

[文章编号] 1000-4718(2007)10-1909-05

TGF- β_1 联合内脏内胚层 END-2 细胞诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞及与凋亡的关系*

曾彬¹, 林国生^{1△}, 郑和忠², 蔡军¹, 罗浩¹

(1 武汉大学人民医院心血管内科, 湖北 武汉 430060; 2 遵义医学院附属医院神经内科, 贵州 遵义 563003)

【摘要】 目的: 探讨体外诱导胚胎干细胞(ESCs)向心肌细胞分化过程中分化与凋亡的关系, 为优化组织工程的种子细胞提供依据。方法: 先将 ESCs 悬浮培养形成 2-3 d 拟胚体(embryoid bodies, EBs), 再向培养液中添加转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), 以及与内脏内胚层样 END-2 细胞条件培养液共培养联合诱导 ESCs 向心肌细胞分化。以自然分化为对照组。激光共聚焦显微技术检测心肌细胞特异性肌钙蛋白 T(TnT) 的表达, 透射电镜观察分化心肌细胞的超微结构。用 Annexin V/PI 双染后, 在流式细胞仪上检测 ESCs 分化过程中的凋亡情况。结果: EBs 经 TGF- β_1 诱导后, 有(43.00±2.08)% 的拟胚体出现自发节律性收缩, 表达心肌细胞特异性蛋白 TnT, 以及观察到心肌样超微结构, 尤其是联合 TGF- β_1 和 END-2 细胞条件培养液诱导, 自发性收缩的拟胚体高达(88.00±1.42)% ($P < 0.01$), 收缩区域较大且拥有较成熟的心肌样结构。然而自然分化组发生自发节律性收缩的拟胚体只有(12.00±1.53)%。经 2 种诱导条件诱导后, 检测两者的凋亡率分别为(5.58±0.65)%、(9.60±0.75)% ($P < 0.05$)。结论: 联合 TGF- β_1 和内脏内胚层样 END-2 细胞条件培养液对心肌细胞分化有较高的诱导率, 两者发挥协同诱导作用, 可能机制是直接诱导 ESCs 分化或促进不向心肌细胞分化的 ESCs 凋亡。

【关键词】 END-2 细胞; 胚胎干细胞; 心肌细胞; 共同培养

【中图分类号】 R363 **【文献标识码】** A

Relationship between apoptosis and differentiation from ESCs into cardiomyocytes induced by TGF- β_1 and co-culture with visceral endoderm like END-2 cells

ZENG Bin¹, LIN Guo-sheng¹, ZHENG He-zhong², CAI Jun¹, LUO Hao¹

(¹ Department of Cardiology, Renming Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; ² Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China. E-mail: lguosheng10272005@yahoo.com.cn)

【ABSTRACT】 **AIM:** To provide the reference for optimizing the seed cells for tissue engineering, the relationship between apoptosis and differentiation in the process of induction on embryonic stem cells(ESCs) was investigated. **METHODS:** Day 2-3 embryoid bodies (EBs) were derived from ESCs, and then tissue growth factor- β_1 (TGF- β_1) was added, and co-cultured with visceral endoderm like END-2 cell conditioned medium. The induced cells were evaluated by using immunofluorescence and transmission electron micrography. Cell apoptosis was analyzed using flow cytometry. **RESULTS:** The total percentage of beating EBs treated with TGF- β_1 was 43%. All the beating cardiomyocytes derived from ESCs expressed cardiac-specific proteins for TnT, and were observed the cardiac-specific ultrastructure. Interestingly, the total percentage of beating EBs treated with TGF- β_1 combined with END-2 cell conditioned medium was 88% ($P < 0.01$), and the beating areas were bigger. After 3 days of induction with different conditions, the apoptotic levels were (5.58%±0.65% and 9.60%±0.75%, $P < 0.05$), respectively. **CONCLUSION:** combination of TGF- β_1 with co-cultured visceral endoderm like END-2 cell conditioned medium could get a higher induction efficiency on the differentiation of ESCs into the cardiomyocytes. The partly inducible effect mechanisms may induce ESCs differentiation toward a cardiac phenotype and enhance apoptosis in cells not committed to cardiac differentiation.

【KEY WORDS】 END-2 cells; Embryonic stem cells; Cardiomyocytes; Coculture

[收稿日期] 2006-03-31 [修回日期] 2006-06-07

* [基金项目] 湖北省卫生厅重点资助项目(No. HB05336); 武汉市 2004 年度重点临床专科资助项目(No. 2004001)

△通讯作者 Tel: 027-63427403; E-mail: lguosheng10272005@yahoo.com.cn

持续而严重的心肌缺血所致的部分心肌缺血坏死,以及在心脏传导系统中心肌坏死或功能紊乱导致的冲动及传导异常,严重危害着人类健康。将外源有功能的细胞代替损伤的心肌细胞,从而恢复心脏功能是一种潜在很有实用价值的治疗措施^[1]。但种子细胞来源不足限制了细胞移植治疗的发展。ESCs 具有长期增殖而不分化的能力,在培养过程中能分化成包括自发性搏动心肌细胞在内的 3 个胚层的所有体细胞^[2],成为细胞移植治疗最有前途的细胞来源。本实验 TGF- β_1 联合内脏内胚层 END-2 细胞条件培养液诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞并探讨分化与凋亡的可能关系,为其临床应用提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 ES-D3 细胞 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 END-2 细胞 由荷兰 Mummery 教授惠赠。

1.3 BALB/c 小鼠 购自华中科技大学同济医学院试验动物中心。

1.4 主要试剂 DMEM(Sigma)、胎牛血清 FCS(Hyclone)、白血病抑制因子 LIF(Gibco)、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺、明胶、胰蛋白酶、EDTA、小鼠抗小鼠 I 抗心肌肌钙蛋白-T(cardiac troponin-T, cTn-T)、TRITC 标记的羊抗小鼠 IgG 均购自 Sigma。

2 方法

2.1 小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast MEF)制备 取 13.5 d 胚胎小鼠,去其头、尾、四肢及内脏后,剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块。以含 10% FCS 的高糖 DMEM 在 37 °C、5% CO₂ 条件下贴壁培养。

2.2 ESCs 细胞培养及 EBs 的制备 ES-D3 细胞复苏后以 5×10^7 cells/L 种植于经丝裂霉素 C(10 mg/L)处理后的 MEF 饲养层上扩增培养。ESCs 的培养基为:高糖 DMEM,15% FCS, 10^6 U/L LIF、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、1 mmol/L L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。

大约 60% 融合,ESCs 克隆用 2×10^5 U/L 胶原酶 IV,在 37 °C 恒温下消化 10 min,轻轻吹打成单个细胞悬液,转移至培养皿中在 37 °C、5% CO₂ 条件下悬浮培养,每天更换去 LIF 的 ESCs 培养液,2-3 d

形成 EBs。

2.3 END-2 细胞条件培养液的制备 收到的 END-2 细胞进行半量换液,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,END-2 细胞长至融合时,用 PBS 冲洗 3 次,加入 END-2 细胞培养液培养 3 d,收集培养液,离心取上清,用 0.22 μ m 的滤膜过滤,现用或 -70 °C 保存备用^[3]。使用前以 6 份上述培养液加 4 份新鲜的 20% FCS 的 ESCs 基本分化诱导液组成了 END-2 细胞条件培养液。END-2 细胞条件培养液为:DMEM/F12 培养基,7.5% FCS,1% 非必需氨基酸, 1×10^5 U/L 青霉素、 1×100 g/L 链霉素。

2.4 ESCs 诱导分化 2-3 d EBs 分 2 组进行诱导:

①2-3d EBs 种植到含有 5 μ g/L TGF- β_1 的 24 孔板中进行诱导,诱导培养液为去 LIF 的 ESCs 培养液。②种植到含有 5 μ g/L TGF- β_1 的 24 孔板中进行诱导,诱导培养液为 END-2 细胞条件培养液。

2.5 分化的心肌细胞鉴定

①大体观察 每天用相差显微镜观察拟胚体,是否出现自发性收缩。节律收缩的拟胚体被认为是拟胚体集落中自发搏动的心肌细胞,也被认为是成功的诱导分化^[4]。

②激光共聚焦显微技术 具体步骤如下:取出盖玻片,磷酸缓冲液 PBS(0.01 mol/L, pH7.2)洗 3 遍,冷甲醇固定 30 min,1% TritonX-100 破膜, PBS 振荡洗 3 遍,1% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,分别加以 1:100 稀释的小鼠抗小鼠 Troponin-T,在 4 °C 孵育过夜。再用罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,缓冲甘油封片,以激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, Leica)观察。

③超微结构分析 细胞消化,离心, PBS 洗 2 次,用含 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液前固定,1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,透射电镜观察。

2.6 细胞凋亡检测 于分化培养第 3 d 收集细胞,应用 Annexin V/PI-Fluorescence 试剂盒(美国 Roche)行 Annexin V 及 PI 双染色标记。应用流式细胞仪(Becton-Dickinson FACScalibur, USA)检测分化细胞的凋亡情况,每次实验进行 3 次。

3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

结 果

1 细胞形态

生长在 MEF 上的小鼠 ESCs 呈紧密聚集、隆起

的圆形或椭圆型岛状生长,岛内细胞界限和形态不清,见图 1。体外培养的 ND - 2 细胞较小,呈多边形,细胞边界清晰,镶嵌排列,生长迅速,1W 左右可以铺满培养瓶,见图 2。

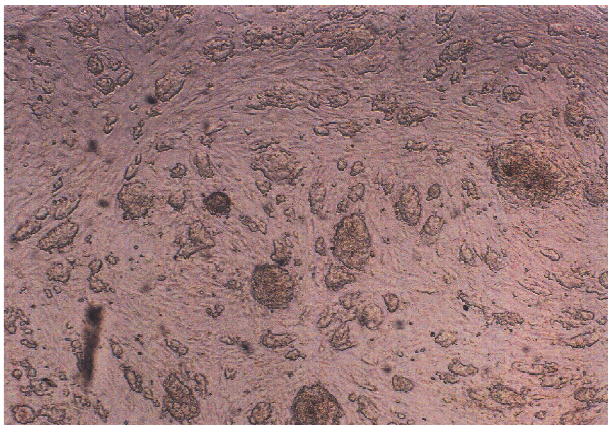


Fig 1 Colonies of ES - D3 on a feeder layer of murine embryonic fibroblasts(×100).

图 1 生长在鼠胚饲养层上的 ES - D3 细胞

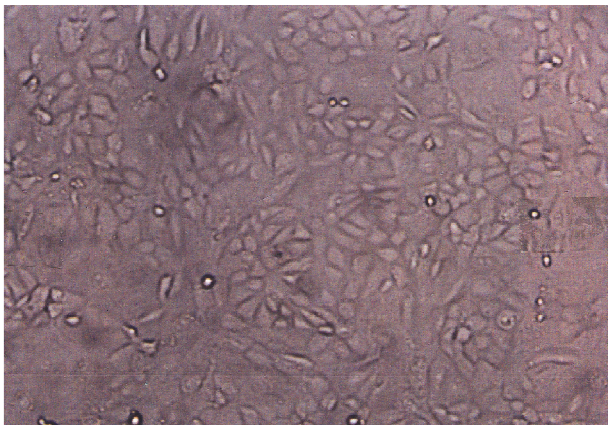


Fig 2 The END - 2 cells grew into confluent monolayer (×100).

图 2 生长成片的 END - 2 细胞

2 ESCs 体外定向分化为心肌细胞

悬浮培养 2 - 3 d 的 EBs(图 3)接种到各组载玻片上开始诱导分化,记为诱导第 1 d。在 1 周内,相差显微镜下即可见自发节律性收缩拟胚体,随着培养时间的延长,自发性节律收缩的拟胚体数目逐渐增加。自然分化组发生自发节律性收缩的拟胚体只有 12%。TGF - β_1 诱导组和 TGF - β_1 联合内脏内胚层 END - 2 细胞条件培养液共培养诱导组各自自发节律性收缩的拟胚体分别是(43.00 ± 2.08)%、(88.00 ± 1.42)% ($P < 0.01, n = 3$)。然而在共培养的条件下,自发节律性收缩区域较大。

3 免疫荧光细胞检测

2 分化诱导组均可检测到心肌特异性 TnT 蛋白

的表达,随着培养时间的延长,表达阳性的细胞越来越多(图 4)。

4 透射电镜超微结构分析

自发节律性收缩的拟胚小体经电镜观察可见排列整齐、沿着细胞长轴方向伸展的肌原纤维、丰富的糖原和充满嵴的线粒体(图 5A),联合诱导组可见较成熟的肌小节和 Z 线以及闰盘、缝隙连接样结构(图 5B、5C)。

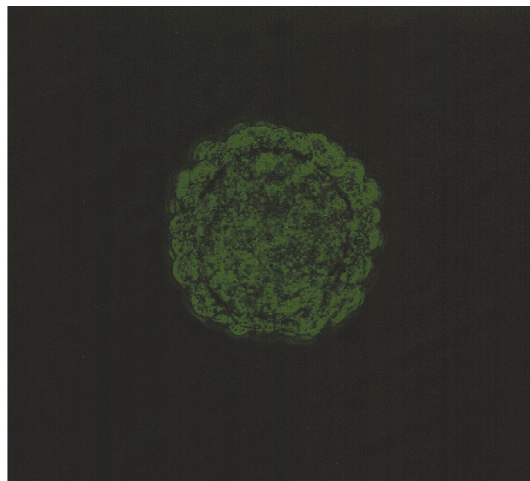


Fig 3 Embryoid bodies of day 2 - 3(×100).

图 3 悬浮 2 - 3 d 的拟胚体



Fig 4 Immunostaining for cardiac troponin - T of ES - D3 cells - derived cardiomyocytes(×400).

图 4 肌钙蛋白 - T 免疫荧光细胞染色

5 细胞凋亡检测

2 诱导组分化第 3 d 的细胞凋亡百分率分别是:(5.58 ± 0.65)%、(9.60 ± 0.75)% ($P < 0.05$)。自然分化组的凋亡百分率为(1.97 ± 0.45)% ,见图 6A、B、C。

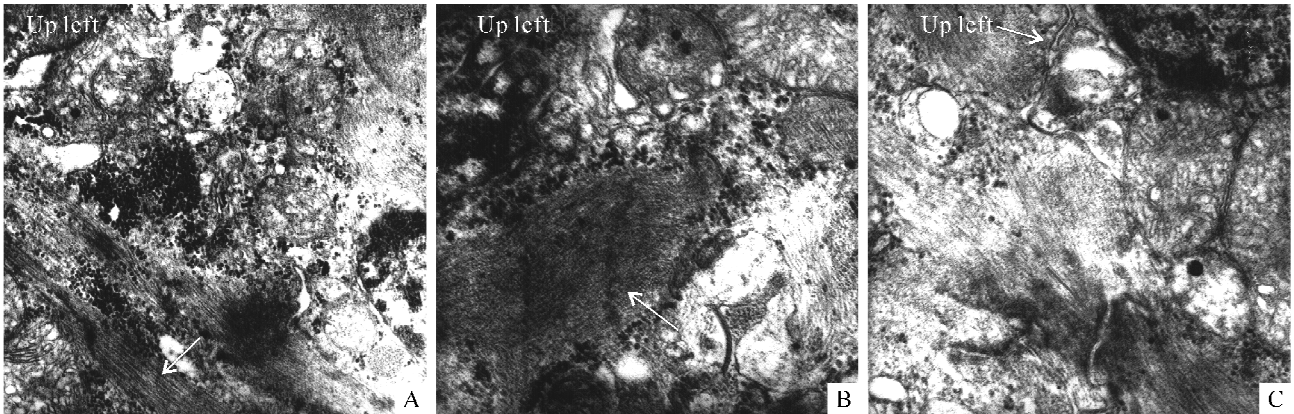


Fig 5 Ultrastructure of ES - D3 cells - derived cardiomyocytes(× 3 000). A: the presence of individual fibrils, huge amounts of glycogen and numerous mitochondrias; B: the presence of more mature sarcomeric organization with Z bands; C: the presence of nascent intercalated disc, and gap junction.

图 5 ES - D3 细胞来源的心肌细胞的超微结构

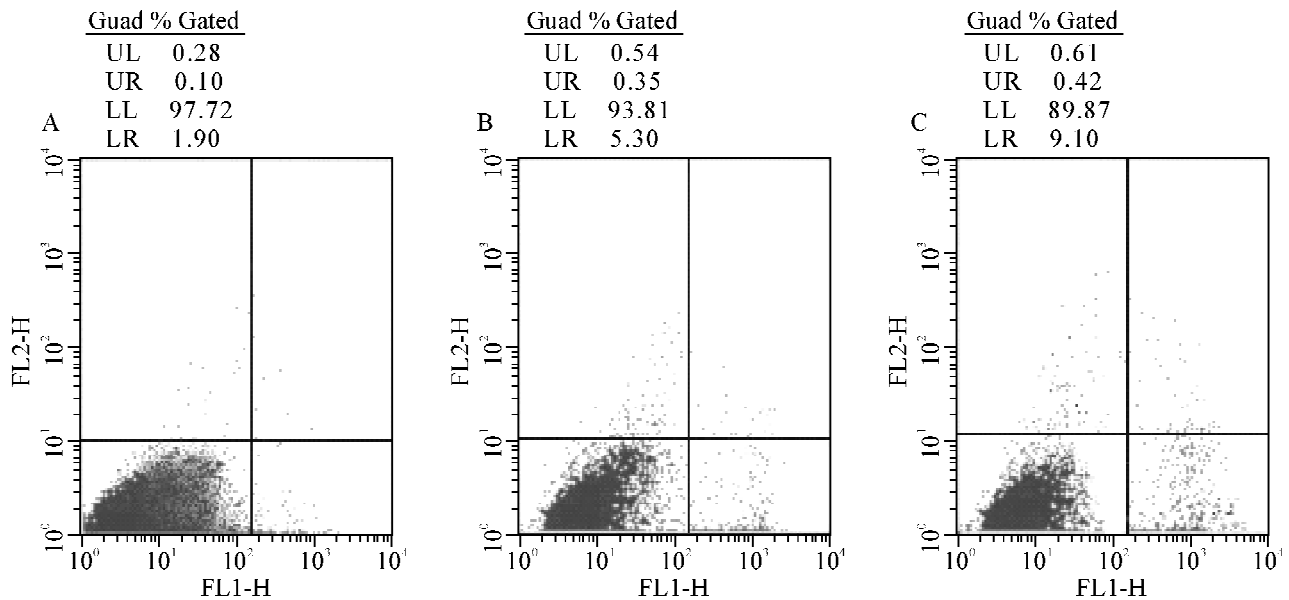


Fig 6 Apoptosis populations of cells under each treatment condition for 3 days. n = 3.

图 6 分化第 3 d 的细胞凋亡百分率

讨 论

种子细胞来源不足是目前限制组织工程发展的瓶颈问题,胚胎干细胞的多向分化潜能和无限扩增能力有望解决这个难题。然而 ESCs 发育分化是多因素复杂的过程^[5],尤其是分化成具有特殊功能的终末成熟的心肌细胞,并非由单一因素决定。为了解 ESCs 发育分化的机制,我们用多种培养方法进行了尝试:向培养液中添加细胞因子^[6,7],把 ESCs 接种在特殊的细胞外基质上^[8],或与具有诱导作用的饲养层细胞共培养^[9]以及导入合适的基因^[10]等。大多数是单一实验方法的运用,目前联合多种方法

诱导 ESCs 向心肌细胞分化的报道很少^[11]。

本实验中,向培养液中添加转化生长因子 - β_1 (TGF - β_1),联合内脏内胚层样 END - 2 细胞条件培养液共培养诱导 ESCs 向心肌细胞分化,可以使 $(88.00 \pm 1.42)\%$ 的拟胚体出现自发节律性收缩。诱导率显著高于单独用 TGF - β_1 诱导组 ($P < 0.01$)。这些具有自发节律性收缩的拟胚体能表达心肌细胞特异性肌钙蛋白 T (TnT),透射电镜可见肌原纤维、肌小节和 Z 线以及闰盘等,这些不同成熟程度的心肌细胞显示出早期心肌细胞发育超微结构的特征。TGF - β_1 家族在心肌细胞发育过程中起着关键作用。Schuldiner 等^[12] 研究表明, TGF - β_1 可以促进

ESCs 向心肌细胞分化,同时促进内皮细胞的增殖,使血管样结构增加。END-2 细胞是用 RA 作用 P19EC 细胞集落后得到的内胚层样亚细胞系^[4],在胚胎发育和体外试验中发现,来自内胚层的诱导信号是干细胞向心肌细胞分化的关键因素^[12]。Mummery 等^[13]用 END-2 细胞与 EC 细胞、mESCs、hESCs 共培养,通过分泌一种或一系列细胞因子可诱导分化出自发节律性收缩的心肌细胞,显示 TGF- β_1 和 END-2 细胞对中胚层心肌细胞发育有着关键的作用。实验结果说明 TGF- β_1 和 END-2 细胞条件培养液这一联合诱导体系含有促进 ESCs 发育分化的微环境,适宜 ESCs 向心肌细胞分化。Kanaga 等^[14]研究表明促进 ESCs 凋亡的信号同时促进 ESCs 分化。Kanno 等^[15]研究发现,一氧化氮(NO)促进 ESCs 向心肌细胞分化同时也诱导不向心肌细胞分化的 ESCs 进入凋亡。为了进一步探索联合诱导体系对 ESCs 向心肌细胞分化的机制,我们用流式细胞仪检测了分化第 3 d 的 EBs 集落凋亡的百分比,结果显示联合诱导体系凋亡率为(9.60 ± 0.75)%,显著高于单独用 TGF- β_1 诱导组(5.58 ± 0.65)%, $P < 0.05$,提示联合诱导体系诱导作用的可能机制是直接诱导 ESCs 分化或促进不向心肌细胞分化的 ESCs 凋亡。

[参 考 文 献]

- [1] Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, et al. Transplantation of cells for cardiac repair[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(5): 711-717.
- [2] Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, et al. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy[J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10(1): 31-47.
- [3] Mummery C, van Achtenberg TA, van den Eijnden-van Raaij AJ, et al. Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells[J]. Differentiation, 1991, 46(1): 51-60.
- [4] Scholz G, Pohl I, Genschow E, et al. Embryotoxicity screening using embryonic cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity[J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165(3-4): 203-211.
- [5] 于艳秋,段玉琦,张义侠,等.小鼠胚胎干细胞分化心肌细胞过程中基因表达情况和电生理特性研究[J].中国病理生理杂志,2006,22(4):666-669.
- [6] Heng BC, Haider H, Sim EK, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage *in vitro*[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(1): 34-42.
- [7] 钱海燕,李庚山,徐红新,等.比较体外不同条件诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞的实验研究[J].中国病理生理杂志,2004,20(12):2198-2201.
- [8] Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, et al. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(3): 495-503.
- [9] Rudy-Reil D, Lough J. Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells[J]. Circ Res, 2004, 94(12): 107-116.
- [10] Meyer N, Jaconi M, Landopoulou A, et al. A fluorescent reporter gene as a marker for ventricular specification in ES-derived cardiac cells[J]. FEBS Lett, 2000, 478(1-2): 151-158.
- [11] Chen SS, Revoltella RP, Papini S, et al. Multilineage differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in three-dimensional culture systems[J]. Stem Cells, 2003, 21(3): 281-295.
- [12] Schuldiner M, Yanuka O, Joseph IE, et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cell[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(21): 11307-11312.
- [13] Mummery C, Ward D, van den Brink CE, et al. Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cell[J]. J Aant, 2002, 200(3): 233-242.
- [14] Kanaga S, Martina K, Pudolf J, et al. Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53[J]. EMBO J, 1997, 16(20): 6217-6229.
- [15] Kanno S, Kim PK, Sallam K, et al. Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(33): 12277-12281.