

骨髓间充质干细胞向肌管状结构分化的动态

张 志, 冯 英, 谢富康

(中山大学基础医学院组胚教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨 5- 氮胞苷体外诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)向心肌细胞分化的最佳条件和体外分化的过程。【方法】体外培养 Sprague-Dawley(SD)大鼠的 MSCs, 传代至 P3、P6 或 P12; 用 5- 氮胞苷诱导, 比较不同诱导浓度组、不同诱导时间组和不同体重动物组 MSCs 的分化率, 观察诱导后细胞分化过程中形态学的变化, 并且用 cardiac troponin I、desmin 和 α -sarcomeric actin 抗体鉴定分化的心肌样细胞。【结果】P12 代较 P3 或 P6 代骨髓 MSCs 易向心肌样细胞分化并融合成肌管样结构。经 10 μ mol/L 的 5- 氮胞苷诱导 24 h 后细胞分化率为 (27 \pm 2.5)%, 20 μ mol/L 的 5- 氮胞苷诱导 24 h 后细胞分化率为 (17 \pm 2.2)%, 其它诱导浓度和诱导时间均不能诱导细胞分化; 50 g(幼年鼠)体重组细胞分化率为 (27 \pm 2.8)%, 150 g(成年鼠)体重组细胞分化率为 (15 \pm 2.9)%, 各组的差异有统计学意义。【结论】5- 氮胞苷诱导 MSCs 向心肌样细胞分化并融合成肌管样结构, 年幼的 SD 大鼠 MSCs 易向心肌样细胞分化。

关键词: 间充质干细胞; 5- 氮胞苷; 细胞分化

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)01-0033-05

Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Myotube-like Structure

ZHANG Zhi, FENG Ying, XIE Fu-kang

(Department of Histology and Embryology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To explore the most appropriate condition that 5-azacytidine induces bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into cardiomyocytes, and to observe the whole differentiating process of MSCs in vitro. 【Methods】MSCs from Sprague-Dawley (SD) rats were cultured and passaged repeatedly to P3, P6, or P12. Experimental groups were divided by various dosage of 5-azacytidine, induce time, and different weights of rats. The continuous morphological changes of the cells were observed after the treatment. Differentiated cardiomyocytes were identified by cardiac troponin I, desmin, and α -sarcomeric actin antibodies immunostaining. 【Results】P12 MSCs could more easily be induced and differentiated into cardiomyocyte-like cells than P3 or P6 and subsequently fused to form myotube-like structure. The differentiation ratio was (27 \pm 2.5)% by 10 μ mol/L 5-azacytidine for 24 hours, but only (17 \pm 2.2)% in 20 μ mol/L 5-azacytidine for the same time. Differentiation did not happen in any other groups with different inducing concentration and inducing times. The differentiation ratio was (27 \pm 2.8)% in 50 g groups compared with (15 \pm 2.9)% in 150 g groups. The difference among these groups was statistically significant. 【Conclusion】MSCs treated with 5-azacytidine could differentiate into cardiomyocyte-like cells that fused to form myotube-like structure. MSCs from neonatal SD rats could easily differentiate into cardiomyocytes than the old ones.

Key words: mesenchymal stem cell; 5-azacytidine; cell differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2006,27(1):33-37]

目前临床上治疗心肌梗死的方法包括药物治疗、介入治疗和手术治疗, 虽然能改善心肌缺血和心力衰竭, 但是不能修复坏死的心肌细胞, 因为心

肌细胞坏死后不能再生, 心肌坏死部位有成纤维细胞形成的瘢痕代替。人们希望通过诱导某些干细胞向肌肉方向分化来替代受损的肌细胞来治疗

收稿日期: 2005-08-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970237)

作者简介: 张 志(1975-), 男, 安徽肥西人, 硕士, 现在广州市番禺区大岗人民医院内科; 谢富康, 教授, 通讯作者。E-mail: frankxie

2000@ahpc.com

上述的疾病。骨髓 MSCs 有自我更新及多向分化的潜能,可分化为脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞、肝细胞、胰腺细胞、内皮细胞、肌细胞和神经元等多种细胞^[1-4]。虽然体外实验证明 MSCs 在诱导因子的作用下向成肌分化,但是细胞分化和融合成肌管的动态变化过程国内未见报道。本实验探讨 5- 氮胞苷体外诱导骨髓 MSCs 向心肌分化的最佳条件和分化过程,为下一步干细胞分化后是否有功能的研究,和体内细胞移植和临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂

纯种 Sprague-Dawley (SD) 幼年鼠(约 50 g), SD 成年鼠(约 150 g), 雄性,由中山大学实验动物中心提供。L-DMEM 培养基(Gibco)、胎牛血清(杭州四季清)、胰蛋白酶(Sigma)、5-氮胞苷(Sigma)、cardiac troponin I 单克隆抗体(Neomark)、desmin 单克隆抗体(Dako)、-sarcomeric actin 单克隆抗体(Dako)、超敏 SP 鼠试剂盒和 DAB 显色试剂盒(迈新公司)。

1.2 MSCs 的取材

引颈处死动物,750 mL/L 酒精消毒其下肢皮肤。无菌手术剪剪开皮肤,仔细分离股骨周围肌肉及结缔组织,剪开股骨两端,取出股骨。在超净台内完全剔除股骨周围的肌肉和结缔组织,用 PBS 冲洗 3 遍,注射器吸取 5 mL 左右培养基(L-DMEM 培养基+150 mL/L 胎牛血清+100 IU/mL 青、链霉素)从股骨的一端冲洗骨髓腔,所得细胞悬液按 1×10^6 /mL 的密度进行接种于 25 cm² 一次性塑料培养瓶,在饱和湿度、体积分数 5%CO₂、37 恒温条件下培养,每 12 h 在倒置相差显微镜下观察 1 次。

1.3 MSCs 的培养及纯化

细胞接种后第 3 天首次完全换液,弃去未贴壁的细胞,以后隔天换液。培养瓶中细胞融合达 90%时,结束原代培养。P1 以后细胞融合至 60%~70%进行 1 2 传代,传至第 5 代时骨髓 MSCs 基本纯化。细胞传至 P3、P6 或 P12 开始诱导。

1.4 诱导分化

1.4.1 诱导分组 根据大鼠体质量分为 50 g 和 150 g 组, MSCs 取材后反复传代至 P3、P6 或 P12 后;分别用 0、3、10、20 和 50 μ mol/L 终浓度 5- 氮

胞苷诱导 12 h、24 h 或 48 h。

1.4.2 诱导方法 细胞传代后按 50 000/孔的密度接种到 6 孔板,24 h 后用 PBS 液洗 2 遍,分别加入含不同终浓度的 5- 氮胞苷的完全培养基(L-DMEM 加体积分数 15% FBS),诱导一定时间后(12 h、24 h 或 48 h),吸去诱导液;用 PBS 洗 3 遍,换新鲜的培养基,每 3 d 换液 1 次直至实验结束,每天在倒置相差显微镜下观察。当分化的细胞有融合的趋势,用含低浓度血清的培养(L-DMEM 加体积分数 5% FBS)培养,促进细胞融合。

1.5 心肌样细胞的结构蛋白鉴定

将诱导后 2 周的骨髓 MSCs 用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次后,加入 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min;加入过氧化物酶阻断剂,室温下 10 min;加入非免疫羊血清封闭,室温下 10 min,甩干血清;加入 desmin(小鼠抗人,即用型)、-sarcomeric actin(小鼠抗兔,即用型)和 cardiac troponin I 单克隆抗体(小鼠抗人,1:200)4 过夜;加入生物素标记的二抗(兔抗小鼠,即用型),室温孵育 10 min;加亲和素-过氧化物酶(即用型),室温孵育 10 min;以上各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入临时配置的 DAB 显色液,5 min 后在显微镜下观察染色的情况。未经诱导的骨髓 MSCs 和 PBS 代替一抗作阴性对照;大鼠的心肌冰冻切片做阳性对照。

1.6 免疫阳性细胞计数

每实验组各取 6 个培养的细胞样本,10 倍镜下每个样本上随机选 4 个视野,苏木素复染细胞核后计数细胞总数和 desmin 抗体阳性细胞数(视野面积 0.25 mm²),取平均数,并计算阳性细胞所占的百分数。

1.7 统计学方法

用 SPSS 11.0 统计软件对样本进行统计检验,用 Shapiro-Wilk 方法进行正态分布检验,用 Levene's 方法进行方差齐性检验和两独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 MSCs 的细胞生长和形态学观察

原代细胞刚接种时, MSCs、血细胞和造血干细胞均为圆形,透亮。接种 24 h 后,可见许多细胞贴壁,48 h 后胞体变成梭形,多角形。培养的第 3~5

天为 MSCs 的生长潜伏期, 细胞呈现集落生长趋势。第 6~9 天为对数生长期, 细胞增殖迅速, 以梭形为主, 胞核呈卵圆形, 有 1~2 个核仁, 胞体内可见少量颗粒。也可见少量多角形细胞和圆形细胞散在分布。形成的细胞集落中心的细胞体积小, 轮廓不清(图 1A), 集落之间有细胞相互连接。原代培养第 10 天, 细胞基本达到 90% 融合。此时, 可

进行细胞传代。传代后 24 h 大部分细胞贴壁, 贴壁细胞呈较均匀的梭形或多角形。传代后的细胞生长潜伏期短, 细胞增长迅速, 3 d 后细胞基本融合。传至第 5 代, 细胞基本纯化, 细胞形态较均匀呈长梭形或多角形, 胞核内有 1~3 个核仁(图 1B), 传至第 12 代细胞生长仍较好, 未见细胞老化现象, 细胞的基本生长特性不变。

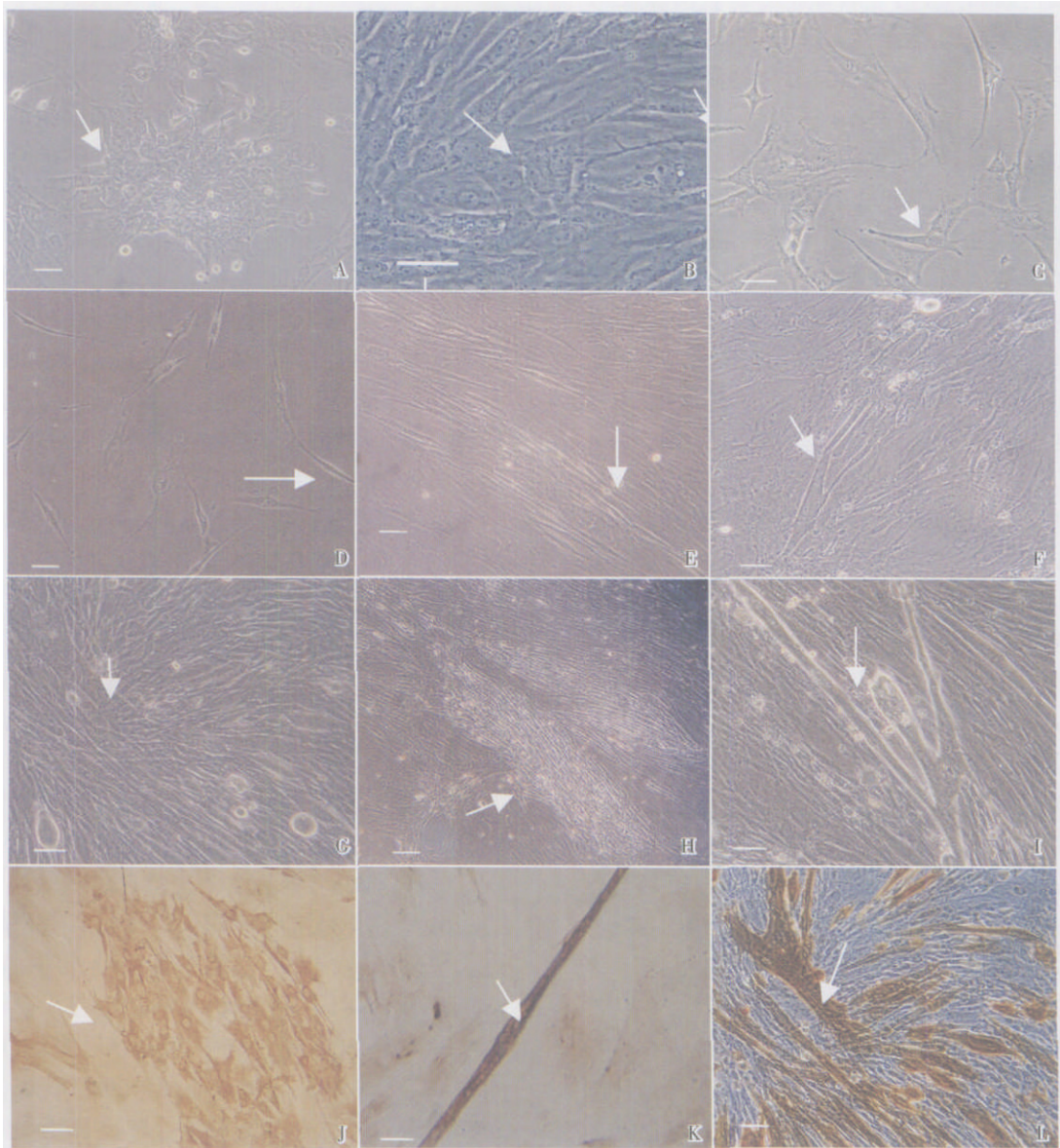


图 1 骨髓间充质干细胞及其向肌管状结构分化

Fig.1 Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to myotube-like structure ($\times 200$)

A: Mesenchymal stem cells in primary culture; B: P5 Mesenchymal stem cells; C: Mesenchymal stem cells before induction; D: Mesenchymal stem cells at 2 days after induction; E: Mesenchymal stem cells at 6 days after induction; F: Mesenchymal stem cells at 11 days after induction; G: Differentiated MSCs fused to form myotubes at 13 days after induction; H: MSCs at 14 days after induction; I: MSCs at 18 days after induction; J: Immunostaining of cardiomyocytes with anti-desmin antibody at 2 weeks after induction; K: Immunostaining of cardiomyocytes with anti-sarcomeric actin antibody at 2 weeks after induction; L: Immunostaining of cardiomyocytes with anti-cardiac troponin I antibody at 2 weeks after induction

2.2 MSCs(50 g 组)诱导后的形态学变化

P3 和 P6 的骨髓 MSCs 经诱导后未见肌管样结构形成。大鼠的 P12 代 MSCs 传代 24 h 后细胞贴壁, 细胞形态呈两大类, 一类为长梭形的细胞, 另一类为多角形细胞(图 1C)。加入含 5- 氮胞苷的完全培养基诱导后, MSCs 增殖减慢, 部分细胞死亡并从培养瓶底脱落, 诱导剂浓度和作用时间与死亡的细胞数相关。诱导后细胞形态呈动态变化, 诱导后第 2 天, 骨髓 MSCs 胞体变细、变长(图 1D)。诱导后第 6 天, 可见少量分化的细长、梭形细胞向同一方向排列(图 1E)。诱导后第 11 天, 可见少量的短棒状, 长杆状细胞散在分布; 有的细胞有融合趋势, 分支状, 可见 3 个以上的细胞核(图 1F)。诱导后第 13 天, 可见短棒状的细胞融合形成粗大的肌管样结构, 呈分支状; 也见许多细长的肌管同方向排列(图 1G)。诱导后第 14 天, 许多长杆状细胞同方向排列, 形成明显的集落, 散在分布, 集落之间出现细胞连接(图 1H)。诱导后第 18 天更多的细胞融合, 形成的肌管样结构更加粗大, 可见分叉, 下面是未分化的骨髓 MSCs(图 1I)。形成肌管样结构后, 细胞生长仍良好, 观察肌管最长存活时间 6 周。未经诱导的 MSCs 未见形成肌管样结构。

2.3 免疫组化结果

P3 和 P6 代细胞未见明显肌管样结构形成, desmin、 α -sarcomeric actin、troponin I 抗体染色均呈阴性反应。P12 代骨髓 MSCs 诱导 14 d 后呈 desmin 抗体染色呈阳性反应, 阳性细胞呈集落样分布, 集落外无阳性反应(图 1J)。分化的肌管样结构 α -sarcomeric actin 抗体(图 1K)和心肌特异性抗体 troponin I 也呈阳性反应(图 1L)。但 PBS 代替一抗做阴性对照未见免疫组化呈阳性反应。未经诱导的骨髓 MSCs 也未见上述抗体阳性反应。用 SPSS 11.0 做统计分析, 结果显示 50 g 幼年鼠骨髓 MSC 经 10 μ mol/L 5- 氮胞苷诱导后的细胞分化率为 (27 \pm 2.8)%, 而 150 g 成年鼠的细胞分化率为 (15 \pm 2.9)%, 经 Shapiro-Wilk 方法检验, $P=0.465$, 符合正态分布; 方差齐性检验结果显示, $F=0.034$, $P=0.858$, 方差齐, 故可直接进行两组独立样本 t 检验, $t=2.904$, $P=0.016$, 说明两组差异具有统计学意义, 50 g 幼年鼠骨髓 MSC 的细胞分化率高于 150 g 成年鼠的细胞分化率。而不同诱导浓度条件下骨髓 MSCs 的分化率经 Shapiro-Wilk 方法检验, $P=$

0.571, 符合正态分布; 方差齐性检验结果显示, $F=0.638$, $P=0.443$, 方差齐, 故可直接进行两组独立样本 t 检验, $t=3.214$, $P=0.009$ 说明两组差异具有统计学意义, 10 μ mol/L 浓度诱导后的细胞分化率高于 20 μ mol/L 浓度诱导后的细胞分化率。

3 讨 论

心肌细胞坏死后不能再生, 只能由成纤维细胞形成瘢痕来替代, 干细胞移植是治疗心肌梗死的一种新方法。理想的供体细胞必须满足 3 个条件: 自体来源, 无免疫排斥反应, 不存在伦理学的困扰; 体外增殖容易, 体内无恶变可能; 移植后与宿主细胞产生紧密连接, 产生有效的电机械兴奋藕联。MSCs 具有自体来源, 取材容易, 扩增能力强, 是一种体内外都具有多向分化潜能的干细胞。已有实验证明在体和体外实验 MSCs 都可向心肌分化, 并与宿主心肌细胞形成紧密连接。在体有心肌微环境促使 MSCs 分化^[5], 体外需要一些化学物质使骨髓 MSCs 发生基因改变, 启动分化基因。

5- 氮胞苷是一种去甲基化药物, 在细胞循环周期的 S 期结合于 DNA 上使碱基去甲基化。5- 氮胞苷可能启动 MSCs 向心肌分化的基因如: Nkx2.5、GATA4 和 MEF2- A/C/D^[6]。鼠的胚胎实验发现在大鼠孕后 6.5 d, 中胚层的心肌前体细胞在发育成自发跳动的心肌细胞过程中表达 Nkx2.5、d/eHAND、GATA-4 转录因子、 α -cardiac actin、desmin 和 β -MHC 基因^[7]。MSCs 向心肌分化后合成结蛋白 (desmin)^[8] 和横纹肌肌动蛋白 (α -sarcomeric actin) 等心肌结构蛋白。

5- 氮胞苷是抗肿瘤药, 浓度过高或作用时间过长可使细胞凋亡, 实验中高浓度 5- 氮胞苷(50 μ mol/l) 或长时间(48 h) 诱导后在相差显微镜下可观察到许多 MSCs 死亡并从培养瓶底脱落, 诱导两周后也未见 MSCs 分化成心肌样细胞或融合成肌管样结构。可见, MSCs 对诱导浓度和诱导时间非常敏感。取自幼年 SD 大鼠的骨髓 MSCs 较年龄老的细胞分化率高, 可能有以下 3 种推测: 年幼的动物 MSC 细胞增殖快不易自发分化以保持其多向分化的潜能; 年幼动物骨髓中具有多向分化潜能的干细胞的比例较高; 可能年幼动物的骨髓 MSCs 对 5- 氮胞苷诱导更加敏感。在本实验中我们对细胞融合达 70% 时就开始传代(1/2), 并对这些细胞

用 15%高浓度胎牛血清培养。由于高浓度的血清中含有的细胞因子多,可以保持 MSCs 处于未分化状态。增殖旺盛的细胞不易自发分化,保持未分化状态的 MSCs 对诱导成心肌至关重要^[9]。

参考文献:

- [1] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*,1999, 284(5411):143- 147.
- [2] HANADA K, DENNIS J E, CAPLAN A I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(10): 1606- 1614.
- [3] DEB A, WANG S, SKELDING K A, et al. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients[J]. *Circulation*, 2003, 107(9): 1247- 1249.
- [4] THEISE N D, BADVE S, SAXENA R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in

mice after radiation - inducement yeloablation [J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 235- 240.

- [5] 曹 丰,贾国良,牛丽丽,等.移植时机对骨髓间充质干细胞修复梗死心肌的影响[J].*第四军医大学学报*, 2005, 26(1):22- 27.
- [6] FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. *Artif Organs*, 2001, 25(3):187- 193.
- [7] AUDA - BOUCHER G, BERNARD B, FONTAINE - PERUS J, et al. Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors [J]. *Developmental Biology*, 2000, 225(1), 214- 225.
- [8] 华 平,熊利华,张 华,等.体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2004,25(1):68- 69,76.
- [9] LIU Y, SONG J, LIU W , et al. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells:does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? [J]. *Cardiovascular Research*, 2003, 58(2): 460- 468.

(编辑 张恩健)

(上接第 10 页 from page 10)

- [3] CLAUSE L R, KRISTIANSSEN M T,RASMUSSEN L M, et al. Growth hormone receptor expression and function in pituitary adenomas[J].*Clin Endocrinol*, 2004, 60(5) :576- 583.
- [4] FAZEKAS I, HEGEDUS B, BACSY E, et al. Characterization of human pituitary adenomas in cell cultures by light and electron microscopic morphology and immunolabeling[J].*Folia Histochem Cytobid*, 2005, 43(2):81- 90.
- [5] ISHIWATA I, ISHIWATA C, IGUCHI M, et al. Biological characteristics of cultured cells derived from various types of human brain tumors[J].*Hum Cell*,2004, 17(3) : 117- 124.
- [6] 杨 地,吴耀晨.垂体腺瘤细胞培养的实验研究[J].*现代临床医学生物工程学杂志*, 2001, 7(5):355- 356.
- [7] FLORIO T, THELLUNG S, CORSARO A, et al. Characterization of the intracellular mechanisms mediating somatostatin and lanreotide inhibition of DNA synthesis and growth hormone release from dispersed human GH-secreting pituitary adenoma cells in vitro [J].*Clin Endocrinol*,2003, 59(1):115- 128.
- [8] JONES T H, JUSTICE S K, PRICE A. Suppression of tyrosine kinase activity inhibits [3H]Thymidine uptake

in cultured human pituitary tumor cells [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82 (7) :2143- 2147.

- [9] ARMATI PJ, CONSTABLE AL, LLEWELLYN F. A new medium for in vitro peripheral nervous tissue myelination without the use of antimetabolites [J]. *J Neurosci Methods*, 1990, 33(2- 3):149- 155.
- [10] SORDILLO L M, OLIVER S P, AKERS R M. Culture of bovine mammary epithelial cells in D -valine modified medium: selective removal of contaminating fibroblasts[J]. *Cell Biol Int Rep*, 1988,12(5): 355- 364.
- [11] HONGPAISAN J. Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D -valine in cultures of smooth muscle cells from human myometrium [J]. *Cell Biol Int*, 2000,24(1):1- 7.
- [12] PADMANABHAN V, FRIDERICI K H, CONVEY E M, et al . D -valine medium maintains prolactin production in primary culture[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1982, 28(3): 613- 626.
- [13] LAZZARO V A, WALKER R J, DUGGIN G G, et al. Inhibition of fibroblast proliferation in L -valine reduced selective media [J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1992, 75(1):39- 48.

(编辑 刘清海)