

·技术研究·

小鼠心源性 CD51 阳性细胞的分离与鉴定

陈 阳¹, 李桂兰², 姜美花³, 彭朝权^{1*}

(中山大学 1.附属第三医院心血管内科,广东 广州 510630;2.中山医学院;3.中山医学院人体解剖学教研室,广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨整合素蛋白 α_v (CD51)阳性细胞在小鼠正常心脏组织中的分布情况并鉴定其是否存在心肌干细胞相关特性。【方法】通过免疫荧光染色,RT-PCR,Q-PCR 等方法,观察 CD51⁺ 细胞在 C57 小鼠心脏中的表达及分布情况;应用流式细胞仪进一步检测心脏中 CD51 的表达比例,并分选出 CD51 阳性细胞进行体外培养;利用 CCK-8 实验检测细胞增殖能力;细胞稳定传代后进行成骨、成脂诱导,检测其多向分化能力。【结果】实验结果显示小鼠心脏中存在 CD51⁺细胞,随年龄增大其表达水平呈下降趋势;在出生 7d C57 小鼠心脏组织中可观察到 CD51⁺细胞广泛分布于心房、心室;流式细胞仪分选出 7 d C57 小鼠心脏组织中阳性细胞结果显示阳性率约 4%左右;诱导结果显示该细胞可以分化形成骨及脂肪组织,进一步证明其存在多向分化能力。【结论】小鼠心肌组织中 CD51⁺ 细胞是具有干细胞性的细胞亚群,可能为心脏来源的 MSC 样干细胞。

关键词: 心肌干细胞;CD51;流式分选;增殖;多向分化

中图分类号: Q254 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2014)03-0424-07

Isolation and Determination of Characteristics of CD51⁺ Cells in Myocardial Tissue of Mouse

CHEN yang¹, LI Gui-lan², JIANG Mei-hua³, PENG Chao-quan^{1*}

(1.Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China; 2.Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University; 3.Department of Anatomy, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To isolate and culture intergrin α_v (CD51⁺) positive cells in mouse heart, and verify its characteristics of cardiac stem cell for investigation of its distribution.【Methods】 To characterize CD51⁺ cell expression and distribution in postnatal C57 mouse heart by using RT-PCR, Q-PCR, and confocal microscopy analysis. The CD51⁺ cell proliferation and multi-differentiation capacity were tested by CCK-8 analysis and osteogenic, adipogenic induction analysis, respectively. 【Results】 Experimental results confirmed that the CD51⁺ cells were widely expressed in the atrium and ventricle, and which expression level declined with the age. Positive cells were sorted by flow cytometry and showed that the positive rate was approximately 4% in 7 d C57 mouse. Cultured CD51⁺ cells showed a strong ability of proliferation and adipogenic/osteogenic differentiation. 【Conclusion】 CD51⁺ cells existed in myocardial tissue of mice are a cell subsets with stem cell characteristics, it may be a category of heart derived MSC-like stem cells.

Key words: cardiac stem cells; CD51; FACS; proliferation; differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2014,35(3):424-430]

心脏疾病是现今社会的主要致死原因之一,且由于心脏是一个终末分化的器官,损伤心肌无法再生修复。干细胞治疗被证明是一个很有前景的修复损伤心脏的方法。最近许多研究证实干细

胞在心肌损伤的治疗作用中,成体心肌干细胞被认为是最有希望实现心肌细胞再生修复的干细胞类型^[1]。目前所报道的不同心脏来源的干细胞包括多种类型,主要可分为心肌干细胞及心源性间

收稿日期:2014-01-26

基金项目:国家自然科学基金(81370214);广东省自然科学基金(S2013010016392)

作者简介:陈阳,医学硕士,研究方向:干细胞与心血管疾病,E-mail:chenyangxiada@foxmail.com; * 通信作者:彭朝权,教授,硕士生导师,E-mail:pengcq123456@163.com

充质干细胞(MSC)两类^[2-3],它们各自又可分为多种细胞亚型,有人认为这些所发现的众多类型的细胞其实质可能是一类细胞的多种亚型,但是至今尚未有统一的细胞表面标志物,限制了对心肌干细胞的进一步研究。因此,寻找一种特异的细胞表面标志物,鉴别和分离心肌来源干细胞成为近年来干细胞领域研究的热点^[1]。CD51又称为整合素蛋白 αv ,是整合素蛋白超家族中的一员,其实质为异质二聚体整合膜蛋白,由 α 链和 β 链两部分构成,进一步可细分为 $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 6$ 和 $\alpha v\beta 8$ 5个亚型,在调控胚胎器官形成、血管生成、血管通透性、癌症演进、上皮组织的炎症及纤维化中发挥重要作用^[4]。有研究报导,CD51广泛分布于牙周韧带、人脐带血及WhaRTon氏胶中MSC样细胞的表面^[5]。同时,也发现CD51存在于大部分人骨髓MSC细胞的表面^[6]。本研究中,我们通过免疫荧光染色观察正常小鼠心脏组织中CD51的表达及分布情况,将这些细胞分离培养并鉴定其多向分化能力,为CD51能否作为心肌来源干细胞的标志物提供一定的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选择生后1天(1d)、7天(7d)、1月(1m)、3月(3m)的C57小鼠为实验动物。由中山大学北校区动物中心提供,实验过程中对动物的处置符合医学伦理学的标准。

1.1.2 主要试剂 II型胶原酶、DNA酶DNaseI(10 ng/ μ L)、DMEM/F12(Hyclone, ThermoFisher)基础培养基,1%双抗,10%胎牛血清,胰蛋白酶(Gibco),FastStart Essential DNA Green Master (Roche),Trizol (Invitrogen),流式抗体PE-CD51 (ebiosciences),抗CD51抗体(BD),荧光二抗包括488、594标记山羊抗小鼠和488、594标记山羊抗兔IgG抗体(Invitrogen),OCT包埋剂(Sakura),荧光封片剂(DAKO)。

1.1.3 主要实验仪器和器材 高通量组织研磨器(TissueLyser II, QIAGEN GmbH),PCR试剂盒(Fermentas),PCR仪(Biorad),LightCycler480 Detection System (Roche),冰冻切片机(Leica CMI900),激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss),荧光倒置显微镜(Olympu IX71-22FL/PH),流式细胞分选仪(BD Influx)。

1.2 方 法

1.2.1 不同个体心脏组织 PCR 出生7d的C57小鼠断颈处死后取出心脏组织,PBS清洗干净,立即放至加入钢珠的EP管中并加入1 mL Trizol,组织研磨器匀浆,运行频率15 Hz,30 s。组织匀浆液按照Invitrogen公司提供的方法提取RNA。RNA使用Fermentas公司的逆转录试剂盒完成cDNA合成。cDNA进行RT-PCR和Q-PCR实验。PCR所用CD51引物F:5, -CACCAGCAGT CAGAGATGGA-3, ;R:5, -TGCCTTGCTGAATGAA CTTG-3,扩增产物约为276 bp。RT-PCR扩增片段进行琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察并记录结果。实时荧光定量PCR则在LightCycler480上进行,程序如下:94℃预变性5 min,循环程序为94℃变性5 s,55℃退火10 s,72℃延伸20 s,72℃延伸时收集荧光信号,总共进行40个循环反应。所用引物同普通PCR。

1.2.2 组织切片 将出生7d的C57小鼠处死后取出心脏组织直接放入40 g/L多聚甲醛,4℃固定6 h,然后用300 g/L蔗糖脱水过夜。处理好的组织OCT包埋,转移至-20℃组织切片机中切成5 μ m厚度的连续切片,用APES处理的载玻片贴片。

1.2.3 免疫荧光染色 切片从冰箱取出后65℃烤片约20 min,PBS冲洗3次、5 min/次,山羊血清封闭30 min,吸去血清后加入一抗抗体CD51(1:100),置于湿盒中4℃过夜。第二天取出于室温复温10 min,尽量吸干净抗体后PBS洗3次、5 min/次。加入相应荧光二抗(1:500),室温孵育40-60 min,PBS洗3次、5 min/次。用DAPI染核3~5 min,加入封片剂封片,应用激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.2.4 检测及分选CD51表达阳性细胞 将7d C57小鼠断颈处死,心脏组织剪成2~3片,HBSS清洗,加入II型胶原酶及DNaseI,组织细胞匀浆仪制备单细胞悬液,227 \times g离心4 min,HBSS清洗、离心、过滤后重悬调整浓度至1 \times 10⁸/mL,加入抗CD51-PE(1:20),4℃避光孵育30 min,HBSS清洗、227 \times g离心、重悬后用流式细胞仪检测阳性细胞率,同时收集阳性细胞,37℃培养。

1.2.5 细胞培养传代 CD51⁺细胞用DMEM/F12+10%胎牛血清的培养基,在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养;2.5 g/L胰蛋白酶+0.02% EDTA进行消化、传代。

1.2.6 多向分化能力检测 成脂分化诱导:以2 \times

10^5 /well 的细胞接种于 12 孔板,加入成脂诱导培养基,其主要成分为 DMEM 高糖培养基中加入 10% FBS、 $1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、 $10 \mu\text{g/mL}$ 胰岛素和 $100 \mu\text{mol/L}$ 的吡啶美辛,成脂诱导细胞 2 周,油红 O 染色观察结果。

成骨分化诱导:以 2×10^5 /well 的细胞接种于 12 孔板,加入成骨诱导培养基,其主要成分为 α -MEM 培养基中加入 10% FBS、 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松、 0.2mmol/L 维生素 C 及 10mmol/L β 磷酸甘油酸,成骨诱导培养 3 周,茜素红染色观察结果。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS19.0 分析软件,实验获得的定量数据处理后以均数 \pm 标准差的形式记录结果,各均数间比较采用方差分析或 *t* 检验进行分析,最后结果以 *P* 值显示,如 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 出生 7 d 的 C57 小鼠心脏组织中 CD51 的表达与分布情况

为了研究 CD51 在小鼠心肌组织中是否存在及进一步探讨其分布特性。选取出生后 1 d、7 d、1 m、3 m 的 C57 小鼠作为实验对象,Q-PCR 检测结果显示 CD51 表达水平随年龄增大逐渐下降(图 1, $P < 0.05$)。同时通过 RT-PCR 检测可发现相同年龄不同个体间心脏组织中 CD51 均有表达,并且不同个体间表达量基本一致(图 2)。为了进一步鉴定 CD51 在心肌组织中的分布特点,我们利用免疫荧光染色方法进行观察,发现生后 7 d 的小鼠心脏组织中 CD51 表达最多,主要位于心房内壁、

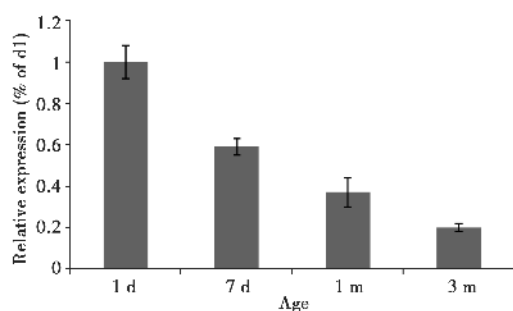


图 1 Q-PCR 分析 C57 小鼠在出生后不同时期心脏中 CD51 的表达情况

Fig.1 Q-PCR analysis CD51 expression in the heart of C57 mouse in different periods after birth

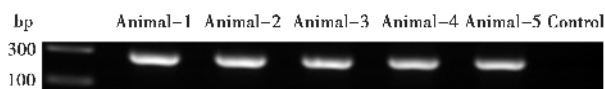


图 2 RT-PCR 分析不同个体 C57 小鼠在出生后 7 d 时心脏中 CD51 的表达情况

Fig.2 RT-PCR analysis CD51 expression in the heart of different C57 mouse individuals aged 7 d

左心室壁及左心室外壁(图 3),而 3m 的小鼠心脏中 CD51 的表达量明显减少(图 4)。

2.2 流式分选 C57 小鼠心脏中 CD51⁺细胞

本实验使用 BD influx 流式细胞仪分选 CD51 阳性细胞。选取出生 7 d 小鼠为实验对象获得心脏单细胞悬液并标记 CD51 抗体,以荧光强度为对照细胞的 10 倍以上为基准收集细胞,可见分选阳性率约为 4.6%(图 5),并同时收集该群阳性细胞。收集到的细胞种板后于倒置显微镜下观察,可见到细胞带有明显的红色荧光(图 6)。

2.3 CD51⁺细胞的形态特征

分选得到的细胞接种在含有 DMEM/F12 培养基的孔板中,24 h 后出现贴壁的纺锤形细胞,约 5 d 左右形成克隆,14 d 后出现致密的贴壁细胞层,细胞为成纤维细胞状(图 7)。

2.4 CD51⁺细胞增殖能力检测

通过 CCK-8 实验鉴定该群 CD51⁺细胞的增殖能力,选取 P5, P15 和 P25 的细胞进行检测,发现细胞的增殖能力无明显差异($P > 0.05$),并且有继续增殖趋势(图 8)。

2.5 CD51⁺细胞的多向分化能力检测

为了进一步鉴定该群 CD51⁺细胞的特性,我们将分选出的阳性细胞进行培养扩增,稳定传代后进行诱导分化实验。在诱导成脂分化 2 周后,油红 O 染色可显示细胞内出现脂肪滴;在诱导成骨分化 3 周后,茜素红染色后可观察到骨节形成(图 9)。

3 讨 论

心脏来源的干细胞主要分为成体心肌干细胞和心源性 MSC 两类。2003 年, Beltrami 等第一次从大鼠心肌内分离出一类具有自我更新能力的细胞,其可分化成新的心肌细胞并改善心脏功能^[7],而后又陆续报导发现了多种类型的心肌干细胞,它们以各种各样的阳性干性标志物为特征,如 c-Kit, Sca-1, Isl-1, SP 细胞(Side Population cells)等^[8]。而

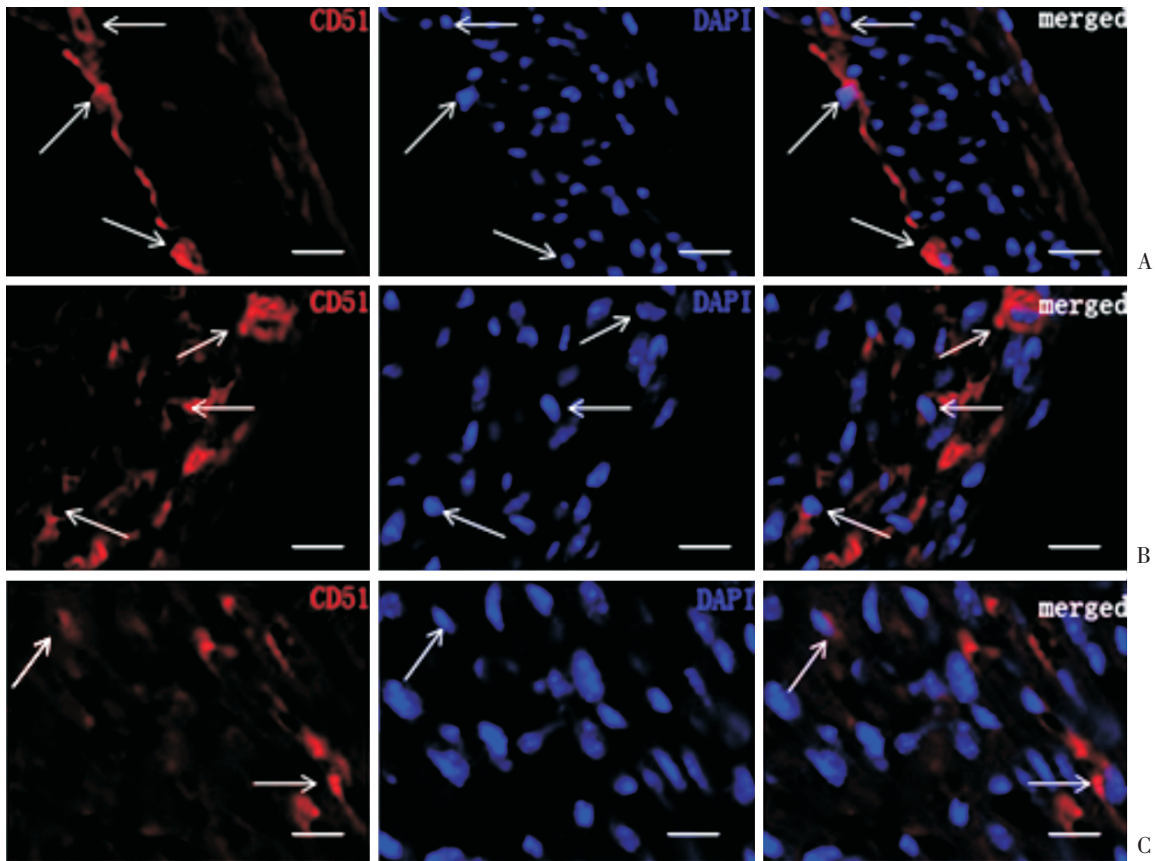


图 3 免疫荧光染色显示出生后 7 d 的 C57 小鼠心脏中 CD51 的分布情况

Fig.3 Immunofluorescence staining showed the distribution of CD51 in the heart of 7 d C57 mouse

The red fluorescent marker of CD51 are mainly located in the A: outside wall of the atrium, B: outside wall of the left ventricle and C: left ventricular wall (A bar = 50 μ m, B bar = 25 μ m, C bar = 10 μ m).

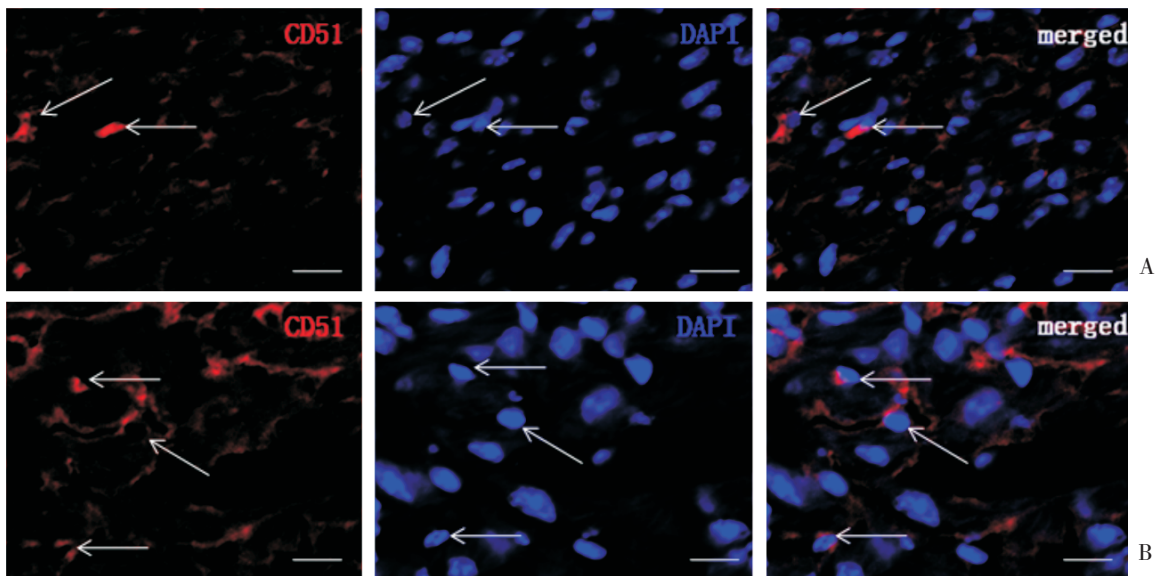


图 4 生后 3m C57 小鼠心脏中 CD51 的分布情况

Fig.4 Immunofluorescence staining showed the distribution of CD51 in the heart of 3m C57 mouse

The expression level of CD51 decreased significantly in adult mice. A:outside wall of the ventricle B:outside wall of the atrium. A bar = 50 μ m, B bar = 10 μ m.

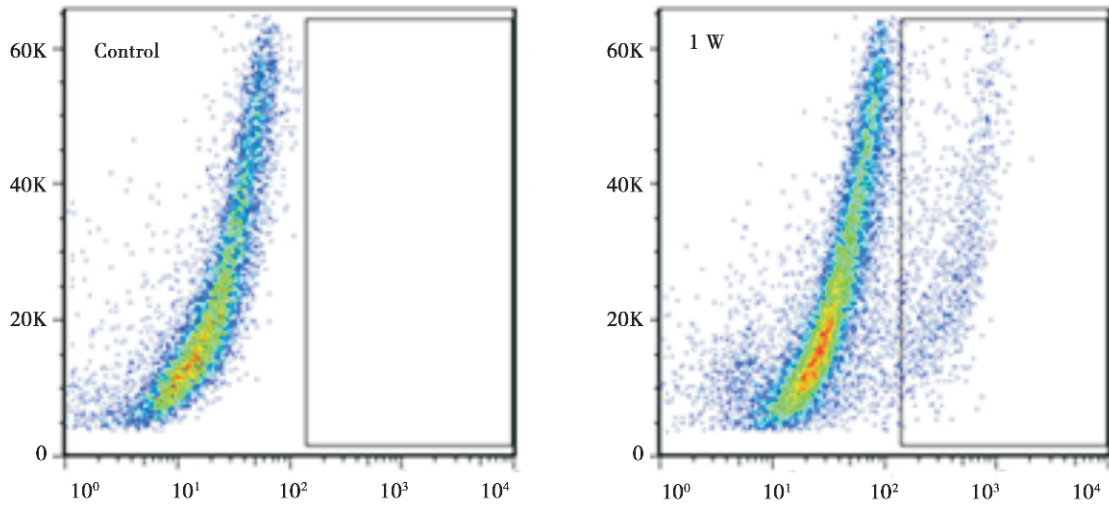


图 5 出生 7 d 的 C57 小鼠心脏组织流式分选结果比对

Fig.5 The flow sorting results of heart tissue of 7d C57 mouse

The sorting positive rate was about 4.62% when used 7d C57 mouse as sorting object.

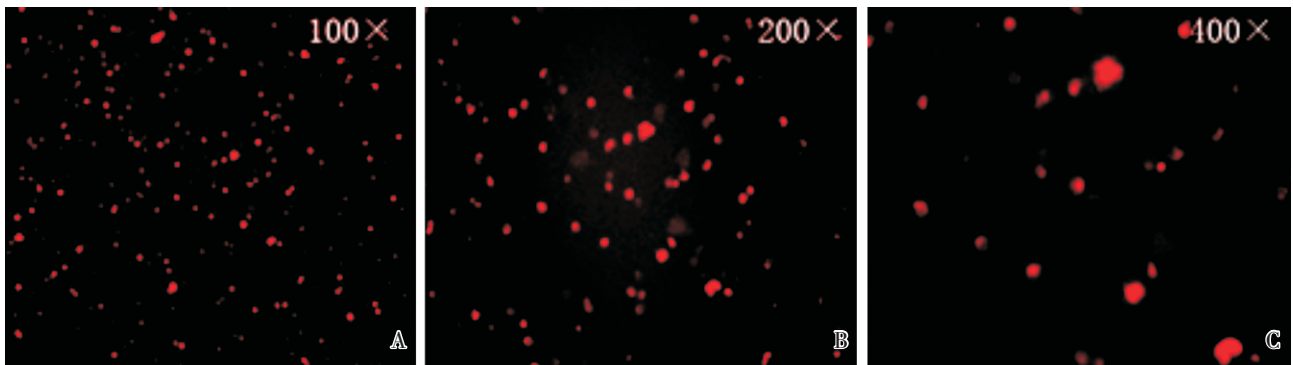


图 6 分选获得的阳性细胞。

Fig.6 The positive cell via flow sorting

Magnifications are indicated on each image.

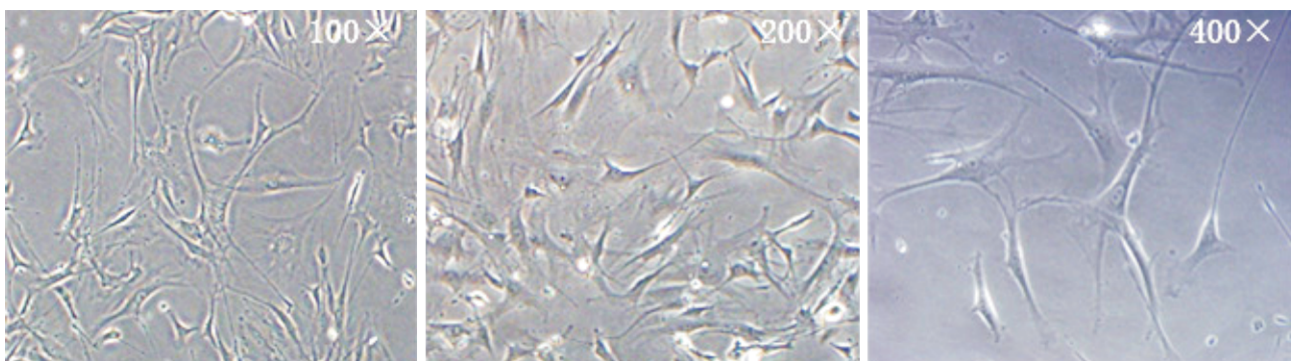


图 7 光镜下培养 14 d 后 CD51⁺ 细胞的形态特征

Fig.7 Morphological characteristics of CD51⁺ cell after 14d

Magnifications are indicated on each image.

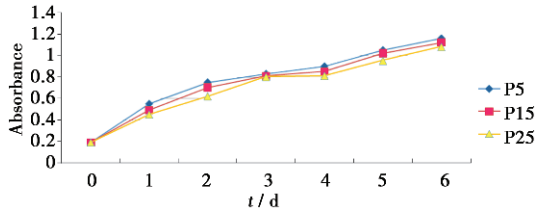


图 8 CCK8 检测 CD51⁺细胞的增殖能力

Fig.8 The proliferative capacity of CD51⁺ cells detected by CCK8 test

对于心脏来源的 MSC 细胞的研究还比较少。

MSC 除了来源于骨髓外,有报导从脑、肝、脾、肾、肺、胰腺、肌肉等组织中也分离出类似的 MSC 样细胞,并证实了这些细胞具有像骨髓来源 MSC 一样自我更新及向成脂、成骨分化的能力,通过对这些不同来源 MSC 样细胞的细胞膜表面蛋白进行分析,可以发现在这些标志中的 8 个(CD49b, CD73, CD90, CD105, CD130, CD146, CD200 和整合素蛋白 α_v/β_5) 可用于从骨髓或其他部位的细胞中分离出 MSC 及 MSC 样细胞^[9-10]。在 2011 年 Pierantozzi 等人首次报道了人心脏组织中存在 MSC 样细胞,该试验首次通过组织块培养法获得该类细胞,经过 FACS 鉴定分选这群细胞中的一部分表达 MSC 相关标志 (CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, 和 HLA-ABC),且进一步实

验证实这些细胞具备 MSC 的基本特性:多向分化能力、支持造血等特征^[2]。这一发现为应用成体干细胞技术再生修复心肌组织提供了另一种可能的细胞来源,但其分离方法特异性较差,容易在培养中混入心肌细胞、纤维细胞等杂细胞而限制了其进一步研究及应用。2013 年 Pinho 等人报导了 CD51 标记广泛分布于骨髓 MSC 细胞表面,可作为骨髓 MSC 的分选标记用于该类细胞的定向分选^[6],同时 Calloni 等人归纳总结了目前发现的各组织部位 MSC 样细胞的表面标志物情况,发现 CD51 还广泛分布于多部位的 MSC 样细胞表面^[5],这一结果为实现特异性分离该类 MSC 样细胞提供了一定依据,但是对于心脏中是否存在该类 CD51⁺细胞及该类细胞是否为 MSC 样细胞并未做进一步研究。本研究对心脏组织中 CD51 标志的表达、阳性细胞分布及其多向分化能力做了初步探究。

CD51 实质为整合素蛋白 α_v ,定位于细胞膜,可在调控胚胎器官形成、血管生成中发挥重要作用^[5]。在本试验中我们观察到 CD51 在相同年龄不同个体小鼠之间稳定表达,而进一步实验发现随着年龄的增长、组织的成熟,表达量逐渐减少,提示 CD51 可能与成体干细胞具有密切的相关性。同时通过荧光染色也发现其表达量随着小鼠年龄增大而减少的现象。在 7 d 小鼠的心脏切片中发现

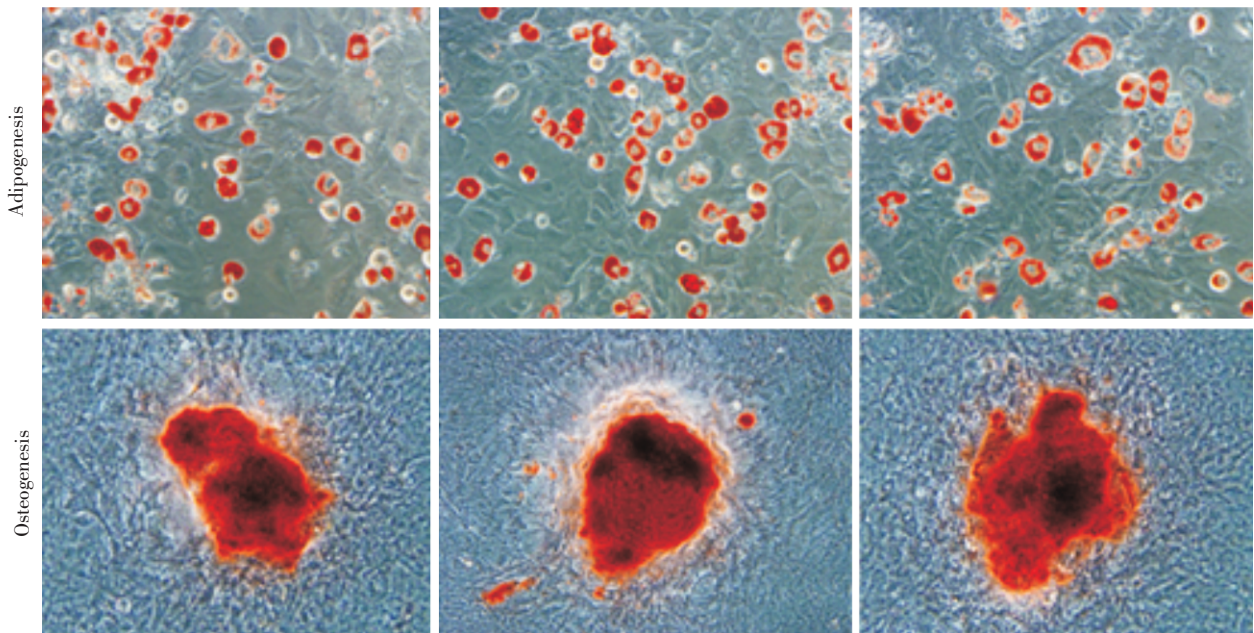


图 9 诱导成脂和成骨分化

Fig.9 Adipocytes shown by oil-red-O and osteoblasts shown by Alizarin Red

CD51⁺细胞广泛存在,主要分布于心房外壁、心室外壁及心室壁内,而当研究对象换为 3 m 小鼠心脏切片时发现 CD51 的表达量明显减少,只有在上述同样部位可以观察到较少的阳性细胞。

传统上我们将来源于骨髓、具有稳定表型培养时细胞呈单层贴壁生长,可以维持在未分化状态并具有自我复制能力,同时还保留了向骨、软骨、脂肪、肌肉等间叶组织分化的能力的一类细胞称之为 MSC^[11]。而在近些时候陆续有关于在其他部位分离出具有与 MSC 相似的形态、表型及分化能力的 MSC 样细胞的报道^[12]。同样地,我们特异地使用 CD51 标志分离目标细胞并进行培养鉴定,发现这群来源于心脏组织的细胞群体可以贴壁生长并在一定程度上具有与传统骨髓来源的 MSC 相似的形态学特征,并且在增殖实验中表现出在不同代数(P5、P10、P25)培养时仍有相似的增殖能力,并有继续增殖的趋势,说明该群 CD51⁺细胞具有较强的增殖能力;另一方面诱导分化实验证实了这群细胞具有向脂肪、骨组织分化的能力,说明这一群细胞同样具有多向分化能力,但是也表现出与之前所报道的骨髓来源 MSC 细胞所不同的分化程度及分化能力,其诱导成骨、成脂肪的能力较骨髓来源的 MSC 有所下降,这也许是由于受到起源部位——心脏的局部环境影响所致。2004 年 Fuchs 等人报道了关于同类干细胞由于所处微环境不同而影响其产生不同表型的研究,反映了干细胞所处并发生相互作用的微环境在干细胞表型形成时发挥至关重要的作用^[13],这一观点进一步印证了分化实验的结果。

综上,本实验结果可以说明,该群 CD51⁺细胞为来源于心脏组织的 MSC 样细胞,其具有与传统骨髓来源的 MSC 相似的增殖能力及分化潜能,但也表现出不同的生物学特性,可能是因为起源微环境的差异所致。这提示我们该类来源于心脏的 MSC 样细胞也许较来源骨髓或其他部位的 MSC 细胞具有不同的功能,可能在治疗特定的疾病(如心脏疾病)方面有更多的优势。但是是否存在这些优势及优势背后的机制还不清楚,需要后续的研究进一步证实,其结果可能有助于探究干细胞治疗心脏疾病的有效机制及找寻新的治疗方法。

参考文献

[1] Andersen DC, Andersen P, Schneider M, et al. Murine

“cardiospheres” are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7): 1571–1581.

- [2] Enrico P, Barbara G, Ivana M, et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2 [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(5): 915–923.
- [3] Lucio B, Elisa M, Alessandro G, et al. Endogenous cardiac stem cells[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 50(1): 31–48.
- [4] Dean S. Roles of av integrins in vascular biology and pulmonary pathology[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(5): 552–557.
- [5] Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, et al. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(9): 1455–1476.
- [6] Sandra P, Julie L, Maher H. PDGFR and CD51 mark human Nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(7): 1351–1367.
- [7] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration[J]. *Cell*, 2003, 114(6): 763–776.
- [8] Di FV, De LA, Colorito ML, et al. Cardiac stem cell research: an elephant in the room? [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009, 292(3): 449–454.
- [9] Dolorme D, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture -amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2631–2635.
- [10] Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(8): 962–971.
- [11] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143–147.
- [12] Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(9): 962–971.
- [13] Fuchs E, Tumber T, Guasch G, et al. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche [J]. *Cell*, 2004, 116(6): 769–778.

(编辑 孙慧兰)