

骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌细胞及其 内向整流钾电流特征

韦育林¹, 伍卫¹, 王景峰¹, 邓春玉³, 钱卫民³, 傅玉如², 魏菁²
(中山大学附属第二医院 1. 心内科, 2. 林百欣医学研究中心, 广东 广州 510120;
3. 广东省心血管病研究所临床电生理室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)分化为心肌细胞并探讨其内向整流钾电流(I_{K1})特征。【方法】采用密度梯度离心法和贴壁培养法分离、纯化大鼠骨髓 MSCs, 在第 3 代细胞以 5-氮杂胞苷进行诱导, 用免疫细胞化学染色和 RT-PCR 方法鉴定诱导细胞, 并采用全细胞膜片钳技术检测 I_{K1} 表达。【结果】诱导后细胞体积较诱导前增大, 呈长梭形。14 d 后细胞之间出现连接, 排列方向渐趋一致。免疫细胞化学染色显示 Desmin、 α -sarcomeric actin 和心肌特异性 cTnI 呈阳性反应, RT-PCR 结果表明诱导细胞有心肌 β 肌球蛋白重链表达。诱导细胞 I_{K1} 表达呈明显的不均一性, 部分细胞 I_{K1} 与正常心室肌细胞相似, 但 I_{K1} 电流密度总体上低于正常心室肌细胞。【结论】5-氮杂胞苷能在体外诱导 MSCs 向心肌细胞分化; 诱导细胞 I_{K1} 表达不均一性提示可能有致心律失常潜能。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 5-氮杂胞苷; 心肌细胞; 内向整流钾电流

中图分类号: R329.2; R331.3+8

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0396-04

Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocytes and Characteristics of Inward Rectifier Potassium Current of Induced Cells

WEI Yu-lin¹, WU Wei¹, WANG Jing-feng¹, DENG Chun-yu², QIAN Wei-min², FU Yu-ru³, WEI Jing³
(1.Department of Cardiology, 2.LIN Bai-xin Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3.Division of Clinical Electrophysiology of Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To study the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into cardiomyocytes *in vitro* and the characteristics of inward rectifier potassium current (I_{K1}) of induced cells. 【Methods】MSCs were isolated and purified from the bone marrow of rats by density gradient centrifugation and adhering to the culture plastic. The third passage MSCs were treated by 5-azacytidine (5-aza). The expression of Desmin, α -actin and Troponin I were observed by immunocytochemistry staining. Whole cell patch clamp technique was used to record I_{K1} . 【Results】After being induced by 5-aza, some MSCs became bigger and longer. The connection of the cells was formed. The direction of the cells arraying was similar gradually. The cells were stained positively for Desmin, α -actin and Troponin I. RT-PCR showed that these cells expressed β myosin heavy chain. I_{K1} of some induced cells was similar to ventricular myocardial cells of normal rats. On average, I_{K1} was lower in induced cells than in ventricular myocardial cells. 【Conclusion】5-aza may induce MSCs to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*. Induced cells demonstrate arrhythmic potential owing to heterogeneity of I_{K1} .

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; 5-azacytidine; cardiomyocyte; inward rectifier potassium current

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(4): 396-399]

近年研究发现骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)有惊人的可塑性, 可横向分化成多种组织细胞, 包括心肌细胞^[1,2]。实验和临床研

究均证实干细胞心肌移植已成心力衰竭治疗的新途径^[3,4], 然而, 移植行为亦暴露心律失常问题^[5,6]。目前关于移植细胞与受体心肌细胞的电生理特性

收稿日期: 2005-02-22

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2004200)

作者简介: 韦育林(1965-), 女, 广西大化人, 博士生, 主治医师。E-mail: gzweiyulin@Yahoo.com.cn

差别如何尚不清楚。内向整流钾通道电流(inward rectifier potassium current, I_{K1})的主要生理功能是稳定心肌细胞膜电位和调节动作电位3相晚期的复极,抑制 I_{K1} 可使复极过程延长,易诱发尖端扭转性室性心动过速。本实验观察5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-aza)体外定向诱导大鼠MSCs分化为心肌细胞的潜能,并采用全细胞膜片钳技术对诱导分化细胞的 I_{K1} 特征作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和溶液

健康Wistar雄性大鼠,体质量120~130 g,由中山大学动物实验中心提供。荧光标记鼠抗CD45-FITC、CD29-FITC(BD phamigen公司)和CD44-FITC、CD11b-FITC(Serotec公司);抗心肌特异性肌钙蛋白I(cTnI)抗体(Santa Cruz);鼠抗Desmin和鼠抗 α -sarcomeric actin(博士德公司);RT-PCR主要试剂购自美国Promega公司。无钙台氏液成分(mmol/L):NaCl 136, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, MgCl_2 1.0, HEPES 10.0, Glucose 10, pH 7.4。电极内液成分(mmol/L):KCl 140, MgCl_2 1.0, HEPES 10.0, EGTA 5, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 5, pH 7.2。细胞外灌流液成分(mmol/L):无钙台氏液中加入 CaCl_2 2.0, CdCl_2 0.3, 4-氨基吡啶 5.0, pH 7.4。

1.2 MSCs的分离和培养

引颈法处死大鼠。置体积分数75%乙醇中浸泡5 min,无菌条件下取出股骨和胫骨,用DMEM培养液反复冲洗骨髓腔,用密度为1.073的percoll淋巴细胞分离液离心分离单个核细胞,用培养液洗涤2次,加入体积分数10%胎牛血清的培养液悬浮沉淀细胞,按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种至培养瓶,在37℃、体积分数5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中原代培养,每3 d换液1次。当细胞生长至约90%融合时,用2.5 g/L胰蛋白酶和EDTA消化传代。

1.3 MSCs的鉴定

第3代细胞经胰酶消化、PBS洗涤后,加入荧光标记抗体,4℃孵育30 min, PBS洗去未标记抗体,10 g/L多聚甲醛固定15 min,应用FACScan流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.4 MSCs的体外诱导分化

第3代细胞经胰酶消化、PBS洗涤后,接种于6孔板及培养皿中,第3天加入5-aza(Sigma公司),使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,置于培养箱中孵育24 h,再按原培养条件继续培养。

1.5 免疫细胞化学检测

取诱导后14 d和未诱导的MSCs,用PBS洗涤,以40 g/L多聚甲醛固定30 min,再以PBS洗涤,加过氧化物酶阻断剂,正常山羊血清封闭,加一抗(鼠抗Desmin、鼠抗 α -sarcomeric actin和抗cTnI抗体),以PBS作空白对照,4℃孵育过夜,其余步骤按SP试剂盒所列步骤进行,以苏木素复染。胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性反应。

1.6 RT-PCR检测

用RT-PCR技术分别检测未诱导MSCs及诱导后2周MSCs的 β 肌球蛋白重链(β myosin heavy chain, β -MHC)mRNA表达,并以大鼠心肌组织作阳性对照。引物按GenBank进行设计,上游引物:5'-CCAAGAAGGC CATCACAGAT-3',下游引物:5'-CTCTTCCTCATGCCCTTAC-3'。用一步法提取总体RNA,逆转录过程:70℃5 min预解链,37℃延伸60 min以合成cDNA。PCR循环参数为:94℃变性5 min,接着33个循环扩增(94℃30 s, 59℃30 s, 72℃30 s),最后72℃延伸10 min。

1.7 大鼠心室肌细胞分离

用Langendorff装置,在37℃用胶原酶分离获得单个心室肌细胞,4℃保存1 h以上用于实验。

1.8 膜片钳全细胞记录

记录大鼠心室肌细胞(对照组)、诱导前MSCs(未诱导组)和诱导14 d后细胞(诱导组)的 I_{K1} 电流。电极用玻璃毛细管经电极拉制仪分两步拉制,充灌电极内液后电阻为2~5 M Ω 。记录 I_{K1} 参数:钳制电压-40 mV,指令电位从-140~70 mV,步长15 mV,持续时间300 ms,刺激频率1 Hz,测量刺激结束时电流即为 I_{K1} 。电流密度为电流除以电容,单位pA/pF。在全细胞记录过程中,刺激脉冲的产生和信号采集均由pCLAMP7.0软件(美国Axon)完成,离子电流通过膜片钳放大器(美国Axon 200B)放大,经AD/DA转换板输入IBM-PC机硬盘中。

2 结果

2.1 镜下观察

接种后4~5 h开始少量细胞贴壁,呈圆形。24 h后约80%~90%细胞贴壁。首次换液,去除未贴壁细胞造血干细胞后,贴壁细胞中见少许逗点状或短棒状细胞,并开始分裂增殖。5~8 d,细胞分裂增殖明显,形成多个集落,细胞多呈梭形,核圆居中,含1~3个核仁,10 d左右细胞长满瓶底。多次传代的MSCs呈均匀有序的成纤维细胞样分布。加入5-aza诱导后,随着时间的延长,部分细胞形态发生变化,体积逐渐增大,呈长梭形,14 d后细

胞之间出现连接,排列方向渐趋一致(图 1)。

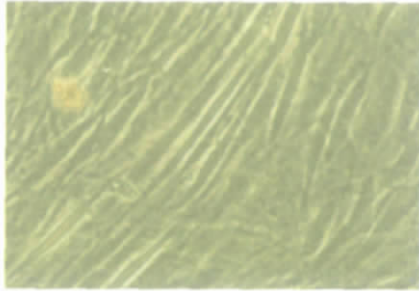


图 1 诱导分化过程 MSCs 细胞形态

Fig.1 The morphology of MSCs during differentiation

After being induced by 5-azacytidine, some MSCs became spindle-like;×200

2.2 MSCs 表面标志鉴定

流式细胞仪检测结果示 MSCs 的 CD45 和 CD11b 阳性率小于 5%,CD29 和 CD44 阳性率均在 95%以上,显示细胞均一性较好。

2.3 免疫细胞化学鉴定

诱导分化后的 MSCs 部分细胞 Desmin、α-sarcomeric actin 和心肌特异性 cTnI 免疫细胞化学染色呈阳性反应(图 2)。未诱导 MSCs Desmin 和 α-sarcomeric actin 检测呈弱阳性或阴性,未发现 cTnI 阳性反应细胞。

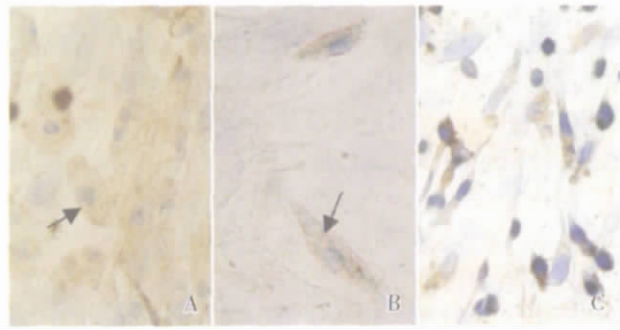


图 2 诱导后 MSCs 免疫细胞化学染色

Fig.2 Immunocytochemistry staining of induced MSCs

A: stained for Desmin; B: stained for α-sarcomeric actin; C: stained for cardiac-specific troponin I ;×400

2.4 RT-PCR 鉴定

诱导后 MSCs 有 β-MHC mRNA 表达,出现阳性条带位置与正常大鼠心肌组织(阳性对照)相同,未诱导 MSCs 未发现阳性条带出现(图 3)。

2.5 3 组细胞 I_{K1} 电流比较

MSCs 在诱导前即可记录到 I_{K1},但电流相对较弱,指令电压为-140 mV 时,未诱导组电流密度为(-3.92±2.08) pA/pF(n=16),对照组为(-18.3±2.81) pA/pF(n=20),两组有显著性差异(P< 0.001)。诱导 14 d 后细胞的 I_{K1} 具有未诱导 MSCs、对照组心室

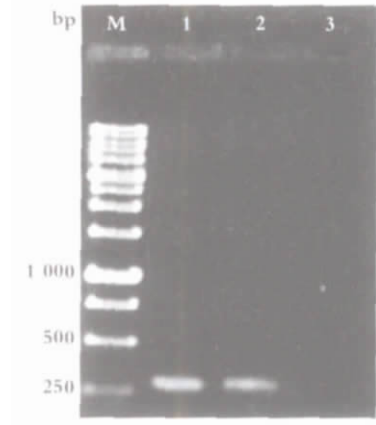


图 3 PCR 检测 β-MHC mRNA 的表达

Fig.3 RT-PCR analysis of expression of β Myosin Heavy Chain mRNA

M: marker; 1: heart tissue; 2: induced cells at day 14; 3: MSCs

肌细胞或介乎两者之间的特征,不同细胞间电流密度差别较大。指令电压-140 mV 时,诱导组电流密度为(-8.99±4.71)pA/pF (n=16),低于对照组(P< 0.01),电流密度减少了 50.9%。与未诱导组相比,诱导组电流密度显著增高(P< 0.01,图 4)。

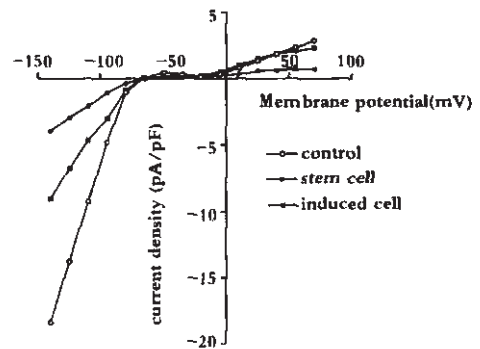


图 4 MSCs、诱导后细胞及心室肌细胞 I_{K1} 电流电压曲线

Fig.4 I-V relationship of I_{K1} density in MSCs, induced cells and ventricular myocardial cells

3 讨论

5-aza 是一种去甲基化药物,能引起 DNA 中某些胞嘧啶去甲基化。Wakitani 等^[7]发现 5-aza 能诱导大鼠骨髓 MSCs 向肌性细胞分化。推测其可能与控制向心肌分化的特异性启动子基因上的组蛋白结合,使其去甲基化,激活转录,促使其向肌性细胞分化^[8]。Makino 等^[1]与 Fukuda 等^[2]最早从小鼠骨髓 MSCs 成功诱导为心肌细胞,证实 MSCs 经 5-aza 处理后,不仅细胞形态发生改变,而且还表达心房利钠肽和脑钠肽。收缩蛋白基因分析表明,

细胞表达肌球蛋白重链、轻链和 α -actin,其表现型与胚胎心室肌细胞类似。

Desmin 是横纹肌和平滑肌中一种特殊的骨架蛋白,在维持肌原纤维形态以及肌小节之间发生信息传递方面起重要作用。 α -sarcomeric actin 是横纹肌肌动蛋白,仅存在于骨骼肌和心肌,不存在于平滑肌。肌钙蛋白是心肌细胞中一种调节蛋白,在钙离子参与下调节、控制收缩蛋白的舒缩活动。它由 3 个亚单位组成,cTnI 是其中之一。在本研究中,MSCs 与 5-aza 作用后,细胞体积较诱导前增大,而且更加细长,呈长梭形。14 d 后细胞之间出现连接,排列方向渐趋一致,从形态上向心肌细胞接近。免疫细胞化学分析,诱导分化后的 MSCs 部分细胞 Desmin、 α -sarcomeric actin 和心肌特异性 cTnI 呈阳性反应,RT-PCR 表明诱导细胞有心肌 β 肌球蛋白重链表达。这些结果提示诱导分化后的 MSCs 不仅有肌样细胞的共同特征,而且有心肌细胞特征,5-aza 启动 MSCs 心肌化过程。

心律失常发生归根到底是由于心肌细胞跨膜离子流活动异常引起。在心肌细胞上目前已知至少有 10 种钾电流,内向整流钾通道电流 I_{K1} 不仅是动作电位复极化后期主要的外向电流,而且是维持膜静息电位的重要电流。有研究证实在心力衰竭状态下心肌细胞 I_{K1} 降低,3 相复极时间延长,静息电位降低,如同时伴有钠-钙交换电流增加,易发生延迟后除极,诱发触发活动和心律失常^[9]。由此可见, I_{K1} 在心律失常发生中也起一定的作用。

干细胞的电生理特性目前研究极少,结果主要来自对胚胎干细胞的研究。有学者发现在胚胎干细胞分化为心肌细胞过程中各种离子通道电流产生并非同步^[10]。胚胎干细胞分化心肌细胞与胚胎心肌细胞离子通道电生理特性类似^[11]。Zhang 等^[12]研究证实,小鼠胚胎干细胞分化心肌细胞的动作电位至少有 3 种表型,动作电位最大上升速率 (dv/dt) 较慢,动作电位时程延长,药物易诱发早期和延迟后除极。这些结果提示胚胎干细胞作细胞移植治疗可能通过折返激动、自律性增高或触发活动中任何一种机制意外地致心律失常。

本研究结果显示,MSCs 诱导前已有 I_{K1} 表达,但较弱,经 5-aza 诱导后 I_{K1} 电流密度较诱导前明显增加,但仍较正常心室肌细胞减少。 I_{K1} 表达明显不均一,部分已接近或达到正常心室肌细胞水平,部分仍呈诱导前状态。考虑此种情况可能与诱导后各个细胞心肌化程度不同有关。本实验从电生理学角度证实 MSCs 具有向心肌分化潜能,但诱导

效率较低,此种细胞用于心肌移植可能有致心律失常危险。

参考文献:

- [1] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* [J]. J Clin Invest, 1999, 103(5):697-705.
- [2] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs, 2001, 25(3): 187-93.
- [3] 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(6):1132-40.
- [4] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, *et al.* Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure[J]. Circulation, 2003, 107(18):2294-302.
- [5] Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, *et al.* Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(12):2063-9.
- [6] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction [J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(7):1078-83.
- [7] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417-26.
- [8] Monzen K, Zhu W, Kasai H, *et al.* Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2.5 on cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(4): 493-500
- [9] Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, *et al.* Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness[J]. Circ Res, 2001, 88(11):1159-67.
- [10] Maltsev VA, Ji GJ, Wobus AM, *et al.* Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca^{2+} current in the early stages of cardiomyocyte development [J]. Circ Res, 1999, 84(2):136-45.
- [11] Doevendans PA, Kubalak SW, An RH, *et al.* Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(5):839-51.
- [12] Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, *et al.* Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential [J]. Circulation, 2002, 106(10):1294-9.

(编辑 黄小延)