

• 基础研究 •

5-氮胞苷浓度对体外骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞的影响

程芮 王士雯 曹丰 孟玲 王颀芳 李艳华 李泱 裴雪涛

【摘要】 目的 探讨不同浓度5-氮胞苷(5-aza)体外诱导小型猪骨髓间充质干细胞(MSCs)向心肌样细胞分化的可能性及其对细胞增殖速度的影响。方法 10 ml骨髓, 1.077 g/ml Ficoll 密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞(MNCs), 第2代传代细胞分别加入3, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度5-aza化学诱导24 h, 与对照组连续培养4周, 细胞爬片免疫荧光法鉴定结蛋白 desmin 及心肌特异性肌钙蛋白 I(cTnI)的表达, 电镜观察诱导细胞的超微结构变化。结果 5-aza化学诱导后 MSCs 形态变长、增大, 排列更加紧密、整齐, 5和10 $\mu\text{mol/L}$ 组可见较多的多核细胞, 部分管状结构, 诱导率分别为36%和31%, 无显著性差异; 3 $\mu\text{mol/L}$ 组上述变化的细胞极少, 3种浓度及对照组4周后细胞扩增数量分别为 $(3.81 \pm 0.40) \times 10^6$ 、 $(3.76 \pm 0.62) \times 10^6$ 、 $(3.67 \pm 0.80) \times 10^6$ 及 $(2.90 \pm 0.21) \times 10^6$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组增殖速度明显减慢 ($P < 0.05$)。各组诱导后的细胞均未见自发搏动。免疫组化提示 desmin 及 cTnI 表达阳性, 5和10 $\mu\text{mol/L}$ 组电镜下出现肌丝样结构、心房颗粒及细胞间的缝隙连接。结论 小型猪 MSCs 经5、10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza化学诱导可分化为心肌样细胞, 其中5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza不仅可以诱导心肌样细胞而且对细胞增殖速度影响小。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 心肌细胞; 5-氮胞苷

Effect of different concentrations of 5-azacytidine on cells differentiation of swine bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells *in vitro*

CHENG Rui, WANG Shiwen, CAO Feng, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To investigate the potential of differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from swine bone marrow into cardiomyocyte-like cells after exposure to different concentrations of 5-azacytidine (5-aza) *in vitro*. Methods Ten ml of bone marrow was taken from swine, and mononuclear cells (MNCs) were freshly isolated by 1.077 g/ml Ficoll lymphocyte separating medium using density-gradient centrifugation. The 2nd-generation MSCs were exposed to the medium containing different concentrations of 5-aza (3, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h for induction cellular differentiation, then cultured in complete of medium for 4 weeks together with control group. Desmin and myocardium-specific cardiac troponin I (cTnI) were examined with immunohistochemistry on day 28 and the ultrastructure of induced cells were observed under electron microscope. Results The MSCs were enlarged, lengthened and closely arranged after chemical inducement. Multinuclear cells and myotube structures were found more in 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza treatment groups than in 3 $\mu\text{mol/L}$ and control groups. $(3.81 \pm 0.40) \times 10^6$, $(3.76 \pm 0.62) \times 10^6$, $(3.67 \pm 0.80) \times 10^6$ and $(2.90 \pm 0.21) \times 10^6$ cells were harvested from 3, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza and control groups respectively and no spontaneous beat was observed in all groups after 28 days of culture. The proliferation slowed down obviously in 10 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.05$). Immunohistochemical examination revealed positive expression of desmin and cTnI in 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ groups, but no heart-specific protein was found in 3 $\mu\text{mol/L}$ group or in control group. Transmission electron microscopy showed that the differentiated cells had myofilaments, atrial granule structures and crevice connection between two cells. Conclusion Purified MSCs from swine bone marrow can differentiate into cardiac-like muscle cells by 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza inducement *in vitro* and the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza has little effect on cell proliferation.

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; cardiomyocyte; 5-azacytidine

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 国家973计划(2001CB509906)、国家863计划重大专项(2002AA205051, 2003AA205160)和北京市科委重大项目(H020220010190)。国家自然科学基金(30371825)

作者单位: 100853 北京市, 解放军总医院老年心血管病研究所(程芮、王士雯、孟玲、李泱); 100850 北京市, 军事医学科学院输血研究所干细胞生物学研究室(程芮、曹丰、孟玲、王颀芳、李艳华、裴雪涛)

通讯作者: 裴雪涛, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn; 王士雯, E-mail: wangsh@public.bta.net.cn

实验研究证实,小鼠、猪、犬及人的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)体外经 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导后可分化为类似心肌细胞结构及电生理特性的心肌样细胞^[1-3],但化学诱导剂的安全性限制了它的临床应用,而且体外化学诱导后的细胞用于心肌再生治疗是否优于未诱导的细胞,使之更有利于转化为有功能的心肌细胞尚不清楚,因此探讨最低的有效剂量对诱导细胞的体内应用显得尤为重要。

1 对象与方法

1.1 材料 小型猪,4~6月龄,体重22~35 kg,雌雄不限,解放军总医院实验动物中心提供;1.077 g/ml Ficoll 淋巴细胞分离液(联星公司);1×PBS;肝素;DMEM-F₁₂ (Dulbecco's modified Eagle's medium-F₁₂)培养基(Hyclone);胎牛血清(Hyclone);5-aza(Sigma公司);一抗为鼠抗猪 desmin 单克隆抗体(Sigma公司,150倍稀释)、羊抗人心肌特异性肌钙蛋白I(cardiac-specific troponin I, cTnI)多克隆抗体(SantaCruz);TRITC 标记的羊抗小鼠 IgG(北京中山生物公司);FITC 标记的兔抗羊 IgG(北京中山生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的分离及培养 无菌条件下取小型猪肋骨两根,PBS清洗,DMEM-F₁₂培养基浸泡,咬骨钳钳夹,骨髓内反复冲洗,等量 DMEM-F₁₂ 稀释,200目滤网过滤,2500 rpm 离心 5 min,弃上清及脂肪层,DMEM-F₁₂培养基重悬为单细胞悬液,叠加到密度 1.077 g/ml 的 Ficoll 分离液上,1500 rpm 离心 30 min,吸取白细胞膜层以上的部分,离心、洗涤,加入完全培养基(DMEM-F₁₂ + 10%胎牛血清 + 双抗含 100 U/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素)充分混匀,按 $2 \times 10^5/\text{cm}^2 \sim 3 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的浓度接种于 25 ml 塑料培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 和饱和湿度的孵箱中培养,72 h 换液,每 2~3 d 换液一次。80%融合时 0.25%的胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化,按 1:2~1:3 比例及时传代。

1.2.2 实验分组 5-aza 诱导浓度分为 3, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 3组,对照组始终用完全培养基培养,接种于 24 孔板各 3 孔,25 ml 培养瓶各一瓶,培养时间均为 4 周。

1.2.3 化学诱导分化 取第 2 代纯化的 MSCs,以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于含 6 mm × 6 mm 盖玻片的 24 孔塑料培养板中,另外以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2 \sim 3 \times 10^5/\text{cm}^2$

的浓度接种于 25 ml 塑料培养瓶中。诱导组分别加入 3, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza,孵育 24 h 后弃去诱导剂,PBS 清洗两次,改用完全培养基继续培养;对照组仅用完全培养基,每 2~3 d 换液一次,4 周后进行免疫组化及电镜鉴定。

1.2.4 光学显微镜动态观察 诱导组及对照组细胞倒置显微镜及相差显微镜下每天连续观察细胞形态变化。

1.2.5 免疫组化染色 诱导后 4 周的细胞爬片,荧光显微镜下进行结蛋白 desmin、cTnI 的免疫荧光鉴定。阴性对照采用 PBS 代替一抗,操作步骤参照中山生物技术公司提供的免疫组化染色步骤。

1.2.6 透射观察定向分化细胞的超微结构 取 5-aza 诱导 4 周后的细胞爬片,3%戊二醛 4℃前固定 2 h,4℃下 PBS-蔗糖缓冲液漂洗,1%锇酸后固定、反复漂洗、梯度酒精脱水,100%丙酮浸透,包埋剂包埋,ULTRACUTE/S 切片机切片,厚度 60~70 nm,醋酸铀避光染色 10 min,柠檬酸铅染色 10 min,Philips EM-400T/Philips CM120 电镜观察。

1.2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS10.0 统计软件分析,组间比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MSCs 的培养 分离的单个核细胞培养 24 h 即有少量 MSCs 贴壁生长,36~48 h 内出现多个小克隆,72 h 细胞克隆增大,7~10 d 细胞迅速增殖,为形态均一的长梭形,排列密集,按照 1:2~1:3 比例及时传代,传代细胞生长旺盛时呈旋涡样,平均每 3 d 左右细胞达 70%~80%融合,每瓶平均获得 $(6.2 \pm 0.11) \times 10^5$ 个 MSCs。10 ml 骨髓液,正常传至第 3 代即可获得 $(3.8 \pm 0.6) \times 10^6$ 个细胞,继续培养可扩增至 10 代以上,仍维持原增长特性,未见自发分化(图 1)。

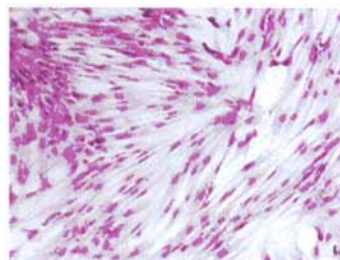


图1 传至11代的MSCs的HE染色旋涡样生长,仍维持原增长特性,未见自发分化($\times 50$)

2.2 光学显微镜下结果 与对照组相比 5-aza 诱导后细胞体积增大、变长,呈平行排列,排列更加紧密、整齐,部分细胞出现多核、管状结构,以 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 诱导组多见,诱导率分别为 36% 和 31%,3 $\mu\text{mol/L}$ 诱导组仅发现 3 个多核细胞,未见肌管样结构,各诱导组培养 4 周始终未见自发搏动现象。与对照组相比 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞增殖速度减慢,4 周后扩增的细胞数量明显少于对照组, $P < 0.05$,3 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较无明显差异(表 1,图 2)。

表 1 细胞接种密度及增殖情况

组 别	接种密度/ cm^2	4 周细胞数 $\times 10^6$ (个)
对照组	2.41×10^5	3.81 ± 0.40
3 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.55×10^5	3.76 ± 0.62
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.52×10^5	3.67 ± 0.80
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.60×10^5	$2.9 \pm 0.21^*$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 免疫组化结果 免疫荧光染色提示 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导后 28d 结蛋白 desmin(红色荧光)及 cTnI 染色阳性(绿色荧光);对照组未见阳性细胞(图 3)。

2.4 透射电镜结果 与对照组相比电镜下 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导后 28 d,细胞核增大,呈椭圆形,胞

浆内质网发达,有肌丝样结构形成,明显且多见,并可见心房颗粒,少数细胞间可见缝隙连接,10 $\mu\text{mol/L}$ 组核质较稀疏,3 $\mu\text{mol/L}$ 组及对照组细胞未见上述变化(图 4)。

3 讨 论

近年的研究证实成熟心肌细胞并不是“永久性细胞”,也具有分裂和增殖能力^[4],但心肌细胞损伤、死亡后,成熟心肌细胞难以迅速再生,因此损伤区域仍通过细胞代偿肥大或瘢痕组织替代,最终导致心力衰竭。而细胞移植可以增加具有完整收缩功能的心肌细胞数目,改善局部或总体心肌的收缩功能,有效治疗心肌损伤,是一个切实可行的增加成体心肌细胞的方法。

动物实验表明, MSCs 能分化为心肌和内皮等组织,并能分泌多种生长因子诱导血管生成,因此 MSCs 是治疗心血管疾病理想的种子细胞来源^[5-7]。MSCs 向心肌细胞分化机制的研究包括化学诱导和组织微环境诱导,其中以化学诱导剂 5-aza 最常用。5-aza 是一种去甲基化药物,到目前为止是惟一的 MSCs 分化为心肌样细胞的有效化学制剂,诱导机制尚未明了,可能与其和控制向心肌分化的特异启动子基因上阻遏蛋白结合,使其去甲基化而发生构型

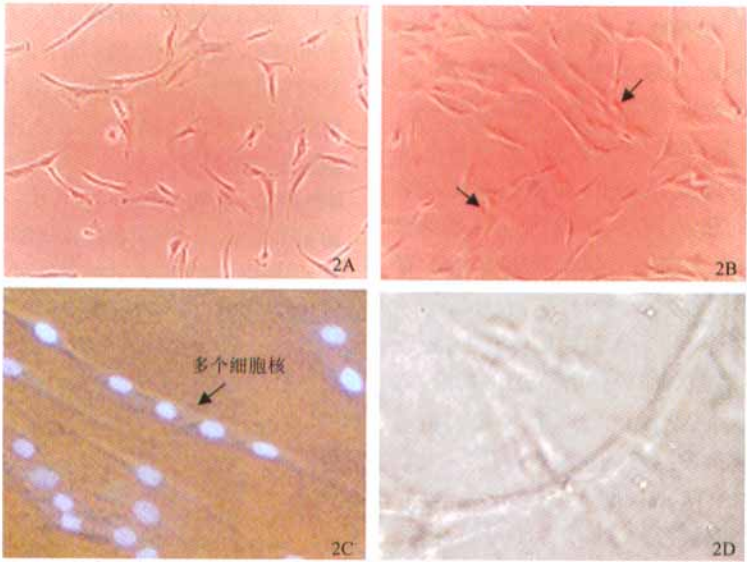


图 2 诱导组及对照组细胞光镜下结果

2A 对照组培养 3 周后细胞散在分布($\times 100$);2B 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza 诱导 3 周后细胞排列整齐,分叉($\times 100$);2C 诱导细胞出现多核现象($\times 200$),胞核 DAPI 染色;2D 诱导细胞肌管样结构($\times 200$)

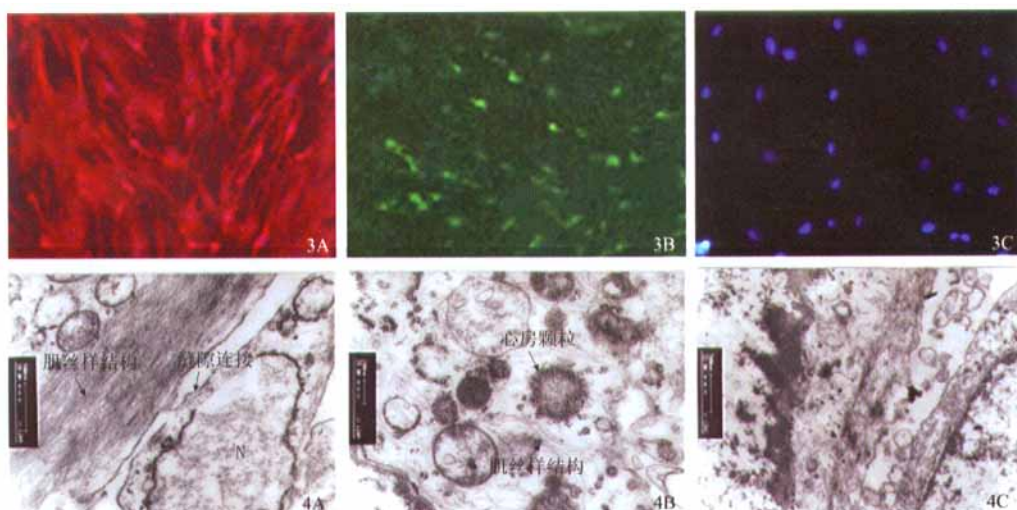


图 3 5-aza 诱导后 MSCs 免疫组化结果

3A desmin 染色阳性, 红色荧光 ($\times 200$); 3B cTnI 染色阳性, 绿色荧光 ($\times 200$), 3C desmin 及 cTnI 双标阴性对照 ($\times 200$)

图 4 5-aza 诱导后及对照组 MSCs 的电镜结果

4A 细胞膜边缘出现肌丝样结构, 两个细胞间的缝隙连接, 右下方细胞(N)核质稀疏 ($\times 28K$); 4B 胞浆内散在肌丝样结构及心房颗粒 ($\times 35K$)。4C 对照组电镜未见肌丝样结构、缝隙连接等 ($\times 28K$)

变化, 启动细胞向心肌分化^[8]。1999 年, Makino 等^[7]首次在体外用较低浓度 ($3 \mu\text{mol/L}$) 5-aza 诱导小鼠 MSCs 分化为心肌细胞, 但其分化效率较低, 文献报道多在 30% ~ 35%^[8]。在本研究中, 笔者发现, 小型猪 MSCs 经过多次传代, 仍保持原有增长特性, 未出现自发分化, 与对照组比较, 光镜下 3, 5 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 3 种不同 5-aza 浓度均可诱导 MSCs 出现多核现象, 以后两组多见, 而且 5 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 组光镜下可见肌管样结构, 电镜下的超微结构出现肌丝、心房颗粒及缝隙连接等心肌样结构, 并且有心肌特异蛋白的表达。而 $3 \mu\text{mol/L}$ 组不仅未出现上述结构变化, 而且未检测到心肌特异蛋白; 另外, $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞空泡样变性多见, 核质稀疏, 该浓度对细胞增殖影响明显, 诱导 4 周后细胞扩增速度明显减慢, 5 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度与 MSCs 诱导率无直接的量效关系, 分别为 36% 和 31%, 增加浓度并不能提高诱导率。到目前为止, 体外诱导后的细胞移植是否优于未诱导细胞的证据不多, Bittira 等^[9]在大鼠左心室冷冻损伤后 3 周的心肌疤痕中注射 5-aza 处理或未处理的 MSCs, 发现 5-aza 处理的细胞似乎产生更多的肌管样细胞, 心肌特异性标志物 cTnI 染色阳性, 提示如果要逆转疤痕为肌性组织, 移植前预处理 MSCs 可能将更为有利。但 5-aza 诱导的细胞虽已具有心肌

细胞的部分特征, 在形态及功能上与成熟的心肌却还存在一定差异, 是否具有心肌细胞特有的电生理特性及功能尚待研究, 因此这种细胞只能称为“心肌样细胞”, 并不是真正的心肌细胞。目前 MSCs 移植用于临床, 都是经不同途径将扩增的 MSCs 注入梗死心肌周围, 依靠组织微环境作用向正常心肌细胞转化, 从而避免细胞经过多体外处理带来的毒副作用; 而诱导后的细胞尚未获得人体应用的许可。本实验结果提示, 5-aza 浓度对 MSCs 分化诱导为“心肌样细胞”有影响, $3 \mu\text{mol/L}$ 浓度不利于向心肌细胞分化; 但提高浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$) 不能增加诱导率反而影响细胞增殖速度, 一方面不容易获得移植所需的细胞数量, 另一方面有可能影响体内局部的增殖; 而 $5 \mu\text{mol/L}$ 不仅能保持一定的诱导率, 同时对细胞增殖影响小, 因此 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 5-aza 是 MSCs 向心肌分化减少毒副作用的最低诱导浓度。

参考文献

- 1 Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. Congenit Anom (Kyoto), 2002, 42:1-9.
- 2 Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous

(下转第 220 页)

病理解剖诊断:(1)原发性系统性淀粉样变性;(2)动脉粥样硬化症,冠心病,主动脉、脑动脉粥样硬化伴溃疡形成和硬化;(3)胸、腹腔积液。

讨论:系统性淀粉样变性是一种少见的免疫系统疾病,常见于中老年男性,平均发病年龄 64 岁^[1]。主要病理改变为淀粉样蛋白沉积于血管壁,以后逐渐扩展至细胞间质,不断累积而引起器官功能障碍及组织损害和萎缩等病变,临床表现视沉积量、累及脏器及其功能受损情况而定,常因心、肾功能不全而死亡。本病主要分原发性和继发性,原发者常累及心、舌、胃肠道、神经和皮肤,而肝、肾、肾上腺和脾受累者常为继发性,尸检发现原发性淀粉样变性患者 80%有肝肾受累^[2]。淀粉样蛋白的电镜表现为特异性的细纤维状结构,无分支,僵硬,呈紊乱的无规律排列,长短不一,直径 8~10 nm。X 线衍射呈交叉 β 片层结构。该蛋白主要分淀粉样轻链(AL)蛋白和淀粉样 A(AA)蛋白两型,两者的形态无特征性区别,但反映了不同的病因。AL 蛋白常见于原发性和骨髓瘤相关淀粉样变性,而 AA 蛋白常见于继发性淀粉样变性,用高锰酸钾碱性刚果红可以鉴别^[2]。经刚果红和高锰酸钾处理后染色,沉积的淀粉样物质均呈砖红色为 AL 蛋白,仅刚果红染色呈砖红色,而经高锰酸钾处理后褪色为 AA 蛋白^[2]。本例为 64 岁男性患者,全身多脏器的血管壁和(或)间质中沉积经高锰酸钾碱性刚果红染色证实为 AL 蛋白的淀粉样物质,且骨髓涂片和尸检结果能排除骨髓瘤诊断。本患者由于

心肌间质淀粉样变性和严重冠心病,终因全心衰竭而死亡。综合考虑本例符合原发性系统性淀粉样变性。因该病的淀粉样物质在不同的组织、器官沉积,临床表现差异很大,故本病的诊断主要依靠活检组织病理学检查,对临床上难以解释的多器官组织损害应注意此病存在。尽管多种组织化学技术已被用来检测淀粉样蛋白,但是该蛋白沉积需达到一定量才出现阳性结果,以致确诊时往往是晚期,而电镜是惟一可早期确立诊断的方法^[3]。本病预后差,与器官系统受累程度有关,确诊后平均生存期为 2 年^[4]。目前尚无理想的治疗方案,激素化疗效果不明显,而且常有副作用。

参考文献

- 1 Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Hematology*, 1995, 32:45-49.
- 2 Tisher MD, Brenner MD. *Renal pathology*. 2nd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1998. 1459-1468.
- 3 Nelson G, Rosai J. *Surgical pathology*. 9th ed. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St lois Sydney Toronto: Mosby Company, 2004. 1181-1184.
- 4 Kumar V, Abulk AB, Fausto N. *Pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: W. B. Elsevier Saunders Company, 2005. 258-264.

(上接第 199 页)

- porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123:1132-1140.
- 3 胡昕婴,史剑慧,牛玉宏,等. 5-氮杂胞嘧啶诱导人骨髓基质干细胞心肌分化. *中国临床医学*, 2004, 11:298-299.
 - 4 Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*, 1998, 83:1-14.
 - 5 Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107:1395-1402.
 - 6 Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of

mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418:41-49.

- 7 Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*, 1999, 103:697-705.
- 8 Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*, 2001, 25:187-193.
- 9 Bittira B, Kuang JQ, Abdulaziz AK, et al. *In vitro* preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74:1154-1160.