

重组人促红细胞生成素干预人源羊水干细胞向心肌前体细胞的分化**

刘燕¹, 李法琦¹, 张彬², 骆建平³

Effect of recombinant human erythropoietin on differentiation of myocardial precursor cells from amniotic fluid stem cells of pregnancy women

Liu Yan¹, Li Fa-Qi¹, Zhang Bin², Luo Jian-Ping³

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that amniotic fluid stem cells of pregnancy women can differentiate into myocardial precursor cells.

OBJECTIVE: To study the effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) at different concentrations on differentiation of myocardial precursor cells from amniotic fluid stem cells of pregnancy women.

METHODS: The differentiation of myocardial precursor cells from amniotic fluid stem cells of pregnancy women was induced by adding conditional culture medium containing 0, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 U/mL rhEPO. After 24 hours, conditional culture medium was replaced by complete medium.

RESULTS AND CONCLUSION: During 14 days of induced differentiation, under the inverted microscope, cells gradually shortened and widened from original shuttle appearance. Adjacent cells fused together, similar to myotube-like structure. The differentiation rate of myocardial precursor cells was highest after 5.0 U/mL rhEPO addition. RT-PCR results showed that rhEPO particularly at the concentration of 5.0 U/mL could promote Nkx-2.5 and GATA-4 mRNA expression. These findings suggest that exogenous rhEPO can promote the differentiation of myocardial precursor cells from amniotic fluid stem cells of pregnancy women dose-dependently.

Liu Y, Li FQ, Zhang B, Luo JP. Effect of recombinant human erythropoietin on differentiation of myocardial precursor cells from amniotic fluid stem cells of pregnancy women. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(10): 1761-1764. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究发现人源羊水干细胞可向心肌前体细胞分化。

目的: 观察不同浓度重组人促红细胞生成素对人源羊水干细胞向心肌前体细胞分化的影响。

方法: 用含 0, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 U/mL 重组人促红细胞生成素的诱导培养基诱导鉴定后的人源羊水干细胞向心肌前体细胞分化, 诱导 24 h 后换为完全培养基继续培养。

结果与结论: 诱导分化 14 d, 倒置显微镜下可见细胞由长梭形逐渐变短增宽, 相邻的细胞间有融合现象, 类似肌管样结构, 以 5.0 U/mL 重组人促红细胞生成素的诱导分化率最高; RT-PCR 检测显示重组人促红细胞生成素可促进细胞 Nkx-2.5 和 GATA-4 mRNA 的表达, 以 5.0 U/mL 重组人促红细胞生成素的作用最强。说明外源性重组人促红细胞生成素能剂量依赖性促进人源羊水干细胞向心肌前体细胞分化。

关键词: 重组人促红细胞生成素; 人源羊水干细胞; 心肌前体细胞; Nkx-2.5; GATA-4; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.10.012

刘燕, 李法琦, 张彬, 骆建平. 重组人促红细胞生成素干预人源羊水干细胞向心肌前体细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1761-1764. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

研究表明, 胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞及成肌前体细胞经某些药物诱导, 或与心肌细胞共培养能向心肌样细胞分化^[1-5], 但这些细胞来源受限, 具有伦理学争议, 而且诱导效率也较低。因此, 取材方便、细胞数量充足又不与伦理相冲突的新来源细胞成为研究热点。羊水干细胞(amniotic fluid stem cell, AFSC)是一种新类型的干细胞, 近年来已有多位国内外学者从羊水、羊膜中分离得到^[6]。这类细胞同时表达胚胎干细胞和骨髓间充质干细胞双重表面分子和转录因子, 增殖活性和分化能力强^[7]。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一类唾液酸糖蛋白激素, 主要由肾脏分泌。研究发现, EPO与其受体结合后通过多种信号途径发挥造血以外的多种功能^[8-11]。EPO可诱导鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化并表达心肌特异转录因子 Nkx-2.5和GATA-4, 以及心肌特异性蛋白肌球蛋白和肌钙蛋白^[12], 但能否诱导AFSC向心肌细胞分化国内外未见报道。实验就EPO能否诱导人源AFSC向心肌前体细胞分化并表达心肌特异转录因子Nkx-2.5和GATA-4进行研究。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

¹Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Cardiology, the General Hospital of Chongqing Iron and Steel Group, Chongqing 400080, China; ³Center of Prenatal Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Liu Yan★, Studying for master's degree, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
liuyan2009110177@163.com

Corresponding author: Li Fa-Qi, M.D., Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
faqili_2006@yahoo.com

Supported by: Medical Scientific Foundation of Chongqing Health Bureau, No. 2009-2-367*

Received: 2012-01-09
Accepted: 2012-02-02

重庆医科大学附属第一医院, ¹老年科, ³临床产前诊断中心, 重庆市400016; ²重钢总医院心内科, 重庆市400080

刘燕★, 女, 1985年生, 重庆市人, 汉族, 重庆医科大学在读硕士, 主要从事老年心血管疾病基础与临床研究。
liuyan2009110177@163.com

通讯作者: 李法琦, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 重庆医科大学附属第一医院老年病科, 重庆市400016
faqili_2006@yahoo.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225(2012)10-01761-04

收稿日期: 2012-01-09
修回日期: 2012-02-02
(20111115009/WLM·S)

时间及地点: 于2010-07/2011-08在重庆医科大学神经病学重点实验室完成。

材料:

羊水标本: 取自重庆医科大学附属第一医院临床产前诊断中心孕18周行产前诊断的孕妇。在超声引导下行羊膜腔穿刺取20 mL羊水, 抽取标本前均取得孕妇本人及家属同意。实验获得重庆医科大学道德伦理委员会的批准。

主要试剂:

试剂	来源
重组人 EPO(recombinant human EPO, rhEPO)	沈阳三生生物
羊水培养液	Scientific, 美国
低糖型 DMEM 培养基、优等胎牛血清	Gibco, 美国
碱性成纤维生长因子	Sigma, 美国

实验方法:

AFSC的分离与原代培养: 取产妇羊水标本20 mL分装于2个离心管中, 室温下1 000 r/min离心10 min, 倒掉8 mL上清液, 加入羊水培养液, 重悬细胞, 接种于50 cm²的培养瓶中, 每个标本接种2瓶, 置培养瓶于饱和湿度, 体积分数5%CO₂、37 °C培养箱中继续静置培养7 d, 第8天观察细胞, 并更换培养基。

AFSC的传代培养: 原代培养时同一标本接种的2瓶细胞在倒置显微镜下观察, 取细胞集落较多、长势较好的细胞, 待细胞长至80%融合时以1 g/L胰酶和体积分数0.02%EDTA消化, 而后传代培养。传代细胞用含有体积分数20%胎牛血清, 0.1 μg/L碱性成纤维生长因子的低糖DMEM培养基培养。

AFSC表面标志物的检测: 取第4代细胞消化离心收集, 并用PBS制成细胞悬液, 立即送至重庆医科大学附属儿童医院流式细胞检测室检测CD34, CD29的表达情况。

实验分组及干预: 取第4代AFSC分为对照组和rhEPO组, rhEPO组分别用含1.0, 5.0, 10.0, 20.0 U/mL rhEPO的诱导培养基进行干预, 对照组用常规培养基培养, rhEPO干预24 h, 去除诱导培养基, 更换成完全培养基继续培养。每天在显微镜下观察细胞形态, 每2 d换1次培养基。

心肌前体细胞分化率: 诱导14 d后, 在倒置显微镜下观察不同浓度rhEPO诱导后心肌前体细胞的形态及其所占比率, 有形态改变的心肌前体细胞的数量百分比记为心肌前体细胞的分化率。

RT-PCR检测Nkx-2.5和GATA-4 mRNA的表达: 用Trizol试剂裂解诱导后第14天的上述2组

AFSC, 提取总RNA。取10 μL用于反转录, 合成cDNA后按如下条件扩增: 94 °C 4 min, 94 °C 30 s, 55~60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 扩增35个循环, 72 °C延伸5 min。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳。在紫外透射仪上观察结果, 读取扩增产物各条带吸光度值并以β-actin mRNA为内参进行分析, 测定GATA-4, Nkx-2.5 mRNA的相对表达量。目的引物序列是根据GenBank中β-actin、GATA-4、Nkx-2.5 mRNA序列设计, 由上海生物工程公司合成。

引物序列、扩增产物长度及退火温度:

基因	引物序列	片段长度 (bp)	退火温度 (°C)
β-actin	上游: 5'-TGG TGG GAA TGG GTC AGA AG-3'	500	58.3
	下游: 5'-ACG CAC GAT TTC CCT CTC TCA G-3'		
GATA-4	上游: 5'-GCG GGT GTT GGA TTT TCT CAG-3'	205	55
	下游: 5'-GCC CTC CGC TTG TTC TCA GAT C-3'		
Nkx-2.5	上游: 5'-AGC GTG CAA TGA GTG ATC CTG-3'	136	56
	下游: 5'-GAA TGG GCG GCC AGA TCT CAG G-3'		

PCR反应体系50 μL。反应条件: 94 °C预变性4 min, 94 °C变性30 s, 55~60 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 扩增35个循环, 72 °C延伸5 min。取5 μL扩增产物, 在1.5%琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外透射仪上观察结果, 读胶仪读取扩增产物各条带吸光度值并照相, 以β-actin mRNA为内参进行分析, 测定GATA-4, Nkx-2.5 mRNA的相对表达量。

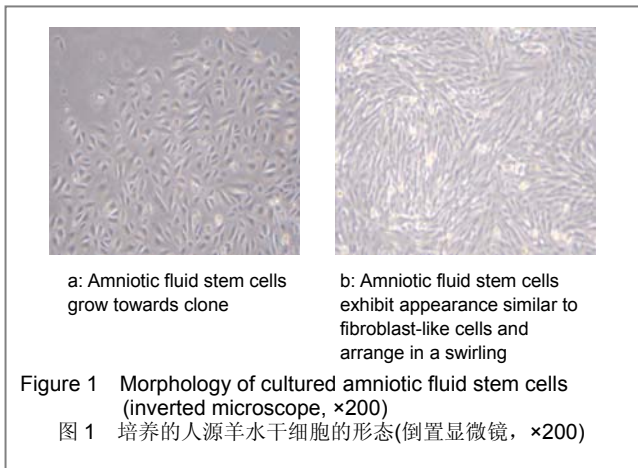
主要观察指标: rhEPO诱导AFSC分化为心肌前体细胞的分化率及细胞GATA-4、Nkx-2.5 mRNA的表达。

统计学分析: 用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验方差齐性, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较用q检验, P < 0.05为差异有显著性意义。

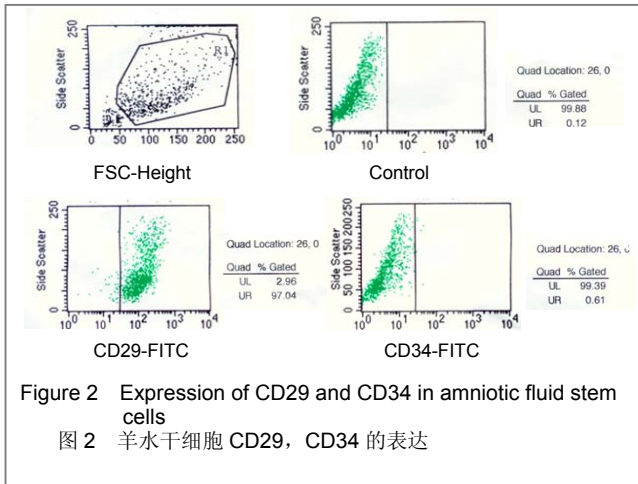
2 结果

2.1 分离培养的AFSC的形态 AFSC原代培养8 d后可见细胞呈集落生长。AFSC形态似骨髓间充质干细胞, 细胞体积大, 核仁大, 胞浆丰富, 传代培养细胞后, 细胞似成纤维样细胞,

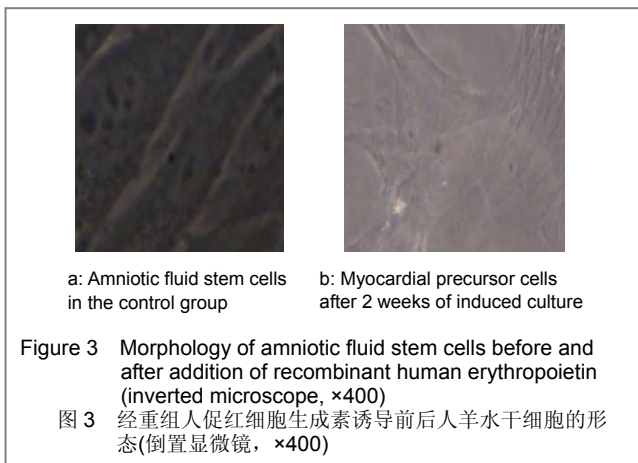
生长迅速, 排列成漩涡状, 见图1。



2.2 AFSC表面标志物检测结果 送检的标本经流式细胞仪检测显示AFSC表型为CD29阳性(97.04%), CD34阴性(0.61%), 见图2。

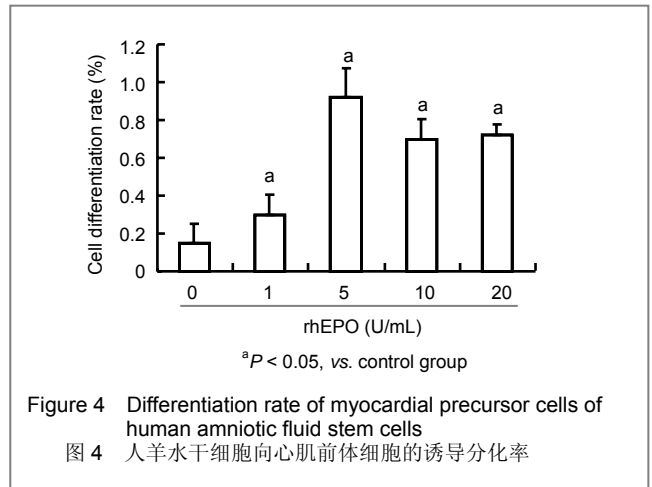


2.3 AFSC经诱导后细胞形态学上的变化及心肌前体细胞分化率 经不同浓度rhEPO诱导1周后的AFSC形态学发生改变, 由长梭形逐渐变短增宽, 甚至形成分叉, 约2周后相邻的细胞间有融合现象, 似类肌管样结构, 见图3。



在倒置显微镜下可见形态改变的心肌前体细胞团,

诱导浓度不同, 心肌前体细胞分化率不同, 但均明显高于对照组($P < 0.05$), 以5 U/mL的诱导分化效率最高, 见图4。而不加rhEPO的对照组, 细胞形态无明显改变。



2.4 rhEPO诱导后的细胞心肌特异转录因子GATA-4和NKx-2.5 mRNA的表达 RT-PCR检测结果显示rhEPO能上调心肌早期转录因子GATA-4, NKx-2.5 mRNA的表达, 见图5。与对照组比较, rhEPO组GATA-4, NKx-2.5 mRNA的表达明显上调($P < 0.05$), 以5 U/mL rhEPO的作用最明显, 见表1。

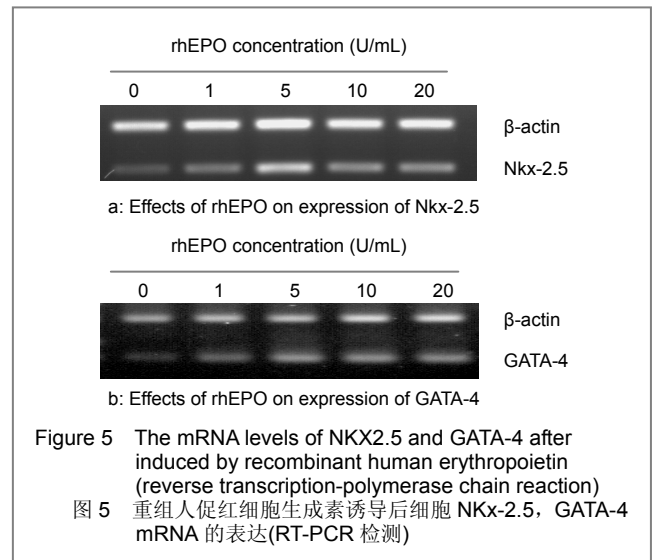


表1 诱导分化14 d 各组细胞 NKx-2.5, GATA-4 mRNA 表达的相对量
Table 1 The ratio of NKx-2.5 and GATA-4 mRNA expression in each group after induced culture with recombinant human erythropoietin (rhEPO) for 14 d ($\bar{x} \pm s$)

rhEPO (U/mL)	NKx-2.5 mRNA	GATA-4 mRNA
0	0.209±0.009	0.264±0.002
1	0.482±0.002 ^a	0.417±0.002 ^a
5	0.818±0.010 ^a	0.817±0.001 ^a
10	0.575±0.023 ^a	0.600±0.002 ^a
20	0.571±0.012 ^a	0.602±0.007 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group (0 U/mL rhEPO)

3 讨论

干细胞体外诱导成心肌细胞是近年来的研究热点。但目前干细胞的来源及伦理问题限制了其多领域、更深度的研究。郭伟祥等^[13]用5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞。Yan等^[14]利用环孢素A诱导胚胎干细胞向心脏祖细胞分化。多位学者已从羊水中分离出AFSC, 且证实AFSC能向中胚层的骨细胞、脂肪细胞以及外胚层的神经细胞和上皮细胞分化^[7]。近年来又发现AFSC能被诱导为心肌细胞^[15-17]。实验发现AFSC能向心肌前体细胞分化, 但AFSC自发向心肌前体细胞分化的分化率极低。

在以往研究中, 学者多以胞嘧啶类似物5-氮胞苷及其衍生物作为干细胞诱导剂^[18-19]。EPO是一类唾液酸糖蛋白激素, 主要由肾脏分泌。以往研究表明EPO主要刺激骨髓造血, 促进红细胞的成熟, 因此临床主要用于各种贫血的治疗。近年发现EPO可通过EPO受体及JAK/STAT、PI-3k/Akt等途径保护心肌细胞、血管细胞及神经细胞, 减轻缺血缺氧引起的细胞凋亡, 及调节胚胎干细胞和成肌细胞增殖^[20]。实验研究rhEPO除上述作用以外是否还具有其他作用, 即是否能作为诱导剂, 应用于干细胞体外研究中。实验发现rhEPO诱导AFSC后其形态逐渐发生改变, 出现类似心肌细胞的形态, 甚至出现类似心肌细胞的肌管结构。且实验发现5 U/mL的rhEPO诱导AFSC分化效率最高。

干细胞向心肌细胞分化时, Nkx2.5和GATA-4转录因子的活化是一系列心肌蛋白合成的启动条件, 其表达顺序和胚胎心脏发育时基因转录的过程相当。Nkx2.5和GATA-4转录因子的表达及随后的心肌较特异性肌球蛋白和肌钙蛋白的表达具有心肌细胞特异性。实验发现经rhEPO诱导分化的AFSC的心肌早期特异性转录因子GATA-4和Nkx2.5 mRNA表达明显上调, 不同诱导剂量间有明显差异, 以5 U/mL rhEPO组升高最显著, 提示人源AFSC经rhEPO诱导后确实分化成了心肌样细胞。但在实验中没有观察到搏动的心肌细胞, 也没有将该阶段的诱导细胞进行动物实验, 以了解此类细胞在体内微环境中是否更易形成具有心肌细胞功能的细胞, 有待进一步研究。

综上, 人源AFSC经rhEPO诱导能分化成心肌前体细胞, 且具有剂量依赖性, 以5 U/mL rhEPO的诱导分化效率最高。

4 参考文献

[1] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126(1):124-132.

[2] Shim WS, Jiang S, Wong P, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324(2):481-488.

[3] Cao XX, Dai YH, Zhang SY, et al. *Jichu Yixue yu Linchuang.* 2007; 27(2):157-160. 曹欣欣, 戴玉华, 张抒扬, 等. 人骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. *基础医学与临床.* 2007, 27(2): 157-160.

[4] Deng FG, Zhang XY, Qu LM, et al. *Zhongguo Mianyixue Zazhi.* 2007; 23(2): 123-126. 邓方阁, 张秀英, 曲丽梅, 等. 人骨髓间充质干细胞体外培养扩增及向心肌细胞诱导分化的实验研究[J]. *中国免疫学杂志.* 2007, 23(2): 123-126.

[5] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995; 18(12):1417-1426.

[6] De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(1):100-106.

[7] Prusa AR, Marton E, Rosner M, et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* 2003; 18(7):1489-1493.

[8] de Souza AC, Volpini RA, Shimizu MH, et al. Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting nuclear-factor kappa B and upregulating endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* In press.

[9] Quesnel S, Nguyen Y, Campo P, et al. Protective effect of systemic administration of erythropoietin on auditory brain stem response and compound action potential thresholds in an animal model of cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2011; 120(11):737-747.

[10] Nafar M, Alipour Abdei B, Ahmadpoor P, et al. Effect of erythropoietin on kidney allograft survival: early use after transplantation. *Iran J Kidney Dis.* 2012; 6(1):44-48.

[11] Qin C, Xiao YB, Chen L, et al. *Xinfei Xueguanbing Zazhi.* 2008; 27(2):109-112. 秦川, 肖颖彬, 陈林, 等. 促红细胞生成素预处理在心肌缺氧复氧损伤中对凋亡相关基因表达影响的研究[J]. *心脑血管病杂志.* 2008, 27(2): 109-112.

[12] Wang Z, Dai QY, Liu W, et al. *Shengwu Yixue Gongcheng yu Linchuang.* 2008; 12(6):499-502. 王治, 戴秋艳, 刘少稳, 等. 重组人促红细胞生成素对小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化的影响[J]. *生物医学工程与临床.* 2008, 12(6):499-502.

[13] Guo WX, Lu TC, Yang T, et al. *Fenzi Kexue Xuebao.* 2009; 25(4): 247-253. 郭伟祥, 卢天成, 杨涛, 等. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究[J]. *分子科学学报.* 2009, 25(4):247-253.

[14] Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, et al. Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379(1):115-120.

[15] Bollini S, Pozzobon M, Nobles M, et al. In vitro and in vivo cardiomyogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011; 7(2):364-380 2011; 5(3):220-228.

[16] Wang H, Chen S, Cheng X, et al. *Shengwu Gongcheng Xuebao.* 2008; 24(9):1582-1587. 王晗, 陈帅, 程祥, 等. 通过形成类胚体诱导人羊水多能干细胞向心肌细胞分化[J]. *生物工程学报.* 2008, 24(9):1582-1587.

[17] Guan X, Delo DM, Atala A, et al. In vitro cardiomyogenic potential of human amniotic fluid stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5(3):220-228.

[18] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995; 18(12):1417-1426.

[19] Dai WD, Kloner RA. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: challenges to be overcome. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(4):730-732.

[20] Naito AT, Akazawa H, Takano H, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res.* 2005; 97(2):144-151.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 重庆市卫生局医学科研项目(2009-2-367), 课题名称: 促红细胞生成素调节经典 Wnt 信号途径促进羊水来源诱导多能干细胞心肌定向分化的研究。

作者贡献: 刘燕进行实验设计、实施及论文的撰写, 李法琦负责指导、评估及审校。张彬协助完成实验, 骆建平、刘燕负责羊水及羊水干细胞的收集。

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。

伦理要求: 研究获得重庆医科大学伦理委员会的批准。