

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)17-1570-05

小鼠骨髓基质干细胞定向诱导为前体心肌细胞

张 勇¹ 蔡振杰² 陈如坤¹(¹ 浙江大学医学院第二医院胸心外科, 浙江 杭州 310009, ² 第四军医大学西京医院心血管外科 陕西 西安 710033)

Mouse marrow stromal cell differentiates into cardiomyocyte progenitor

ZHANG Yong¹, CAI Zhen-Jie², CHEN Ru-Kun¹

¹Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Second Affiliated Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China, ²Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the differentiation from mouse mesenchymal stem cell (MSCs) into cardiomyocyte progenitor. **METHODS:** MSCs were separated from mouse marrow and cultured and observed. To detect the surface antigens, the label cells were analyzed on a FAC scan flow cytometer. MSCs were induced with 5-azacytidine which acted as a myoblast inducer. The induced MSCs were detected by RT-PCR, electron microscope and immunofluorescence technique. **RESULTS:** The isolated subculturing MSCs displayed a fusiform cell-like morphology. MSCs were uniformly positive for CD29 and CD44, but didn't express CD34 and CD45. Through RT-PCR analysis, induced MSCs expressed cardiomyocyte-specific transcription factors (Nkx2-5/Csx and GATA4) and fetal ventricular cardiomyocyte-specific gene β -myosin heavy chain (β -MHC), but did not express adult ventricular cardiomyocyte-specific gene-myosin heavy chain (α -MHC). Induced MSCs expressed α -sarcomeric actin and desmin by immunofluorescence technique and myofilament formation was seen under electron microscope. **CONCLUSION:** MSCs can be induced to differentiate into cardiomyocyte progenitor.

【Keywords】 marrow mesenchymal stem cell; differentiation

【摘要】目的: 体外诱导小鼠骨髓基质干细胞(MSCs)向心肌细胞分化。方法: MSCs通过细胞传代培养,并通过流式细胞仪进行鉴定。MSCs经过5-杂氮胞苷诱导后,通过RT-PCR,透射电镜和免疫荧光技术检测诱导后的MSCs。结果: 培养的MSCs为形态学均一的梭形细胞,有时可见细胞融合。流式细胞仪显示MSCs CD29, CD44表达阳性, CD34, CD45表达阴性。

收稿日期 2004-03-26; 修回日期 2004-05-25

作者简介: 张 勇(1972-)男(汉族),湖北省武汉市人。主治医师,博士(导师陈如坤)。Tel. 13573108459 Email. zhywhzh@163.net

经过5-杂氮胞苷诱导后的MSCs表达Nkx2-5/Csx, GATA4, β -MHC基因和 α -sarcomeric actin和desmin蛋白,透射电镜显示诱导后的MSCs有肌丝形成。结论: 经过5-杂氮胞苷诱导后的MSCs可以向前体心肌细胞分化。

【关键词】 骨髓基质干细胞 分化

【中图分类号】 R654.2 **【文献标识码】** A

0 引言

成年哺乳动物心肌细胞本身缺乏增殖分化能力,心肌细胞损伤坏死后必然由纤维组织替代,导致心脏的收缩舒张功能障碍。细胞移植治疗缺血性心脏病是通过移植具有成肌潜能的各种干细胞至心梗区,使其在心梗死区增殖分化为肌组织,增加有功能的肌细胞数量,改善心功能。骨髓基质干细胞(MSCs)是具有多种分化潜能的干细胞,具有巨大的功能可塑性,可以在新的微环境中生成新的组织所必需的细胞株,研究表明, MSCs可以在缺血心肌中分化为心肌细胞^[1]。MSCs易于体外分离和体外培养,易于外源基因的导入和表达,另外骨髓再生能力强,易于反复获取,这使得MSCs成为细胞替代治疗心肌梗死的理想选择,具有重要的应用前景^[2]。我们通过体外培养、诱导MSCs,进一步验证了MSCs是具有向心肌细胞前体分化潜能的干细胞,并分析了MSCs诱导分化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 3~4 wk龄昆明种小鼠(第四军医大学实验动物中心),雌雄不限,DMEM低糖(Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青),Percoll细胞分离液(购自华美公司),5-杂氮胞苷(Sigma公司),Trizol试剂、一步法RT-PCR试剂盒(SuperscriptTM One-Step RT-PCR with Platium Taq X Invitrogen公司),引物Nkx2-5/Csx(同源异型盒基因216 bp),GATA4(锌指转录因子275 bp), β -MHC(β -肌球蛋白重链205 bp), α -MHC(α -肌球蛋白重链302 bp),DNA甲基转移酶(MTase 610 bp)由上海生工合成。FITC标记的羊抗大鼠IgG多克隆体(BD Biosciences公司),大鼠抗小鼠CD34 mAb(Hy biotechnology公司),大鼠抗小鼠CD29 mAb(BD Biosciences公司),大鼠抗小鼠CD45

mAb(Ebiosciences 公司),大鼠抗小鼠 CD44 多克隆抗体(Ebiosciences 公司). ECL 试剂盒(Amersham 公司). 小鼠抗 Desmin 抗体、小鼠抗 α -sarcomeric actin 抗体、FITC 标记的二抗(羊抗小鼠 IgG)、Cy3 标记的二抗(羊抗小鼠 IgG)购自武汉博士德公司.

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的分离、培养和诱导 用 21 号针头注射器插入 3~4 wk 龄昆明种小鼠的股骨干,10 mL 含 200 mL/L 胎牛血清的完全 L-DMEM(2 mmol/L L-谷氨酰胺, 10×10^4 u/L 青霉素和 25 μ g/L 两性霉素)冲洗骨髓腔,60% 的 Percoll 细胞分离液分离细胞,接种于 25 cm² 的培养瓶中. 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 浮箱静置培养. 于接种 5 d 后进行第 1 次换液,将未贴壁的细胞全部弃掉,以后每周换两次培养液. 倒置显微镜下观察细胞形态和生长情况,适时照相. 原代培养的细胞接近铺满整个培养瓶的表面时,即可用 2.5 g/L 胰酶将贴壁细胞消化分离(37 $^{\circ}$ C, 3~5 min),然后按 1:2 传代,并记为 P1,传代培养过程中隔日换液,直至贴壁细胞彼此融合,铺满整个培养瓶的底面. 再重复以上操作,传代培养记为 P2,余类推. 取生长状态良好的第二代 MSCs 加入 8 μ mol/L 5-杂氮胞苷,培养 24 h 后更换培养液,继续培养 3 wk 和 5 wk,培养方法同前.

1.2.2 MSCs 的鉴定 取生长状态良好的第二代 MSCs 胰酶消化, PBS 洗涤 3 次,分别加入荧光标记的抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗去未标记的抗体,10 g/L 的多聚甲醛固定,应用 ACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)检测细胞表面抗原表达.

1.2.3 细胞 RNA 的提取及 RT-PCR 反应 取细胞数约 3×10^6 ,加 Trizol 试剂 1 mL 提取总的 RNA,应用 Invitrogen 生物技术公司的一步法 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应. 拟测量的 PCR 产物为:①Nkx2-5/Csx, 预计扩增长度为 216 bp,正义引物为 5'-CAGTGGAGCTGGACAAAGCC-3'; 反义引物为:5'-TAGCGACGGTCTGGAACCA-3';②GATA4, 预计扩增长度为 275 bp,正义引物为:5'-CTGACATCTCAC-TATGGCA-3', 反义引物为:5'-CCAAGTCCGAG-CAGGAATT-3';③ β -MHC, 预计扩增长度为 205 bp,正义引物为:5'-GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC-3', 反义引物为:5'-TGCAAAGGCTCCAGGTCT-GAGGC-3';④ α -MHC, 预计扩增长度为 302 bp,正义引物为:5'-GGAAGAGTGAGCGCCATCAAGG-3', 反义引物为:5'-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG-3'.

1.2.4 间接免疫荧光染色步骤 经 5-AZ 诱导后 5 wk 的小鼠骨髓 MSCs 的细胞爬片以 950 mL/L 乙醇

固定 5~10 min,甩掉多余液体,加入 10 g/L BSA 封闭非特异结合位点,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min. 加入小鼠抗 desmin 抗体、小鼠抗 α -sarcomeric actin 抗体,置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 下孵育 24 h,0.01 mol/L PBS(pH 7.4)振荡 3 次,每次 5 min. 加入 FITC 标记的二抗(羊抗小鼠 IgG)(1:200)、Cy3 标记的二抗(羊抗小鼠 IgG)(1:200),37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h. 免疫荧光专用缓冲甘油封片,即刻在荧光显微镜下观察照相.

1.2.5 透射电镜观察 5 g/L 胰酶消化、收集 MSCs 和经 5-AZ 诱导后 6 wk 的小鼠骨髓 MSCs,于 1.5 mL 离心管中,40 g/L 戊二醛固定 24 h,常规超薄切片,透射电镜观察细胞外的基质形成情况及细胞的超微形态.

2 结果

在原代培养的人骨髓 MSCs 中,多数为成纤维样的梭形细胞,偶有宽阔、平坦的多边形细胞,初始细胞

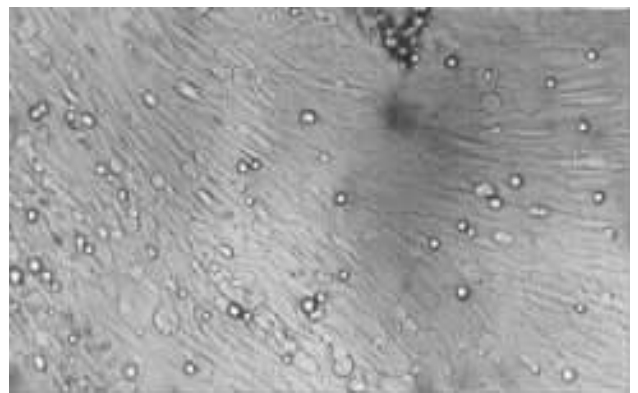


Fig 1 Subcultured MSCs display the fusiform morphology

图 1 传代培养的细胞为形态均一的梭形细胞

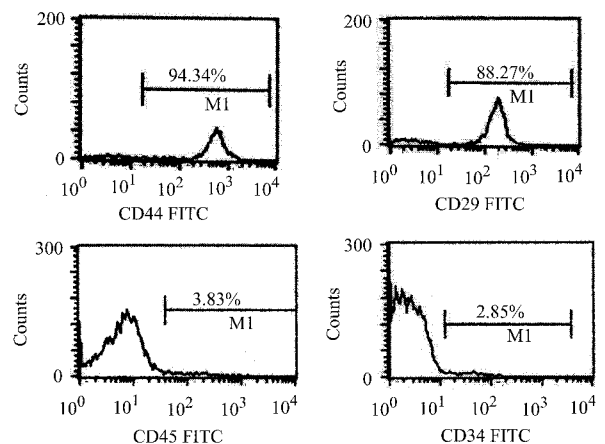


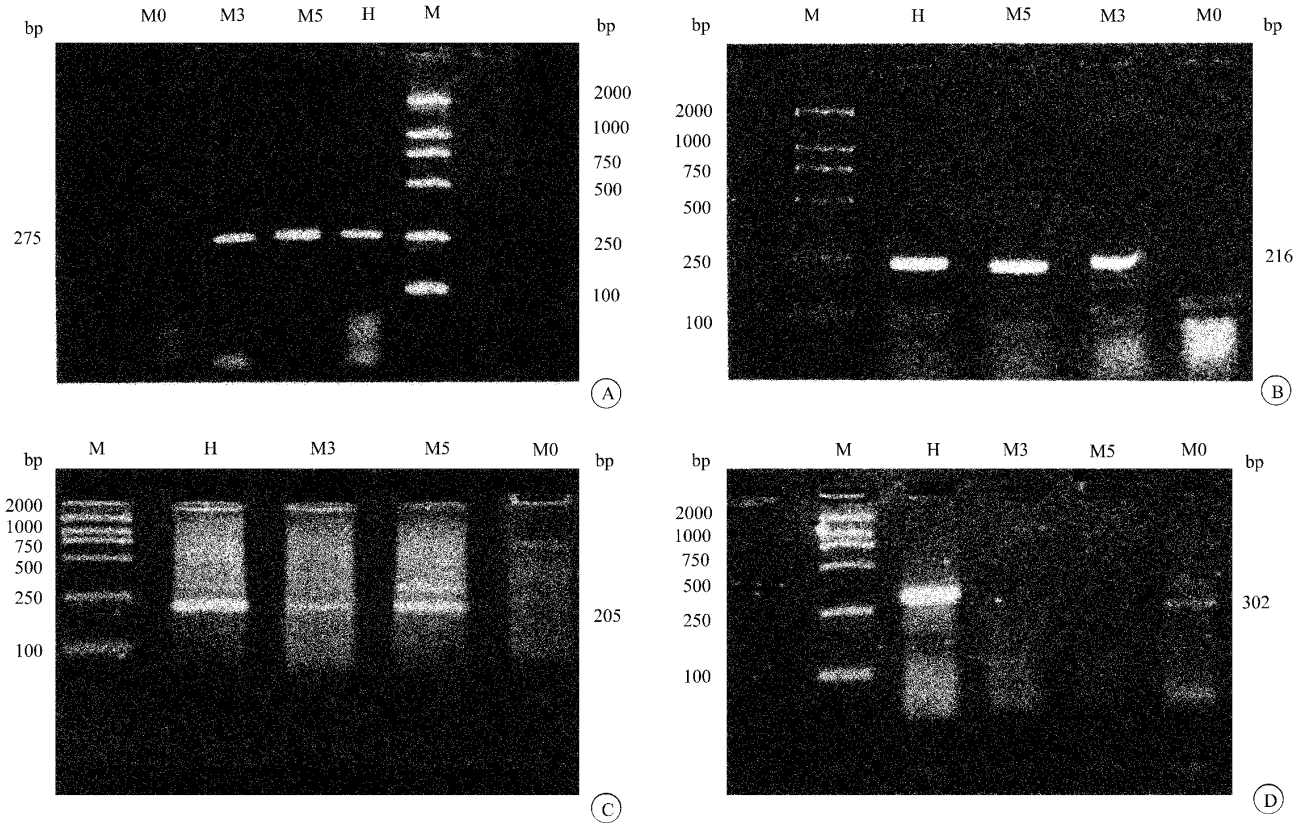
Fig 2 FAC Scan flow cytometry shows that MSCs are uniformly positive for CD29 and CD44, but negative for CD34 and CD45

图 2 流式细胞仪显示 MSCs CD29, CD44 表达阳性, CD34, CD45 表达阴性

呈团簇生长,向四周发散.经传代培养后,造血细胞基本消失,贴壁细胞体积较大,均为一致的梭形细胞,有时可见细胞融合(Fig 1).

经抗 CD44,CD29,CD34 和 CD45 mAb 标记后检测结果为:细胞表面抗原抗 CD29,CD44 抗体为阳性,抗 CD34,CD45 抗体为阴性(Fig 2).

通过 RT-PCR 分析显示经过 5-杂氮胞苷诱导 3 wk 和 5 wk 的 MSCs 表达出心肌特异性的转录因子 Nkx2-5/Csx 和 GATA4,同时表达出在胚胎期占优势的心肌细胞特异性的 β -MHC,没有表达处在成年期占优势的心肌细胞特异性的 α -MHC(Fig 3).



A GATA4 B Nkx2-5/Csx C β -MHC D α -MHC. H normal mouse myocardium M DNA maker DL2000 M3 MSCs after 3 weeks of induction M5 MSCs after induced 5 weeks of induction M0 MSCs.

Fig 3 RT-PCR analysis shows that MSCs induced by 5-AZ express cardiomyocyte-specific gene
图3 通过 RT-PCR 分析显示经过 5-杂氮胞苷诱导的 MSCs 表达出心肌特异性的基因

经过免疫荧光检测证实 5-杂氮胞苷诱导后的 MSCs 表达 α -sarcomeric actin 和 desmin 蛋白,说明诱导后的 MSCs 向成肌细胞分化(Fig 4).

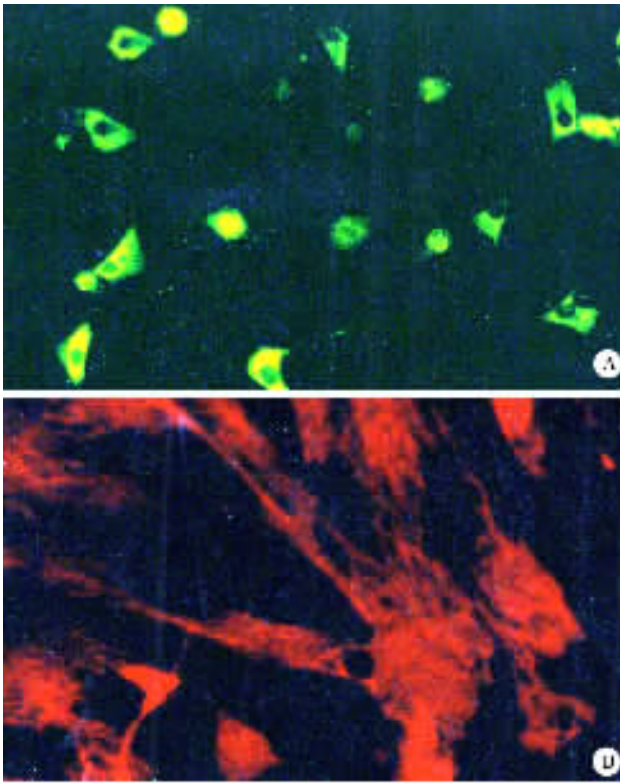
通过透射电镜还可以观察到诱导后的 MSCs 有明显的肌丝形成,并且可见到较多的糖原颗粒(Fig 5).

3 讨论

MSCs 不同于骨髓中的造血干细胞,它们可以向间质细胞分化,1968 年 Friedenstein 发现 MSCs 黏附在组织培养板上,类似成纤维细胞形态,以克隆方式生长.多个种属包括人、大鼠、小鼠、兔和猴的 MSCs 均具有这些特性^[3].本试验发现传代培养的 MSCs 为形态均一的梭形细胞,类似成纤维细胞,有时可见细胞融合.

骨髓来源的 MSCs 不能通过显微镜观察或者通过流式细胞仪来区分形态学的大小和细胞特征, MSCs 的表面标志具有非单一特性,它表面具有 50 多种可检测的表面抗原,表达了间质细胞、内皮细胞的表面标志.目前认为 CD29, CD44, CD71, CD90, CD166, CD120a, CD124, SH2 及 SH3 是 MSCs 的重要标志. MSCs 不表达造血细胞表面抗原,如造血前体细胞标志抗原 CD34,白细胞标志抗原 CD45,淋巴细胞表面抗原 CD11a,单核细胞/巨噬细胞表面抗原 CD14 等,这说明 MSCs 为非造血细胞^[4].本研究结果分析显示了相同的结果.

MSCs 已经被证明包含祖细胞能力可以多向分化为骨骼组织如骨骼、软骨、脂肪、肌腱、韧带和骨髓基质,这些新的发现不仅对于传统的干细胞生物是一种



A Desmin positive MSCs ; B : α -sarcomeric actin positive MSCs.

Fig 4 Induced MSCs express α -sarcomeric actin and desmin by immunofluorescence technique

图 4 诱导后的 MSCs 表达 α -sarcomeric actin 和 desmin 蛋白

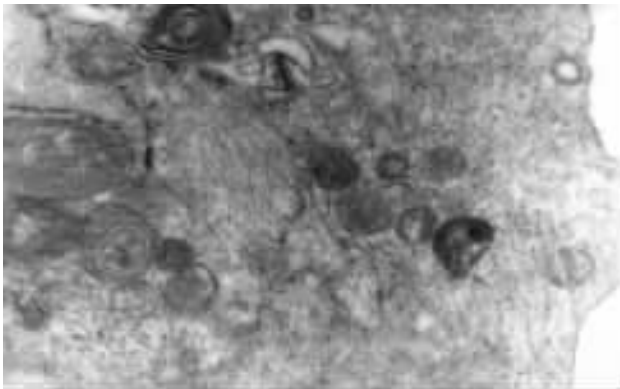


Fig 5 Myofilament formation in induced MSCs by electron microscopic detection

图 5 通过透射电镜还可以观察到诱导后的 MSCs 有明显的肌丝形成

挑战,也意味着 MSCs 在临床上有着广泛的应用. 5-杂氮胞苷是一种具有多种特异生物学性质的胞苷类似物,5-杂氮胞苷可以通过非竞争性地结合到真核生物 DNA 上甲基转移酶的结合位点,并阻断甲基转移酶的活性,从而能选择性地活化真核生物的基因表达,诱导细胞分化,但其具体的作用机制目前尚不完全清楚^[5]. 本试验用 5-杂氮胞苷诱导 MSCs,通过免

疫荧光染色方法和 Western-blot 检测方法显示诱导后的 MSCs 表达出肌小节肌动蛋白 α -sarcomeric actin^[6] 和横纹肌中间丝蛋白 desmin^[7],通过透射电镜还可以观察到诱导后的 MSCs 有明显的肌丝形成,证明了 MSCs 可以向成肌细胞转化. 通过 RT-PCR 分析显示经过 5-杂氮胞苷诱导后的 MSCs 表达出心肌特异性的转录因子 Nkx2-5/Csx 和 GATA4^[8],同时表达出在胚胎期占优势的心肌细胞特异性的 β -MHC,没有表达处在成年期占优势的心肌细胞特异性的 α -MHC^[9],进一步说明 MSCs 可以向心肌细胞转化,但是分化的细胞是介于成熟的心肌细胞和心肌祖细胞之间的心肌细胞前体^[10]. 本实验未诱导出跳动的心肌细胞可能是细胞克隆的特性不同所致, MSCs 生长以克隆形式生长,生长步骤在不同的克隆是不同的,因此诱导出结果不同^[4].

随着在干细胞研究中不断深入,人们发现一种组织的特异性干细胞可以横向分化成其他组织的细胞,而且干细胞的横向分化具有明显的普遍性. 另外由于胚胎干细胞供体不足,需长期免疫移植治疗,使其临床应用前景受到挑战. MSCs 可以从成年骨髓中反复穿刺获得,而且 MSCs 容易体外培养,细胞增殖能力强,不需要加任何昂贵的细胞因子等优点使其成为进行细胞移植的理想材料^[1]. 本试验发现 MSCs 可以横向分化为成肌细胞,使得利用 MSCs 成为细胞移植治疗缺血性心脏病的主要来源成为可能.

【参考文献】

- [1] Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration [J]. *Cardiovas Res*, 2002 91(12): 1092-1102.
- [2] 郑奇军,蔡振杰,俞世强,等. 骨髓间质干细胞体外转化为心肌细胞的实验研究 [J]. 第四军医大学学报, 2002 23(20): 1871-1873.
Zheng QJ, Cai ZJ, Yu SQ, et al. Experimental study on differentiation of mesenchymal stem cells in bone marrow to cardiomyocytes in vitro [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002 23(20): 1871-1873.
- [3] Pittenger F, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999; 284(5411): 143-147.
- [4] Yu L, Jian S, Wei XL, et al. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: Does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? [J]. *Cardiovas Res*, 2003 58(2): 460-468.
- [5] 吴铁军,蔡振杰,俞世强,等. 不同浓度 5-杂氮胞苷对骨髓间质干细胞体外诱导分化的作用 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(15): 1373-1375.
Wu TJ, Cai ZJ, Yu SQ, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to cardiomyocytes in vitro with different concentration of 5-azacytidine [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003 24(15): 1373-1375.

- [6] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. *Nature*, 2001;410(6829):701-705.
- [7] Kuramochi Y, Fukazawa R, Migita M, et al. Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice[J]. *Pediatr Res*, 2003;54(3):319-325.
- [8] Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis[J]. *Cardiovas Res*, 2002;90(5):509-519.
- [9] Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC, et al. Reversal of chronic mo-

lecular and cellular abnormalities due to heart failure by passive mechanical ventricular containment[J]. *Circ Res*, 2003;93(11):1095-1101.

- [10] Hakuno DH, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors[J]. *Circulation*, 2002;105(3):380-386.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)17-1574-01

脑卒中患者并发肺部感染的相关因素分析

王线妮, 赵童, 马晓丽

(第四军医大学唐都医院神经内科, 陕西西安 710038)

【关键词】脑卒中 肺部感染 危险因素

【中图分类号】R743.3 【文献标识码】B

0 引言 肺部感染是脑卒中常见的并发症,如不及时诊断和治疗常导致患者病情加重甚至死亡,亦影响患者日后神经功能的恢复。现将我科近3年来住院治疗的脑卒中并发肺部感染的患者进行回顾性分析,探索脑卒中并发肺部感染的危险因素。

1 对象和方法

1.1 对象 2000-01/2003-01 在我院神经内科治疗的脑卒中患者 1326 例,所有患者均符合第四届全国脑血管会议的诊断标准^[1]。参照《临床医院感染学》中医院获得性肺部感染的诊断标准^[2],确定为肺部感染者 145 例,肺部感染率为 10.94%。

1.2 统计方法 采用 SPSS 统计软件包,率的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 患者意识障碍程度^[3]与肺部感染的关系 无意识障碍者 607 例,肺部感染 21 例(3.46%);轻度意识障碍者 445 例,肺部感染 29 例(6.52%);中度意识障碍者 152 例,肺部感染 39 例(25.66%);重度意识障碍者 122 例,肺部感染 49 例(40.16%)。组间两两比较发现,无意识障碍组与轻度意识障碍组之间差异无显著性($P > 0.05$),而其余两组之间比较均有显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 患者年龄与感染的关系 患者年龄 < 60 岁者 462 例,肺

部感染 31 例(6.71%);年龄 60~70 岁者 490 例,肺部感染 50 例(10.20%);年龄 > 70 岁者 374 例,肺部感染 64 例(17.11%)。组间两两比较均有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 血糖水平与感染的关系 入院时血糖水平正常的患者 834 例,肺部感染 65 例(7.79%);入院时血糖水平高于正常的患者 492 例,肺部感染 80 例(16.26%)。两组比较存在非常显著性差异($P < 0.01$)。

2.4 抗生素应用与感染的关系 预防性应用抗生素的 102 例患者中,肺部感染 42 例(41.16%);未行预防性用药的 1224 例患者中,肺部感染 103 例(8.42%)。两组比较存在显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论 意识障碍是脑卒中患者并发肺部感染的重要危险因素。长期卧床,咳嗽反射、吞咽反射均减弱或消失,极易发生坠积性肺炎及吸入性肺炎,吸痰时将口鼻腔的病原菌直接带入气管内,进一步增加了肺部感染的机会。高龄脑卒中患者肺部感染率明显高于低年龄组。老年人支气管壁腺体增生,分泌物增加而粘膜纤毛清除功能降低,再加上很多高龄患者卒中前就已存在老慢支和肺气肿等肺部疾病,脑卒中应激状态下,极易发生肺部感染。脑卒中后血糖水平较高的患者肺部感染率明显增加。其中部分为卒中前既有糖尿病史,部分为脑卒中后早期出现的应激性高血糖,高血糖患者中性粒细胞的杀菌功能降低,免疫球蛋白、补体、抗体等生成减少,导致机体免疫功能低下,高血糖环境有利于细菌生长繁殖,糖尿病血管神经病变引起血流缓慢,亦影响了局部组织对感染的反应^[4]。滥用抗生素亦是引起肺部感染的重要因素之一。

【参考文献】

- [1] 张新华,武迎宏,徐燕,等. 90 例脑血管患者医院感染与季节关系的分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2000;10(6):433-434.
- [2] 卫生部医政司医院内感染监控小组. 医院感染的诊断标准[S]. *中华医院管理杂志*, 1990;5(5):306.
- [3] Adqams RJ, Meador KJ, Sethi KD, et al. Graded neurologic scale for use in acute hemisphere stroke treatment protocols[J]. *Stroke*, 1987;18(3):665.
- [4] 胡军民,束枫,吕健,等. 脑血管意外合并糖尿病患者医院感染分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002;12(8):595.

编辑 王小仲

收稿日期 2004-05-11; 修回日期 2004-06-15

作者简介:王线妮(1973-),女(汉族),陕西省西安市人,主管护师。

Tel.(029)83377743