

• 论著 •

体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞定向分化的研究

冯敏 孙荣青 马爱群

【摘要】 目的 探讨心肌细胞对骨髓间充质干细胞(MSCs)向心肌细胞定向诱导分化的作用及其生物学特性。**方法** 取大鼠四肢骨髓,用细胞分离液通过密度梯度离心分离 MSCs,并将 MSCs 进行原代培养和传代培养,将传 2 代 MSCs 用 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)进行标记。采用胰蛋白酶消化法取乳鼠心尖部心肌细胞进行培养,并与标记的 MSCs 混合培养,光镜下观察其动态变化,并于第 3 日行免疫组化染色,第 5 日行电镜观察。**结果** 原代和传代的 MSCs 增殖迅速,其阳性率达 $(90.34 \pm 2.31)\%$,与平行对照组 $[(4.07 \pm 1.35)\%]$ 比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。与心肌细胞混合后,光镜下观察 MSCs 形态出现明显的变化,第 3 日 BrdU 标记阳性的 MSCs 胞质中肌动蛋白(actin)表达阳性。电镜下观察原始细胞内出现了不规则的肌小节样结构。**结论** 心肌细胞与 MSCs 的接触可有效诱导 MSCs 向心肌细胞定向分化。

【关键词】 骨髓干细胞; 心肌细胞; 混和培养; 分化

Study of inducing differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of rat into cardiac myocytes in vitro
FENG Min*, SUN Rong-qing, MA Ai-qun. * Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan, China
Corresponding author: SUN Rong-qing, Email: rongqing.sun@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of cardiac myocytes in the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) to cardiac myocytes and the biological properties in the course. **Methods** The bone marrow of the extremities of the rats was flushed, and bone marrow MSCs were obtained by method of density gradient centrifugation. They were cultured. The second passage of cultured MSCs were labelled with bromodeoxyuridine (BrdU). The cardiac myocytes were obtained from the apex of rat heart with trypsin digestion method, and they were cocultured with labeled MSCs. The developmental changes of bone marrow MSCs were observed under light microscope with immunohistochemical staining for BrdU and α -sarcomeric actin on the 3rd day, and electron microscopic examination on the 5th day. **Results** MSCs proliferated fast in primary culture and subculture, positive rate was $(90.34 \pm 2.31)\%$, and there was statistical difference when it compared with control group $[(4.07 \pm 1.35)\%, P < 0.01]$. The morphology of MSCs changed significantly after coculture. There were new cells nuclei of which were positively stained for BrdU and its cytoplasm positive for actin. Under transmissive electron microscope, sarcomeres like structure and abnormal Z line were observed in cytoplasm. **Conclusion** Cardiac myocytes can effectively induce bone marrow MSCs to differentiate into cardiac myocytes by coculturing.

【Key words】 bone marrow stem cell; cardiac myocyte; coculture; differentiation

目前对急性心肌梗死的治疗包括药物治疗、介入治疗和手术治疗,这些治疗方法能使闭塞的血管再通或形成新的血管,改善心肌缺血的症状,防止梗死面积的扩展,却不能代替不可复生的坏死心肌,因此,心肌梗死后因瘢痕形成造成局部心脏无功能已成为医疗界的难题。干细胞可横向分化为心肌细胞^[1],可有效补充因心肌梗死造成的细胞数量减少,可为缺血性心脏病的治疗提供一条新的途径。骨髓是一个巨大的干细胞库,而且骨髓间充质干细胞

(MSCs)取材比较方便,因而成为科学界研究的重点。我们将传 2 代的 MSCs 和心肌细胞在体外进行混合培养,来观察 MSCs 的动态变化。

1 材料与方法

1.1 试验仪器和主要试剂:低糖 DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品,胎牛血清(FBS)为杭州四季青公司产品,Percoll 细胞分离液(1.131 g/ml)为美国 Pharmacia 公司产品,胰蛋白酶为美国 Am-Resco 公司产品;5-溴脱氧尿核苷(BrdU)为武汉博士德生物工程有限公司产品,抗 BrdU 抗体为美国 Sigma 公司产品,小鼠抗大鼠肌动蛋白(actin)为美国 NeoMarker 公司产品,双重免疫组化试剂盒为博士德生物工程有限公司产品;倒置显微镜为日本

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.06.007

作者单位:450052 河南郑州,郑州大学第一附属医院(冯敏、孙荣青);西安交通大学第一医院(马爱群)

通信作者:孙荣青,Email:rongqing.sun@126.com

Olympus 公司产品,扫描电镜为日立 S-520L 产品,透射电镜为日本 JEM-2000EX 产品。

1.2 大鼠 MSCs 的分离与培养:在无菌条件下取 1 月龄 SD 大鼠(由西安交通大学实验动物中心提供)四肢骨,用 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,将冲洗的细胞悬液缓慢加于等体积的细胞分离液上(1.073 g/ml Percoll 液),离心取中间层单个核细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次后,将细胞加入含有体积分数 10%胎牛血清(FBS)、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素的 DMEM 培养液中,调整细胞密度为 $5 \times 10^8/L$,在 37℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后更换培养基,大部分悬浮的造血细胞被去除,再加入新鲜的含 10%FBS 的 DMEM 培养基,3~4 d 换液 1 次,直到细胞占瓶底的 80%或接近融合。用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞,按 1:2 的比例传代接种,3~4 d 常规全量换液,约 7~10 d 后细胞长满瓶底。

1.3 心肌细胞的分离与培养:取出生 2 d 的 SD 乳鼠(由西安交通大学实验动物中心提供),无菌条件下活杀取其心尖部心肌,将其剪成 1 mm³ 大小的碎块,加入含 0.06%胰蛋白酶的消化液,在磁力搅拌器上 37℃水浴中消化,将首次消化液弃去,用含 10%FBS 的 DMEM 培养液中和,离心并弃去上清液,将沉淀细胞洗涤 2 次,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基将细胞沉淀混匀,计数细胞。以 $2 \times 10^8/L$ 细胞浓度接种于置有处理过盖玻片的 24 孔板中,37℃5%CO₂ 孵箱中培养。培养 24 h 后可见搏动的心肌细胞,于 48 h 细胞同步搏动后用于实验,等待与 MSCs 混合。

1.4 MSCs 的标记:取传 2 代的 MSCs 培养到第 3 日,将 BrdU 以终浓度为 0.01 mmol/L 加入培养基,放置 CO₂ 培养箱中 24 h 以标记 MSCs,用 PBS 洗涤 5 次后,观察标记效果。

1.5 MSCs 和心肌细胞的混合:吸取 0.5 ml 消化标记后的 MSCs 悬液(细胞密度为 $2 \times 10^8/L$)和 0.5 ml 的心肌细胞悬液(细胞密度为 $2 \times 10^8/L$)以 1:1 的比例置于放有盖玻片的 24 孔培养板内,观察细胞混合后的形态和功能变化。MSCs 以相同密度加入此体系中培养作为对照组。

1.6 细胞形态学和免疫组化观察:倒置显微镜下观察细胞形态变化。并于混合后 3 d 行 BrdU+cTnT 的免疫组化检测,另做 3 孔的 MSCs 爬片作为对照。并于混合后第 5 日用戊二醛固定后行 MSCs 和混合后细胞的扫描电镜和透射电镜检查。

2 结果

2.1 MSCs 形态学观察

2.1.1 倒置显微镜观察:MSCs 为成纤维细胞样,胞体膨大,伸出长短不一的胞质,突起较少,胞核大,核轮廓不清,核仁清晰可见。传代细胞排列更加整齐有序,杂质细胞已明显少见(彩色插页图 1a)。

2.1.2 透射电镜观察:MSCs 核大,核型极不规则,细胞内含有丰富的粗面内质网和线粒体(彩色插页图 1b)。

2.1.3 扫描电镜观察:MSCs 细胞扁平,胞质突起粗大,微绒毛较少,细胞间连接也较粗大(彩色插页图 1c)。

2.1.4 流式细胞仪分析鉴定:培养的 MSCs 不表达 CD34⁺,高表达 CD44⁺,其阳性率平均为 $(90.34 \pm 2.31)\%$,与平行对照组 $[(4.07 \pm 1.35)\%]$ 比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明造血细胞很少,以 MSCs 为主。

2.2 MSCs 与心肌细胞混合培养后的形态学观察

2.2.1 倒置显微镜观察:MSCs 和心肌细胞混合后 MSCs 开始变形,细胞体积变小,胞核、核仁清晰可见,胞体周边细长,伸出长的突起,细胞内出现黑色颗粒状物质(彩色插页图 2a),数量较多,以核周最为明显;心肌细胞多为圆形或椭圆形,胞核不易看清,或与 MSCs 接触,或独立贴附于瓶壁上。随着培养时间的延长,胞内黑色颗粒状物质明显增多,一些细胞胞体较大,伸出大的胞质突起,细胞间的突起可见相互连接(彩色插页图 2b),发现有变形的 MSCs 样细胞收缩跳动,且随着培养时间的延长,细胞跳动频率逐渐加快。

2.2.2 透射电镜观察:混合后细胞的内部结构既具有干细胞的特征,也出现了肌细胞所特有的肌小节样的结构,为 MSCs 向心肌细胞分化的一种中间状态(彩色插页图 2c)。胞内肌小节样结构排列不规则,大小不一,Z 线不规则,呈散乱排列状态。心肌细胞内可见有排列规则的肌小节和均匀排列的肌丝。

2.2.3 扫描电镜观察:混合后胞体隆起,以 MSCs 形状为主,全身有大量的微绒毛(彩色插页图 2d)。

2.3 双重免疫组化染色:细胞质被染成淡蓝或偏紫色即为 BrdU 染色阳性;细胞质被染成红色即为 actin 染色阳性。MSCs 和心肌细胞混合培养后,在宽大的不规则形状的 MSCs 中间,有细胞核和细胞质均着色的双阳性细胞,其形状类似于 MSCs,有细长的细胞突起,细胞核被染成淡蓝色,细胞质被染成红色(彩色插页图 3)。

3 讨论

近年来, MSCs 在体外被成功诱导分化为成骨细胞^[2]、成肌细胞^[3]、神经元^[4]。常颖等^[5]用人 MSCs 在体外诱导成神经细胞、成骨细胞及脂肪细胞等。动物实验表明, MSCs 注入心脏后能在局部微环境影响下分化为心肌样细胞^[6]; 杨国勋等^[7]将兔 MSCs 注入心肌梗死区, 发现含有肌小节纤维的幼稚细胞, 部分细胞与周围正常的心肌细胞形成缝隙连接; 各种关于干细胞分化的现象表明, 微环境是影响干细胞分化的决定性因素^[8,9]。一个细胞所处的微环境主要由 3 个因素来决定: ①通过膜蛋白介导的细胞间相互作用。这种接触方式有两种, 即简单的表面接触和细胞间的缝隙连接。②分泌的细胞因子, 即局部组织自分泌和旁分泌一些细胞因子诱导干细胞的分化发育。③通过细胞外基质介导的细胞间相互作用。

本实验显示当 MSCs 同新生心肌细胞共同培养时, 部分 MSCs 很快开始变形, 也就是说, 当 MSCs 与心肌细胞混合培养时, MSCs 在心肌细胞的影响下已经开始逐渐发生形态的转变, 24~48 h 内一小部分细胞已经开始变形, 并且观察到心肌细胞和 MSCs 相互接触, 细胞体积变小, 伸出较长的突起, 细胞间形成连接; 同时可以看到一种处于中间态的细胞, 这种细胞既具有干细胞的特征, 还出现了肌细胞的一些特征, 即出现了肌小节样结构和不规则的 Z 线, 免疫组化染色为在核 BrdU 染色阳性的细胞内肌小节肌动蛋白表达呈阳性。与文献^[6-7]报道结果基本一致, 一方面证实了 MSCs 向心肌细胞转化的可能性, 同时也间接证实了 MSCs 的横向分化中,

干细胞与受损组织细胞的直接接触是关键, 通过细胞间“通话”, 启动定向分化因子的转录, 调节各种生长因子的表达, 诱导干细胞向不同组织分化。

参考文献

- [1] Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 120 (5): 999-1005.
- [2] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 295-312.
- [3] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 1995, 18(12): 1417-1426.
- [4] Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, et al. A role for SOX1 in neural determination. *Development*, 1998, 125 (10): 1967-1978.
- [5] 常颖, 齐欣, 卜丽莎, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(2): 95-97.
- [6] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002, 105(1): 93-98.
- [7] 杨国勋, 刘唐威, 钟国强, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(7): 428-430.
- [8] Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122(4): 699-705.
- [9] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (32): 11474-11479.

(收稿日期: 2009-05-07 修回日期: 2009-05-20)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

内毒素血症全身炎症反应导致肠道通透性增加

尽管肠道常被认为是脓毒症的始动器官, 但全身炎症反应与肠道通透性的关系却不明了。本研究关注实验性内毒素血症时肠道通透性的变化。向 14 只健康大鼠静脉注射脂多糖 2 ng/kg 制备内毒素血症模型, 用聚乙二醇(PEGs)作为肠道通透性的标记物。通过检测肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)来评价肠上皮细胞损伤程度。结果显示: 内毒素血症能产生炎症反应, 导致尿 PEGs 增高, 血清白细胞介素-10(IL-10)水平与尿 PEGs 增高相关($r=0.48$, $P=0.027$), 但 I-FABP 释放未受到影响。因此研究者认为, 全身炎症反应可导致肠道通透性增加, 这可能是由于肠缺血使肠上皮细胞受损所致。

白慧颖, 编译自《Shock》, 2009 年 3 月(电子版); 胡森, 审校

JNK1/c-fos 通过细胞外信号调节激酶和 p38 丝裂素活化蛋白激酶抑制心肌肿瘤坏死因子- α 表达

加拿大学者研究发现, JNK1 缺陷鼠或选择性抑制 JNK1 信号通路可增强肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达, 并伴有细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 和丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)磷酸化增加。内毒素刺激后 JNK1 激活, 同时也导致心肌细胞 c-fos 表达, 抑制 JNK1 信号通路可阻断 c-fos 表达。在心肌细胞和离体心脏均观察到 c-fos 缺陷可显著增强脂多糖(LPS)介导的 TNF- α 表达。c-fos 过度表达导致心肌 TNF- α 表达减少, 这与 ERK1/2 和 p38MAPK 磷酸化减少相关联。研究者认为, JNK1/c-fos 抑制 ERK1/2 和 p38MAPK 信号途径, 导致心肌 TNF- α 表达降低, 并能提高内毒素血症时的心肌功能。

王瑞晨, 编译自《Cardiovasc Res》, 2008-11-29(电子版); 胡森, 审校

体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞定向分化的研究

(正文见340页)

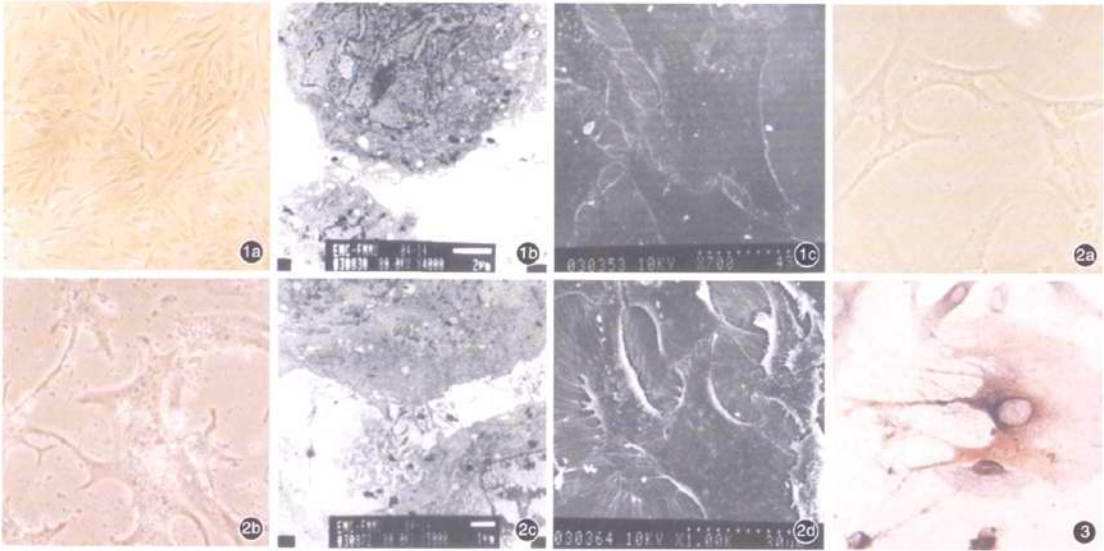


图1a 倒置显微镜下观察大鼠传2代MSCs排列整齐有序, 杂质细胞少见 $\times 40$ 图1b 透射电镜下观察MSCs核大, 核型不规则, 细胞内含有丰富的粗面内质网和线粒体 $\times 4000$ 图1c 扫描电镜下MSCs细胞扁平, 胞质突起粗大, 微绒毛较少, 细胞间连接粗大 $\times 700$ 图2a 倒置显微镜下观察MSCs与心肌细胞混合后培养1d MSCs开始变形, 细胞体积变小, 胞核、核仁清晰可见, 胞体周边细长, 伸出长的突起, 细胞内出现黑色颗粒物质 $\times 100$ 图2b 倒置显微镜下观察大鼠MSCs与心肌细胞混合后细胞间连接 $\times 200$ 图2c 透射电镜下观察混合培养后细胞呈中间型细胞 $\times 5000$ 图2d 扫描电镜下观察混合培养细胞呈中间型细胞 $\times 1000$ 图3 免疫组化染色胞核BrdU与胞质actin均着色的双阳性细胞 $\times 400$

Omi/HtrA2在窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞凋亡中的作用

(正文见346页)

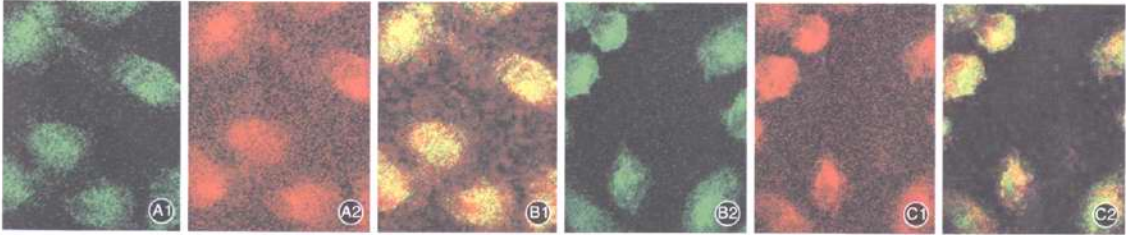


图1 窒息后血清诱导HIF-2细胞对Omi/HtrA2转位的影响 A: 绿色通道, B: 红色通道, C: 合成, 1: 空白对照组, 2: 窒息组 激光共聚焦显微镜下观察, 空白对照组Omi/HtrA2荧光染色后呈现绿色荧光, 与线粒体染色后的红色荧光几乎完全重叠, 图片叠加后呈现黄色荧光图片, Omi/HtrA2位于线粒体内, 未发生胞内转位; 而窒息血清攻击后Omi/HtrA2绿色荧光与线粒体红色荧光发生错位, Omi/HtrA2由线粒体内转位到胞质中 $\times 400$

地塞米松对脑损伤大鼠核转录因子- κ B 水平的影响

(正文见364页)

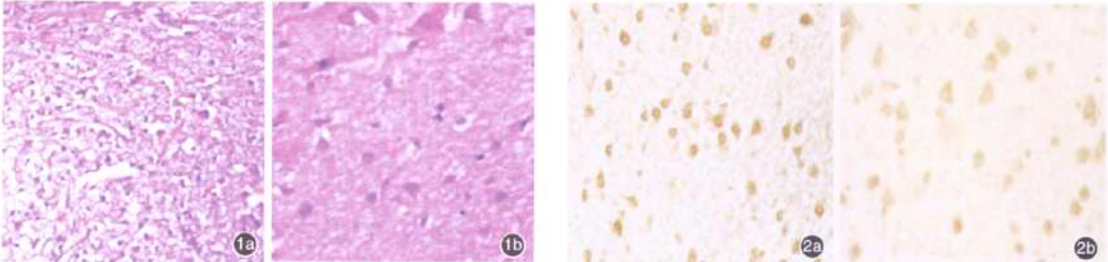


图1 光镜下观察大鼠脑组织病理学改变 TBI组(a) 伤后24h组织结构紊乱, 局部出血, 组织水肿, 神经细胞大量变性、坏死, 可出现大量无定形空泡, 创伤区可见炎性细胞; 地塞米松组(b) 伤后24h细胞损伤明显减轻, 出血减少且较轻, 细胞变性减轻, 细胞坏死明显减少, 细胞水肿仍存在, 但较TBI组明显减轻 HE $\times 200$ 图2 光镜下观察大鼠脑组织NF- κ B 阳性表达 TBI组(a) 术后24h脑组织中NF- κ B 阳性表达明显; 地塞米松组(b) 阳性表达明显轻于TBI组 免疫组化 $\times 400$