文章编号:1000-5404(2007)15-1465-04

论著

与胎儿心肌细胞共同培养诱导人胚胎干细胞发生心肌样分化

常 静[1],雷 寒[1],陈建斌[2],贾锋鹏[1] (重庆医科大学附属第一医院:[1]心血管内科,[2]血液内科,重庆 400016)

提 要:目的 了解与胎儿心肌细胞共同培养对人胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)向心肌方向分化的影响。**方法** 通过酶消化法从流产胎儿中分离培养出胎儿心肌细胞及成纤维细胞,将后者用丝裂霉素处理后制备成滋养层;收集辅助生育中心施行试管婴儿后所剩余的健康胚胎,取内细胞团接种在滋养层上分离培养出人ESCs。用荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridzation,FISH)方法来检测上述两种细胞的XY染色体,选用不同性别的胎儿心肌细胞与2~5代人ESCs以1:2的比例混合,然后以$5\times10^4/cm^2$的密度接种于培养皿中进行共同培养,诱导其向心肌方向的分化。将未与胎儿心肌细胞混合的人ESCs以相同密度接种于培养皿中作为阴性对照。至第5天收集共同培养的细胞,进行双重染色,即FISH染色及心肌特异性蛋白Desmin或cTnI免疫组化染色。**结果** 在与胎儿心肌细胞共同培养5 d后,40%~50%的人ESCs在心肌细胞的诱导下表达心肌特异性蛋白Desmin或cTnI,而没有进行共同培养的人ESCs不表达上述蛋白。**结论** 与胎儿心肌细胞的共同培养能诱导人ESCs发生向心肌方向的分化,人ESCs有望成为心肌干细胞移植的细胞材料。

关键词:胎儿心肌细胞;人胚胎干细胞;共同培养;心肌样分化
中图法分类号:R322.11;R329.21 **文献标识码**:A

Cardiac differentiation of human embryonic stem cells by coculturing with human fetal cardiomyocytes

CHANG Jing[1], LEI Han[1], CHEN Jian-bin[2], JIA Feng-peng[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Department of Hemotology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the cardiac differentiation of human embryonic stem cells (ESCs) in coculturing with human fetal cardiomyocytes. **Methods** Fetal cardiomyocytes and fibroblasts were obtained from the aborted fetus, and human ESCs were from the inner cell mass (ICM) of the surplus embryos for tube babies, with the treated fibroblast as feeder layer. Human ESCs of passage 2 to 5 were cocultured with fetal cardiomyocytes at the ratio of 1:2, and the XY chromosome types of these two kinds of human cells were different to each other in order to be marked. At the same time, human ESCs without coculture were used as negative control. The cocultured cells were harvested 5 days later and were double-stained with human XY chromosome probe and cardiac specific antibody (desmin or cardiac troponin I, cTnI). **Results** On coculture day 5, 40%-50% human ESCs expressed cardiac specific antigens, and human ESCs without coculture did not express those antigens. **Conclusion** Human ESCs could be induced into cardiac differentiation by the coculture with fetal cardiomyocytes, and hopefully they will be the candidate for cell transplantation of heart.

Key words: fetal cardiomyocyte; human embryonic stem cells; coculture; cardiac differentiation

心血管疾病已经成为了工业化社会中最常见的死亡原因,其中充血性心力衰竭和急性心肌梗死是严重危害中老年人身体健康的常见病,其共同的细胞学机制是心肌细胞的坏死和丢失。近年来兴起的心肌干细胞移植技术修复坏死心肌展示出良好的前景[1],该研究为心血管疾病患者,特别是急性心肌梗死患者带来了新的希望,干细胞移植已成为了心血管疾病治疗的新途径。

依据来源不同干细胞分为2种,即成体干细胞和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)。其中成体干细胞能在环境因素的诱导下能向几个方向分化,故被称为多能干细胞。ESCs来源于哺乳动物胚胎早期的囊胚阶段,能分化为各种组织细胞,因而被称为全能干细胞。研究证实,ESCs能在体外被诱导或自发分化为三个胚层中的所包含的各种类型的细胞[2-6],共计

基金项目:WHO奖学金(2003)
Supported by the Scholarship of WHO(2003)
作者简介:常 静(1969-),女,山西省长治市人,博士,主治医师,主要从事心肌干细胞移植方面的研究。电话:(023)89012949, E-mail: chang8753@yahoo.com.cn
通讯作者:雷 寒,电话:(023)89012949
收稿日期:2006-08-28;**修回日期**:2006-11-12

约210种细胞类型,其中包括心肌细胞。本研究拟通过与人心肌细胞共同培养的方式模拟心肌微环境,旨在研究人ESCs在上述环境中能否发生向心肌方向的分化,为将来应用于临床奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基的组成和试剂

心肌细胞、成纤维细胞培养基所用的培养基:DMEM-LG培养液(Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose,Invitrogen,苏格兰)+15%胎牛血清(FBS,Sigma,美国)。人ESCs所用的培养基:DMEM-HG培养液(Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose,Invitrogen,苏格兰)+20% FBS+2 000 IU/ml人白血病抑制因子(LIF,Gibco,美国)+1 mmol/L左旋谷氨酰胺(Invitrogen,苏格兰)+0.1 mmol/L β-巯基乙醇(β-MB,Biochemika,瑞士)+1%非必需氨基酸(PAA,奥地利)。共同培养时所用的培养基:与上述培养基相似,但不含LIF。

鼠抗人X/Y染色体探针(DakoCytomation,丹麦),鼠抗人阶段特异性胚胎抗原(stage-specific embryonic antigen,SSEA,Hybridoma,美国)-1和-3,鼠抗人肿瘤识别抗原-1-60(tumor recognition antigen,TRA-1-60,Chemicon,美国),鼠抗人Desmin单克隆抗体(DakoCytomation,丹麦),鼠抗人心肌肌钙蛋白I(cTnI)单克隆抗体(RDI,美国),FITC标记的兔抗鼠单克隆抗体(DakoCytomation,丹麦)。

1.2 胎儿心肌细胞的分离培养

细胞的来源:收取妇产科自然流产的新鲜人胚,共用4个人胚,平均胎龄为9周(6~10周)。

心脏组织的消化:在无菌条件下真空抽吸取出胚胎,迅速分离出心脏并于冰上剪碎,然后加入适量体积的Ⅱ型胶原酶溶液、37 ℃水浴并搅拌,10 min后静置使未消化组织自然沉淀,吸出溶液并加入等量培养基终止消化,备用;将未消化组织继续重复上述消化过程直至组织块完全消化为止。

心肌细胞的分离和培养:收集消化溶液,离心取沉淀物制成细胞悬液置于培养瓶中,静置1 h后将细胞悬液移至另一培养瓶中;重复该过程2~3次,利用差速贴壁法分离出易贴壁的成纤维细胞和悬浮的心肌细胞。将分离出的心肌细胞和成纤维细胞置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养备用。

1.3 成纤维细胞滋养层的制备

对上述贴壁分离出成纤维细胞进行培养传代,取2~5代细胞制备滋养层:将成纤维细胞用10 μg/ml的丝裂霉素处理细胞2~4 h,然后接种于预先用明胶包被的培养板上。

1.4 人ESCs的分离培养(该部分工作主要由干细胞研究中心完成)

细胞来源:经患者及家属知情并同意后,收集辅助生育中心施行试管婴儿后所剩余的健康胚胎。共用5个胚胎,胎龄为7~8 d。

分离培养:去除透明带后挑出ICM,然后用吸管轻轻吹打使它分散,接种于新鲜制备的滋养层上。细胞集落形成后,将集落移入上述消化液中用吸管吹打使它散开,种植到新培养基上。如此反复传代。

1.5 人ESCs的鉴定

形态学改变:显微镜下观察细胞形态及生长方式。

碱性磷酸酶(AKP)组织化学染色:采用常规钙钴法,ESCs应着棕黑色,而成纤维细胞着色很浅或不着色。

免疫组化方法检测表面标志的表达:将细胞消化后离心收集到玻片上,2%的多聚甲醛中固定4 min。用含0.05%的三硝基甲苯的PBS洗涤3次,每次3 min,然后加5%兔血清封闭非特异性抗原,室温下孵育20 min。弃去血清,分别加1:50鼠抗SSEA-1、SSEA-3和TRA-1-60单克隆抗体,室温下孵育2 h。洗涤凉干后滴加1:20荧光标记的二抗,孵育1 h。洗涤后滴加含DAPI的封固液及盖玻片,在荧光显微镜下观察并拍照。

体外分化能力的检测:将ESCs消化吹打成小细胞团(3~4个细胞),在不含滋养层细胞的培养皿中悬浮培养3 d,观察有无类胚胎结构形成。

核型分析:方法详见下述,即荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization,FISH)检测人类来源的XY染色体。

1.6 FISH检测胎儿心肌细胞和人ESCs的性别,即检测XY染色体

将上述分离培养的心肌细胞或人ESCs细胞消化后离心,收集到玻片上。在2%的多聚甲醛中固定2 min,然后放在95%的乙醇中约2 min,置于空气中晾干。室温下浸泡于含0.1% Igepal的2×SSC中30 min,然后依次放在不同浓度的冰冻乙醇中脱水并凉干。加入3 μl探针溶液并加盖玻片,用胶封闭后在72℃下烘烤5 min使组织及探针中DNA变性。将切片放在潮湿的塑料盒中,在37℃中孵育1~2 h。去掉封闭胶,将玻片放置在2×SSC中,使盖玻片自动脱落。洗涤后滴加含DAPI的封固剂,加盖玻片后在荧光显微镜下观察并拍照。X染色体呈绿色点状,而Y染色体呈红色点状。

1.7 与胎儿心肌细胞共同培养,诱导人ESCs的心肌样分化

选用不同性别的胎儿心肌细胞与人ESCs进行共同培养,诱导其向心肌方向的分化。本实验所用的人ESCs为第2~5代细胞,从滋养层细胞上分离出人ESCs形成的细胞集落,用消化液消化3~5 min,吸管轻轻吹打使它散开。将上述细胞与原代培养24~48 h的胎儿心肌细胞以1:2的比例混合,充分混匀后以$5\times10^4/cm^2$的密度接种于含新鲜制备滋养层的培养皿中,而滋养层细胞与心肌细胞性别相同。每3~4天换液1次,直至第5天实验结束。将未与胎儿心肌细胞混合的人ESCs以$5\times10^4/cm^2$的密度接种于含新鲜制备滋养层的培养皿中,作为阴性对照。

1.8 收集共同培养的细胞,进行双重染色

于共同培养的第5天将细胞离心收集到玻片上。首先,通过FISH确定玻片上各细胞的性别,由此判断细胞的来源和性质;然后对该玻片再进行Desmin或cTnI的免疫组化染色,由此判断被诱导的人ESCs心肌分化状况。具体参见前所述的FISH过程及免疫组化方法。

1.9 心肌细胞转化率的测定

将双重染色后的玻片置于荧光显微镜下,选取8~10个不同的视野,分别计数每个视野内的人ESCs数(根据细胞的核型来判断)以及发生向心肌方向分化的人ESCs数(表达cTnI的人ESCs数)。计算各个视野发生心肌分化的人ESCs数/总人ESCs数比,取其均值,即为人ESCs的心肌细胞转化率。

2　结果

2.1　人 ESCs 的生长情况

5 个囊胚中有 3 个 ICM 于接种后死亡,另外 2 个存活,并增殖发育为细胞克隆。挑出上述细胞克隆,机械分离为小的细胞团块后,再分别接种到新的饲养层上,4 ~ 5 d 后每个培养皿中长出 2 ~ 3 个细胞克隆,克隆呈椭圆形或不规则团块状,边缘光滑清晰。细胞克隆较扁平,其内细胞排列较紧密,形似鸟巢。细胞体积较小,核大,有一个或多个核仁,细胞质少。人 ESCs 在脱离滋养层细胞后悬浮培养,可以形成桑椹状或囊状的拟胚体,见图 1A、B。

2.2　人 ESCs 未分化状态的检测

观察发现,人 ESCs 集落内存在高浓度的 AKP,成纤维细胞滋养层不着色或着色很浅。取 2、6、10 代细胞检测 SSEA-1、SSEA-3 及 TRA-1-60 的表达,结果显示,各代细胞表达谱相似,均阳性表达 SSEA-3 和 TRA-1-60,不表达 SSEA-1,提示人 ESCs 在滋养层细胞上能够保持未分化状态。

2.3　人 ESCs 和胎儿心肌细胞的核型分析

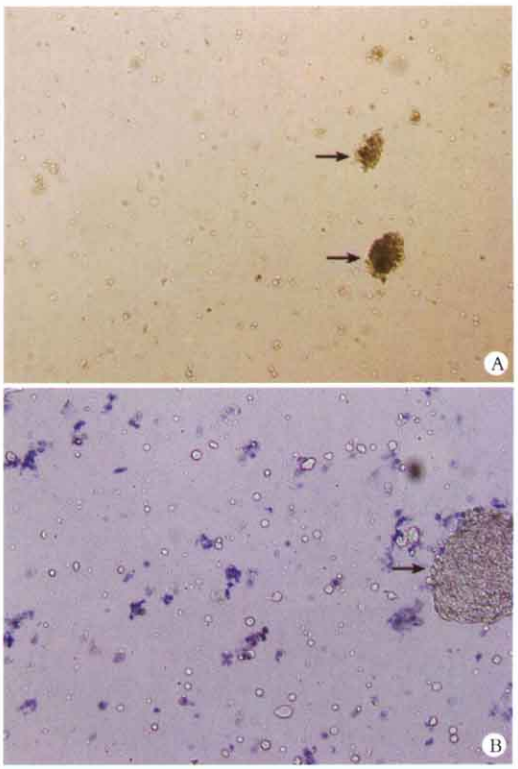
2 个能正常传代的人 ESCs 集落染色体分别为正常的 XX 型和 XY 型,至第 10 代仍维持正常 XX 型或 XY 型。分析胎儿心肌细胞的核型,其中 3 个为 XX 型,另一个为 XY 型。

2.4　共同培养前胎儿心肌细胞的形态学观察

分离的胎儿心肌细胞,开始呈圆形,数小时后开始贴壁,逐渐伸展为梭形、三角形或扁平不规则形,相互交织形成细胞簇,并出现自发性搏动。不同部位搏动频率不同,频率波动于 40 ~ 60 次/min 之间。随着培养时间的延长,至培养的 7 ~ 9 d,细胞数量明显增加,其中以成纤维样细胞增殖明显,而自发搏动点则逐渐减少,搏动也逐渐减弱。

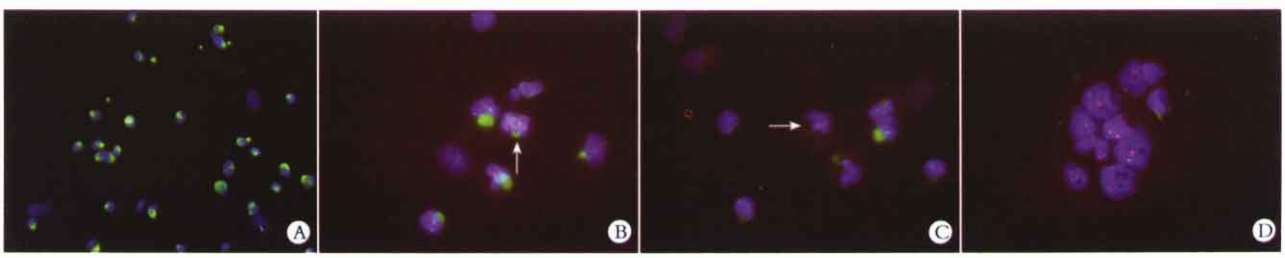
2.5　共同培养后检测人 ESCs 向心肌方向的分化

免疫组化染色结果显示,与胎儿心肌细胞的共同培养诱导人 ESCs 发生了向心肌方向的分化。Desmin 的免疫组化染色显示,共同培养的细胞中大部分细胞阳性表达 Desmin,见图 2A。将 XX 型心肌细胞与 XY 型人 ESCs 共同培养,双重染色结果显示,40% ~ 50% 的人 ESCs 在心肌细胞的诱导下表达 cTnI,见图 2B、C。没有进行共同培养的人 ESCs(即阴性对照组)不表达 cTnI,见图 2D。



A: 桑椹状拟胚体; B: 囊状拟胚体

图 1　人 ESCs 悬浮培养时形成的拟胚体　(相差显微镜 ×100)



A: 大部分共同培养的细胞阳性表达 Desmin　(FISH, S-P ×100); B: 共同培养的胎儿心肌细胞(XX 型)和人 ESCs(XY 型)　(FISH,S-P ×200),具有 2 绿色小点的细胞为核型为 XX 型的胎儿心肌细胞,箭头示核型为 XY 型的人 ESCs,共同培养后发生了向心肌方向的分化,阳性表达 cTnI; C: 共同培养后未表达 cTnI 的人 ESCs(箭头所示)　(FISH,S-P ×200); D: 未发生心肌分化的人 ESCs　(FISH,S-P ×200),没有进行共同培养的人 ESCs(即阴性对照组)不表达 cTnI

图 2　与胎儿心肌细胞(XX 型)共同培养诱导人 ESCs(XY 型)发生向心肌方向的分化

3　讨论

与鼠 ESCs 相比,人 ESCs 在建系和培养过程中还存在不少问题。仅有美国、瑞典、韩国、日本、以色列、澳大利亚、新加坡等为数不多的几个国家,率先掌握了分离培养人胚胎干细胞的技术。目前,美国 NIH 共收集了 11 个鉴定成功的人胚胎干细胞系(http://stemcells.nih.gov/registry/),澳大利亚的 Reubinoff 教授成功建立 2 个人胚胎干细胞系[7],而我国的黄绍良教授也成功建立了 3 个人胚胎干细胞系[8]。本研究于 2004 年完成于瑞典 Karolinska 大学,其时所在的干细胞研究中心正处于建立自己的人胚胎干细胞系的摸索

阶段，尚未完全掌握长期维持其未分化状态的理想方法，因而本研究中用于共同培养的细胞为短期培养的人 ESCs(2～5 代细胞)。

目前，一般选用胎鼠成纤维细胞制备成滋养层，但因存在着动物源细胞或病原体污染的危险，限制了其临床应用。Richards 等[9]分别用人胎儿肌细胞、皮肤细胞及人输卵管上皮细胞作滋养层，成功培养出了人 ESCs。本实验采用了来源于胎儿心肌组织的成纤维细胞为滋养层，所用培养基为 DMEM-HG 培养液、15%～20% 的胎牛血清和其他一些微量成分如 β-ME、非必需氨基酸、谷氨酰胺等，另外还包括 LIF。结果显示，本课题组成功培养出了人 ESCs，并在一定时间内(4～6 代)保持其未分化状态及自身增殖能力。上述结果提示，人类来源的成纤维细胞将有可能替代胎鼠成纤维细胞而被用于人 ESCs 的培养，从而有利于其临床应用。

本实验所分离培养的人 ESCs 具有以下生物学性质：①从人囊胚内细胞团分离培养获得。②细胞体积小，核大而明显，有一个或多个核仁，核质比高。③在体外培养时呈集落状生长。④AKP 活性呈阳性，而已分化的细胞或成纤维细胞呈弱阳性或阴性。⑤表达特异细胞胚胎抗原谱，包括阳性表达 SSEA-3 和 TRA-1-60，不表达 SSEA-1 面抗原的表达。⑥具有正常稳定的二倍体核型。上述生物学性质完全符合人 ESCs 的鉴定标准[10]，证实本课题组已成功分离并培养出了人 ESCs。

除形成拟胚体外，局部微环境对 ESCs 的分化过程也起着十分重要的作用。研究者发现，与肺间质组织的共同培养诱导鼠 ESCs 形成Ⅱ型肺泡细胞[11]。而在培养基中加入不同的生长因子，鼠 ESCs 将发生不同方向大分化，如加入骨多形蛋白 BMP-4 诱导其发生向软骨方向的分化，而胰岛素和三碘甲状腺氨酸诱导向脂肪方向的分化[3]。另有研究表明，细胞保护剂二甲基亚砜、抗坏血酸或 FGF-1 等能诱导并促进 ESCs 发生心肌样分化，表达 GATA4 及 Nkx2.5[12,13]。本实验通过与胎儿心肌细胞共同培养的方式诱导人 ESCs 向心肌方向的分化。结果显示，共同培养 5 d 后，40%～50% 的人 ESCs 表达 Desmin 和 cTnI。因 Desmin 是一种肌细胞来源的结蛋白，cTnI 是一种心肌特异性的肌钙蛋白，因而上述结果提示，共同培养诱导人 ESCs 发生了向心肌方向的分化。本实验选用不同性别的细胞进行共同培养，然后通过荧光原位杂交的方法检测细胞的 X/Y 染色体，从而对 ESCs 进行标记。该标记方法先进可靠，因而结果应是科学而可信的。

Muller 等[14]也通过共同培养的方式诱导人 ESCs 发生了向心肌方向的分化，并出现了自发性搏动区域。2004 年 Rudy 等[15]将悬浮聚集状态的鼠 ESCs 与鸟类的内胚层和中胚层前侧组织(将发育成心肌组织)进行共同培养，结果显示，65% 的拟胚体出现了自发性跳动；虽然均是通过共同培养诱导心肌分化，因本实验所用的 ESCs 的种属来源、共同培养的组织、培养状态(本实验接种于滋养层而非悬浮)均与上述实验不同，故对于其分化率不能进行简单的数字比较。然而，这些实验从不同角度证实同一个结论：心肌样微环境具有促进 ESCs 发生向心肌样方向分化的作用。关于其具体机制尚不清楚，有待于进一步研究，但这为 ESCs 的心肌移植治疗坏死心肌提供了必要的实验依据。

参考文献：

[1] 常 静，雷 寒，贾锋鹏. 基质干细胞及明胶微载体植入大鼠心脏的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：507－511.

[2] Wiese C，Kania G，Rolletschet A，*et al*. Pluripotency：capacity for in vitro differentiation of undifferentiated embryonic stem cells[J]. Methods Mol Biol，2006，325：181－205.

[3] Kahan B W，Jacobson L M，Hullett D A，*et al*. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells：an in vitro model to study islet differentiation[J]. Diabetes，2003，52(8)：2016－2024.

[4] Kawaguchi J，Mee P J，Smith A G. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors[J]. Bone，2005，36(5)：758－769.

[5] Odorico J S，Kaufman D S，Thomson J A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines[J]. Stem Cells，2001，19(3)：193－204.

[6] Itskovitz-Eldor J，Schuldiner M，Karsenti D，*et al*. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers[J]. Mol Med，2000，6(2)：88－95.

[7] Reubinoff B E，Pera M F，Fong C Y，*et al*. Embryonic stem cell lines from human blastocysts：somatic differentiation *in vitro*[J]. Nat Biotechnol，2000，18(4)：399－404.

[8] 何志旭，黄绍良，李 予，等. 人胚胎干细胞系的初步建立[J]. 中华医学杂志，2002，82(19)：1314－1318.

[9] Richards M，Fong C Y，Chan W K，*et al*. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol，2003，20(9)：933－936.

[10] Amit M，Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells[J]. J Anat，2002，200(Pt 3)：225－232.

[11] Van-Vranken B C，Romanska H M，Polak J M，*et al*. Coculture of embryonic stem cells with pulmonary mesenchyme：a microenvironment that promotes differentiation of pulmonary epithelium[J]. Tissue Eng，2005，11(7－8)：1177－1187.

[12] E L L，Zhao Y S，Guo X M，*et al*. Enrichment of cardiomyocytes derived from mouse embryonic stem cells[J]. J Heart Lung Transplant，2006，25(6)：664－674.

[13] Sachinidis A，Kolossov E，Fleischmann B K，*et al*. Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies[J]. Herz，2002，27(7)：589－597.

[14] Muller M，Fleischmann B K，Selbert S，*et al*. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*[J]. FASEB J，2000，14(15)：2540－2548.

[15] Rudy-Reil D，Lough J. Avian precardiac endoderm/mesoderm induces cardiac myocyte differentiation in murine embryonic stem cells[J]. Circ Res，2004，94(12)：e107－e116.

(编辑 汪勤俭)