

## 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究

王 俊,陈 斌,刘 翔,李 芝,陈亦江\*

(南京医科大学第一附属医院胸心外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究体外培养大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)经 5-氮胞苷(5-aza)诱导定向分化为心肌样细胞形态学及分子生物学特征。方法:SD 大鼠股骨骨髓经密度梯度离心及贴壁分离培养传代 MSCs,体外用 5-aza 定向诱导向心肌样细胞分化。相差显微镜观察心肌样细胞形态学变化。免疫组化检测肌钙蛋白 T(cTnT)、 $\alpha$ -肌动蛋白和缝隙连接蛋白 Cx43 表达。结果:密度梯度离心及贴壁法分离培养的 MSCs 生长稳定,增殖快。5-aza 诱导后,部分细胞形态发生变化,有肌管样结构形成。随诱导后培养时间延长 MSCs 中 cTnT、 $\alpha$ -肌动蛋白和缝隙连接蛋白 Cx43 表达逐渐增强。结论:密度梯度离心及贴壁分离培养可获得大量纯度较高的骨髓间充质干细胞。经 5-aza 诱导骨髓间充质干细胞体外可分化为心肌样细胞。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;心肌样细胞;5-氮胞苷

**[中图分类号]** Q813

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)05-631-05

### Experimental study on 5-azacytidine induced differentiation of murine mesenchymal stem cells to cardiomyogenic cells *in vitro*

WANG Jun, CHEN Bin, LIU Xiang, LI Zhi, CHEN Yi-jiang\*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the cardiomyogenic potential and biological characteristics of mesenchymal stem cell (MSCs) induced by 5-azacytidine (5-aza) *in vitro*. **Methods:** MSCs were isolated from bone marrow of mice by density gradient centrifugation and attachment culture. MSCs of passage 2 were induced to differentiate by 5-aza at 10.0  $\mu$ mol/L. Optical microscope was used to observe the morphology of cells. cTnT,  $\alpha$ -actin and connexin-43 were detected by immunochemistry to identify the differentiation. **Results:** MSCs isolated by density gradient centrifugation and attachment culture can grow steadily and proliferate rapidly. After incubated with 5-aza, MSCs were found to change their round shape into spindle shape and form myotube structure. cTnT,  $\alpha$ -actin and connexin-43 expression was gradually up-regulated with the extension of culture time. **Conclusion:** The density gradient centrifugation and attachment culture method can be used for isolating MSCs with high purity. After treatment with 5-aza, MSCs can differentiate into cardiomyogenic cells with typical morphological and histological characteristic *in vitro*.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; cardiomyogenic cells; 5-azacytidine

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 631-635]

缺血性心脏病严重危害人民健康,由于大量心肌细胞在缺血时发生“顿抑(stunned)”、“冬眠(hibernation)”、坏死以及凋亡,因此治疗上不仅要考虑改善心肌的血供,还需要增加心脏的有效协同收缩物质<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有强大的增殖能力及多向分化潜能,因此成为心肌梗死和充血性心力衰竭治疗研究领域的

热点<sup>[2]</sup>。但 MSCs 能否在体外经 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导分化为正常心肌细胞仍有争议。本研究通过 5-aza 体外诱导大鼠 MSCs 并观察其分化为心肌样细胞的能力,为临床干细胞治疗缺血性心脏病奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

实验动物:2~4 周龄健康 SD 大鼠(南京医科大学实验动物中心),质量 150~200 g,雄雌不限。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30872544)

\*通讯作者, E-mail: yjchen@njmu.edu.cn

试剂和仪器:高糖 DMEM 培养基(美国 Invitrogen 公司),磷酸盐缓冲液(PBS,美国 JRH 公司),胎牛血清、EDTA、胰蛋白酶、5-aza、Percoll 细胞分离液(美国 Sigma 公司), $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)抗体、DAB 显色系统(丹麦 DAKO 公司),鼠抗人心肌特异性肌钙蛋白 T(cTnT)抗体、缝隙连接蛋白 Cx43 抗体(美国 Transduction Labs),FITC 标记抗大鼠 CD29、CD34、CD44、CD45 抗体(美国 Pharmingen 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 大鼠 MSCs 的分离培养

SD 大鼠颈椎脱臼处死后,以 75%酒精浸泡 5 min 消毒,无菌条件下取出股骨,剪除骨骺端,用 DMEM 培养基冲洗骨髓腔,制成细胞悬液,缓慢将细胞悬液注入预先加有 Percoll 细胞分离液的无菌试管中,4℃ 1 500 r/min 离心 15 min,取中间的单个核细胞层,用 DMEM 培养基洗涤 1 次,以 800 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基,以  $2 \times 10^6$  个/L 的密度接种于塑料培养瓶中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 及 80%相对湿度的孵箱中培养。48 h 后更换培养液,以后每 3 d 换液 1 次。倒置相差显微镜观察细胞的形态、贴壁及生长情况,待细胞生长至 90%融合时,PBS 洗涤细胞 2 次,用 0.25%的胰蛋白酶和 1 mmol/L EDTA 按 1:4 配比组成的复合消化液消化,按 1:3 比例传代培养。

### 1.2.2 MSCs 生长曲线绘制

取培养的第 2 代 MSCs,细胞融合达 90%时,PBS 洗涤 3 次,胰酶消化成单细胞悬液,将细胞悬液移至离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM 培养液制成单细胞悬液,细胞计数,调整细胞密度为  $5 \times 10^3$  个/L,然后以每孔相同的细胞数接种于 6 孔板内,依次于培养后 1~9 d 消化细胞,计数细胞,每次消化 3 孔,取平均值,根据每天所得的细胞数绘制生长曲线。

### 1.2.3 MSCs 的表面标志鉴定

培养的细胞用 PBS 洗涤 3 次,胰酶消化成单细胞混悬液,将细胞混悬液移入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀用 PBS 洗涤 3 次,分别加入 FITC 标记抗大鼠 CD29、CD34、CD44、CD45 抗体,4℃孵育 30 min,PBS 洗去未标记抗体,1%多聚甲醛固定,应用流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

### 1.2.4 体外诱导 MSCs 向心肌细胞分化

取体外培养的第 2 代 MSCs 经胰酶消化,PBS 洗涤后,接种于 24 孔板中,第 3 天后加入 10.0

$\mu\text{mol/L}$  5-aza 诱导,孵育 24 h 后,用 IMDM 冲洗,再按原培养条件培养,每周换液 1 次。

### 1.2.5 免疫细胞化学鉴定

弃去 6 孔板内培养液,PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次。4%甲醇-20℃固定 15 min,PBS 再振荡清洗 3 次,10 min/次。加入 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的甲醇液孵育 10 min 阻断内源性过氧化氢酶,PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次。6 孔板 1、2、3 孔内分别加入鼠抗人  $\alpha$ -actin、鼠抗人 cTnT 和 Cx43 抗体 50  $\mu\text{l}$ ,4、5、6 孔加入 PBS 50  $\mu\text{l}$  作为阴性对照。37℃孵育 60 min,PBS 振荡清洗 3 次,10 min/次。加入 DAB,室温下孵育 15 min,彻底清洗后,加入苏木素复染 2 min,再次彻底清洗后,甘油明胶封片,镜检。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 细胞形态及增殖能力

用 Percoll 分离液密度梯度离心及贴壁分离法可从骨髓中获得较纯的间充质干细胞。细胞接种 24 h 后部分大圆形单核细胞贴壁。48 h 后,贴壁细胞呈纺锤形,可见分裂增殖。4~5 d 后,细胞增殖迅速,呈星形,贴壁生长形成多个形态均一的细胞集落。10 d 后,细胞呈梭形,集落明显增大并融合。传代后细胞呈圆形,散在分布,24 h 贴壁,细胞体较原代增大,逐渐重新变为梭形及扁平多角形。传代后的 MSCs 较原代细胞增殖速度快,第 2 代 MSCs 生长潜伏期 1~2 d,传代细胞倍增时间为 3~4 d,具有较好的增殖能力,7~8 d 进入平台期(图 1)。经传代 6 次后,细胞仍较有活力,以 1:3 的分种率在 72 h 内可长满,形态呈长梭性,极性排列。8 代以后细胞生长速度逐渐缓慢。

### 2.2 MSCs 表面标志鉴定

应用流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原,结果显示细胞均一性约 94%,表型为 CD29、CD44 阳性,CD34、CD45 阴性,证明提取培养的 MSCs 纯度较高(图 2)。

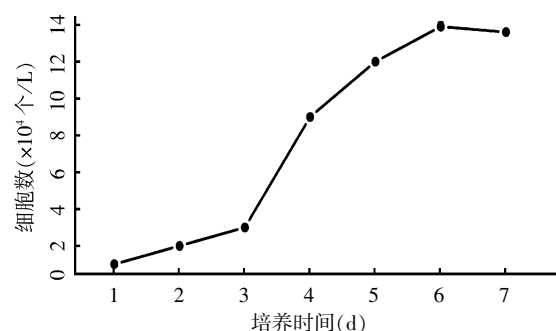


图 1 MSCs 生长曲线

Figure 1 MSCs growth curve

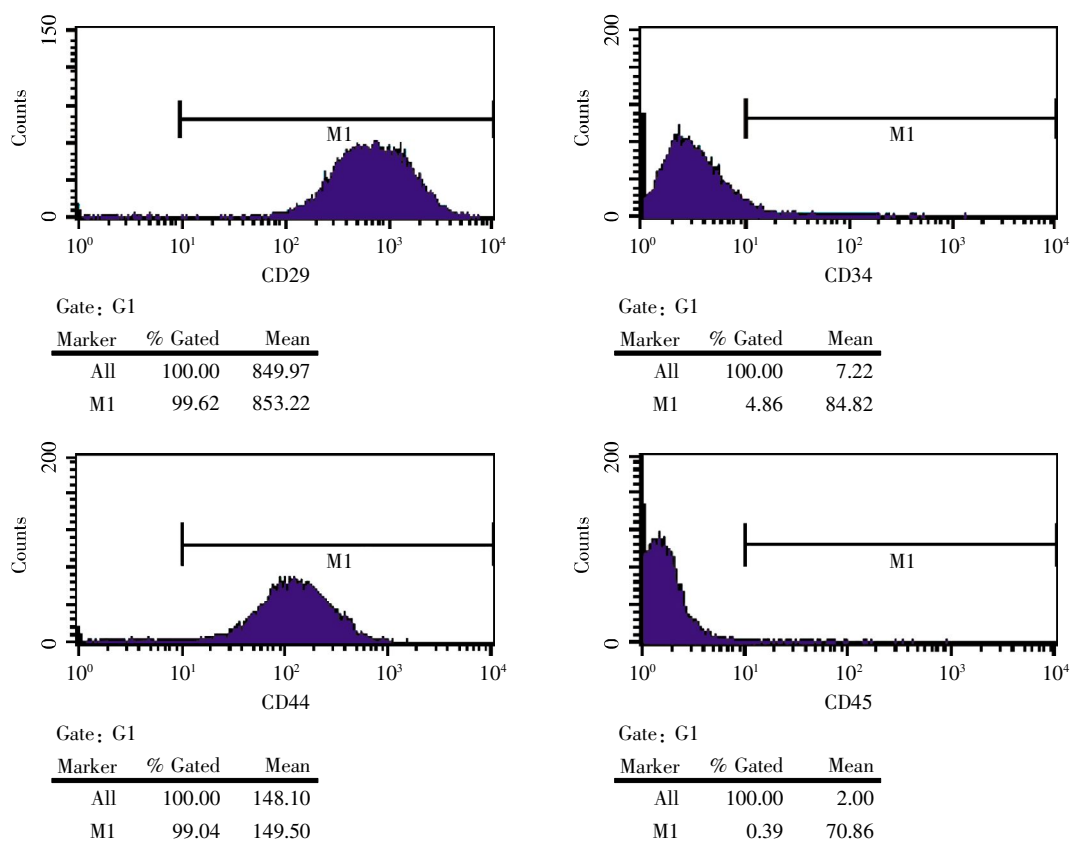


图 2 流式细胞仪检测 MSCs 表面抗原 CD29、CD34、CD44 和 CD45 的表达

Figure 2 The expression of CD29, CD34, CD44 and CD45 of MSCs by flow cytometry

### 2.3 MSCs 诱导分化为心肌样细胞

以 10 μmol/L 的 5-aza 诱导后, 细胞形态逐渐发生变化, 1 周后细胞体积增大, 呈杆状形态。2 周后, 细胞呈多角形和短柱状, 相邻细胞融合。3 周后细胞相互连接, 呈一定方向性排列, 开始形成类肌管结构。4 周后更多的细胞形成类肌管样结构(图 3)。培养细胞无自主搏动。

### 2.4 免疫组化

诱导后 2 周 MSCs 的 α-actin、cTnT 和 Cx43 的单抗呈阳性反应, 胞浆内见棕黄色颗粒(图 4)。且诱导后随培养时间延长 MSCs cTnT、α-actin 和 Cx-43 表达渐增强。对照组免疫组化染色未见阳性表达。

## 3 讨论

急性心肌梗死后心肌细胞只有极少数可再生, 绝大部分坏死心肌形成瘢痕组织, 从而导致心室重构, 最终发展为难治性心功能衰竭<sup>[3]</sup>。尽管近来心力衰竭治疗有了很大发展, 但这些治疗均不能修复坏死心肌。细胞移植因此成为研究的热点, 其目的是希望通过移植细胞分化为心肌细胞, 移植后给心室壁提供一个强有力的构架, 限制纤维化及坏死的扩

张, 限制心室扩张和重建, 改善心肌收缩性; 并与宿主心肌细胞形成偶联, 参与宿主心脏的同步收缩, 增加心肌的顺应性和弹性, 从而改善心功能<sup>[4]</sup>。目前可供心脏细胞移植的细胞包括骨髓干细胞、胚胎干细胞、胎心细胞、骨骼肌卫星细胞等。骨髓干细胞包括造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)、内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)或称血管干(母)细胞(angioblast)和 MSCs。MSCs 具有强大的增殖能力及多向分化潜能, 可在体外长期培养, 遗传背景较稳定, 来源充分, 不存在主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)限制, 无免疫排斥; 而且用自体干细胞诱导构建的组织不涉及伦理问题, 所以利用 MSCs 治疗缺血性心脏病和心力衰竭日益受到重视<sup>[5]</sup>。

MSCs 分离的方法主要包括贴壁筛选、密度梯度离心、流式细胞仪分选和免疫磁珠分选等<sup>[6-8]</sup>。本实验采用 Percoll 分离液密度梯度离心将单个核细胞自骨髓细胞群中筛出, 再采用贴壁分离法, 结果表明这种两步骤的方法虽然获得细胞数量少, 操作相对复杂易污染, 但较单纯贴壁分离法获得的 MSCs 更纯。MSCs 体外培养生长曲线提示细胞生长

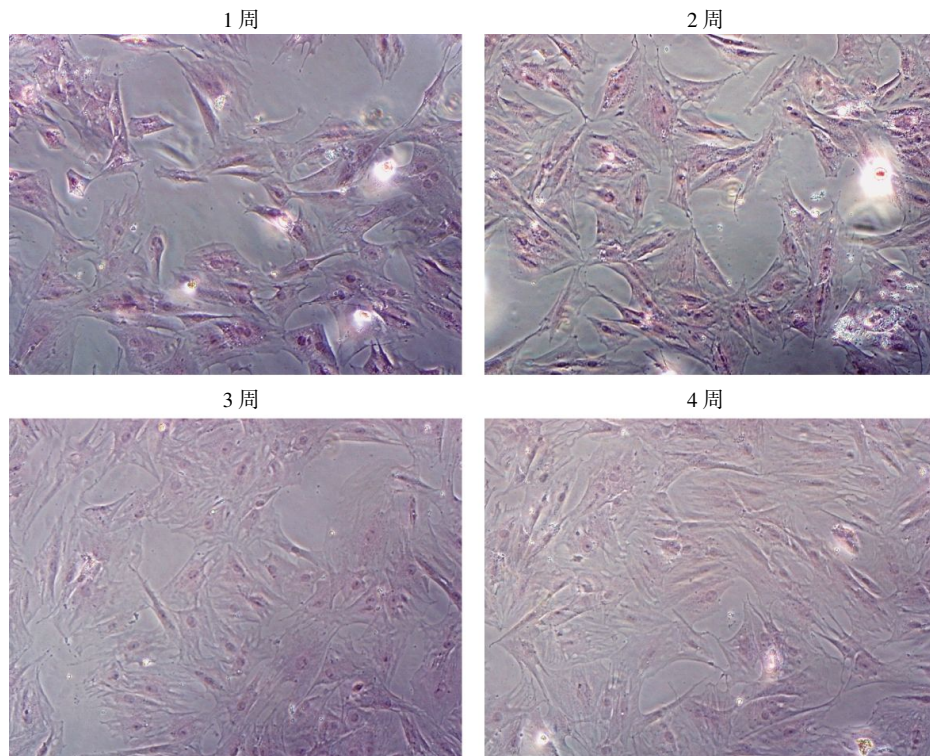
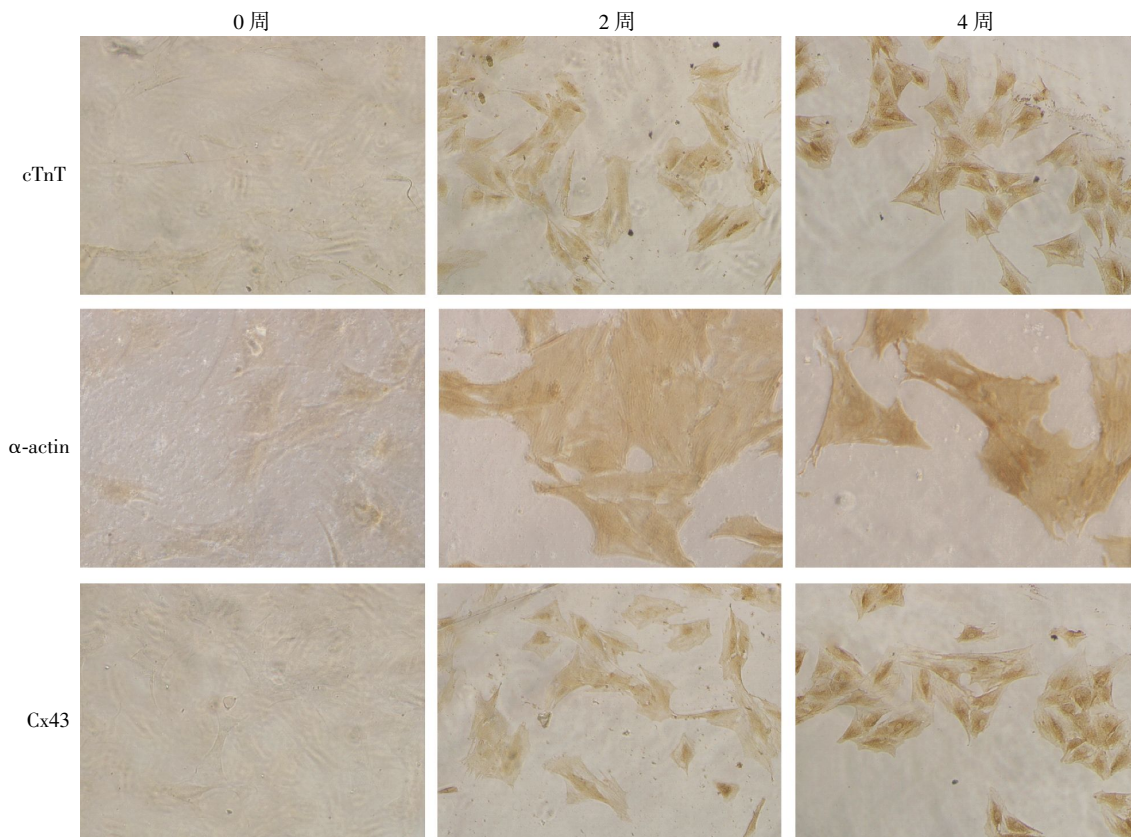


图 3 MSCs 经 5-aza 诱导后 1~4 周形态变化( $\times 200$ )

Figure 3 Morphological changes of MSCs after induction by 5-azacytidine( $\times 200$ )



胞浆内可见棕黄色颗粒,随培养时间的延长,特异蛋白表达增强。

图 4 MSCs 特异性抗体(cTnT, $\alpha$ -actin,Cx43)免疫组化染色阳性反应( $\times 200$ )

Figure 4 Immunocytochemistry results of the localizations of cardiac troponin T, $\alpha$ -sarcomeric actin,and Cx43( $\times 200$ )

经历了潜伏期、快速增殖期和平台期,传代培养的 MSCs 能在短时间内贴壁,接种存活率高,贴壁细胞有强大的增殖能力,证实了在体外快速大量扩增 MSCs 的可能性。本实验采用流式细胞仪检测细胞表面抗原,结果提示 CD29、CD44 呈阳性反应,而对造血细胞的 CD34、CD45 抗原则呈阴性反应,表明 Percoll 分离液密度梯度离心及贴壁分离培养法可有效地从骨髓细胞群中提取出纯度较高的 MSCs。

骨髓干细胞具有多向分化潜能,近年研究发现体外培养条件下多种诱导剂可调控骨髓间充质干细胞向心肌样细胞转化。Makino<sup>[9]</sup>与 Fukuda<sup>[10]</sup>最早将小鼠 MSCs 经过 5-aza 体外诱导分化成心肌细胞,为 MSCs 在心脏病细胞移植治疗的应用提供了实验依据。此过程的机制尚不完全清楚,推测 5-aza 作用于 MSCs 时能整合进 DNA,与调控向心肌分化的特异启动子基因上的阻遏蛋白结合,通过抑制 DNA 甲基转移酶使其去甲基化并发生构型变化,从而启动细胞向心肌细胞分化。本实验选择了浓度为 10.0  $\mu\text{mol/L}$  的 5-aza 对第 2 代 MSCs 进行诱导,结果表明经 5-aza 诱导后的 MSCs 比诱导前增大,渐趋于均一的梭形,同集落细胞之间形成连接,并随着时间延长形成肌管样结构。免疫组化结果表明诱导后骨髓间充质干细胞表达  $\alpha$ -actin、cTnT 和 Cx43,且诱导后随培养时间延长表达渐增强。对照组免疫组化染色未见阳性表达。 $\alpha$ -actin 是肌细胞的特征性骨架蛋白,在骨骼肌和心肌中均有表达,在维持肌原纤维形态以及在肌小节之间发生信号传递方面起重要作用<sup>[11]</sup>。cTnT 仅在心肌中表达,是鉴定心肌细胞的特异性蛋白。Cx43 在心脏中主要存在于心房和心室肌内,参与缝隙连接的构成,与中间连接、桥粒一起构成闰盘的三种特殊结构。心肌细胞间通过特定的缝隙连接耦联,在电反应中形成整体<sup>[12]</sup>。MSCs 诱导后 Cx43 表达阳性,说明心肌细胞间具有形成闰盘结构的形态学基础,为有节律的收缩舒张运动提供了物质基础,能维持电活动和收缩、舒张功能的同步性,对心肌功能的保持非常重要。上述蛋白在 5-aza 诱导后的细胞呈阳性表达,说明 MSCs 发生了心肌样转化。值得注意的是浓度为 10.0  $\mu\text{mol/L}$  的 5-aza 仅诱导部分 MSCs 分化成心肌样细胞,因此,如何提高诱导分化的效率还有待进一步研究。此外

实验未发现细胞有节律性的搏动。因此,诱导分化后细胞内的超微结构和功能也有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Berry MF,Engler AJ,Woo YJ,et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,290(6):2196-2203
- [2] Bianco P,Robey PG,Simmons PJ. Mesenchymal stem cells:revisiting history,concepts,and assays [J]. Cell Stem Cell,2008,2(4):313-319
- [3] Kemp CD,Conte JV. The pathophysiology of heart failure [J]. Cardiovasc Pathol,2012,[Epub ahead of print]
- [4] Minguell JJ,Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease[J]. Exp Biol Med,2006,231(1):39-49
- [5] Augello A,De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. Hum Gene Ther,2010,21(10):1226-1238
- [6] Chang Y,Hsieh PH,Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential[J]. Chang Gung Med J,2009,32(3):264-275
- [7] Meirelles Lda S,Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell:isolation,*in vitro* expansion,and characterization [J]. Br J Haematol,2003,123(4):702-711
- [8] Pountos I,CorcaddenD,Emery P,et al. Mesenchymal stem cell tissue engineering:techniques for isolation,expansion and application [J]. Injury,2007,38(Suppl 4):s23-s33
- [9] Makino S,Fukuda K,Miyoshi S,et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro* [J]. J Clin Invest,1999,103(5):697-705
- [10] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs,2001,25(3):187-193
- [11] Kinner B,Zaleskas JM,SpectorM. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells [J]. Exp Cell Res,2002,278(1):72-83
- [12] Boengler K,Schulz R,Heusch G. Connexin 43 signalling and cardioprotection [J]. Heart,2006,92(12):1724-1727

[收稿日期] 2012-01-05