DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.022
526 第26卷第6期 2004年3月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 26, No. 6 Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0526-04

5-氮杂胞苷诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化过程中PPARγ表达及其作用

林先和,李隆贵 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨5-氮杂胞苷诱导骨髓间充质干细胞(MSC)分化过程中PPARγ的表达情况及其在细胞分化过程中的作用。方法 利用原代培养小鼠MSC,5-氮杂胞苷诱导分化;脂质体转染法,将pEGFP-N1-PPARγ2表达质粒转入MSC中,G418筛选,RT-PCR检测PPARγmRNA表达,免疫组化检测myosin及PPARγ表达。油红O染色检测细胞内脂滴。结果 MSC在未诱导时不表达PPARγ,经5-氮杂胞苷诱导后,多数细胞向成肌细胞分化,部分细胞表达PPARγ且向成脂肪细胞分化;pEGFP-N1-PPARγ2转染成功的细胞均分化为脂肪细胞。结论 5-氮杂胞苷不仅诱导MSC向成肌细胞分化,也诱导其向成脂肪细胞分化;其诱导MSC向成脂肪细胞分化可能与PPARγ表达有关。

关键词:间充质干细胞;诱导;PPARγ
中图法分类号:R329.2;R394.2 文献标识码:A

PPARγ expression and its effects on the differentiation of mesenchymal stem cells induced by 5-Azacytidine *in vitro*

LIN Xian-he, LI Long-gui (Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of peroxisome proliferator-activated receptorγ (PPARγ) and its roles in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by 5-Azacytidine. **Methods** 5-Azacytidine was used to induce the differentiation of primary cultured mesenchymal stem cells. The eukaryotic expression plasmid vector pEGFP-N1-PPARγ was transfected into MSCs with lipotransfection method followed by G418 selection. The expression levels of PPARγ mRNA were detected by RT-PCR. Immunohistochemistry and Western blot were employed to study the protein expression of PPARγ. Lipid droplets in the cells were stained with Oil Red O. **Results** No expression of PPARγ mRNA was found in undifferentiated MSCs. After induction by 5-Azacytidine, partial MSCs expressed PPARγ and differentiated into lipoblasts. MSCs, transfected with pEGFP-N1-PPARγ2, differentiated into adipocytes. **Conclusion** 5-Azacytidine can induce the differentiation of MSCs into myoblasts and lipoblasts, which may be related to the expression of PPARγ.

Key words: mesenchymal stem cell; induction; PPARγ

来源于中胚层的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是多能干细胞,具有多向分化的潜能,可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞及肌腱细胞等多种细胞。目前广泛用来诱导MSC向成肌分化的诱导剂主要是5-氮杂胞苷,其机制可能与5-氮杂胞苷使调节细胞分化的看家基因去甲基化有关。近期已经有人应用5-氮杂胞苷成功地将体外培养的骨髓间充质干细胞诱导成心肌细胞,分化后的心肌细胞能自主搏动,且表达心肌特异性基因[1]。

PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)是调节细胞分化的重要转录因子,能促进MSC向脂肪细胞分化,抑制MSC向成肌细胞分化[2]。然而,在5-氮杂胞苷诱导MSC分化过程中,PPARγ的表达情况及其作用少见相关报道。

本研究拟用培养小鼠MSC作为实验材料,应用5-氮杂胞苷诱导MSC分化,检测其分化过程中PPARγ的表达变化,探讨其在MSC分化过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

培养基和添加成分:DMEM/低糖培养基、优质胎牛血清购自Hyclone公司;动物:6~8周龄BALB/c纯系雄性小鼠100只,体质量(15±5) g,购自本校实验动物中心;诱导添加剂:5-氮杂胞苷购自Sigma公司;检测试剂:抗骨骼肌肌球蛋白单抗(myosin)购自北京中山生物技术公司,PPARγ抗体购自Santa公司;S-P免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒,福州迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建及转染 将pCAG-PPARγ2表达质粒(加

作者简介:林先和(1965—),男,安徽省望江县人,博士研究生,主治医师,主要从事心力衰竭方面的研究。电话:(023)65230731

收稿日期:2003-11-14;修回日期:2004-01-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

拿大 Capone 教授惠赠)中的 PPARγ2 通过酶切回收, 构建组成 pEGFP-N1-PPARγ2 表达质粒, 用脂质体法转染 pEGFP-N1-PPARγ2 至 MSC。G418 筛选, G418 筛选浓度为 400 μg/l, 维持浓度为 300 μg/L。应用增强型绿色荧光蛋白作为报告基因。

1.2.2　鼠骨髓间充质干细胞的分离、原代培养[3]　选用健康 BALB/c 纯系小鼠, 颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 5 min 后, 无菌条件下取出股骨和胫骨, DMEM /低糖培养基冲洗出骨髓, 以 1∶2 比例加到 Percoll(比重为 1.082)细胞分离液上, 500× g 离心 20 min, 取中间单核细胞层, 加入等量无血清培养基, 500× g 离心 5 min, 弃上清, 以含 10% 优质胎牛血清 DMEM /低糖培养基及青、链霉素各 100 U/ml 重悬细胞接种密度按每瓶 1× 10^6 /ml 接种于培养瓶内, 37 ℃, 5% CO_2 条件下常规培养, 24 h 后更换新培养基以去除悬浮细胞, 观察记录细胞贴壁生长情况, 以后每 3 d 换液 1 次, 0.5% 胰酶消化, 胎牛血清终止酶活性进行传代培养。

1.2.3　诱导细胞分化及分组　用 5-氮杂胞苷 3 μmol/L 在细胞融合至 60% ~ 70% 时开始诱导, 同时加入 5% 马血清促进细胞分化。作用 24 h 后, 去除诱导培养基, 以 0.01 mol/L PBS 液充分洗涤 2 次后, 改为完全培养基继续培养。细胞分组如下: ① 5-氮杂胞苷 3 μmol/L 诱导组, ② pEGFP-N1- PPARγ2 转染组, ③ pEGFP-N1- PPARγ2 转染后再用 5-氮杂胞苷 3 μmol/L 诱导组, ④ 对照组(不加诱导剂, 不转染基因)。

1.2.4　油红 O 染色[4]　将第二代 MSC 按 1.0× 10^5 /ml 接种于 6 孔培养板中爬片, 以 PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% 异丙醇油红 O 染液染色 10 ~ 15 min, 用 60% 乙醇分色至背景清晰, 自来水冲洗, 胞核淡染苏木精, 用 1% 磷酸氢二钠冲洗至变蓝, 甘油封片, 摄相记录。

1.2.5　免疫组化　采用 SABC 法, 按试剂盒说明进行, 设阴性对照, 以 0.01 mol/L PBS 代替抗小鼠 myosin 及 PPARγ 单克隆抗体。将第二代 MSC 按 1.0× 10^5 /ml 接种于 6 孔培养板中盖玻片上, 按上述方法行诱导实验, 在诱导后的 12 d 以 PPARγ 及 myosin 特异单抗, SABC 试剂盒(博士德公司)行免疫组织化学染色。

1.2.6　逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)　用一步法(Tripure)提取 MSC 的总 RNA, 测定其浓度。检测 PPARγ mRNA 表达。引物序列如下: PPARγ, 正向: 5′-CTCACAATGCCATCAGGTTT-3′, 反向: 5′-CTCTTGCACGGCTTCTACGG-3′, 片段长度 359 bp; 内参照物为 β-actin, 正向: 5′-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3′; 反向: 5′-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3′, 片段长度 462 bp, 以 TaKaRa 公司 RT-PCR 二步法试剂盒常规方法检测。程序: 第 1 步 RT, 50 ℃, 30 min; 99 ℃, 2 min; 94 ℃, 1 min, 1 个循环; 第 2 步 PCR, 94 ℃, 2 min, 1 个循环; 94 ℃, 30 s, 52 ℃, 30 s, 72 ℃, 2 min, 30 个循环; 72 ℃, 5 min, 4 ℃, 10 min。PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 紫外透射仪下观察, 以凝胶成像分析系统扫描。

1.2.7　形态观察　在诱导后不同时相点观察 5-氮杂胞苷诱导后 MSC 的形态变化。

2　结果

2.1　细胞分化

应用 5-氮杂胞苷 3 μmol/L 诱导 MSC 9 d 后, 部份 MSC 胞体明显增粗, 类粗杆状, 折光性好, 12 d 后, 呈管状形态并可见 2~3 个细胞之间有融合样情况发生, 至 14 ~ 16 d 可见有类肌管样细胞出现。但部分细胞胞浆内可见折光性强的脂滴, 且胞体变大, 胞浆丰富。

2.2　基因转染

pEGFP-N1 表达载体内构建有绿色荧光蛋白基因, 表达后能发出绿色荧光蛋白, 是转染成功的报告基因。经 G418 筛选后, 转染成功的阳性克隆表达绿色荧光蛋白, 在波长为 488 nm 蓝光激发下发绿色荧光(图 1)。

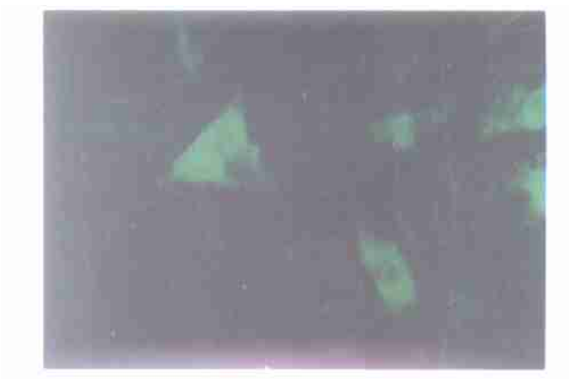


图 1　pEGFP-N1- PPARγ2 表达载体转染后绿色荧光蛋白表达 (× 200)

Fig 1　The expression of green fluorescent protein in MSCs after transfection with pEGFP-N1- PPARγ2 (× 200)

2.3　免疫组化鉴定

①A 组, 应用 5-氮杂胞苷 3 μmol/L 诱导 MSC24 h, 再换成完全培养基, 诱导后的第 3 天, 部分细胞 PPARγ 出现阳性表达, 诱导后 12 d, 部分细胞表达 myosin, 阳性细胞体积较其它细胞体积增大、增粗(图 2)。②B 组, pEGFP-N1-PPARγ2 转染后第 28 天免疫组化检测 G418 筛选的阳性克隆 PPARγ 表达呈阳性, 主要分布在细胞核周围(图 3)。③C 组与 B 组之间无明显差异。④D 组, 未经诱导的细胞其 myosin 及 PPARγ 表达均呈阴性。



图 2　5-氮杂胞苷诱导后部分细胞 **Myosin** 表达阳性 (× 200)

Fig 2　The positive expression of myosin in part of MSCs induced by 5-Aza (× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图 3 pEGFP-N1- PPARγ2 表达载体转染后细胞核周围 PPARγ 环状阳性表达 (SABC× 100)

Fig 3 The expression of PPARγ around cellular nuclears in MSC transfected with pEGFP-N1- PPARγ2 (SABC× 100)

2.4 油红 O 染色

A、B、C 三组细胞胞浆内均可见圆形折光脂滴形成，经油红 O 染色可见 A 组仅有部分细胞胞浆内有脂滴形成，脂滴数量较少，B、C 两组几乎所有细胞胞浆内有大量脂滴形成，脂滴分布在胞浆内靠近胞核处，部分脂滴相互融合(图 4、5)。D 组细胞内未见红染脂滴。



图 4 pEGFP-N1- PPARγ2 表达载体转染后细胞胞浆内脂滴形成 (油红 O 染色× 100)

Fig 4 The lipid droplet in cytoplasm of MSCs after transfection with pEGFP-N1- PPARγ2 (oil red staining× 100)

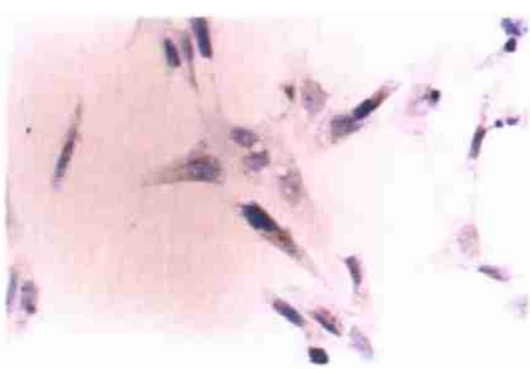
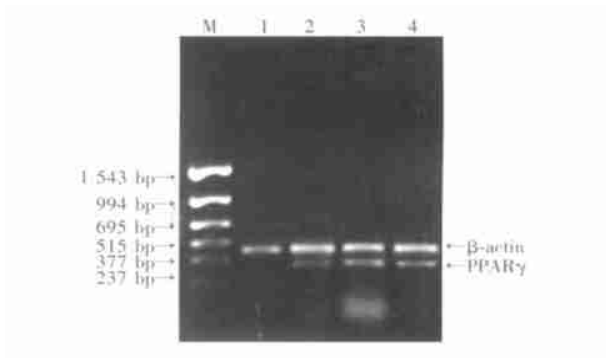


图 5 5-氮杂胞苷诱导 MSC 分化后部分细胞胞浆内脂滴形成 (油红 O 染色× 100)

Fig 5 The lipid droplet in cytoplasm of part of MSCs induced by 5-Aza (oil red staining× 100)

2.5 RT-PCR 结果

D 组 PPARγmRNA 未见表达；A、B、C 组 PPARγmRNA 表达均呈现阳性，见图 6。



M: Marker; 1: D group; 2: A group; 3: B group; 4: C group

图 6 小鼠 MSC PPARγ mRNA 表达变化

Fig 6 Changes of expressions of PPARγ mRNA in mouse MSC

2.6 形态观察

单纯应用 5-氮杂胞苷诱导后 9 d，部份 MSC 细胞胞体明显增粗，类粗杆状，折光性好；12 d 后，呈管状样形态并可见 2～3 个细胞之间出现融合样改变；至 14～16 d 可见有类肌管样细胞出现。

3 讨论

本研究显示 5-氮杂胞苷不仅诱导骨髓间充质干细胞向成肌方向分化，也有部分细胞向成脂肪方向分化，其细胞胞浆内有脂滴形成，油红 O 染色明显阳性。以往研究认为 PPARγ 基因表达是干细胞向脂肪细胞分化的标志[5]。本研究体外培养小鼠骨髓间充质干细胞在未经诱导前 PPARγ 表达呈阴性，经 5-氮杂胞苷诱导后部分细胞出现阳性表达。Mbalaviele 等[5] 从人骨髓中分离出骨髓间充质干细胞和 $CD34^+$ 的人造血干细胞，并检测到 $CD34^+$ 造血干细胞 PPARγmRNA 表达呈阳性，而人骨髓间充质干细胞不表达 PPARγmRNA；经向成脂肪方向诱导后，该细胞可表达 PPARγ。说明不同种属的骨髓间充质干细胞可能在未经诱导前不表达 PPARγ，但经过诱导剂诱导后，该基因出现阳性表达。至于 PPARγ 在骨髓间充质干细胞中经 5-氮杂胞苷诱导后才开始表达，到目前为止，其机制尚不清楚，可能与 5-氮杂胞苷能使该基因去甲基化有关。

5-氮杂胞苷是一种 DNA 甲基化抑制剂，在肿瘤治疗中可抑制细胞的增殖，诱导细胞分化[6]。研究表明它可与 DNA 共价结合形成复合物从而导致 DNA 甲基在细胞分裂周期中进行性丢失，发挥去甲基化作用；而甲基化对于基因印记维持是必需的，5-氮杂胞苷作用后产生低甲基化作用可使印记丢失，使某些相关等位基因得以表达[7]。由于 MSC 兼有向成肌细胞及成脂肪细胞的分化潜能，推测其看家基因可能在甲基化位置中含有一个调控分化的位点并处于转录失活阶段，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

当5-氮杂胞苷作用后, 可能使 MSC 的相关基因发生低甲基化, 激活细胞分化相关调控基因表达, 启动向成肌细胞及成脂肪细胞的定向分化。本实验结果说明 5-氮杂胞苷虽广泛用来诱导骨髓间充质干细胞向骨骼肌及心肌分化, 但这种诱导是非特异性的。在一定程度上属于一种广谱诱导剂。

为了观察 PPARγ 在 MSC 分化中的作用, 我们采用 PPARγ 表达质粒转染 MSC, 然后再用 5-氮杂胞苷诱导, 可见转染成功的 MSC 不管使用 5-氮杂胞苷诱导与否均分化成为脂肪细胞, 胞浆内大量脂滴形成。结果表明, 一旦 PPARγ 在 MSC 中表达, 其成脂肪分化方向就已经确定, 再用 5-氮杂胞苷诱导不能改变其分化方向。

先前报道认为, 在成肌细胞中表达 PPARγ 能抑制其向肌肉细胞分化, 并能使其转分化为成熟的脂肪细胞, 说明 PPARγ 在诱导细胞分化不同特异性表型之间起到开关作用。Hunter 等[8] 利用 PPARγ 的配体格列酮, 前列腺衍生物 15 d-PGJ2 作用于小鼠 C2C12 细胞, 并用报告基因来检测肌肉特异性基因的表达, 结果显示, 在细胞分化过程中, 骨骼肌细胞特异性基因表达明显抑制, 而 PPARγ 表达却明显增强。

骨髓间充质干细胞的分化是一个极其复杂的过程, 受到诸多调节细胞分化的看家基因调控, 分化方向也不同。成肌细胞分化受到 MyoD、Myf5、myogenin、MRF4 等基因调控; 成骨细胞分化则主要由 Cbfa1 调控, 成脂肪细胞分化的调控基因为 PPARγ。研究表明, 骨髓间充质干细胞的分化是在多个转录因子的共同调控下进行的, 这些调控因子相互作用从而决定着细胞的分化方向。如抑制骨髓间充质干细胞中的 MAPK 的表达则导致 PPARγ 表达上调, 细胞向成脂肪方向分化, 向成骨方向分化则明显受到抑制。在 MSC 中稳定转染 PPARγ2 能抑制 Cbfa1 的表达。因此, 骨髓间充质干细胞分化过程中不是某个单一看家基因作用的结果, 而是诱导因子与抑制因子共同作用从而使其向某一特定方向分化[9]。至于这些基因之间是如何相互作用以及适当抑制 PPARγ 表达能否促使 MSC 向成肌细胞方向分化, 尚有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. C. R. Biol, 2002, 325(10): 1027-1038.

[2] Mueller E, Drori S, Aiyer A, *et al*. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41925-41930.

[3] 周进明, 邹仲敏, 郭朝华, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性及分化潜能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 58-61.

[4] Goodpaster B H, He J, Watkins S, *et al*. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained Athletes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(12): 5755-5761.

[5] Mbalaviele G, Amer Y A, Meng A, *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptorγ pathway inhibits osteoclast differentiation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14388-14393.

[6] Glover A B, Jones B L. Biochemistry of 5-Azacytidine: a review[J]. Cancer Treatment Reports, 1987, 71(10): 959-962.

[7] Robertson K D, Jones P A. DNA methylation past, present and future directions[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 461-467.

[8] Hunter J G, Delf M F V, Rachubinski R A, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptorγ ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor γ-dependent and-independent pathways[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 38297-38306.

[9] Dennis J E, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma[J]. Stem Cells, 2002, 20(3): 205-214.

(编辑　薛国文)

(上接 525 页)

表1　A 组与 B 组出血量、手术时间、创口愈合时间比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	出血量 (ml)	手术时间 (min)	创口愈合时间 (d)
A 组	25	97.20±16.46	20.84±3.90	44.20±9.97
B 组	25	18.20±9.12△	9.72±1.46△	14.60±4.69

与 A 组比较, △: $P<0.01$

3　讨论

对严重烧伤合并吸入性损伤患者实施小切口气管造瘘术是一种安全、快速、简便的手术方法[3], 所需手术器械少, 床头即可施术, 因术中横行切口小, 不需过多分离皮下组织和切断气管环, 具有操作方便迅速、出血少、创面愈合快等优点, 值得在临床进一步推广应用。

本手术方法所用气管扩张钳、导丝、深静脉穿刺针、腹水穿刺针套管等可消毒反复使用, 只需另备 Pertax 气管套管(前贸公司供), 便可再次穿刺造口, 其在急救及远期效果等方面均具有较大优势。

操作中应注意以下几点: ①皮肤切开后要仔细止血, 切口大小以能容纳气管套管为宜。多在第 2 至第 4 气管软骨环的范围内进行, 气管软骨环前方的重要结构为甲状腺峡部, 造瘘时可能造成该部轻微损伤, 由于实施该术时间较短, 置管后立即向套管套囊内充气, 并迅速经套管吸出气管内血液及吸入物, 不至于造成太大危险。②沿导丝置入一级扩张器(即腹水穿刺针套管)及气管套管时应边退导丝边送入, 以免导丝被挤压变形成角, 使置入困难。③扩张钳伸入气管后其弯曲部应指向远端, 扩张方向与纵轴垂直, 不可偏移。④一次性套管套囊周围易聚集气道分泌物, 如果带管时间较长, 可在术后 5~7 d 更换为可煮沸消毒之金属套管。

关键词: 微创气管造口术; 严重烧伤吸入伤患者
中图法分类号: R615; R644　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Winkler W B, Kamik R, Seelmann O, *et al*. Bedside percutanous dilational tracheostomy with endoscopic guidance: experience with 71 ICU patients [J]. Intensive Care Med, 1994, 20: 476-479.

[2] 杜　谦, 王天成, 刘　会. 经皮穿刺气管切开术在神经外科的应用(附 21 例病例)[J]. 中国急救医学, 2003, 23(4): 261.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net