

研究论文

发育心肌和心肌干细胞分化后心肌特异蛋白表达的比较研究

贺其志^{1,2} 谭玉珍^{1*} 王海杰¹ 孙丽莉¹¹复旦大学上海医学院人体解剖与组织胚胎学系, 上海 200032; ²同济大学附属第一妇婴保健院病理科, 上海 200040)

摘要 为探讨MCSC移植修复缺血性心肌的可能性, 观察了大鼠发育心肌和MCSC分化为心肌细胞的cTnT和Cx-43表达特点。结果表明从胚胎发育至成年, 心肌*cTnT* mRNA表达逐渐上调; 用BMP-2诱导1周的MCSC可检测到*cTnT* mRNA表达, 3~4周表达显著升高, 诱导2周能观察到cTnT蛋白, 3~4周可见cTnT呈现横纹样结构。胚胎第11 d心肌可检测到Cx-43 mRNA表达, 生后7 d达高峰, 以后逐渐降低, 17 d趋于稳定。胚胎期Cx-43蛋白多分布于肌膜下, 生后10 d位于细胞连接处。诱导的MCSC中Cx-43 mRNA表达特征与*cTnT* mRNA相似, 2周可观察到Cx-43蛋白, 3~4周可见Cx-43位于相邻细胞连接处。本研究结果提示, 在BMP-2诱导下MCSC可分化为心肌细胞, 表现为成熟心肌细胞的结构特征。MCSC有望成为治疗缺血性心脏病的理想种子细胞。

关键词 骨髓源性心肌干细胞; 心肌分化; 心肌肌钙蛋白T; 缝隙连接蛋白43; 大鼠

干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 我们通过克隆培养技术从骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MMSC)中筛选出具有心肌特异分化潜能的多能干细胞, 称为骨髓源性心肌干细胞(marrow-derived cardiac stem cell, MCSC)。在体外已将MCSC诱导分化为心肌细胞, 并可观察到心肌的搏动^[1,2], 在心肌梗死动物模型移植MCSC能有效地修复坏死心肌^[3]。然而, 对于MCSC分化为功能心肌细胞的机制, 还不十分清楚。深入探讨诱导MCSC向心肌定向分化过程中维持其结构和功能的分子机制, 尤其是明确特异基因*cTnT*和Cx-43的表达变化, 并与不同发育和成熟阶段的SD大鼠心肌组织作对比研究, 对于正确评价诱导分化细胞的成熟程度, 以及能否将MCSC尽早应用于临床治疗心肌梗死等缺血性心脏病具有重要价值。

肌钙蛋白是以复合物的形式存在于骨骼肌和心肌细胞的细肌丝中, 在钙诱导的肌肉收缩中起重要作用, 是肌细胞产生收缩的结构基础之一^[4]。心肌与骨骼肌细胞内的肌钙蛋白复合物, 分别由不同的基因调控, 两者的氨基酸组成有一定的差异, 故心肌肌钙蛋白被称为特异性心肌肌钙蛋白(cardiac

troponin, cTn)^[5]。cTn由3个亚基即cTnC、cTnI和cTnT组成, 分别由不同的基因编码^[6]。心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)作为cTn中的一种亚型, 为心肌细胞的特异性收缩调节蛋白, 对心肌的收缩功能有着重要作用。在胚胎发育过程中, 干细胞向心肌细胞的终末分化主要表现为细胞首先表达心肌特异性结构蛋白, 进而出现心肌结构蛋白的集聚, 并逐渐组成粗细肌丝, 最后产生规则的肌小节结构^[7]。因而cTnT可以作为鉴定心肌分化的重要指标之一。

心肌的同步收缩需要细胞间的相互联系。缝隙连接蛋白43 (connexin-43, Cx-43) 作为心肌纤维闰盘结构中缝隙连接的主要结构蛋白, 参与构成细胞间物质和信息交换的重要通道, 是细胞间代谢耦联、冲动传导及心肌细胞维持正常电生理搏动的结构基础^[8]。Cx-43在种属间具有高度的保守性, 大鼠Cx-43的氨基酸序列与人有97%同源(382个氨基酸中仅有9个不同), 在心脏发育过程中, Cx-43基因和

收稿日期: 2010-10-09 接受日期: 2011-01-12

国家自然科学基金资助项目(No.30470883, No.30971674)和高等学校博士点专项科研基金(No.200802460044)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54237289-9306, E-mail: yztan@shmu.edu.cn

蛋白的表达发生明显变化,这种变化与心功能的逐步建立密切相关^[9]。缺失Cx-43的小鼠心脏发育异常,导致右心室畸形而死亡^[9]。将c-kit⁺的髓间充质干细胞移植到心肌梗死的大鼠,这些细胞可分化为心肌细胞并表达Cx-43,从而修复受损心肌,改善心肌功能^[10]。然而,对于在体外诱导干细胞向心肌分化过程中Cx-43基因及其蛋白的表达变化,目前尚缺乏完整的研究资料。

为此,本文以大鼠不同发育期及成熟过程中心肌组织cTnT和Cx-43的表达变化作为参照,将BMP-2诱导条件下MCSC向心肌分化过程中cTnT和Cx-43的表达变化与发育心肌进行对比研究,以便为干细胞移植治疗心肌梗死提供可行性实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源和标本制备

选择2月龄SD(Spragus Dawley)大鼠,体重100±2g,购自复旦大学实验动物科学部。以雌雄比例2:1合笼,次日清晨观察,出现阴栓时将胎龄(embryonic day, ED)记为ED0.5。以ED14.5、ED21.5 胚鼠及出生后3 d、10 d、21 d、35 d大鼠为研究对象。采用颈椎脱位处死孕鼠后,剪开孕鼠腹腔,暴露子宫,将子宫从孕鼠体内取出,置于0.01 mol/L PBS液中,剥离出胚胎,然后取心脏。生后大鼠直接开胸后取心脏,置于4%多聚甲醛中固定4 h,然后,将心肌组织块取出,用0.1 mol/L PBS反复浸洗,每次10 min,浸洗5次,以洗净组织上残留的固定液。然后将浸洗过的心肌组织块移至15%蔗糖溶液中,置4℃冰箱内过夜,待蔗糖溶液完全浸透心肌组织后,将组织块移入30%蔗糖溶液中,当组织块沉至瓶底后取出, OCT定向包埋。液氮中速冻,-80℃冰箱保存。用Leica恒冷箱切片在-20℃作冷冻切片,切片厚度为5 μm。将组织切片贴附在涂有0.1%多聚赖氨酸的载玻片上,置于通风橱内凉干后,置于-20℃冰箱内保存备用。

1.2 MCSC的筛选及其诱导分化

MMSC的分离、克隆培养和MCSC的筛选方法同文献^[5],将第4~8代MCSC克隆接种到25 ml培养瓶中,用含有15% FBS的DMEM培养。当细胞生长至接近形成单层时,吸去培养液,用0.01 mol/L PBS浸洗2次。实验分2组,BMP-2诱导组,在无血清培养液中加入10 ng/ml BMP-2(PerproTech, London);以加入10 ng/ml牛血清白蛋白作为对照。经BMP-2诱导后

24 h,吸去培养液,PBS浸洗2次,然后加入含10% FBS的DMEM培养液,继续培养。每隔4~5 d换液1次。

1.3 cTnT和Cx-43 mRNA表达检测

分别取胚胎第11.5 d、第17.5 d和出生后1 d、7 d、17 d、31 d的SD大鼠的心脏组织80 mg,以及对对照组、诱导前和诱导后1~4周的细胞各1×10⁷个,用Trizol裂解后,提取总RNA,按照TaKaRa试剂盒说明书的操作程序,分别检测cTnT和Cx-43 mRNA的表达,以β-actin作为内对照。引物序列见表1。扩增条件为95℃预变性5 min,95℃变性30 s,54℃退火45 s,72℃延伸1 min,共30个循环。最后,72℃延伸

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度
Genes	Primer sequences	Expected product size
cTnT	(F)5'-AGA GGA CTC CAA ACC CAA GC-3'	250 bp
	(R)5'-ATT GCG AAT ACG CTG CTG TT-3'	
Cx-43	(F)5'-TTT TTT GGC ATT CTG GTT GTC-3'	397 bp
	(R)5'-GGT GGT GTC CTT GGT GTC TCT-3'	
β-actin	(F)5'-TGC TGT CCC TGT ATG CCT CT-3'	462 bp
	(R)5'-GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG-3'	

5 min后在4℃冰箱内冷却1 min。用3%琼脂糖作凝胶电泳,然后经凝胶成像分析系统(上海复日科技有限公司)作图像分析和数据处理。以β-actin作为校正进行相对量分析。

1.4 cTnT和Cx-43的免疫荧光标记

切片从冰箱中取出,室温下放置2 h后,用0.01 mol/L PBS浸洗3次,每次5 min。滴加含小牛血清的一抗阻断液,在37℃条件下孵育20 min,以减少背景非特异性着色。然后,倒去一抗阻断液,分别加入小鼠抗大鼠cTnT(1:200, Neomarkers, USA)和兔抗大鼠Cx-43(1:200, Sigma, St Louis)单克隆抗体,在37℃条件下反应1 h。用PBS浸洗3次后,加入FITC标记的羊抗鼠IgG(1:100, Jackson, USA)和羊抗兔IgG(1:100, Jackson, USA),在37℃条件下孵育1 h。缓冲甘油封片,在Nikon荧光显微镜和Zesis共聚焦激光扫描显微镜下观察和照相记录。实验中以PBS代替一抗,作为阴性对照。

分别取诱导后1、2、3、4周的细胞,在室温条件下用4%多聚甲醛固定20 min,再在37℃条件下用

10%山羊血清封闭30 min。然后,分别加入鼠抗大鼠cTnT(1:200)和兔抗大鼠Cx-43(1:200),在37°C条件下反应1 h。用PBS浸洗3次后,加入FITC标记的羊抗鼠IgG(1:100)和羊抗兔IgG(1:100),在37°C条件下孵育1 h。缓冲甘油封片,在Nikon荧光显微镜和Zesis共聚焦激光扫描显微镜下观察和照相记录。实验中以PBS代替一抗,作为阴性对照。

1.5 统计学分析

免疫组化结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 11.5统计软件包分析,用单因素方差分析进行各组内数据的比较。将目的基因条带*cTnT*和*Cx-43* mRNA与内参 β -actin的平均光密度值作半定量分析,用统计软件处理数据和作单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *cTnT* mRNA的表达

cTnT mRNA在胚胎期第11.5 d大鼠的心肌组织表达较弱,随着胚胎的发育、出生、生后发育直至成年大鼠心肌组织的*cTnT* mRNA表达逐渐上升(图1A),半定量分析结果显示,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(图1B)。在诱导前的MCSC中*cTnT*不表达。诱导后1周,RT-PCR可检测到*cTnT* mRNA,2周表达略增强,3~4周表达明显(图1A)。半定量分

析结果显示,差异有统计学意义($P<0.01$)(图1B)。

2.2 *cTnT*蛋白的表达

在胚胎第14.5 d大鼠的心肌组织,心肌细胞的排列不很规则,但心肌细胞内可观察到*cTnT*的表达,阳性反应产物呈不均一性散在分布于细胞质内(图2A)。胚胎第21.5 d大鼠的心肌细胞排列趋向规则,细胞内*cTnT*的表达较为明显(图2B)。出生后3 d大鼠的心肌细胞*cTnT*的表达增强,阳性反应产物呈现横纹样结构(图2C)。出生后10 d, *cTnT*的表达进一步增强,横纹样结构更加明显。21 d和35 d大鼠的心肌细胞排列规则,细胞内*cTnT*的表达逐渐趋向稳定(图2D~图2F)。在诱导分化细胞中,诱导后1周的细胞未观察到*cTnT*的表达(阴性结果未展示)。诱导后2周*cTnT*表达较弱,散在于细胞内(图2G)。诱导后3周*cTnT*表达增强,细胞内可见横向条纹(图2H)。诱导后4周, *cTnT*表达更加明显,横纹增多,排列密集(图2I)(箭头所示为*cTnT*的表达,图左下角为未加*cTnT*的阴性对照图片)。

2.3 *Cx-43* mRNA的表达

Cx-43 mRNA在胚胎期第11.5 d大鼠心肌组织的表达已较为明显。随着胚胎的发育, *Cx-43* mRNA的表达逐渐增加,至出生后7 d达到高峰。7 d后*Cx-43* mRNA的表达逐渐降低,17 d后表达趋于稳定(图3A)。半定量分析结果显示,差异有统计学意义

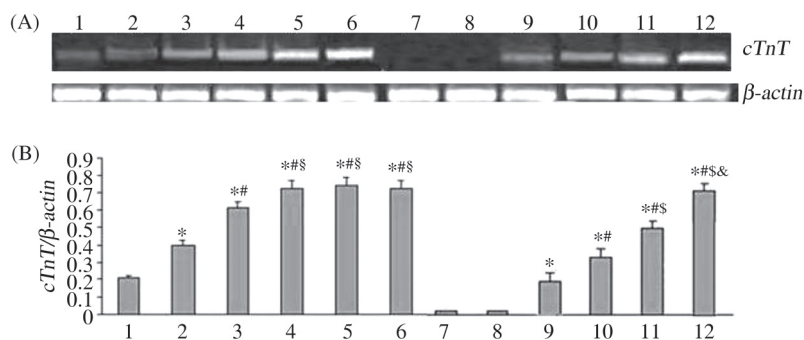


图1 大鼠心脏发育不同阶段及BMP-2诱导MCSC后*cTnT* mRNA的表达

1~6为大鼠心肌组织,7~12为BMP-2诱导MCSC分化后的细胞。1:胚胎第11.5 d;2:胚胎第17.5 d;3:生后1 d;4:生后7 d;5:生后17 d;6:生后31 d;7:空白对照;8:诱导前MCSCs;9:诱导后1周的细胞;10:诱导后2周的细胞;11:诱导后3周的细胞;12:诱导后4周的细胞。*各组与1或7、8比较 $P<0.01$;#各组与2或9比较 $P<0.01$;\$各组与3比较 $P<0.05$;&各组与10比较 $P<0.01$;&与11比较 $P<0.01$ 。

Fig.1 Expressions of *cTnT* mRNA on myocardial cells during development process of rat and on cardiomyocytes differentiated from MCSCs induced by BMP-2

Lane 1~6 were myocardium of rats, Lane 7~12 were differentiated cells from MCSCs induced by BMP-2. Lane 1: embryonic day 11.5; Lane 2: embryonic day 17.5; Lane 3: postnatal day 1; Lane 4: postnatal day 7; Lane 5: postnatal day 17; Lane 6: postnatal day 31, Lane 7: control; Lane 8: MCSCs before induction; Lane 9: cells at one week after induction; Lane 10: cells at two weeks after induction; Lane 11: cells at three weeks after induction; Lane 12: cells at four weeks after induction. *indicated the group was compared with 1 or 7 and 8, $P<0.01$; #indicated the group was compared with 2 or 9, $P<0.01$; \$indicated the group was compared with 3, $P<0.05$; &indicated the group was compared with 10, $P<0.01$; &indicated the group was compared with 11, $P<0.01$.

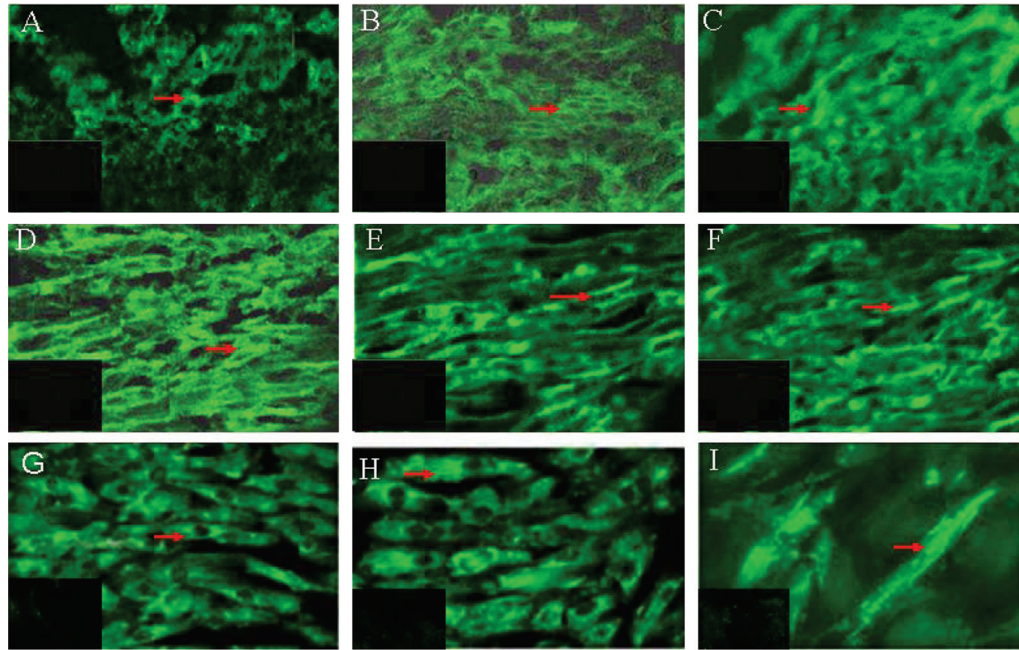


图2 大鼠心脏发育不同阶段及BMP-2诱导MCSC后cTnT蛋白的表达(×400)

A~F为大鼠心肌细胞cTnT的表达, G~I为BMP-2诱导MCSC分化后心肌细胞cTnT的表达。A: 胚胎第14.5 d; B: 胚胎第21.5 d; C: 出生后3 d; D: 出生后10 d; E: 出生后21 d; F: 出生后35 d; G: 诱导后2周的细胞; H: 诱导后3周的细胞; I: 诱导后4周的细胞。

Fig.2 Expressions of cTnT on myocardial cells during development process of rat and on cardiomyocytes differentiated from MCSCs induced by BMP-2 (×400)

A~F were expression of cTnT on myocardial cells of rats, G~I were expression of cTnT on cardiomyocytes differentiated from MCSCs after induction by BMP-2. A: expression of cTnT on myocardial cells embryonic day 14.5; B: expression of cTnT on myocardial cells embryonic day 21.5; C: expression of cTnT on myocardial cells postnatal day 14; D: expression of cTnT on myocardial cells postnatal day 10; E: expression of cTnT on myocardial cells postnatal day 21; F: expression of cTnT on myocardial cells postnatal day 35; G: expression of cTnT on differentiated cells at two weeks after induction; H: expression of cTnT on differentiated cells at three weeks after induction; I: expression of cTnT on differentiated cells at four weeks after induction.

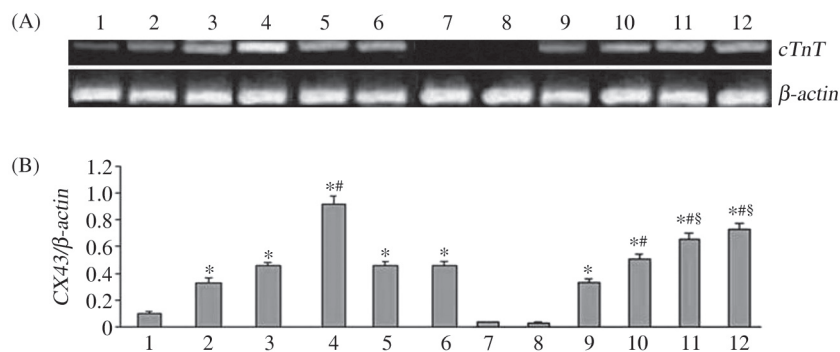


图3 大鼠心脏发育不同阶段及BMP-2诱导MCSC后Cx-43 mRNA的表达

1~6为大鼠心肌组织, 7~12为BMP-2诱导MCSC分化后的细胞。1: 胚胎第11.5 d; 2: 胚胎第17.5 d; 3: 生后1 d; 4: 生后7 d; 5: 生后17 d; 6: 生后31 d; 7: 空白对照; 8: 诱导前MCSC; 9: 诱导后1周细胞; 10: 诱导后2周细胞; 11: 诱导后3周细胞; 12: 诱导后4周细胞。*各组与1或7、8比较 $P < 0.01$; #各组与2、3、5、6或9比较 $P < 0.01$; §各组与10比较 $P < 0.01$ 。

Fig.3 Expressions of Cx-43 mRNA on myocardial cells during development process of rat and on cardiomyocytes differentiated from MCSCs induced by BMP-2

Lane 1~6 were myocardium of rats, Lane 7~12 were differentiated cells from MCSCs induced by BMP-2. Lane 1: embryonic day 11.5; Lane 2: embryonic day 17.5; Lane 3: postnatal day 1; Lane 4: postnatal day 7; Lane 5: postnatal day 17; Lane 6: postnatal day 31, Lane 7: control; Lane 8: MCSCs before induction; Lane 9: cells at one week after induction; Lane 10: cells at two weeks after induction; Lane 11: cells at three weeks after induction; Lane 12: cells at four weeks after induction. *indicated the group was compared with 1 or 7 and 8, $P < 0.01$; #indicated the group was compared with 2, 3, 5, 6 or 9, $P < 0.01$; §indicated the group was compared with 10, $P < 0.01$.

($P < 0.01$)(图3B)。Cx-43 mRNA在诱导前的MCSC不表达。诱导后1周, RT-PCR可检测到Cx-43 mRNA, 2周表达略增强, 3~4周表达明显(图3A)。半定量分析结果显示, 差异有统计学意义($P < 0.01$)(图3B)。

2.4 Cx-43蛋白的表达

在胚胎第14.5 d大鼠的心肌组织, Cx-43主要分布在小梁的心室肌细胞内, 阳性反应产物呈散在分布(图4A)。在胚胎第21.5 d大鼠, Cx-43呈颗粒状分布于所有心室肌细胞内, 在细胞膜下分布较多(图4B)。出

生后3 d, Cx-43的表达增强, 大多聚集于心肌细胞连接(闰盘)处, 排列不规则(图4C)。出生后10 d阳性反应产物呈串线状, 主要位于心肌闰盘处(图4D)。出生后21 d, Cx-43的表达进一步增多, 呈粗线状规则地分布于心肌闰盘处(图4E)。出生后35 d, Cx-43分布特点类似于第21 d, 但表达强度较第21 d降低(图4F)。诱导后1周未观察到Cx-43表达(阴性结果未展示)。诱导后2周, 在靠近细胞膜下可见Cx-43表达, 荧光产物呈颗粒状分布(图4G)。诱导后3周, 表达增强, 荧光颗粒较

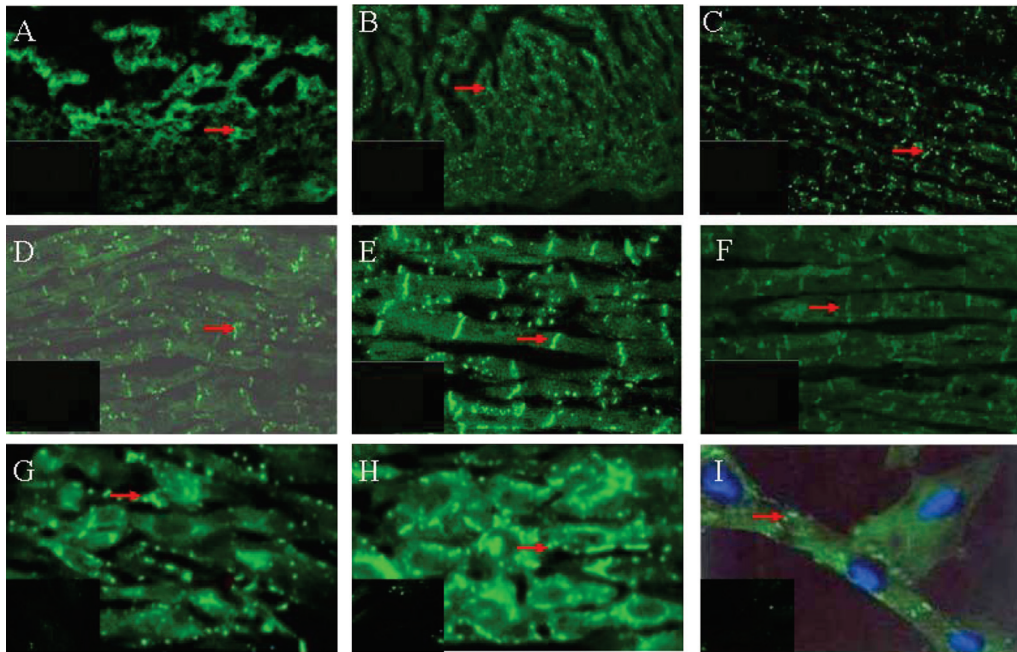


图4 大鼠心脏发育不同阶段及BMP-2诱导MCSC后Cx-43蛋白的表达($\times 400$)

A~F为大鼠心肌细胞Cx-43的表达, G~I为BMP-2诱导MCSC分化后心肌细胞Cx-43的表达。A: 胚胎第14.5 d; B: 胚胎第21.5 d; C: 出生后3 d; D: 出生后10 d; E: 出生后21 d; F: 出生后35 d; G: 诱导后2周的细胞; H: 诱导后3周的细胞; I: 诱导后4周的细胞。

Fig.4 Expressions of Cx43 on myocardial cells during development process of rat and on cardiomyocytes differentiated from MCSCs induced by BMP-2($\times 400$)

A~F were expression of Cx-43 on myocardial cells of rats, G~I were expression of Cx-43 on cardiomyocytes differentiated from MCSCs after induction by BMP-2. A: expression of Cx-43 on myocardial cells embryonic day 14.5; B: expression of Cx-43 on myocardial cells embryonic day 21.5; C: expression of Cx-43 on myocardial cells postnatal day 14; D: expression of Cx-43 on myocardial cells postnatal day 10; E: expression of Cx-43 on myocardial cells postnatal day 21; F: expression of Cx-43 on myocardial cells postnatal day 35, G: expression of Cx-43 on differentiated cells at two weeks after induction; H: expression of Cx-43 on differentiated cells at three weeks after induction; I: expression of Cx-43 on differentiated cells at four weeks after induction.

大, 呈串珠状, 位于相邻细胞连接处(图4H)。诱导后4周, 由几个细胞形成肌管样结构, 在肌管的相邻细胞连接处, Cx-43呈颗粒状密集分布(图4I)(箭头所示为Cx-43的表达, 图左下角为未加Cx-43的阴性对照图片)。

3 讨论

骨髓是人体最大的干细胞库, 其中含有多向分

化潜能的干细胞。Orlic^[10]和Jiang等^[11]将骨髓干细胞移植入心脏, 观察到干细胞向心肌分化, 但分化效率较低。Huang等^[12]发现, 用基因修饰后高表达CCR1的骨髓干细胞移植后可促进其向梗死部位迁移, 从而有助于改善心功能。然而, 由于骨髓中含有多元化的干细胞, 移植后不仅向心肌分化的效率较低, 而且存在一定不安全的因素, 故使其在临床应用方面

受到一定限制。Bearzi等^[13]从心脏组织中分离出了c-kit⁺心肌干细胞(cardiac stem cell, CSC),在体内外特定诱导条件下,CSC可直接向心肌、内皮和平滑肌等组织细胞定向分化。但是,这些细胞因数量很少,难以大量应用于临床移植治疗缺血性心脏疾病。而且,最近有人提出心脏内的心肌干/祖细胞可能来源于骨髓。本课题组通过单细胞克隆培养技术、c-kit免疫荧光标记和检测心肌早期转录因子Nkx2.5、GATA4和Tbx5等的表达,从骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MMSC)中筛选出具有心肌特异分化潜能的MCSC,在体外用BMP-2成功地将其诱导分化为心肌细胞,并且在体内能有效地修复坏死心肌和改善心功能^[1-3,14]。然而,对于这些干细胞向心肌分化过程中其特异蛋白的表达变化是否与胚胎发育有着一定的联系,尚不清楚。明确干细胞分化与胚胎发育中心肌特异蛋白表达的关系,将有助于深入理解干细胞移植后向心肌细胞分化以及与宿主心肌建立功能联系的分子机制,为临床干细胞移植治疗心肌梗死奠定基础。

心肌的收缩是由细胞内结构蛋白的生物物理和生物化学反应导致粗细肌丝间的滑动引起的。肌钙蛋白是心肌和骨骼肌的收缩调节蛋白之一^[5]。心肌肌钙蛋白T(cTnT)作为心肌细胞内的一种特异性结构蛋白,参与组成细肌丝,并与心肌收缩和舒张的调节密切相关^[4]。因此,明确干细胞向心肌细胞分化过程中cTnT的表达变化,将有助于确定细胞的分化和成熟阶段以及在心功能活动中发挥的生理作用。本研究结果显示,在大鼠心脏的发育过程中,cTnT mRNA在胚胎期第11.5 d大鼠的心肌组织已能够检测到,cTnT蛋白在胚胎14.5 d已经表达,其表达随着大鼠的发育从胚胎期到出生后一段时间逐渐增加,出生10 d,横纹样结构更趋明显。分布特征由最初的散在分布,渐变为有规律的细胞周围分布。这表明细胞cTnT的表达和分布是与心肌功能相适应的。与胚胎发育和成熟期的心肌组织相比较,用BMP-2诱导前,MCSC不表达cTnT,诱导后2周,细胞开始弱表达cTnT。这表明诱导后2周的细胞即已具备心肌细胞的某些特征。诱导后4周,细胞内cTnT的表达明显增强,呈现明显的横纹样结构。与不同发育和成熟期SD大鼠心肌组织的cTnT表达特点相比较,用BMP-2诱导后4周细胞cTnT的表达特点与出生后10 d大鼠心肌组织cTnT的表达特点相类似,即基本具备

了成熟心肌细胞的结构特征。RT-PCR半定量分析结果显示,cTnT mRNA的表达与10 d左右的大鼠心肌组织表达相似。有研究表明,cTnT缺失后,不能形成肌小节,心脏没有收缩活性^[15,16]。因此,cTnT是心肌细胞发育和分化的重要结构蛋白,是调节心脏功能的重要物质基础。本实验结果提示,用BMP-2诱导后MCSC能够有效地分化为心肌细胞,分化细胞表达cTnT,基本具备了成熟心肌的结构特征。结合先前的研究,本文提出用MCSC移植有助于增加有收缩功能的心肌细胞数量,对于降低梗死区面积和改善心功能具有重要意义。

Cx-43是组成缝隙连接的主要蛋白,是心肌细胞维持正常电生理搏动的结构基础^[17,18]。通过对Cx-43表达的检测,有助于明确分化后的细胞是否能够建立细胞间的相互联系,这对于评价分化细胞能否发挥生理作用具有重要意义。本研究结果显示,大鼠Cx-43的表达从胚胎到成年发生了显著的变化。在胚胎时期Cx-43呈颗粒状散在分布于心肌细胞质内,从出生到成年逐渐集中分布于细胞两端的闰盘处,并在此处稳定表达。由此可见,Cx-43的表达和分布特征随着胚胎的发育和成熟而发生了很大的变化,从颗粒状散在分布到整齐地排列在细胞两端的闰盘处,这与心脏同步收缩功能的建立密切相关。大鼠出生后心脏迅速发育,血流动力学发生改变,从而引起心壁结构发生变化。因此,幼年大鼠心肌Cx-43的表达和分布也随之发生明显变化,这与幼年大鼠心脏的功能活动相适应。成年大鼠心脏的功能活动趋向稳定,心肌Cx-43的表达和分布也趋向稳定,不再发生显著变化。在用BMP-2诱导MCSC向心肌分化过程中,诱导前的MCSC不表达Cx-43。诱导后2周,细胞开始表达Cx-43。诱导后3周,Cx-43表达增强,并趋向于在相邻细胞连接处分布。诱导后4周,Cx-43集中分布于肌管的相邻细胞连接处。这些结果提示,经BMP-2诱导分化4周的细胞已经具备了同步收缩的结构基础。与大鼠发育过程中心肌细胞Cx-43的表达特点相比较,MCSC经BMP-2诱导分化后4周,心肌细胞内Cx-43的表达特征类似于出生后14.5 d左右大鼠心肌组织Cx-43的表达。Cx-43作为心肌纤维闰盘结构中缝隙连接的主要结构蛋白,在细胞膜聚合而形成的缝隙连接通道是介导细胞间离子、小分子和信号分子跨膜交流的重要结构基础^[8],对于心肌细胞的发育、分化和收缩功能建立都有重要

作用^[19,20]。最近,在动物模型体内研究结果显示^[14],MCSC移植后能够与宿主心肌细胞之间形成缝隙连接,因此本研究结果对于将MCSC应用于临床干细胞移植治疗心肌梗死提供实验依据具有重要意义。通过Cx-43与宿主细胞建立电-机械耦合,移植后分化的细胞有可能直接参与心脏的同步化收缩活动,这是心功能恢复的前提。

由于大鼠和人类有高度同源性并且二者心血管系统极为相似,且大鼠具有取材容易,操作简便及花费低廉等优点,应用大鼠来代替人类对心脏发育的研究不失为一种好的方法。用BMP-2诱导后,MCSC能够分化为成熟的心肌细胞,这将为干细胞研究和临床应用开辟更广泛的前景。

参考文献(References)

- 1 孙丽莉,谭玉珍,王海杰,贺其志.骨髓间充质干细胞的克隆培养及其向心肌细胞的诱导分化.复旦学报(医学版) 2003; 30(6): 519-23.
- 2 贺其志,谭玉珍,王海杰,王新艳,孙丽莉. BMP-2在骨髓源性心肌干细胞向心肌分化中的作用.解剖学报 2005; 36(5): 498-502.
- 3 张贵焘,谭玉珍,王海杰,敖红,国海东,黄国英.骨髓源性心肌干细胞移植治疗心肌梗死的实验研究.中华心血管病杂志 2007; 36(10): 940-4.
- 4 Pinto JR, Parvatiyar MS, Jones MA, Liang J, Potter JD. A troponin T mutation that causes infantile restrictive cardiomyopathy increases Ca²⁺ sensitivity of force development and impairs the inhibitory properties of troponin. J Biol Chem 2008; 283(4): 2156-66.
- 5 Sumandea MP, Vahebi S, Sumandea CA, Garcia-Cazarin ML, Staidle J, Homsher E. Impact of cardiac troponin T N-terminal deletion and phosphorylation on myofilament function. Biochemistry 2009; 48(32): 7722-31.
- 6 Jin JP, Huang QQ, Yeh HI, Lin JJ. Complete nucleotide sequence and structural organization of rat cardiac troponin T gene. A single gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternative splicing. Mol Biol 1992; 227(4): 1269-76.
- 7 Gomes AV, Guzman G, Zhao J, Potter JD. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity and inhibition of force development. Insights into the role of troponin T isoforms in the heart. J Biol Chem 2002; 277(38): 35341-9.
- 8 Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. Circ Res 2003; 70(5): 438-44.
- 9 Houghton FD. Role of gap junctions during early embryo development. Reproduction 2005; 129(2): 129-35.
- 10 Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. Int J Hematol 2002; 76(Suppl 1): 144-5.
- 11 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418(6893): 41-9.
- 12 Huang J, Zhang Z, Guo J, Ni A, Deb A, Zhang L, Mirosou M, et al. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. Circ Res 2010; 106(11): 1753-62.
- 13 Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(35): 14068-73.
- 14 Guo HD, Wang HJ, Tan YZ, Wu J. Transplantation of marrow-derived cardiac stem cells carried in fibrin improves cardiac function after myocardial infarction. Tissue Eng Part A 2011; 17(1): 45-58.
- 15 Nishii K, Morimoto S, Minakami R, Miyano Y, Hashizume K, Ohta M, et al. Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. Dev Biol 2008; 322(1): 65-73.
- 16 Lombardi R, Bell A, Senthil V, Sidhu J, Noseda M, Roberts R, et al. Differential interactions of thin filament proteins in two cardiac troponin T mouse models of hypertrophic and dilated cardiomyopathies. Cardiovasc Res 2008; 79(1): 109-17.
- 17 Hervé JC, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development. Pathol Biol (Paris) 2008; 56(5): 334-41.
- 18 Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res 2004; 62(2): 228-32.
- 19 Houghton FD. Role of gap junctions during early embryo development. Reproduction 2005; 129(2): 129-35.
- 20 Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Briand JP, Willecke K, Gros D, et al. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. Circ Res 1997; 81(3): 423-37.

Comparison in Expression of Specific Myocardial Proteins in Developing Myocardium and Differentiated Cardiac Stem Cells

Qi-Zhi He^{1,2}, Yu-Zhen Tan^{1*}, Hai-Jie Wang¹, Li-Li Sun¹

¹Department of Anatomy, Histology and Embryology, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²Department of Pathology, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Tongji University, Shanghai 200040, China)

Abstract To explore the possibility of transplantation of marrow-derived cardiac stem cells (MCSCs) for repairing the ischemic myocardium, expression features of cardiac troponin T (cTnT) and connexin-43 (Cx-43) in the developing rat myocardium and the cardiomyocytes differentiated from marrow-derived cardiac stem cells (MCSCs) induced by bone morphogenesis protein-2 (BMP-2) were investigated. Expression of *cTnT* mRNA in the myocardium increased gradually from embryonic rats to adult rats. After induction with BMP-2 for one week, *cTnT* mRNA of the cells was detected. In week 3 and week 4 after induction, expression of *cTnT* mRNA of the cells increased significantly. In immunostaining, the cells induced for two weeks expressed cTnT. In week 3 and week 4 after induction, the cells appeared transverse striation-like structures. *Cx-43* mRNA was detected in E11 rats. On day 7 after birth, expression of *Cx-43* mRNA reached the peak. Then, *Cx-43* mRNA expression decreased gradually. In day 17, it trended stable. Cx-43 protein expressed mostly beneath the cell membrane in embryonic period and at cell junctions from day 10 after birth. Changes in expression *Cx-43* mRNA were similar with that of *cTnT* mRNA expression in the cells induced with BMP-2. Expression of Cx-43 protein was observed in week 2 after induction, Cx-43 protein expressed at cell junctions from week 3 to week 4 after induction. These results demonstrate that MCSCs may differentiate into cardiomyocytes under induction with BMP-2. The structural characteristics of differentiated cells are similar with that of mature cardiomyocytes. Therefore, MCSCs are desirable cells for cell transplantation therapy of ischemic heart diseases.

Key words MCSCs; myocardial differentiation; cTnT; Cx-43; rats

Received: October 9, 2010 Accepted: January 12, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470883, No.30971674) and the Scientific Research Foundation of State Education Commission of China (No.200802460044)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237289-9306, E-mail: yztan@shmu.edu.cn