

Nestin 阳性细胞在小鼠心肌组织中的表达及分布特征

吴冰原¹, 李桂兰², 姜美花², 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.干细胞与组织工程研究中心,广东 广州 510080)

摘要:【目的】了解 Nestin 在小鼠正常和损伤心脏组织中的表达及分布特征,探讨 Nestin 能否作为心肌干细胞的标志物。【方法】通过倒置荧光显微镜观察、RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测,分析 Nestin 在胚胎期 13.5 d、出生后 1 d、7 d、1 月、3 月的 Nestin-GFP 转基因小鼠心脏组织中的表达情况;建立小鼠心肌梗死模型,观察损伤后心肌组织中 Nestin 的表达情况;利用免疫荧光染色法检测小鼠心脏组织中 Nestin 与多种干细胞标记物的共表达关系。【结果】胚胎 13.5 d Nestin 表达主要集中于大脑、脊髓、视网膜等部位,但在心脏组织中也可观察到 Nestin 的绿色荧光,小鼠出生后 Nestin 的表达随着小鼠年龄的增加而逐渐减少,并且 RT-PCR、Q-PCR 的结果显示 Nestin 表达同样呈递减趋势。在梗死部位的心肌组织中可见 Nestin 阳性的细胞较正常组织显著增多。可见 Sca-1、c-kit、Isl-1、Nkx2.5 在心肌组织中广泛表达,但是未与 Nestin 共表达,而 Nestin 在正常与损伤组织均可与 musashi-1、vimentin 共表达。【结论】Nestin 与心脏发育成熟有密切的关系,可能为神经外胚层来源的一类心肌干细胞。

关键词: Nestin, 心肌干细胞, 心肌再生。

中图分类号: Q254

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)04-0505-08

Expression and Distribution Characteristics of Nestin-positive Cells in Myocardial Tissue of Mouse

WU Bing-yuan¹, LI Gui-lan², JIANG Mei-hua², PENG Chao-quan^{1*}

(1.Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China; 2.Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】The main aim of this study was to systematically evaluate the expression patterns of the Nestin in the developing or damaged adult heart issue, and probe into whether Nestin can be as a marker of cardiac stem cell.【Methods】Nestin expression was assessed in the embryonic 13.5 d and postnatal 1 d, 7 d, 1 month, 3 months old Nestin-GFP transgenic mouse heart tissue by fluorescence microscopy, real-time quantitative PCR and RT-PCR. Myocardial infarction model was established by ligation of left anterior descending coronary in adult Nestin-GFP mice and the Nestin expression was observed in the myocardium at 7d after injury. Then, the correlation between Nestin and other stem cell markers expression in mouse heart tissue were determined by immunofluorescent assay.【Results】In embryonic 13.5 d, the Nestin mainly expressed in the brain, spinal cord, and the retina, and also can be observed in the heart tissue. After the mouse was born, Nestin expression is gradually reduced with growth, and that was also confirmed by the RT-PCR and Q-PCR analysis. Nestin-positive cells increased significantly in myocardial infarction area compared to the normal tissue. Sca-1, c-kit, Isl-1, and Nkx2.5 were widely expressed in heart tissue, but not co-expressed with Nestin. However, in normal and injured tissue, Nestin was co-expressed with vimentin and musashi-1, neural cell marker.【Conclusion】These results indicate that Nestin expression is highly correlated with cardiac development, and the Nestin-positive myocardial cell might be arise from neural lineage cells, which suggest that such cells play an important role in the growth and maintenance of the cardiogenesis and regeneration.

Key words: Nestin; cardiac stem cells; myocardial regeneration

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4):505-512]

收稿日期:2013-04-19

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800125)

作者简介:吴冰原,医学硕士,研究方向:Nestin 与小鼠心肌干细胞的关系,E-mail:wuby0322@163.com; * 通信作者:彭朝权,教授,硕士生导师,E-mail:pengcq123456@163.com

目前普遍认为成体心肌干细胞是最有希望达到心肌细胞完全再生的干细胞类型,但其并没有明确、特异的表面标志,因此寻求统一的体外分离心肌干细胞群的细胞生物学或遗传学标志物成为近年来生物学家们研究的热点^[1]。Nestin 作为中间丝蛋白家族成员之一,在胚胎发育过程中广泛表达,最早的表达时间出现在胚胎发育第 7.5 天(E7.5)的单细胞神经外胚层^[2]。在早期胚胎发育阶段,大多数 Nestin 阳性细胞代表了增殖旺盛的干/祖细胞群,而这群细胞一旦开始分化或者停止分裂,Nestin 表达开始下降并逐渐被其他组织特异性的中间丝蛋白所取代。同时,Nestin 阳性细胞在成体组织中也有一定分布,例如中枢神经系统的侧脑室下区、海马齿状回颗粒细胞层下区、嗅球神经上皮祖细胞等,在一定条件下这些细胞可以增殖、分化和迁移,具有成体干细胞的特性^[3]。值得关注的是,在组织损伤发生时,可以观察到部分 Nestin 阴性细胞重新表达 Nestin 并进入细胞增殖和迁移状态^[3-4]。有研究报道,在心肌缺血损伤后有 Nestin 阳性细胞可迁移到缺血坏死区域参与神经和血管的再生。因此,我们通过观察正常和损伤心脏组织 Nestin 的表达情况以及与几种干细胞的标志物的共表达情况,为 Nestin 能否作为心肌干细胞的标志物提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选择胚胎期 13.5 d、出生后 1 d、7 d、1 个月和 3 个月的 C57BL/6 遗传背景的 Nestin-GFP 转基因小鼠为实验动物,由日本熊本大学提供,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 免疫荧光染色所用一抗 Nestin 抗体购于美国 Millipore 公司,干细胞因子受体(c-kit)抗体、干细胞抗原-1(Scd-1)抗体、胰岛因子-1(Isl-1)抗体购于 abcam 公司,Nkx2.5 抗体购于 Santacruz 公司,波形蛋白(vimentin)抗体购于 abcam 公司,musashi-1 抗体购于 Sigma 公司,二抗包括山羊抗小鼠和山羊抗兔 IgG 抗体均购于 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要实验仪器和器材 冰冻切片机(Leica 公司 CM1900),激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss 公

司),荧光倒置显微镜(Olympu 公司 IX71-22FL/PH),PCR 试剂盒(Fermentas 公司),PCR 仪(Biorad 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司),RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司),Light Cyclor480 Detection System(Roche 公司)。

1.2 组织的冰冻切片制作

将小鼠 13.5 d 的胚胎和出生后 1 d、7 d 的 Nestin-GFP 小鼠心脏组织直接放入 40 g/L 多聚甲醛,4℃固定 6~10 h。1 个月、3 个月的 Nestin-GFP 小鼠,先行 40 g/L 多聚甲醛心脏灌注,随后取出组织放入多聚甲醛 4℃固定 12 h。用 300 g/L 蔗糖对已固定好的各年龄的小鼠组织过夜脱水。常温下,将组织在液态 OCT 包埋剂中在切片托上调整好位置,转移至-20℃,使包埋剂凝结呈固体状,待冰冻切片机温度降至-20℃后对已包埋好的组织行 6 μm 厚度的切片。切片于-20℃避光保存。

1.3 组织免疫荧光染色

0.01 mol/L 的 PBS 冲洗组织上的 OCT 后,用含 5 g/L TrionX-100 的 0.01 mol/L 的 PBS 对组织透化处理 40 min,后山羊血清封闭 30 min。吸出血清后加入一抗抗体 Sca-1 (1:100 稀释)、c-kit (1:100 稀释)、Isl-1 (1:150 稀释)、Nkx2.5 (1:100)稀释、vimentin(1:100 稀释)、musashi-1(1:100 稀释)、后于 4℃过夜,次日取出在室温复温 30 min,0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入相应二抗,室温孵育 1 h,0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min。用 DAPI 染核 5 min,0.01 mol/L 的 PBS 漂洗后加入 20 μL 荧光封片剂封片,封好片的样品可于荧光倒置显微镜或激光共聚焦照相系统下观察拍照。

1.4 心脏组织各时期 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR

根据 Trizol 说明书,整个过程注意防止 RNase 污染。将新鲜的心脏组织取出后立即放至消毒好的碾磨器,并立即在碾磨器中加入液氮,待液氮挥发干用碾磨器将组织碾磨成粉末状,加入 1 mL Trizol 于碾磨器中按照 Invitrogen 公司提供的方法提取 RNA。对提取的 RNA 检测纯度和浓度,并使用 Fermentas 公司的逆转录试剂盒完成逆转录反应。对逆转录合成的 DNA 应用 Fermentas 公司的 PCR 试剂盒完成普通 PCR 反应,PCR 引物 Nestin 上游为 5'-TCGCCAGGAGGAGGCCATT-3',下游

为 5'-CTCCCCAGCCCTCCCCAGAC-3', 扩增片段 194 bp, PCR 反应体系为 20 μ L, 反应结束后经过琼脂糖电泳、溴化乙锭染色后在凝胶成像系统下观察成像并记录结果。实时荧光定量 PCR 应用 10 μ L 的反应体系, 在 LightCycler480 (roche) 上行如下程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 而后开始做 40 个循环, 循环程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸一步时收集荧光信号。循环完成后, 做融解曲线步骤。结束后, 使用 PCR 仪器配套分析软件进行相对定量的比较试验。

1.5 小鼠心肌梗死模型的建立和观察

用冠状动脉结扎法制作小鼠心肌梗死模型: 将体质量在 20~25 g 的约 3 个月大的 Nestin-GFP 小鼠用 40 g/L 的水合氯醛腹腔注射麻醉后, 气管插管连通小动物呼吸机, 后于第 3-4 肋间作约 1 cm 长的切口, 将左心耳和前室间隔沟暴露于视野下, 结扎其左冠状动脉前降支后关胸腔。心肌梗死模型制作后做心电图确认小鼠心肌梗死的存在。心梗模型建立 1 周后取实验动物心脏的损伤部分分别做横切和纵切的冰冻切片, 并于激光共聚焦

显微镜下拍照观察。

2 结 果

2.1 胚胎发育及不同年龄的小鼠心脏 Nestin 的表达

为了探讨 Nestin 在心肌组织中的表达及分布特性, 我们利用 Nestin-GFP 转基因动物观察胚胎发育及不同年龄段小鼠的心肌组织。通过在荧光倒置显微镜下观察可见: 胚胎 13.5 d Nestin 表达主要集中于大脑、脊髓、视网膜等部位, 但在心脏组织中也可观察到 Nestin 的绿色荧光(图 1)。小鼠出生后 Nestin 的表达有随着年龄的增加而逐渐减少, 在 1 d 的小鼠心脏组织中 GFP 阳性细胞数量最多, 3 个月的小鼠心脏组织中 GFP 阳性细胞明显减少, 并且 RT-PCR、Q-PCR 的结果显示, Nestin 的表达同样随年龄的增加呈递减趋势(图 2)。同时为了鉴定其在心肌组织中的表达分布特点, 我们分别观察了不同年龄的小鼠左心室、右心室及室间隔 Nestin 的表达情况, 发现在上述部位

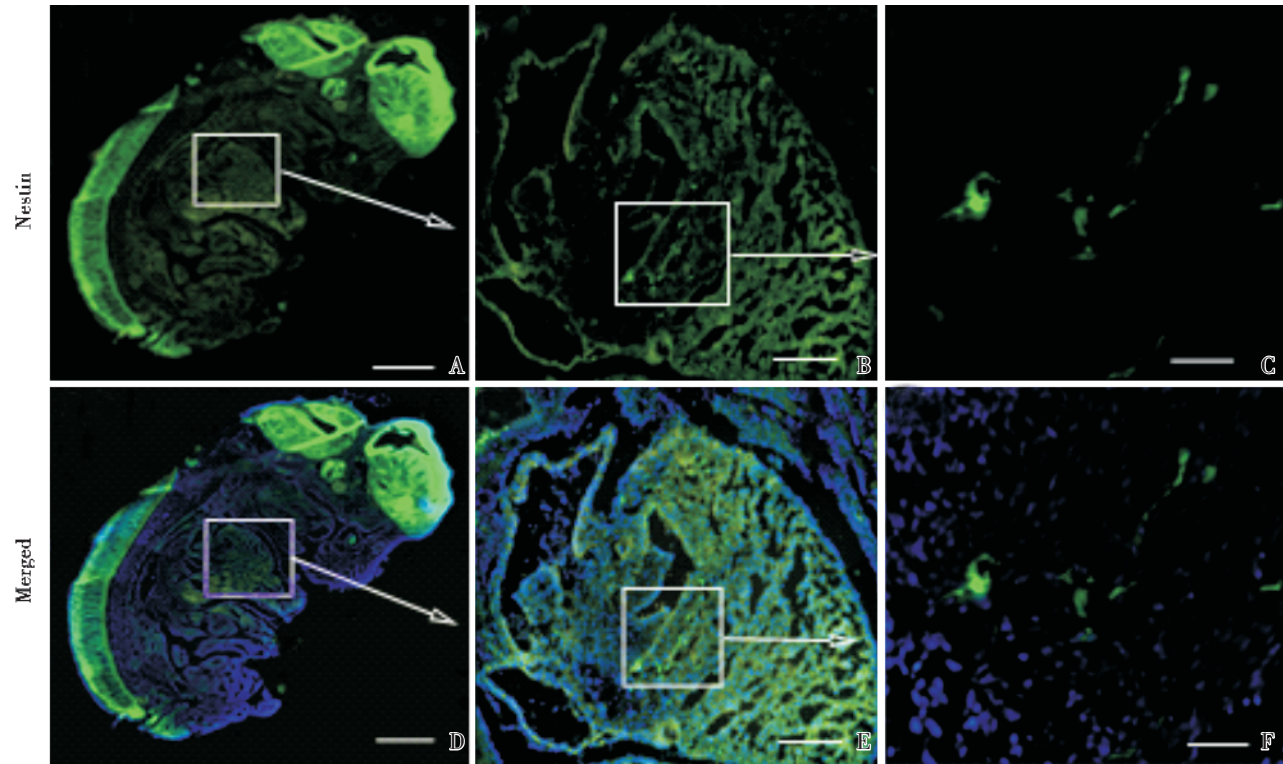


图 1 Nestin-GFP 小鼠胚胎 13.5 d 的 Nestin 表达

Fig.1 Expression of Nestin in embryonic 13.5 d Nestin-GFP mouse

A: In the 13.5 day of embryo, the expression of Nestin is mainly in the brain, spinal cord and the retina (bar = 1 mm). B: Nestin green fluorescent can be observed in the heart tissue (bar = 200 μ m). C: The expression of nestin observed under high power microscope (bar = 50 μ m).

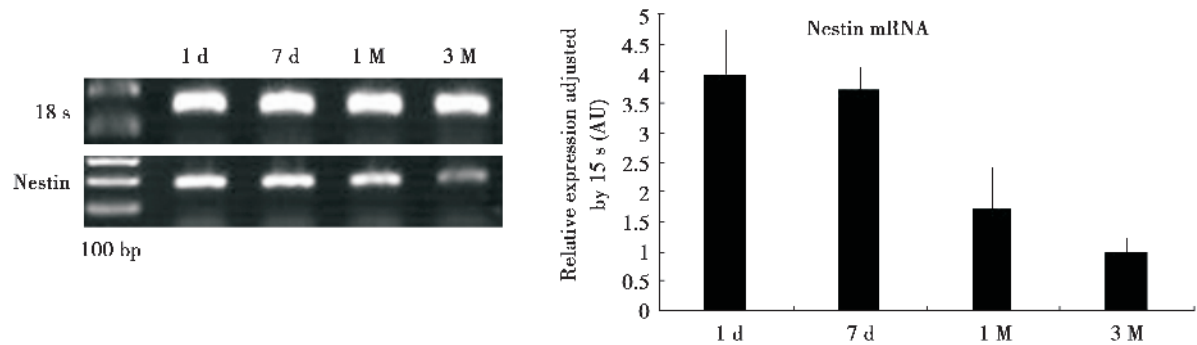


图 2 RT-PCR 和 Q-PCR 分析 Nestin 在出生后不同时期的 Nestin-GFP 小鼠心脏中的表达

Fig.2 RT-PCR and Q-PCR analysis of Nestin expression in the hearts of different ages Nestin-GFP mouse

M: month

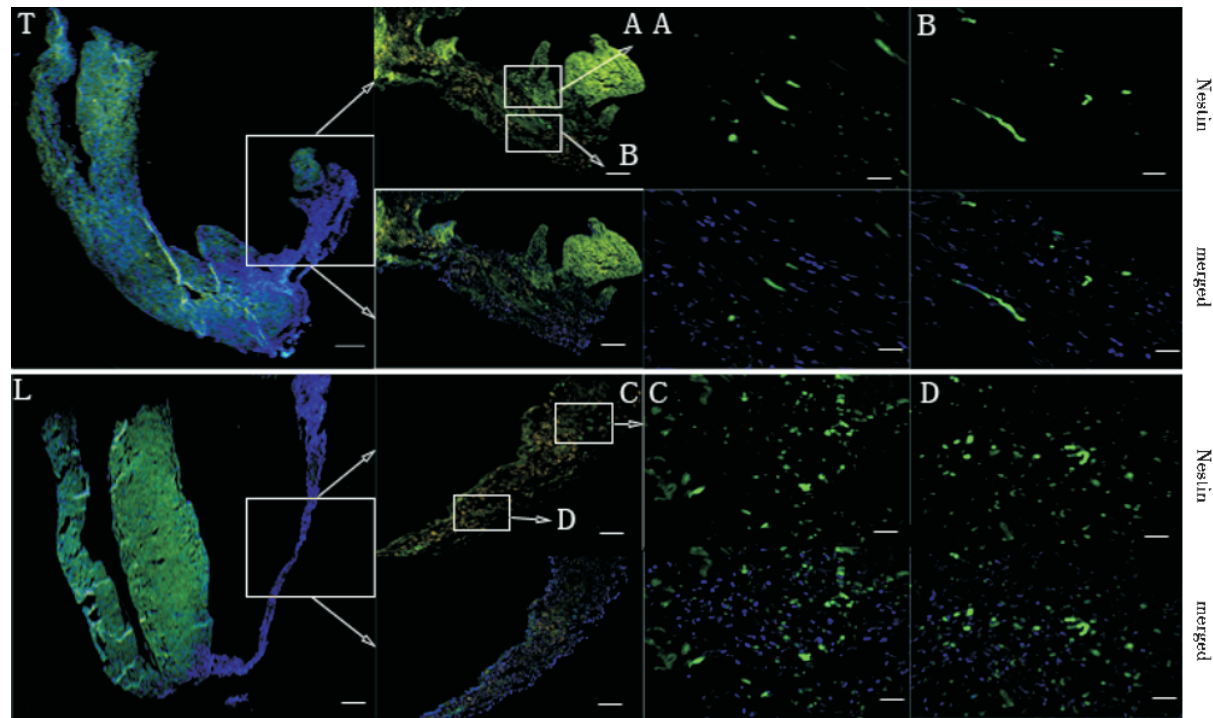


图 4 3 月龄 Nestin-GFP 小鼠心肌梗死后 1 周损伤部位 Nestin 的表达

Fig.4 Nestin expression was observed in the myocardium at 7 d after injury

The infacted heart is removed after a week, then make transverse slices (T bar = 400 μ m) and longitudinal section (L bar = 400 μ m), we can observe that the site of injury tissue (left ventricle) is significantly thinner than normal tissue and Nestin-positive cells are increased conspicuously (bar = 400 μ m).

均有 Nestin 阳性细胞的分布, Nestin 表达情况未见明显差异(图 3)。

2.2 损伤后的小鼠心脏 Nestin 的表达

为了确定是否心肌损伤以后 Nestin 表达增加,我们建立了心肌缺血小鼠动物模型。随后将心肌梗死后 7 d 的 Nestin-GFP 小鼠心脏组织做成冰冻切片,于荧光倒置显微镜下观察发现:左冠状动脉前降支被结扎后,其供血部位的心室壁明显变薄,且在梗死部位的心肌组织中出现 Nestin 阳性,

同时较正常组织处显著增多(图 4)。

2.3 心脏组织中 Nestin 阳性细胞特性

将出生后 7 d 的 Nestin-GFP 小鼠心脏做成冰冻切片,对其进行多种干细胞标记物的免疫荧光染色,并观察其与 Nestin 的共表达情况,于激光共聚焦显微镜下观察发现:已报道过的心肌干细胞相关标志物 Sca-1、c-kit、Isl-1、Nkx2.5^[5]等可见红色荧光,但是未与 Nestin 共表达(图 5)。同时在正常和损伤的心肌组织中均可见 Nestin 与 musashi-

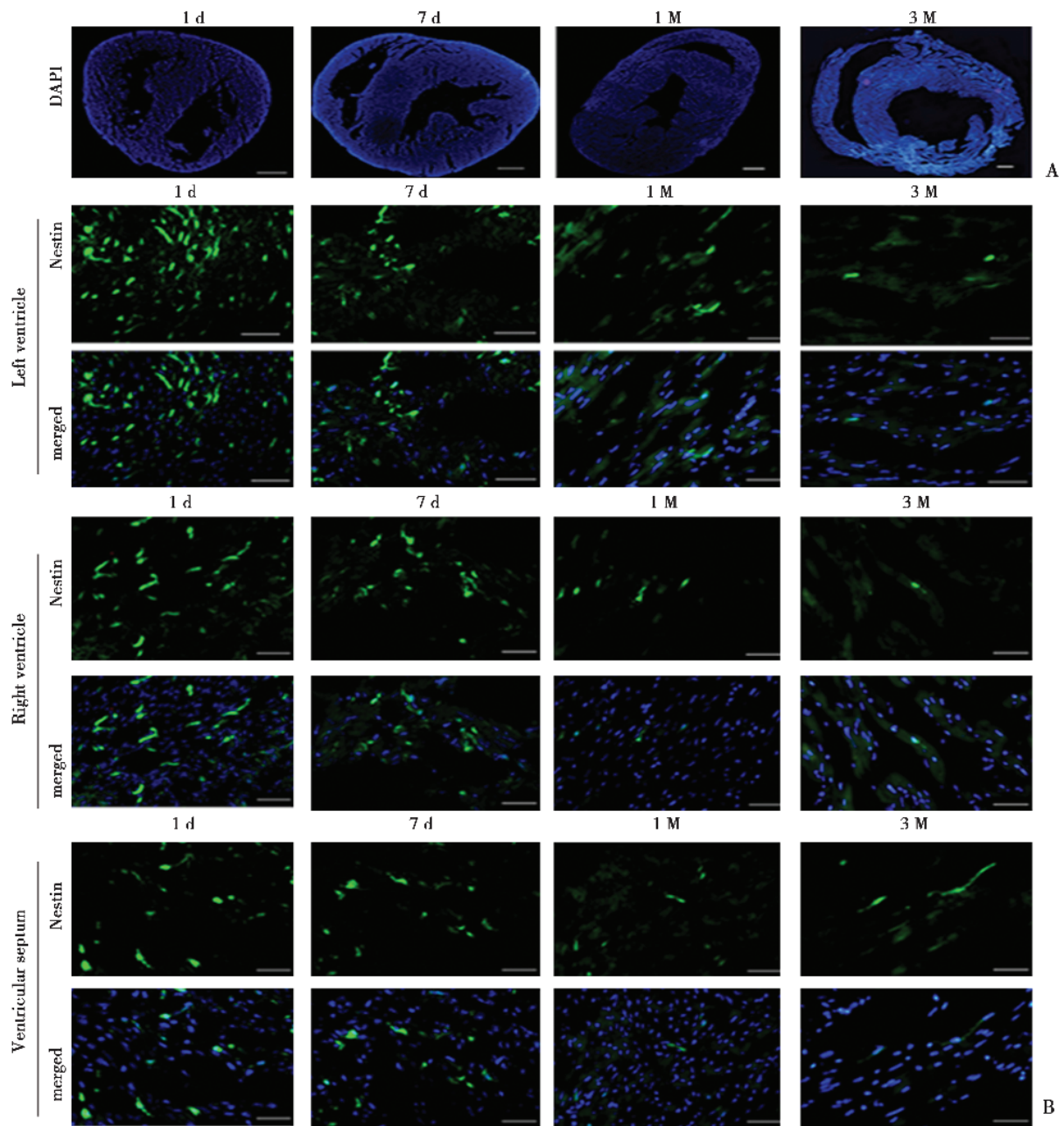


图 3 不同年龄段的 Nestin-GFP 小鼠心脏组织中不同部位 Nestin 的表达。

Fig.3 Expression of Nestin in different parts of hearts tissue, which is from Nestin-GFP mouse aged 1 d, 7 d, 1 month, and 3 months

A: The transverse slices of Nestin-GFP mice ventricular of different ages (bar = 400 μm). B: The GFP fluorescence (green) in left ventricle, right ventricle, ventricular septum of different ages Nestin-GFP mouse; Nestin expression has nothing to do with the part of heart, but it is gradually reduced with growth (bar = 50 μm). M: month

1(神经干细胞标志蛋白)、Vimentin(胚胎早期神经上皮表达)共表达(图 6、7)。

3 讨 论

2003 年, Beltrami 等^[6]首次从大鼠心肌内分离

出一类具有自我更新能力的细胞, 具有分化成心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞的能力, 而将这些细胞移植到心肌梗死大鼠心肌内, 可分化成新的心肌细胞并明显改善心脏功能。这类细胞被认为是成体心肌干细胞。Nestin 又名巢蛋白, 它定位于细胞质, 可被抗巢蛋白抗体特异性识别, 是未分化

状态多能神经干细胞的抗原标志, 目前 Nestin 阳性细胞也被看作为神经前体细胞^[7]。另外 Nestin 在机体发育不同时期的许多器官、组织、细胞中均有分布, 尤其在胚胎期分布广泛, 在成体组织中, Nestin 在胰腺^[8]、睾丸、心脏^[3]、皮肤毛囊、肾脏^[4]等中均有表达。在本实验中, 我们观察到在小鼠胚胎

期 13.5 d 心脏发育的早期即有 Nestin 的表达, 出生后第一天 Nestin 的表达量最多, 之后随着年龄的增长, 组织的成熟, 表达量逐渐减少, 提示 Nestin 可能与成体心肌干细胞具有密切相关性。

Anversa 等于 2002 年在患者移植的心脏中发现 Nestin 阳性细胞, 其同时表达心肌干细胞转录

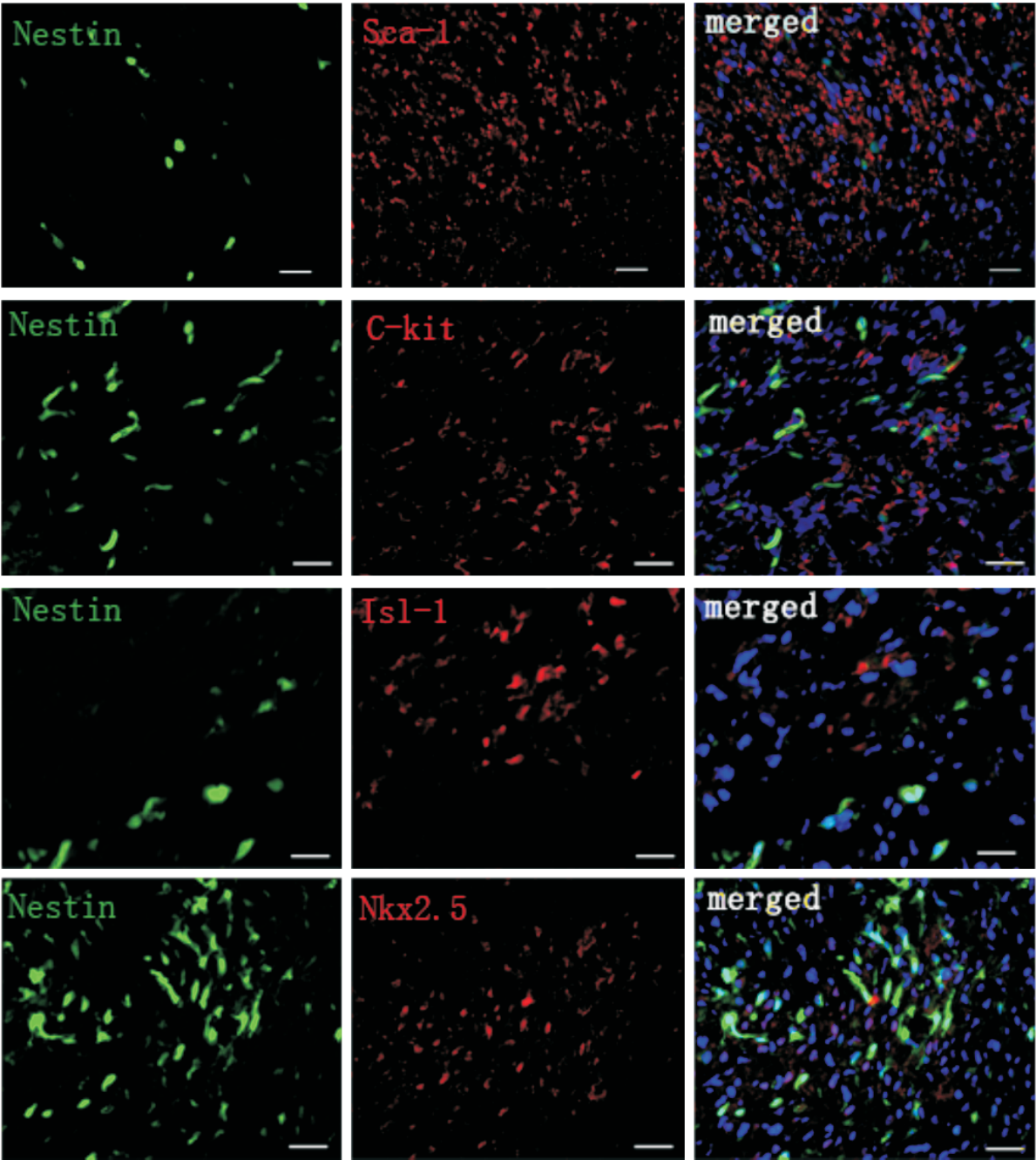


图 5 7 d 的 Nestin-GFP 小鼠心脏组织切片 Nestin 阳性细胞与 Sca-1、c-kit、isl-1、nkx2.5 的共定位免疫荧光染色

Fig.5 Immunofluorescence staining for hearts tissue of 7 d Nestin-GFP mouse with anti-Sca-1, anti-c-kit, anti-isl-1, and anti-nkx2.5 antibody

Sca-1, c-kit, Isl-1, and Nkx2.5 are widely expressed in heart tissue (red fluorescence), but not co-expressed with Nestin (green fluorescence, bar = 50 μ m).

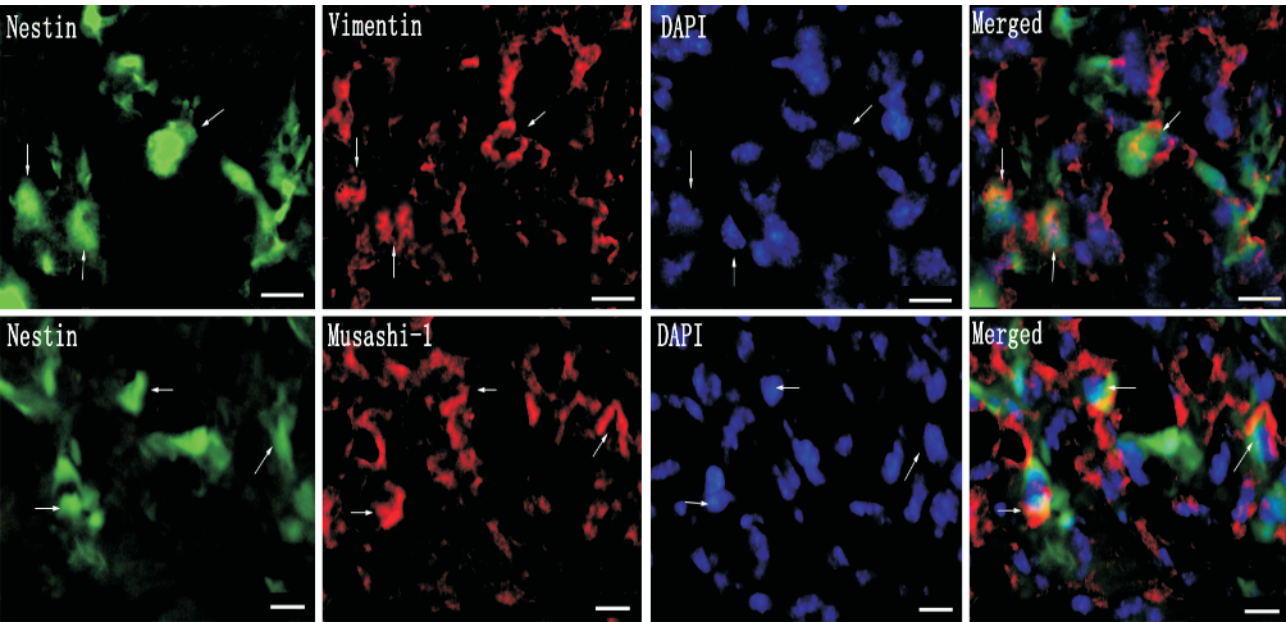


图 6 7 d Nestin-GFP 小鼠心脏组织切片 Nestin 阳性细胞与 musashi-1、vimentin 的共定位免疫荧光染色

Fig.6 Immunofluorescence staining for hearts tissue of 7 d Nestin-GFP mouse with anti-vimentin and anti-musashi-1 antibody

Nestin was co-expressed with vimentin and musashi-1 (red fluorescence, bar = 50 μm)

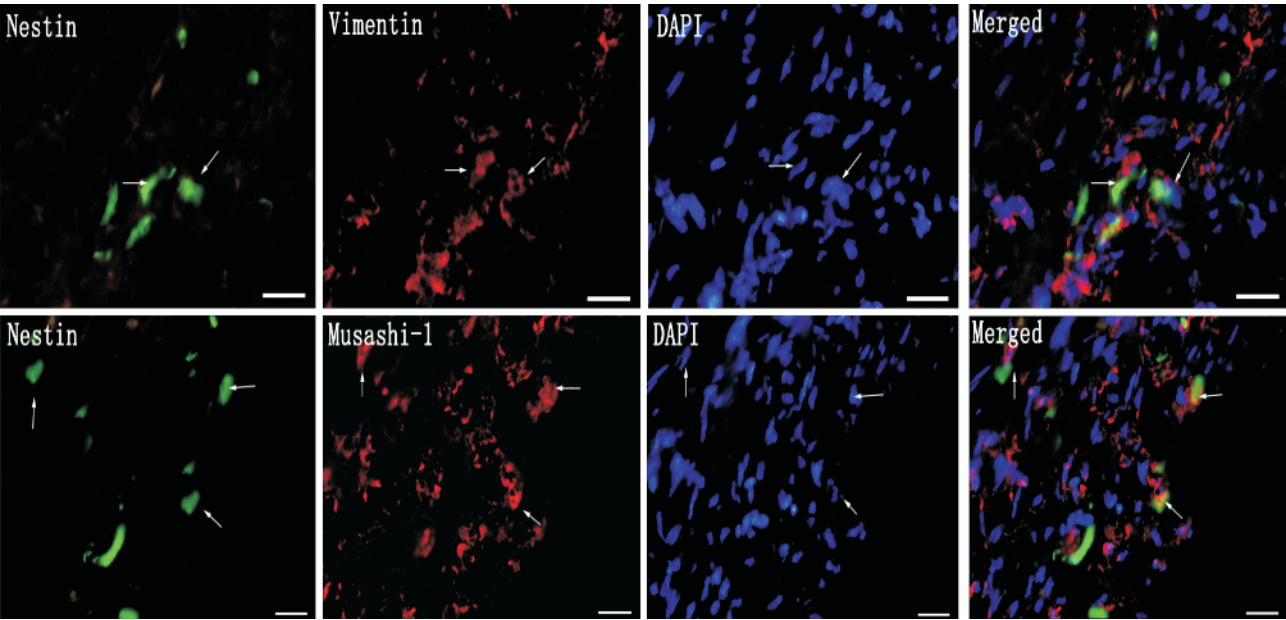


图 7 3 月龄 Nestin-GFP 小鼠心肌梗死 1 周损伤部位 Nestin 阳性细胞与 musashi-1、vimentin 的共定位免疫荧光染色

Fig.7 Immunofluorescence staining for injured hearts tissue with anti-musashi-1 and anti-vimentin antibody

Nestin was co-expressed with vimentin and musashi-1 (red fluorescence, bar = 50 μm).

因子 MEF2、Nkx2.5 和 GATA4^[9]。在心肌缺血损伤后有 Nestin 阳性细胞可迁移到缺血坏死区域参与神经再生^[10]、血管再生,甚至心肌细胞的再生^[11]。本实验亦通过建立小鼠心梗模型,来观察 Nestin 与心肌损伤的关系,结果发现损伤区 Nestin 表达

明显增多,考虑部分 Nestin 阴性细胞会重新表达 Nestin 并进入细胞增殖和迁移状态,并进一步说明 Nestin 可能通过调节中间丝蛋白的重构参与了细胞形态的改变或调节信号通路促使终末分化细胞逆转为未成熟细胞调节细胞修复过程。

目前报道成体心肌干细胞有6个亚群,包括SP细胞(side population cells)、c-kit阳性干细胞、Sca-1阳性干细胞、Isl-1阳性干细胞、SSEA-1(stage-specific embryonic antigen-1)阳性干细胞和心肌球来源的干细胞。但在心脏中存在的这6个干细胞亚群其实都是混合的细胞群体,目前并没有统一特异的表面标志。另外有报道指出,早期的中胚层细胞逐步发展成为心脏的过程中,心脏神经嵴和心外膜前体细胞也起到了重要的作用,心脏神经嵴细胞不但参与心脏流出道和大血管的形成,而且参与了心脏自主神经系统正常发育^[12]。在本研究中,我们没有观察到Nestin与上述心肌干细胞标志物Sca-1、c-kit、Isl-1以及早期心脏转录因子Nkx2.5明显的共表达,但是在正常和损伤组织中与musashi-1以及vimentin均有共表达。其中musashi-1选择性地表达在神经前体细胞上,包括神经干细胞上,在维持干细胞状态、分化等方面起着重要作用^[13],vimentin又称波形蛋白,属于第Ⅲ类中间丝蛋白,仅在胚胎早期神经上皮表达,出生后停止表达;在神经前体细胞最先表达的是Nestin,vimentin次之,随后两者共存,在几乎所有成熟中枢神经系统细胞上均不表达。由此可知,Nestin阳性的心肌细胞可共同表达对于神经系统早期发育重要的标志物,提示我们这群细胞可能存在共同的起源,在胚胎期发育早期可能来源于神经外胚层。而对于Nestin阳性的心肌细胞和心脏神经嵴细胞的关系以及Nestin能否作为成体心肌干细胞的标志物,仍需进一步实验探讨。

本实验观察了胚胎期和出生后不同时期的Nestin-GFP小鼠心脏中Nestin的表达情况,并且发现心肌梗死发生后,损伤区域Nestin的表达明显增多,提示Nestin会参与损伤的修复过程,同时在对心脏组织进行免疫荧光染色中发现Nestin未与目前发现的几种心肌干细胞标志物共表达,但是与musashi、vimentin共表达,提示Nestin阳性心肌细胞可能是神经外胚层来源的一类心肌干细胞,对于其与心脏神经嵴细胞的关系仍需进一步探索。

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] Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, et al. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 17(2): 259-273.
- [3] Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2510-2522.
- [4] Chen J, Boyle S, Zhao M, et al. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes [J]. *Am Soc Nephrol*, 2006, 17(5): 1283-1291.
- [5] 丁付燕, 吕志前, 等. 成体心肌干细胞的研究进展 [J]. *国际心血管病杂志*, 2010, 37(5): 257-260.
Ding FY, Lv ZQ, et al. Adult cardiac stem cell research [J]. *Int J Cardiovasc Dis*, 2010, 37(5): 257-260.
- [6] 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.
- [7] Frederiksen K, McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo [J]. *J Neurosci*, 1988, 8(4): 1144-1151.
- [8] Street CN, Lakey JR, Seeborg K, et al. Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker [J]. *Endocrinol*, 2004, 180(2): 213-225.
- [9] Beguin PC, El-Helou V, Gillis MA, et al. Nestin (+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart [J]. *Cell Physiol*, 2011, 226(5): 1157-1165.
- [10] El-Helou V, Beguin PC, Assimakopoulos J, et al. The rat heart contains a neural stem cell population: role in sympathetic sprouting and angiogenesis [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(5): 694-702.
- [11] Tamura Y, Matsumura K, Sano M, et al. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(3): 582-589.
- [12] Sturzu AC, Wu SM, Wu. Developmental and Regenerative Biology of Multipotent Cardiovascular Progenitor Cells [J]. *Circ Res*, 2011, 108(3): 353-364.
- [13] 张俊虎, 王建交, 郑永日, 等. 神经干细胞的鉴定 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(27): 5108-5112.
Zhang JH, Wang JJ, Zheng YR, et al. Identification of neural stem cells [J]. *Tissue Engineer Res*, 2012, 16(27): 5108-5112.

(编辑 孙慧兰)