

研究论文

## 移植胎鼠间充质干细胞的抗衰老作用

李军, 张洹, 刘革修\*

暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632

**摘要:** 本文旨在研究 BALB/c 小鼠胎鼠源干细胞同种异体移植的抗衰老作用。采用无菌剖宫产取胎鼠, 密度梯度离心法分离干细胞, 贴壁培养法纯化扩增间充质干细胞, 连续 3 次尾静脉注射 P1 代细胞植入 15 月龄雌性 BALB/c 小鼠体内。超声检查小鼠心脏, 检查血清总超氧化物歧化酶活力、丙二醛含量、谷胱甘肽过氧化物酶活力, 各器官做解剖学检查以及组织学衰老程度比较、评分。结果显示, Y 染色体原位杂交实验检测到移植后干细胞长期存活, 移植后移植组小鼠存活日期明显长于对照组, 移植 3 个月后评价心功能的各指标, 心脏质量指数、脾脏质量指数, 心脏、肾脏、肺脏、皮肤、结肠等器官组织学衰老程度评分结果以及血液生化指标, 皆优于对照组(均  $P < 0.05$ )。以上结果提示, 移植小鼠胎鼠源干细胞能有效地延缓小鼠衰老进程。

**关键词:** 胎鼠; 干细胞; 移植; 抗衰老

**中图分类号:** R363

## Anti-aging effect of transplantation of mouse fetus-derived mesenchymal stem cells

LI Jun, ZHANG Yuan, LIU Ge-Xiu\*

*Institute of Hematonosis, Medical School, Jinan University, Guangzhou 510632, China*

**Abstract:** To determine the role of allogeneic graft of mesenchymal stem cells in mammalian longevity, mesenchymal stem cells were isolated from BALB/c mouse uterine-incision delivery fetus by two successive density gradient centrifugations, and then were purified and amplified by adherent culture. Identified P1 mesenchymal stem cells were injected (i.v.) through vena caudalis into the 15-month-old female BALB/c mice three times. The mice were evaluated with ultrasoundcardiogram, autopsy, score of cardiac, skin, lung, kidney, colon histopathology and serum total superoxide dismutase activity, maleic dialdehyde content, glutathione peroxidase activity. The results showed that after transplantation, the long-term surviving stem cells were found to be located in many organ tissues with *in situ* Y chromosomal hybridization dyeing. Median life span was increased in these animals after transplantation. Skin, cardiac, lung, kidney and colon pathology development were delayed. The retrogradation of heart function was attenuated, the increase of heart mass index (the mass of heart/the mass of the body), and serum maleic dialdehyde content, the decrease of spleen mass index (the mass of spleen/the mass of the body), serum total superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase activity were reduced three months after transplantation (all  $P < 0.05$ ). These results support the idea that longevity can be enhanced by transplantation of mesenchymal stem cells and reinforce the hypothesis of mesenchymal stem cell as antiager.

**Key words:** mouse fetus; stem cell; transplantation; anti-aging

迄今为止, 关于衰老的机制还没有根本确定, 除了饥饿疗法得到公认外, 抗衰老研究也没有大的进展。人和其它多细胞动物的生命是个动态平衡的

过程, 必须经常不断补充新的组织细胞才能存活。干细胞的研究为提高组织损伤修复、治疗衰老退行性疾病、甚至延缓组织器官的年龄依从性功能下降

Received 2009-10-09 Accepted 2009-11-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30670902), the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 06300546) and the Key Subject Construction Foundation of Overseas Chinese General Affairs Office (No. 200510).

\*Corresponding author. Tel: +86-20-85220262; Fax: +86-20-85220262; E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

带来希望<sup>[1]</sup>。但至于随着年龄的增长,干细胞功能下降是衰老的原因还是结果,至今仍无定论<sup>[2]</sup>。成体干细胞能够分化成机体各种类型的细胞,它对机体自我修复和组织再生至关重要;它需要实现“自身平衡”,随着年龄的增长,成体干细胞功能逐渐降低、数目减少,机体血细胞和其它细胞的再生能力逐渐下降,机体因而也逐渐衰老<sup>[3]</sup>。所以我们提出研究假说,认为补充外源间充质干细胞有可能改善老年动物生存质量,提高动物寿命。本实验拟探讨补充外源幼稚的同基因小鼠胎鼠源间充质干细胞对15月龄老年BALB/c小鼠的抗衰老作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 试剂与仪器** 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司 的淋巴细胞分离液(比重 $1.077\pm 0.000$  1)以及小鼠 SRY DNA 生物素标记 POD 和荧光 FISH 原位杂交双染色系统(Y 染色体原位杂交试剂盒),美国 GIBCO 公司的 DMEM-F12 液体培养基,奥地利 PAA 公司胎牛血清,加拿大 Visual Sonics 公司 Vevo770® 高分辨率小动物超声系统,南京建成生物工程研究所的超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒即脂质过氧化物(LPO)测试盒和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒。

**1.2 实验动物** 四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,合格证号 SCXK(川)2004-15,15 月龄,体重 26~29 g,将小鼠随机分为 3 组,分别作为对照组、移植组和补充组,对照组 20 只小鼠,移植组 20 只小鼠,补充组 10 只小鼠。

**1.3 实验方法** 无菌剖腹产取孕 6 天 BALB/c 胎鼠(雌雄胎儿混合),于 PBS 液中用吸管反复吹打其至成为细胞悬液状态,100 目细胞筛网滤掉脐带等微量的组织块,用 1:1 体积比淋巴细胞分离液连续两次密度梯度离心法除去红细胞等杂质,贴壁培养法纯化、扩增细胞。移植组和补充组每只小鼠每次尾静脉注射 0.2 mL 约  $10^7$  个 P1 代细胞,每 10 天注射一次,连续注射 3 次;对照组注射等量相应 PBS 溶液,每 10 天注射一次,连续注射 3 次;移植 3 个月后观察补充组小鼠一般状况,每当其比较衰弱的时候即尾静脉注射 0.2 mL 约  $10^7$  个 P1 代细胞,直至其死亡为止。

成脂、成骨诱导分化实验鉴定移植的细胞。以含 5% 胎牛血清的 DMEM-F12 配制成脂肪诱导分化

液,其终浓度含 1  $\mu\text{mol/L}$  地塞米松、5 U/mL 胰岛素、200  $\mu\text{mol/L}$  吡啶美辛、0.5% 异丁基甲基黄嘌呤,培养观察到胞浆中有大量脂肪空泡形成时,油红 O 染色鉴定。以含 5% 胎牛血清的 DMEM-F12 配制成骨诱导分化液,其终浓度含  $2.5\times 10^{-8}$  mol/L 地塞米松磷酸钠、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50  $\mu\text{g/mL}$  抗坏血酸,诱导 40 天后茜素红染色鉴定。

首先总体观察比较移植前后对照组和移植组小鼠的形态改变、精神状况以及活动度。从对照组和移植组中各随机选取 10 只小鼠于干细胞移植前以及移植 3 个月后,用 Vevo770® 高分辨率小动物超声系统对其做心脏检查。其中超声测量指标为左室质量、心输出量、每搏量、左室舒张期容积。第二次超声检查后即从做过超声检查的小鼠内眦静脉取血 1 mL,测血清总 SOD 活力、MDA 含量、GSH-PX 活力,然后处死小鼠,各脏器都在同一部位取材,石蜡切片做各脏器组织学检查,评价组织衰老程度通过 0~4 分法双盲打分<sup>[4,5]</sup>。我们取材皮肤的部位为背部正中部位,这样就减少了摩擦、撕咬等因素的影响。取材同时测定每只小鼠的心脏质量指数(心脏质量/小鼠体质量)、脾脏质量指数(脾脏质量/小鼠体质量)。并从注射干细胞即日起计数三组剩余小鼠存活天数,最后当小鼠自然死亡后,通过 Y 染色体原位杂交试剂盒检测植入的干细胞。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件,采用两独立样本的 *t* 检验。 $P<0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 间充质干细胞鉴定结果

贴壁培养法以及成脂、成骨诱导分化实验证明移植的细胞为间充质干细胞。成脂油红 O 染色结果,可见胞浆中有大量被染成鲜红色的小脂滴。成骨茜素红染色结果,细胞间质被染成鲜红色的钙结节随处可见。

### 2.2 移植后总体改变

移植后未发现间充质干细胞移植对小鼠造成明显不良影响,并且观察到移植组小鼠的体力活动、精神状态优于对照组。移植前以及移植 3 个月后 3 组小鼠体重均无统计学差异,且移植组平均存活日期显著高于对照组(图 1,表 1),补充组平均存活日期也高于移植组,但二者之间无统计学差异。同

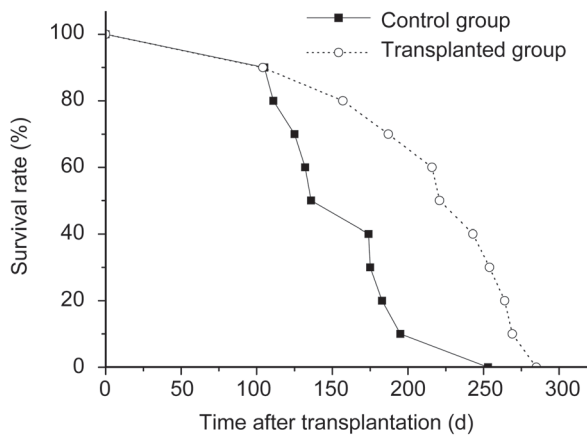


图 1. 移植后小鼠生存曲线

Fig. 1. Mouse survival curve after transplantation in control and transplanted groups.

时发现补充组宿主主要继续存活就需要不断的输入干细胞，并且要求输入的周期越来越短，最终输入无效，小鼠衰竭而死。

### 2.3 植入细胞的转归

对自然死亡小鼠 Y 染色体原位杂交结果表明，在肺脏、肾脏、皮肤、结肠等多数脏器都能检测到大量的植入的间充质干细胞(阳性细胞核被染成棕色，见图 2)。

### 2.4 超声心动图、血清学以及解剖学情况

移植 3 个月后相对于移植前，对照组和移植组二者之间的心脏超声测量各指标的改变量，两组小鼠血清总 SOD 活力、MDA 含量、GSH-PX 活力，反映免疫功能的脾脏指数量，以及反映心功能的心脏质量指数都存在统计学差异(图 3，表 1)。

表 1. 两组小鼠存活天数、组织衰老程度评分、尸解结果、心脏超声结果、血液生化指标比较

Table 1. Comparison of survival time, severity of pathology, postmortem, echocardiography and blood biochemical indicators between the control group and the transplanted group

Detection target	Sample number	Control group	Transplanted group
Survival time (d)	10	158.90±45.73	220.00±56.55 <sup>A</sup>
Increment of left ventricular mass (mg)	10	20.40±10.93	11.34±6.72 <sup>A</sup>
Decrease of cardiac output (mL/min)	10	12.95±2.76	7.50±2.65 <sup>A</sup>
Decrease of stroke volume (μL)	10	12.76±7.25	6.89±4.90 <sup>A</sup>
Decrease of left ventricular diastolic volume (μL)	10	9.46±4.05	5.50±2.32 <sup>A</sup>
Serum total superoxide dismutase activity (U/mL)	10	370.40±25.51	401.30±31.69 <sup>A</sup>
Serum maleic dialdehyde content (nmol/mL)	10	13.26±2.27	10.60±2.21 <sup>A</sup>
Serum glutathione peroxidase activity (U)	10	392.60±20.05	436.00±23.99 <sup>A</sup>
Spleen mass index (%)	10	0.57±0.16	0.76±0.22 <sup>A</sup>
Heart mass index (%)	10	0.55±0.05	0.49±0.08 <sup>A</sup>
Severity of cardiac pathology (score)	10	1.60±1.13	2.60±0.91 <sup>A</sup>
Severity of kidney pathology (score)	10	1.25±0.92	2.40±1.05 <sup>A</sup>
Severity of lung pathology (score)	10	1.25±1.14	2.40±1.17 <sup>A</sup>
Severity of skin pathology (score)	10	1.50±1.00	2.60±1.07 <sup>A</sup>
Tunica muscularis coli thickness (μm)	10	113.35±19.16	92.83±17.53 <sup>A</sup>

Mean±SD. <sup>A</sup>P<0.05 vs the control group.

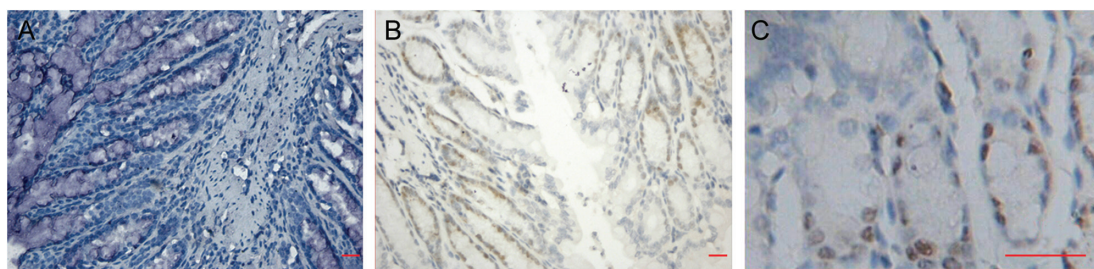


图 2. 通过 Y 染色体原位杂交，在移植组结肠检测到大量的植入的间充质干细胞(阳性细胞核被染成棕色)

Fig. 2. Identification of transplanted mesenchymal stem cells in colon by *in situ* Y chromosomal hybridization. A: Control group. B, C: Transplanted group under two different magnifications. The transplanted cell nuclei were dyed brown. Scale bar, 50 μm.

## 2.5 组织学检查结果

移植3个月后可对照组与移植组各脏器组织学衰老程度相比,各脏器呈现较衰老状态,具体表现在以下几个方面。对照组心脏心肌病样改变明显,心肌间质广泛纤维化,心肌脂肪变性,细胞质玻璃样

变,细胞浆空泡形成;肌纤维大小不一,肌小节断裂,异位钙化,小动脉硬化,充血性心力衰竭样改变明显(图4)。镜下对照组肾脏远端小管明显萎缩,肾单位数量减少,肾单位体积减小,肾小球硬化率增加,间质内结缔组织增多,肾小囊基膜

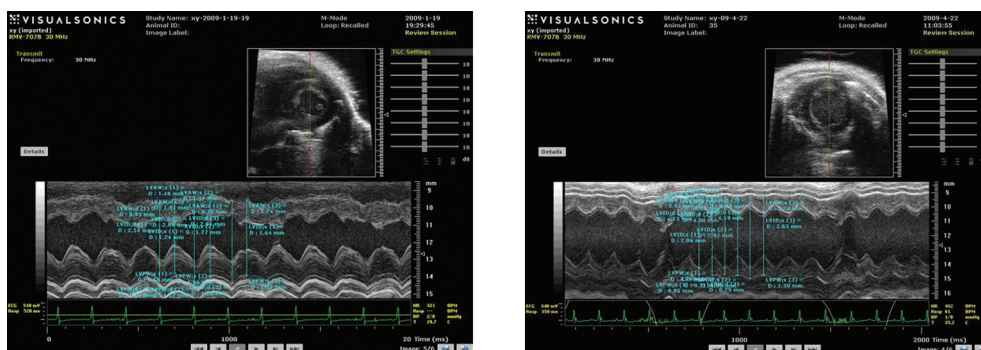


图 3. 超声心动图显示对照组左室舒张期容积低于移植组

Fig. 3. Echocardiography showed that the left ventricular diastolic volume in control group was less than that in the transplanted group.

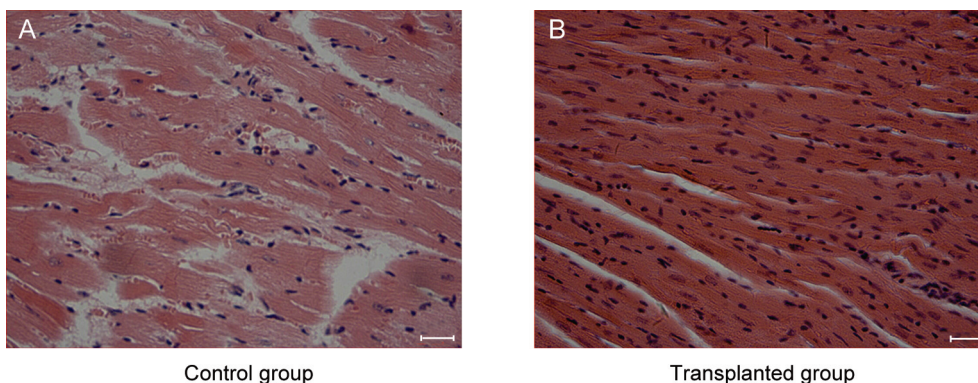


图 4. 移植后对照组和移植组小鼠心脏组织学对比

Fig. 4. Cardiac pathology in control and transplanted groups. *A*: The control cardiac pathology showed subendocardial interstitial fibrosis, variable myocyte fiber size, collapse of sarcomeres, and the cardiac muscle fibers lined up irregularly. *B*: The transplanted mouse heart muscle fibers and cell nucleus were disposed regularly. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

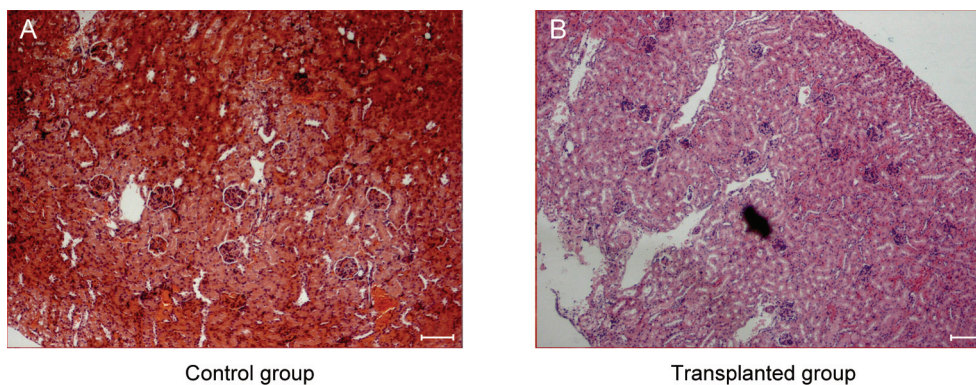


图 5. 移植后对照组和移植组肾脏组织学对比

Fig. 5. Histological observation of kidney in control and transplanted groups. Reduction of the number of nephron observed in control mouse (*A*) was improved and the increase of connective tissue in renal interstitium was alleviated in the transplanted mouse (*B*). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

增厚，肾小囊囊腔变小，近端小管上皮细胞相对减少，刷状缘退化，基膜增厚(图5)。对照组肺气肿改变明显：气腔扩大，正常肺泡结构破坏(图6)。

对照组皮肤表皮各层界限不清楚，真皮层成纤维细胞数量减少，胶原纤维变细，毛囊数明显减少，皮下脂肪层变薄；移植组小鼠表皮组织结构相对较完

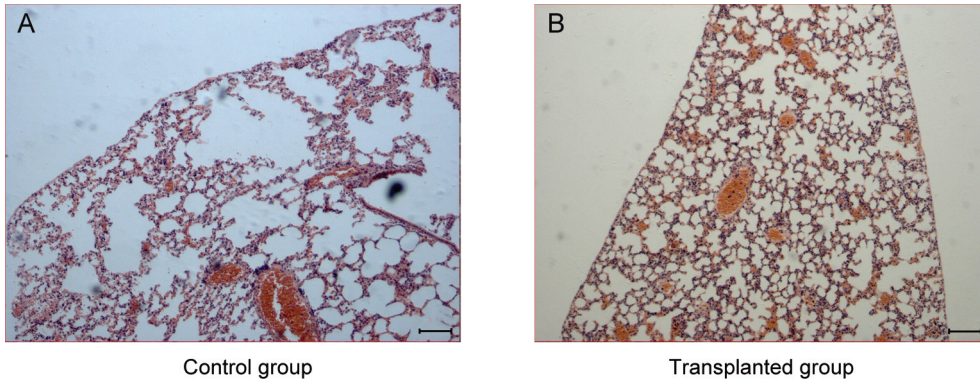


图 6. 移植后对照组和移植组肺脏组织学对比

Fig. 6. Histological observation of lung in control and transplanted groups. Emphysematous changes, including enlargement of air spaces and destruction of the normal alveolar architecture, were observed in control mouse (A), but were alleviated in the transplanted mouse (B). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

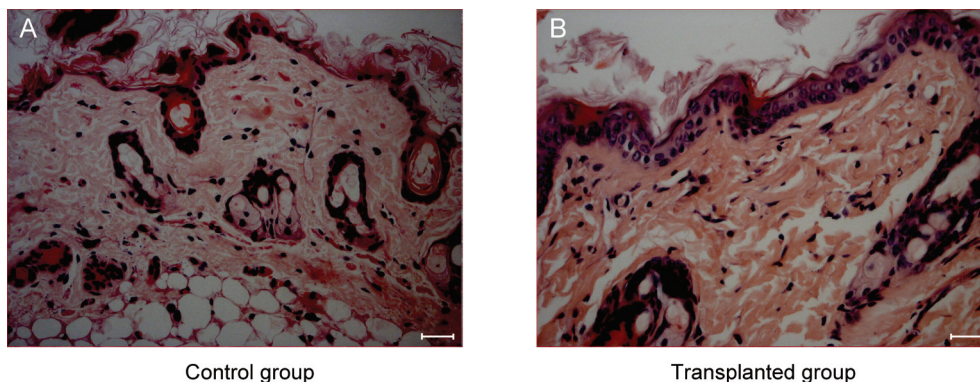


图 7. 移植后对照组和移植组皮肤组织学对比

Fig. 7. Histological observation of skin in control and transplanted groups. Collagen fibers in the dermis layer was thinner in the control mouse (A) than that in the transplanted one (B). Cuticular layer was even, epidermal tissue structure was more integrated, and the layers in the cuticular layer were clearer in the transplanted group than those in the control one. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

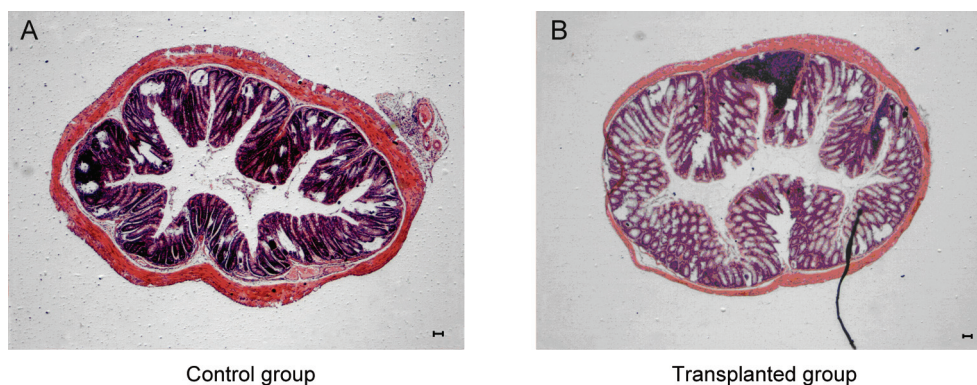


图 8. 移植后对照组和移植组结肠组织学对比

Fig. 8. Histological observation of colon in control and transplanted groups. The cross-sections of the colon showed that the tunica muscularis coli in control group (A) was thicker than that in the transplanted one (B). Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

整, 细胞分层较清晰(图 7)。对照组与移植组相比, 结肠黏膜萎缩, 肌层增厚(图 8)。

### 3 讨论

我们研究的 SPF 级 BALB/c 雌鼠的平均寿命, 多报道为 561 天<sup>[6]</sup>。就小鼠而言, 生理的老年小鼠的特征性表现为心房增大、心室容积减小、瓣环扩大、瓣尖增厚、心肌收缩性减退、心肌顺应性减退、泵功能减退<sup>[7]</sup>; 反映免疫功能的脾脏指数减低; 反映抗氧化能力的血清总 SOD 活力、GSH-PX 活力降低, MDA 含量增加。其脏器的特征性组织学变化为: 心脏呈心肌病样改变, 充血性心力衰竭样改变。肾单位数量减少, 肾小球硬化率增加, 间质内结缔组织增多。肺脏呈现老年性肺气肿改变。皮肤表皮层细胞减少, 毛囊数明显减少, 皮下脂肪减少。结肠黏膜萎缩, 由于胃肠功能减退, 消化道肌层也相应代偿性增厚。而 BALB/c 小鼠易患动脉硬化, 老年小鼠几乎 100% 患有冠心病, 所以比较有利于观察干细胞移植后心脏功能和结构的改变。BALB/c 小鼠为国际公认的近交系品种<sup>[8]</sup>, 它们之间的干细胞移植可以认为是同基因移植。P1 代细胞成脂诱导后, 油红 O 特异性将脂肪滴染成鲜红色, 说明移植的细胞可向脂肪细胞分化; P1 代细胞成骨诱导后, 茜素红特异性将细胞间质的钙结节染成鲜红色, 说明移植的细胞可向骨细胞分化, 结合培养时的细胞特性, 我们有理由认为移植的为间充质干细胞。胎鼠来源的间充质干细胞比成体干细胞更原始, 我们采用 P1 代原始干细胞, 移植的干细胞的分化、增殖潜力更大, 同时由于其较低的免疫原性, 也更容易植入成功。

本实验移植后未发现移植对小鼠造成明显不良影响, 发现肾小球减少、肾小球纤维化为小鼠衰老最为明显的变化。通过对自然死亡小鼠的解剖学检查, 我们未发现干细胞致瘤性。通过整体水平、器官水平、组织细胞水平、蛋白质水平、分子水平, 以及器官结构和功能方面的检测、数据分析, 显示与对照组相比, 胎鼠源间充质干细胞移植可以使小鼠的存活天数延长, 使小鼠的抗氧化能力以及免疫功能得到明显提高, 延缓了各脏器组织学、结构和功能衰老进程, 提示胎鼠源间充质干细胞移植有抗衰老作用。

正常情况下间充质干细胞在体内的主要作用是产生新的组织间质结构, 替代老的间质结构, 从而

服务于各种组织细胞, 但它也能通过分化形成各种新的组织细胞。原位杂交实验显示, 在自然死亡小鼠多个脏器分裂增生旺盛组织都存在大量的已经分化成各脏器功能细胞的移植的细胞, 说明我们移植的细胞在小鼠体内能够长期存活, 而且能够发生迁移, 遍布机体多个脏器, 还能最终分化成机体各种成熟的组织细胞, 与宿主的细胞共同组成完整的个体。我们推测胎鼠源间充质干细胞通过分化替代途径, 形成由部分年轻细胞参与构成的组织器官, 从而延缓这些脏器功能衰退。

移植入宿主体内的干细胞的数量与宿主本身的细胞总量来说, 只占非常小的一部分, 况且移植前, 宿主本身是一个完好的结构, 植入的干细胞要分化、全部替代宿主的组织细胞必然会受到成熟的完整的宿主组织的抑制, 本实验中 Y 染色体杂交阳性细胞也基本分布在皮肤、结肠等分裂代谢旺盛的组织, 而心脏等分裂增生较低的组织未检测到阳性细胞, 但是这些组织和阳性细胞聚集组织存在同样的形态学改变, 即衰老进程同样得到延缓。我们以前的实验证明移植同种异体干细胞并未能有效抑制臭氧致衰老小鼠的衰老进程(待发表), 提示宿主寿命的决定性因素是宿主本身的细胞, 而非移植的干细胞; 本实验中补充组的研究表明特别衰老的宿主主要继续存活就需要不断的输入干细胞, 并且要求输入的周期越来越短, 最终输入无效, 小鼠衰竭而死。综合考虑以上因素, 我们推测宿主寿命的决定性因素是宿主本身的细胞, 而非不断补充的外援的植入的间充质干细胞; 间充质干细胞抗衰老作用通过分化替代途径得以实现, 同时也不排除干细胞分泌因子途径可能参与其中, 抗衰老可能是植入的干细胞和宿主本身细胞相互作用的结果。

以前美国学者早就发现, 当把老年动物的细胞置入年轻者的血液后, 则衰老的细胞又重新变得年轻起来<sup>[9]</sup>, 我们推测本组实验的抗衰老也可能通过类似的机理, 即在干细胞分泌的细胞因子的作用下, 小鼠器官的衰老进程减慢。再例如在某些神经凋亡性疾病治疗中, 培养干细胞的培养液(去除干细胞后)与单纯干细胞移植能起到相同的作用<sup>[10,11]</sup>, 我们的实验中, 移植组血清抗氧化能力明显高于对照组, 但是移植入宿主体内的干细胞的数量只占宿主细胞总量的微小部分, 以上结果表明干细胞分泌的细胞因子的抗衰老作用也不可忽视, 这可能是干细胞延缓心脏等分裂增生较低的脏器衰老进程的机

制。虽然人们已经试图提高机体各种可能延缓衰老的蛋白质含量，但是到目前为止，仍没有取得抗衰老研究的突破。这提示机体是个复杂的系统，它可能通过多种微量效应的协同而调控衰老进程。

本实验观察了胎鼠间充质干细胞移植的远期作用，研究表明：胎鼠间充质干细胞移植有确切的抗衰老功效，这为以后采用细胞重新编程等细胞工程化生产这些细胞做了铺垫性基础工作。然而对机体生存来说，其本身的宿主细胞起主要作用，移植进去的干细胞只起补充作用。我们推测干细胞的主要作用是弥补、分化取代一部分分裂旺盛的细胞，从而延缓这些脏器的衰老，也可能通过改善血供等途径而改善宿主的间质结构，从而为受体的支架细胞服务，延缓机体的衰老过程。总之，我们的结论是胎鼠源间充质干细胞移植有确切的抗小鼠衰老作用，其可能通过分化替代途径延缓小鼠脏器功能衰退，但不排除其它途径参与其中。

### 参考文献

- 1 Brunet A, Rando TA. Ageing: From stem to stern. *Nature* 2007; 449: 288-291.
- 2 Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441: 1080-1086.
- 3 Cheng J, Turkel N, Hemati N, Fuller MT, Hunt A J, Yamashita YM. Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* 2008; 456: 599-604.
- 4 Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Remmen HV, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by over expression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005; 308: 1909-1911.
- 5 Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone klotho. *Science* 2005; 309: 1829-1833.
- 6 Jiang LM (蒋腊梅), Wu WJ. Morphological observation on cochlea of BALB/c mice with age-related hearing loss. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg* (中国耳鼻咽喉颌底外科杂志) 2008; 14(4): 263-267 (Chinese, English abstract).
- 7 Jin CH (金春和), Ding YS. Ageing and senile cardiac disease. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志) 1981; 1: 46-51 (Chinese, English abstract).
- 8 Liu SH (刘双环), Ma LY, Wang XQ, Wang H, He ZM, Xing RC. Effect of genetic contamination of BALB/c mouse on the preparation of monoclonal antibodies. *Lab Ani Sci Man* (实验动物科学与管理) 2006; 23(3): 9-11 (Chinese, English abstract).
- 9 Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760-764.
- 10 Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang LN, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Med* 2005; 11: 367-368.
- 11 Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang LM, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006; 20: 661-669.