

全反式维甲酸联合Ⅳ型胶原促进胚胎干细胞向平滑肌细胞分化

邵晓平¹, 彭程飞³, 田孝祥³, 闫承慧³, 韩雅玲³, 张红明², 刘大男¹

(1. 贵州医科大学附属医院心内科, 贵州省贵阳市 550000; 2. 济南军区总医院心内科, 山东省济南市 250000; 3. 沈阳军区总医院心内科, 辽宁省沈阳市 110016)

[关键词] 胚胎干细胞; 全反式维甲酸; Ⅳ型胶原; SM- α actin; SM-MHC

[摘要] **目的** 探讨全反式维甲酸(atRA)联合Ⅳ型胶原(collagen Ⅳ)能否更好的促进小鼠胚胎干细胞(mESC)向平滑肌细胞分化。**方法** 体外培养 mESC, 通过碱性磷酸酶染色、SSEA1 染色和在体成瘤实验检测 mESC 全能性。制作胚胎小体(EB)并悬浮 3 天后分别分为: 无诱导(对照组)、atRA 诱导组、Ⅳ型胶原诱导组、atRA 联合Ⅳ型胶原诱导组, 使其贴壁分化。通过平滑肌细胞抗体(SM- α actin)的 Western blot 检测及 SM- α actin 与平滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)免疫荧光双染结果观察比较不同组别的细胞分化为平滑肌细胞的情况并进行比较。**结果** 经 mESC 全能性鉴定, 提示小鼠胚胎干细胞的培养成功。发现在第 7 天及第 14 天 atRA 联合Ⅳ型胶原诱导组细胞 SM- α actin 蛋白表达量均明显高于其他 3 组, 同时观察第 14 天的 SM- α actin 与 SM-MHC 双荧光染色, 发现 atRA 联合Ⅳ型胶原诱导组的 SM- α actin 与 SM-MHC 表达量也是最高, 表明细胞的分化成熟度是最好的, atRA 诱导组和Ⅳ型胶原诱导组次之, 对照组最差。**结论** 全反式维甲酸联合Ⅳ型胶原能够更好的促进胚胎干细胞向平滑肌细胞分化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

All-trans Retinoic Acid Combined with Collagen Type Ⅳ Promoted Embryonic Stem Cells to the Differentiation of Smooth Muscle Cell

SHAO Xiao-Ping¹, PENG Cheng-Fei³, TIAN Xiao-Xiang³, YAN Cheng-Hui³, HAN Ya-Ling³, ZHANG Hong-Ming², and LIU Da-Nan¹

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of Jinan Military Region of PLA, Jinan, Shandong 250000, China; 3. Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang, Liaoning 110016, China)

[KEY WORDS] MESC; AtRA; Collagen Type Ⅳ; SM- α Actin; SM-MHC

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether all-trans retinoic acid (atRA) combined with collagen Ⅳ can promote mouse embryonic stem cells(mESC)to differentiate into smooth muscle cell. **Methods** The totipotency and chromosome of ES cells were examined by ALP staining, SSEA-1 staining, and in-vivo teratoma formation test. After forming EBs by suspending in EB media for 3 days, EBs were divided into four induced groups: none induction (Control group); atRA group; collagen Ⅳ group; atRA + collagenⅣgroup. They were differentiated for 7 d and 14 d. Then, they were harvested at 7 d and 14 d to analysis by Western blot and immunostaining. **Results** ①The successful culture of the ESCs was identified by the totipotent function. ②Compared with the other three groups, the expression of SM- α actin in group atRA + collagenⅣ significantly increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the proportion of SM- α actin⁺/SM-MHC⁺ cells in group atRA + collagen Ⅳ was higher than the other three groups. **Conclusion** atRA combined with collagen Ⅳ

[收稿日期] 2015-06-04

[修回日期] 2015-09-15

[基金项目] 贵州省高层次创新型人才培养计划项目(黔科合人才 2015 4026); 贵州省社会发展攻关项目(黔科合 SY 20133017); 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(黔科合人字 201126); 贵州省对外合作项目(黔科合省 20117001)

[作者简介] 邵晓平, 硕士研究生, 主要从事平滑肌细胞分化机制及组织工程血管方面的研究, E-mail 为 shao_xiaoping@126.com。张红明, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的治疗与机制研究, E-mail 为 13295416075@163.com。通讯作者刘大男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail 为 liudanan2000@sina.com。

could do better in inducing the differentiation of mouse embryonic stem cells to smooth muscle cell than both alone.

动脉粥样硬化、高血压等疾病的发生发展过程中伴随着血管发生的病理生理过程^[1]。而平滑肌细胞作为血管的重要组成部分尤其是具有分化成熟表型的平滑肌细胞,在这一病理生理过程更是扮演着重要的角色^[2]。而鉴于平滑肌细胞培养很难维持其稳定性^[3],因此寻找一个新的路径来提供大量的平滑肌细胞构建组织工程血管是目前心血管界研究的热点。近十年来,胚胎干细胞由于其无限的自我更新和分化能力,被认为是用于工程血管重构的理想细胞来源。本研究选择小鼠胚胎干细胞,联合应用全反式维甲酸和Ⅳ型胶原诱导其分化为平滑肌细胞,拟探究其联合诱导效率以期将来组织工程血管构建提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胎牛血清及初生牛血清由美国 GIBCOBRL 公司提供;MEM 培养基由 Hyclone 公司提供;胰蛋白酶、抗 SM- α actin、SM-MHC 抗体、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、丙酮酸钠、Ⅳ型胶原、多聚甲醛由 Sigma 公司提供,青霉素、链霉素、白血病抑制因子 LIF 由 Chemicon 公司提供。

1.2 小鼠胚胎干细胞的培养

滋养层细胞 STO(小鼠成纤维细胞株,ATCC, CRL 15031M)培养液成分包括:MEM、10%新生牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素。置于 5% CO₂、37℃培养箱中进行培养。待细胞生长至培养皿底约 95%~100%时,用 10 mg/L 丝裂霉素 C 处理 2 h 后,将处理过的 STO(MSTO)按 1:4 冻存备用。小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)细胞株 R1(ATCC, SCRC-1011TM)培养于处理过的 STO(MSTO)上。干细胞培养基成分包括:15%胎牛血清、1%非必需氨基酸、0.01% β -巯基乙醇、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、0.1%白血病抑制因子。5% CO₂、37℃培养。每天换液,以维持其未分化状态,至干细胞生长至亚融合状态时进行传代。

1.3 胚胎干细胞的鉴定碱性磷酸酶染色

将 ESC 培养于六孔板上至 70%融合,4%多聚甲醛(PFA, Sigma-Aldrich)室温固定 1 min。吸弃多聚甲醛,并用含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗 3 遍。根据 ALP 试剂盒(Sidansai Biotechnology, Shanghai, China)配置 2 mL 染剂,室温避光孵育 15 min。阳性

染色为蓝色。阶段特异性胚胎抗原 1(stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1)免疫荧光染色 4%多聚甲醛固定 ESC 爬片 5 min, 0.2% Triton X-100 通透 10 min, 5%山羊血清封闭 1 h。按 1:100 加入小鼠来源单克隆 SSEA-1 抗体(Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 4℃孵育过夜。次日加入抗小鼠 IgM 抗体(1:100, Cell signaling), 室温孵育 1 h。上述步骤之间,均用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。封片后,使用 Olympus I \times 70 倒置荧光显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)观察。在体成瘤实验将 1 \times 10⁶ ESC 悬浮于 0.1 mL 50% matrigel 中,皮下注射于同源小鼠后肢 Sv/129 hosts($n=6$)。注射 4 周后,小鼠安乐死处理后,将畸胎瘤手术取出。畸胎瘤固定后,石蜡包埋切片,按照 HE 染色步骤进行免疫组织化学染色。显微镜下识别各胚层来源的结构。

1.4 小鼠胚胎小体的培养

胚胎小体(embryonic bodies, EB)的制法参考文献[4-5],接种于培养皿中,培养液除无白血病抑制因子(Leukaemia Inhibitor Factor, LIF)外与 ESC 培养液相同。悬浮培养后 3 天,分为 4 组:无诱导组(对照组)将 EB 接种于铺有盖玻片的六孔板及 90 mm 培养皿内,使用普通 EB 培养基培养;全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, atRA)诱导组将 EB 接种于铺有盖玻片的六孔板内及 90 mm 培养皿,使用加有 10⁻⁸ 全反式维甲酸的 EB 培养基培养;Ⅳ型胶原诱导组将 EB 接种于 5 mg/L Ⅳ型胶原包被的铺有盖玻片的六孔板及 90 mm 培养皿内,使用普通 EB 培养基培养;atRA 联合Ⅳ型胶原诱导组将 EB 接种于 5 mg/L Ⅳ型胶原包被的铺有盖玻片的六孔板及 90 mm 培养皿内,使用加有 10⁻⁸ atRA 的 EB 培养基培养,于第 7 天、14 天收集 4 组蛋白、RNA 及玻片。

1.5 Western blot 技术检测 SM- α actin 的表达

采用 BCA 比色法试剂盒测定裂解液中蛋白质的浓度,将 30 μ g 总蛋白加入 4 \times Loading buffer, 95℃煮沸 5 min 后,经 12%分离胶行 SDS-PAGE 电泳,并以预染蛋白 maker 为标志,判定电泳终止时间。在 4℃的循环水浴内以 350 mA 电流将样品转至硝酸纤维素滤膜上,时间为 80 min;于 5%的脱脂奶粉 TBS-T 缓冲液室温封闭 1 h;加入 1:3 500 Anti-SM- α actin 4℃孵育过夜;TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min;加入辣根标记的羊抗小鼠抗体(1:2 000 稀释),室温孵育 2 h;TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min;EC L 化学发光显影。

1.6 实时荧光定量 PCR 技术检测 SM- α actin、SM-MHC mRNA 水平

TRIzol[®] 提取胚胎小体中的总 RNA。使用 PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 试剂盒将每组 1 g 总 RNA 逆转录为 cDNA, 并通过 biosystems 7300 进行 Real-Time PCR 检测。基因表达水平的差异通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.7 免疫荧光法检测 SM- α actin 与 SM-MHC 的表达

各组细胞爬片用 4% PFA 固定 10 min, 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 通透 15 min, 5% 山羊血清室温封闭 1 h。按 1:100 加入小鼠来源 SM- α actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、兔来源 SM-MHC 抗体 (Sigma-Aldrich), 4℃ 孵育过夜。次日, 加入抗小鼠 (1:100, Cell signaling, Green) 和抗兔 IgM 抗体 (1:100, Cell signaling, Red), 室温避光孵育 1 h。上述步骤之间, 均用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。封片后, 使用 Olympus I \times 70 倒置荧光显微镜 (Olympus, Tokyo, Ja-

pan) 观察。
1.8 统计学分析
各分组所得计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 软件处理数据, 各组间比较用方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESC 全能性检测

EGFP-R1 团状生长于滋养层细胞上, 生长致密, 边界不清。ALP 染色和 SSEA-1 染色均为阳性, 周围的滋养层细胞未着色 (图 1A)。镜下观察畸胎瘤切片, 可发现存在外胚层 (ectoderm) 来源的上皮组织 (epidemis)、中胚层 (Mescderm) 来源的软骨和肌肉组织 (cartilage, muscle) 以及内胚层 (Endoderm) 来源的肠上皮组织 (intestinal epithelium) 三个胚层的结构 (图 1B)。这表明本实验中培养所得的干细胞具有全能性, 可分化为各个胚层来源细胞。

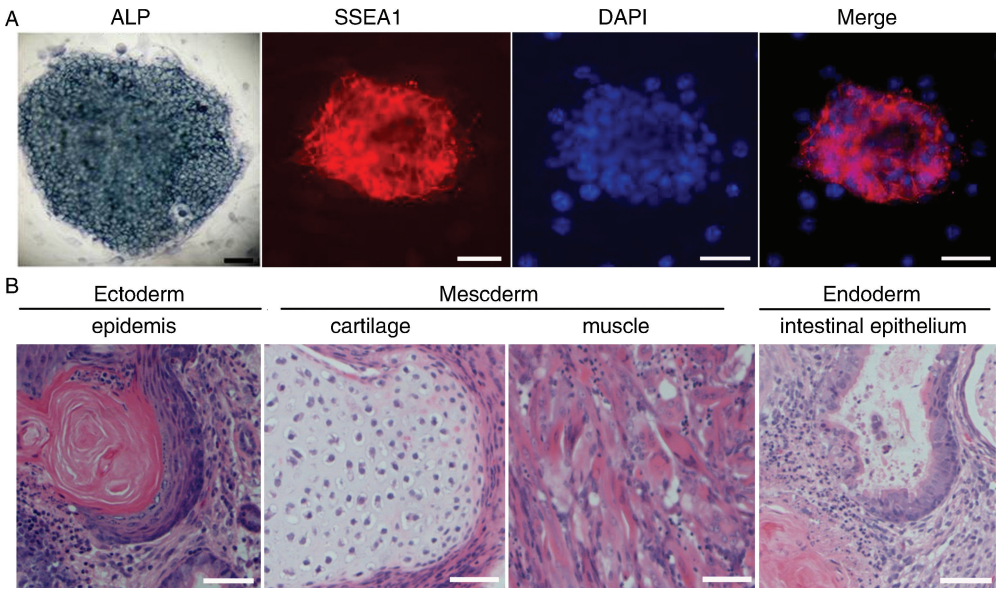


图 1. ALP 及 SSEA-1 染色观察胚胎干细胞 (50 μ m), HE 染色观察胚胎干细胞在体成瘤情况 (100 μ m)
Figure 1. ES cells were examined by ALP and SSEA-1 staining (50 μ m); The totipotency of ESC in-vivo teratoma formation were tested by HE staining (100 μ m)

2.2 全反式维甲酸联合 IV 型胶原促进胚胎干细胞向平滑肌细胞分化的效率高于二者的单独作用效果

分别提取对照组、atRA 诱导组、IV 型胶原诱导组、atRA + IV 型胶原诱导组贴壁分化 7 天、14 天的 mRNA, 通过实时荧光定量 PCR 技术检测 4 组贴壁分化 EB 7 天、14 天在 SM- α actin 及 SM-MHC 的表达情况, 无论 7 天还是 14 天, atRA + IV 型胶原诱导组 SM- α actin 及 SM-MHC 的表达量均明显的高于

其他 3 组并具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 atRA 诱导组、IV 型胶原两组之间则没有差异但是也均高于对照组并具有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2)。
进一步提取贴壁分化 7 天、14 天的蛋白, 经 Western blot 技术检测 SM- α actin 的表达情况, 可以发现, 无论 7 天还是 14 天, atRA + IV 型胶原诱导组 SM- α actin 的表达量均明显的高于其他 3 组并具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 atRA 诱导组、IV 型胶原

诱导组之间则没有差别但是也均高于对照组并具有统计学意义($P < 0.05$;图3)。

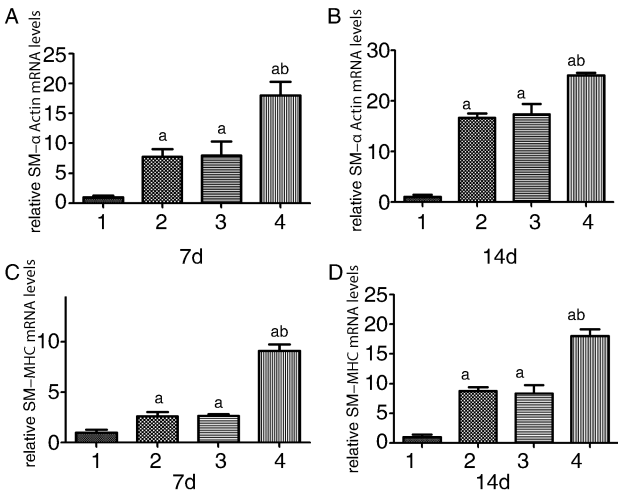


图2. 实时荧光定量PCR检测胚胎干细胞中SM-α actin以及SM-MHC在不同组别中的表达 1为对照组,2为atRA诱导组,3为collagen IV诱导组,4为atRA+collagen IV诱导组。a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$ 与atRA诱导组和atRA+collagen IV诱导组比较。

Figure 2. The mRNA levels of SM-α actin and SM-MHC in ESC of different groups are investigate by real-time PCR

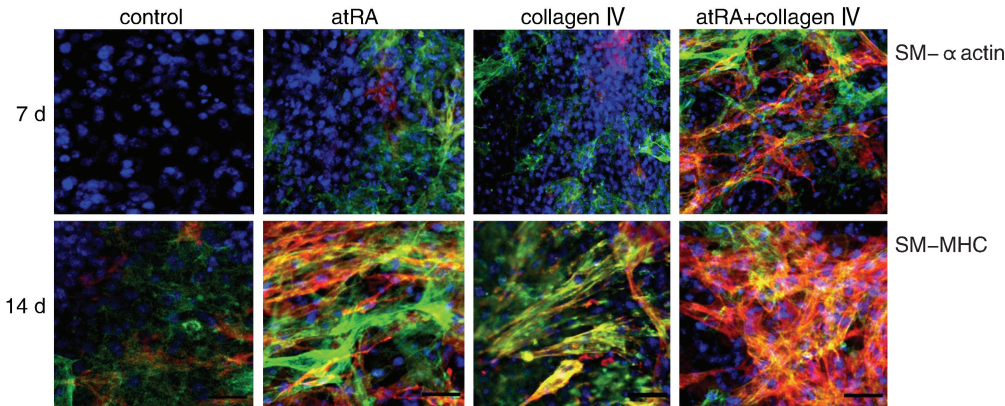


图4. 免疫荧光技术检测胚胎干细胞中SM-α actin以及SM-MHC在不同组别中的表达

Figure 4. Immunofluorescent staining with SM-α actin (green) and SM-MHC (red) are detected in different groups

3 讨论

SM-α actin是平滑肌细胞发育最早期的标志物^[6],并随着胚胎晚期血管系统的发生发展表达更是日益增多^[7]。在SM-α actin基因敲除小鼠的研究中发现^[8],基因敲除小鼠会出现低血压、血流量下降等病理生理改变,而这些改变与血管重要组成部分平滑肌细胞的作用息息相关,因此通过SM-α ac-

同时免疫荧光染色发现,7天和14天两个时间点,atRA+IV型胶原诱导组细胞SM-α actin与SM-MHC双染阳性最为明显,说明细胞分化成熟度最好。atRA诱导组、IV型胶原诱导组次之,对照组最差(图4)。

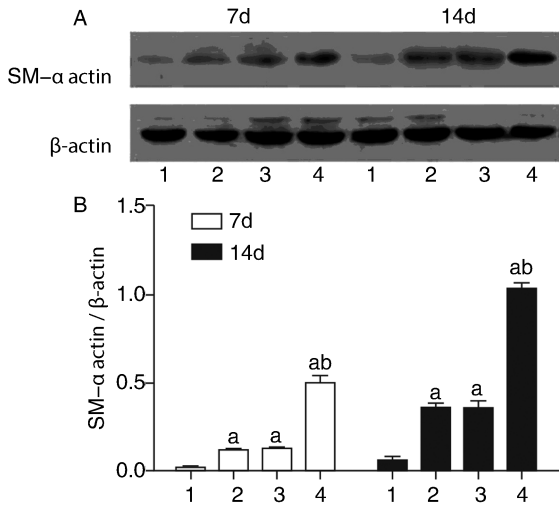


图3. Western blot检测胚胎干细胞中SM-α actin在不同组别中的表达 1为对照组,2为atRA诱导组,3为collagen IV诱导组,4为atRA+collagen IV诱导组。

Figure 3. The protein levels of SM-α actin in ESC of different groups are detected by Western blot

tin来研究血管平滑肌的发生发展具有重要意义。SM-MHC作为平滑肌细胞的晚期功能性标志物^[7],其阳性染色表明分化所得平滑肌细胞是具有收缩功能的成熟细胞。因此,本研究选择SM-α actin和SM-MHC来共同鉴定胚胎干细胞分化来的平滑肌细胞。

胚胎干细胞具有多向分化潜能,能够在体外无限繁殖。近年来,胚胎干细胞已经成为国内外研究

的一个热点问题。定向诱导胚胎干细胞分化为血管平滑肌细胞可用于工程血管重建和高血压、动脉粥样硬化等疾病血管损伤的修复。目前常用的诱导方案有全反式维甲酸诱导和Ⅳ型胶原诱导两种。Blank 等^[7]第一次提出全反式维甲酸体外诱导干细胞向平滑肌分化这一模型。研究发现,全反式维甲酸对小鼠胚胎干细胞分化的影响表现为剂量依赖性。高浓度($10^{-6} \sim 10^{-5}$ mol/L)刺激胚胎干细胞可促进向神经细胞的分化,而较低浓度($10^{-8} \sim 10^{-9}$ mol/L)则促进向平滑肌细胞的分化^[9]。依据文献报道,本研究将全反式维甲酸的浓度设置为 10^{-8} mol/L。细胞外基质对于细胞的粘附、生长、迁移、凋亡和分化都有影响。细胞外基质含有丰富胶原,其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原可形成结构类似的纤维组织,Ⅳ型胶原则形成一种二维网状纤维,是基底膜的主要组成成分。有研究表明^[10],Ⅳ型胶原在 F9 干细胞的分化中具有重要作用。研究^[11-12]中发现,Ⅳ型胶原能够成功的将 VEGFR2⁺ 原始细胞诱导为平滑肌细胞。而本研究是首次将两种诱导方案联合应用,从实验结果看是大大提高了胚胎干细胞向平滑肌细胞的分化效率,对于进一步高效率构建组织工程学血管奠定了基础。

全反式维甲酸进入细胞后可以与胞内受体 CRABP 形成复合物,该复合物可入核与染色体上的受体结合,进而调控相关基因的表达,这可能与其诱导胚胎干细胞向平滑肌细胞分化的功能有关。另一方面,干细胞分化早期可分泌Ⅳ型胶原,其诱导血管平滑肌细胞分化的机制可能与Ⅳ型胶原-整合素和 PDGFR β 介导的信号通路有关。但是,全反式维甲酸与Ⅳ型胶原联合诱导更好的促进胚胎干细胞向平滑肌细胞分化的机制尚不清晰,有待我们在下一步的实验研究中继续深入探讨。

综上所述,我们的研究是联合应用全反式维甲酸与Ⅳ型胶原诱导胚胎干细胞向平滑肌细胞分化,发现其诱导分化效率明显高于二者的单独诱导效果,为进一步提高构建组织工程学血管效率提供了研究依据。

【参考文献】

[1] 宁静,张松,张余杭.香烟烟雾提取物对小鼠血管平滑肌细胞的损伤作用及表型转变的影响[J].中国动脉

硬化杂志,2015,23(1):44-48.

- [2] 赵京山,杨瑞萍,魏彦茹,等.血管平滑肌细胞在高血压中的作用[J].中华老年医学杂志,2009,28(6):520-523.
- [3] 陈亚丽,王丽英,江金垚.法舒地尔抑制血管平滑肌细胞的增殖及其分子机制[J].中华老年医学杂志,2013,32(8):890-893.
- [4] ED O' Cearbhaill, MA Punchard, M Murphy, et al. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate[J]. Biomaterials, 2008, 29: 1 610-619.
- [5] Xiao Q, Wang G, Luo Z, et al. The mechanism of stem cell differentiation into smooth muscle cells[J]. Thromb Haemost, 2010, 104: 440-448.
- [6] 楚海荣,李宏,吴海燕,等.高糖对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响及其机制[J].中国动脉硬化杂志,2014,22(11):1 097-100.
- [7] Blank RS, Swartz EA, Thompson MM, et al. A retinoic acid-induced clonal cell line derived from multipotential P19 embryonal carcinoma cells expresses smooth muscle characteristics[J]. Circ Res, 1995, 76: 742-749.
- [8] Hamlyn JM, Linde CI, Gao J, et al. Neuroendocrine humoral and vascular components in the pressor pathway for brain angiotensin II: a new axis in long term blood pressure control[J]. PLoS One, 2014, 9: e108 916.
- [9] Yu X, Zhang L, Wen G, et al. Upregulated sirtuin 1 by miRNA-34a is required for smooth muscle cell differentiation from pluripotent stem cells[J]. Cell Death Differ, 2014, doi: 10. 1038/cdd. 2014, 206.
- [10] Sillat T, Saat R, Pöllänen R, et al. Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16: 1 485-495.
- [11] Azhdari M, Baghaban-Eslaminejad M, Baharvand H, et al. Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model[J]. Stem Cell Res, 2013, 10: 288-300.
- [12] Horie N, Pereira MP, Niizuma K, et al. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects poststroke recovery, inflammation, and vascular repair[J]. Stem Cells, 2011, 29: 274-285.

(此文编辑 李小玲)