维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)03-0292-00

5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究

苏 立[1], 陈运贞[1], 张晓刚[1], 张润峰[1], 马 旭[2]

(1.重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016;2.重庆医科大学临床学院肾内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:比较 5-氮胞苷(5-azacytidine,5-aza)于不同浓度、不同孵育时间对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSC)向心肌样细胞分化的影响;观察诱导后不同时间点心肌标志物的表达情况。方法:体外分离培养 Wistar 大鼠 MSC,传代纯化后进行诱导实验。浓度分组(C1-C4):分别以 3、5、10、20μmol/L 5-aza 处理 24h,之后更换新鲜培养基继续培养。时间分组(T1-T5):以 10μmol/L 分别孵育 6h、12h、24h、48h、72h,之后更换新鲜培养基继续培养。各组均于首次加药 4 周后行免疫细胞化学染色检测。RT-PCR 检测 10μmol/L 5-aza 处理后 2、4、8 周细胞 GATA4mRNA、cTnTmRNA 的表达情况。结果:经 5-aza 诱导处理后 4 周,C1-C4 组 Desmin 及 α-Sarcomeric Actin 染色阳性率各组比较均无统计学差异($P>0.05$);而 T1-T5 各组其阳性率比较存在统计学差异($P<0.01$)。RT-PCR 显示,诱导后 2 周,GATA4mRNA 开始表达,持续至 8 周;cTnTmRNA 在诱导后 2 周无表达、4 周时弱表达,8 周时更为显著。结论:成年人鼠 MSC 在适当浓度 5-aza 处理后可以向心肌样细胞分化,在 3μmol/L~20μmol/L 范围内,5-aza 浓度的变化对 MSC 的分化率影响较小;在 48h 内,适当延长 5-aza 的孵育时间可能增加 MSC 向心肌样细胞的转化率。

【关键词】间充质干细胞;心肌样细胞;诱导;分化;5-氮胞苷

【中国图书分类法分类号】Q781 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-09-02

5-azacytidine induce bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into cardiomyocyte-like cells in vitro

SU Li, et al

(*Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine whether 5-azacytidine(5-aza) can induce bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation into cardiomyocytes and whether variant concentration and incubation time of 5-aza have any effect on the differentiation of MSCs. *Methods*: MSCs were isolated from adult Wistar rats' femoral and tibial bones and were purified by consecutive passages. The purified MSCs were then treated with 5-aza for 24h in variant concentretions (groupC1-C4:3,5,10,20μmol/L respectively)or in the same concentration(10μmol/L5-aza) but differs from incubation time (groupT1-T5:incubated for 6h,12h,24h,48h,72h respectively). The induced MSCs differentiation was observed by phase-contrast microscope, immunohistochemistry staining and RT-PCR, and the rates of the differentiated MSCs were calculated in each group. *Results*: Treated with 5-aza, the shape and the aligment pattern of the cells changed gradually, some induced MSCs were stained positive with Desmin and α-Sarcomeric Actin antibody. The rates were 29%,31%,36%,34.5%($P>0.05$) and 26%,28.5%,30%,32% ($P>0.05$) respectively in groupC1-C4, while in groups T1-T5, the rates were 21%,28%,36%,40%,37.5% ($P<0.01$) and 16%,25%,30%,34.5%,33% respectively($P<0.01$). The GATA-binding protein 4(GATA4)mRNA expression was detected at the time point 2w,4w and 8w after 5-aza treatment while cardiac troponin T (cTnT) mRNA expressed at the forth week and significantly increased at the eighth week. *Conclusion*: Induced by appropriate concentration of 5-aza, MSCs of the adult rat can differentiate into cardiomyocyte-like cells. With the increasing 5-aza concentration from 3 μmol/L to 20 μmol/L, the differentiation rates of MSCs were affected slightly($P>0.05$). However, the differentiation rate of MSCs increased probably with the incubation time prolonged. During the procedure of MSCs differentiation, the expression pattern of some genes such as GATA4 and cTNT may make some difference.

【Key words】Mesenchymal stem cells;Cardiomyocyte-like cells;Differentiation;Induce;5-azacytidine

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

心肌梗死后,如何促进心肌细胞的再生是心血管病学家面临的一个难题。人们一直试图寻找一种

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞移植材料以修复坏死心肌、改善心脏功能。近年来,干细胞的研究为人们提供了新的希望。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)因具有多向分化潜能加之其来源广泛、易于获取等诸多优点而成为近年研究的热点之一。目前已有 MSC 分化为多种间质组织细胞的报道[1~3]。为了进一步研究 MSC 的向心肌细胞的分化,我们以 5-氮胞苷(5-azacytidine)不同浓度及不同孵育时间处理大鼠 MSC,观察其对 MSC 心肌分化率及心肌标志物表达的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

DMEM 培养液(Gibco,美国),胎牛血清(Hyclone,美国),5-氮胞苷(Sigma,美国),抗结蛋白抗体、肌动蛋白抗体、SABC 试剂盒及 DAB 显色剂(武汉博士德),Tripure 总 RNA 提取试剂(Promega,美国),PCR 引物(上海生工),RT-PCR 试剂盒(Roche,美国),CO_2 培养箱(Shellab,美国),凝胶成像系统(Bio-Rad Doc Gel2000,美国)。

1.2 MSC 的分离培养及纯化

Wistar 大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重 150~200g。戊巴比妥(30mg/kg)腹腔注射麻醉,无菌条件下取股骨及胫骨,去除骨垢端,用 3~5ml 无血清培养基冲洗骨髓腔,收集冲洗液,1000r/min 离心 5min,弃上清,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基悬浮细胞,以 10^{11}/L 接种于 50ml 培养瓶,37℃、5% CO_2 及饱和湿度的孵箱中培养。30h 后去除悬浮细胞,加入新鲜培养基。每 3~4 天换液 1 次。10~12 天后,MSC 基本铺满瓶底后,首次传代。

1.3 实验分组

将 1~2 代 MSC 接种于预先置有盖玻片的 24 孔板中,继续培养 3 天。C1~C4 组:各组分别用 3、5、10、20μmol/L 5-aza 处理 24h,更换 5% FBS 的不含 5-aza 新鲜培养基,每 3~4 天换液 1 次,1 周后以上述浓度 5-aza 再次处理 24h,之后更换新鲜培养基继续培养。T1~T5 组:各组以 10μmol/L 5-aza 分别处理 6h、12h、24h、48h、72h,之后更换新鲜培养基继续培养。对照组:不用 5-aza 处理,仅更换培养基。

1.4 免疫细胞化学染色

5-aza 处理后 4 周,取上覆 MSC 的盖玻片,PBS 冲洗 2 次,95% 乙醇固定 10min,PBS 冲洗,正常山羊血清封闭,漂洗;分别滴加 1:200 稀释的 Desmin 及 α-Sarcomeric Actin 一抗,4℃过夜。其余步骤按 SABC 试剂盒操作说明进行。显微镜下观察,低倍镜下随机取 3 个视野,以胞浆染成棕黄色为阳性,计数阳性细胞占整个视野细胞数的比例,以 3 次结果的均值计算阳性率。以未诱导细胞作对照。

1.5 RT-PCR 检测基因转录

待 1~2 代的 MSC 基本长满瓶底,以 10μmol/L 5-aza 直接加入培养瓶内进行诱导,方法同 1.3。分别取诱导后 2、4、8 周的 MSC,Tripure 提取细胞总 RNA,用以下条件行 RT-PCR:48℃ 45min 合成 cDNA,94℃ 预变性 10min,继之 95℃ 30s,60℃ 1 min,72℃ 30s 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。使用引物如下:

GATA4 引物 上游 5'-ATCAGACCGTCAACCGTGTC-3';

下游 5'-GTCGTCGTCACTTCTCTACG-3';

扩增长度 278bp。

cTNT 引物 上游 5'-GGAAGACCTACATGGGAGGT-3';

下游 5'-CAGAGGTTTTGAGCACCCTT-3';

扩增长度 297bp。

PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,以 Bio-Rad Doc Gel2000 采集图像。

2 结 果

2.1 形态学观察

原代培养的 MSC 细胞,4~6h 后开始贴壁,多呈纺锤形和圆形(图 1)。3~4 天后部分细胞呈集落生长,逐渐汇合成片,10~12 天基本铺满瓶底。传代后细胞不再呈集落生长,分布较均匀,呈扁平多角形、三角形、梭形等多种形态,圆形细胞逐渐减少,胞浆透明。5-aza 处理后 1 周,细胞形态及排列开始出现变化,呈较为均一的长梭形,排列方向趋于一致。之后,部分细胞脱壁死亡,至 2~3 周左右,细胞数量较诱导前明显减少。诱导后 4 周,细胞稀落,周围伸出较多长的突起,体积大小不等,呈梭形、星形,胞浆粗糙,有纤维样结构存在,但未见有自发性搏动的细胞出现。



图 1 贴壁生长的原代 MSC × 100

维普资讯 http://www.cqvip.com

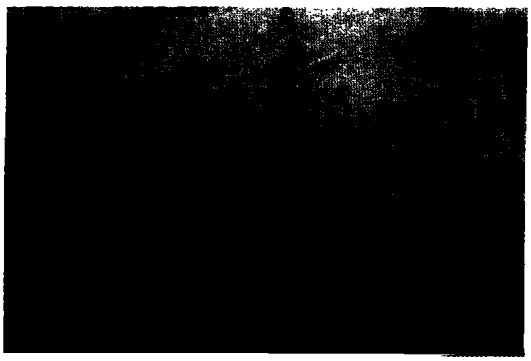


图 2 诱导后 MSC Desmin 染色 ×250



图 3 诱导后 MSCα - Sarcomeric Actin 染色 ×250

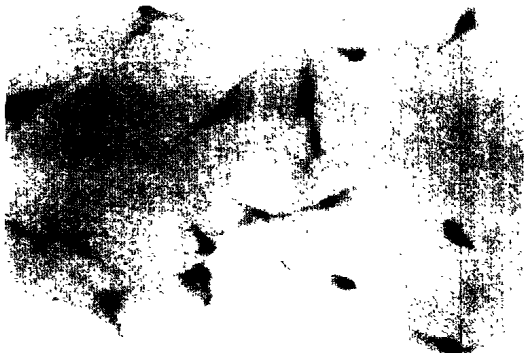


图 4 未诱导 MSC 的 α - Sarcomeric Actin 染色 ×100

2.2 免疫细胞化学染色

经 5 - aza 处理后 4 周，部分细胞胞浆 Desmin 及 α - Sarcomeric Actin 抗体染色呈棕黄色，阳性细胞体积较大，形态不规则，细胞周围形有较长的突起(图 2 - 图 3)。对照组未见阳性染色细胞(图 4)。

2.3 各组细胞阳性染色比例(MSC 分化率)的比较

C1 - C4 组：Desmin 染色阳性率分别为 29%、31%、36%、34.5%（$\chi^2 = 2.7922$，$P = 0.4248$）；α - Sarcomeric Actin 染色阳性率为 26%、28.5%、30%、32%（$\chi^2 = 1.8590$，$P = 0.6022$）。两种抗体染色后，各浓度组之间阳性率比较均无统计学差异（$P > 0.05$）。

T1 - T5 组：Desmin 染色阳性率分别为 21%、28%、36%、40%、37.5%（$\chi^2 = 22.4274$，$P = 0.0002$）；α - Sarcomeric Actin 阳性率 16%、25%、30%、34.5%、33%（$\chi^2 = 22.3497$，$P = 0.0002$）。二者 P 均 < 0.05，表明不同孵育时间对 MSC 的分化率有影响，在 48h 内 MSC 分化率随孵育时间的延长而有所提高。

2.4 RT - PCR 检测 GATA4 mRNA 及 cTnT mRNA 表达

MSC 诱导 2 周后，GATA4 mRNA 开始表达，持续至 8 周；cTnT mRNA 在诱导后 4 周才开始表达，8 周时表达更为明显。对照组各时点均无阳性条带出现(图 5、6)。

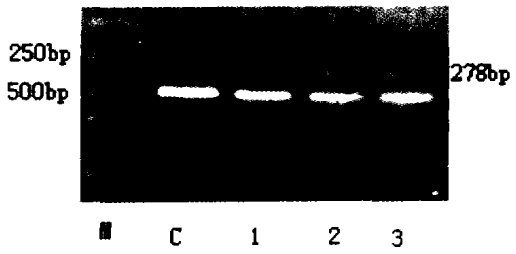


图 6 MSC 诱导后不同时间点 GATA4mRNA 的表达 M: Marker; 1: 2w; 2: 4w; 3: 8w; C: control

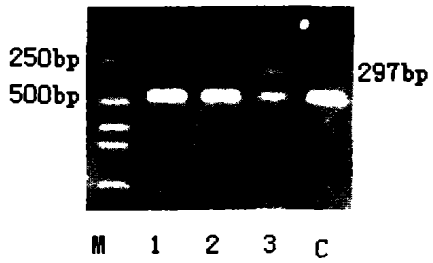


图 7 MSC 诱导后不同时间点 cTNTmRNA 的表达 M: Marker; 1: 2w; 2: 4w; 3: 8w; C: control

3 讨 论

骨髓基质干细胞是骨髓组织中除造血干细胞以外的另一类干细胞，具有向多种中胚层组织细胞如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、神经胶质细胞等分化的能力，故又称为骨髓间充质干细胞。1999 年，Makino S 等首次在体外用较低浓度(3μmol/L)5 - 氮胞苷诱导小鼠 MSC 分化为心肌细胞，但其分化效率较低[4]。为进一步探讨 5 - 氮胞苷诱导 MSC 分化的条件，我们比较了 5 - aza 不同浓度梯度及不同孵育时间对大鼠 MSC 的心肌细胞分化率的影响。结果表明经 3、5、10、20μmol/L 的 5

维普资讯 http://www.cqvip.com

－aza 处理后，均能使部分 MSC 向心肌细胞转化，虽然 5μmol/L 和 10μmol/L 组的转化率较高，达到 36%，但各组总体比较无统计学差异（$P>0.05$）。在本浓度梯度范围内 5－aza 浓度与 MSC 分化率之间并不存在直接的量效关系。10μmol/L 的 5－aza 与 MSC 分别孵育 6h，12h、24h、48h、72h，诱导 4 周后免疫细胞化学染色发现 Desmin 及 α－Sarcomeric Actin 蛋白均有表达，在 48h 内，随着孵育时间的延长，MSC 的转化率有增高趋势（$P<0.01$），超过 48h 后其转化效率不再增加。

5－aza 诱导 MSC 分化为心肌细胞的效率较低，文献报道在 30%～35%[5]。我们的研究中，虽然用了较高浓度的 5－aza 和较长孵育时间，但 MSC 的分化比例仍然较低，不足 50%。关于 5－aza 诱导 MSC 分化为心肌细胞的机制目前仍未明了。5－aza 是一种去甲基化药物，DNA 的甲基化可在转录水平调控基因的表达。目前认为可能是 5－氮胞苷降低了细胞 DNA 的甲基化水平，它和控制 MSC 向心肌细胞分化的特异启动子基因上的阻遏蛋白相结合，使后者发生去甲基化而发生构型变化，从而启动 MSC 的分化[5]。

细胞分化的主要标志是细胞内开始合成新的特异性蛋白质，其实质是细胞中固有基因的正常的、有序的、选择性的表达。MSC 在 5－aza 诱导后 4 周，Desmin 及 α－Sarcomeric Actin 均有不同程度的表达，对照组未见表达。这两种蛋白在横纹肌如心肌和骨骼肌存在，而不存在于平滑肌。GATA 是一个具有多样锌指结构的转录因子家族，在细胞的分化调控中起着重要作用。GATA－4 是心脏限定启动子的转录因子，调节心脏肌球蛋白和肌钙蛋白的表达，而后者是心肌细胞的特异性蛋白。我们的研究发现，在 5－aza 诱导 2 周后，GATA4mRNA 即有表达，持续至 8 周；cTnTmRNA 在诱导后 2 周无表达，4 周已有表达，之后更为显著。

综上述，经 5－aza 诱导后 MSC 可以出现肌系细胞的蛋白表达及心肌特异性基因 cTnTmRNA 转录，表明 MSC 具有向肌系细胞分化的能力，由于诱导后的细胞在形态及功能上与成熟的心肌还存在一定差异，是否具有心肌细胞特有的电生理特性及功能均尚待研究，因而还不能称为心肌细胞，但它已具有心肌细胞的部分特征，故我们称之为“心肌样细胞”。细胞的分化是一个渐进的过程，不同基因表达的启动时间及表达水平亦存在一定的差异。

参 考 文 献

[1] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent ceells from marrow can serve as long－lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995;92(11):4857－4861.

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

[3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potentiall of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999;284:143－147.

[4] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro[J]. J Clin Invest, 1999;103:697－705.

[5] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from msenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. Artif Organs, 2001;25(3):187.