

诱导体外培养的骨髓间充质干细胞 向心肌样细胞的分化

王 勃 王桂玲¹ 白小涓* 宋今丹¹

(中国医科大学附属第一临床学院循环内科, 沈阳 110001;

¹中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 选用 Wistar 大鼠分离骨髓间充质干细胞作体外培养及鉴定其表达抗原 CD44、CDw90; 采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 5- 氮胞苷诱导第 1 代的骨髓间充质干细胞, 于诱导后 2、4 周进行免疫细胞化学反应检测 α - 横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白 T。证实体外培养的第 1 代骨髓间充质干细胞经 5- 氮胞苷诱导可分化为心肌样细胞, 为指导体外诱导的心肌细胞应用于临床提供一定的理论依据和技术手段。

关键词 骨髓间充质干细胞; 诱导; 心肌样细胞

心肌梗死、缺血性心脏病最终均可导致功能心肌细胞的减少、泵功能衰竭。心肌细胞在胎儿出生前几天即停止了增殖、分化, 因而由其他成体干细胞分化为心肌细胞进行细胞移植治疗就显得尤为重要。为此许多学者开展了这方面的基础^[1-3]和临床研究工作^[4,5], 发现细胞移植对心脏病具有一定治疗价值。国外自 1985 年陆续开展了有关体外诱导胚胎干细胞、骨髓干细胞向心肌细胞分化的研究^[6,7]。但胚胎干细胞的研究存在受体成瘤性、供体来源缺乏及伦理学问题, 不利于临床应用。另外对于心脏移植的其他候选细胞, 如骨骼肌成肌细胞、内皮前体细胞和胚胎心肌细胞的研究亦较多, 从目前的研究结果看更趋向于骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)。所以我们选用来源丰富易得、具有多向分化潜能、未发现致瘤性的大鼠 BMMSCs 作为研究对象, 总结和借鉴前人的方法, 探讨诱导体外培养的 BMMSCs 向心肌样细胞的分化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠, 雄性, 体重约 150 g, 由本校实验动物部提供。

1.2 试剂与仪器

培养液 DMEM(低糖型)购于 Gibco BRL 公司, 胎牛血清购于天津灏洋生物有限公司, 5- 氮胞苷购

于 Sigma 公司, CD34、CD44、即用型 SABC 免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司, CDw90 购于 Santa Cruz 公司, 小鼠抗大鼠 α - 横纹肌肌动蛋白单抗、小鼠抗大鼠肌钙蛋白 T 单抗购于 Neomarker 公司。CO₂ 培养箱为 SANYO MCD-18A1C 型。

1.3 BMMSCs 分离、培养及鉴定

大鼠 BMMSCs 原代培养方法参照文献[8]和[9]: 以 40 mg/kg 戊巴比妥腹腔注射全麻大鼠, 75% 乙醇消毒皮毛, 移入超净台, 分层剥离后肢皮肤、附着肌肉, 剪断胫、股骨的干骺端, 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液冲洗髓腔, 然后以 200 目筛网过滤, 将滤液以 150 g 离心 8 min, 弃上清液, 加入 PBS 吹打成细胞悬液, 再次离心, 弃上清液, 加入培养液(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 青、链霉素各 100 U/ml), 记数板记数后, 以 5×10^8 个 / ml 接种, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中温育, 以后每 3~4 天换液, 去除未贴壁的造血干细胞, 7 天后细胞铺满瓶底, 以 0.25% 胰蛋白酶消化后传代, 将传至 1 代的 BMMSCs 种于盖玻片上, 培养 3 天, 进行免疫细胞化学染色鉴定, 步骤如下: ① PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)洗去盖玻片上的培养液, 纯丙酮室温固定 30 min, 蒸馏水洗。②滴加过氧化氢, 室

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2005-01-26

*通讯作者。Tel: 024-23256666-6226, Fax: 024-23255781, E-mail:

xjuanbai@hotmail.com

温 30 min, 蒸馏水洗 3 次。③滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体, 不洗。④分别滴加一抗(兔抗大鼠 CD34 多抗, 兔抗大鼠 CD44 多抗, 兔抗大鼠 CDw90 多抗), 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 每次 2 min。⑤余下步骤按照 SABC、SABC-荧光 FITC 试剂盒使用说明书。⑥ PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 BMMSCs 诱导分化及鉴定

取第 1 代 BMMSCs 种于盖玻片上, 培养 3 天, 细胞贴壁、伸展后, 加入含有 10 μmol/L 浓度的 5-氮胞苷的完全培养液, 于 37 °C CO₂ 培养箱中温育 24、48 h 后, 更换为含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养至 2、4 周时, 进行肌细胞、心肌细胞特异表达蛋白: α-横纹肌肌动蛋白、肌钙蛋白 T 的免疫细胞化学染色, 步骤同上。

2 结果

2.1 形态学变化

相差显微镜下可见: 原代培养第 1 天的 BMMSCs 呈小圆形贴壁(图 1A), 自第 2 天开始伸展成小多角形、星型, 以后胞体逐渐增大, 核椭圆、居中, 呈集落样、蜂窝状生长, 其上可见散在小圆形细胞, 7 天后细胞铺满瓶底(图 1B)。将传至 1 代的 BMMSCs 加入诱导剂, 2 周时观察部分 BMMSCs 形状变为小短梭形, 局部细胞生长具有同向性(图 1C), 4 周后胞体渐增大, 形似柱状, 两端有突起, 卵圆形核位于中央, 与心肌细胞形态完全相同(图 1D)。

2.2 BMMSCs 鉴定

本实验对传至 1 代的 BMMSCs 采用免疫细胞化学染色方法进行鉴定, 指标包括 CD34、CD44、CDw90。结果表明: 胞浆未着色, 仅见复染的蓝色胞核, 为 CD34 阴性(图 2A); 胞浆呈淡棕黄色, 胞核为蓝色, CD44 阳性(图 2B); 免疫荧光(FITC)染色的 CDw90 胞浆呈绿色, 为阳性反应(图 2C), 提示包括小圆形细胞在内的大多数贴壁细胞为 BMMSCs, 而非造血干细胞。

2.3 心肌样细胞的鉴定

对诱导前后的 BMMSCs 进行心肌特异性蛋白免疫细胞化学染色, 发现诱导前 BMMSCs 不表达肌钙蛋白 T(图 3A), 而诱导后 2 周的部分 BMMSCs 胞浆内出现棕褐色免疫复合物(图 3B), 诱导后 4 周胞内 α-横纹肌肌动蛋白棕褐色反应仍然阳性(图 3C)。同

样诱导后 4 周的细胞对抗肌钙蛋白 T 抗体也显示出阳性反应(图 3D)。提示诱导后的部分 BMMSCs 表达了心肌特异性蛋白: α-横纹肌肌动蛋白和肌钙蛋白 T。另外, 通过细胞记数的方法发现: 诱导 4 周时 α-横纹肌肌动蛋白阳性细胞所占的比率为 45.6%, 肌钙蛋白 T 阳性细胞所占的比率为 30.3%。

3 讨论

骨髓干细胞的成份较复杂, 除已知的造血干细胞、间充质干细胞以外, 还有一些不明的干细胞, 如边缘细胞群等。因至今未发现 BMMSCs 的特异表面标志, 不利于 BMMSCs 的鉴定、纯化, 目前发现 BMMSCs 表达 SH₂、SH₃、CD29、CD44、CD71、CD90、CD120a、CD124, 但 CD14、CD34、CD45 呈阴性。BMMSCs 在合适的体外环境中可长期生长, 具有分化成心肌细胞、骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞及血管内皮等多向分化潜能, 这一发现为干细胞研究史上的重大技术突破^[10]。Wakitanis 等^[9]发现 5-氮胞苷可促进大鼠 BMMSCs 跨越分化为肌源性细胞; Fukada^[11]证明可分化为心肌细胞; 我国学者亦成功地进行了上述研究。目前体外培养 BMMSCs 的分离、纯化方法主要有以下 3 种: ①贴壁法: 该法操作简单, 对细胞损伤小, 适于分离少量的骨髓。②密度梯度离心: 使用淋巴细胞分离液, 梯度离心骨髓后分层获取, 适于分离大量骨髓。③标记 BMMSCs 利用流式细胞仪分选。笔者在原代培养过程中为避免操作过程复杂及时间过长引起的 BMMSCs 损伤及污染, 未使用 Percoll 或 Ficoll 等细胞分离液, 根据 BMMSCs 贴壁生长特性, 通过更换培养液去除不贴壁的造血干细胞以分离、纯化 BMMSCs, 且通过免疫细胞化学染色证实了该细胞表达 CD44、CDw90, 而不表达造血干细胞的表面标志 CD34, 为 BMMSCs。另外, 采用该方法体外培养的 BMMSCs 生长状态良好, 利于体外诱导分化及应用于临床。国外自 2000 年将体外分离的骨髓单核细胞用于临床治疗心肌梗死, 但直接注入骨髓单核细胞还是先将其于体外诱导成心肌细胞再注入心肌尚有争议。诱导剂 5-氮胞苷为一去甲基化药物, 可能作用于调控向心肌细胞分化的特异启动子基因上的阻遏蛋白, 导致 BMMSCs 向心肌细胞的跨越分化。关于 5-氮胞苷诱导体外培养 BMMSCs 的时间点、诱导剂量及持续作用时间各不相同, 以前多采用传至 8 代的所谓“永生化

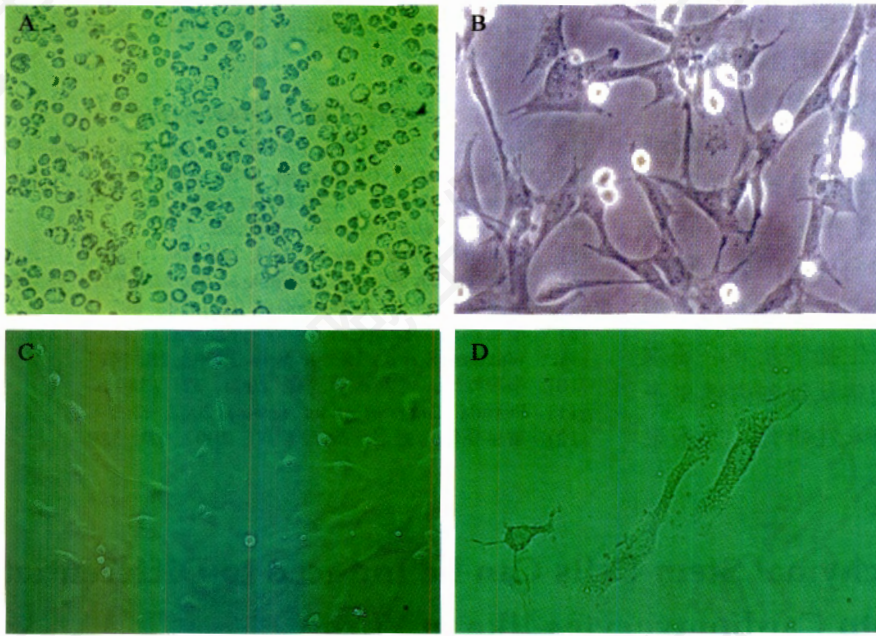


图1 相差显微镜下观察诱导前后BMSCs形态学变化($\times 400$) (A)原代培养第1天的BMSCs; (B)培养第7天的BMSCs; (C)诱导2周的BMSCs; (D)诱导4周的BMSCs。

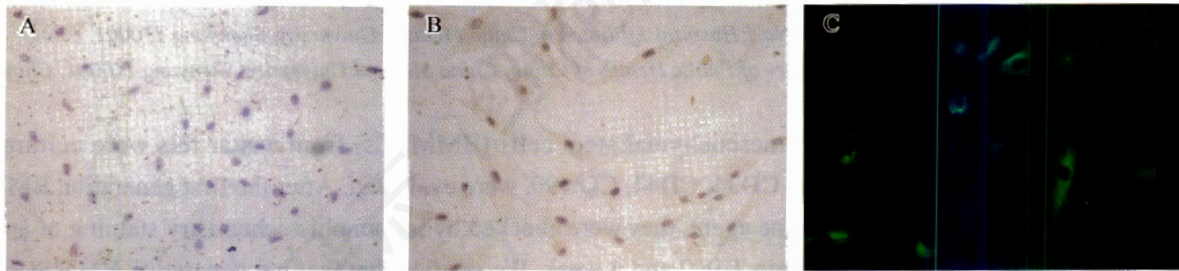


图2 免疫细胞化学染色鉴定BMSCs($\times 400$) (A) CD34⁻; (B) CD44⁺; (C) CDw90⁺。

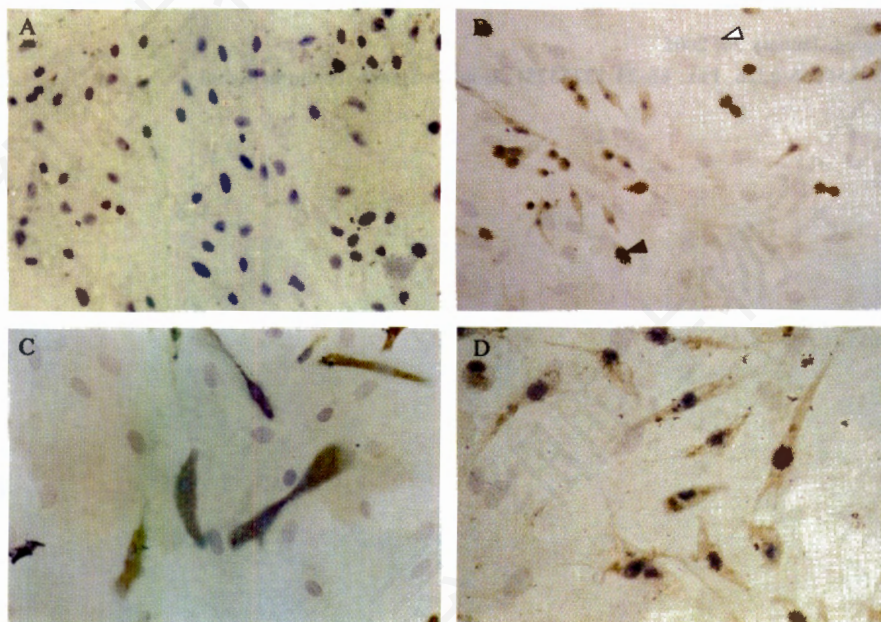


图3 诱导BMSCs表达心肌特异性蛋白($\times 400$)

(A)诱导前BMSCs抗-肌钙蛋白T抗体反应阴性; (B)5-氮胞苷诱导后2周的BMSCs进行免疫细胞化学染色:黑色箭头所示的胞浆呈强棕黄色,为抗 α -横纹肌肌动蛋白免疫阳性复合物,白色箭头所示的胞浆未着色,胞核呈淡蓝色,为抗 α -横纹肌肌动蛋白免疫反应阴性; (C)诱导4周时抗 α -横纹肌肌动蛋白阳性细胞的体积较前增大; (D)诱导后4周的部分BMSCs胞浆呈抗-肌钙蛋白T抗体棕色阳性反应。

BMMSCs”作为诱导对象^[12]，近来多选用体外培养早期。我们在前人的基础上选择第1代BMMSCs作为诱导分化对象，通过形态学观察和免疫细胞化学反应证实了诱导第1代BMMSCs可分化为心肌样细胞。推测BMMSCs于体外培养早期具有较强的复制、增生能力，且不易发生自发分化，在一定诱导因素的作用下能够向特定的方向分化，有一定的诱导成功率。对于由BMMSCs分化而来的心肌样细胞与成体心肌细胞之间是否存在生物学差异，还须大量的实验加以证实。以后我们将从细胞内钙离子及超微结构等方面做进一步的深入性研究，为未来

体外诱导的心肌细胞应用于临床打下坚实的理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Saito T *et al.* *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **126**: 114
- [2] Tomita S *et al.* *Circulation*, 1999, **100**: II247
- [3] Jackson KA *et al.* *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1395
- [4] Rubart M *et al.* *Circ Res*, 2003, **92**: 1217
- [5] Stamm C *et al.* *Lancet*, 2003, **361**: 45
- [6] Doetschman TC *et al.* *J Embryol Exp Morphol*, 1985, **87**: 27
- [7] Makino S *et al.* *J Clin Invest*, 1999, **103**: 697
- [8] 康新勤等. *西安交通大学学报(医学版)*, 2003, **24**: 518
- [9] Wakitani S *et al.* *Muscle Nerve*, 1995, **18**: 1417
- [10] 李凌松等. *生理科学进展*, 2001, **32**: 138
- [11] Fukuda. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2002, **42**: 1
- [12] 唐耀亮等. *复旦学报(医学版)*, 2002, **29**: 329

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can be Induced to Differentiate into Cardiomyocytes-like *in Vitro*

Bo Wang, Gui-Ling Wang¹, Xiao-Juan Bai*, Jin-Dan Song¹

(Department of Internal Circulation, No.1 Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹ Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract The bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) from wistar rats were cultured and expression of surface markers, including CD34, CD44, CDw90, were evaluated. After the first generation BMMSCs were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine agent, they were checked by immunohistochemistry staining of antibodies against α -sarcomeric actin and troponin T in 2 and 4 week. We verified that the first generation BMMSCs could be induced to differentiate into cardiomyocytes-like. This provided theory foundation and technique method for cardiomyocytes induced *in vitro* and applied in clinic.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; induce; cardiomyocytes-like

Received: August 17, 2004 Accepted: January 26, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-6226, Fax: 86-24-23255781, E-mail: xjuanbai@hotmail.com