

体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞

华平¹, 熊利华¹, 张华¹, 陈炬¹, 张惠忠¹, 闵军²

(中山大学附属第二医院 1. 心胸外科, 2. 干细胞研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨体外培养定向诱导大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)向心肌样细胞分化的潜能。【方法】取大鼠下肢骨髓,分离培养MSCs,用5-氮胞苷(5-aza)定向诱导24h,相差显微镜下观察其形态变化,免疫组化法检测肌钙蛋白(cTnT)和心肌细胞结蛋白(desmin)表达,并通过RT-PCR对肌球蛋白重链(MHC)在细胞中的表达进行鉴定。【结果】MSCs经5-aza诱导后,部分细胞呈梭形,并可见肌管样结构。免疫组化检测示诱导后MSCs的cTnT阳性细胞数为15%,Desmin表达强阳性,RT-PCR示诱导后MSCs有MHC表达。【结论】MSCs在体外能在一定条件下被诱导分化为心肌样细胞,是心肌缺血干细胞移植的较理想的细胞来源。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 5-氮胞苷; 心肌细胞

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0067-03

Study on Induction of Rat Mesenchymal Stem Cells to differentiate into Cardiomyocytes *in vitro*

HUA Ping¹, XIONG Li-hua¹, ZHANG Hua¹, CHEN Ju¹, ZHANG Hui-zhong¹, MIN Jun²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, 2. Stem Cells Research Center, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510120, China)

Abstract: 【Objective】To study the potential of rat mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into cardiomyocytes by induction *in vitro*. 【Methods】SD rat MSCs were isolated and cultured from rat bone marrow, then induced by 5-aza for 24 h. The MSCs differentiation was observed by phase-contrast microscope. The immunohistochemical technique was used for the expression of cTnT and desmin. The expression of myocin heavy chain (MHC) was examined by RT-PCR. 【Results】After being induced by 5-aza, some of MSCs became spindle-like and formed myotube-like structure. And cTnT positive cells were about 15%, desmin positive cells were found by immunohistochemistry staining. The expression of MHC (one of cardiac-special genes) could be detected by RT-PCR. 【Conclusion】The MSCs can be differentiated to cardiomyocytes *in vitro* by 5-aza, and MSCs might be a new cell source of stem cell transplantation in ischemic myocardium.

Key words: mesenchymal stem cells; 5-azacytidine; cardiomyocyte

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1):68~69,76]

缺血性心脏病在我国的发生率逐年提高。人们已经认识到心肌细胞是细胞分化的终点,没有再生和修复损伤的能力,因此心肌梗死后的最终结局是有完整舒缩功能的心肌细胞数量相对或绝对减少,导致心力衰竭。骨髓间充质干细胞(mesenchymal

stem cells, MSCs)是一种具有多向分化潜能的干细胞,在一定条件下,这类细胞可定向诱导分化为软骨细胞,成骨细胞,肌细胞等。同时这类细胞由于取材容易,体外扩增能力强,并且具有多向分化能力而备受重视^[1]。本实验对SD大鼠MSCs进行培

收稿日期:2003-08-19

作者简介:华平(1972-),男,湖南衡阳人,在职博士生,主治医师.E-mail: huaping88@sina.com

养, 并采用 5-氮胞苷体外诱导向心肌样细胞分化, 为受损心肌组织的细胞移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) 培养基(购于美国 Gibco 公司); 胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品; Ficoll-paque 分离液购于 Pharmacia 公司; 胰蛋白酶和 EDTA 为 Gibco 公司产品; 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza) 购于 Sigma 公司。鼠抗人结蛋白(Desmin) 单抗为 Sigma 公司产品, 鼠抗人肌钙蛋白 T(cTnT) 单抗和肌球蛋白重链(MHC) 为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2 MSCs 的分离和培养

4 周龄雄性 SD 大鼠, 体质量 200 ~ 250 g, 由中山大学动物实验中心提供。将 SD 大鼠颈椎脱臼处死后, 体积分数 75% 乙醇浸泡 5 min, 无菌条件下取下肢长骨, 显露骨髓腔, 用体积分数 15% 胎牛血清的 IMDM 培养液冲洗骨髓腔获取骨髓细胞, 将冲洗液收集于离心管中, 2 000 r/min 离心 15 min(上海医用分析仪器厂离心沉淀仪, 型号 LXJ-II, $r = 4$ cm), 弃上清及脂肪层, 取沉淀, 用 IMDM 培养液混匀, 轻轻地层加到 1.077 g/mL 淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 离心 10 min, 收集中间的单核细胞层, 用 IMDM 培养液 1 000 r/min 离心洗涤 10 min, 然后收集细胞, 用含体积分数 15% 胎牛血清 IMDM 培养液混匀后接种于培养瓶中, 置于 37 °C 含体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 原代细胞生长至 90% 融合时, 用 2.5 g/L 胰酶和 EDTA 消化后按 1:3 的比例传代。

1.3 MSCs 的诱导分化

4 ~ 5 次换液后, MSCs 变得较为同质, 大小较均匀。将传代 2 次后的 MSCs 用 2.5 g/L 的胰酶消化, 用 IMDM 液清洗 2 次后制成细胞悬液, 重新接种于 12 孔培养板中, 对每孔培养板内细胞行 5-aza 诱导 24 h, 终浓度 $c(5-aza) = 10 \mu\text{mol/L}$ 。吸去含 5-aza 的培养液, 然后按正常培养条件继续培养, 每 3 d 换液 1 次, 2 周后供免疫组化及 RT-PCR 检测。

1.4 免疫组化染色检测

将诱导的 MSCs 和未诱导的 MSCs 培养 3 d, 然后用 PBS 液清洗 1 次, 用 4 °C 甲醛固定 5 min, PBS 液冲洗 3 次, 加入一抗(鼠抗人 cTnT 抗体 1:80; 鼠

抗人结蛋白 Desmin 抗体 1:50), 4 °C 孵育过夜。其余步骤按 SP 免疫组化试剂盒操作程序进行, 最后苏木素复染, 中性树脂封固。以大鼠心肌组织切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。胞浆中有棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。

1.5 RT-PCR 鉴定

通过 RT-PCR 分别检测大鼠心肌组织, 未诱导 MSCs 及诱导 8 周后的 MSCs 的肌球蛋白重链(MHC) mRNA 的表达。RT-PCR 用 Promega 一步法试剂盒, 按照操作程序进行。先 48 °C 45 min 合成 cRNA, 再 94 °C 变性 2 min, 接着 35 个循环扩增(95 °C 30 s, 60 °C 1.5 min, 72 °C 1 min), 最后 72 °C 延伸 7 min。MHC 上游引物: 5'-GGAAGAGTGAGGGG CCATCAAGG-3'; 下游引物: 5'-CTGCTGG AGAG-GTTATTCCTCG-3'。

2 结果

2.1 MSCs 的特性

分离 3 d 后, 逐渐出现贴壁细胞, 第 6 天换液时, 可见多个贴壁的细胞克隆, 细胞呈梭形或纺锤形, 细胞核较大, 胞质丰富, 培养 7 d 后, 细胞迅速增殖, 10 d 后出现细胞融合及重叠, 约 14 d 可传代。传代后细胞于 24 h 内完全贴壁, 首次传代采用 1:3, 传代第 3 天见细胞体积较原代细胞增大, 大部分呈扁平多角形, 胞核明显, 呈卵圆形。

2.2 MSCs 体外定向诱导后的形态变化

相差显微镜下观察, 诱导前的表现为较典型的成纤维细胞样形态, 5-aza 诱导后可见部分细胞形态发生变化, 体积逐渐增大, 呈梭形, 部分细胞死亡。第 7 天可见肌管样结构形成, 第 3 周可见细胞间出现连接, 排列具有方向性(图 1)。

2.3 免疫组化鉴定

未诱导 MSCs 中未发现 cTnT 阳性细胞, 而诱导后的 MSCs 中发现 cTnT 阳性细胞, 阳性率约 15%, 胞质中可见明显的肌原纤维结构(图 2)。未诱导 MSCs 中结蛋白免疫组化染色发现少量 Desmin 弱阳性细胞, 而在诱导的 MSCs 中出现强阳性免疫复合物, 并呈集落样分布(图 3)。

2.4 RT-PCR 检测诱导后的 MSCs 心肌特异因子的表达

以正常心肌组织 MHC 阳性条带为对照, 在未诱导 MSCs 中未发现阳性条带的出现, 而诱导后的

MSCs 在相同的位置出现了 MHC 的阳性条带 (图 4)。



图 1 诱导后的 MSCs 细胞形态

Fig. 1 Phase-contrast photograph of MSCs after induction (× 200)

After induced the MSCs with 5-azacytidine, the clones of adherent fibroblast-like cells were formed spindle-like cells



图 2 诱导后的 MSCs 中 cTnT 免疫组化染色

Fig. 2 Immunostain of induced MSCs with anti-cTnT antibody (× 400)

MSCs from rats induced by 5-azacytidine could be identified by the positive staining for cTnT

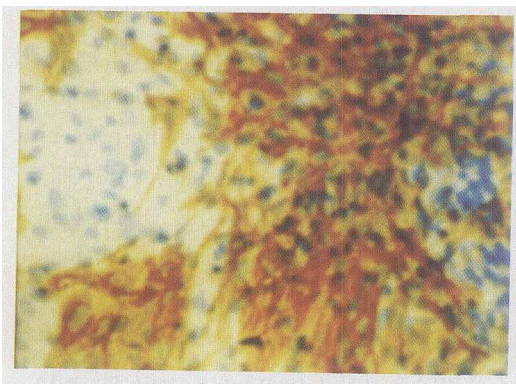


图 3 诱导后的 MSCs 中 Desmin 免疫组化染色

Fig. 3 Immunostain of induced MSCs with anti-Desmin antibody (× 200)

MSCs from rats induced by 5-azacytidine could be identified by the positive staining for Desmin

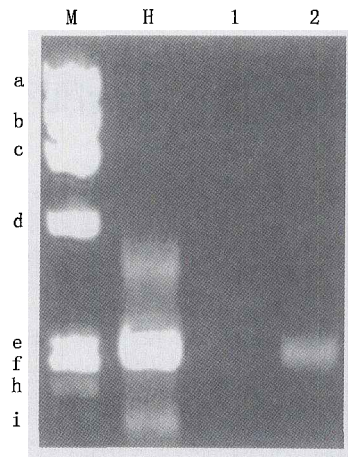


图 4 RT-PCR 检测心肌特异性因子 MHC 的表达

Fig. 4 RT-PCR analysis of expression of cardiomyocyte-specific genes: MHC

M: marker; H: heart tissue; 1: MSCs; 2: induced MSCs. a: 1 353 bp; b: 1 078 bp; c: 872 bp; d: 603 bp; e: 310 bp; f: 271 bp; h: 118 bp; i: 72 bp

3 讨 论

干细胞移植治疗心肌缺血是近年来研究的新课题。MSCs 因其来源于自体,取材容易,扩增能力较强,在体内外均有较强的分化潜能而成为目前很有希望的一种心肌供体细胞来源^[1,2]。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。有研究表明,鼠的胚胎细胞与 5-aza 作用后能向中胚层细胞转化,其机制可能与激活肌源性基因 MyoD1 有关。它可能通过控制向心肌分化的特异启动子基因而阻遏蛋白结合,从而使 MSCs 去甲基化而发生构型改变使启动细胞向心肌分化,使 MSCs 转化为心肌细胞^[3-5]。在我们的实验中 MSCs 与 5-aza 作用后,细胞形态较未诱导前更加细长,呈梭形,第 7 天可见细胞融合成肌管,并于第 3 周可见细胞间出现连接,呈一定方向排列,表现出幼稚的心肌样细胞的特点。

肌钙蛋白 cTnT 仅在心肌细胞中表达,是鉴定心肌细胞的特异性蛋白。结蛋白 desmin 是心肌和骨骼肌中的一种特异性的骨架蛋白,在维持肌原纤维形态以及在肌小节之间发生信号传递方面起重要作用^[6]。在我们的实验中,未诱导的 MSCs 中 cTnT 无表达,而诱导后 MSCs 中 cTnT 表达率为 15%;未诱导的 MSCs 结蛋白为弱表达,而在诱导

(下转第 76 页 to page 76)

裂开颅底进路): 本术式能良好显露中颅底侧方自茎突到中线附近的岩骨下部、颞下窝、咽旁间隙顶部、蝶骨基部和上颈部等区域。可用本术式切除该区域的良性或恶性肿瘤。如侵犯到翼腭窝、颞下窝、蝶窦等部位的鼻咽血管纤维瘤。本组资料有1例患者采用改良 Biller's 切口联合腭进路^[3], 切除了1例鼻咽血管纤维瘤侵犯鼻腔, 筛窦、蝶窦、颅底、翼腭窝、颞下窝、眶尖及海绵窦等部位的肿瘤。该例患者术中在下颌角处断离下颌骨, 将下颌骨升支向外上方牵拉, 切除翼腭窝及颞下窝肿瘤 3 cm × 3 cm × 4 cm。再取硬腭“U”型切口, 切除鼻咽、鼻腔及筛窦肿瘤 7 cm × 6 cm × 5 cm, 该处肿瘤与翼腭窝、颞下窝肿瘤呈哑铃状。大块肿瘤切除后用鼻内窥镜镜检查蝶窦, 从蝶窦分离取出肿瘤 2 cm × 1.5 cm × 1.2 cm。术后将断离的下颌骨升支复位。患者术后咬合及固定良好。侵犯海绵窦部位的 1 cm × 1.2 cm 小肿瘤未能切除, 但术后1个月用伽玛刀照射痊愈, 经随访4年未复发。

鼻内镜进路鼻咽血管纤维瘤切除术, 国外 Kamel^[3] 在1996年报道1例, 国内韩德民等^[4] 在1998年报道8例。本组资料有3例, 术中暴露瘤体后用切割吸引器及电刀沿肿瘤边缘分离, 至肿瘤根部完全分离后用圈钳或圈套器自口腔取出。我们的

体会是: ①术前行CT血管增强扫描或MRI检查, 鼻咽血管纤维瘤病变范围局限于鼻咽及鼻腔部位。②术前2~3d行血管数字减影术(DSA)检查并选择动脉栓塞, 以减少术中出血。③采用控制性低血压气管内全身麻醉技术, 使术中出血量减少, 保持术野清楚。

采用鼻内窥镜下手术在减少创伤, 术后功能保存方面有明显的优越性。但对于鼻咽血管纤维瘤侵入颅内, 或鼻咽血管纤维瘤侵入翼腭窝、颞下窝者, 应列为禁忌证。

参考文献:

- [1] 李添应, 苏振忠, 余达德, 等. 严重鼻出血的血管栓塞治疗[J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(3): 222-3.
- [2] 李添应. 耳鼻咽喉肿瘤(临床部分)[M]. 广州: 广东科技出版社, 2000. 245-9.
- [3] Kamel R H. Transnasal endoscopic surgery in juvenile nasopharyngeal angiofibroma[J]. J Laryngol Otol, 1996, 110(7): 962-4.
- [4] 韩德民, 陈学军, 王锦礼, 等. 鼻内窥镜引导下鼻咽血管纤维瘤切除术[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33(6): 358-9.

(编辑 刘清海)

(上接第69页 from page 69)

后的MSCs中结蛋白呈强阳性表达。这说明未经诱导的MSCs虽然也具有自发向肌系细胞分化的能力, 但很弱, 不能心肌化, 而经5-aza诱导后的MSCs可表现为明确的心肌化过程。肌球蛋白重链是心肌特异性的表达因子, 我们用RT-PCR方法扩增了与心肌肌球蛋白kb大小一致的扩增带, 说明诱导后的MSCs可表达心肌特异性的肌球蛋白。

综合我们实验中免疫组化和RT-PCR结果, 我们认为经5-aza诱导后的MSCs可向心肌样细胞转化。虽然我们所得到的的是较幼稚的心肌样细胞, 但有研究表明, 在体内特定的微环境下, MSCs可表现出很强的可塑性, 当MSCs植入缺血心肌后能在环境与生长因子的作用下发生环境依赖性变化^[7]。所以经5-aza定向诱导后的MSCs可以向心肌样细胞分化, 为修复受损的心肌提供了一种新的种子细胞, 可以作为移植细胞用于心肌缺血的治疗。

参考文献:

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C. Multilineage

potential of adult human mesenchymal stem cell [J]. Science, 1999, 284(2): 143-7.

- [2] 项鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元细胞[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(5): 321-3.
- [3] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs, 2001, 25(3): 187-91.
- [4] Wakitani S, Satio T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(6): 1412-6.
- [5] Makino S, Fukuda K, Miyoshi, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stem cells *in vitro*[J]. J Clin Invest, 2002, 103(5): 697-701.
- [6] Ordahl C P. Myogenic shape-shifters. J Cell Bio, 1999, 147(4): 695-700.
- [7] Wang J S, Shumtim D, Galipeau J. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120(5): 999-1006.

(编辑 张敏瑞)