

# 5-氮胞苷联合骨形态发生蛋白2诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化

https://doi.org/10.12307/2022.371

王文华<sup>1,2</sup>, 刘洋<sup>2</sup>, 王巧敏<sup>1,2</sup>, 吕洋<sup>2</sup>, 赵亚如<sup>1,2</sup>, 王海萍<sup>2</sup>

投稿日期: 2020-11-11

采用日期: 2020-12-14

修回日期: 2021-04-29

在线日期: 2021-05-24

中图分类号:

R459.9; R394.2; R329.2

文章编号:

2095-4344(2022)19-02958-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 鉴定:

采用流式细胞技术对第3代骨髓间充质干细胞进行表面抗原鉴定。

细胞培养:  
采用全骨髓培养贴壁法获取骨髓间充质干细胞。

### 分组:

(1) 对照组 (普通IMDM培养基);  
(2) 骨形态发生蛋白2组 (200 ng/L);  
(3) 5-氮胞苷组 (10 μmol/L);  
(4) 5-氮胞苷+骨形态发生蛋白2组。

诱导3 d后更换正常培养基继续培养4周

### 检测指标:

(1) 光学显微镜观察诱导后细胞的形态学特点;  
(2) Western blot 检测诱导后细胞的cTnI、cTnT表达;  
(3) 免疫细胞化学法检测诱导后细胞的cTnI表达, 免疫荧光细胞化学法检测诱导后细胞的Desmin、cTnT表达;  
(4) RT-qPCR检测诱导后细胞的GATA-4和Nkx2.5基因表达。

### 文章特点一

△ 5-氮胞苷和骨形态发生蛋白2联合诱导可以显著提高骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的效率;

△ 从细胞及基因水平证实5-氮胞苷与骨形态发生蛋白2具有协同作用。

## 文题释义:

**骨形态发生蛋白2:** 属于转化生长因子β超家族一员, 它可以对多种细胞的增殖、生存、分化和凋亡具有调节作用。在胚胎发育过程中, 骨形态发生蛋白是心肌发育的一个关键上游信号, 因此在一定条件下它可以促进骨髓间充质干细胞分化成为心肌样细胞。

**骨髓间充质干细胞:** 是一类具有多向分化潜能的成体干细胞, 在一定条件下可以诱导分化为多种功能性细胞, 包括骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、心肌细胞等。除此之外, 骨髓间充质干细胞具有获取分离容易、操作简单等特点, 可大量培养扩增, 并具有免疫调节作用。

## 摘要

**背景:** 干细胞已成为组织工程中理想的种子细胞, 为细胞移植治疗心肌梗死提供了研究方向。

**目的:** 探讨骨形态发生蛋白2联合5-氮胞苷体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的可行性。

**方法:** 采用全骨髓贴壁法培养骨髓间充质干细胞, 将第3代骨髓间充质干细胞进行分组诱导, 分别为对照组(普通IMDM培养基)、骨形态发生蛋白2组(200 ng/L)、5-氮胞苷组(10 μmol/L)、5-氮胞苷+骨形态发生蛋白2组。诱导3 d后更换正常培养基继续培养4周, 免疫细胞化学法检测cTnI的表达, 免疫荧光化学法检测Desmin、cTnT的表达, Western blot检测cTnT和cTnI的表达; 诱导3 d后更换正常培养基继续培养1, 2, 4周, 采用RT-qPCR检测心肌早期转录因子GATA-4、Nkx2.5 mRNA的表达。

**结果与结论:** ①Western blot检测诱导组均表达cTnT、cTnI, 联合诱导组cTnT、cTnI的表达高于单独诱导组( $P < 0.01$ ); ②免疫细胞化学法检测诱导组cTnI均呈阳性表达, 联合诱导组高于单独诱导组( $P < 0.05$ ); 免疫荧光细胞化学法检测诱导组Desmin、cTnT均呈阳性表达, 联合诱导组高于单独诱导组( $P < 0.05$ ); ③RT-qPCR检测诱导组均有GATA-4、Nkx2.5 mRNA的表达, 联合诱导组高于单独诱导组( $P < 0.05$ ); ④结果表明, 骨髓间充质干细胞经5-氮胞苷和骨形态发生蛋白2联合诱导后可以提高心肌样细胞的分化效率。

**关键词:** 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 心肌样细胞; 骨形态发生蛋白2; 5-氮胞苷; SD大鼠

## 5-Azacytidine combined with bone morphogenetic protein 2 induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells

Wang Wenhua<sup>1,2</sup>, Liu Yang<sup>2</sup>, Wang Qiaomin<sup>1,2</sup>, Lü Yang<sup>2</sup>, Zhao Yaru<sup>1,2</sup>, Wang Haiping<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, <sup>2</sup>Stem Cell and Reproductive Biology Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Wang Wenhua, Master candidate, Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, and Stem Cell and Reproductive Biology Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

**Corresponding author:** Wang Haiping, MD, Professor, Master's supervisor, Stem Cell and Reproductive Biology Laboratory, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Stem cells have become ideal seed cells in tissue engineering, which provides a research direction for cell transplantation in the treatment of myocardial infarction.

河北北方学院, <sup>1</sup>基础医学院组织学与胚胎学教研室, <sup>2</sup>干细胞与生殖生物学实验室, 河北省张家口市 075000

第一作者: 王文华, 女, 1992年生, 河北省张家口市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的相关研究。

通讯作者: 王海萍, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 河北北方学院干细胞与生殖生物学实验室, 河北省张家口市 075000

https://orcid.org/0000-0002-7342-3827 (王文华)

基金资助: 河北省自然科学基金(C2019405091), 项目负责人: 王海萍; 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2019066), 项目负责人: 王海萍

引用本文: 王文华, 刘洋, 王巧敏, 吕洋, 赵亚如, 王海萍. 5-氮胞苷联合骨形态发生蛋白2诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):2958-2963.



**OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of bone morphogenetic protein 2 combined with 5-azacytidine on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells *in vitro*.

**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells were cultured by whole bone marrow culture adherent method. The third generation of bone marrow mesenchymal stem cells was divided into four groups: control group (ordinary Iscove's modified Dulbecco's medium), bone morphogenetic protein 2 group (200 ng/L), 5-azacytidine group (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 5-azacytidine and bone morphogenetic protein 2 group. After induction for 3 days, the normal medium was changed and cultured for 4 weeks. The expression of cTnI was detected by immunocytochemistry. The expression of Desmin and cTnT was detected by immunofluorescence. The expression of cTnT and cTnI was detected by western blot assay. After 3 days of induction, the normal medium was changed and cultured for 1, 2 and 4 weeks. The mRNA expression of GATA-4 and Nkx2.5 was detected by RT-qPCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Western blot assay showed that cTnT and cTnI were expressed in the induction group. The expression levels of cTnT and cTnI in the combined group were higher than those in other groups ( $P < 0.01$ ). (2) Immunocytochemistry showed positive expression of cardiac troponin (cTnI) in the induction group; the expression was higher in the combined group than that in the induction group ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence cytochemistry assay showed the positive expression of Desmin and cTnT; the expression in the combined group was higher than that in the induction group ( $P < 0.05$ ). (3) RT-qPCR showed the mRNA expression of GATA-4 and Nkx2.5 in the induction group; the expression was higher in the combined group than that in the induction group ( $P < 0.05$ ). (4) The results showed that bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine and bone morphogenetic protein 2 could improve the differentiation efficiency of cardiomyocyte-like cells.

**Key words:** stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; myocardial like cells; bone morphogenetic protein 2; 5-azacytidine; SD rats

**Funding:** Hebei Natural Science Foundation, No. C2019405091 (to WHP); Science and Technology Research Project of Hebei University, No. ZD2019066 (to WHP)

**How to cite this article:** WANG WH, LIU Y, WANG QM, LÜ Y, ZHAO YR, WANG HP. 5-Azacytidine combined with bone morphogenetic protein 2 induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(19):2958-2963.

## 0 引言 Introduction

近几年, 心血管疾病仍然是社会高度关注的问题之一。尽管目前采取疾病预防和综合治疗措施包括药物治疗、介入治疗、手术治疗等, 但是其死亡率仍然最高。许多研究表明, 干细胞分化的心肌样细胞可以代替受损的心肌细胞, 从而改善心脏功能, 解决了心肌梗死后心肌损伤、细胞凋亡和不能再生的问题, 骨髓间充质干细胞在组织工程研究中被认为是最为理想的种子细胞<sup>[1]</sup>, 但是如何在体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞高效率分化一直是研究的热点。5-氮胞苷是诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的有效化学制剂<sup>[2]</sup>, 由于5-氮胞苷在临床可用作抗癌药物治疗急性骨髓性白血病, 所以单独诱导具有一定的细胞毒性。骨形态发生蛋白2对于细胞生长、分化和凋亡具有一定的作用<sup>[3]</sup>。该研究用骨形态发生蛋白2与5-氮胞苷联合诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化, 从形态学、蛋白以及基因等多方面表明分化效率明显提高, 说明二者联合诱导是一种更有效的体外诱导方法, 既可以减少单个诱导剂的局限性, 又可以增加体外诱导分化为心肌样细胞的效率, 现报道如下。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年6月至2020年11月在河北北方学院生命科学研究中心完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级SD大鼠6只, 3周龄, 雌雄不限, 体质量25-35g, 由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2019-001。

1.3.2 实验试剂和仪器 IMDM培养基(美国CORNING公司); 胎牛血清(德国PAN-Biotech GmbH公司); 二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo公司); 倒置相差荧光显微镜(日本Nikon公司); 普通光学显微镜(日本Olympus公司); 流式细胞仪(美国BD公司); 超净工作台(苏州净化集团安泰公司)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的分离与培养 采用全骨髓培

养贴壁法获取骨髓间充质干细胞。将大鼠脱臼处死, 放入体积分数75%乙醇中浸泡5min, 超净台中分离肱骨和胫骨, 暴露骨髓腔, 用IMDM完全培养基冲出骨髓, 收集在无菌离心管中, 室温离心(1500 r/min, 8 min), 弃上清, 用适量的IMDM完全培养基将细胞重悬, 接种到无菌培养瓶, 放入37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱, 48h后首次换液, 之后每隔3d换液1次, 培养至2-4代用于以下实验。

1.4.2 大鼠骨髓间充质干细胞的表面抗原鉴定 选择融合度达到80%-90%长势良好的细胞, PBS冲洗3次, 加入1.0-2.0 mL胰酶消化, 新鲜IMDM培养基终止消化后反复吹打成单细胞悬液, 室温离心(1500 r/min, 7 min), 弃上清, 加入PBS振荡重悬, 离心, 重复3次, 制成单细胞悬液, 每个样品分装到3个离心管, 实验管中加入CD29-PE抗体、CD45-FITC抗体、CD90-PE-CyTM7抗体混匀, 同型对照管中加入CD29-PE、CD45-FITC、CD90-PE-CyTM7同型对照抗体混匀, 阴性对照管中只加入适量的PBS混匀, 在4℃条件下孵育30min, 离心弃上清, 再加入适量PBS, 离心弃上清, 再加入适量的PBS, 上机进行流式细胞技术检测。

1.4.3 大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化 将长势良好、形态均一的第1代骨髓间充质干细胞, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度进行传代, 37℃, 体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱孵育过夜。第2代细胞培养48h后, 细胞融合密度约达80%, 将其分为4组: ①空白对照组: 只加入IMDM完全培养基; ②骨形态发生蛋白2组: 在培养基中加入5mL终质量浓度为200ng/L骨形态发生蛋白2诱导72h; ③5-氮胞苷组: 在培养基中加入5mL终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷诱导24h; ④5-氮胞苷+骨形态发生蛋白2组: 在培养基中加入5mL终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮胞苷的培养基预先处理24h后, 更换成5mL终质量浓度为200ng/L骨形态发生蛋白2诱导72h。各组诱导完成后更换成IMDM完全培养基继续培养, 每3d换液1次, 培养至28d, 在显微镜下观察各组细胞形态变化以及生长状况。

1.4.4 免疫细胞化学法检测cTnI的表达 诱导3d后更换正常培养基继续培养4周, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 接种于



24 孔板中 (接种前放置细胞爬片), 每孔 500  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 后待细胞融合度达到 80%–90% 时, PBS 冲洗, 40 g/L 多聚甲醛 -0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液固定 30 min, 弃掉固定液, PBS 冲洗, 1%TritonX-100-PBS 室温下通透 20 min, PBS 冲洗, 滴加适量的内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 15 min, PBS 冲洗, 滴加适量的封闭用正常山羊血清工作液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min, 用滤纸吸干液体 (勿洗), 滴加 cTnI 一抗 (1 : 50) 4  $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育过夜, 复温 30 min, PBS 冲洗, 滴加适量的生物素标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 20 min, PBS 冲洗, 滴加适量的辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 15 min, PBS 冲洗, 加入适量的新鲜配制的二氨基联苯胺显色液, 根据染色程度终止染色, 自来水冲洗后进行苏木精复染 20 s, 然后依次进行分化、返蓝、脱水、透明、封固, 光学显微镜下观察。

1.4.5 免疫荧光化学法检测 cTnT、Desmin 的表达 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 将细胞浓度调整为  $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 接种于 24 孔板中 (接种前放置细胞爬片), 培养 24 h 后待细胞融合度达到 80%–90% 时, PBS 冲洗, 40 g/L 多聚甲醛 -0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液固定 30 min, 弃掉固定液, PBS 冲洗, 1%TritonX-100-PBS 室温通透 20 min, PBS 冲洗, 滴加适量的封闭用正常山羊血清工作液室温封闭 30 min, 用滤纸吸干液体 (勿洗), 滴加 cTnT、Desmin 一抗 (1 : 50) 4  $^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育过夜, 复温 30 min, PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次, 滴加荧光素标记的羊抗兔 IgG (1 : 300), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min, PBS 冲洗, 吸干, 用荧光衰减封固剂进行封固, 倒置荧光显微镜下观察。

1.4.6 Western blot 检测 cTnT、cTnI 的表达 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 弃掉原培养基, PBS 冲洗, 用细胞刮勺刮下细胞, 收集到离心管, 常温离心 (1 500 r/min, 7 min), 弃上清, 按每  $5 \times 10^5$  个细胞加入 200  $\mu\text{L}$  预冷的裂解液 (每 1 mL RIPA 裂解液中加入 5  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂), 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  振荡离心 (12 000 r/min) 15 min, 取上清, 放入新的预冷的离心管, 检测蛋白浓度, 将蛋白样品以 1 : 5 的比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 充分混匀, 在进行下一步实验前, 将配制好的蛋白样品在沸水中加热 10 min 进行变性, 在凝胶样品孔内加入已变性的蛋白样品和蛋白 marker, 电压设置 160 V, 时间 45 min 左右, 电泳停止后取出凝胶玻璃板进行剥胶, 在电压 100 V, 时间 60 min 条件下完成转膜 (Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统), 配制好封闭液后将膜封闭 2 h, 加入一抗 (Actin 以 1 : 10 000 稀释; cTnT, cTnI 均以 1 : 1 000 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗膜, 加入二抗稀释液 [辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L), 以 1 : 1 000 稀释], 室温孵育 2 h, 室温脱色摇床上洗膜, 加入 ECL 化学发光工作液, 采用 AI600 超灵敏化学发光成像仪成像, 根据得到的条带对实验结果进行定量分析。

1.4.7 RT-qPCR 法检测 GATA-4、Nkx2.5 mRNA 表达 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 提取各组细胞的总 RNA, 以 GAPDH 作为内参对照, 按照 ABScript II RT Master Mix for qPCR 试剂说明及条件将其反转录为 cDNA, 按照 2X Universal

SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂说明进行目的基因 GATA-4、Nkx2.5 的扩增, 分析数据。各基因引物的合成序列, 见表 1。

表 1 | 各基因引物的合成序列

Table 1 | Synthetic sequences of each gene primer

基因	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	5'-ACT CTA CCC ACG GCA AGT TC-3'	5'-TGG GTT TCC CGT TGA TGA CC-3'
GATA-4	5'-AGG ACT AGG CAC CTC TAG CC-3'	5'-AGG GCT GAC TCT ACT CCA GG-3'
Nkx2.5	5'-TTT TAT CCG CGA GCC TAC GG-3'	5'-AGG TAC CGC TGT TGC TTG AA-3'

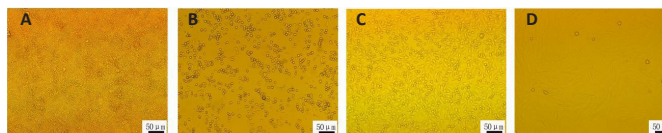
表注: GAPDH 作为内参对照, 上述引物委托大连宝生物工程有限公司进行合成

1.5 主要观察指标 ①骨髓间充质干细胞的形态及表面抗原鉴定; ②各组骨髓间充质干细胞诱导分化后的形态变化; ③各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 cTnI、cTnT、Desmin 蛋白表达以及 GATA-4、Nkx2.5 mRNA 表达。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 20.0 统计学软件处理实验数据, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 *t* 检验进行两组间比较, 单因素方差分析进行多组间比较,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态 倒置相差显微镜下观察, 分离初期大鼠骨髓悬液细胞密集, 细胞均为圆形, 形态均一; 12 h 开始贴壁, 24 h 换液去除未贴壁细胞; 3 d 后可见细胞伸出突起, 突起圆顿光滑, 细胞呈梭形、多边形和菱形, 部分外观似纤维细胞样并且数量明显增加; 4 d 开始呈对数增长; 7 d 左右细胞长满瓶底, 体积增大, 形态多样化; 传至第 4 代细胞形态均一, 排列整齐, 细胞之间紧密联系; 5- 氮胞苷和骨形态发生蛋白 2 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 细胞中出现类肌管样结构, 未见自发搏动, 见图 1。



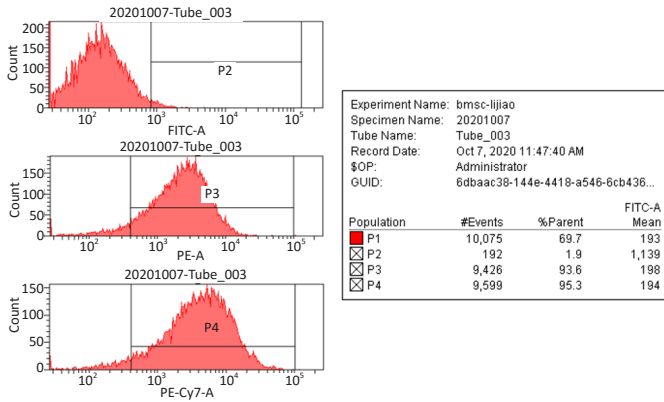
图注: 图中 A 为初分离的大鼠骨髓悬液; B 为贴壁 72 h; C 为贴壁 7 d; D 为 5- 氮胞苷和骨形态发生蛋白 2 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 细胞中出现类肌管样结构, 未见自发搏动

图 1 | 大鼠骨髓间充质干细胞形态及诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周的细胞形态 ( $\times 100$ )

Figure 1 | Morphological observation of rat bone marrow mesenchymal stem cells and cell morphology cultured in normal medium for 4 weeks 3 days after induction ( $\times 100$ )

2.2 大鼠骨髓间充质干细胞的表面抗原鉴定结果 流式细胞术检测骨髓间充质干细胞的表面抗原 CD29、CD45 和 CD90 阳性表达率分别是 93.6%, 1.9%, 95.3%, 说明全骨髓贴壁法分离的细胞为纯化的骨髓间充质干细胞, 见图 2。

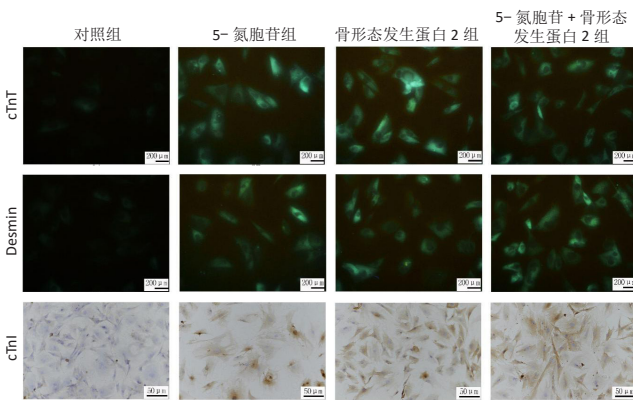
2.3 免疫细胞化学法和免疫荧光细胞化学法检测结果 免疫荧光细胞化学法检测结果: 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 各诱导组心肌样细胞 cTnT 蛋白和 Desmin 蛋白表达均增加, 其中 5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 联合诱导组的 cTnT 蛋白和 Desmin 蛋白表达量显著高于单独诱导组。免疫细胞化学法检测结果: 诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周, 细胞质呈棕黄色, 其中 5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 联合诱导组的 cTnI 蛋白表达量显著高于单独诱导组, 见图 3。



图注：骨髓间充质干细胞的表面抗原 CD29、CD45 和 CD90 阳性表达率分别是 93.6%，1.9%，95.3%

图 2 | 大鼠骨髓间充质干细胞流式细胞术鉴定结果

Figure 2 | Identification results of flow cytometry of rat bone marrow mesenchymal stem cells



图注：对照组 cTnT、Desmin、cTnI 蛋白阴性表达；骨髓间充质干细胞诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周，5- 氮胞苷组、骨形态发生蛋白 2 组、5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 组 cTnT、Desmin、cTnI 蛋白阳性表达

图 3 | 免疫荧光细胞化学法检测各组细胞 cTnT、Desmin 蛋白表达以及免疫细胞化学法检测各组细胞 cTnI 蛋白表达 (×200)

Figure 3 | Immunofluorescence cytochemistry detection of cTnT and Desmin protein expression in cells of each group and immunocytochemical method of cTnI protein expression of cells in each group (×200)

2.4 Western blot 检测结果 骨髓间充质干细胞诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周，各组 cTnT、cTnI 蛋白表达量均增加，其中 5- 氮胞苷组 + 骨形态发生蛋白 2 组 cTnT、cTnI 蛋白表达量显著高于单独诱导组，见图 4，5 和表 2。

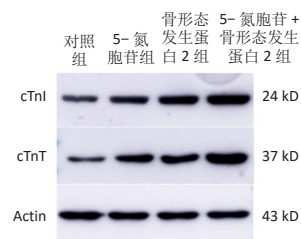


图 4 | Western blot 检测各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 cTnT 和 cTnI 蛋白的表达 (代表性条带)

Figure 4 | Protein expression of cTnT and cTnI after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group detected by western blot assay (representative bands)

2.5 RT-qPCR 检测结果 骨髓间充质干细胞诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 1, 2, 4 周，各诱导组均有 GATA-4 和 Nkx2.5 的 mRNA 表达，其中 5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 组在 4 周时表达相对较显著，见图 6，表 3 和表 4。

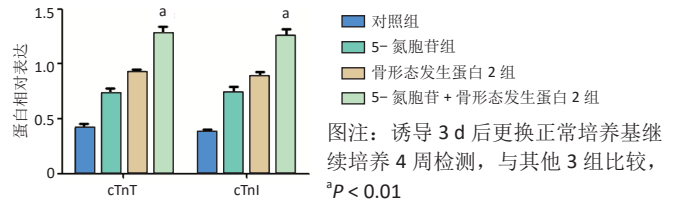


图 5 | Western blot 检测各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 cTnT 和 cTnI 蛋白的表达量 (各条带的定量分析)

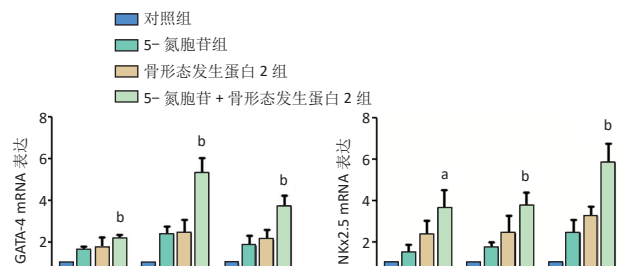
Figure 5 | Western blot assay of the expression of cTnT and cTnI protein after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group (quantitative analysis of each band)

表 2 | 各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 cTnT 与 cTnI 蛋白表达量

( $\bar{x} \pm s$ , n=5)  
Table 2 | Expression of cTnT and cTnI protein after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

组别	cTnT	cTnI
对照组	0.419±0.088	0.380±0.043
5- 氮胞苷组	0.730±0.112 <sup>a</sup>	0.738±0.123 <sup>a</sup>
骨形态发生蛋白 2 组	0.930±0.038 <sup>bc</sup>	0.890±0.082 <sup>bc</sup>
5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 组	1.281±0.132 <sup>ab</sup>	1.256±0.139 <sup>ab</sup>

表注：诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周检测，与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.01；与 5- 氮胞苷组和骨形态发生蛋白 2 组比较，<sup>b</sup>P < 0.01；与 5- 氮胞苷组比较，<sup>c</sup>P < 0.05



图注：诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周检测，与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.05，<sup>b</sup>P < 0.01

图 6 | RT-qPCR 检测各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 GATA-4 和 Nkx2.5 mRNA 的表达量

Figure 6 | RT-qPCR detection of Nkx2.5 and GATA-4 expression at mRNA level after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

表 3 | 各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 GATA-4 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

Table 3 | GATA-4 mRNA expression after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

组别	诱导 1 周	诱导 2 周	诱导 4 周
对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
5- 氮胞苷组	1.580±0.437 <sup>a</sup>	2.340±0.910 <sup>a</sup>	1.827±1.000 <sup>a</sup>
骨形态发生蛋白 2 组	1.700±1.163 <sup>a</sup>	2.420±1.471 <sup>a</sup>	2.088±1.097 <sup>a</sup>
5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 组	2.136±0.511 <sup>a</sup>	5.315±1.590 <sup>ab</sup>	3.720±1.005 <sup>a</sup>

表注：诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周检测，与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.01；与 5- 氮胞苷组和骨形态发生蛋白 2 组比较，<sup>b</sup>P < 0.05

表 4 | 各组骨髓间充质干细胞诱导分化后 Nkx2.5 mRNA 的表达

( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

Table 4 | Expression of Nkx2.5 mRNA after differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

组别	诱导 1 周	诱导 2 周	诱导 4 周
对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
5- 氮胞苷组	1.473±0.855	1.718±0.561 <sup>b</sup>	2.409±1.454 <sup>b</sup>
骨形态发生蛋白 2 组	2.347±1.514	2.410±1.921 <sup>b</sup>	3.241±1.018 <sup>b</sup>
5- 氮胞苷 + 骨形态发生蛋白 2 组	3.618±2.025 <sup>a</sup>	3.760±1.381 <sup>a</sup>	5.839±2.068 <sup>bc</sup>

表注：诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 4 周检测，与对照组比较，<sup>a</sup>P < 0.05，<sup>b</sup>P < 0.01；与 5- 氮胞苷组和骨形态发生蛋白 2 组比较，<sup>c</sup>P < 0.05



2.6 生物相容性 骨髓间充质干细胞是一类易于分离和分泌生物活性分子的多功能细胞,它可以激活组织修复过程,调节免疫和炎症细胞,由于骨髓间充质干细胞缺乏细胞表面组织相容性复合体 II 类分子和 T 细胞共刺激分子以及旁分泌介导的免疫调节活性,因此其具有免疫特权作用,避免了宿主免疫系统的破坏<sup>[4]</sup>。骨髓间充质干细胞与心肌细胞尽管来自不同的胚胎区域,但是均来自于早期中胚层,在作用上具有一定的相似性。目前也有关于自体人间充质干细胞移植和同种异体人间充质干细胞经心内膜移植治疗缺血性心肌病的临床研究,同种异体骨髓间充质干细胞在心肌梗死患者中具有良好的耐受性<sup>[5]</sup>。为了提高心脏的再生,将细胞与生物材料相结合成为研究的热点,这样既可以创造相似的微环境又可以具有良好的机械性能,还有生物降解和生物相容性。因此,与生物材料结合的方法可以为受损的心脏提供生物物理性支持<sup>[6-7]</sup>。

### 3 讨论 Discussion

干细胞治疗心肌梗死的方式一般分为两种:①将干细胞直接移植到心脏损伤部位,直接在体内诱导干细胞向心肌细胞定向分化<sup>[8]</sup>;②体外直接诱导干细胞分化成为心肌样细胞,将分化的心肌细胞移植到损伤部位。骨髓间充质干细胞是一种能够从骨髓中分离出来的多能干细胞,它具有多向分化潜力和高度自我更新能力,在一定条件下可以诱导分化为多种功能性细胞,其中包括心肌细胞。研究发现它具有获取容易、操作简单、免疫调节作用,在组织工程领域已经成为治疗心血管疾病的理想种子细胞。

5-氮胞苷作为心源性诱导剂,属于胞嘧啶核苷类似物,可以引起 DNA 中一些胞嘧啶去甲基化,通常可参与细胞的生长和分化,对提高心肌细胞分化效率具有重要的意义。早在 1999 年,MAKINO 等<sup>[9]</sup>的研究中就首次证实了 5-氮胞苷在体外能够将间充质干细胞成功诱导分化为心肌细胞。由此 5-氮胞苷成为公认的细胞化学诱导剂<sup>[10-13]</sup>。2004 年,CHOI 等<sup>[14]</sup>在研究中发现,5-氮胞苷诱导的胚胎干细胞分化成为心肌样细胞,有心肌标志基因和骨形态发生蛋白信号分子的上调。但是由于 5-氮胞苷具有毒性,对细胞具有一定的损伤,做为单独诱导剂具有一定的局限性。

骨形态发生蛋白 2 属于转化生长因子  $\beta$  家族中的一员,对心脏发育具有一定的作用。在心肌分化的发育水平和细胞水平上,骨形态发生蛋白 2 其实是一个关键的上游信号。有研究表明,胚胎中骨形态发生蛋白 2 表达增加可以促进心肌细胞的增殖,并且激活骨形态发生蛋白 2 可能对未成熟心肌细胞的扩增具有帮助。骨形态发生蛋白 2 在心肌方面具有多种作用:①在心脏的形成和心脏修复的过程中,骨形态发生蛋白 2 能促进骨髓间充质干细胞旁分泌相关因子<sup>[15-16]</sup>;②骨形态发生蛋白 2 具有抗纤维化的作用。骨形态发生蛋白 2 可以作为一种新型的抗纤维化细胞因子,在减轻压力超负荷诱导的心肌纤维化方面具有重要作用,可改善心功能<sup>[17-18]</sup>;③骨形态发生蛋白 2 具有一定的抗凋亡作用,骨形态发生蛋白

2 主要激活 PI3K/AKT 或 MAPK 通路;④此外,骨形态发生蛋白 2 是一种促进分化的因子,可以增强骨髓间充质干细胞促进心肌修复和再生作用。许多研究证实骨形态发生蛋白 2 在体外可以诱导骨髓间充质干细胞分化成为心肌样细胞<sup>[19-22]</sup>。

骨形态发生蛋白 2 与 5-氮胞苷联合诱导时,骨形态发生蛋白 2 的多重作用是否在一定程度上对骨髓间充质干细胞存在一定的保护作用,并且在一定程度上可以减轻 5-氮胞苷的细胞毒性,从而显著增加心肌样细胞的分化效率。ABBEY 等<sup>[23]</sup>研究表明,在小鼠 p19EC 细胞分化的初始阶段,5-氮胞苷可以通过降低甲基化和组蛋白乙酰化从而使心脏发生相关基因高表达,激活 ERK 信号通路,使心脏相关基因骨形态发生蛋白 2 的 DNA 甲基化状态发生变化。

实验通过免疫荧光细胞化学法、免疫细胞化学法检测均证实了骨形态发生蛋白 2 与 5-氮胞苷联合诱导组 cTnT、Desmin、cTnI 的表达均高于单独诱导组,说明诱导后的心肌样细胞具有心肌细胞的表型。cTnT 和 cTnI 属于心肌肌钙蛋白一部分,均可以调节肌肉收缩,并且具有高度的心肌特异性<sup>[24-25]</sup>。Desmin 是一种心肌细胞早期出现的细胞骨架蛋白,对肌细胞收缩具有维持作用,在很早就被认为是心肌细胞分化的标志之一<sup>[26-27]</sup>。为了进一步证实诱导后的心肌样细胞的有效性,RT-qPCR 检测结果显示骨髓间充质干细胞诱导 3 d 后更换正常培养基继续培养 1, 2, 4 周具有 GATA-4 和 Nkx2.5 mRNA 的表达,GATA-4 和 Nkx2.5 均为心脏早期转录因子,二者具有协同作用,参与心脏前体细胞分化的整个过程<sup>[28-29]</sup>,进一步证明了经过 5-氮胞苷与骨形态发生蛋白 2 联合诱导优于单独诱导。

综上所述,实验采用公认的化学诱导剂 5-氮胞苷与心脏相关因子骨形态发生蛋白 2 联合诱导,从形态学、蛋白以及基因等多方面证实,联合诱导的分化效率要优于单独诱导,但是 5-氮胞苷与骨形态发生蛋白 2 联合诱导通过何种机制促进骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化,还要进一步探究。

**作者贡献:** 实验设计与实施由第一作者完成,实验评估由通讯作者完成,资料的收集、数据的整理由全部作者完成。

**经费支持:** 该文章接受了“河北省自然科学基金(C2019405091)”及“河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2019066)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经河北北方学院实验动物福利伦理审查委员会批准,批准号为 2020-12-01。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过河北北方学院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] 宋晓玥, 程灏, 陈璐. 间充质干细胞治疗心肌梗死的研究进展 [J]. 中国医学工程, 2019, 27(6): 34-39.
- [2] 贾秀丽, 李昌平. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(50): 7469-7474.
- [3] MONZEN K, NAGAI R, KOMURO I. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(6):263-269.
- [4] GOLPANIAN S, WOLF A, HATZISTERGOS KE, et al. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiol Rev.* 2016;96(3):1127-1168.
- [5] HARE JM, FISHMAN JE, GERSTENBLITH G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2369-2379.
- [6] SIMPSON D, LIU H, FAN TH, et al. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells.* 2007;25(9):2350-2357.
- [7] LIU J, HU Q, WANG Z, et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H501-511.
- [8] YANG L, YAN F, MA J, et al. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction-Mediated Co-Delivery of Cxcl12 (Sdf-1alpha) and Bmp2 Genes for Myocardial Repair. *J Biomed Nanotechnol.* 2019;15(6):1299-1312.
- [9] MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103(5):697-705.
- [10] 郭茂娟, 范英昌, 徐秀梅, 等. 5-氮胞苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(46): 9238-9241.
- [11] 王俊, 陈斌, 刘翔, 等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的实验研究 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2012, 32(5): 631-635.
- [12] 王欢, 杨曦, 魏琴, 等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(12): 1590-1594.
- [13] XING Y, LV A, WANG L, et al. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2012;360(1-2):279-287.
- [14] CHOI SC, YOON J, SHIM WJ, et al. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp Mol Med.* 2004;36(6):515-523.
- [15] POTAPOVA IA, DORONIN SV, KELLY DJ, et al. Enhanced recovery of mechanical function in the canine heart by seeding an extracellular matrix patch with mesenchymal stem cells committed to a cardiac lineage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(6):H2257-2263.
- [16] WANG YL, ZHANG G, WANG HJ, et al. Preinduction with bone morphogenetic protein-2 enhances cardiomyogenic differentiation of c-kit+ mesenchymal stem cells and repair of infarcted myocardium. *Int J Cardiol.* 2018;265:173-180.
- [17] CHUNG YH, HUANG YH, CHU TH, et al. BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF-β1 signaling. *Lab Invest.* 2018;98(8):999-1013.
- [18] WANG S, SUN A, LI L, et al. Up-regulation of BMP-2 antagonizes TGF-β1/ROCK-enhanced cardiac fibrotic signalling through activation of Smurf1/Smad6 complex. *J Cell Mol Med.* 2012;16(10):2301-2310.
- [19] 陈晓依, 王浩宇, 吕洋, 等. PFT-α 与 BMP-2 联合诱导大鼠 BMMSCs 分化为心肌样细胞 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(8): 1088-1093.
- [20] LV Y, GAO CW, LIU B, et al. BMP-2 combined with salvianolic acid B promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017;33(10):477-485.
- [21] 高辰玮, 王海萍, 吴志刚, 等. 骨形态发生蛋白 2 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(27): 4953-4958.
- [22] 侯婧, 吕安林, 刘博武, 等. 骨形态蛋白 2 诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2012, 6(7): 27-30.
- [23] ABBEY D, SESHAGIRI PB. Aza-induced cardiomyocyte differentiation of P19 EC-cells by epigenetic co-regulation and ERK signaling. *Gene.* 2013;526(2):364-373.
- [24] SHIOZAKI M, INOUE K, SUWA S, et al. Utility of the 0-hour/1-hour high-sensitivity cardiac troponin T algorithm in Asian patients with suspected non-ST elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2017;249:32-35.
- [25] MUELLER C, GIANNITSIS E, CHRIST M, et al. Multicenter Evaluation of a 0-Hour/1-Hour Algorithm in the Diagnosis of Myocardial Infarction With High-Sensitivity Cardiac Troponin T. *Ann Emerg Med.* 2016;68(1):76-87.
- [26] APPLE FS. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. *Clin Chim Acta.* 1999;284(2):151-159.
- [27] HNIA K, RAMSPACHER C, VERMOT J, et al. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* 2015;360(3):591-608.
- [28] YU B, GONG M, WANG Y, et al. Cardiomyocyte protection by GATA-4 gene engineered mesenchymal stem cells is partially mediated by translocation of miR-221 in microvesicles. *PLoS One.* 2013;8(8):e73304.
- [29] CAREY AS, LIANG L, EDWARDS J, et al. Effect of copy number variants on outcomes for infants with single ventricle heart defects. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(5):444-451.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)