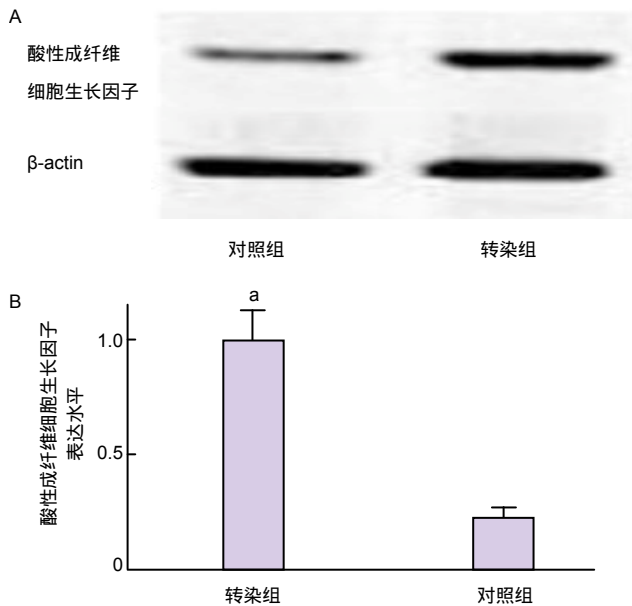


图6 Western-blot 检测酸性成纤维细胞生长因子蛋白表达情况
Figure 6 Western blot assay of acidic fibroblast growth factor protein expression

图注:转染组酸性成纤维细胞生长因子蛋白表达阳性,与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

修复衰竭心脏,成为目前最有前景的治疗手段之一。但动物实验显示约90%的骨骼肌卫星细胞在移植后24-48 h死亡^[18-19],在人类成肌细胞存活率更低^[20],主要原因有:心肌梗死早期梗死区炎症反应。缺血-再灌注损伤。梗死区血供匮乏。移植过程中的机械损伤。细胞体外培养使活力下降,对免疫排斥反应耐受力差。移植本身导致炎症反应。这些因素不仅导致细胞坏死,同时还有细胞凋亡参与^[21-22]。大量的研究表明酸性成纤维细胞生长因子能够刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖^[23-24],并诱导血管新生,因此具有改善心肌缺血、保护心肌的作用。但这些研究只是在进行细胞移植的时候将酸性成纤维细胞生长因子同期注射入心肌,因此酸性成纤维细胞生长因子的作用时效短、效率低,造成移植效果欠佳。本研究就尝试将携带有酸性成纤维细胞生长因子基因的治疗转染进骨骼肌卫星细胞,从而让酸性成纤维细胞生长因子发挥更大的功效。

3.2 酸性成纤维细胞生长因子对骨骼肌卫星细胞生物学特性影响 酸性成纤维细胞生长因子多种类型细胞的丝裂原,能促进中胚层外胚层来源的多种细胞增殖,具有广泛的生物学作用,能影响多种细胞的生长、分化及功能,在正常生理和病理过程中参与生长发育和组织损伤的修复过程。本研究表明,酸性成纤维细胞生长因子能提高电转染组的骨骼肌卫星细胞细胞周期的S期的百分比,促进DNA的合成,提示电转染后细胞增殖能力明显增强,同时能抑制骨骼肌卫星细胞分化为肌管,且能稳定表达酸性成纤维细胞生长因子蛋白。这些都表明电转染酸性成纤维细胞生长因子基因后骨骼肌卫星细胞的具有增殖能力强、分

化能力减弱等特点,具有稳定生物学特性,适合进行心肌移植治疗。

3.3 电转染效率的问题 电转染穿孔的原理是应用短暂的高压电脉冲使细胞膜形成纳米级的微孔,外源基因通过这些微孔或者伴随微孔关闭时膜成分的再分布而直接进入细胞内。影响电穿孔的因素主要有细胞因素、物化因素(电穿缓冲液的pH,离子成分,外源DNA的浓度,形状,电穿前后对细胞的处理方式)和电参数(脉冲类型,电压,脉冲时间,脉冲次数)^[25]。其中电参数尤为重要。电压越高,转化效率越高,但细胞存活率越低。因此找到转化效率和存活率的平衡点是电击追求的最佳效果。本课题组在先前研究的基础上降低了电压^[26],适当延长了脉冲时间,从而获得了良好的转染效果和较持久的基因表达。

综上所述,本研究表明在优化电转染条件下,酸性成纤维细胞生长因子基因以极高的效率导入了骨骼肌卫星细胞,并观察了酸性成纤维细胞生长因子对骨骼肌卫星细胞的生长特性、细胞周期的影响,为以后进一步酸性成纤维细胞生长因子联合骨骼肌卫星细胞并心肌移植提供了很好的依据。

*作者贡献:*设计、评估为第一、第二作者,实施为全体作者,第一作者成文并对文章负责。

*利益冲突:*文章及内容不相关利益冲突。

*伦理要求:*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。

*学术术语:*酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)-是一种对来源于中胚层及神经外胚层的细胞,有广泛促分裂作用的微量活性物质,主要分布于脑、垂体、神经组织、视网膜、肾上腺、心脏和骨等器官或组织内,其他组织含量很少,在血清和体液中以极低的浓度存在。

*作者声明:*文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Bryant SJ, Cuy JL, Hauch KD, et al. Photo-patterning of porous hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007; 28(19): 2978-2986.
- [2] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 1078-1083.
- [3] Kang HJ, Lee HY, Na SH, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*. 2006; 114(1 Suppl): 145-151.
- [4] Guarita-Souza LC, Francisco JC, Simeoni R, et al. Benefit of stem cells and skeletal myoblast cells in dilated cardiomyopathies. *World J Cardiol*. 2011; 26; 3(3): 93-97.

- [5] Fujita T, Sakaguchi T, Miyagawa S, et al. Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. *Surg Today*. 2011; 41(8): 1029-1036
- [6] Povsic TJ, O'Connor CM, Henry T, et al. A double-blind, randomized, controlled, multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J*. 2011;162(4):654-662.
- [7] Brickwedel J, Gulbins H, Reichenspurner H, et al. Long-term follow-up after autologous skeletal myoblast transplantation in ischaemic heart disease. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2014;18(1):61-66.
- [8] Mouquet F, Lemesle G, Delhaye C, et al. The presence of apoptotic bone marrow cells impairs the efficacy of cardiac cell therapy. *Cell Transplant*. 2011;20(7):1087-1097 .
- [9] Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*. 2009;8(11): 20-28.
- [10] Hassan N, Tchao J, Tobita K. Concise review: skeletal muscle stem cells and cardiac lineage: potential for heart repair. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(2):183-193.
- [11] Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013; 113(6): 810-834.
- [12] Loughran JH, Chugh AR, Ismail I, et al. Stem cell therapy: promising treatment in heart failure? *Curr Heart Fail Rep*. 2013;10(1):73-80.
- [13] Xiang G, Yang Q, Wang B, et al. Lentivirus-mediated Wnt11 gene transfer enhances cardiomyogenic differentiation of skeletal muscle-derived stem cells. *Mol Ther*. 2011;19(4): 790-796.
- [14] Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A. Angiogenic potential operivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*. 1998 ;274(3): 930-937.
- [15] 余瑛, 蔡绍哲, 夏玉先. 酸性成纤维细胞生长因子研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(2): 125-128.
- [16] Cuevas P, Carceller F, Cuevas B. Protection of rat myocardium by mitogenic and non-mitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion]. *Growth Factors*. 1997;15(1):29-40.
- [17] 董少红, 张鹏, 温隽珉, 等. 酸性成纤维细胞生长因子促进兔骨骼肌卫星细胞生长的研究[J]. *中华医学杂志* 2007, 87(17): 1195-1198.
- [18] Irintchev A, Zweyer M, Wernig A. Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast implantation. *J Neurocytol*. 1995;24(4): 319-331.
- [19] Mouquet F, Lemesle G, Delhaye C, et al. The presence of apoptotic bone marrow cells impairs the efficacy of cardiac cell therapy. *Cell Transplant*. 2011;20(7):1087-1097.
- [20] Pouzet B, Vilquin JT, Hagège AA, et al. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: Can tissue processing be optimized?. *Circulation*. 2000;102(19): 210-215.
- [21] Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, et al. Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res*. 2012;110(1):126-144.
- [22] González A, Ravassa S, Beaumont J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(18):1833-1843.
- [23] Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol*. 1998; 142(5): 1257-1267.
- [24] Rosengart TK, Budenbender KT, Duenas U. Therapeutic angiogenesis: a comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J Vasc Surg*. 1997;26(2): 302-312.
- [25] Peng B, Zhao Y, Xu L, et al. Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 2007;25(11):2064-2073.
- [26] 董少红, 李江华, 罗林杰, 等. 电穿孔介导外源性基因转染大鼠骨骼肌卫星细胞的可行性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(12): 2206-2210.