

· 基础论著 ·

# 骨形态发生蛋白 2 与 P53 抑制剂 PFT- $\alpha$ 联合诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究

侯兆蕾 吕安林 达晶 侯红 艾世宜 侯婧 刘博武

**【摘要】** 目的 观察骨形态发生蛋白 2(BMP-2)与 P53 抑制剂 PFT- $\alpha$  体外联合诱导骨髓间充质干细胞(BMMSCs)定向分化为心肌样细胞的作用。方法 采用密度梯度离心法分离大鼠 BMMSCs,取第 4 代 BMMSCs 分四组诱导:(1)空白对照组,仅用完全培养基诱导;(2)骨形态发生蛋白 2 组(BMP-2,终浓度 10  $\mu\text{g/L}$ );(3)P53 抑制剂组(PFT- $\alpha$ ,终浓度 20  $\mu\text{mol/L}$ );(4)BMP-2 联合 PFT- $\alpha$  组(BMP-2 + PFT- $\alpha$ ,终浓度分别为 10  $\mu\text{g/L}$  与 20  $\mu\text{mol/L}$ )。24 h 后换为普通培养液继续培养 4 周。用倒置相差显微镜观察细胞的形态学改变,免疫细胞化学法鉴定诱导后心肌样细胞中心肌特异标志物性肌钙蛋白 I(cTnI)的表达,流式计数法计算诱导后心肌样细胞诱导率。结果 原代 BMMSCs 10 d 形成集落,呈星形或梭形。传代后细胞体积变大,诱导 4 周后细胞呈长梭形,生长趋于一致性,出现肌岛样结构。免疫细胞化学结果显示诱导 4 周后 BMMSCs 表达心肌特异性蛋白 cTnI。流式计数法结果显示:空白对照组、BMP-2 组、PFT- $\alpha$ 、BMP-2 联合 PFT- $\alpha$  组心肌样细胞诱导率分别为(1.4  $\pm$  0.3)%、(17.1  $\pm$  1.2)%、(28.2  $\pm$  1.0)%、(39.9  $\pm$  1.7)%、BMP-2 联合 PFT- $\alpha$  组心肌样细胞诱导分化率高于 BMP-2 组与 PFT- $\alpha$  组( $P < 0.01$ )。结论 BMP-2 联合 PFT- $\alpha$  可在体外诱导大鼠 BMMSCs 定向分化为心肌样细胞,其诱导分化率明显高于单纯 BMP-2 或单纯 PFT- $\alpha$  诱导。

**【关键词】** 间质干细胞; 骨形态发生蛋白质类; 肿瘤抑制蛋白质 p53; 细胞分化; 心肌样细胞

**Bone morphogenetic protein 2 and the p53 inhibitor PFT- $\alpha$  induce the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells** HOU Zhao-lei, LV An-lin, DA Jing, HOU Hong, AI Shi-yi, HOU Jing, LIU Bo-wu. Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, China

Corresponding author: LV An-lin, Email: lvanlin@fmmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and the p53 inhibitor PFT- $\alpha$  on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) into cardiomyocyte-like cells. **Methods** BMMSCs were isolated from bone marrow of SD rats and purified with a density gradient centrifugation method. The forth passage cells were divided into four groups: BMP-2 group (10  $\mu\text{g/L}$ ), PFT- $\alpha$  group (20  $\mu\text{mol/L}$ ), BMP-2 (10  $\mu\text{g/L}$ ) + PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) group and an untreated group as control. After 24 h induction, the medium was changed to complete culture medium without any inductor and the cells cultured for 4 weeks. The morphological changes were observed under inverted phase contrast microscope. The cardiomyogenic cells were identified by immunofluorescence staining. The differentiation ratio was examined by flow cytometer. **Results** BMMSCs of primary culture formed cell colonies at 10 days. The passaged cells were larger than those of primary culture. After induction, the cells presented long spindle, aligned in parallel and formed "muscle island"-like structure. The expression of specific protein of cardiac troponin I (cTnI) in induced BMMSCs was positive. Flow cytometer showed that the differentiation ratio in control group, BMP-2 group, PFT- $\alpha$  group and BMP-2 combined with PFT- $\alpha$  group were respectively (1.4  $\pm$  0.3)%, (17.1  $\pm$  1.2)%, (28.2  $\pm$  1.0)%, (39.9  $\pm$  1.7)%, demonstrating that the differentiation ratio in BMP-2 combined with PFT- $\alpha$  group was higher than that of in BMP-2 group or PFT- $\alpha$  group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** BMP-2 and PFT- $\alpha$  can induce the differentiation of BMMSCs into cardiomyocyte-like cells, and the differentiation ratio was higher than that of in BMP-2 or PFT- $\alpha$  only.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Bone morphogenetic proteins; Tumor suppressor protein p53; Cell differentiation; Cardiomyocyte-like cells

缺血性心脏病的发病率日益上升,严重威胁着人类的生存以及生活质量。心肌梗死后心肌细胞自我修复能力极其有限,近年来干细胞研究为心肌修复带来了新的希望,也成为缺血性心脏病治疗的研究热点<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)有多向分化,自我更新,免疫耐受,调节宿主细胞存活等优势,又具有取材方便,易于诱导等优势,已经成为研究热点<sup>[2-5]</sup>。有研究显示 BMMSCs 可以被骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 诱导为心肌样细胞<sup>[6-7]</sup>。也有研究显示, P53 抑制剂(p-fifty three inhibitor-alpha, PFT- $\alpha$ ) 阻断 P53-P21 通路能够促进 BMMSCs 的增殖和分化, P53 抑制剂对 BMMSCs 的分化发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。本研究将观察 BMP-2 与 P53 抑制剂 PFT- $\alpha$  联合诱导是否能提高 BMMSCs 向心肌样细胞分化。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 试剂:胎牛血清(PAA, USA), L-DMEM 培养基(Hyclone, USA), PFT- $\alpha$  (Cayman chemical, USA), BMP-2 (PEPROTECH, USA), 胰蛋白酶(GIBCO, USA), cTnI 一抗(abcam, USA), Hoechst33258 (GIBCO, USA)。

2. 实验动物:健康 SD 大鼠, 雄性, 4 周龄, 质量 90 ~ 100 g, 第四军医大学动物实验管理中心提供。

### 二、方法

1. BMMSCs 分离与培养:无菌超净台内预先准备 2 只无菌离心管, 每只加入 4 ml 淋巴细胞分离液。颈椎脱臼法将 SD 大鼠处死, 取四肢长骨, 浸泡于 75% 酒精 5 min。无菌超净台内分离出肱骨、胫骨以及股骨, 分离两端骨髓, 用不含血清的 L-DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔并吹打混匀。将细胞悬液沿淋巴细胞分离液液面缓慢加入离心管中, 1500 r/min, 离心 20 min。沿液面吸中间云雾层, 1500 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 加入 5 ml 完全培养液, 充分吹打混匀后, 接种于无菌培养瓶培养。3 d 后对细胞首次换液, PBS 洗两次, 去除未贴壁的细胞, 以后每 3 d 换 1 次液。细胞长至 80% 融合时, 用含 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 按 1:1 或 1:2 的比例传代。体外培养到第 4 代备用。

2. 细胞形态学鉴定:每天在倒置相差电子显微镜下观察诱导后细胞生长状况和形态学变化。

3. BMMSCs 的鉴定:将传至第 4 代 BMMSCs 用无菌 PBS 洗 3 次后加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3 min, 加入含血清的完全培养液终止消化, 滴管吹打使细胞形成细胞悬液, 离心, 800 r/min, 5 min, PBS 洗 2 次重悬细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /L, 移至 2.0 ml EP 管中, 每管 100  $\mu$ l, 分别加入 FITC-抗大鼠-CD44 单克隆抗体、PE-抗大鼠/小鼠-CD29 单克隆抗体、PE-抗大鼠-CD45

单克隆抗体, 终浓度分别为: 12.5  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml, 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 离心, PBS 洗 2 次。每组加 400  $\mu$ l PBS, 吹打制成单细胞悬液。用流式细胞仪检测各组细胞中 FITCPE 红色荧光和绿色荧光阳性表达率。

4. BMMSCs 的诱导:取第 4 代 BMMSCs 分四组诱导:(1)空白对照组, 仅用完全培养基诱导;(2) BMP-2 组(终浓度 10  $\mu$ g/L); (3) P53 抑制剂组(PFT- $\alpha$ , 终浓度 20  $\mu$ mol/L); (4) BMP-2 联合 PFT- $\alpha$  组(BMP-2 + PFT- $\alpha$ , 终浓度分别为 10  $\mu$ g/L 与 20  $\mu$ mol/L)。24 h 后换为普通培养液继续培养 4 周。

5. 免疫细胞化学检测:将诱导组和空白对照组细胞培养 4 周后爬片 4  $^{\circ}$ C 预冷的丙酮固定 20 min, 将片用中性树胶固定到载玻片上, 风干, 0.3% Triton-X100 透膜 3 min, PBS 冲洗 2 次, 孵育 cTnI 抗体, 浓度 74  $\mu$ g/ml, 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗 2 次, 加入相应二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 冲洗 2 次, Hoechst33258 常温孵育 3 min, PBS 洗 2 次, 风干, 用甘油封片并在荧光显微镜下观察、拍照。

6. Western blot 检测:将诱导组和空白对照组细胞培养 4 周后进行铺板, PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白。配胶、上样、电泳, 溴酚蓝指示染料绿色条带移至距下端 1 cm 时停止电泳并转膜, 立春红染色后, 剪出目的条带。用抗体稀释液稀释一抗( $\beta$ -tubulin 1:3000, CX43 1:5000, cTnI 1:3000), 4  $^{\circ}$ C 过夜。TBST 摇洗 3 次, 孵相应二抗, 37  $^{\circ}$ C 震荡孵育 40 min, TBST 摇洗 3 次, 加入显影液, 放入凝胶成像系统中曝光并照相。结果以与  $\beta$ -tubulin 的灰度比值来表达。

7. 流式细胞计数:将诱导组和空白对照组细胞培养 4 周后, 胰蛋白酶消化并离心, 调细胞悬液密度约至  $1 \times 10^6$  个/ml, 0.3% Triton-X100 透膜 3 min, PBS 冲洗 2 次, 孵 cTnI 抗体, 浓度 74  $\mu$ g/ml, 室温 40 min, PBS 冲洗 2 次, 再孵相应二抗, 37  $^{\circ}$ C 避光 40 min, PBS 冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min。流式细胞仪检测 FITC 阳性标记细胞百分比。

8. 统计学分析:所有数据用 SPSS 14.0 统计软件处理, 结果用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. BMMSCs 形态学改变:刚分离的 BMMSCs 为圆形, 折光性较强, 悬浮于培养液中(图 1A)。3 d 首次换液之后, 大多数细胞呈贴壁生长, 细胞大小均一, 呈短梭形, 有三角形, 也有星形, 从胞质伸出长短、粗细不一的突起(图 1B), 10 d 左右后形成数个细胞集落, 向四周扩散。传代后细胞体积明显变大, 为长梭形, 混杂少

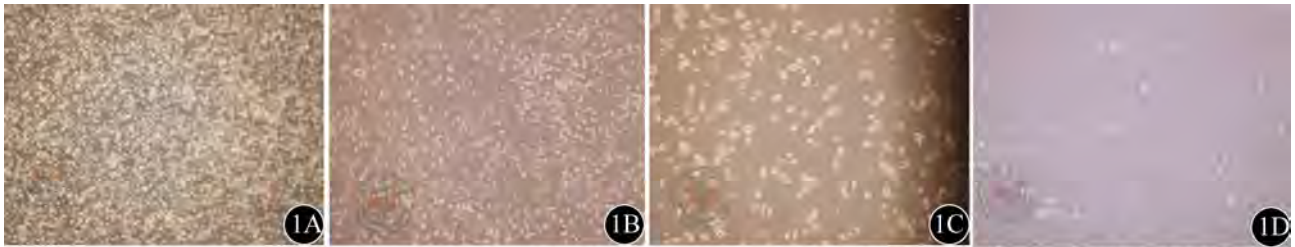


图1 BMSCs形态学改变(×200)。1A: 刚分离的BMSCs; 1B: 3 d首次换液后的BMSCs; 1C: 第4代BMSCs; 1D: BMSCs诱导4周后

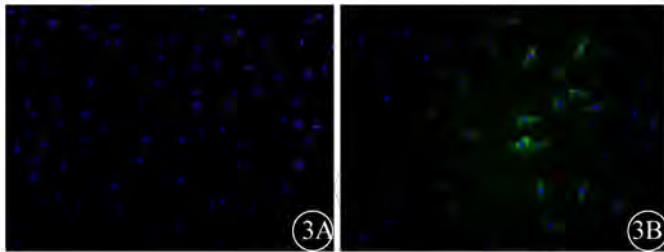
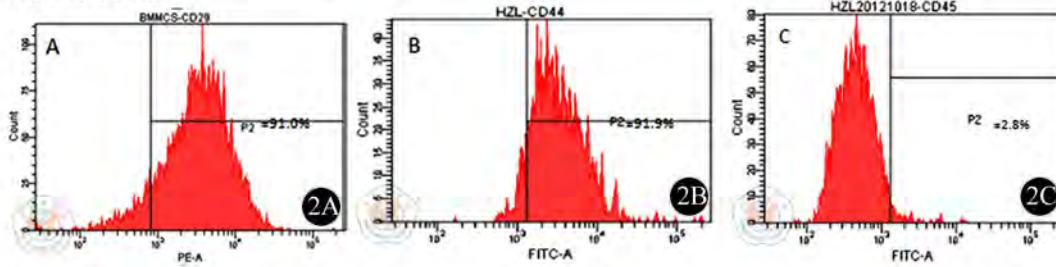


图2 第4代BMSC表面标志物表达。2A: BMSCs表面标志物CD29表达率; 2B: BMSCs表面标志物CD44表达率; 2C: BMSCs表面标志物CD45表达率 图3 免疫荧光染色。3A: 空白对照组; 3B: 诱导组

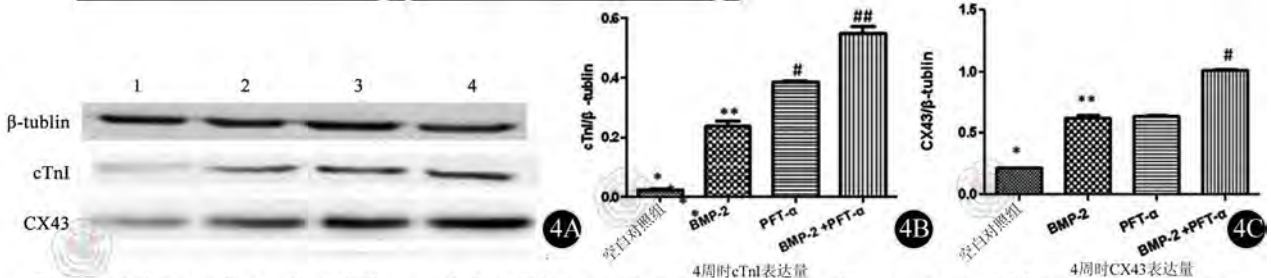


图4 4周时CX43和cTnI的表达量。1: 空白对照组; 2: BMP-2组; 3: PFT-α组; 4: BMP-2联合PFT-α组。4A: West-ern blot测定结果; 4B: 各组cTnI灰度值比值统计图。\*: BMP-2组或PFT-α组或BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组,  $P < 0.01$ ; \*\*: PFT-α组或BMP-2联合PFT-α组强于BMP-2组,  $P < 0.01$ ; #: BMP-2联合PFT-α组显著强于PFT-α组,  $P < 0.01$ ; ###: BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组或BMP-2组或PFT-α组,  $P < 0.01$ ; 4C: 各组CX43灰度值比值统计图。\*: BMP-2组或PFT-α组或BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组,  $P < 0.01$ ; \*\*: BMP-2组与PFT-α组无显著性差别,  $P > 0.05$ ; #: BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组或BMP-2组或PFT-α组,  $P < 0.01$

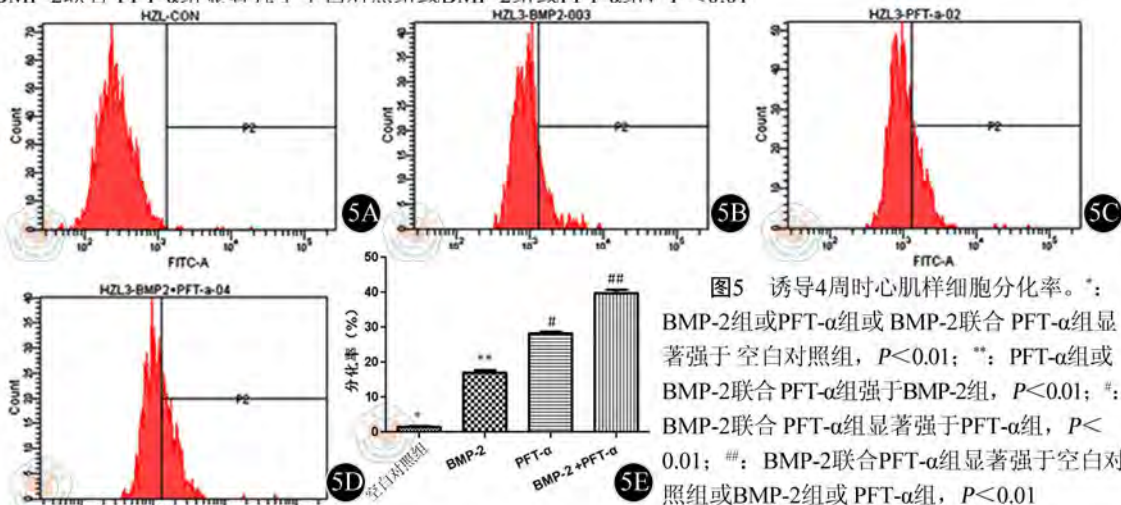


图5 诱导4周时心肌样细胞分化率。\*: BMP-2组或PFT-α组或BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组,  $P < 0.01$ ; \*\*: PFT-α组或BMP-2联合PFT-α组强于BMP-2组,  $P < 0.01$ ; #: BMP-2联合PFT-α组显著强于PFT-α组,  $P < 0.01$ ; ###: BMP-2联合PFT-α组显著强于空白对照组或BMP-2组或PFT-α组,  $P < 0.01$

量多角形细胞,细胞排列紊乱。传4代后,BMMSCs排列紧密,细胞形态趋于一致(图1C)。BMMSCs诱导4周后,呈束状排列,方向趋于一致,并出现“肌岛”样结构(图1D)。

2. BMMSCs的鉴定:检测BMMSCs表面特异性标志物CD29(+)、CD44(+)和CD45(-)。结果显示:BMMSCs CD29阳性表达率为(94.4±3.0)% (图2A),CD44阳性表达率为(92.4±0.6)% (图2B),而CD45阳性表达率为(2.0±0.7)% (图2C)。

3. 免疫荧光染色:空白对照组在诱导4周时不表达cTnI,免疫荧光染色阴性,诱导组表达cTnI,表达cTnI的细胞质内呈绿色荧光,细胞核染色为蓝色荧光(图3)。

4. CX43和cTnI蛋白表达:各组均表达cTnI,对照组较各实验组表达量少( $P < 0.01$ );BMP-2联合PFT- $\alpha$ 组较其他各组表达量多( $P < 0.01$ );BMP-2组较其他实验组表达量少( $P < 0.01$ )。

CX43蛋白在各组均有表达,对照组较各实验组表达量少( $P < 0.01$ );BMP-2联合PFT- $\alpha$ 组较其余各组表达量多( $P < 0.01$ ),BMP-2组与PFT- $\alpha$ 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图4)。

5. 流式细胞计数结果:诱导4周后,空白对照组、BMP-2组、PFT- $\alpha$ 、BMP-2联合PFT- $\alpha$ 组心肌样细胞诱导分化率分别为(1.4±0.3)%、(17.1±1.2)%、(28.2±1.0)%、(39.9±1.7)% ,各组均向心肌样细胞分化,对照组较各实验组心肌样细胞诱导分化率低( $P < 0.01$ );BMP-2联合PFT- $\alpha$ 组较其他各组心肌样细胞诱导分化率高( $P < 0.01$ );BMP-2组较其他实验组心肌样细胞诱导分化率低( $P < 0.01$ )(图5)。

## 讨 论

BMMSCs具有干细胞的特征,具备自我复制和多向分化潜能,体外在不同诱导条件下,能够向软骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、肌腱细胞、内皮细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞及心肌细胞等不同的细胞系分化<sup>[10-11]</sup>。BMMSCs体外被诱导为不同细胞系分化的诱导条件是探讨疾病发生机制及防治研究的重点。随着干细胞研究的不断深入,BMMSCs在体外诱导、分化为心肌样细胞、用于细胞移植,为缺血性心肌病中晚期并发症的防治提供了新的治疗思路。有研究表明,BMP-2可将胚胎干细胞诱导分化为心肌样细胞<sup>[12]</sup>。也有研究表明,BMP-2可诱导BMMSCs向心肌样细胞分化<sup>[7]</sup>,但其诱导率分化偏低,临床安全性还不明确,因此这一方法要真正应用于临床还有许多问题需要解决。因此,目前需要解决的问题是需要寻找更为安全、有效、诱导分化率高的药物。有研究显示,P53抑制剂PFT- $\alpha$ 在体外可诱导人

BMMSCs向心肌样细胞分化<sup>[9]</sup>,但目前国内外尚没有用BMP-2联合PFT- $\alpha$ 共同诱导BMMSC体外诱导分化为心肌细胞的研究。

骨形态发生蛋白家族包含至少40个成员,至今已经鉴定的BMPs有15种之多,均属于转化生长因子(transforming growth factor  $\beta$ ,TGF- $\beta$ )家族,以同源性的功能结构域为基础,分成几个BMP超家族。其中,BMP-2超家族有很高的生物学活性,在心脏的形成过程中发挥着重要的作用。BMP-2功能蛋白26 kDa,由2个相同的氨基酸多肽链经一个二硫键连接组成。对鸡胚的研究表明,在早期鸡胚的心脏发育部位,能够检测到BMP-2的表达,证明BMP-2在胚胎期的心脏发育、心肌分化中起着十分重要的作用。侯婧等发现BMP-2能有效诱导BMMSCs分化为心肌样细胞。

P53基因位于人类染色体17p13上,分为野生型和突变型,基因全长16~20 kb,包含11个外显子和10个内含子。P53基因启动子不含TATA盒、CAAT盒以及GC盒等常见启动序列,转录产生2.5 kb mRNA,翻译生的蛋白质由393个氨基酸残基组成,分子量53 kD,因此称为P53基因。P53基因为抑癌基因,参与细胞周期调控,在DNA修复、细胞凋亡、抑制肿瘤增殖过程中发挥着重要作用。PFT- $\alpha$ 主要抑制P53转位到细胞核后的转录调节作用。PFT- $\alpha$ 能够特异性、可逆性地抑制P53的活性,减少细胞的凋亡,提高细胞的存活率,又不会引起肿瘤发生。燕学波等发现PFT- $\alpha$ 能有效诱导BMMSCs分化为心肌样细胞。

cTnI是存在于心肌中的特有物质,可以作为心肌细胞分化的检测指标。cTnI表达意味着分化的心肌样细胞具有收缩的结构基础。所以本研究以cTnI作为BMMSCs分化为心肌样细胞的检测指标。

本研究初步探讨了BMP-2联合PFT- $\alpha$ 共同诱导BMMSC分化为心肌样细胞的作用,发现无论从细胞的形态、免疫组织化学,都表明BMMSCs在BMP-2联合PFT- $\alpha$ 作用下可向心肌样细胞转化,具有心肌细胞的特征,且诱导分化率高于单纯BMP-2组或PFT- $\alpha$ 组诱导。这为推动应用BMMSCs治疗心肌损伤,为细胞移植治疗有关心血管疾病提供了一种新思路,但其分子机制尚不明确,因此,随着对干细胞的深入研究,BMP-2联合PFT- $\alpha$ 共同诱导BMMSC分化为心肌样细胞分化率高的机制有待进一步研究。我们观察到结果,为以后的机制研究提供了良好的思路以及方法学基础。

## 参 考 文 献

- [1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001, 19: 180-192.
- [2] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 2007, 213: 341-347.
- [3] Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, et al. Mesenchymal stem

cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc*, 2009, 84:893-902.

[4] Schueller PO, Meyer C, Brehm M, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transplantation beneficially modulates heart rate variability. *Int J Cardiol*, 2007, 119:398-399.

[5] Liang XJ, Chen XJ, Yang DH, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro. *Cell Biol Int*, 2012, 36:215-221.

[6] Wang J, Greene SB, Bonilla-Claudio M, et al. Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-mediated mechanism. *Dev Cell*, 2010, 19:903-912.

[7] 侯婧, 吕安林, 刘博武, 等. 骨形态蛋白 2 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6:27-30.

[8] Yan X, Lv A, Xing Y, et al. Inhibition of p53-p21 pathway promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354:21-28.

[9] 燕学波, 吕安林, 刘博武, 等. P53 抑制剂诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 4:2878-2885.

[10] Tuli R, Tuli S, Nandi S, et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, 2003, 21:681-693.

[11] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004, 8:301-316.

[12] Bin Z, Sheng LG, Gang ZC, et al. Efficient cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2 combined with visceral endoderm-like cells. *Cell Biol Int*, 2006, 30:769-776.

(收稿日期:2013-01-25)  
(本文编辑: 张岚)

侯兆蕾, 吕安林, 达晶, 等. 骨形态发生蛋白 2 与 P53 抑制剂 PFT-α 联合诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(6):2514-2518.

