文章编号:1000-5404(2006)05-0435-03

论著

大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞内向钠电流的研究

农耀明[1],宋治远[1],陈鹏慧[2],尹戴佳佳[1]　(第三军医大学:[1]西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,[2]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提　要: 目的　研究大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)诱导分化为心肌样细胞内向钠电流的状态。**方法**　取健康 SD 大鼠骨髓,经密度梯度离心和贴壁培养获得 MSCs,传至第两代,以 10 μmol/L 的 5-氮杂胞嘧啶(5-aza)孵育诱导 24 h。培养 4 周,用免疫细胞化学染色方法鉴定心肌样细胞(cardiomyocyte-like cells);用全细胞膜片钳技术,检测胞膜内向钠电流,并与未经诱导的 MSCs 和急性分离的心肌细胞进行比较。**结果**　MSCs 经 5-aza 诱导后部分表达心肌特异性肌钙蛋白 T,在诱导后 4 周记录到快速激活和失活的膜内向钠电流。与急性分离的心肌细胞比较,相同刺激脉冲下心肌样细胞所产生的电流幅值较小,I-V 曲线向右偏移。**结论**　经 5-aza 诱导后,MSCs 可分化成具有兴奋性内向钠电流的心肌样细胞。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 5-氮杂胞苷; 膜片钳; 内向电流; 大鼠
中图法分类号: R322.11; R329.21; R329.25　　**文献标识码**: A

Study on the inward currents of cardiomyocyte-like cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells

NONG Yao-ming[1], SONG Zhi-yuan[1], CHEN Peng-hui[2], YIN Dai-jia-jia[1] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To observe the electrophysiological characteristics of the inward current of cardiomyocyte-like cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods**　Bone marrow specimens was extracted from SD rats aged 1 month. MSCs were isolated by gradient centrifugation and obtained by adherence culture. The second-passage MSCs were treated with 10 μmol/L 5-azacytidine and incubated for 24 h. After 4 weeks, cardiomyocyte-like cells were identified by immunocytochemical staining technique, then used to detect the inward current with the whole-cell patch-clamp technique, which results were compared with the normal cardiomyocytes and the MSCs without induction. **Results**　Some cardiomyocyte-like cells were stained positive for troponin T, and the quickly activated and inactivated inward currents were elicited 4 weeks after 5-aza cytidine treatment. The inward currents of cardiomyocyte-like cells recorded in the same square pulse were weaker than that of the normal cardiomyocytes, and the I-V curve of cardiomyocyte-like cells was right-shifted. **Conclusion**　After treated with 5-azacytidine, MSCs differentiate into cardiomyocyte-like cells which express the excitable inward current.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; 5-azacytidine; patch clamp; inward current; rat

1995 年 Wakitani[1] 首先报道 MSCs 能在一定条件下向肌细胞转化,从而使肌肉修复成为一种可能。Makino[2] 等将 MSCs 连续传代 4 个月以上,并在 5-氮杂胞嘧啶(5-azacytidine, 5-aza)作用下诱导分化,筛选出部分细胞类似胎儿的心肌细胞,为 MSCs 的心脏细胞移植提供了理论基础。近年来,国内外虽对 MSCs 在各种条件下诱导分化为心肌细胞进行了诸多研究,但有关大鼠 MSCs 体外诱导分化的心肌样细胞内向钠电流的研究尚少见报道。本实验在体外将大鼠 MSCs 经 5-aza 诱导心肌化,并以未经诱导的 MSCs 和急性分离的大鼠心室肌细胞为对照,采用全细胞膜片钳技术,对细胞膜内向钠电流进行了研究。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与器材

D-Hanks 液(Hyclone 公司)、DMEM 培养液(Gibco 公司)、优等胎牛血清(TBD 公司)、5-氮杂胞苷(Sigma 公司)、Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司),胰蛋白酶(Gibco 公司), Troponin T-C 单抗(SANTA CRUZ 公司)、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。Axonpatch 200B 膜片钳放大器、Digidata1200 AD/DA 转换器(Axon 公司),电极拉制仪(Narishge, PC10),玻璃电极(南京六合泉水教学实验器材公司)。Hepes 、TTX 均为美国 Sigma 公司产品,其余无机盐均为国产分析纯产品。

1.2　实验分组

经 5-aza 诱导培养的 MSCs 为实验组,取未经 5-aza 诱导培养的 MSCs 及急性分离的心室肌细胞为对照组。

1.3　MSCs 的体外诱导培养

参照本实验室建立的诱导培养方法[3] 进行。取健康 1 月

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:农耀明(1976 -),男,广西壮族自治区南宁市人,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。电话:(023)60823517
通讯作者:宋治远,电话:(023)68765168
收稿日期:2005-09-13;**修回日期**:2005-10-29

龄 SD 大鼠(体质量 120～140 g,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供),腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg(含 1∶200肝素)麻醉。常规消毒,暴露双侧股骨,将其上附着的肌肉和肌腱分离清除干净,取下股骨,剪去长骨两端,用注射器抽取 DMEM 反复冲洗骨髓腔,并经密度梯度离心和贴壁培养获得骨髓间充质干细胞。细胞传至第 2 代,用含 10 μmol/L 的 5-aza 的 DMEM 培养基孵育诱导 24 h,然后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基换液。每 3～4 天换液 1 次。

1.4 大鼠心室肌细胞的急性分离

取 2～3 日龄 SD 大鼠(1 只,10～15 g,雌雄不限,由第三军医大学实验动物中心提供),断头处死,剪开胸腔,暴露心脏,沿房室沟剪下心室部分,剪碎后用 0.1% 胰酶消化 5 min,然后用 0.1% 的Ⅱ型胶原酶消化 30 min,其间间断吹打,直至溶液浑浊,组织块完全消失。离心,去上清,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基将沉淀悬起,吹打混匀,接种至培养瓶中,在孵箱内置 30 min,利用差速贴壁法去除成纤维细胞,将细胞悬液转移至预置盖玻片的培养皿中。取贴壁 6 h 细胞用于检测。

1.5 体外诱导分化心肌样细胞的免疫组化检测

取 5-aza 诱导后 4 周的 MSCs,4% 多聚甲醛固定。一抗选用羊抗大鼠心肌钙蛋白 T 多克隆抗体(Troponin T-C,工作液浓度 1∶200),按 SABC(过氧化物酶)试剂盒的说明书进行免疫组化染色,DAB 显色。以不加一抗工作液作空白对照,以盖玻片培养的正常大鼠心肌细胞作阳性对照。未经诱导的 MSCs 以同样方法检测。

1.6 细胞膜内向钠电流的记录

以全细胞膜片钳技术分别记录对照组大鼠心室肌细胞、未经诱导的 MSCs 及诱导 4 周后的 MSCs 3 组细胞的膜内向钠电流。根据免疫组化染色的结果和文献[3]报道,在倒置显微镜下选取胞膜光滑,胞体饱满的梭形 MSCs 进行检测。采用软质中性无芯玻璃管(直径 1.5 mm,长 8 cm)于拉制仪上拉制成尖端直径 1～2 μm 的微电极。充灌电极内液后阻抗为 6～8 MΩ。实验采用 Axonpatch 200B 膜片钳放大器,Digidata1200 AD/DA 转换器和 pclamp 6(版本:6.0.4)记录和分析软件(均为 AXON 公司产品)。全细胞电流记录应用 Clampex 程序采样,采样频率 10 kHz,滤波频率 5 kHz。细胞外液(mmol/L):NaCl 140, $CaCl_2$ 1.8, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.0, HEPES 10, Nifedipinde 0.02, glucose 10,pH 7.3。电极内液(mmol/L):CsCl 100, $MgCl_2$ 3, EGTA 10, HEPES 5, Na_2ATP 5, pH 7.3。内向电流记录方法:调节三维操纵仪进行封接,使封接阻抗达 1 GΩ 以上,吸破细胞形成全细胞记录模式,然后调用预先设计的刺激参数,电压钳方式下进行全细胞内向离子流记录。所有记录数据应用 Clampfit 9(AXON)软件进行后台分析处理。

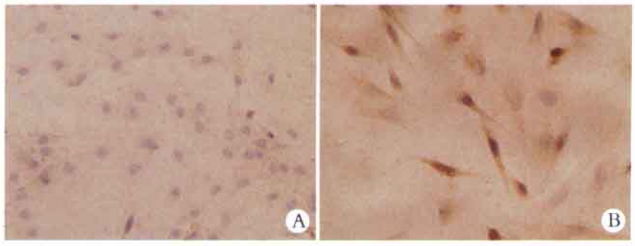
1.7 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 MSCs 体外诱导心肌样细胞的形态学观察及免疫组化检测

MSCs 经 5-aza 诱导后,细胞形态和排列方向渐趋向一致,但未观察到自发搏动的细胞。通过透射电镜观察,细胞浆内可见肌丝样结构,呈丝条状和点状排列[3]。免疫组织化学染色结果显示,经 5-aza 诱导后 4 周,约 40% 的 MSCs 表达心肌特异性肌钙蛋白 T,这些细胞大部分呈长梭形,胞体饱满。未经诱导的 MSCs 不表达心肌特异性肌钙蛋白 T(图 1)。



A:未经诱导的 MSCs 细胞 troponinT 阴性 (SABC×100);B:经 5-aza 诱导 4 周后部分 MSCs 细胞 troponinT 阳性 (SABC×200)

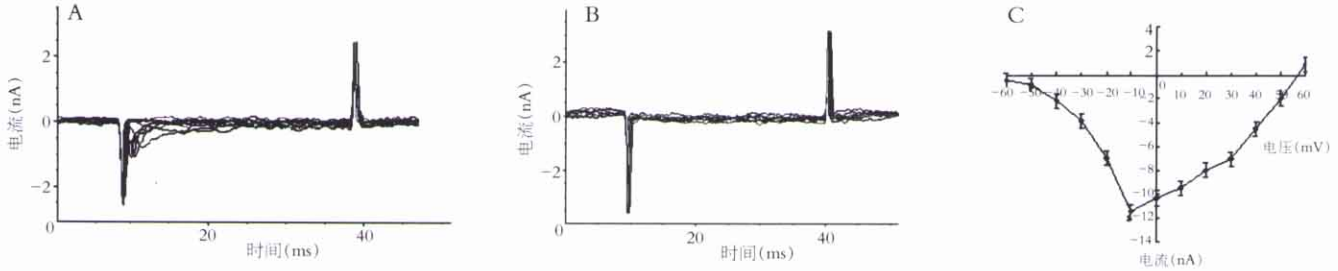
图 1 免疫组织化学染色结果

2.2 各组细胞膜内向钠电流的检测

当保持电位为 -100 mV 时,以 10 mV 间距给予幅值 -60 mV 至 +60 mV,时程 30 ms 去极化脉冲,记录不同钳制电压下的膜内向电流。

2.2.1 心室肌细胞的内向钠电流状态 内向钠电流最大幅值为(-9.924 1±0.253 4) nA,能被 TTX 特异性阻断。电流的特点:在 -60 mV 左右激活,最大激活电位 -30 mV,反转电位 45 mV 左右。

2.2.2 经 5-aza 诱导后 MSCs 膜内向钠电流状态 选择表面光滑,胞体饱满的细胞进行封接。记录到幅度较小的快速激活和失活的内向膜电流,10 ms 内通道已基本关闭。电流最大幅值为(-1.136 1±0.229 2) nA,与心室肌细胞内向钠电流最大幅值(-9.924 1±0.253 4) nA,有显著差异($P<0.01$)在灌流液中加入 1 μmol/L 河豚毒素(TTX)后这种内向电流消失。去除 TTX 后内向电流恢复(图 2A、B)。这种内向电流的特点:在 -60 mV 左右激活,最大激活电位 -10 mV,反转电位 55 mV 左右(图 2C)。



A:诱导 4 周后 MSCs 可记录到快速激活和失活的内向电流;B:TTX 阻断后 MSCs 的内向电流消失;C:诱导后 MSCs 的内向钠电流 I-V 曲线

图 2 诱导后 MSCs 膜内向电流

2.2.3　未经诱导的 MSCs 膜钠电流状态　　当保持电位为 -100 mV 时，以 10 mV 间距给予幅值 -60 mV 至 +60 mV，时程 30 ms 去极化脉冲，未能检测到膜内向电流。

3　讨论

MSCs 在体外经 5-aza 诱导可分化为心肌样细胞已被众多实验所证实[2-6]。5-aza 是去甲基化药物，对其诱导骨髓间充质干细胞心肌化的机制目前被认为是 5-aza 与调控心肌分化的特异性启动子的阻遏蛋白结合，使其去甲基化而发生构型变化，启动干细胞向心肌细胞分化。但现阶段仍存在着诱导比率偏低，诱导条件不成熟，各实验室结果差异较大的问题，目前多数文献报道的结果一般在 30% ~40% 左右。本实验的免疫组化结果显示，经 5-aza 诱导后 4 周，约 40% 的 MSCs 表达心肌特异性肌钙蛋白 T，这些细胞大部分呈长梭形，胞体饱满，与文献报道的情况较为相符。诱导比率偏低提示了诱导后 MSCs 的分化程度并不完全一致，可能的原因是在 5-aza 诱导时，MSCs 处于不同细胞周期，受到的影响程度不同。

内向钠电流是可兴奋细胞的重要标志。在 Makino[2] 的研究中，经 5-aza 诱导后两周，部分 MSCs 出现自发性跳动，表现出结样、心房肌样、心室肌样动作电位，表达心肌特异性蛋白。但其未对膜离子通道进行进一步的研究。Maltsev[7] 在利用胚胎干细胞分化心肌细胞的研究中检测到了内向钠电流。Kohyama[8] 以 5-aza 对 MSCs 进行诱导分化，但仅检测到了外向延迟整流 K^+ 电流。目前对于大鼠 MSCs 诱导分化心肌样细胞的内向钠电流的研究在国内外尚少见报道。

本实验结果显示，利用常规记录钠电流的刺激参数，在经诱导 4 周后的 MSCs 可记录到内向电流，这种内向电流能被钠通道特异性阻断剂河豚毒素（TTX）阻断，当去除 TTX 后内向电流恢复如初，证明这种内向电流为钠电流，说明在 MSCs 细胞分化过程中存在着钠离子通道基因表达[9]。但是这种钠电流和急性分离的心室肌细胞钠电流比较有明显差异，表现在以下几个方面：①最大内向电流的幅值比心室肌要小，二者有显著差异（$P<0.01$）；②最大激活电位比心室肌要高；③反转电位比心室肌高。I-V 曲线向右偏移。

本实验显示，经 5-aza 诱导后，约 40% 左右的 MSCs 表达心肌细胞特异性的肌钙蛋白 T，虽未观测到有自发搏动的细胞，但利用膜片钳技术，以全细胞记录模式记录到膜内向电流，这种内向电流能被 TTX 特异性阻断，证实为钠电流。结合免疫组化结果，证明经 5-aza 诱导后，MSCs 可转变为可兴奋性的心肌样细胞。但这种钠电流和心室肌细胞相比有较显著差异，考虑与 MSCs 分化形成的心肌样细胞尚处于幼稚阶段，钠通道蛋白表达较少有关，同时因为钠电流幅度小，尚不能形成明显的动作电位。本实验中，诱导后的这种心肌样细胞更倾向于工作细胞而非自律细胞，因为自律细胞起搏离子流 I_f 虽然主要由内向 Na^+ 电流组成，但其特点是在超极化时激活，可被 Cs^+ 阻断，但不被 TTX 阻断，与我们在实验中记录到的能被 TTX 特异性阻断的 Na^+ 电流特点不同。

本实验探讨了 MSCs 体外诱导分化心肌样细胞的电生理学特性，从电生理学的角度证明了骨髓间充质干细胞经 5-aza 诱导后具有与心肌工作细胞类似的膜内向钠电流活动，为对体外诱导分化心肌细胞进行电生理学鉴定提供了实验依据。

参考文献：

[1] 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): 1412 - 1416.

[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): 687 - 705.

[3] 朱淑霞，宋治远，罗向东，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2005，27(15)：1555 - 1557.

[4] FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. Artif Organs, 2001, 25(3): 187 - 193.

[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] 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.

[7] MALTSEV V A, WOBUS A M, ROHWEDEL J, *et al*. Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents [J]. Circ Res, 1994, 75(2): 233 - 244.

[8] KOHYAMA J, ABE H, SHIMAZAKI T, *et al*. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent[J]. Differentiation, 2001, 68(4 - 5): 235 - 244.

[8] 法宪恩，王利霞，侯剑峰，等. 人骨髓间充质干细胞体外培养及生物学特性观察[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：445 - 447.

（编辑　汪勤俭）