

TBX3 及 TBX18 在人源诱导多能干细胞向窦房结样细胞富集分化中的作用



刘锋¹, 方易冰¹, 熊琪¹, 罗良琴², 周锐³, 廖斌¹

1. 西南医科大学附属医院心脏大血管外科 (四川泸州 646000)
2. 西南医科大学附属医院普胸外科 (四川泸州 646000)
3. 西南医科大学心血管医学研究所 (四川泸州 646000)

【摘要】 目的 探索过表达 TBX3、TBX18 在人源诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, HiPS) 向窦房结样细胞富集分化的作用。方法 取 HiPS, 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 检测其干性标记物 OCT3/4、SOX2、NANOG 表达, 并与人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 比较; 免疫荧光染色观察 HiPS 干性标记物 OCT3/4、NANOG、SSEA4 和 TRA-1-60 表达。将 HiPS 向心肌细胞定向分化, qRT-PCR 检测心肌前体细胞特异性基因 ISL1、NKX2-5 (NK2 homeobox 5) 以及心肌细胞特异标记物 ACTN1、TNNT2 表达, 以成人心肌细胞 (human adult cardiomyocytes, hACM) 作为阳性对照; 免疫荧光染色观察心肌前体细胞特异核转录因子 NKX2-5, 心肌细胞特异性收缩蛋白肌球蛋白 (cardiac troponin, cTnT)、 α -辅肌动蛋白 (α -actinin), 以及心房肌球蛋白轻链 (myosin light chain 2A, MLC-2A) 和心室肌球蛋白轻链 (myosin light chain 2V, MLC-2V) 表达; 流式细胞术检测 α -actinin 阳性率。在 HiPS 向心肌细胞定向分化第 3 天 (中胚层阶段), 以慢病毒方式过表达窦房结相关基因 TBX3、TBX18, 继续培养至 21 d, 采用 qRT-PCR 检测窦房结细胞特异性标记物 TBX3、TBX18、SHOX2、NKX2-5、HCN4、HCN1 相对表达量, 以增强绿色荧光蛋白空白病毒为对照。结果 OCT3/4、SOX2、NANOG 在 HiPS 和 ESCs 中均高表达, 各基因相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); OCT3/4 和 NANOG 在 HiPS 中特异分布于细胞核中, SSEA4 和 TRA-1-60 分布于细胞膜上。HiPS 向心肌细胞分化 5、7、21、28 d 时 ISL1 基因以及分化 7、21、28 d 时 NKX2-5 基因相对表达量均显著高于 hACM ($P<0.05$), 分化 3、5、7、21 d ACTN1 和 TNNT2 基因相对表达量均显著低于 hACM ($P<0.05$)。NKX2-5 在绝大部分细胞核中表达; cTnT 和 α -actinin, MLC-2A 和 MLC-2V 信号定位于细胞质中, 并初步呈现出肌小结纹理样结构。流式细胞术检测示 HiPS 向心肌细胞诱导分化成功。过表达 TBX3 组中, TBX18、SHOX2、HCN4、HCN1 较对照组表达均有上调, 且 SHOX2 基因相对表达量差异有统计学意义 ($P<0.05$); NKX2-5 基因相对表达量虽低于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。过表达 TBX18 组中, 各基因相对表达量与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 HiPS 和 hESCs 的多能性相近, 建立了稳定的 HiPS 干性维持及培养方法; 成功建立 HiPS 向心肌细胞高效分化技术平台; 尽管 TBX3、TBX18 在 HiPS 向窦房结样细胞富集分化中的促进作用不显著, 但 TBX3 呈现出一定促进趋势, 未来可进一步探索。

【关键词】 人诱导多能干细胞; TBX3; TBX18; 窦房结样细胞

Role of over-expression of TBX3 and TBX18 in the enrichment and differentiation of human induced pluripotent stem cells into sinoatrial node-like cells

LIU Feng¹, FANG Yibing¹, XIONG Qi¹, LUO Liangqin², ZHOU Rui³, LIAO Bin¹

1. Department of Cardiac Macrovascular Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan, 646000, P.R.China
2. Department of General Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou Sichuan, 646000, P.R.China
3. Institute of Cardiovascular Medicine, Southwest Medical University, Luzhou Sichuan, 646000, P.R.China

Corresponding authors: ZHOU Rui, Email: zhouhuaxizhu@126.com; LIAO Bin, Email: 1875153677@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the role of over-expression of TBX3 and TBX18 in inducing human induced pluripotent stem cells (HiPS) to enrich and differentiate into sinoatrial node-like cells. **Methods** The expression of stemness markers OCT3/4, SOX2, and NANOG in HiPS was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-

PCR), and compared with human embryonic stem cells (hESCs). Immunofluorescence staining was used to observe the expression of HiPS stemness markers OCT3/4, NANOG, SSEA4, and TRA-1-60. The HiPS were directional differentiated into cardiomyocytes, the expressions of ISL1, NK2 homeobox 5 (NKX2-5), ACTN1, and TNNT2 were detected by qRT-PCR, and human adult cardiomyocytes (hACM) were used as positive control. Immunofluorescence staining was used to observe the expressions of NKX2-5, cardiac troponin (cTnT), α -actinin, atria myosin light chain 2A (MLC-2A), and ventricular myosin light chain 2V (MLC-2V). The positive rate of α -actinin was detected by flow cytometry. On the 3rd day after HiPS were differentiated into cardiomyocytes (mesodermal stage), lentiviral over-expressions of sinoatrial node-related genes TBX3 and TBX18 were carried out for 21 days. The relative expressions of specific markers TBX3, TBX18, SHOX2, NKX2-5, HCN4, and HCN1 in sinoatrial node cells were detected by qRT-PCR, and compared with enhanced green fluorescent protein blank virus. **Results** OCT3/4, SOX2, and NANOG were highly expressed in HiPS and ESCs, and there was no significant difference in the relative expression of each gene ($P>0.05$); OCT3/4 and NANOG were specifically distributed in the nucleus of HiPS, while SSEA4 and TRA-1-60 were distributed in the cell membrane. The relative expressions of ISL1 gene at 5, 7, 21, and 28 days and NKX2-5 gene at 7, 21, and 28 days of HiPS differentiation into cardiomyocytes were significantly higher than those of hACM ($P<0.05$), and the relative expressions of ACTN1 and TNNT2 genes at 3, 5, 7, and 21 days of HiPS differentiation into cardiomyocytes were significantly lower than those of hACM ($P<0.05$). NKX2-5 was expressed in most of the nuclei, cTnT and α -actinin, MLC-2A and MLC-2V signals were localized in the cytoplasm, presenting a texture-like structure of muscle nodules. Flow cytometry results showed that HiPS was successfully induced to differentiate into cardiomyocytes. The expressions of TBX18, SHOX2, HCN4, and HCN1 in the over-expression TBX3 group were up-regulated when compared with the control group, and difference in the relative expression of SHOX2 gene was significant ($P<0.05$); the relative expression of NKX2-5 gene was lower than that in the control group, but there was no significant difference ($P>0.05$). There was no significant difference in the relative expression of each gene between the over-expressed TBX18 group and the control group ($P>0.05$). **Conclusion** HiPS and hESCs have similar pluripotency, and we have established a stable method for maintaining and culturing the stemness of HiPS. A technological platform for the efficient differentiation of HiPS into cardiomyocytes has been successfully established. Although TBX3 and TBX18 do not play a significant role in promoting the enrichment and differentiation of HiPS into sinoatrial node-like cells, TBX3 shows a certain promoting trend, which can be further explored in the future.

【Key words】 Human derived induced pluripotent stem cells; TBX3; TBX18; sinoatrial node-like cells

病态窦房结综合征 (sick sinus syndrome, SSS) 是一系列因心脏起搏器窦房结功能紊乱所引起的相关疾病的统称。SSS 可通过引发窦房结功能衰竭进而导致循环衰竭。目前, 对 SSS 的治疗主要依赖于人造电子心脏起搏器的植入。该方法在一定程度上很好地改善了上述症状, 但仍存在对机体激素刺激不敏感、感染、电池失效、血栓形成等不足^[1]。这些问题有望通过多能干细胞制备的“生物起搏器”得到解决。

2006 年 Takahashi 等^[2]将 OCT4、SOX2、C-MYC 和 KIF4 等 4 个转录因子导入小鼠成纤维细胞中, 成功获得了诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)。随后 Huangfu 等^[3]在 2007 年利用相同方式将人皮肤成纤维细胞 (human fibroblasts, HFB) 重编程为多能干细胞, 即人源 iPS (human derived iPS, HiPS)。近年来, 也有研究报道将脂肪干细胞、人羊膜间充质干细胞诱导为韧带成纤维细胞、肝细胞等多种体细胞^[4-5]。HiPS 具有和胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 相似的多

向分化潜能, 可诱导分化为几乎所有类型的体细胞, 包括心肌细胞、神经细胞等终末分化细胞^[6-7]。有研究显示, 通过瞬时激活 Wnt 通路后瞬时抑制 Wnt 通路, 可以实现 HiPS 向心肌细胞高效分化^[8]。然而, 该方案获得的心肌细胞为混合细胞, 其中以心室肌细胞为主、心房细胞为辅, 而窦房结细胞所占比例极低。据报道, TBX18 (T-box18) 基因是窦房结早期从头部合成的关键基因, 而且可以重编程房室心肌向窦房结细胞转化, 而 TBX3 (T-box3) 基因在体内整个窦房结发育过程中持续表达^[9-10]; 提示上述转录因子可能在窦房结细胞分化中发挥重要作用。目前尚未见在 HiPS 单层培养诱导为心肌细胞基础上, 过表达 TBX3 或 TBX18 定向诱导分化为窦房结细胞的报道。本研究拟在 HiPS 诱导为心肌细胞的中胚层阶段通过慢病毒转染 TBX3 或 TBX18 转录因子, 探索其在窦房结样细胞富集分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

HiPS 系 (LHPB-YaabC3)、HiPS 维持培养基 (PM1 培养基)、人 ESCs (human ESCs, hESCs) 系 (HN4) (广州皓昇莱生物制药有限公司); HFB (美国 ATCC 细胞库); TBX3、TBX18 过表达慢病毒 (上海和元生物技术股份有限公司); Wnt 通路激活剂 CHIR-99021、Wnt 通路抑制剂 IWP-2 (Selleck 公司, 美国); 鼠抗 α -辅肌动蛋白 (α -actinin) 抗体 (Sigma-Aldrich 公司, 美国); 鼠抗 NKX2-5 (NK2 homeobox 5)、兔抗心肌细胞特异性收缩蛋白肌球蛋白 (cardiac troponin, cTnT)、鼠抗心房肌球蛋白轻链 (myosin light chain 2A, MLC-2A)、兔抗心室肌球蛋白轻链 (myosin light chain 2V, MLC-2V) 抗体 (Abcam 公司, 美国); DAPI、兔抗 OCT3/4 单克隆抗体、兔抗 NANOG 单克隆抗体、鼠抗 SSEA4 单克隆抗体、鼠抗 TRA-1-60 单克隆抗体、Alexa Fluor488 标记抗兔二抗、Alexa Fluor594 标记抗兔二抗、Alexa Fluor488 标记抗鼠二抗 (Cell Signaling Technology 公司, 美国); Toyobo 逆转录试剂盒、QuantiTect SYBR[®] Green PCR 试剂盒、实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (Thermo Fisher 公司, 美国); RNA 提取试剂 Nucleo Zol (Invitrogen 公司, 美国)。

细胞培养箱 (SANYO 公司, 日本); 倒置相差显微镜、荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本); 流式细胞仪 (BD 公司, 美国); RT-PCR 仪 (Thermo Fisher 公司, 美国); 紫外分光光度仪 (NanoDrop 公司, 德国)。

1.2 HiPS 培养及鉴定

1.2.1 HiPS 培养 取 HiPS 系 (LHPB-YaabC3), 用 PM1 培养基于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养, 培养 3 d 取融合度达 70%~80% 且处于对数生长期的细胞用于后续实验, 倒置相差显微镜观察细胞形态。

1.2.2 qRT-PCR 检测干性标记物表达 取 HiPS、HFB、hESCs, 采用 qRT-PCR 法检测各细胞干性标记物 OCT3/4、SOX2、NANOG 基因表达。使用 Nucleo Zol 按照操作说明书对细胞样品进行 RNA 提取, 用 Nanodrop 测量 RNA 浓度, Toyobo 逆转录试剂盒制备 cDNA。采用 QuantiTect SYBR[®] Green PCR 试剂盒检测各基因表达, 以人源 GAPDH 作为内参。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火/延伸 15 s, 40 个热循环。溶解曲线: 95℃、2 min, 60℃、20 s, 95℃、15 s, 从 60℃ 缓慢加热到 99℃。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算各基因相对表达量, 各基因引物序列见表 1。

1.2.3 免疫荧光染色观察干性标记物表达 取 HiPS 以 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% Triton X-100 通透 15 min; 牛血清白蛋白封闭 30 min, 加入一抗 [兔抗 OCT3/4 单克隆抗体 (1:50)、兔抗 NANOG 单克隆抗体 (1:50)、鼠抗 SSEA4 单克隆抗体 (1:50)、鼠抗 TRA-1-60 单克隆抗体 (1:50)] 4℃ 过夜, 二抗 [Alexa Fluor594 抗兔二抗、Alexa Fluor488 抗兔二抗、Alexa Fluor488 抗鼠二抗 (1:500)], 室温避光 1 h。DAPI 复染, 荧光显微镜观察。

1.3 HiPS 向心肌细胞定向分化及检测

1.3.1 定向分化 取 HiPS 以 1.2×10⁵ 个/孔密度接种于 12 孔板, 融合度达 100% 时 (记为 0 d), 以 6 μ mol/L CHIR-99021 作用 24 h; 更换 PM1 培养基培养 48 h, 加入 5 μ mol/L IWP-2 作用 48 h, 换液; 分化第 7 天后每 3 天换液 1 次, 各时间点进行以下检测。

1.3.2 qRT-PCR 检测心肌细胞特异性标记物表达

分别于分化 0、3、5、7、21、28 d 取出细胞, 同 1.2.2 方法检测心肌前体细胞特异性基因 ISL1 (ISL LIM homeobox 1)、NKX2-5, 以及心肌细胞特异标记物 ACTN1 (actinin alpha 1)、TNNT2 (troponin T2, cardiac type) 基因表达, 以成人心肌细胞 (human adult cardiomyocytes, hACM) 作为阳性对照, 用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算其倍数变化关系作为各基因相对表达量。各基因引物序列见表 1。

1.3.3 免疫荧光染色观察心肌细胞特异性标记物

分化 21 d 取出细胞, 同 1.2.3 方法, 采用免疫荧光染色法检测心肌前体细胞特异核转录因子 NKX2-5、cTnT、 α -actinin, 以及心房、心室特异表达蛋白 MLC-2A 和 MLC-2V 的表达。

1.3.4 细胞流式术检测 取 HiPS 按照 1.3.1 方法向心肌细胞定向分化作为实验组, 自分化细胞作为对照组。培养 21 d 以 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.2% Triton X-100 通透 15 min; 牛血清白蛋白封闭 15 min, 加入一抗 (鼠抗 α -actinin 抗体, 1:100) 4℃ 过夜, 二抗 (Alexa Fluor488 抗鼠二抗, 1:500) 室温避光 30 min, 采用流式细胞仪检测各组 α -actinin 阳性率。

1.3.5 诱导心肌细胞的形态和功能检测 同 1.3.4 方法分组, 培养 21 d 采用倒置相差显微镜观察两组细胞形态。培养过程中注意观察细胞初始搏动时间, 并计算 21 d 时细胞搏动频率和细胞搏动比例。

1.4 病毒转染 HiPS 相关观测

1.4.1 最佳转染复数 (multiplicity of infection,

MOI) 确定 取 HiPS 按照 1.3.1 方法向心肌细胞定向分化, 第 3 天(中胚层阶段)用增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)空白病毒分别以 MOI 为 5、25、50、75 转染, 于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养, 静置转染 8 h, 换液, 继续培养至 48 h 后用荧光显微镜观察其转染效率, 筛选出最佳 MOI。

表 1 qRT-PCR 各基因引物序列
Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR genes

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
OCT3/4	上游 CTGGGTTGATCCTCGGACCT Upstream 下游 CCATCGGAGTTGCTCTCCA Downstream
SOX2	上游 GCCGAGTGGAACTTTTGTGCG Upstream 下游 GGCAGCGTACTTATCCTTCT Downstream
NANOG	上游 TTTGTGGCCTGAAGAAAACCT Upstream 下游 AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG Downstream
ISL1	上游 ATCAGGTTGTACGGGATCAAATG Upstream 下游 ATGTGATACACCTTGGAGCG Downstream
NKX2-5	上游 CAAGTGTGCGTCTGCCTTT Upstream 下游 CAGCTCTTTCTTTTCGGCTCTA Downstream
ACTN1	上游 TCCATCGGAGCCGAAGAAATC Upstream 下游 GTGTCCGGTGGATCAAAGCACA Downstream
TNNT2	上游 TTCACCAAGATCTGCTCCTCGCT Upstream 下游 TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGTGG Downstream
TBX3	上游 CCCGGTCCACATTGTAAGAG Upstream 下游 GTATGCAGTCACAGCGATGAAT Downstream
TBX18	上游 GACGATCTTCTCCCATCAAGC Upstream 下游 CTATCTCAGGCGAGTAATCTGC Downstream
SHOX2	上游 CAAAGAGGATGCGAAAGGGAT Upstream 下游 AGTGGGTCTCGTCAAAAAGCC Downstream
HCN1	上游 GGGGAAAGCAGTATTCATACGC Upstream 下游 ATGGTAATCCAGAGGTCAGACA Downstream
HCN4	上游 TGGACACCGCTATCAAAGTGG Upstream 下游 CTGCCGAACATCCTTAGGGA Downstream

1.4.2 实验分组 实验设置 TBX3 过表达组、TBX18 过表达组和对照组。取 HiPS 按照 1.3.1 方法向心肌细胞定向分化, 第 3 天通过慢病毒以最佳 MOI 转染分别实现 TBX3、TBX18 过表达, 空白病毒转染作为对照组, 继续培养至 21 d 时进行以下检测。

1.4.3 qRT-PCR 检测窦房结细胞标记物表达 取各组细胞, 同 1.2.2 方法采用 qRT-PCR 检测过表达 TBX3 组和对应的对照组 TBX18、SHOX2、NKX2-5、HCN4、HCN1 基因相对表达量; 检测过表达 TBX18 组和对应的对照组 TBX3、SHOX2、NKX2-5、HCN4、HCN1 基因相对表达量。各基因引物序列见表 1。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。数据以均值±标准差表示, 组间比较采用 t 检验; 检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 HiPS 形态学观察及鉴定

2.1.1 形态学观察 培养 3 d 倒置相差显微镜观察示, 细胞排列致密, 克隆边缘规整; 高倍镜下细胞呈圆形, 核质比高且核仁明显。见图 1。

2.1.2 qRT-PCR 检测干性标记物表达 HiPS 特异转录因子 OCT3/4、SOX2、NANOG 在 HiPS 和 hESCs 中均高表达, 各基因相对表达量比较差异无统计学意义 (P>0.05); 各基因在 HFB 中不表达。见图 2。

2.1.3 免疫荧光染色观察干性标记物表达 荧光显微镜观察示, OCT3/4 和 NANOG 在 HiPS 中特异分布于细胞核中, 且呈现强阳性信号; SSEA4 和 TRA-1-60 在 HiPS 中高表达, 且在细胞膜上呈强阳性信号, 该信号与细胞核特异染料 DAPI 信号不重叠。见图 3。

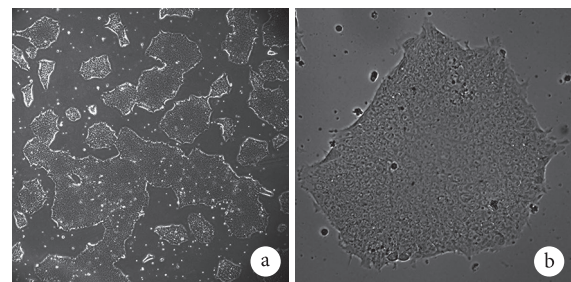


图 1 倒置相差显微镜观察 HiPS 形态 a. ×4; b. ×20

Fig.1 Morphology observation of HiPS under inverted phase contrast microscope a. ×4; b. ×20

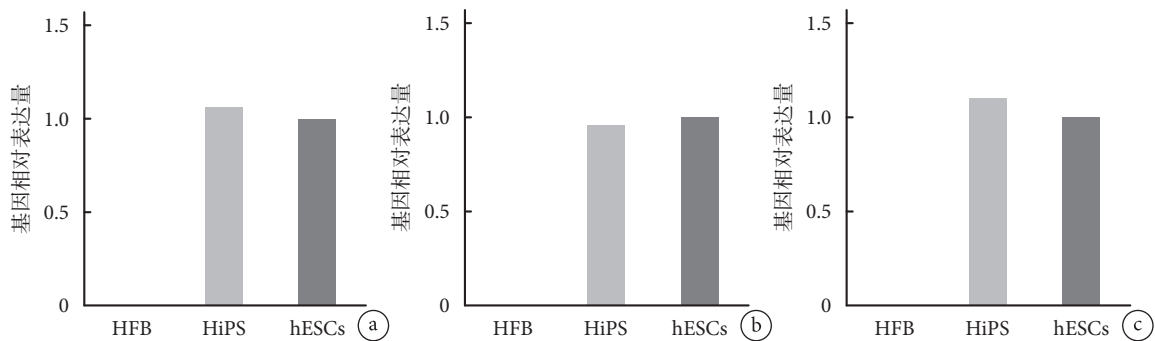


图 2 qRT-PCR 检测各细胞干性标记物表达 a. OCT3/4; b. SOX2; c. NANOG

Fig.2 Detection of stemness markers by qRT-PCR method a. OCT3/4; b. SOX2; c. NANOG

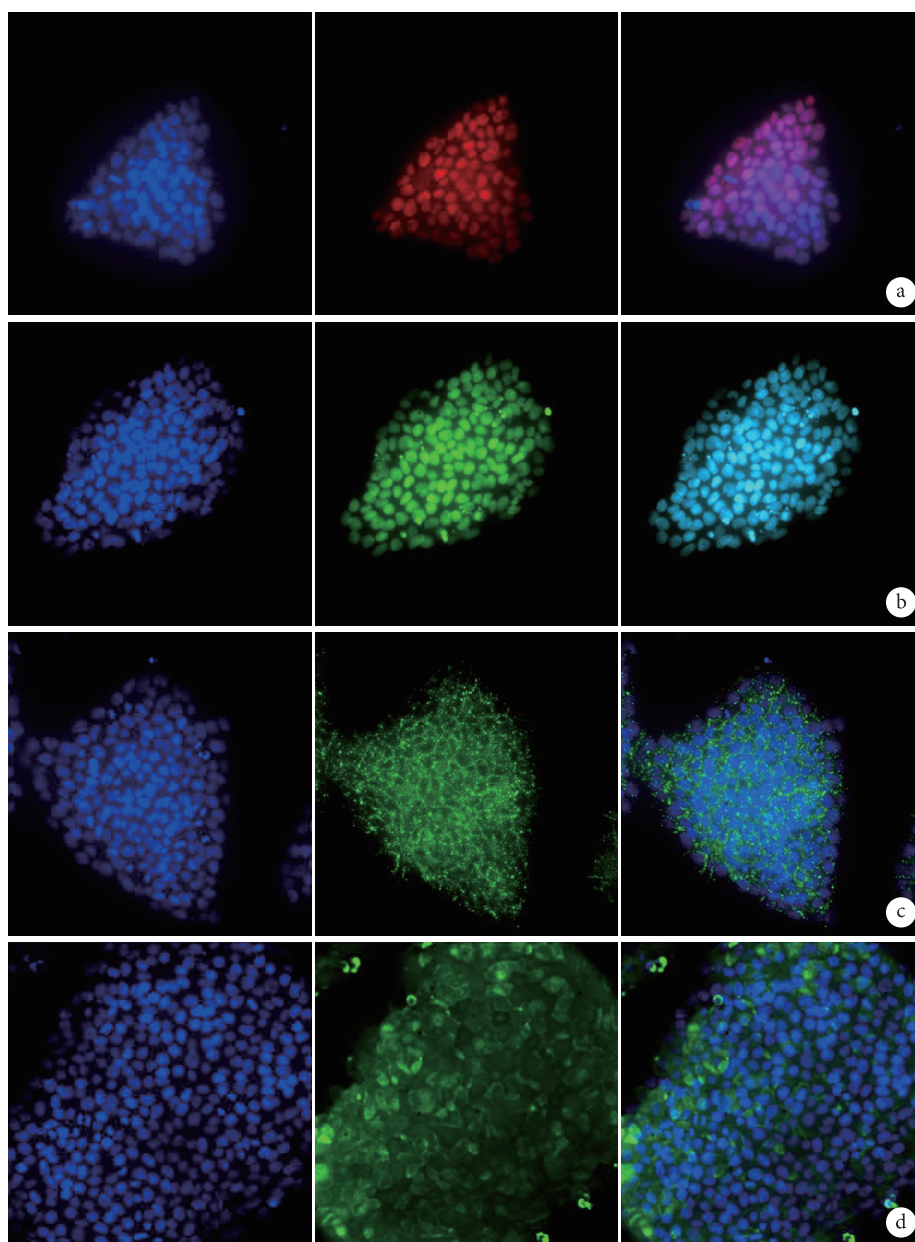


图 3 免疫荧光染色观察 HiPS 干性标记物表达 (荧光显微镜×40) 从左至右依次为 DAPI 核染色、荧光染色、二者重叠 a. OCT3/4; b. NANOG; c. SSEA4; d. TRA-1-60

Fig.3 Detection of stemness markers of HiPS by immunofluorescence staining (Fluorescence microscope×40) From left to right for DAPI nucleus staining, fluorescence staining, and merge a. OCT3/4; b. NANOG; c. SSEA4; d. TRA-1-60

2.2 HiPS 向心肌细胞定向分化

2.2.1 qRT-PCR 检测心肌细胞特异性标记物表达

hACM 基因相对表达量为 1。ISL1 和 NKX2-5 于 HiPS 分化第 3 天出现表达, 分别于第 5、7 天达峰值, 随后逐渐下降。分化第 5、7、21、28 天 ISL1 基因以及分化第 7、21、28 天 NKX2-5 基因相对表达量均显著高于 hACM 基因相对表达量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ACTN1 和 TNNT2 基因随分化时间延长, 相对表达量呈递增趋势。分化第 3、5、7、21 天 ACTN1 和 TNNT2 基因相对表达量均显著低于 hACM 基因相对表达量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 分化第 28 天 ACTN1 和 TNNT2 基因相对表达量与 hACM 基因相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.2.2 免疫荧光染色观察心肌细胞特异性标记物表达

荧光显微镜观察示, 绝大部分细胞核中含有 NKX2-5 蛋白表达, 且信号强, 同核特异染料 DAPI 可以完全重叠。cTnT、 α -actinin 和 MLC-2A、MLC-2V 信号定位于细胞质中, 并且初步呈现出肌小节纹理样结构。见图 5。

2.2.3 流式细胞术检测

实验组细胞中 α -actinin 阳性率为 78.5%, 对照组为 3.2%, 提示 HiPS 向心肌

细胞诱导分化成功。见图 6。

2.2.4 诱导心肌细胞的形态和功能检测

实验组分化第 9 天细胞开始搏动; 随着分化时间延长, 细胞逐渐成熟, 排列紧密, 呈鱼群状或漩涡状生长; 21 d 细胞搏动频率为 40 ~ 90 次/min, 细胞搏动比在 70% 以上。对照组培养过程中均未出现心肌细胞的形态特征改变, 也未观察到搏动的细胞。见图 7。

2.3 病毒转染 HiPS

2.3.1 最佳 MOI 确定

荧光显微镜观察示, 随着 MOI 值的增加, 病毒转染效率呈递增趋势。MOI 为 50 和 75 时的病毒转染效率类似, 但 MOI 为 75 时细胞形态出现一定损伤, 故选取 50 作为最佳 MOI 进行后续实验。见图 8。

2.3.2 qRT-PCR 检测窦房结细胞标记物表达

过表达 TBX3 组中, 除 SHOX2 基因相对表达量显著高于相应对照组 ($P < 0.05$) 外, TBX18、NKX2-5、HCN4、HCN1 基因相对表达量与对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。过表达 TBX18 组中, TBX3、SHOX2、NKX2-5、HCN4、HCN1 基因相对表达量与相应对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 9、10。

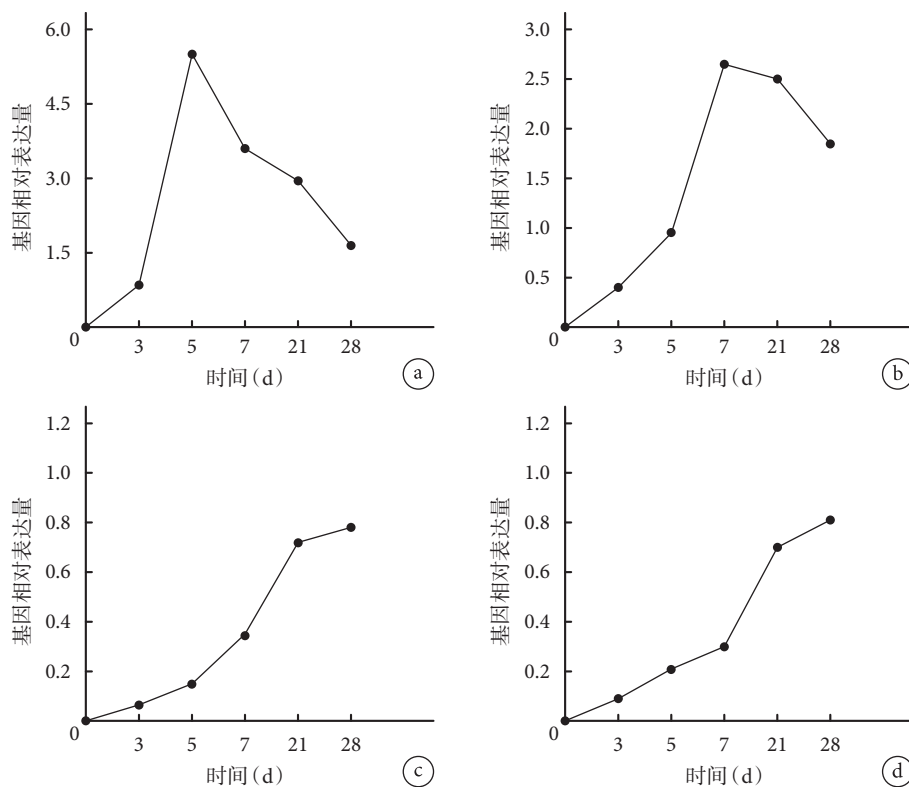


图 4 qRT-PCR 检测分化各时间点心肌细胞特异性标记物表达 a. ISL1; b. NKX2-5; c. ACTN1; d. TNNT2

Fig.4 Detection of cardiomyocyte markers after differentiation at different time points by qRT-PCR method a. ISL1; b. NKX2-5; c. ACTN1; d. TNNT2

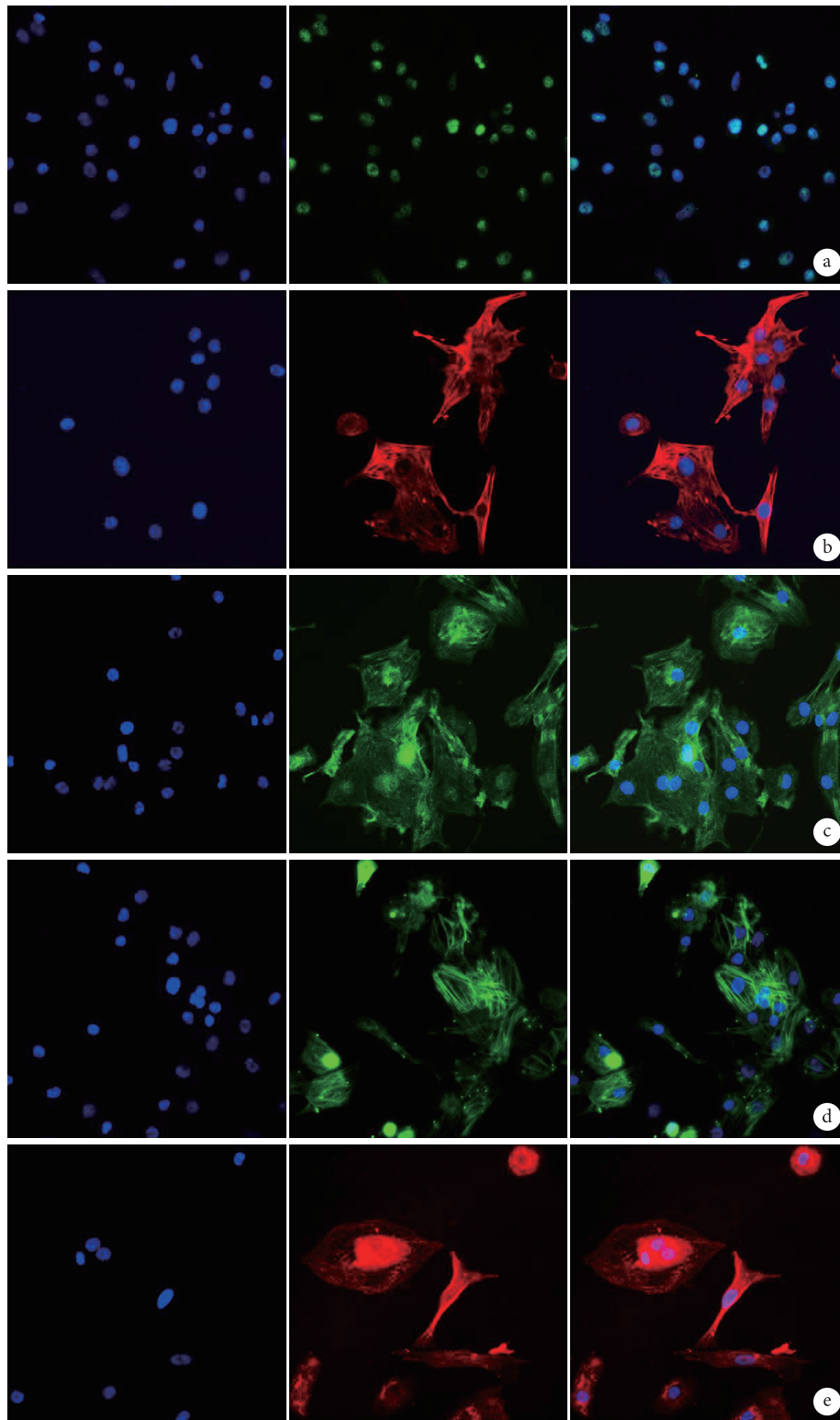


图 5 分化 21 d 免疫荧光染色观察心肌细胞特异性标记物表达 (荧光显微镜×40) 从左至右依次为 DAPI 核染色、荧光染色、二者重叠 a. NKX2-5; b. cTnT; c. α-actinin; d. MLC-2A; e. MLC-2V

Fig.5 Detection of cardiomyocyte markers of HiPS by immunofluorescence method at 21 days after differentiation (Fluorescence microscope×40) From left to right for DAPI nucleus staining, fluorescence staining, and merge a. NKX2-5; b. cTnT; c. α-actinin; d. MLC-2A; e. MLC-2V

3 讨论

近年来,干细胞作为心肌再生研究的种子细

胞,是一种极具潜力的未来治疗策略。但 ESCs 涉及伦理、免疫排斥等问题;成体 MSCs 心肌再生能力极低。Huangfu 等^[3]研究用联合多能转录因子的



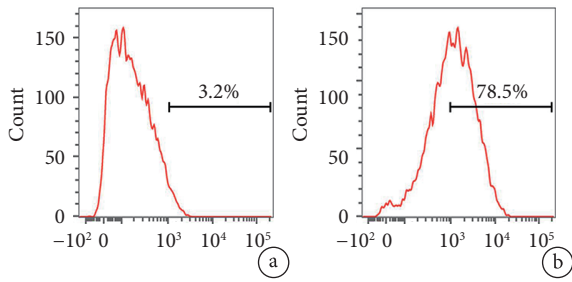


图6 分化 21 d 流式细胞术检测两组 α -actinin 阳性率 a. 对照组; b. 实验组

Fig.6 Detection of positive ratio of α -actinin at 21 days after differentiation by flow cytometry method a. Control group; b. Experimental group

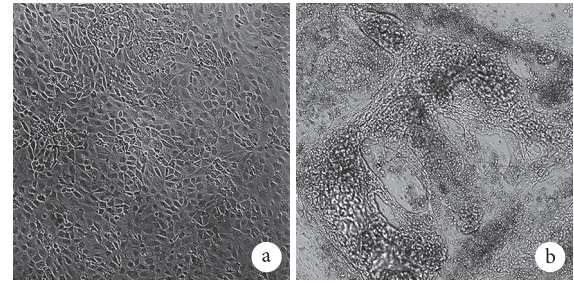


图7 HiPS 向心肌细胞分化 21 d 后细胞形态观察 (倒置相差显微镜 $\times 10$) a. 对照组; b. 实验组

Fig.7 Morphological observation of HiPS differentiated into cardiomyocytes at 21 days (Inverted phase contrast microscope $\times 10$) a. Control group; b. Experimental group

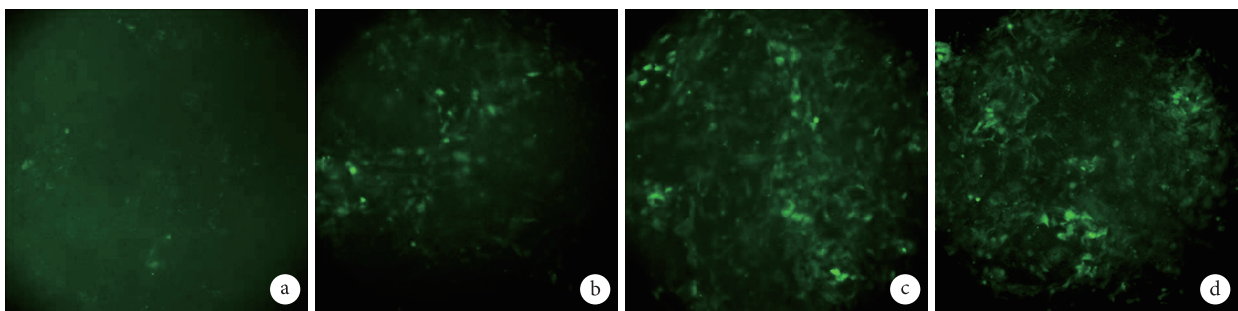


图8 不同 MOI 转染细胞 48 h 后转染效率观察 (荧光显微镜 $\times 10$) a. MOI: 5; b. MOI: 25; c. MOI: 50; d. MOI: 75

Fig.8 Observation on transfection efficiency of different MOI transfected cells at 48 hours (Fluorescence microscope $\times 10$) a. MOI: 5; b. MOI: 25; c. MOI: 50; d. MOI: 75

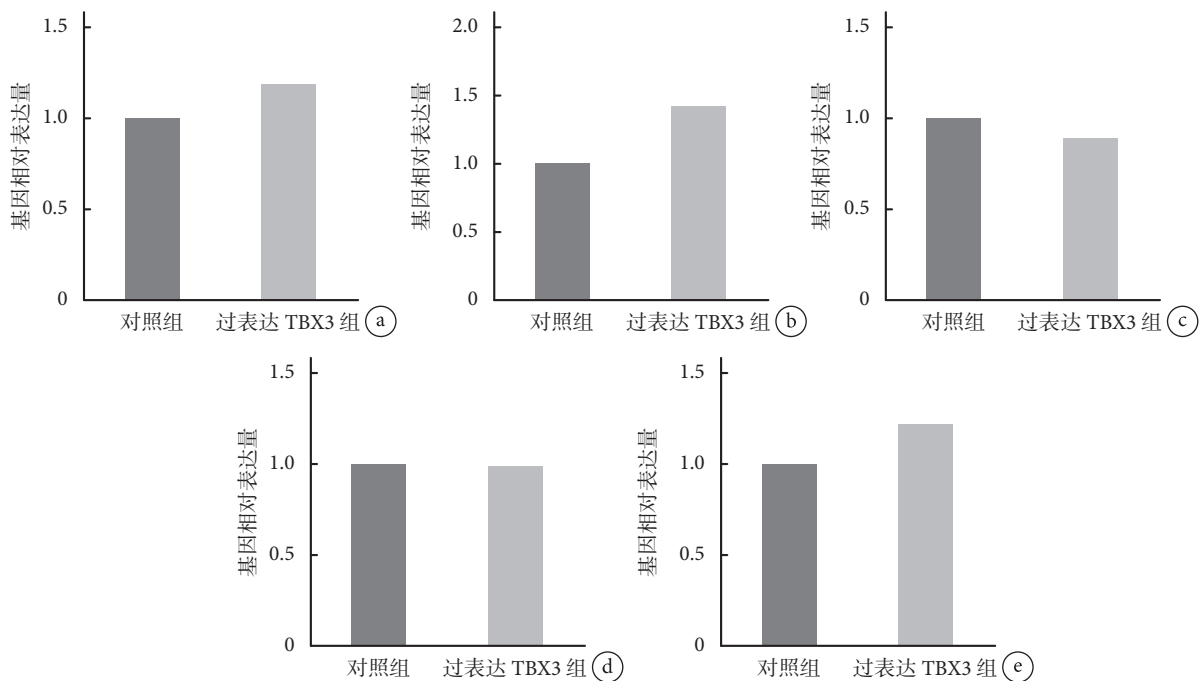


图9 qRT-PCR 检测 TBX3 过表达组与相应对照组窦房结细胞标记物表达 a. TBX18; b. SHOX2; c. NKX2-5; d. HCN4; e. HCN1

Fig.9 Comparison of sinus node markers expressions by qRT-PCR method between TBX3-over group and control group a. TBX18; b. SHOX2; c. NKX2-5; d. HCN4; e. HCN1

方法, 成功将 HFB 诱导为 HiPS, HiPS 可由成体细胞重编程而来, 来源广泛, 容易获取, 另外很好地

解决了 ESCs 存在的伦理争议和免疫排斥等问题。故本实验选用 HiPS 作为研究细胞。HiPS 与 ESCs

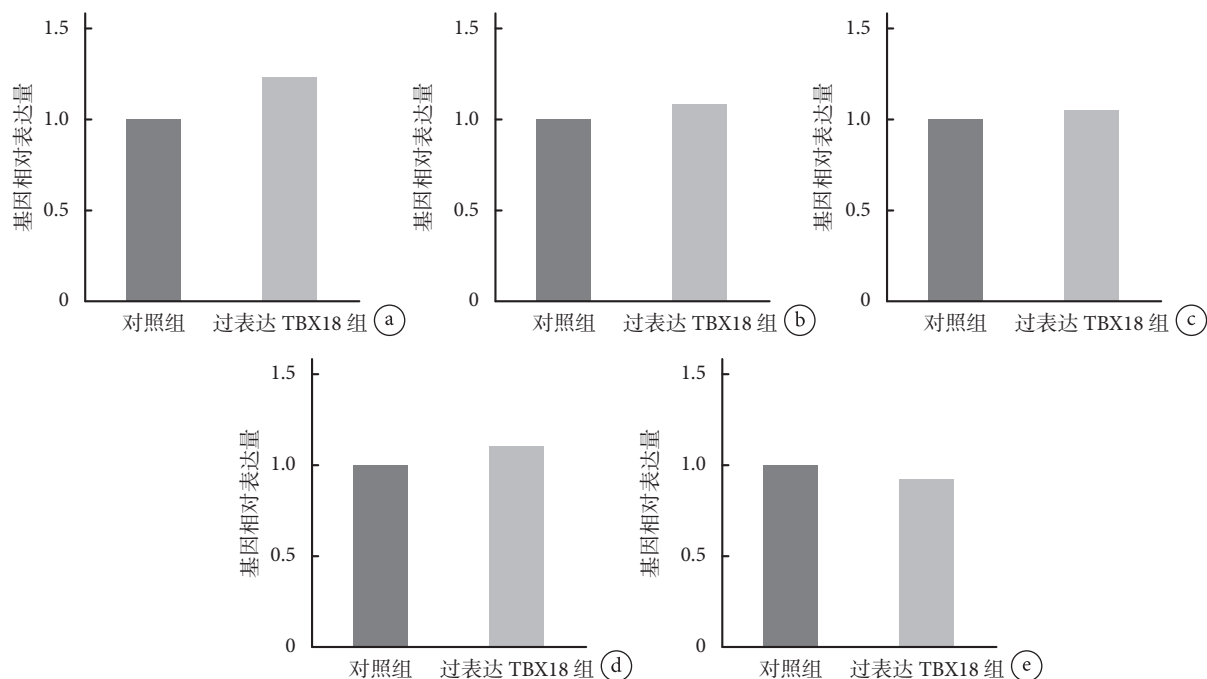


图 10 qRT-PCR 检测 TBX18 过表达组与相应对照组窦房结细胞标记物表达 a. TBX3; b. SHOX2; c. NKX2-5; d. HCN4; e. HCN1

Fig.10 Comparison of sinus node markers expressions by qRT-PCR method between TBX18-over group and control group a. TBX3; b. SHOX2; c. NKX2-5; d. HCN4; e. HCN1

具有相似的干细胞特异标记物表达^[11-12]。HiPS 经过连续传代后仍具有原代 HiPS 的形态学特征。另外，本实验对传代的细胞进行了相关干性标记物 (OCT3/4、NANOG、SSEA4、TRA-1-60) 的检测，结果与既往研究一致，提示本研究所使用的 HiPS 具有同 ESCs 及其类似的 HiPS 的特征。

近年来，研究者分别利用拟胚体法和共培养法，成功将 HiPS 诱导分化出具有收缩功能的心肌细胞^[13-16]，但分化效率均不高。随后研究发现早期激活、晚期抑制 Wnt 通路，有助于心肌细胞高效率分化^[8]。本研究采用同样的方法，即在分化初始通过 CHIR-99021 作用 24 h 进而短暂激活 Wnt 通路，第 3 天加入 Wnt 通路抑制剂 IWP-2 作用 48 h，通过瞬时短暂激活和随后抑制 Wnt 信号通路得以实现高效的心肌细胞诱导分化。流式细胞术显示实验组心肌细胞特异标记物 α -actinin 阳性率为 78.5%，提示该方法高效的分化效率。qRT-PCR 结果进一步表明，HiPS 诱导分化的细胞高水平表达一系列心肌前体和心肌特异细胞标记物，其表达水平接近于 hACM 水平。免疫荧光染色检测示，泛心肌细胞特异标记物 NKX2-5、cTnT、 α -actinin 呈现高比例且强阳性信号，心房、心室特异物 MLC-2A、MLC-2V 染色结果则初步提示分化的心肌细胞中以心室和心房肌细胞为主。

T-BOX 家族的相关基因，如 TBX1、TBX2、TBX3、

TBX5、TBX18 和 TBX20，被认为与心脏的胚胎发育相关^[17]。其中 TBX3 和 TBX18 被认为与窦房结的发育密切相关^[18]。研究显示，过表达 TBX3、TBX18 能够促进窦房结样细胞的特异性分化^[13,19]。本研究将 HiPS 向心肌细胞诱导分化 3 d，即处于中胚层阶段时，采用慢病毒转染方法过表达 TBX3 和 TBX18，继续培养至 21 d 后，qRT-PCR 结果显示，关于窦房结特异转录因子，过表达 TBX3 显著上调了 SHOX2 的水平 ($P < 0.05$)，TBX18 呈现一定上调趋势但差异无统计学意义；窦房结特异离子通道基因 HCN1 也呈现出上调趋势 ($P > 0.05$)；此外，TBX3 对阻碍窦房结细胞分化的心肌前体细胞标记物 NKX2-5 的表达也呈现出一定的下调趋势。上述结果提示 TBX3 在 HiPS 向窦房结细胞富集分化过程中可能发挥一定的促进趋势，而过表达 TBX18 促进 HiPS 向窦房结样细胞富集分化的作用不明显。针对以上结果我们分析其原因如下：① 可能需要更加精准的基因导入时间节点，本研究只探索了第 3 天 1 个时间点，尝试更早或者更晚的时间点可能会有不一样的效果。② 文献报道^[20]胚胎心脏发育过程中 TBX18 主要作用于窦房结头部区域的形成，而 TBX3 主要参与尾部的形成，二者在窦房结发育分化过程中分别在不同时空发挥作用，因此联合转染过表达 TBX3 和 TBX18 可能是一个有效的促进窦房结分化的策略。此外，本实验对于诱导分化的细

胞检测方法仅局限在核酸水平,考虑到细胞内存在转录后修饰和翻译后修饰,因此在未来研究中还需加入蛋白水平检测。

综上所述,本研究对于过表达 TBX3、TBX18 诱导 HiPS 向窦房结细胞特异性分化方面做了初步探索,结果提示在 HiPS 的心肌诱导中胚层阶段过表达 TBX3 呈现出一定的窦房结细胞富集分化趋势,但不显著。通过对 TBX 家族转录因子基因导入时间点以及联合导入等方法进行改进和尝试,有望在未来实现显著高效的 HiPS 向窦房结样细胞的诱导分化,进而为未来生物起搏器制备所需的大量起搏样细胞提供理论和技术基础。

参考文献

- Jung JJ, Husse B, Rimbach C, *et al.* Programming and isolation of highly pure physiologically and pharmacologically functional sinus-nodal bodies from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5): 592-605.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269-1275.
- 邹刚,李豫皖,金瑛,等. TGF- β_1 联合 VEGF 对人羊膜间充质干细胞向韧带成纤维细胞体外分化作用的研究. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(5): 582-593.
- 周兰庭,冯雁婷,戴景兴,等. miRNA 调控脂肪干细胞分化的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(12): 1506-1511.
- Zwi L, Caspi O, Arbel G, *et al.* Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2009, 120(15): 1513-1523.
- Nicaise AM, Banda E, Guzzo RM, *et al.* HiPS-derived neural progenitor cells from PPMS patients reveal defect in myelin injury response. *Exp Neurol*, 2017, 288: 114-121.
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, *et al.* Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*, 2013, 8(1): 162-175.
- Kapoor N, Liang W, Marbán E, *et al.* Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 54-62.
- Wiese C, Grieskamp T, Airik R, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res*, 2009, 104(3): 388-397.
- Li Y, Zhang Q, Yin X, *et al.* Generation of HiPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res*, 2011, 21(1): 196-204.
- Wei X, Chen Y, Xu Y, *et al.* Small molecule compound induces chromatin de-condensation and facilitates induced pluripotent stem cell generation. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(5): 409-420.
- Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945-949.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322(5903): 949-953.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-630.
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, *et al.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 633-638.
- Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, *et al.* A chemical platform for improved induction of human HiPSCs. *Nat Methods*, 2009, 6(11): 805-808.
- Esteban MA, Wang T, Qin B, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 71-79.
- Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev*, 2007, 21(9): 1098-1112.
- Wiese C, Grieskamp T, Airik R, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res*, 2009, 104(3): 388-397.

收稿日期: 2018-12-02 修回日期: 2019-03-03

本文编辑: 王雁