文章编号:1000-5404(2008)19-1795-04

论著

血管紧张素Ⅱ诱导成人脂肪间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究

张卫泽,樊 艳,陈永清,马 凌,哈小琴,张耀辉 (兰州军区兰州总医院心血管内科,兰州 730050)

摘 要:目的 采用血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)作为诱导剂,体外诱导成人脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)向心肌细胞方向分化。**方法** 自成人脂肪组织中分离培养ADMSCs,分别用0.05、0.10和0.20 μmol/L 3种不同浓度的AngⅡ诱导ADMSCs,同时设立对照组,倒置相差显微镜及透射电子显微镜下观察细胞的形态学特征,免疫细胞化学染色方法检测心肌特异性肌钙蛋白-I(cardiac troponin-I, cTn-I),计算转化率。**结果** 诱导后第3周时,0.20 μmol/L组可见cTn-I阳性细胞表达,第4周时0.10 μmol/L组和0.20 μmol/L组均有cTn-I阳性细胞表达,但0.20 μmol/L组的阳性细胞数明显多于前组,且细胞形态变化显著。**结论** AngⅡ在体外可以诱导ADMSCs分化为心肌样细胞,其诱导分化的最佳浓度为0.20 μmol/L。

关键词: 干细胞;脂肪组织;血管紧张素Ⅱ;心肌细胞;诱导分化
中图法分类号: R322.11; R392.1 **文献标识码:** A

Angiotensin Ⅱ induces adult adipose-derived mesenchymal stem cells to differentiate into cardiocyte-like cells

ZHANG Wei-ze, FAN Yan, CHEN Yong-qing, MA Ling, HA Xiao-qin, ZHANG Yao-hui (Department of Cardiology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To study the effects of angiotensin Ⅱ (AngⅡ), as inducing agent *in vitro*, in inducing adult adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) to the direction of myocardial cell. **Methods** ADMSCs were isolated and cultured from adult adipose tissues. Different concentrations of AngⅡ (0.05, 0.10 and 0.20 μmol/L, respectively) were used to induce ADMSCs. Untreated ADMSCs were used as normal control. The cell morphological feature was observed under inverted phase-contrast microscope and transmission electron microscope. Immunocytochemical staining was used to detect the cardiac troponin-I (cTn-I) and calculate the conversion rate. **Results** After three weeks of induction, cTn-I-positive cells could be detected in 0.20 μmol/L AngⅡ group. Four weeks later, cTn-I-positive cells were detected in 0.10 and 0.20 μmol/L AngⅡ groups, furthermore, the number of cTn-I-positive cells in 0.20 μmol/L AngⅡ group was significantly higher than that of other groups. **Conclusion** AngⅡ can induce *in vitro* ADMSCs to differentiate into cardiocyte-like cells, and the best induction concentration is 0.20 μmol/L.

Key words: stem cells; adipose tissue; angiotensin Ⅱ; myocardial cells; induced differentiation

有研究表明,心肌微环境能够将间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)诱导分化为心肌样细胞[1-4]。近年有实验用心肌细胞裂解液成功将脂肪组织源性的间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)诱导分化为心肌样细胞[5,6]。血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)是心肌细胞裂解液中的重要生物活性物质,参与构成心肌微环境,具有多种生物学效应。在心肌微环境诱导ADMSCs分化为心肌细胞的过程中,AngⅡ是否发挥着某种作用,目前研究较少。本实验通过使用AngⅡ作为促分化物质,观察不同浓度AngⅡ对ADMSCs的作用,以期为今后ADMSCs在心血管病领域的基础研究以及临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成人(急性单纯性阑尾炎患者)腹部大网膜脂肪组织,自兰州军区兰州总医院普通外科无菌手术条件下获取。患者知情

基金项目:全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB094)
Supported by the Key Medical Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06MB094)
作者简介:张卫泽,男,甘肃省和政县人,博士,主任医师,主要从事心血管内科临床与基础方面的研究。电话:(0931)8975211, E-mail: zhangzwz@medmail.com.cn
收稿日期:2007-12-04;修回日期:2008-04-05

同意,并经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及设备

高糖-DMEM 培养基(Gibco),胎牛血清(杭州四季青),Ⅰ型胶原酶(Gibco),胰蛋白酶(Invitrogen),血管紧张素Ⅱ(AnaSpec),鼠抗人心肌肌钙蛋白-I 单克隆抗体(CHEMICON),鼠抗人 CD29-PE、HLA-DR-FITC 标记的单克隆抗体(eBioscience),S-P 免疫组化染色试剂盒(北京中杉),DAB 显色试剂盒(北京中杉),抗体稀释液(北京中杉),MTT(Sigma),分析纯二甲基亚砜(鹏程生物),流式细胞仪(BECTON DICKINSON),酶标仪(芬兰雷勃),倒置相差显微镜及成相系统(Olympus),透射电子显微镜及成像系统(日本 JEM-1230)。

1.3 实验方法

1.3.1 体外分离培养 ADMSCs 获取成人腹部大网膜脂肪组织约 200 mg。PBS(含 200 U/ml 青霉素和 200 μg/ml 链霉素)清洗,剔除肉眼可见的血管成分,眼科剪剪碎,移入 10 ml 离心管,加入 2 倍体积的 0.1% Ⅰ型胶原酶,37 ℃恒温水浴箱内振荡消化 60 min,1500 r/min 离心 10 min,弃上清及上层组织,加入完全培养液(含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 HG-DMEM 培养基)吹打细胞沉淀成单细胞悬液,200 目细胞筛过滤,接种于 25 cm^2 一次性塑料培养瓶,于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养。48 h 后首次换液,以后每2~3天换液 1 次。待细胞生长至 70%~80% 融合时,0.25% 胰蛋白酶消化传代,传代后隔天换液。

1.3.2 ADMSCs 的鉴定 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 3 次(1 000 r/min × 10 min),调整细胞数为 1×10^6 ml^{-1},分别吸取荧光标记的单克隆抗体 CD29、HLA-DR 各 5 μl,加入细胞悬液 100 μl,混匀后室温避光孵育 15 min,加 PBS 500 μl 重悬,流式细胞仪检测,Cell Quest 软件分析。同时设立空白对照。

1.3.3 体外诱导 0.25% 胰蛋白酶消化收集生长状态良好的第 4 代 ADMSCs,调整细胞数为 1×10^4 ml^{-1},重新接种于预先置有玻片的 12 孔培养板内行细胞爬片。随机分为 0.05、0.10、0.20 μmol/L 3 种不同浓度的 AngⅡ诱导组,同时设立对照组。细胞贴片后,按上述分组要求换不同浓度 AngⅡ诱导培养液,作用 24 h,PBS 洗 3 次,换完全培养液,对照组仅常规换液。

1.3.4 免疫细胞化学染色 分别于诱导后第 7、14、21、28 天,取出细胞爬片。4 ℃丙酮固定 15 min,滴加 3% H_2O_2 去离子水,37 ℃孵育 10 min,PBS 振洗,滴加封闭用正常山羊血清工作液,37 ℃封闭 15 min,滴加 1∶100 稀释的鼠抗人 cTn-I 一抗工作液,4 ℃过夜。PBS 振洗,滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG 二抗工作液,37 ℃孵育 45 min,PBS 振洗,滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37 ℃孵育 15 min,PBS 振洗。DAB 显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.3.5 计算转化率 光学显微镜 200 倍视野下,每张细胞爬片取 4 个视野,计数显黄色的阳性细胞数(N1)和总细胞数(N),按公式计算心肌样细胞转化率:转化率(%) = N1/N × 100%。

1.3.6 细胞的超微结构 根据免疫细胞化学染色结果,于诱导后第 14 天消化收集 0.20 μmol/L AngⅡ诱导组和对照组 ADMSCs。1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗 1 次(1 000 r/min × 10 min),3% 戊二醛 4 ℃固定 72 h。PBS 洗 3 次,1% 锇酸固定,丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,2% 醋酸铀和枸橼酸铅染色,透射电子显微镜下观察拍照。

1.3.7 检测细胞增殖活性 消化收集第 4 代 ADMSCs,调整细胞密度为 2×10^4 个/ml,重新接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl。24 h 后换 0.20 μmol/L AngⅡ诱导培养液孵育 24 h,同时设立对照组。第 7 天于各孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,混匀后 37 ℃孵育 4 h,加入二甲基亚砜 150 μl,温和振荡 10 min。酶标仪上 490 nm 处读出吸光度值[D(490)]。上述过程重复 3 次。

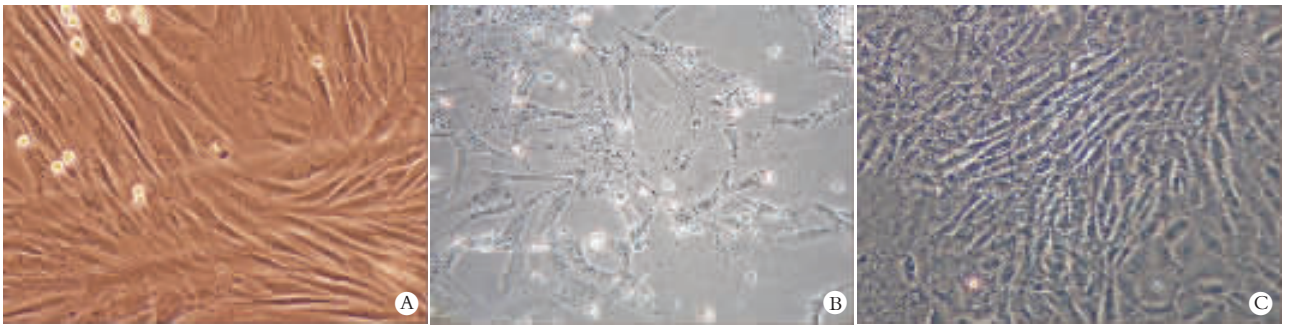
1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本比较的 t 检验。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜下 ADMSCs 的形态学特征

体外分离培养的成人 ADMSCs 为成纤维细胞样,核较大,居中,有 1~2 个核仁,排列具有一定的方向性,呈漩涡样、辐射样或平行样。经 AngⅡ诱导后,0.05 μmol/L、0.10 μmol/L 诱导组 ADMSCs 形态变化不明显;0.20 μmol/L 诱导组 ADMSCs 于诱导后 7d 左右形态开始发生改变,细胞变长、变大,细胞质着色加深,诱导后第 28 天左右细胞形态变得不规则,呈多角形、短棒状,有分支,相邻细胞间相互连接,类似心肌细胞的形态特征。同时与对照组相比,AngⅡ作用后的 ADMSCs 生长旺盛、增殖迅速,有聚集生长的趋势,呈条梭状排列,符合肌细胞的生长特性(图 1)。

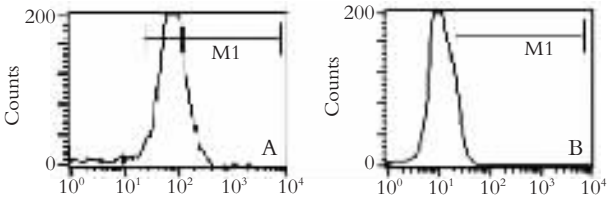


A:原代 ADMSCs(×200);B、C:0.20 μmol/L AngⅡ诱导后第 28 天(B:×200,C:×100)

图 1 倒置相差显微镜下 ADMSCs 的形态学特征

2.2　流式细胞术检测细胞表面分子标志

脂肪组织分离获得的单个核细胞,呈 CD29 阳性表达(87.51%),HLA-DR 阴性(9.54%)。见图 2。

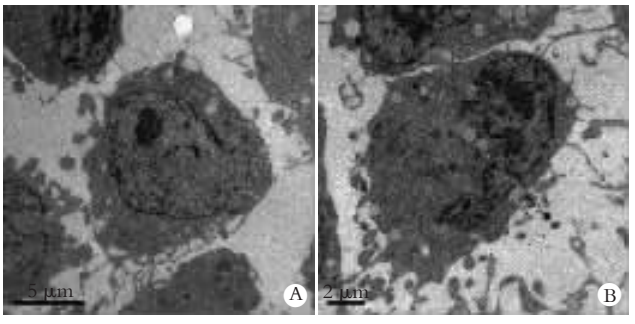


A:CD29;B:HLA-DR

图 2　流式细胞术分析细胞表面分子

2.3　透射电子显微镜下 ADMSCs 的超微结构

未诱导组 ADMSCs 胞体呈圆形,表面有较多伪足伸出,可能与细胞吸收营养物质有关,核大、圆,有分叶,核仁大、染色深,细胞器较少,符合幼稚细胞的超微结构特征。AngⅡ诱导后第 14 天,ADMSCs 形态发生改变,拉长呈不规则形,表面伪足减少,细胞核变长,呈梭形,有沟槽,符合肌细胞核的形态特征,细胞质丰富,有大量线粒体、内质网、溶酶体等细胞器,并可见肌丝样结构,说明诱导后的 ADMSCs 进一步分化成熟,体现出心肌细胞的超微结构特征(图 3)。



A:未诱导组;B:诱导后第 14 天

图 3　ADMSCs 的超微结构　(TEM)

2.4　免疫细胞化学染色

ADMSCs 经 AngⅡ诱导后第 21 天,0.20 μmol/L 诱导组开始表达 cTn-I,第 28 天 cTn-I 阳性细胞数明显增多;0.10 μmol/L 诱导组于诱导后第 28 天有 cTn-I 阳性细胞表达,但远少于 0.20 μmol/L 诱导组;0.05 μmol/L 诱导组和对照组始终未见 cTn-I 阳性细胞表达(图 4)。

2.5　心肌样细胞转化率

0.20 μmol/L AngⅡ诱导组 cTn-I 表达最早,阳性率最高,诱导后第 28 天为(30.73 ± 3.49)%,与其他各组间比较,差异有统计学意义(P < 0.01),见表 1。

表 1　ADMSCs 经 3 种不同浓度 AngⅡ诱导后心肌样细胞转化率(%)

时间(d)	AngⅡ诱导组(μmol/L)			对照组
	0.05	0.10	0.20	
7	0	0	0	0
14	0	0	0	0
21	0	0	21.08 ± 3.17	0
28	0	20.64 ± 3.05	30.73 ± 3.49[a]	0

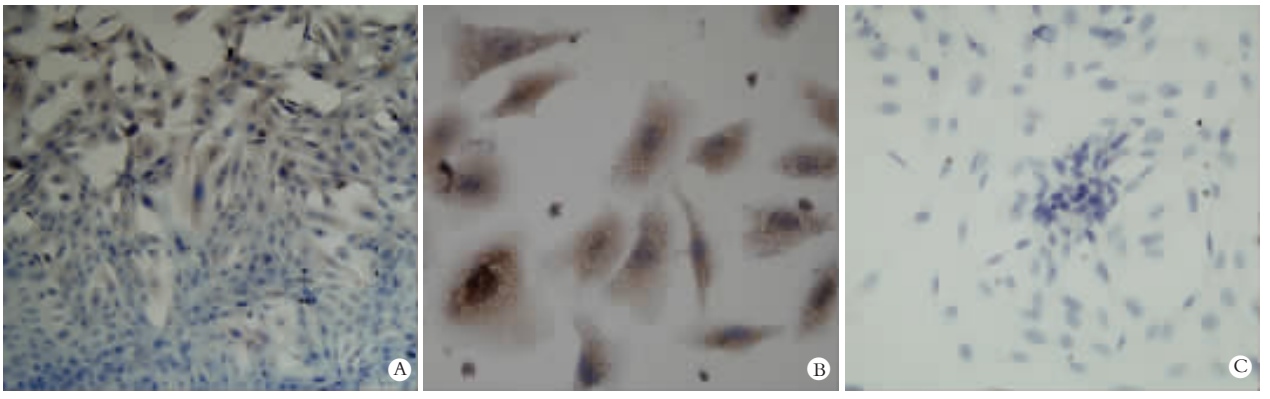
a:P < 0.01,与其他各组间比较

2.6　细胞增殖活性

MTT 法检测 AngⅡ诱导组 ADMSCs 的 D(490)值为(0.307 5 ± 0.04),对照组为(0.19 ± 0.02),差异有统计学意义(P < 0.01)。

3　讨论

心肌微环境诱导 ADMSCs 分化为心肌细胞的机制可以归结为两类:物理因素和化学因素,前者包括直接接触的细胞和细胞基质所提供的信号刺激、细胞之间的牵拉力以及电生理环境等,后者包括细胞因子、激素、离子梯度等。国外 Gaustad 等[5],国内李宾公等[6]通过使用鼠心肌细胞裂解液诱导人 ADMSCs 向心肌细胞方向分化均获得成功。心肌细胞提取物中含有内皮素、血管紧张素Ⅱ、TGF-β、胰岛素样生长因子-I、去甲肾上腺素等多种生物活性物质,这些物质在胚胎发育时期对心肌细胞的发育成熟具有重要作用,在干细胞分化为心肌细胞的过程中可能也起着某种作用。但是心肌细胞提取物成分复杂,直接应用于临床尚存在许多不确定因素。近年,苑媛等[7]用 AngⅡ成功将人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)诱导分化为心肌样细胞,提示 AngⅡ可能是心肌细胞提取物中的有效成分或其中之一。



A:部分 ADMSCs 呈 cTn-I 阳性表达(×100);B:cTn-I 在胞质中表达,核周较多(×200);C:对照组未见 cTn-I 表达(×100)

图 4　0.20 μmol/L AngⅡ诱导后第 28 天行免疫细胞化学染色检测 cTn-I　(S-P)

目前尚缺乏 ADMSCs 特异性的表面分子标志,但众多实验表明,ADMSCs 具有与 BMMSCs 相似的细胞表型[8-10]。本实验检测 ADMSCs 的表面分子标志,其表达 CD29,符合间充质干细胞的表面分子特征,不表达 HLA-DR,排除成纤维细胞的干扰。由于 ADMSCs 与 BMMSCs 的生物学特性极其相似,在本实验中,我们参照苑媛等[7]的实验,使用 AngⅡ作为促分化物质来诱导 ADMSCs。在实验过程中显示,AngⅡ作用 48 h 与 24 h 的诱导分化效能无明显差别,而且作用时间过长,ADMSCs 增殖太快,不利于细胞的分化。另外,为了比较不同浓度 AngⅡ的诱导分化效能,以确定经济高效的诱导浓度,必须消除"作用时间"这一影响因素,所以将诱导时间定为 24 h。实验结果显示,ADMSCs 可以被 AngⅡ诱导分化为心肌样细胞,且 0.20 μmol/L AngⅡ的诱导分化能力最强,表现为细胞形态变化最显著,超微结构更趋近于心肌细胞,cTn-I 表达最早,阳性率最高,说明 AngⅡ的这种诱导分化作用具有一定的浓度依赖关系,其最佳诱导浓度为 0.20 μmol/L。

AngⅡ对 ADMSCs 向心肌细胞方向分化的诱导机制尚不十分清楚,可能与其活化 MAPK、PKA、PKC 等多条细胞信号转导通路[11]有关。AngⅡ是一种重要的生物活性物质,行使循环内分泌系统和组织旁分泌/自分泌系统的功能[12]。作为循环肽,AngⅡ具有调节水钠代谢、血管张力的生理作用;作为旁分泌/自分泌肽,AngⅡ具有刺激血管平滑肌细胞、成纤维细胞增殖、调节生物活性物质释放等作用。在实验中还观察到,ADMSCs 经 AngⅡ作用以后,细胞增殖迅速,提示 AngⅡ在促进 ADMSCs 增殖的同时具有诱导其向心肌细胞方向分化的作用,是一种更具临床应用前景的生物活性诱导剂。对 AngⅡ的诱导研究,为优化 ADMSCs 体外诱导分化的条件提供了思路。

参考文献:

[1] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, *et al*. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(6): 1470-1480.

[2] 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.

[3] 袁 岩, 陈连凤, 张抒扬, 等. 心肌细胞裂解液对骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化诱导作用的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(2): 170-173.

[4] 姚 青,宋治远,马显光. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 410-413.

[5] Gaustad K G, Boquest A C, Anderson B E, *et al*. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(2):420-427.

[6] 李宾公, 曾秋棠, 王红祥, 等. 心肌细胞裂解液诱导人脂肪基质干细胞分化为心肌样细胞的研究[J]. 中国急救医学, 2006, 26(4): 280-282.

[7] 苑 媛, 吕安林, 陈 丹, 等. 血管紧张素Ⅱ诱导人骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 心脏杂志, 2006, 18(3): 258-261.

[8] Lee R H, Kim B, Choi I, *et al*. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue[J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(4-6): 311-324.

[9] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, *et al*. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[10] Gronthos S, Franklin D M, Leddy H A, *et al*. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells[J]. J Cell Physiol, 2001, 189(1): 54-63.

[11] Xiao G, Jiang D, Thomas P, *et al*. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(6): 4453-4459.

[12] Hanada M, Saito E, Kambe T, *et al*. Evidence for the involvement of platelet-derived growth factor in the angiotensin Ⅱ-induced growth of rat vascular smooth muscle cells[J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(2): 137-141.

(编辑 郭建秀)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由3所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从2007年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31-1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000-1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各1份,照片提供3份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038) **电话**:(023)68752782