

5-氮杂胞苷诱导人脐带间充质干细胞向心肌样细胞的分化☆

阮中宝¹, 杨向军¹, 陈各才², 朱莉², 李伟³, 杨兵³, 欧阳溪³, 潘少辉³

5-azacytidine induces the differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes

Ruan Zhong-bao¹, Yang Xiang-jun¹, Chen Ge-cai², Zhu Li², Li Wei³, Yang Bing³, Ouyang Xi³, Pan Shao-hui³

Abstract

BACKGROUND: 5-azacytidine (5-aza) can induce the differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (hUCMSCs) into cardiomyocytes.

OBJECTIVE: To investigate the cellular mechanism underlying the differentiation of hUCMSCs into cardiomyocytes induced by 5-aza.

METHODS: hUCMSCs were isolated and purified by adherent method. hUCMSCs at passage 3 were induced to differentiate into cardiomyocytes by 5-aza.

RESULTS AND CONCLUSION: Spindle-shaped hUCMSCs were presented from human umbilical cord tissue by adherent culture method. hUCMSCs treated with 5-aza had long cytoplasmic process 1-2 weeks after induction, and they were connected with adjacent cells forming myotube-like structures 3-4 weeks after induction. hUCMSCs treated with 5-aza were stained positively for cTnI 4 weeks after induction. Statistically higher level expression of Nkx2.5 and GATA 4 mRNA in induced group was observed in comparison with those of control group ($P < 0.05$). These indicated that hUCMSCs can be induced to differentiate into cardiomyocytes by 5-aza *in vitro* through up-regulating the expression of Nkx2.5 and GATA4.

Ruan ZB, Yang XJ, Chen GC, Zhu L, Li W, Yang B, Ouyang X, Pan SH. 5-azacytidine induces the differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6705-6708. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 5-氮杂胞苷能诱导人脐带间充质干细胞分化为心肌细胞。

目的: 以5-氮杂胞苷诱导人脐带间充质干细胞分化为心肌细胞。

方法: 采用贴壁培养法分离、纯化人脐带间充质干细胞,以5-氮杂胞苷诱导第3代人脐带间充质干细胞分化为心肌样细胞。

结果与结论: 诱导前脐带间充质干细胞呈典型的梭形;诱导后一二周细胞体积变大,三四周后相邻细胞间胞膜有接触,逐渐相连呈肌管状,细胞胞质内可见细丝样结构。诱导4周后免疫组织化学鉴定人脐带间充质干细胞cTnI表达阳性,未诱导细胞cTnI表达阴性;诱导组Nkx2.5、GATA 4 mRNA表达水平较未诱导组显著增加($P < 0.05$)。提示5-氮杂胞苷可能通过调控GATA4、Nkx2.5基因的表达促进人脐带间充质干细胞分化为心肌样细胞,并促进其成熟。

关键词: 脐带;间充质干细胞;细胞分化;心肌细胞;5-氮杂胞苷

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.013

阮中宝, 杨向军, 陈各才, 朱莉, 李伟, 杨兵, 欧阳溪, 潘少辉. 5-氮杂胞苷诱导人脐带间充质干细胞向心肌样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6705-6708. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

间充质干细胞具有多向分化、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点,在一定条件下能分化成为各种功能细胞,被广泛应用于多种疾病的治疗^[1]。研究发现5-氮杂胞苷在体外可诱导小鼠^[2-3]、人骨髓间充质干细胞及人脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, hUCMSCs)分化为心肌细胞^[4-5]。进一步的研究发现,5-氮杂胞苷可通过参与心肌发育早期转录因子GATA4和/或Nkx2.5的基因表达调控来诱导小鼠^[2,6-7]、大鼠和人骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞^[8-9]。

hUCMSCs具有取材方便、来源广泛、含量

丰富等优点,在一定条件下可定向分化为心肌细胞^[10],但有关其向心肌细胞分化的机制报道较少。文章通过分离纯化后的hUCMSCs经5-氮杂胞苷诱导后向心肌细胞定向分化过程中特异蛋白肌钙蛋白cTnI表达的鉴定和形态观察的研究及GATA4和Nkx2.5的基因表达,初步探讨5-氮杂胞苷是否和骨髓及脐带血间充质干细胞分化为心肌细胞的机制一样,通过参与心肌发育早期转录因子GATA4和Nkx2.5的基因表达的调控来诱导hUCMSCs分化为心肌细胞。

1 材料和方法

设计: 细胞体外分离培养,形态学观察,对比实验。

时间及地点: 于2010-09/2011-04在泰州

¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; ²Department of Cardiology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China; ³Jiangsu BeiKe Bio-Technology, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Ruan Zhong-bao☆, Studying for doctorate, Associate chief physician, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
ruanzhongbao@medmail.com.cn

Correspondence to: Yang Xiang-jun, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
yxjdemail@163.net

Received: 2011-06-28
Accepted: 2011-07-13

¹ 苏州大学附属第一医院心内科, 江苏省苏州市 215006; ² 泰州市人民医院心内科, 江苏省泰州市 225300; ³ 江苏省北科生物科技有限公司, 江苏省泰州市 225300

阮中宝[☆], 男, 1970 年生, 江苏省兴化市人, 汉族, 苏州大学在读博士, 副主任医师, 主要从事心电生理介入治疗及干细胞移植治疗方面的研究。
ruanzhongbao@medmail.com.cn

通讯作者: 杨向军, 主任医师, 教授, 博士生导师, 苏州大学附属第一医院心内科, 江苏省苏州市 215006
yxjdemail@163.net

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)36-06705-04

收稿日期: 2011-06-28
修回日期: 2011-07-13
(20110628018/GW-W)

市人民医院中心实验室及江苏省北科生物科技有限公司完成。

材料:

脐带标本来源: 3份脐带标本来源于2010-09泰州市人民医院产科足月顺产或剖宫产胎儿, 产妇健康, 无传染性疾病, 胎儿无先天性疾病。实验经产妇及其家属同意, 实施经泰州市人民医院伦理委员会批准同意。

主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基	GIBCO, NVF0274
南美胎牛血清	Excell, 10057
5-氮杂胞苷	Sigma A2385
通用型 SP Kit 广谱免疫组织化学试剂盒(sp-0022)、二氨基联苯胺/DAB 染色试剂盒(C0010)、Anti-cTnI 抗体(bs-0799R)、试剂 A: 封闭用正常山羊血清工作液(yb-kw0130)、试剂 B: 生物素化二抗工作液(IgG/Bio)(SP-0023)、SP-9000: 生物素标记山羊抗兔、大鼠和豚鼠 IgG、SP-9001: 生物素标记山羊抗兔 IgG、SP-9002: 生物素标记山羊抗小鼠 IgG、试剂 C: 辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)、试剂 D: 体积分数 3% H ₂ O ₂ 去离子水、普通 PCR 试剂盒	北京博奥森生物技术有限公司
Percoll 细胞分离液	上海前尘生物科技有限公司 17-0891-01
TRIzol 试剂 (RNAA10065)、上海嘉达生物科技有限公司 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(RNAA10065)	上海嘉达生物科技有限公司
DEPC 水	上海研生生化试剂有限公司
ReverTra Ace qPCR RT Kit 试剂盒	东洋纺(上海)生物科技有限公司
SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒	上海欣百诺生物科技有限公司
倒置显微镜	日本 Olympus

实验方法:

hUCMSCs的分离培养与鉴定^[10]: 取采集24 h内的新鲜脐带至培养皿中, 将脐带沿结扎内侧剪断, 取中间部分。加入适量的生理盐水, 洗涤脐带至表面干净无血, 将脐带移至另一培养皿中; 将脐带剪成2.0~3.0 cm的小段, 沿静脉血管剪开, 将静脉血管壁和动脉血管剥离; 将华通氏胶小心的剥离, 用组织剪剪碎至1 mm³大小, 接种于T75培养瓶中, 培养液为10 mL含体积分数10%FBS的DMEM/F12, 倒置显微镜观察细胞形态。待细胞60%融合后, 1:3传代。传至3代后, 部分细胞冷冻保存, 部

分细胞用于实验。整个过程在无菌条件下进行。免疫表型CD29、CD44、CD73、CD105、CD166、CD34、CD45、CD40、CD40L、CD80、CD86、HLA-DR鉴定确定为间充质干细胞。

hUCMSCs的诱导: 取第3代细胞常规消化收集, 用PBS清洗2次, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 重新接种于24孔培养板中, 培养24 h待细胞贴壁(约10%融合), 培养液中加入终浓度为10 μmol/L的5-氮杂胞苷培养24 h, 吸去含5-氮杂胞苷的培养液, 用PBS洗涤2次, 改用完全培养液继续培养, 设对照组5-氮杂胞苷的浓度为0 μmol/L, 其他操作相同。持续培养4周, 每3 d换液1次。在倒置显微镜下观察细胞生长和形态学的变化, 分别于诱导前和诱导后1, 2, 3, 4周进行拍照。

hUCMSCs的免疫组织化学鉴定: 将载有诱导分化4周后和对照组间充质干细胞的盖玻片用PBS轻轻洗涤浸泡5 min; 试剂D孵育10~15 min, 以消除内源性过氧化物酶活性, 滴加试剂A室温孵育10~15 min, 倾去, 勿洗; 滴加适当比例稀释的一抗Anti-cTnI, 37℃孵育2.0~3.0 h; PBS冲洗, 3 min×3次; 滴加试剂B, 室温或37℃孵育10~15 min; PBS冲洗, 3 min×3次; 滴加试剂C, 室温或37℃孵育10~15 min; PBS冲洗, 3 min×3次; 显色剂显色(DAB或AEC); 自来水充分冲洗; 显微镜下拍照, 细胞质中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。

实时荧光定量PCR检测hUCMSCs细胞GATA4、Nkx2.5基因的表达: 收集3份脐带标本诱导组和对照组细胞后, 按Trizol试剂盒说明书提取总RNA。取5 μL RNA进行反转录反应, 反应完毕后取1.0 μL cDNA, 采用Cycler IQ型多彩实时荧光定量探测仪分别检测细胞GATA4、Nkx2.5的基因表达, 参照物为3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 引物序列见表1。

表1 目的基因引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequences	Fragment (bp)
GAPDH-F	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	135
GAPDH-R	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	
Nkx-2.5-F	5'-CCC CTG GAT TTT GCA TTC AC-3'	75
Nkx-2.5-R	5'-CGT GCG CAA GAA CAA ACG-3'	
Gata4-F	5'-GGC TAT GTC CAC CCC GCT CTG-3'	162
Gata4-R	5'-TGGCAGTTGGCAC AGGAGAGG -3'	

分析各孔扩增循环数(Ct值), mRNA 相对含量采用标准化后的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示^[11], 计算基因初始拷贝数的相对量。

主要观察指标: ①倒置显微镜下观察诱导前后hUCMSCs细胞形态变化。②免疫组织化学鉴定诱导组和对照组hUCMSCs细胞cTnI的表达。③实时荧光定量PCR 检测诱导组和对照组hUCMSCs细胞GATA 4、Nkx2.5基因的表达。

统计学分析: 采用SPSS 13.0软件分析, 计量资料组间比较采用配对t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 诱导前后hUCMSCs细胞的形态变化 见图1。

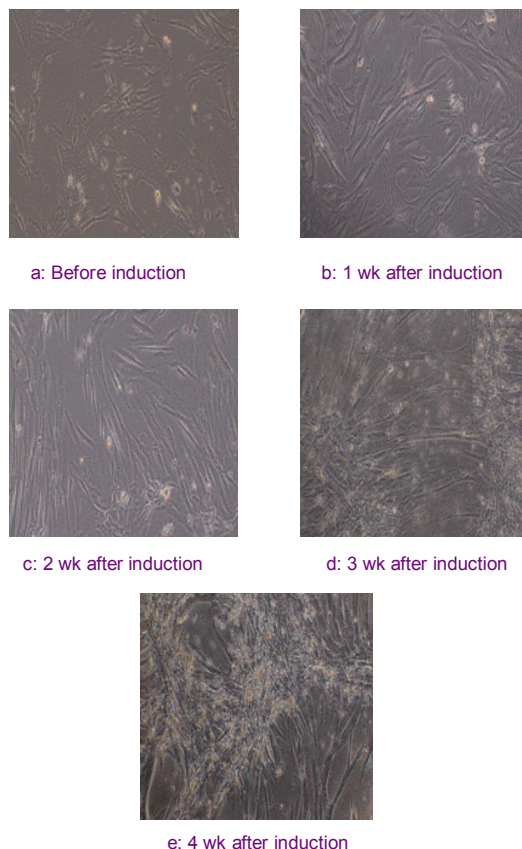


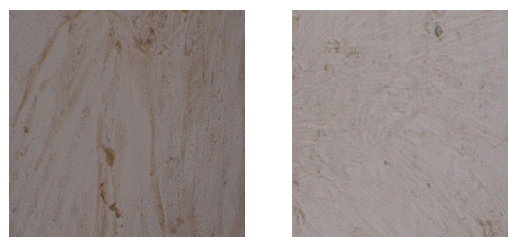
Figure 1 Morphology of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells before and after induction of 5-azacytidine (Inverted phase contrast microscope, $\times 200$)

图1 人脐带间充质干细胞在 5-氮杂胞苷诱导前后的形态变化(倒置显微镜, $\times 200$)

诱导前hUCMSCs细胞为典型的梭形, 核/质比例高, 胞质量少而均匀, 无颗粒、细丝样结构, 核内可见明显核仁, 细胞呈同心圆或漩涡样生长; 处理24 h后, 仅有少量细胞死亡; 诱导后一两周, 细胞形态出现变化; 细胞多紧密平行排列生长, 细胞体积变大, 纺锤形细胞

比例下降, 多数细胞呈杆状, 少部分细胞呈不规则外形、长梭形或椭圆形; 三四周, 细胞增殖减慢, 部分细胞脱壁死亡, 细胞数量较同期对照组明显减少, 相邻细胞间胞膜有接触, 逐渐相连呈肌管状, 细胞核质比例明显降低, 胞质内有细小的颗粒样结构, 且颗粒样结构多聚集于细胞核周围, 约30%细胞胞质内可见细丝样结构。对照组未见肌管状细胞出现。

2.2 诱导前后hUCMSCs细胞免疫组织化学鉴定结果 诱导组细胞均能着浅褐色, 即cTnI表达为阳性, 对照组细胞未能着色, 即cTnI表达为阴性, 见图2。



a: Induced group

b: Control group

Figure 2 Immunohistochemistry staining of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells before and after induction of 5-azacytidine ($\times 200$)

图2 人脐带间充质干细胞在 5-氮杂胞苷诱导前后的免疫组织化学染色检测结果($\times 200$)

2.3 诱导前后hUCMSCs细胞Nkx2.5、GATA 4 mRNA 基因的表达 诱导组Nkx2.5、GATA 4 mRNA 表达水平分别较对照组增加了 (4.72 ± 0.58) , (3.76 ± 0.06) 倍。①Nkx2.5Ct值: 对照组为 12.91 ± 0.39 , 诱导组为 8.19 ± 0.95 ($t=2.80$, $P < 0.05$)。②GATA4Ct值: 对照组为 15.87 ± 1.06 , 诱导组为 12.10 ± 1.01 ($t=3.19$, $P < 0.05$)。所有测定的Ct值均经GAPDH校正。

3 讨论

间充质干细胞是目前倍受关注的一类具有多向分化潜能的组织干细胞, 能在一定条件下分化为多种功能细胞^[1]。最近研究表明, 应用间充质干细胞移植有可能取代受损心肌细胞, 并建立新的血管来改善供血, 改善心功能, 为心肌梗死的治疗开辟了一条崭新的途径。

目前间充质干细胞的主要来源为成人骨髓和胎儿脐血, 但成人骨髓间充质干细胞数量级增值分化潜能随供者年龄的增大而下降, 病毒感染率较高, 且采集需行骨髓穿刺, 来源受到限制^[12]。脐血细胞数量相对较少, 一份取材良好的脐带血只能获得 10×10^6 左右的CD34阳性细胞^[13], 其相对不足的细胞数导致的植入延迟和植入失败是脐血移植面临的主要问题。因此寻找新的间充质干细胞来源是目前国内外干细胞研究的热点。脐带来源广泛、便于取材、对供者无不利影响、无伦理道德问题的限制, 且细胞增殖、分化能力较强, 适合体外大规模

培养。因此, hUCMSCs有望成为骨髓间充质干细胞的理想替代来源^[12]。

实验初步建立了人脐带贴壁培养法培养和用5-氮杂胞苷诱导hUCMSCs体外定向分化为心肌细胞的实验体系, 诱导三四周后, 相邻hUCMSCs细胞间胞膜有接触, 逐渐相连呈肌管状, 约30%hUCMSCs细胞胞质内可见细丝样结构。肌钙蛋白是心肌细胞中的一种调节蛋白, 参与调节收缩蛋白的舒缩活动, 由3个亚单位组成, cTnI是其中之一, hUCMSCs经5-氮杂胞苷诱导分化后, cTnI免疫组织化学染色阳性, 这与文献报道一致^[10], 提示分化后的细胞已经合成了心肌所特有的物质, 表明hUCMSCs在体外诱导分化为心肌细胞, 为今后细胞移植治疗心肌梗死提供了实验依据。

目前, 5-氮杂胞苷作为一种促使间充质干细胞向心肌细胞分化的诱导剂已得到确认, 并且5-aza诱导骨髓或脐血间充质干细胞分化的心肌细胞中Nkx2.5和GATA4表达的上调已有文献报道^[2,6-9], 但有关5-氮杂胞苷诱导hUCMSCs分化为心肌细胞的机制迄今尚未见相关报道。Nkx2.5和GATA4是两个与心脏发育密切相关的转录因子^[14]。人Nkx2.5基因定位于染色体5q34~35, 是DNA结合蛋白质, 能激活转录, 是影响心脏发育的关键性转录因子之一, 在胚胎发育早期即有表达, 并持续存在整个心脏发育过程中。研究证实靶向性干扰Nkx2.5表达将严重影响心脏的形态学发育, 引起胚胎早期死亡; 反之增加Nkx2.5的表达将引起胚胎体的心脏长大^[15]。GATA4是心脏形成过程中的一个必需的剂量依赖性转录因子, 参与调节心肌细胞结构基因和相关调控基因的表达(α -MHC、 β -MHC、心房利钠因子、肌钙蛋白等), 还可与几种心肌基因调控区域的基因结合, 参与心肌细胞的分化过程。在心脏发育的早期抑制GATA4表达将抑制前心肌细胞及分化终末期心肌细胞的发育, 阻断了原始肌管的形成。相反, 增加GATA4表达将加速心脏的发育, 并明显增加分化末期搏动的心肌细胞数量^[16]。实验结果显示5-氮杂胞苷诱导后GATA 4、Nkx2.5基因表达水平增加, 明显高于对照组, 存在统计学差异, 提示5-氮杂胞苷可能通过对GATA 4、Nkx2.5基因表达的调控而促进分化hUCMSCs分化为心肌细胞, 并且促进其成熟, 更详尽的信号转导通路还有待进一步的研究。

实验首次报道了5-aza体外诱导hUCMSCs定向分化为心肌细胞的过程中, 两个与心脏发育密切相关的转录因子GATA4和Nkx2.5的表达在诱导后显著增加, 与在小鼠、大鼠及人脐血间充质干细胞研究的结果一致, 提示5-氮杂胞苷可能通过调控GATA4、Nkx2.5基因的表达促进hUCMSCs分化为心肌样细胞, 并促进其成熟。

4 参考文献

- [1] Si YL,Zhao YL,Hao HJ,et al.MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. Ageing Res Rev. 2011;10(1): 93-103.
- [2] Fukuda K.Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. Artif Organs. 2001; 25(3):187-193.
- [3] Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. Congenit Anom (Kyoto). 2002; 42(1):1-9.
- [4] Xu W,Zhang X,Qian H,et al.Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood).2004; 229(7):623-631.
- [5] Cheng F,Zou P,Yang H,et al.Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocyte-like cells in vitro. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.2003; 23(2): 154-157.
- [6] Zhang Y,Cai ZJ,Chen RK.Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2005;25(2): 190-194.
张勇,蔡振杰,陈如坤.小鼠骨髓基质干细胞体外分化为前体心肌细胞的初步试验[J].第一军医大学学报,2005,25(2): 190-194.
- [7] Cho J,Rameshwar P,Sadoshima J. Distinct roles of glycogen synthase kinase (GSK)-3alpha and GSK-3beta in mediating cardiomyocyte differentiation in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.J Biol Chem.2009; 284(52):36647-26658.
- [8] Wu CX,Zhang EY,Yang SY,et al.Sichuan Daxue Xuebao. 2008; 39(6): 882-885.
伍长学,张尔永,杨思远,等.骨髓间充质干细胞向心肌诱导过程中GATA-4 和Nkx2.5基因的表达[J].四川大学学报:医学版,2008, 39(6):882-885.
- [9] Cao F,Niu LL,Meng L,et al.Cardiomyocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells after exposure of 5-azacytidine in vitro. J Geriatr Cardiol.2004; 1(2): 101-107.
- [10] Lin XB,He HY,Luo MJ,et al.Shiyong Erke Linchuang Zazhi.2007;22(13): 971-977.
林晓波,何红燕,罗敏洁,等.人脐带间充质干细胞向心肌样细胞分化的研究[J].实用儿科临床杂志,2007,22(13): 971-977.
- [11] Kumar V,Rathee P.Umbilical cord stem cell: an overview.Curr Pharm Biotechnol.2009;10(3):327-333.
- [12] Yu JM,Wu X,Gimble JM,et al.Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow.Aging Cell.2011; 10(1): 66-79.
- [13] Delalat B,Pourfathollah AA,Soleimani M,et al.Isolation and ex vivo expansion of human umbilical cord blood-derived CD34+ stem cells and their cotransplantation with or without mesenchymal stem cells.Hematology (Amsterdam, Netherlands).2009; 14(3): 125-132.
- [14] Armiñán A,Gandía C,Bartual M,et al.Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev.2009; 18(6):907-918.
- [15] Yamada Y,Sakurada K,Takeda Y,et al.Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. Exp Cell Res. 2007; 313(4): 698-706.
- [16] Li H,Zuo S,He Z,et al.Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival.Am J Physiol Heart Circ Physiol.2010; 299(6): H1772-H1781.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验设计由第一作者在第二作者指导下完成, 实验实施为第一、五、六、七、八作者, 实验评估为第一、二作者, 资料收集为第一、三作者, 第一作者成文, 第二、三作者审核, 第一、二作者对文章负责。

致谢: 感谢泰州市人民医院中心实验室的各位老师在整个实验过程中提供的技术性帮助及工作方便。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。