

TNNI3K 基因过表达诱导小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化

王 银¹, 徐瑞霞¹, 马春艳¹, 姚雨宏¹, 叶 珏², 李建军¹

(中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 1. 心血管疾病国家重点实验室
血脂异常与心血管病诊治中心, 2. 心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037)

[关键词] 小鼠胚胎干细胞; 肌钙蛋白 I 相关激酶; 心肌细胞

[摘要] **目的** 研究肌钙蛋白 I 相关激酶(TNNI3K)对小鼠胚胎干细胞(mESC)向心肌细胞分化的影响。**方法** 从形态和细胞免疫荧光、碱性磷酸酶试验以及 HE 染色鉴定 mESC 的多能性。采用悬滴法培养 mESC 形成拟胚体(EB), 自分化为跳动的心肌细胞, 通过细胞免疫荧光和透射电镜(TEM)方法鉴定。慢病毒分别携带 hTNNI3K 基因和 siRNA 感染 mESC, 并分别自分化为心肌细胞, 通过流式细胞术(FCM)、细胞免疫荧光、Western blot 等分析心肌特异性蛋白表达水平的差异。**结果** mESC 表面蛋白分子 SSEA-1 和 Oct-4 表达呈阳性(绿色), ALP 试验呈蓝紫色, 核质比>>1。正常自分化的细胞免疫荧光显示 cTn I、cTnT、MLC2 以及 α -actinin 阳性(绿色), 肌节清晰可见。TEM 显示心肌细胞独有的肌纤维亚细胞结构。过表达组 cTnT⁺ 阳性细胞率高于对照组, Western blot 显示心肌特异性蛋白 cTnT、cTn I、MLC2、 α -actinin 等显著高于对照组, 且细胞免疫荧光结果显示 MHC6 蛋白提前表达。干扰组不仅 cTnT⁺ 阳性细胞率显著低于对照组, 而且心肌特异蛋白也显著低于对照组, MHC6 蛋白表达延后。**结论** TNNI3K 基因能增强心肌细胞的生成, 促进 mESC 向心肌细胞的分化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Overexpression of Cardiomyocyte-specific Kinase TNNI3K Induces Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation into Cardiomyocytes

WANG Yin¹, XU Rui-Xia¹, MA Chun-Yan¹, YAO Yu-Hong¹, YE Jue², and LI Jian-Jun¹

(1. Division of Dyslipidemia & State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, 2. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital & National Center for Cardiovascular Diseases & Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Mouse Embryonic Stem Cell; TNNI3K; Cardiomyocyte

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of TNNI3K gene on differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Methods** Firstly, we identified the omnipotency of mESC by the morphological characteristics and cellular immunofluorescence, alkaline phosphatase test (ALP) and HE staining. In addition, Embryonic body, cultured by hanging drop method, differentiated spontaneously into beating cardiomyocytes, which were identified by cellular immunofluorescence and transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, hTNNI3K gene and siRNA, carried by Lentivirus, infected mESC more than 10 days, respectively, and spontaneously differentiated into mature cardiomyocytes, the differences of myocardial marker proteins expression levels were analyzed by flow cytometry (FCM), cellular immunofluorescence, Western blot. **Results** The membrane proteins of mESC, SSEA-1 and Oct-4, were presented green fluorescence, and ALP test presented blue-purple as well as HE staining with karyoplasmic ratio >>1. What's more, it was cTn I, cTnT, MLC2 and α -actinin that were clearly visible by cellular immunofluorescence, as well as the unique structure of the muscle fibers by TEM. Furthermore, the cTnT⁺ positive cells rate of TNNI3K-overexpression group was remarkably higher than that in control group, likely the expression of cTn I, MLC2, GATA4, et al. Interestingly, the contraction protein MHC6 expressed earlier than other groups. The rate of cTnT⁺ positive cells in the siRNA group was significantly

[收稿日期] 2016-01-15

[修回日期] 2016-03-07

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20101106120007)和国家自然科学基金(81100118)

[作者简介] 王银, 硕士研究生, 研究方向为小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化机制, E-mail 为 yinwang_fuwai@163.com。马春艳, 硕士研究生, 研究方向为血脂代谢, E-mail 为 imachunyan@163.com。通讯作者徐瑞霞, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为干细胞向心肌细胞分化机制研究, 血脂代谢的机制研究, E-mail 为 ruixiaxu@sina.com。

lower than that of the control group, the same as the expression of other cardiac specific proteins.

Conclusions

TNNI3K gene might enhance the synthesis of cardiomyocytes and promote the differentiation of mESC into cardiomyocytes.

目前,伴随着社会人口的老龄化,心肌梗死(myocardial infarction, MI)发病率逐年增高^[1]。MI常规治疗手段,如溶栓治疗及冠状动脉旁路移植术,均难以逆转其心脏功能。心脏移植术也因供体来源、免疫排斥等因素而受限制。细胞移植是治疗MI的新方法,近年来受到关注^[2]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是成体干细胞的主要来源,曾用于治疗缺血性心脏病^[3],但骨髓MSC的数量和分化潜能随着供体的年龄增加而下降,因此难以满足细胞移植的需求。Lai等^[4]采用P19细胞系研究肌钙蛋白I相关激酶(cardiac troponin I-interacting kinase, TNNI3K)基因诱导心肌细胞分化时,发现TNNI3K基因促进心肌细胞分化进程,增强心肌细胞功能,且对改善MI小鼠心脏功能有很好疗效,然而P19细胞系来源于畸胎瘤,故临床应用受到限制。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)因具有分化为体内3个胚层来源的各种类型组织细胞潜能的全能干细胞而广泛运用于心血管再生方面的研究^[5-6]。ESC体外分化心肌细胞模型重演体内心肌发育过程,为研究胚胎心脏发育过程中TNNI3K基因新功能特征带来了新机遇。

生物信息学的基因结构域分析表明,TNNI3K蛋白含三种结构域:N端为7个锚蛋白重复结构域,中间近C端为一激酶结构域,C末端为富含Ser结构域^[7]。TNNI3K蛋白存在于心肌细胞核内,能自我磷酸化,且具有双激酶活性^[8-10]。提示该基因可能在心肌的信号传导通路中扮演重要角色。目前研究发现,TNNI3K基因参与缺血性心室重构^[11-12]、向心性肥厚^[13]以及扩张型心肌病^[14]等疾病发生发展过程,而在ESC向心肌细胞分化过程中,TNNI3K基因扮演着怎样的角色还不得而知。因此,本研究旨在观察TNNI3K基因在小鼠ESC(mESC)过表达对心肌细胞生成的影响,为临床细胞移植应用提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料

C57BL/6小鼠胚胎干细胞、C57BL/6小鼠胚胎干细胞培养基均购自广州赛业生物技术有限公司。13.5~14.5天C57BL/6孕鼠SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。pLenti-CMV-TNNI3K/Flag(3' flank)-IRES-EGFP购自北京东华坊生物技术

公司,基因信息 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_015978.2。pLenti-RNAi(pLKO.1质粒改造而来,携带puromycin抗性)购自北京东华坊生物技术公司,基因信息 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_177066.5。干扰片段:CGGTGGCAA-CAAGTCGCATAT。新生牛血清(美国Gibco公司)。兔抗Stage Specific Embryonic Antigens-1(SSEA-1)抗体及兔抗Oct-4抗体(美国Millipore公司),小鼠抗cTnT抗体及兔抗cTnI抗体(美国Abcam公司),兔抗 α -actinin抗体(美国Sigma公司),兔抗MLC2抗体(美国Santa Cruz公司),兔抗GAPDH单克隆抗体(美国CST公司),FITC标记山羊抗兔/抗鼠、Alexa标记山羊抗鼠及HRP标记山羊抗兔/抗鼠(北京中杉金桥公司)。BCIP/NBT碱性磷酸酶试剂盒(江苏碧云天公司)。RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、BCA蛋白定量试剂盒(北京普利莱公司)。PBS以及TEM染色试剂均由中国医学科学院阜外医院病理科配制。

1.2 细胞培养

1.2.1 胚胎干细胞饲养层细胞的制备 将孕鼠麻醉颈椎脱臼处死后,75%酒精消毒,于生物安全柜内无菌环境下取胎盘组织,小心剥离胎膜,去除四肢、头、尾部及内脏,无菌PBS冲洗至无色。胰酶消化制备小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)参考文献^[15]。

1.2.2 小鼠胚胎干细胞的培养 提前1h弃新生牛血清培养基,无菌PBS轻洗一次,加入5 mL胚胎干细胞完全培养基继续培养。从液氮中取出一支mESC迅速置于37℃恒温水浴中,快速左右晃动,使其在1 min内融化。将融化的细胞悬液加入预先温浴的5 mL DMEM无血清培养基的无菌离心管中,轻吹混匀。1000 r/min离心2 min,弃上清后,加入3 mL 10%胚胎干细胞完全培养基轻吹成细胞悬液,加入10 cm培养皿中,补充完全培养基至10 mL,37℃、5%CO₂培养,每24 h轻洗换液。

mESC呈巢式生长,融合达80%~85%时,进行传代。弃原液,加5 mL无菌PBS轻洗2次。加入3 mL温浴的0.25%胰酶-0.04% EDTA,镜下观察消化程度,待见MEF收缩时,加入5 mL完全培养基终止消化,用无菌弯头玻璃滴管轻轻吹打,使mESC充分分散开,并转移至15 mL离心管中,1000 r/min离心5 min,弃上清。加入5 mL完全培养基,将mESC按1:5比例分成5份,2份种在已铺好MEF的10 cm

培养皿中,2 份分别种在 2 个 6 孔板(MEF 种在 25 mm 细胞爬片上)中,剩余 1 份种在 1 个铺好 MEF 的 6 孔板中,继续培养,每天观察并换液。

1.3 小鼠胚胎干细胞的多能性鉴定

1.3.1 免疫荧光鉴定 SSEA-1 和 Oct-4 mESC 在对数期时,取出细胞爬片 4 张,D-PBS 轻洗 3 次 \times 2 min/次,丙酮/甲醇(V:V=1:1)固定 5 min,干燥 30 s,0.5% TritonX-100 作用 1 h。分别加兔抗 SSEA-1 抗体(1:100)和兔抗 Oct-4 抗体(1:150),并设置阴性对照,4℃湿盒过夜。37℃复温 45 min 后,D-PBS 轻洗 3 次 \times 2 min/次,加入 FITC 标记的二抗,避光,37℃ 1 h。防荧光淬灭剂封片,避光干燥,共聚焦荧光显微镜(SP8 系统)观察。

1.3.2 碱性磷酸酶鉴定 mESC 在对数期时,取出细胞爬片 2 张,PBS 轻洗 3 次 \times 2 min/次;4%多聚甲醛室温固定 15 min,染色过程按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒的说明操作;设置阴性对照,苏木精复染 10 min 后,水洗,脱水封片,光镜下观察。

1.3.3 苏木精-伊红染色 小鼠胚胎干细胞在对数期时,取出细胞爬片 1 张,PBS 轻洗,丙酮/甲醇(V:V=1:1)固定 5 min 后,空气干燥 30 s,苏木素染色 10 min,流水轻洗后伊红染色 1 min,流水轻洗后盐酸-乙醇脱色,脱水封片,光镜下观察。

1.4 小鼠胚胎干细胞向心肌细胞的分化

10 cm 培养皿中 mESC 融合至 80%~85%时,消化成单个细胞,分化液(胚胎干细胞完全培养基中除去白血病抑制因子 LIF)并调至浓度 2×10^8 个/L。取 20 mL 细胞于无菌的 10 cm 培养皿中,20 μ L/滴种于 150 mm 培养皿内盖上,悬滴培养形成拟胚体(embryonic body, EB),每 3 天补加 10 μ L/滴分化液。EB 培养至第 6 天时,将其按 20 个/孔转移至 6 孔板中培养,每 2 天更换分化液,并观察。

1.5 慢病毒转染小鼠胚胎干细胞

小鼠胚胎干细胞融合至 80%~85%时,弃原液,无菌 PBS 轻洗 2 次,加入无血清培养基稀释的慢病毒悬液 2 mL/孔,分别做 3 个复孔。TNNT3K 过表达慢病毒,其对照为 Flag-only, TNNT3K 干扰,对照为无义 RNA 片段,稀释比例分别为 1:150、1:300、1:500、1:500。8~24 h 根据细胞死亡情况终止感染,并将其消化,转移至已铺好 MEF 的 6 cm 培养皿中,加入 5 mL 完全培养基继续培养,并观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达。观察到明显的荧光后,流式细胞术(flow cytometry, FCM)分选出 GFP 阳性细胞,种在已铺好 MEF 的 10

cm 培养皿中,融合至 80%~85%时分化培养,如上所述。

1.6 Western blot 检测内源性 TNNT3K 蛋白、TNNT3K 过表达与干扰心肌特异性蛋白表达

收集干细胞、-2、0、2、4……26 天细胞,RIPA 裂解液提取细胞蛋白,BCA 法定量后,每孔上样 40 μ g。分别收集过表达组、过表达对照组、干扰组以及干扰对照组 12、16、20、24 天细胞,使用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白,BCA 法定量蛋白后,每孔上样 20 μ g。一抗稀释比例分别为 α -actinin(1:1000)、MLC2(1:500)、GATA4(1:1000)、cTnT(1:1000)、cTn I(1:1000)、TNNT3K(1:1000)以及内参 GAPDH(1:1000)。一抗 4℃孵育过夜,相应的 HRP 标记山羊二抗室温 1 h。避光显色,全自动凝胶成像分析仪(BioRad 公司)信息采集分析。

1.7 细胞免疫双染荧光检测 TNNT3K 过表达与干扰心肌细胞特异性蛋白

选取过表达组、干扰组以及正常对照组跳动的细胞团块爬片,细胞处理如上所述。一抗稀释比例分别为 cTnT(1:100)、MHC6(1:150),FITC 标记山羊抗兔以及 Alexa 标记山羊抗鼠(1:400)。

1.8 拟胚体计数及 FCM 检测 cTnT⁺细胞阳性率

挑选正常组、过表达组、过表达对照组、干扰组以及干扰对照组分化 10、14、18、22、26、30 天细胞,显微镜下分别记录跳动的 EB 数量以及每个孔的总 EB 数。

收集正常组、过表达组、过表达对照组、干扰组以及干扰对照组分化 10、14、18、22、26、30 天细胞,0.25%胰酶消化成单个细胞,200 目筛网过滤,具体步骤参考文献[16]。cTnT 的稀释浓度 1:100, FITC 标记二抗稀释浓度 1:400。C6 流式细胞仪检测。

1.9 统计学方法

每份数据重复 3 次,数据采用 SPSS Statistics 20 软件进行统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,多个样本间的两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠胚胎干细胞培养与鉴定

相差显微镜下,培养 24 h 的 MEF 细胞大小不一,形态各异,呈长梭形、柳叶状、多边形、极形等,细胞伸出伪足平铺在平皿底部,细胞界限大致清楚,部分细胞相互重叠,排列无规则,无折光性。mES 细胞在 MEF 细胞上生长良好,大小不一,形态各异,呈圆

形、卵圆形、不规则形等,细胞呈分散的单个克隆,边界清晰可见,有弱折光性。呈集落巢状生长,部分细胞相互融合,连成一片,边界不清(图1)。

免疫荧光显示,SSEA-1 蛋白和 Oct-4 蛋白在

mESC 膜表面表达,且阳性率为 100%。HE 染色结果表明,细胞核质比>>1,符合干细胞的特征。在多能干细胞中,高表达 ALP,随着分化的进行,ALP 逐渐表达减弱,颜色越深,表达越强(图2)。

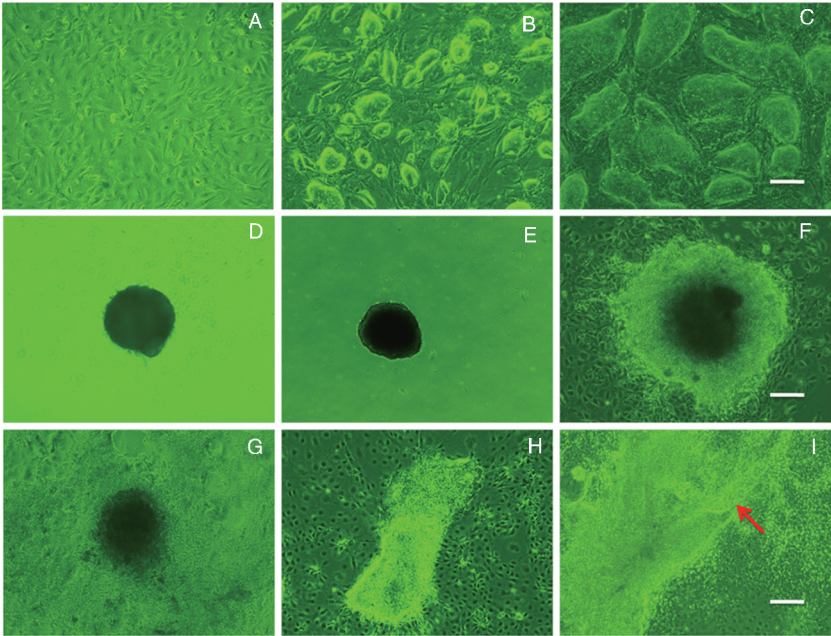


图 1. MEF 与不同时间 mESC 的形态特征(100×) A 为 MEF 培养 2 天,B 和 C 分别为 mESC 培养 2 天和 4 天,D~H 依次为贴壁培养 2、4、8、10 和 14 天,I 为分化 16 天跳动的细胞(红色箭头所示)。

Figure 1. Morphological changes in mouse embryonic fibroblasts and phenotypic characteristics of mESC(100×)

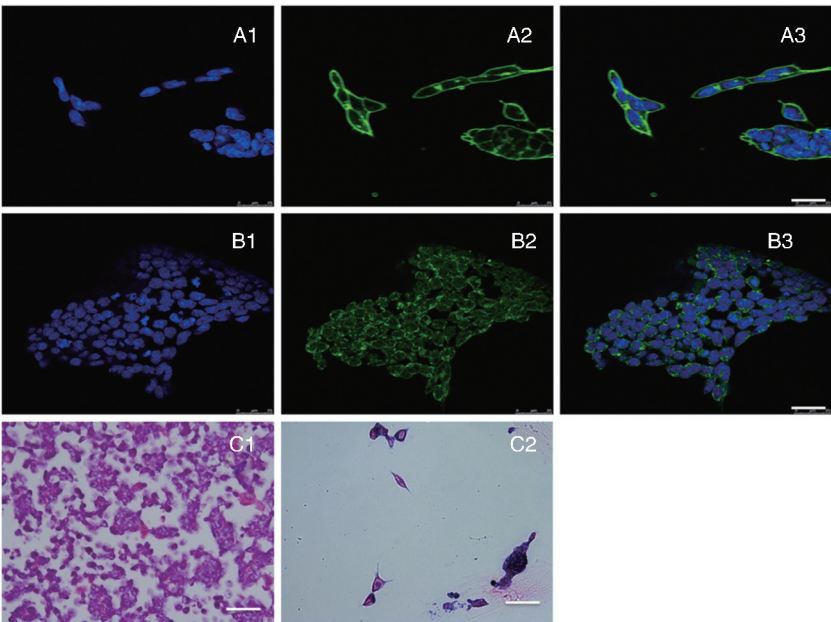


图 2. 免疫荧光、ALP 和 HE 染色鉴定 mESC 的全能性 A1 为 DAPI 染色(400×),A2 为 SSEA-1 荧光蛋白染色(400×),A3 为 DAPI+SSEA-1 蛋白(400×);B1 为 DAPI 染色(400×),B2 为 Oct-4 荧光蛋白染色(400×),B3 为 DAPI+Oct-4 蛋白;C1 为 mESC 培养 2 天 HE 染色(100×);C2 为 mESC 培养 2 天 ALP 染色(100×)。

Figure 2. Pluripotency detection of mESC by immunofluorescence, ALP and HE

2.2 自分化心肌细胞的鉴定

免疫荧光显示,分化第 22 天时,mESC 源性细胞高表达 cTnT、cTn I、 α -actinin 和 MLC2 蛋白,均为

心肌特异性蛋白标志物(图 3)。而 TEM 观察到明显的肌纤维,为心肌细胞所具有的亚细胞结构(图 4)。

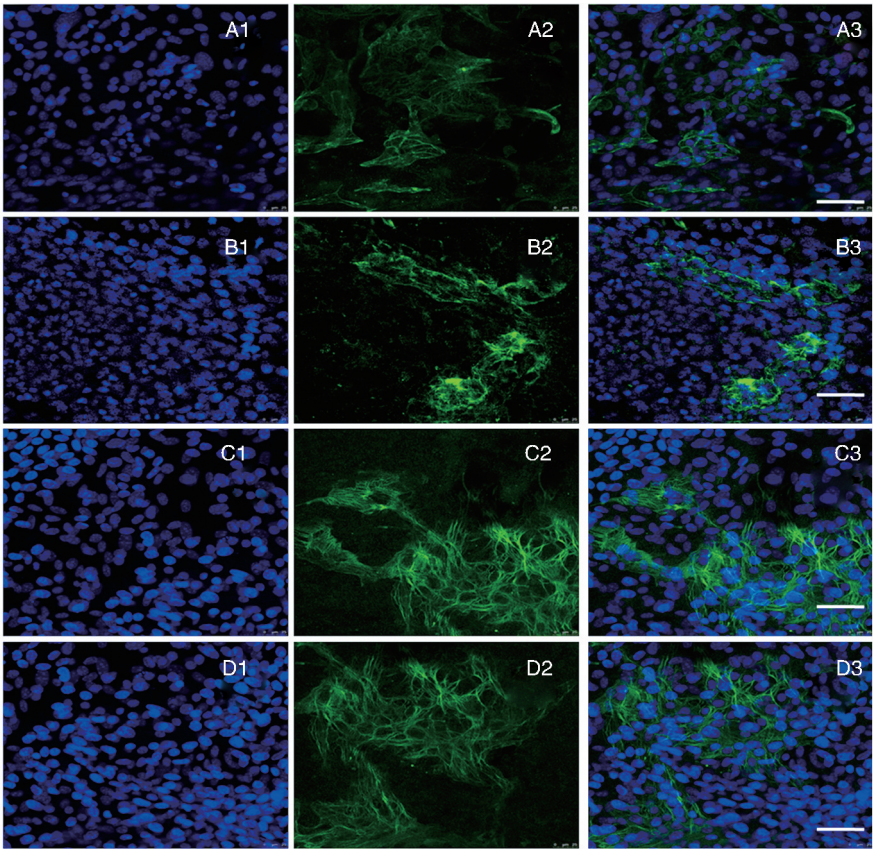
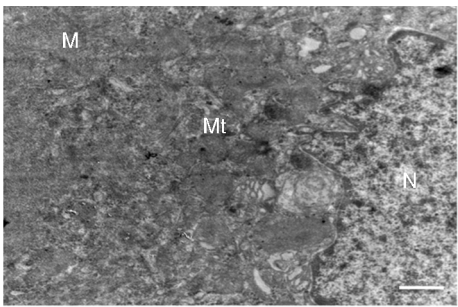


图 3. 免疫荧光鉴定分化 22 天的心肌细胞(400 \times) A1 为 DAPI 染色,A2 为 cTnT 荧光蛋白染色,A3 为 DAPI+cTnT 蛋白;B1 为 DAPI 染色,B2 为 cTn I 荧光蛋白染色,B3 为 DAPI+cTn I 蛋白;C1 为 DAPI 染色,C2 为 α -actinin 荧光蛋白染色,C3 为 DAPI+ α -actinin 蛋白;D1 为 DAPI 染色,D2 为 MLC2 荧光蛋白染色,D3 为 DAPI+MLC2 蛋白。

Figure 3. Immuofluorescence detection of expression of cardiac-specific proteins on day 22 in differentiated mESC(400 \times)



M:myofiber;Mt:mitochondria;N:nuclear

图 4. TEM 鉴定分化 22 天的心肌细胞(15000 \times)
Figure 4. Ultramicrostructure of the mESC following differentiation into cardiomyocytes on day 22(15000 \times)

2.3 内源性 TNNT3K 基因的表达和 TNNT3K 过表达、干扰对心肌特异性蛋白表达水平的影响

Western blot 结果表明,内源性 TNNT3K 基因表

达呈现不连续性表达特性(图 5)。在所选择的时间点中,TNNT3K 过表达组心肌特异性蛋白如 MLC2、cTn I、cTnT、GATA4、 α -actinin 等显著高于对照组($P<0.05$)。而 TNNT3K 干扰组表达明显低于对照组($P<0.05$;图 6)。

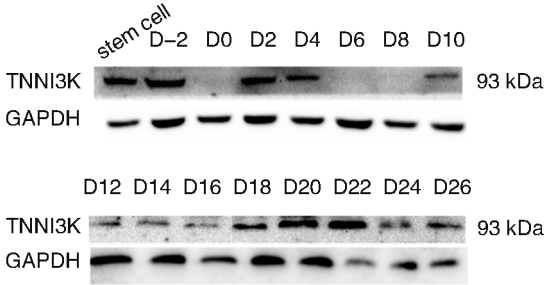


图 5. 内源性 TNNT3K 基因的时空表达
Figure 5. Space-time expression of endogenous TNNT3K gene

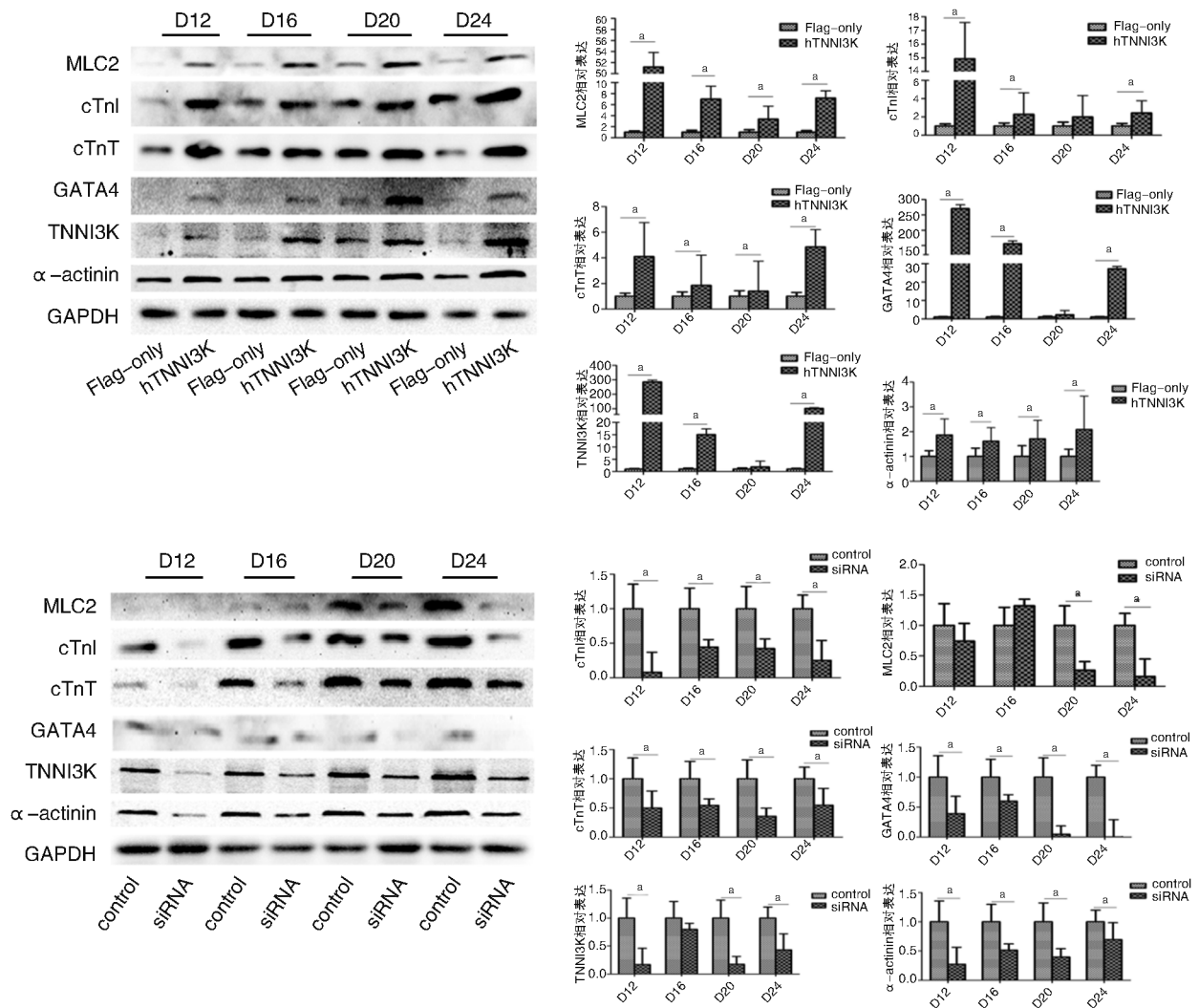


图 6. Western blot 鉴定 TNNI3K 过表达 (上图) 与干扰 (下图) 对心肌特异蛋白的影响

hTNNI3K 为过表达组, Flag-only 为其对照组; siRNA 为 TNNI3K 干扰组, control 为无义 RNA 组。a 为 $P < 0.05$ 。

Figure 6. Western blot detection of expression levels of TNNI3K overexpression and knockdown on cardiac-specific proteins

2.4 TNNI3K 过表达、干扰对心肌细胞分化数目的影响

从 EB 跳动的百分比可以看出, TNNI3K 过表达组高于对照组, 且对照组与正常组无明显差异, 分化 20 天以后, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。而 TNNI3K 干扰组 EB 跳动数低于对照组, 分化 22 天以后差异有显著性 ($P < 0.05$)。FCM 结果表明, TNNI3K 过表达组 cTnT⁺ 细胞阳性率高于对照组, 分化第 18 天后差异有显著性 ($P < 0.05$)。而 TNNI3K 干扰组 cTnT⁺ 细胞阳性率低于对照组, 分化第 10 天差异有显著性 ($P < 0.05$; 图 7)。

2.5 免疫荧光检测 TNNI3K 过表达、干扰对心肌收缩蛋白表达的影响

免疫荧光双染结果显示, TNNI3K 过表达组中 MHC6 高表达, 如绿色所示, 而干扰组与对照组均无

MHC6 的表达 (图 8)。

3 讨论

由于伦理学等限制人胚胎干细胞的应用, 哺乳动物胚胎干细胞成为研究早期胚胎发生、细胞分化和基因表达调控等的理想模型, 并为未来临床细胞治疗提供细胞来源。体外 ESC 培养主要采用饲养层细胞, 且培养基中添加分化抑制因子已形成一种常规且稳定的 ESC 培养方式。体外实验表明, ESC 向心肌细胞分化人为分为了 4 个阶段^[17-18]: 早期 (d8~d11), 中期 (d12~d15), 末期 (d16~19), 终末期 (d20~d31)。我们的实验最早观察到分化跳动的心肌细胞是第 13 天, 一般在第 16 天开始跳动。在体外模拟体内心肌细胞分化过程, 对研究心脏发育

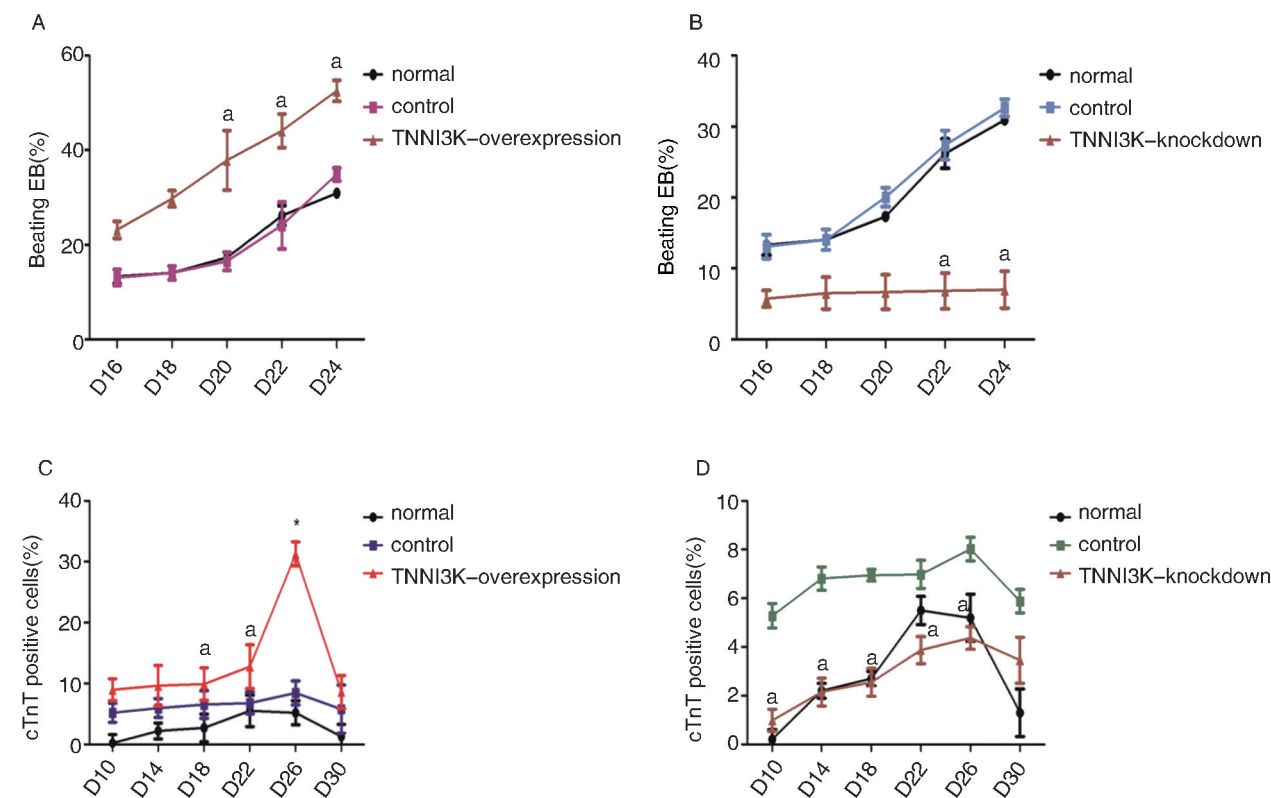


图 7. EB 计数与流式细胞术检测 CTNT⁺ 阳性细胞率 A 为 TNNI3K 过表达对跳动拟胚体 (EB) 的影响 (control 为 Flag-only 组, normal 为正常培养自分化细胞组); B 为 TNNI3K 干扰对跳动 EB 的影响 (control 为无义 RNA 组, normal 为正常培养自分化细胞组); C 为 TNNI3K 过表达组 cTnT⁺ 阳性细胞率变化 (control 为 Flag-only 组, normal 为正常培养自分化细胞组); D 为 TNNI3K 干扰组 cTnT⁺ 阳性细胞率变化 (control 为无义 RNA 组, normal 为正常培养自分化细胞组)。a 为 $P < 0.05$ 。

Figure 7. EB counting and flow cytometry with ImageXpress Micro detection for cTnT⁺ cells

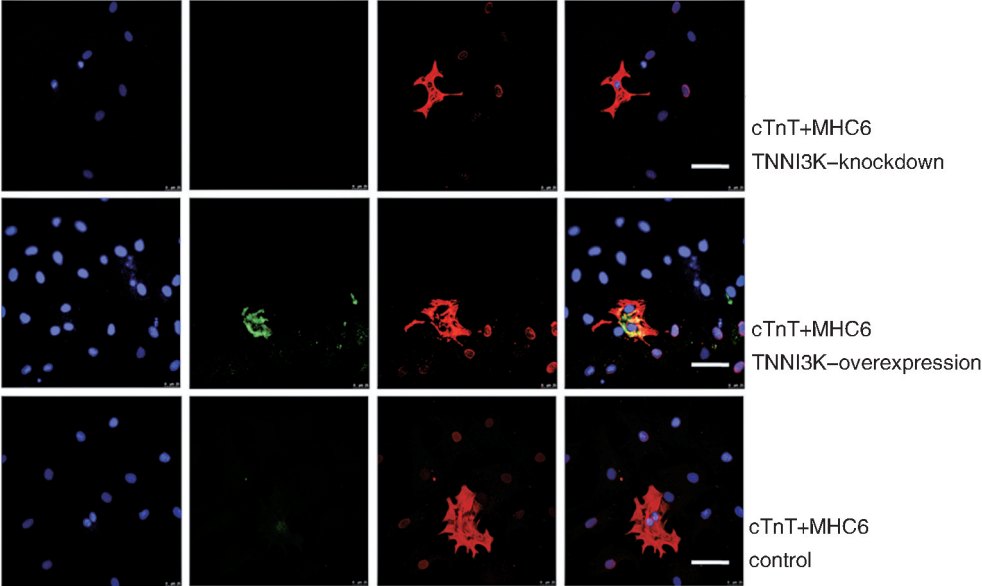


图 8. 免疫荧光鉴定 TNNI3K 过表达与干扰对心肌细胞收缩蛋白表达的影响 (400×) 从左到右依次为 DAPI 染色, MHC6 荧光蛋白染色, cTnT 荧光蛋白染色, DAPI+MHC6 蛋白+cTnT 蛋白。

Figure 8. Immunofluorescence detection of expression levels of TNNI3K overexpression and knockdown on cardiac-specific contractive proteins (400×)

的模型和临床心血管药物筛选具有重大意义。

本研究采用叶珏等^[15]的方法制备 MEF,该方法制备的 MEF 能够很好的支持 mESC 生长,且价格低廉,简单易行。首先,我们从以下几方面鉴定所培养的 mESC 具有全能性:①形态学观察:mESC 在 MEF 上呈巢式生长,细胞核大,胞质少,细胞排列紧密,边缘清晰可见。②干细胞表面标志物:ESC 具有表达早期胚胎细胞表面抗原 SSEA-1、SSEA-3 和 SSEA-4 的特性,其中 mESC 仅仅表达 SSEA-1,而不表达 SSEA-3 和 SSEA-4^[19]。免疫荧光结果显示,所培养的 mESC 高表达 SSEA-1 阳性结果(绿色)。Oct-4 是 POU 转录因子家族中的一员,其高水平表达与 ESC 全能性高度相关^[20]。本研究中免疫荧光结果表明,mESC 高水平表达 Oct-4(绿色),进一步证明 mESC 的全能性。③ALP 试验与 HE 染色:ESC 中表达丰富的 ALP,而分化的细胞低表达或不显示 ALP 活性^[21]。本研究结果显示 ALP 为蓝紫色阳性结果,提示 mESC 高表达 ALP。HE 染色本身不能证明 ESC 的全能性,但从显色结果可以看出,细胞核(蓝色)大,几乎占据了整个细胞的大部分,而胞质(红色)仅在细胞边缘略微可见,核质比>>1,从侧面证明其未分化状态。因此,本实验所培养的 mESC 仍处于未分化状态,保持干细胞的全能性。

目前,诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化的化学试剂主要有 DMSO、5-aza、RA、ICA、维生素 C,而中药成分淫羊藿苷和去甲淫羊藿苷也有此作用^[22-27]。传统药物诱导心肌细胞合成方法不可避免引起药物的毒副作用。本研究从内部基因出发,有效地避免了外界诱导剂的副作用。TNNI3K 基因定位于 1 号染色体短臂 3 区 1 带 1 亚带(1p31.1),该区域恰好靠近 1 号染色体短臂 3 区 1 带到 2 区 1 带(1p31-1p21),后者正是心脏房室间隔缺损易患基因存在的区域^[28]。在研究 TNNI3K 生物学功能实验中,Lai 等^[4]将 hTNNI3K 导入 P19 细胞系中,其实验结果证明 TNNI3K 促进心肌细胞生成。然而 TNNI3K 基因在 ESC 中的作用却未曾报道。为了研究 TNNI3K 基因在 ESC 中对心肌细胞分化的作用,我们检测了内源性 TNNI3K 表达的时空变化,并将 hTNNI3K 基因以慢病毒为载体导入 mESC 中培养,荧光显微镜下观察到强绿色荧光时流式细胞术分选阳性细胞,自分化为跳动的心肌细胞。实验结果表明,TNNI3K 过表达组跳动的 EB 数高达 50%,而对照组不到 30%。cTnT 蛋白在心肌细胞中特异性表达,可作为成熟心肌细胞的标志物。在内源性 TNNI3K 的表达过程中,TNNI3K 呈现不连续表达特性,具体机制尚

不清楚。TNNI3K 过表达组中,cTnT⁺阳性细胞率最高时达 30%左右,而对照组维持在 10%以下水平,即有 5%~25%心肌细胞的增加,相比于 Tbx5 基因的 5%~11%促心肌细胞分化率有更好的优势^[29];在分子水平上,TNNI3K 过表达组心肌特异性蛋白 cTnT、cTn I、MLC2、 α -actinin 以及心肌核转录因子 GATA4 在不同时间点开始高表达;免疫双染荧光实验显示,TNNI3K 过表达组 MHC6 蛋白提前表达。

为了进一步证明 TNNI3K 在心肌细胞分化过程中的作用,我们将 TNNI3K 抑制作用最强的 siRNA 导入 mESC 中,经流式细胞术筛选后继续增殖培养并自分化为心肌细胞。在 TNNI3K 干扰组中,cTnT⁺阳性细胞率最高时不足 5%,而干扰对照组维持在 7%水平。TNNI3K 干扰组中,cTnT、cTn I、MLC2、 α -actinin 以及核转录因子 GATA4 均低表达。细胞免疫荧光实验显示,细胞收缩蛋白 MHC6 在相同的分化时间未见表达。siRNA 抑制 TNNI3K 基因的表达,使其表达量下降,进而影响到其对心肌细胞的分化。

综上所述,在 mESC 向心肌分化的过程中均有 TNNI3K 基因表达,若增强该基因的表达,则心肌细胞数目增多,心肌特异性蛋白表达增加;若 siRNA 干扰 TNNI3K 基因的表达,则心肌细胞数目减少,心肌特异性蛋白表达受抑制。TNNI3K 基因促进 mESC 向成熟心肌细胞分化,而阐明其具体机制将对临床心脏疾病研究具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 447-454.
- [2] 关春艳,高航.骨髓基质干细胞向心肌细胞分化的研究进展[J].*心血管病学进展*, 2009, 30(6): 1 050-053.
- [3] Strauer B E, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans [J]. *Circulation*, 2002, 106(15): 1 913-918.
- [4] Lai Z F, Chen Y Z, Feng L P, et al. Overexpression of TNNI3K, a cardiac-specific MAP kinase, promotes P19CL6-derived cardiac myogenesis and prevents myocardial infarction-induced injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(2): H708-H716.
- [5] Boheler K R. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2002, 91(3): 189-201.

- [6] Scavone A, Capilupo D, Mazzocchi N, et al. Embryonic stem cell-derived CD166 + precursors develop into fully functional sinoatrial-like cells[J]. *Circ Res*, 2013, 113(4): 389-398.
- [7] Yong Zhao X M, Cao X Z D L, Ding C L J. Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I[J]. *J Mol Med*, 2003, (81): 297-304.
- [8] Wang H, Wang L, Song L, et al. TNNT3K is a novel mediator of myofilament function and phosphorylates cardiac troponin I [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(2): 128-137.
- [9] Wang X, Wang J, Su M, et al. TNNT3K, a cardiac-specific kinase, promotes physiological cardiac hypertrophy in transgenic mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58 570.
- [10] 王林, 王慧, 宋莉, 等. 腺病毒过表达 TNNT3K 基因对成年大鼠心肌细胞肌丝钙敏感度的影响[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2011, 11(2): 83-87.
- [11] Wheeler F C, Tang H, Marks O A, et al. Tnni3k modifies disease progression in murine models of cardiomyopathy [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(9): e1000 647.
- [12] Lodder E M, Scicluna B P, Milano A, et al. Dissection of a quantitative trait locus for PR interval duration identifies Tnni3k as a novel modulator of cardiac conduction[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(12): e1003 113.
- [13] Ward D G, Cornes M P, Trayer I P. Structural consequences of cardiac troponin I phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 41 795-801.
- [14] Wang L, Wang H, Ye J, et al. Adenovirus-mediated overexpression of cardiac troponin I -interacting kinase promotes cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38(4): 278-284.
- [15] 叶珏, 张燕婉, 时娜, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养及饲养层制备[J]. *标记免疫分析与临床*, 2013, 20(1): 46-48.
- [16] Qian L, Berry E C, Fu J, et al. Reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells in vitro[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(6): 1 204-215.
- [17] Wei H, Juhasz O, Li J, et al. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses[J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(4): 804-817.
- [18] 蒋芳萍, 张晓刚, 丘彦, 等. 成熟心肌细胞诱导胚胎干细胞定向分化为心肌样细胞[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(5): 1 030-033.
- [19] Brenner C A, Wolny Y M, Adler R R, et al. Alternative splicing of the telomerase catalytic subunit in human oocytes and embryos[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(9): 845-850.
- [20] Niwa H, Miyazaki J, Smith A G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 372-376.
- [21] Li C, Zhou J, Shi G, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(22): 4 340-349.
- [22] Jasmin D C S A. Chemical induction of cardiac differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(3): 403-412.
- [23] Gong J, Gu H, Wang X, et al. SRC kinase family inhibitor PP2 promotes DMSO-induced cardiac differentiation of P19 cells and inhibits proliferation[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1 400-405.
- [24] Choi S C, Yoon J, Shim W J, et al. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells [J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(6): 515-523.
- [25] Zhou J, Zhang Y, Lin Q, et al. Embryoid bodies formation and differentiation from mouse embryonic stem cells in collagen/Matrigel scaffolds [J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(7): 451-460.
- [26] Sun X, Sun X, Jin X, et al. Icarin induces mouse embryonic stem cell differentiation into beating functional cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 349(1-2): 117-123.
- [27] Jin M, Shi S, Zhang Y, et al. Icarin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 344(1-2): 1-9.
- [28] Sheffield V C, Pierpont M E, Nishimura D, et al. Identification of a complex congenital heart defect susceptibility locus by using DNA pooling and shared segment analysis [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(1): 117-121.
- [29] Herrmann F, Bundschu K, Kuhl S J, et al. Tbx5 overexpression favors a first heart field lineage in murine embryonic stem cells and in *Xenopus laevis* embryos[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(12): 2 634-645.

(此文编辑 许雪梅)