

間質幹細胞共同培養法對於心肌細胞缺血缺氧再灌流損傷之影響作用評估

*^{1,2} 鄭伯智、¹ 葉婷婷、¹ 許孟博

¹ 南臺科技大學生物科技系、² 奇美醫療財團法人奇美醫院心臟血管外科

cbcheng@stust.edu.tw

摘要

隨著國人飲食精緻化及生活壓力增加，心血管疾病好發年齡也逐漸下降。目前，有許多治療方法被發展用來治療缺血性心臟血管問題，其中包含著有臨床藥物的使用(血管擴張劑, β 交感神經阻斷劑及鈣離子阻斷劑)與介入性心導管技術(冠狀動脈繞道手術及狹窄冠狀動脈擴張術)的突破，已有改善病人因缺血性心臟病的損傷，但是缺血性心臟病卻是主要的致命原因，病人若未能及時接受臨床的治療及恢復循環，可能再出現嚴重的心臟問題，然而隨著醫療日益進步，再生醫學利用幹細胞分化增生等特性替未來的醫療開啟新世界的大門。幹細胞的治療可以修復壞死心肌組織與促進新生血管循環方式，有效地改善心臟收縮性，可說是極具有潛力的治療方式。本實驗目的在評估利用共同培養法 (Co-culture transwell system) 給予間質幹細胞(Mesenchymal stem cells)治療 H9C2 心肌細胞於氧氣及葡萄糖剝奪(oxygen and glucose deprivation, OGD)模擬缺血缺氧再灌流(ischemia-reperfusion, I/R)模式之保護作用，我們發現間質幹細胞可以有效抑制心肌細胞在缺氧缺血環境中死亡，提高存活率並抑制減緩細胞凋亡(apoptosis)途徑如 DNA 片段化及 Sub-G1 形成而提高存活率。我們利用間質幹細胞共同培養心肌細胞的方式希望可以提供未來臨床上缺血性心臟治療上另一種選擇。

關鍵詞： 心肌損傷、間質幹細胞、共同培養法、細胞凋亡

The Effects of Mesenchymal Stem Cell on Cardiomyocyte Ischemia and Reperfusion Injury in a Co-culture System

^{1,2}Bo-Chi Cheng*, ¹Ting-Ting Yeh, ¹Meng-Bor Hsu

¹Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology

²Department of Cardiovascular Surgery, Chi Mei Medical Center

Abstract

With the refinement of diet and the augmentation of life stress, Taiwanese people are getting cardiovascular diseases at a younger age. There have been breakthroughs in a lot of ischemic cardiovascular disease treatments, including clinical drugs (vasodilator; β blocker; calcium channel blocker) and cardiac catheterization intervention (coronary bypass surgery; coronary angioplasty). Both can improve ischemic heart disease (IHD) injuries. However, IHD is primarily lethal. Without prompt clinical treatment-caused circulation, severe cardiac problems would probably become recurrent. Anyhow, with the progress of health care, regenerative medicine plies stem cell characteristics, such as proliferation and differentiation, opening the door to prospective health care. Stem cell therapy, which is extremely potential in medical treatment, can repair necrotic myocardium and advance new

Received: Aug. 25, 2017; first revised: Oct. 17, 2017; second revised: Jan.10, 2018; accepted: March, 2018.

Corresponding author: B.-C. Cheng, Department of Cardiovascular Surgery, Chi Mei Medical Center, Tainan 71004, Taiwan.

vessel circulation and cardiac contractility. Therefore, the objective of our study is to evaluate and apply protective effects of the mesenchymal stem cells (MSC) co-culture with cardiomyocyte (H9c2) in oxygen-glucose deprivation (OGD) that mimicked ischemia-reperfusion (I/R). The results showed that MSC can effectively inhibit OGD-induced H9C2 death and enhance survival rate. It is expected that the co-culture with H9C2 can be an option for clinical treatment of IHD.

Keywords: Myocardium Injury, Mesenchymal Stem Cell, Co-culture, Apoptosis

壹、前言

心肌梗塞誘發缺血性心臟的損傷據統計為台灣人前三大死因之一，也是排名全世界人口因疾病死亡的第二名[1-2]。心臟性疾病目前可分類為：先天性，風濕性，瓣膜性，原發性及冠狀動脈性心臟病，其中以冠狀動脈性心臟病最為人所知及易被忽略，而在急性心肌梗塞病例中又以冠狀動脈心臟疾病是最嚴重的[3]。近年來由於醫學治療的精進及照護，讓心肌梗塞的死亡率有明顯的降低，但台灣國人的飲食逐漸向西方國家靠攏及現代人的生活作息不正常的影響下，急性心肌梗塞的病例有逐年成長的改變且發生發病的年齡也有越來越低的趨勢[4]。

缺血性心臟病係因冠狀動脈發生硬化導致血管阻塞，無法獲得充分的氧氣及養分引起的細胞死亡，儘快恢復血液供應是迫切且必要的治療。臨床研究發現血流雖開始恢復，然而病情不但未見舒緩，組織破壞反而增加，使得病情更為惡化，這種治療後血流恢復所造成更嚴重的二度傷害即稱為「缺血再灌流傷害」，其詳細機轉尚未釐清[5-6]。

間質幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 又稱為多功能性的間質幹細胞，具有有效的自我更新及分化的能力，在體外的研究中 (*In vitro*) 能夠分化成特定組織或器官，近年來間質幹細胞應用在修補損傷的組織或器官為臨床應用及學術上熱門研究的課題 [7-9]。依據研究顯示在受損的組織或器官中，會產生很多不同的細胞間素(chemokines)及生長因子(growth factor)，而間質幹細胞會受吸引而移動到損傷部位，進而幫助修復與治療[10-11]。另外，它也能藉由與免疫細胞的協同作用調控免疫反應，因此在免疫性疾病的治療上也扮演著重要且關鍵的角色，功能相當全面[12-14]。

間質幹細胞的治療可藉由修復壞死心肌組織與促進血管新生的方式以健全心臟收縮的功能，是一種相當具有潛力及發展的治療方式[15-16]。過去研究顯示幹細胞是一具有潛力且已進入臨床實驗的療法，然而間質幹細胞的治療理論基礎仍需進一步闡明[17-19]。本實驗將利用 H9C2 心肌細胞於缺氧及葡萄糖環境下，建立細胞缺血再灌流之損傷模式[20-22]，評估透過共同培養法給予間質幹細胞對於 H9C2 心肌細胞遭受缺血再灌流之保護作用，及其抑制細胞死亡作用之機轉評估。

貳、材料與方法

一、細胞培養

H9C2 大鼠心肌細胞購自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)。心肌細胞培養於含有 10% 胎牛血清，25 mM Glucose，2 mM L-Glutamine，100 mM Penicillin 及 Streptomycin 的 DMEM (pH 7.4) 培養液中。

MSC 人類骨髓間質幹細胞購自 Lonza (Walkersville, MD, USA) 培養於含有 10% 胎牛血清，25 mM Glucose，2 mM L-Glutamine，100 mM Penicillin 及 Streptomycin 的 DMEM (pH 7.4) 培養液中。

細胞置於 5% CO₂、37°C 培養箱中培養，所有細胞試劑均購自 Gibco (Rockville, MD, USA)。

二、誘發心肌細胞缺血缺氧模式

以氧氣及葡萄糖剝奪 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 模擬缺血缺氧再灌流 (ischemia-reperfusion, I/R) 模式。將心肌細胞以密度 1×10^5 之細胞數種盤於 6 孔培養皿 (Corning, NY, USA) 中，培養置隔夜。利用 ProOxC system (Biospherix, Redfield, NY, USA) 高低氧氣控制系統將混合氣體 (95% N₂ & 5% CO₂) 進行氧氣濃度控制。控制組 (Control) 於培養 24 小時後置換新鮮含有血清及葡萄糖的培養液，培養於 37°C、21% O₂ 培養箱；缺血再灌流組 (I/R) 將細胞培養液置換成 Earle's Balanced Salt Solution (pH 7.4)，培養於 37°C (5% CO₂、0.2% O₂) 培養箱，進行 Ischemia，5 小時後，移除上清液加入含 25 mM glucose 之 DMEM (pH 7.4) 並置於 37°C 培養箱中復氧至 21% O₂，稱為 Reperfusion，培養 24 小時；治療組則是於 OGD 5 小時後，移除上清液加入含 25 mM glucose 之 DMEM (pH 7.4) 後將含有間質幹細胞 (1×10^4 cells) 之 Transwell insert (0.4 μm pore, Corning, NY, USA) 置入共同培養。

三、細胞存活分析

細胞進行 I/R 損傷實驗後，以 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, USA) 染色，測定細胞存活率。將心肌細胞種盤於 6 孔盤後，置 37°C 培養箱培養隔夜後，給予 OGD 損傷及 MSC 治療實驗 24 小時，每孔加入 200 ul 5 mg/ml MTT 試劑，置 37°C 培養箱培養 1 小時後，吸取上清液並加入 1 ml DMSO，搖晃均勻並置 37°C 培養箱溶解 10 分鐘，再以分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) 測吸光值 490 nm。

四、DNA 膠體電泳

實驗採用 Promega 公司所提供之 Wizard Genomic DNA Purification kit (Cat No: A1120) 抽取胞內 genomic DNA。取細胞樣本，加入 Nuclei lysis solution 溶解細胞，之後加入 RNase，置 37°C、30 分鐘以分解 RNA。加入 protein precipitation solution 並離心取上清液並加入 isopropanol 沈澱出 DNA 並加入 70% 酒精清洗加入 rehydration solution 放 4°C 隔夜以回溶 DNA。以分光光度計測量 DNA 濃度後，進行膠體電泳分析並以 Ethidium Bromide (1 μg/ml) 染色以 UV 照膠系統 (Photo-print type, Vilber Lourmat, France) 顯影拍照。

五、Flow cytometry (PI stain)

細胞收集後以冰冷 70% 冰冷的酒精固定並置於 -20°C 固定一晚。細胞加入 1ml PI/Triton X-100 (最終濃度 PI=20 μg/ml, Triton-X 100=0.1%, RNase A=0.2 mg/ml)，室溫避光染色 30 分鐘，以 Novocyte 流式細胞儀 (ACEA Biosciences, USA) 偵測螢光強度。開啟細胞儀配備之波長 488 nm 氬離子雷射做激發光源。開啟 FL3 (625 nm) 偵測器接收螢光訊號，細胞共收取 10,000 顆，並以 NovoExpress 軟體分析螢光訊號。

六、西方墨點法

取量 20 μg 蛋白質樣本進行 15% SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳，電泳時間約 3–4 小時後將膠體切除合適大小再以溼式轉漬法 (wet transfer) 通電轉移至 Polyvinylidene fluoride 轉漬膜上 (PVDF, Millipore, MA, USA) 進行 1 小時，取出轉漬膜後並浸泡在 5% non-fat milk/PBS-T 中進行 Blocking 阻擋。接著進行一級抗體的雜交，將 Caspase-3 (Cell Signaling technology, MA, USA) 及 β-actin (Santa cruz Biotechnology, CA, USA) 抗體稀釋在 5% non-fat milk/PBS-T 中，置 shaker 上 4°C 搖晃至隔夜。以 Anti-rabbit 及 Mouse IgG-Horseradish peroxidase (HRP, Cell Signaling technology) 進行二級抗體雜

交。再以混合之 Enhanced chemiluminescence substrates (ECL substrates, PerkinElmer, USA), 室溫反應 1 分鐘並於暗房以 Hyperfilm ECL film (Amersham Bioscience, IL, USA) 感光顯影。

七、統計分析

所有的實驗結果及數據會以平均值±平均誤差值 (Mean ± Standard error of mean) 表示, 再輔以 Sigma Plot 10.0 統計套裝軟體中之 student-test 進行統計學上的分析及判讀, 用來比較兩組別間不同處理的實驗結果, 而結果中 $P < 0.05$ 可判定具有統計學上的意義。

參、結果

H9c2 心肌細胞未損傷利用共同培養法給予間質幹細胞, 細胞密度與控制組沒太大差異, 表示利用共同培養法給予間質幹細胞對 H9c2 心肌細胞並沒有傷害。H9c2 心肌細胞遭受缺血再灌流相較於控制組, 利用模擬缺血缺氧再灌流使細胞損傷, 可見有些許小顆黃色亮點的凋亡小體產生, 且細胞明顯萎縮型態已不成紡錘狀, 證實了細胞於缺血再灌流損傷啟動細胞凋亡; 而損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞作為治療, 可見凋亡小體明顯減少。因此, 從圖 1 中細胞型態上看來, 給予間質幹細胞作為治療組可以減少細胞傷害。

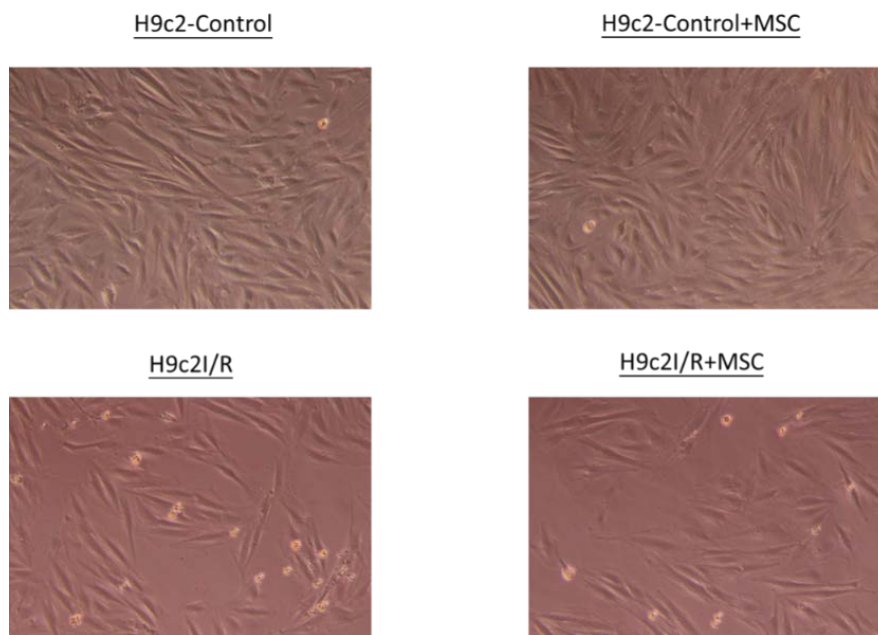


圖 1 心肌細胞經缺血再灌流損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞治療, 心肌細胞型態之表現

H9C2-Control: 正常 H9C2 心肌細胞, H9C2-Control +MSC: 正常 H9C2 心肌細胞與間葉幹細胞共同培養, H9C2+I/R: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury, H9C2 I/R+MSC: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury 後與 MSC 細胞共同培養。(放大倍率 200X)

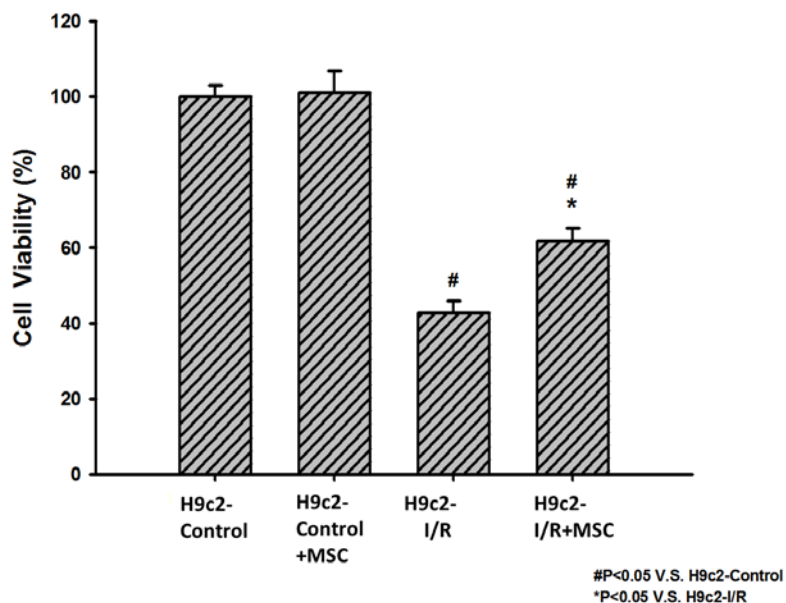


圖 2 心肌細胞受缺血再灌流損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞後對其存活率之影響

H9C2-Control: 正常 H9C2 心肌細胞，H9C2-Control +MSC: 正常 H9C2 心肌細胞與間葉幹細胞共同培養，H9C2+I/R: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury，H9C2 I/R+MSC: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury 後與 MSC 細胞共同培養。實驗以 MTT 法染色，再以分光光度計測其吸光值，吸光值越大，則表示活細胞數目越多。

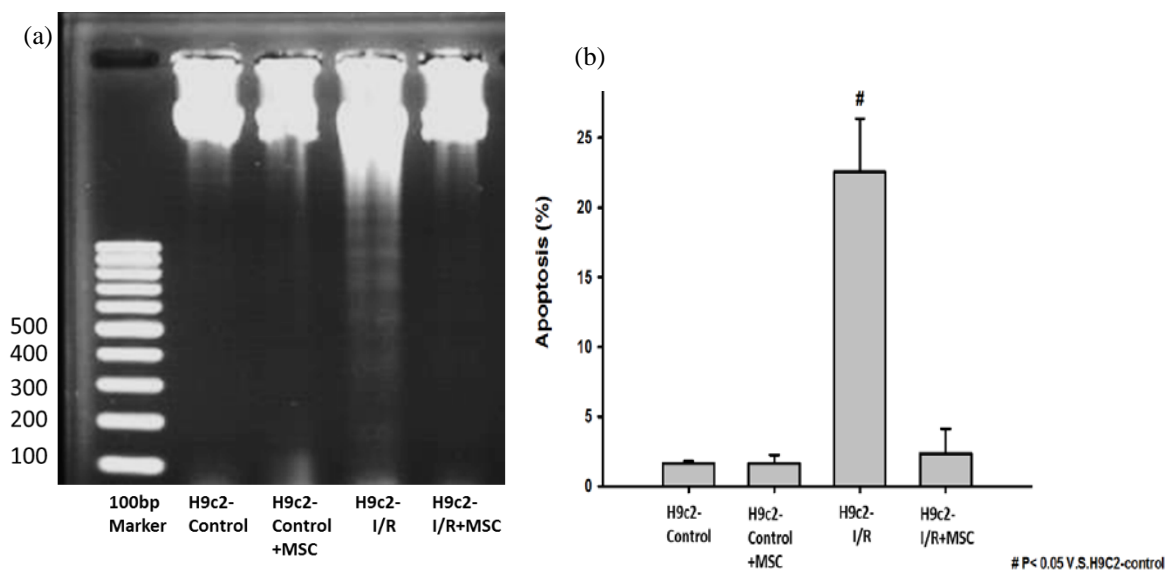


圖 3 心肌細胞經缺血再灌流損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞治療對細胞凋亡的影響

H9C2-Control: 正常 H9C2 心肌細胞，H9C2-Control +MSC: 正常 H9C2 心肌細胞與間葉幹細胞共同培養，H9C2+I/R: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury，H9C2 I/R+MSC: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury 後與 MSC 細胞共同培養。(a)實驗進行後收取細胞，抽取、純化及定量 DNA，之後進行 DNA 膠體電泳分析。(b)實驗組別於實驗進行後收取細胞，酒精固定、染色，再進行流式細胞儀 Sub-G1 期分析。

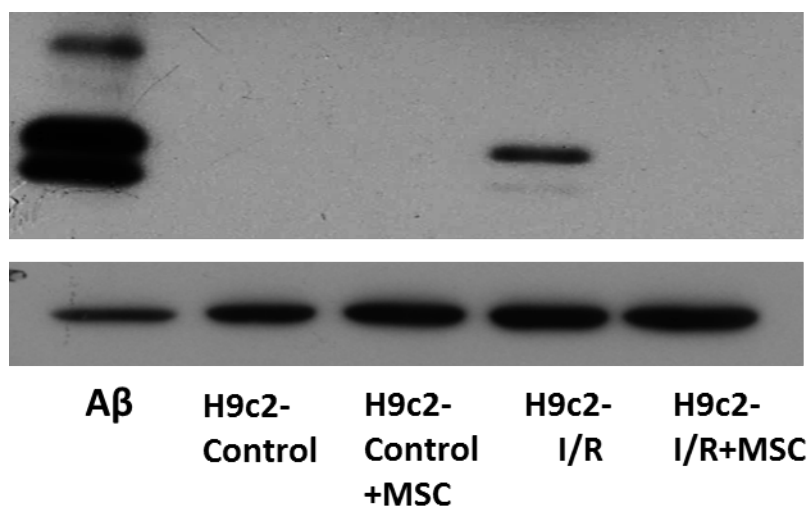


圖 4 心肌細胞經缺血再灌流損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞治療對 Caspase-3 的影響

H9C2-Control: 正常 H9C2 心肌細胞, H9C2-Control +MSC: 正常 H9C2 心肌細胞與間葉幹細胞共同培養, H9C2+I/R: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury, H9C2 I/R+MSC: H9C2 心肌細胞給予 ischemia/reperfusion injury 後與 MSC 細胞共同培養, A β : Caspase-3 positive control。實驗以西方墨點法分析 Caspase-3 蛋白質表現。

肆、討論

幹細胞的發現與應用是近幾年來較被關注的話題之一。幹細胞有增生分化等功能, 藉由修復壞死心肌組織與促進新生血管增生的有效方式, 來改善心臟循環及收縮性的功能, 是未來相當具有潛力的療法及選擇, 目前已有許多學術與臨床獨立或共同的研究陸陸續續投入及評估間質幹細胞在疾病的治療之可行性[23–26]。

本實驗目的在評估利用共同培養法給予間質幹細胞對於 H9C2 心肌細胞以氧氣及葡萄糖剝奪 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 模擬缺血缺氧再灌流 (ischemia-reperfusion, I/R) 模式之保護作用, 並分析此間質幹細胞對心肌細胞凋亡路徑之影響。因此本篇實驗將著重於缺血缺氧後進行再灌流, 更進一步探討 H9c2 心肌細胞在損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞做治療是否能降低細胞凋亡機制。H9c2 心肌細胞遭受缺血再灌流相較於控制組, 細胞密度明顯減少且細胞萎縮, 型態已不成紡錘狀, 產生小顆黃色亮點的凋亡小體 (apoptotic bodies) 產生, 證實了細胞於缺血再灌流損傷啟動細胞凋亡, 而損傷後利用共同培養法給予間質幹細胞做為治療, 得知細胞密度增加、凋亡小體及 apoptosis (例如: DNA 片段化及 Sub-G1 表現) 明顯減少。因此得知利用共同培養方法給予間質幹細胞治療可以減少心肌細胞於缺血缺氧再灌流的環境中的傷害。

幹細胞治療方式相當多樣及廣泛[7–9], 包括通過血管輸注或直接植入幹細胞等方式, 細胞會自行移動到患者受損的部位對受損的細胞進行修復和重建, 來達成治療的效果。但無論自體或異體移植幹細胞均有一定風險存在, 例如致腫瘤性 (tumorigenicity) [27–28], 一直是研究待解決的課題。因此幹細胞的分泌蛋白質體 (secretome) 運用在動物臨床疾病模式上的治療也是熱門的話題[29–30]。我們利用共同培養方法給予間質幹細胞治療可以減少心肌細胞於缺血缺氧再灌流的環境中的傷害, 由於研究中所使用 Transwell inserts 孔徑 (0.4 μ m) 間葉幹細胞並無法穿透至下方心肌細胞培養環境, 因此間葉幹細胞的抑制細胞凋亡的能力可能不是透過細胞本身而是其分泌蛋白質體, 亦是未來進一步研究的重點所在。

參考文獻

- [1] A. S. Go, D. Mozaffarian, V. L. Roger, E. J. Benjamin, J. D. Berry, M. J. Blaha, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, S. Franco, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, M. D. Huffman, S. E. Judd, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, R. H. Mackey, D. J. Magid, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, D. K. McGuire, E. R. 3rd. Mohler, , C. S. Moy, M. E. Mussolino, R. W. Neumar, G. Nichol, D. K. Pandey, N. P. Paynter, M. J. Reeves, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, M. B. Turner, C. American Heart Association Statistics, and S. Stroke Statistics.(2014). Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association, *Circulation*,129(3), e28–e292.
- [2] S. Stewart, K. MacIntyre, S. Capewell, and J. J. McMurray.(2003). Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart*,89(1), 49–53.
- [3] S. Barquera, A. Pedroza-Tobias, C. Medina, L. Hernandez-Barrera, K. Bibbins-Domingo, R. Lozano, and A. E. Moran.(2015). Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease, *Arch Med Res*,46(5), 328–38.
- [4] S. Costantino, F. Paneni, and F. Cosentino.(2016). Ageing, metabolism and cardiovascular disease, *The Journal of physiology*, 594(8), 2061–73.
- [5] M. Donato, P. Evelson, and R. J. Gelpi.(2017). Protecting the heart from ischemia/reperfusion injury: an update on remote ischemic preconditioning and postconditioning, *Curr Opin Cardiol*, 32(6), 784–790.
- [6] P. Ferdinandy, R. Schulz, and G. F. Baxter.(2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning, *Pharmacol Rev*, 59(4), 418–58.
- [7] S. A. Fisher, C. Doree, A. Mathur, D. P. Taggart, and E. Martin-Rendon.(2016). Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure, *Cochrane Database Syst Rev*, 12, CD007888.
- [8] S. Montanari, V. Dayan, G. Yannarelli, F. Billia, S. Viswanathan, K. A. Connelly, and A. Keating.(2015). Mesenchymal stromal cells improve cardiac function and left ventricular remodeling in a heart transplantation model, *J Heart Lung Transplant*, 34(11), 1481–8.
- [9] J. Cheng, P. Zhang, and H. Jiang.(2015). Let-7b-mediated pro-survival of transplanted mesenchymal stem cells for cardiac regeneration, *Stem Cell Res Ther*, 6, 216.
- [10] H. Zhang, M. Xiang, D. Meng, N. Sun, and S. Chen.(2016). Inhibition of myocardial ischemia/reperfusion injury by exosomes secreted from mesenchymal stem cells, *Stem cells international*, 2016, 4328362.
- [11] M. Motavaf, K. Pakravan, S. Babashah, F. Malekvandfard, M. Masoumi, and M. Sadeghizadeh.(2016). Therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes: A promising cell-free therapeutic strategy in regenerative medicine, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 62(7), 74–9.
- [12] E. Andreeva, P. Bobyleva, A. Gornostaeva, and L. Buravkova.(2017). Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: Bidirectional effects, *Cytotherapy*, 19(10), 1152–1166.
- [13] K. Le Blanc and L. C. Davies.(2015). Mesenchymal stromal cells and the innate immune response, *Immunology letters*, 168(2), 140–6.
- [14] H. K. Chae, W. J. Song, J. O. Ahn, Q. Li, B. Y. Lee, K. Kweon, S. C. Park, and H. Y. Youn.(2017). Immunomodulatory effects of soluble factors secreted by feline adipose tissue-derived mesenchymal stem

- cells, *Vet Immunol Immunopathol*, 191, 22–29.
- [15] M. B. Preda, T. Ronningen, A. Burlacu, M. Simionescu, J. O. Moskaug, and G. Valen.(2014). Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury, *Stem Cells*, 32(8), 2123–34.
- [16] K. H. Leong, L. L. Zhou, Q. M. Lin, P. Wang, L. Yao, and Z. T. Huang.(2016). Therapeutic effects of various methods of MSC transplantation on cerebral resuscitation following cardiac arrest in rats, *Molecular medicine reports*, 13(4), 3043–51.
- [17] J. Kim, L. Shapiro, and A. Flynn.(2015). The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease, *Pharmacol Ther*, 151, 8–15.
- [18] O. Pfister, G. Della Verde, R. Liao, and G. M. Kuster.(2014). Regenerative therapy for cardiovascular disease, *Transl Res*, 163(4), 307–20.
- [19] A. B. Mathiasen, M. Haack-Sorensen, and J. Kastrup.(2009). Mesenchymal stromal cells for cardiovascular repair: current status and future challenges, *Future Cardiol*, 5(6), 605–17.
- [20] S. Liu, Q. Ai, K. Feng, Y. Li, and X. Liu.(2016). The cardioprotective effect of dihydromyricetin prevents ischemia-reperfusion-induced apoptosis in vivo and in vitro via the PI3K/Akt and HIF-1alpha signaling pathways, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 21(12), 1366–1385.
- [21] B. Sousa, T. Melo, A. Campos, A. S. Moreira, E. Maciel, P. Domingues, R. P. Carvalho, T. R. Rodrigues, H. Girao, and M. R. Domingues.(2016). Alteration in phospholipidome profile of myoblast H9c2 cell line in a model of myocardium starvation and ischemia, *Journal of cellular physiology*, 231(10), 2266–74.
- [22] L. Yu, B. Li, M. Zhang, Z. Jin, W. Duan, G. Zhao, Y. Yang, Z. Liu, W. Chen, S. Wang, J. Yang, D. Yi, J. Liu, and S. Yu.(2016). Melatonin reduces PERK-eIF2alpha-ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 21(7), 809–24.
- [23] X. R. Gao, H. J. Xu, L. F. Wang, C. B. Liu, and F. Yu.(2017). Mesenchymal stem cell transplantation carried in SVVYGLR modified self-assembling peptide promoted cardiac repair and angiogenesis after myocardial infarction, *Biochemical and biophysical research communications*, 491(1), 112–118.
- [24] D. Luger, M. J. Lipinski, P. C. Westman, D. K. Glover, J. Dimastromatteo, J. C. Frias, M. T. Albelda, S. Sikora, A. Kharazi, G. Vertelov, R. Waksman, and S. E. Epstein.(2017). Intravenously delivered mesenchymal stem cells: systemic anti-inflammatory effects improve left ventricular dysfunction in acute myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy, *Circ Res*, 120(10), 1598–1613.
- [25] J. Butler, S. E. Epstein, S. J. Greene, A. A. Quyyumi, S. Sikora, R. J. Kim, A. S. Anderson, J. E. Wilcox, N. I. Tankovich, M. J. Lipinski, Y. A. Ko, K. B. Margulies, R. T. Cole, H. A. Skopicki, and M. Gheorghiade.(2017). Intravenous allogeneic mesenchymal stem cells for nonischemic cardiomyopathy: Safety and efficacy results of a phase ii-a randomized trial, *Circ Res*, 120(2), 332–340.
- [26] S. J. Greene, S. E. Epstein, R. J. Kim, A. A. Quyyumi, R. T. Cole, A. S. Anderson, J. E. Wilcox, H. A. Skopicki, S. Sikora, L. Verkh, N. I. Tankovich, M. Gheorghiade, and J. Butler.(2017). Rationale and design of a randomized controlled trial of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with nonischemic cardiomyopathy, *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 18(4), 283–290.
- [27] L. Barkholt, E. Flory, V. Jekerle, S. Lucas-Samuel, P. Ahnert, L. Bisset, D. Buscher, W. Fibbe, A. Foussat,

- M. Kwa, O. Lantz, R. Maciulaitis, T. Palomaki, C. K. Schneider, L. Sensebe, G. Tachdjian, K. Tarte, L. Tosca, and P. Salmikangas.(2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints, *Cytotherapy*, 15(7), 753–9.
- [28] A. L. Berkowitz, M. B. Miller, S. A. Mir, D. Cagney, V. Chavakula, I. Guleria, A. Aizer, K. L. Ligon, and J. H. Chi.(2016). Glioproliferative lesion of the spinal cord as a complication of "stem-cell tourism", *N Engl J Med*, 375(2), 196–8.
- [29] T. J. Chuang, K. C. Lin, C. C. Chio, C. C. Wang, C. P. Chang, and J. R. Kuo.(2012). Effects of secretome obtained from normoxia-preconditioned human mesenchymal stem cells in traumatic brain injury rats, *J Trauma Acute Care Surg*, 73(5), 1161–7.
- [30] F. G. Teixeira, M. M. Carvalho, K. M. Panchalingam, A. J. Rodrigues, B. Mendes-Pinheiro, S. Anjo, B. Manadas, L. A. Behie, N. Sousa, and A. J. Salgado.(2017). Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of parkinson's disease, *Stem Cells Transl Med*, 6(2), 634–646.