论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0410-04

脉冲微交流电刺激促进体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌分化

姚 青[1],宋治远[1],马显光[2] (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]基础医学部物理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨脉冲微交流电刺激对体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的作用。**方法** 常规方法分离培养鼠骨髓间充质干细胞,取P3细胞进行5-氮胞苷诱导,诱导后以是否给予脉冲微交流电刺激分为两组,观察各组细胞生长情况、细胞形态学及超微结构改变,免疫细胞化学方法检测α-actin、cTnT、Cx43的表达。**结果** 脉冲微交流电刺激组细胞较非刺激组生长良好,更早出现心肌样细胞改变,诱导后1周可观察到胞内肌丝形成及α-actin、cTnT、Cx43的表达,且在随后的相同时相点(诱导后2、3、4周),α-actin、cTnT、Cx43表达水平明显高于非刺激组,胞内肌丝也由杂乱分布逐渐成束,部分细胞可观察到肌节。**结论** 模拟心脏跳动的脉冲微交流电刺激有助于经5-氮胞苷诱导的骨髓间充质干细胞在体外分化为功能完备的心肌样细胞。

关键词:电刺激;骨髓间充质干细胞;心肌样细胞

中图法分类号:R322.11;R329.21;R337.5 **文献标识码:**A

Electrical stimulation promotes the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocyte induced by 5-azacytidine *in vitro*

YAO Qing, SONG Zhi-Yuan, MA Xian-guang ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Department of Physics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of electrical stimulation on the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to cardiomyocyte induced by 5-azacytidine *in vitro*. Methods MSCs from Sprague-Dawley (SD) rats were cultured and passed repeatedly to P3. MSCs were treated with 5-azacytidine (10 μmol/L) and incubated for 24 h. The induced MSCs were divided to stimulated group and non-stimulated group, and every groups divided by incubated for 1, 2, 3 and 4 weeks were named as subgroup Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ respectively. MSCs of stimulated group were stimulated for 30 min every day by supra-threshold square biphasic pulses (2 ms duration, 1.5 Hz, 20 μA), and the stimulation was initiated 1 d after inducing. Light and electronic microscope were used to identify the influences of characteristic morphological of MSCs in every subgroups, and immunocytochemistry was used to identify the expression of α-actin, cTnT, Cx43 in MSCs. Results The growth of MSCs in stimulated group was better than that of non-stimulated group. MSCs of stimulated group exhibited differentiation into cardiomyocyte-like cell at 1 week after inducing, earlier than that of no-stimulated group (2 weeks). In stimulated subgroup Ⅰ, scattered myogenic structure was observed in the plasma of some cells under electronic microscope, and α-actin, cTnT expressed in some cells, but not that be observed in non-stimulated subgroup Ⅰ. In cells of stimulated subgroups Ⅱ to Ⅳ, the expression level of α-actin, cTnT, Cx43 of were all higher than that of non-stimulated subgroups respectively. Conclusion Electrical stimulation (simulating the heart beating) could redound differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to cardiomyocyte induced by 5-azacytidine *in vitro*.

Key words: electrical stimulation; bone marrow mesenchymal stem cells; cardiomyocyte

基金项目:国家自然科学基金(30700147)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (3070014)

作者简介:姚 青,女,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事心脏电生理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754470,E-mail:swyaoqing@sina.com

通信作者:宋治远,电话:(023)68765168

收稿日期:2007-11-30 **修回日期:**2008-01-04

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)是一种具有多向分化潜能的细胞[1-3],在体外培养可向成骨细胞、神经细胞、脂肪细胞、心肌细胞等方向分化。1999 年 Makino 等[4] 将 MSCs 连续传代 4 个月以上,并在 5-氮杂胞嘧啶(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,虽然体外实验证明 MSCs 在诱导因子的作用下向成肌分化,但尚未获得功能完善的心肌样细胞。本实验从模拟心脏细胞生长的电微环境出发,以脉冲微交流电刺激体外模拟心脏跳动,观察其对 5-氮胞苷诱导后的大鼠 MSCs 向心肌分化的作用,探索新的促使 MSCs 向心肌细胞分化的诱导方法。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及器材

DMEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(TBD 公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、5-氮胞苷(Sigma 公司)、cTnT 抗体(SANTA CRUZ 公司),α-actin 抗体(Sigma 公司),Connexin43 抗体 (Sigma 公司),SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德)。脉冲微交流电刺激仪为自行研制[5]。

1.2　实验分组

分别将经 5-aza 诱导培养的 P3 大鼠 MSCs 按是否给予脉冲微电流刺激分为刺激及非刺激组,每组又以诱导培养时间(1、2、3、4 周)分为 4 个亚组(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ组)。

1.3　大鼠 MSCs 的分离培养

参照本实验室建立的 MSCs 的培养方法进行[6]。取 1 月龄健康 SD 大鼠(体质量 120 ~ 140 g,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 ms/kg 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 培养液反复冲洗骨髓腔,并经密度梯度离心和贴壁培养获得骨髓间充质干细胞,以 10×10^8/ml 接种于 25 cm^2 塑料培养瓶,置 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 及饱和湿度的 CO_2 孵育箱中培养,每 3 ~ 4 天换液 1 次,12 ~ 15 d 后 MSCs 达到 90% 瓶底面积时进行传代培养。P1 以后细胞融合至 80% 进行 1∶2 传代。

1.4　诱导分化

将生长状态良好的第 3 代 MSCs 在消化传代接种时,按 25 000/孔的密度接种到 12 孔板(每孔中放置 12 × 12 mm 的盖玻片)中,24 h 后用 PBS 液洗 2 遍,分别加入终浓度为 10 μmol/L 的 5-氮胞苷的完全培养基(10% FBS),诱导 24 h 后,吸去诱导液,用 PBS 洗 3 遍,换新鲜的含低浓度血清的培养基(5% FBS)培养,每 3 天换液 1 次直至实验结束。

1.5　脉冲微电流刺激

1.5.1　细胞培养小室的制作　　细胞培养小室制作按照下图所示进行。做成的两个纯铂丝电极平行固定于培养皿中,间距 13 mm。无菌条件下,将两挡板分别置于两纯铂丝电极内侧且与之平行,电极位于培养小室之外,然后在挡板与培养皿之间的区域填充质量浓度 15 g/L 的琼脂糖,待凝固后,小心撤离辅助挡板(图 1)。

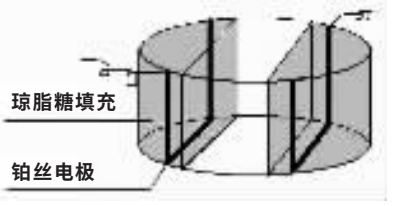


图 1　细胞培养小室制作示意图

1.5.2　脉冲微电流刺激　　经 5-氮胞苷诱导 24 h 后,将细胞爬片在无菌条件下移入细胞培养小室,刺激组细胞每日给予脉冲微电流刺激 30 min(频率 1.5 Hz,脉宽 2 ms,电流 20 μA),直至实验结束,非刺激组同样条件下培养。每 24 小时倒置显微镜观察细胞形态及生长方式。

1.6　大鼠 MSCs 的超微结构观察

收集诱导后各组细胞,以细胞刮子刮取各组细胞,离心沉淀,弃去上清液后 PBS 冲洗 2.5% 戊二醛固定,1% 四氧化锇固定,乙醇梯度脱水,Epon812 环氧树脂包埋,超薄切片机切片,透射电镜观察拍照。

1.7　免疫细胞化学染色

将诱导后的各组细胞用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次后,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min 加入过氧化物酶阻断剂,室温下 20 min 加入非免疫血清封闭,室温下 20 min,甩干血清 加入 cTnT 抗体、α-actin 抗体、Cx43 抗体 4 ℃过夜 加入生物素标记的二抗,室温孵育 30 min 加亲和素一过氧化物酶(即用型),室温孵育 30 min;以上各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入临时配置的 DAB 显色液,10 min 后在显微镜下观察染色的情况。未经诱导的骨髓 MSCs 和 PBS 代替一抗作阴性对照 大鼠的心肌冰冻切片做阳性对照。显微镜下观察及图像分析,Tiger920 型图像分析系统处理,其表达水平用平均光密度值表示。

1.8　统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

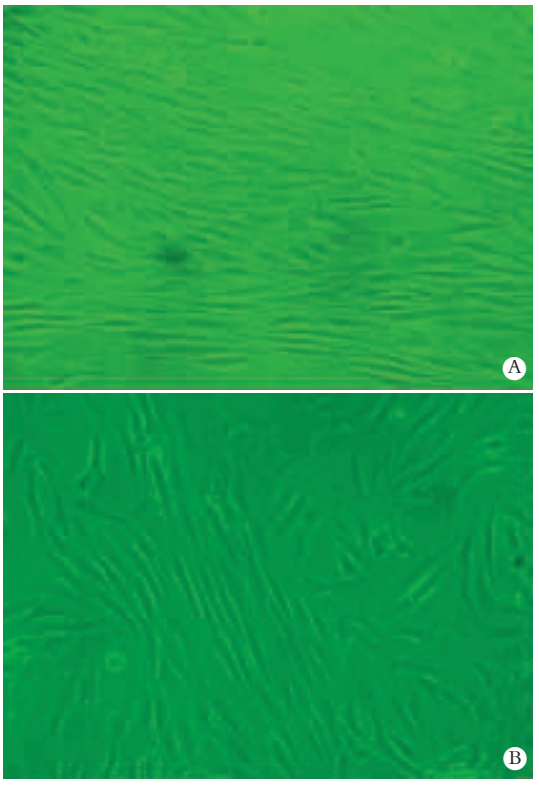
2.1　大鼠 MSCs 的细胞生长和形态学观察

原代细胞刚接种时,MSCs、血细胞和造血干细胞均为圆形,透亮。接种 24 h 后,可见许多细胞贴壁,48 h 后胞体变成梭形,多角形。接种第 3 天首次更换培养基,可见纺锤形细胞散在均匀分布,折光性好,7 d 时细胞增殖明显,呈集落样生长,14 d 时细胞融合成片,达到传代要求,传代后细胞体积较原代细胞修长,呈长梭形。传代至 P3 时,细胞基本纯化,呈均匀的长梭形或多边形。

2.2　大鼠 MSCs 诱导后的形态学变化

诱导后的细胞增殖减慢,部分细胞死亡并从培养板底脱落,诱导后细胞形态呈动态变化,MSCs 胞体先变细、变长,而后少量分化的细长、梭形细胞向同一方向排列,后可见少量的短棒状,长杆状细胞散在分布,细胞出现融合趋势,逐渐可见短棒

状的细胞融合形成粗大的肌管样结构，呈分支状，并同方向排列。刺激组 MSCs 经诱导上述变化出现较非刺激组早，在 1 周左右即出现肌管样结构，而非刺激组则在 2 周左右才观察到肌管样结构形成，且形成的肌管数量较刺激组少（图 2）。



A：诱导 1 周刺激组；B：诱导 2 周非刺激组

图 2　诱导不同时间大鼠骨髓间充质干细胞形态观察　（倒置显微镜 ×200）

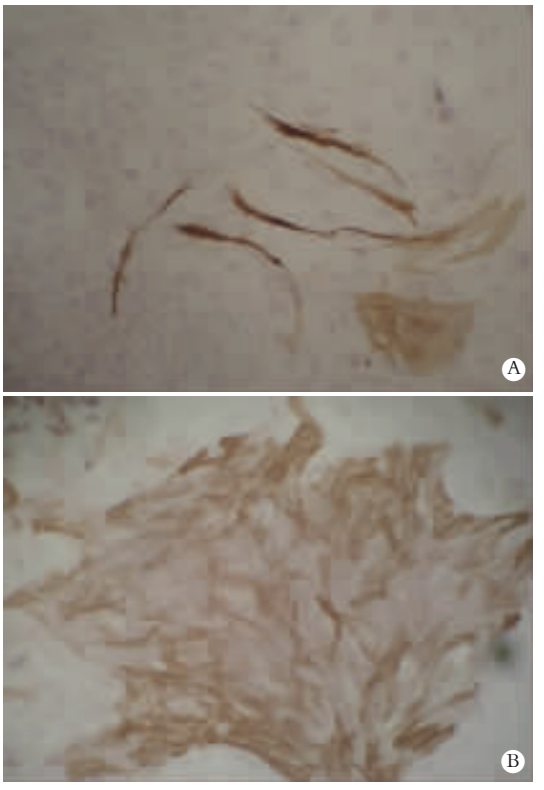
2.3　免疫细胞化学结果

刺激组细胞在诱导后 1 周部分细胞出现 α-actin，cTnT，Cx43 弱阳性表达，部分杆状细胞及分化的肌管样结构上述抗体均呈阳性表达，非刺激组 1 周时未见 α-actin、cTnT、Cx43 表达。诱导后 2、3、4 周，刺激组 α-actin，cTnT，Cx43 阳性细胞率及表达水平也明显高于非刺激组（表 1），但 PBS 代替一抗做阴性对照未见阳性反应。阳性对照组（大鼠心肌细胞）上述抗体均呈阳性表达（图 3－5）。

表 1　5-aza 诱导后大鼠 MSCs α-actin、cTnT、Cx43 的表达（n =8）

组别	α-actin	cTnT	Cx43
非刺激组			
Ⅰ	0.023 ± 0.005	0.026 ± 0.008	0.024 ± 0.004
Ⅱ	0.046 ± 0.004[a]	0.059 ± 0.010[b,c]	0.053 ± 0.009[b,c]
Ⅲ	0.088 ± 0.006[b]	0.118 ± 0.009[b,d]	0.109 ± 0.007[b,d]
Ⅳ	0.081 ± 0.005[b]	0.121 ± 0.011[b,d]	0.114 ± 0.010[b,d]
刺激组			
Ⅰ	0.056 ± 0.012[a]	0.048 ± 0.011[a]	0.047 ± 0.013[a]
Ⅱ	0.112 ± 0.010[b,d]	0.102 ± 0.012[b,d]	0.106 ± 0.010[b,d]
Ⅲ	0.157 ± 0.013[b,d]	0.142 ± 0.010[b,d]	0.145 ± 0.011[b,d]
Ⅳ	0.161 ± 0.012[b,d]	0.146 ± 0.011[b,d]	0.144 ± 0.012[b,d]

a：P < 0.05，b：P < 0.01，与非刺激组Ⅰ比较；c：P < 0.05，d：P < 0.01，与刺激组Ⅰ比较



A：诱导 1 周；B：诱导 4 周

图 3　诱导不同时间刺激组大鼠骨髓间充质干细胞 α-actin 的表达　（SABC ×100）

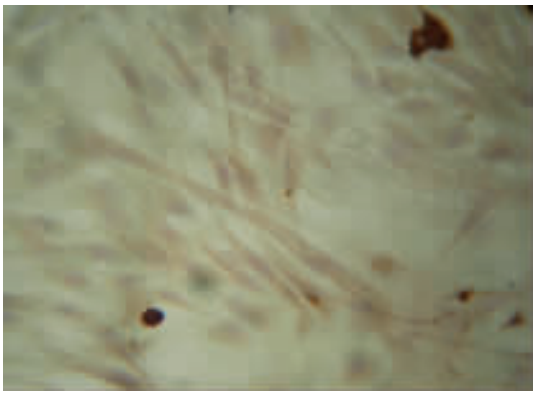


图 4　诱导后 1 周刺激组细胞 cTnT 的表达　（SABC ×400）



图 5　诱导后 1 周刺激组细胞 Cx43 的表达　（SABC ×200）

2.4　超微结构

刺激组细胞在诱导后 1 周可见细小的肌丝样结构,这种肌丝样结构分布较为广泛,但排列不够密集. 方向不够一致,未见肌节样结构形成,体现出较为幼稚的肌细胞形态,非刺激组细胞未见 上述结构 刺激组细胞诱导后 2 周细胞显示典型的心肌细胞超微结构特点,可见整齐成束排列的肌丝,部分细胞可见肌节形成。非刺激组细胞于诱导后 2 周才观察到肌丝样结构出现,且排列紊乱,在诱导后 3、4 周也未观察到肌节形成(图 6)。

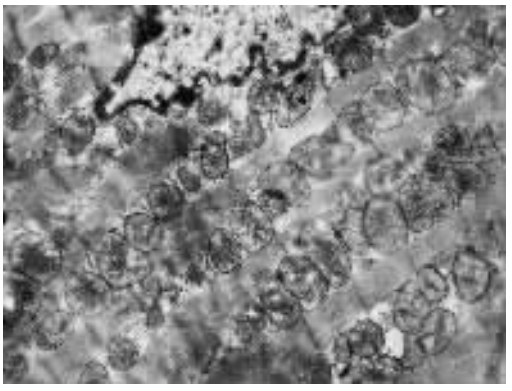


图 6　诱导后 4 周的刺激组细胞　(TEM ×3 500)

3　讨论

虽然目前有大量的研究已经证实 5-aza 可以诱导 MSCs 向心肌细胞分化,但其诱导效果并不十分理想,经 5-aza 诱导后,细胞生长较慢,获得心肌样细胞数量少,结构幼稚,难以满足细胞移植治疗的需要。

脉冲微交流电(pulsed alternating microcurrent, PAMC)是用正弦电流调制等幅交流获得,其特点是电流呈脉冲方式发放,其电流强度仅 μA 级,具有微电流刺激的所有生物学效应,可使细胞 DNA 的合成活跃及细胞分裂数目增多,有利于细胞的增殖[7]。与脉冲电场刺激相比较,PAMC 刺激时培养液中电流方向随时变化,细胞不会向某单一方向迁移,且对培养液的电离作用小,不影响长时间观察细胞的增殖与分化情况。在生理条件下,心脏细胞一直处于脉冲式变化的电场中,便构成了心脏的电环境。选用合适的 PAMC 参数,理论上可以模拟生理情况下心脏的跳动,在体外重建心脏细胞生长的电学环境。最新的研究结果显示,心脏的电学环境对于心脏细胞的生长及功能完善是至关重要的[8],Sharon 等在聚合物支架上对胎鼠心肌细胞进行培养,并加以双向矩形脉冲电刺激模拟心脏跳动的频率,结果显示:与体外普通培养的心肌细胞相比较,接受电刺激的心肌细胞生长良好,收缩力强,α-肌球蛋白重链(α-MHC)、Cx43、肌酸激酶-MM 以及肌钙蛋白表达明显增加,超微结构也显示肌节结构更清晰,其细胞的形态与功能均更接近成熟的心肌细胞。表明在体外进行心肌细胞培养时给予 PAMC 刺激可以模拟生理条件下心脏活动的电学环境,有助于促进细胞的分化与成熟。

本研究从模拟心肌细胞分化的心脏电环境出发,在体外诱导培养过程中加以 PAMC 刺激,模拟胚胎时期心脏细胞分化过程中的生物电学环境,以促进其向心肌细胞分化。实验结果表明,给予 PAMC 刺激后,MSCs 向心肌细胞分化的效率明显提高,其结构与功能也更加完善,有细胞出现自发性跳动,超微结构可观察到肌节形成。本研究结果提示,模拟心脏跳动的微交流电刺激有助于经 5-氮胞苷诱导的骨髓间充质干细胞在体外分化为功能完备的心肌样细胞。心肌细胞的体外诱导分化的成功,不仅证实了电学环境因素对心肌细胞分化的作用,并且将为下一步进行组织工程心肌构建及移植研究提供实验基础。

参考文献:

[1] Theise N D, Badve S, Saxena R, *et al*. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation[J]. Hepatology, 2000, 31(1):235 – 240.

[2] Deb A, Wang S, Skelding K A, *et al*. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients[J]. Circulation, 2003, 107(9):1247 – 1249.

[3] Chen F H, Rousche K T, Tuan R S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(7):373 – 382.

[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] 马显光,姚　青,宁　旭,等. 干预细胞增殖分化的脉冲交流电刺激器的研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2007, 24(2):147 – 149.

[6] 农耀明,宋治远,陈鹏慧,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5):435 – 437.

[7] 岳海岭,彭代智,董征学, 等. 微电流刺激表皮角朊细胞体外增殖的培养模型[J]. 中国临床康复, 2005, 9(18):74 – 76.

[8] Gerecht-Nir S, Radisic M, Park H, *et al*. Biophysical regulation during cardiac development and application to tissue engineering[J]. Int J Dev Biol, 2006, 50(2 – 3):233 – 243.

(编辑　邓强庭)