文章编号:1000-5404(2005)15-1555-03

论著

体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的研究

朱淑霞[1],宋治远[1],罗向东[2],仝识非[1],苏踊跃[2],梁光萍[2],唐红英[2] (第三军医大学西南医院:[1]心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨用5-氮胞苷(5-aza)体外诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)分化为心肌样细胞的最佳条件。**方法** 用Percoll密度梯度离心法分离培养、纯化大鼠MSCs,取第3代MSCs随机分为A、B、C 3组,分别加入5、10、20 μmol/L 5-aza;每组分别孵育12、24、48 h,继续培养28 d。相差显微镜观察细胞形态变化,免疫组化法检测细胞肌动蛋白(α-actin)和心肌肌钙蛋白T(cTnT)表达,并通过Western印迹法对细胞cTnT进行定量分析。**结果** MSCs经5-aza诱导培养28 d后,电镜下见细胞胞浆有散在肌丝样结构,免疫组化检测α-actin和cTnT表达均呈阳性;5 μmol/L的5-aza孵育48 h、10 μmol/L孵育24 h培养28 d的细胞cTnT表达量与10 μmol/L的5-aza孵育48 h、20 μmol/L 3种孵育时间各组比较无显著性差异,且细胞生物学特性未受到明显影响。**结论** MSCs在体外经5-aza诱导后可分化为心肌样细胞;5 μmol/L的5-aza孵育48 h和10 μmol/L的5-aza诱导24 h是MSCs体外诱导分化心肌样细胞的理想条件。

关键词:骨髓间充质干细胞;5-氮胞苷;诱导分化;心肌样细胞;大鼠
中图法分类号:R322.11;R329.21 **文献标识码**:A

Differentiation of mesenchymal stem cells from rat bone marrow into cardiomyocyte-like cells *in vitro*

ZHU Shu-xia[1], SONG Zhi-yuan[1], LUO Xiang-dong[2], TONG Shi-fei[1], SU Yong-yue[2], LIANG Guang-ping[2], TANG Hong-ying[2] ([1]Department of Cardiology, [2] State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the optimal condition for the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into cardiomyocyte-like cells *in vitro*. **Methods** The MSCs were purified by percoll mediated density gradient centrifugation, and then randomly divided into A, B and C groups treated with 5, 10, 20 μmol/L 5-azacytidine, respectively. MSCs in each group were treated with 5-azacytidine for 12, 24 and 48 h, and then cultured for 28 d before examination. The morphological changes in MSCs were observed with inverted microscope. The expression of α-actin and cTnT was determined by immunohistochemistry and the protein expression of cTnT was determined by Western blotting. **Results** At day 28 after induction with 5-azacytidine, scattered myogenic structure was observed in the plasma of MSC under electronic microscope. Positive expression of α-actin and cTnT were detected with immunohistochemistry. As compared with 10 μmol/L (48 h) and 20 μmol/L (12, 24 and 48 h) subgroups, there was no significant difference in the expression of cardiac troponin T among 5 μmol/L (48 h) and 10 μmol/L (24 h) groups without effect on the biological characteristics. **Conclusion** MSCs could be differentiated into cardiomyocyte-like cells by 5-azacytidine *in vitro*. Induction with 5 μmol/L 5-azacytidine for 48 h or 10 μmol/L of 5-azacytidine for 24 h is the optimal condition for the differentiation of MSCs into cardiomyocyte-like cells *in vitro*.

Key words: marrow mesenchymal stem cells; 5-azacytidine; induction differentiation; cardiomyocyte-like; rat

近年研究表明,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能,可在不同的诱导条件下分化为成骨细胞、成软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞、神经元、神经胶质细胞及肝细胞等[1]。MSCs在体外经5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导可分化为心肌样细胞已被众多的实验所证实[2~5],但在体外不同浓度的5-aza及不同的诱导时间对MSCs分化的影响如何尚少见系统的研究报道。本研究旨在探讨MSCs体外诱导分化为心肌样细胞的最佳条件,提高诱

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370585)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370585)
作者简介:朱淑霞(1972-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,主治医师,主要从事间充质干细胞向心肌细胞方向诱导分化方面的研究,发表论文5篇。电话:13110226193
通讯作者:宋治远,电话:(023)68765168
收稿日期:2005-01-10;**修回日期**:2005-03-17

导分化心肌样细胞的比率。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM/ HamF12 1∶1 培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清 FBS (Hyclone 公司)、amphotericin B (Sigma 公司)、Percoll 分离液(Prarmia 公司)、5 -azacytidine(Sigma 公司)、兔抗肌动蛋白(α-actin 武汉博士德公司)、羊抗肌钙蛋白 T (TroponinT cTnT Santa 公司)、HRP 标记抗羊 IgG(Santa 公司)、硝酸纤维素(NC)膜(美国 Sigma 公司)、ECL 试剂盒(Pharmacia 公司)以及 S-P 超敏免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(福州迈新)。

1.2 MSCs 的分离、培养及纯化

取 2 月龄 Wistar 大鼠,体质量 100 ~ 120 g,购自第三军医大学实验动物中心。以 1% 戊巴比妥钠过量麻醉致死,75% 乙醇浸泡 10 min,无菌条件下取出胫骨、股骨,剪除两端骨骺,PBS 冲洗胫骨、股骨骨髓腔,200 目滤网过滤骨髓液,1 000 r/min离心 5 min ,取沉淀加入 DMEM/F12 重悬,轻轻叠加到密度为 1.073 g /ml Percoll 分离液上,2 500 r/min 离心 25 min ,收集单核细胞层,DMEM/F12 洗涤 2 次,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 重悬细胞沉淀,以(1 ~ 6) × 10^6 接种至培养瓶,在 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 孵箱内培养,细胞融合 80% 时,0.25% 胰酶和 0.01% EDTA 消化后以 1∶2 传代,相差显微镜(Olympus)下观察。

1.3 MSCs 的体外诱导分化

取第 3 代 MSCs 以每孔 1 × 10^5 个细胞的浓度接种于 3 个 6 孔培养板中,每个培养板分 A、B、C 3 组(每组 2 孔),于接种后第 3 天细胞 60 % 融合后给予处理,A、B、C 3 组分别加入 5、10、20 μmol/L 的 5-aza,3 个培养板分别孵育 12、24、48 h 后用 PBS 洗涤 2 次,并更换 10% FBS 的 DMEM/ HamF12 培养基继续培养,每 3 d 换液 1 次, 连续观察 28 d。

1.4 透射电镜观察

取诱导分化 28 d 的细胞消化、离心(1 500 r/ min,10 min)使细胞成团,经 2% 多聚甲醛、2.5% 戊二醛 4 ℃和 1% 锇酸后固定,梯度酒精脱水、环氧树脂 Epon812 包埋,超薄切片机切片,透射电镜观察。

1.5 免疫组化检测

取未诱导 MSCs 细胞和 5-aza 诱导培养 28 d 的细胞爬片,先用 4% 多聚甲醛固定 15 min,再按 S-P 试剂盒说明书进行,通过 α-actin 抗体 1∶200 、cTnT 抗体 1∶200 的工作浓度分别检测肌动蛋白和肌钙蛋白的表达。实验中用 PBS 代替一抗作阴性对照,棕黄色或棕褐色染色为阳性。

1.6 Western 印迹法检测

取诱导培养 28 d 的细胞,用 Western 印迹法对 cTnT 的表达进行定量分析。用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维膜上,封闭,杂交,1∶500 cTnT 及 1∶3 000相应的抗羊 IgG 二抗与滤膜共温浴,ECL 试剂显色,X 线片压片曝光,扫描后用 Bio Rad 的 Quantity one 图像分析软件进行光密度积分值分析。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 医学统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 相差显微镜观察

原代培养时细胞呈纺锤形以集落式迅速生长,传代后以分布均匀式生长。传至第 3 ~ 4 代,细胞外观均匀一致、生长特性和增殖能力比较稳定。用 5-aza 进行诱导培养时见 B 组孵育 48 h 和 C 组孵育 12、24、48 h 各亚组均有 10% ~ 30% 细胞脱落死亡,增殖期也较其余各组延迟。其余各亚组诱导培养 3 d 后均可见细胞变细长,排列更有序,7 d 时细胞呈长梭形,14 d 时细胞之间形成连接,排列方向渐趋一致,胞质变深,28 d 时可见有条索状肌管样细胞明显增多(图 1)。

2.2 透射电镜观察

经 5-aza 诱导培养 28 d 后用透射电镜观察,细胞浆内可见散在肌丝样结构,呈丝条状和点状排列,细胞核单一,呈不规则形(图 2)。

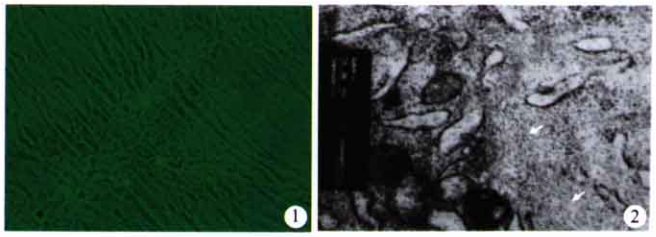


图 1 5-aza 诱导培养 28 d 显微镜观察 (相差显微镜 × 100)

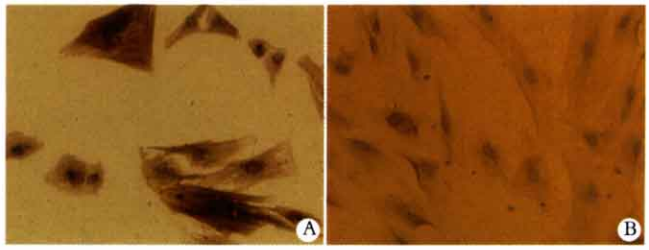
Fig 1 MSC cells treated by 5-azacytidine for 28 d (Phasecontrast microscope × 100)

图 2 诱导培养 28 d 后透射电镜下观察 (TEM ×34 000)

Fig 2 The ultrastructure of MSC cells induced by 5-azacytidine at day 28 shown strip and bundle dot of myofilament-like structures (TEM ×34 000)

2.3 免疫组化检测

5-aza 诱导培养 28 d 的细胞经 α-actin 和 cTnT 免疫组化检测均呈阳性反应(图 3)。而未经 5-aza 诱导的 α-actin 呈弱阳性,cTnT 呈阴性。



A: Positive expression of α-actin; B: Positive expression of cTnT

图 3 5-aza 诱导 28 d 后部分培养细胞 (S-P ×200)

Fig 3 The expression of α-actin and cTnT in MSCs induced by 5-azacytidine at day 28 (S-P ×200)

2.4　Western 印迹法检测

对经 5-aza 诱导培养 28 d 的细胞用 Western 印迹法对 cTnT 的表达进行了定量分析，结果显示：5-aza 浓度相同的各亚组浓度随孵育时间延长 cTnT 表达量逐渐增加，而孵育时间相同者则随 5-aza 浓度增加 cTnT 表达量逐渐增加，但浓度越大、孵育时间越长的累积效果并不明显（表 1）。

表 1　不同浓度 5-aza 和不同作用时间 cTnT 表达的图像光密度积分值（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Image quantity of cTnT expression by Western blotting in each group（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Total time of induction	Concentration of 5-azacytidine		
	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L
12 h	6.26 ± 0.26	7.72 ± 0.25☆	9.50 ± 0.38☆#
24 h	7.27 ± 0.22*	9.43 ± 0.26*☆	9.55 ± 0.18☆
48 h	9.48 ± 0.26*△	9.54 ± 0.301*	9.62 ± 0.19

*：$P<0.05$，*vs* 12 h；△：$P<0.05$，*vs* 24 h；☆：$P<0.05$，*vs* 5 μmol/L 5-azacytidine；#：$P<0.05$，*vs* 10 μmol/L 5-azacytidine

3　讨论

1999 年 Makino 等[2]首次体外给予 3 μmol/ L 的 5-aza 诱导 MSCs 定向分化心肌样细胞获得成功，开创了 MSCs 体外诱导分化心肌样细胞研究的先河。一些学者对其诱导机制进行了研究，认为 5-aza 是胞嘧啶核甙的一个类似物，能引起 DNA 中某些胞嘧啶的去甲基化，从而参与激活表达肌细胞的特异性启动或分化调控基因。这些特异性基因在甲基化状态下处于转录失活状态，5-aza 使其去甲基化而发生构型改变，转录激活，从而使启动细胞向心肌分化，使 MSC 转变成心肌细胞[6,7]。

本实验采用密度梯度离心与差速贴壁培养相结合的方法纯化 MSCs，通过 Percoll 分离液对骨髓液进行密度梯度离心，除去绝大部分红细胞、粒细胞、脂肪细胞和血小板，获得纯度较高的有核细胞，再根据贴壁性差异，随换液弃除悬浮生长的造血细胞。传代有益于纯化其中的干细胞组分，传至 3 ~ 4 代后细胞变为排列均匀有序的成纤维样细胞。提示 Percoll 密度梯度离心法应用于纯化 MSCs 效果肯定。一般认为传代后第 2 ~ 4 天细胞进入细胞增殖期，从理论上讲此期处于有丝分裂的细胞数比例大，药物发生有效干扰作用效率高，同时认为延迟细胞增殖周期可以促进细胞分化，反复传代也将促使细胞增生，快速增生将会使细胞失去分化能力。故本实验 5-aza 诱导时机选择在 MSCs 第 3 代传代后第 3 天的细胞，诱导 4 周内不传代，降低培液中胎牛血清浓度和延迟换液促进 MSCs 分化。

已有研究表明，actin 主要存在于肌细胞胞浆中，心肌型与骨骼肌型两种 α-actin 异构体有近乎完全相同的结构特征[8,9]。故心肌 α-actin 的研究大多是建立在骨骼肌基础之上的；而 cTnT 在心肌与骨骼肌上的氨基酸序列是不同的，二者在结构上和免疫方面也有很大的区别，其抗血清的交叉反应率只有 1% ~ 2%，不易受骨骼肌的影响；两者均是鉴定心肌细胞的比较特异性的蛋白。因此，为鉴定 MSCs 在体外经 5-aza 诱导培养是否分化为心肌样细胞，本实验用免疫组化法对经 5-aza 诱导培养 28 d 细胞 α-actin 和 cTnT 表达进行了检测，结果表明经 5-aza 诱导培养 28 d 细胞 α-actin 和 cTnT 均呈阳性，而未经 5-aza 诱导的对照组细胞 α-actin 呈弱阳性，cTnT 呈阴性，表明经 MSCs 经 5-aza 诱导 28 d 后已分化为心肌样细胞。

通过 Western 印迹法检测不同条件下诱导 28 d 的细胞 cTnT 的表达表明，5 μmol/L 的 5-aza 孵育 48 h、10 μmol/L 的 5-aza 孵育 24、48 h 及 20 μmol/L 的 5-aza 孵育 12 h 以上 cTnT 表达量相对较高，且相互之间比较无显著性差异，但形态学观察显示 10 μmol/L 的 5-aza 孵育 48 h、20 μmol/L 的 5-aza 孵育 12 h 以上细胞生物活性均受到明显影响。故认为在用 5-aza 诱导 MSCs 分化为心肌细胞时，以加入 5 μmol/L 的 5-aza 孵育 48 h 和 10 μmol/L 的 5-aza 孵育 24 h 为宜，其既可保证心肌样细胞的诱导率，又不会对细胞的生物学产生太大的影响，是较为理想的诱导条件。

参考文献：

[1] Barry F P, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 568 - 584.

[2] 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.

[3] 曹　丰，牛丽丽，孟　玲，等. 体外化学诱导人骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 实验生物学报，2004，37(2)：118 - 124.

[4] Xu W, Zhang X, Qian H, *et al*. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2004, 229(7): 623 - 631.

[5] Rangappa S, Fen C, Lee E H, *et al*. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(3): 775 - 779.

[6] Konieczny S F, Emerson C P Jr. 5-azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination[J]. Cell, 1984, 38(3): 791 - 800.

[7] Wakitani S, Saito T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417 - 1426.

[8] Rubenstein P A. The functional importance of multiple actin isoforms[J]. Bioessays, 1990, 12(7): 309 - 315.

[9] Jin J P, Lin J J. Isolation and characterization of cDNA clones encoding embryonic and adult isoforms of rat cardiac troponin T[J]. J Biol Chem, 1989, 264(24): 14471 - 14477.

（编辑　汪勤俭）