

大鼠骨髓间充质干细胞条件培养液 促进心肌细胞肥大

徐瑞霞 陈 曦 陈静海 韩 瑜 韩变梅*

(中国医学科学院阜外心血管病医院, 卫生部心血管疾病再生医学重点实验室, 北京 100037)

摘要 体外模拟心肌缺血微环境, 研究骨髓间充质干细胞(MSCs)的旁分泌作用对心肌细胞的影响。以大鼠 MSCs 各时间点的条件培养液刺激心肌细胞, 观察心肌细胞蛋白含量、 $[^3\text{H}]$ -Leu 掺入、ANF-荧光素酶(luciferase)表达和心肌细胞面积的变化。MSCs 条件培养液处理心肌细胞后, 与对照组相比较 6 h 及 9 h 时间点的条件培养液可明显增加心肌细胞蛋白含量、 $[^3\text{H}]$ -Leu 掺入、ANF-荧光素酶表达以及心肌细胞面积, 其中以 6 h 时间点条件培养液的作用最为显著($P<0.01$)。MSCs 条件培养液能够通过旁分泌作用刺激心肌细胞肥大, 此现象提示移植入心肌缺血区 MSCs 可能通过旁分泌作用影响心肌细胞, 从而参与细胞移植后心功能的改善。

关键词 骨髓间充质干细胞; 条件培养液; 心肌细胞; 肥大; 旁分泌

随着冠心病发病率的逐年增高, 缺血性心肌病已成为危害人类健康的重大疾病之一。缺血引起的心肌细胞死亡导致斑痕组织形成及心室壁顺应性降低, 最终降低心功能引发心力衰竭。近年来, 随着干细胞研究的兴起, 骨髓间充质干细胞(MSCs)以其具有多向分化潜能、来源充足、体外易扩增、无免疫排斥等优点, 已经成为细胞移植治疗心肌梗塞的首选^[1,2]。动物实验及临床研究均表明心肌梗塞后进行 MSCs 移植可以改善心功能, 降低死亡率, 其机制主要涉及 MSCs 向心肌细胞分化以及促血管生成作用^[3,4]。最近, Gneccchi 等^[5]的研究发现 Akt-MSCs 移植后 72 h 内即可观察到心功能的改善, 提示此显著效果不可能来自于移植细胞的心肌再生作用, 而只可能是移植细胞的旁分泌作用。至此, 新的理论初露端倪: MSCs 移植后心功能的改善除了与其向心肌细胞分化及血管再生有关外, 还可能涉及到旁分泌作用。那么移植 MSCs 的旁分泌作用究竟对心肌细胞产生了何种影响呢? 目前国内外尚无此类相关的研究报道。

本实验目的是在体外以缺氧、无血清条件^[6]模拟心肌梗塞后移植入的 MSCs 面临的缺血微环境, 研究 MSCs 旁分泌作用对心肌细胞的影响, 力图为临床 MSCs 移植治疗缺血性心脏病的有效性提供进一步的实验依据。

1~3 天龄的 Sprague Dawley (SD) 乳鼠和 80 g SD 大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM、IMDM、胎牛血清购自 Gibco 公司; BrdU、鬼笔环肽(phalloidin)-TRITC 和胰蛋白酶购自 Sigma 公司; 缺氧催化剂购自 BioMérieux®sa(France); $[^3\text{H}]$ -亮氨酸(Leu)购自中国原子能研究院同位素研究所; Trizol 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; pRL-CMV Renilla Luciferase Vector and Dual-Luciferase Reporter (DLR) Assay Kit, ANF-Luciferase Vector 购自 Promega; EndoFree Plasmid Maxi Kit 购自 Qiagen。

1.3 MSCs 的分离培养及 MSCs 条件培养液的获取

无菌条件下剥离大鼠股骨和胫骨, 以全骨髓法分离并培养 MSCs^[6]。第 2~5 代 MSCs 生长至汇合状态时, 以 PBS 漂洗 2 次, 加入无血清 IMDM 培养基, 然后迅速将细胞放入密闭缺氧罐中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内培养, 分别在 3 h、6 h、9 h 和 24 h 时间点收集条件培养液, 贮存于 -70 °C 备用^[7]。

1.4 心肌细胞的分离和培养

无菌条件下剪取 SD 乳鼠心室肌部分, 0.08% 胰蛋白酶 37 °C 消化数次, 收集消化液, 离心后弃上清

1 材料与方法

1.1 动物

收稿日期: 2006-12-22 接受日期: 2007-03-28

国家杰出青年科学基金资助项目(No.30400178)

* 通讯作者。Tel: 010-88396049, E-mail: hanbianmei2006@yahoo.

com.cn

液,加入 DMEM (含 10% 胎牛血清)培养液制成细胞悬液,接种于培养瓶或板中,置 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱内培养。根据心肌细胞和成纤维细胞贴壁时间的不同,采用差速贴壁方法获得心肌细胞。培养 48 h 之内,在培养液中加入 0.01 mmol/L BrdU,以抑制成纤维细胞的生长。

1.5 心肌细胞蛋白质含量的测定

心肌细胞以 4×10^5 个/ml 的密度接种于 6 孔板中,每孔 2 ml。培养 48 h 后换以无血清 IMDM 过夜静息,对照组仍以无血清 IMDM 继续培养,实验组换以不同时间收集的 MSCs 条件培养液处理,48 h 后收集细胞,Bradford 法测定心肌细胞蛋白质含量。实验重复 3 次。

1.6 免疫细胞化学法测定心肌细胞面积

鬼笔环肽能特异性结合肌丝,与荧光染料四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)偶联后在荧光显微镜下能清晰的显示细胞结构。心肌细胞接种于盖玻片上, MSCs 条件培养液处理结束后,经 4% 多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100 处理,加入 TRITC-鬼笔环肽染液室温避光温育 1~2 h 后,激光共聚焦显微镜下观察细胞,并以仪器系统软件分析心肌细胞面积。

1.7 心肌细胞 [³H]-Leu 掺入测定

心肌细胞接种于 24 孔板,无血清 IMDM 静息后实验组换以不同时间收集的 MSCs 条件培养液,并同时加入 [³H]-Leu (终浓度为 1 μCi/ml),共同温育 48 h。弃细胞培养液,用 10% 三氯乙酸固定 30 min,0.9% 生理盐水漂洗两次后,以 0.3 mol/L NaOH-0.1% SDS 裂解细胞,取 300 μl 细胞裂解液置于闪烁瓶中,加入 PPO/POPOP/二甲苯闪烁液,静置过夜,在液体闪烁计数器上进行放射性强度测定。实验重复 3 次。

1.8 心肌细胞 ANF-荧光素酶(luciferase)的检测

心肌细胞接种于 24 孔板,加入质粒 DNA(ANF-Luc+pRL-CMV)和 Lipofectamine 2000 的混合液进行转染,置 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱内培养 12~16 h。对照组换无血清 IMDM 培养基,实验组加入不同时间收集的 MSCs 条件培养液刺激 48 h。之后按 Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 操作指南继续处理细胞,最后经 Promega's Veritas™ Microplate Luminometer 检测。基因表达活性 = 萤火虫荧光素酶活性 / 海肾荧光素酶活性。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

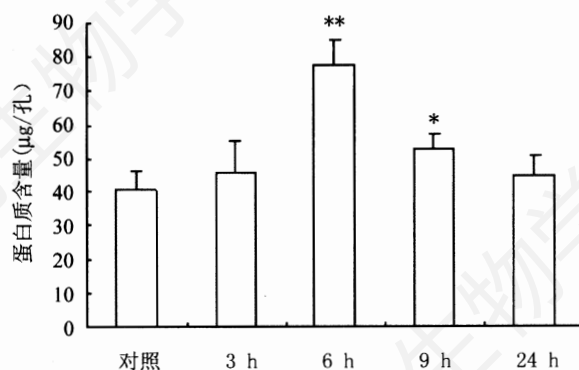


图1 不同时间收集的 MSCs 条件培养液对心肌细胞蛋白含量的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 MSCs 条件培养液对新生大鼠心肌细胞蛋白含量的影响

用 MSCs 条件培养液刺激心肌细胞后,细胞总蛋白含量的变化采用 Bradford 法来检测。结果表明,与对照组相比较,经 6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液处理后,心肌细胞蛋白含量明显增加,其中 6 h 收集的 MSCs 条件培养液处理组效果最为显著(图 1)。而在 3 h 及 24 h 收集的 MSCs 条件培养液处理组,心肌细胞蛋白含量无明显变化。

2.2 MSCs 条件培养液对心肌细胞表面积的影响

心肌细胞中肌动蛋白成束排列组成肌原纤维,具有收缩功能。鬼笔环肽能特异结合肌动蛋白,它与荧光染料 TRITC 偶联后在激光共聚焦显微镜下能清晰显示细胞大小和肌原纤维的结构。共聚焦显微镜下观察可见,与对照组相比,6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液明显促进心肌细胞肌原纤维结构变粗,细胞面积显著增大。图 2A 为对照组,图 2B、图 2C 分别代表经 6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液处理过的心肌细胞。经仪器系统软件分析细胞面积后,发现 6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液能够促进心肌细胞肥大,与对照组相比有显著性差异(图 3)。

2.3 MSCs 条件培养液对心肌细胞 [³H]-Leu 掺入的影响

通过对心肌细胞总蛋白含量和面积的检测,我们确定了 MSCs 条件培养液能够促进心肌细胞肥大的现象。为了进一步探讨 MSCs 条件培养液是否通过促进蛋白质合成的增加而产生了促肥大作用,接下来进行了 [³H]-Leu 掺入实验。MSCs 条件培养液刺激心肌细胞 48 h 后,通过 [³H]-Leu 掺入检测心肌细胞蛋白

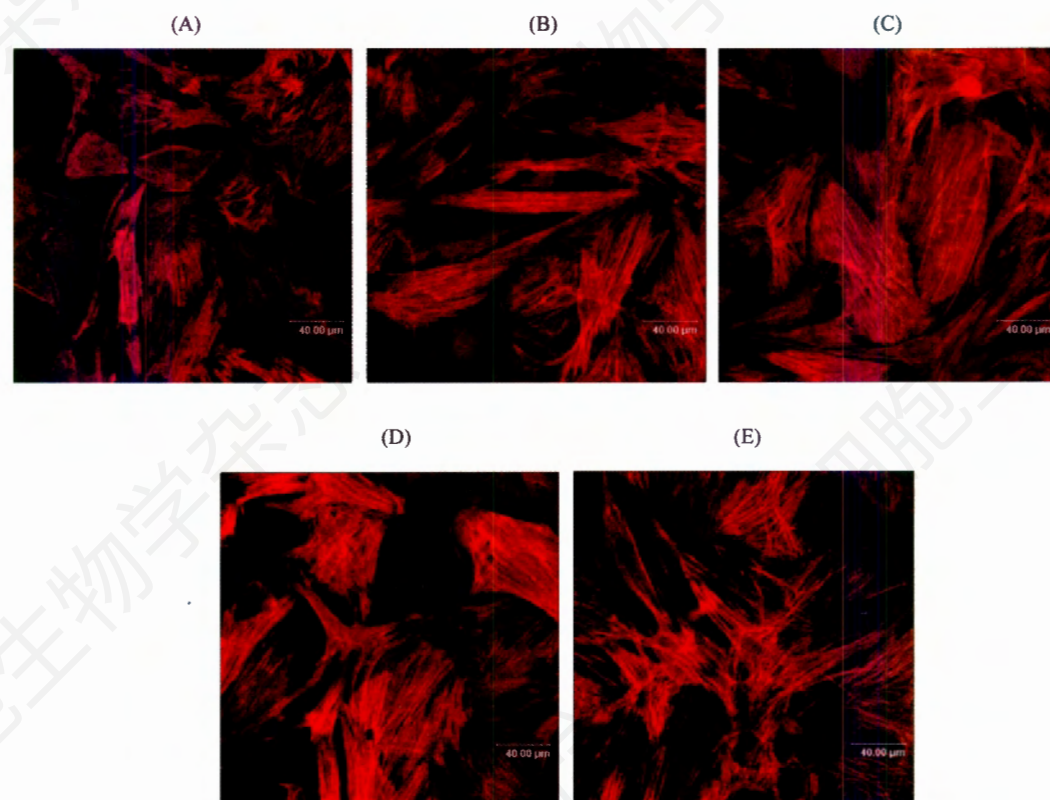


图2 心肌细胞经 MSCs 条件培养液处理后以 TRITC- 兔抗人 α -肌动蛋白染色显示面积的变化

A: 对照组; B、C、D、E 分别代表经 3 h、6 h、9 h 和 24 h 收集的 MSCs 条件培养液处理组。

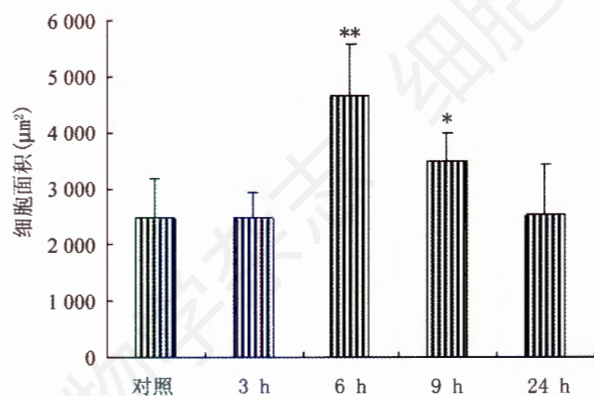


图3 不同时间收集的 MSCs 条件培养液对心肌细胞表面积的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

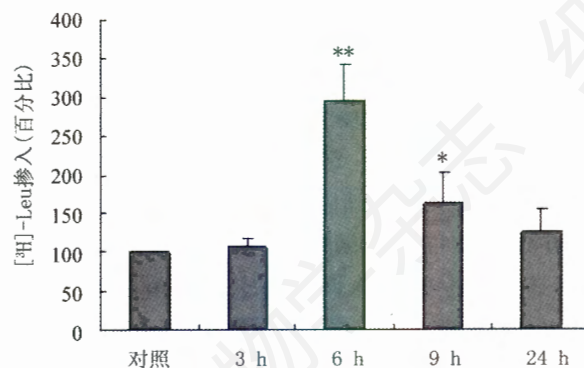


图4 不同时间收集的 MSCs 条件培养液对心肌细胞 $[^3\text{H}]$ -Leu 掺入的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

质的合成。与对照组相比, 经 6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液处理后, 心肌细胞的 $[^3\text{H}]$ -Leu 掺入明显增加, 存在显著性差异(图 4)。

2.4 MSCs 条件培养液对心肌细胞 ANF- 荧光素酶表达的影响

心肌细胞肥大的一个特征性改变是胚胎期基因 ANF 的表达增加。本实验中用 MSCs 条件培养液处

理转染了 ANF- 启动子- 荧光素酶报告载体的心肌细胞, 通过双荧光素酶报告基因检测系统检测 MSCs 条件培养液对心肌细胞的促肥大作用。结果显示: 与对照组相比, 心肌细胞经 6 h 和 9 h 收集的 MSCs 条件培养液处理后, 荧光素酶的活性显著上升, 即代表 ANF 的表达显著增加。而心肌细胞经 3 h 和 24 h 收集的 MSCs 条件培养液处理后, ANF 的表达未见明显

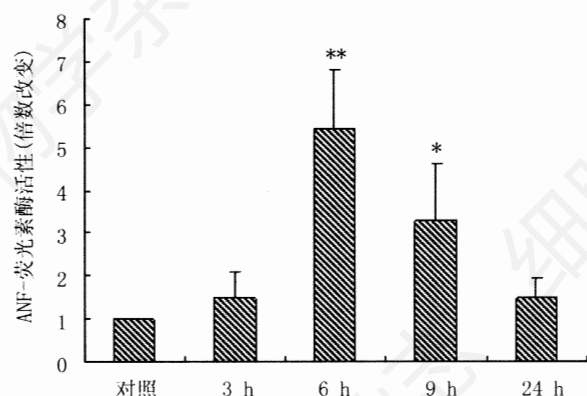


图5 不同时间收集的MSCs条件培养液对心肌细胞ANF-荧光酶表达的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

的增加($P > 0.05$)(图5)。

3 讨论

越来越多的研究证明心肌梗塞后进行MSCs移植能够有效的改善心功能, MSCs能够分化为心肌细胞及血管内皮细胞, 重建梗塞区心肌的微循环, 增加血流量改善局部血供, 从而改善心功能^[8,9]。新近有研究报道^[10], MSCs移植入心肌梗大鼠梗塞区后3个月才能检测到部分肌细胞肌血管内皮细胞表型, 而全部表型的出现则需6个月时间, 但在移植后4周即可检测到心功能增强, 由此推测, 移植的MSCs通过旁分泌途径参与了早期心功能的改善。Tang等^[11]将MSCs注射到梗塞大鼠的梗塞边缘区, 2周后bFGF、VEGF和干细胞归巢因子(SCDF-1)表达升高, Bax表达下降, 左室收缩性明显提高, 提示MSCs通过旁分泌作用促进了血管再生并抑制心肌细胞凋亡, 从而改善了心功能。上述研究结果有力的证明了MSCs旁分泌作用的存在, 但目前仍未见有文献报道MSCs旁分泌作用对心肌细胞有何影响。

本实验在细胞水平上研究MSCs对心肌细胞的旁分泌作用, 采用撤去培养液中血清以及缺氧条件模拟心肌梗塞后移植入的MSCs面临的缺血微环境, 观察到MSCs条件培养液能够促进心肌细胞肥大, 具体表现在心肌细胞蛋白含量增加, 细胞面积显著增加, [³H]-Leu掺入增加及ANF表达增强。本实验中, 心肌细胞生长至正常状态(细胞伸展开, 完全自主、有节律的跳动)时加入MSCs条件培养液进行处理; 同时, 因为心肌细胞几乎不具备有丝分裂能力, 不能进行增殖, 因此, 我们观察到的蛋白质合成和含量增加

是细胞体积的增大, 即细胞发生了肥大。

从实验结果可以看出, 6 h和9 h收集的MSCs条件培养液具有明显促心肌细胞肥大的效果, 说明MSCs条件培养液中含有能够促进细胞肥大的活性物质。本研究结果还显示, 6 h收集的MSCs条件培养液具有最明显的促心肌细胞肥大作用, 而在经24 h收集的MSCs条件培养液处理组, 心肌细胞没有发生肥大, 说明不同时间点的MSCs条件培养液对心肌细胞产生的作用不同。从本实验结果我们可以推测, 6 h及9 h时间点MSCs条件培养液中含有某些能够促进心肌细胞肥大的活性物质; 但MSCs在24 h缺氧/无血清的条件下有可能分泌出更多其他种类的细胞因子, 而这些因子恰恰可以阻断6 h及9 h分泌的活性物质的促肥大作用。

最近, Kinnaid等^[12]的研究结果证明, 人的MSCs在单纯缺氧条件下即可分泌多种细胞因子: FGF-2、FGF-7、IL-1、IL-6、TGF- β 、TNF- α 、VEGF等。同时另外有研究表明FGF-2、IL-1、IL-6、TGF- β 及TNF- α 均具有促进心肌细胞肥大及促成纤维细胞胶原合成的作用^[13-17], 在心肌梗塞后心脏功能的代偿及心肌重塑过程中扮演重要角色。本研究小组先前的研究结果显示, 大鼠的MSCs条件培养液能有效促进乳鼠心脏成纤维细胞的胶原合成, 且以6 h收集的MSCs条件培养液处理组作用最强^[7]。因此, 结合目前研究进展, 本实验结果可以在一定程度上解释干细胞移植后早期心功能改善的部分机制: 移植入梗塞区的MSCs在局部缺氧缺血微环境中, 可能分泌上述多种细胞因子, 各种细胞因子能够作用于邻近的心肌细胞和成纤维细胞, 通过复杂的旁分泌及自分泌途径调节某些基因的表达并促进心肌细胞肥大, 对降低了的心功能产生一定的代偿作用。大鼠的MSCs缺氧/无血清条件培养液中究竟含有哪些细胞因子? 细胞因子的分泌谱究竟随时间的延长发生了哪些变化? 其中哪些细胞因子在促进心肌细胞肥大过程中发挥了作用? 下一步的研究中我们将对这些问题进行深入的探讨。

综上所述, 本研究结果证明MSCs条件培养液能够通过旁分泌途径促进心肌细胞肥大, 这一机制可能参与了细胞移植后早期心功能的改善, 对于进一步阐明细胞移植治疗心肌梗塞的临床应用提供了可靠的实验依据和理论基础。

参考文献(References)

- [1] Keating A. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13: 419

- [2] Krampera M *et al.* *Bone*, 2006, **39**: 678
[3] Amado LC, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**: 11474
[4] Tang J *et al.* *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, **30**: 353
[5] Gneocchi M, *et al.* *Nat Med*, 2005; **11**: 367
[6] Zhu W *et al.* *Stem Cells*, 2006, **24**: 416
[7] 韩 瑜等. *中国分子心脏病学杂志*, 2006, **2**: 43
[8] Shyu KG *et al.* *J Biomed Sci*, 2006, **13**: 47
[9] Liu J *et al.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**: H501
[10] Dai W *et al.* *Circulation*, 2005, **112**: 214
[11] Tang YL *et al.* *Ann Thorac Surg*, 2005, **80**: 229
[12] Kinnaird T *et al.* *Circ Res*, 2004, **94**: 678
[13] Corda S *et al.* *Circ Res*, 1997, **81**: 679
[14] Horio T *et al.* *Endocrinology*, 1998, **139**: 4576
[15] Fredj S *et al.* *J Cell Physiol*, 2005, **204**: 428
[16] Gray MO *et al.* *Cardiovasc Res*, 1998, **40**: 352
[17] Sarkar S, *et al.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**: H107

Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Cultured Rat Mesenchymal Stem Cells Conditioned Medium

Rui-Xia Xu, Xi Chen, Jing-Hai Chen, Yu Han, Bian-Mei Han*

(Research Center for Cardiovascular Regenerative Medicine, the Ministry of Health, Cardiovascular Institute and Fu-Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

Abstract This study examined the hypertrophic effect of mesenchymal stem cells-conditioned medium (MSCs-CM) on neonatal rat cardiomyocytes. Rat MSCs were cultured with serum-free medium under hypoxic condition for 3 h, 6 h, 9 h and 24 h, and then the conditioned medium were collected separately. Cultured neonate rat cardiomyocytes were examined by ^3H -leucine incorporation, ANF-luciferase expression, F-actin staining and cell area measurement after stimulated with the above MSCs-CM for 48 h. Compared with control group, the total protein content, ^3H -leucine incorporation, ANF-luciferase expression and cell area were obviously increased in MSCs-CM stimulated groups. These results demonstrated that MSCs-CM induced cardiomyocyte hypertrophy in a paracrine manner and implied that this effect likely involved in the improvement of heart function after MSCs transplantation.

Key words mesenchymal stem cells; conditioned medium; cardiomyocyte; hypertrophy; paracrine

Received: December 22, 2006 Accepted: March 28, 2007

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.304001780)

*Corresponding author. Tel: 86-10-88396049, E-mail: hanbianmei2006@yahoo.com.cn