

· 基础研究 ·

骨形态发生蛋白-2、梗死心肌裂解液对骨髓间充质干细胞体外诱导分化作用的研究

海 澜¹, 高 航^{2△}

(辽宁医学院:1. 研究生院;2. 附属第一医院心内科, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、梗死心肌裂解液模拟的生物微环境诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)向心肌样细胞分化及在模拟的微环境中 BMP-2 对诱导的影响。方法 BMSCs 分离与体外培养, 构建大鼠心肌梗死模型制成梗死心肌裂解液; 分 4 组: 单纯 DMEM 培养组(A 组)、梗死心肌裂解液组(B 组)、梗死心肌裂解液加 BMP-2 阻断剂 noggin 组(C 组)、BMP-2 组(D 组), 通过倒置相差显微镜形态学观察、应用免疫细胞化学技术检测心肌特异性肌钙蛋白(cTnT)、心肌特异性肌球蛋白重链(MHC)的表达, 并对诱导的心肌样细胞进行统计学分析。结果 诱导 3 周后免疫细胞化学染色分析 cTnT、MHC, A、C 组呈阴性表达, B、D 组呈阳性表达, B、D 组与 A、C 组相比阳性细胞数增加($P < 0.05$)。结论 BMP-2、梗死心肌裂解液可诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞; 且 BMP-2 是梗死心肌裂解液诱导过程中重要的组成成分之一。

关键词:骨髓祖代细胞; 间质干细胞; 肌细胞, 心脏; 骨形态发生蛋白质类; 梗死心肌裂解液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)14-1394-03

Study on role of bone morphogenetic protein 2, infarcted myocardium lysate on bone marrow mesenchymal stem cells induced in vitro differentiation

Hai Lan¹, Gao Hang^{2△}

(1. Graduate School; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of bone morphogenetic protein 2(BMP-2), infarcted myocardium lysate simulated biological microenvironment on bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) differentiation into cardiomyocytes and the effect of BMP-2 on the induction in the simulation microenvironment. **Methods** BMSCs were separated and cultured in vitro. The rat model of myocardial infarction was constructed to prepare myocardial infarction lysate, which was divided into 4 groups: pure DMEM culture group(A), infarcted myocardium lysate group(B), infarcted myocardium lysate + BMP-2 blocker noggin group(C) and BMP-2 group(D). The morphological observation was performed by the inverted phase contrast microscope, the immunohistochemical technique was used for detecting the expression of cardiac specific troponin(cTnT) and myocardial specificity myosin heavy chain(MHC) expression, and the induced cardiomyocytes were analyzed by statistics. **Results** After 3-week induction, the immunocytochemistry analysis showed the negative expression of cTnT and MHC in the group A and C, and the positive expression in the group B and D. Comparing the group B and D with the group A and C, positive cells number was increased with statistical difference between them($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-2 and infarcted myocardium lysate can induce the differentiation of BMSCs into cardiomyocytes and BMP-2 is one of important components during infarcted myocardium lysate induction process.

Key words: myeloid progenitor cells; mesenchymal stem cells; myocytes, cardiac; bone morphogenetic proteins; infarcted myocardium lysate

骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein, BMP-2)^[1]属于转化生长因子 β 超家族成员,具有调节多种细胞的生长、分化和凋亡功能,在胚胎发育^[2]早期表达,对胚胎心肌细胞分化的启动、终末分化及心肌干细胞的定向分化起重要作用。研究显示心肌梗死后,心肌组织中 BMP-2 含量增加^[3],BMP-2 不仅对梗死周围的心肌有抗凋亡的作用^[4],而且参与了心肌祖细胞向心肌细胞的分化^[5],对于干细胞分化为心肌样细胞起着重要的诱导作用。本实验观察 BMP-2、梗死心肌裂解液模拟的生物微环境诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向心肌样细胞分化及在梗死心肌裂解液模拟的微环境中 BMP-2 对诱导的影响。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 清洁级 2 周龄 SD 大鼠 6 只(辽宁医学院动

物实验中心提供, SPF 级, 雌雄不限, 体质量不限)。

1.2 试剂与仪器 DMEM 低糖培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司), 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA(美国 Hyclone 公司), BMP-2、Noggin(美国 Prarmia 公司), CD44、CD166、CD34 抗体(北京中杉金桥公司), 鼠抗心肌特异性肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)、鼠抗心肌特异性肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)单抗(美国 Abcam 公司); 倒置相差显微镜(Olympus), 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司), CO₂ 细胞培养箱(德国 Hera cell culture), 超净工作台(苏州净化设备有限公司), 台式高速离心机(上海医用分析仪器厂), 电子天平(上海天平仪器厂), 磁力搅拌器(美国 Bellco-glass 公司), 4℃ 冰箱, -20℃ 冰箱(沈阳北斗星仪器有限公司), 高压蒸汽灭菌器(天津市精工医疗设备有限公司)。

△ 通讯作者, Tel:13941684293; E-mail: gaohangyb@163.com。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠骨髓 BMSCs 的培养 SD 大鼠 3 只脱白处死后, 75% 乙醇浸泡, 分离双侧股骨及胫骨, 剪去包括骺板在内的两侧骺端, 用含 10% 普通胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培养基冲洗骨髓腔, 将骨髓冲入培养瓶, 制成单细胞悬液, 细胞悬液离心后收集细胞, 再用含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养液重新悬浮细胞并接种细胞于培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养。3 d 后首次半量换液, 以后每 3 天换液 1 次。待贴壁细胞融合达 90% 以上时进行 1:2 传代, 取第 3 代细胞进行诱导。

1.3.2 梗死模型的建立及裂解液的制备 梗死模型的建立: SD 大鼠采用 12% 乌拉坦 1 mL/100 g 腹腔麻醉。气管插管, 呼吸机正压辅助通气, 于左胸第 4 肋间开胸, 切开心包暴露心脏, 在左心耳下缘与肺动脉圆锥之间结扎左冠状动脉前降支, 造成左心室前壁心肌梗死, 依次关闭胸腔。观察 20 min 后, 左心室前壁变苍白、收缩力减弱, 心电图示 ST 段升高 0.2 mv 即认为造模成功。取术后 6 h 存活 SD 大鼠为心肌梗死模型。梗死心肌组织裂解液的制备: 将梗死模型大鼠颈椎脱白处死后, 用无菌眼科剪取梗死模型的梗死部位心肌组织, 剪成 1 mm³ 大小的颗粒状组织块, 于组织匀浆机中处理 10 min 后, 用 DMEM 培养基制成约 20 mg/mL 的组织匀浆液, 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 的滤器过滤备用。

1.3.3 实验分组 将第 3 代 BMSCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成 4×10⁵/mL 的细胞悬液 25 μL 滴加于孔板中 (内置预先处置过的 25 mm² 盖玻片), 放入 37 °C 培养箱中培养, 且密度、活性、传代数均相同。单纯 DMEM 培养组 (A 组): 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基 0.1 mL 培养; 梗死心肌裂解液组 (B 组): 加入梗死心肌组织裂解液 0.1 mL; 梗死心肌裂解液加 noggin 阻断剂组 (C 组): 加入梗死心肌组织裂解液 0.1 mL 和 0.2 mg/L noggin 阻断剂 0.05 mL; BMP-2 组 (D 组): 加入 0.2 mg/L 的 BMP-2 0.1 mL, 3 周收获细胞。

1.3.4 指标检测

1.3.4.1 倒置相差显微镜 (inverted phase contrast microscope, IPCM) 下 BMSCs 的生长和形态观察

1.3.4.2 BMSCs 的鉴定 在 24 孔塑料培养板内放置无菌盖玻片, 每孔种植 1×10⁵/mL 细胞悬液 (第 2 代) 1 mL。待细胞生长至融合状态, 取出盖玻片, 用磷酸缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 清洗 3 次, 95% 乙醇固定 15 min, PBS 充分冲洗, 3% 过氧化氢封闭 10 min; 滴加蛋白阻断剂, 室温封闭 10 min, 甩去阻断剂, 加鼠抗 CD166、CD44 单抗 4 °C 过夜, 加入生物素标记的二抗, 室温孵育 30 min, 二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色, 中性树胶封固, 光学显微镜下观察。

1.3.4.3 IPCM 下 BMSCs 经梗死心肌裂解液 BMP-2 诱导 3 周后的生长和形态观察

1.3.4.4 BMSCs 经梗死心肌裂解液 BMP-2 诱导 3 周后免疫细胞化学染色 将诱导后的 BMSCs 置于培养板里的盖玻片上培养 3 周, 取出盖玻片用 PBS 清洗 3 次, 95% 乙醇固定 15 min, PBS 液充分冲洗, 3% 过氧化氢封闭 10 min; 滴加蛋白阻断剂室温封闭 10 min, 甩去阻断剂: (1) 加鼠抗 cTnT 单抗 4 °C 过夜, 然后加入生物素化标记的二抗, 室温孵育 30 min, DAB 显色, 中性树胶封固, 光学显微镜下观察。 (2) 加鼠抗 MHC 单抗 4 °C 培养过夜; 选用山羊抗鼠荧光素结合的 IgG 抗体为二

抗, 荧光素结合的 IgG 抗体在 490 nm 蓝光激发 MHC 标记诱导后 MSC 呈现绿色荧光。

1.3.4.5 心肌样细胞转化率的计算 免疫细胞化学染色后, 每组随机取 8 个视野, IPCM 下 (×100) 应用细胞计数板分别计数每个视野内的 cTnT 阳性细胞数 (Ni)、每个视野内细胞数 (N); 根据公式计算 BMSCs 心肌样细胞转化率 (心肌样细胞的转化率 = Ni/N×100%)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较行 LSD-*t* 检验, 多组间比较应用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IPCM 下 BMSCs 的生长和形态的观察 原代细胞接种 24 h 后部分细胞贴壁。3 d 时贴壁的细胞逐渐变形, 多数呈纺锤形或梭形并相互连接。7 d 时细胞呈长梭形外观, 体积逐渐增大, 此期细胞迅速分裂繁殖, 呈集落样聚集生长, 当细胞集落达到 80% 以上融合时, 可进行细胞传代。传代细胞 24~48 h 基本贴壁, 5~6 d 即可铺满瓶底。传代后的细胞变得较为同质, 大小均匀, 贴壁速度增快, 基本呈长梭形, 体积较原代时增大 (封 3 图 1)。

2.2 BMSCs 的鉴定 将生长良好的第 2 代 BMSCs 消化成单细胞悬液, 经免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色检测, 其表面抗原 CD44、CD166 阳性 (封 3 图 2), 阳性率均在 97% 以上, 造血干细胞的表面标记 CD34 表达阴性。

2.3 IPCM 下 BMSCs 诱导后 1 周、3 周的细胞生长和形态的观察 A、C 组呈纤维细胞样形态, 细胞的形态未发生明显变化。B 组诱导后 1 周的 BMSCs 细胞体积逐渐增大呈长梭形, 有聚集生长趋势; 诱导后 3 周, 可见肌丝样结构, 分布较广泛, 排列较密集, 但方向不够一致, 未见肌节样结构形成, 为肌细胞形态 (封 3 图 3)。D 组诱导后 1 周的 BMSCs 细胞伸出伪足, 排列方向渐趋一致; 诱导后 3 周细胞间连接增多, 可见部分片状肌丝样结构, 排列具有明显的方向性, 但排列不够密集。

2.4 BMSCs 诱导 3 周后免疫细胞化学染色鉴定及组间的比较 诱导 3 周后 A、C 组均呈阴性表达; B 组诱导后的 BMSCs 可见 cTnT 呈阳性表达 (封 3 图 4), 且转化率为 (13.731 3 ± 1.776 0)%, 荧光免疫细胞化学鉴定可见细胞质内 MHC 的表达阳性呈绿色, D 组诱导后的 BMSCs 可见 cTnT 呈阳性表达 (封 3 图 5), 且转化率为 (14.862 5 ± 2.132 2)%, 荧光免疫细胞化学鉴定可见细胞质内 MHC 的表达阳性呈绿色, B、D 组阳性细胞数与 A、C 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨 论

BMSCs 在不同的体外培养条件可分化为多种细胞^[6]。Rangappa 等^[7] 研究认为, BMSCs 的诱导分化因素分为化学性和物理性因素, 前者包括细胞因子、激素、离子梯度及周围细胞产生的可溶性细胞因子; 后者包括细胞直接接触的细胞外基质和相邻细胞所提供的局部信号刺激、电场、细胞间的牵拉力等。有研究认为, 5-Aza 作为一种诱导剂可体外诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞, 但其转化率并不高, 且具有潜在的毒性。苑媛等^[8] 研究显示, 血管紧张素 II 在体外可诱导人 BMSCs 向心肌样细胞分化。

本实验用梗死心肌裂解液模拟的生物微环境成功诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞。有研究表明梗死心肌组织与正常

心肌组织所释放的细胞因子或信号分子有明显不同,梗死心肌组织裂解液所模拟的心肌微环境具有促进 BMSCs 向心肌样细胞方向分化的作用^[9]。Monzen 等^[10]发现 BMSCs 移植于梗死心肌组织内或梗死边缘心肌组织内,能够分化为心肌细胞,并且能够与宿主心肌细胞建立细胞间连接。上述说明,BMSCs在适当的心肌微环境中可以诱导为有功能的心肌细胞前体,即心肌样细胞^[11]。

本研究用 BMP-2 成功诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞。曾有报道 BMP-2 在体外无血清条件下能将胚胎干细胞诱导分化为心肌样细胞^[12],甚至诱导分化为搏动的心肌细胞^[2,12]。noggin 的分子结构和 BMP-2 相似,是 BMP-2 的一种特异性直接拮抗剂。有研究证实,过表达 BMP-2 拮抗剂 noggin 可阻断心肌转录因子和收缩蛋白的表达。本实验在梗死心肌裂解液中加入 noggin 拮抗 BMP-2,使梗死心肌裂解液无法发挥诱导作用^[14-15],说明 BMP-2 是梗死心肌裂解液中起重要诱导作用的成分之一。

本研究采用 BMP-2、梗死心肌裂解液模拟的生物微环境成功诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞,且发现在梗死心肌裂解液模拟的生物微环境中,BMP-2 是不可缺少的重要组成部分。但是,在心肌样细胞生长的微环境中除 BMP-2 外,还有哪些必不可少的细胞因子或信号分子? 这些细胞因子或信号分子调控分化的路径、机制及心肌样细胞生长的最佳体外微环境等还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hughes S. Cardiac stem cell[J]. J Pathol,2002,197(4):468-478.
- [2] 陈志东,李建美. 骨髓间充质干细胞诱导为心肌样细胞的诱导剂概况[J]. 心血管病进展,2010,31(2):295-297.
- [3] Behfar A,Zingman LV,Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart[J]. FASEB J,2002,16(12):1558-1566.
- [4] Izumi M,Fujio Y,Kunisada K, et al. Bone morphogenetic protein-inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway[J]. J Biol Chem,2001,276(33):31133-31141.
- [5] 赵金超,顾春虎,王云雅,等. 梗死心肌组织裂解液对鼠骨髓间充质干细胞诱导分化作用的体外研究[J]. 中国医药生物技术,2007,2(6):411-415.
- [6] Monzen K,Shiojima I,Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4[J]. Mol Cell Biol,1999,10(9):7096-7105.
- [7] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2003,126(1):124-132.
- [8] 苑媛,吕安林,陈丹,等. 血管紧张素 II 诱导人骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 心脏杂志,2006,18(3):258-261.
- [9] Moscoso I,Centeno A,Lopez E, et al. Differentiation in vitro of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation[J]. Transplant Proc,2005,37(1):481-482.
- [10] Monzen K,Nagai R,Komuro I. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation[J]. TCM,2002,12(6):263-269.
- [11] Degeorge BR, Rosenberg M, Eckstein V. BMP-2 and FGF-2 synergistically facilitate adoption of a cardiac phenotype in somatic bone marrow c-kit⁺/Sca-1⁺ stem cells[J]. Clin Transl Sci,2008,1(2):116-125.
- [12] Kim YY,Ku SY,Liu HC, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells derived-cardiomyocytes induced by BMP-2 in serum-free condition[J]. Reprod Sci,2011,18(3):252-260.
- [13] Tan YZH,Wang HJ. Lineage commitment and differentiation of cardiac stem cells and their regulating mechanism[J]. Biomed Eng Foreign Med Sci,2004,27(1):37-41.
- [14] 王新艳,谭玉珍,王海杰,等. Smad 信号通路在骨髓源性心肌干细胞向心肌分化中的作用[J]. 解剖学报,2006,37(5):525-529.
- [15] Hao J,Ju H,Zhao S, et al. Elevation of expression of smads 2,3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing[J]. J Mol Cell Cardiol,1999,31(6):667-678.

(收稿日期:2012-01-02 修回日期:2012-03-02)

(上接第 1933 页)

- [12] 吴冬梅,李庆平. 前胡丙素对肾型高血压大鼠血压及尾动脉反应性的影响[J]. 中国药理学通报,1997,13(3):242-243.
- [13] Tupling AR. The decay phase of Ca²⁺ transients in skeletal muscle: regulation and physiology[J]. Appl Physiol Nutr Metab,2009,34(3):373-376.
- [14] Jia LG. Hypertrophy, increased ejection fraction, and re-

duced Na-K-ATPase activity in phospholemman deficient mice[J]. Am J Physiol,2005,288(4):H1982-1988.

- [15] 陈开祥,祝宝华,刘晨,等. 缺氧预适应和前胡丙素预处理对心肌受磷蛋白磷酸化水平的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2008,3(3):210-213.

(收稿日期:2011-12-28 修回日期:2012-02-09)