维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)05-0644-04

在心肌细胞/MSCs 共培养体系中 MSCs 出现心肌分化表型

苏 立[1], 陈运贞[2], 张晓刚[2], 佘 强[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010;2. 重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 MSCs 在心肌细胞/MSCs 共培养体系中向心肌细胞的分化情况。方法:体外分离培养大鼠心肌细胞,然后将传代后大鼠 MSCs 与心肌细胞混合培养,建立心肌细胞/MSCs 共培养体系,同时以心肌细胞培养上清液及成纤维细胞培养上清液为诱导因素作对照。培养 1 周后行免疫细胞化学染色,鉴定 MSCs 中心肌特异性 cTnT 蛋白的表达。结果:在心肌细胞/MSCs 共培养体系中,MSCs 与心肌细胞交织成网状,部分 MSCs 出现 cTnT 的表达,而对照组 MSCs 未检出 cTnT 的表达。结论:体外模拟的心肌环境可以诱导 MSCs 向心肌细胞分化并表达心肌细胞特异性标志物,诱导 MSCs 向心肌分化的分子信号可能是心肌细胞膜蛋白。

【关键词】间充质干细胞;诱导;细胞分化;共培养

【中国图书分类法分类号】R54 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-01-17

Bone marrow mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype in a coculture system

SU Li, et al

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

【Abstract】*Objective*: To observe the tansdifferentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into cardiomyocyte in a coculture system with cardiomyocytes. *Methods*: Newly born Wistar Rats' cardiomyocytes were isolated and cultured and the cells were labeled with DAPI. Prepared MSCs were planted into the cardiomyocytes dishes to establish a co-culture system. Supernatant liquid of the cardiomyocytes or fibroblast was added the MSCs (non-labeled) dishes as the control. After one week of coculture, fluorescence microscope observation and immunocytochemical staining with cTnT was performed to evaluate the phenotype changes in non-labeled MSCs. *Results*: MSCs and cardiomyocytes were connect with each other by net in culture plate after a few days of coculture; some non-labeled cells were positively stained by cTnT antibody while the MSCs cultured with cardiomyocytes or fibroblast supernatant liquid were stained negatively. *Conclusion*: To obtain cardiomyocyte phenotype in vitro, direct contact of MSCs with cardiomyocytes is essential. The signaling molecules induce MSCs' transformation into cardiomyocytes are likely some membrane proteins on the surface of cardiomyocytes.

【Key words】Mesenchymal stem cells; Induce; Cell differentiation; Coculture

MSCs 移植实验表明,MSCs 移植到心肌梗死动物心脏后,可改善心脏功能并提高心梗动物的存活率,其机制可能为 MSCs 在心肌组织微环境中,向心肌细胞和/或血管内皮细胞分化,使心肌再生、血运重建[1~3]。然而目前尚无直接的证据表明,心肌组织中何种细胞或因子在诱导 MSCs 向心肌细胞分化过程中起主导作用。为此,我们建立了心肌细胞与 MSCs 的共培养体系,试图模拟心肌组织微环境以诱导 MSCs 表达心肌细胞分化表型,为 MSCs 可以在心肌组织中发生向心肌细胞的定向分化寻找实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胎牛血清(Hyclone,美国);DMEM 培养液(Gibco,美国);5'-溴-2'-脱氧尿苷(Brdu)及 4',6-Diamidino-2-phenyindole(DAPI)(Sigma,美国);兔抗鼠 cTnT 抗体(福州迈新)。

实验动物成年 Wistar 大鼠(雌雄不拘,6~8 周龄,体重 150~200g)及新生 Wistar 大鼠(雌雄不拘,出生 1~3 天)均

作者介绍:苏 立(1970-),男,主治医师,博士,主要研究方向:冠心病的细胞和基因治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 细胞的分离培养

按文献方法[4],分离培养成年大鼠骨髓间充质干细胞并传代备用。采用分次酶消化及差速贴壁法法分离新生大鼠心肌细胞。消化的细胞悬液接种,1.5h后吸出尚未贴壁的细胞悬液,接种于6孔板中,10%FBS培养,并于培养液中加入0.1mmol/L 5′-溴-2′-脱氧尿苷(Brdu),共3天,使心肌细胞进一步纯化。而接种1.5h内贴壁细胞主要为成纤维细胞,继续培养并传代备用。

1.3 实验分组

1.3.1 心肌细胞诱导组:待上述分离培养的心肌细胞生长3~4天后,取生长密度适中的心肌细胞,吸弃培养液,取3孔每孔中加入1.5ml DAPI使其终浓度为50μg/ml,37℃孵育2h,吸出DAPI标记液,以预温0.01mol/L,pH 7.2 BPS清洗6次,以充分洗去染液;取传代后生长状态良好的MSCs,消化后,以3.5×10^4密度接种于上述DAPI标记后的心肌细胞培养孔中,1ml/well,建立心肌细胞/MSCs孔培养体系;24h后换液,换用新鲜含5%胎牛血清的DMEM培养液,之后每2~3天换液1次。培养至细胞70%~80%汇片。

1.3.2 心肌细胞培养上清液诱导组:心肌细胞生长3~4天后,换液24h后收集未予DAPI标记的3孔心肌细胞,低温离心机2000r/min离心5min,取上清液加入传代培养48h的MSCs培养孔中,隔日重复上述实验至1周。

1.3.3 成纤维细胞上清液诱导组:方法同1.3.2。

1.4 诱导后细胞鉴定

各诱导组细胞均于1周后行cTnT抗体免疫细胞化学染色。荧光显微镜下观察心肌细胞/MSCs共培养体系中未带DAPI标记之细胞,即MSCs中cTnT抗体染色情况,染色阳性者即为已分化的MSCs。

2 结 果

2.1 心肌细胞的生长、鉴定及DAPI标记

分离的心肌细胞,开始呈圆形,8h左右开始贴壁,24h少数细胞开始伸出伪足,但尚未见自发性搏动。培养72h后,细胞充分铺展,贴壁牢固;细胞呈梭形、三角形或扁平不规则形;胞浆粗糙、折光度较高,其周围伸出较多突起;细胞中央隐约可见细胞核(图1);特异性肌钙蛋白T抗体染色鉴定,90%左右细胞染色呈阳性(图2)。细胞出现自发性搏动,同一视野下,可见多处自发性搏动灶。DAPI标记后,荧光显微镜下以359nm激发波长观察可见细胞核有较强蓝色荧光,标记率达100%。

2.2 心肌细胞/MSCs共培养体系中细胞的生长

在建立心肌细胞/MSCs共培养体系后,MSCs较快贴壁,24h换液去除非贴壁细胞后,可见培养体系中主要含有两类细胞:一类较大,细胞三角形、多角形或扁平不规则形,胞浆丰富,核/浆比较小,部分可自发性搏动;另一类细胞体积较小,形态以梭形为主,胞浆较为透明,核/浆比例相对较大,无自发性搏动。3~4天后,细胞之间通过较长的伪足或粗大的突起,并伸向周围细胞胞浆,相互交织成网。之后网状结构更为明显,小细胞数量增加,形态多样,多数仍呈梭状,但多角形及不规则形细胞有所增加。6~7天,细胞数量明显增多,视野中可见多处较大网状结构,网状结构之间可见协同收缩。



图1 培养5天的大鼠心肌细胞×100



图2 心肌细胞的cTnT免疫细胞化学染色×200

2.3 MSCs在心肌细胞上清液诱导及成纤维细胞上清液诱导后的生长

心肌细胞上清液诱导及成纤维细胞上清液诱导后,细胞形态为均一的长梭形,胞浆铺展,可呈放射状排列及平行同向排列,细胞大小一致;经心肌上清液诱导的细胞,一般7~8天即可达90%汇片,成纤维细胞上清液诱导的细胞生长较快,5~6天即可铺满盖片。

2.4 诱导后细胞的鉴定

心肌细胞诱导组细胞行肌钙蛋白抗体免疫细胞化学染色,染色后在荧光显微镜下以359nm激发波长观察有较强蓝色荧光的视野,并换用自然光下拍

维普资讯 http://www.cqvip.com

摄同一视野下免疫细胞化学染色照片(图 3,图 4),可见带荧光的细胞,cTnT 染色阳性;而在无荧光标记的细胞中,亦存在部分细胞 cTnT 染色阳性,表明在与心肌细胞的共培养体系中,部分 MSCs 已存在心肌细胞特异性标志物 cTnT 的表达。其它两组细胞 cTnT 抗体染色后未见阳性表达(图 5)。

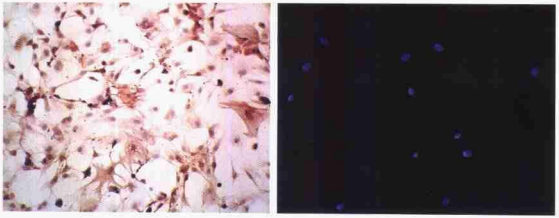


图 3 心肌细胞/MSCs 共培养 7 天后 cTnT 染色及同一视野 DAPI 标记细胞×100

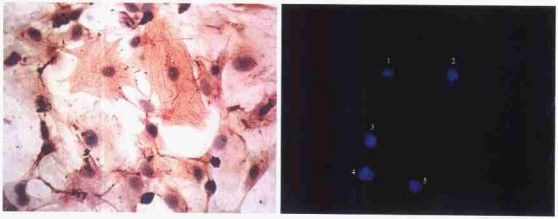


图 4A、B 共培养 7 天后 cTnT 染色及同一视野 DAPI 标记细胞×400
(AB 两图中的 5 个细胞相互对应,为带 DAPI 标记的心肌细胞,从图 A 可见,未带 DAPI 标记的 MSCs 中,部分细胞亦存在 cTnT 的表达,出现心肌细胞表型)

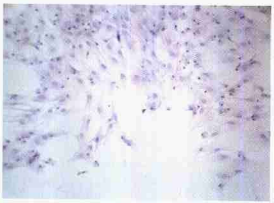


图 5 心肌细胞培养上清液诱导后 MSC 的 cTnT 染色×100

3 讨 论

本研究采用心肌细胞及 MSC 细胞共培养体系,同时分别用心肌细胞及成纤维细胞培养上清液与 MSC 共同孵育,试图体外模拟心肌组织微环境以诱导 MSCs 向心肌细胞分化。结果表明在与心肌细胞的共培养体系中,MSCs 可出现心肌标志物肌钙蛋白的表达,而心肌细胞上清液及成纤维细胞上清液未能诱导出 MSCs 表达心肌肌钙蛋白。

心肌细胞培养中,由于非心肌细胞的增殖较快,即使少量存在也会很快超过心肌细胞的数量,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结构和生理功能[5-7]。本实验采取两种措施纯化心肌细胞:首先采用差速贴壁法[8]将 1.5h 内贴壁的大部分非心肌细胞去除;在此基础上于培养的前 3 天在培养液中加入低浓度的 5'-溴-2'-脱氧尿苷(Brdu)。Brdu 可引起成纤维细胞染色体的异染色质部分发生断

维普资讯 http://www.cqvip.com

裂,使细胞处于 G0 期而停止增殖,而对心肌细胞的超微结构及生物学特性无明显影响[9]。同时,心肌细胞接种时应尽量均匀,以免影响细胞的形态及生存时间[10]。

在建立心肌细胞与 MSC 共培养体系时,MSC 的接种密度对两种细胞的存活至关重要。由于 MSC 在培养过程中能较快增殖,与心肌细胞争夺空间及营养,影响细胞的生长。因此本实验借鉴 Condorelli 等[11]的内皮细胞及心肌细胞共培养条件并在预实验的基础上适当改进,采用较低密度接种,使 MSCs 与心肌细胞数量约为 1:4,并于共培养体系建立后换用低浓度血清,以维持细胞的生长、促进 MSC 的分化。

细胞的分化不是单个细胞的孤立行为,是在一定的条件下发生的变化,除了细胞的内在决定因素外,细胞间的相互作用是必不可少的[12]。关于诱导 MSC 向特定细胞分化的环境信号一直是人们探求的重点。是哪些分子信号促使 MSC 发生向局部组织细胞的适应性变化,这些信号分子存在于何处,它们是如何起作用的? 目前人们对这些问题几乎还一无所知。Condorelli G 等[11]将分离的胚胎血管内皮细胞及血管内皮细胞株分别与大鼠心肌细胞建立共培养体系,培养 5 天后发现约 10% 的血管内皮细胞发生转分化,表达横纹肌肌动蛋白。虽然成纤维细胞生长因子 - 2 和骨形态发生蛋白 - 4 可以诱导胚胎干细胞向心肌分化[13],但并不能诱导内皮细胞的转分化。作者还观察到这些转分化的内皮细胞与心肌细胞相互联结、融合,认为细胞 - 细胞之间的相互接触可能对内皮细胞向心肌细胞的转分化是非常重要的。Tomita 等[14]报道 GFP 标记的 MSCs 在心肌细胞培养体系中可形成克隆并与心肌细胞同步收缩。Rangappa 等[15]最近报道,MSCs 与心肌细胞共培养 48h 后,流式细胞仪检测 66% 的 MSCs 处于 G1 期;RT - PCR 检测分化的细胞存在肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC)、β - 肌动蛋白 (beta - actin) 及肌钙蛋白 T (cardiac troponin - T, cTnT) mRNA 的表达;免疫细胞化学染色 MHC 及 cTnT 表达阳性。本研究发现,MSC 与心肌细胞共培养后,细胞在形态、排列方式上均发生与心肌细胞相适应的变化,细胞 - 细胞之间相互交织成网状且部分 MSC 细胞出现肌钙蛋白的表达,与上述研究结果相似。

本研究还显示,在心肌细胞及成纤维细胞培养上清液中,MSCs 的形态及排列与普通培养时无明显差别,且未能诱导出 MSCs 表达肌钙蛋白。推测其原因可能为 (1) 诱导 MSCs 向心肌细胞分化的信号分子很可能存在于心肌细胞膜上,MSCs 的分化必须依赖与膜的直接接触或其它间接的信号途径;(2) 心肌细胞和成纤维细胞生理情况下的分泌型生物活性物质如细胞因子等不能诱导 MSCs 向心肌分化,或因在我们的培养条件中其浓度较低,尚不足以诱导 MSCs 的分化;(3) 作用时间较短,MSC 尚未出现分化表型。Rangappa 等[15]的研究亦表明 MSCs 在有或无血清的心肌细胞条件培养基中,仅存在 beta - actin 的表达,未见心肌细胞特异性标志物的表达。最近 Iijima 等[16]报道,骨骼肌母细胞 (skeletal myoblasts) 与心肌细胞共培养后,可出现心脏转录因子 Csx/Nkx2.5 和 GATA4 以及 TnT、ANP 等心肌特异性标志物的表达,而且骨骼肌母细胞与心肌细胞可形成联结并表达钙粘蛋白 (cadherin) 及间隙连接 43(connexin 43);在用硝苯地平处理或无 Ca^{2+} 离子的培养基中,骨骼肌母细胞不表达心脏特异性蛋白。作者认为骨骼肌母细胞 - 心肌细胞之间的相互联结及邻近心肌细胞的搏动对骨骼肌母细胞分化为心肌细胞是必须的。上述两项研究结果均支持本文推测。

本研究中未能成功建立 MSC 与心肌成纤维细胞的共培养体系,加之心肌成纤维细胞在细胞鉴定方面存在的困难,故 MSC 在成纤维细胞环境中的分化情况尚不清楚。在构成心脏组织的细胞中,大部分为心肌成纤维细胞,而心肌细胞仅占 1/3 左右,MSC 移植后为何能在非心肌细胞数量占绝对优势的情况下分化为心肌细胞以及非心肌细胞在此过程中的作用尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001; 410 (6829): 701 - 705.

[2] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart[J]. Circulation, 2002; 105(1): 93 - 98.

(下转第 651)

维普资讯 http://www.cqvip.com

床推广应用。

参 考 文 献

[1] Kuglar A, Stuhler G, Walden P, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell - dendritic cell hybrids[J]. Nat Medicine, 2000; 6(3): 332 - 336.

[2] Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and Clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor - derived dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2001; 61(17): 6451 - 6458.

[3] 高 建,陈 敏,彭明利,等.肝癌细胞裂解物致敏的树突状细胞瘤苗体外诱导特异性抗肝癌免疫[J].中华肝脏病杂志,2005;13(3):198 - 201。

[4] Van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, et al. Dendritic cell induced activation of adaptive and innate antitumor immunity[J]. J Immunol, 2003; 171(11): 5842 - 5852.

[5] Mailliard RB, Dallal RM, Son Yi, et al. Dendritic cells promote T cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen[J]. Immunol Invest, 2000; 29(2): 177 - 185.

[6] Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, et al. Generation of tumor - specific T - lymphocytes by cross - priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells[J]. Cancer Res, 2000; 60(13): 3542 - 3549.

[7] 杨 镇,主编.肿瘤免疫学[M].第 1 版,武汉:湖北科学技术出版社,1998;7 - 9.

[8] Lau R, Wang F, Jeffery G, et al. Phase I trial of intravenous peptide - pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma[J]. J Immunother, 2001; 24(1): 66 - 78.

[9] Chau GY, Wu CW, Lui WY, et al. Serum interleukin - 10 but not interleukin - 6 is related to clinical outcome in patients with respectable hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg, 2000; 231(4): 552 - 558.

(上接第 647 页)

[3] Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM, et al. Incorporation and integration of implanted myogenic stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements [J]. J Thorac Cardiovas Surg, 2002; 124(3): 584 - 590.

[4] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosic Res, 2000; 61(4): 364 - 370.

[5] Harada M, Itoh H, Nakagawa O, et al. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy[J]. Circulation, 1997; 96(10): 3737 - 3739.

[6] Guo WN, Kamiya K, Kada KJ, et al. Regulation of cardiac kvK+ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998; 30(1): 157 - 159.

[7] Suzuki T, Tsuruda A, Katoh SH, et al. Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rat assay of myocytes cultured in a serum - free medium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997; 29(8): 2087 - 2091.

[8] Simpson P, McGrath A, Savion S, et al. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. Circ Res, 1982; 51(2): 787 - 801.

[9] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat muocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. Cire Res, 1982; 50(1): 101 - 116.

[10] Clark WA, Decker ML, Behnke - Barclay M, et al. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long - term primary culture [J]. J Mol Cell Cardiol., 1998; 30(1): 139 - 142.

[11] Condorelli G, Borello U, De Angelis L, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for muocardium regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA., 2001; 98(19): 10733 - 10738.

[12] Wolpert L, Beddington R, Brockes J, et al. Principles of development. Edition one[M]. London, New York: Current biology Ltd&Oxford university press, 1998; 269 - 320.

[13] Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non - precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative[J]. Dev Dyn, 2000; 218(2): 383 - 393.

[14] Tomita S, Nakatani, Fukuhara S, et al. Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system[J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2002; 50(8): 321 - 324.

[15] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte - mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 126(1): 124 - 132.

[16] 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.