DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.022
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1423-04

论著

MyoD基因诱导骨髓间充质干细胞分化为成肌细胞的实验研究

张 勇[1],邹仲敏[1],郭朝华[1],周进明[1],王 劲[1],范文辉[2],罗成基[1],程天民[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;[2]附属西南医院神经内科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨MyoD基因诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)分化为成肌细胞的可能性。方法 利用脂质体转染方法,将真核表达的双顺反子质粒载体pIRES2-EGFP-MyoD转入MSCs中,G418筛选;用RT-PCR检测MyoD的表达,扩增产物纯化测序鉴定;荧光显微镜和激光共聚焦观察报告基因产物;免疫组化检测MyoD、myogenin、myosin、myoglobin、desmin的表达;电镜观察转染前后细胞超微结构的变化。结果 RT-PCR可检测出转染后细胞表达MyoD,扩增产物纯化测序与Gene Bank比较完全一致;荧光显微镜和激光共聚焦观察均可见绿色荧光;免疫组化检测MyoD、myogenin、myosin、myoglobin、desmin表达均为阳性;转染后的MSCs观察表现为较为成熟细胞的形态学特点,且胞浆中有丝状物结构。结论 MyoD基因可成功诱导体外培养的骨髓MSCs分化为成肌细胞,为进一步研究MSCs和成肌细胞促进创伤修复提供了实验基础。

关键词:间充质干细胞;成肌分化;MyoD;诱导
中图法分类号:R322.74;R329.21;R394.2 文献标识码:A

Experimental studies on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into myoblasts induced by MyoD gene *in vitro*

ZHANG Yong, ZOU Zhong-min, GUO Chao-hua, ZHOU Jin-ming, WANG Jin, FAN Wen-hui, LUO Cheng-ji, CHENG Tian-ming (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To explore the possibility of MyoD gene inducing bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to differentiate into myoblasts *in vitro*. Methods The eukaryotic expression bicistron plasmid vector pIRES2-EGFP-MyoD was transfected into MSCs with lipotransfection method followed by G418 selection. The expression of MyoD in the transfectants was detected with RT-PCR and the amplified, purified product was identified with sequence analysis. The reporter gene (Enhance green fluorescent protein, EGFP) was observed in the transfected cells under the fluorescent and the laser cofocal microscopes. Immunohistochemical methods were employed to study the expressions of MyoD, myogenin, myosin, myoglobin and desmin. The ultrastructure changes of cells before and after transfection were observed with electron microscopy. Results The expression of MyoD was detected in the transfected MSCs with RT-PCR and the amplified, purifed product was in same sequence with that from Genbank. Green fluorescence was observed in the transfectants under the fluorescent and the laser cofocal microscopes. Immunohistochemical methods indicated the expressions of MyoD, myogenin, myosin, myoglobin and desmin respectively in the transfected cells. The transfected cells were of characteristic of filaments in their cytoplasm. Conclusion MyoD gene could induce cultured MSCs to differentiate into myoblasts, thus providing an experimental foundation for trauma repair.

Key words mesenchymal stem cells; myogenesis; MyoD

骨髓中除了造血干细胞外,还存在着间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs),多潜能的MSCs有可能为骨、软骨和肌肉等组织的修复提供强大的备用库。正常情况下成肌细胞(Myoblasts)来源于肌干细胞(Muscle stem cells),成肌细胞再分化为肌细胞。用5-氮杂胞苷可将MSCs体外诱导为成肌细胞[1],但应用质粒MyoD转染方法调控MSCs为成肌细胞尚待研究,为此我们进行以下实验尝试了这种可能性,为进一步研究MSCs和成肌细胞促进创伤修复提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及来源

IMDM培养粉、特级优质胎牛血清(FBS)、胰酶、G418:Hyclone公司;Percoll:Sigma公司;脂质体DOTAP:Roche公司;PCR Marker:TakaRa公司;兔抗小鼠-MyoD、myogenin:Santa cruz公司;兔抗小鼠-myosin、myoglobin、desmin:北京中山生物技术有限公司。

1.2 标本来源

取自附属西南医院正常健康人髂骨骨髓。

1.3 实验方法

1.3.1 MSCs分离、培养、扩增与鉴定 参照文献[2~5]进行分离、培养、扩增,方法略作改进:①将贴壁时间延长至24 h后换液去掉悬浮细胞;②将胰酶消化时间缩短至5~7 min,常规传代培养扩增备用。按照本所建立的方法进行鉴定[3,5]。

1.3.2 脂质体DOTAP转染MyOD入MSCs 取传代后的指数生长期MSCs(第3代),当其融合至60%~80%时转染。5 μl DNA(53 μg/ml)+20 μl 转染缓冲液与15 μl DOTAP+35 μl 转染缓冲液混合,室温下轻轻混均,1 200 r/min离心30 s,静置15 min,将之缓慢配入含10% FBS的IMDM中;将培养瓶中培养液吸弃,0.01 mol/l PBS清洗1次,最后将含有转染体系的培养液加入培养瓶中,37℃、5% CO_2 培养箱温育24 h,之后换液。将G418按800 μg/ml浓度加入培养瓶中约1月,半月时换液1次,

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G1999054205)
作者简介:张 勇(1967-),男,四川省武胜县人,博士,主治医师,讲师,主要从事干细胞基础方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754000-73059
收稿日期:2002-05-20;修回日期:2002-08-20

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

维持 G418 浓度不变，将筛选后的细胞扩增备用。

1.3.3 RT-RCR 验证 MyoD 的表达，产物纯化测序

1.3.3.1 RT-PCR 引物设计

Left primier CCGTGGCAGCGAGCACTACA

Right primier GTCTGGGTTCCCTGTTCTGTGT

引物扩增的片段预计为 329 bp，引物由上海生物工程公司合成。

1.3.3.2 RNA 的提取 取 5 瓶 50 ml 培养瓶中的转染细胞常规方法进行，640 型分光光度计测定 RNA 含量，－70 ℃保存。

1.3.3.3 逆转录反应 常规方法进行。

1.3.3.4 PCR 条件 94.5 ℃预变性 5 min，加 Taq 酶 1 μl，PCR 仪上扩增：94.5 ℃变性 60 s，58 ℃退火 60 s，72℃ 延伸 180 s，共 37 次循环。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。Gel Dco2000 型凝胶图像分析系统成像。

1.3.3.5 产物纯化测序 在暗箱式紫外透射仪下切下 PCR 产物，常规方法纯化，产物纯化后交上海生物工程公司测序。

1.3.3.6 阴性对照 取 5 瓶未转染的 MSCs 为标本，上述相同方法行 RT-PCR。

1.3.4 增强型绿色荧光蛋白(Enhance green fluorescent protein，EGFP)报告基因的表达 将普通盖玻片泡酸、洗净、烘干后，放入直径 6 cm 培养皿中，$^{60}Co\gamma$ 射线常规照射消毒。经转染、筛选、扩增之细胞从培养瓶中用 0.25% 胰酶消化，以约 1×10^5/ml 的浓度，接种于培养皿中，24 h 后吸弃培养液，0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次，取出盖玻片，置于载玻片上，在 488 nm 的蓝光激光激发下，分别用荧光显微镜和激光共聚焦观察 EGFP 的绿色荧光。

1.3.5 免疫组化检测 MyoD 及下游蛋白的表达 将培养皿中的盖玻片取出，0.01 mol/L PBS 漂洗 2 次，95% 乙醇固定 15 min；蒸馏水漂洗，置于 0.01 mol/L PBS 10 min；一抗(1∶100)孵育 4 ℃过夜；0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min，EnVision™(二抗及三抗)孵育 10～30 min；0.01 mol/L PBS 漂洗，色源底物溶液(3,3-二氨基联苯胺)孵育 10 min；蒸馏水漂洗，复染及封片。

1.3.6 转染前后细胞超微结构观察 取 50 ml 培养瓶中几近长满的 MSCs 及转染后的细胞，常规消化离心，0.01 mol/L PBS 漂洗，3% 戊二醛固定后送透射电镜检测。

2 结果

2.1 MSCs 分离、培养与扩增

MSCs 基本上为梭形的成纤维细胞状形态，见图 1，传代培养后均匀分布生长，且形态更为纤长。

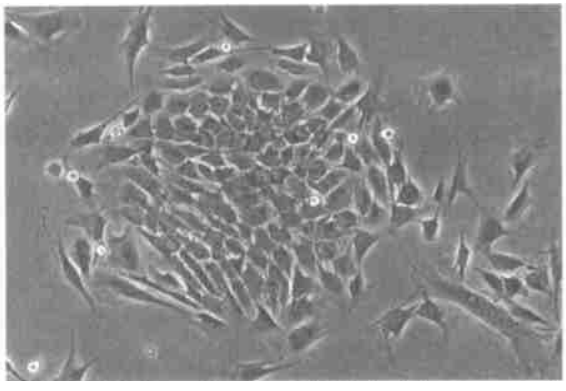


图 1 充质干细胞 (光镜× 132)

Fig 1 Mesenchymal stem cells (LM× 132)

2.2 脂质体 DOTAP 转染 MyoD 入 MSCs 并筛选

转染 24 h 后用 G418 进行筛选，筛选 4 h 后即可观察到细胞开始死亡，第 3 d 更加明显，以后随着时间的延长细胞死亡越多，至第 28 d 每瓶仅剩 3～5 个残存的集落，见图 2。将之消化培养扩增备用。

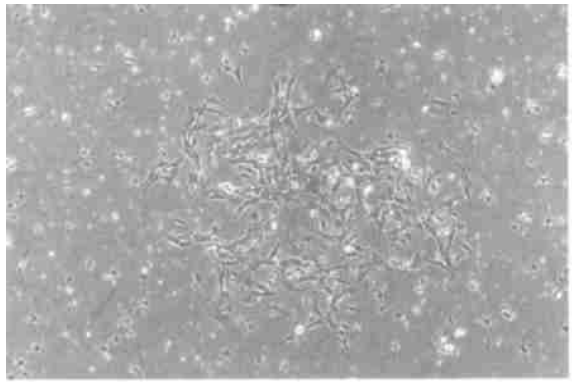


图 2 **G418 筛选(800 μg/ml)第 28 天的 MSCs 细胞** (光镜× 33)

Fig 2 MSCs selected with G418 (800 μg/ml) on the 28th day after transfection (LM× 33)

2.3 RT-PCR 检测 MyoD 的表达，产物纯化测序

在凝胶图像分析系统上可见转染后的 MSCs 表达 MyoD，而未转染的 MSCs 未见表达，见图 3。PCR 产物纯化测序结果与 GeneBank 比较，序列完全一致。

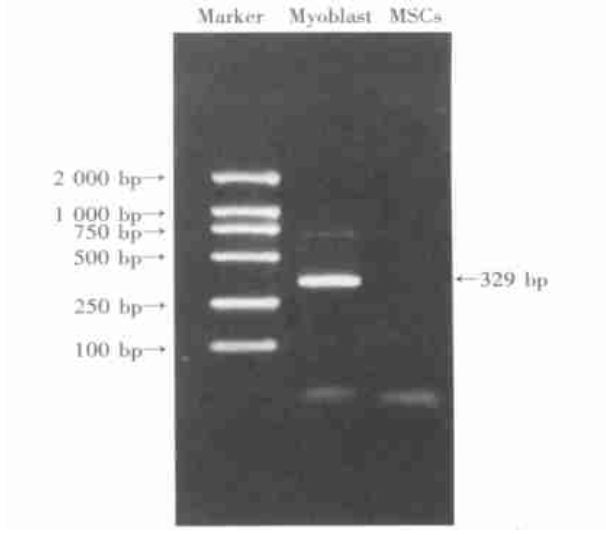


图 3 **RT-PCR 检测 MyoD 的表达**

Fig 3 Expression of MyoD in the transfected MSCs detected by RT-PCR

2.4 EGFP 报告基因的表达

荧光显微镜和激光共聚焦下均观察到转染后的 MSCs 胞体内有报告基因产物的绿色荧光，见图 4、5，表明报告基因 EGFP 成功地转入 MSCs 中。

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

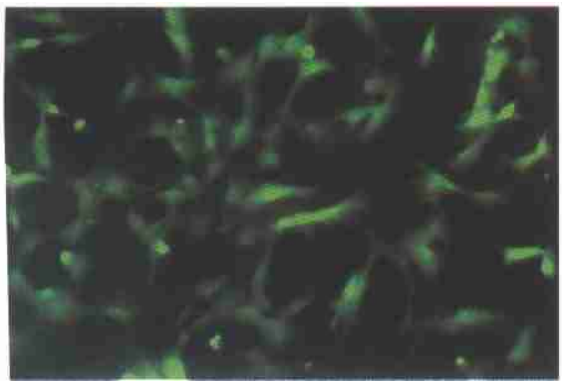


图 4　荧光显微镜下可见成功转染 MyoD 的 MSCs 发出绿色荧光　（光镜× 66）

Fig 4　Green fluorescence was found in transfected MSCs under fluorescent microscope　（IM× 66）

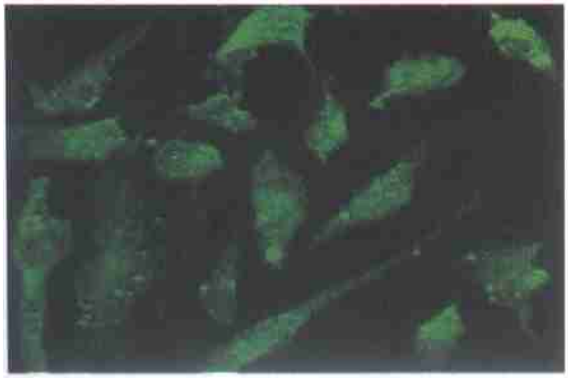


图 5　激光共聚焦下可见成功转染 MyoD 的 MSCs 发出绿色荧光　（光镜× 66）

Fig 5　Green fluorescence was found in transfected MSCs under laser cofocal microscope　（IM× 66）

2.5　免疫组化检测 MyoD 及下游蛋白的表达

转染 MyoD 的 MSCs 其 MyoD 表达阳性, 胞浆中可见棕褐色颗粒, 见图 6, 而对照组未见表达。下游蛋白 myogenin、myosin、myoglobin 、desmin 也分别呈阳性表达, 见图 7, 而对照组呈阴性表达。



图 6　**MyoD** 阳性的成肌细胞　（苏木精复染× 66）

Fig 6　MyoD positive myoblasts　（Haematine staining× 66）



图 7　**MSCs** 细胞 **myogenin** 表达阳性　（苏木精复染× 66）

Fig 7　Positive expression of myogenih in MSCs　（Haematine staining× 66）

2.6　超微结构

未转染的 MSCs 胞体较小, 核/浆比例大, 染色质较疏松, 核仁明显, 胞浆内细胞器不发达, 表现出早期细胞的特点; 而转染 MyoD 的 MSCs 胞体较大, 核/浆比例小, 染色质较致密, 胞浆内细胞器非常丰富, 并可见丝状物结构。

3　讨论

MyoD 是骨骼肌表达的生肌调节因子的重要组分, 单一的 MyoD 即足以使肌干细胞分化为成肌细胞。由于转染 MyoD 可以启动肌分化过程, 所以 MyoD 一直被当作最重要的成肌转录因子, 并且 MyoD 可激活肌肉基因转录, 使非肌细胞转变为肌细胞。MyoD 转化的细胞移植后, 参与再生的肌肉与卫星细胞来源的肌纤维形态学上完全一致[6]。这就是我们选择 MyoD 的原因。

基因转染包括短暂(或瞬时)转染和稳定(或永久)转染两种。前者被转染的基因的转录或复制可在 DNA 导入后 1～4 d 内进行, 而后者是将 DNA 整合到染色体中[8]。由于 MyoD 在成肌分化过程中仅仅起“发动者”的作用[6], 我们选择瞬时转染的方式。该方式又包括磷酸钙转染、电穿孔和脂质体介导的转染。电穿孔主要适用于悬浮细胞, 而脂质体介导的转染最简便, 重复性较好, 故选择之。影响脂质体转染效率的因素主要包括脂类的浓度、DNA 的浓度和温育时间[7], 根据文献[8] 我们掌握脂质体与 DNA 的比例为 3∶1。理论上讲, 温育时间超过 8 h 可能对细胞产生毒性作用, 而转染效率随温育时间的延长而提高, 血清对转染效率也有影响。由于 Roche 公司的脂质体是一种新型的脂质体, 且受血清影响不大, 我们选择温育的时间为 24 h, 最终获得成功的转染。

转染后的阳性克隆的筛选是一个必需的过程, 此过程至少在 1 月以上, 方法有二: ①G418 从较低的浓度逐渐增加进行筛选, 直至最后克隆耐受的最大浓度; ②直接将细胞放入能耐受的最大 G418 浓度, 即: “休克法”, 本实验采取后一种方法, 筛选至第 28 天时可见培养瓶中细胞死亡 90%以上, 仅残留 3～5 个集落, 1 月

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

后该集落在 G418 浓度为 800 μg/ml 的条件下仍然存在,这就是我们需要的阳性克隆。由于采用"休克法"细胞死亡较多,残存的细胞需要的营养成分相对较少,故筛选过程中我们仅换液 1 次。实践证明此种方法是可行的。

从转染的重组质粒 pIRES2-EGFP 结构上分析,启动子 PCMV IE 顺序启动目的基因 MyoD 和报告基因 EGFP 的表达,但 MyoD 和 EGFP 由 IRES 相连,并未融合,故筛选后的细胞发出绿色荧光,并不能完全证明 MyoD 已表达,这就需要行 MyoD 检测,我们用 RT-PCR 的方法从 RNA 的水平对 MyoD 进行了检测,结果证实转染后的细胞中含有 MyoD,而未转染的 MSCs 不含 MyoD;同时免疫组化也从蛋白质水平证实只有转染后的细胞胞浆中有 MyoD 蛋白颗粒,由此充分证明报告基因 EGFP 表达时,目的基因 MyoD 也就同时表达了。

在肌分化过程中,首先是成肌细胞的定向分化,以表达 myogenin 为标志[7];反之,细胞表达了 myogenin,则表明至少处于成肌细胞阶段,即 myogenin 可视为成肌细胞的特异标志之一[6]。MyoD 是肌分化的"发动者",但 MyoD 并非直接激活下游基因,而是首先激活 myogenin[9],紧接着才是 myosin、myoglobin 和 desmin 的表达,它们都是骨骼肌最早的成肌标志之一。同时,myosin 和 desmin 分别是微丝和中间丝家族中代表肌分化的成员[10,11],结合免疫组化的结果,我们提示透射电镜所见的丝状结构可能是以 myosin 和 desmin 为主的微丝及中间丝结构。

综上所述,我们分离培养纯化扩增 MSCs 后,将重组质粒 pIRES2-EGFP- MyoD 用脂质体介导的方法成功地进行了转染,经 G418 筛选,获得了成肌细胞的阳性克隆。表明 MSCs 在质粒 MyoD 的调控下可以定向分化为成肌细胞,为进一步观察 MSCs 及成肌细胞对肌损伤的修复作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Wakitani S, Saito T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1 417—1 426.
[2] Dennis J E, Merriam A, Awadallah A, *et al*. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(5): 700—709.
[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(10): 58—61.
[4] Bruder S P, Kurth A A, Shea M, *et al*. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 1998, 16(2): 1 551—1 562.
[5] 艾国平, 粟永萍, 闫国和, 等. 骨髓间充质干细胞的分离与培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 553—555.
[6] 邹仲敏, 程天民, 罗成基, 等. 肌形成及其基因调控的研究进展[J]. 中国科学基金, 2000, 14(3): 137-142.
[7] F. 奥斯伯, R E 金斯顿, J G 塞德曼等著. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 311-312.
[8] 郭晓东, 杜靖远, 郑启新, 等. TGF-β1 基因转染间充质干细胞的量效关系及安全性研究[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(2): 125—128.
[9] Hollenberg S M, Cheng P F, Weintraub H. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(17): 8 028—8 032.
[10] Capetanaki Y, Milner D J, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences[J]. Cell Struct Funct, 1997, 22(1): 103—116.
[11] Buckingham M E, Carvatti M, Minty A, *et al*. Skeletal muscle myogenesis: the expression of actin and myosin mRNAs[J]. Adv Exp Med Biol, 1982, 158: 331—334.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)12-1426-02

空回肠系膜血管淋巴管瘤 1 例

A case report of hemolymphangioma in mesentery of jejunoileum

李胜平[1], 韩仕碧[1], 唐小丽[1], 汪盛贤[2] (成都军区总医院: [1] 妇产科; [2] 病理科; 成都 610083)

患者, 女, 66 岁, 农民。因下腹部逐渐增大 4 月, 发现腹部巨大包块 5 d 于 2001 年 5 月 21 日入院, 病案号 256278。既往史: 99 年在外院因"右侧浆液性卵巢囊肿蒂扭转破裂出血, 行次全子宫及双附件切除术"。入院时彩超检查: 子宫体缺如, 宫颈隐约显示。盆腹腔见一 28 cm× 14 cm× 23.5 cm 的囊性占位, 壁薄, 上界达肝下缘, 占据整个腹腔。内可见多个条索状光带, 分隔状, 囊性暗区透声佳, 后壁回声增强, 彩色多普勒未见血流信号, 考虑包块来自右附件可能性大。因患者既往有"右侧卵巢浆液性囊腺瘤"病史, 在外院手术情况不详, 遂于 2001 年 5 月 25 日行剖腹探查术。

术中见子宫及双附件缺如, 空肠系膜上有一囊性多房性包块约 38 cm× 32 cm× 20 cm 大小, 质地较软, 色泽淡黄, 包膜完整, 活动度好, 并与小部分回肠系膜粘连。有部分与肠壁间粘连, 腹腔各脏器无粘连及转移结节。切开囊壁抽吸囊内液体约 3 500 ml, 淡黄透明。囊肿缩小后从蒂部将囊肿切除。病理报告:"空回肠系膜"血管淋巴管瘤, 局部囊壁平滑肌恶变(低恶性)。免疫组化结果: 瘤细胞 actin (结蛋白+++), vim(波形蛋白++), ker(角蛋白-)。术后患者恢复良好, 7 d 拆线出院。因拒绝化疗, 要求其门诊随访。

(下转 1429 页)

作者简介: 李胜平(1970—), 男, 湖北省孝感市人, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤耐药机制方面的研究。电话: (028)86570374

收稿日期: 2001-07-12; 修回日期: 2001-12-05

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