

[文章编号] 1007-3949(2008)16-01-0013-04

•实验研究•

小鼠骨髓间充质干细胞体外诱导向平滑肌样细胞分化过程中 myocardin 的表达

孟 寒^{1,2}, 阮秋蓉¹, 瞿智玲¹, 黄 冠¹, 余 俊¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院病理研究所, 湖北省武汉市 430030;

2. 湖北省襄樊市中心医院病理科, 湖北省襄樊市 441000)

[关键词] 病理学; 骨髓间充质干细胞; 平滑肌样细胞; 血小板源性生长因子 BB; 胎牛血清; 分化; myocardin

[摘 要] 目的 探讨血小板源性生长因子 BB 联合高浓度胎牛血清体外诱导骨髓间充质干细胞定向分化为平滑肌细胞的可行性及 myocardin 在此过程中的表达变化。方法 采用全骨髓贴壁法分离骨髓间充质干细胞, 血小板源性生长因子 BB (50 μg/L) 联合高浓度胎牛血清诱导骨髓间充质干细胞, 分别于诱导前, 及诱导 4 d 和 8 d 后用免疫细胞化学法检测细胞平滑肌肌动蛋白、平滑肌肌球蛋白重链和 myocardin 的表达。结果免疫组织化学显示, 诱导前及诱导 4 d 和 8 d 时, 平滑肌肌动蛋白、平滑肌肌球蛋白重链和 myocardin 三种蛋白的表达逐渐增强, 平均灰度值逐渐降低, 不同时间点之间比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 血小板源性生长因子 BB 联合高浓度胎牛血清可有效诱导骨髓间充质干细胞向平滑肌样细胞分化。Myocardin 在此分化过程中可能起了重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Expression of Myocardin in Differentiation of Mouse Bone Mesenchymal Stem Cell into Smooth Muscle-Like Cells in Vitro

MENG Han^{1,2}, RUAN Qiu Rong¹, QU Zhi Ling¹, HUANG Guan¹, YU Jun¹

(1. Institute of Pathology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Department of Pathology, Xiangfan Central Hospital, Xiangfan Hubei 441000)

[KEY WORDS] Bone Mesenchymal Stem Cell; Smooth Muscle Like Cell; Platelet Derived Growth Factor BB; Fetal Bovine Serum; Differentiation; Myocardin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the feasibility of differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) into smooth muscle cell (SMC) in vitro under platelet-derived growth factor-BB (50 μg/L) and high concentrations of fetal bovine serum (FBS) (20%), and the positive effect of myocardin on BMSC differentiating into SMC. **Methods** Mouse BMSCs were isolated and purified from bone marrow, then 50 μg/L PDGF-BB and FBS (20%) were added to the BMSCs. And the cells were cultured for 4 and 8 days respectively. Immunohistochemistry assay and image analysis were used to value the expression extent of α-smooth muscle actin (α-SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) and myocardin. **Results** Intensities of the three protein immunostaining significantly increased after 4 and 8 days. And Test of One-way ANOVA showed that there was statistically significance in different times ($P < 0.05$). **Conclusions** BMSC could be induced to differentiate into smooth muscle-like (SM-like) cells through adding PDGF-BB (50 μg/L) and FBS (20%) with BMSC in vitro. Myocardin may play an important role in this process.

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖并合成细胞外基质是动脉粥样硬化(Artherosclerosis, As)发生发展中的重要环节。目前已有研究证明 As 斑块中的 SMC 的重要来源之一是骨髓细胞^[1,2]。骨髓中的间充质干细胞取材容易, 体外扩增能力强, 且具

有多向分化潜能, 在体外特定条件下能向成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和平滑肌细胞等分化^[3-5]。已有研究发现骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)能向血管损伤处迁移, 参与损伤的修复^[6], 因此 BMSC 可能是 As 斑块中 SMC 的来源之一。本实验拟用血小板源性生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 联合高浓度胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)诱导 BMSC 向 SMC 分化, 并观察其在体外分化过程中 myocardin 的表达。

Myocardin 是迄今所发现的最关键的促 SMC 分化的因子, 能有效激活 SMC 的分化程序^[7,8]。因此

[收稿日期] 2007-09-19 [修回日期] 2007-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30570725)

[作者简介] 孟寒, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, 联系电话为 027-83655542, E-mail 为 menghan1979@yahoo.com.cn。
通讯作者阮秋蓉, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化研究, 联系电话为 027-83692619, E-mail 为 Ruanqiuorong@sina.com。瞿智玲, 主管技师, 主要从事动脉粥样硬化研究, 联系电话为 027-83650551, E-mail 为 QWF9527@hotmail.com。

作者推断 BMSC 向 SMC 分化过程中应该有 myocardin 表达的变化。本实验旨在探讨 PDGF-BB 联合高浓度血清能否诱导 MSC 向 SMC 分化及这一过程中 myocardin 的表达情况,为后继的实验研究中证明通过干扰 myocardin 的合成能够有效阻止 BMSC 向 SMC 分化提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

昆明小鼠(华中科技大学同济医学院动物实验中心);L-DMEM(Gibco,美国);优等胎牛血清(FBS)(Gibco,美国);小鼠 PDGF-BB(Biovision,美国); α -SMA 单抗(博士德);平滑肌肌球蛋白(SM myosin)重链单抗(Santa Cruz Bio 美国);myocardin 多抗(Santa Cruz Bio 美国);二抗试剂盒(北京中杉)。

1.2 骨髓间充质干细胞的分离和培养

采用全骨髓贴壁法:取4周左右的昆明小鼠,雄性,颈椎脱臼处死,用75%酒精消毒后无菌条件下取出股骨,胫骨,将表面的肌肉剥离干净,剪去两端,用含10%FBS的L-DMEM培养液冲洗骨髓腔,将洗出的细胞接种于25 mL的培养瓶中,于饱和湿度、37℃、5%CO₂的条件下培养。48 h后换液去除未贴壁细胞。以后每3 d换液一次,80%融合时传代,利用BMSC易脱落的特点来将其与贴壁性较强的成纤维细胞,上皮样细胞等杂细胞分离,以后可每4~6 d传代一次。

1.3 骨髓间充质干细胞的诱导实验

将P2代细胞消化后接种在已放置灭菌盖玻片的24孔板内,加入诱导液(L-DMEM培养液+20%FBS+PDGF-BB 50 μ g/L),每3~4 d换液一次。

1.4 骨髓间充质干细胞分化后的检测

用丙酮:乙醇(1:1)的混合固定液分别将诱导前及诱导后不同时间(4 d和8 d)的细胞固定10 min。用免疫组织化学检测 α -SMA, SM-MHC, myocardin 的表达。阳性对照用小鼠平滑肌细胞及胸主动脉。

1.5 统计学处理

每1分组中随机选择视野记数100个以上的细胞,计算阳性细胞着色率。利用图象分析系统(HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统)检测阳性细胞的平均灰度值。实验数据采用SPSS 13.0统计软件处理,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,同一检测指标不同时间点的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 诱导前后细胞的形态学观察结果

未诱导的BMSC大多呈梭形,多边形或分支状,诱导4 d和8 d后细胞体积稍增大,仍以梭形细胞为主,但是8 d后的细胞密集处出现束状,漩涡状排列,与SMC相似。

2.2 平滑肌细胞特异性标志 α -SMA, SM-MHC的免疫组织化学结果

诱导前约98%细胞弱阳性表达 α -SMA,诱导4 d和8 d后细胞的着色逐渐增强(图1);而SM-MHC在诱导前呈阴性表达,4 d后约92%的细胞呈弱阳性表达,8 d后着色增强(图2)。图象及统计分析显示,未诱导组及诱导4 d、8 d组的平均灰度值逐步降低,且同一检测指标不同时间点之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$;表1)。

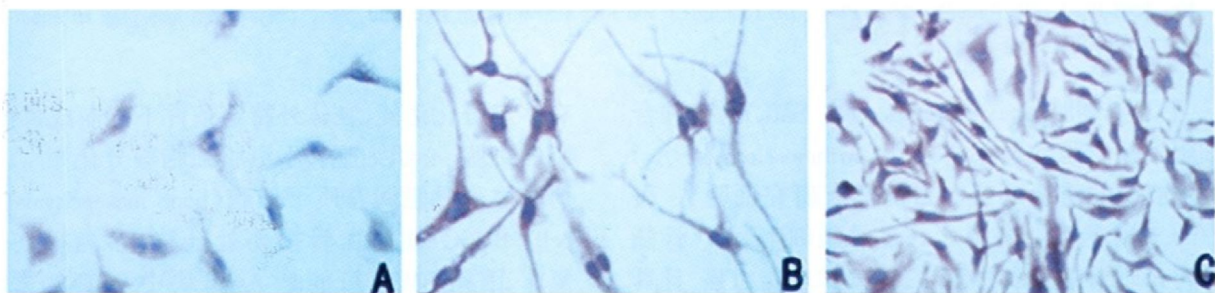


图1. 骨髓间充质干细胞诱导分化过程中 α -SMA的免疫组织化学结果($\times 400$) A为诱导前, B为诱导4 d, C为诱导8 d。

2.3 平滑肌细胞分化中的重要因子 myocardin 的免疫组织化学结果

诱导前71%的细胞胞浆染色呈淡黄色云雾状,

且胞核未见明显着色。诱导4 d、8 d后,95%的细胞的着色主要在胞核和核膜,均呈黄色颗粒状染色,胞浆也呈淡黄色,且着色随诱导时间的延长而增强(图

3)。图象及统计分析显示,未诱导组及诱导 4 d、8 d 组的平均灰度值逐步降低,且不同时间点之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 表 1)

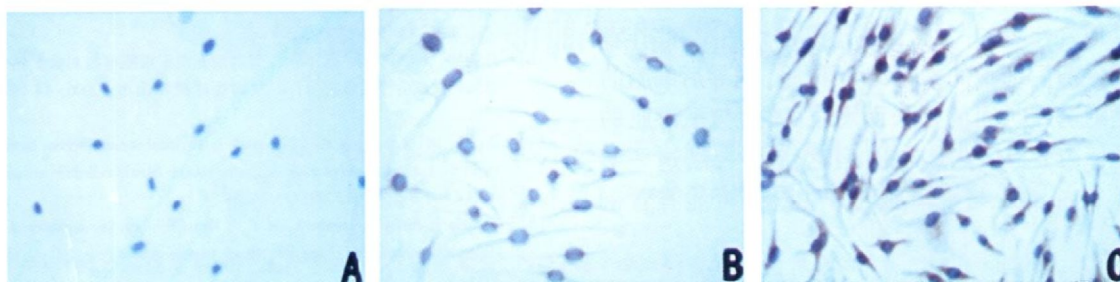


图 2. 骨髓间充质干细胞诱导分化过程中 SM-MHC 的免疫组织化学结果 ($\times 400$) A 为诱导前, B 为诱导 4 d, C 为诱导 8 d

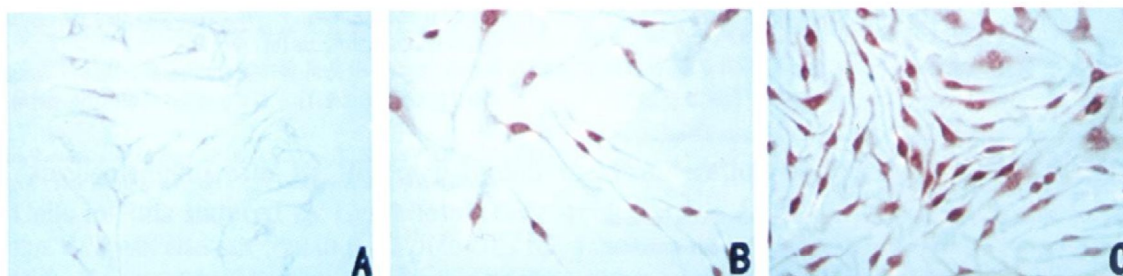


图 3. 骨髓间充质干细胞诱导分化过程中 myocardin 的免疫组织化学结果 ($\times 400$) A 为诱导前, B 为诱导 4 d, C 为诱导 8 d。

表 1. BMSC 分化过程中不同时间点表达三种蛋白的平均灰度值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

蛋白种类	0 d	4 d	8 d
α -SMA	181.52 \pm 2.78	164.25 \pm 7.51 ^a	146.62 \pm 7.38 ^{ab}
SM-MHC	-	189.87 \pm 1.37	173.00 \pm 9.84 ^b
myocardin	183.63 \pm 8.10	143.33 \pm 7.80 ^a	115.28 \pm 5.21 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 d 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 4 d 组比较。

3 讨论

干细胞分化外源性调控是多种细胞因子相互作用引起细胞一系列复杂的生理生化反应的过程。目前认为影响干细胞向 SMC 分化的因素有 PDGF-BB, 转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 空腹血糖 (fasting blood sugar, FBS), 凝血酶, 以及与内皮细胞, SMC 的接触等^[5,9,10]。本实验采用 PDGF-BB 联合高浓度 FBS 诱导 BMSC 向 SMC 分化。结果发现虽然从单个细胞形态上看, 诱导前后变化不明显, 均呈梭形, 多边形或分支状, 但是细胞体积略增加, 且诱导 8 d 后细胞较密集处出现束状, 漩涡状排列, 与 SMC 的排列结构相似。用免疫

细胞化学检测 SMC 的分化早期标志 α -SMA 和分化中晚期标志 SM-MHC 发现, 诱导前 BMSC 弱表达 α -SMA, 而 SM-MHC 为阴性表达。诱导 4 d、8 d 后 α -SMA 的表达逐渐增强, 而且 SM-MHC 在诱导后也出现表达, 并随时间的延长表达逐渐增强。有研究认为 BMSC 本就表达 α -SMA, 可视为 BMSC 的一个特异性标志物^[11,12]。并且做为一种经典的 SMC 标记物, α -SMA 在诱导后表达明显增强, 结合 SM-MHC 的表达结果证明 PDGF-BB 联合高浓度 FBS 能够有效诱导 BMSC 向平滑肌样细胞分化。

研究证明, myocardin 是一种强效的转录激活剂, 能够通过与血清反应因子 (serum response factor, SRF) 形成三元复合物而激活 CArG 框 [(CC(A/T)6GG)] 依赖的平滑肌启动子从而促进 SMC 的分化。用 myocardin 的表达质粒转染非平滑肌细胞后能特异激活 SMC 标志基因和蛋白的表达, 而用 myocardin 的显性失活突变体可阻断平滑肌的分化^[13]。因此 myocardin 被认为是调节 SMC 分化的最关键的因子之一。作为一种转录因子, myocardin 在核内起作用, 其染色定位应在胞核。本实验的 myocardin 检测结果显示, 诱导前大部分细胞胞浆染色呈淡黄色云

雾状,胞核未见明显着色,诱导后 myocardin 虽主要着色在胞核,但部分胞浆也有着色,并且阳性对照的小鼠主动脉免疫组织化学结果也是如此。作者考虑可能是 myocardin 存在一些剪接变异体,在胞浆中可能有其他合作者,并发挥不为所知的作用,因此作者认为诱导前后细胞的染色均为阳性。诱导后细胞的着色是随诱导时间的延长而增强的,这与平滑肌的特异性标志 α -SMA, SM-MHC 表达趋势一致,这一结果提示 myocardin 与平滑肌的分化过程可能有着密切联系。

本研究拟进一步用 RNA 干扰技术阻抑 myocardin 的基因表达,观察其对 BMSC 向 SMC 分化及对 As 斑块形成是否有抑制作用,从而对 BMSC 参与 As 斑块形成及其分子机制进行探讨,为阐明 As 发病机制提供实验依据,也为 As 的防治提供新思路。

[参考文献]

- [1] Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (4): 403-409.
- [2] Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (8): 4 754-759.
- [3] Jiang YH, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, **418** (6 893): 41-49.
- [4] 徐瑾,王彬尧,何奔,等.骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死后心功能衰竭的远期疗效[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(7):585-589.
- [5] Heger B, Weber M, Dragun D, et al. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Hypertens*, 2005, **23** (6): 1 191-202.
- [6] 孙晓楠,刘国树,石蕊,等.骨髓间充质干细胞移植对大鼠钙化主动脉结构及顺应性的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(9):771-774.
- [7] Du KL, Ip HS, Li J, et al. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23** (7): 2 425-437.
- [8] Yoshida T, Sinha S, Dandre F, et al. Myocardin is a key regulator of CARG-Dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes [J]. *Circ Res*, 2003, **92** (8): 856-864.
- [9] Simpe D, Stalboerger PG, Panetta C J, et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1 199-204.
- [10] Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (4): 714-727.
- [11] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 2001, **226** (6): 507-520.
- [12] 李红华,刘厚奇,刘太华,等.人胚胎间充质干细胞向平滑肌细胞定向分化标志蛋白的选择[J].第二军医大学学报,2004,25(8):822-826.
- [13] Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, et al. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (12): 7 129-134.

(此文编辑 李小玲)

•读者•作者•编者•

我刊报道的疾病和诊治方法

- | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 肥胖症 | 9.4 动脉硬化性闭塞症 | 15 脑动脉硬化症 |
| 2 小儿肥胖病 | 9.5 动脉硬化性周围动脉缺血 | 16 动脉硬化性精神病 |
| 3 原发性高脂蛋白血症 | 10 高血压病 | 17 其他缺血性脑血管疾病 |
| 4 高脂血症 | 11 周围血管疾病 | 18 粥样栓塞性肾病 |
| 5 原发性肺动脉高压症 | 11.1 血栓闭塞性脉管炎 | 19 肾动脉血栓形成或栓塞 |
| 6 早老症 | 11.2 雷诺综合征 | 20 糖尿病合并心血管疾病 |
| 6.1 弥散性动脉粥样硬化 | 11.3 手足紫绀症 | 20.1 糖尿病并发冠心病 |
| 6.2 冠状动脉栓塞 | 11.4 急性动脉栓塞 | 20.2 糖尿病性心肌梗死 |
| 7 冠状动脉粥样硬化性心脏病 | 11.5 肢端动脉痉挛病 | 20.3 糖尿病并发血管病变 |
| 7.1 原发性心跳骤停 | 12 伯格氏病 | 21 代谢综合征 |
| 7.2 心绞痛 | 13 短暂性脑缺血发作 | 22 血管疾病的影像学诊断 |
| 7.3 心肌梗死 | 13.1 黑矇 | 23 血管疾病的手术疗法 |
| 7.4 冠状动脉性心力衰竭 | 13.2 视野异常 | 23.1 动脉旁路移植术 |
| 7.5 缺血性心律失常 | 14 脑梗死 | 23.2 动脉内膜切除术 |
| 8 急性冠状动脉综合征 | 14.1 脑血栓形成 | 23.3 激光心肌内血管重建术 |
| 9 动脉硬化症 | 14.2 脑血管栓塞 | 23.4 经皮腔内血管成形术 |
| 9.1 颈动脉硬化症 | 14.3 腔隙性脑梗死 | 23.5 其它血管手术 |
| 9.2 肾动脉硬化 | 14.4 多发梗死性痴呆 | 24 血管疾病的基因疗法 |
| 9.3 动脉硬化性主动脉瘤 | | |

(胡必利编写)