

研究论文

诱导小鼠胚胎干细胞在体外分化为骨骼肌细胞的实验研究

叶枫 佟慧丽 杜巍 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 小鼠胚胎干细胞是从胚泡未分化的内部细胞团中得到的干细胞, 它在体外培养的环境中具有无限增殖、自我更新以及多向分化的特性。将小鼠胚胎干细胞在体外诱导分化为肌肉细胞, 并且利用这些分化得来的肌肉细胞治疗肌肉退行性疾病, 是干细胞研究领域的热点。该实验的目的在于筛选小鼠胚胎干细胞向骨骼肌细胞定向分化的实验条件, 有效地将体外单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞诱导分化成骨骼肌细胞。最终发现, 10^{-8} mol/L 维甲酸(retinoid acid, RA)+0.5% 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)组诱导小鼠胚胎干细胞在体外分化成骨骼肌前体细胞的效率最高, 分化得到的骨骼肌前体细胞经进一步纯化, 能分化为多核的肌管。该实验为治疗肌肉退行性疾病提供了细胞来源, 也为研究小鼠胚胎干细胞分化为骨骼肌细胞的机制提供了有利的条件。

关键词 小鼠胚胎干细胞; 骨骼肌细胞; 分化

Research of Inducing Mouse Embryonic Stem Cells Differentiate into Skeletal Muscle Cells *in vitro*

Ye Feng, Tong Huili, Du Wei, Yan Yunqin*

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Mouse embryonic stem cells are separated from the inner cell mass of embryo, with the abilities of unlimited growth, self-renewal and differentiation potential when cultured *in vitro*. Mouse embryonic stem cells can be induced to differentiate into muscle cells, which can be used in treatment of muscle degenerative diseases and is becoming a research focus of the field. The aim of this study was to obtain the effective conditions of inducing mouse embryonic stem cells differentiate into skeletal muscle cells. Results showed that 10^{-8} mol/L retinoid acid (RA) and 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) could induce mouse embryonic stem cells differentiate into skeletal muscle precursor cells with the highest efficiency, and the skeletal muscle precursor cells purified to differentiate into multinucleated myotubes. It provided cells for the treatment of muscle degenerative diseases and also can be beneficial to the study of the mechanism about mouse embryonic stem cells differentiate into skeletal muscle.

Key words mouse embryonic stem cells; skeletal muscle cells; differentiation

收稿日期: 2012-10-22 接受日期: 2012-12-04

转基因生物新品种培育科技重大专项(批准号: 2008ZX08007-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyq@neau.edu.cn

Received: October 22, 2012 Accepted: December 4, 2012

This work was supported by the Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects (Grant No.2008ZX08007-002)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55190846, E-mail: yanyq@neau.edu.cn

网络出版时间: 2013-03-04 15:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130304.1503.002.html>

在成体骨骼肌中, 卫星细胞的数量很少, 有研究认为可能是由于凋亡速度加快所致^[1]。在骨骼肌受损伤或是发生骨骼肌退行性疾病时, 卫星细胞对骨骼肌的修复能力有限^[2], 所以近年来, 有很多研究者将其他类型的细胞诱导分化成骨骼肌细胞, 通过细胞移植补充受损的肌肉组织。研究得比较早的是骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。BMSCs的分化能力很强, 能诱导分化成多种类型的细胞^[3-4]。

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有分化的全能性, 在体外培养条件下可以向三个胚层分化^[5]。研究表明, 直接移植胚胎干细胞进入肌营养不良小鼠骨骼肌内, 使其在动物体内自发地向骨骼肌方向分化的效果比较差^[6]。研究者通过转基因技术, 将*Pax3*基因转入到小鼠胚胎干细胞后, 再用药物诱导转染成功的细胞定向分化成骨骼肌细胞, 已成功治愈了肌肉受损的小鼠^[7]。将胚胎干细胞悬浮培养成拟胚体后, 再对拟胚体进行诱导也可以得到骨骼肌细胞^[8]。

除此之外, 向拟胚体中添加低浓度的药物如维甲酸(retinoic acid, RA)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、地塞米松以及bFGF、EGF、PDGF等^[9-11]细胞因子都能促进骨骼肌细胞的形成。对维甲酸在骨骼肌细胞诱导分化方面的应用已经有很多报道^[12-13]。近年来的一些研究表明, 浓度约为0.5%的二甲基亚砷在体外培养环境中诱导骨骼肌形成的效果最好^[14]。低浓度的地塞米松也可以诱导成体干细胞分化为骨骼肌细胞, 在分化后融合成肌管的骨骼肌细胞中可检测出肌球蛋白的表达^[15]。

目前, 虽然用于诱导胚胎干细胞分化为骨骼肌的方法比较多, 但分化的效率并不是很高。本实验选择单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞作为研究对象, 在维甲酸和二甲基亚砷的作用下诱导其在体外分化为骨骼肌前体细胞, 优化了在体外诱导小鼠胚胎干细胞高效分化为骨骼肌细胞的培养条件, 同时也为研究小鼠胚胎干细胞分化为骨骼肌细胞的机制提供了一种新的研究手段。

1 材料与方法

1.1 诱导小鼠胚胎干细胞分化为骨骼肌前体细胞

按照之前文献报道的方法^[13], 将胚胎干细胞按 1×10^4 /孔的密度直接接种在只铺有0.1%明胶的6

孔培养板中, 用培养液A培养单层贴壁培养的胚胎干细胞。培养液A含有DMEM high glucose、15% FBS、0.1 mmol/L非必需氨基酸、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、10 ng/mL EGF及双抗。将维甲酸的浓度按梯度设置为 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol/L四个组。在单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞自然分化3天后, 向培养液中添加这四组不同浓度的维甲酸, 并设不添加维甲酸的细胞作为对照组。通过免疫荧光和Western blot实验来检测细胞中 α -actin、Desmin和Nestin基因的表达, 比较各组细胞之间的分化情况。

筛选维甲酸诱导胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞分化的最佳浓度, 用最佳浓度的维甲酸与浓度为0.5%的二甲基亚砷联合作用组, 以及最佳浓度的维甲酸与 10^{-8} mol/L地塞米松的联合作用组, 分别诱导自然分化到第3天的单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞。在这一阶段的分化过程中使用培养液B(成分为: DMEM high glucose、10% FBS、5%马血清、0.1 mmol/L非必需氨基酸、0.2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、10 ng/mL EGF以及双抗)。在分化的第10天通过免疫荧光和Western blot实验检测 α -actin和Desmin的表达情况, 比较胚胎干细胞分化的效果。

最后, 比较诱导小鼠胚胎干细胞分化为骨骼肌前体细胞的维甲酸最佳浓度组、最佳浓度维甲酸+0.5%二甲基亚砷组和最佳浓度维甲酸+ 10^{-8} mol/L地塞米松组这三组之中的骨骼肌前体细胞的形成率, 找出最佳的分化条件。按之前实验中得到的最佳分化条件, 在培养液B的环境中诱导胚胎干细胞分化, 待分化得到的细胞长满时将细胞传代培养, 传代培养4-6次后, 观察细胞生长的状态并检测骨骼肌标志性基因的表达情况, 在光镜下观察分化得到的骨骼肌前体细胞的形态, 并通过免疫荧光的方法检测细胞中 α -actin的表达情况。并且通过免疫荧光和Western blot检测骨骼肌前体细胞分化成的肌管细胞中MyoG的表达情况, 来鉴定由胚胎干细胞分化得到的骨骼肌前体细胞在高密度生长环境中诱导分化为肌管的能力。

1.2 免疫荧光检测

将胚胎干细胞的单细胞悬液以 1×10^4 /孔的密度接种在铺有0.1%明胶的盖玻片上, 待细胞长至80%左右时, 从培养箱中取出, 去除培养液, 用PBS洗3

次。加入4%多聚甲醛固定15 min, 用PBS洗3次, 每次5 min, 然后用1% BSA封闭1 h, 加入按1:500用BSA稀释的一抗, 37 °C孵育1 h, 一抗为骨骼肌特异性标志 α -actin以及神经前体细胞标志Nestin。用PBS洗3次, 每次5 min, 加入按1:100稀释的二抗, 37 °C孵育1 h, 二抗为FITC或CY3标记的。在避光的条件下, 用PBS洗3次, 每次5 min, 最后加入DAPI孵育10 min, 用PBS洗3次, 每次5 min, 加入抗荧光淬灭剂封片, 在荧光显微镜中观察并照相。

1.3 RT-PCR检测

提取待测细胞的总RNA, 具体过程参照Trizol Reagent说明书。抽提后的RNA溶解于适量的DEPC水中(约10~20 μ L)。在20 μ L反转录体系中, 加入细胞总RNA 50 ng~5 μ g、TransScript™ RT/RI Enzyme Mix 1 μ L、2 \times ES Reaction Mix 10 μ L、Anchored Oligo(dT) 18 Primer(0.5 μ g/ μ L) 1 μ L、RNase-free Water补至20 μ L。共30个循环周期。反应条件为: 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 失活EsayScript™ RT, 反转录产物放在-20 °C保存。引物序列分别为: α -actin正义链: 5'-ATC TCA CGT TCA GCT GTG GTC A-3', 反义链: 5'-ACC ACC GGC ATC GTG TTG GAT-3', 扩增片段长度为182 bp; *Desmin*正义链: 5'-CGC TTC GCC AAC TAC AT-3', 反义链: 5'-CGC TCC AGG TCA ATA CG-3', 扩增片段长度为329 bp; *Tnni2*正义链: 5'-AGA GGT ACC GGA GAT GAG GAG AAG CG-3', 反义链: 5'-AAG GAA TTC TAG GAC TCG GAC TCA AA-3', 扩增片段长度为220 bp; GAPDH正义链: 5'-AGC CTC GTC CCG TAG A-3', 反义链: 5'-CGC TCC TGG A AG ATG G-3', 扩增片段长度为253 bp。使用LA Taq扩增基因, 反应体系为: LA Taq 0.1 μ L、10 \times LA Buffer 2 μ L、dNTP mix 1.6 μ L、cDNA 1 μ L、sense primer 1 μ L、antisense primer 1 μ L、H₂O 13.3 μ L, 共30个循环周期。每个周期包括94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 60 s。扩增产物用1.5%琼脂糖进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统照相。

1.4 Western blot检测

提取细胞的蛋白后加入等体积的2 \times 上样Buffer, 放入沸水中煮沸10 min, 将蛋白取出, 放入冰箱保存。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜, 用5%的脱脂奶粉封闭1 h后按1:500加入一抗, 37 °C脱色摇床摇1 h, 用PBST洗3次, 每次5 min。按1:1 000的比例加入HRP

标记的二抗, 37 °C脱色摇床摇1 h, 用PBST洗3次, 每次5 min。加上发光液, 在暗室中发光, 观察结果。

1.5 数据分析

对免疫荧光的结果进行计数分析, 对同一个分化组任意三个不同视野中的阳性细胞率进行统计, 取三组的平均值, 分析分化效率。利用SPSS 11.5软件, 用方差进行组间差异的分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果

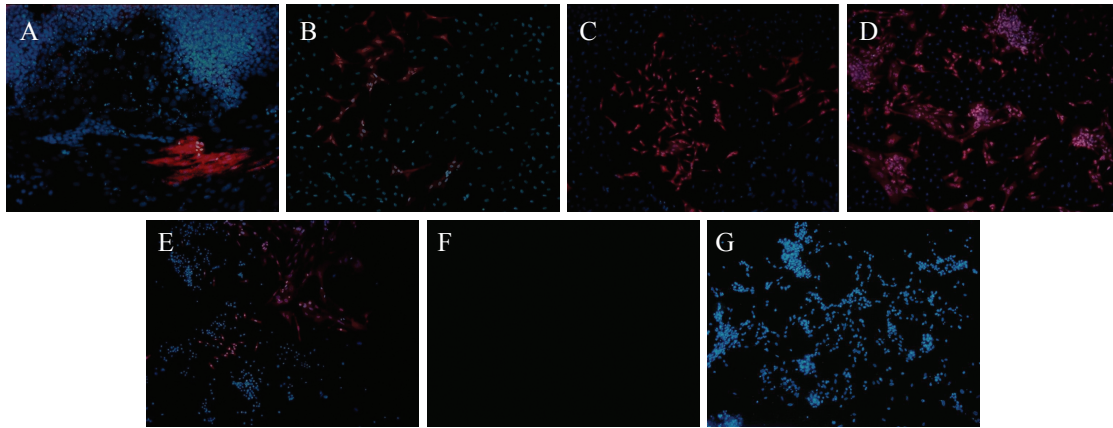
2.1 不同浓度的维甲酸诱导胚胎干细胞分化

CY3标记的骨骼肌特异性标志 α -actin的免疫荧光染色结果(图1)显示, 自然分化的胚胎干细胞中, 一小部分能自发地分化为骨骼肌前体细胞, 分化率为9.40% \pm 1.34%; 在4组分别添加了浓度为 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} mol/L维甲酸的分化组中, 胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞分化的效率依次为21.70% \pm 1.56%、40.30% \pm 2.03%、62.40% \pm 1.75%、29.30% \pm 2.28%, 从数据上可以看出维甲酸的浓度为 10^{-8} mol/L时, 分化效果最好, 各组之间差异极显著($P < 0.01$)(表1)。

神经细胞标志Nestin的免疫荧光染色结果显示, 这五个分化组中(图2A-图2E), 胚胎干细胞向神经前体细胞方向分化的效率从对照组开始依次为9.03% \pm 1.12%、68.20% \pm 0.74%、43.20% \pm 1.29%、15.20% \pm 1.15%、11.80% \pm 0.98%, 从数据上可以看出浓度为 10^{-6} mol/L的维甲酸诱导了神经细胞的大量生成, 各组之间都有极显著差异($P < 0.01$)(表2)。

Western blot实验结果显示, 从 10^{-6} mol/L RA组到 10^{-8} mol/L RA组的骨骼肌标志性因子 α -actin和Desmin的蛋白表达量逐渐升高, 10^{-8} mol/L RA组的表达量最高, 10^{-9} mol/L RA组的表达量有所降低; 从 10^{-6} mol/L RA组到 10^{-9} mol/L RA组的神经细胞标志Nestin的蛋白表达量依次降低。此外, RA处理组的骨骼肌标志基因和神经细胞标志基因的蛋白表达量都要高于胚胎干细胞自然分化的对照组(图3)。

RT-PCR结果显示, 从 10^{-6} mol/L RA组到 10^{-8} mol/L RA组的骨骼肌标志性因子 α -actin、*Desmin*和*Tnni2*的mRNA表达量逐渐升高, 10^{-8} mol/L RA组的表达量最高, 10^{-9} mol/L RA组的表达量有所降低。RA处理组的骨骼肌标志基因的mRNA表达量都要高于胚胎干细胞自然分化的对照组(图4)。

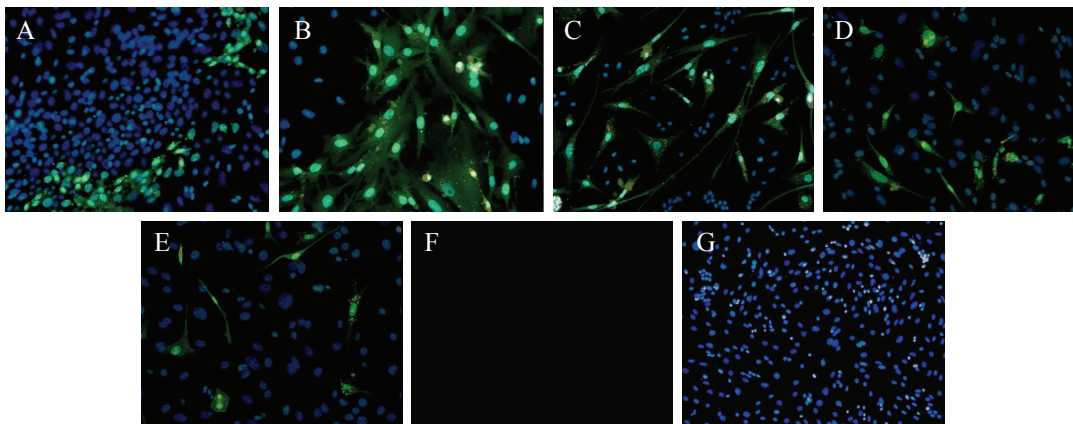


A: 胚胎干细胞自然分化的对照组; B: 10^{-6} mol/L 维甲酸处理组; C: 10^{-7} mol/L 维甲酸处理组; D: 10^{-8} mol/L 维甲酸处理组; E: 10^{-9} mol/L 维甲酸处理组; F: 阴性对照; G: 阴性对照DAPI染色的细胞核。

A: ESCs differentiation control; B: 10^{-6} mol/L RA treated group; C: 10^{-7} mol/L RA treated group; D: 10^{-8} mol/L RA treated group; E: 10^{-9} mol/L RA treated group; F: negative control; G: nucleus with DAPI tagged of negative control.

图1 骨骼肌前体细胞中 α -actin免疫荧光染色(100 \times)

Fig.1 Immunofluorescent staining of skeletal muscle progenitor cells with α -actin(100 \times)



A: 胚胎干细胞自然分化的对照组; B: 10^{-6} mol/L 维甲酸处理组; C: 10^{-7} mol/L 维甲酸处理组; D: 10^{-8} mol/L 维甲酸处理组; E: 10^{-9} mol/L 维甲酸处理组; F: 阴性对照; G: 阴性对照DAPI染色的细胞核。

A: ESCs differentiation control; B: 10^{-6} mol/L RA treated group; C: 10^{-7} mol/L RA treated group; D: 10^{-8} mol/L RA treated group; E: 10^{-9} mol/L RA treated group; F: negative control; G: nucleus with DAPI tagged of negative control.

图2 神经前体细胞的Nestin免疫荧光染色(100 \times)

Fig.2 Immunofluorescence staining of Nestin in neural progenitor cells(100 \times)

在维甲酸的诱导下,大多数细胞都分化成了骨骼肌前体细胞或神经前体细胞,但维甲酸对细胞的增殖有抑制作用,维甲酸处理组的细胞增殖能力明显比对照组细胞的增殖能力弱。

2.2 维甲酸分别与二甲基亚砜、地塞米松联合作用诱导ESCs分化

免疫荧光的结果显示, 10^{-8} mol/L RA组诱导骨骼肌前体细胞的形成率高于其他RA浓度组,选用 10^{-8} mol/L RA分别与0.5%二甲基亚砜和 10^{-8} mol/L的

地塞米松联合作用于小鼠胚胎干细胞后,骨骼肌特异性标志 α -actin大量表达(图5)。 10^{-8} mol/L RA分别与0.5%二甲基亚砜组中胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞的分化率达到了 $82.50\% \pm 2.21\%$; 10^{-8} mol/L RA与地塞米松联合处理组的骨骼肌前体细胞分化率为 $73.20\% \pm 1.87\%$,这两组之间差异极显著($P < 0.01$) (表3)。

Western blot检测显示, 10^{-8} mol/L RA+0.5% DM-SO组和 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L地塞米松组的骨骼

表1 不同浓度的维甲酸诱导胚胎干细胞分化为骨骼肌前体细胞的分化率($\bar{x}\pm s$)Table 1 Differentiation rate of ESCs-derived skeletal muscle progenitors cells induced by different concentrations of RA($\bar{x}\pm s$)

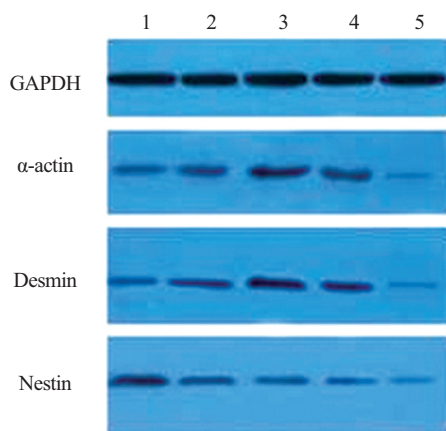
组名	诱导物	天数	分化率(%)
Group	Inducer	Days	Differentiation rate(%)
A	Control	10	9.40±1.34*
B	10 ⁻⁶ mol/L RA	3+7	21.70±1.56*
C	10 ⁻⁷ mol/L RA	3+7	40.30±2.03*
D	10 ⁻⁸ mol/L RA	3+7	62.40±1.75*
E	10 ⁻⁹ mol/L RA	3+7	29.30±2.28*

3+7代表ESC细胞自然分化3天后再添加药物诱导分化7天。* $P<0.01$ 。
3+7 stands for ESCs differentiate naturally for 3 days and induced with the drugs for 7 days. * $P<0.01$.

表3 不同处理组诱导胚胎干细胞分化为骨骼肌前体细胞的分化率($\bar{x}\pm s$)Table 3 Differentiating rate of ESCs-derived skeletal muscle progenitor cells induced by different conditions($\bar{x}\pm s$)

组名	诱导物	天数	分化率
Groups	Inducer	Days	Differentiating rate
A	10 ⁻⁸ mol/L RA	3+7	62.40%±1.75%*
B	10 ⁻⁸ mol/L RA+0.5% DMSO	3+7	82.50%±2.21%*
C	10 ⁻⁸ mol/L RA+10 ⁻⁸ mol/L DEX	3+7	73.20%±1.87%*

3+7代表ESC细胞自然分化3天后再添加药物诱导分化7天。* $P<0.01$ 。
3+7 stands for ESCs differentiate naturally for 3 days and induced with the drugs for 7 days. * $P<0.01$.



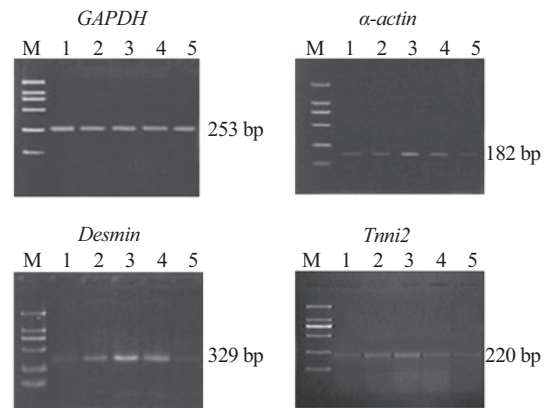
1: 10⁻⁶ mol/L RA处理组; 2: 10⁻⁷ mol/L RA处理组; 3: 10⁻⁸ mol/L RA处理组; 4: 10⁻⁹ mol/L RA处理组; 5: 正常分化的胚胎干细胞。

1: 10⁻⁶ mol/L RA treated group; 2: 10⁻⁷ mol/L RA treated group; 3: 10⁻⁸ mol/L RA treated group; 4: 10⁻⁹ mol/L RA treated group; 5: normal ESCs.

图3 α -actin、Desmin和Nestin的表达情况Fig.3 The protein expression of α -actin, Desmin and Nestin表2 不同浓度的维甲酸诱导胚胎干细胞分化为神经前体细胞的分化率($\bar{x}\pm s$)Table 2 Differentiation rate of ESCs-derived neural progenitors induced by different concentrations of RA($\bar{x}\pm s$)

组名	诱导物	天数	分化率(%)
Group	Inducer	Days	Differentiation rate(%)
A	Control	10	9.03±1.12*
B	10 ⁻⁶ mol/L RA	3+7	68.20±0.74*
C	10 ⁻⁷ mol/L RA	3+7	43.20±1.29*
D	10 ⁻⁸ mol/L RA	3+7	15.20±1.15*
E	10 ⁻⁹ mol/L RA	3+7	11.80±0.98*

3+7代表ESC细胞自然分化3天后再添加药物诱导分化7天。* $P<0.01$ 。
3+7 stands for ESCs differentiate naturally for 3 days and induced with the drugs for 7 days. * $P<0.01$.



M: DL2 000 DNA marker; 1: 10⁻⁶ mol/L RA处理组; 2: 10⁻⁷ mol/L RA处理组; 3: 10⁻⁸ mol/L RA处理组; 4: 10⁻⁹ mol/L RA处理组; 5: 正常分化的胚胎干细胞。

M: DL2 000 DNA marker; 1: 10⁻⁶ mol/L RA treated group; 2: 10⁻⁷ mol/L RA treated group; 3: 10⁻⁸ mol/L RA treated group; 4: 10⁻⁹ mol/L RA treated group; 5: normal ESCs.

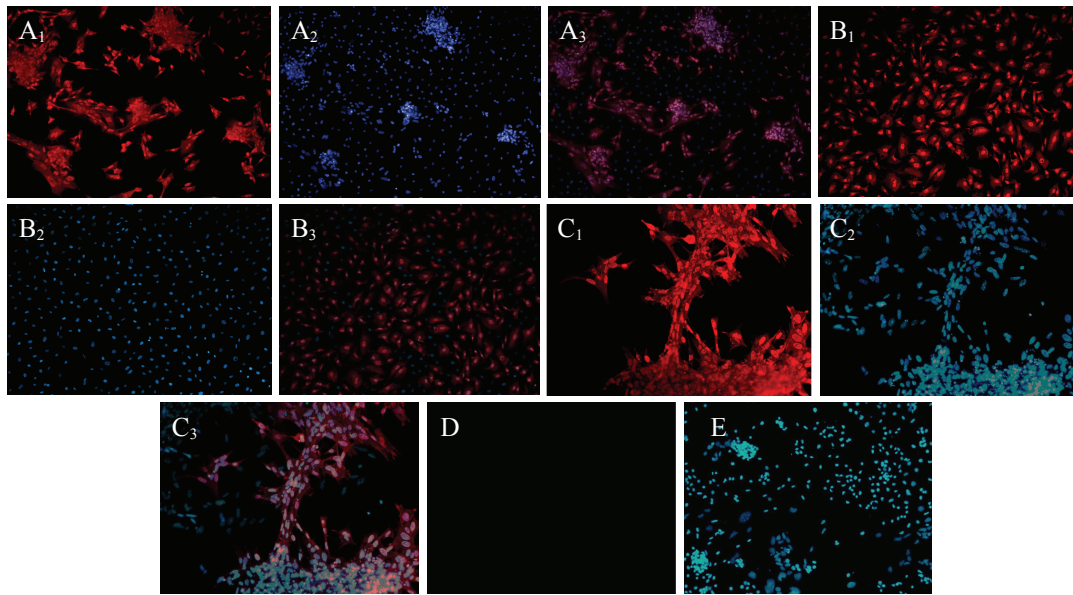
图4 α -actin、Desmin和Tnni2的mRNA表达情况Fig.4 The mRNA expression of α -actin, Desmin and Tnni2

肌标志性基因 α -actin和Desmin的蛋白表达量都高于10⁻⁸ mol/L RA组。10⁻⁸ mol/L RA+0.5% DMSO组中 α -actin和Desmin的蛋白表达量最高(图6)。

RT-PCR检测结果显示, 10⁻⁸ mol/L RA+0.5% DMSO组和10⁻⁸ mol/L RA+10⁻⁸ mol/L地塞米松组的骨骼肌标志性基因 α -actin、Desmin和Tnni2的mRNA表达量都高于10⁻⁸ mol/L RA组。10⁻⁸ mol/L RA+0.5% DMSO组中 α -actin、Desmin和Tnni2的mRNA表达量最高(图7)。

2.3 胚胎干细胞来源的骨骼肌前体细胞的传代筛选

10⁻⁸ mol/L RA+0.5% DMSO处理组中诱导形成



A₁-A₃: 10^{-8} mol/L 维甲酸处理组。A₁: 骨骼肌前体细胞中CY3标记的 α -actin的表达; A₂: DAPI染色的细胞核; A₃: A₁、A₂的合成图; B₁-B₃: 10^{-8} mol/L 维甲酸+0.5%二甲亚砜处理组。B₁: 骨骼肌前体细胞中CY3标记的 α -actin的表达; B₂: DAPI染色的细胞核; B₃: B₁、B₂的合成图; C₁-C₃: 10^{-8} mol/L 维甲酸+ 10^{-8} mol/L地塞米松处理组。C₁: 骨骼肌前体细胞中CY3标记的 α -actin的表达; C₂: DAPI染色的细胞核; C₃: C₁、C₂的合成图; D: 阴性对照; E: 阴性对照DAPI染色的细胞核。

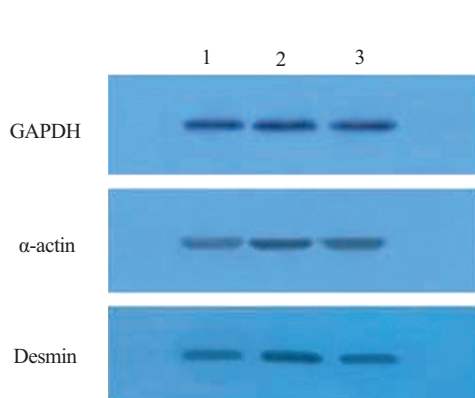
A₁-A₃: 10^{-8} mol/L RA treated group. A₁: the expression of α -actin in skeletal muscle progenitor cells, with CY3-antibody tagged; A₂: nucleus with DAPI tagged; A₃: merged figure of A₁ and A₂; B₁-B₃: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO treated group. B₁: the expression of α -actin in skeletal muscle progenitor cells, with CY3-antibody tagged; B₂: nucleus with DAPI tagged; B₃: merged figure of B₁ and B₂; C₁-C₃: 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L DEX treated group. C₁: the expression of α -actin in skeletal muscle progenitor cells, with CY3-antibody tagged; C₂: nucleus with DAPI tagged; C₃: merged figure of C₁ and C₂; D: negative control; E: nucleus with DAPI tagged of negative control.

图5 骨骼肌前体细胞 α -actin免疫荧光染色(100 \times)

Fig.5 Immunofluorescent staining of skeletal muscle progenitor cells with α -actin(100 \times)

的骨骼肌前体细胞, 在培养液B中经过进一步的传代筛选, 传代4-6次后可得到比较纯的骨骼肌前体细

胞。在光学显微镜下可以观察到, 胚胎干细胞来源的骨骼肌前体细胞的形态与成纤维细胞相似, 大部

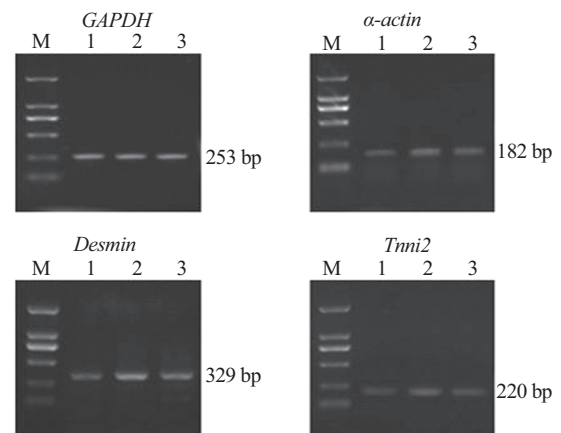


1: 10^{-8} mol/L RA组; 2: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO组; 3: 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L地塞米松组。

1: 10^{-8} mol/L RA group; 2: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO group; 3: 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L DEX group.

图6 GAPDH、 α -actin和Desmin的蛋白表达情况

Fig.6 The protein expression of GAPDH, α -actin and Desmin



M: DL2 000 DNA marker; 1: 10^{-8} mol/L RA组; 2: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO组; 3: 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L地塞米松组。

M: DL2 000 DNA marker; 1: 10^{-8} mol/L RA group; 2: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO group; 3: 10^{-8} mol/L RA+ 10^{-8} mol/L DEX group.

图7 α -actin、Desmin和Tnni2的mRNA表达情况

Fig.7 The mRNA expression of α -actin, Desmin and Tnni2

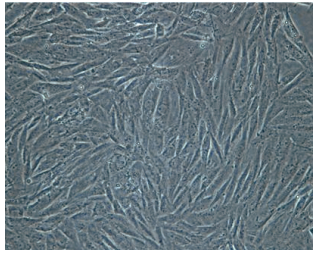


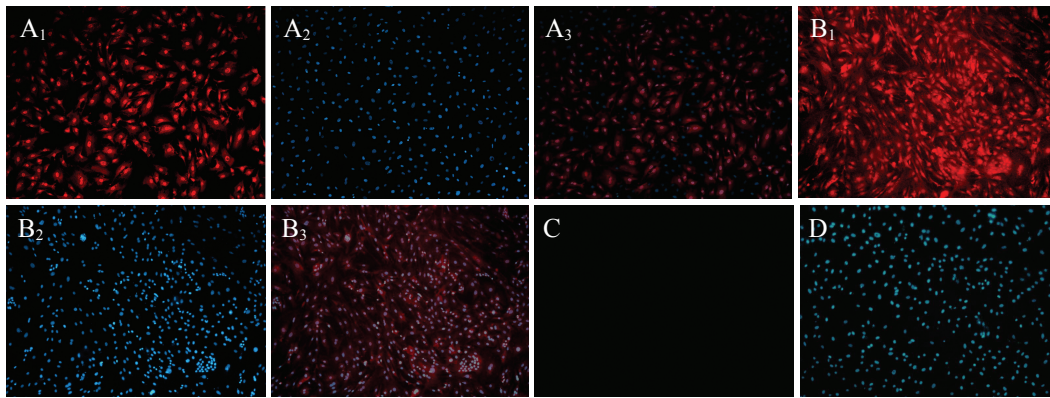
图8 胚胎干细胞来源的骨骼肌前体细胞的形态(200×)
Fig.8 Morphology of ESCs-derived skeletal muscle progenitor cells(200×)

分为梭形,少数为多角形,胞质丰富(图8)。每隔3~4 d 传代一次。

免疫荧光染色结果表明,骨骼肌前体细胞中 α -actin表达为阳性,骨骼肌前体细胞的数量占细胞总数的98%以上,明显高于传代培养之前的骨骼肌前体细胞的形成率(图9)。

2.4 胚胎干细胞来源的骨骼肌前体细胞具有分化为肌管的能力

传代培养4-6次之后,在高密度的生长环境中,骨骼肌前体细胞会自发地形成有伸缩能力的肌管。

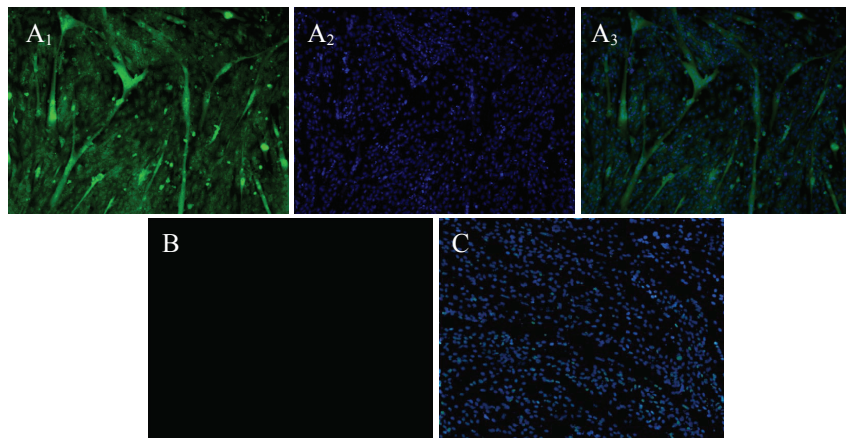


A₁-A₃: 10^{-8} mol/L 维甲酸+0.5% 二甲基亚砷处理组。A₁: 骨骼肌前体细胞中CY3标记的 α -actin的表达; A₂: DAPI染色的细胞核; A₃: A₁、A₂的合成图; B₁-B₃: 传代培养4-6次的 10^{-8} mol/L 维甲酸+0.5% 二甲基亚砷处理组。B₁: 骨骼肌前体细胞中CY3标记的 α -actin的表达; B₂: DAPI染色的细胞核; B₃: B₁、B₂的合成图; C: 阴性对照; D: 阴性对照DAPI染色的细胞核。

A₁-A₃: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO treated group, A₁: the expression of α -actin in skeletal muscle progenitor cells, with CY3-antibody tagged; A₂: nucleus with DAPI tagged; A₃: merged figure of A₁ and A₂; B₁-B₃: 10^{-8} mol/L RA+0.5% DMSO treated group after passaged four to six times. B₁: the expression of α -actin in skeletal muscle progenitor cells, with CY3-antibody tagged; B₂: nucleus with DAPI tagged; B₃: merged figure of B₁ and B₂; C: negative control; D: nucleus with DAPI tagged of negative control.

图9 骨骼肌前体细胞 α -actin免疫荧光染色(100×)

Fig.9 Immunofluorescence staining of α -actin in skeletal muscle progenitor cells(100×)



A₁: 形成肌管的骨骼肌细胞中MyoG的表达; A₂: DAPI染色的细胞核; A₃: A₁、A₂的合成图; B: 阴性对照; C: 阴性对照DAPI染色的细胞核。

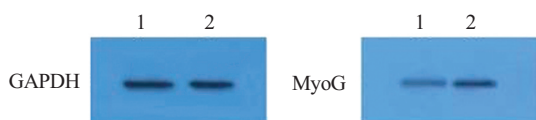
A₁: the expression of MyoG from myotubes of skeletal muscle cells; A₂: nucleus with DAPI tagged; A₃: merged figure of A₁ and A₂; B: negative control; C: nucleus with DAPI tagged of negative control.

图10 骨骼肌前体细胞分化形成的肌管中MyoG的免疫荧光染色(100×)

Fig.10 Immunofluorescence staining of MyoG in myotubes differentiation from skeletal muscle progenitor cells(100×)

免疫荧光实验结果表明, 骨骼肌细胞中MyoG的表达为阳性, 并且在形成肌管的部位发现MyoG高表达(图10)。

经Western blot实验发现, 在纯化后骨骼肌前体细胞中检测到了骨骼肌特异性基因MyoG的表达, 而且在分化成肌管的骨骼肌细胞中, MyoG的表达量更高(图11)。说明我们获得的骨骼肌前体细胞具有分化为肌管的能力。



1: 纯化后的骨骼肌前体细胞; 2: 形成肌管的骨骼肌细胞。

1: purified skeletal muscle progenitor cells; 2: skeletal muscle cells which formed myotubes.

图11 MyoG蛋白的表达情况

Fig.11 The protein expression of MyoG

3 讨论

目前, 关于小鼠胚胎干细胞定向诱导分化成其他细胞的方法多数是建立在诱导形成拟胚体的基础上的。小鼠胚胎干细胞在没有LIF因子和MEF饲养层的环境中悬浮培养会自发形成具有三个胚层的细胞聚集体, 通过模拟体内的发育过程, 使胚胎干细胞发生分化^[16]。但这种方法会导致胚胎干细胞分化的随机性增大, 分化得到的目的细胞浓度降低, 用于临床移植时会有成瘤的风险。此外, 用于分化的机制研究时也会因为杂细胞太多从而会影响研究的准确性。

本实验利用低浓度维甲酸和二甲基亚砷诱导单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞定向分化为骨骼肌前体细胞。这种在体外高效诱导单层贴壁培养的小鼠胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞分化的方法尚未见报道, 该方法诱导程序简单, 但诱导效率却很高。单层贴壁培养的体系使小鼠胚胎干细胞有相同的机会接触到促进分化的培养液, 提高了分化的同步性, 也提高了分化的效率。该方法不用通过拟胚体途径, 从而避免了拟胚体分化时产生的大量杂细胞, 为用于临床的医疗细胞提供了一个新的来源, 也为研究低浓度维甲酸诱导胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞分化的分子机制提供了一个新的平台。

维甲酸在胚胎发育中有很重要的作用, 它能调

节机体形态的发生、细胞的增殖和分化^[17]。研究人员发现, 在拟胚体贴壁后就加入维甲酸会促进胚胎干细胞分化为神经细胞, 并且抑制了胚胎干细胞向其他细胞方向分化^[18]。因此, 本实验在单层贴壁培养的胚胎干细胞自然分化3 d后, 加入不同浓度的维甲酸进行诱导分化, 增加了维甲酸诱导胚胎干细胞分化形成骨骼肌前体细胞的能力。

Bader等^[12]在2000年研究发现, 低浓度的维甲酸能诱导拟胚体形成一定量的肌肉细胞。在体外培养条件下, 不同浓度的维甲酸对单层贴壁培养的胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞和神经细胞诱导分化的比较目前尚未见报道。为了确定维甲酸诱导胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞分化的最佳浓度, 本实验设置了不同浓度的维甲酸诱导组对胚胎干细胞的分化情况进行比较, 结果发现, 在维甲酸的诱导下, 多数胚胎干细胞都向着骨骼肌前体细胞和神经细胞这两个方向分化。因此, 有效地抑制维甲酸诱导神经细胞的形成、并且促进骨骼肌前体细胞的形成是实验成功的关键。

二甲基亚砷具有诱导骨骼肌细胞分化和成熟的能力, 单独使用低浓度二甲基亚砷可以诱导胚胎干细胞分化为骨骼肌细胞, 但分化的效率不高^[19]。二甲基亚砷与维甲酸联合处理细胞, 可以放大作用的效果。Chen等^[20]研究表明, 在诱导小鼠胚胎干细胞形成心机的实验中, 二甲基亚砷和维甲酸联合作用的效果要比二者单独作用的分化效果好。Kennedy等^[21]研究表明, 二甲基亚砷和维甲酸联合作用于干细胞时, 可以提高骨骼肌前体细胞的形成率。

本实验的结果证实, 在胚胎干细胞向骨骼肌前体细胞诱导分化时, 维甲酸与二甲基亚砷联合作用的效果比较好, 这与前人的结果一致^[20-21]。因为本实验是在胚胎干细胞单层贴壁培养的基础上进行的诱导分化, 所以分化效率比以往的研究要高。

地塞米松属于糖皮质激素, 在低浓度时可以诱导骨骼肌的形成, 但高浓度时会降解骨骼肌蛋白。研究人员发现, 浓度为 10^{-4} mol/L~ 10^{-3} mol/L的地塞米松对肌管的长寿命蛋白有降解作用, 地塞米松浓度与降解值有正相关性, 但在高于 10^{-3} mol/L这个浓度值之后, 蛋白降解率趋于平稳, 不再上升^[22]。在本实验中, 地塞米松与维甲酸共同作用的分化效果没有二甲基亚砷与维甲酸共同作用的分化效果好, 这可能是由于地塞米松在诱导胚胎干细胞形成骨骼肌

前体细胞的同时, 对骨骼肌前体细胞也造成了一定的损伤所导致的。

参考文献 (References)

- 1 Brand-Saberi B. Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat* 2005; 187(3): 199-207.
- 2 Ono Y, Boldrin L, Knopp P, Morgan JE, Zammit PS. Muscle satellite cells are a functionally heterogeneous population in both somite-derived and branchiomic muscles. *Dev Biol* 2010; 337(1): 29-41.
- 3 Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Embryol Exp Morph* 1985; 7: 27-45.
- 4 Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18(12): 1417-26.
- 5 Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19(3): 193-204.
- 6 Kaji E, Leiden J. Gene and stem cell therapies. *JAMA* 2001; 285(5): 545-50.
- 7 Darabi R, Baik J, Clee M, Kyba M, Tupler R, Perlingeiro RC. Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2009; 220(1): 212-6.
- 8 Sasaki T, Matsuoka H, Saito M. Generation of a multi-layer muscle fiber sheet from mouse ES cells by the spermine action at specific timing and concentration. *Differentiation* 2008; 76(10): 1023-30.
- 9 Wakitani S, Saito T, Caplan A. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18: 1417-26.
- 10 Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, *et al.* Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004, 22:617-624.
- 11 Chan J, O'Donoghue K, Gavina M, Torrente Y, Kennea N, Mehmet H, *et al.* Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells* 2006; 24: 1879-91.
- 12 Bader A, Al-Dubai H, Weitzer G. Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions. *Circ Res* 2000; 86: 787-94.
- 13 Karen AM, Tammy P, Virja M, Scott DR, Feodor P, Vian P, *et al.* Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative β -catenin. *BMC Biol* 2009; 7: 67.
- 14 Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW. Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J Anat* 2002; 200(3): 249-58.
- 15 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7(2): 211-28.
- 16 Ying Q, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monolayer. *Nat Biotechnol* 2003, 21(2): 183-6.
- 17 Kim M, Habiba A, Doherty JM, Mills JC, Mercer RW, Huettner JE. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. *Dev Biol* 2009; 328(2): 456-71.
- 18 Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* 1995; 168(2): 342-57.
- 19 Dinsmoer J, Ratliff J, Deacon T, Pakzaban P, Jacoby D, Galpern W, *et al.* Embryonic stem cells differentiated *in vitro* as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 1996; 5: 131-43.
- 20 Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Guo J, Zhou QJ, Yao X, *et al.* Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Cell Biol Int* 2006; 30(4): 301-7.
- 21 Kennedy K, Porter T, Mehta V, Ryan SD, Price F, Peshdary V, *et al.* Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative β -catenin. *BMC Biol* 2009; 7: 67.
- 22 Roos-Mattjus P, Sistonen L. The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann Med* 2004; 36(4): 285.