

不同成肌诱导液对人尿源干细胞体外成肌分化的探究

李凤雯 姜之歆 王从容

摘要 **目的** 研究人尿源干细胞(human urine-derived stem cells, hUSC)在不同成肌诱导液中的体外成肌分化能力及效果。**方法** 提取正常成人志愿者新鲜尿液,经体外培养、扩增、流式细胞术鉴定后,用4种不同配方的成肌诱导液分别诱导 hUSC 向骨骼肌细胞分化。在诱导第28天,光镜下观察细胞形态。并用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测成肌分化特异基因结蛋白(desmin)和肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC)的表达量。**结果** hUSC的细胞表面标物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 为阳性,CD34、CD45 为阴性,提示其为间充质来源。hUSC 在 A、B、C、D 成肌诱导液中诱导培养 28 天后,细胞伸展变长,呈现肌细胞形态,可见肌管样细胞。4种成肌诱导液诱导 14 天及 28 天后成肌分化特异基因 desmin 和 MyHC 表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。组间比较提示,B 和 C 成肌诱导液成肌分化下 desmin 和 MyHC 相对表达水平高于 A、D 成肌诱导液组。**结论** 4种成肌诱导液均可将 hUSC 定向分化成骨骼肌细胞。从细胞分化形态和成肌特异基因表达水平上分析,C 成肌诱导液成肌分化效果更好。hUSC 的这种向骨骼肌分化的能力,提示其在疾病治疗和病因学研究上具有潜在价值。

关键词 人尿源干细胞 成肌分化 干细胞

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.07.008

Study on Different Myogenic Induction Medium on Myogenic Differentiation of Human Urine-derived Stem Cells in Vitro. Li Fengwen, Jiang Zhixin, Wang Congrong. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To investigate the myogenic differentiation ability of human urine-derived stem cells (hUSC) in vitro in four different media and compare their effects. **Methods** Sterile fresh urine was extracted from normal volunteers, and after in vitro culture, expansion and flow cytometry identification, hUSC were induced to skeletal myogenic cells with four kinds of myogenic induction medium. The morphological changes of the cells were observed under a light microscope after 28 days'induction. The levels of mRNA expressions of desmin and Myosin Heavy Chain (MyHC) were detected by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** The surface markers of hUSC were positive for CD29, CD44, CD73 and CD90, and negative for CD34 and CD45, suggesting that they were mesenchymal sources. After 28 days'induction in A, B, C, and D myogenic induction medium, the cells stretched and became longer, showing the shape of muscle cells, and myotube-like cells were seen. The mRNA levels of desmin and MyHC were higher in A, B, C and D induction medium after 14 and 28 days'induction than those in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In addition, the mRNA expression of desmin and MyHC in B and C myogenic induction medium were higher than those in the other two groups. Desmin in B myogenic induction medium was higher than that in others. **Conclusion** Four kinds of myogenic induction medium can differentiate hUSC into skeletal myogenic cells. Based on the analysis of cell differentiation morphology and myoblast-specific gene expression level, C myogenic induction medium had better effect. The differentiation capabilities of hUSC suggests its potential value in disease treatment and etiology research.

Key words Human urine-derived stem cells; Myogenic differentiation; Stem cells

间充质干细胞因其自我更新能力强,具备多向分化潜能,在组织工程学上的应用十分广泛^[1-3]。2008

年由 Zhang 等^[4]首次从尿液中分离获得的一种具有多种分化潜能、符合间充质干细胞特征的人尿源干细胞(human urinary stem cells, hUSC),尿液取材方便,安全无创,在基础研究中有一定的应用前景。hUSC 具有成脂、成骨、成软骨的 3 系分化能力。既往研究显示特定诱导液能将 hUSC 分化成神经细胞,但是 hUSC 定向成肌分化的能力尚不完全清楚^[5]。为进一步确定 hUSC 的成肌分化能力,本研究结合既往文

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81570808);上海市卫生计生系统优秀人才培养计划项目(2017BR045)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科(李凤雯、姜之歆);200120 上海,同济大学附属东方医院内分泌科(王从容)

通讯作者:王从容,电子信箱:crwang@tongji.edu.cn

献,筛选以及调整成肌诱导液的相关成分,对 hUSC 进行定向成肌分化进行探索性研究。

对象与方法

1. 对象:由 3 名成年男性健康志愿者留取尿液,留取过程符合上海市第六人民医院伦理学委员会规定。志愿者留取清洁中段尿液约 200ml,用于后续提取。

2. 方法:(1)hUSC 分离和培养:留取无菌中段尿 200ml 后,加 5ml 青链霉素混匀后,超净工作台内分装至 4 支 50ml 无菌管。2000r/min 离心 10min 后弃上清,加入 20ml PBS 依次清洗各管中的残余液体,吹打混匀后,再 2000r/min 离心 10min。之后弃上清,用 12ml 培养基吹打混匀,将悬液加入预先用 0.1% 明胶包被的 6 孔板中,每孔 2ml。最后,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中观察。每天观察细胞状态,直至克隆形成。待克隆团块融合至 80% 左右,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代扩增。(2)hUSC 表面标志物的鉴定:选取 P5 代人尿源干细胞, PBS 洗涤 2 遍,加 0.25% 胰蛋白酶将细胞消化下来,离心收取细胞。用 1% 牛血清白蛋白(BSA)洗涤后重悬细胞计数,调整细胞密度为 10⁶/ml。取细胞悬液 200μl 加入藻红蛋白标记的单克隆抗体 CD29、CD73、CD90、CD34,以及异硫氰酸荧光素标记的单克隆抗体 CD44、CD45 至各流式管,并以相应的光标记的 IgG 抗体为同型对照组。冰上避光孵育 30min,孵育后 2000r/min 离心 5min,使用 PBS 清洗游离体,2000r/min 再次离心 5min。最终用 1% BSA 重悬细胞至 200μl,经 Guava easyCyte(美国 Millipore 公司)流式细胞仪检测。(3)不同成肌诱导液的配置:A 成肌诱导液:经典成骨诱导分化培养基 + 10μmol/L 5-氮杂胞苷(只处理前 24h)^[6];B 成肌诱导液:DMEM 高糖完全培养基 + 10μmol/L 5-氮杂胞苷(只处理前 24h) + 0.1ng/ml MyoD + 2ng/ml IGF-1 + 0.1ng/ml TGF-β₃;C 成肌诱导液:DF-12 完全培养基 + 10μmol/L 5-氮杂胞苷(只处理前 24h) + 0.1ng/ml MyoD + 2ng/ml IGF-1 + 0.1ng/ml TGF-β₃;D 成肌诱导液:高糖 DMEM + 10% FBS + 5% 马血清 + 20μmol/L L-Glu + 50μmol/L 氢化可的松 + 0.1μmol/L 地塞米松^[7]。(4)成肌诱导分化:选取 P5 代 hUSC,以 5 × 10⁴/ml 接种在 6 孔板上,待细胞融合至 90%,分别进行诱导分化。对照组不进行成肌诱导分化。诱导液每 3 天换 1 次,诱导至第 28 天,倒置显微镜下观察各诱导液中细胞形态变化。(5)诱导分化不同时间点成肌基因 desmin 和 MyHC

的 mRNA 表达水平测定:诱导第 14 天及第 28 天用 PBS 清洗细胞培养板,收取对应天数的细胞板。利用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒进行送检样品总 RNA 的提取,期间进行去 DNA 处理。利用 TaKaRa Prime script RT reagent kit with gDNA Eraser(perfect real-time)试剂盒进行总 RNA 的反转录。反转录-聚合酶链反应参照 AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme)反应体系,最终由 LightCycler 480 system 测算 CT 值。引物定量标准依据内参 GAPDH。基因的引物序列 Primer-BLAST 在线设计获得,由上海生物工程有限公司合成,正反向引物序列:GAPDH 正向引物:5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATG-3',反向引物:5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3';desmin 正向引物:5'-ACCATCGCGGCTAAGAACAT-3',反向引物:5'-AATCGGTCTCCAATTCCCG-3';MyHC 正向引物:5'-CCGTCAGCACCGTGTCTT-3',反向引物:5'-TGCGGATGAATTTGCCGAATC-3'。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,Graphpad Prism 7.0 软件进行作图。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. hUSC 细胞形态:正常人尿液沉渣细胞经 hUSC 完全培养基重悬后接种在六孔板上,次日观察是否污染。经过 10 天左右的观察,有米粒或是短梭形克隆出现,贴壁生长(图 1A)。然后 PBS 清洗后,更换培养基。再经过 3~4 天的扩增长,细胞克隆形成一个较大群落(图 1B),可进行胰酶消化传代,得到 P1 细胞。细胞经过多次传代后,细胞活性以及形态未发生明显改变。

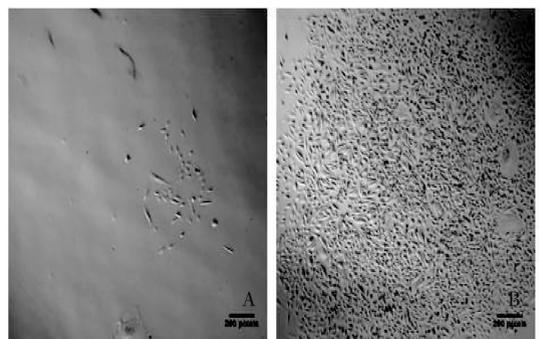


图 1 hUSC 原代细胞形态(×200)

A. 细胞克隆出现;B. 细胞克隆扩增

2. 流式细胞术检测 hUSC 表面标志物:P5 代 hUSC 表面标志物鉴定结果见图 2。CD29 为 99.8%,

CD34 为 1.0% ,CD44 为 99.8% ,CD45 为 0.7% ,CD73 为 99.9% , CD90 为 99.5% 。符合间充质干细胞表面标志物特征。

3. hUSC 在不同成肌诱导液诱导分化过程中的形态学变化:使用 4 种不同配制的诱导液成肌诱导 28 天后,细胞形态与未诱导时比较,出现以下变化(图 3)。细胞间排列更紧密,hUSC 由米粒或长梭形逐渐伸展变长,呈现肌细胞形态,可见肌管样细胞,其中经 B 和 C 成肌诱导液诱导的细胞,折光性更强,临近细胞相互融合,形成类似肌管样结构(图 3 中 C、D)。

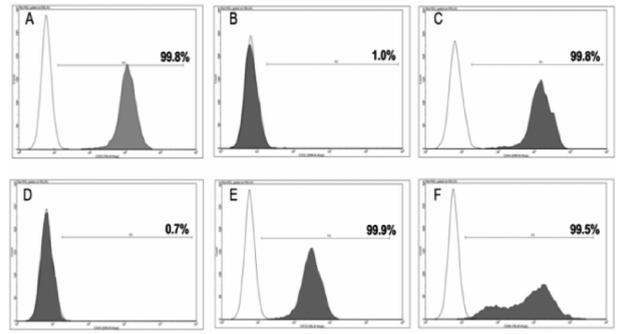


图 2 流式细胞术检测 hUSC 表面标志物
A ~ F 依次为表面标志物 CD29、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90

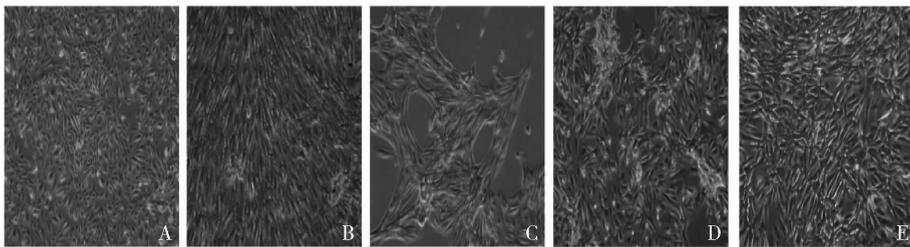


图 3 hUSC 在不同成肌诱导液诱导分化过程中的形态学变化(×50)
A. 未诱导;B. A 成肌诱导液;C. B 成肌诱导液;D. C 成肌诱导液;E. D 成肌诱导液

4. 诱导分化不同时间点成肌基因结蛋白(desmin)和肌球蛋白重链(MyHC)的 mRNA 表达:成肌诱导分化第 14 天以及第 28 天时细胞 desmin 的表达量均较对照组显著上调($P < 0.05$)。第 14 天时,A、B、C 和 D 成肌诱导液中细胞 desmin 基因表达水平分别是未分化状态下的 3.03、4.19、3.23、1.28 倍;成肌分化第 28 天,各成肌诱导液中细胞 desmin 基因表达水平的趋势与第 14 天基本一致,其中 B 成肌诱导液组较对照组增高 6.43 倍(图 4A)。此外,4 种成肌诱导液第 14 天及 28 天成肌分化中细胞 MyHC 基

因表达均显著高于对照组($P < 0.05$)。第 14 天 A、B、C 和 D 成肌诱导液成肌分化下细胞 MyHC 表达水平分别是对照组的 13.08、16.03、31.54、7.93 倍;第 28 天各组细胞中 MyHC 表达水平分别是对照组的 22.93、107.91、191.98、10.65 倍(图 4B)。

讨 论

hUSC 相较于其他来源的间充质干细胞,取材方便无创,有望成为细胞治疗的种子细胞^[8]。然而 hUSC 成肌分化的研究还不成熟,目前主要借助于市场上已有的用于其他干细胞的成肌诱导液。本研究利用 4 种不同成肌诱导液培养 hUSC,观察其分化 14 天以及 28 天成肌特异基因表达。成肌基因表达产物包括肌源性标志蛋白 desmin 和 MyHC。desmin 为肌细胞的中间丝蛋白,正常分布于平滑肌细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞和肌上皮细胞,是肌细胞分化最早标志物。MyHC 是肌球蛋白的基本组成单位,出现在肌细胞发育分化末期。本研究发现 4 种成肌诱导液诱导分化第 14 天,结蛋白的 mRNA 表达水平分别是对照组的 3.03、4.19、3.23、1.28 倍,其中 B 成肌诱导液中 desmin 显著表达。而分化末期即 28 天后,成肌诱导液分化下细胞 MyHC mRNA 表达水平是对照组的 22.93、107.91、191.98、10.65 倍。本研究未检测到成肌基因 MyoD、Myogenin 的基因表达,既往文献报道

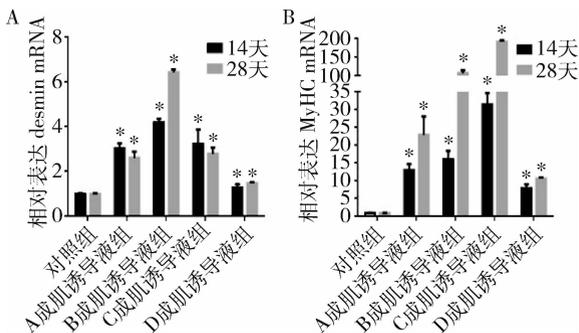


图 4 不同成肌诱导液诱导至第 14 天及第 28 天时成肌基因 desmin、MyHC 的相对表达水平
A. 成肌基因 desmin 的表达;B. 成肌基因 MyHC 的表达;
与对照组比较,* $P < 0.05$

这两个基因在骨骼肌的表达量较低,无法检出或由于该基因本身的表达量较低。此外,成肌诱导 28 天后,经 B 和 C 成肌诱导液诱导的细胞,折光性更强,细胞有融合现象,类肌管样结构出现。整体而言,4 种成肌诱导液均可诱导 hUSC 的成肌分化,B 和 C 成肌诱导液在分化效果上优于另外两种。其中,C 成肌诱导液终末分化效果最佳。

5-氮杂胞苷法是诱导细胞成肌分化的常见方法。其原理是阻止新复制 DNA 的胞嘧啶甲基化,激活原本转录失活的成肌基因^[9]。研究表明 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-氮杂胞苷不仅可以控制药物本身对干细胞产生的毒性,还获得较高的成肌诱导率^[10]。此外,细胞因子包括胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、转化生长因子 β (TGF- β) 等都影响成肌分化。前者通过激活骨骼肌卫星细胞,增加 PI₃K 水平,减少骨骼肌纤维化等提升成肌分化能力^[11-14]。而 TGF- β 通过卫星细胞活化,调节免疫应答强度,从而参与肌肉修复的调节^[15]。成肌调节因子 MyoD 作为骨骼肌细胞分化的开关基因,诱导的增强子 RNA 与 hnRNPL 相互作用,在成肌分化过程中激活靶基因转录,激活骨骼肌卫星细胞,促进成肌分化^[16,17]。本研究采用了 4 种不同成分的成肌诱导液,A、B、C 成肌诱导液均采用含 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷的完全培养基进行前 24h 的干预,B 和 C 成肌诱导液中又都添加了细胞因子 IGF-1、TGF- β 、成肌调节因子 MyoD,其分化完成后的成肌能力也更为明显。而 D 成肌诱导液则借助马血清和糖皮质激素诱导成肌分化。B 和 C 成肌诱导液的最大不同主要在于 B 成肌诱导液采用 DMEM 高糖完全培养基而 C 成肌诱导液则选用 DF-12 完全培养基,DF-12 培养基中营养成分更为丰富,或在分化期间更促进成肌进程。

综上所述,本研究利用不同成分的成肌诱导液对 hUSC 进行成肌分化,结合细胞形态以及成肌特异基因表达,4 种成肌诱导液在一定条件下均可将 hUSC 分化成肌细胞,其中,C 成肌诱导液效果更显著。目前尚需开展进一步的研究来验证 hUSC 在成肌分化甚至细胞治疗上的价值。

参考文献

- Han Y, Li X, Zhang Y, *et al.* Mesenchymal stem cells for regenerative medicine[J]. *Cells*, 2019, 8(8):886
- Sui BD, Zheng CX, Li M, *et al.* Epigenetic regulation of mesenchymal stem cell homeostasis [J]. *Trends Cell Bio*, 2019, 30(2):97-116
- Viezzler C, Mazzuca R, Machado DC, *et al.* A new waterborne chitosan-based polyurethane hydrogel as a vehicle to transplant bone marrow

mesenchymal cells improved wound healing of ulcers in a diabetic rat model[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 231:115734

- Zhang Y, McNeill E, Tian H, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5):2226-2233
- 姜之歆,王从容. 人尿源干细胞的分离培养及体外成神经细胞分化研究[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(4):295-299
- Ciuffreda MC, Malpasso G, Musaro P, *et al.* Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1416:149-158
- Chen W, Xie M, Yang B, *et al.* Skeletal myogenic differentiation of human urine derived cells as a potential source for skeletal muscle regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(2):334-341
- Pavathuparambil N, Al-Hawwas M, Bobrovskaya L, *et al.* Urine-derived cells for human cell therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):189
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine[J]. *Muscle Nerv*, 1995, 18(12):1417-1426
- Antonitsis P, Ioannidou PE, Papakon C, *et al.* In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2007, 6(5):593-597
- Yu M, Wang H, Xu Y, *et al.* Insulinlike growth factor1 promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI₃K/Akt signalling pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(8):910-922
- Sumino Y, Hanada M, Hirata Y, *et al.* The effects of hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-1 on the myogenic differentiation of satellite cells in human urethral rhabdosphincter[J]. *Neurourol Urodyn*, 2010, 29(3):470-475
- Aboalola D, Han VKM. Different effects of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-2 on myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:8286248
- Liu G, Pareta RA, Wu R, *et al.* Skeletal myogenic differentiation of urine derived stem cells and angiogenesis using microbeads loaded with growth factors[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4):1311-1326
- Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, *et al.* The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(7):706-715
- Zhao Y, Zhou J, He L, *et al.* MyoD induced enhancer RNA interacts with hnRNPL to activate target gene transcription during myogenic differentiation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5787
- Li L, Chen Y, Nie L, *et al.* MyoD induced circular RNA CDR1as promotes myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(8):807-821

(收稿日期:2020-01-17)

(修回日期:2020-02-13)