

同种异体骨髓间充质干细胞在大鼠体内 心肌缺血微环境中的分化及存活

张 静¹ 魏 峰² 吴忠东¹ 王亭忠² 倪雅娟² 马爱群²

摘要 目的 观察大鼠同种异体骨髓间充质干细胞(MSCs)在体内心肌缺血微环境中,向心肌细胞分化过程中主要心肌特异性标志物的分化表达及存活。方法 采用左冠状动脉前降支(LAD)结扎术建立大鼠急性心肌梗死(MI)模型($n=62$)。将绿色荧光蛋白(GFP)转染标记的MSCs,于心外膜下注射到心肌梗死周边区;免疫荧光染色观察移植后3、5、7、9 d移植的MSCs的存活情况及其主要特异性标志物(MYH、Cx43、cTnI、 α -actin)蛋白的表达;应用激光捕获显微切割技术分离心肌组织中GFP标记的MSCs群,应用Real-time PCR法测定其MYH、Cx43、cTnI、 α -actin相对于未移植的MSCs的mRNA表达,对移植后9 d的移植区域行TUNEL凋亡染色。结果 免疫荧光染色观察到移植的MSCs于移植后3 d开始持续表达MYH、Cx43,于移植后5 d开始持续表达cTnI,未观察到 α -actin的表达;Real-time PCR法结果显示,移植的MSCs上MYH于移植后5、7 d的表达量较3 d的明显增多($P<0.05$),Cx43、cTnI于移植后7 d的表达量较5 d的均增加($P<0.05$),于移植后9 d MSCs几乎观察不到,TUNEL凋亡染色示移植的MSCs发生了凋亡。结论 移植的MSCs在大鼠体内心肌缺血微环境下向心肌细胞分化的过程中能够表达部分主要心肌特异性标志物,但其不能长时间、有效的存活。

关键词 心肌梗死;骨髓间充质干细胞;移植;心肌特异性标志物;MYH;Cx43;cTnI; α -actin

中图分类号 R 541.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0300-05

缺血性心脏病通过骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植修复或替代严重受损或坏死的心肌细胞来改善心脏功能、逆转心肌重构已成为目前的研究热点^[1]。已有大量动物实验研

究^[2-4]表明,心肌梗死区域同种异体MSCs的局部移植可改善心脏功能,但同时也有研究^[2]观察到部分心肌梗死患者接受移植后发生心律失常等异质性改变。移植的MSCs分化具有微环境依赖性^[5],在心肌缺血微环境下,移植的MSCs是向正常心肌细胞方向分化还是向受损或异常的心肌细胞或纤维瘢痕组织分化需要进一步探讨。该研究拟观察同种异体的MSCs在大鼠体内心肌缺血微环境下心肌特异性标志物的表达及分化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 80 g 清洁级雄性SD大鼠1只,180~200 g 清洁级雄性SD大鼠62只,均由西安交通大学医学院实验动物中心提供。80 g 大鼠用于骨髓供体,分离培养MSCs,180~200 g 大鼠用于建立心肌梗死(myocardial infarction, MI)模型。

1.2 主要仪器及试剂 BX51型正置光学显微镜购于日本Olympus公司;BL-420生物机能实验系统购于成都泰盟科技有限公司;HM325石蜡切片机购于德国MICROM公司;激光显微切割仪购于瑞士LEICA公司;MYH、Cx43、cTnI、 α -actin抗体购于美国Santa Cruz公司;兔抗山羊IgG-FITC购于北京中杉金桥生物技术公司;山羊抗兔IgG-Cy3购于北京康为世纪生物科技有限公司;TUNEL试剂盒购于美国Promega公司。

1.3 方法

1.3.1 MSCs的分离培养与标记 采用Percoll密度梯度离心结合贴壁培养法分离纯化SD大鼠MSCs,采用文献^[6]的方法,以携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的慢病毒载体转染标记纯化的MSCs。

1.3.2 MI模型的建立 100 g/L水合氯醛以3 ml/kg的剂量腹腔注射麻醉健康成年SD大鼠,常规备皮、消毒、铺巾,剪开皮肤,钝性分离胸大肌和前锯肌,用血管弯钳穿透肋间肌进入胸腔并沿肋间隙方向撑开,另一血管弯钳沿垂直肋间隙方向撑开肋骨,适当用力将心脏挤出,迅速在左心耳与肺动脉圆

2013-09-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30800455)

作者单位:¹ 新疆医科大学第四附属医院心脏中心,乌鲁木齐 830000

² 西安交通大学医学院第一附属医院心血管内科,西安 710061

作者简介:张 静,女,硕士,住院医师;

马爱群,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: maaiqun@medmail.com.cn

锥交界处平左心耳下缘 2 mm 处,以 7/0 无损伤缝合线结扎左冠状动脉前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)近端,结扎后立即将心脏归位并置入接注射器的引流管,对合皮肤的同时抽出胸腔内气体约 2 ml,立即拔管并行胸外按压,体表心电图观察有无心肌梗死后的心电图改变,待心律、心率恢复正常且呼吸平稳后,缝合皮肤,术后连续 3 d 肌肉注射青霉素钠。

1.3.3 MSCs 的体内移植 将成功建立 MI 模型的 53 只大鼠 2 周后接受 MSCs 移植,采用建立 MI 模型同样方法麻醉、开胸、暴露心脏,用 1 ml 胰岛素注射器于 MI 周边区均匀迅速注射 6×10^6 个 MSCs (约 0.15 ml 细胞悬液),注射后的心脏归位、恢复胸腔负压、关胸及术后护理同 MI 模型的建立步骤。

1.3.4 心肌组织标本的提取 将以上成功建立移植模型的 41 只大鼠于第 3、5、7、9 天分别随机处死 10、10、10、11 只。前 3 d 处死的 10 只中,5 只用于免疫荧光染色,5 只用于 Real-time PCR 法检测,第 9 天处死的 11 只中,6 只用于免疫荧光染色,5 只用于 TUNEL 凋亡染色。

1.3.5 免疫荧光染色 将第 3、5、7、9 天处死的大鼠心脏取出,冲净残血,切取注射部位的心肌组织,40 g/L 多聚甲醛固定 12 h,200 ml/L 蔗糖溶液脱水 12 h,OCT 包埋组织,冰冻,连续组织切片,行常规免疫荧光染色;一抗稀释浓度为 1:100,二抗稀释浓度为 1:100;激光共聚焦显微镜观察染色结果。

1.3.6 Real-time PCR 法检测 同 1.3.5 中方法取出心脏,切取注射部位的心肌组织,制备连续冰冻组织切片,方法同免疫荧光染色。应用激光显微切割仪捕获切片上 GFP 标记的 MSCs,采用单细胞 PCR 试剂盒中说明书推荐的方法裂解其 RNA,并行逆转录反应,反应条件为:25 °C 10 min;50 °C 20 min;85 °C 5 min;Real-time PCR 反应条件为:50 °C 2 min;95 °C 2 min;95 °C 15 s;60 °C 30 s;共 50 个循环,内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。计算 GFP 标记的 MSCs 相对于未移植 MSCs 的基因拷贝数。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算其相对表达量。

1.3.7 TUNEL 凋亡染色 处死 9 d 的大鼠,分离注射部位的心肌组织,冲洗数次,40 g/L 多聚甲醛固定 12 h,200 ml/L 蔗糖溶液脱水 12 h;用 OCT 包埋组织,-80 °C 保存;连续冰冻切片,吸附到用多聚赖氨酸处理过的载玻片上;添加 100 μ l 的 20 μ g/ml 蛋

白酶 K 稀释液(10 mg/ml 蛋白酶 K 原液,用 PBS 500:1 稀释),室温孵育 30 min;再次固定,滴入 Equilibration 缓冲液 10 min 后滴加 rTdT 反应混合物同时覆盖塑料盖膜,37 °C 湿盒中孵育 60 min;避光环境下加入 Streptavidin HRP 稀释液(用 PBS 500:1 稀释 Streptavidin HRP),室温孵育 30 min;PBS 冲洗后加入 DAB 稀释液,室温干燥 30 min;荧光显微镜结合光学显微镜观察结果并拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间比较采用独立样本 *t* 检验,可采用检验水准取 0.05。

2 结果

2.1 移植 MSCs 的分布特点及其主要心肌特异性标志物蛋白的表达 通过免疫荧光染色观察移植的 MSCs 在心肌组织内呈带状分布,排列方向与心肌细胞一致,于移植后 3 d 开始持续表达 MYH、Cx43,移植后 5 d 开始持续表达 cTnI,不表达 α -actin,见图 1。

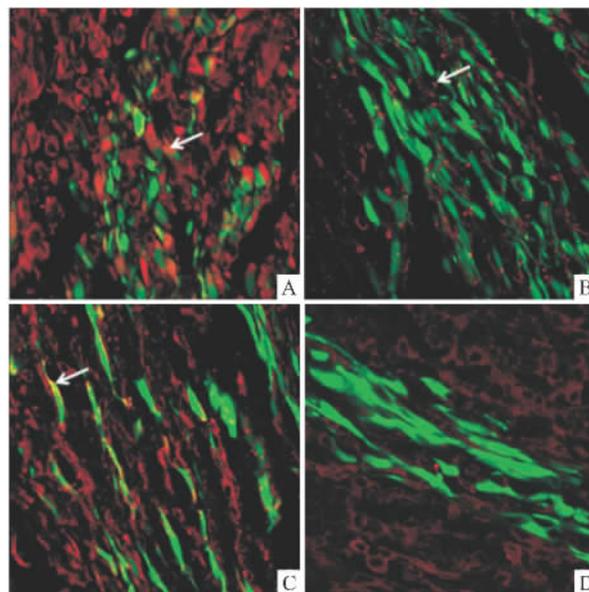


图1 GFP 标记的 MSCs 在心肌缺血微环境中心肌特异性标志物蛋白的表达 免疫荧光染色 $\times 600$

A: MYH; B: Cx43; C: cTnI; D: α -actin; 箭头所示为已表达相应目的蛋白的 MSCs,呈棕黄色

2.2 移植的 MSCs 主要心肌特异性标志物 mRNA 的表达 与未移植 MSCs 相比,移植的 MSCs 中 MYH、Cx43 于移植后 3 d 表达明显增多($P < 0.05$),cTnI 于移植后 5 d 表达明显增多($P < 0.05$)。其

中, MYH 于移植后 5、7 d 较 3 d 表达量明显增多 ($P < 0.05$), Cx43、cTnI 于移植后 7 d 较 5 d 表达量均增多 ($P < 0.05$), 见图 2。

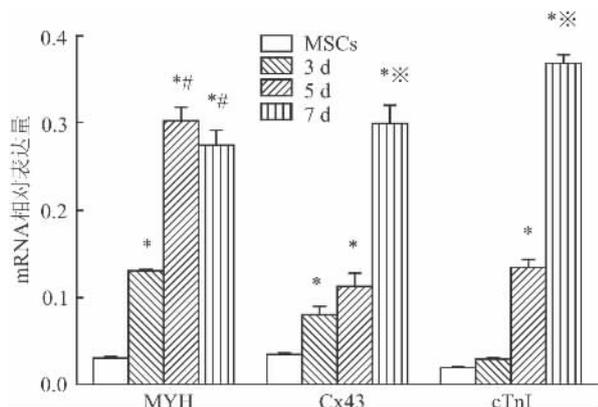


图 2 Real-time PCR 法测定特异性标志物的 mRNA 相对表达量与未移植 MSCs 比较: * $P < 0.05$; 与 3 d 比较: # $P < 0.05$; 与 5 d 比较: ** $P < 0.05$

2.3 移植的 MSCs 数量的变化 移植的 MSCs 起初数量众多、存活良好,但随着移植时间的延长,细胞数量逐渐减少,于移植后第 9 天基本全部丢失,见图 3。

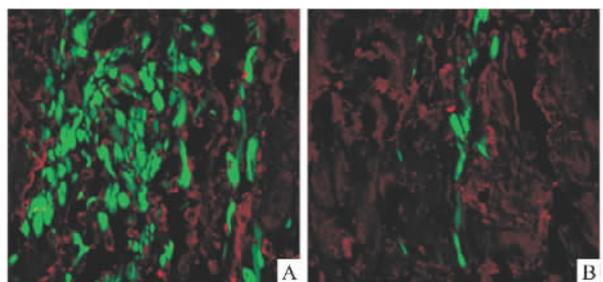


图 3 移植的 MSCs 数量变化 免疫荧光染色 $\times 600$
A: 3 d 时移植的 MSCs 数量众多,存活良好; B: 9 d 时移植的 MSCs 数量明显减少

2.4 TUNEL 凋亡染色 9 d 时移植的 MSCs 细胞数量明显减少,行 TUNEL 凋亡染色示移植的 MSCs 在光镜下呈棕褐色,见图 4。

3 讨论

MSCs 因具备储量丰富、易于分离、培养、扩增、无染色体异常或端粒酶缺失、不易刺激异体免疫细胞增殖等优点而成为该领域的热点细胞^[7],大量的动物实验、临床试验已证实 MSCs 的移植可以修复坏死的心肌细胞,从而改善心脏功能。有实验证实移植的 MSCs 的分化具备环境诱导依赖性^[8]。移植

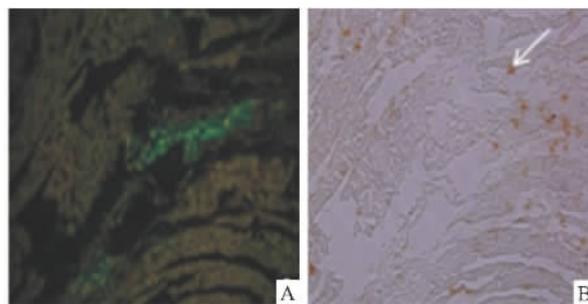


图 4 移植的 MSCs 凋亡染色 TUNEL 凋亡染色 $\times 600$
A: 9 d 时移植区域; B: 相同部位移植的 MSCs 凋亡染色后呈棕褐色,如箭头所示

的 MSCs 所处环境是病态环境,周围既有正常的心肌细胞,也有受损或异常的心肌细胞以及纤维瘢痕组织等,然而, MSCs 具有多向分化潜能,是否能向正常心肌细胞方向分化有待证实。本实验证实移植的 MSCs 可以表达心肌特异性蛋白 cTnI、MYH、Cx43,未观察到 α -actin 的表达。

cTnI 是肌钙蛋白 3 种基因亚基之一,具有较高的心肌特异性。本实验证实移植的 MSCs 随着移植时间的延长, cTnI 表达且表达量不断增加,这初步验证了移植的 MSCs 朝着心肌样细胞方向分化。

与心肌收缩有关的肌原纤维的主要成分是肌球蛋白与肌动蛋白。MYH 是肌球蛋白重要组成部分,本实验证实移植的 MSCs 于移植后 3 d 开始表达 MYH,并随着时间的延长,表达有所增加,这为移植的 MSCs 收缩及与宿主心肌细胞协调运动提供了结构蛋白基础。然而本实验证实了移植的 MSCs 不表达作为肌动蛋白主要亚型之一的 α -actin,但 Fukuda^[9] 研究发现 MSCs 在体外可分化为心肌细胞和肌小管,表达 α -actin。这与本实验结果不符合,究其原因, α -actin 的未表达考虑可能与移植细胞存活时间短而未完成分化相关,同时 α -actin 的缺失表达致使移植的 MSCs 缺乏结构蛋白的支持而逐渐丢失,其具体机制需要进一步证实。

Cx43 是机械偶联主要的中间连接蛋白,在与宿主心肌细胞间的信号传导方面起着重要作用。Shake et al^[10] 将 Di-I 标记的自体 MSCs 注射入猪心肌梗死模型的梗死心肌内,2 周后可检测到 Cx43 与宿主心肌细胞发生电-机械偶联。Pijnappels et al^[11] 发现上调 Cx43 的表达可以提高心肌细胞间电偶联及心肌间传导速度增加,可以减少心肌梗死后心律失常的发生。本实验证实移植的 MSCs 于 3 d 后即可观察到 Cx43 的表达,移植细胞及宿主细胞之间提

供了信号通道,与宿主心肌之间初步形成了电-机械偶联,为改善心脏的功能奠定结构基础。

本实验同时证实 MSCs 随着移植时间的延长,细胞数量逐渐减少,移植后第 9 天基本全部丢失。既往已有大量实验证实 MSCs 免疫原性低,其诱导分化的组织免疫排斥反应弱,且可来源于异体,避免了组织配型和免疫排斥反应的问题^[12]。这就为同种异体之间的安全及有效移植奠定了基础。但有实验证实 MSCs 移植后 24 h,超过 50% 的细胞发生了凋亡,1 周后超过 90% 的细胞发生了凋亡^[13]。凋亡的具体机制尚不明确,推测微环境可能是影响 MSCs 存活的主要因素。第一,移植区域周边心肌细胞因坏死而肌纤维的断裂、细胞间网格结构破坏以及移植的 MSCs 自身结构框架蛋白如 α -actin 的表达缺失或不完全等均可导致移植的 MSCs 失去存活的空间;第二,移植的 MSCs 在微环境中缺乏足够的营养能量供给,某些心肌标志物的表达缺失可能会引起 MSCs 向心肌细胞分化的过程中线粒体能量代谢障碍,导致能量缺失;第三,局部注射的移植方法可能会导致移植的 MSCs 炎症细胞聚集于移植区、分布高度不均匀而引起心肌细胞的急性炎症反应;第四,可能与移植的 MSCs 的 GFP 表达沉默相关,致使 GFP 标记的原位细胞绿色荧光消失而观察不到, Schierling et al^[14] 研究表明移植后 3 d 其标记的 GFP 表达沉默。

参考文献

- [1] Nabel E G, Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(1): 54-63.
- [2] Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen S R, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model[J]. *Circulation*, 2007, 115(17): 2254-61.
- [3] Perin E C, Dohmann H F, Borojevic R, et al. Transendocardial,

autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure [J]. *Circulation*, 2003, 107(18): 2294-302.

- [4] Ben-Dor I, Fuchs S, Kornowski R. Potential hazards and technical considerations associated with myocardial cell transplantation protocols for ischemic myocardial syndrome[J]. *J Am Coll Cardiol* 2006, 48(8): 1519-26.
- [5] Tosh D, Slack J M. How cells change their phenotype [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 187-94.
- [6] 魏峰, 马爱群, 王亭忠, 等. 慢病毒载体介导 GFP 标记大鼠骨髓间充质干细胞 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2010, 31(3): 288-92.
- [7] Nasef A, Fouillard L, Ashammakhi N. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms [J]. *Regen Med*, 2008, 3(4): 531-46.
- [8] Tosh D, Slack J M. How cells change their phenotype [J]. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3): 187-94.
- [9] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering [J]. *Artif Organs*, 2001, 25(3): 187-93.
- [10] Shake J G, Gruber P J, Baumgartner W A, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(6): 1919-25.
- [11] Pijnappels D A, Schalij M J, Van Tuyn J, et al. Progressive increase in conduction velocity across human mesenchymal stem cells is mediated by enhanced electrical coupling [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(2): 282-91.
- [12] Tse W T, Pendleton J D, Beyer W M, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. *Transplantation* 2003, 75(3): 389-97.
- [13] Zhang M, Methot D, Poppa V, et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(5): 907-21.
- [14] Schierling W, Kunz-Schughart L A, Muders F, et al. Fates of genetically engineered haematopoietic and mesenchymal stem cell grafts in normal and injured rat hearts [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(6): 354-64.

The differentiation and survival of mesenchymal stem cells in the microenvironment of rat myocardial ischemia *in vivo*

Zhang Jing¹, Wei Feng², Wu Zhongdong¹, et al

(¹Centre of Cardiology, The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000;

²Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

Abstract Objective To observe the differentiation and survival of the main myocardial specific markers of mesen-

pEGFP-C2-ASIC2a 真核表达载体的构建及其在大鼠关节软骨细胞中的表达

倪文琳, 唐杰, 潘春晓, 葛金芳, 陈飞虎

摘要 目的 通过构建真核表达 pEGFP-C2-ASIC2a 质粒 转染大鼠关节软骨细胞, 建立 ASIC2a 在关节软骨细胞中过表达的模型, 观察 ASIC2a mRNA 及其蛋白在细胞中的表达。方法 从大鼠脑组织中提取目的基因 ASIC2a, 并用 EcoR I 和 Kpn I 进行双酶切, 同时用这两种酶双酶切质粒 pEGFP-C2, 将其酶切产物按常规方法连接并转化入大肠杆菌 DH5a, 挑单克隆菌进行培养, 提取质粒, 再通过双酶切鉴定及测序后, 用 Lipofectamine 2000 将所构建质粒转染入关节软骨细胞, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 使用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 ASIC2a mRNA 和蛋白表达, 以鉴定模型建立成功与否。结果 进行双酶切鉴定目的条带清晰准确, 转染后可在荧光显微镜下观察到绿色荧光表达, 通过 RT-PCR 可发现 mRNA 转录, Western blot 法可发现目的蛋白表达。结论 成功构建重组 pEGFP-C2-ASIC2a 表达载体, 将用于进一步观察 ASICs 对软骨细胞的影响。
关键词 ASIC2a; pEGFP-C2; 软骨细胞; 基因表达; 蛋白表达

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0304-05

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于系统性自身性免疫性疾病,是一种以慢性、多关节炎滑膜炎、关节外病变为主要表现的病因不明的全身性临床疾病。在 RA 发展过程中,软骨与骨组织的破坏是导致关节畸形和功能障碍的重要因素。研究^[1]表明,炎性滑液的低 pH 值及其引发的软骨细胞过度凋亡是导致软骨基质无法修复和再生的重要原因,纠正低 pH 环境导致的病理损伤成为 RA 防治的靶点之一。有研究^[2-4]表明,酸敏感离子通道(acid sensing ion channels, ASICs)对细胞外酸化环境敏感,受 H⁺ 门控(ASIC4 除外),激活的 ASICs 导致胞外 Na⁺、Ca²⁺ 内流并激发各种病理效应,在炎症、肿瘤、癫痫等以组织酸化为主要病理特征的疾病中发挥重要作用。关于 ASIC2a 在 RA 中的作用尚不明确,该研究通过构建真核表达 pEGFP-C2-ASIC2a 质粒,通过 Lipofectamine 2000 转入大鼠关节软骨细胞内,建立 ASIC2a 过表达模型,以期为进一步阐明 ASICs 在 RA 中的作用提供实验依据。

2013-08-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271949)

作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:倪文琳,女,硕士研究生;

陈飞虎,男,博士生导师,责任作者,E-mail: aydcfh@163.

com

chymal stem cells (MSCs) in microenvironment of rat myocardial ischemia *in vivo*. **Methods** The myocardial infarction(MI) models of rats were established by ligating the left anterior descending coronary artery. The MSCs labeled by green fluorescent protein(GFP) were injected into the surrounding area of the epicardium myocardial infarction ($n = 62$); the protein expression of the main myocardial specific markers (cTnI, MYH, Cx43, α -actin) on the transplanted MSCs was observed by immunofluorescence staining at day 3, day 5, day 7 and day 9; the corresponding mRNA related to the non-transplanted MSCs was acquired by laser capture microdissection and was measured by real-time PCR. Then, the transplanted area was observed by TUNEL staining. **Results** Immunofluorescence staining and real-time PCR indicated MYH were detected at day 3, significantly lower than day 5 and day 7; Cx43 were indicated at day 3, and at day 7 higher than day 5; cTnI was found at day 5, decreased compared to day 7 significantly ($P < 0.05$); while α -actin was not found; the transplanted MSCs which shared morphological features known from apoptotic cells by TUNEL staining decreased gradually and disappeared at day 9. **Conclusion**

The transplanted MSCs could express some main myocardial specific markers in the microenvironment of myocardial infarction, but the differentiated cardiomyocytes were immature, and could not survive for a long time effectively.

Key words myocardial infarction; mesenchymal stem cell; transplantation; myocardial specific markers; MYH; Cx43; cTnI; α -actin