DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.010
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1148 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1148-03

乳鼠心肌成纤维细胞 MyoD cDNA 转染后的形态变化

王先梅[1],李震一[1],吴志峰[1],祝善俊[1],祝之明[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]附属大坪医院野战外科研究所高血压中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨运用MyoD基因转染使乳鼠心肌间质细胞转化为肌细胞的可能性。方法 MyoD基因是具有碱性螺旋-环-螺旋结构的生肌因子之一,用脂质体介导法将MyoD cDNA导入培养的乳鼠心肌间质细胞(主要是成纤维细胞)。结果 心脏成纤维细胞在导入MyoD cDNA 5 d后可见:①部分细胞形态发生改变,类似骨骼肌细胞,胞体伸展,胞浆颗粒增多;②经原位杂交证实:1.8%~10.9%的细胞有下游生肌分化标志即骨骼肌肌球蛋白重链mRNA的表达。结论 表明心肌成纤维细胞可转化为具有潜在功能的类骨骼肌细胞,提示在分子水平从心肌成形途径恢复心脏功能是有可能的。

关键词:MyoD基因;脂质体;成纤维细胞
中图法分类号:R329.24;R394.3 文献标识码:A

Morphological changes of myocardial fibroblasts of neonatal rat following transfection with MyoD cDNA *in vitro*

WANG Xian-mei, LI Zhen-yi, WU Zhi-feng, ZHU Shan-jun, ZHU Zhi-ming (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the possibility of converting cultured myocardial mesenchymal cells (mostly cardiac fibroblasts) of neonatal rat to skeletal muscle cells by the transfection with MyoD gene, one of the basic helix-loop-helix myogenic factors. Methods The plasmid-MyoD cDNA was transferred into cultured myocardial mesenchymal cells of neonatal rat with liposome-mediated method. Results Five days after the transfection, the myocardial fibroblasts showed that: ①Some of them were morphologically similar to skeletal muscle cells, cell body elongated and cytoplasmic particles increased; ②The expression of downstream myogenic differentiation marker (myosin heavy chain mRNA) was observed, in 1.8% to 10.9% of the transfected cells with *in situ* hybridization with specific MyoD cDNA probe. Conclusion The myocardial fibroblasts can be converted to "skeletal muscle like" cell with potential function. These results suggest that it is possible to restore cardiac function via molecular cardiomyoplasty.

Key words: MyoD gene; liposome; fibroblasts

MyoD基因家族具有碱性螺旋-环-螺旋(Basic helix-loop-helix, bHLH)结构,包括MyoD, Myogenin, myf-5, MRf/myf-6/herculin,可诱导非肌性细胞向肌性细胞转化[1]。MyoD仅在骨骼肌表达。基于心肌和骨骼肌具有相同的收缩装置,我们设想,使心肌间质细胞(主要为成纤维细胞)转变为具有潜在功能的类骨骼肌细胞,可能成为临床治疗心衰的另一种辅助方法。本实验利用外源性MyoD导入原代培养的心脏成纤维细胞,观察转染MyoD后心脏成纤维细胞肌球蛋白重链(MHC)的表达,探讨使心脏成纤维细胞转变为类骨骼肌细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 MyoD cDNA 表达质粒的提取、鉴定及纯化

PKK3/4(Amp^r)为含有1.8 kb MyoD的表达质粒,MyoD cDNA克隆于*Eco*RⅠ位点,它含有编码鼠骨骼肌蛋白的完整开放阅读框,该质粒为加拿大McMaster学院Rudnicki教授及C Ying女士惠赠。质粒的转化、提取、鉴定、纯化以及酶切片段的回收按常规方法进行。地高辛随机标记探针的制备按宝灵曼公司说明书提供的方法进行,采用斑点杂交方法进行检测。

作者简介:王先梅(1967—),女,安徽省天长县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心力衰竭方面的研究。电话:(023)68755000-74601

收稿日期:2000-01-25;修回日期:2000-05-04

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

1.2　细胞培养

无菌条件下, 取出生后 2～4 d Wistar 大白鼠(购于本校实验动物中心)心脏, 4 ℃生理盐水冲洗, 剪下心室组织放于 D-Hanks液中剪碎, 0.25%胰酶-0.01%胶原酶 II 消化, 每 10～15 min 收集 1 次细胞悬液, 共 6～7 次, 离心, D-Hanks 液洗涤 1 次, 将所得的全部细胞置于含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基的大培养瓶中, 5%CO_2 孵箱贴壁培养 20～30 min 后, 再贴壁 1 次, 弃细胞悬液后, 留在瓶底的细胞主要为成纤维细胞, 最后将成纤维细胞以 1× 10^6 的密度接种于 24 孔培养板中, 培养基组成为 15%小牛血清, 85%DMEM, 100 U/ml 的青霉素。待细胞长满瓶底后, 用 0.25%胰酶消化传代, 以保证细胞的数量和纯度。

1.3　脂质体介导的质粒 DNA 转染培养细胞(贴壁细胞转染方法)

转染前 24 h 将细胞消化, 重新接种于 24 孔板, 每孔细胞数约 3× 10^5 个。37 ℃ 5%CO_2 孵箱培养。转染当天, 在加入脂质体(Dosper, 购于宝灵曼公司)/DNA 之前更换培养基。准备不同比例的 Dosper/ DNA 混合物各 100 μl, 加入培养孔板的体系中, 轻轻摇动孔板使其充分混匀, 以避免局部 Dosper/DNA 浓度过高, 37 ℃ 5%CO_2 孵箱培养 6 h 后更换培养基(成份: 20%小牛血清, 80%DMEM, 100 U/ml 青霉素), 3～5 d 后可进行表达产物的检测。

1.4　原位杂交

运用原位杂交对表达产物骨骼肌肌球蛋白重链 mRNA 进行检测。

1.5　统计学处理

计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 阳性百分率与 DNA 量采用相关分析, 所有数据均在计算机 Excel 程序中处理。

2　结果

2.1　质粒酶切鉴定

碱裂解法提取质粒 PKK3/4, 经 *EcoR* I 酶切后电泳有 2 条 DNA 区带, 分别为 1.8 kb 和 5.6 kb, 前者为 MyoD cDNA, 后者为质粒载体, 见图 1。

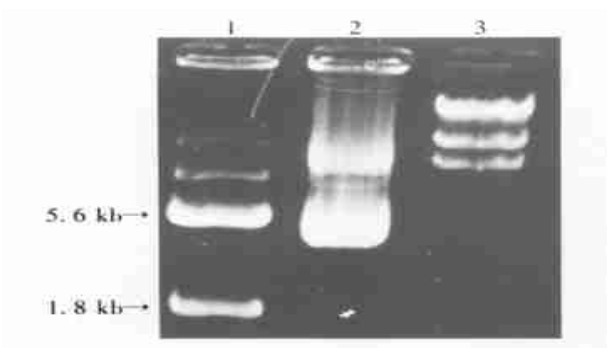


图 **1**　质粒 **PKK3/4** 酶切电泳图

Fig 1　Electrophorestic chromatogram of *EcoR* I digested with plasmid PKK3/4

1: Digested upper MyoD cDNA lower plasmid vector; 2: Undigested; 3: DNA marker

2.2　纯化后的质粒 D_λ 值

紫外线光光度计检测 MyOD cDNA D_{260}/D_{280} 比值为 1.8333, 产量为 3 ml 菌液可提取 8.145 μg 质粒。

2.3　心脏原代成纤维细胞培养

经差速贴壁后留在瓶底的非心肌细胞主要为成纤维细胞, 相差显微镜下特征为: 细胞质透明, 显得很薄, 细胞核明显大, 椭圆形, 颜色淡, 常含有 2～3 个核。

2.4　脂质体介导的基因转染后细胞形态学的变化

转染 3 d 后, 可见部分细胞胞体伸展, 胞浆丰富, 颗粒增多, 但未出现明显的肌小管结构, 而未加 Dosper/ DNA 的细胞形态无改变。

2.5　转染细胞 MyoD 的表达

原位杂交阳性细胞可见紫蓝色颗粒, 见图 2, 生肌转换的阳性率最低在 1.8%, 最高为 10.9%。在受染细胞数一定时, 阳性百分率与 DNA 量在一定范围内呈正相关。



图 **2**　转染 **MyoD cDNA** 后原位杂交结果

阳性细胞胞浆中可见紫蓝色着色颗粒(原位杂交× 400)

Fig 2　*In situ* hybridization of transfected MyoD cDNA

Violet blue granules in cytoplasm of positive cell

(*In situ* hybridization× 400)

3　讨论

3.1　成纤维细胞的识别与鉴定

心脏细胞包括心肌细胞和间质细胞, 心肌细胞约占 75%, 间质细胞约占 25%, 间质细胞数为心肌细胞数的 2 倍。根据心肌细胞和非心肌细胞贴壁速度不同进行区别[2]。一是形状不同; 二是超过 48 h 心肌细胞出现自发性搏动; 三是培养的成纤维细胞分裂增殖旺盛, 相互不积聚成团[3]。还有一种鉴别方法用 β-actin 对两组细胞进行免疫染色, 心肌细胞呈阳性。

3.2　关于脂质体介导的基因转移

基因转移需借助载体将外源性基因导入靶细胞, 并

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

稳定地整合在细胞基因组内,随细胞分裂传递到子代细胞。PKK3/4 包含 MSV-LTR、SV_{40}PolyA、T_3、T_7 启动子,可用于哺乳动物真核细胞转染。目前,将目的基因导入哺乳动物靶细胞的方法主要有两大类,一是病毒载体介导的方法,二是非病毒载体介导的方法。本实验采用脂质体介导法,成功地将 MyoD cDNA 导入细胞内,使受染细胞具备 MHC 的阳性表达(最高达10.9%)。

3.3 MyoD 基因在心肌间质的表达及其意义

心肌为终末分化细胞,故损伤后不能再生[4]。近年来有学者从分子水平探讨恢复心脏功能。我们采用基因转染技术将 MyoD 导入心肌间质细胞以观察其成肌作用。MyoD 又名生肌调节因子(MRF),在体外能使某些非肌细胞分化成类骨骼肌细胞[1]。本实验应用 Dosper-Liposomes 包裹 MyoD cDNA 真核细胞表达质粒,将 MyoD 导入培养的心肌间质细胞观察到受染细胞的形态发生改变,经原位杂交检测部分细胞有骨骼肌 MHC mRNA 表达。显示间质细胞在导入 MyoD 后胞浆内含有肌性成份,具有肌细胞的基本特征。本实验为心肌间质细胞分化为肌性细胞的理论提供了依据。

参考文献:

[1] Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell, 1987, 51(6): 987—1 000.

[2] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating of nonmyocardial cells[J]. Ciss Res, 1982, 50(1): 101—116.

[3] 杨育红, 王维信. 雷尼替丁对体外培养乳鼠心肌细胞自发搏动及动作电位的影响[J]. 中国药理通报, 1996, 12(2): 164—167.

[4] Quaini F, Cigolac E, Lagrasta C, *et al*. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes[J]. Cir Res, 1994, 75(6): 1 050—1 063.

(编辑 郭建秀)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)12-1150-01

电脑验光与人工验光对比分析

Comparative analysis of auto-refractor and retinoscopy

孙 强, 贺翔鸽, 袁洪峰 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所眼科, 重庆 400042)

电脑验光仪以方便快捷等优点已广泛应用于眼科临床[1],目前传统的人工视网膜验光仍广泛使用。我们对电脑验光与人工验光的结果进行对比分析,以探讨电脑验光的特点,找出电脑验光的应用规律。

1 资料与方法

1.1 病历选择

1999 年 4 月至 1999 年 6 月因视力不良就诊,眼科常规检查后无其它疾病,能合作的大于 5 岁患者 83 例(166 眼)。

1.2 方法

人工验光前小瞳电脑验光。部分年轻患者扩瞳后电脑验光及人工验光。使用日本 Topcon R; K 7100 型电脑验光仪,每眼检查 3 次,记录平均值。人工验光用点状光检影镜,由经验丰富的验光师验光。

2 结果

2.1 电脑验光与人工验光球镜值、柱镜值对比分析

各年龄段的电脑验光与人工验光球镜值相符率,见表 1。5~16 岁患者,扩瞳前相符率 73%,扩瞳后相符率 87%。各年龄段电脑验光与人工验光柱镜值比较(< 0.50 DC 相符率),结果均大于 90%。

表 1 电脑验光与人工验光球镜值相符率

	5~11 岁	12~16 岁	17~39 岁	40 岁
例数	48 眼	36 眼	48 眼	24 眼
< 0.50 DS 相符率	71%	81%	90%	100%

作者简介: 孙 强(1969—), 男, 重庆市江北区人, 医师, 主要从事屈光、斜视、弱视方面的研究。电话: (023)68757161

收稿日期: 2000-01-10; 修回日期: 2000-05-20

(下转 1154 页)

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