文章编号:1000-5404(2005)16-1681-04

论著

# 心肌细胞介导骨髓间充质干细胞的心肌样分化

张 蕾[1],陈 沅[1],田 杰[1],张 文[1],朱 静[2] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]心血管内科,[2]儿科研究所,重庆 400014)

**提 要:目的** 探讨骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在不同培养条件下定向分化过程中的生物学特性变化及其机制。**方法** 贴壁法分离大鼠MSCs,培养至第6代。实验分3组:条件培养基组,用新生鼠心肌细胞培养上清液制成的条件培养基处理MSCs 48 h 2次,其间间隔48 h;混合培养组,新生鼠心肌细胞和MSCs按1:1的比例混合培养1周;对照组,MSCs常规培养。检测各组MSCs中心肌细胞结构功能蛋白:心肌肌联蛋白(titin)、肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)、心肌组织缝隙连接的特异性组成蛋白质Connexin43(Cx43)的表达情况。**结果** ①条件培养基可诱导MSCs心肌样分化,表达心肌细胞骨架蛋白titin的Z带及A带部分,Cx43大量表达,但在检测期内未观察到MHC的表达;②MSCs在混合培养中与心肌细胞形成连接,表达titin,部分细胞内可检测到类似肌小节的结构,Cx43集中分布于细胞相邻的界面;③对照组中的部分MSCs可少量表达Cx43及titin。**结论** 源于心肌细胞的各种因素可促使MSCs心肌样分化,分化的程度取决于作用信号的性质。

**关键词:**骨髓间充质干细胞;心肌细胞;诱导分化
**中图法分类号:** R322.11;R329.21;R329.24 **文献标识码:** A

# Cardiomyocyte-induced myogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Lei[1], CHEN Yuan[1], TIAN Jie[1], ZHANG Wen[1], ZHU Jing[2] ([1]Department of Cardiology, Children's Hospital, [2]Institute of Pediatrics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To investigate the differentiation of marrow mesenchymal stem cells (MSCs) under various *in vitro* conditions and analyze its mechanisms. **Methods** Rat MSCs were isolated and passaged. MSCs were either cultured in conditioned medium, the combination of supernatant of cardimyocyte culture and common medium, or cocultured with neonatal cardiomyocytes at the ratio of 1:1 (cocultured group), or under normal medium (control group). After 7 d of induction, immunofluorescence was employed to detect titin, early cytoskeletal protein of cardiomyocyte, myosin heavy chain (MHC) and Connexin43 (Cx43) expression in MSCs. **Results** ①Conditioned medium could induce MSCs into cardiomyocyte lineage. Z part and A part of titin, large quantity of Cx43 could be detected after 1 week while myosin heavy chain was absent; ②MSCs could form junctions with neighboring cardiomyocytes. Above mentioned cardiomyocyte proteins were expressed in cocultured MSCs. Sarcomeric-like structure was detected in the cytoplasm of cocultured MSCs. Cx43 was mainly distributed in the MSC-cardiomyocyte interface. ③Untreated rat MSCs expressed myocardial gap junction protein Cx43 and titin in a lower degree. **Conclusion** Microenvironment of cardiomyocyte can induce the differentiation of MSCs into myocyte phenotype *in vitro*, either by soluble signaling molecules or by direct cell-to-cell contact. Degree of differentiation depends on the signal properties.

**Key words:** mesenchymal stem cell; cardiomyocyte; differentiation

干细胞移植在心脏疾病治疗中的运用已进行大量动物试验,并进入临床研究,显示其良好的应用前景[1,2]。骨髓的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),成为近年研究的热点。体外培养时,MSCs可保持其多能性[3],经过去甲基物质5-azacytidine处理后,能向心肌细胞分化[4];将MSCs直接移植入心肌组织,也能实现这种分化,使病损心脏的功能得到改善[5~7],我们的前期研究也体现了这一点[8],研究心肌微环境中作用于MSCs的定向分化的各个因素对于调节MSCs的分化方向、提高分化率具有极其重要的意义。本实验利用混合培养和上清液即条件培养基培养方法,以探讨促使MSCs定向分化所必需的作用条件。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30371499)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371499)
**作者简介:**张 蕾(1979-),女,四川省乐山市人,硕士,医师,主要从事小儿心血管疾病诊治方面的研究。电话(023)63632756-3483
**收稿日期:**2004-09-02;**修回日期:**2005-03-15

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器及试剂

倒置相差显微镜(OlympusIX70,日本);荧光显微镜(Olym-

pusBX51,日本);激光共聚焦显微镜(Leica TCS-NT,德国)。Dulbecco's modified Eagle medium/F12(1∶1)培养基[DMEM/F12(1∶1),Hyclone];胎牛血清(FBS,Hyclone);胰蛋白酶(Promega);溴脱氧核苷尿嘧啶(Bromodeoxyuridine,BrdU,Sigma);4′,6-Diamidino-2-phenylindole(DAPI,Roche);羊抗大鼠 myosin heavy chain(MHC),兔抗大鼠 Cx43 均购自 Santa Cruz;兔抗大鼠 titin-M 线部分(MIR)、兔抗大鼠 titin-Z 带部分(z1z2)由 EMBL Dr. Siegfried Labeit 馈赠;小鼠抗大鼠 BrdU、FITC-兔抗羊、FITC-羊抗兔、TRITC-羊抗小鼠购自中山公司。

### 1.2 动物

8 周龄 Wistar 大鼠,体质量(140±10)g;0~3 d 新生 Wistar 大鼠,均购自重庆医科大学实验动物中心。

### 1.3 MSCs 的分离与纯化

方法参照文献[8]:分离成年大鼠股骨与胫骨,DMEM/F-12 冲出骨髓,离心,DMEM/F12(1∶1)培养液(含 10% FBS 及 100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)重悬沉淀,置于 37 ℃,5% $CO_2$ 饱和湿度培养箱培养。24 h 后换液,以后每 3 天换液,至 80%~90% 融合时传代。

### 1.4 新生大鼠心肌细胞分离与培养

新生 Wistar 大鼠,取出心脏,剪碎心肌组织至 1 $mm^3$,加入 0.25% 胰酶,反复吹吸消化 5~6 min,收集消化液至含 10% FBS 的培养液中,继续向残余组织中加胰酶消化,反复至组织完全消化为止。消化液经钢网过滤后离心,含 10% FBS 培养液重悬沉淀,37 ℃,5% $CO_2$ 培养,贴壁 2 h 后,转培养液入培养板。

### 1.5 条件培养液的制备及 MSCs 的条件培养液培养

收集心肌细胞培养每 2 天更换的培养液,过滤后加入等体积的含 10% FBS 的 DMEM/F12(1∶1)培养液,即为条件培养液。将传至第 6 代的 MSCs 按每孔 $2\times10^5$ 细胞数接种入置有盖玻片的 6 孔培养板中,加入条件培养液,作用 48 h,更换为普通培养液,48 h 后条件培养液再次作用 48 h;对照组为普通培养液培养,每 48 小时换液共 1 周。

### 1.6 心肌细胞与 MSCs 混合培养

加 BrdU 入传代后的 MSCs,浓度为 3 μmol/L,作用 48 h;其后,PBS 冲洗 6 次,按每孔 $2\times10^5$ 细胞数接种入置有盖玻片的 6 孔培养板,按 1∶1 的细胞数比例加入刚分离的新生大鼠悬液,每 48 小时换液至 1 周。

### 1.7 免疫荧光检测

采用间接荧光法,PBS 代替一抗设为阴性对照。对照组和条件培养基组:PBS 冲洗盖玻片后丙酮固定、0.1% Triton X-100 处理后,正常山羊血清或兔血清封闭 10 min;分别加入 MHC,Cx43、titin-M 线部分(MIR)、titin-Z 带部分(z1z2)抗体,稀释度均为 1∶100,4 ℃过夜;PBS 充分清洗后,加入 FITC-羊抗兔或兔抗羊(1∶150),室温 1 h;PBS 清洗,1 μg/ml DAPI 复染,室温 5 min,充分清洗后 50% 甘油封片。

混合培养组,采用双标免疫荧光,以 BrdU 抗体(1∶100)及前述 4 种抗体中的一种作为一抗,程序与前大致相同,所作改变简述如下:固定后 2 mol/L 盐酸变性,室温 15 min;0.1% Triton X-100 及封闭血清处理同前;分别加入上述 4 种抗体中的一种,作用后加入相应的二抗;PBS 洗涤,加入抗 BrdU 抗体,4 ℃过夜,PBS 充分洗涤;加入 TRITC-羊抗小鼠(1∶150),室温 1 h;PBS 清洗,封片。

### 1.8 荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察

荧光显微镜随机选取 10 个非重复视野(400 倍)作细胞分类计数。以细胞抗原表达的形态及其荧光强度为标准进行分级,依次为强阳性、阳性、弱阳性及阴性,以正常心肌细胞抗原的规则表达及其 FITC 强度设为强阳性;不具有规则结构但荧光强度同前者的设为阳性;未加一抗的 MSCs 设为阴性;荧光强度介于阳性及阴性之间的设为弱阳性。细胞总数在对照组及条件培养基组中以 DAPI 为标志计数,在混合培养组中以 TRITC 阳性为标志计数。将阳性片进一步作激光共聚焦显微镜观察,以检测肌小节的存在及形态。

### 1.9 统计学处理

将分类数据整理成频数表资料,针对每种蛋白表达情况进行 3 组组间显著水平分析,采用 Ridit 分析法。从频数表资料得到每组细胞内不同表达强度的细胞数占细胞总数的百分比,作图描述。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 的分离与培养

MSCs 接种 24 h 后开始贴壁生长;3~4 d 后开始集落样增殖;7~8 d 达到 90%~95% 融合。传代后细胞呈束状、漩涡状排列,每 3~4 天达 90% 融合,至第 4 代时,细胞形态一致,典型成纤维细胞样,几乎无折光性。

### 2.2 新生鼠心肌细胞分离与培养

差速贴壁 2 h 后成纤维细胞贴壁,转移未贴壁细胞,36 h 见部分细胞突起更为明显,开始收缩;1 周后大量细胞成团收缩,同时成纤维细胞开始生长,呈扁平纤维状。免疫荧光检测 titin 显示肌小节完整而规则,Z 带和 M 线规则排列。心肌细胞大量表达 Cx43,密集分布于细胞之间交界处。

### 2.3 MSCs 的条件培养基培养及混合培养观察

相差显微镜下,条件培养基组 MSCs 与对照组形态上无明显区别,增殖速度一致。在混合培养组中,心肌细胞及 MSCs 均能正常贴壁生长,呈成纤维细胞样,心肌细胞具有较强折光性,自发搏动,同单独培养时一致,并于 24~48 h 开始同折光性很弱的 MSCs 相互连接,带动 MSCs 搏动。1 周后,成纤维细胞开始增殖,细胞密度明显增加,影响心肌细胞和 MSCs 的生长及检测,处理到此终止。

### 2.4 条件培养基组及混合培养组 MSCs 的 Titin 及 MHC、Cx43 的表达

对照组中,约 12% 的 MSCs titin Z 带部分表达为弱阳性,约 1% 呈阳性;M 线部分 8% 为弱阳性,1% 为阳性,阳性或弱阳性细胞分散分布,titin 表达弥散均一分布于细胞浆中,未发现任何周期样结构。条件培养组及混合培养组的 titin 表达强度明显增加,以阳性及强阳性表达为主,与对照组有明显差异($P<0.01$)(表 1,2),两组的 Z 带及 M 线细胞表达强度分类百分比基本一致,条件培养基组阳性细胞成团分布,细胞内 titin 表达弥散,无周期样结构,而在混合培养基组中,阳性细胞主要分布在与心肌细胞相邻的 MSCs 中,极少数荧光信号较强的 MSCs 中可见到 Z 带或 M 线的规则排列(图 1)。

**表 1　3 组 MSCs 的 titin Z 带部分表达情况**

**Tab 1　Z part of titin in MSCs of three groups**

| Group | Negative | Weak positive | Positive | Strong positive |
|---|---|---|---|---|
| Control | 0.877 | 0.113 | 0.011 | 0 |
| Conditioned * | 0.068 | 0.017 | 0.048 5 | 0.33 |
| Cocultured * | 0.275 | 0.087 5 | 0.062 5 | 0.575 |

*：$P<0.01$，*vs* control

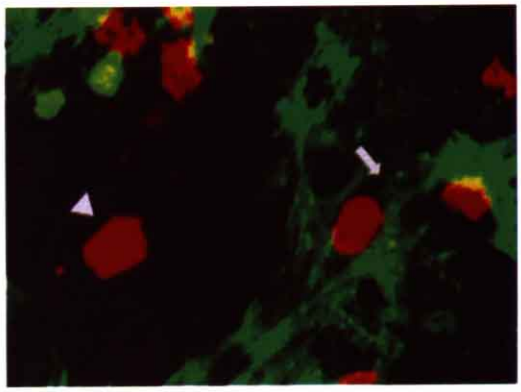
**表 2　3 组 MSCs 的 titin M 线部分表达情况**

**Tab 2　M part of titin in MSCs of three groups**

| Group | Negative | Weak positive | Positive | Strong positive |
|---|---|---|---|---|
| Control | 0.908 | 0.082 | 0.01 | 0 |
| Conditioned * | 0.169 | 0.139 | 0.351 | 0.342 |
| Cocultured *# | 0.226 | 0.019 | 0.17 | 0.585 |

*：$P<0.01$，*vs* control；#：$P<0.05$，*vs* conditioned group

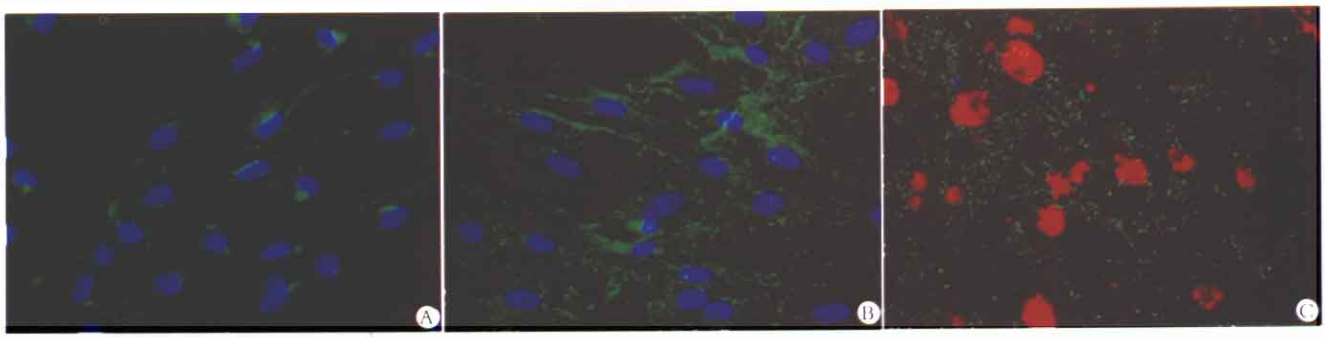
表达 Cx43 的细胞阳性率在 3 组无明显差异，均为(90 ± 5)%，但表达强度及分布有明显不同。对照组 MSCs Cx43 的荧光颗粒小而稀疏，弥散分布于胞浆、核周部，少部分位于胞膜(图 2A)。随传代次数增加无明显改变。与之相比，条件培养基组 Cx43 表达量明显增多，颗粒粗大，相邻细胞膜处可见大量分布(图 2B)；混合培养组中，MSCs 的 Cx43 表达量与条件培养基组基本相当(表 3)，与心肌细胞接触的 MSCs 胞膜上大量的 Cx43 分布，胞浆中则较稀疏，未与心肌细胞接触的 MSCs 的 Cx43 表达与条件培养基组一致(图 2C)。



The MSCs surrounded by cardiomyocytes (red nuclei) has sarcomeric-like structure in cytoplasm (arrow) and the isolated MSCs is negative (arrow head)

**图 1　titin 在混合培养的 MSCs 中的表达**(免疫荧光 ×400)

**Fig 1　titin expression in MSCs cocultured with myocytes** (Immunofluorescence ×400)




A：control group；B：conditioned group；C：cocultured group

**图 2　3 组中 MSCs 的 Cx43 的表达情况**(免疫荧光 ×400)

**Fig 2　Cx43 expression of MSCs in three groups**　(Immunofluorescence ×400)

**表 3　3 组 MSCs 的 Cx43 表达情况**

**Tab 3　Cx43 part of titin in MSCs of three groups**

| Group | Negative | Weak positive | Positive | Strong positive |
|---|---|---|---|---|
| Control | 0.254 | 0.155 | 0.482 | 0.109 |
| Conditioned * | 0.022 | 0.022 | 0.167 | 0.789 |
| Cocultured * | 0.022 | 0.066 | 0.11 | 0.802 |

*：$P<0.01$，*vs* control

对照组及条件培养基组未检测到 MHC 表达，在混合培养组中可见与心肌细胞接触的 MSCs 有约极少部分表达弱阳性的 MHC，未见到周期样规则成分的存在。

## 3　讨论

条件培养基中含有心肌细胞培养过程中释放的生长因子、细胞因子等物质，代表了心肌细胞微环境中的大量可溶性因素。将条件培养基作用于 MSCs，在体外模拟可溶性因素对于 MSCs 的诱导作用，将此因素从心肌细胞微环境中分离，并独立控制。处理 1 周后 MSCs titin 及 Cx43 的表达明显增多，为其心肌样分化的表现。混合培养使 MSCs 处于上述可溶性因素与心肌细胞联合作用下，体现心肌细胞自身在诱导过程中所起的作用，在此环境下，MSCs 不仅有定向分化，而且部分与心肌细胞相接触的 MSCs 形成规则的肌小节结构。Rangappa[9] 将人 MSCs(hMSCs)进行条件培养基处理，48 h 后，仅发现 β-肌动蛋白表达，基本未检测到分化证据；与之相比，混合培养 48 h 的 hMSCs β-MHC、肌钙蛋白 T 及 β-肌动蛋白均有表达[9]，与本实验中 titin 的表达互为补充，说明心肌细胞分泌的可溶性因子能够诱导 MSCs 的心肌样分化，表达早期蛋白质，但不能组装成有效的结构，也不能进一步表达其它蛋白质如 MHC 等，分化程度较低；若与心肌细胞联合作

用，则 titin 的组装更有序，出现类似肌小节的结构，并伴有更多结构功能蛋白的表达，分化程度明显提高。

心肌细胞与 MSCs 之间 Cx43 的大量表达，提示缝隙连接的存在，后者为小分子物质和电信号的传递通道，能将源于心肌细胞的促分化信息持续作用于 MSCs，使 MSCs 中的心肌细胞特异性基因开放或开放增加；同时，心肌细胞的收缩带动 MSCs，使后者受到持续的机械刺激，从而导致 MSCs 分化程度提高，结构上的发育更趋完善，说明细胞与细胞的直接接触是 MSCs 高分化的重要条件。MSCs 具有多向分化潜能，其分化方向取决于所处微环境的性质，将其植入心肌细胞瘢痕区，细胞大量死亡，存活的细胞则主要分化为成纤维样细胞[6]，而在非梗塞区域，MSCs 与正常宿主心肌细胞相接触，向正常心肌细胞的表型分化；若将 MSCs 作移植前 5-aza 处理，发现在宿主心肌内，其分化程度更高，改善心功能的效果更显著[10]，再次结合本实验中条件培养与混合培养对 MSCs 影响的对比，这些现象均说明微环境的各种因素对于调控 MSCs 分化方向及分化程度所起的关键作用，也可以说明微环境的性质在很大程度上决定了细胞移植的效果。

本实验选用 titin 作为检测的重点，是因为在心肌细胞发育过程中，titin 早于肌球蛋白 myosin 和肌动蛋白 actin 表达，Z 带部分表达最早。Titin 首先形成“支架”，介导 myosin 和 actin 在其上的组装，从而形成规则的肌小节，另外 titin 也具有调节心肌细胞主动收缩及被动舒张的功能，是除粗肌丝和细肌丝以外的第三肌丝系统。Titin 表达正常的量以及形成规则的结构是心肌细胞具有正常结构和功能的基础和前提条件[11]。但是，正如 Rangappa S 的条件培养基处理 MSCs，现有的研究，无论细胞移植或体外诱导，一般都是观察 myosin、actin 或肌钙蛋白等心肌细胞发育过程中比较后期表达的蛋白质，这就会否定一些有价值的假设。同时，通过检测 titin 发现混合培养 MSCs 中肌小节结构的存在，说明在心肌细胞微环境作用下的 MSCs 具有收缩功能的结构基础。

本实验显示，相当一部分常规培养的 MSCs 表达 Cx43，也有极少部分表达 titin。hMSCs 中也发现包括 Cx43 在内的多种连接蛋白的存在[9]，这说明 MSCs 中可能含有具有心肌分化倾向性的细胞，由表达的 Cx43 的分布可看出此缝隙连接也还不具备正常的生理功能，可能处于休眠状态[9]，若经过心肌细胞分泌的一些因子作用，可以部分激活。MSCs 作为含有不同分化程度及分化方向的细胞群，使其在细胞移植应用中具有多样性，这对于改善心功能是非常重要的，分化成心肌细胞可以弥补丧失的功能性心肌细胞，改善心肌收缩功能；分化成内皮细胞可以形成新生血管，改善缺血区域的血液供应，成纤维细胞产生的胶原等细胞外基质形成支架，对于维持心肌组织良好的生理特性是必要的。

需要提到的一点是，条件培养基来自心肌细胞培养后的上清液，营养与普通培养液相比会有所降低，因此实验中，将 MSCs 用条件培养基处理 48 h 2 次，间隔 48 h 使用普通培养液以使营养得到补偿；而混合培养则是 MSCs 受心肌细胞作用持续 1 周，两组作比较，可能会低估条件培养基的作用，考虑到处理时间短，相差不大，这种差异可能也不会很明显。另外，心肌细胞培养 1 周以后，由于成纤维细胞增殖，细胞密度增加，开始影响心肌细胞及 MSCs 的生长及实验检测，因此本实验的处理因素仅作用 1 周，以后有必要改进培养方法，可使观察时间更长，更能模拟体内诱导的过程。通过以上的实验，初步说明心肌细胞形成的微环境可以使 MSCs 分化成心肌样细胞，两种细胞可以相互连接，传递各种信号，提高 MSCs 的分化程度。但还需要更深入的研究阐明这些因素及信号途径，以便我们可以对干细胞的分化进行调控，使其临床应用更为安全和有效。

**参考文献：**


[1] Menasche P, Hagege A A, Scorsin M, *et al*. Myoblast transplantation for heart failure[J]. Lancet, 2001, 357(9252): 279-280.

[2] Strauer B E, Brehm M, Zeus T, *et al*. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans [J]. Circulation, 2002, 106(15): 1913-1918.

[3] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[4] 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.

[5] Shake J G, Gruber P J, Baumgartner W A, *et al*. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects [J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(6): 1919-1925.

[6] Wang J S, Shum Tim D, Chedrawy E, *et al*. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications [J]. J Thorac Caridovasc Surg, 2001, 122(4): 699-705.

[7] Tang G H, Fedak P W, Yau T M, *et al*. Cell transplantation to improve ventricular function in the failing heart [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2003, 23(6): 907-916.

[8] 吕铁伟，田 杰，朱 静，等. 骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞[J]. 细胞生物学杂志，2004，26(2)：197-203.

[9] Rangappa S, Entwistle J W, Wechsler A S, *et al*. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(1): 124-132.

[10] Saito T, Kuang J Q, Lin C C, *et al*. Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(1): 114-123.

[11] 张 蕾，陈 沅，田 杰. 心肌肌联蛋白的结构及其生物学意义[J]. 国外医学儿科学分册，2003，30(1)：32-35.


（编辑 周 芳）