维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0907-04

大鼠心肌细胞诱导人骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的研究

常 静[1],雷 寒[1],陈建斌[2],黄仁英[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属第一医院血液内科,重庆 400016;3. 垫江县妇幼保健院,重庆 648300)

【摘 要】目的:研究人间充质干细胞(MSCs)向心肌方向分化的机制。方法:将人 MSCs 以 10000/cm² 的密度接种,共分为四组:1)对照组;2)共同培养组:人 MSCs 和 新生 SD 大鼠心肌细胞进行共同培养;3)条件培养液组:将从新生 SD 大鼠心肌细胞培养中获得的培养液,用于人 MSCs 的培养;4)细胞匀浆液组:将心肌细胞匀浆液用于 人 MSCs 的培养。分别于实验第 2、5、7 天收集各实验组的人 MSCs,进行 Desmin 及肌钙蛋白 I 的免疫组化染色。在共同培养组中,同时还用抗人 DNA 进行的荧光原位杂交,以区分鼠来源的细胞及人来源的细胞。结果:在对照组、条件培养液组及细胞匀浆液组均未检测到心肌特异性蛋白的表达。在共培养组中,第 2 天,部分人 MSCs 开始表达 Desmin,第 5 天细胞开始表达 cTnI,至第 7 天阳性表达率达 35%左右。结论:与大鼠心肌细胞共同培养可以诱导人 MSCs 向心肌方向的分化,而心肌细胞的条件培养液及心肌细胞匀浆不能诱导它们的心肌分化。

【关键词】间充质干细胞;心肌细胞;共同培养;心肌分化
【中国图书分类法分类号】R541.4,R318.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-23

The study about the cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells induced by rat cardiomyocytes

CHANG Jing, et al

(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanism about the cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells(MSCs) induced by rat cardiomyocytes. *Methods*:To induce the cardiac differentiation of human MSCs by using rat cardiomyocytes in different ways (three dishes for each way):(1) Cocultured with rat cardiomyocytes at the ratio of 1:1;(2)Cultured with the conditional medium, which got from the culture of rat cardiomyocytes and mixed with fresh medium by 1:1;(3) Cultured with the supernatant, which got from the minced rat cardiomyocytes and mixed with fresh medium by 1:10. The human MSCs were harvested at the day of 2,5 and 7, respectively.Then the cells were stained with desmin and cardiac troponin I monoclonal-antibodies, and fluorescent in situ hybridization to human DNA was used to mark the cells from human. *Results*: No desmin or cTnI was detected in the human MSCs cultured with conditional medium or supernatant. While for the human MSCs cocultured with rat cardiomyctes, desmin was detectable at the day of 2 and cTnI at the day of 5. Until the day of 7, about 35% of cocultured-human MSCs expressed those cardiac specific antigens. *Conclusion*:Human MSCs could be induced to differentiate into cardiomyocyte-like cells by coculture with rat cardiomyocytes, but not by the conditional medium or the supernatant of rat cardiomyocytes.

【Key words】 Mesenchymal stem cells;Cardiomyocytes;Coculture;Cardiac differentiation

近年来,心肌干细胞移植技术为心肌梗死及终末期心衰患者带来了治愈的希望。大量研究表明,移植到心肌组织的骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)能分化为心肌细胞[1-3],然而其分化机制尚不清楚。本实验利用体外培养的新生 SD 大鼠心肌细胞,通过不同方式模拟心肌微环境,包括与心肌细胞共培养、使用心肌细胞条件培养液及

作者介绍:常 静(1969-),女,博士,主治医师,主要研究方向:心肌干细胞移植。

基金项目:WHO 奖学金资助项目(2004)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

心肌细胞匀浆液 3 种方式，旨在研究人 MSCs 在上述环境中是否发生向心肌方向的分化，从而了解 MSCs 发生心肌分化的机制，为心肌干细胞移植技术早日应用于临床打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 人 MSCs 的分离培养和鉴定

骨髓捐献者为年龄为 19~47 岁健康自愿者。在无菌条件下取骨髓，稀释后置于密度为 1.073g/ml 的 percoll 分离液之上。离心取界面层细胞，接种于培养瓶中，悬浮于含 15%胎牛血清的 DMEM-LG 培养基(Invitrogen，苏格兰)中，37℃培养 3 天，换液弃掉未贴壁细胞。继续培养，每 3~4 天换液，达 80%融合时传代。通过流式细胞仪检测培养出的细胞表达 MSCs 表面标志的情况，所用抗体分别为 PE-抗人 CD29 和 CD44 单克隆抗体（Immenotech，法国）、FITC-抗人 CD34 及 CD45 单克隆抗体(Becton Dickinoson，美国)。

1.2 新生 SD 乳鼠心肌细胞的原代培养

取出生 1~3 天的 SD 乳鼠共 20 只(购于卡洛林斯卡大学动物中心)，断颈处死后迅速取出心脏。将心室组织于冰上剪碎，加入适量体积的Ⅱ型胶原酶溶液中，搅拌直至组织块完全消化为止。收集上清液并离心，取沉淀物，加入培养基，调节细胞浓度为(10^5~10^6)个/ml 之间。将细胞接种于培养瓶中，利用差速贴壁法除去易贴壁的成纤维细胞，纯化心肌细胞，然后置于 37℃培养箱中培养。

1.3 实验分组

人 MSCs 以 10000/cm^2 的密度接种，接种后 24h 开始进行诱导分化实验。共分为四组，每组共 3 个重复孔：1)对照组：人 MSCs 仅在 DMEM-LG 中培养，不加入任何诱导因素；2)共同培养组：人 MSCs 和 新生 SD 大鼠心肌细胞以 1:2 的比例分别接种于培养皿的两侧，进行共同培养；3)条件培养液组：从新生 SD 大鼠心肌细胞的原代培养中取出培养掖，称为条件培养液。将条件培养液与 DMEM-LG 以 1:1 的比例混合，用于培养人 MSCs；4)细胞匀浆液组：将心肌细胞匀浆液与 DMEM-LG 以 1:10 的比例混合，用于培养人 MSCs。分别于实验第 2、5、7 天收集各实验组的细胞，离心收集在玻片上。

1.4 FISH 标记人来源的心肌细胞

将收集到玻片上的共同培养组细胞，在 2%的多聚甲醛中固定 2min，置于 95%的乙醇中 2min，凉干后浸泡于 2×SSC 中 30min，然后依次放在不同浓度的冰冻乙醇中脱水并凉干。加入 3μl 含抗人 DNA 抗体的探针溶液(Vysis 公司，美国)并加盖玻片，用胶封闭后在 72℃下烘烤 5min。在 37℃中孵育 1~2h 后，去掉封闭胶，将玻片放置在 2×SSC 中，使盖玻片自动脱落。洗涤后滴加含 DAPI 的封固剂，在荧光显微镜下观察并拍照。鼠来源的细胞核被染为蓝色，而人来源的细胞核被染为红色。

1.5 免疫组化染色检测心肌特异性蛋白的表达

将收集有细胞的玻片固定、洗涤后，加 5%兔血清封闭非特异性抗原，室温下孵育 20min。分别加鼠抗人 Desmin(Dako 公司，丹麦)及心肌肌钙蛋白 I(RDI 公司，美国)单克隆抗体，室温下孵育 2h。洗涤凉干后滴加荧光标记的二抗（Dako 公司，丹麦），孵育 1h。在荧光显微镜下观察并拍照。以对照组人 MSCs 作为阴性对照，以 SD 大鼠心肌组织为阳性对照。

2 结 果

2.1 人 MSCs 的形态学表现

HE 染色显示，低倍镜下，大多数细胞呈较均一的长梭形，细胞呈平行排列生长或旋涡状生长，逐渐形成大小不一、边界清楚的细胞集落（见图 1)。高倍镜下，细胞多为单核，核大，核仁明显，核仁数目不等，多为 2~4 个，胞浆丰富，富含颗粒，集中在细胞核的周边区域，相互间以细胞突起相连接(见图 2)。

2.2 检测人 MSCs 的表面抗原特性

结果提示，所测的 2~9 代细胞表面抗原表达具有均一性，即阳性表达 CD29、CD44(见图 3)，不表达造血干细胞表面标志抗原 CD34、CD45(见图 4)。

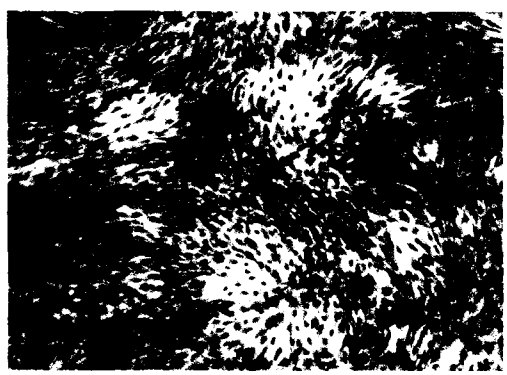


图 1 长梭形细胞逐渐形成细胞集落(HE×10)



图 2 细胞多为单核，核大，胞浆富含颗粒(HE×40)

维普资讯 http://www.cqvip.com

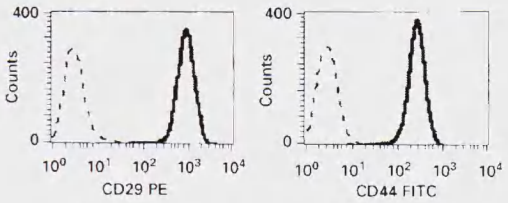


图 3 分离培养出的细胞阳性表达 CD29、CD44

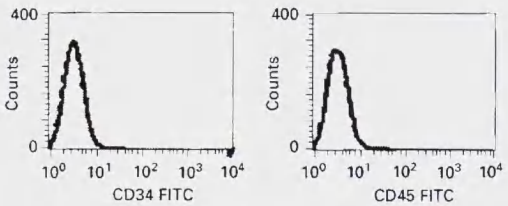


图 4 阴性表达造血干细胞表面标志抗原 CD34、CD45

2.2 新生 SD 大鼠心肌细胞的形态学表现

培养的心肌细胞开始呈圆形，8h 左右开始贴壁，24h 少数细胞开始伸出伪足，并在局部开始出现较弱而规律的搏动。在培养的第 3~5 天，细胞充分铺展呈梭形、三角形或扁平不规则形，胞浆粗糙、折光度较高，细胞核呈卵圆形并居细胞中央；搏动点增加，规律且有力，不同搏动点搏动频率不同，波动于 60~90 次/min 之间。随培养时间的延长，至第 7~10 天，有大量梭形、成纤维样细胞生长，交织成网状甚至重叠生长；同时搏动点逐渐减少，搏动逐渐减弱直至完全消失。

2.3 各实验组人 MSCs 表达心肌特异性蛋白的检测结果

在对照组、条件培养液组及细胞匀浆液组均未检测到心肌特异性蛋白的表达，提示在上述 3 组中人 MSCs 没有发生向心肌方向的分化。

而在共培养组中，免疫组化及 FISH 双重染色结果显示，共培养后第 2 天部分人 MSCs 开始少量表达 Desmin，见图 A，但没有发现心肌肌钙蛋白 I 的表达。至第 5 天，人 MSCs 表达 Desmin 的浓度增加，见图 B，部分细胞开始表达心肌肌钙蛋白 I。至第 7 天，阳性表达 Desmin 及心肌肌钙蛋白 I 的细胞数及表达浓度进一步增加，分化率达 35%左右，见图 C。

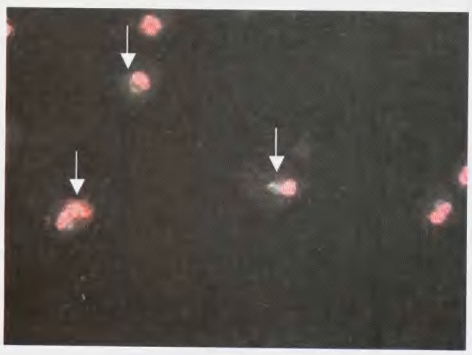


图 A

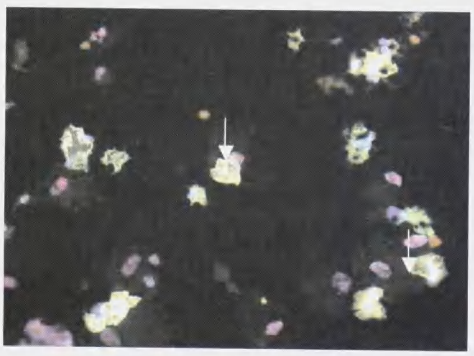


图 B

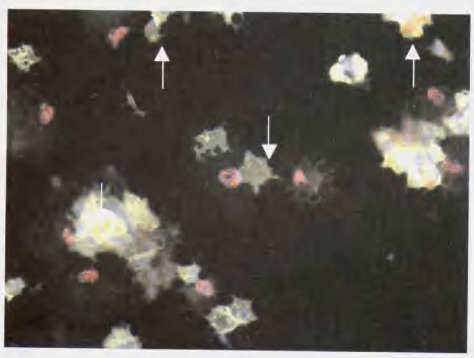


图 C

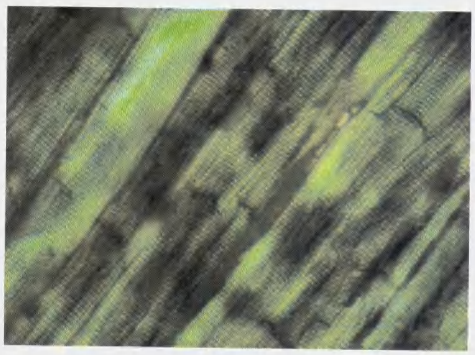


图 D

图 5 双重染色显示，在共同培养条件下，显示为红色细胞核的人 MSCs 发生了向心肌方向的分化(黑色箭头所示)，蓝色细胞核显示为来源于鼠的细胞。(图 A)第 2 天：部分人 MSCs 开始少量表达 Desmin(S-P 及 ISH×40)；(图 B)第 5 天 ：表达 Desmin 的人 MSCs 增加(S-P 及 ISH×40)；(图 C)第 7 天：Desmin 表达进一步增加，阳性细胞率达 35% (S-P 及 ISH×40)；(图 D)以乳鼠心肌组织为 Desmin 的阳性对照(S-P×100)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

由于 MSCs 易于取材和体外扩增、具有多向分化潜能、不表达共刺激抗原、以及无伦理学争论等众多优点，因而在细胞治疗、基因治疗及组织工程等方面具有广阔的应用前景。目前尚无 MSCs 的特异性标记，对其特征的描述及其分离方法，都是以一个细胞群体的形式进行的。本实验选取其中有代表性的 4 种抗原，用流式细胞仪进行了检测。结果显示，第 2~9 代人 MSCs 具有一致的抗原表达谱，均阳性表达 CD29、CD44，而阴性表达 CD34 和 CD45。其表达符合有关 MSCs 表面抗原的特点[4,5]，证实所获得的细胞是高纯度且性质稳定的人 MSCs。

本实验采用了多种模拟心肌微环境的方式，包括于心肌细胞共同培养、使用心肌细胞提取液及使用从心肌细胞培养中获得的条件培养液等三种方式，以比较上述三种模拟心肌微环境的方式对人 MSCs 心肌分化过程的影响。结果显示，在鼠心肌细胞的条件培养液或匀浆组中，没有观察到人 MSCs 向心肌方向甚至肌细胞方向的分化。该结果与 Kristine[6]及 Benard[7]等人的结果有所不同，这可能与所用细胞的来源和方法不同有关。Kristine[6]等所用的人 MSCs 来源于脂肪组织而非来源于骨髓，而其心肌细胞提取液是来源于大鼠心肌细胞核而非来源于整个细胞匀浆。推测在大鼠心肌细胞胞浆中含有某些物质或信号抑制了 MSCs 向心肌细胞方向的分化。而 Benard[7]等所用的 MSCs 来源于小鼠，且其培养液中添加了多种细胞因子，如白介素 1、白介素 6 及干细胞生长因子等，提示某些细胞因子对心肌分化过程有促进作用，在以后的诱导实验中可以考虑在培养液中加入这些细胞因子。

为鼠心肌细胞共同培养的条件下，人 MSCs 发生了向心肌方向的分化。Desmin 是一种丝蛋白，广泛存在于肌肉来源的组织中，包括骨骼肌、心肌、平滑肌，而心肌肌钙蛋白 I 是近年来发展起来的一种高灵敏度、高特异性的心肌标志物。本实验结果提示，共同培养诱导的 MSCs 先出现向肌系细胞的分化，再逐步特异地向心肌细胞分化。推测实验中发现的 Desmin 阳性，而 cTnI 阴性细胞也可能是正处于向心肌细胞分化阶段的原始细胞阶段。至共同培养第 7 天，上述蛋白表达进一步增加，细胞转化率约为 35%。本实验未观察到 Fukuda 等报道的分化细胞出现的自发性跳动[8]。为了便于分离共同培养组的人 MSCs，也为了在观察细胞的分化与自发性搏动时不受诱导心肌细胞的影响，故将两种细胞接种在培养皿的不同部位，这可能限制了两者的充分接触和作用，从而影响了人 MSCs 的进一步分化而出现自发性搏动[9,10]。作者曾在前期实验中对人 MSCs 的免疫学性质进行了研究，结果提示，人 MSCs 具有低免疫源性及成熟的免疫调节作用，因而推测在体外共同培养中不同种属来源的细胞间不存在较强的免疫反应，然而这有待进一步实验证实。

本实验结果显示，人 MSCs 在合适的心肌微环境中能分化为心肌样细胞，关于其具体机制尚不清楚。我们有理由相信，对分化前后的人 MSCs 的基因及蛋白表达进行对比研究将有助于该问题的解答，从而解决心肌干细胞移植技术的“瓶颈问题”。

参 考 文 献

[1] Kajstura J, Rota M, Whang B, et al. Bone marrow cells differentiatiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion[J]. Circ Res, 2005; 96: 127-137.

[2] Li TS, Hayashi M, Ito H, et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-β-preprogrammed bone marrow stem cells[J]. Circulation, 2005; 24: 2438-2445.

[3] Le Blanc K, Ringden O. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study[J]. Pflugers Arch, 2006; 453 (1): 43-52.

[4] Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristic and clinical applications[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006; 44(4): 215-230

[5] Fukuda K, Yuasa S. stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2006; 98: 1002-1013.

[6] Kristine GG, Andrew CB, Brent EA, et al. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004; 314: 420-427.

[7] Benard VP, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cell[J]. Circ Res, 2004; 94: 223-229.

[8] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bome marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 125: 1474-1480.

[9] 苏 立，陈运贞，张晓刚，等. 在心肌细胞/MSCs 共培养体系中 MSCs 出现心肌分化表型[J]. 重庆医科大学学报，2005; 30(5): 644-647, 651.

[10] Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate[J]. Int J Biochem Cell B, 2004; 36: 714-727.