

## IGF-1 和动态微环境对脂肪干细胞 向心肌细胞分化作用的研究\*

朱艳霞<sup>1, 2)</sup> 刘天庆<sup>1)\*\*</sup> 宋克东<sup>1)</sup> 马学虎<sup>1)</sup> 崔占峰<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大连理工大学干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024;

<sup>2)</sup>*Institute of Biomedical Engineering, Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)*

**摘要** 体外组织工程模型中, 生物化学和机械信号对心肌再生起着很重要的促进作用, 对人胰岛素样生长因子(IGF-1)和三维动态微环境对脂肪干细胞向心肌细胞分化过程中的促进作用进行了研究. 带有 IGF-1 基因的质粒整合到胶原-壳聚糖支架中, 脂肪干细胞接种到整合质粒的支架内, 未整合质粒的支架作为对照组, 心肌细胞培养基作为分化培养基, 转瓶生物反应器提供动态微环境. 经 2 周分化培养后, 检测质粒在支架内释放及表达情况、细胞在支架内的活性以及心肌功能性蛋白和基因的表达. 结果表明: 动态微环境能促进质粒 DNA 的释放和转染; IGF-1 可促进脂肪干细胞在胶原-壳聚糖支架内增殖以及向心肌细胞分化; 动态微环境可加强 IGF-1 的促增殖分化作用. 因此, IGF-1 和动态微环境能独立或相互促进脂肪干细胞在胶原-壳聚糖支架内活性, 动态微环境还可强化 IGF-1 对脂肪干细胞的促分化作用. 对体外构建工程化心肌组织进行心肌再生研究有着重要的指导意义.

**关键词** 脂肪干细胞, 心肌细胞, 支架, IGF-1, 反应器, 组织工程

**学科分类号** R318

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00335

心脏病是发病率和死亡率最高的疾病之一, 基于细胞的修复给心肌再生提供了一个较好的途径. 而运用组织工程的方法在体外构建三维心肌组织移植将是治疗缺血性心脏病较好的方法<sup>[1~4]</sup>. 组织工程三大要素包括细胞、支架材料和生物活性分子. 干细胞由于具有自我更新和多向分化潜能而成为组织工程重要的细胞来源, 而脂肪干细胞来源于脂肪组织, 无论伦理道德和细胞来源的问题, 近年来越来越多地受到临床医学家的重视. 很多学者应用脂肪干细胞进行心脏病治疗和其他组织再生的研究<sup>[5, 6]</sup>. 将干细胞与基因治疗相结合是未来研究及临床应用的一个方向, 此时细胞不仅仅作为载体将目的基因运输到特定的部位, 还参与组织修复的过程.

组织工程另一大要素就是支架材料. 我们先前的研究中, 结合胶原和壳聚糖的优缺点制备的胶原-壳聚糖多孔支架具有较好的生物相容性, 适于脂肪干细胞增殖<sup>[7]</sup>. 有研究表明胶原还可作为基因载体促进骨组织形成<sup>[8]</sup>. 壳聚糖作为一个天然阳离子多聚物, 在基因治疗、药物释放及组织再生等领

域有着广泛的应用<sup>[9, 10]</sup>. 近年来, 越来越多的研究者运用生物材料(壳聚糖、明胶等)作为基因转染的载体<sup>[11, 12]</sup>. Hosseinkhani 等<sup>[13]</sup>将阳离子明胶-质粒 DNA 阳离子多聚物整合到支架内来提高组织工程骨的形成, 并表明此方法优于传统二维基因转染. 通过基因转染可在体内外引入外源基因进行实验或疾病的治疗, 将是未来研究中比较有前景的一种方法. 而我们构建的胶原-壳聚糖多孔支架表面有大量带正电荷的氨基, 其可与带负电荷的质粒进行离子键合, 保护质粒不受核酸酶的降解.

生物活性分子在组织工程构建中起着重要的作用. 微环境中的生物活性分子对干细胞向特定组织细胞的分化起着重要的导向作用. 先前的共培养研究已表明心肌细胞培养基可促进脂肪干细胞向心肌

\* 国家自然科学基金(30670525)和大连理工大学青年教师培养基金(893228)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, Fax: 0411-83633080, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2009-05-22, 接受日期: 2009-07-23

细胞分化<sup>[4]</sup>。胰岛素样生长因子(IGF-1)在心脏发生的早期阶段可促进细胞有丝分裂和增殖<sup>[5]</sup>,是心脏发生中的一个重要的生长因子。IGF-1还可促进胚胎干细胞向心肌细胞分化以及心脏功能的改善<sup>[6]</sup>, IGF-1 基因转染三维支架内心肌细胞后可促进心肌移植物的形成<sup>[7]</sup>。所有这些研究都表明 IGF-1 在心肌细胞分化及促进心肌修复过程中起着重要的作用。组织工程构建中,传统的静态培养方法并不能给支架内的细胞供应充足的氧和营养物质,生物反应器提供的动态环境很好地解决了这一问题。之前的研究已表明,转瓶生物反应器可促进脂肪干细胞在胶原-壳聚糖支架内的扩增<sup>[8]</sup>,还可促进干细胞在胶原支架内的活性,并促进软骨基质的形成<sup>[9]</sup>。所以有理由相信动态微环境对促进细胞在多聚支架上的黏附、增殖和分化是一个有效的方法。

本实验研究是对不同微环境因子对脂肪干细胞在胶原-壳聚糖支架上向心肌细胞分化的影响。结合组织工程和基因工程的方法,将胶原-壳聚糖支架作为脂肪干细胞生长的支架和 IGF-1 质粒 DNA 的基因载体,心肌细胞培养基作为分化培养基,转瓶生物反应器提供动态微环境,研究 IGF-1 和动态微环境对脂肪干细胞向心肌细胞分化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 胶原-壳聚糖多孔支架的制备

将 2%壳聚糖(海得贝海洋生物技术有限公司)和 5 g/L I 型胶原(生友生物技术有限公司)溶液均匀混合,冻干法制备胶原/壳聚糖多孔支架<sup>[7]</sup>。胶原与壳聚糖按体积比 7:3 混合, -80℃ 预冻 2 h 后冻干机(LABCONCO Co., Kansas, MO, USA)内冻干 24 h。冻干后的支架经碳化二亚胺/羟基琥珀酰胺(EDC/NHS, 上海延长生化公司)交联后再次冻干,环氧乙烷灭菌后备用。

### 1.2 质粒 DNA 的制备及整合到胶原-壳聚糖支架

目的基因人胰岛素样生长因子(IGF-1, 392 bp)从逆转录病毒载体 pBabe-puro/hIGF-1(武汉大学万瑜教授馈赠)酶切获得。IGF-1 基因片段插入到真核表达载体 pIRES2-AcGFP1(5.3 kbp)多克隆位点的 *EcoR* I 和 *Sal* I 处。重组后的 pIRES2-AcGFP1-IGF-1 质粒在 DH5 $\alpha$  大肠杆菌中扩增,质粒小量提取试剂盒(QIAGEN 公司)纯化质粒。纯化后的质粒溶液滴加到干的无菌胶原-壳聚糖支架内,每毫克支架整合 2 微克质粒, 4℃ 过夜。支架中自由氨基与质粒中磷酸根的摩尔比即 N:P 比依据文献[20]选择为

5。支架-质粒复合物置于液氮中预冻 60 s,然后冻干 12 h。冻干的支架-质粒复合物 4℃ 保存。

### 1.3 脂肪干细胞和心肌细胞的分离培养

用改进的方法<sup>[21]</sup>自外科手术患者(年龄 16~60 岁)的皮下正常脂肪组织中分离脂肪干细胞。0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司)和 0.1% 胶原酶(Sigma 公司)联合消化,吸出下层含单个核细胞的液体,加入含胎牛血清(Gibco 公司)的高糖 DMEM 终止消化,剩余脂肪组织重复消化 2~3 次,在收集的细胞沉淀中加入含 10% 胎牛血清 DMEM 重悬细胞,移入培养瓶中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育,每 2~3 天换液。第 4 代纯化以后的细胞用于实验。

按照先前的方法[14]无菌分离 1~2 天龄 SD 大鼠心室肌细胞(大连医科大学动物实验中心提供)。分离的心室组织剪碎后用 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶联合消化,在收集的细胞沉淀中加入含 20% 新生小牛血清 DMEM 重悬细胞,移入培养瓶中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育。经 50 min 差速贴壁离心肌细胞与成纤维细胞,丝裂霉素 C 作用 24 h 抑制非心肌细胞的生长。

### 1.4 脂肪干细胞接种到支架复合物上

支架-质粒复合物(直径 5 mm,厚度为 2 mm)经无菌 PBS 冲洗 3 次,每次 20 min,再用含 10% FBS 的 DMEM 浸泡过夜。未整合质粒的支架作为对照组。将第 4 代脂肪干细胞制成 1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml 悬液,用 10  $\mu$ l 微量进样器由支架的中心部位将细胞悬液注入, 37℃ 静置 3 h。心肌细胞培养基作为分化培养基。支架-质粒-细胞复合物分为两组,静态培养组支架置于 100 mm 培养皿中;生物反应器组,装置同前<sup>[8]</sup>,先将支架插入玻璃架上的钢丝上,然后置入转瓶(1965-10100, BELLCO GLASS, INC, USA)中, 20 r/min 间歇搅拌 3 h,补加培养基至 75 ml,再 40 r/min 间歇搅拌 3 h,最后补加培养基至 100 ml, 40 r/min 间歇搅拌,置入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 2 周。

### 1.5 扫描电镜观察支架-质粒复合物

通过扫描电镜观察质粒在支架上整合情况。冻干后的支架-质粒复合物直接喷金,然后置于 JEM-1200EX 型(日本)扫描电镜下观察。

### 1.6 质粒 DNA 释放分析

为研究质粒从支架中释放情况,支架-质粒复合物置于钢丝上,分别浸入两个装有 PBS(pH 7.4)的转瓶内,一个静置,一个以 40 r/min 的速度搅拌。分别在第 1、2、4、7、15 天收集 500  $\mu$ l PBS

进行检测,同时加入等体积的 PBS. 752 型紫外光栅分光光度计(上海申化仪表自控公司)测定样本的吸光度.

### 1.7 IGF-1 基因的表达

转染 2 天后在多光子显微扫描系统 MPM (MicroRadiance 2100 Multi-Photon Microscope scanning system, BioRad/Zeiss, UK)下观察 IGF-1 表达情况, Laserssharp2000 分析软件进行分析. 从培养的第一天开始每天收集各组支架,连续 7 天,收集的支架用 PBS 洗 3 次,剪碎后在裂解液(0.1 mol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100)中匀浆. 裂解物在 4℃ 以 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清于冰上保存. 应用人 IGF-1 ELISA 检测试剂盒(QIAGEN)检测 IGF-1 蛋白的表达情况.

### 1.8 支架内细胞活性的检测

经 2 周培养后收集各组支架,加入 10 mg/L PI 和 1  $\mu$ mol/L calcein-AM 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 10 min. 在多光子显微扫描系统 MPM 下进行观察, Laserssharp2000 分析软件进行分析.

### 1.9 细胞总蛋白含量的检测

经 2 周培养后收集各组支架, PBS 洗 3 次,剪碎后在裂解液(0.1 mol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100)中匀浆. 裂解物在 4℃、12 000 r/min 离心 5 min,收集上清. BCA 蛋白分析试剂盒(碧云天公司)测定各组细胞总蛋白含量.

### 1.10 免疫细胞化学分析

收集各组支架, PBS 冲洗后用含 0.1% Triton X-100 的 4% 多聚甲醛固定,羊血清封闭, PBS 漂洗,一抗为 1:100 稀释的兔抗大鼠肌动蛋白(TnI)和连接蛋白(Connexin43)抗体, 4℃ 孵育过夜,二抗为 1:100 稀释的 PE 标记的羊抗兔 IgG 抗体(所有抗体都从 Santa Cruze, USA 购买), 37℃ 作用 1 h,多光子显微扫描系统 MPM 下进行观察, Laserssharp2000 分析软件进行分析.

### 1.11 Western blot 分析

经 2 周分化后收集各组支架,经细胞裂解液裂解后, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清进行 SDS-PAGE. 蛋白质样品电转入硝酸纤维素膜后用脱脂奶粉封闭. 一抗为 1:200 稀释的兔抗大鼠 TnI 和 Connexin43 抗体, 4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶连接的二抗室温作用 1 h. ECL 化学发光试剂盒检测免疫活性蛋白, Kodak 医用胶片进行曝光, Scion image 软件进行光密度分析.

### 1.12 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

收集各组支架,提取支架内细胞的总 RNA,用合成第一链 cDNA 试剂盒(TakaRa 公司,日本)逆转录合成 cDNA,并用  $\alpha$ -skA、 $\beta$ -myosin heavy chain、troponin I、connexin-43、ANP、GATA-4 和 Nkx2.5 的引物分别进行扩增, GAPDH 作为内参照. PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Scion Image 图像分析软件对电泳条带进行分析. 引物序列同前<sup>[4]</sup>.

### 1.13 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验.  $P < 0.05$  为有显著性差异.

## 2 结 果

### 2.1 支架-质粒复合物的结构和质粒从支架中的释放

扫描电镜下可见胶原-壳聚糖多孔支架孔径大小基本一致,未整合质粒的支架表面光滑(图 1a),而一些豆样的支架-质粒复合物出现在支架表面(图 1b),一些甚至整合到支架内部(箭头所示). 支架-质粒复合物的直径大约 5  $\mu$ m.

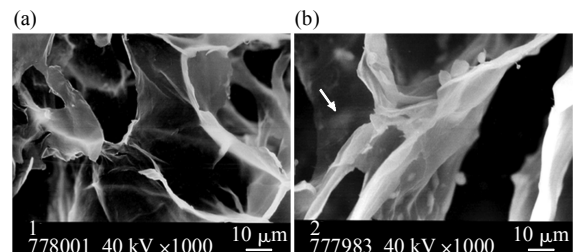
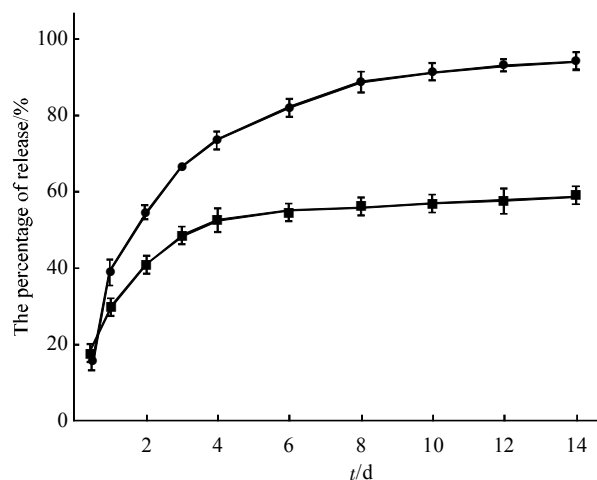


Fig. 1 Surface structure of collagen/chitosan-plasmid DNA complex was observed by SEM

(a) Collagen/chitosan scaffold without plasmid DNA as control, the surface was smooth. (b) Some bead-like complexes were shown on the surface of scaffold, some even in the scaffold (white arrow).

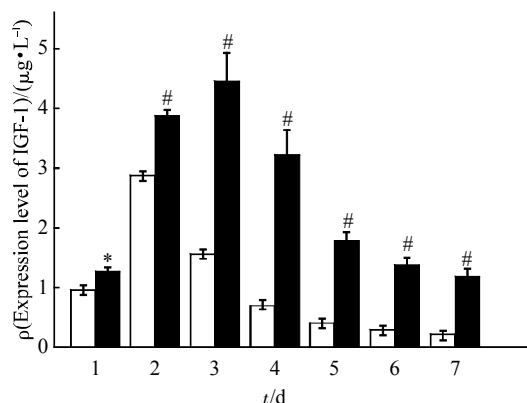
质粒释放测试的最初 3 天,质粒迅速从支架释放,静态条件下大约有 50% 质粒释放,而动态环境中约有 65% 的质粒被释放出来. 第 4 天以后,静态环境中质粒从支架中释放非常缓慢,有释放终止的迹象,2 周后仅有约 60% 的质粒释放,而动态环境中质粒持续缓慢释放,2 周后 90% 以上的质粒都得到释放,如图 2 释放曲线图所示.



**Fig. 2** *In vitro* release profiles of plasmid DNA IGF-1 from collagen/chitosan scaffold

In the first three days, plasmid DNA were released from scaffold quickly, after the fourth day, plasmid in static environment were released slowly, while under dynamic environment, plasmid were released continuously, over 90% plasmid were released by the end of two weeks. ●—●: Dynamic; ■—■: Static.

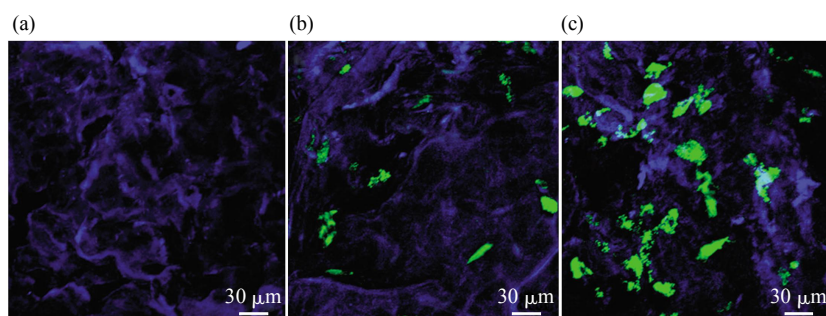
支架内脂肪干细胞中 IGF-1 蛋白在培养的最初阶段表达逐渐增加, 静、动态条件下 IGF-1 蛋白表达的峰值分别出现在第 2 天和第 3 天(图 3). 峰值过后, IGF-1 蛋白表达水平随培养时间的延长而逐渐降低, 但动态环境中 IGF-1 蛋白的表达水平明显高于静态环境, 此结果与质粒释放结果一致.



**Fig. 3** *In vitro* IGF-1 expression in ADSCs cultured by static and stirring methods

After plasmid DNA IGF-1 impregnated into collagen/chitosan scaffold and transfected ADSCs, there is a highest expression of IGF-1 protein in ADSCs under static environment, while under dynamic environment, higher expression of IGF-1 protein was continued several days. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.01$ : Significant relative to the expression level of static group. ■: Dynamic; □: Static.

转染 2 天后, 多光子显微扫描系统 MPM 观察质粒, 在支架内脂肪干细胞中表达的结果如图 4 所示, 动态环境下 IGF-1 蛋白的表达明显高于静态环境, 进一步证实了图 3 中 IGF-1 蛋白表达的分析图. 1 周后甚至可以观察到一些稳定转染的脂肪干细胞(图中未显示).



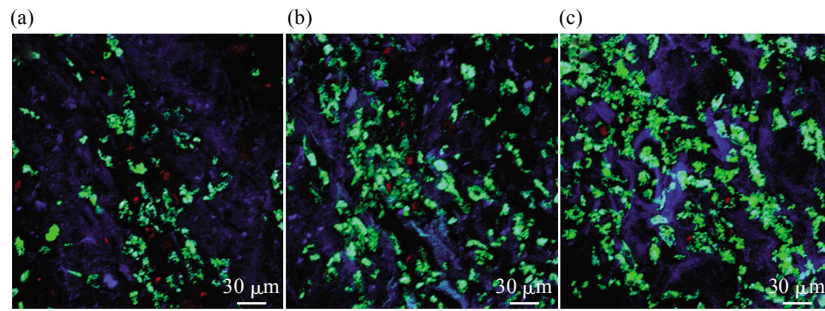
**Fig. 4** Observation of IGF-1 protein expression in ADSCs under multi-photon microscope

After two days transfection, majority of ADSCs expressed IGF-1 protein (b, c, green), stirring culture significantly increased the expression of IGF-1 protein (c). Scaffold without plasmid DNA used as control (a). Collagen showed blue under MPM.

**2.2 支架中细胞的活性及总蛋白含量**

运用 PI 和 Calcein-AM 来检测转染后细胞在支架内的活性, MPM 扫描结果如图 5 所示, 细胞能在支架内较好地黏附增殖, 未转染质粒支架内细

胞增殖能力没有转染组强, 而且死亡细胞较多(图 5a). 同时也可以观察到, 在质粒转染组, 动态环境中细胞增殖能力更强, 而且仅有很少量的死细胞(图 5c).



**Fig. 5 The viability of ADSCs in collagen/chitosan scaffold with or without plasmid DNA IGF-1**

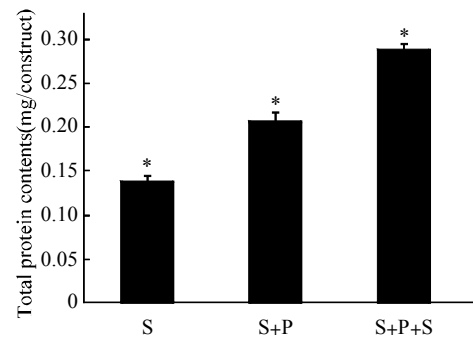
After two weeks culture, ADSCs in scaffold were dyed with Calcein-AM and propidium iodide, live cells (green) and dead cells (red) were shown in the scaffold (Collagen showed blue under MPM). (a) ADSC cultured in naked collagen/chitosan scaffold. (b) ADSC cultured in scaffold with plasmid DNA IGF-1. (c) ADSC cultured in scaffold with plasmid DNA IGF-1 under dynamic environment.

经 2 周培养后, 支架内细胞总蛋白含量如图 6 所示, 与细胞活性检测结果一致, 转染的 IGF-1 基因可提高细胞活性和细胞内总蛋白的表达, 而动态微环境进一步加强了 IGF-1 的促增殖作用。

### 2.3 心肌特异性蛋白和转录因子的表达

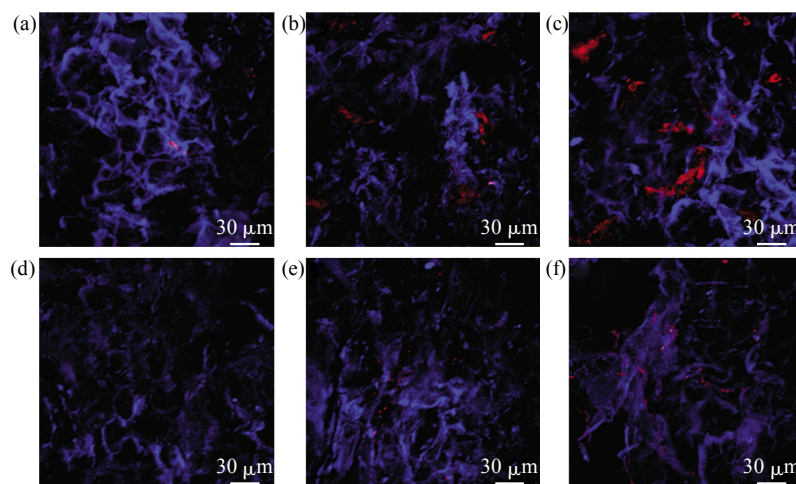
如图 7 所示, 经 2 周诱导分化后, 支架内出现一些表达心肌特异性蛋白 TnI 和 Cx43 的心肌样细胞。转染 IGF-1 后可促进 TnI 和 Cx43 蛋白的表达 (图 7b, 7e), 而在动态环境下, 细胞变长, 有的还显示出双核 (图 7c), 这些都是早期分化的表现, 虽然我们并没有看到清楚的心肌横纹。

动态环境进一步促进 TnI 和 Cx43 蛋白的表达。通过 Western blot 对 TnI 和 Cx43 蛋白表达进行定量分析, 如图 8 所示, IGF-1 在 TnI 和 Cx43



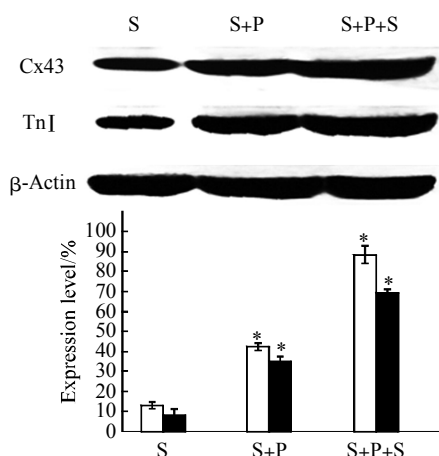
**Fig. 6 Total protein contents of cells after two weeks culture**

Total protein contents of cells were measured with BCA kit. S: ADSC+scaffold group; S+P: ADSC+scaffold-plasmid group; S+P+S: ADSC+scaffold-plasmid+spinner group. \* $P < 0.05$ : significant relative to the other group.



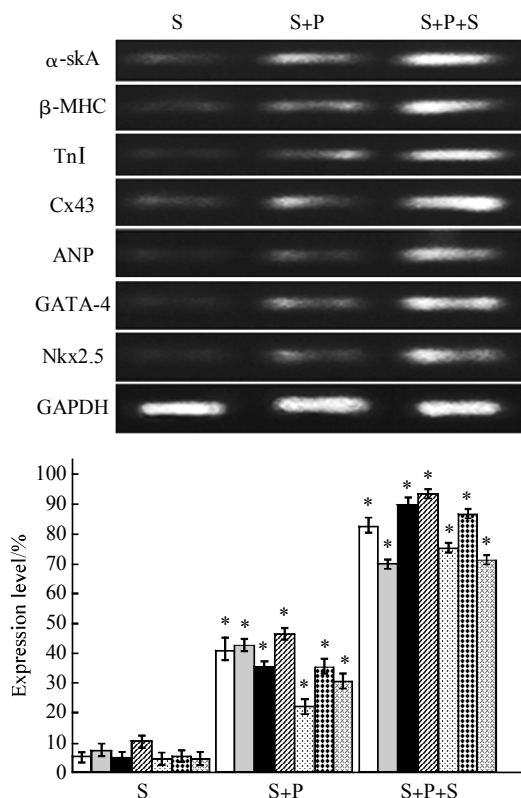
**Fig. 7 The expressions of cardiac specific proteins TnI and Cx43 were observed by multi-photon microscope**

Some cells expressed cardiac specific proteins TnI (7a, 7b and 7c, red) and Cx43 (7d, 7e and 7f, red) in collagen/chitosan scaffold (Collagen showed blue under MPM). Cardiomyocyte-like cells appeared elongated morphology, gap junction protein Cx43 between cells were also shown, although the cross-striations could not be seen clearly. (a), (d) ADSC cultured in naked collagen/chitosan scaffold. (b), (e) ADSC cultured in scaffold with plasmid DNA IGF-1. (c), (f) ADSC cultured in scaffold with plasmid DNA IGF-1 under dynamic environment.



**Fig. 8 Western blot analysis of cardiac proteins TnI and Cx43 in the differentiated ADSCs**

After two weeks differentiation with the impregnation of plasmid DNA IGF-1, some cardiomyocytes-like cells expression cardiac specific proteins TnI and Cx43, dynamic environment promoted the effect of IGF-1 significantly.  $\beta$ -Actin was as an internal control. S: ADSC + scaffold group; S+P: ADSC+scaffold-plasmid group; S+P+S: ADSC+scaffold-plasmid+spinner group. \* $P < 0.05$ : Significant relative to the other group. □ : TnI; ■ : Cx43.



**Fig. 9 RT-PCR analysis of cardiac specific genes in the differentiated ADSCs**

Cardiac specific genes  $\alpha$ -skA,  $\beta$ -MHC, TnI, Cx43, ANP, GATA-4 and Nkx2.5 were expressed with the effect of IGF-1, the expressions were promoted significantly by the effect of dynamic environment. GAPDH was used as internal control. S: ADSC + scaffold group; S+P: ADSC + scaffold-plasmid group; S+P+S: ADSC + scaffold-plasmid + spinner group. \* $P < 0.05$ : Significant relative to the other group. □:  $\alpha$ -skA; ▤:  $\beta$ -MHC; ■: TnI; ▨: Cx43; ▩: ANP; ▪: GATA-4; ▫: Nkx2.5.

蛋白的表达和心肌细胞分化中确实起到一定作用, 而动态培养环境更能促进 IGF-1 的分化作用, 此结果与 MPM 结果一致. 我们也用 RT-PCR 对支架内脂肪干细胞心肌特异性转录因子  $\alpha$ -skA,  $\beta$ -MHC, TnI, Cx43, ANP, GATA-4 和 Nkx2.5 mRNA 的表达进行检测, 如图 9 所示, IGF-1 也可促进脂肪干细胞表达心肌特异性转录因子从而促进心肌分化, 动态微环境可加强 IGF-1 的这一促分化作用.

### 3 讨 论

本研究结合组织工程和基因工程的方法, 将胶原-壳聚糖多聚支架既作为细胞生长的组织工程支架又将其作为基因转染的载体. 据我们所知, 此方法尚未见文献报道. 值得一提的是, 在三维组织构建中应用基因转染是一个较新的领域, 目前的方法主要是先在 2D 中将外源基因整合到细胞内, 筛选稳定表达的细胞, 然后将重组的细胞接种到支架上<sup>[20]</sup>, 这将是一个复杂而长期的过程. 而 Xie 等<sup>[22]</sup>和 Hosseinkhani 等<sup>[20]</sup>分别指出直接整合 cDNA 到细胞-支架构建物上或先将质粒-阳离子化明胶多聚物整合到支架, 然后接种细胞到支架上, 这两种转染方法的效率都比在 2D 中转染高. 基因转染的方法很多. 虽然病毒载体转染效率高, 但越来越多的研究者认为, 利用非病毒载体进行基因转染将是一个更好的方法, 因为其毒性低, 无免疫反应, 特别是阳离子多聚物, 其结构灵活, 易调整其分子量及聚合物合成, 而且多聚物形状可变. 壳聚糖和明胶是两个常用作基因转染的生物材料, 而本研究所制备的胶原-壳聚糖支架表面有大量的带正电荷的氨基, 易于与质粒表面带负电的磷酸基团结合, 把质粒包裹在内部, 使其不受核酸酶的降解. 带有 IGF-1 基因的质粒整合到胶原-壳聚糖支架后, 电镜观察到支架表面可见大量珠样多聚物, 甚至有些质粒整合到支架内部, 所以质粒释放动力学表现为在最初二三天质粒释放是逐渐增加, 此时支架表面的质粒逐渐释放, 而释放峰值过后, 在静态环境中, 质粒释放近乎停止. 因为质粒不仅仅是从支架表面进行简单的扩散释放, 带正电的胶原-壳聚糖与带正电的质粒结合后使多聚物紧紧地固定在支架上, 有些甚至结合到支架内部, 此时要释放质粒只有通过降解支架才能实现. 静态条件下支架的降解是很缓慢的, 而动态环境可能会促进支架的降解, 从而促进质粒的释放, 所以峰值过后动态环境中质粒持续缓慢释放, 而静态环境中质粒的释放近乎停

止。质粒与支架形成的阳离子多聚物(带正电荷)与细胞膜表面(带负电荷)的静电作用是胶原-壳聚糖-质粒多聚物黏附并进入细胞内的一个决定因素,也是基因转染很重要的第一步。IGF-1 表达检测结果表明,整合有质粒的阳离子多聚物能较好地转染支架内的干细胞,动态环境可促进质粒从支架内持续缓慢释放,转染效率比静态环境更高。一周后支架内仍可见一些稳定转染的脂肪干细胞。因此此方法比传统的直接对细胞进行质粒转染或直接加质粒到细胞-支架内效率更高,更方便。

本研究是利用 IGF-1 基因、心肌细胞培养基及动态微环境多个因素刺激来增加脂肪干细胞在 3D 构建物内的活性及向心肌细胞分化的能力。为使 IGF-1 基因在心肌组织构建中长期发挥作用,我们将 IGF-1 基因转染脂肪干细胞。IGF-1 的表达可促进心脏干细胞和早期心肌细胞存活和增殖<sup>[23]</sup>,在心肌损伤运用未分化的胚胎干细胞进行治疗时,IGF-1 的表达可提高心肌分化和心脏功能<sup>[16, 24, 25]</sup>。目前,IGF-1 是唯一一个已知的对肌细胞同时有促增殖和促分化作用的生长因子<sup>[26]</sup>。因此本研究将 IGF-1 作为目的基因转染脂肪干细胞,结果显示,IGF-1 可抑制细胞凋亡和死亡,促进细胞增殖。IGF-1 可能通过增加 PI3 激酶的水平来抑制细胞凋亡和死亡,PI3K 依赖的通路导致转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的激活,转而诱导抗凋亡因子 bcl-2 的表达<sup>[26]</sup>。除了抗凋亡和促增殖作用,IGF-1 也可诱导干细胞分化为心肌细胞<sup>[19]</sup>。心脏发育早期阶段, Troponin I (Tn I)是心肌表型出现的一个明显的标志,而 Connexin43(Cx43)是心肌细胞进行电偶联的标志蛋白。IGF-1 可促进支架内脂肪干细胞表达心肌特异性蛋白 Tn I 和 Cx43。IGF-1 可通过激活 Akt 增加细胞内  $Ca^{2+}$  水平<sup>[26]</sup>,  $Ca^{2+}$  在心肌细胞电偶联过程中起着重要作用,  $Ca^{2+}$  水平增加可能促进连接蛋白 Cx43 的表达。心脏转录因子在心脏发育过程中也起着很重要的作用。GATA-4 转录因子家族在细胞存活、增殖和分化中起着重要的作用<sup>[25]</sup>。正如本研究和其他研究<sup>[29]</sup>结果显示, IGF-1 可促进 GATA-4 的表达,而 GATA-4 与 Nkx2.5 共同作用可诱导胚胎干细胞大量心脏转录因子的表达<sup>[27]</sup>。因此在整合有质粒 IGF-1 的支架内,脂肪干细胞也表达大量的心脏转录因子。Akt 被 IGF-1 激活后也可通过 PI3 激酶信号通路增加心肌的收缩性, Akt 也是蛋白激酶 C 上游序列的启动子,而蛋白激酶 C 在心脏功能,  $Ca^{2+}$  代谢和心肌收

缩性中起着重要的作用<sup>[29]</sup>。因此 IGF-1 可通过不同或相同的信号通路抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和心肌细胞分化。

良好的组织工程种子细胞、合适的支架材料、有效的生长因子和有利的微环境对构建工程化心肌组织是很重要的,因此培养环境对工程组织的构建是非常重要的。体外构建的三维组织缺少体内正常组织拥有的血管网络,因此组织构建物内氧和营养物质的供应是一个关键问题。搅动培养可提供一个动态微环境,持续交换细胞构建物周围的培养基,因此构建物中细胞可得到充足的氧和营养物质供应。前面已提到,动态培养可通过促进支架的降解而促进质粒的释放,提高细胞内质粒的转染量及 IGF-1 的表达量。动态环境促进 IGF-1 蛋白表达也可从细胞黏附和支架的机械强度来解释。细胞黏附伸展,细胞骨架的重组启动一些信号通路来控制基因的表达<sup>[28]</sup>。我们先前的研究表明,搅动培养可促进三维支架内脂肪干细胞的增殖<sup>[18]</sup>,细胞增殖能力越强,细胞内基因转染效率越高<sup>[29]</sup>,因此动态环境中支架内质粒的释放和表达也可能与脂肪干细胞增殖的数量有关。细胞在支架内的活性在三维组织构建中是很重要的,而 IGF-1 和动态环境分别或相互作用都可促进细胞的存活和增殖。一方面动态环境可促进支架内脂肪干细胞增殖;另一方面,细胞数量的增加可提高 IGF-1 基因的转染率和表达量,动态环境可促进质粒释放,提高 IGF-1 质粒转染量和表达量,而 IGF-1 的表达可抑制细胞凋亡和死亡,促进细胞增殖。有研究表明动态环境不仅可促进细胞增殖还可促进细胞分化<sup>[30, 31]</sup>。虽然在本研究中并未涉及动态环境对支架中脂肪干细胞分化的影响,但结果显示应用多因素刺激(IGF-1 基因、心肌细胞培养基和动态环境)后细胞的分化率要高于仅单因素或双因素作用后心肌细胞的分化率<sup>[14, 30, 32]</sup>。

本研究建立了一套新的在三维支架内转染质粒并构建工程化心肌移植物的方法,但还有很多方面需要改进:可以加入转铁蛋白和氯喹来改进利用阳离子多聚物进行基因转染的效率;根据心肌电生理特性,电刺激可能有利于干细胞的分化和心肌移植物的形成;还应该对构建的心肌移植物进行功能性检测;如有可能,我们希望能进行后期临床试验。

总之,本研究用脂肪干细胞作为组织工程种子细胞,胶原-壳聚糖多孔支架既作为脂肪干细胞生长的三维支架又作为基因转染的载体,心肌细胞培养基作为分化培养基, IGF-1 作为目的基因,搅动

培养提供一个动态微环境, 从而构建三维心肌移植体。结果表明, IGF-1 质粒与胶原-壳聚糖支架形成阳离子多聚物进行基因转染比传统的方法更简单有效, 生长因子 IGF-1 可有效地促进支架内脂肪干细胞的增殖和向心肌细胞的分化, 而动态微环境可进一步加强 IGF-1 的促增殖和分化作用。因此多因素刺激对工程化心肌组织工程的设计和构建有很重要的意义。

### 参 考 文 献

- 1 Stevens K R, Pabon L, Muskheli V, *et al.* Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2008, **15**(6): 1211~1223
- 2 Tandon N, Cannizzaro C, Chao P H, *et al.* Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nat Protoc*, 2009, **4**(2): 155~173
- 3 Wu K H, Mo X M, Liu Y L. Cell sheet engineering for the injured heart. *Med Hypotheses*, 2008, **71**(5): 700~702
- 4 Zimmermann W H. Remuscularizing Failing Hearts with Tissue Engineered Myocardium. *Antioxid Redox Signal*, 2009. ahead of print
- 5 Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 2007, **25**(4): 818~827
- 6 Hong L, Peptan I A, Colpan A, *et al.* Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs*, 2006, **183**(3): 133~140
- 7 Zhu Y, Liu T, Song K, *et al.* Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the *in vitro* expansion of human adipose tissue-derived stem cells. *J Mater Sci: Mater Med*, 2009, **20**(3): 799~808
- 8 Dunn C A. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Molecular therapy*, 2005, **11**(2): 294~303
- 9 Yan J, Li X, Liu L, *et al.* Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2006, **34**(1): 27~39
- 10 Zhang Y F, Cheng X R, Wang J W, *et al.* Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta 1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochem Biophys Res Communications*, 2006, **344**(1): 362~369
- 11 Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, *et al.* Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 2006, **97**(4): 313~321
- 12 Lee M. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 2001, **18**(4): 427~431
- 13 Hosseinkhani H, Yamamoto M, Inatsugu Y, *et al.* Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials*, 2006, **27**(8): 1387~1398
- 14 Zhu Y, Liu T, Song K, *et al.* ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. *Mol Cell Biochem*, 2009, **324**(1~2): 117~129
- 15 Laustsen P G, Russell S J, Cui L, *et al.* Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol*, 2007, **27**(5): 1649~1664
- 16 Kofidis T, de Bruin J L, Yamane T, *et al.* Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells*, 2004, **22**(7): 1239~1245
- 17 Cheng M, Moretti M, Engelmayr G C, *et al.* Insulin-like growth factor-I and slow, bi-directional perfusion enhance the formation of tissue-engineered cardiac grafts. *Tissue Eng Part A*, 2009, **15**(3): 645~653
- 18 Zhu Y, Liu T, Song K, *et al.* *Ex vivo* expansion of adipose tissue-derived stem cell in spinner flask. *Biotechnology Journal*, 2009, **4**(8): 1198~1209
- 19 Radisic M, Park H, Martens T P, *et al.* Pre-treatment of synthetic elastomeric scaffolds by cardiac fibroblasts improves engineered heart tissue. *J Biomed Mat Res Part A*, 2008, **86**(3): 713~724
- 20 Hosseinkhani H, Inatsugu Y, Hiraoka Y, *et al.* Impregnation of plasmid DNA into three-dimensional scaffolds and medium perfusion enhance *in vitro* DNA expression of mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 2005, **11**(9~10): 1459~1475
- 21 Zhu Y, Liu T, Song K, *et al.* Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function*, 2008, **26**(6): 664~675
- 22 Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, *et al.* Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. *Tissue Eng*, 2006, **12**(12): 3535~3543
- 23 Torella D, Rota M, Nurzynska D, *et al.* Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res*, 2004, **94**(4): 514~524
- 24 Li Q, Yang X, Sreejayan N, *et al.* Insulin-like growth factor I deficiency prolongs survival and antagonizes paraquat-induced cardiomyocyte dysfunction: role of oxidative stress. *Rejuvenation Res*, 2007, **10**(4): 501~512
- 25 Li Z, Gu T X, Zhang Y H. Hepatocyte growth factor combined with insulin like growth factor-1 improves expression of GATA-4 in mesenchymal stem cells cocultured with cardiomyocytes. *Chin Med J (Engl)*, 2008, **121**(4): 336~340
- 26 Suleiman M S, Singh R J, Stewart C E. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol Ther*, 2007, **114**(3): 278~294
- 27 Gassanov N, Devost D, Danalache B, *et al.* Functional activity of the carboxyl-terminally extended oxytocin precursor peptide during cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, **26**(1): 45~54
- 28 Webb K, Hlady V, Tresco P A. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. *J Biomed Mat Res Part A*, 2000, **49**(3): 362~368
- 29 Suzuki K. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation*, 2001, **104**(90001): 207~218



- 30 Tandon N, Marsano A, Cannizzaro C, *et al.* Design of electrical stimulation bioreactors for cardiac tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008, **2008**: 3594~3597
- 31 King J A, Miller W M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, **11**(4): 394~398
- 32 van Dijk A, Niessen H W M, Doulabi B Z, *et al.* Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell and Tissue Research*, 2008, **334** (4): 457~467

## Differentiation Enhancement of ADSC in Scaffolds With IGF-1 Gene Impregnation Under Dynamic Microenvironment\*

ZHU Yan-Xia<sup>1)</sup>, LIU Tian-Qing<sup>1)\*\*</sup>, SONG Ke-Dong<sup>1)</sup>, MA Xue-Hu<sup>1)</sup>, CUI Zhan-Feng<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

<sup>2)</sup> Institute of Biomedical Engineering, Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)

**Abstract** Biochemical and mechanical signals enabling cardiac regeneration can be elucidated by using *in vitro* tissue engineering models. It was hypothesized that human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and three dimensional dynamic microenvironment could act independently and interactively to enhance the survival and differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) and hence the construction of engineered cardiac grafts. IGF-1 can be expressed by the ADSCs through genetic modification, which can be conveniently realized by incorporating the relevant genes into the three dimensional scaffold. ADSCs were cultured on three dimensional porous scaffolds with or without plasmid DNA PIRE2-IGF-1 in cardiac media, in dishes and in a spinning flask bioreactor respectively. Cell viability, formation of cardiac like structure, expression of functional proteins, and gene expressions were testified to the cultured constructs on day 14. The results showed that dynamic microenvironment enhanced the release of plasmid DNA; the ADSCs can be transfected by the released plasmid DNA PIRE2-IGF-1 in scaffold; IGF-1 had beneficial effects on the cellular viability and the increase of total protein; and it also increased the expressions of cardiac specific proteins and genes in the grafts. It was also demonstrated that dynamic stirring environment could promote the proliferation of ADSCs. Therefore, IGF-1, expressed by ADSCs transfected by DNA PIRE2-IGF-1 incorporated into scaffold, and hydrodynamic microenvironment can independently and interactively increase cellular viability, and interactively increased the expressions of cardiac specific proteins and genes in the grafts. The results would be useful for developing tissue engineered grafts for myocardial repair.

**Key words** adipose tissue-derived stem cells (ADSCs), cardiomyocyte, scaffold, IGF-1, bioreactor, tissue engineering

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00335

\*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30670525) and Young Teacher Culture Foundation of Dalian University of Technology (893228).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-411-84706360, Fax: 86-411-83633080, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: May 22, 2009 Accepted: July 23, 2009