基础研究 文章编号:0253-3626(2011)05-0564-05

Oct-4表达下调促大鼠骨髓多能成体祖细胞向心肌分化

谢靖芸[1],吕铁伟[1],朱 静[2],陈国珍[1],孙慧超[1],刘振国[3],田 杰[1]
(1.重庆医科大学附属儿童医院心脏内科;2.儿童发育疾病研究省部共建教育部重点研究室,重庆 400014;
3.美国俄亥俄州立大学医学中心心肺研究所,哥伦布 43210)

【摘 要】目的:明确骨髓多能成体祖细胞(Bone marrow multipotent adult progenitor cells,MAPCs)体外向心肌特异性分化及其与八聚体结合转录因子4(Octamer-binding transcription factor-4,Oct-4)表达的相关性。方法:将大鼠骨髓中分离出的MAPCs,在无血清培养基中连续培养35 d,采用5-氮杂胞苷(5-azacytidine,5-aza,1 μmol/L)诱导24 h促使其向心肌细胞分化。结果:MAPCs在5-aza诱导的24 h后早期心脏特异性基因NKx2.5与GATA-4的mRNA水平显著增加,Western blot和免疫荧光染色显示心肌特异性蛋白Connexin-43与肌钙蛋白Ⅰ在5-aza诱导后的7 d开始表达,流式细胞分析表明在35 d后超过37%的细胞为肌钙蛋白Ⅰ阳性;同时实时定量聚合酶链反应、Western blot、免疫荧光染色和流式细胞技术检测到未分化的MAPCs高表达特异性干细胞标志物Oct-4,但在心肌分化过程中其表达明显下降。结论:MAPCs在5-aza诱导后能够有效地分化为心肌样细胞,并与Oct-4的表达下调相关。

【关键词】MAPCs;Oct-4;大鼠;5-aza;心肌细胞;细胞分化
【中国图书分类法分类号】R322.1+1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-19

Downregulation of Oct-4 expression accelerates cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow multipotent adult progenitor cells in vitro

XIE Jing-yun[1],LV Tie-wei[1],ZHU Jing[2],CHEN Guo-zhen[1],SUN Hui-chao[1],LIU Zhen-guo[3],TIAN Jie[1]
(1. Department of Cardiology,the Children's Hospital,Chongqing Medical University;2. Children's Nutrition Research Center,Key Laboratory of Developmental Disease in Childhool of Education Ministry; 3. Institute of Cardiopulmonary,Ohio State University Medical Center)

【Abstract】*Objective*:To investigate whether bone marrow multipotent adult progenitor cells (MAPCs) undergo cardiac specification and its dependablity with octamer-binding transcription factor-4 (Oct-4) expression during their cardiomyocyte differentiation in vitro. *Methods*:MAPCs were isolated from rat bone marrow,treated with 5-azacytidine (5-aza,1 μmol/L) for 24 h,and cultured in a serum-free medium for cardiac differentiation for up to 35 days.*Results*:The cells started to express early cardiac-specific genes Nkx2.5 and GATA-4 with a significant increase in their mRNA level after 24h with 5-aza treatment.Western blot analysis and immunofluorescence staining revealed that the cardiac-specific proteins connexin-43 and troponin Ⅰ were expressed in the cells 7 days after 5-aza treatment. Flow cytometry analysis demonstrated that over 37% of the cells were positive for troponin Ⅰ by 35 days of differentiation,though the cells did not display spontaneous contraction.Meanwhile,the undifferentiated MAPCs expressed a significant level of the stem-cell-specific marker Oct-4 that was dramatically decreased in the cells shortly after the initiation of cardiomyocyte differentiation as evaluated using real-time (RT)-polymerase chain reaction,Western blot,immunofiuorescence staining,and flow cytometry. *Conclusion*:Downregulation of Oct-4 expression effectively accelerate cardiomyocyte differentiation of rat MAPCs after 5-aza induction in in vitro culture.

【Key words】MAPCs;Oct-4;rat;5-aza;cardiomyocyte;cell differentiation

细胞移植是当前适用于心肌损伤修复与重建的一种有效的治疗途径。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,MSCs)是心脏修复与再生细胞治疗的优良种子细胞之一,它具有容易获取、不涉及伦理问题、并且对任何不良免疫反应都极少出现免疫原性等优点[1,2]。

作者介绍:谢靖芸(1985-),女,硕士,
研究方向:小儿心血管疾病。
通信作者:吕铁伟,男,主治医师,Email:mltw00145@yahoo.com.cn。

骨髓多能成体祖细胞(Bone marrow multipotent adult progenitor cells,MAPCs)是从成人以及成年大鼠和小鼠骨髓中分离出的MSCs的一种(CD45-TER119-)[3]。八聚体结合转录因子4(Octamer-binding transcription factor-4,Oct-4)是目前公认的原始干细胞标记物,可通过顺式元件活化基因转录。在胚胎干细胞(Embryonic stem cells,ESCs)中,Oct-4调控着2 260余种基因表达,功能涉及染色质构象、DNA修复、细胞增殖和凋亡等,是ESCs维持自我更新的主要调控因子之一,而

且也是首要的作为鉴定全能 ESCs 的标志物。MAPCs 在体内与体外均表达高水平的 Oct-4，在增殖过程中未出现端粒缩短或染色体组型异常，具有较高的扩增能力；且具备多向分化的潜能，研究发现在体内外实验中 MAPCs 能在单细胞水平分化为包括所有 3 个胚层的细胞谱系，如内皮细胞，成骨细胞，平滑肌样细胞，骨骼肌成肌细胞，肝细胞，和神经元等[3-7]。当注射到早期小鼠囊胚中时，单一未分化的 MAPCs 能够生成大部分系统的细胞群体[6]。在动物研究中，急性心肌梗死后将 MAPCs 移植到梗死区域附近可改善左室收缩功能[7]，但没有证据表明这些细胞分化成为心肌细胞。体内与体外的研究显示，MSCs 在 5-氮杂胞苷（5-azacytidine，5-aza）诱导或与成熟心肌细胞共培养条件下可向心肌细胞特异性分化[2]。因此本研究拟检测MAPCs 在 5-aza 诱导下是否可分化为心肌细胞及其与 Oct-4 表达的相关性，为下一步 MAPCs 成为心肌修复与再生的实验性心肌细胞治疗的重要细胞来源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 MAPCs 的分离与培养

取 SD 大鼠后肢分离出股骨与胫骨，以达尔伯克改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified eagle's medium，DMEM，Gibco 公司）冲洗髓腔与干骺端，离心后贴壁培养细胞，用免疫微磁珠（Miltenyi Biotec 公司）分离纯化出 MAPCs[3,5]。将细胞接种在 100 ng/ml 纤维连接蛋白（FN；Sigma）预处理的培养皿中，加入自制的 MAPCs 培养基[5]，置于 37℃，5% O_2，5% CO_2，与90% N_2 的孵箱中进行培养（后同），为避免细胞间的相互接触影响扩增需严格保持其接种密度为 100~200 个细胞/cm^2[3,5]。

1.2 MAPCs 的心肌细胞化

将 MAPCs 转入含有 1 μmol/L 5-aza（Sigma）的分化培养基（不含胎牛血清，血小板衍生生长因子，表皮生长素，白血病抑制因子）中诱导 24 h 后，转入不含 5-aza 的分化培养基培养直至第 35 天，其间每隔 24~48 h 更换 1 次分化培养基。分化过程中密切观察细胞形态，在第 1、3、7、14、21、28、35 天检测心肌细胞特异性标志物的表达。

1.3 免疫荧光染色

将分化与未分化的 MAPCs 均接种于纤维连接蛋白预处理的盒式载玻片上。分别于第 1、3、7、14、21、28、35 天收集细胞，按免疫荧光染色试剂说明染色：4%多聚甲醛（Sigma）固定 30 min，分别加入稀释倍数为 1:200 的 Connexin-43、肌钙蛋白 I 与 Oct-4 抗体（Santa Cruz）4℃孵育过夜；PBS 漂洗后加入稀释倍数为 1:200 的种属特异性荧光素异硫氰酸标记免疫球蛋白 G（Sigma）常温孵育 1 h；最后加入 1:1 000 的荧光染料 DAPI 标记细胞核[3,8]，封片后使用荧光显微镜检测抗原表达情况。

1.4 实时定量聚合酶链反应分析

使用 RNeasy 的 RNA 提取试剂盒（Qiagen 公司）提取来自未分化的 MAPCs 与 5-aza 处理后在分化第 1、3、7、14、21、28、35 天的 MAPCs 的总 RNA，并使用分光光度法在 260 nm 处定量。用荧光定量逆转录试剂盒进行逆转录后[8]，扩增合成目的基因 Nkx2.5、GATA4、Oct-4（引物见表 1），采用 GAPDH 作为管家基因。

1.5 Western blot 检测

检测心肌特异性标记 Connexin-43 与肌钙蛋白 I 以及干细胞标志物 Oct-4 的表达水平。用细胞裂解液处理未分化的 MAPCs 与 5-aza 诱导后在第 1、3、7、14、21、28、35 天收集的 MAPCs。在 4℃下离心 14 000 g，15 min 后收集上清液，之后用 BCA 蛋白定量试剂盒（Pierce 公司）检测蛋白浓度。将 20 μg 的蛋白加入到 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中，按照 Western blot 实验步骤说明书（Santa Cruz 公司）进行[8]。Connexin-43，肌钙蛋白 I，Oct-4 与 β-actin 抗体稀释倍数分别为 1:500，1:500，1:1 000 与 1:1 000，辣根过氧化物酶交联的二抗（稀释倍数 1:10 000）与电化学发光系统测定蛋白浓度。本实验至少需重复 3 次。

1.6 流式细胞分析

在 MAPCs 分化后采用流式细胞仪以肌钙蛋白 I 阳性细胞所占百分比来检测 MAPCs 心肌分化的效率。Oct-4 阳性细胞在分化前后也要使用流式细胞仪进行评估。将获取的未分化的 MAPCs 与分化 5 周后的细胞洗脱并悬浮在预冷的磷酸盐缓冲液中，保持细胞密度为（1~5）× 10^6 个细胞数/ml。在 4℃下用 Oct-4 与肌钙蛋白 I 的一抗孵育细胞 30 min，再使用 FITC 标记的二抗孵育 20 min。用 4%的多聚甲醛固定，然后置于 Becton Dickinson FACS Calibur 进行流式细胞分析。

1.7 统计分析

所有实验数据均使用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS12.0，进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MAPCs 的形态学改变

未分化的 MAPCs 呈现出多种形态，如棒状、梭状。在诱导的第 14 天，细胞呈现出肌管样形态，类似心肌细胞样形态，但直至分化的第 35 天也未能在培养体系中观察到细胞的自发性收缩。

2.2 心肌细胞特异性标志物的转录表达

检测细胞分化过程中 mRNA 的表达，可反映心肌特异性基因 NKx2.5 与 GATA-4 的转录表达水平。在分化的第 1 天，

表 1 用于实时定量聚合酶链反应的引物序列

基因	上游引物	下游引物
NKx2.5	GATGCCACAGGGCAATTC	TCTCCTAAAGGTGGGAGTCG
GATA-4	TCTGAATAAATCTAAGACACCAGCA	GTTGCTGGAGGCACCACT
Oct-4	CTGTAACCGGCGCCAGAA	TGCATGGGAGAGCCCAGA
GAPDH	CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

能[11]。此外，在不同的研究中使用的 5-aza 诱导浓度也各不相同。据报道在体外 5-aza 诱导 MSCs 向心肌分化的最佳浓度为 10 μmol/L[12]。本实验采用不同浓度的 5-aza(0.5~10 μmol/L)培养 MAPCs，在 5-aza 浓度达到或超过 5 μmol/L 时观察到细胞出现大量死亡。因此，本实验采用 1 μmol/L 的 5-aza 处理细胞使其向心肌分化。在以上的实验条件下，超过 37% 的 MAPCs 在分化 35 d 后表现为肌钙蛋白 I 阳性，提示 MAPCs可能是实验性心肌细胞治疗的一种良好细胞来源。进一步的研究需阐明在体外 MAPCs 能否达到更高的分化效率，在体内 MAPCs 能否向心肌分化并参与心脏修复与再生，以及体内研究的最佳条件。下一步的实验还需阐明采用人类 MAPCs在体内与体外能否取得相同的或更高的心肌分化效率。

干细胞分化是一种复杂且严格受控的过程，涉及多种转录因子与蛋白[4]。Oct-4 是一种在植入前胚胎的多能干细胞中与多数生殖细胞中高表达的转录因子，该表达对于维持干细胞的自我更新和多能性是必要的，ESCs 的分化导致 Oct-4 表达下调。小鼠 ESCs 中 Oct-4 的表达被广泛认为是细胞全能性的标志，且对胚胎分化调控起关键性作用[13]。成年鼠神经干细胞适当表达 Oct-4 本身就足以分化出多能干细胞[14]。未分化的 MAPCs 大量表达 Oct-4，并在其向内皮分化的早期阶段显著下降[15]，本实验在心肌分化过程中也取得了类似的结果。Oct-4表达快速下调也许是 MAPCs 向心肌或内皮分化的关键步骤，本实验证实了 MAPCs 向心肌分化伴随着 Oct-4 表达的下调。Oct-4 在 MAPCs 向心肌分化的体外过程中所起的作用以及其在体内过程的变化有待于进一步研究证实。

心肌细胞的一个特征是其伴有独特的离子流与膜电位的自发收缩。有研究发现 MSCs 在体外向心肌分化后出现了细胞群的自发跳动，伴有或快或慢流动的 L 型 Ca^{2+} 电流与整流 K^+ 电流[16]。然而在本研究中 MAPCs 向心肌分化后没有观察到自发收缩，这种差异的原因目前仍不清楚。一种较大的可能是在这些试验中使用的细胞制备上有所差别。近期一项研究也表明小鼠骨髓 MSC 细胞群向心肌分化后并没有出现任何自发收缩，也没有产生动作电位或典型的心肌细胞离子流[17]。尽管心室电活动传播所需的心肌间隙连接蛋白 Connexin-43 与心脏收缩所需的肌钙蛋白 I 存在于已分化的细胞中，但这些细胞功能状态的评估仍有待进一步研究。因为本次实验中分化后的细胞没有出现自发收缩，所以并未检测其离子流、膜电位或动作电位。下一步研究还需阐明在体内分化后的细胞能否出现自发收缩及特有的离子流。

综上所述，本研究阐明了大鼠 MAPCs 在体外经 5-aza 诱导后可高效的分化为心肌样细胞，且 MAPCs 向心肌分化与 Oct-4 的表达下调相关。研究数据提示 MAPCs 可能成为心肌修复与再生的实验性心肌细胞治疗的重要细胞来源，但要实现其临床应用还有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Garc í a-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool [J]. Cell Mol Med, 2008, 12(6B): 2552-2565.

[2] Psaltis P, Zannettino A, Worthley S, et al. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair[J]. Stem Cells, 2008, 26(9): 2201-2210.

[3] Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain [J]. Exp Hematol, 2002, 30(8): 896-904.

[4] Qi H, Aguiar D, Williams S, et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(6): 3305-3310.

[5] Breyer A, Estharabadi N, Oki M, et al. Multipotent adult progenitor cell isolation and culture procedures[J]. Exp Hematol, 2006, 34(11): 1596-1601.

[6] Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt R, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[7] Pelacho B, Luttun A, Aranguren X, et al. Therapeutic potential of adult progenitor cells in cardiovascular disease[J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7(8): 1153-1165.

[8] Feng C, Zhu J, Zhao L, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardio- myocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(17): 3044-3051.

[9] Xu C, Police S, Rao N, et al. Character- ization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cell[J]. Circ Res, 2002, 91(12): 501-508.

[10] Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive pro- genitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment[J]. Blood, 2007, 109(3): 1298-1306.

[11] Zhang S, Ge J, Sun A, et al. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source[J]. Cell Biochem, 2006, 99(4): 1132-1147.

[12] Tomita S, Li R, Weisel R, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function [J]. Circulation, 1999, 100(19): 247-256.

[13] Niwa H, Miyazaki J, Smith A. Quantitative ex-pression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells [J]. Nat Genet, 2000, 24(4): 372-376.

[14] Kim J, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. Cell, 2009, 136(3): 411-419.

[15] Xu J, Liu X, Jiang Y, et al. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell [J]. Cell Mol Med, 2008, 12(6A): 2395-2406.

[16] Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, et al. 5-Azacytidine induces chan-ges in electrophysiological properties of human mesenchy-mal stem cells[J]. Cell Res, 2006, 16(12): 949-960.

[17] Rose R, Jiang H, Wang X, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro[J]. Stem Cells, 2008, 26(11): 2884-2892.

（责任编辑：关蕴良）