

# APJ 在 hESCs 定向心肌分化过程中的表达特征

童珊珊<sup>1,2</sup>, 陈宇<sup>1,2</sup>, 张宁坤<sup>2</sup>, 高连如<sup>2</sup>, 程涛<sup>2</sup>, 王泽<sup>2</sup>, 雷洪涛<sup>2</sup>, 李春花<sup>2</sup>

**摘要** 目的 在人胚胎干细胞(hESCs)定向心肌分化过程中,以中胚层阶段(d2)、心肌细胞起始分化阶段(d3)、心肌细胞后分化阶段(d7)为时间节点,探索APJ的表达特征。方法 hESCs经单层培养后,应用化学成分明确的诱导分化培养基定向诱导hESCs向心肌细胞分化,再于d2、d3、d7阶段分别进行细胞免疫荧光检测,共聚焦显微镜观察Brachyury T、mesp1、Nkx2.5与APJ的蛋白表达情况,实时荧光定量PCR法检测4种标志物mRNA的表达水平。结果 诱导d7开始出现跳动的细胞,跳动细胞数量d7~d16逐渐增加,d16达高峰。细胞免疫荧光结果显示跳动的细胞心肌特异性标志物 $\alpha$ -Actinin、cTNNT2表达阳性,并可见到明显的肌节及闰盘结构;APJ在d2、d3、d7阶段分别与阶段特异性标志物Brachyury T、mesp1、Nkx2.5共表达。3个阶段中APJ mRNA呈持续性表达,在中胚层起始时表达最高,中胚层后表达逐渐降低。结论 APJ与代表hESCs心肌分化过程中的阶段特异性标志物Brachyury T、mesp1、Nkx2.5共表达,证实APJ在人心肌细胞发育的整个过程中持续性表达。

**关键词** 人胚胎干细胞;心脏祖细胞标志物;定向心肌分化;心肌细胞

中图分类号 R 349.5; R 349.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1738-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.005

APJ是1993年O'Dowd等发现的一种G蛋白偶联受体,因与血管紧张素AT1受体有一定的同源性,又称血管紧张素AT1相关受体,apelin为其内源性配体。2007年,在斑马鱼中首次证实APJ/apelin信号通路控制心肌祖细胞的迁移及分化,且干扰APJ基因表达后,心脏祖细胞减少甚至缺失<sup>[1-2]</sup>。D'Aniello et al<sup>[3]</sup>发现在小鼠心脏发育过程中,APJ能够诱导中胚层标志物Brachyury T及心肌分化起始标志物mesp1的表达,同时上调心肌特异性标志物

Mef2C、Mlc2v、Tbx5、Gata4及Nkx2.5的表达。而敲除APJ基因,则导致小鼠原始心管形成缺陷、房室垫形成延迟及死胎等<sup>[4]</sup>。APJ在斑马鱼及哺乳动物心脏发育中有重要作用,然而,APJ在人类心血管发育过程中的表达特征目前尚无报道,该实验探索人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)体外定向心肌分化过程中APJ的表达特征,为揭示APJ/apelin信号通路在人心肌分化过程中的作用奠定基础,同时也为优化体外心肌分化方法提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂和仪器** E8培养基、EDTA人多能干细胞传代工作液、Basement Membrane Matrix、Brachyury T抗体、mesp1抗体、APJ抗体、Nkx2.5抗体(美国Abcam公司); $\alpha$ -Actinin(美国Sigma公司);cTNNT2抗体、FITC标记的羊抗兔抗体、FITC标记的羊抗鼠抗体(美国Santa Cruz公司);TRIzol试剂、逆转录试剂盒、SYBR Select Master Mix(美国Life公司);实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司);倒置相差显微镜(日本NIKON公司);CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司);共聚焦显微镜(德国莱卡公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 hESCs的培养、扩增** 6孔板中每孔加入1 ml生长因子减量的Matrigel胶并置于37℃温箱中包被过夜,吸去上层包被液,每孔中加入2 ml E8完全培养基,以20%的接种密度将hESCs以3~5个细胞团块的形式均匀接种于6孔板中,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养。3~4 d后,倒置显微镜下观察,细胞汇合度达到85%~90%时,弃去各孔中培养基,每孔2 ml PBS清洗2次,0.5 mmol/L EDTA消化细胞5 min,弃去EDTA,每孔加2 ml E8完全培养基呈扇形轻轻吹打孔底部细胞,按1:4的比例将细胞传代至生长因子减量的Matrigel胶包被过的6孔板中,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中继续培养。

**1.2.2 hESCs定向心肌诱导分化** 将hESCs接种于6孔板,E8培养基中培养3 d,细胞汇合度约达

2016-07-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81370238);北京市自然科学基金(编号:7142156)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学海军临床学院,北京 100048

<sup>2</sup>海军总医院心脏中心,北京 100048

作者简介:童珊珊,女,硕士研究生;

陈宇,女,硕士生导师,责任作者,E-mail: YuChen911@hotmail.com

90% 将 E8 培养基换成心肌诱导分化培养基 CDM 3(成分为 RPMI 1640、500  $\mu\text{g/ml}$  重组人血清白蛋白、213  $\mu\text{g/ml}$  的维生素 C)。每孔加入 2 ml 添加有 6  $\mu\text{mol/L}$  CHIR99021 的 CDM 3 分化培养基 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 48 h,弃去原培养基,加入添加 2  $\mu\text{mol/L}$  Wnt-C59 的 CDM 3 分化培养基 48 h 后换成 CDM 3 培养基,每 2 d 换液 1 次,以后逐渐增加换液频率,直到出现跳动的心肌细胞。

**1.2.3 心肌细胞的纯化和鉴定** 心肌诱导分化的第 16 天弃去原诱导分化培养基,每孔加入 2 ml 心肌纯化培养基,继续培养 10 d。心肌纯化培养基的成分为无糖的 RPMI 1640、213  $\mu\text{g/ml}$  的维生素 C、500  $\mu\text{g/ml}$  重组人血清白蛋白、5 mmol/L DL-乳糖钠溶液。

**1.2.4 免疫荧光染色检测不同诱导阶段 APJ 和相应阶段特异性标志物的蛋白表达** 诱导分化 d2,取 6 孔板的 1 个孔进行免疫荧光染色。取出细胞爬片,PBS 清洗 3 次 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次 0.5% Triton-100 室温打孔 15 min,加入 3% 的 BSA 封闭 30 min,加入 1:100 倍稀释的 Brachyury T 和 APJ 抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,PBS 清洗 3 次,再分别加入 1:100 倍稀释的羊抗鼠和羊抗兔的二抗室温避光孵育 1 h,共聚焦显微镜观察。d3 同时加入 mesp1 和 APJ 抗体,d7 同时加入 Nkx2.5 和 APJ 抗体,其余处理同 d2 细胞样本。

**1.2.5 Real-Time PCR 法检测 APJ 和各阶段特异性标志物 mRNA 的表达水平** 分别收集诱导 d0、d2、d3、d7 共 4 个阶段的细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA。取适量 RNA 按照试剂盒说明进行逆转录反应,即 37  $^{\circ}\text{C}$ 、60 min 95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。再以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 Real-Time PCR 反应,反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$ 、2 min,循环 1 次;95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s、60  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,循环 40 次。基因及引物序列见表 1。经内参基因 GAPDH 标化后,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因的表达水平,每个基因设置 3 个复孔,本次实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用多因素方差分析,组间比较采用 SNK- $q$  检验。

## 2 结果

**2.1 hESCs 传代培养、扩增** hESCs 接种于 6 孔板后第 1 天,细胞开始贴壁生长,并形成多个细胞克隆单位,每个克隆单位周边较整齐并有细胞向外周爬

行生长,第 3 天后细胞排列紧密,克隆单位增大,边缘光滑圆润且不同克隆单位出现相互融合的现象(图 1)。

表 1 目的基因及内参基因的引物序列

| 基因          | 引物序列(5'-3')                                               |
|-------------|-----------------------------------------------------------|
| Brachyury T | F: GACCCCAACGCCATGTACTC<br>R: ACGTACTTCCAGCGGTGGTT        |
| Mesp1       | F: CCTGAGGAGCCCAAGTGACA<br>R: GAAGGTGCTGAGGCCAAAAG        |
| Nkx2.5      | F: CAAGGACCTAGAGCCGAAA<br>R: TCAAGGCGCTGGAGAACAA          |
| APJ         | F: GAGGAGGGAGTGACGAGTCAAG<br>R: GCCTTACCCCGTCTCAGTTA      |
| GAPDH       | F: CATGAGAAAGTATGACAACAGCCT<br>R: AGTCCTTCCACGATACCAAAAGT |

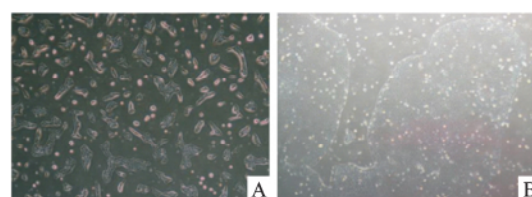


图 1 倒置显微镜下观察细胞接种后 hESCs 形态  $\times 40$   
A: 第 1 天; B: 第 3 天

**2.2 定向分化 7 天后搏动的心肌细胞** hESCs 诱导的 d7,开始出现跳动的细胞,之后跳动细胞逐渐增加,并出现成片细胞搏动的现象。至 d16,跳动的细胞约占 60%,此后比例几乎不再增加(图 2)。

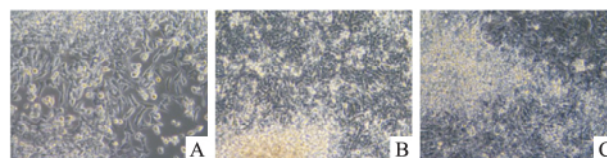


图 2 倒置显微镜下观察诱导分化的 hESCs 形态  $\times 200$   
A: 第 2 天; B: 第 3 天; C: 第 7 天

**2.3 纯化心肌细胞的鉴定** 诱导的细胞纯化 10 天后,心肌细胞比例约达 95%,纯化后的细胞经免疫荧光染色显示,成熟心肌细胞标志物 cTNNT2 和  $\alpha$ -Actinin 表达阳性,可见明显的肌节、闰盘结构(图 3)。

**2.4 诱导不同阶段细胞免疫荧光检测结果** 诱导分化的 d2,中胚层标志物 Brachyury T 表达阳性,d3 中胚层起始心肌分化标志物 mesp1 表达阳性,d7 成熟心肌细胞标志物 Nkx2.5 表达阳性。免疫荧光显示 d2 表达 Brachyury T 的细胞,d3 表达 mesp1 的细

胞, d7 表达 Nkx2.5 的细胞均同时表达 APJ, APJ 在这 3 个阶段中持续性表达。见图 4。

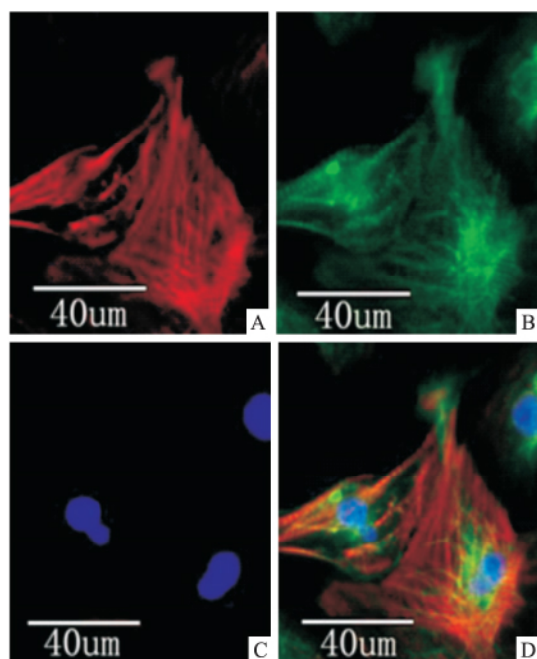


图3 细胞纯化后免疫荧光染色结果

A: cTNNT2 染色; B: α-Actinin 染色; C: DAPI 染色; D: ABC 3 个图的融合

## 2.5 APJ 和心肌细胞特异性标志物 mRNA 的表达

Real-Time PCR 检测在 hESCs 定向心肌诱导分化的 d2, Brachury T 表达最高, 之后表达立即消失; d0 至 d3 mesp1 的表达逐渐增高, d3 达最高, 之后又逐渐降低; Nkx2.5 在 d0、d2、d3 阶段均不表达, 在 d7 开始出现跳动心肌细胞时高表达; APJ 在 d2 时表达最高, 之后逐渐降低, 其表达峰值与 Brachury T 同期但先于 mesp1。见图 5。

## 3 讨论

心脏发育起始于胚胎发育早期, 原肠胚期中胚层前体细胞迁移至前侧板中胚层后开始向心血管分化<sup>[5]</sup>。在胚胎发育过程中, Brachury T、mesp1 作为中胚层早期及中胚层后起始心血管分化的标志物, 用以界定心肌分化过程中的关键时间点。Nkx2.5 是心脏前体细胞分化的最早标志物之一, 参与心肌前体细胞的分化及心腔的形成, 同时 Nkx2.5 局限表达于成熟心肌细胞, 是一种心肌细胞特异性标志物。体外心肌细胞的分化主要通过模拟胚胎心脏发育的关键步骤, 阶段特异性激活或抑制某些信号通路诱导心肌细胞的产生。开始通过激活 activin /

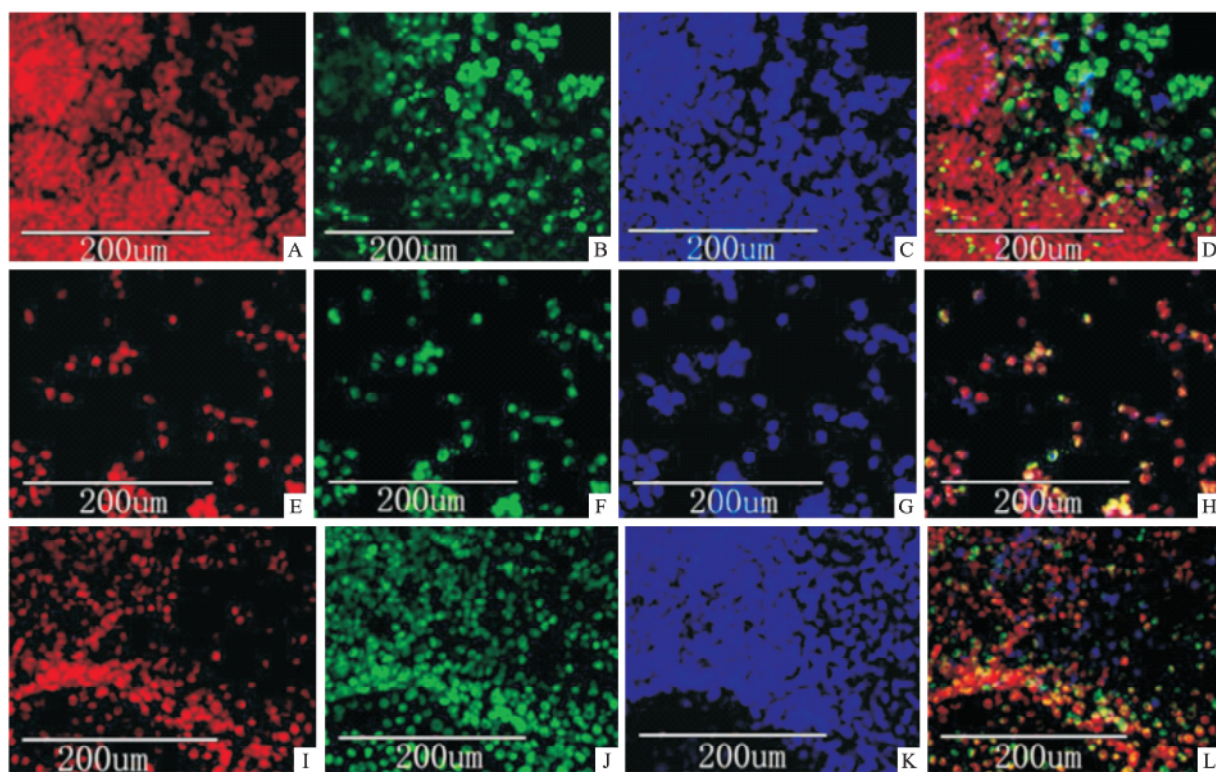


图4 hESCs 诱导各阶段细胞免疫荧光染色

A、E、I: APJ; B: Brachury T; F: mesp1; J: Nkx2.5; C、G、K: DAPI; D: A、B、C 融合图; H: E、F、G 融合图; L: I、J、K 融合图

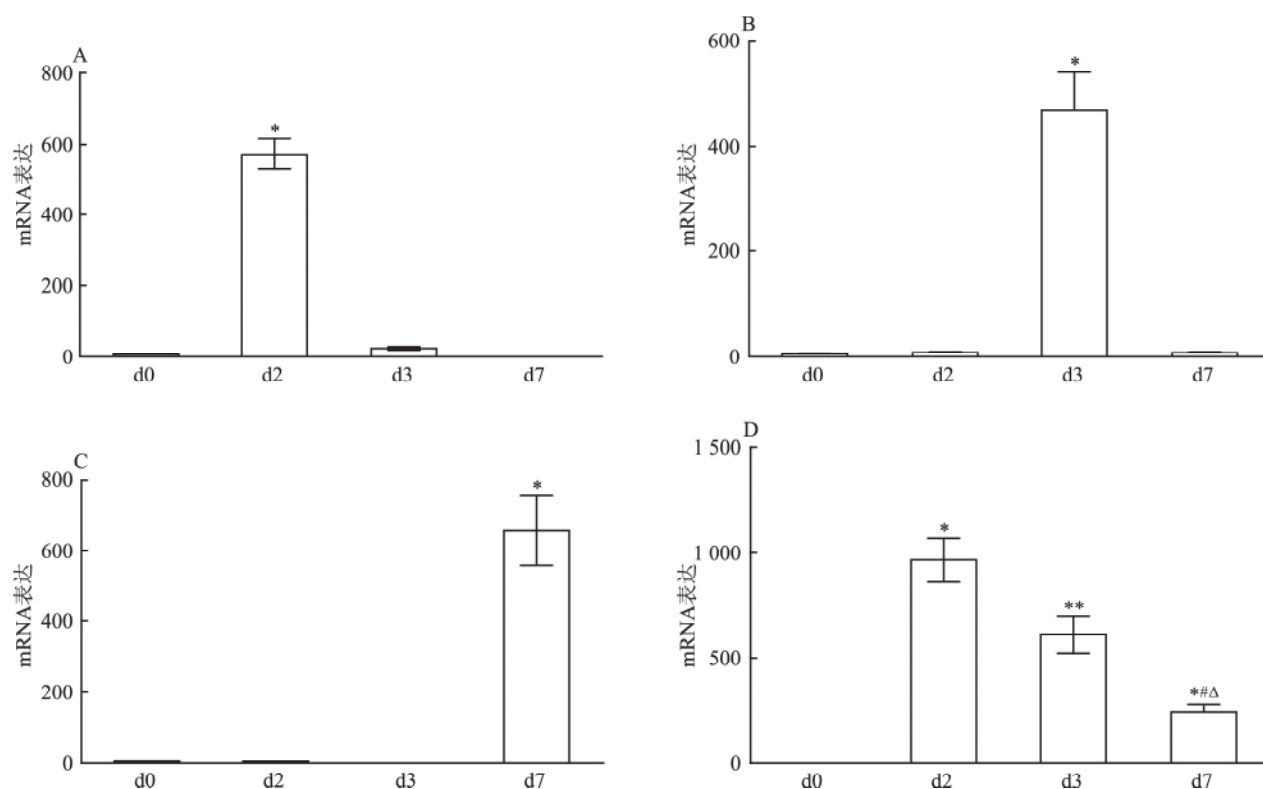


图5 hESCs 诱导分化过程中 Brachury T、mesp1、Nkx2.5、APJ mRNA 表达

A: Brachury T; B: mesp1; C: Nkx2.5; D: APJ; 与 d0 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 d2 比较: #  $P < 0.05$ ; 与 d3 比较: Δ  $P < 0.05$

Nodal、BMP、Wnt、FGF<sup>[6-8]</sup> 等诱导中胚层的形成,随后通过抑制 BMP<sup>[7]</sup>、Wnt<sup>[8]</sup>、TGF- $\beta$ <sup>[9]</sup> 等最终诱导心肌细胞的形成。本实验以 Brachury T、mesp1、Nkx2.5 的表达代表心脏发育过程的不同时间点,观察 hESCs 定向心肌分化过程中 APJ 的表达特征。

原肠胚期,侧板中胚层心血管前体细胞汇合至中线并逐渐向喙部延伸形成左右两侧心域,即第一生心区和第二生心区,第一生心区分化为心房和左心室,第二生心区分化为心脏流出道和右心室。斑马鱼原肠胚期,APJ 表达在侧板中胚层,apelin 表达在中线,APJ/apelin 通过调节侧板中胚层心脏祖细胞的迁移和两侧心域的汇合影响心脏的发育。干扰 APJ 的表达,心脏祖细胞减少甚至缺失,心脏发育缺陷;干扰 apelin 的表达,心脏祖细胞分布异常且汇合至中线受阻<sup>[11]</sup>。敲除小鼠 APJ 基因后显示,胚胎发育过程中原始心管环化不全、房室垫形成延迟,胚胎死亡率增加,存活至成年的小鼠也存在室间隔缺损等心脏结构的异常<sup>[4]</sup>。Smad2 是中胚层形成必不可少的因子,Nodal/Cripto 通过激活 Smad2 诱导中胚层的形成<sup>[10]</sup>,Cripto/Smad2 是心肌细胞形成过程的重要通路,激活 Smad2 对 APJ、apelin 的表达具有关键作用,而 APJ 作为 Smad2 的下游信号分子,使

Brachury T 表达降低、mesp1 表达增高<sup>[3]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示,APJ 在原肠胚早期开始表达,心肌发育的晚期,APJ 的表达降低,说明 APJ 在心脏祖细胞早期的发育过程中具有重要作用。本实验中 APJ 在中胚层起始时开始表达,之后表达逐渐降低,且其表达峰值先于 mesp1,与既往研究相符。本实验虽然可见跳动的细胞且心肌细胞特异性标志物阳性,但由于经费等原因,未进行心肌细胞膜电位的检测。

目前,虽然药物、介入及外科手术使心梗患者的死亡率有所降低,但心梗后心肌重塑所致心功能的恶化却使患者的死亡率增加,最终导致心血管疾病的死亡率居高不下。而应用有自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞替代坏死心肌可以根本改善患者的预后。寻找有自我更新能力、多向分化潜能、无免疫排斥反应且可通过旁分泌/自分泌途径改善心功能的良好种子细胞应用于心脏再生是目前研究的热点。本实验结果证实在 hESCs 定向心肌细胞发育过程中,APJ 与 mesp1 及 Nkx2.5 共表达,且在起始心肌分化前高表达,提示 APJ 可能是一种心血管前体细胞的标志物,而 APJ 阳性的干细胞是否可以分化为心血管细胞及 APJ 阳性的细胞对心梗后心功能的改善效果仍需进一步的探索。

## 参考文献

- [1] Zeng X X, Wilm T P, Sepich D S, et al. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation [J]. *Dev Cell* 2007, 12(3): 391–402.
- [2] Scott I C, Masri B, D'Amico L A, et al. The G protein-coupled receptor agtr1b regulates early development of myocardial progenitors [J]. *Dev Cell* 2007, 12(3): 403–13.
- [3] D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, et al. G Protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated Kinase/p70S6 Kinase signaling pathway [J]. *Circ Res* 2009, 105(3): 231–8.
- [4] Kang Y, Kim J, Anderson J P, et al. Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development [J]. *Circ Res* 2013, 113(1): 22–31.
- [5] Garry D J, Olson E N. A common progenitor at the heart of development [J]. *Cell* 2006, 127(6): 1101–4.
- [6] Burridge P W, Thompson S, Millrod M A, et al. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability [J]. *PLoS One* 2011, 6(4): e18293.
- [7] Kattman S J, Witty A D, Gagliardi M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines [J]. *Cell Stem Cell* 2011, 8(2): 228–40.
- [8] Yang L, Soonpaa M H, Adler E D, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population [J]. *Nature* 2008, 453(7194): 524–8.
- [9] Willems E, Cabral-Teixeira J, Schade D, et al. Small molecule-mediated TGF-beta type II receptor degradation promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell* 2012, 11(2): 242–52.
- [10] Kitamura R, Takahashi T, Nakajima N, et al. Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells [J]. *Circ Res* 2007, 101(1): 78–87.

## Expression characteristics of APJ in cardiac differentiation of human embryonic stem cells

Tong Shanshan<sup>1,2</sup>, Chen Yu<sup>1,2</sup>, Zhang Ningkun<sup>2</sup>, et al

( <sup>1</sup>*Navy Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048;*

<sup>2</sup>*Dept of Cardiology, Navy General Hospital, Beijing 100048*)

**Abstract Objective** To investigate the expression characteristics of APJ in the process of cardiac differentiation of human embryonic stem cells according to the three stage markers of mesoderm, earliest cardiac morphogenesis, later cardiac morphogenesis. **Methods** After monolayer-based hESCs culturing, using chemically defined cardiac differentiation medium to differentiate hESCs into myocardial cell, the expression of Brachyury T, mesp1, Nkx2.5 and APJ were observed with confocal microscope after cyto-immunofluorescence in the stage of mesoderm (d2), earliest cardiac morphogenesis (d3) and later cardiac morphogenesis (d7). The mRNA expressions of Brachyury T, mesp1, Nkx2.5 and APJ were detected with Real-Time PCR. **Results** Beating cardiac cells began at d7 and beating cells didn't increase till d16. After purification of cardiomyocytes,  $\alpha$ -Actinin and cTNNT2 proteins were positively expressed and sarcomere and intercalated discs were observed obviously. Cyto-immunofluorescence staining showed that APJ was co-expressed with stage-specific markers of Brachyury T, mesp1, Nkx2.5 in d2, d3, d7. The mRNA expression of APJ was persistent in all three stages, highest in mesoderm and then decreased gradually. **Conclusion** APJ is co-expressed with stage-specific markers of Brachyury T, mesp1 and Nkx2.5. APJ is persistently expressed in the process of human myocardial development.

**Key words** human embryonic stem cells; markers of cardiac progenitor cells; defined cardiac differentiation; myocardial cell