维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0463－04

骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞的初步实验观察

吕铁伟[1]，田　杰[1]，朱　静[2]，钱永如[1]

(1.重庆医科大学儿科学院心内科;2.重庆医科大学儿科学院儿科研究所,重庆　400014)

【摘　要】目的:初步观察 MSCs 体内诱导分化为心肌细胞的能力。方法:从大鼠双侧股骨骨髓获得 MSCs,在体外纯化、扩增后,DAPI 进行细胞标记,然后注射到急性心肌梗塞模型鼠和正常大鼠的心肌组织内,饲养 2～4 周后,处死动物在注射点获取心肌标本,初步采用 HE 染色和电镜观察形态学的方法对分化的心肌细胞进行鉴定,并用免疫组化法从组织学上对转化心肌细胞进行心肌特异性抗原的检测。结果:MSC 进行 DAPI 的标记效率高,电镜观察与宿主心肌细胞间形成了闰盘,组化检测有心肌特异性抗原的出现。结论:在宿主心肌组织内,MSCs 具有分化为心肌细胞的能力。

【关键词】骨髓间充质干细胞(MSCs);心肌细胞;诱导分化

【中国图书分类法分类号】Q813.11　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－09－09

An experimental study on mesenchymal stem cells differentiated into cardiomyocytes in vivo

LU Tiewei, et al

(*Department of Cardiology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the ability of mesenchymal stem cells differentiated into cardiomyocytes in vivo. *Methods*: MSCs isolated form rats bilateral tibias were purified, expanded in vitro culture, labeled with DAPI, then injected into the myocardium of the recipients(including acute myocardial infraction and normal rats). The hearts were harvested 2～4 weeks after implantation. Morphology of the differentiated cardiomyocytes was identified using HE stain and electron microscopy. Cardiac－specific antigen was detected using immunohistochemistry. *Results*: Viable cells labeled with DAPI can be identified in host myocardium at all time points after implantation. Implanted MSCs showed the growth potential in myocardial environments, after 4 weeks, donor cells derived from MSCs demonstrated myogenic differentiation with the expressing of myosin heavy chain. Donor cells demonstrated cardiomyocytes phenotypes with the expressing of cardiac－specific antigen Cx43. Meanwhile, electron microscopy examination demonstrated the existence of intercalated disks between donor cells and host cells. *Conclusion*: MSCs can differentiate into cardiomyoytes in host myocardial microenvironments.

【Key words】Mesenchymal stem cells; Cardiomyocytes; Differentiation

Pittenger 等[1]发现骨髓中存在另一种干细胞即骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs),其具有干细胞自我更新和多向分化的特性。在特定的条件下,可向骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经细胞方向分化;Shinji 等[2]报道 MSCs 在体外培养的过程中,加入诱导剂 5－氮胞苷(5－aza)后,可使之转化为心肌细胞,并从形态学、电生理特性上得以证实。而本实验中,将纯化、扩增的 MSCs 直接植入到心肌组织内,观察其在体内分化为心肌细胞的能力并给予初步的鉴定。

作者介绍:吕铁伟(1973－　),男,硕士,主要研究方向:小儿心血管疾病。

基金项目:重庆市科委资助项目,编号:渝科发计字[2001]54－40。

1　材料与方法

1.1　材料

实验动物:Wistar 雄性大鼠 8 只,体重 180～250g,购于重庆第三军医大学大坪医院实验动物中心。小牛血清(杭州四季青),DMEM 高糖培养基(Hyclon),胰蛋白酶(上海博亚),DAPI(生物晶美),免疫组化试剂(Santancruz).

1.2　方法

1.2.1　MSCs 的分离、纯化与扩增

用异戊巴比妥钠(用量 10mg/kg)腹腔内注射麻醉 Wis-

维普资讯 http://www.cqvip.com

tar 大鼠,严格无菌条件下取出其双侧股骨,用 DMEM 培养基对骨髓腔进行反复冲洗,将冲洗液进行离心(1500r/min)5min,弃去上清液,加入培养基混悬细胞,移入培养瓶,放入 CO_2 孵箱进行培养;用贴壁筛选法对 MSCs 进行纯化,每 3 天换 1 次液,经数次换液后基本上为纯化的 MSCs。MSC80% 融合时,用浓度为 0.02% 的 EDTA 和 0.25% 的胰酶以 1:1 的比例混合进行消化传代。

1.2.2 MSC 的细胞标记

在细胞移植前,将 DAPI 以 50μg/ml 的浓度加入培养基中,与细胞共同孵育过夜,用 PBS 缓冲液漂洗至少 6 次以洗掉未结合的 DAPI,在用酶消化后离心收集细胞,加入 DMEM 培养基制成细胞悬液以备用。

1.2.3 大鼠急性心梗模型的建立和细胞移植[3]

将成年大鼠随机分为细胞移植组和正常对照组。用异戊巴比妥钠 20mg/kg 腹腔注射麻醉,行胸骨旁切口,在肋骨 3、4 肋间打开胸腔,暴露心脏,在动脉起始点下方 2~3mm 处结扎左冠脉前降支建立急性心梗模型,以远端供血区心肌组织颜色苍白和心电图上 S-T 段持续抬高作为模型制作成功的标志。随后用微量注射器吸取标记好的细胞悬液 150μl(含细胞数为 1×10^6)注入梗死区的心肌组织,而对照组则注射到正常鼠的心肌组织中,常规关闭胸腔。术后单笼饲养,抗感染治疗。

1.3 结果观察

1.3.1 细胞形态及标记的观察

用倒置显微镜动态观察 MSCs 在不同代数和不同时期的形态变化,同时用荧光显微镜观察 DAPI 标记好的 MSCs 及标记效率。

1.3.2 电镜观察

将做完细胞移植的 Wistar 大鼠饲养 4 周后,过量麻醉处死,取出心脏,用戊二醛进行常规固定,在注射点切取心肌组织,制成切片,经过脱水、漂洗、染色等步骤制成超薄切片,进行电镜观察。

1.3.3 免疫组化检测

处死动物,取出心脏,在标记点做冰冻切片。按照免疫组化的常规操作步骤,对 MHC(肌球重链蛋白)、Cx43(心肌细胞连接蛋白)进行检测。二抗为 FITC(荧光素结合抗体)。

2 结 果

2.1 MSC 的形态观察及细胞标记

对通过骨髓腔冲洗获得的细胞进行培养,4h 后可见 MSC 贴壁,其中悬浮的圆形细胞为幼稚红细胞。24h 后大部分 MSC 均已贴壁,其形态为梭形或短棒状,经过几次换液后,大部分红细胞被倒掉,而 MSC 形态则变为典型的梭形或纤维状,立体感强、折光性好、数量可(见图 1)。用 DAPI 进行细胞标记后,移至荧光显微镜下观察可见所有 MSC 均已标上蓝色荧光。该方法标记效果好,标记效率高(见图 2)。



图 1 培养 10 天的 MSC,细胞已均匀铺满瓶底,镜下观察呈纤维状平行排列,可进行消化传代。其中仍有少量造血干细胞。倒置显微镜观察(10×10)

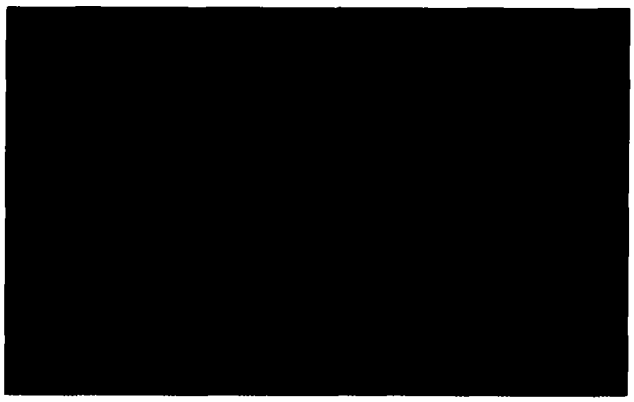


图 2 DAPI 标记的 MSC,镜下可以看到显蓝色荧光的细胞,标记效果好,标记效率高。荧光显微镜观察(10×10)



图 3 心肌细胞切片 HE 染色的镜下观,可及植入的细胞核大,胞浆内容物少,核/浆比例大,为幼稚细胞表型。普通光学显微镜观察(10×10)

维普资讯 http://www.cqvip.com

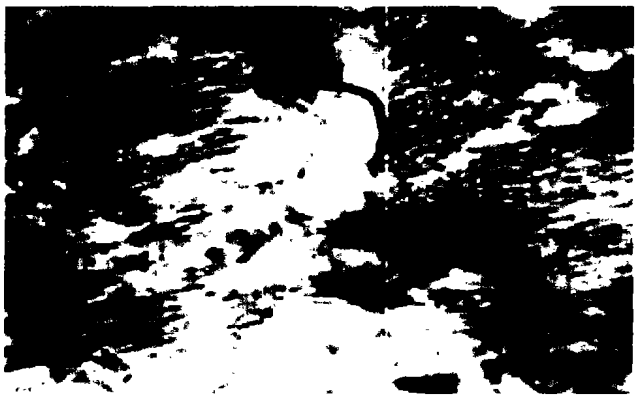


图 4 心肌细胞的电镜照片,镜下可见闰盘的存在,植入细胞电镜下可见线粒体,肌丝排列比较规则(× 50000)

2.2 电镜观察

饲养 4 周后,处死动物,取心肌标木,做电镜观察,结果显示在细胞移植处有闰盘的形成,移植细胞线粒体丰富,肌丝排列比较规则(见图 4);同时在该处做组织冰冻切片,发现有荧光的存在,证明移植细胞在宿主心肌组织中能够成活,并与宿主心肌细胞形成了细胞连接;做冰冻切片的 H-E 染色可见移植的细胞淡染,核浆比例大,为非成熟细胞的表型(见图 3)。

2.3 免疫组化检测

细胞移植 2 周后,处死动物,在注射点取心肌组织做冰冻切片。对移植组和对照组同时进行免疫组化检测,发现两组均有 MHC 的表达,而没有 Cx43 的表达,证明 MSC 已向成肌细胞方向分化,但尚未有分化为心肌细胞;4 周后进行免疫组化检测,则发现既有 MHC 又有 Cx43 的表达,证明 MSC 已分化为心肌细胞(见图 5、6)。

3 讨 论

心肌梗塞、心肌病、终末期心力衰竭等心血管疾病严重地威胁人类的健康,其根本原因是功能性心肌细胞的减少,临床上的治疗有限,而细胞移植术则为该类心血管疾病的治疗提供了一种全新的治疗策略,即应用组织工程技术将 MSCs 移植到病损的心肌组织内,使之转化且替代原来的心肌细胞,重建心肌的结构,使衰竭的心功能得到恢复,达到根治的目的。该实验的完成为其在临床的应用打下了一定的基础。



图 5 免疫组化法对 MHC 的检测。因 FITC 和 DAPI 的激发波长不同,FITC 在蓝紫光的激发下呈黄绿色,而 DAPI 在紫外光的激发下呈蓝色。左图显示出 MHC 的表达,右图显示标记荧光的移植细胞。两图为同一视野,结合起来说明植入的细胞在体内出现了 MHC 的表达,证实其已向成肌细胞分化。(10× 10)

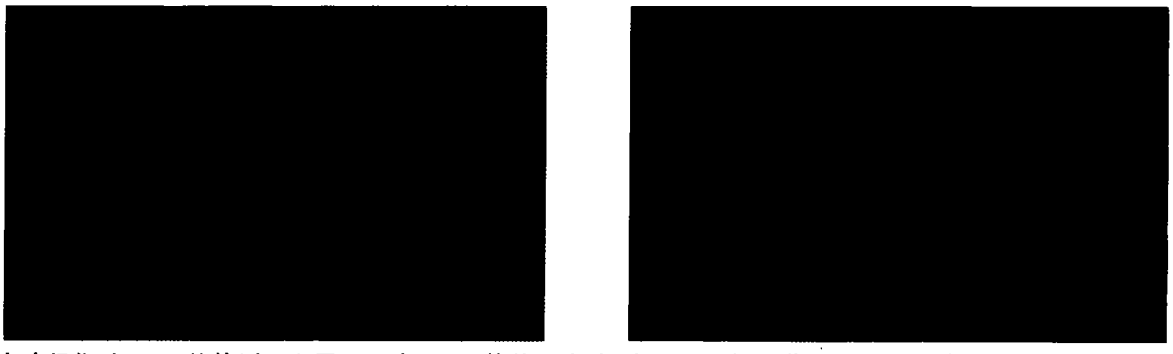


图 6 免疫组化对 Cx43 的检测。左图显示出 Cx43 的特异表达,右图显示标记荧光的移植细胞。两图为同一视野。证实 MSC 在体内已向心肌细胞分化。(10× 10)

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验将分离获得的 MSCs 不经过体外诱导，而是直接移植到成年鼠的急性梗死心肌区域和正常鼠的心肌组织中，可以观察到 MSCs 在心肌组织内得以存活，并同宿主心肌细胞间形成了细胞连接，组化检测有心肌特异性抗原的出现，说明其已转化为心肌细胞。究其原因，可能为 MSC 有微环境依赖性诱导的特性，与心肌微环境中存在的信号肽、细胞因子、生长因子和细胞间特殊基质有关[4]。

本实验中细胞标记至关重要，我们采用 DAPI 进行标记，文献[5]报道 DAPI 孵育时间为 30min，而经过实践我们得出最佳的孵育时间为 3～4h，时间过短则标记强度不够，过长则已饱和而无意义。DAPI 为一种荧光染料，能与细胞核中的双链 DNA 结合而发挥标记的作用，在紫外光激发下，DAPI 在波长为 345nm 的条件下荧光强度最高，荧光显微镜观察细胞标记的效率高(几乎为 100%)，且对活细胞无毒副作用。

电镜结果显示移植细胞与宿主心肌细胞间有闰盘的存在，证明两者间存在电生理一致性及机械收缩同步性的物质基础[4]。免疫组化检测是 MSCs 分化为心肌细胞的组织学标志。MSCs 在体内微环境的诱导下两周以后即出现 MHC 的表达，显示其已向成肌细胞方向分化；而 Cx43 是心肌细胞的细胞连接蛋白，为心肌细胞所特有，在移植四周后出现 Cx43 的特异表达，说明其已分化为心肌细胞。

MSCs 植入受体心肌组织后，在体内微环境的诱导下，从形态学和组织学上证实其已初步分化为心肌细胞，但其是否具备心肌细胞的电机械联系及舒缩等功能，能否对衰竭的心肌进行修复并改善衰竭的心功能等问题，需进一步进行实验研究。同时，可对心肌组织内微环境诱导的调控机制、基因水平的整合、有否差异表达基因的表达做更深入的研究，给本课题开拓了更大的外延空间。

参 考 文 献

[1] Pittenger MF, Packay AM, Beck SC, et al. Multilinage potential of adult human mesenchymal stem cell[J]. Sciencse, 1999;284:143－147.

[2] Shinji M, Keiichi F, Shunichirou M, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow strowal cells in vitro[J]. Clin Invest, 1999;103(5):697－705.

[3] Jih SW, Dominique ST, Edger C, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001;122:699－705.

[4] Jih SW, Dominique ST, Jacques G, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2000;120:999－1006.

[5] Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, et al. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2001;121:871－878.

(上接第 462 页)

growth factor and interleukin－6 in paracrine tumor－stromal cell interactions in multiple myeloma[J]. Blood, 2000;95(8):2630－2636.

[4] Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al. Down－regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c－src[J]. J Biol Chem, 1998;273(2):1052－1057.

[5] Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130－mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2000;275(14):10561－10566.