

骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞

吕铁伟^{1*}, 田杰¹, 朱静², 邓兵², 江德勤¹, 陈沅¹, 钱永如¹

(¹重庆医科大学儿童医院心血管内科; ²重庆医科大学儿科研究所, 重庆400014)

摘要: 观察骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)植入体内后, 在心肌微环境诱导下分化为心肌细胞的能力。无菌条件下取出大鼠双侧股骨及胫骨, 冲洗骨髓腔获得细胞, 贴壁筛选法纯化MSCs, 体外培养、扩增, 4, 6-二咪基-4-联苯基吲哚(4, 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)标记细胞, 注入结扎冠脉左前降支所致心肌梗塞模型鼠的心肌组织。在不同时间点处死大鼠, 获取心肌组织, 采用HE染色和电镜技术对植入MSCs进行形态学观察和超微结构检测, 荧光免疫组化检测植入MSCs肌球蛋白重链(MHC)和心肌特异性抗原Cx43的表达, 同时应用RT-PCR技术检测心脏早期发育基因NKx2.5、GATA-4的表达。结果发现细胞标记效率为100%, 通过连续检测MSCs植入后细胞形态从无规则状态、幼稚细胞表型逐渐向成熟心肌细胞方向转化, 植入细胞排列同正常肌纤维方向平行, 且植入四周后电镜检测到闰盘的存在; 两周出现MHC的表达, 后随时间延长表达逐渐增强。四周出现Cx43的表达, 以后表达稳定, RT-PCR检测NKx2.5、GATA-4在一天即出现弱表达, 两周~三周时表达最强, 以后强度逐渐减弱。结果表明MSCs在体内微环境条件下能够转化为心肌细胞。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 心肌细胞; 体内; 诱导分化; 动物实验

中图分类号: Q813.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-197-07

心肌梗塞、心肌病等心血管疾病严重威胁人类健康, 发病率和死亡率居各类疾病之首, 其主要病因为功能性心肌细胞的减少或丧失, 临床上内科保守治疗和心脏移植因各具有一定的局限性而难以推广; 成熟心肌细胞再生能力有限, 心肌细胞对缺血缺氧性损伤的反应是肥大, 坏死而不是增生, 由周围纤维结缔组织修复损伤, 形成心脏疤痕, 导致心肌重构, 心输出量下降, 最后心功能衰竭, 导致死亡。

细胞替代疗法^[1,2]是心脏病有效的治疗途径, 将其他来源的细胞植入受损的心肌组织内, 转化为心肌细胞或有心肌细胞功能的细胞, 替代衰竭或死亡的心肌细胞, 重建心肌, 恢复或改善心功能, 最后达到治疗心脏病的目的, 动物实验表明许多类型的细胞都可用于细胞替代疗法, 包括胚胎和新生心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞, 但远期效应、心脏并发症和对自身的损伤等方面的影响都制约进一步的研究。故寻找一安全有效理想的种子细胞显得尤为重要。

研究发现^[3]人类、鸟类、啮齿类等动物的骨髓

存在另一类干细胞间—充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs), 具有干细胞自我更新、多向分化的特点。在特定条件下具有向骨、软骨、脂肪、神经元和心肌细胞分化的潜能。Makino等^[4]报道MSCs在体外培养的过程中, 加入诱导剂5-氮胞苷(5-aza)后, 可使之转化为心肌细胞, 并从形态学、电生理特性上得以肯定。而本实验中, 我们不经过任何诱导, 将纯化、扩增的MSCs直接植入到心肌组织内, 观察MSCs在体内微环境条件下分化为心肌细胞的能力, 并给予进一步的鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 Wistar大鼠, 清洁级动物, 雌雄不限, 体重180~220g, 购于重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要实验试剂 胎牛血清(美国Hyclon公

收稿日期: 2003-04-30; 修回日期: 2003-09-10

国家自然科学基金资助项目(项目编号: 30271381)

* 通讯作者, E-mail: ltw200145@yahoo.com.cn

司); DMEM/F₁₂ 培养基主要组分包括 13 种氨基酸、8 种维生素、微量元素、无机离子和谷氨酰胺(美国 Hyclon 公司); 胰蛋白酶(上海博亚公司); DAPI (生物晶美公司); 免疫组化试剂(美国 Santacruz 公司); RT-PCR 试剂盒(北方同正公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的分离、纯化与扩增 异戊巴比妥钠(用量 10mg/kg)腹腔内注射麻醉 Wistar 大鼠, 严格无菌条件下取出其双侧股骨及胫骨, 用 DMEM/F₁₂ 培养基对骨髓腔进行反复冲洗, 将冲洗液进行离心(1500 转/分)5 分钟, 弃去上清液, 加入培养基混悬细胞, 移入培养瓶, 放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱进行培养; 根据 MSCs 贴壁生长而其他细胞不贴壁的特点, 用贴壁筛选法对 MSCs 进行纯化, 每三天换一次液, 经数次换液后, 非贴壁细胞和贴壁细胞中不具有自我更新能力的细胞基本上可以除去, 从而得到较纯化的 MSCs。待 MSCs 80% 贴满培养瓶底时, 用 0.02%EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶以 1:1 比例混合进行消化传代, 传代后继续培养。

1.2.2 MSCs 细胞标记 将 DAPI 以 50μg/ml 浓度加入培养基中, 与细胞共同孵育过夜, 然后倒掉培养基, 用 0.01mol/L PBS 缓冲液漂洗细胞 6 次以洗掉未结合的 DAPI, 再用胰蛋白酶消化后离心收集细胞, 计数, 加入 DMEM/F₁₂ 培养基制成细胞悬液以备用。

1.2.3 大鼠急性心肌梗塞动物模型的建立和 MSCs 移植 3.5% 水合氯醛(1ml/100g)腹腔麻醉大鼠, 行胸骨旁切口, 在动物呼吸机的支持下, 于 3、4 肋间打开胸腔, 暴露心脏, 左冠脉的起始处位于左心耳后下缘, 在起始点下方 2~3mm 处结扎左冠脉前降支建立急性心梗模型, 以远端供血区心肌组织颜色苍白、心电图检测 S-T 段持续抬高及病理组织切片作为模型制作成功的标志。结扎冠脉至少 40 分钟后, 用微量注射器吸取标记好的传三代细胞悬液 100μl(含细胞数为 1 × 10⁶), 直接注入梗死区边缘的心肌组织, 常规关闭胸腔。术后单笼饲养, 抗感染治疗。

1.2.4 培养细胞形态及标记的观察 倒置显微镜动态观察 MSCs 在不同代数 and 不同时期的形态变化, 同时荧光显微镜下观察 MSCs 标记情况及标记效率。

1.2.5 植入后 MSCs 形态变化及超微结构的观察

细胞移植后大鼠, 在不同的时间点处死, 无菌条件下获取心脏标本, 于细胞注射点取心肌组织,

做连续冰冻切片, 按常规步骤做切片的 HE 染色, 光镜下观察 MSCs 在植入不同时间点的形态变化; 取出移植四周的心脏标本, 用戊二醛进行常规固定, 在注射点取心肌组织, 经过脱水、漂洗、染色等步骤制成超薄切片, 进行电镜观察。

1.2.6 免疫组化检测 MHC、Cx43 的表达 取不同时间点的心肌组织连续冰冻切片, 按照免疫组化的常规操作步骤, 对肌球蛋白重链(MHC)、心肌细胞缝隙连接蛋白 Cx43 进行检测。本实验采用两种荧光标记, 细胞采用 DAPI 标记, 免疫组化采用 FITC 标记二抗, DAPI 在 345nm 紫外光的激发下呈现蓝色荧光, 而 FITC 在 488nm 蓝光的激发下则呈现黄绿色, 将同一视野的两张图片结合观察, 鉴定 MSCs 植入宿主心肌组织后 MHC 及 Cx43 的表达情况。

1.2.7 RT-PCR 检测心脏早期发育基因 NKx2.5、GATA-4 的表达 无菌条件下取植入 MSCs 后不同时间点的心肌组织, 以正常新生鼠和正常成年鼠心肌组织作为对照, Trizol 一步法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 加入 NKx2.5、GATA-4 特异性引物及内参照 β-actin 引物, 标本入 PTC-2000 基因扩增仪, 设定循环参数(变性 94℃ 40s, 58℃ 40s 72℃ 60s, 最后延伸 7min, 总循环数为 36 个循环), 扩增目的基因, 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图象分析系统对结果进行分析。

基因	引物序列	基因长度
GATA-4	上游: 5'-ctgtcatctcactatgggca-3'	275bp
	下游: 5'-accaaggtcttggcagcgat-3'	
NKx2.5	上游: 5'-ttaaggacgagcctgaacc-3'	216bp
	下游: 5'-cag atgccggttcaggtactcagtc-3'	
β-actin	上游: 5'-acactgtgccatctacagg-3'	624bp
	下游: 5'-tcatactgctcaggccggga-3'	

2 结果

2.1 MSCs 的形态观察及细胞标记

对通过骨髓腔冲洗获得的细胞进行培养, 4h 后可见 MSCs 贴壁, 其中悬浮的圆形细胞为幼稚的红细胞。24h 后大部分 MSCs 均已贴壁, 其形态为梭形或短棒状, 经过几次换液后, 大部分红细胞被倒掉, 而 MSCs 形态则变为典型的梭形或纤维状, 立体感强、折光性好、数量可(图 1)。MSCs 体外扩增迅速, 原代培养细胞 5~7 天长满瓶底, 传代后细胞生长加快, 3~5 天就可传代。本实验中我们将 MSCs 传至 12 代, 细胞数目从原代的 5 × 10⁵ 扩增到 7.5 × 10¹²。用 DAPI 进行细胞标记后, 移至荧

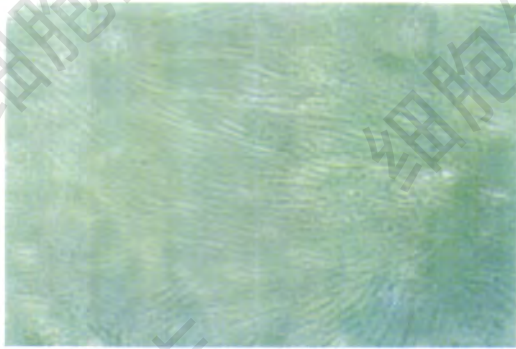


图1 原代培养十天传代前的MSCs(倒置相差显微镜×100)

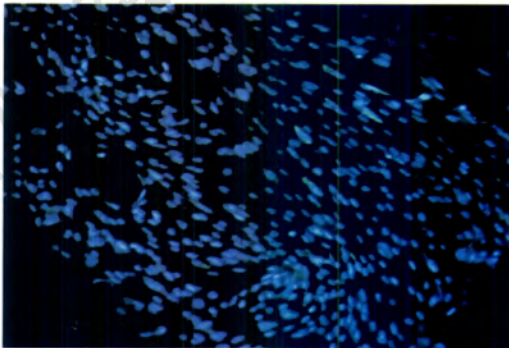


图2 DAPI的细胞标记(倒置相差显微镜×100)

光显微镜下观察可见所有MSC均已标上蓝色荧光。该方法标记敏感性好,标记效率高(图2)。

2.2 急性心肌梗塞动物模型构建的鉴定

心电图检测发现在冠脉结扎后I、II、III导连ST段呈持续性抬高,病理组织切片常规HE染色后,显微镜下观察可见心肌组织呈区域性变形坏死,病变区肌纤维排列紊乱,肌丝断裂溶解,细胞核固缩甚至碎裂,间质充血水肿,有炎性细胞浸润(图3、4)。

2.3 植入后MSCs形态变化及超微结构观察

MSCs植入急性心肌梗塞模型心肌组织后能够存活和增殖,形态发生了明显的变化,植入早期呈幼稚细胞表型,细胞体积小,但胞核大,胞浆内容少,核浆比大。细胞核染色较浓,而胞浆淡染,同周围正常细胞有明显的区别,细胞在注射点附近无规则地堆积,与周围肌纤维排列无任何组织解剖关系;至第四周,可见细胞体积增大,细胞远离注射点,分布范围变广,呈条索状,以树枝样方式向宿主正常和梗塞区域的心肌组织中延伸,其延伸方向与正常肌纤维相一致,到六周时,细胞同正常组织形成了完好的整合,细胞形态与宿主心肌细胞相似,肌纤维排列平行,胞核位于细胞的中央,

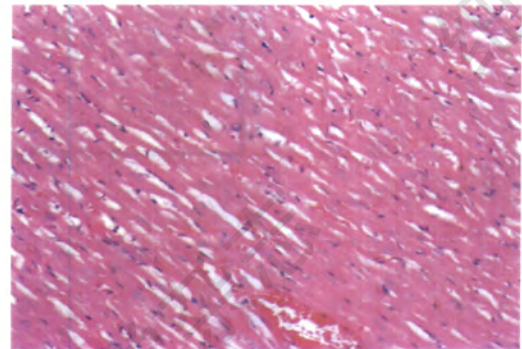


图3 正常心肌组织切片(HE×100)

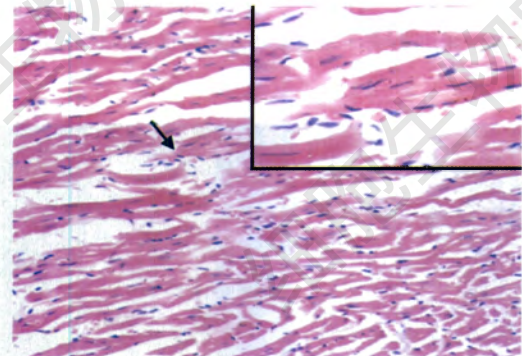


图4 动物模型病理组织切片

右上图为箭头所示区域的放大,可见肌纤维排列紊乱,肌丝断裂溶解,细胞核固缩甚至碎裂。

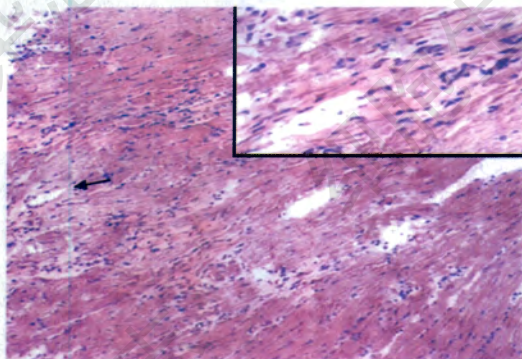


图5 MSCs植入四周的组织切片(HE×100)

右上图为箭头所示区域的放大,可见植入细胞为幼稚细胞表型,核浆比大,淡染,呈条索状向正常心肌组织中延伸。

大多为单核,呈圆形或椭圆形,但染色仍较宿主细胞为淡染(图5、6)。MSCs注入宿主心肌组织四周后,处死动物,移植点取心肌组织标本行超薄切片,电镜观察结果显示在移植处出现明显的闰盘结构,细胞内含有丰富的线粒体。闰盘一侧肌丝排列规则,而另一侧则相对稀疏(图7),初步提示闰盘结构在幼稚细胞和成熟细胞间形成。

2.4 免疫组化对MHC、Cx43的检测

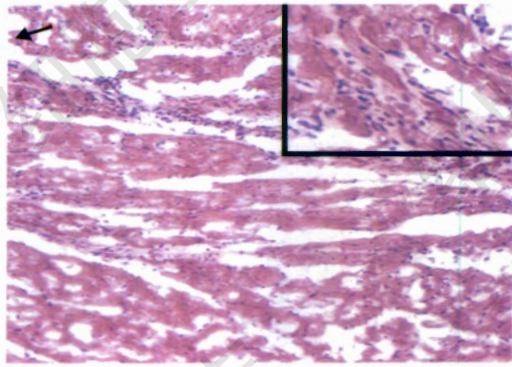


图6 MSCs 植入六周的组织切片(HE×100)

右上图为箭头所示区域的放大, 可见植入六周后细胞体积同宿主细胞相似, 胞核缩小, 细胞排列方向与正常心肌细胞相一致。

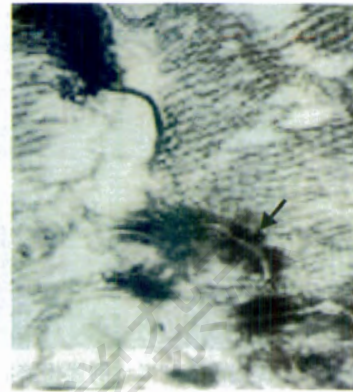


图7 MSCs 植入四周时的闰盘观察(×150 000)

箭头所示即为闰盘结构, 细胞内有线粒体存在。右侧肌丝排列规则, 而左侧肌丝分布疏松, 初步提示该结构在幼稚细胞与成熟细胞之间形成。

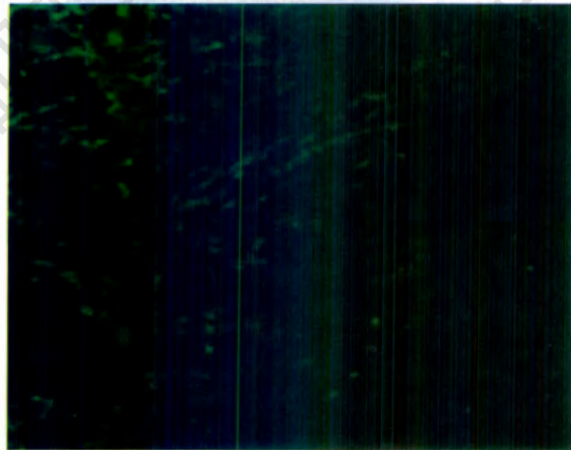
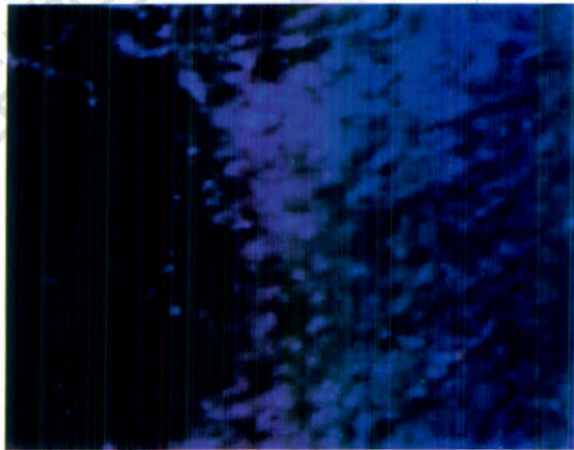


图8 MSCs 植入后对MHC的检测(×100)

左图为DAPI 标记的细胞, 右图为MHC 的表达, 两图为同一视野。

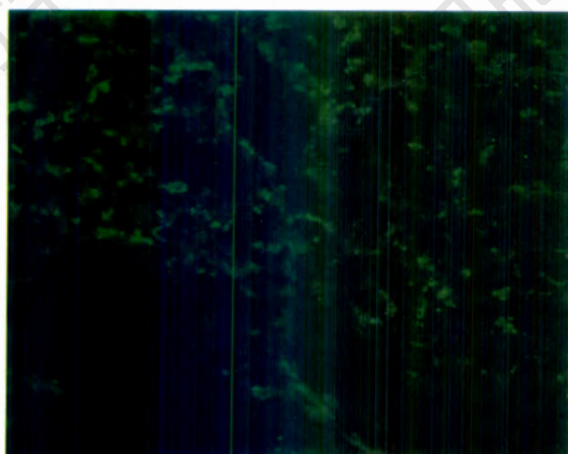
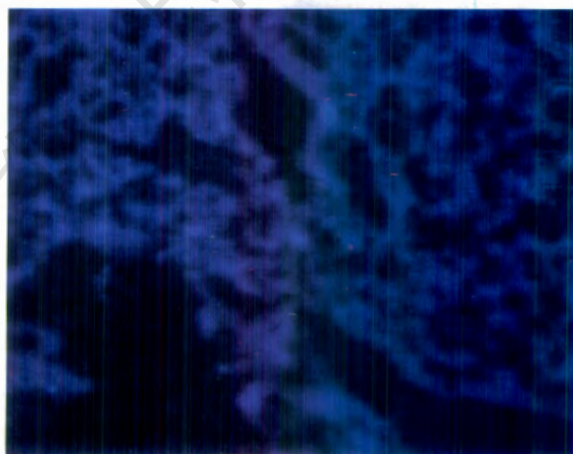


图9 MSCs 植入后对Cx43的检测(×100)

左图为DAPI 标记的细胞, 右图为Cx43 的表达, 两图为同一视野。

免疫组化结果显示细胞移植两周后, 出现MHC的弱表达, 随着移植时间的延长, MHC的表达强度逐渐增加, 证明MSC已向成肌细胞方向分化, 但尚未有分化为心肌细胞; 四周后检测发现出

现Cx43的表达, 以后Cx43的表达增强, 说明MSC已向心肌细胞方向分化(图8、9)。

2.5 RT-PCR对早期发育基因NKx2.5、GATA-4的检测

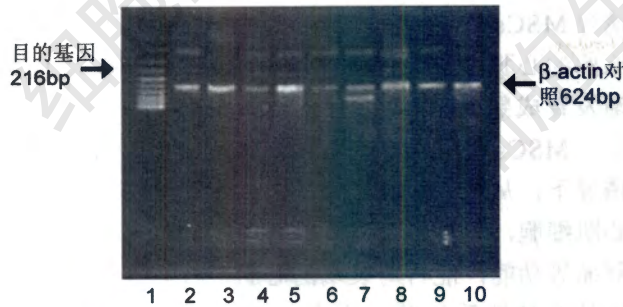


图10 MSCs 植入后 NKx2.5 mRNA 的表达

条带1: Marker; 条带2: 正常新生鼠对照; 条带3: MSCs 植入后一天; 条带4: MSCs 植入后一周; 条带5: MSCs 植入后两周; 条带6: MSCs 植入后三周; 条带7: MSCs 植入后四周; 条带8: MSCs 植入后五周; 条带9: MSCs 植入后六周; 条带10: 正常成年鼠对照。

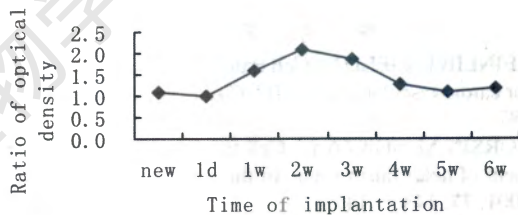


图11 MSCs 植入后 NKx2.5 mRNA 表达的动态变化

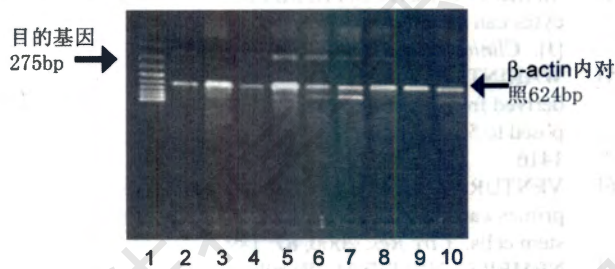


图12 MSCs 植入后 GATA-4 mRNA 的表达

条带1: Marker; 条带2: 正常新生鼠对照; 条带3: MSCs 植入后一天; 条带4: MSCs 植入后一周; 条带5: MSCs 植入后两周; 条带6: MSCs 植入后三周; 条带7: MSCs 植入后四周; 条带8: MSCs 植入后五周; 条带9: MSCs 植入后六周; 条带10: 正常成年鼠对照。

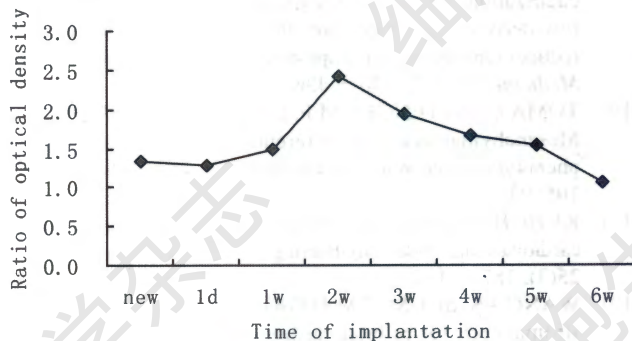


图13 MSCs 植入后 GATA-4 mRNA 表达的动态变化

RT-PCR 检测结果显示, MSCs 移植后一天

NKx2.5、GATA-4 即有低强度的表达, 随后表达强度显著提升, 一周时表达强度较一天有明显升高, 两周时达到高峰, 而后随时间的延长, 其表达强度则缓慢减弱(图10、11)。

同样, 在 MSCs 移植后一天~一周 GATA-4 即有低强度的表达, 一周后表达强度显著提升, 两周~三周时达到高峰, 而后随时间的延长, 其表达强度则迅速减弱(图12、13)。

3 讨论

MSCs 作为成体干细胞, 主要存在于骨髓组织中, 通过简单骨髓穿刺或骨髓抽吸即可得到, 体外扩增容易; 由于 MSCs 免疫原性低, 其诱导分化的组织免疫排斥反应弱, 且可来源于自体, 避免了组织配型和免疫排斥反应的问题; MSCs 可诱导分化的组织广泛, 能分化为所有的间充质组织类型, 以上优点使 MSCs 成为组织工程学较理想的种子细胞。有些学者^[4,5]通过动物试验证明 MSCs 在体外培养的条件下, 加入一定的诱导剂可以转变为心肌细胞。本实验将分离获得的 MSCs 不经过体外诱导, 而是直接移植到急性梗死心肌模型鼠受损心肌组织边缘, 观察 MSCs 在心肌组织内存活情况, 并通过形态学、组织学和分子生物学等方面观察其在宿主心肌组织内转化为心肌细胞的能力。

实验结果显示 MSCs 在体内心肌组织微环境诱导下向心肌细胞的转化是一个连续的过程, 在此过程中, 其基因和表型均发生了很大的变化, 在形态学、组织学和基因水平各方面均向心肌细胞方向靠拢。移植前 MSCs 为幼稚细胞表型, 细胞核大, 形状不规则呈多型性, 染色质分布稀疏, 电子密度低, 胞浆细胞器少。植入宿主心肌组织后形态发生改变, 细胞体积逐渐增大, 胞浆内容物增多, 分布范围扩大, 其逐渐向梗塞区和周边心肌组织伸展, 并同周边心肌纤维平行排列, 形成类似心肌组织的结构; 同时选用 MHC、Cx43 以及细胞间闰盘三个指标进行检测, 鉴定 MSCs 是否向心肌细胞方向转化。肌球蛋白是肌原纤维基本收缩功能单位-肌小节中粗肌丝的重要组成部分, 是心肌、骨骼肌和平滑肌细胞所特有的蛋白。闰盘是心肌细胞间一种特化的结构单位, 是心肌同步性收缩和电生理一致性的物质结构基础, 缝隙连接是闰盘的主要组分之一, Cx43 是心肌缝隙连接的主要功能蛋白, 且在心肌中特异表达。本实验结果有闰盘结构的出

现,且显示出其一侧细胞浆中肌丝排列疏松,而另一侧排列则致密规则,初步提示在植入的幼稚MSCs与成熟心肌细胞间形成了闰盘结构,在实验中,我们用荧光免疫组化技术对MHC、Cx43进行检测,植入的MSCs用显蓝色荧光的DAPI进行标记,而二抗用显绿色荧光的FITC标记,DAPI为特异性标记,宿主心肌细胞在荧光显微镜下显色,宿主心肌组织本身含有MHC、Cx43而同样可显现出FITC的颜色,因此将同一视野两种荧光结合观察,即可观测到MSCs植入宿主心肌组织后其MHC、Cx43的表达情况,结果表明第二周即出现MHC弱表达,以后表达强度逐渐增高,MHC的表达说明其已向肌细胞方向分化。细胞移植四周后Cx43表达阳性,随时间的延长稳定表达,在同一时段细胞间出现闰盘结构,这两者作为心肌组织的特异性标志,显示MSCs已向心肌细胞方向转化。

在MSCs体内诱导分化的过程中,受到各种细胞因子及基因的调控。目前研究发现转录因子NKx2.5、GATA-4对心脏的早期发育具有至关重要的作用^[6,7]。NKx2.5在心肌细胞的分化、整个原始心管的形成与环化中起到重要的调控作用,且有显著的心脏特异性表达的特点,在胚胎、胎儿心肌细胞中保持一定的表达水平,是心脏前体细胞分化的最早期标志之一。GATA-4是GATA转录因子家族的成员,在心脏中特异性表达,它除了直接参与调节心肌细胞结构基因和相关调控基因的表达外,还可与几种心肌基因调控区的DNA结合,参与心肌细胞的分化过程。NKx2.5、GATA-4在心肌细胞发育的早期即出现表达,两者单独或协同作用可促进正常心肌细胞的特化、分化和成熟。在MSCs诱导分化为心肌细胞的过程中,我们亦检测到两个基因的表达,且表达强度-时间曲线相似,显示NKx2.5、GATA-4在MSCs诱导分化调控过程中的重要性,亦进一步证实MSCs向心肌细胞方向转化。

在实验中,MSCs植入心肌组织后,在宿主心肌微环境的诱导下,显示出向心肌细胞逐渐分化的特性,在此过程中,MSCs形态逐渐类似于宿主心肌细胞,并且有收缩蛋白MHC、连接蛋白Cx43的出现及早期发育基因的表达,说明MSCs经体内诱导已成功分化为心肌细胞,但其分化机制尚不清楚,可能与心肌组织微环境中心肌特异性生长因子、细胞因子、细胞间质及MSCs和宿主心肌细胞间接的信号传导有关,它们以暂时和连贯的方式

诱导MSCs表达相关发育基因,使MSCs先分化为原始的心肌细胞,最后在各种复合因素的作用下逐渐发育成熟^[8-13]。

MSCs植入受体心肌组织后,在体内微环境的诱导下,从形态学和组织学上证实其已初步分化为心肌细胞,但其是否具备心肌细胞的电机械联系及舒缩等功能,能否对衰竭的心肌进行修复并改善衰竭的心功能等问题,需进一步进行实验研究。同时,可对心肌组织内微环境诱导的调控机制、基因水平的整合、有否差异表达基因的表达做更深入的研究,给课题开拓了更大的外延空间。

参 考 文 献

- [1] REINLIB L, FIELD L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease[J]? *Circulation*, 2000, **101**:182-187.
- [2] CORSIN M, SONZA L. Cell transplantation for the treatment of heart failure state of the art [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2001, **77**: 143 - 147.
- [3] PITTENGER M F, PACKAY A M, BECK S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell[J]. *Science*, 1999, **284**: 143 - 147.
- [4] MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro [J]. *Clinical Invest*, 1999, **103**(5): 697 - 705.
- [5] WAKINTANI S, SAITO T, CAPLAN A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow Mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. *Muscle Nerve*, 1995, **18**: 1412-1416.
- [6] VENTURA C, MAIOLI M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent pluripotent stem cells. *Circ Res*, 2000, **87**: 189.
- [7] NEMER G, NEMER M. Regulation of heart development and function through combinatorial interactions of transcription factors. *Ann Med*, 2001, **33**(9):604.
- [8] WANG J S, SHUM-TIM D, CHEDRAWY E, et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiological and therapeutic implications [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **122**: 699 - 705.
- [9] KOCHER A A, SCHUSTER M J, SZABOLCS S, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human-bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function[J]. *Nature Medicine*, 2001, **7**: 430 - 436.
- [10] TOMA C, PITTENGER M F, CAHILL K S, et al. Human Mesenchymal stem cell differentiate to a cardiomyocytes phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, **105**: 93 - 98.
- [11] KEIICHI FUKUDA. Development of regenerative cardiovascular: tissue engineering [J]. *Artificial Organs*, 2001, **25**(3): 187 - 193.
- [12] WANG J S, SHUM-TIM D, GALIPEAU J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, **120**: 999 - 1006.
- [13] RAJNOCH C, CHACHQUES J C, BERREBIA, et al. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **121**: 871 - 878.