

CHIR99021 对小鼠胚胎干细胞心肌细胞分化的双重作用

杨谋广, 邹传德, 王爱玲

摘要 目的 研究 CHIR99021 在小鼠胚胎干细胞(mESCs)分化为心肌细胞的作用。方法 运用经典的悬滴培养法促进 mESCs 形成拟胚体(EBs)。在不同分化时间段加入糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)抑制剂 CHIR99021, 诱导 mESCs 向心肌细胞分化, 相差显微镜在不同时间点观察不同组 EBs 搏动百分率。RT-PCR 法检测心肌特异性转录因子 Nkx2.5、 α -肌球蛋白重链(α -MHC)基因表达水平的变化。Western blot 法和免疫荧光染色法检测心肌特异性蛋白 cTnT 的表达。实验时将不加入 CHIR99021 命名为对照组, 分化第 2~5 天和第 6~10 天加入 CHIR99021 分别命名为 2~5 d 组和 6~10 d 组。结果 通过悬滴培养法能够形成 EBs, 且形成的 EBs 能够出现自发性搏动并有 cTnT 表达。在诱导分化的过程中, 第 2~5 天加入 CHIR99021 的 2~5 d 组的搏动 EBs 百分率比对照组更高, Nkx2.5、 α -MHC 基因表达的水平也比对照组高; 6~10 d 组的结果跟 2~5 d 组相反。各组中都可过 Western blot 和免疫荧光染色法检测到 cTnT 的表达, 但 2~5 d 组的 cTnT 的表达量高于对照组, 6~10 d 组的 cTnT 的表达量低于对照组。结论 GSK-3 β 抑制剂 CHIR99021 对 mESCs 心肌细胞分化具有双重作用, 即分化前期(2~5 d)促进分化, 可获得更高的分化率, 分化后期(6~10 d)结果相反。

关键词 胚胎干细胞; 心肌细胞; 分化; GSK3 β ; CHIR99021
中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1733-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.004

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)来源于胚胎着床前的多能干细胞, 在体外其可以在白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)/血清和小分子抑制剂 CHIR99021/PD0325901(即“2i”)的条件下继续保持增殖和分化的能力。通过体外培养形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)可以进一步分化形成心肌细胞^[1]。通过 ESCs 定向分化成的心肌细胞可以作为心脏发育研究和细胞移植提供材料来源,

但是由于其有多向分化的特性使得定向分化程度较低从而限制其应用^[2]。ESCs 培养采用的“2i”主要抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和糖原合成激酶 3(glycogen synthase kinase 3, GSK3)信号通路, 从而使小鼠胚胎干细胞(mESCs)长期保持自我更新, 抑制其分化^[3]。单独使用 GSK3 β 抑制剂 BIO 可以诱导 ESCs 分化成心肌细胞^[4]。该研究主要观察 GSK3 β 抑制剂 CHIR99021 对 ESCs 心肌细胞分化的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系 46C mESCs^[5] 由美国南加州大学应其龙教授赠送。

1.2 主要试剂 基础培养液[高糖 DMEM、10% 胎牛血清(FBS)]购自美国 HyClone 公司; 1% 非必需氨基酸、1% 丙酮酸钠购自美国 Introgen 公司; 0.1 mmol/L β -巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1 g/L 双抗购自美国 Gibco 公司; 1 000 U/ml LIF 购自美国 Chemicon 公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 小鼠抗心肌钙蛋白 T 抗体购自英国 Abcam 公司; 小鼠单克隆抗体 α -Tubulin、HRP 标记的羊抗小鼠抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Alexa-488 标记羊抗小鼠荧光抗体购自武汉博士德公司; Hoechst33258 购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 mESCs 的培养 从 -80 °C 冰箱取出 1 支冻存的 mESCs(46C), 快速放入 37 °C 水浴中复苏, 复苏后加入基础培养液稀释冻存时所用的二甲基亚砷, 然后在 1 000 r/min 下离心 3 min 后用基础培养液重悬并接种于 0.1% 明胶包被的 6 孔板中, 加入含有 LIF 的基础培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 换液 1 次。当 mESCs 集落达 60%~70% 融合时, 此时细胞处于对数生长期, 弃去培养液并用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗 2 遍后, 用 0.25% 胰酶消化, 用基础培养液中和胰酶、离心和重悬后进行传代。

1.3.2 EBs 的形成及诱导分化 将需要传代的

2016-06-27 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目(编号: KJ2015ZD24)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 合肥 230022

作者简介: 杨谋广, 男, 硕士研究生;

王爱玲, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: wal@ah.edu.cn

mESCs(46C) 经过胰酶消化、稀释、离心和重悬后得到 mESCs 单细胞悬液,用细胞计数板进行计数,调整细胞数目使细胞数达到 1 000 个/20 μ l,然后吸取 20 μ l 细胞悬液接种于 100 mm 无菌细菌皿皿盖上,每个皿盖上接种 200 个相同体积的孤立的悬液后将皿盖轻轻反扣于盛有 10 ml 的基础培养液细菌皿上,接种的悬液形成一个悬滴,小心将其放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。开始做悬滴培养的当天称为分化第 0 天,经过悬滴培养 2 d 后,将已经形成的 EBs 根据不同的处理条件进行分组,将不加入 CHIR99021 命名为对照组,分化第 2~5 天和第 6~10 天加入 1 μ mol/L CHIR99021 分别命名为 2~5 d 组和 6~10 d 组。然后将 EBs 分别转移到对应各组的无菌细菌培养皿基础培养液内,继续悬浮培养 5 d,每 2 d 换液 1 次,每天用移液管轻吹 EBs 1 次阻止 EBs 贴壁。

1.3.3 EBs 的贴壁培养及自发搏动情况的观察

在分化的第 7 天将各组悬浮培养的 EBs 移入 15 ml 离心管让其重力作用下自由下沉。待 EBs 沉底后吸出培养液,将沉底的 EBs 移入 0.1% 明胶包被的 12 孔板中贴壁培养,每组 60 个 EBs,每天用相差显微镜观察 EBs 分化情况,以便及时记录出现自发搏动的 EBs 的最初时间及数量。根据自发搏动的 EBs 数可得出心肌细胞的诱导效率,即出现自发搏动的 EBs 数与总的 EBs 数的比率。

1.3.4 RT-PCR 法检测目的基因表达 在分化培养过程中,分别在第 0 天、第 5 天、第 10 天和第 15 天用 TRIzol 提取总 RNA,具体步骤见说明书。以总 RNA 为模板先进行逆转录合成 cDNA,然后用逆转录产物进行 PCR 反应以检测不同组的心肌细胞特异性基因(Nkx2.5、 α -MHC)的表达水平。实验所用的基因引物由上海生工公司合成,Nkx2.5 F: 5'-GACAGGTACCGCTGTTGCTT-3', R: 5'-AGCCTACGGT-GACCCTGAC-3'; α -MHC F: 5'-AGCTGACAGGGGC-CATCAT-3', R: 5'-ACATACTCGTTCCCCACCTTC-3'。实验以 GAPDH 作为内参,GAPDH F: 5'-TTCAC-CACCATGGAGAAGGC-3', R: 5'-GGCATGGACTGTG-GTCATGA-3',各基因 mRNA 相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

1.3.5 Western blot 法检测 分化培养第 15 天的细胞,弃培养液并用 PBS 洗 2 遍后用 RIPA 裂解细胞并提取细胞蛋白,用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,根据蛋白质浓度确定合适的上样量。蛋白电泳完毕后,根据目标蛋白的大小选择转膜的区域,采用

湿法将蛋白质电转印至 PVDF 膜,转膜完成后取出 PVDF 膜,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,然后用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h 后再用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。用 5% BSA 按照 1:1 000 稀释 cTnT 抗体和 α -Tubulin 抗体,稀释的一抗在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,次日用 TBST 洗膜,然后用 HRP 标记的二抗室温温育 2 h,洗膜后使用 ECL 化学发光法显色,采用 α -Tubulin 作为内参。

1.3.6 免疫荧光法检测 在分化的第 7 天将悬浮培养的 EBs 贴壁 2 d 换液 1 次,于第 14 天吸出 EBs 培养液,用 PBS 清洗 3 次后,加入 4% 多聚甲醛(PFA)室温下固定 20 min,然后再用 PBS 清洗 3 次后加入 PBS-BSA(5% BSA、0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液)在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。弃 PBS-BSA 后用 PBS 洗涤 1 次,按照 1:200 加入小鼠抗 cTnT 抗体的 PBS-BSA 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,回收一抗,用 PBS-BSA 洗 3 次,每次 3 min,然后将含有 Alexa-488 标记的羊抗小鼠荧光抗体(1:1 000)和 Hoechst33258(DAPI, 1:5 000)染料 PBS-BSA 加入培养皿中,锡箔纸包裹,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后于荧光显微镜下观察结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用独立样本 t 检验,每组实验重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mESCs 向心肌细胞分化 复苏后的 mESCs 在 0.1% 明胶包被的 6 孔板中贴壁并呈集落样生长,起初集落呈隆起的圆形或椭圆形,随后向四周继续生长,集落中的细胞排列紧密,界限和形态不清(图 1A)。当正常培养 mESCs 培养液中去除 LIF 和 "2i" 后, mESCs 可自发出现分化。实验时将重悬后的 mESCs 经过悬滴培养 2 d 后移入 EBs 培养液悬浮培养,可见大小不一、直径约为 150~220 μ m 的球形结构即 EBs(图 1B)。在分化的第 7 天,将 EBs 移入明胶包被的培养板内贴壁培养,95% EBs 在 24 h 后贴壁生长,贴壁后的 EBs 渐渐摊平,像荷包蛋样向四周散开生长(图 1C)。2~5 d 组在第 6 天可看到极少数 EBs 开始出现自发性搏动,搏动不明显,对照组和 6~10 d 组在第 7 天贴壁培养后小部分 EBs 逐渐始出现自发性搏动,并随着分化天数的增加,搏动的百分率逐渐增加(图 2)。

2.2 mESCs 分化的不同时期加入 CHIR99021 对分化为心肌细胞的影响 实验结果显示随着分化天

数的增加,各组的心肌标志基因 Nkx2.5 都升高,与对照组比较 2~5 d 组的 Nkx2.5 基因表达水平更高,而 6~10 d 组的 Nkx2.5 基因表达水平较对照组低(图 3)。在分化第 10 天 2~5 d 组的 α -MHC 基因表达水平(3.474 0 \pm 0.638 1) 比对照组高,而 6~10 d 组(0.552 0 \pm 0.231 3) 结果与 2~5 d 组结果相反。分化第 15 天 2~5 d 组(6.179 0 \pm 1.189 4) 和 6~10 d 组(0.886 0 \pm 0.798 2) 的 α -MHC 的表达水平都高于第 10 天相应各组的表达水平,但与对照组(2.347 0 \pm 0.439 3) 相比结果与第 10 天类似($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 4。

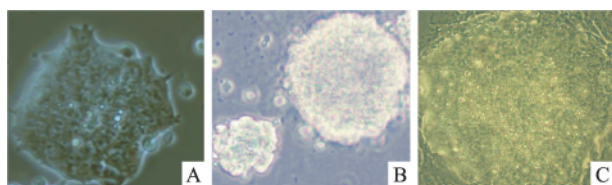


图 1 相差显微镜观察 mESCs 和 EBs 的形态 $\times 100$

A: 正常培养的 mESCs; B: 悬浮培养的 EBs(3 d); C: 贴壁培养的 EBs(8 d)

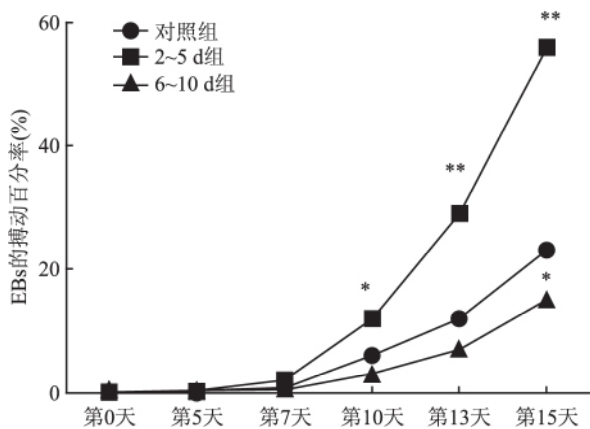


图 2 不同分化天数搏动 EBs 的百分率
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

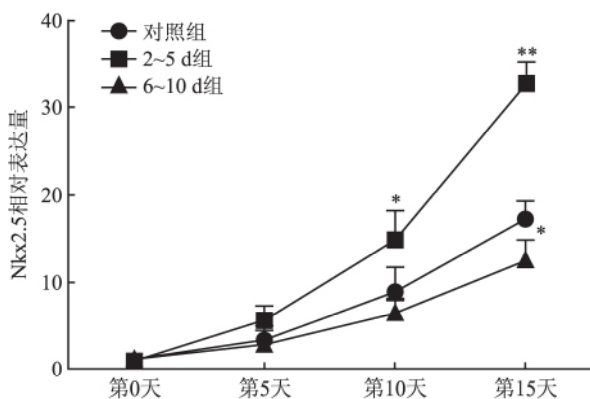


图 3 不同分化天数 Nkx2.5 的表达量
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

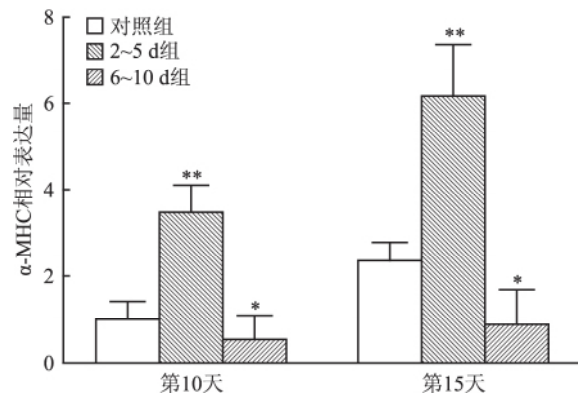


图 4 分化第 10 天和 15 天 α -MHC 的表达量
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 Western blot 法检测不同组心肌特异性蛋白 cTnT 表达 分化第 15 天的细胞,提取总蛋白用于 Western blot 法检测,其结果与 RT-PCR 的检测结果一致,提示 2~5 d 组的 cTnT 表达量高于对照组,而 6~10 d 组的 cTnT 表达量低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

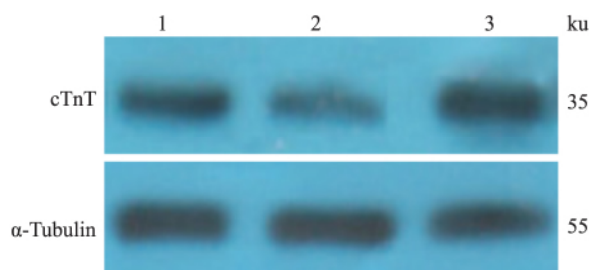


图 5 分化第 15 天 cTnT 的表达
1: 对照组; 2: 6~10 d 组; 3: 2~5 d 组

2.4 免疫荧光检测不同组心肌特异性蛋白 cTnT 的表达 在分化的第 14 天,将各组贴壁生长的 EBs 运用免疫荧光法检测,各组搏动的 EBs 内都有心肌特异性蛋白 cTnT 的表达,但 2~5 d 组的 cTnT 的表达量高于对照组,而 6~10 d 组的 cTnT 的表达量低于对照组(图 6)。

3 讨论

ESCs 是由动物或人囊胚的内细胞团或原始生殖细胞分离出来,经体外分化抑制培养筛选出的具有全能性的细胞^[6]。ESCs 在体外可以通过某些特定的因子诱导分化成心肌细胞、神经细胞^[7]和胰腺细胞^[8]等多种细胞类型。Wnt 信号通路在心脏发育和血管生成中起重要作用,在心脏发育早期激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进心脏祖细胞增殖和迁

移,而心脏发育晚期抑制其活性,促进心肌细胞分化^[9]。

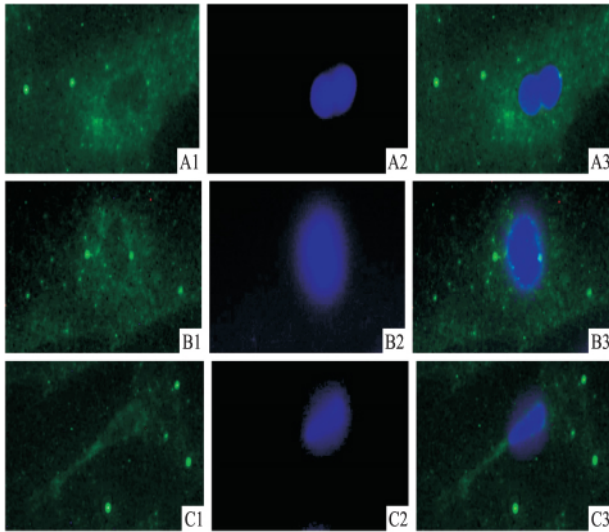


图6 免疫荧光染色 ×200

A: 对照组; B: 2 ~ 5 d 组; C: 6 ~ 10 d 组; 1: cTnT 染色(绿色); 2: Hoechst 染色(蓝色); 3: cTnT 染色和 Hoechst 染色融合

经典 Wnt/ β -catenin 信号通路在没有 Wnt 信号的情况下,细胞质中游离的 β -catenin 和 GSK-3 β 、骨架蛋白(Axin)、大肠腺瘤息肉蛋白(APC)、酪蛋白激酶(casein kinase, CK-1)一起形成多蛋白复合物, GSK-3 β 和 CK-1 对 β -catenin 进行磷酸化,磷酸化的 β -catenin 与泛素结合并最终被蛋白酶体降解。而当 Wnt 蛋白(如 Wnt3a、Wnt5a)与跨膜受体 Frizzled(Fzd)以及共同受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP5/6)结合后,激活 Dsh(Dishevelled)蛋白, Dsh 可诱导 GSK-3 β 发生磷酸化,使其与 Axin 脱离,从而拮抗 β -catenin-Axin-APC-GSK3 复合物的形成,进而阻断 β -catenin 的磷酸化、泛素化降解,进而使游离的 β -catenin 在细胞质中大量聚集,最后进入细胞核内与 Tcf/Lef 家族转录因子结合,调节靶基因(如 c-myc、cyclinD1 等)的表达水平,启动靶基因的转录,促进细胞的增殖或活化^[10]。

GSK-3 β 可以使细胞内不同底物发生磷酸化而发挥双向调节作用。Wnt 信号激活 Wnt/ β -catenin 信号通路后可以促使 LRP6 上的 PPPSPxP 序列发生磷酸化,磷酸化后的 PPPSPxP 序列决定了后续的 xS 的磷酸化。PPPSPxP 的先后磷酸化位点是 Axin 蛋白结合部的停泊位点且 GSK-3 β 是使 PPPSPxP 磷酸化的激酶^[11]。总之,在 Wnt 信号未激活时, GSK-3 β 则磷酸化 β -catenin, 然后降解胞质内游离 β -cate-

nin,起负向调控的作用。当 Wnt 信号通路被激活时, GSK-3 β 被募集并磷酸化 LRP6,磷酸化的 LRP6 可以吸引胞质内的 Axin,从而解离 β -catenin-Axin-APC-GSK3 降解复合物,可以正向调控 β -catenin。但是 Wnt 信号只能够使辅助受体 LRP6 发生磷酸化,使其能够招募 Axin/GSK-3 β 复合物转移到细胞膜上发挥生物功能,然而 Wnt 信号通路的另一个辅助受体 LRP5 尚未发现有此相似作用,其机制尚待研究。因此, GSK-3 β 的双向调节作用取决于其使什么底物发生磷酸化。GSK-3 β 的抑制剂激活 Wnt/ β -catenin 后可以诱导 microRNA-211 的表达^[12], microRNA 在 mESCs 自我更新和分化的过程具有重要作用。GSK-3 β 抑制剂在调节 mESCs 的自我更新和多向分化性时, Wnt/ β -catenin 通路并不只是唯一通路,同时还抑制 JAK/STAT3 通路^[13]。GSK-3 β 的抑制剂有多种小分子如 BIO、CHIR99021、CHIR98014 和 SB216763, GSK-3 β 的抑制剂 CHIR99021 促进 mESCs 分化的效果较其他的抑制剂好,且 1 μ mol/L 是最适浓度^[14]。本研究通过在不同的分化时间段加入 GSK-3 β 的抑制剂 CHIR99021,观察 mESCs 向心肌细胞分化的效率。实验结果显示,在分化早期(2 ~ 5 d)加入 GSK-3 β 的抑制剂可以促进 mESCs 心肌细胞分化,心肌特异性基因表达增加,而分化后期(6 ~ 10 d)则抑制心肌分化,心肌特异性基因表达较对照组低,说明不仅没有促进分化,反而抑制了 mESCs 向心肌细胞分化。根据实验结果可以得知在整个分化过程中不同时间段加入诱导剂,实验结果相反,可见 GSK-3 β 的抑制剂 CHIR99021 对 mESCs 心肌细胞分化具有双重作用。

综上所述,根据 CHIR99021 对 ESCs 心肌细胞分化双重作用的特点,可以有目的地诱导 mESCs 向心肌细胞分化,可以在不同分化时间段激活/阻断其作用,从而获得更高的心肌细胞分化率,得到更多的心肌细胞。该研究可以为 mESCs 心肌细胞分化提供一种新的诱导方式,可以为临床心脏疾病的细胞移植提供细胞来源。

参考文献

- [1] Ying Q L, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. Nature 2008, 453(7194): 519-23.
- [2] Makhoul G, Jurakhan R, Jaiswal P K, et al. Conditioned medium of H9c2 triggers VEGF dependent angiogenesis by activation of p38/pSTAT3 pathways in placenta derived stem cells for cardiac repair[J]. Life Sci, 2016, 153: 213-21.
- [3] Huang G, Yan H, Ye S, et al. STAT3 phosphorylation at tyrosine

- 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates [J]. *Stem Cells* 2014 32(5): 1149–60.
- [4] Ueno S, Weidinger G, Osuigi T, et al. Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad U S A* 2007 104(23): 9685–90.
- [5] Ying Q L, Stavridis M, Griffiths D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]. *Nat Biotechnol* 2003 21(2): 183–6.
- [6] Abbey D, Seshagiri P B. Aza-induced cardiomyocyte differentiation of P19 EC-cells by epigenetic co-regulation and ERK signaling [J]. *Gene* 2013 526(2): 364–73.
- [7] Lu J, Tan L, Li P, et al. All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluri-potent embryonic stem cells *via* multiple pathways [J]. *BMC Cell Biol* 2009 10: 57.
- [8] Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells [J]. *Diabetes* 2001 50(8): 1691–7.
- [9] Lian X, Zhang J, Zhu K, et al. Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical Wnt signaling can rescue this inhibition [J]. *Stem Cells* 2013 31(3): 447–57.
- [10] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(3): 119–29.
- [11] Wu G, Huang H, Garcia Abreu J, et al. Inhibition of GSK3 phosphorylation of β -catenin *via* phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6 [J]. *PLoS One*, 2009 4(3): e4926.
- [12] Wu Y, Liu F, Liu Y, et al. GSK3 inhibitors CHIR99021 and 6-bromindirubin-3'-oxime inhibit microRNA maturation in mouse embryonic stem cells [J]. *Sci Rep*, 2015 5: 8666.
- [13] Liu L, Nam S, Tian Y, et al. 6-Bromindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells [J]. *Cancer Res* 2011 71(11): 3972–9.
- [14] Naujok O, Lentz J, Diekmann U, et al. Cytotoxicity and activation of the Wnt/ β -catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors [J]. *BMC Res Notes* 2014 7: 273.

Biphasic effects of CHIR99021 on differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes

Yang Mouguang, Zou Chuande, Wang Ailing

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the roles of CHIR99021 in differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs) into cardiomyocytes. **Methods** Hanging drop culture was used to induce mESCs differentiating into cardiomyocytes through forming EBs. ESCs were induced differentiating into cardiomyocytes *via* administering GSK3 β inhibitor CHIR99021 at different time points. The percentage of beating EBs was calculated by inverted phase contrast microscope and the mRNA expression of Nkx2.5 and α -MHC were detected by RT-PCR at different time points. Cardiac-specific protein TnT (cTnT) was detected by Western blot and immunofluorescence staining. The untreated group, the CHIR99021-treated group during days 2 to 5 and during days 6 to 10 were referred to as control group, 2 to 5 d group and 6 to 10 d group respectively. **Results** Spontaneously beating EBs were positively stained with cTnT *via* hanging drop culture and 2 to 5 d group produced higher level of cTnT versus control, while 6 to 10 d group had the opposite results. 2 to 5 d group produced higher percentage of beating EBs and higher gene expression of Nkx2.5 and α -MHC compared with those in the control group, whereas 6 to 10 d group had the opposite results. **Conclusion** Our results indicate that the function of GSK3 β inhibitor CHIR99021 during cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells is biphasic. The activation of CHIR99021 during the days 2 to 5 produces a higher level of myocardial differentiation than the inhibition of CHIR99021 during days 6 to 10.

Key words embryonic stem cells; cardiomyocyte; differentiation; GSK3 β ; CHIR99021