

间充质干细胞向心肌细胞分化的诱导研究

董 亮 薛 松

【摘要】 间充质干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞,能在多种诱导条件下形成心肌细胞。化学因素:化学小分子可以通过改变间充质干细胞 DNA 甲基化和组蛋白修饰(乙酰化、甲基化和磷酸化等)等表观遗传特性;物理因素:电磁场和力学因素可以诱导间充质干细胞;生物因素:生长因子、激素等对心肌细胞的发育起着重要作用等这些诱导条件,在体外环境下成功诱导间充质干细胞分化为心肌细胞。该文阐述不同的诱导条件对间充质干细胞向心肌细胞分化的影响和相关机制。

【关键词】 间充质干细胞;诱导;心肌细胞;分化

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.010

由于心肌细胞的不可再生性,干细胞移植成为治疗心肌梗死的有效手段。间充质干细胞易于体外培养和扩增,取材容易,具有免疫调节作用,避免免疫排斥反应,没有伦理学争议。间充质干细胞经不同诱导方法向心肌细胞分化的研究取得了一定的成果。本文就体外诱导间充质干细胞向心肌细胞分化的不同方法和相应机制做一综述。

1 化学诱导

小分子化合物可以通过改变间充质干细胞 DNA 甲基化和组蛋白修饰(乙酰化、甲基化和磷酸化等)等表观遗传特性,诱导干细胞向心肌细胞分化。

1.1 5-氮杂胞苷

Makino 等于 1999 年用 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-氮杂胞苷在体外成功诱导小鼠克隆化培养的间充质干细胞向心肌细胞分化。此后该方法成为诱导间充质干细胞向心肌分化较理想的途径,而且是衡量其他诱导条件有效性的标准。5-氮杂胞苷是一种 DNA 去甲基化药物,其诱导分化的机制推测可能是作用于与分化有关的基因如 OCT4、SOX2、NANOG、LIN28 等,使其发生去甲基化或者甲基化程度减少而使干细胞向心肌细胞分化。但 Burlacu 等^[1]证实,未用 5-氮杂胞苷诱导的间充质干细胞也表达心肌细胞特异性蛋白和相关基因,间接证明了 5-氮杂胞苷不是引发而只是促进干细胞向心肌的分化。

1.2 乙酰化抑制剂

间充质干细胞分化为心肌细胞过程中,存在组蛋白乙酰化和去乙酰化平衡导致的染色质重塑作用。推测组蛋白乙酰化作用通过维持一种有效的通道,保持其转录活性,促进间充质干细胞向心肌细胞的分化。组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以通过抑制去乙酰化酶的活性,促进组蛋白的乙酰化发挥作用。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂包括丙戊酸(VPA)、曲古抑菌素(TSA)、辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)等。很多研究采用组蛋白去乙酰化酶抑制剂作用于间充质干细胞,诱导向心肌细胞分化,均取得了较好的效果,证实 SAHA 和 TSA 能够促进间充质干细胞分化^[2, 3]。

1.3 其他化学小分子

Song 等^[4]研究发现,促肿瘤剂佛波醇酯(PMA)是一个新的诱导剂,结构与二酰基甘油(DG)相似,可以活化蛋白激酶 C(PKC)。用于诱导大鼠间充质干细胞后能检测到心肌细胞标志物的增加,更重要的是能够较为显著地提高间充质干细胞移植后的存活率,避免移植细胞和心肌细胞异源性导致的移植细胞大量凋亡。但是 PMA 作用的具体机制还不明确。作为一种有效的诱导剂,需要进一步研究其最适作用条件和作用机制。

2 物理方法

心脏通过电传导不停在搏动,所以心肌细胞和组织始终处于电磁场和力学的环境中。因而这些环境自始至终影响着心肌细胞的增殖和生长。研究证实电磁场和力学因素可以诱导间充质干细胞向心肌细胞分化。

2.1 力学因素

应用拉力测试系统施加 1HZ 的 4% 和 8% 的基底拉伸力作用于人骨髓间充质干细胞,发现细胞表达 Cx43、骨形成蛋白(BMP)2 等心肌早期基因,表明力学荷载在诱导方面的作用。Ge 等^[5]用这一方法作用于大鼠的骨髓间充质干细胞,也能检测到心肌细胞相关基因和蛋白的表达。Chang 等^[6]模拟心脏环境,应用振荡压力作用于间充质干细胞,虽然不能单独作用引发分化,但是可以通过与其他因素联合,增强其诱导作用。Huang 等^[7]通过建模,利用流体的剪切力作用于大鼠的间充质干细胞,之后能够检测到心肌细胞在基因和蛋白水平上相关标志物。并且通过控制流体剪切力的大小,做了相关对比实验,得出流体剪切力在 10 dyne/cm² 时,其诱导分化效果最明显。丰富了力学负荷的作用方式。表明力学负荷在诱导干细胞分化为心肌细胞中的有效性,虽然作用的具体机制还没有阐明,但依然可以研究更多的力学负荷方式,从而找出最合适,最有效的力学诱导方式。

2.2 电磁场作用

电磁场对干细胞诱导作用的研究很少,对间充质干细胞向心肌细胞分化的诱导实验更是没有。但是早在 1999 年, Sauer 等^[8]研究了电磁场对胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞的作用,发现可以形成搏动细胞。近年, Serena 等^[9]延续了 Sauer 等的实验,用电磁场作用人胚胎干细胞,不仅可以形成搏动细胞,而且可以检测到肌钙蛋白 T、肌节结构等心肌细胞典型特点。由此推测电磁场可以诱导间充质干细胞向心肌细胞分化,以后可以开展相应的实验。

3 生物因素对间充质干细胞向心肌细胞分化的影响

各种生物因素包括生长因子、激素等对心肌细胞的发育起着重要作用,体外研究也发现生物因素能够诱导间充质干细胞向心肌细胞分化。

3.1 生长因子

BMP 是转化生长因子(TGF)家族一员。BMP-2、成纤维细胞生长因子(FGF)和胰岛素样生长因子(IGF)在心脏的发育中起重要作用。研究表明,联合应用 FGF-1, IGF-1 和 BMP2 能够诱导间充质干细胞形成心肌样细胞^[10]。有实验应用梗死心肌提取液作用于间充质干细胞也能成功诱导,经检测可以发现提取液中 BMP-2, TGF- β 1 明显高于正常心

肌组织。可以证明生长因子在诱导中的重要作用^[11]。

Singla 等^[12]总结了多种因子对胚胎干细胞的作用,研究证明心肌发生相关因子如 TGF- β 1、BMP、Wnt 家族蛋白(Wnt families)、FGF 以及全反式维甲酸(RA)、维生素 C、二甲基亚砷(DMSO)和垂体后叶素等均可以诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞。鉴于间充质干细胞在治疗心肌梗死方面的诸多优势,有必要在以后的实验中研究这些因子对间充质干细胞分化的作用。

3.2 梗死心肌组织提取物

很多实验研究证实梗死心肌组织中存在多种细胞因子、趋化因子和生长因子^[13]。通过梗死心肌组织匀浆,过滤后得到的提取物作用于间充质干细胞,能够检测到心肌细胞特异性标志物^[5, 11]。检测梗死心肌组织提取物的成分显示 TGF- β 1 明显增高,表明 TGF- β 1 通路在诱导分化中起着重要作用。这对移植到梗死心肌组织的间充质干细胞向心肌细胞的分化具有重要意义。但是, Chang 等^[11]证实单独应用 TGF- β 1 效果不好,这表明梗死心肌组织提取物中其他因子的作用需要进一步验证。

3.3 细胞共培养

心肌细胞形成的微环境对间充质干细胞向心肌细胞分化起有重要影响。相关实验证明,间充质干细胞与心肌细胞直接接触培养后间充质干细胞能检测到心肌细胞相关标志物^[14],但是没有与心肌细胞直接接触,即利用侵袭实验(transwell),间充质干细胞与心肌细胞只通过细胞因子互相影响或者用培养过心肌细胞的条件培养基培养间充质干细胞,则几乎检测不到心肌细胞相关标志物^[15]。但是, Li 等^[16]利用侵袭实验培养间充质干细胞和心肌细胞,之后能够观察到间充质干细胞有规律的收缩,并且利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组化、电镜、电生理、均能发现心肌细胞的特征。针对上述争论,仍需要更多对照实验加以论证。He 等^[17]在前面的基础上进一步发现,随着心肌细胞数量的增加,与其共培养的间充质干细胞向心肌细胞分化率增加。

4 其他因素

4.1 中药的作用

近年来,中药在防治心血管病的作用日渐突出,很多人也开始研究中药在诱导间充质干细胞向心肌细胞分化的作用。利用各种中药成分或者中

成药,包括黄芪甲苷、双龙方、丹参滴丸等。制成含药血清或者无血清含药培养液进行诱导,均能检测到心肌细胞特异性标志物,表明能诱导为心肌样细胞,但是诱导阳性率普遍不高,较其他诱导方式优势不明显^[18-20]。

4.2 组织工程聚合物微结构

应用间充质干细胞治疗心肌梗死,一般是直接把分化或者未分化的干细胞注入梗死部位。但是因为局部炎症等原因导致干细胞存活率和分化率很低。近年来,很多实验应用组织工程的方式,将心肌细胞、生物材料或者应用小肠黏膜下层整合形成 3D 微环境,模拟心脏微环境,然后将间充质干细胞植入其中,这样不仅能增加间充质干细胞移植后的成活率,而且在移植入心脏前能直接促进干细胞的分化^[21, 22]。

5 问题与展望

人们利用化学因素、物理因素、生物因素等多方面因素诱导间充质干细胞,取得一定成果。但是也存在诸多不足。(1)间充质干细胞的分离、纯化、鉴定没有形成统一规范。不同实验室提取干细胞的方案、条件不尽相同,导致后期的诱导效果参差不齐;(2)干细胞能否诱导分化为心肌细胞仍存在质疑。很多实验用上述诱导方法没有诱导分化为有效的心肌样细胞。Xu 等^[23]用 10 mM 5-氮杂胞苷作用于间充质干细胞两周后没有发现典型的肌节结构。Mastitskaya 等^[24]分别应用 5-氮杂胞苷、TSA 不同的因子与心肌细胞共培养,均没有产生有功能活性的心肌细胞,虽然间充质干细胞经诱导后能够使心肌细胞相关基因激活,也存在某些相关标志物的升高,但是没有产生典型的心肌细胞特征,如收缩、偶联等,也没有形成典型的缝隙连接;(3)间充质干细胞向心肌分化的具体机制还未阐明。初步阐明:在心肌分化过程中,有几条信号通路参与其中,研究较广泛的是 Wnt 信号通路,已被阐明在心脏的发生中起到关键作用^[25]。BMP 通路、FGF 通路、Ntoch 通路、Smads 通路也参与了心肌的发育。同时与分化有关的基因如 OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、MEF-2C 等与干细胞向心肌分化相关,是其重要的启动基因。改变相关基因的表现遗传特性(如乙酰化、甲基化和磷酸化等),可诱导干细胞向心肌细胞分化。但是具体哪个信号通路,哪个分化基因起关键作用仍未明确,各信号通路如何相互作用也未明确。这些都需要后续的实验来阐明。

随着对间充质干细胞的研究深化,完善间充质干细胞分选,纯化方案,阐明诱导分化的作用机制,找到最合适的诱导条件。相信间充质干细胞在临床上的应用前景会更加广阔。

参 考 文 献

- [1] Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, et al. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Eur J Cell Biol*, 2008,87(3):173-184.
- [2] Snykers S, Vanhaecke T, De Becker A, et al. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow[J]. *BMC Dev Biol*, 2007,7:24.
- [3] Feng C, Zhu J, Zhao L, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. *Exp Cell Res*, 2009,315(17):3044-3051.
- [4] Song H, Hwang HJ, Chang W, et al. Cardiomyocytes from phorbol myristate acetate-activated mesenchymal stem cells restore electromechanical function in infarcted rat hearts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(1):296-301.
- [5] Ge D, Liu X, Li L, et al. Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,381(3):317-321.
- [6] Chang SA, Lee EJ, Kang HJ, et al. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2008,26(7):1901-1912.
- [7] Huang Y, Jia X, Bai K, et al. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Arch Med Res*, 2010,41(7):497-505.
- [8] Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, et al. Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells [J]. *J Cell Biochem*, 1999,75(4):710-723.
- [9] Serena E, Figallo E, Tandon N, et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species [J]. *Exp Cell Res*, 2009,315(20):3611-3619.
- [10] Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, et al. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008,51(9):933-943.
- [11] Chang SA, Lee EJ, Kang HJ, et al. Impact of myocardial infarct proteins and oscillating pressure on the differentiation of mesenchymal stem cells: effect of acute myocardial infarction on stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2008,26(7):1901-1912.
- [12] Singla DK, Sobel BE. Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a

- promising foundation for cardiac regeneration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,335(3):637-642.
- [13] Hill JM, Bartunek J. The end of granulocyte colony-stimulating factor in acute myocardial infarction? Reaping the benefits beyond cytokine mobilization [J]. *Circulation*, 2006, 113(16):1926-1928.
- [14] Valarmathi MT, Fuseler JW, Goodwin RL, et al. The mechanical coupling of adult marrow stromal stem cells during cardiac regeneration assessed in a 2-D co-culture model [J]. *Biomaterials*, 2011,32(11):2834-2850.
- [15] Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, et al. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003,125(6):1470-1480.
- [16] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2):295-303.
- [17] He XQ, Chen MS, Li SH, et al. Co-culture with cardiomyocytes enhanced the myogenic conversion of mesenchymal stromal cells in a dose-dependent manner [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010,339(1-2):89-98.
- [18] Fan X, Li X, Lv S, et al. Comparative proteomics research on rat MSCs differentiation induced by Shuanglong Formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010,131(3):575-580.
- [19] 武重阳, 孙兰军, 赵英强, 等. 复方丹参滴丸含药血清诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. *中国老年学杂志*, 2010,30(16):2328-2330.
- [20] 洗绍祥, 杨忠奇, 汪朝晖, 等. 黄芪甲苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2007,24(1):37-40.
- [21] Valarmathi MT, Goodwin RL, Fuseler JW, et al. A 3-D cardiac muscle construct for exploring adult marrow stem cell based myocardial regeneration [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(12):3185-3200.
- [22] Tan MY, Zhi W, Wei RQ, et al. Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(19):3234-3240.
- [23] Xu W, Zhang X, Qian H, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004,229(7):623-631.
- [24] Mastitskaya S, Denecke B. Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes in vitro [J]. *J Negat Results Biomed*, 2009,8:11.
- [25] Cohen ED, Tian Y, Morrissey EE. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal [J]. *Development*, 2008, 135(5): 789-798.

(收稿:2011-04-24 修回:2011-10-25)

(本文编辑:金谷英)

• 文摘 •

再灌注时间对 STEMI 患者室性心律失常的影响 [英] / Saurabh Kumar... // *Heart Rhythm*. —2011,8(4). —493~499

对 ST 段抬高型心肌梗死 (STEMI) 患者早期再灌注治疗可增加心肌细胞存活数目, 减少梗死面积, 保持心室功能, 降低全因死亡率, 减少梗死后心电不稳定。因室性心动过速 (VT) 所致心脏性猝死占心肌梗死后死亡的 50%, 及时再灌注是否可降低室性心律失常的发生尚不明确。在心脏电生理研究中, 诱发的 VT 可预测心室功能受损心肌梗死患者晚期自发性室性心律失常。该文研究再灌注时间对 STEMI 患者早期 VT 及晚期自发性室性心律失常的影响。

STEMI 患者梗死相关动脉完全血运重建后, 实施指南推荐的治疗方案并于第 3 天检测左室射血分数 (LVEF)。对 LVEF ≤ 40% 者行电生理检查。入选 128 例患者符合: (1) 既往无冠状动脉疾病及心肌病病史。(2) 心肌梗死后经介入治疗已获得血运重建, TIMI 血流 III 级。(3) 梗死后 LVEF ≤ 40%。根据再灌注时间分为: 早期组 (≤ 3 h), 中期组 (3~5 h), 晚期组 (> 5 h)。电生理检查方法如下: 右室心尖部 S1S2400/300 ms 反扫, 以 10 ms 步长递减至心室不应

期。如早搏刺激不能诱发 VT, 则加发 S3/S4 早搏刺激, 直至诱发 VT、室颤 (VF) 或达第 4 个早搏的不应期。刺激终点是单形性 VT 持续时间 > 10 s。如果持续单形性 VT 由 ≤ 4 个早搏刺激诱发且周长 ≥ 200 ms, 为阳性。应用 SPSS15.0 对数据进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

患者平均年龄 (57 ± 11) 岁, 82% 为男性, 85% 为前壁梗死。3 组 LVEF 及肌酸激酶峰值均无统计学差异。早期组、中期组、晚期组 VT 的诱发率分别为 11.5%、17.8%、36.8%。2 年内自发性室性心律失常在 3 组的发生率分别为 0、8.9%、14% ($P = 0.025$)。经多变量分析, 晚期再灌注可增加诱发性 VT 6 倍 ($P = 0.01$), 是自发性 VF 最佳的预测指标 ($OR = 4.31, P = 0.001$)。如果将诱发性 VT 从多变量模式中排除, 晚期再灌注可增加 3 倍自发性 VF 风险 ($P = 0.035$)。再灌注时间确实影响 STEMI 患者 PCI 术后早期及晚期室性心律失常的发生, 缩短再灌注时间可获益。

(050000 河北医科大学第二医院心内科

张小坤摘 刘 凡校)