

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.23.005 [http://www.crter.org]

唐欣, 王妮妮, 易海波, 王岩, 庞天舒. 人脐带间充质干细胞经5-氮胞苷诱导后心肌特异性肌钙蛋白I的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(23):4212-4215.

人脐带间充质干细胞经5-氮胞苷诱导后心肌特异性肌钙蛋白I的表达

唐欣¹, 王妮妮¹, 易海波², 王岩³, 庞天舒¹

1 辽河油田中心医院循环内科, 辽宁省盘锦市 124000
2 辽河油田第二职工医院内科, 辽宁省盘锦市 124000
3 辽河油田中心医院放射线科, 辽宁省盘锦市 124000

文章亮点:

- 1 倒置显微镜下观察 5-氮胞苷诱导 24 h 之后, 人脐带间充质干细胞失去典型的梭形形态, 转变为棍状或者柱状。
- 2 免疫组化染色显示 5-氮胞苷诱导后 2 周细胞心肌特异性肌钙蛋白 I 表达呈阳性。
- 3 透射电镜观察显示 5-氮胞苷诱导后 4 周部分人脐带间充质干细胞内可见典型的肌小节及心房颗粒。
- 4 以上的细胞形态改变与心肌源性细胞特异性生化标志物表达提示经 5-氮胞苷诱导后人脐带间充质干细胞能够向心肌样细胞转化。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 脐带间充质干细胞; 5-氮胞苷; 免疫组化; 心肌细胞; 肌钙蛋白 I; 干细胞图片文章

摘要

背景: 人脐带间充质干细胞具有多向分化潜能, 经诱导后是否可向心肌细胞分化? 目前的报道尚不多。

目的: 观察人脐带间充质干细胞经 5-氮胞苷诱导分化后肌钙蛋白 I 的表达情况。

方法: 取第 2 代人脐带间充质干细胞标本, 经消化、离心、沉淀后, 分为 7 份, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 分别加入浓度为 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷于同样条件继续培养, 作用 24 h 后除去, 继续培养 4 周。

结果与结论: ①人脐带间充质干细胞经 5-氮胞苷处理 24 h 之后, 各组细胞都会出现部分死亡, 失去典型的梭形形态, 成为棍状或者柱状, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞形态变化明显。②免疫组化染色显示 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导后 2 周心肌特异性肌钙蛋白 I 表达呈阳性, 对照组与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组心肌特异性肌钙蛋白 I 表达为阴性。选取 5 个高倍视野进行细胞计数, 80, 40, 20, 10 $\mu\text{mol/L}$ 组间心肌样细胞的转化率差异无显著性意义, 均明显高于 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.05$)。③超微结构观察显示经 5-氮胞苷诱导后 4 周时部分人脐带间充质干细胞内可见典型的肌小节及心房颗粒。而未经 5-氮胞苷诱导的对照组无以上改变。结果提示经 5-氮胞苷诱导后人脐带间充质干细胞能够向心肌样细胞转化。

唐欣, 1978 年生, 辽宁省营口市人, 汉族, 2001 年大连医科大学毕业, 主治医师, 主要从事心血管疾病的诊断与治疗研究。
tangxin1978@qq.com

通讯作者: 王岩, 辽河油田中心医院放射线科, 辽宁省盘锦市 124000

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)23-04212-04

收稿日期: 2012-11-27
修回日期: 2013-02-27
(20110927013/M-S)

Cardiac troponin I expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells after 5-azacytidine induction *in vitro*

Tang Xin¹, Wang Ni-ni¹, Yi Hai-bo², Wang Yan³, Pang Tian-shu¹

1 Department of Cardiology, Central Hospital of Liaohe Oil Field, Panjin 124000, Liaoning Province, China

2 Department of Internal Medicine, Second Workers Hospital of Liaohe Oil Field, Panjin 124000, Liaoning Province, China

3 Department of Radiology, Central Hospital of Liaohe Oil Field, Panjin 124000, Liaoning Province, China

Tang Xin, Attending physician,
Department of Cardiology,
Central Hospital of Liaohe Oil
Field, Panjin 124000,
Liaoning Province, China
tangxin1978@qq.com

Corresponding author: Wang
Yan, Department of Radiology,
Central Hospital of Liaohe Oil
Field, Panjin 124000,
Liaoning Province, China

Received: 2012-11-27
Accepted: 2013-02-27

Abstract

BACKGROUND: Human umbilical cord mesenchymal stem cells possess multi-differentiation potential. There are few studies describing whether human umbilical cord mesenchymal stem cells can be induced to differentiate into cardiomyocytes.

OBJECTIVE: To investigate cardiac troponin I expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells after 5-azacytidine induction *in vitro*.

METHODS: Passage 2 human umbilical cord mesenchymal stem cells were digested, centrifuged and deposited. Cell suspension was prepared and cell concentration was adjusted to be $2 \times 10^7/L$. Then cells were cultured for 24 hours after addition of various concentrations of 5-azacytidine (80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 $\mu\text{mol/L}$). After removal of 5-azacytidine, cells were cultured for another 4 weeks.

RESULTS AND CONCLUSION: After treatment with 5-azacytidine for 24 hours, some cells died in each group, and typical fusiform appearance turned into stick-like or column-like appearance, especially in the 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine groups. Immunohistochemical staining results showed that cardiac troponin I expression was detected in human umbilical cord mesenchymal stem cells in 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine groups after induction for 2 weeks, but it was not detected in the control and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine groups. Five high-fold fields were selected for cell counting. The number of cardiomyocytes was not significantly different between 80, 40, 20, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine groups, but it was significantly higher compared to that in the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine group. After 5-azacytidine treatment for 4 weeks, typical sarcomeres and cardiac atrium particles were observed in some human umbilical cord mesenchymal stem cells. Such changes were not observed in the control group in which 5-azacytidine induction was not used. These findings suggest that human umbilical cord mesenchymal stem cells were induced to cardiomyocyte-like cells by 5-azacytidine.

Key Words: stem cells; stem cell culture and differentiation; umbilical cord mesenchymal stem cells; 5-azacytidine; immunohistochemistry; cardiomyocyte; cardiac troponin I; stem cell photographs-containing paper

Tang X, Wang NN, Yi HB, Wang Y, Pang TS. Cardiac troponin I expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells after 5-azacytidine induction *in vitro*. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013; 17(23):4212-4215.

0 引言

在局部缺血损伤的状态下, 心肌细胞死亡、心肌细胞缺乏再生能力会导致心肌梗死、扩张型心肌病、心力衰竭等一系列疾病, 但是目前国内外学者还没有较好的处理方法^[1-6]。晚期患者常需进行心脏移植, 但是手术风险较高、手术费用较为昂贵, 同时也很难获得合适的供体, 这样就使心脏移植治疗受到了很大的限制。因此, 在心血管研究领域, 采用生物学技术来修复受损心肌组织是一个较好的方法^[7]。实验采用5-氮胞苷诱导人脐带间充质干细胞分化为心肌细胞, 免疫组化检测心肌特异性肌钙蛋白I的表达情况。

1 材料和方法

设计: 细胞学对比观察实验。

时间及地点: 实验于2009年12月至2010年12月在辽宁医学院完成。

材料: 人脐带间充质干细胞由细胞产品国家工程研究中心提供。5-氮胞苷、抗人cTnI单抗(Sigma公司), 倒置显微镜、透射电子显微镜(日本Olympus公司)。

实验方法:

体外培养诱导方法: 取2份第2代人脐带间充质干细胞标本, 0.25%胰蛋白酶消化后, 500×g离心5 min。离心后进行沉淀, 用无血清DMEM培养液将其进行混匀, 分为7份, 清洗2次, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 L^{-1}$, 分别加入浓度为80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷于同样条件继续培养, 作用24 h后, 吸去含5-氮胞苷的培养液, 洗涤2次(Tyrode氏

平衡盐溶液), 改用完全培养液继续培养, 每3 d换液1次。

诱导心肌样细胞的鉴定:

人脐带间充质干细胞的形态观察和细胞生长情况: 在倒置显微镜下观察诱导前, 诱导后24 h, 48 h, 1周, 2周, 3周, 4周细胞生长和形态的变化。

免疫组织化学方法检测心肌特异性肌钙蛋白I的表达: 诱导2周后, 在室温下用PBS洗涤人脐带间充质干细胞的盖玻片, 然后再将其放入到比例为1:1的冰乙酸: 甲醇液体中洗涤3次, 固定20 min, 加入37 °C的二抗、鼠抗人 β -肌球蛋白重链进行洗涤。细胞浆中的阳性细胞会出现棕黄色颗粒。

超微结构观察: 诱导4周后, 收集细胞, 消化离心、戊二醛固定、环氧树脂包埋, 制成电镜超薄切片, 经醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染后透射电镜观察细胞的超微结构。

心肌样细胞转化率: 取诱导后的细胞爬片, 每张玻片取5个视野, 对视野内的蓝色细胞核数、肌钙蛋白I阳性细胞数进行计数, 计算人脐带间充质干细胞经诱导后向心肌样细胞的转化率。

统计学分析: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 13.0统计软件分析。两两组间比较用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

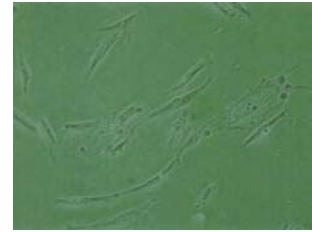
2.1 倒置显微镜观察细胞形态改变 在5-氮胞苷处理前, 无细丝样结构、无颗粒, 胞浆量均匀且少, 核/浆比例高, 细胞形态是典型的梭形, 细胞呈漩涡样或同心圆生长, 核内会见到较为明显的核仁, 见图1; 在5-氮胞苷处理24 h之后, 梭形转变为棍状或者柱状, 80, 40, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组有30%细胞出现死亡, 10, 5, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组仅有少量细胞死亡, 部分细胞黏附生长, 见图2。



注: 第2代人脐带间充质干细胞为典型的梭形形态, 核内会见到较为明显的核仁。

图1 倒置显微镜观察第2代人脐带间充质干细胞形态($\times 200$)

Figure 1 Morphology of passage 2 human umbilical cord mesenchymal stem cells under inverted microscope ($\times 200$)



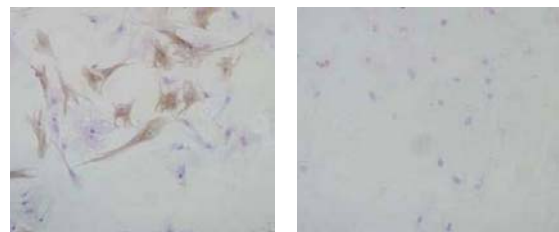
注: 部分细胞黏附生长, 失去了典型的梭形, 为柱状或棍状。

图2 人脐带间充质干细胞经10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷诱导后24 h形态变化($\times 200$)

Figure 2 Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-azacytidine for 24 h ($\times 200$)

诱导7 d后, 细胞形态发生变化, 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。诱导两三周时细胞增殖减慢, 部分细胞脱壁死亡, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞形态变化明显。

2.2 免疫组化鉴定结果 免疫组化染色显示5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ 组诱导后2周心肌特异性肌钙蛋白I表达呈阳性, 对照组与2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组心肌特异性肌钙蛋白I表达为阴性, 见图3。



A: 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷组

B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷组

注: 免疫组化染色显示10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷组心肌特异性肌钙蛋白I表达呈阳性, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷组心肌特异性肌钙蛋白I表达为阴性。

图3 5-氮胞苷诱导后2周人脐带间充质干细胞心肌特异性肌钙蛋白I表达(免疫组化染色, $\times 200$)

Figure 3 Cardiac troponin I expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells after treatment with 5-azacytidine for 2 wk (immunohistochemical staining, $\times 200$)

2.3 人脐带间充质干细胞经诱导后向心肌样细胞的转化率 选取5个高倍视野进行细胞计数, 80 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮

胞苷组心肌样细胞的转化率为(24.1±5.6)%, 40 μmol/L 5-氮胞苷组为(21.2±5.2)%, 20 μmol/L 5-氮胞苷组为(23.3±5.6)%, 10 μmol/L 5-氮胞苷组为(28.3±3.6)%, 5 μmol/L 5-氮胞苷组为(15.6±4.2)%。80, 40, 20, 10 μmol/L 组间差异无显著性意义, 均明显高于 5 μmol/L 组 ($P < 0.05$)。

2.4 透射电镜观察诱导后细胞超微结构 诱导后 4 周, 对照组与 2.5 μmol/L 组的细胞表面有诸多突起, 细胞核形态不规则, 核染色质呈弥散样分布, 电子密度低, 核仁清晰, 部分核可见多个核仁, 胞质内细胞器形态分化幼稚, 线粒体小且电子密度很高。5, 10, 20 μmol/L 组的细胞胞浆内线粒体丰富, 核位于细胞中央, 多为单核, 少量细胞为双核或者多核, 核周围聚集有丰富的房性颗粒样结构, 直径在 100-200 nm, 见图 4。40, 80 μmol/L 组的细胞大量死亡, 未行电镜观察。



注: 经过 5-氮胞苷诱导后 4 周, 细胞胞浆内线粒体丰富, 核位于细胞中央, 多为单核, 少量细胞为双核或者多核, 核周围聚集有丰富的房性颗粒样结构。

图 4 人脐带间充质干细胞经 10 μmol/L 5-氮胞苷诱导后 4 周的超微结构(×9 600)

Figure 4 Ultrastructure of human umbilical cord mesenchymal stem cells after treatment with 10 μmol/L 5-azacytidine for 4 wk (×9 600)

3 讨论

倒置显微镜观察结果表明, 在 5-氮胞苷处理诱导前, 无细丝样结构、无颗粒, 胞浆量均匀且少, 核/浆比例高, 细胞形态是典型的梭形, 细胞呈漩涡样或同心圆生长, 核内会见到较为明显的核仁; 在 5-氮胞苷处理 24 h 之后, 各组细胞都会出现部分死亡, 典型的梭形形状失去, 成为棍状或者柱状, 由此可见, 人脐带间充质干细胞发生心肌样转化。

肌钙蛋白位于收缩蛋白的细肌丝上, 主要是调节肌肉舒张和收缩过程, 属于一种典型的肌肉组织收缩调节

蛋白, 其中肌钙蛋白 I 有较高的特异性, 是检测心肌损伤和鉴定心肌源性细胞的特异性生化标志物。免疫组化染色显示 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L 组诱导后 2 周心肌特异性肌钙蛋白 I 表达呈阳性, 对照组与 2.5 μmol/L 组心肌特异性肌钙蛋白 I 表达为阴性。选取 5 个高倍视野进行细胞计数, 80, 40, 20, 10 μmol/L 组间心肌样细胞的转化率差异无显著性意义, 均明显高于 5 μmol/L 组 ($P < 0.05$)。超微结构观察显示经 5-氮胞苷诱导后 4 周时部分人脐带间充质干细胞内可见典型的肌小节及心房颗粒。而未经 5-氮胞苷诱导的对照组无以上改变。以上的细胞形态改变与文献报道的心肌样细胞形态相近, 提示经 5-氮胞苷诱导后人脐带间充质干细胞向心肌样细胞转化。实验中未观察到经 5-氮胞苷诱导后细胞的自主搏动。

作者贡献: 实验设计为唐欣, 实验实施为王岩, 实验评估为唐欣, 资料收集为易海波。庞天舒成文, 唐欣对文章负责。

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: 人脐带间充质干细胞由细胞产品国家工程研究中心提供, 在产妇知情同意的情况下, 经医院伦理委员会批准, 获取人脐带间充质干细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(1):229-236.
- [2] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93-98.
- [3] Hou M, Yang KM, Zhang H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *Int J Cardiol.* 2007;115(2):220-228.
- [4] Iso Y, Spees JL, Serrano C, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(3):700-706.
- [5] Suzuki K, Smolenski RT, Jayakumar J, et al. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III216-221.
- [6] Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res.* 1999;42(2):339-360.

- [7] Shi Q, Hao Q, Bouissac J, et al. Ginsenoside-Rd from Panax notoginseng enhances astrocyte differentiation from neural stem cells. *Life Sci.* 2005;76(9):983-995.