

心肌样微环境诱导脂肪干细胞分化的研究*

朱艳霞¹⁾ 刘天庆^{1)**} 宋克东¹⁾ 马学虎¹⁾ 崔占峰²⁾

¹⁾大连理工大学干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024;

²⁾Oxford Centre for Tissue Engineering and Bioprocessing, Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)

摘要 微环境在促进干细胞分化过程中起着重要的作用, 研究心肌样微环境介导脂肪干细胞向心肌细胞分化有重要意义. 将脂肪干细胞与心肌细胞直接或通过细胞培养小室间接共培养, 检测脂肪干细胞的分化情况. 对于直接共培养体系, 采用绿色荧光蛋白 CFSE 对脂肪干细胞进行标记, 然后与心肌细胞以 1:5 混合后进行直接共培养, 2 周后, 通过流式细胞仪分选分化的脂肪干细胞, 并检测其分化情况. 检测方法包括: 扫描电镜和透射电镜观察细胞的超微结构; 免疫细胞化学检测心肌特异性肌球蛋白重链(MHC)、肌钙蛋白(TnI)和连接蛋白(Cx43); Western blot 定量分析; RT-PCR 检测心脏特异性转录因子 mRNA 的表达. 结果表明, 分化的脂肪干细胞呈现心肌样超微结构, 并表达心肌特异性蛋白和转录因子, 并且直接共培养体系中分化的脂肪干细胞其表达率明显高于间接共培养体系中的表达率. 因此, 在心肌样微环境中, 除了可溶性细胞因子对分化起作用以外, 心肌细胞产生的机械牵拉对脂肪干细胞向心肌细胞分化也起着重要的作用.

关键词 脂肪干细胞, 心肌细胞, 共培养, 肌钙蛋白, 连接蛋白

学科分类号 R318

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00599

心肌梗死是发病率和死亡率最高的疾病之一, 目前的治疗包括药物治疗、介入治疗和搭桥手术, 虽能缓解症状, 甚至使闭塞的血管再通, 但不能够替代坏死心肌. 心脏移植虽能彻底改善心脏状态, 但供体少, 费用高, 临床很难广泛开展. 尽管研究发现, 心肌组织中存在心脏干细胞^[1], 但数量稀少, 很难满足大面积心肌梗死心肌再生的需求, 因此, 人们一直在探讨采用其他干细胞转化为心肌细胞的可能性. 脂肪组织中存在大量的干细胞, 即脂肪干细胞(adipose tissue-derived stem cell, ADSC), 它不仅容易大量获取, 而且具有较强的增殖能力和多向分化潜能, 不仅能分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞, 还能分化为心肌细胞^[2]. 脂肪干细胞已被认为是替代骨髓间充质干细胞进行细胞移植治疗的理想种子细胞.

脂肪干细胞不仅可自发地分化为心肌细胞^[3], 还可经 5-氮杂胞苷诱导分化为心肌细胞^[2], 但 5-氮杂胞苷具有一定的基因毒性, 有研究将未经诱导的脂肪干细胞移植到动物心脏中, 一段时间后脂肪干细胞也可表达心肌特异性蛋白^[4,5], 另有学者用心肌细胞提取液诱导脂肪干细胞分化为心肌细胞并获

得成功^[6], 提示心肌微环境对脂肪干细胞的分化发挥着重要作用. 但也有研究者认为, 在心肌样微环境中干细胞分化为心肌细胞属于随机事件^[7], 将心肌细胞与骨髓间充质干细胞进行间接共培养, 或用培养过心肌细胞的培养液来培养骨髓间充质干细胞, 这两种方法培养的骨髓间充质干细胞中均未发现心肌细胞特异性蛋白表达^[8,9]. 此外, 干细胞与心肌细胞之间的直接接触是否是诱导干细胞向心肌细胞分化的必要条件, 也有很多不同的观点^[8,10,11]. 目前, 只有胚胎干细胞具有较高的心肌细胞分化率, 且分化后的细胞较易出现搏动^[12,13], 而骨髓干细胞和脂肪干细胞等向心肌细胞分化的分化率都很低, 且少有搏动出现^[3,14]. 由于来源和伦理道德问题, 胚胎干细胞的应用受到限制. 因此, 寻找一种适宜的诱导方法提高脂肪干细胞的分化率是非常必要

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

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2008-10-24, 接受日期: 2008-12-29

的. 本文将脂肪干细胞和心肌细胞进行直接共培养或通过细胞培养小室进行间接共培养, 研究心肌样微环境在脂肪干细胞向心肌细胞分化过程中的作用及机制, 以期为临床心脏病细胞移植治疗提供一个更好的方法.

1 材料与方法

1.1 脂肪干细胞的分离培养

用我们改进的方法^[2]自外科手术患者(年龄16~60岁, 经患者同意, 大连医科大学附属第二医院提供)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)的培养基终止消化, 剩余脂肪组织重复消化2~3次, 将收集到的细胞沉淀加入含10%胎牛血清DMEM(Gibco公司)重悬细胞, 移入培养瓶中, 37℃、5% CO₂培养箱孵育, 每2~3天换液. 纯化的第4代以后的细胞用于实验.

1.2 心肌细胞分离培养

用改进的方法无菌分离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, 吸取上层含单个核细胞的液体, 加入含新生小牛血清(Gibco公司)的培养基终止消化, 剩余组织重复消化2~3次, 将收集到的细胞沉淀加入含20%新生小牛血清DMEM重悬细胞, 移入培养瓶中, 37℃、5% CO₂培养箱孵育. 经50 min差速贴壁分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.

1.3 脂肪干细胞与心肌细胞共培养

脂肪干细胞与心肌细胞通过细胞培养小室(transwell, BD)进行间接共培养. 细胞培养小室半透膜的孔径为0.4 μm, 脂肪干细胞与心肌细胞密度比为1:5, 心肌细胞置于上层小室内, 脂肪干细胞置于六孔板底部. 含20%胎牛血清的DMEM作为诱导培养基, 37℃, 5% CO₂培养箱培养. 脂肪干细胞与脂肪干细胞共培养作为阴性对照, 心肌细胞作为阳性对照. 2周后收集诱导分化的脂肪干细胞进行观察检测.

在脂肪干细胞与心肌细胞进行直接共培养前, 脂肪干细胞标记上绿色荧光染料CFSE(Sigma公司), 标记的脂肪干细胞与心肌细胞以1:5混合后以密度 5×10^4 个/ml接种到培养瓶, 含20%胎牛血

清的DMEM作为诱导培养基, 37℃, 5% CO₂培养箱培养2周后, 经流式细胞仪分选收集脂肪干细胞并对分化的脂肪干细胞进行检测. 脂肪干细胞作为阴性对照, 心肌细胞作为阳性对照.

培养过程中对细胞形态改变进行观察.

1.4 分化细胞超微结构观察

通过扫描电镜观察细胞间连接情况. 细胞爬片经PBS冲洗后, 2.5%戊二醛固定3 h, PBS冲洗, 梯度酒精脱水, 真空干燥后喷金, 置于JEM-1200EX型(日本)扫描电镜下观察.

收集分化的细胞, 2.5%戊二醛前固定、饿酸后固定、脱水、包埋、超薄切片、醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色, 透射电镜(JEM-1200EX)观察细胞超微结构并摄像.

1.5 免疫细胞化学

无菌条件下取出细胞爬片, 用含0.1% TritonX-100的4%多聚甲醛固定, 羊血清封闭, PBS漂洗, 一抗为1:100稀释的兔抗大鼠肌球蛋白重链(MHC)、肌动蛋白(Tn I)和连接蛋白(Connexin43, Cx43)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, 37℃作用1 h, Hoechst 33342复染核. 于Olympus荧光显微镜下观察并摄像.

1.6 流式细胞仪分析

收集分化的脂肪干细胞, 甲醇固定, 0.1% TritonX-100透膜. 一抗为1:100稀释的兔抗大鼠MHC、Tn I和Cx43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, 37℃作用1 h, 经PBS洗涤2次后用PBS重悬细胞, 流式细胞仪(BD, San Jose, CA, USA)进行检测.

1.7 Western blot 分析

经2周培养后, 收集分化的ADSCs. 将收集的细胞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分析. 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Tn I和Cx43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软件进行吸光度分析.

1.8 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

收集间接共培养的ADSC和直接共培养经分选后的ADSC, 提取分化后ADSC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 α -skA、 β -MHC、Tn I、Cx43、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. 引物序列如下: α -skA, 5' ACC AGG GTG TCA TGG 3', 5' GTG AGC AGG GTC GGG 3', 202 bp; β -MHC, 5' GCA GAC CAT CAA GGA CCT 3', 5' GTT GGC CTG TTC CTC CGC C 3', 259 bp; Tn I, 5' CCC TGC ACC AGC CCC AAT CAGA 3', 5' CGA AGC CCA GCC CGG TCA ACT 3', 200 bp; Cx43, 5' GAATTCTGGTTATCATCGTCGG-GGAA 3', 5' TACCATGCGACCAGTGGTGCGCT 3', 259 bp; ANP, 5' GCC CTG AGC GAG CAG ACC GA 3', 5' CGG AAG CTG TTG CAG CCT A 3', 202 bp; GATA-4, 5' ACC AGC AGC AGC GAG GAG AT 3', 5' GAG AGA TAC AGT GTG CTC GT 3', 512 bp; Nkx2.5, 5' GGT GGA GCT GGA GAA GAC AGA 3', 5' CGACGCCGAAGTTCACGA-AGT 3', 536 bp; GAPDH, 5' ATT GTC AGC AAT GCA TCC TG 3', 5'GTA GGC CAT GAG GTC CAC CA 3', 555 bp.

1.9 细胞融合分析

分别对脂肪干细胞和心肌细胞标记上绿色荧光染料 CFSE (Sigma 公司)和红色荧光染料 PKH-26

(Sigma 公司), 标记的脂肪干细胞与心肌细胞以 1:5 混合后以密度 5×10^4 个/ml 接种到培养瓶, 含 20% 胎牛血清的 DMEM 作为诱导培养基, 37°C , 5% CO_2 培养箱共培养 2 周后, 荧光显微镜下观察.

1.10 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 细胞形态学观察

共培养前, 心肌细胞呈梭形或多边形, 折光性较强, 有些细胞聚集成团(图 1a), 脂肪干细胞呈长梭形, 生长具有方向性(图 1b). 脂肪干细胞与心肌细胞直接共培养前, 脂肪干细胞标记上绿色荧光染料 CFSE, 标记率达 100%(图 1c). 经 2 周共培养后, 脂肪干细胞伸展, 体积变大, 并与邻近的心肌细胞相互连接, 心肌细胞带动邻近脂肪干细胞同步收缩, 部分脂肪干细胞甚至形成肌管样结构(图 1f). 而作为阳性对照的心肌细胞与心肌细胞间相互连接并同步收缩, 收缩频率随培养时间的延长而逐渐减慢(图 1d), 作为阴性对照的脂肪干细胞完全融合, 甚至重叠生长(图 1e).

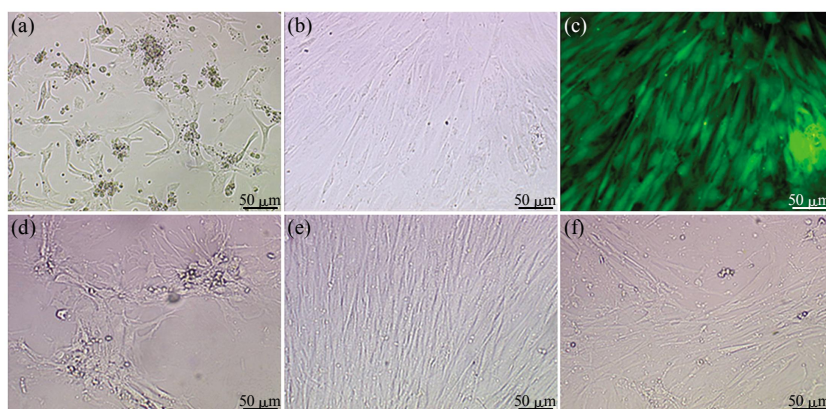


Fig. 1 Morphology changes of cardiomyocytes and ADSCs cocultured directly

Before coculturing, cardiomyocytes were isolated and purified with mitomycin C (a); ADSCs confluent completely (b) and stained with fluorescence staining CFSE (c). 14 days later, cardiomyocytes, as positive control, connected and contracted synchronously (d); ADSCs, as negative control, grew overlapped (e); After 14 day's cocultivation, ADSCs connected with cardiomyocytes and it contracted synchronously (f).

脂肪干细胞与心肌细胞通过细胞培养小室共培养 4 天后, 小室内心肌细胞相互连接并形成同步搏动(图 2b), 此时, 部分脂肪干细胞伸展, 体积比共

培养前稍大(图 2a), 2 周后, 脂肪干细胞体积进一步增大, 折光性增强(图 2c). 整个共培养过程中未观察到分化的脂肪干细胞搏动.

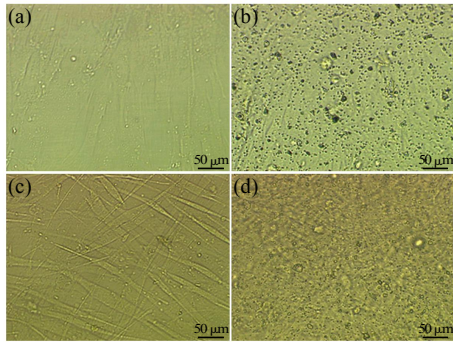


Fig. 2 Morphology changes of cardiomyocytes and ADSCs cocultured indirectly

After 4 days cocultivation, morphology of ADSCs has no significant change (a), cardiomyocytes in cell culture insert connected and contracted synchronously (b); when ADSCs and cardiomyocytes cocultured 14 days, ADSCs became bigger and elongated (c), cardiomyocytes spread and formed a cell slice (d).

2.2 细胞超微结构观察

共培养 2 周后扫描电镜的观察表明，作为阳性对照的心肌细胞间的连接清晰可见(图 3a)，阴性对照的脂肪干细胞间也可能产生相互连接(图 3b)。而脂肪干细胞与心肌细胞间接共培养 2 周后，可清晰观察到脂肪干细胞间的相互连接(图 3c)。与心肌细胞直接共培养 2 周后，也可观察到脂肪干细胞与心肌细胞间，以及脂肪干细胞间都产生相互连接(图 3d)。

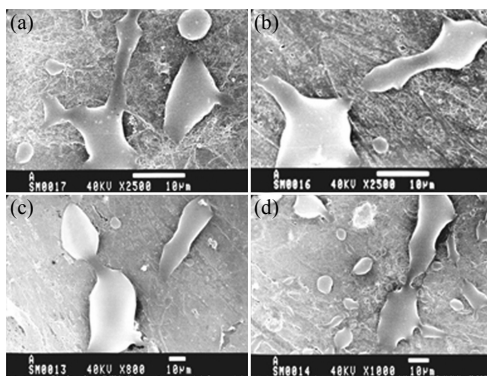


Fig. 3 Observation of cardiomyocytes and ADSCs with scanning electron microscopy

Cardiomyocytes as positive control (a), ADSCs as negative control (b). After ADSCs cocultured with cardiomyocytes indirectly or directly, ADSC-ADSC contact (c) and ADSC-cardiomyocyte contact (d) all can be observed clearly.

透射电镜下，分化的脂肪干细胞显示出均一染色质和正常的细胞核。间接共培养 2 周后，图 4a

显示分化的脂肪干细胞内出现整齐排列的肌原纤维细丝。直接共培养 2 周后，分化的脂肪干细胞内出现心肌样肌丝和横纹(图 4b)。

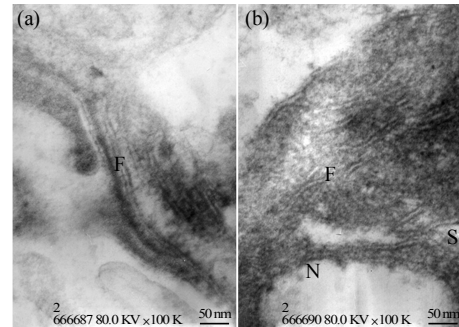


Fig. 4 Microstructure of CLCs was observed by transmission electron microscopy

CLCs showed even distribution of chromatin and a normal nucleolus (N). Compared with negative control, CLCs displayed cardiac-like myofilaments (F) and sarcomeres (S). (a) Coculture indirectly. (b) Coculture directly.

2.3 心肌特异性蛋白表达

2.3.1 免疫细胞化学分析. 经 2 周间接共培养后，分化的脂肪干细胞表达心肌特异性肌球蛋白重链 (MHC)，肌钙蛋白(troponin I, Tn I)和连接蛋白(connexin43, Cx43) (图 5b, d, f)。直接共培养后，分化的脂肪干细胞和心肌细胞都表达心肌 Tn I 和 Cx43(图 6c, f, i)。连接蛋白 Cx43 的表达进一步证实了扫描电镜和形态学结果。

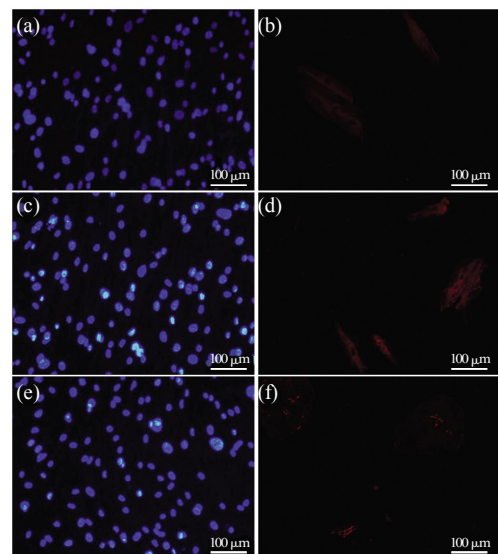


Fig. 5 Immunofluorescent staining for CLCs after indirectly cocultivated for 2 weeks

Immunofluorescent staining for cardiac MHC(b), Tn I (d) and Cx43(f) with nuclear counterstained (a, c and e) of differentiated ADSCs. Cardiomyocyte-like cells were shown in the pictures (red).

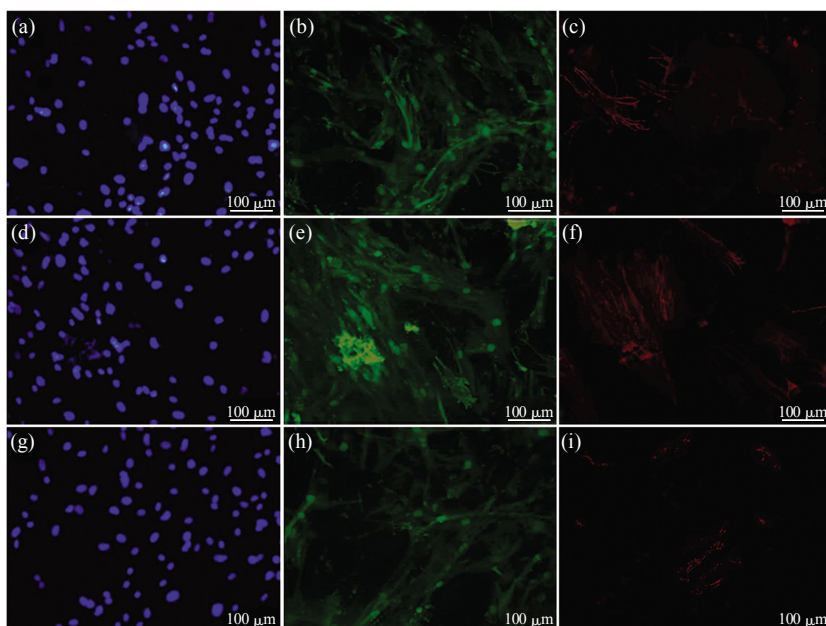


Fig. 6 Immunofluorescent staining for cardiomyocyte-like cells (CLCs) after direct cocultivation of 2 weeks

Immunofluorescent staining for cardiac MHC (c), Tn I (f) and Cx43(i) with nuclear counterstained (a, d and g). ADSCs were dyed with CFSE and shown green fluorescence (b, e and h).

2.3.2 流式细胞仪定量分析. 通过流式细胞仪对分化的脂肪干细胞心肌特异性蛋白 MHC、Tn I 和 Cx43 的表达进行定量分析(图 7). 结果与荧光染色

的结果基本一致, 直接共培养体系内, 3 种蛋白质表达率分别为 35.9%、30.8% 和 40.1%. 而经间接共培养后, 分化的脂肪干细胞心肌蛋白表达率明显

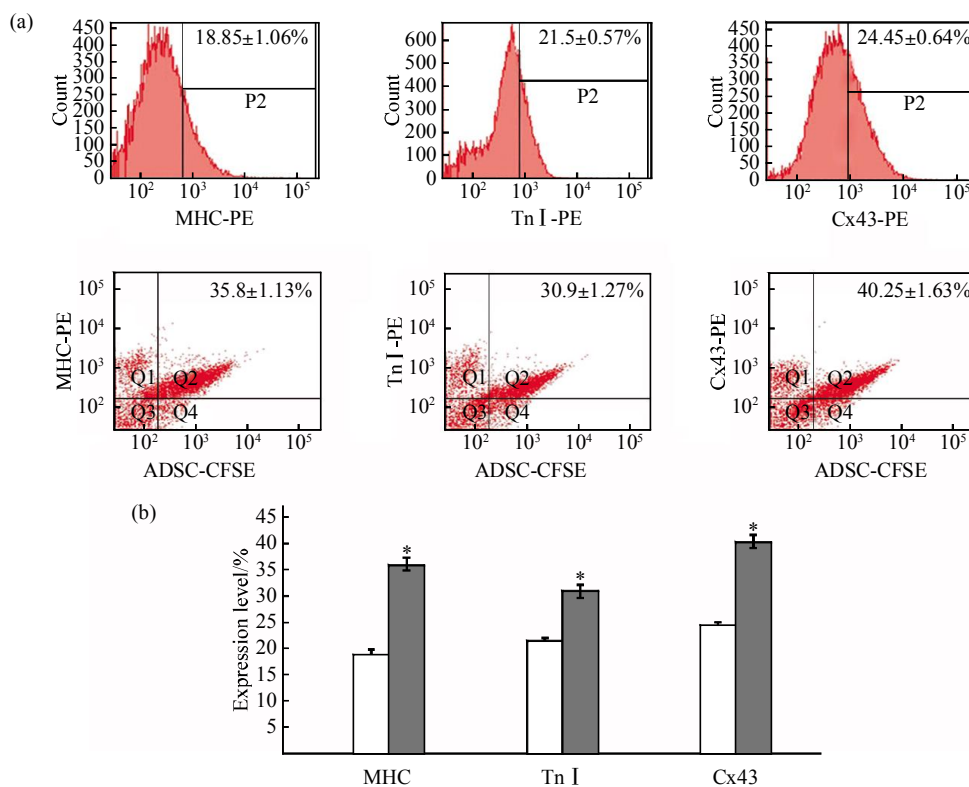


Fig. 7 Quantitative analysis of cardiomyocyte specific protein MHC, Tn I and Cx43 by flow cytometer

The expression ratios were 18.4%, 21.8% and 24.6% respectively for indirect coculture. While the corresponding data were 35.9%, 30.8% and 40.1% respectively for direct coculture. □: Indirect; ■: Direct. **P* < 0.05.

低于直接共培养组，分别为 18.4%、21.8% 和 24.6%，也就是说 20%左右的脂肪干细胞表现出心肌样表型，而在直接共培养体系中，心肌样细胞大约有 30%~40%。

2.3.3 Western blot 分析. 通过 Western blot 分析进

一步检测心肌蛋白 Tn I 和 Cx43 的表达量，由图 8 可见分化的脂肪干细胞都表达心肌蛋白 Tn I 和 Cx43，而且通过直接共培养的干细胞心肌蛋白表达率明显高于间接共培养，此结果与免疫细胞化学和流式细胞仪检测的结果一致。

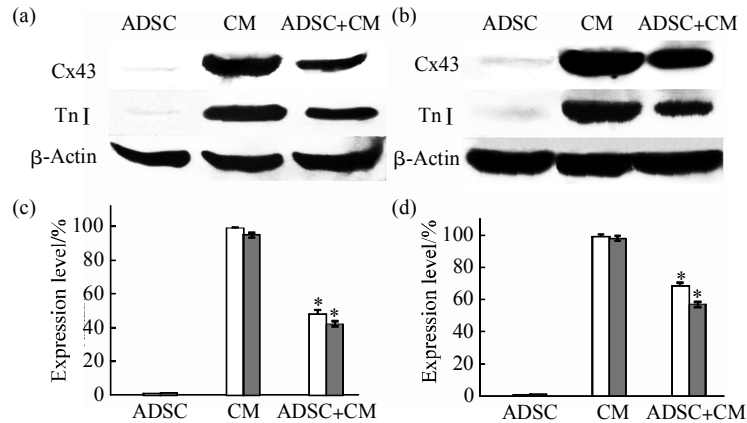


Fig. 8 Western blot analysis of cardiac Tn I and Cx43 in CLCs after 2 weeks coculture

β-Actin was as an internal control. Cardiomyocytes and ADSCs were as positive and negative control respectively. Cardiomyocyte-like cells from ADSCs which cocultured with cardiomyocytes indirectly (a) or directly (b) for 2 weeks. Results are shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). □: Cx43; ■: Tn I. * $P < 0.05$.

2.4 心肌特异性基因表达

RT-PCR 结果显示，经 2 周共培养后，分化的脂肪干细胞都能表达心脏特异性转录因子 α-skA、β-MHC、TnI、Cx43、ANP、GATA-4 和 Nkx2.5

mRNA，通过直接共培养的干细胞心脏转录因子 mRNA 表达率明显高于间接共培养。β-MHC，TnI 和 Cx43 mRNA 的阳性表达进一步证实了免疫细胞化学和 Western blot 的分析结果(图 9)。

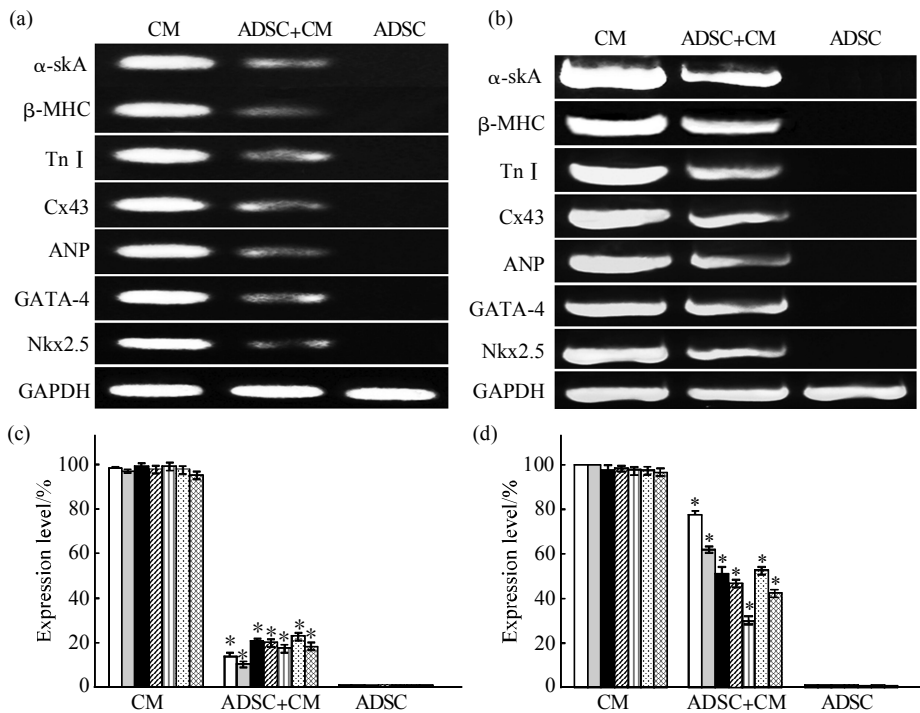


Fig. 9 RT-PCR analysis of cardiac specific genes α-skA, β-MHC, Tn I, Cx43, ANP, GATA-4 and Nkx2.5

GAPDH was used as internal control. Cardiomyocytes and ADSCs were as positive and negative control respectively. Cardiomyocyte-like cells from ADSCs which cocultured with cardiomyocytes indirectly (a) or directly (b) for 2 weeks. Results are shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 3$). □: α-skA; ▤: β-MHC; ■: Tn I; ▨: Cx43; ▩: ANP; ▪: GATA-4; ▫: Nkx2.5. * $P < 0.05$.

2.5 细胞融合的观察

脂肪干细胞与心肌细胞共培养 2 周后, 荧光显微镜下观察到带绿色荧光的脂肪干细胞(图 10a)和带红色荧光的心肌细胞(图 10b). Hechst33342 核复染(图 10c), 叠加的图片可见既显示绿色又显示红色荧光的双核细胞, 即脂肪干细胞与心肌细胞融合后的细胞(图 10d, 箭头所示), 融合的细胞很少见, 大部分细胞并未发生融合.

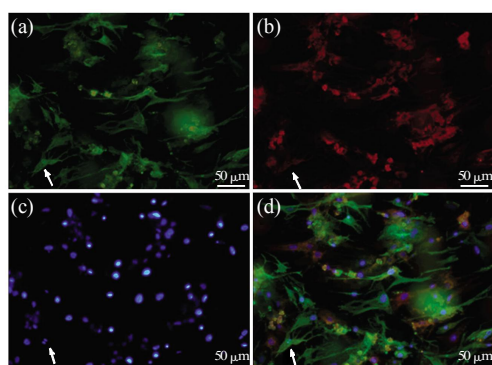


Fig. 10 Photofluorogram of ADSCs with CFSE and cardiomyocytes with PKH-26 cocultured 2 weeks

ADSCs were labeled with green fluorescent dye CFSE(a); cardiomyocytes were labeled with red fluorescent dye PKH-26 (b); nucleus were counterstained with Hechst33342(c); several cells with double nucleus showed both green and red fluorescence in merged picture(d, showed as arrow).

3 讨 论

干细胞在体内外一定条件下能分化为心肌细胞^[4, 6], 但具体机制仍不清楚. 最近有研究表明, 心肌微环境提供一定的信号分子促进心肌外干细胞分化为心肌细胞^[9, 15, 16]. Xu 等^[17]研究表明, 骨髓间充质干细胞与心肌细胞间的连接是其向心肌细胞分化的一个必要条件. 然而本研究结果与之不同, 通过细胞培养小室将脂肪干细胞与心肌细胞进行间接共培养后发现, 即使没有与心肌细胞产生连接, 脂肪干细胞仍能分化为心肌样细胞. 扫描电镜和透射电镜观察到分化的脂肪干细胞具有心肌样超微结构, 并通过 Western blot 和 RT-PCR 检测到心肌特异性蛋白和基因的表达. 此结果与 Li 等^[18]的研究结果一致, 他们发现, 骨髓干细胞并不需要与心肌细胞产生生理连接就能分化为心肌细胞. 这些结果的差异可能是因为除了心肌细胞收缩产生的机械信号, 心肌细胞也可产生多种生长分化因子, 这样一个具有多种因子的微环境也可促进干细胞向心肌细胞分化. 这一推断也符合干细胞可塑性这一特征,

即局部微环境可能是干细胞定向分化的一个决定性因素^[19, 20].

调节脂肪干细胞向心肌细胞分化的机制或信号通路还不是很清楚, 但很明显的是, 局部微环境是决定干细胞最后表型的一个重要因素. 微环境因素大致分为化学信号和机械信号^[8]. 化学信号包括细胞因子, 激素和其他通过旁分泌作用产生的可溶性因子. 而机械信号可能是由细胞搏动、细胞电生理环境和其他的局部信号产生. 脂肪干细胞与心肌细胞通过细胞培养小室间接共培养, 心肌细胞产生的可溶性细胞因子透过膜孔作用于脂肪干细胞, 促使脂肪干细胞分化为心肌细胞. 但除了可溶性信号分子, 细胞间连接产生的机械信号在微环境介导干细胞分化为心肌细胞的过程中也起着重要的作用^[8]. 对此观点, 有人持不同看法, 他们认为细胞间的连接并不是干细胞向心肌细胞分化的一个必备条件^[10, 11]. 为了进一步确定细胞间连接产生的机械信号到底在干细胞分化过程中是否起着重要的作用, 我们又将脂肪干细胞与心肌细胞进行了直接共培养.

本实验通过免疫荧光染色、流式细胞仪、Western blot 和 RT-PCR 分析表明, 分化的脂肪干细胞表达心肌特异性蛋白 MHC 和 Tn I, 而且直接共培养组的表达率(约 30%~40%)明显高于间接共培养组(约 20%), Gaustad 等^[6]用心肌细胞提取液诱导脂肪干细胞分化, 分化率也仅 20%左右, 说明通过直接共培养更容易得到心肌样表型. 这一分化率也高于骨髓干细胞向心肌细胞的分化率(约 10%)^[14], 但低于胚胎干细胞的分化率(约 70%~90%)^[12, 13]. 胚胎干细胞向心肌细胞的分化率虽然很高, 但由于伦理道德问题以及存在畸胎瘤的危险性, 到目前为止还没有进行过临床实验. 胚胎干细胞能向心肌细胞大量分化很可能是因为一系列的信号分子而不是某个特殊的因子的作用^[12], 但具体是哪些因子在起作用还不是很清楚. 下一步的任务就是找出促进胚胎干细胞向心肌细胞分化的一些有效的信号分子, 然后用这些信号分子来促进脂肪干细胞向心肌细胞的分化.

结果还表明, 共培养体系显著增加了转录因子 Nkx2.5 和 GATA-4 的表达. Nkx2.5 是一个同源异形区的转录因子, 在心脏早期发育中起着重要的作用^[21], Nkx2.5 通过与心脏锌指转录因子 GATA-4 的 C 端锌指结构相互作用来激活心脏基因的转录^[22], 重要的是, 在直接共培养体系中这两个转录

因子的表达也高于间接共培养组. 这些结果表明, 直接共培养过程中, 除了心肌细胞产生的生物化学因子, 心肌细胞产生的机械信号也可能通过细胞间连接传递到脂肪干细胞促使其分化为心肌细胞, 表达心肌样转录因子和蛋白质.

干细胞必须与邻近的心肌细胞通过缝隙连接蛋白进行电偶联, 才能表现出心肌样功能性特征^[8]. 心肌细胞间进行电偶联的一个明显的标记就是 Cx43, Cx43 可能在干细胞向心肌细胞分化的过程中起着重要的作用. 在我们的共培养体系中, 通过扫描电镜观察到脂肪干细胞与邻近的心肌细胞间进行连接, 免疫细胞化学、流式细胞仪、Western blot 和 RT-PCR 实验结果也表明, 分化的脂肪干细胞表达连接蛋白 Cx43 及其基因. 而且在普通光学显微镜下我们观察到除了心肌细胞自身, 心肌细胞和它周围的脂肪干细胞相互连接也形成同步搏动, 最后所有的细胞形成同步收缩. 虽然用心肌细胞提取液诱导脂肪干细胞分化时也可看到少量细胞搏动^[6], 骨髓干细胞和胚胎干细胞向心肌细胞分化的过程中也可看到部分细胞搏动^[12~14], 但有趣的是, 我们观察到所有脂肪干细胞与心肌细胞相互连接形成同步搏动. 当脂肪干细胞与心肌细胞进行直接共培养时, 两种细胞通过连接蛋白传递化学因子和机械信号, 而这些信号分子在脂肪干细胞分化过程中起着重要的作用. 这种连接也可在间接共培养体系中脂肪干细胞间观察到, 脂肪干细胞间的连接和信息传递更说明细胞间的化学和机械信号的传递在心肌细胞的分化过程中起着重要的作用.

有关干细胞共培养过程中的细胞融合问题, 2002 年英国和美国两组科学家同时在《自然》(Nature)上发表文章, Terada 等^[23]将骨髓干细胞和胚胎干细胞体外培养时发生自发融合, 而 Ying^[24]报道, 将大鼠神经干细胞和胚胎干细胞在体外混合培养时观察到了自发性细胞融合. 这两项研究引起一些学者对成体干细胞可塑性提出质疑, 认为这是细胞融合的结果, 并推测, 既然在体外两种干细胞能发生融合, 那么干细胞与已分化细胞之间也有可能发生融合. 因此, 我们将脂肪干细胞与心肌细胞分别标记不同荧光染料, 共培养两周后, 仅出现个别既带绿色又带红色荧光的双核细胞, 即融合细胞, 大部分细胞并未发生融合. 而流式细胞仪检测结果表明, 约有 30%~40%脂肪干细胞表达心肌细胞特异性蛋白, 说明心肌细胞横向分化并不是细胞融合的结果, Western blot 和 RT-PCR 结果进一步证明

了这一点.

本研究阐明了脂肪干细胞在心肌样环境下可不与心肌细胞直接接触, 通过心肌细胞分泌的可溶性细胞因子促使干细胞分化为心肌细胞. 除了心肌样环境中产生的可溶性因子以外, 脂肪干细胞与心肌细胞间产生连接, 从心肌细胞传递到干细胞的机械信号可进一步促进脂肪干细胞向心肌细胞分化.

参 考 文 献

- Engelmann M G, Franz W M. Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?. *Curr Opin Mol Ther*, 2006, **8**(5): 396~414
- Zhu Y X, Liu T Q, Song K D, *et al.* Adipose tissue-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Func*, 2008, **26**(5): 664~675
- Planat-Benard V, Menard C, Andre M, *et al.* Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*, 2004, **94**(2): 223~229
- Strem B M, Zhu M, Alfonso Z, *et al.* Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy*, 2005, **7**(3): 282~291
- Sohn R L, Jain M, Liao R. Adult stem cells and heart regeneration. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007, **5**(3): 507~517
- Gaustad K G, Boquest A C, Anderson B E, *et al.* Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**(2): 420~427
- Belema B F, Technau A, Ebel H, *et al.* Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(21): 9509~9519
- Schuleri K H, Boyle A J, Hare J M. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, **180**: 195~218
- Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, *et al.* Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, 2007, **28**(6): 1036~1047
- Guldner N W, Kajahn J, Klinger M, *et al.* Autonomously contracting human cardiomyocytes generated from adult pancreatic stem cells and enhanced in co-cultures with myocardial biopsies. *Int J Artif Organs*, 2006, **29**(12): 1158~1166
- Zhang D Z, Gai L Y, Liu H W, *et al.* Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction. *Chin Med J*, 2007, **120**(4): 300~307
- Bin Z, Sheng L G, Gang Z C, *et al.* Efficient cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2 combined with visceral endoderm-like cells. *Cell Biology International*, 2006, **30**(10): 769~776
- Passier R, Oostwaard D W, Snapper J, *et al.* Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells*, 2005, **23**(6): 772~780
- Li X, Yu X, Lin Q, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells

- differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, **42**(2): 295~303
- 15 Liao R, Pfister O, Jain M, *et al.* The bone marrow—cardiac axis of myocardial regeneration. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, **50**(1): 18~30
- 16 Camelliti P, McCulloch A D, Kohl P. Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional *in vitro* model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*, 2005, **11**(3): 249~259
- 17 Xu M, Wani M, Dai Y S, *et al.* Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation*, 2004, **110**(17): 2658~2665
- 18 Li X, Yu X, Lin Q, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, **42**(2): 295~303
- 19 Chen J, Wang C, Lu S, *et al.* *In vivo* chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2005, **319**(3): 429~438
- 20 Li H, Yu B, Zhang Y, *et al.* Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**(2): 320~325
- 21 Eberli D, Atala A. Tissue engineering using adult stem cells. *Methods Enzymol*, 2006, **420**: 287~302
- 22 Bai X, Pinkernell K, Song Y H, *et al.* Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **353**(3): 665~671
- 23 Terada N, Hamazaki T, Oka M, *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, **416**(6880): 542~545
- 24 Ying Q L, Nichols J, Evans E P, *et al.* Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002, **416**(6880): 545~548

Adipose Tissue-derived Stem Cells Differentiated into Cardiomyocytes in Cardiac Microenvironment*

ZHU Yan-Xia¹⁾, LIU Tian-Qing^{1)**}, SONG Ke-Dong¹⁾, MA Xue-Hu¹⁾, CUI Zhan-Feng²⁾

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

²⁾Oxford Centre for Tissue Engineering and Bioprocessing, Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)

Abstract Microenvironment plays a critical role in directing the progression of stem cells into differentiated cells. It is necessary to investigate the role of cardiac microenvironment in directing the differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). Human ADSCs were cocultured with rat cardiomyocytes directly or indirectly by cell culture inserts. For direct coculture, hADSCs were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), then mixed with cardiomyocytes at a 1 : 5 ratio in complete media and seeded at a cell density of 50 000 cells/ml. Fluorescence-activated cell sorting was used to extract and examine the directly cocultured differentiated ADSCs. For indirect coculture, differentiated ADSCs were collected directly. The assays used include scanning electron microscope(SEM) and transmission electron microscope(TEM) for the ultrastructure of differentiated cells, immunostaining against myosin heavy chain, troponin I and connexin43, Western blotting and RT-PCR for the expression of cardiac specific proteins and genes respectively. Results showed that the differentiated ADSCs experienced the coculture presented cardiac ultrastructure and expressed cardiac specific genes and proteins, and the fractions of ADSCs expressing these markers by direct coculture were higher than those of indirect coculture. These data indicate that in addition to soluble signaling molecules, the direct cell-to-cell contact is obligatory in relaying the external cues of the microenvironment controlling the differentiation of ADSCs to cardiomyocytes.

Key words adipose tissue-derived stem cells (ADSCs), cardiomyocyte, coculture, troponin I, connexin43

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00599

*This work was supported by grants from The National Natural Science 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: October 24, 2008 Accepted: December 29, 2008