论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1016-04

丁酸钠对大鼠骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的影响

杨 婧,徐惠成,王延洲,梁志清 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

【摘要】 **目的** 探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors,HDACi)丁酸钠对在体外与膀胱平滑肌细胞(bladder smooth muscle cells,BSMCs)接触共培养的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化能力的影响。**方法** 常规培养大鼠 BMSCs 及 BSMCs 至第 3 代,种植于多孔膜两侧进行接触共培养。实验组 BMSCs 培养上室面添加含 3 mmol/L 丁酸钠诱导其分化;对照组不含丁酸钠行接触共培养。免疫荧光化学染色法对 2 组 BMSCs 中平滑肌标志性蛋白 calponin 进行检测,同时用逆转录 PCR(RT-PCR)和荧光定量 PCR 法(real-time PCR)对 BMSCs 中平滑肌 α 肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、calponin、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle-myosin heavy chain,SM-MHC)行进鉴定。**结果** 大鼠原代 BMSCs 流式检测显示 CD29、CD44、CD166 表达阳性,阳性率分别为 96.55%、92.76%、99.54%;CD31、CD45 表达阴性,阳性率为 1.39%、5.56% 。BSMCs 鉴定 α-SMA、calponin、SM-MHC 3 种标志性蛋白的表达均为阳性。细胞免疫荧光染色显示平滑肌标志性蛋白 calponin 的表达均随时间的延长而增加,实验组表达强度明显高于对照组。RT-PCR 和荧光定量 PCR 显示实验组中 BMSCs 平滑肌标志性基因 α-SMA、calponin、SM-MHC 随共培养时间的延长逐渐增多,与对照组比较有明显差异($P<0.05$)。**结论** HDACi 丁酸钠可以增强 BMSCs 向平滑肌细胞的分化能力,提示提高组蛋白乙酰化程度可以促进 BMSCs 分化。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;膀胱平滑肌细胞;细胞分化;组蛋白乙酰化;丁酸钠
【中图法分类号】 R331.22;R337;R329.26 【文献标志码】 A

Effects of sodium butyrate on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into smooth muscle cells *in vitro*

Yang Jing, Xu Huicheng, Wang Yangzhou, Liang Zhiqing (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor (HDACi), on differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into smooth muscle cells *in vitro*. **Methods** Rat BMSCs and bladder smooth muscle cells (BSMCs) were isolated, identified, cultured to the third passage, and subjected to contact co-culture on two surfaces of a porous membrane. The co-culture medium for BMSCs contained 3.0 mmol/L sodium butyrate in an experimental group and 0 mmol/L sodium butyrate in a control group. The expression of smooth muscle markers, α-smooth muscle actin (α-SMA), calponin, and smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC), was evaluated by RT-PCR and real-time PCR. The concentration of calponin in BMSCs was detected by immunofluorescence staining. **Results** The isolated rat BMSCs had positive expression of CD29, CD44, and CD166, with positive rates of 96.55%, 92.76%, and 99.54%, respectively, and negative expression of CD31 and CD45, with positive rates of 1.39% and 5.56%, respectively. The isolated rat BSMCs had positive expression of α-SMA, calponin, and SM-MHC. The immunofluorescence staining results indicated that the expression of calponin increased gradually in both groups and was significantly higher in the experimental group. The RT-PCR and real-time PCR results showed that the gene expression levels of α-SMA, calponin, and SM-MHC increased gradually in both groups, with more obvious increase in the experimental group ($P<0.05$). **Conclusion** HDACi sodium butyrate can promote the differentiation of BMSCs into smooth muscle cells, suggesting that increasing the degree of histone acetylation can promote the differentiation of mesenchymal stem cells.

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金(30801234)
【通信作者】 梁志清,电话:(023)68754409,E-mail:zhi lz liangz@ gmail. com
徐惠成,电话:(023)68765403,E-mail:Xhuicheng@ yahoo. com. cn

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cells; bladder smooth muscle cells; cell differentiation; histone acetylation; sodium butyrate

Supported by the National Science Foundation of China for Young Scholars(30801234). Corresponding author: Liang Zhiqing, Tel: 86-23-68754409, E-mail: zhi lz liang@gmail.com, Xu Huicheng, Tel: 86-23-68765403, E-mail: Xhuicheng@yahoo.com.cn

压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)是女性盆底功能障碍性疾病,严重影响女性身心健康和生活质量。由于尿道固有括约肌缺陷(intrinsic sphincter deficiency, ISD)型尿失禁为其主要类型,医学上一直在探索一种能修复或替代尿道括约肌功能的方法来治疗压力性尿失禁。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种存在于骨髓中的非造血细胞,具有增殖和多向分化潜能,给细胞、组织修复研究提供了非常宝贵的细胞资源。近年来人们对间充质干细胞(MSC)移植治疗ISD型压力性尿失禁寄予厚望,然而至今该疗法并没有获得预期的疗效,可能因为干细胞体内微环境下的适应性及机制还有很多关键性的问题没有解决。既往仅关注了MSC移植后的细胞表型变化,对其分化机制研究较为局限。随着对表观遗传学机制之一——组蛋白乙酰化的深入研究,组蛋白乙酰化对干细胞的增殖分化起着至关重要的作用[1]。丁酸钠(sodium butyrate)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,能提高细胞内环境组蛋白乙酰化程度。研究表明,丁酸钠可诱导干细胞向多种细胞分化,如诱导大鼠间充质干细胞向成熟肝细胞和胆管细胞分化[2],诱导人胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)分化为肝细胞[3-6]。本研究模仿BMSCs移植后体内生存的微环境,观察在丁酸钠的诱导下,是否能提高BMSCs向平滑肌细胞分化的效率。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雌性SD大白鼠2只,1月龄,体质量约120 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

高糖DMEM培养基(HG-DMEM)、DMEM-F12、胎牛血清(FBS)、胰酶、双抗购于Gibco公司,PBS缓冲液(中杉金桥公司),Ⅱ型胶原酶(Sigma公司),悬挂式细胞培养小室(transwell, millipore公司),抗平滑肌α-肌动蛋白单克隆抗体(α-SMA,中杉金桥公司),抗calponin单克隆抗体、抗平滑肌肌球蛋白重链抗体(SM-MHC)购于Abcam公司,抗FITC山羊抗小鼠IgG(中衫金桥公司),DAPI(碧云天公司),Beta-actin(康成公司),Rever Tre Ace-a逆转录试剂盒、SYBRGreen定量PCR试剂盒(TOYOBO公司)。

1.3 细胞培养

1.3.1 大鼠BMSCs的分离与培养 按照Sun等[7]的方法分离并培养BMSCs。无菌操作下取双侧股骨、胫骨,反复冲洗骨髓腔,混匀冲洗液,1 000 r/min,离心5 min,弃掉混有较多脂肪的上层液体,再以适量5% FBS的DMEM-F12溶液重悬,缓慢加入并平铺于1.073 g/ml的等体积Precoll密度梯度离心液,2 000 r/min,4 ℃离心20 min,吸取白色云雾状的第2层,该层为所需单核细胞层,PBS洗涤2~3次,加入DMEM-F12培养液中,含10%胎牛血清和100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素,以5×10^5/ml接种于培养瓶,置37 ℃的5% CO_2培养箱中培养。24 h后更换培养基,以后每3天换液1次。待细胞接近80%~90%融合时传代。

1.3.2 膀胱平滑肌细胞培养 按照文献[8]的方法分离并培养膀胱平滑肌细胞。

1.4 建立丁酸钠诱导BMSCs向平滑肌细胞分化的共培养体系

将悬挂式细胞培养小室transwell下室的多孔膜(1 μm)向上倒置于大培养皿中,将2代膀胱平滑肌细胞以2×10^5均匀种植于下室面,在37 ℃的5% CO_2培养箱中培养6 h后取出,PBS洗去未贴壁细胞,翻转transwell将其放回含平滑肌培养液的6孔板中继续培养。次日将BMSCs 2×10^5均匀种植于膜内面。分组标记,实验组上室内加入含3.0 mmol/L丁酸钠的BMSCs培养液,对照组加入普通BMSCs培养液,CO_2培养箱中培养并计时,每48小时换液1次。

1.5 细胞鉴定

1.5.1 流式细胞仪检测 取1×10^6个原代BMSCs细胞,分别加入流式细胞抗体CD29、CD31、CD45、CD44、CD166,5种抗体均为FITC标记,前4种抗体均购自ABR公司,后1种抗体和FITC标记二抗购于Santa Cruz公司,4 ℃避光孵育30 min,加PBS调至200 μl重悬细胞,上机检测(BD FACSCalibur),以WinMD12.9分析软件分析并记录结果。

1.5.2 免疫荧光化学染色 运用免疫荧光化学染色鉴定BSMCs。用4%多聚甲醛固定BSMCs爬片,30 min后ddH_2O和PBS分别漂洗5 min×3次;滴加0.3% Triton X-100 4 ℃透化10 min,PBS漂洗5 min×3次;5% BSA室温下封闭30 min;按1∶200稀释抗α-SMA单克隆抗体,抗calponin单克隆抗体,抗SM-MHC抗体,滴加一抗后4 ℃孵育过夜,PBS漂洗5 min×3次,FITC山羊抗小鼠IgG按1∶100稀释后室温避光孵育1 h,PBS漂洗5 min×3次,DAPI室温孵育10 min衬染细胞核,PBS漂洗5 min×5次,水溶胶封片,荧光显微镜下观察细胞。

1.6 丁酸钠诱导分化对BMSCs影响的鉴定

1.6.1 免疫荧光化学染色 应用免疫细胞化学方法检测未经过共培养的BMSCs中calponin的表达情况,并检测实验组和对照组中BMSCs第5、8天的calponin的表达情况。方法:transwell半透膜在固定前用棉签将下室面的平滑肌细胞擦净,PBS冲洗,用4%多聚甲醛固定长有细胞的半透膜和未经过共培养的BMSCs爬片,其余步骤同1.5.2。

1.6.2　逆转录PCR和real-time PCR检测　PCR检测含丁酸钠诱导培养组和对照组中第1、2、3天的BMSCs中α-SMA，calponin和SM-MHC的表达情况。3种标志性基因引物由上海生工合成，α-SMA上、下游序列：5′-GGGCATCCACGAAACCAC-CTAT-3′、5′-CGCCGATCCAGACAGAATATTTG-3′，扩增片段大小212 bp；calponin上、下游序列：5′-CCCACAATCACCACCCA-CACAAC-3′、5′-CCTCGGCCTGATCTCCCCAAACT-3′，扩增片段大小172 bp；SM-MHC上、下游序列：5′-GAGGAGGCGGTGCAG-GAGTGTAG-3′、5′-GGCGCTGGTGTCCTGCTCCTT-3′，扩增片段大小108 bp。β-actin上、下游序列：5′-TGGTGGGAATGGGT-CAGAA-G-3′、5′-ACGCACGATTTCCCTCTCAG-3′，扩增片段大小249 bp。transwell上室面取丁酸钠培养组和对照组中BMSCs，以Trizol抽提细胞总RNA。取25 μg总RNA行逆转录反应。再以逆转录反应液2 μl作为模板，加入相应引物进行PCR扩增。反应条件为94 ℃ 5 min变性后进入循环，94 ℃，30 s→62 ℃，30 s→72 ℃，30 s，30个循环后72 ℃ 10 min结束反应。取15 μl PCR反应产物用1 %的琼脂糖凝胶电泳。取已完成逆转录的cDNA反应液2 μl加入相应引物进行SYBR Green荧光定量PCR，反应条件：94 ℃ 5 min变性后进入循环，94 ℃，30 s→55 ℃，30 s→72 ℃，30 s，35个循环后72 ℃ 10 min结束反应。以β-αctin为内参，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$进行相对定量结果分析。

1.7　统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件，计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，进行配对样本t检验。

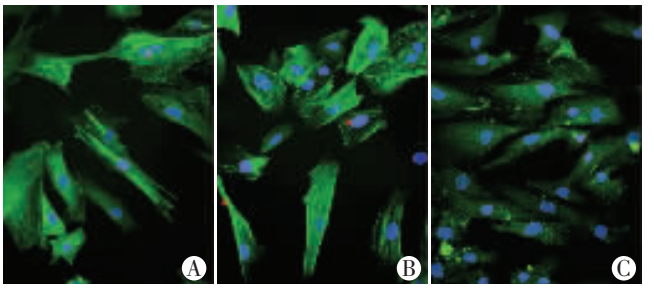
2　结果

2.1　流式细胞仪检测BMSCs表面标记

BMSCs中CD29、CD44、CD166表达阳性，阳性率分别为96.55%、92.76%、99.54%；CD31、CD45表达阴性，阳性率分别为1.39%、5.56%。

2.2　免疫荧光化学染色鉴定BSMCs

BSMCs中α-SMA、calponin、SM-MHC表达阳性（图1）。



A：α-SMA；B：calponin；C：SM-MHC

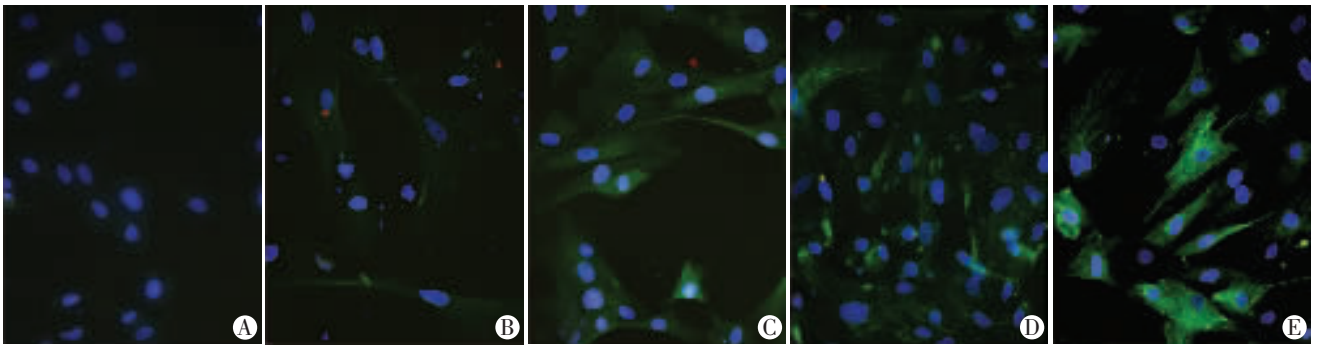
图1　免疫荧光化学染色检测BSMCs标志性蛋白（FITC）（荧光显微镜 ×400）

2.3　免疫荧光化学染色检测丁酸钠对BMSCs诱导分化的影响

在未经过共培养的BMSCs中calponin为阴性。共培养第5天，对照组BMSCs中calponin表达弱阳性，实验组中calponin表达较明显；共培养第8天，对照组与实验组BMSCs的calponin表达均较前有所增加，且实验组calponin表达明显高于对照组。见图2。

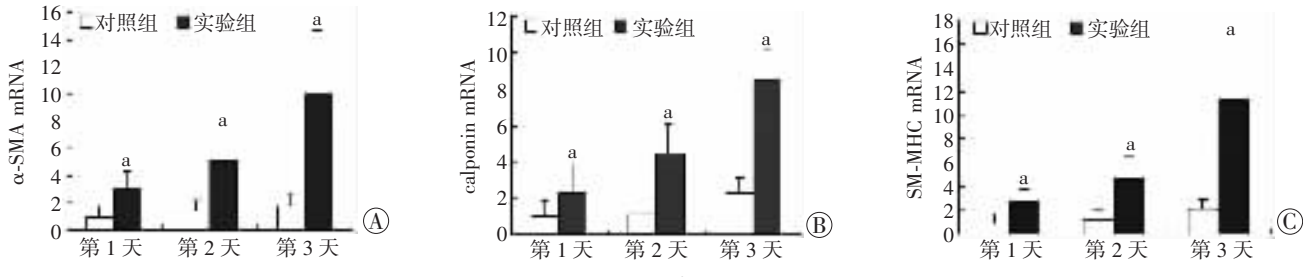
2.4　PCR检测丁酸钠对BMSCs诱导分化的影响

丁酸钠共培养组和对照组中平滑肌标志性基因α-SMA、calponin及SM-MHC的表达量随培养时间的延长逐渐增多，且丁酸钠共培养组中平滑肌标志性基因的增加情况较对照组更加明显。见图3、4。



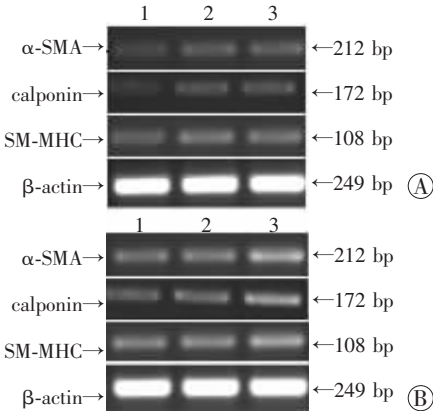
A：未经过接触共培养的BMSCs；B：对照组共培养5 d；C：实验组共培养5 d；D：对照组共培养8 d；E：实验组共培养8 d

图2　免疫荧光化学染色检测实验组与对照组BMSCs的calponin表达（FITC）（荧光显微镜 ×400）



a：$P<0.05$，与对照组比较

图3　real-time PCR检测对照组与实验组BMSCs中α-SMA（A）、calponin（B）、SM-MHC（C）基因的相对表达量



1～3：BMSCs、BSMCs 接触共培养 1、2、3 d

图 4　RT-PCR 检测对照组(A)与实验组(B)BMSCs 中 α-SMA、calponin、SM-MHC 表达量

3　讨论

本研究成功的从大鼠骨髓和膀胱中分离出了 BMSCs 和 BSMCs 原代细胞，并用流式检测和免疫荧光染色对我们提取的两种细胞进行了鉴定。为更好的模拟体内尿道平滑肌微环境，本实验采用多孔膜两侧种植两种细胞进行接触共培养诱导分化。前期已有相关报道，丁酸钠可诱导多种干细胞向成熟细胞分化。本实验重点观察在诱导体系中加入含有丁酸钠的干细胞培养液后，实验组与对照组在不同时间段的分化差异。结果表明在相同的共培养时间下，丁酸钠可明显的提高 BMSCs 平滑肌标志性蛋白 calponin 的表达，并缩短其分化的进程。PCR 检测发现，含有丁酸钠的共培养体系，可以明显的增强 BMSCs 中 α-SMA、calponin、SM-MHC 3 种平滑肌标志性基因表达，有效的提高间充质干细胞向平滑肌细胞分化的效率。

MSCs 是一小群存在于骨髓中的非造血细胞，它具有增殖和多向分化潜能[9]。女性压力性尿失禁与尿道壁内平滑肌和横纹肌的减少有关[10]，故医学上一直对 MSCs 用于其治疗寄予厚望，然而由于目前对 MSCs 的分化机制研究不足，导致其临床疗效不佳。随着人们对表观遗传学的深入了解，发现表观遗传学在干细胞的分化增殖上起着重要的作用，特别是组蛋白乙酰化修饰[11]，这种修饰可成为一种识别标志，在染色质包装和基因转录调控中扮演着重要的角色[12]。一般而言，组蛋白乙酰化与基因的活化有着密切的关系，相反的，去乙酰化以及降低整体乙酰化水平与基因的沉默相关[13]。其机制可能是组蛋白乙酰化程度影响着干细胞微环境中胞内信号与目的基因的结合[14]，通过染色质水平调节 DNA 构型疏密，允许或阻止 MSC 中信号分子与相关基因启动子结合[15]。本科室前期研究发现，BMSCs 和 BSMCs 的接触共培养能诱导 BMSCs 向平滑肌分化[8]，但该研究仅观察了诱导分化后的 BMSCs 表型变化，对其相关分化机制并不了解，在组蛋白乙酰化促进干细胞分化的理论支持下，本实验在共培养体系中加入丁酸钠——一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂，它可以引起细胞核内组蛋白的超乙酰化，通过组蛋白修饰的方式启动细胞的分化。研究表明，较之前的普通接触共培养体系，丁酸钠的存在大大提高了 BMSCs 向平滑肌细胞分化的效率，证明组蛋白乙酰化程度的增加能促进 BMSCs 的分化。但本实验仅从细胞整体水平研究了组蛋白乙酰化对干细胞分化的影响，具体通过何种分子机制尚需进一步研究，深入理解膀胱平滑肌微环境诱导 MSCs 适应性的调控机制，为 MSCs 作为种子细胞应用于组织工程研究奠定基础。

参考文献：

[1] Tan J, Huang H, Huang W, *et al*. The genomic landscapes of histone H3-Lys9 modifications of gene promoter regions and expression profiles in human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Genet Genomics, 2008, 35(10): 585－593.

[2] Tarnowski M, Koryciak-Komarska H, Czekaj P, *et al*. The comparison of multipotential for differentiation of progenitor mesenchymal-like stem cells obtained from livers of young and old rats[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(3): 245－254.

[3] Min J, Shang C Z, Chen Y J, *et al*. Selective enrichment of hepatocytes from mouse embryonic stem cells with a culture system containing cholestatic serum[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28 (12): 1931－1937.

[4] 商昌珍，闵军，张磊，等. 丁酸钠体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为肝细胞[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(12)：2424－2428.

[5] Rambhatla L, Chiu C P, Kundu P, *et al*. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells[J]. Cell Transplant, 2003, 12 (1): 1－11.

[6] Zhou Q J, Xiang L X, Shao J Z, *et al*. *In vitro* differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(1): 29－42.

[7] Sun S, Guo Z, Xiao X, *et al*. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method[J]. Stem Cells, 2003, 21 (5): 527－535.

[8] 刘晓芳，王延州，徐惠成，等. 细胞间接触诱导骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：516－519.

[9] McCarty R C, Gronthos S, Zannettino A C, *et al*. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2): 324－333.

[10] Fatton B. Urinary incontinence and menopause: epidemiological data [J]. Pelvi Perineologie, 2007, 2(2): 149－155.

[11] 李秀森，郭子宽，杨靖清，等. 骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. 解放军医学杂志，2000，25(5)：346－348.

[12] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code[J]. Science, 2001, 293(5532): 1074－1080.

[13] Peterson C L. Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. Third in review series on chromatin dynamics[J]. EMBO Rep, 2002, 3(4): 319－322.

[14] Lachner M, O'Sullivan R J, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 11): 2117－2124.

[15] McDonald O G, Owens G K. Programming smooth muscle plasticity with chromatin dynamics[J]. Circ Res, 2007, 100(10): 1428－1441.

（收稿 2010-11-02 修回 2011-02-12）

（编辑　栾　嘉）