

·实验研究 Experiment research·

成年鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化为心肌样细胞

李 城, 方唯一, 朱 皓, 郑晓群, 纪东华, 王 峰

【摘要】 目的 探讨成年大鼠骨髓间充质干细胞(MSC)体外培养条件及定向分化为心肌样细胞的可行性。**方法** 通过取成年 SD 大鼠股骨干骨髓,进行体外培养和传代,用 $10\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷(5-aza)分别对原代、一代和三代 MSC 进行体外定向诱导,用免疫组化方法分析检测分化后细胞的心肌特异性抗原(肌丝蛋白、肌钙蛋白)并通过 RT-PCR 鉴定心肌细胞特异因子基因(ANP、GATA-4)的表达。**结果** 原代、一代 MSC 在体外经 5-aza 诱导 4 周后,细胞形态无明显变化,而经 5-aza 诱导 4 周后的三代 MSC 形态变大,呈杆形、球形,诱导细胞相互连接,连接细胞出现肌管样结构。免疫组化检测经 $10\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 4 周的原代、一代 MSC 未见肌丝蛋白、肌钙蛋白 T 阳性细胞,而诱导三代 MSC 肌丝蛋白阳性比例近 20%,肌钙蛋白阳性比例约 8%。RT-PCR 显示诱导三代 MSC 4 周后有 ANP 和 GATA-4 心肌细胞特异基因表达。**结论** MSC 能够在体外经 5-aza 诱导分化为心肌样细胞,具有向心肌细胞转化的潜力,是自体心肌细胞移植的一种良好供体。

【关键词】 骨髓细胞;干细胞;心肌细胞;细胞培养

中图分类号:R541 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2006)-10-0611-04

Induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes-like of adult mice *in vitro* LI Cheng, FANG Wei-yi, ZHU Hao, ZHENG Xiao-qun, JI Dong-hua, WANG Feng. Department of Intervention, First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116011, China

【Abstract】 Objective To investigate the factors governing the growth and possibility that induced MSCs of adult mice to differentiate into cardiomyocytes-like *in vitro*. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells were aspirated from adult SD mice, s femal bone and isolated by gradient centrifugation method. The MSCs (primary, first and third passage) were respectively treated with 5-aza for 24 h. The MSCs differentiation was observed by phase-contrast microscope, cardiac-specific antigen of the diffrentiated cells were detected by using immunohistochemistry, the expression of cardiomyocytes-specific gene was evaluated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The MSCs of primary and first passages induced by 5-aza for 4 weeks showed no positive staining for Desmin and Troponin T, but the MSCs of the third passages induced by 5-aza for 4 weeks showed postive staining for Desmin and Troponin T. Desmin positive cells were 20% and Troponin T positive cells were nearly 8%. The MSCs of the third passage induced by 5-aza for 4 weeks expressed cardiac-special genes, including ANP, GATA-4. **Conclusions** The MSCs cultured with 5-aza could differentiate into cardiomyocytes-like *in vitro*, possessing as ideal dornor cells for implantation to myocardial infarction area. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 611-614)

【Key words】 Bone marrow cells; Stem cells; Cardiomyocytes; Cell cultures

大量心血管疾病,例如心肌梗死,导致心肌细胞数量减少,进而引起心脏功能恶化,最终导致缺血性心脏病。虽然目前有证据表明心肌有再生现

象^[1,2],但是这种能力非常有限。心肌受到损伤后,则只能有成纤维细胞填充,形成瘢痕组织,以致发生左室重构,最终造成心力衰竭。

尽管众多方式在当前被用作患者治疗,但是并不能改变心肌细胞数量减少这一心力衰竭的根本原因。细胞移植成为治疗心肌梗死及缺血性心脏病

作者单位:116011 大连医科大学附属一院介入科(李 城、纪东华、王 峰);心内科(朱 皓、郑晓群);上海市胸科医院(方唯一)

通讯作者:李 城

的新策略。而骨髓间充质干细胞(MSC)是全能干细胞分化而来的非造血系干细胞,具有多向分化潜能,可以分化为成骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、干细胞等^[9]。可用来研究作为细胞移植的供体细胞来源。

本实验对 SD 大鼠 MSC 进行体外培养,并采用 5-氮杂胞苷(5-aza)在体外诱导,旨在探索一种体外定向分化为心肌细胞的方法。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 Dulbecco, Modified Eagle 培养基(DMEM) (Gibco, 美国), 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂公司), 胎牛血清(FBS) (中国医学科学院血液学研究所), 5-aza (Sigma, 美国), 鼠抗人肌钙蛋白 T(cTnT)抗体、肌丝蛋白(Desmin)抗体、超敏 S-P 试剂盒及 DAB 显色剂(福州迈新生物技术开发公司产品), 逆转录 PCR(RT-PCR)试剂盒 大连宝生物公司产品

1.1.2 PCR 引物 由大连宝生物公司合成

1.1.2.1 ANP 引物系列: 正义 5'-TTGGCTTCCAGGCCATAATTG-3'; 反义 5'-AAGAGGGCAGATCTATCGGA-3'

1.1.2.2 GATA-4 引物系列: 正义 5'-CTGTCATCTCACTATGGGCA-3'; 反义 5'-CCAAGTCCGAGCAGGAAT TT-3'

1.2 实验动物

SD 大鼠, 雌雄不限, 体重 200 ~ 250 g, 由大连医科大学实验动物中心提供。

1.3 大鼠 MSC 的分离、培养和纯化

SD 大鼠用氯胺酮 100 mg/kg 腹腔注射, 无菌条件下取双侧股骨, 去除软组织, 剪去长骨两头, 暴露骨髓腔, 以 DMEM 基础培养基冲洗骨髓腔, 冲洗液充分混匀收集于离心管中, 2 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀重新加入 DMEM 混基础培养基混匀, 轻轻叠加到淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 离心 30 min, 收集单核细胞层, PBS 洗涤 3 次以去除分离液, 进行细胞计数, 以 2×10^6 密度接种于完全培养基(含 10% FBS, 100 μ g/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基)培养瓶中, 在 37℃、5%CO₂ 的孵育箱中培养。每 3 d 换液 1 次, 随着每次换液, 弃去悬浮生长的造血细胞, 留下贴壁生长的 MSC。2 周后当细胞接近 80% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化细胞, 以 1:2 进行传代。

1.4 大鼠骨髓 MSC 体外诱导分化

1.4.1 实验分组 分诱导组 and 对照组, 诱导组中加入含 10 μ mol/L 5-aza 培养基 24 h, 而对照组不加入 5-aza。

1.4.2 诱导方法 分别选取对数生长期的原代、一代及三代 MSC, 以每孔 5×10^5 个细胞浓度接种于带盖玻片 6 孔培养板中, 每代细胞设 3 孔, 当细胞融合至 80% ~ 90% 时, 分别加入终浓度为 10 μ mol/L 5-aza, 24 h 后更换新鲜培养基, 以后每 3 天换液 1 次, 细胞不再传代, 对照组在培养过程中不加入 5-aza, 其余培养条件同诱导组, 相差显微镜下观察细胞形态变化。

1.5 诱导细胞鉴定

1.5.1 细胞免疫化学鉴定 取诱导 4 周后的 MSC 和对照组未诱导的 MSC, 以 PBS 液冲洗 3 次, 以冷丙酮固定 5 min, 然后以 PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 在室温条件下每张玻片用 50 μ l 正常非免疫动物血清封闭 10 min, 滴加一抗(Desmin, cTnT) 50 μ l 室温下孵育 1 h, 然后加入 50 μ l 生物素标记的第二抗体室温下 10 min, 最后加入一滴链霉菌抗生物素-过氧化氢酶溶液室温下 10 min, 以 DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 倒置显微镜下观察, 阳性细胞胞质呈棕黄色。每张玻片随机取 3 个视野, 分别记数每视野内细胞数(N) 和阳性细胞数(N₁), 计算大鼠 MSC 分化为心肌样细胞的转化率(心肌样细胞转化率 = $N_1/N \times 100\%$)。

1.5.2 RNA 提取及 RT-PCR 鉴定 采用 Trizol RNA 一步提取法提取总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA, 以吸收光谱法检测 RNA 纯度和含量, 分两组以 RT-PCR 方法检测大鼠心肌组织, 未诱导三代 MSC, 诱导 4 周三代 MSC 心房肽(ANP)、GATA-4 的 mRNA 表达。RT-PCR 用 TaKaRa 一步法试剂盒, 操作按说明书进行, 先 48℃, 45 min 合成 cDNA, 再 94℃变性 2 min, 接着 35 个 PCR 循环扩增(95℃ 30 s, 60℃ 1.5 min, 72℃ 1 min), 最后 72℃延伸 7 min。反应完毕, 用 1 倍 TBE 缓冲液配制浓度为 2% 琼脂糖凝胶(EB 掺入量为 0.5 μ g/ml), 取扩增产物 8 μ l 加样于 2% 琼脂糖凝胶, 常规电泳, DL2000 作为标准参照, 电泳完毕后紫外透射仪观察并照相。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学观察

MSC 贴壁生长, 接种后为均一的单个圆形, 未伸展。3 d 后, 部分贴壁生长的细胞呈梭性或纺锤形, 散

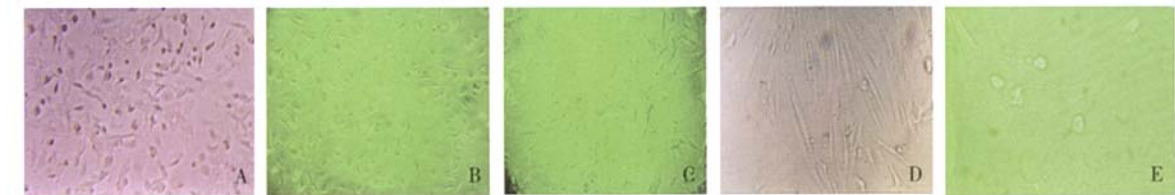


图 1 A:原代培养 MSC 第 3 天($\times 100$)。细胞呈纤维样细胞外观,多为纺锤状,散在贴壁于培养瓶底;B:原代培养 MSC 4~5 d 形成细胞集落($\times 100$)。细胞集落大小不一,呈旋涡状或火山口状;C:诱导前的三代 MSC($\times 100$)。细胞较原代增大,多呈三角形、梭形;D:10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza 诱导 2 周后的 MSC($\times 100$)。细胞体积较诱导前明显增大,由原来的梭形、三角形变为长杆形、球形等,细胞排列具有方向性;E:10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 4 周后的 MSC($\times 200$)。诱导细胞相互连接,连接细胞出现肌管样结构。

布贴壁于培养瓶底(图 1A),而未贴壁的、悬浮的圆形细胞多数为造血细胞,可随着换液而逐步去掉。4~5 d 后贴壁的 MSC 开始迅速增殖,体积变大,形成多个细胞集落(图 1B),大小不一,呈旋涡状或火山口状,2 周后细胞集落逐渐增大,相互融合、连接,可铺满 80%~90% 培养瓶底,此时可传代。传代细胞 12 h 后贴壁,贴壁细胞体积较原代细胞明显增大,呈三角形、梭形及扁平多角形,细胞核明显,呈圆形,可见双核细胞。3 d 换液 1 次,1 周左右传代 1 次,细胞铺满培养瓶底,细胞排列紊乱,细胞间隙变小。可相互重叠。2 次传代后可获得较纯的 MSC(见图 2)。

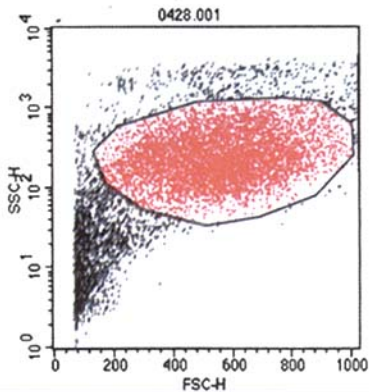


图 2 FACS 根据细胞形态大小将二代 MSC 分为 R1 细胞群,R1 细胞群形态单一,约占细胞总数 80%,证明二代 MSC 为较纯化的细胞

2.2 诱导细胞形态学观察

诱导原代及一代培养的 MSC,相差显微镜下观察可见少量细胞死亡从培养瓶底脱落,存活细胞继续生长,但生长较对照组缓慢,细胞形态较对照组细胞无明显变化。而诱导的三代细胞,也可见少量细胞死亡从培养瓶底脱落,细胞生长停滞,但诱导 2 周后细胞体积及核增大,MSC 由原来的梭形、三角形变为长杆形、球形,椭圆形,细胞排列具有方向性(图 1C、D)。4 周后诱导细胞相互连接,连接细胞出现肌管样结构(图 1E)。

2.3 诱导细胞的免疫组化

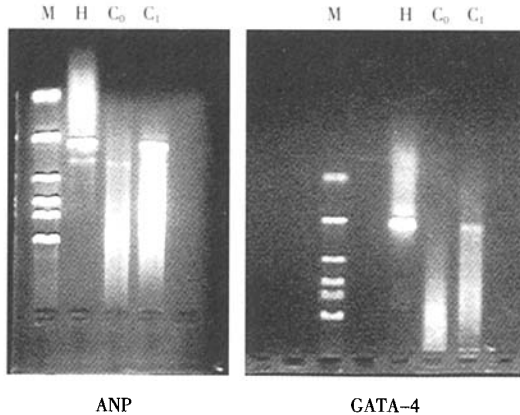
分别取诱导 4 周的原代、一代及三代 MSC 进行免疫组化染色,原代、一代均未见棕黄色阳性细胞,而对照组亦未见阳性细胞。Desmin 免疫组化可见三代诱导的 MSC 胞质中出现棕黄色免疫阳性复合物,Desmin 阳性细胞的比例约 20%,呈散在分布,形态多为三角形、多角形(图 3A)。而 Troponin T 阳性细胞也只在三代诱导的 MSC 胞质中出现棕黄色免疫阳性复合物,但 Troponin T 阳性细胞的比例约占 8%,形态多为不规则形,圆形(图 3B、C)。而对照组未见阳性细胞出现。

2.4 RT-PCR

心肌细胞特异因子 ANP、GATA-4 在诱导 4 周的三代 MSC 和大鼠心肌组织在相同的位置出现阳性条带,而未诱导的 MSC 无阳性条带出现(图 4)。



图 3 A:Desmin 抗体,DAB 染色的经 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza 诱导 4 周的三代 MSC($\times 100$);B:Troponin 抗体,DAB 染色经 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 4 周的三代 MSC($\times 100$);C:Troponin 抗体,DAB 染色的经 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 4 周的三代 MSC($\times 400$)



M:DNA 标志(DL2000)由上至下分别为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp;H:SD 大鼠心肌组织 C₀: 未诱导三代 MSC C₁:诱导 4 周三代 MSC

图 4 5-aza 诱导 4 周的三代 MSC 心肌特异因子结果

3 讨论

由于 MSC 能够分化为不同的细胞类型,而相对于心肌,MSC 分化发育成心肌和营养心肌的血管^[4];从成人提取骨髓细胞很容易,不会出现用胎儿和婴儿组织所产生的伦理和法律问题;自体骨髓移植不会出现排斥现象。因此骨髓间充质干细胞成为细胞移植和基因治疗的理想选择。

本实验证实了 MSC 在去甲基化药物 5-aza 进行体外诱导可向心肌细胞方向转化。以诱导三代 MSC 细胞形态发生明显改变,部分细胞形态趋于杆状、椭圆形,相邻细胞之间相互连接,形成肌管样结构。心肌细胞特异的肌钙蛋白抗原染色阳性比例近 8%,而肌丝蛋白抗原染色阳性比例近 20%。Makino 等^[5]在体外培养大鼠永生化的 MSC,加入 5-aza 培养 24 h 后,可诱导出类似于胎心的心肌细胞,转化率约 30%。Tomita 等^[6]抽取成年大鼠骨髓细胞,用新鲜骨髓细胞、普通培养的骨髓细胞和经 5-aza 诱导的骨髓细胞分别进行自体心脏内移植,发现只有经 5-aza 诱导的骨髓细胞移植组抑制了瘢痕区的变薄和左室的扩张,左室收缩压力和生成压显著优于对照组,提示收缩功能的改善。

目前 MSC 鉴定的方法都是通过密度梯度离心法或差速贴壁法分离得到细胞后在培养过程中出现分化表型,然后逆推得知是否为间质干细胞。因为至今还未能筛选到 MSC 特有的标记分子。本实验通过对原代、一代和三代 MSC 进行诱导来观察诱导的最佳时机。实验结果发现原代、一代无成肌细胞转化,而诱导的三代 MSC 出现肌丝蛋白、肌钙蛋白抗原染色阳性,这可能由于三代 MSC 细胞较纯化、

数量较多所致。但是三代诱导 MSC 成肌细胞转化率较 Makino 诱导永生化的 MSC 的成肌细胞转化率明显减少,因此,对于诱导时机的选择还有待于进一步实验研究。

不同的 5-aza 的浓度对于 MSC 体外向心肌细胞诱导分化的影响起十分重要的作用。Tomita 等^[6]分别用 0.1、1、5、10、20、和 100 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 MSC,发现只有 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导组较其他诱导组细胞形态发生明显改变,未见大量细胞死亡,并且心肌样细胞转化率最高,提示 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 是最佳诱导浓度。因此本实验选择了 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为诱导浓度。

但是如何选择向心脏谱系分化的 MSC 是一个重要问题。Klug 等^[10]用包含 $\alpha\text{-MHC}$ 启动子与编码氨基酸糖甙磷酸化的融合基因转染鼠胚胎干细胞,通过合适的选择培养基(G418)筛选后,他们获得了超过 99%纯化的心肌细胞。利用类似的基因筛选方法是否可以从诱导的 MSC 中获得较为纯化的心肌样细胞,尚需进一步的实验研究,但是目前 MSC 的分化机制还有待明确。

参考文献

- [1] Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart [J]. Circ Res, 1998, 83: 1 - 14.
- [2] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2001, 344:1750 - 1757.
- [3] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal cell: nature, biology, and potential application[J]. Stem cell, 2001, 1: 180 - 192.
- [4] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123: 1132 - 1135.
- [5] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. J Clin Invest, 1999, 103: 697 - 705.
- [6] Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function[J]. Circulation, 1999, 100: II247 - 256.
- [7] Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts[J]. J Clin Invest, 1996, 98: 216 - 224.

(收稿日期:2005-08-08)