论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1722-04

抗坏血酸诱导体外培养小鼠胚胎干细胞分化为心肌细胞

李 捷,张宜明,刘 颖,夏 晖,于长海 (解放军总医院第一附属医院心胸外科,北京 100037)

摘 要:目的 探讨采用抗坏血酸诱导体外培养小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)分化为心肌细胞的可行性。**方法** 未分化ES细胞在滋养层上长至汇合,胰酶消化成单个细胞经旋转生物反应器(RCCS)制备拟胚体(embryoid bodies,EBs),EBs贴壁后用抗坏血酸诱导分化为心肌细胞。通过光镜观察跳动的心肌细胞,采用免疫组织化学、激光共聚焦显微镜(CLSM)和RT-PCR的方法鉴定心肌细胞。**结果** 抗坏血酸能有效地诱导小鼠胚胎干细胞向心肌细胞的分化,诱导效率为90%;分化的心肌细胞自发而有节律地收缩,心肌肌钙蛋白T(cTnT)、α-辅肌动蛋白(α-actinin)、肌动蛋白(actin)表达阳性。此外,分化的心肌细胞还表达调控心肌发育的基因α-MHC、β-MHC。**结论** 抗坏血酸能有效地诱导体外培养小鼠胚胎干细胞分化为心肌细胞。

关键词: 小鼠胚胎干细胞;心肌细胞;抗坏血酸;细胞培养
中图法分类号: R322.11;R329.21;R977.23 **文献标识码:** A

Ascorbic acid induces mouse embryonic stem cells to differentiate into cardiac myocytes

LI Jie, ZHANG Yi-ming, LIU Ying, XIA Hui, YU Chang-hai (Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of ascorbic acid to induce mouse embryonic stem cells (mESC) to differentiate into cardiac myocytes. **Methods** Undifferentiated mouse embryonic stem cells grew confluent and were digested by trypsin to single cell to form embryoid bodies (EBs) by rotary cell culture system (RCCS). After plated, EBs were induced by ascorbic acid, then observed with light microscopy and confocal laser scanning microscopy (CLSM), identified by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** The cells after induction displayed spontaneous and rhythmic contractile activity. The beating cells was markedly increased in number and accounted for 90% of the induced cells. They were positive for cTnT, α-actinin and actin, and also expressed the cardiac genes α-MHC and β-MHC. **Conclusion** Ascorbic acid could effectively induce mES cells into cardiac myocytes.

Key words: mouse embryonic stem cells; cardiomyocyte; ascorbic acid; cell culture

获得足够数量、不引起免疫排斥反应且具有再生活力的心肌细胞是开展心肌组织工程研究的前提和基础。胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)是从早期哺乳动物囊胚的内细胞团发育而来,在体外具有无限增殖能力和发育的全能性。胚胎干细胞作为心肌组织工程的种子细胞来源,除需要对拟胚体(embryoid bodies,EBs)进行规模化扩增以获得足够数量ES细胞外,还需要将获取的ES细胞在一定条件下,定向诱导分化为心肌细胞才有望用于心肌组织的体外构建研究。目前,EBs的制备方法有限,包括悬滴培养法、直接悬浮培养法(低贴附性平皿)、两步法。而应用上述方法所制备的EBs在数目上虽可满足发育生物学等基础研究的需要,却无法适应干细胞组织工程等应用研究的需求。为了获得足够的EBs及高的心肌细胞诱导效率,本研究尝试应用一种新型的细胞培养系统——旋转生物反应器(rotary cell culture system, RCCS)来实现EBs的批量扩增,由抗坏血酸诱导定向分化为心肌细胞。探讨并建立小鼠胚胎干细胞体外心肌细胞定向分化的实验体系,为心肌组织工程种子细胞提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料

复苏小鼠胚胎干细胞(ES-D3细胞)、胎牛血清(FBS)购自北京元亨圣马生物技术研究所;β-巯基乙醇、非必需氨基酸、丝裂霉素C、抗坏血酸、TRITC标记的phalloidin、Hoechst 33258、Dispase酶、α-辅肌动蛋白、EDTA、地尔硫卓、异丙肾上腺素、去氧肾上腺素购自Sigma公司;H-DMEM、胰酶、LIF购自Gibco公司;明胶(北京化学试剂公司);心肌肌钙蛋白T(cTnT)抗体(博

作者简介:李 捷,男,山东省日照市人,博士,主治医师,主要从事心肺移植及肺部外科基础与临床方面的研究,发表论文9篇。电话:(010)66848361,E-mail:lijie@301hospital.com.cn

收稿日期:2008-01-08;修回日期:2008-03-21

士德公司);α-sarcomeric actin、FITC 标记的二抗、生物素标记的羊抗小鼠试剂盒购自中杉金桥公司。

1.2　方法

1.2.1　滋养层细胞的培养和处理　　复苏的小鼠原代成纤维细胞,离心清洗后重悬于滋养层细胞培养液(10% FBS、2.2 g/L $NaHCO_3$、2 mmol/L 谷胺酰胺、庆大霉素 4 万 U/L、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、1 mmol/L 非必需氨基酸的 H-DMEM),接种到3 cm 的 0.1% 明胶包被的培养皿中,每皿完全培养基 5 ml。37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,第 2 天更换培养液,继续培养,直至细胞铺满皿底。用终浓度为 10 mg/ml 的丝裂霉素 C 处理成纤维细胞,37 ℃培养 2 ~ 3 h。将含丝裂霉素 C 处理过的且失去有丝分裂活性的成纤维细胞冻存,制备为滋养层细胞[1,2]。

1.2.2　未分化 mES 细胞的培养　　复苏 mES 细胞(ES-D3),离心弃去 DMSO 培养液,重悬于 ES 细胞未分化培养液(15% FBS、2.2 g/L $NaHCO_3$、2 mmol/L 谷胺酰胺、庆大霉素 4 万 U/L、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、1mmol/L 非必需氨基酸、1 000 U/ml LIF 的 H-DMEM),接种到丝裂霉素 C 处理过的已经失去有丝分裂活性的滋养层细胞的 3 cm 培养皿中,每皿完全培养基 5 ml,细胞密度约 1×10^6/ml。37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,第 2 天更换培养液,继续培养[3]。

1.2.3　mES 细胞的分化培养

1.2.3.1　RCCS 制备 EBs　　取对数生长期 mESC,经 0.25% 胰酶 + 0.04% EDTA 消化后制备为细胞悬液,细胞计数后以 $1 \times 10^4 ml^{-1}$ 细胞数种植入经无菌处理的容量为 110 ml 的 RCCS(STLV 型)内,并补充培养基至充满整个容器。将整个装置置于 CO_2 培养箱内,37 ℃条件下常规培养。RCCS 的初始转速为 10 r/min,随着 EBs 的形成及其体积的不断增加,调节转速至 15 ~ 20 r/min 以维持 EBs 的悬浮培养状态。

1.2.3.2　mES 细胞定向分化培养为心肌细胞　　将经 RCCS 制备 5 d 的拟胚体转移到含 ES 细胞分化培养基,即 20% FBS、2.2 g/L $NaHCO_3$、2 mmol/L 谷胺酰胺、庆大霉素 4 万 U/L、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、1 mmol/L 非必需氨基酸、10 g/L 抗坏血酸的 H-DMEM 培养液的组织培养皿(Nunc)中[4,5],接种密度为 1 ~ 3 EBs/cm^2,或分别接种于 24 孔板中,每孔置一预先用 0.1% 的明胶包被的 10 mm × 10 mm 盖玻片。或在 96 孔板中每孔接种 1 个拟胚体,令 EBs 贴壁生长,分化为心肌细胞[6,7]。不同分化时间 EBs 行 HE 染色。

1.2.4　心肌细胞的鉴定

1.2.4.1　免疫组织化学染色　　分化 23 d 的 EBs 经 PBS 清洗 2 次,丙酮固定后用抗心肌肌钙蛋白 T 抗体和肌小节肌动蛋白作免疫组织化学鉴定。细胞经 PBS 漂洗 3 次 ×5 min,10% 封闭血清作用 20 min,分别加抗心肌肌钙蛋白 T 抗体(1∶100)和 α-sarcomeric actin(1∶100),4 ℃过夜。PBS 漂洗 3 次 ×5 min,加入二抗,37 ℃孵育 45 min;PBS 漂洗 3 次 ×5 min,辣根标记的链霉卵白素 37 ℃作用 45 min。PBS 漂洗 3 次 ×5 min,DAB 显色,自来水洗,细胞核苏木精衬染,二甲苯透明,封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4.2　激光共聚焦显微镜(CLSM)观察　　分化 23 d 的 EBs 经 PBS 漂洗 2 次,丙酮固定 10 min,PBS 漂洗 3 次 ×5 min。室温下用 0.5% Triton X-100 作用 10 min,封闭血清处理 20 min。4 ℃条件下同一抗抗 α-辅肌动蛋白(1∶800)作用过夜,PBS 漂洗 3 次 ×5 min,与 FITC 标记的二抗(抗大鼠 IgG,1∶50)室温下作用 45 min,PBS 漂洗 3 次 ×5 min,然后用 TRITC 标记的 Phalloidin(50 μg/ml)在室温下与样本作用 40 min,以显示肌动蛋白。PBS 漂洗 3 次 ×5 min,Hoechst 33258 染核 15 min,PBS 漂洗 3 次 ×5 min。用 90% 的甘油 PBS 溶液支撑盖玻片,激光共聚焦显微镜观察。

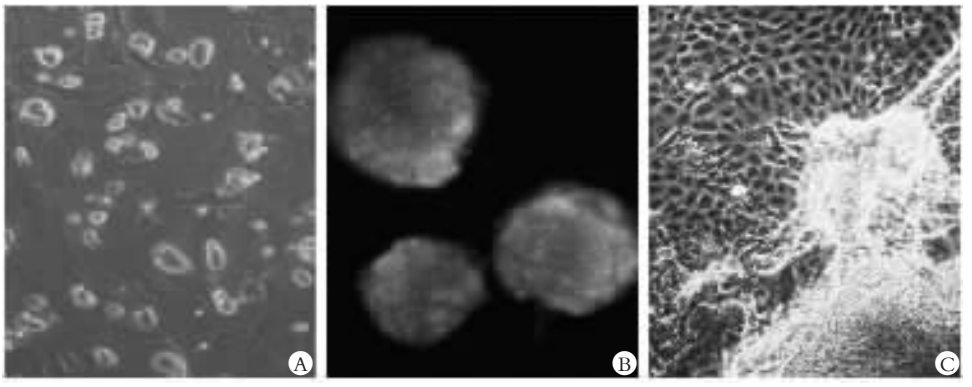
1.2.4.3　RT-PCR 分析　　把分化 14 d EBs 用细胞刮刮下,置于离心管中,轻微离心 2 min,去上清,加入胶原酶溶液(Dispase 酶),置于 37 ℃、CO_2 孵箱中 20 min,轻微离心,去上清,加高 K^+ 溶液,用吸管吹打,等组织块被消化完,200 目网过滤后,1 200 r/min,离心 5 min,去上清,沉淀提 RNA,分析 α-MHC、β-MHC、β-tubulin 的表达。正常昆明白小鼠心脏作为对照。

1.2.5　ES 源心肌细胞对药物的反应　　分化的 EBs 在实验的前 1 天换液,第 2 天分别加入不同浓度的地尔硫卓、异丙肾上腺素、去氧肾上腺素,在孵箱内静置 20 ~ 30 min,观察 mES 细胞源的心肌细胞对药物的反应。每个实验重复 6 次。

2　结果

2.1　小鼠胚胎干细胞源心肌细胞的观察

2.1.1　倒置相差显微镜观察　　未贴壁的 EBs 呈球形或椭圆形,培养 2 ~ 3 h 后细胞开始贴壁生长,24 h 后 EBs 基本贴壁,EBs 继续分化,经 VC 诱导,1 ~ 4 d 少数贴壁的 EBs 小区域出现自发性搏动,搏动的频率、节律不同。随着分化时间的延长,跳动的细胞明显增多,跳动节律不同。在分化 14 ~ 27 d 跳动的 EBs 最多,随着 EBs 的进一步分化,心肌细胞逐渐成熟,跳动的细胞及频率也随着降低(图 1)。有近 90% 的拟胚体贴壁后分化为具有自发节律性收缩功能的心肌细胞(图 2)。



A:长在滋养层上未分化的细胞(×100);B:悬浮第 6 天的 EBs(×200);C:分化 14 d 跳动的 EBs(×100)

图 1　ES 细胞光镜观察

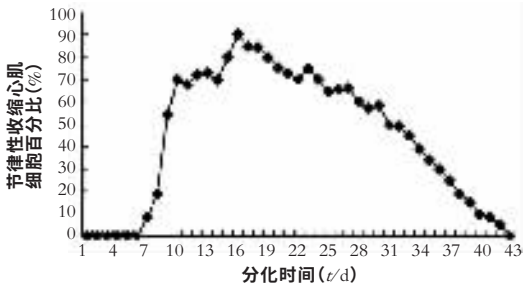


图 2　ES 细胞体外定向分化为自发节律收缩的心肌细胞出现的情况

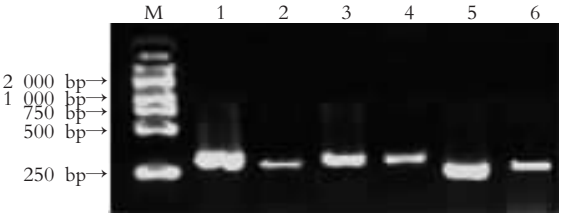
2.1.2　HE 染色　　分化 6 d 和 14 d 的 EBs 经 HE 染色,核为蓝色,细胞质为红色,细胞形态正常(图 3)。

2.2　小鼠胚胎干细胞源心肌细胞的鉴定

2.2.1　免疫组织化学染色　　抗坏血酸诱导小鼠胚胎干细胞源心肌细胞 cTnT、α-sarcomeric actin 表达呈阳性,棕色颗粒位于细胞质(图 4)。

2.2.2　激光共聚焦观察　　在激光共聚焦显微镜下观察,α-sarcomeric actin 显示红色,α-actinin 显示绿色,核为蓝色。叠加后,可显示抗坏血酸诱导小鼠胚胎干细胞源心肌细胞中形成结构良好的红绿相间肌原纤维束(图 5)。

2.2.3　RT-PCR 分析　　RT-PCR 产物的电泳结果:在 EBs 经 RCCS 制备分化的第 14 天可检测到心肌转录因子 α-MHC、β-MHC、β-tubulin 的表达(图 6)。



M: 2000 mES cell-drived; 1: β-tubunlin adult C57 mouse; 2: α-MHC adult C57 mouse; 3: β-MHC adult C57 mouse; 4: β-tubulin; 5: α-MHC; 6: β-MHC

图 6　EBs 分化 14 d 及小鼠心肌表达心肌特异基因 α-MHC、β-MHC

3　讨论

ES 细胞可分化为包括内胚层、中胚层和外胚层的多种类型的细胞[8,9],即在合适的体内或体外条件下,能够分化为内、中、外 3 个不同胚层的细胞类型。

本实验采用 RCCS 制备 EBs 由抗坏血酸诱导建立了小鼠胚胎干细胞体外分化为心肌细胞的实验体系。以往的胚胎干细胞源心肌细胞诱导剂通常用维甲酸(RA)、二甲基亚砜(DMSO)、cAMP、骨形态生发蛋白(BMP)-2/4。本研究采用抗坏血酸诱导,实验证实同样能达到胚胎干细胞定向分化为心肌细胞的目的,且具有较高的诱导分化率,为干细胞向心肌细胞分化提供了一条新途径。RCCS 的运用,使三维培养代替了

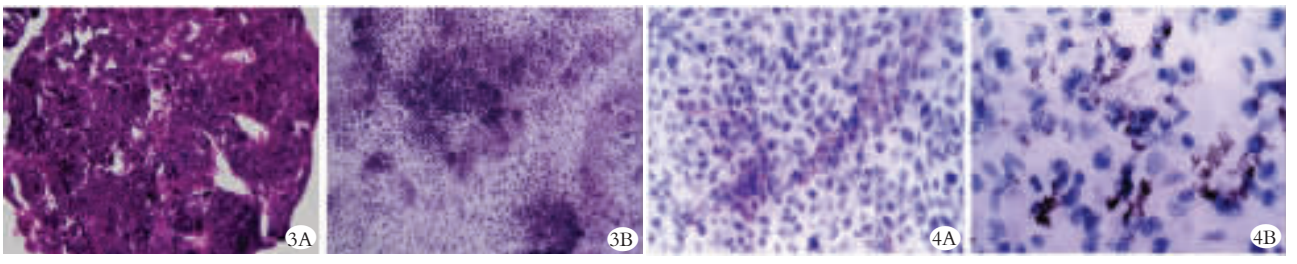
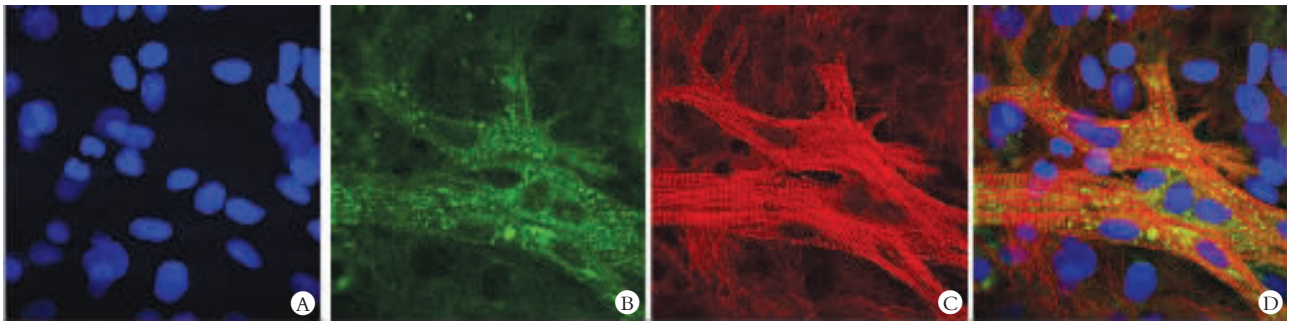


图 3　不同分化时间 EBs HE 染色　A:6 d 未贴壁的 EBs(×400); B:分化 14 d 的 EBs(×100)

图 4　ES 细胞源心肌细胞免疫组织化学染色　(×100)　A:分化 23 d 的 EBs cTnT 染色; B:分化 14 d 的 EBs 肌小节肌动蛋白染色



A:Hoechst 33258 显示核为蓝色; B:α-actinin 显示绿色; C:α-sarcomeric actin 显示红色; D:叠加后,形成红绿相间的肌原纤维束

图 5　分化 23 d EBs 细胞源心肌细胞激光共聚焦图像

EBs 的一维培养。EBs 悬浮其内,每个面充分接触培养基,使 EBs 有更充足的培养体系,一方面避免 EBs 中心坏死和 EBs 形成过程中在培养皿中贴壁,另一方面,RCCS 能制备数量多且体积均匀的 EBs,更适应干细胞组织工程的研究需要。

经过 RCCS 悬浮培养的拟胚体转移到分化培养基后,有近 90% 的拟胚体贴壁后分化为具有自发节律性收缩功能的心肌细胞,光镜下可见这些细胞。随着进一步培养,具有自发节律性收缩功能的心肌细胞数目逐渐增多,有的拟胚体在镜下可见多个有着独立收缩频率的收缩区域。免疫组织化学染色、α-sarcomeric actin、cTnT 表达阳性,这些结果表明抗坏血酸能很好地诱导小鼠胚胎干细胞定向分化为心肌细胞。在激光共聚焦显微镜下观察到红绿相间的肌原纤维束,进一步证明抗坏血酸诱导 mES 细胞源心肌细胞形态正常,具有自发节律性收缩功能。本研究应用 RT-PCR 对 α-MHC、β-MHC 在 ES 源心肌细胞中表达进行了检测,表明 ES 源心肌细胞和小鼠心肌一样表达心肌特异转录因子。可见体外诱导分化的心肌细胞可作为体外研究心脏基因表达和功能及心肌发育的实验模型。本实验结果证实:经抗坏血酸诱导小鼠胚胎干细胞能定向分化为形态、活力良好的心肌细胞,该实验体系可用于心脏疾病治疗药物的筛选和干细胞组织工程的研究。

参考文献:

[1] 曾　彬, 林国生, 罗　浩, 等. 体外诱导鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化的实验研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2006, 27(2): 184 - 187.

[2] 周　江, 杨　晓, 孙彦旬, 等. G418 抗性的小鼠胚胎干细胞滋养层的制备[J]. 军事医学科学院院刊, 2001, 25(1): 59 - 61.

[3] 钱海燕, 李庚山, 徐红新, 等. 诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞的实验研究[J]. 武汉大学学报: 医学版,2004, 25(4): 383 - 386.

[4] Guo X M, Zhao Y S, Chang H X, *et al*. Creation of engineered cardiac tissue *in vitro* from mouse embryonic stem cells[J]. Circulation, 2006, 113(18): 2229 - 2237.

[5] 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.

[6] 林　钊, 贾竹青, 马康涛, 等. 定向诱导小鼠 ES 细胞向心肌细胞的分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(2): 262 - 266.

[7] 张　良, 黄　冰, 唐仕波, 等. 体外培养拟胚体条件的探讨[J]. 中国病理生理杂志,2004, 20(4): 700 - 702.

[8] 谢　安, 汪　泱, 郭　菲, 等. BALB/C 小鼠胚胎干细胞的分离培养及初步鉴定[J]. 江西医学检验,2006, 24(1): 1 - 2, 6.

(编辑　吴培红)

(上接 1717 页)

液 2.0、3.0、4.0 ml 各 3 份,按供试品溶液制备方法制备,并按样品测定项下测定,计算含量。

1.2.3.7　样品测定　　取 3 个批号(20070505、20070507、20070512)的供试品,每批取样 3 份,每份取约 1 g,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,进行测定。

2　结果

2.1　黄柏 TLC 鉴别结果

供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。

2.2　红花 TLC 鉴别结果

供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰。

2.3　牡丹皮中主要成分丹皮酚的含量测定结果

2.3.1　HPLC 色谱测定　　在此色谱条件下丹皮酚峰保留时间为 17.3 min ,理论塔板数 $n>5\ 000$,阴性对照无干扰。

2.3.2　线性关系考察　　以峰面积积分值为纵坐标,对照品浓度为横坐标,得线性回归方程为:$Y=116\ 603.4X-17\ 243.22$, $r=0.999\ 9$,结果表明在 5.2 ~ 52 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3.3　精密度试验结果　　测定丹皮酚峰面积积分值,RSD 为 0.2% 。

2.3.4　重复性试验结果　　丹皮酚含量的 RSD 为 0.86%。

2.3.5　稳定性试验结果　　6 次测定的丹皮酚峰面积积分值的 RSD 为 1.43%。

2.3.6　加样回收率试验结果　　平均回收率为 100.32%, RSD 为 1.08%。

2.3.7　样品测定结果　　批号 20070505:含量 2.35, RSD 1.08%;批号 20070507:含量 2.27, RSD 1.12%;批号 20070512:含量 2.29, RSD1.05%。

3　讨论

抗异散为我院制剂,方中红花性辛温,具有活血通经、散瘀止痛之功效,为君药;丹皮性苦辛,微寒,可清热凉血,活血化瘀,为臣药;黄柏性苦寒,具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮的功效,为佐药。

中药成分复杂,鉴别仅以单一成分为对照,难以反映药品质量,在可能的情况下,应以有效成分和对照药材作对照。本研究采用 TCL 鉴别黄柏、红花专属性强,分离效果好。

丹皮酚为方中臣药牡丹皮的主要活性成分,在用高效液相色谱法测定时,方法稳定无干扰[2]。本研究采用高效液相色谱法测定丹皮酚的含量简便、快速、准确。

关键词: 抗异散;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准
中图法分类号: R284.1　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005: 103, 119, 214, 591.

[2] 姜　潇, 张广宏, 刘学起. HPLC 法测定牡丹皮中丹皮酚的含量[J]. 齐鲁药事, 2004, 23(6): 31.

(编辑　栾　嘉)