(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101437938 B
(45)授权公告日 2015.05.13

(21)申请号 200580040364.1

(22)申请日 2005.11.08

(30)优先权数据
60/625,695 2004.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2005/040359 2005.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2006/052925 EN 2006.05.18

(73)专利权人 约翰霍普金斯大学
地址 美国马里兰州

(72)发明人 E·马尔万 M·R·亚伯拉罕
R·R·史密斯

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 路小龙

(51)Int.Cl.
C12N 5/08(2006.01)

(56)对比文件
WO 99/49015 A,1999.09.30, 全文.
MESSINA ELISA et al.Isolaiton and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart.《CIRCULAITON RESEARCH》.2004, 第95卷(第9期),1524-4571.
OH,H et al.Cardiac progenitor cells from adult myocardium:homing,differen tiation, and fusion after infarction.《PNAS》.2003, 第100卷(第21期),12313-12318.
Beltrami Antonio et al.Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.《CELL》.2003, 第114卷(第6期),763-776.

审查员 劳芳

权利要求书3页 说明书13页 附图6页

(54)发明名称

心脏干细胞

(57)摘要

可以通过心内膜活检分离人心脏干细胞。此类细胞在小鼠梗塞模型中介导心肌再生并改善心脏功能。所述细胞可以用于患者中的自体、异基因、同基因、或异种治疗应用。干细胞可以被遗传修饰,以增强它们的治疗活性。

CN 101437938 B

1. 心球衍生细胞 (CDC) 群在制备增强哺乳动物的受损或患病心脏的功能的药物中的应用 :

其中所述受损或患病心脏在左心室射血分数 (LVEF) 和左心室面积分数 (LVFA) 方面具有缺陷 ;

其中所述 CDC 群表达 c-Kit、CD105、心脏肌球蛋白重链 (cMHC) 和心脏肌钙蛋白 I(cTnI) ;

其中所述 CDC 群通过下述步骤获得 :

酶法消化从哺乳动物获得的心脏组织以产生外植体,其中所述酶法消化使用选自胶原酶、基质金属蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的蛋白酶进行,

在包被纤连蛋白的培养物表面上培养所述外植体,所述外植体在完全外植体培养基中温育 30 分钟以产生粘附的外植体,

使用完全外植体培养基,在完全外植体培养基中培养所述粘附的外植体 8 天以上,直到基质样细胞层从所述粘附的外植体产生,并且小的圆的亮相细胞迁移到所述基质样细胞层上的时刻,

其中完全外植体培养基包括 20% 热灭活胎牛血清、100 单位 /mL 的青霉素 G、100 μg/mL 链霉素、2mmol/L L- 谷氨酰胺和 0.1mmol/L 2- 巯基乙醇的 IMDM 培养基 ;

酶法收获所述小的圆的亮相细胞,其中所述酶法收获包括通过用蛋白酶消化分离所述松散粘附的圆的亮相细胞,

在包被聚 -D- 赖氨酸的第一表面上以 $2\text{-}5\times10^{4}$ 个细胞 /ml 培养所述收获的小的圆的亮相细胞 4-28 天的时期以产生心球,

其中心球生长培养基包括 65% 1 : 1 的 Dulbecoʹ s Modified Eagle Media 和 Hamʹ s F-12 补充物和 35% 所述完全外植体培养基以及 2% B27、25ng/mL 表皮生长因子、80ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、4ng/mL 心肌营养蛋白 -1 和 1 单位 /mL 凝血酶,

收获所述心球,

在包被纤连蛋白的表面上用所述完全外植体培养基培养所述心球,

在所述第二表面上,使所述培养的心球形成贴壁单层,从而形成 CDC ;和

其中所述 CDC 适合于输送至所述哺乳动物的所述受损或患病心脏并移入所述患病心脏 ;和

其中所述 CDC 的所述移入适合于增加 LVEF 和 LVFA,从而增加心脏功能。

2. 权利要求 1 所述的应用,其中所述 CDC 源自从所述哺乳动物获得的所述受损或患病心脏组织。

3. 权利要求 1 所述的应用,其中所述 CDC 源自从哺乳动物获得的相对于具有受损或患病心脏的所述哺乳动物是异基因的健康心脏组织。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的应用,其中所述药物适合于局部施用。

5. 权利要求 1-3 任一项所述的应用,其中所述哺乳动物经历过急性心脏事件。

6. 权利要求 1-3 任一项所述的应用,其中所述小的圆的亮相细胞或所述心球在不存在外源生长因子 EGF 和 bFGF、心肌营养蛋白 -1 和凝血酶的情况下被培养。

7. 权利要求 1-3 任一项所述的应用,其中所述培养所述消化的心脏组织在不存在外源生长因子 EGF 和 bFGF、心肌营养蛋白 -1 和凝血酶的情况下进行。

8. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述培养所述消化的心脏组织在存在胎牛血清但不存在其它外源生长因子的情况下进行。

9. 权利要求 1 所述的应用，其中所述心球衍生细胞对于具有受损或患病心脏的所述哺乳动物是异基因的。

10. 权利要求 1 所述的应用，其中所述心球衍生细胞对于具有受损或患病心脏的所述哺乳动物是自体的。

11. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述药物适合于全身施用。

12. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述 CDC 适用于移入所述受损或患病心脏并给所述患病心脏提供可扩散产物。

13. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述受损或患病心脏经历过慢性心脏病。

14. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，进一步包括将所述心球解聚成单个细胞或较小的细胞聚集体。

15. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述 CDC 不源于基于干细胞标记物的表达进行识别并选择的心球，而是其中所述心球表达一种或多种干细胞标记物。

16. 权利要求 15 所述的应用，其中所述心球表达的所述干细胞标记物包含 c-kit 和 CD105。

17. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述心脏组织的来源是所述心脏内的界嵴。

18. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述心脏组织的来源是所述心脏内的右室心内膜。

19. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述心脏组织的来源是间隔或心室壁。

20. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述心脏组织的来源是心耳。

21. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中在室温下进行所述酶法消化和 / 或所述酶法收获。

22. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述酶法消化使用 0.05％胰蛋白酶 -EDTA 或 1mg/ml 的 IV 型胶原酶进行。

23. 权利要求 14 所述的应用，其中所述解聚通过研磨进行。

24. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述小的圆的亮相细胞或所述 CDC 用表达构建物转染，所述表达构建物包含蛋白质的编码序列，所述蛋白质选自 :akt、连接蛋白 43、其它连接蛋白、HIF1α、VEGF、FGF、PDGF、IGF、SCF、心肌素 (myocardin)、心肌营养蛋白、L 型钙通道 α 亚单位、L 型钙通道 β 亚单位和 Nkx2.5。

25. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述药物包括每千克所述哺乳动物体重 1×10^{6}到 10×10^{6}CDC。

26. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述哺乳动物是人。

27. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述哺乳动物是狗。

28. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述哺乳动物是马。

29. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述小的圆的亮相细胞或所述 CDC 是人小的圆的亮相细胞或 CDC。

30. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述小的圆的亮相细胞或所述 CDC 是马小的圆的亮相细胞或 CDC。

31. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述小的圆的亮相细胞或所述 CDC 是狗小的圆的亮相细胞或 CDC。

32. 权利要求 1-3 任一项所述的应用，其中所述小的圆的亮相细胞或所述 CDC 是猪小的圆的亮相细胞或 CDC。

33. 通过前述权利要求任一项的分离步骤获得的 CDC 群。

34. 权利要求 22 所述的应用，其中所述酶法消化使用 0.05％胰蛋白酶 -EDTA 进行 5 分钟。

35. 权利要求 22 所述的应用，其中所述酶法消化使用 1mg/ml 的 IV 型胶原酶进行 30 分钟。

36. 权利要求 1 所述的应用，其中所述酶法收获通过使用 0.05％胰蛋白酶 -EDTA 进行。

心脏干细胞

[0001] 本申请要求 2004 年 11 月 8 日提交的临时申请序列第 60/625,695 号的权益，其公开内容被清楚地并入本文。技术领域

[0002] 本发明涉及成体干细胞领域。具体而言，它涉及干细胞的获取、扩增和再引入。发明背景

[0003] 直到最近，主流观点断定心脏是终末分化的器官，不具有再生潜能。该观点受到下面证明的破坏：成体心脏含有一小群内源性定向心脏干细胞 (cardiac stem cell，CSCs)，也称为心脏祖细胞，通过它们的 c-Kit、MDR1 或 Sca-1 的表面表达可以鉴定 (1-5)。CSCs 代表了开发心肌再生疗法的合乎逻辑的细胞来源。它们的早期心脏转录因子的表达、以及在体内和体外向心脏谱系分化的能力赋予相比于其它细胞来源增强的心脏发生前景。CSCs 可以在无选择压力的情况下从人手术样品中分离并在原代培养中扩增 (6)。

[0004] 培养中的心脏手术活组织检查得到球形的多细胞簇，称为“心球 (cardiospheres)”(6)。令人感兴趣的是，此类心球在它们的关键心肌结构蛋白的表达上是心脏样的；当注射入小鼠心脏时，人心球在体内再生出心肌和血管。

[0005] 在本领域中存在对用于获取和扩增人 CSCs 的简单的、非手术方法的持续需求，所述人 CSCs 用于随后的自体 (autologous)、异基因 (allogeneic)、同基因 (syngeneic) 或异种 (xenogeneic) 移植。发明概述

[0006] 根据本发明的一个实施方式，提供了增强哺乳动物的受损或患病心脏的功能的方法。向哺乳动物施用一群细胞。该细胞群从而增强哺乳动物中的心脏功能。通过在表面上将从心球获得的细胞培养为单层的方法，获得该细胞群。

[0007] 本发明的另一个实施方式提供了增强哺乳动物的受损或患病心脏的功能的方法。向哺乳动物施用一群体外扩增的细胞。该细胞具有在悬浮培养中形成心球的能力。然而，当施用时，该细胞并非是心球的形式。

[0008] 本发明的又一个实施方式提供了治疗具有受损或患病心脏的哺乳动物的方法。通过经皮心内膜活检，从哺乳动物的受损或患病心脏或从供体的健康心脏获得心脏组织。处理该心脏组织，以获得并扩增心脏干细胞群。所述心脏干细胞和 / 或它们的子代被引入哺乳动物的受损或患病心脏。

[0009] 根据本发明的另一个实施方式，处理心脏活检样品的方法被提供。在蛋白酶存在的情况下温育该心脏活检样品。收集通过蛋白酶温育从该活检样品释放出的细胞。在表面上将收集的细胞培养成单层，扩增细胞数。

[0010] 本发明的另一方面是治疗具有受损或患病器官的哺乳动物的方法。通过经皮活检，从哺乳动物的受损或患病器官或从供体的健康器官获得组织。处理该组织，以获得并扩增干细胞群。所述干细胞和 / 或它们的子代被引入哺乳动物的受损或患病器官。

[0011] 本发明的进一步的方面是扩增心脏干细胞群的方法。一个或一个以上的心球被解聚成单独的细胞或较小的细胞集合。在表面上将该单独的细胞或较小的细胞集合培养成单层。

[0012] 本发明还提供单层的体外扩增细胞群。所述细胞具有在悬浮培养中形成心球的能

力。然而，所述细胞并非是心球的形式。

[0013] 本发明的又一个方面是通过在表面上将细胞培养成单层的方法而得到的细胞群。所述细胞从解聚的心球获得。

[0014] 本发明的进一步的分支是处理肾活检样品的方法。在蛋白酶存在的情况下温育该肾活检样品。收集通过蛋白酶温育从该活检样品释放出的细胞。在表面上将收集的细胞培养成单层，扩增细胞数。

[0015] 在阅读说明书后，这些实施方式和其它实施方式对于本领域技术人员将是显而易见的，所述实施方式为本领域提供了用于患病和受损器官治疗的方法和群体。附图简述

[0016] 图 1(A)-1(I). 用于心球生长和心球衍生细胞 (Cardiosphere DerivedCell，CDC) 扩增的样品处理。图 1A 示意性描绘了样品处理中包括的步骤。图 1B) 第 1 天的人心内膜活检片段。图 1C) 平板接种 3 天后的人外植体 (explant)。图 1D) 在平板接种 13 天后人外植体的边缘，显示出基质样和亮相 (phase-bright) 细胞。图 1E) 使用心球形成细胞 (cardiosphere-forming cells) 进行的亚群选择的结果。c-Kit$^+$细胞为 90.0±4.7% CD105$^+$，和 c-Kit$^-$细胞为 94.0±0.8% CD105$^+$(n = 3)。图 1F) 在第 25 天，即收集心球形成细胞后 12 天的人心球。图 1G) 在第 2 代期间的人 CDCs，铺板于纤连蛋白上，用于扩增。图 1H) 描绘了在 4 个月的过程中来自未移植患者的 11 个样品的累积生长。图 1I) 示出了来自移植患者的 59 个样品的生长。第 0 天相应于采集样品的日期并且在该日的细胞数以对数刻度绘制成 1，因为还没有从该样品获得心球形成细胞。

[0017] 图 2A-2C. 心球和 CDC 表型。图 2A) 通过其中心表达 c-Kit 和在其外周表达 CD105 的心球。图 2B) 主要在其外周表达心脏 MHC 和 TnI 的心球。图 2C) 一个代表性样品表现出的在第 2 代的 CDCs 中的 c-Kit 和 CD105 表达水平 (n = 3 和 n = 2)。

[0018] 图 3A-3E. 移入和再生。图 3A 和 3B) 描绘了在注射 20 天后，在对 H&E 和 β-半乳糖苷酶双染色的心脏切片中，CDCs(图 3A) 或成纤维细胞 (图 3B) 的移入。可见 CDCs 的浸润，为明显的带，同时在一些切片中很少的一些成纤维细胞组可以被检测到。图 3C 和图 3D) 对于代表性的 CDC 注射小鼠 (图 3C) 和成纤维细胞注射小鼠 (图 3D)，用于计算心肌再生的 Masson 三色染色被示出。图 3E) 在 CDC 注射组 (n = 8)、PBS 注射组 (n = 4) 和成纤维细胞注射组 (n = 4) 中，在梗塞区内发现的存活心肌的百分比被示出。*p < 0.01。

[0019] 图 4A-4F. 功能改善。图 4A 和图 4B) 在 20 天后，在 CDC 注射小鼠中进行的超声心动图的长轴视图。图 4A 示出舒张末期。图 4B 示出收缩末期。黄线画出用于计算 LVEF 和 LVFA 的左心室区周围的轮廓。图 4C 和图 4D) 在成纤维细胞注射小鼠中的比较视图。图 4E) 在 20 天后 3 个实验组的左心室射血分数 (CDC n = 8，PBS n = 7，成纤维细胞 n = 4；*p < 0.01)。LVEF = 100x(LV 容积$_{舒张}$-LV 容积$_{收缩}$)/LV 容积$_{舒张}$，其中从假设为长椭球体的长轴视图计算 LV 容积。图 4F) 在 20 天后 3 个实验组的左心室面积分数百分数。*p < 0.01。LVFA = 100x(LV 面积$_{舒张}$-LV 面积$_{收缩}$)/LV 面积$_{舒张}$。

[0020] 图 5A-5C. 定量再生。图 5A) 示出代表性 CDC 注射小鼠的 Masson 三色染色。在图 5B 和图 5C 中以黄色描绘总梗塞区的轮廓。图 5B) 在图像处理后以红色示出纤维化区域。图 5C) 在图像处理后以红色示出存活心肌区域。每只动物分析六个切片并取平均值。

[0021] 图 6A-6F. 移入时程。图 6A) 在 H&E 染色切片中，示出在第 0 天注射细胞的团块。图 6B) 描绘了注射后 8 天 CDCs 的移入。图 6C 和图 6D) 注射后 20 天 CDCs 的移入。图 6E 和

图 6F) 是图 6C 和图 6D 的相应更高放大率视图，证明 lac-Z 阳性 CDCs 和活心肌的共定位。

发明详述

[0022] 本发明人已经开发出扩增器官的驻留干细胞(resident stem cell)群的方法，使得仅需要少量的初始样品。此类少量初始样品可以通过简单的经皮进入相对非侵入性地获得。此类步骤如此简单，以至于它们可以在门诊病人的基础上进行，而不需要大外科和全身麻醉。

[0023] 驻留干细胞是在特定器官发现的那些。尽管申请者不希望束缚于任何具体理论，据认为，在特定器官中发现的干细胞并非多能的，而是定向于特定的分化支。因此，在心脏中，期望发现心脏干细胞，以及在肾中，期望发现肾干细胞。但是，可能的是，通过本发明扩增和分离的干细胞中的一些能够发育成器官的细胞，所述器官不同于从其中获得干细胞的器官。

[0024] 心球是细胞的自缔合聚集体，已经显示，所述细胞表现出心肌细胞的一些性质。因此，心球已经显示出在体外“搏动”。它们是可兴奋的并同步收缩。已经从心脏活检获得形成心球的细胞。使用本领域中用于分离细胞团或聚集体的标准方法，包括但不限于研磨、搅拌、摇动、捣碎，可以解聚所述心球。优选地，心球被解聚成单个细胞，但至少将它们解聚成较小的细胞聚集体。在解聚后，细胞可以在固体表面上生长，例如培养皿、容器壁或底部、微量滴定皿、珠、瓶、滚瓶等。表面可以是例如玻璃或塑料。细胞可以粘附到固体表面的材料或者固体表面可以用增加粘附的物质包被。此类物质是本领域中熟知的，并且非限制性地包括纤连蛋白、水凝胶、聚合物、层粘连蛋白、血清、胶原、明胶和聚 L- 赖氨酸。在表面上生长将优选是单层生长。

[0025] 在解聚细胞生长后，它们可以直接被施用于需要它们的哺乳动物，或者它们可以在有利于心球形成的条件下生长。表面生长和悬浮生长（心球）之间的重复循环导致期望细胞的快速和指数扩增。也可以省略心球阶段，并重复扩增在表面上生长的细胞，其中在每次传代不形成心球。

[0026] 本发明的细胞培养——或者在细胞表面上或在心球中——可以在不存在外源生长因子的情况下进行。尽管可以使用胎牛血清，但已经发现其它因子是不必要的。例如，本发明的细胞在不存在添加的 EGF、bFGF、心肌营养蛋白 -1 和凝血酶的情况下被容易地培养。

[0027] 可以是细胞的供体或受者的哺乳动物并未受限制。尽管人可以提供细胞并可以是受者，但通常其它哺乳动物将是有用的。例如，猪细胞可以移植入人。此类交叉物种移植被称为异种移植。移植还可以是异基因的、同基因的或自体的，它们都在一个物种内。用在本发明中的合适的哺乳动物包括宠物，例如狗、猫、兔；农用动物，例如马、牛、绵羊、山羊、猪；以及人。

[0028] 可以通过本领域中已知的任何方法将细胞施用于哺乳动物。心脏细胞可以被全身性或局部输送至心脏。细胞通常不以心球的形式。然而，它们在合适的条件下通常有形成心球的能力。局部施用可以通过导管或在手术期间进行。全身施用可以通过静脉内注射或动脉内注射、灌注或输注。当本发明的细胞群被全身性施用时，它们迁移至合适的器官，例如，如果细胞是来源于驻留心脏干细胞的话，迁移至心脏。在施用细胞至哺乳动物后观察到的有益效果的原因可以在于细胞本身，或者在于细胞表达的产物。例如，可能是细胞移入产生有利的结果。还可能是细胞因子或趋化因子或其它可扩散因子刺激驻留细胞更好地生长、

再生或执行功能。

[0029] 心脏干细胞的有效剂量通常在 $1x10^6$和 $100x10^6$之间，优选在 $10x10^6$和 $50x10^6$之间。取决于心脏受损区的大小，可以使用或多或少的细胞。较大的受损区需要较大的细胞剂量，而小的受损区要求较小的细胞剂量。基于受者体重，有效剂量可以在每千克体重 1 和 $10x10^6$之间，优选每千克体重在 $1x10^6$和 $5x10^6$个细胞之间。患者年纪、一般状况、以及免疫状态可以用作确定施用剂量的因素。

[0030] 根据本发明可以治疗的疾病包括急性和慢性心脏病。例如，心脏可以经受过缺血性事件，或者可以是慢性缺血或充血性心脏病的主体。患者可以是心脏移植的候选者或心脏移植的受者。此外，由于创伤导致受损的心脏，例如在手术期间诱导的损伤或其它意外损伤，可以用根据本发明的细胞治疗。

[0031] 由于实现了细胞群的优异扩增，不需要大的初始细胞样品。因此，并非从手术期间获得的常规活检样品开始，而是可以使用较小的样品，这消除了对侵入性手术的需要。此类样品可以使用经皮活体钳 (bioptome) 获得。活体钳可以被用于进入来自任何器官来源的组织样品，包括心脏、肾脏、肝、脾和胰腺。在心脏内使用活体钳可以进入的特别合适的位置包括界嵴、右室心内膜、间隔或心室壁、和心耳。已经发现这些位置提供丰富的干细胞或祖细胞。利用比用于为诊断目的而进入右室心内膜的标准活体钳更柔软的活体钳，促进进入此类位置。优选地，活体钳也可以通过外部控制器被操纵。

[0032] 引起能够使用小活检样品作为原材料的增强之一是收集以前被忽视或丢弃的细胞群。通过用蛋白酶处理活检样品并收获或收集从该活检样品释放出的细胞，形成所述细胞群。这些释放的细胞的使用增加了细胞群扩增的速率。可以使用的蛋白酶的例子包括胶原酶、基质金属蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。该技术可以被应用于其驻留干细胞被期望的任何器官，包括，例如心脏、肾脏、肺脏、脾脏、胰腺和肝脏。

[0033] 可以遗传修饰根据本发明收集、扩增和 / 或施用的细胞群。它们可以用例如蛋白的编码序列转染。所述蛋白可以是对于患病器官例如心脏有益的。可以使用的编码序列的例子非限制性地包括 akt、连接蛋白 43(connexin 43)、其它连接蛋白、HIF1α、VEGF、FGF、PDGF、IGF、SCF、心肌素 (myocardin)、心肌营养蛋白、L 型钙通道 α 亚单位、L 型钙通道 β 亚单位和 Nkx2.5。在所述细胞被施用于哺乳动物之前，可以常规地遗传修饰所述细胞。遗传修饰细胞以表达已知蛋白的技术在本领域中是熟知的。

[0034] 从活检样品容易收获并容易扩增心球衍生细胞 (CDCs)，并且我们已经示出，它们在急性 MI 模型中再生心肌并改善功能。显著地，通过我们的方法，70 位患者中的 69 位具有产生细胞的样品，使得自体细胞心肌成形术的目标可以达到。早期临床研究将理所当然地集中于自体细胞，其是理想的遗传匹配，从而比异基因细胞存在更少的安全顾虑。使用自体细胞的一个实践中的限制源于从组织收获到细胞移植的延迟。为避免延迟，可以建立具有限定免疫特征的患者的心脏干细胞 (cardiac stem cells(CSCs)) 细胞库。这些应该允许供体细胞和受者的免疫抗原匹配，用于异基因移植。匹配抗原在移植领域中是已知的。

[0035] 在以前的临床研究中，骨髓源干细胞在急性 MI 2 周内被注射入患者，导致 LVEF 的显著改善，其中冠状动脉内输注 $5-80x10^6$个细胞 (15-17)，这使得我们假设，好几百万的 CDCs 可以构成有效的治疗剂量。通过单个活体钳样品，仅在 2 次传代后，就可以得到数百万的 CDCs ；如果特别为了治疗的目的进行活检，那么原材料的量可以容易地增加 10 倍或以

上，进一步改进总体细胞产量。具有慢性心力衰竭的患者也是 CDC 治疗的合适候选者。

[0036] 最小化扩增的传代数将使 CDCs 癌性转化的风险最小化，该问题已经在基质干细胞中观察到，但仅在＞ 6 次传代后 (18)。细胞移植另一个突出的风险在于致心律失常的潜能 (19-21)。关于心脏干细胞，尚未报道过心律失常。

[0037] 我们已经使用了未经抗原选择的来自人活检的 CDCs。我们有意包括从初始心脏样品释放出并继续对心球形成起作用的所有细胞。因此，我们的细胞根本上不同于通过一种或另一种公认干细胞标记物的抗原淘选而分离的心脏“干细胞”(2,3)。然而，CDCs 包括相当大的表现出干细胞标记物的细胞群，并且观察到的体内再生能力进一步支持了如下观点 :CDCs 包括许多驻留干细胞。我们确实还不知道 CDCs 的亚级分 (subfraction) 是否足以产生该有益效果 ;事实上，我们已经避免了亚分级化 (subfractionation)，因为它将可能延迟移植并引起由引入人工选择步骤导致的常规顾虑。

[0038] 成人心脏干细胞已经显示出通过增殖和心肌再生有限程度地应答于心脏肥大状态 (4) 并且通过动员至损伤边沿区和随后的再生有限程度地应答于急性缺血，但在慢性缺血情况下经常最终屈服于凋亡 (5)。使用动物模型，增强 CSCs 的体内存活、动员、增殖和随后的分化的鉴定方法正在取得显著的进步 (22,23)。我们的用于随后自体移植的驻留干细胞的体外扩增的方法可以赋予这些细胞群——驻留和被扩增的细胞群——介导心肌再生至适宜程度的组合能力。如果是这样，则心脏干细胞治疗可以很好改变我们的治疗心脏功能障碍疾病的基本手段。

[0039] 上面的公开一般性地描述了本发明。所有本文中公开的参考文献被明确并入作为参考。参考下面的具体实施例可以获得更完全的理解，所述实施例仅为了阐述的目的被提供于本文中，并且不意图限制本发明的范围。实施例 1 材料和方法 :样品处理和心球生长 :

[0040] 按照规定的步骤，并在患者同意下，从经受临床指示 (clinically-indicated) 的经皮心内膜活检的患者获得人活检样品，并如 (6) 所述稍作修改加以处理。样品由由完整或部分活体钳“咬合 (bites)”组成，在高钾心脏停搏液中储存在冰上并在 2 小时内处理 (图 1A，步骤 1)。将样品切成片段，并从片段除去粗大结缔组织。然后，洗涤该片段，酶法部分消化，并丢弃单个细胞。剩余的组织片段在包被纤连蛋白的培养皿上作为“外植体”培养 (图 1A，步骤 2)。几天后，基质样细胞层从贴壁外植块产生，小的、圆的、亮相细胞在该外植块上迁移。一旦汇合，通过温和酶消化收获所述外植块周围的松散粘附的细胞 (图 1A，步骤 3)。这些细胞在设计用于心球最优生长的培养基中以 $2\text{-}3x10^4$ 个细胞 /mL 接种于聚 D- 赖氨酸包被培养皿上 (图 1A，步骤 4)。然后，分离的心球种板于纤连蛋白包被瓶中并被扩增成贴壁单细胞层 (图 1A，步骤 5)，其可以随后通过胰蛋白酶化传代。在相差显微镜下使用血球计数器对单个细胞作为心球形成细胞进行计数以及在 CDC 传代期间进行计数，以追踪每一样品的细胞生长。从相同的样品分离心球形成细胞又被重复高达 3 次。亚群选择和流式细胞术分析 :

[0041] 为表征形成心球的细胞的抗原特征，通过用 APC- 偶联的抗 c-Kit 单克隆抗体的磁活化细胞分离，随后通过用微珠偶联的抗 -APC 标记，之后通过使用 OctoMACS 分离，亚选择在第一次收获 (图 1A,3) 期间获得的细胞。然后，用直接偶联至微珠的二抗亚选择 $CD105^+$ 群。

[0042] CDCs 以贴壁单层传代两次，然后用于流式细胞术实验。使用 c-Kit-APC、CD105-PE

和相似偶联的同种型匹配对照单克隆抗体。通过 7-AAD 荧光和前向散射建立门。使用含 CellQuest 软件的 FACScalibur 细胞荧光光度计收集数据。腺病毒构建和细胞转导：

[0043] 将大肠杆菌 β-半乳糖苷酶 (lacZ) 基因克隆进腺病毒穿梭载体 pAd-Lox，以在 Cre-4 293HEK 细胞中通过 Cre-Lox 重组产生 pAd-Lox-LacZ，如所述 (9)。CDCs 以贴壁单细胞层被传代 2 次并用病毒转导。使用 MOI 20 达 12 小时，获得 90％的转导效率。心肌梗塞和细胞注射：

[0044] 腺病毒转导的 CDCs 被注射入 10-16 周龄的成年雄性 SCID- 米色鼠。通过扎结冠状动脉左前降支中部，形成心肌梗塞，如所述 (10)，以及在直接可视化下在 2 个梗塞周围位点注射细胞或载体 (vehicle)。注射存在于 10μl 体积的 PBS 中的 CDCs(10^5)(每一位点 5μl)，以 10^5个原代人皮肤成纤维细胞或 10μl PBS 作为对照。所有小鼠在手术前（基线）接受超生心动图检查，在手术后 20 天再次接受该检查。使用 V1.3.8 软件，通过从梗塞区采集的 2D 长轴视图，计算射血分数 (ejection fraction(EFs))。然后，在第 0、8 或 20 天对小鼠实施安乐死，并且制备切除的心脏用于组织学。免疫染色、免疫组化和显微术：

[0045] 当心球大小已达到 100-1000 个细胞时，收集心球用于免疫染色。抗 c-Kit、CD105、心脏肌球蛋白重链 (cardiac myosin heavy chain，cMHC) 和心脏肌钙蛋白 I(cardiac troponin I，cTnI) 的一抗被用于免疫染色。使用 Alexa 荧光染料偶联的二抗。如以前所述 (6) 进行免疫染色。在装配有氪 / 氩激光的 Eclipse TE2000-U 上，使用 UltraVIEW 软件，进行共聚焦荧光成像。

[0046] 切除小鼠心脏，包埋入 OCT 化合物中、冷冻、并切片成 5μm 的切片。用苏木精 - 伊红和 β-半乳糖苷酶试剂或 Masson 三色对组织切片进行染色 (11)。通过手动追踪梗塞边界，然后使用 ImageJ 软件来计算全部梗塞区内的活心肌百分数，从 Masson 三色染色切片 (12,13) 计算梗塞区内的组织存活能力，如图 S1 所阐述。统计：

[0047] 所有的结果都以平均值 ±SEM 表示。任何两组之间的差异显著性通过 Student's t 检验（学生 t 检验）进行确定。使用 GB-Stat 软件，采用单因素 ANOVA 比较多个组，以及如果得到显著的 F 值，用 Bonferroni-Dunn 法比较组对 (group pairs)。认为值 $P < 0.05$ 具有显著性。

[0048] 采用广义估计方程 (generalized estimation equation，GEE) 法 (14)，以鉴定与高细胞产量独立相关的参数。来自捐献多个样品的患者的数据以重复测量处理。这些在单变量模型中是显著的 ($P \leq 0.1$) 参数被包括在最终的多变量模型中。使用 SAS 软件，进行该分析。最终值 $p < 0.05$ 被认为是显著的。所有报道的 p- 值都是双侧的。表 1 产品和制造商

培养基配方：		
移植块和CDC培养基：IMDM，20%FBS，1%青霉素-链霉素，1%L-谷氨酰胺，0.1mM2-巯基乙醇		
心球培养基：在最终工作浓度下35%IMDM和65%DMEM/F-12 Mix，3.5% FBS，1%青霉素-链霉素，1%L-谷氨酰胺，0.1mM2-巯基乙醇，凝血酶，B-27，bFGF，EGF，和心肌营养蛋白-1		
产品：	*工作浓度：*	*制造商：*
IMDM		Invitrogen
DMEM/F-12 Mix		Invitrogen
凝血酶	1单位/mL	Sigma
B-27	1:50	Invitrogen
bFGF	80 ng/mL	PeproTech
EGF	25 ng/mL	PeproTech
心肌营养蛋白-1	4 ng/mL	PeproTech
纤连蛋白	25 μg/mL	BD Biosciences
聚D-赖氨酸	20 μg/mL	BD Biosciences
c-Kit-APC	1:10	BD Pharmingen
CD105 MicroBeads	1:5	Miltenyi Biotec
Anti-APC MultiSort	1:4	Miltenyi Biotec
CD105-PE	1:10	R&D Systems
7-AAD	20 μg/mL	Calbiochem
SCID- 米色鼠		Harlan

皮肤成纤维细胞		ATCC
c-Kit pAb	1:100	Abcam
CD105 mAb	1:50	R&D Systems
cMHC pAb	1:100	(6) Rome, Italy
cTnI mAb	1:200	Chemicon
Alexa 488, 568	1:400	Invitrogen
OCT		VWR Scientific

设备和软件：	*制造商：*
OctoMACS	Miltenyi Biotec
FACScalibur	BD Biosciences
Vevo 660 Echo	VisualSonics
Eclipse TE2000-U	Nikon
CellQuest	BD Biosciences
V1.3.8 软件	VisualSonics
UltraVIEW 软件	Perkin Elmer
ImageJ 软件	NIH
GB-Stat v10	Dynamic Microsystems Inc.
SAS 软件 v9.1	SAS Institute Inc.

实施例 2 样品处理和心球形成亚群：

[0049] 图 1B 示出了在其被获得当天在切碎和部分酶消化后典型的外植块，以及第 3 天（图 1C）和第 13 天（图 1D），紧在第一次收获之前的外植体。在获得样品后 8 天或 8 天以上时最初进行心球形成细胞收获（图 1A，步骤 3），以及其后以 4-12 天间隔进行收获。面板 E 概述了使用从 3 个不同患者样品收获的细胞进行亚群选择实验的结果。大部分产生心球的细胞是 $CD105^{+}$，$c\text{-}Kit^{+}$的细胞和 $c\text{-}Kit^{-}$的细胞。在图 1F 中示出了在收获后 12 天的典型心球。在步骤 3 后 4-28 天将漂浮的心球铺板扩增（图 1A，步骤 5），以及其后以 2-7 天间隔传代。图 1G 示出了在第 2 代扩增期间种板于纤连蛋白上的 CDCs，此时那些细胞被收获用于注射。实施例 3 患者样品和心球生长：

[0050] 获得 83 份患者样品（21.0±1.9mg）进行分析。所述样品中的 72 份得自接受心脏移植的患者而 11 份来自等待移植的患者。9 位移植患者捐献多份样品。83 份样品中的 78

份被处理，从未收获的那些样品的 4 份来自重复患者，从 70 位患者中的 69 位得到生长数据。每一样品的累积生长曲线被描绘在图 1 面板 H 和 I 中。来自等待移植的患者的生长曲线（图 1H）类似于来自移植患者的那些（图 1I），这表明这些样品中有很宽范围的生长潜能。表 2 概述了非移植组和移植组的患者参数。包括在该表中列出的所有患者参数的 GEE 分析揭示，在非移植组内没有高细胞产量的独立预测因素。在移植组中，来自具有高 EF 的患者的样品倾向于产生更多的细胞，但效果较弱（R^2＝??，最终估计＝ 0.04，p ＜ 0.05）。

表 2. 患者群体概要

	非移植患者：	移植患者：
患者年龄	47.2±3.7 年	53.6±1.7 年
患者性别	63％男性，37％女性	73％男性，27％女性
患者射血分数	36.9±4.7％	61.9±0.8％
供体年龄		31.4±1.6 年
供体性别		69％男性，31％女性
移植后时间		4.5±0.6 年
供体缺血时间		173.9±7.8 分钟
病理性排斥水平 *		0.5±0.1
免疫抑制水平 **		31％正常，43％低，26％高

*等级 0=0，等级 1A=0.5，等级 1B=1，等级 2=2，等级 3A=3

**针对相对于移植后时间的环孢菌素和 FK506 (±雷帕霉素)而考虑 (24, 25)

实施例 4

心球和心球衍生细胞表型：

[0051] 使用 CDCs 的基本原理在于心球和它们的细胞子代的独特生物学。自组织心球建立了有利于干细胞抗原（例如，c-Kit 和 CD105，图 3A）表达的微环境，并且经常表现出成熟心脏特异性抗原（cMHC 和 cTnI，图 3B）标记的表面表型，同时保持内在的“干细胞性(stemness)”。事实上，c-Kit 和 CD105 存在于所有检测的心球中（来自 10 位患者的每一位的 10 个或以上），c-Kit 或位于中心或遍及球表达，而 CD105 通常位于外周或到处表达。在两次传代后 CDCs 保持高水平的 c-Kit 和 CD105 抗原表达（图 3C，分别表示来自 3 位和 2 位不同患者的 CDCs 的表达概况）。实施例 5 心球衍生细胞移植入、再生和功能改善：

[0052] 来自 4 位不同患者的 CDCs 被用于体内实验。为评价移植和细胞迁移，用表达 lac-Z

的 CDCs 注射小鼠并在 3 个时间点的每一个处死小鼠（注射后 0、8 和 20 天）。在第 0 天，CDCs 位于边沿区中的注射位点，但在第 8 天和第 20 天，注射的细胞主要分布在 MI 区，形成 β－半乳糖苷酶阳性组织岛或连续带（图 5）。

[0053] 8 只小鼠被注射 CDCs 并追踪 20 天；11 只小鼠作为对照（4 只注射成纤维细胞，以及 7 只注射 PBS）。图 4A 显示了典型的 β－半乳糖苷酶染色模式，表明注射的人细胞 20 天后在体内的分布。注意到浸润入梗塞区的蓝色细胞的带，其在成纤维细胞注射小鼠（图 4B）或 PBS 注射小鼠中并不明显。如在 Supplement 中所述，Masson 三色染色切片被用于定量再生（图 4，C 和 D）。面板 C，来自 CDC 注射心脏，在蓝色梗塞区内显示出许多明显的红色区；在成纤维细胞注射心脏中此类区明显更少（图 4D）。相比于成纤维注射小鼠（17.7±1.8%，$p < 0.01$）或 PBS 注射小鼠（13.7±0.7%，$p < 0.01$），CDC 注射小鼠在 MI 区中具有更高的活品红阳性组织分数（24.9±1.1%），但总的全部梗塞区类似于两个对照组（60.6±6.4CDC，76.9±7.0 成纤维细胞，75.7±2.7PBS，10^4像素中的单元；p ＝ NS）。CDC 组和每一对照组在 MI 区内活心肌百分数之间的差异——7.2%和 11.2%，表示可归功于 CDCs 的心肌再生的程度。

[0054] 在第 20 天对所有组进行超声心动图；图 5 示出了在舒张末期和收缩末期 CDCs 和成纤维细胞处理组的例子。左心室 EF（LVEF，图 5E）和左心室面积分数（LVFA，图 5F）的合并数据揭示，相比成纤维细胞处理组（24.5±1.8%，$p < 0.01$）或 PBS 处理组（26.4±3.0%，$p < 0.01$），CDC 处理组具有更高的 LVEF（38.8±1.7%），但两组对照组无差别。在基线处，LVEF 之间没有差异。实施例 6 从心脏活检样品分离心脏干细胞的方法：

[0055] 使用多步骤方法，可以从心脏活检样品或其它心脏组织分离多能干细胞（参见图 1A，示意图）。首先，通过经皮心内膜活检或通过心脏的无菌解剖心脏获得心脏组织。一旦获得后，组织样品在高钾心脏停搏液（含有 5%葡萄糖，68.6mmol/L 甘露醇，12.5meq 氯化钾和 12.5meq 碳酸氢钠，其中添加 10 单位 /mL 的肝素）中储存在冰上，直至它们被处理（可达 12 小时以后）。为了处理，使用无菌镊子和剪刀将样品切成 1-2mm^3的块；除去任何粗大结缔组织。然后，用无 Ca^{++}-Mg^{++}- 的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤此部分，并通常在室温下用 0.05%胰蛋白酶 -EDTA 消化 5 分钟。可选地，该组织部分可以在 IV 型胶原酶（1mg/mL）中于 37℃消化 30 分钟。初步实验已经表明，当使用胶原酶时，每 mg 外植块组织的细胞产量更大。

[0056] 一旦消化完成，用“完全外植体培养基（Complete Explant Medium，CEM）”洗涤剩下的组织部分，以停止消化过程，所述培养基为含有 20%热灭活胎牛血清、100 单位 /mL 的青霉素 G、100 μg/mL 链霉素、2mmol/LL- 谷氨酰胺和 0.1mmol/L 2- 巯基乙醇的 IMDM 培养基（Iscove′ s modifiedDulbecco medium）。用无菌镊子和剪刀再次将组织部分切碎，然后转移到纤连蛋白包被（25 μg/mL，大于等于 1 小时）的组织培养板，在那里它们沿着板的表面被均匀地间隔开放置。将最小量的 CEM 加入到该板，其后在 37℃和 5% CO_2下温育 30 分钟，使得组织部分——现称为“外植体”，粘附到该板上（图 1B）。一旦该外植体粘附后，加入足够的 CEM 到该板，覆盖所述外植体，并且将该板放回培养箱。

[0057] 在 8 天或以上的时期后，一层基质样细胞开始从粘附外植体产生，覆盖包围外植体的板表面。在该层上，可见一群小的、圆的、亮相细胞（图 1C、D）。一旦该基质细胞层开始汇合并且存在一大群亮相细胞，收获包围外植体的松散粘附细胞。这首先通过用无 Ca^{++}-Mg^{++}- 的 PBS 洗涤该板，然后用 0.48mmol/L EDTA（1-2 分钟）洗涤并最终用 0.05%胰蛋

白酶 -EDTA 洗涤 (2-3 分钟) 进行。所有洗涤都在室温下在可视控制下进行,以确定松散粘附细胞已经分离的时刻。在每一步后,收集洗涤液体并与其它步骤的洗涤液合并。在最后的洗涤后,再次用 CEM 覆盖外植体并送回培养箱。可以以这种方式以 5-10 天间隔收获每一板的外植体高达 4 次。然后在 1000rpm 下离心合并的洗涤液 6-8 分钟,形成细胞沉淀。当离心结束后,除去上清,重悬沉淀物,并使用血球计数器对细胞进行计数。然后,将细胞以每孔 3-5x10^4个细胞的密度范围 (取决于物种) 种板于聚 D- 赖氨酸包被的 24 孔培养板并放回培养箱。细胞可以在由 65% 1 ∶ 1 的 Dulbeco′ s Modified Eagle Media 和 Ham′ s F-12 补充物和 35% CEM 以及 2% B27、25ng/mL 表皮生长因子、80ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、4ng/mL 心肌营养蛋白 -1 和 1 单位 /mL 凝血酶组成的“心球生长培养基 (Cardiosphere Growth Media, CGM)”中,或在单独的 CEM 中生长。

[0058] 在任一种培养基中,在 4-28 天的时期后,多细胞簇 (“心球”) 将形成,从组织培养物表面分离,并开始悬浮生长 (图 1e、f)。当大小和数量足够时,通过抽出它们的培养基收获这些自由漂浮的心球,并且将得到的悬浮液转移到在 CEM 中的纤连蛋白包被组织培养瓶中 (仍粘附于聚 D- 赖氨酸包被的培养皿上的细胞不再进一步扩增)。在纤连蛋白存在下,心球粘附并形成“心球衍生细胞 (CDCs)”的贴壁单层 (图 1g)。这些细胞将生长至汇合,然后可以被重复传代并扩增成 CDCs,或者返回至聚 D- 赖氨酸包被板,在那里它们再次形成心球。作为 CDCs 生长,在获得心脏组织的 4-6 周时间内数百万的细胞可以被生长,无论组织来源是人 (图 1i)、猪或来自啮齿动物 (数据未示出)。当使用胶原酶时,每块外植体组织收获的细胞的初始增加导致更快产生大量的 CDCs。参考文献所引用的每一参考文献的公开内容被明确并入本文。参考文献 :1. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplantedheart. N Engl J Med 2002 ; 346(1) :5-15. 2. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells aremultipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003 ;114(6) : 763-76. 3. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells fromadult myocardium :homing, differentiation, and fusion after infarction. ProcNatl Acad Sci USA 2003 ;100(21) :12313-8. 4. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, et al. Intense myocyte formation fromcardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA2003 ;100(18) :10440-5. 5. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration byactivation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. ProcNatl Acad Sci USA 2005 ;102(24) :8692-7. 6. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adultcardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res2004 ;95(9) :911-21. 7. Mason JW. Techniques for right and left ventricular endomyocardialbiopsy. Am J Cardiol 1978 ; 41(5) :887-92. 8. Anastasiou-Nana MI, O ′ Connell JB, Nanas JN, Sorensen SG, AndersonJL. Relative efficiency and risk of endomyocardial biopsy :comparisons inheart transplant and nontransplant patients. Cathet Cardiovasc Diagn1989 ; 18(1) :7-11. 9. Hoppe UC, Marban E, Johns DC. Distinct gene-specific mechanisms ofarrhythmia revealed by cardiac gene transfer of two long QT disease genes, HERG and KCNE1. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ;98(9) :5335-40. 10. Stull LB,

Leppo MK, Szweda L, Gao WD, Marban E. Chronictreatment with allopurinol boosts survival and cardiac contractility inmurine postischemic cardiomyopathy. Circ Res 2004 ;95(10) :1005-11. 11. Biological Stain Commission., Conn HJ, Clark G. Staining proceduresused by the Biological Stain Commission. 3d ed. Baltimore,: Published forthe Biological Stain Commission by Williams & Wilkins ;1973. 12. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size andventricular function in rats. Circ Res 1979 ;44(4) :503-12. 13. Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, et al. Platelet-derived growth factor-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model :feasibility ofrestoring impaired angiogenic capacity in the aging heart. Circulation2002 ;105(5) :608-13. 14. Zeger SL, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete andcontinuous outcomes. Biometrics 1986 ;42(1) :121-30. 15. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation ofprogenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardialinfarction : final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. J Am CollCardiol 2004 ;44(8) : 1690-9. 16. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardiumby autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantationin humans. Circulation 2002 ;106(15) :1913-8. 17. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrowcells after myocardial infarction. Circ Res 2004 ;95(7) :742-8. 18. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adultstem cell transformation. Cancer Res 2005 ;65(8) :3035-9. 19. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletalmyoblast transplantation for severe postinfarction left ventriculardysfunction. J Am Coll Cardiol 2003 ;41(7) :1078-83. 20. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, et al. Autologous skeletal myoblasttransplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury :phaseI clinical study with 12 months of follow-up. Am Heart J2004 ;148(3) :531-7. 21. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, et al. Catheter-basedintramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primarytreatment of ischemic heart failure :clinical experience with six-monthfollow-up. J Am Coll Cardiol 2003 ;42(12) :2063-9. 22. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardi ac Stem Cells PossessGrowth Factor-Receptor Systems That After Activation Regenerate theInfarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-TermSurvival. Circ Res 2005. 23. Limana F, Germani A, Zacheo A, et al. Exogenous High-MobilityGroup Box 1 Protein Induces Myocardial Regeneration After Infarction viaEnhanced Cardiac C-Kit+ Cell Proliferation and Differentiation. Circ Res2005. 24. Taylor DO, Barr ML, Radovancevic B, et al. A randomized, multicenter comparison of tacrolimus and cyclosporine immunosuppressiveregimens in cardiac transplantation :decreased hyperlipidemia andhypertension with tacrolimus. J Heart Lung Transplant 1999 ;18(4) :336-45. 25. Kobashigawa J, Miller L, Renlund D,

et al.A randomizedactive-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplantrecipients.Mycophenolate Mofetil Invenstigators.Transplantation 1998;66(4):507-15.

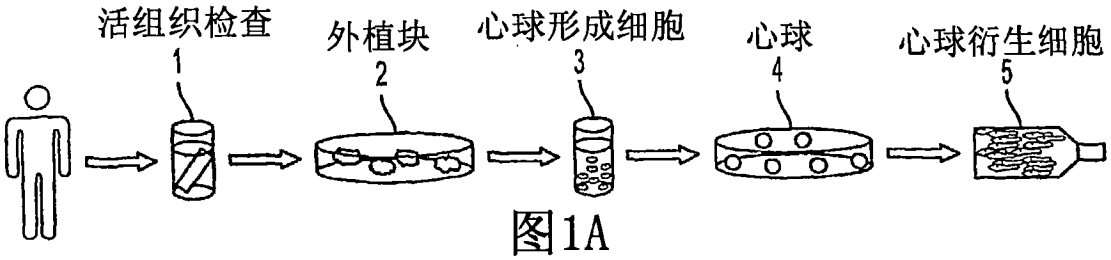


图1A

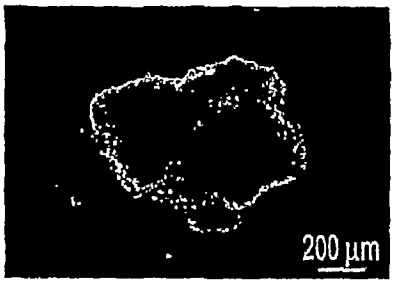


图 1B

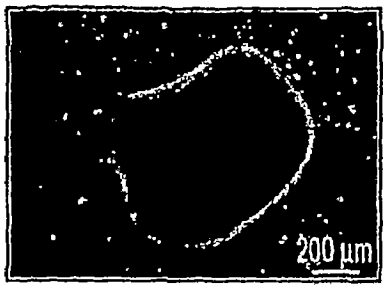


图 1C

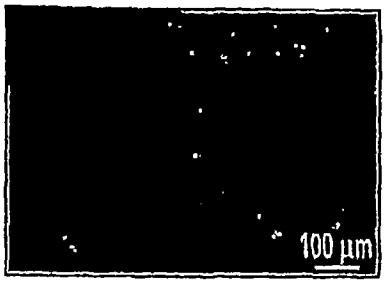


图 1D

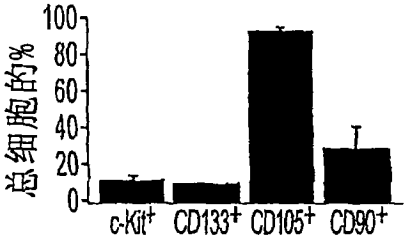


图 1E

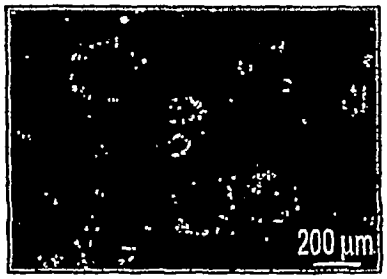


图 1F

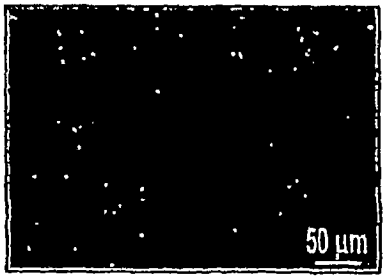


图 1G

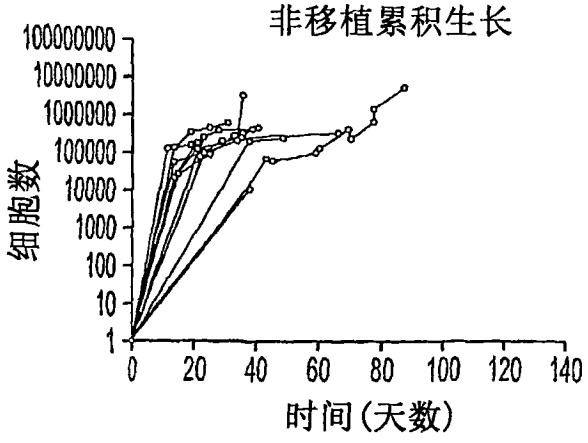


图 1H

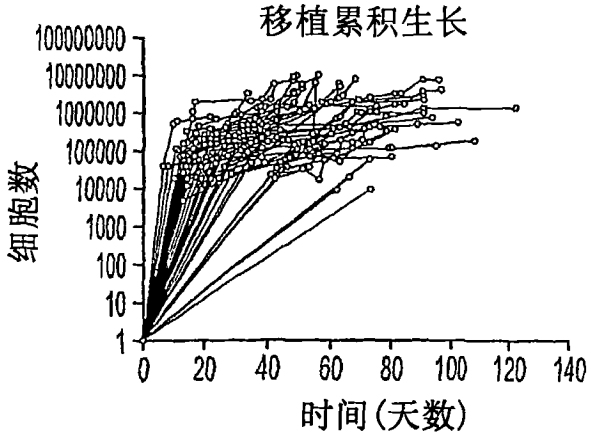


图 1I

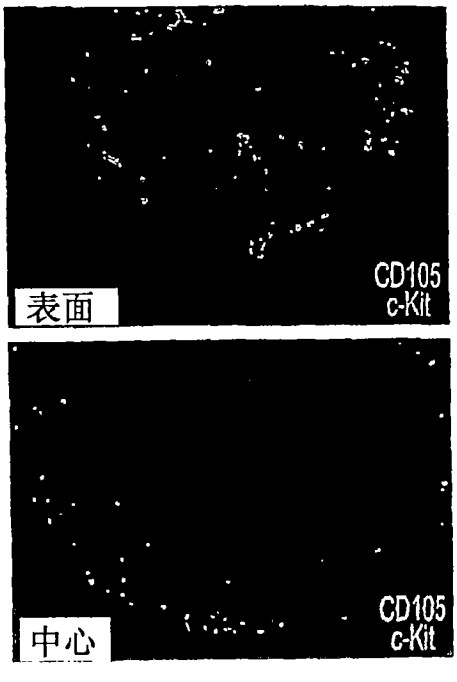


图 2A

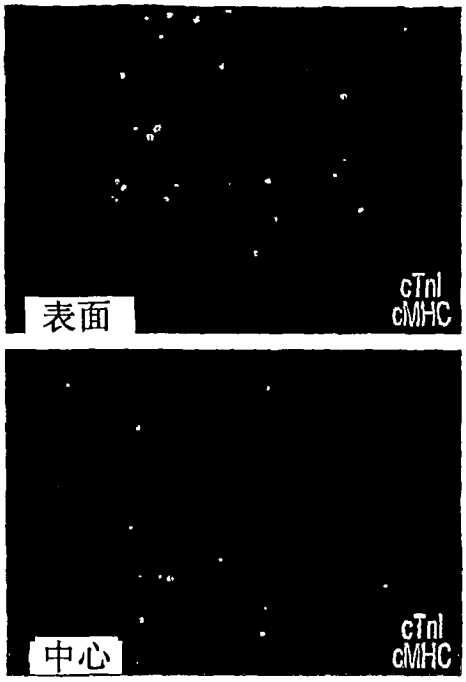


图 2B

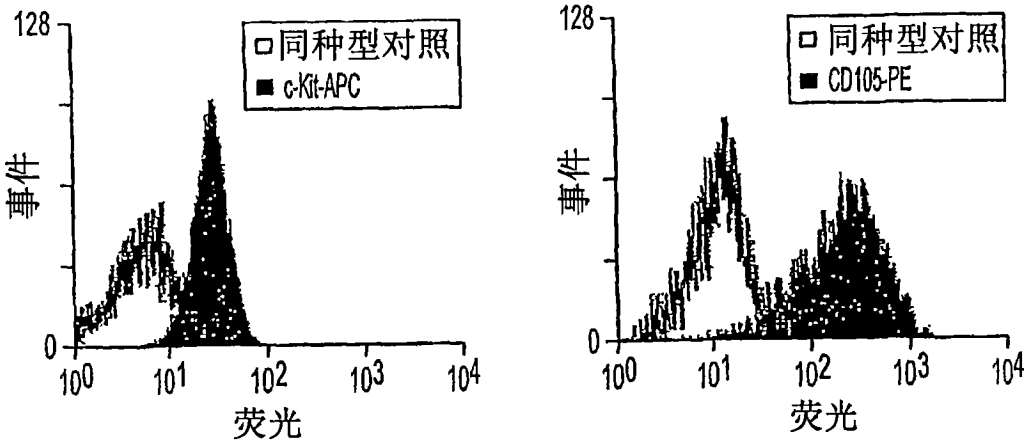


图 2C

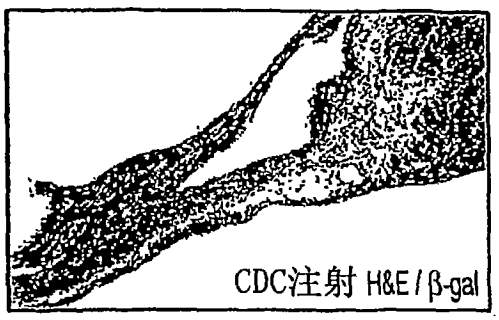


图 3A

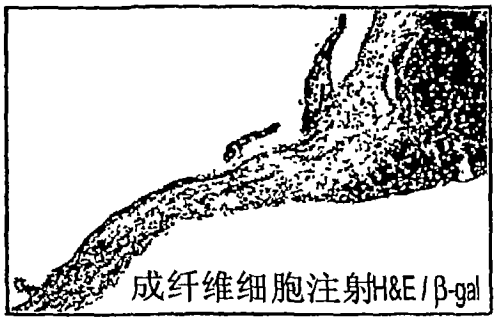


图 3B

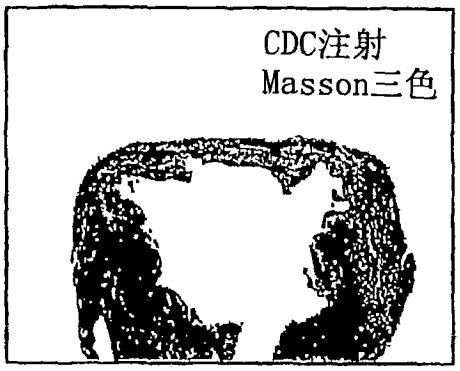


图 3C



图 3D

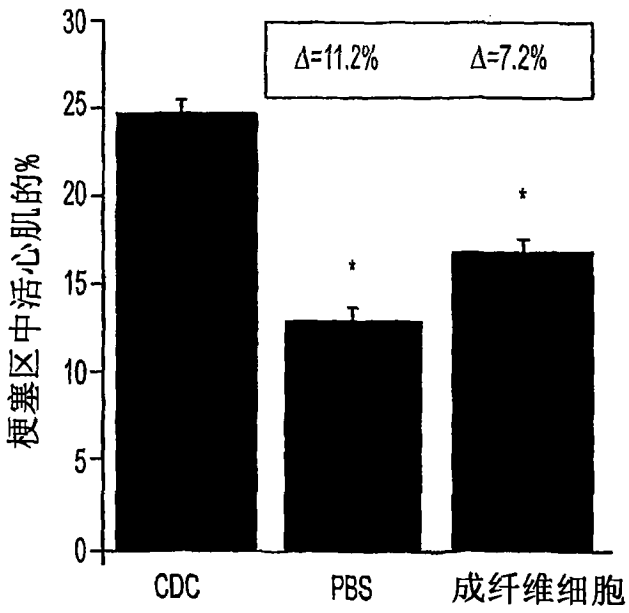


图 3E

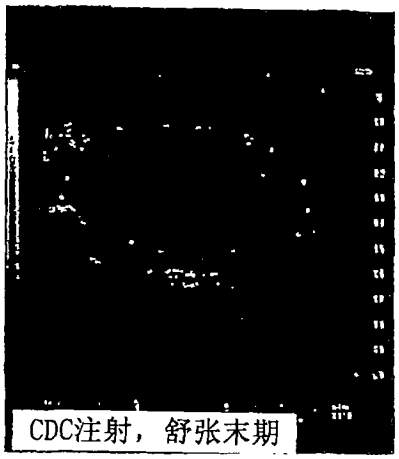


图 4A

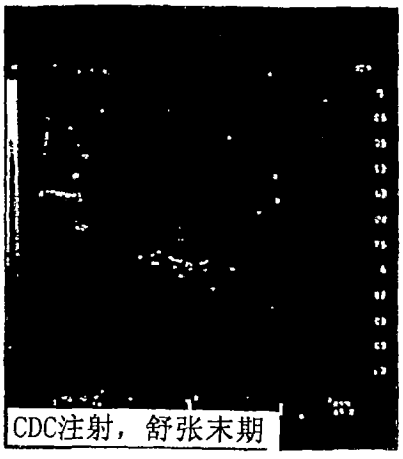


图 4B

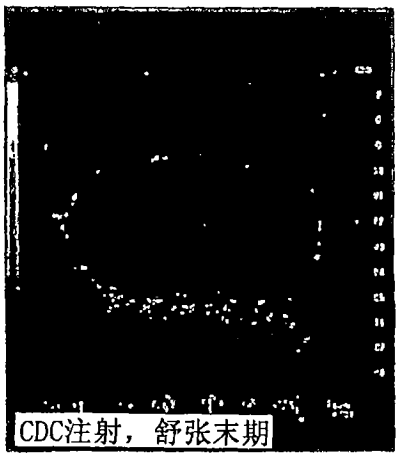


图 4C

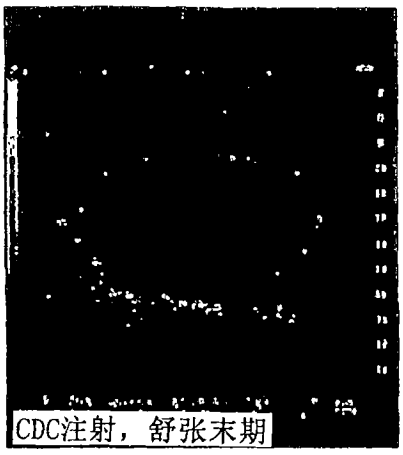


图 4D

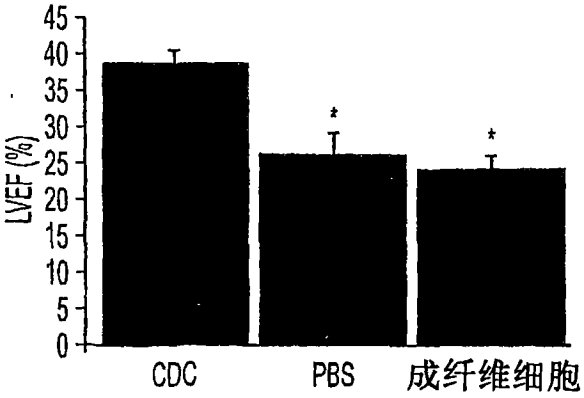


图 4E

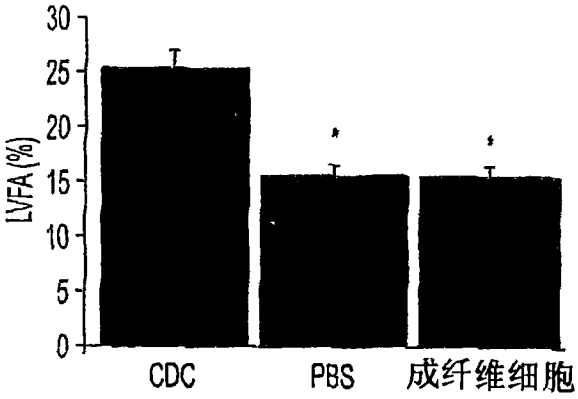


图 4F



图 5A



图 5B



图 5C

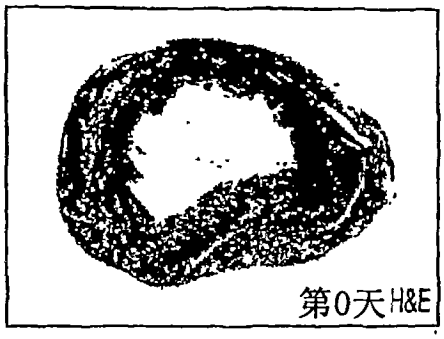


图 6A

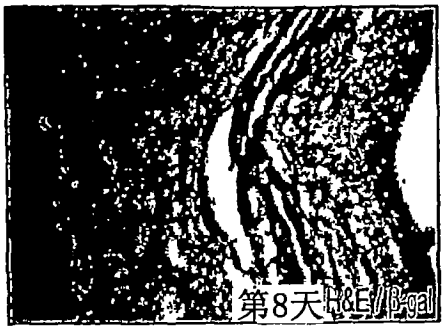


图 6B

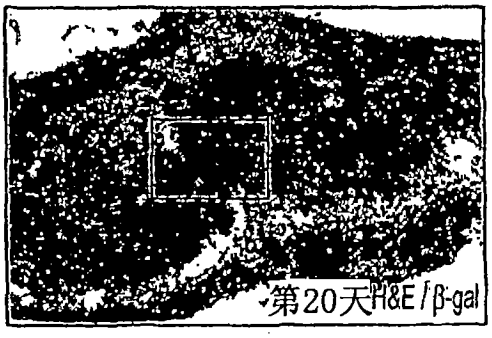


图 6C

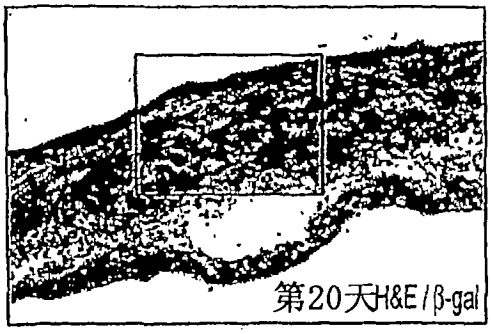


图 6D

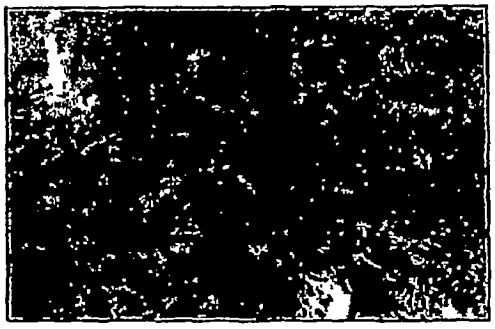


图 6E



图 6F