

小鼠胚胎干细胞向骨骼肌细胞分化的研究进展

叶 枫, 杨 悦, 金 鑫, 刘聪聪, 严云勤
(东北农业大学 生命科学院, 哈尔滨 150030)

中图分类号: Q343

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012) 01 - 0020 - 03

关键词: 胚胎干细胞; 骨骼肌细胞; 分化; 拟胚体

摘 要: 近年来, 胚胎干细胞的应用越来越广泛, 在体外将小鼠胚胎干细胞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, 一直是胚胎干细胞研究领域的热点, 而胚胎干细胞的分化机制更是其中的难点。目前, 用于诱导小鼠胚胎干细胞分化为骨骼肌细胞的方法很多, 但分化的效率并不是很高, 所以研究胚胎干细胞向骨骼肌细胞方向分化的机制显得尤为重要。文章仅就最近几年对小鼠胚胎干细胞向骨骼肌细胞方向分化的一些方法及其机制作一综述。

The development of research on the differentiation of mouse embryonic stem cells into skeletal muscle cells

YE Feng, YANG Yue, JIN Xin, LIU Cong - cong, YAN Yun - qin
(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Key words: embryonic stem cells; skeletal muscle cells; differentiation; embryoid body

Abstract: In recent years, embryonic stem cells have been widely applied. The mouse embryonic stem cells were induced in vitro to differentiate into muscle cells, and used to treat muscle degenerative diseases. It has been a hot field of stem cell research, and stem cell differentiation mechanism is the most difficulties of the research. Currently, there are many different ways to induce embryonic stem cells to differentiate into skeletal muscle, but the efficiency of differentiation is not very high, so it is extremely important to study clearly the mechanism of embryonic stem cells differentiation into skeletal muscle cells. This paper summarizes some methods and mechanism of the mouse embryonic stem cells differentiation into skeletal muscle cells and compared them in the last few years.

胚胎干细胞(ESCs)是从早期胚胎或原始性腺中分离出来的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。Y. Mizuno 等提出,无论在体外还是体内环境,胚胎干细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。O. Yusuke 等的研究表明,骨骼肌是终末分化组织,细胞再生能力很弱,已发育成熟的成体肌纤维一般无分裂再生能力,损伤后可由存在于肌纤维周围的肌卫星细胞分化后得以补充。在成体的骨骼肌中,卫星细胞的数量很少,有人认为这可能是由于凋亡速度加快所致。卫星细胞数量的减少提高了骨骼肌退化甚至瘫痪和萎缩的可能性。D. Radbod 等通过转基因技术诱导胚胎干细胞分化成

骨骼肌细胞,并成功治愈了肌肉受损的小鼠。

1 胚胎干细胞诱导分化为骨骼肌细胞的一般方法

小鼠胚胎干细胞向骨骼肌细胞诱导分化主要有以下几种类型。

1.1 通过转基因的方法生成肌细胞

对小鼠胚胎干细胞转染促进肌肉生成的基因有 MyoD、Myf6、Pax3 等,通过添加药物诱导这些基因的高效表达,从而可以使胚胎干细胞分化为肌肉细胞。

1) 小鼠胚胎干细胞在二甲基亚砜(DMSO)的直接诱导下可以分化为心肌细胞、骨骼肌细胞和平滑肌细胞等多种类型细胞,但转染了骨骼肌特异性基因的小鼠胚胎干细胞在二甲基亚砜的诱导下几乎只分化成骨骼肌细胞。徐蓬^[1]通过使用电穿孔转染的方法,将 MyoD 基因转染到小鼠胚胎干细胞中。用 0.8 mL 无钙、镁离子的 PBS, 50 μ g 的 MyoD 质粒(1 mg/mL),在电容 500 μ F,电压 250 V 条件下电击 1 次,将电击后的胚胎干细胞重新放入含 1% 二甲基亚砜的培养液中,24 h 后加入 400 μ L/mL 的 G418,

收稿日期:2011-08-03;修回日期:2011-10-08

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大课题项目(2008ZX08007-002)

作者简介:叶 枫(1987-),女,硕士研究生, feng567891234@126.com.

通信作者:严云勤(1962-),男,教授,硕士。

培养 8 ~ 10 d 后取出单细胞进行克隆,最后转入 96 孔培养板中培养;对照组未做任何处理,仅在培养液中添加 1% 的二甲基亚砷。结果表明,试验组与对照组相比胚胎干细胞被诱导分化为骨骼肌细胞的数量多(种类单一)。根据转染效率的不同,胚胎干细胞的分化程度也不同。

2) R. Darabi 等^[2] 在小鼠胚胎干细胞中转染成带有绿色荧光蛋白的 Pax3 基因后,用流式细胞仪筛选出转染成功的细胞,再向其中添加强力霉素,可诱导小鼠胚胎干细胞定向地分化为骨骼肌细胞。

1.2 通过诱导拟胚体生成骨骼肌细胞

1) A. Bader 等^[3] 的研究表明,在胚胎干细胞形成拟胚体(EB)后,经低浓度的维甲酸(RA)处理能诱导产生一定量的骨骼肌细胞。

2) H. Chang 等^[4] 已成功地在体外将小鼠胚胎干细胞诱导成 Pax7 阳性卫星样细胞。将小鼠胚胎干细胞产生的拟胚体在被覆有基质胶的平皿上培养,使用含有胎牛血清和马血清的 DMEM 培养液。通过荧光活化细胞分选系统,用 1 种新颖的反卫星细胞抗体,使 Pax7 阳性卫星样细胞得到增加,带有该抗性的阳性细胞,在体内和体外都能有效地分化为骨骼肌纤维。这些细胞表现出卫星细胞的特征,如在肌肉损伤模型上具有自我更新能力,而且移植效率很高。

3) 在小鼠胚胎干细胞中精胺可以诱导生成多层肌肉纤维层。T. Sasaki 等^[5] 用悬滴法培养胚胎干细胞 2 d 后形成拟胚体,将拟胚体转移到 1 个含有分化培养基的 24 孔培养板中(每孔 1 个拟胚体),在无精胺培养条件下,拟胚体没有分化成能收缩的肌纤维。相反,培养时添加精胺(0.5 ~ 1.0 mmol/L)可使拟胚体周围形成收缩的肌肉纤维,并且能进一步分化为多层肌肉纤维层。研究发现,精胺中的拟胚体只能在有限的时间内被诱导分化为肌细胞;此外,高浓度的精胺可抑制肌纤维的生成。

4) 丁慧^[6] 通过在培养液中添加低浓度的地塞米松、胰岛素转硫酸(ITS)、表皮生长因子(EGF)等培养拟胚体,能使其分化形成骨骼肌细胞。

2 胚胎干细胞向骨骼肌细胞分化的影响因素

2.1 调节因子

骨形态发生蛋白(BMP4)是 TGF- β 家族的成员之一,在中胚层的诱导发育中起重要的调节作用。在无血清培养基中,BMP4 可以诱导胚胎干细胞向中胚层方向发展。在分化的小鼠胚胎干细胞中,血小板衍生生长因子(PDGFR- α)和 E 钙黏素(ECD)是区别轴旁中胚层的祖细胞和未分化的细胞及内胚层细胞的有效标志。早期去除骨形态发生蛋白 4 后,随之而来的 LiCl 促进了向生肌祖细胞的分化,这些生肌祖细胞在体外能进一步分化为成熟的骨骼肌细胞。有研究表明,维甲酸(RA)也能通过调控骨形态发生

蛋白 4 信号通路增强骨骼肌的形成。SMYD1 是一种保守的心脏和肌肉特异表达的组蛋白 H3 甲基转移酶,直接参与心脏和肌肉发育,是生肌的活化剂。Li Da-li 等^[7] 对该基因启动子的研究发现,血清应答因子(SRF)和 Myogenin 直接结合在 SMYD1 基因启动子的 CArG 位点,调控其表达。结果表明,SMYD1 能激活肌肉标志因子并与 MyoD 基因存在协同激活效应,而 SRF 和 Myogenin 共同作用激活 SMYD1 启动子的活性,促进肌管的形成。王娟等^[8] 研究表明,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)很有可能通过激活 SMYD1 的表达促进肌肉分化,进而促进心肌和骨骼肌的发育,加速肌肉损伤修复过程,胰岛素样生长因子-1 能够促进 SRF 与 SMYD1 启动子的结合。

2.2 肌肉特异性基因

徐蓬^[9] 通过将 MyoD 基因转染到胚胎干细胞中,以二甲基亚砷诱导其在体外分化成骨骼肌细胞,成功地治疗了小鼠肌肉损伤。MyoD 是骨骼肌的特异性表达基因,将 MyoD 基因转染到胚胎干细胞中,并使其强制表达,会导致胚胎干细胞向骨骼肌方向分化。R. Darabi 等^[2] 利用 Pax3 基因诱导拟胚体细胞分化为骨骼肌细胞,再将得到的不纯细胞用 PDGFR- α 和 Flk1 标志进行流式分选,获得纯骨骼肌细胞,将其注入肌营养不良小鼠,发现肌肉的收缩功能得到了改善。说明外源性细胞起到了移植修复的作用。Pax3 能调节成纤维细胞生长因子(FGF)信号通路并影响肌肉形成。M. Lagha 等^[10] 研究表明,成纤维细胞生长因子 4(Fgfr4)是个直接作用的位点,Pax3 与 Fgfr4 的 3'端结合,使得 Pax3 能够在转基因小鼠胚胎中肌肉形成位置表达。这个调控元件的活性部分受 E-box、Pax3 和其他成纤维细胞生长因子信号元件的调控。

2.3 蛋白激酶

E. Barruet 等^[11] 研究表明,p38 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)的活动是胚胎干细胞分化为心肌、内皮细胞、平滑肌细胞和骨骼肌这些中胚层的重要因素。在分化过程中,野生型的胚胎干细胞需使用 p38 促分裂原活化蛋白激酶特异性抑制剂处理胚胎干细胞。p53 作为抑癌基因,在各种组织、器官和胚胎中广泛表达。在 p53 表达下调胚胎干细胞中,维甲酸诱导的胚胎干细胞没有分化出类似神经元的细胞,而是更易诱导分化为肌细胞。L. Pani 研究表明,p53 参与了早期神经和肌肉分化过程,但 p53 的作用机制尚不明确。

2.4 内质网蛋白

S. Wanaerling 等^[12] 研究发现,内质网分子伴侣 94(GRP94)在正常细胞的内质网腔中含量较高,其表达与多种因素有关。敲除了内质网分子伴侣 94 基因的小鼠在妊娠第 7 天就会死亡,中胚层不发育。缺失

内质网分子伴侣^[94]的胚胎干细胞能被培养并向3个胚层方向分化;然而,这些细胞不能分化成心肌、平滑肌、骨骼肌。突变体胚胎干细胞缺乏胰岛素样生长因子Ⅱ,这个缺失能通过外源性的胰岛素样生长因子Ⅰ或Ⅱ来弥补。

2.5 细胞外物质的介导作用

维甲酸是干细胞中骨骼肌生成的最有效的小分子增强子,但是维甲酸的作用机制还不明确。P. Qin等^[12]研究表明,添加低水平的维甲酸(1×10^{-8} mol/L)后用治疗小鼠胚胎干细胞的细胞,可促进骨骼肌生成。有人通过染色质免疫沉淀,将维甲酸受体直接与Wnt3a、Pax3和Meox1中调控区域绑定。当存在阴性的抑制物融合蛋白时,维甲酸不能阻止骨骼肌生成的抑制;此外,维甲酸还可下调骨形态发生蛋白4表达并且上调骨形态发生蛋白4抑制物,能提高干细胞中肌肉前体阶段的骨骼肌生成,通过激活维甲酸受体并直接绑定中胚层和骨骼肌前体基因,还可以激活 β -catenin功能,以及抑制骨形态发生蛋白4信号。强力霉素、二甲基亚砷等都有诱导胚胎干细胞分化的能力,但机制尚不明确。

3 胚胎干细胞与骨骼肌祖细胞

胚胎干细胞具有用于细胞治疗的巨大潜力。研究表明,胚胎干细胞衍生的祖细胞有使骨骼肌再生的潜能,但这些细胞如何促进受损肌纤维重组仍然存在疑问。H. Sakurai等^[13]通过向受损肌肉中植入胚胎干细胞来源的中胚层前体细胞,研究受伤肌肉的再生过程,用传统的分化系统诱导中胚层前体细胞,并且使用流式细胞仪分离出PDGFR- α 和血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)。当把PDGFR- α 和VEGFR-2细胞群移植到免疫缺陷鼠受损的肌肉中时,PDGFR- α 表现出了轴旁中胚层的特征。G. Messina等^[14]研究表明,PDGFR- α (+)可以分化成肌卫星细胞,卫星细胞是成人肌肉的干细胞,具有表达Pax7和CD₃₄的特征。这些胚胎干细胞衍生的卫星细胞在体外能形成有功能的成熟肌纤维,在体内与受损的宿主肌纤维产生肌纤维融合。另一方面,PDGFR- α (-) VEGFR-2(+)群体显示了侧板中胚层特征,表现出在受伤肌肉中有限分化成卫星细胞的潜能。研究表明,在体内没有诱导或抑制基因操纵的情况下,胚胎干细胞来源的轴旁中胚层祖细胞有产生功能肌肉细胞的潜力,可以用来修复患病和受损的肌肉。

4 结论

综上所述,胚胎干细胞在用于肌肉损伤修复时,先分化为中胚层前体细胞,再分化成肌祖细胞,最后形成骨骼肌细胞,进一步聚合形成大量的肌管,从而出现节律性收缩的现象。在胚胎干细胞向骨骼肌细

胞分化的过程中,伴随着很多的细胞内蛋白、转录因子、分泌因子、整合素等的共同调节作用,其中的一些机制尚不明确。未来的研究方向应集中于对胚胎干细胞向骨骼肌分化机制的研究,在明确了胚胎干细胞分化机制之后,可以利用细胞疗法来促进肌肉的再生,治疗肌肉退行性疾病,改善肌肉功能。

参考文献:

- [1] 徐蓬. DMSO 诱导的 MyoD 基因转染的小鼠胚胎干细胞成肌功能的实验研究 [J]. 西安: 第四军医大学, 2000.
- [2] DARABI R, BAIK J, CLEEM M, et al. Engraftment of embryonic stem cell - derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy [J]. Exp Neurol, 2009, 220(1): 212 - 216.
- [3] BADER A, AL - DUBAI H, WEITZER G. Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions [J]. Circ Res, 2000, 86(7): 787 - 794.
- [4] CHANG H, YOSHIMOTO M, UMEDA K, et al. Generation of transplantable, functional satellite - like cells from mouse embryonic stem cells [J]. FASEBJ, 2009, 23(6): 1907 - 1919.
- [5] 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 [J]. Differentiation, 2008, 76(10): 1023 - 1030.
- [6] 丁慧. 人胚胎干细胞体内向肌细胞分化的研究 [J]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- [7] LI D L, NIU Z Y, YU W S, et al. SMYD1, the myogenic activator, is a direct target of serum response factor and myogenin [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(21): 7059 - 7071.
- [8] 王娟, 叶湘漓, 姜丽, 等. IGF - 1 通过 SRF 结合位点调节 SMYD1 在 C2C12 细胞中的表达 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010(12): 1113 - 1120.
- [9] LAGHA M, KORMISH J D, ROCANCOURT D, et al. Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program [J]. Genes Dev, 2008, 22(13): 1828 - 1837.
- [10] BARRUET E, HADADEH O, PEIRETTI F, et al. p38 mitogen activated kinase controls two successive steps during the early mesodermal commitment of embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(7): 1233 - 1246.
- [11] WANDERLING S, SIMEN B B, OSTROVSKY O, et al. GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin - like growth factor secretion [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18(10): 3764 - 3775.
- [12] QIN P, HABERBUSCH J M, ZHANG Z, et al. Pre - B cell leukemia - a transcription factor (PBX) proteins are important mediators for retinoic acid - dependent endodermal and neuronal differentiation of mouse embryonal carcinoma P19 cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 16263 - 16271.
- [13] SAKURAI H, OKAWA Y, INAMI Y, et al. Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells [J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1865 - 1873.
- [14] MESSINA G, SIRABELLA D, MONTEVERDE S, et al. Skeletal muscle differentiation of embryonic mesoangioblasts requires pax3 activity [J]. Stem Cells, 2009, 27(1): 157 - 164.

(006)