

[文章编号] 1671-587X(2010)01-0020-03

体外诱导人骨髓间充质干细胞定向分化为心肌细胞实验方法的建立

张慕蕊, 王岩, 李玉林

(吉林大学基础医学院 病理生物学教育部重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 探讨体外培养并诱导人骨髓间充质干细胞(hMSCs)分化为心肌细胞(CMs)的实验方法。方法: 采用密度梯度离心法联合贴壁培养法分离、纯化hMSCs, 采用5-氮杂胞苷(5-Aza)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对hMSCs进行联合诱导, 诱导3~4周, 观察细胞形态学的变化, 免疫组织化学方法鉴定肌细胞及心肌细胞特异蛋白的表达。结果: hMSCs体外经5-Aza和bFGF联合诱导1~2周后, 细胞体积较诱导前增大, 呈长梭形。诱导2~3周后细胞伸出伪足呈多爪形; 诱导3~4周后细胞伪足间相互连接形成肌管样结构。联合诱导3~4周后免疫组织化学鉴定结蛋白(Desmin)、肌钙蛋白(cTn I)和横纹肌肌动蛋白(α -sarcomeric actin)表达均呈阳性。结论: hMSCs在体外经5-Aza和bFGF联合诱导可以分化为CMs。

[关键词] 间质干细胞; 肌细胞, 心脏; 5-氮杂胞苷

[中图分类号] R542.2; Q813.1 **[文献标志码]** A

Establishment of method to induce human bone mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*

ZHANG Mu-rui, WANG Yan, LI Yu-lin

(Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract; Objective To establish the method to induce human bone mesenchymal stem cells (hMSCs) to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*. **Methods** hMSCs were isolated and purified from the bone marrow of human by density gradient centrifugation and adhering to the culture dishes. The fourth passage of MSCs was induced by 5-azacytidine (5-Aza) and bFGF for four weeks. The expression of Desmin, Troponin I and α -sarcomeric actin were detected by immunocytochemistry 3-4 weeks after induction. **Results** hMSCs treated with 5-Aza and bFGF had long cytoplasmic process one week after induction, and had multiple branches two weeks after induction, and they connected with adjoining cells forming myotube-like structures four weeks after induction. The induced hMSCs were stained positively for Desmin, Troponin I and α -sarcomeric actin. **Conclusion** 5-Aza and bFGF can induce hMSCs to differentiate into cardiomyocytes *in vitro*.

Key words: mesenchymal stem cells; myocytes, cardiac; 5-azacytidine

心肌细胞(myocardial cells, CMs)属于终末分化期永久性细胞, 坏死的心肌只能由纤维疤痕组织取代。尽管心肌中也含有干细胞, 在心梗后这些

细胞会发生分裂增生, 但数量少, 增殖能力低, 不能完整地修复心肌组织, 更不能满足心肌组织再生的需求。因此近年来学者们致力于研究心肌梗死后

[收稿日期] 2009-06-15

[基金项目] 国家863重大专项基金资助课题(2004AA205020); 国家自然科学基金资助课题(30772488); 吉林省科技厅重大项目资助课题(20076023);

[作者简介] 张慕蕊(1981-), 女, 吉林省长春市人, 医学博士, 主要从事干细胞信号转导相关研究。

[通信作者] 李玉林(Tel: 0431-85619481, E-mail: ylli@mail.jlu.edu.cn)

CMs 再生以及血运的重建, 而干细胞移植被认为是修复损伤心肌、治疗心梗的一个较有前景的方法^[1-3]。骨髓干细胞是细胞移植的主要细胞来源, 在体内外均具有分化为 CMs 的可能^[4-6]。目前国内学者应用以 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5-Aza) 为主要诱导剂的多种方法诱导骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 定向分化为 CMs。鉴定 CMs 的检测指标多样, 主要以缝隙连接蛋白、肌钙蛋白 T 为主。本实验通过对人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 体外分离、培养、扩增及鉴定, 应用 5-Aza 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 联合诱导 MSCs 定向分化为 CMs, 观察诱导前后细胞的形态学变化, 首次更为全面地检测 CMs 的相对特异性标志蛋白即结蛋白 (Desmin)、肌钙蛋白 I (cTn I) 和横纹肌肌动蛋白 (α -sarcomeric actin) 的表达情况, 为干细胞移植修复损伤心肌、治疗心肌梗死提供有力的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 18~45 岁正常成人穿刺骨髓血 5 例, 均来自吉林大学中日联谊医院健康自愿者。

1.2 主要试剂和仪器 低糖 DMEM 培养基 (美国 Gibico 公司), 胎牛血清 (Hyclone 公司), 胰蛋白酶和 EDTA (Sigma 公司), 5-Aza (美国 Sigma 公司), Percoll 分离液 (美国 Prarmia 公司); CD105、CD73、CD166、CD29 和 CD45 抗体 (BDPharMingen 公司或 NeoMarker 公司), FITC 标记二抗 (sigma 公司), 即用型 SP 免疫组化试剂盒 (福州迈新公司), 抗人肌钙蛋白 Troponin I 抗体 (博奥森生物工程有限公司), 抗人 Desmin 抗体, 抗人 α -sarcomeric actin 抗体 (福州迈新公司)。流式细胞仪 FACS (美国)。

1.3 hMSCs 的分离培养及传代扩增 具体方法见文献 [1]。取 P4 或 P5 代 hMSCs 用于实验。

1.4 hMSCs 的鉴定 流式细胞仪检测 hMSCs 表面标志: 取第 4 代细胞, 0.25% 胰酶加 0.02% EDTA 消化收集细胞, 每例样本细胞数为 2×10^5 , 细胞重悬于 500 μ L PBS 中洗涤, 与一抗 CD105、CD73、CD166、CD29、CD45 抗体孵育液 (一抗稀释度为 1:50) 常温下孵育 30 min, PBS 洗涤, 1 200 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 分别与 FITC 标记的二抗 (稀释度为 1:50) 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 1 200 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 弃去

PBS, 再加入 500 μ L PBS 重悬细胞, 用于 FACS 分析。细胞表达阳性百分比由 FACS 软件系统自动生成。

1.5 hMSCs 的体外诱导分化 选生长状态良好、纯度高达 95% 以上的 P4 代 hMSCs, 以每孔 1×10^4 个细胞的浓度接种于置有处理过的盖玻片的 24 孔板中。当细胞融合达到 60%~70% 时, 用 PBS 轻轻清洗细胞 1 次, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 5-Aza 和 10 μ g \cdot L⁻¹ bFGF 孵育 24 h, 对照孔不加诱导剂, 24 h 后再换成不含诱导剂的完全培养基继续培养, 每 3 d 换液 1 次。

1.6 免疫细胞化学检测 诱导后细胞培养 15~20 d 后, 细胞爬片, 用 PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 冲洗 3 次。加过氧化物酶阻断剂, 血清封闭, 加一抗 (抗人肌钙蛋白 Troponin I、抗人 Desmin 抗体、抗人 α -sarcomeric actin 抗体), 加 PBS 作空白对照, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 其余步骤按 SP 试剂盒所列步骤进行, 最后以苏木素复染。以胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性反应。

2 结 果

2.1 hMSCs 形态学特点 联合应用 Percoll (1.073 g \cdot mL⁻¹) 密度梯度离心法联合贴壁筛选法, 成功分离出 hMSCs。原代 hMSCs 接种 24~48 h 换液, 弃去未贴壁的细胞, 约 3~5 d 可见散在生长、分布不均的单个贴壁细胞, 即为 hMSCs (图 1A, 见封二)。细胞均为纺锤状, 呈成纤维细胞样, 此时孔板内尚有少量未贴壁细胞, 以后每隔 3 d 换液, 第 8~12 天时可见单个细胞形成多个细胞克隆, 经单克隆消化后继续培养, 第 13~28 天, 细胞汇流达 90%, 呈鱼群样或漩涡状排列, 细胞长梭形, 贴壁紧密, 细胞形态均匀一致 (图 1B, 见封二)。此时以 1:3 比例进行传代, 传代培养的 hMSCs 生长旺盛, 传代细胞保持原代细胞的形态特征, 紧密排列, 更加趋向一致。

2.2 光镜下 hMSCs 诱导为心肌样细胞的形态变化 加入 5-Aza 和 bFGF 诱导 1~2 周, 部分细胞体积变大, 呈长梭形 (图 1C 和 D, 见封二), 诱导 2~3 周细胞伸出伪足呈多爪形 (图 1E, 见封二), 诱导 3~4 周细胞伪足间相互连接形成肌管样结构 (图 1F, 见封二)。

2.3 MSCs 表面标志鉴定 流式细胞仪检测 P4 代 hMSCs 表面标志表达, CD 29、CD73、CD105

(间充质干细胞相对特异性标志)和 CD166(间充质细胞标志)为阳性, CD45(白细胞标志)阴性。经3次以上传代后, 细胞成分均一, 纯度在96%以上, 具有高度的同源性(图2, 见封二)。

2.4 免疫细胞化学检测 hMSCs 诱导3周后, cTn I、Desmin 和 α -sarcomeric actin 免疫细胞化学染色呈阳性, 未诱导 hMSCs 中 cTn I、Desmin 和 α -sarcomeric actin 检测呈阴性(图3, 见插页一)。

3 讨论

MSCs 取材容易, 扩增能力强, 具有高度的分化潜能, 无免疫排斥及伦理道德等限制; 此外, MSCs 可分泌各种细胞因子, 促进心肌细胞的修复; 同时, MSCs 还易于外源基因的转染和表达。随着组织细胞工程学和基因工程学的发展, 上述无可比拟的优势使得 MSCs 在组织工程学中被广泛应用, 成为细胞治疗和基因治疗的理想靶细胞^[7-8]。MSCs 在不同的诱导条件下可分化为多种组织细胞, 如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞和神经细胞等^[9]。1999年 Makino 等^[10]首次报道 hMSCs 体外向 CMs 诱导分化的成功, 他们用 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-Aza 对从小鼠骨髓中分离出的 MSCs 进行体外诱导, 使细胞逐渐转化为类似于胎心的心肌细胞。此后, 国内外许多学者也相继报道了 MSCs 体外经 5-Aza 诱导后可向 CMs 分化, 证实了诱导后的细胞可形成肌管样结构, 表达心肌特异性抗体, 并具有一定的电生理功能, 从而为 hMSCs 用于心肌损伤修复的细胞移植与基因治疗提供了有力的实验依据。本实验观察 5-Aza 联合 bFGF 对 MSCs 体外诱导分化的影响, 联合诱导 2~6 周, 部分(30%~40%) hMSCs 出现心肌样细胞形态学特征改变, 细胞体积变大, 呈星形或多爪形, 胞浆内出现颗粒及细丝样结构。

Desmin 是横纹肌和平滑肌中的一种骨架蛋白, 在维持肌原纤维形态以及肌小节间的信息传递上发挥重要作用。肌钙蛋白是心肌细胞中的一种调节蛋白, 参与调节收缩蛋白的舒缩活动, 由3个亚单位组成, cTn I 是其中之一。 α -sarcomeric actin 是横纹肌肌动蛋白, 存在于心肌和骨骼肌, 是肌细胞舒缩活动的物质基础。hMSCs 经 5-Aza 联合 bFGF 诱导分化后的细胞, Desmin、cTn I 和 α -sarcomeric actin 免疫组化染色阳性, 提示分化后的细胞已经合成了心肌或骨骼肌所特有的物质, 表明 MSCs 在体外诱导分化为心肌细胞。

5-Aza 对 MSCs 的体外诱导肌样分化确切机制目前还不清楚, 但迄今为止, 5-Aza 是诱导 MSCs 分化为 CMs 惟一有效的化学制剂^[11]。研究者普遍认为: 5-Aza 是使 MSCs 从基因水平发生改变而决定细胞分化的方向, 5-Aza 是一种甲基转移酶抑制剂, 与控制向心肌分化的特异启动子基因上阻遏蛋白结合, 使其去甲基化, 使原转录失活阶段的相关基因激活从而启动干细胞向 CMs 分化^[12]。而 bFGF 是一种促细胞分裂的肝素结合蛋白, 可诱导多种细胞的增殖与分化。

[参考文献]

- [1] Ioannis D, Nagy AH, Myrtle YA, et al. Adult bone marrow-derived stem cells and the injured heart: just the beginning [J]. *Europ J Cardio-thoracic Surg*, 2005, 28 (2): 665-676.
- [2] Wlx-Siepe M, Heilman C, von Samson P, et al. Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration [J]. *Eur J Cardiothor Surg*, 2005, 28 (1): 318-324.
- [3] Morito T, Muneta T, Hara K, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans [J]. *Rheumatology*, 2008, 47 (3): 1137-1143.
- [4] Keiichi F, Shinsuke Y. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2006, 4 (2): 1002-1013.
- [5] Tan SCW, Pan WX, Ma G, et al. Viscoelastic behaviour of human mesenchymal stem cells [J]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9 (3): 40-47.
- [6] Kobune M, Kawano Y, Ito Y, et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31 (2): 715-722.
- [7] Mark FP, Bradley JM. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics [J]. *Circ Res*, 2004, 95 (2): 9-20.
- [8] Christian J, Jan G, Danielle N. Tissue engineering through Autologous mesenchymal stem cells [J]. *Curr Opin Biotech*, 2004, 15 (4): 406-410.
- [9] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (3): 143-147.
- [10] 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.
- [11] 法宪恩, 王利霞, 侯剑锋, 等. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化观察 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2005, 40 (6): 1056-1059.
- [12] Konieczny SF, Emerson CP. 5-Azacytidine induction of stable mesenchymal stem cell lineage from 10 T 1/2 cells: evidence of regulatory genes controlling determination [J]. *Cell*, 1984, 38 (2): 791-800.