基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0389-04

曲古抑菌素干预骨髓间充质干细胞向心肌细胞特化体外实验

杨 舸[1],朱 静[1],田 杰[2],陈 沅[2],冯 川[1],赵莉莉[1],张晓萍[1]
(1.重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所;2.心血管内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:在体外以新生大鼠心肌细胞(Cardiomyocytes,CM)与骨髓间充质干细胞((Mesenchymal stem cells,MSCs)共同培养的方式模拟体外心肌微环境,研究间质干细胞在 HDAC 酶抑制剂曲古抑菌素(Trichostatin A,TSA)干预后乙酰化酶活性与 MSCs 向心肌细胞特化之间的联系。方法:分离大鼠 MSCs 将已标记的 MSCs 与心肌细胞、分别加入不同浓度 TSA 干预后的 MSCs 与心肌细胞混合培养。贴壁法分离大鼠 MSCs 在体外培养纯化后进行细胞标记,培养至第 4 代。根据实验需要分为 3 组:阳性对照组,实验组,阴性对照组。用 4.6-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI)和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(Brdu)对核进行双标。分别在共培养 1 周后用免疫荧光染色检测 MSCs 细胞中的心肌结构功能蛋白:肌球蛋白重链(Myosin heavy chain,MHC)、心肌组织缝隙连接的特异性组成蛋白质 Connexin43(Cx43)的表达情况。结果:① MSCs 与搏动的心肌细胞共培养 1 周,MSCs 开始出现心肌样分化说明建立了心肌微环境;②阳性对照组中,MSCs 经 TSA 干预 48 h 后与心肌细胞混合培养,出现心肌样分化并表达心肌结构功能蛋白表达。③阴性对照组中的部分 MSCs 可少量表达心肌结构功能蛋白。在共培养的 7 d,经 TSA 诱导后经 Brdu—DAPI 双标 MSCs 的核,MHC 和 Cx43 荧光显示分化率与阳性对照组的分化率有显著差别。结论:MSCs 与经 HDAC 酶抑制剂干预后的 MSCs 在心肌微环境中,HDAC 酶抑制剂对 MSCs 向心肌样细胞的特化有促进作用,提示乙酰化酶活性与细胞特化之间的存在联系。

【关键词】骨髓间充质干细胞;心肌细胞;诱导分化;去乙酰化酶抑制剂
【中国图书分类法分类号】R394.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-22

The specialization of mesenchymal stem cells to cardiac muscle cells with trichostatin A intervention in the simulated microenvironment

YANG Ge, et al
(*Institute of Pediatrics, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:This study was to investigate the interrelations between the acetylase activity and specialization rate of the differentiation of MSCs to the cardiac cells when histon deacetylase enzyme inhibitor trichostatin A (TSA) interferes in the cardiac cells. Method: MSCs of ratswere separated, The already labeled MSCs and cardiac muscle cells were put respectively into the MSCs interfered by different concentrations of TSA cultivated in mix tune with cardiac muscles. Adding TSA into the conventional culture of MSCs for the negative group.One week later, with the help of immunofluorescence, detecting the expression of the function proteinum, ie. myosin heavy chain (MHC) and Connexin43 (Cx43), of the cardiac muscle constitution in MSCs was detected. *Results*: ① There appeared sample differentiation of the cardiac muscle cells after the coculture of the MSCs and the pulsating cardiac muscle cells for one week, and the expression of the function proteinum of the cardiac muscle constitution; ② In the positive group, in the mix culture of the cardiac muscle cells and the MSCs in which the TSA interfered for 48 h, there appeard sample differentiation of the cardiac muscle cells; ③ In the negative group, part of the MSCs could express the function proteinum of the cardiac muscle constitution. During the 7 days of coculture, with the induction of TSA, MSCs was double-labeled by Brdu-DAPI. The differentiation rate of the fluorescent manifestation of the MHC and Cx43 in the MSCs was notably different expression that in the positive group, *Conclusion*: MSCs in which HDAC, the enzyme inhibitor, interferes are in the microenvironment of the cardiac muscle cells. HDAC, the enzyme inhibitor, functions as a promotion factor in the specialization of MSCs, suggesting the interrelation between the acetylase activity and the cell specialization rates.

【Key words】Bone marrow mesenchymal stem cell; Cardiomyocytes; Induction and differentiation; De-acetylase inhibitor

骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs)在适宜的心脏微环境中可以自发的向心肌样细胞分化,是目前认为较有希望成为梗死心肌细胞替代治疗的细胞。但微环境的组成及其对干细胞的诱导机制尚不明确。Fukuhara 等[1]认为宿主细胞与干细胞间的直接接触是诱导的关键因素,并在体外

作者介绍:杨 舸(1978-),男,主管检验师,硕士,
研究方向:间质干细胞在定向分化中的组蛋白乙酰化调控。
通讯作者:朱 静,女,副研究员,E-mail:zhujing310@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670871)。

通过心肌细胞与 MSCs 共培养的方式模拟心肌微环境,成功地将 MSCs 诱导分化为心肌细胞。本实验在此基础上利用心肌细胞与 MSCs 共培养的方式提供它们间的直接接触, 采用去乙酰化酶抑制剂(Trichostatin A) 进行干预后 MSCs 在体外模拟的心肌微环境中培养,观察 TSA 对 MSCs 的促分化作用。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

倒置相差显微镜(OlympusIX70,日本);荧光显微镜(Olympus BX51,日本);Dul-becco'S modified Eagle medium/Fl2(1:1)培养基[DMEM/F12(1:1),Hyclone];胎牛血清(FBS,Hyclone);胰蛋白酶(Promega);溴脱氧核苷尿嘧啶(Bromodeoxyuridine,BrdU,Sigma);4,6-Dia-midino-2-phenylindole(DAPI,Roche);羊抗大鼠 myosin heavy chain(MHC),兔抗大鼠 Cx43 均购自 Santa Cruz;小鼠抗大鼠 BrdU、FITC- 兔抗羊、FITC- 羊抗兔、TRITC 一羊抗小鼠购自中山公司。

1.2 动物

8 周龄 Wistar 大鼠,质量(40 ± 10) g;0 ~ 3 d 新生 Wistar 大鼠,均购自重庆医科大学实验动物中心。

1.3 MSCs 的分离与纯化

方法参照文献[2]:分离成年大鼠股骨与胫骨,DMEM/F-12 冲出骨髓,离心,DMEM/Fl2(1:1)培养液(含 10% FBS 及 100 I-U/ml 青霉素、100 g/ml 链霉素)重悬沉淀,置于 37℃ ,5%CO_2 饱和湿度培养箱培养。24 h 后换液,以后每 3 d 换液,至 80% ~ 90%融合时传代。红细胞和没有自我复制能力的贴壁细胞(如巨噬细胞、成纤维细胞等)随着传代被弃去,经过 3 ~ 4 次传代达到纯化,扩增、纯化后的 MSCs 可用于下一步实验。

1.4 新生大鼠心肌细胞分离与培养

出生后 1 ~ 3 d 的 Wistar 大鼠分离心脏,迅速置入预冷的无钙镁 D-Hanks 液的培养皿中。用预冷 D-Hanks 液清洗心脏,将心脏剪成 1 mm^3 大小的组织块,再次清洗,洗去心腔内残留的血细胞。分离心肌细胞,Ⅱ型胶原酶 37℃水浴消化 3 次,每次 8 ~ 10min。收集消化后静置的上清,200 目钢网过滤消化上清液,过滤液转入离心管,离心 1 000 r/min × 5min,用 D-Hanks 液洗涤细胞,然后用含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基 10 ml 重悬,37℃,5%CO_2 培养,贴壁 2 h 后、转培养液入培养板。

1.5 心肌细胞与 MSCs 混合培养

加 BrdU 入传代后的 MSCs,浓度为 10 μ mol/L,作用 48 h;其后,PBS 冲洗 6 次, 按每孔 2×10^5 个细胞数接种入置有盖玻片的 6 孔培养板,按 1:1 的细胞数比例加入刚分离的新生大鼠悬液,每 48 h 换液至 1 周。

1.6 HDAC 酶抑制剂(TSA)干预培养

TSA(Sigma 公司产品)分别溶于磷酸缓冲液(PBS)和二甲基亚砜(DMSO)中,置于 -20℃ 冰箱。加入 TSA 入传代后的 MSCs,浓度为 100 nmol/L、300 nmol/L、500 nmol/L 诱导 48 h;其后换掉含 TSA 的培养液,换成 DMEM/Fl2(1:1)培养液培养,按每孔 2×10^6 个细胞数接种入置有盖玻片的 6 孔培养板,按 1:1 的细胞数比例加入刚分离的新生大鼠悬液,每 48 h 换液至 1 周。

1.7 免疫荧光检测

采用间接荧光法标记,PBS 代替一抗设为阴性对照。对照组 PBS 冲洗盖玻片后丙酮固定、0.1%Triton X.100 处理后,正常山羊血清或兔血清封闭 10 min;分别加入 MHC,Cx43 抗体,稀释度均为 1:150,4℃过夜;PBS 充分清洗后,加入 FITC-羊抗兔或兔抗羊(1:150),室温 1 h;PBS 清洗,1 ml DAPI 复染,室温 5 min,充分清洗后 50%甘油封片。混合培养组,采用双标免疫荧光,以 BrdU 抗体(1:100)及前述 4 种抗体中的一种作为一抗,程序与前大致相同,所作改变简述如下:固定后 2 mol/L 盐酸变性,室温 15 min;0.1%Triton X.100 及封闭血清处理同前;分别加入上述 2 种抗体中的一种,作用后加入相应的二抗;PBS 洗涤,加入抗 BrdU 抗体,4℃过夜,PBS 充分洗涤;加入 TRITC- 羊抗小鼠(1:150),室温 1 h;PBS 清洗,封片。

1.8 荧光显微镜观察并计算分化率

计算心肌细胞转化率:免疫荧光染色后每孔随机选取 8 ~ 10 个不同的视野,分别计数每个视野内的阳性细胞数(已转化的 MSCs,胞核红色荧光,胞质绿色荧光)以及细胞总数(已转化和未转化的 MSCs,胞核红色荧光,胞质未着色)。计算各个视野阳性细胞数 / 细胞总数比,取其均值,即为 MSCs 分化为心肌样细胞的转化率。

1.9 统计学分析

统计学处理用 SPSS 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 的分离与培养及生长情况

MSCs 接种 24 h 后开始贴壁生长,可见稀少的呈长梭形的贴壁细胞 3 ~ 4 d 后开始集落样增殖, 梭形贴壁细胞开始增多,集落周围的贴壁细胞逐渐开始融合;进入对数生长期 7 ~ 8 d 达到 90% ~ 95%融合(图 1)。传代后细胞呈束状、漩涡状排列,每 3 ~ 4 d达 90%融合,随着换液与传代,MSCs 逐渐得到纯化;至第 4 代时,细胞形态一致,典型成纤维细胞样,几乎无折光性。

2.2 新生鼠心肌细胞分离与培养

差速贴壁 1 h 后成纤维细胞贴壁, 转移未贴壁细胞,36 h 见部分细胞突起更为明显,开始收缩;分离的心肌细胞贴壁生长第 3 d 细胞相互接触交织,逐渐形成细胞簇或细胞单层,镜下计数 6 孔板的 6 个孔各 8 ~ 10 个不同视野下搏动的细胞团(含单个自发搏动的细胞),搏动细胞的百分比为 63%,搏动呈同步性,搏动频率在 40 ~ 60 次 /min。1 周后大量细胞成团收缩,同时成纤维细胞开始生长,呈扁平纤维状。免疫荧光检测心肌早期结构功能蛋白,心肌细胞大量表达 Cx43 和 MHC,密集分布于细胞之间交界处。

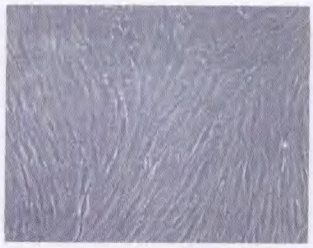


图 1 进入对数生长期 7~8 d 达到 90%~95%

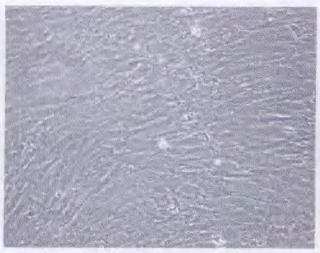


图 2 TSA 干预 48 h 后 MSCs 细胞



图 3 混合培养 7 d 后，镜下 MSCs 可见心肌细胞特征性功能结构蛋白 Cx43 散在分布于 MSCs 胞质(×200)



图 4 未经 Brdu 标记的心肌细胞在荧光显微镜下胞核不显色仅胞质显绿色荧光(×200)



图 5 阳性对照组 MSCs Cx43 的荧光颗粒小而稀疏，弥散分布于胞浆及核周，部分位于胞膜(×200)

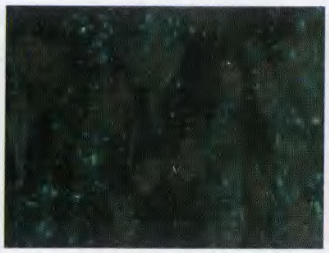


图 6 TSA 干预组 Cx43 表达量明显增多，颗粒略粗，相邻细胞膜可见大量分布(×200)

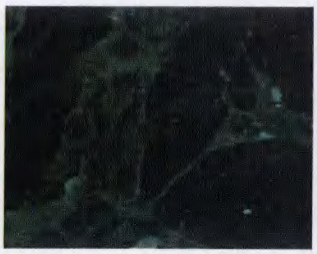


图 7 混合培养中 MSCs 的 MHC 荧光表达(×200)



图 8 MHC 荧光染色，在经 TSA 干预后与阳性对照组相比胞质荧光表达强度增加且布满整个胞核(×200)

2.3 TSA 干预后共培养及 MSCs 与心肌细胞混合培养观察

相差显微镜下，经 TSA 干预后的 MSCs 与对照组相比，形态上细胞体积略微增宽，细胞生长密度增加，增殖速度高于对照组(图 2)。在混合培养组中，心肌细胞及 MSCs 均能正常贴壁生长，呈成纤维细胞样，心肌细胞具有较强折光性，自发搏动，同单独培养时一致，并于 24 ~ 48 h 开始同折光性很弱的 MSCs 相互连接，带动 MSCs 搏动。1 周后，成纤维细胞开始增殖，细胞密度明显增加，影响心肌细胞和 MSCs 的生长及检测，处理到此终止。

2.4 分化细胞鉴定

在共培养第 7 d 后 MSCs 出现向心肌样细胞分化，MSCs 细胞中的心肌结构功能蛋白 Cx43 和 MHC 荧光染色阳性，在不同光源激发下细胞核发红色荧光而细胞质发绿色荧光(阳性细胞)。高倍镜下可见心肌细胞特征性功能结构蛋白 Cx43 散在分布于 MSCs 胞质且与心肌细胞直接接触相连接（图 3)。未经 Brdu 标记的心肌细胞在荧光显微镜下胞核不显色仅胞质显 Cx43 绿色荧光(图 4)，未分化的 MSCs 仅胞核发红色荧光。细胞在 TSA 干预组三种不同浓度(100 nmol/L、300 nmol/L、500 nmol/L) 其功能蛋白Cx43 和 MHC 表达量没有明显差异，但与对照组相比其荧光表达量有增加($P<0.05$)。在培养第 4 d 和 7 d其表达量分别为：100 nmol/L(1.76 ± 0.13)%、(1.86 ± 0.161)%;300 nmol/L(1.79 ± 0.11)%、(1.83 ± 0.23)%；500 nmol/L(1.78 ± 0.19)%、(1.88 ± 0.31)%；对照组(1.26 ± 0.14)%、(1.32 ± 0.15)%。TSA 干预组与阳性对照组荧光表达强度及分布有明显不同，阳性对照组 MSCs Cx43 的荧光颗粒小而稀疏，弥散分布于胞浆及核周，部分位于胞膜(见图 5)；与之相比，TSA 干预组 Cx43 表达量明显增多，颗粒略粗，相邻细胞膜可见大量分布(见图 6)。MHC 荧光染色，在经 TSA 干预后与阳性对照组相比心肌纹理明显增厚且布满整个胞质(见图 7、8)。

3 讨 论

间充质干细胞具有多向分化的潜能，将 MSCs 直接注入活体心脏或在体外将 MSCs 与心肌细胞共同培养均可以使 MSCs 向心肌细胞转化，说明心肌细胞本身或(和)心肌细胞的生理环境具有诱导 MSCs 分化为心肌样细胞的作用。目前诱导 MSCs 向心肌样细胞分化的方法有两种，一是用化学药物如 5 - 氮胞苷或两性霉素进行诱导[3,4]，二是在体外模拟心肌样微环境使其定向分化[5]。Fukuhara 等[1]通过体外细胞培养证实了 MSCs 与心肌细胞直接的电一机械刺激是诱导其向心肌样细胞的定向分化的必要条件[6]。但是这两种方式的分化率均较低，如何将干细胞高效率地诱导成心肌细胞、如何安全有效地植入梗死心肌是目前需待解决的问题。

本研究采用心肌细胞及 MSCs 细胞共同培养体系，同时分别用去乙酰化酶抑制剂 TSA 对 MSCs 干预后进行共培养，试图在体外模拟心肌微环境 MSCs 向心肌细胞转化过程中，提示通过 TSA 的干预能够

提高 MSCs 向心肌细胞的分化率。结果表明 MSCs 与心肌细胞混合培养,使 MSCs 与正常的心肌细胞存在着直接接触,通过这两种细胞之间存在的电-机械藕联等诱导因素作用下,MSCs 不仅有定向分化,而且出现部分与心肌细胞相接触的 MSCs。通过荧光标志显示 MSCs 表达心肌细胞结构功能蛋白 MHC 和 CX43,Cx43 的表达提示缝隙连接的存在,后者为小分子物质和电信号的传递通道,能将源于心肌细胞的促分化信息持续作用于 MSCs,使 MSCs 中的心肌细胞特异性基因开放或开放增加;同时,心肌细胞的收缩带动 MSCs,使后者受到持续的机械刺激,从而导致 MSCs 分化程度提高,结构上的发育更趋完善。MHC 为心肌特异性蛋白,有 α-MHC 和 β-MHC 两种亚型,前者见于胚胎型心肌细胞,而后者在成熟心肌细胞中表达。MHC 蛋白含量在一定程度上反映 MSCs 向心肌细胞的分化情况。

在 MSCs 特化心肌样细胞的过程中,存在一个由遗传和表观遗传修饰有机结合的互连调控网络,其中乙酰化平衡导致的染色质重塑在其中扮演着十分重要的角色。乙酰化通过干预,维持一种有效的通道,保持其转录活性。并在 MSCs 的诱导分化过程中,通过 HDAC 可被 TSA 所抑制,这种抑制作用可维持新加入的组蛋白的乙酰化状态,从而保持转录通道的开启,亦有可能提高 MSCs 的分化率[7]。本实验用去乙酰化酶抑制剂 TSA 对 MSCs 干预后的实验组与阳性对照组相比较其分化率有明显提高,且其心肌结构功能蛋白的荧光表达强度及分布亦有明显的不同。但三种浓度之间没有出现显著性差异。这可能的原因有以下几点:① 本实验培养的 MSCs 尚未建系,纯度可能不够高,因此有分化潜能的 MSCs 细胞只是其中一部分;② 在心肌细胞培养过程中,由于非心肌细胞(比如成纤维细胞)的增殖速度较快,占据心肌细胞生存空间,限制心肌细胞的活动,甚至分泌生物活性物质影响心肌细胞的形态和生理功能[5-7],从而影响 MSCs 向心肌细胞的分化率;③ 在 TSA 对 MSCs 进行干预后的共培养中,由于经 TSA 处理后造成细胞组蛋白 H3 和 H4 在核外乙酰化水平的增强,诱导一些基因的转录活性[8],从而促进细胞的分化。因而反映在 MSCs 的荧光表达强度上有明显提高。但是由于培养体系和培养时间等因素,一定程度上也限制了 MSCs 向心肌细胞的分化,如果延长培养天数,可能会检测到更多荧光标记的 MSCs 表达心肌特异结构功能蛋白,其心肌细胞分化率的检出相应也会提高。

本实验显示阴性对照组中,经 TSA 干预后的 MSCs 有部分表达 Cx43,但没有发现有 MHC 的表达。这说明具有多向潜能分化的 MSCs 细胞中可能具有心肌样细胞分化倾向的细胞,其分化方向取决于所处微环境的性质。据报道将 MSCs 植入心肌细胞瘢痕区,细胞大量死亡,存活的细胞则主要分化为成纤维样细胞,而在非梗塞区域,MSCs 与正常宿主心肌细胞相接触,向正常心肌细胞的表型分化[9]。实验通过 TSA 给予 MSCs 一个刺激,对 MSCs 的多向潜能分化有一个诱导作用,从而激活部分 MSCs 表达心肌结构功能蛋白 Cx43,从另一方面也证实 TSA 对 MSCs 的分化有一个诱导作用。

本研究拟通过用去乙酰化酶抑制剂 TSA 的干预来提高 MSCs 向心肌细胞的分化,实验表明通过 TSA 的干预后,MSCs 向心肌细胞的潜分化能力有提高的趋势;但还需进一步探索 MSCs 在向心肌细胞转化过程中,MSCs 内部存在哪些心肌细胞早期特异转录因子及分化过程中转录因子的表达变化,以便对 TSA 对 MSCs 向心肌细胞分化过程中的干预作用更深入的研究,进而找到能够提高 MSCs 向心肌细胞转化的有效途径。

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: 1470-1480.

[2] 吕铁伟,田 杰,朱 静,等.骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 197-203.

[3] 张航向,李 源,臧益民.干细胞移植与心血管疾病[J]. 心脏杂志, 2002, 14(5): 524-529.

[4] 杨胜利,何作云.干细胞移植治疗心肌梗死[J]. 心脏杂志, 2003, 15(4): 372-373.

[5] Rangappa S, Entwistle J W, Weehsler A S, et al. Cardiomyoctye-mediated contact programs human mesenehymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126: 124-132.

[6] IijimaY, Nagai T, Mizukami M, et al. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2003, 17(10): 1361-1363.

[7] Svechnikova I, Almqvist P M, Ekstrom T. HDAC inhibitors effectively induce cell type-specific differentiation in human glioblastoma cell lines of different origin[J]. Int J Oncol, 2008, 32(4): 821-827.

[8] Taddei A, Roche D, Bickmore W A, et al. The effect of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implicationsfor anticancer therapy[J]. EMBO Rep, 2005, 6(6): 520-524.

[9] Wang J S, Shum Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myoc ardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications[J]. J Thorac Caridovasc Surg, 2001, 122, 699-705.

(责任编辑:冉明会)