

· 基础研究 ·

转录因子 Tbx18 导入人诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞构建起搏样细胞的实验研究

王芸 吴福建 兰峰 任学军

【摘要】 目的: 研究转录因子 Tbx18 能否转染人诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞 (hiPSC-CMs) 并使其向起搏细胞分化。方法: 纯化接种 hiPSC-CMs 构建重组腺病毒-绿色荧光蛋白 Ad-(GFP)-Tbx18 载体 转染 hiPSC-Cs 为实验组 转染只含 GFP 的腺病毒组及空白未转染组作为对照。转染后定期检测细胞的变化情况 荧光倒置显微镜计数转染后细胞的搏动频率变化情况; RT-PCR 测定起搏细胞特异性基因的表达。结果: 实验组 hiPSC-CM 的搏动频率高于对照组 [(61.3 ± 13.6) vs. (33.0 ± 1.67) 次/min, $P < 0.05$]。实验组起搏特异性基因 HCN4 的表达较对照组明显增加, KIR2.1、SCN5A、CX43 等心室肌特异性基因表达较对照组下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: Tbx18 基因可成功转染 hiPSC-CMs 并使之转化为窦房结样起搏细胞。

【关键词】 转录因子 Tbx18; 诱导多潜能干细胞; 生物起搏

【中图分类号】 R54 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1007-5062(2018)04-354-05

Direct conversion of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of transcript factor Tbx18 WANG Yun, WU Fujian, LAN Feng, REN Xuejun Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institution of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China

【Abstract】 Objective: To observe if Tbx18 can successfully transfer human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) and induce it to differentiate into pacemaker-like cells. **Methods:** Human iPSC-CMs were obtained from Beijing Cellapy Biological Technology Co., Ltd. After purified for 1 week, the hiPSC-CMs were transfected with Tbx18 and GFP carried by adenoviral vectors. Quantitative Real time-PCR was used to detect the expression change fold of HCN4 mRNA. **Results:** After transfection, the fluorescence could be seen by the fluorescence microscope, and it last for about 3 weeks. Within days of transduction with Tbx18, the cardiomyocytes in culture developed spontaneous electrical firing physiologically indistinguishable from that of sinoatrial node cells, along with morphological and epigenetic features characteristic of pacemaker cells. **Conclusion:** Tbx18 can be transfected into hiPSC-CMs, and it can induce human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to differentiation into sinoatrial node-like pacemaker cells.

【Keywords】 Transcription factor; ips cell; Biological pacemaker

生物起搏是当前治疗缓慢型心律失常的研究热点,能克服传统起搏器置入可能出现的感染、电池耗竭、导线磨损等问题^[1]。胚胎期的转录因子能够从窦房结发育的上游信号通路调控细胞的发育,动物模型研究表明转录因子 Tbx18 对早期窦房结功能特异性至关重要^[2]。利用基因技术在离体和动物在体

环境中过表达 Tbx18,可以使心室肌细胞转变为起搏样细胞^[3]。但是 Tbx18 是否能使人性诱导多潜能干细胞 (human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, hiPSC) 向自律性较高的起搏样细胞转化仍然未知。我们的实验旨在探索 Tbx18 转染是否能使 hiPSC 分化的心肌细胞向窦房结样起搏

细胞分化,从而为其在心脏生物起搏的治疗方面做好准备。

材料与方法

1. 实验材料 CardioEasy® 人心肌细胞 (Cellapy: CA2101106)、人心肌细胞铺底工作液 (Cellapy: Cat. CA2010100/ CA2010500)、心肌接种培养基 (Cellapy: CA2002009)、人心肌细胞纯化培养基 (Cellapy: CA2005100)、心肌维持培养基 (Cellapy: CA2003100)、人心肌细胞消化液 (Cellapy: CA2006009)、细胞培养级 DMSO (Sigma: Cat. D2650)、细胞培养级的 PBS 溶液 (Hyclone: Cat. SH30256.01)、腺病毒载体 Ad. Tbx18、Ad. GFP (吉凯公司)、人 HCN4 单克隆抗体美国 (Abcam 公司)、Trizol 试剂、实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 仪、倒置显微镜、荧光显微镜 (日本 olympus 公司)、电泳仪、电泳槽。

2. hiPSC 心肌细胞纯化、接种及鉴定 (1) 材料准备: ①在 60mm 培养皿中添加人心肌细胞铺底工作液至完全覆盖皿底, 37℃ 包被 4h 以上备用。②室温下平衡心肌细胞接种培养基, 吸去培养皿中的铺底工作液, 加入适量接种培养基, 置于 5% CO₂, 37℃ 恒温细胞培养箱中。(2) 心肌细胞消化: ③取 CardioEasy® 人心肌细胞 1 瓶, PBS 溶液清洗一次, 加入心肌细胞消化液使之完全覆盖瓶底, 37℃ 恒温, CO₂ 培养箱孵育 15 ~ 30 min, 显微镜下观察到大部分细胞间连接消失, 细胞呈现单个圆形。④用移液枪吹打制成单细胞悬液, 并转至 15mL 离心管中, 再用适量 PBS 溶液清洗培养瓶, 收集剩余细胞加入同一离心管中 200g 离心 5 min。⑤弃去上清, 用接种培养基重悬细胞, 并按 2:1 ~ 3:1 的比例接种到准备好的皿, 水平十字摇匀。(3) 心肌细胞纯化: 5% CO₂, 37℃ 恒温培养箱中培养 24h, 更换为心肌细胞维持培养基, 待心肌细胞稳定搏动 2 d 后, 用 PBS 溶液清洗 1 次, 更换为心肌细胞纯化完全培养基。5% CO₂, 37℃ 恒温箱中培养 4d, 加入 PBS 溶液清洗 1 次去除死细胞, 更换为心肌细胞维持培养基持续培养, 1 ~ 3 d 后, 可观察到细胞恢复搏动, 细胞纯度变高。(4) 心肌细胞鉴定: RT-PCR 检测 NKX2-5, MYH6, MYH7, MLC2V 等心肌细胞特异性基因在 hiPSC-CM 中的表达情况。

3. 病毒转染 取纯化的 hiPS-CM 细胞接种入 12 孔板中, 当细胞 80% 融合时分别以不同的感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 值 (10、20、30、50、

70、100) 分别加入 Ad. GFP. Tbx18 和 Ad. GFP 进行转染。使用心肌维持培养基定容为 500μL, 2 h 后补加至 1 mL。培养 48h 后换液, 72 h 后置于荧光显微镜下观察细胞形态变化、成活率及 GFP 荧光比例, 选择转染率高且细胞病死率低的 MOI 值使用上述方法进行后续转染。

4. 转染后观察细胞形态和搏动频率变化 将纯化的 hiPS-CM 细胞接种入 12 孔板中, 待生长至 70% 融合时, 使用最佳病毒浓度转染 hiPS-CM 细胞, 实验组、GFP 组分别转染 4 孔, 空白对照组 4 孔。48 h 后换液, 72 h 后开始显微镜下观察。在倒置显微镜和荧光显微镜下观察转染 Tbx-18 的细胞形态和搏动频率, 第 1、3、5、7、14、21 天分别计数三组心率变化、观察细胞形态变化。每组从各孔随机取 3 个视野, 分别计数视野中细胞簇的搏动频率, 取平均值, 各视野分别录像 1 分钟。

5. 实时定量 PCR 检测起搏细胞相关基因表达 转染 10d 后采用 Trizol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书将其反转录成 cDNA, 行 qRT-PCR。PCR 反应体系为: 2 × SYBR Green 染料 12.5 μL, 引物混合物 1 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 2 μL, PCR 反应条件: 95℃ 2 min, 95℃ 1 min, 55℃ 2 min, 35 个循环, 延伸 5 min。延伸时读板, 收集荧光值。以 GAPDH 作为内参, 2^{-ΔΔCt} 法计算产物相对量。

6. 统计学方法 用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差表示, 多组间均数比较用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1. 人诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞形态表型及功能鉴定 通过 MLC2v、MLC2a 和 HCN4 等心肌工作细胞及起搏细胞特异性蛋白的免疫荧光检测, 表明 hiPS-CMs 为细胞混合体, 含有约 70% ~ 80% 的心室肌细胞、20% ~ 30% 的心房肌细胞和 < 5% 的窦房结样细胞。这些细胞表达常规的心肌特异性基因, 包括多种收缩蛋白和离子通道, 同时具备经典的心肌细胞电生理活性, 能够对电生理和生物化学刺激做出心肌细胞的常规反应。

2. 病毒转染效率 病毒转染后 48 h 于显微镜下观察 (10X), MOI = 10 组细胞形态未见明显改变, 细胞大部分贴壁生长, 死亡细胞较少; MOI = 30 组漂浮死亡细胞数量较前组多, 部分细胞形态变为圆形,

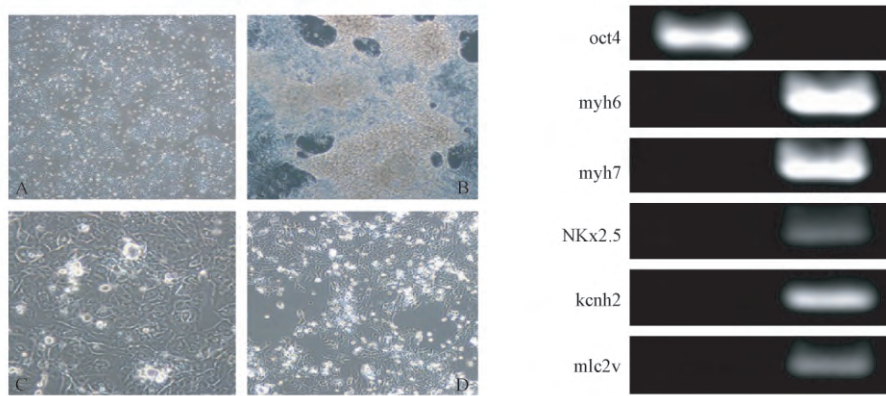


图1 左图: hiPSC 及 hiPSC-CMs 镜下图像(10x)。A: 重编程后纯化的 hiPSC; B: 诱导分化后未纯化的心肌细胞; C: 纯化 3 天后的心肌细胞; D: 纯化 7 天后的心肌细胞; 右图: RT-PCR 检测 CardioEasy® 人心肌细胞能够表达常规的心肌特异性基因

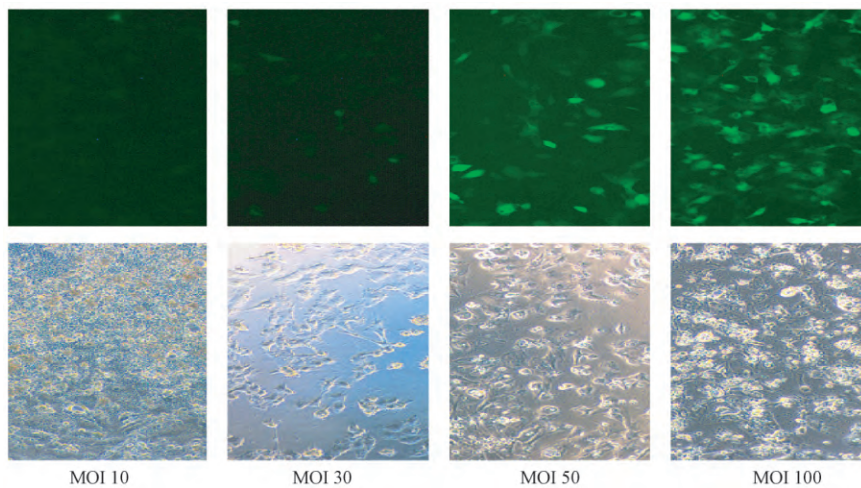


图2 病毒转染效率图(×10)

细胞间连接减少; MOI = 50 组死亡细胞数量前组相似, 大多数细胞形态变为梭形; MOI = 100 组细胞数量减少, 死亡细胞较多。72 h 后置于荧光显微镜下观察(×10), 三组均有绿色荧光表达, MOI = 10 与 MOI = 30 组组荧光亮度较弱, 荧光细胞几乎没有; MOI = 50 组荧光亮度较强, 荧光细胞数目与之相似, MOI = 100 组荧光亮度较强, 与前组相似, 但漂浮死亡细胞较多。综合考虑转染率与细胞病死率, 我们选用 MOI = 50 作为最佳转染剂量。

3. 转染后各组细胞形态功能变化 加病毒 1d 心肌细胞形态无明显改变, 以多边形为主, 可见少量梭形、菱形细胞, 细胞间形成联系, 可见均一的同步化跳动的单层心肌组织, 频率多在 35bpm 左右; 3 ~ 7d 细胞形态逐渐改变, 以梭形、纺锤形为主, 细胞间联系减少, 搏动频率逐渐增加, 在 60 次/min 左右。7 ~ 21d 后细胞形态较前无明显变化, 部分形成新的细胞间连接, 可见细胞簇, 搏动频率较前无明显增

加, 18d 后细胞搏动逐渐减弱(图 3)。

TBX18 组的搏动频率明显快于 GFP 组 [(61.33 ± 13.5) vs. (33.01 ± 1.67) 次/min, $P < 0.01$] (表 1, 图 4), 说明 Tbx18 可以显著提高 hiPSC-CMs 的搏动频率; GFP 与空白对照组之间搏动频率并无差异 ($P > 0.05$), 说明腺病毒转染基本不影响 hiPSC-CMs 的活性及功能。

表 1 加入病毒 21d 各组心率比较(次/min)

组别	平均心率	标准差	最小心率	最大心率
tbx-18 (n = 21)	61.33	13.5	35	74
GFP (n = 21)	33.01	1.67	30	36
空白 (n = 21)	35.05	1.28	33	37

4. 转染后起搏细胞相关基因的表达改变情况 用腺病毒载体转染 293 细胞 4d, 进行起搏相关基因 HCN4 表达量的检测, 得出 5×10^6 (MOI = 50) 为最佳病毒转染浓度, 并以 HCN4 表达量为参照。实验组 (Ad. Tbx18) 与对照组 (Ad. GFP) 同时转染腺病毒

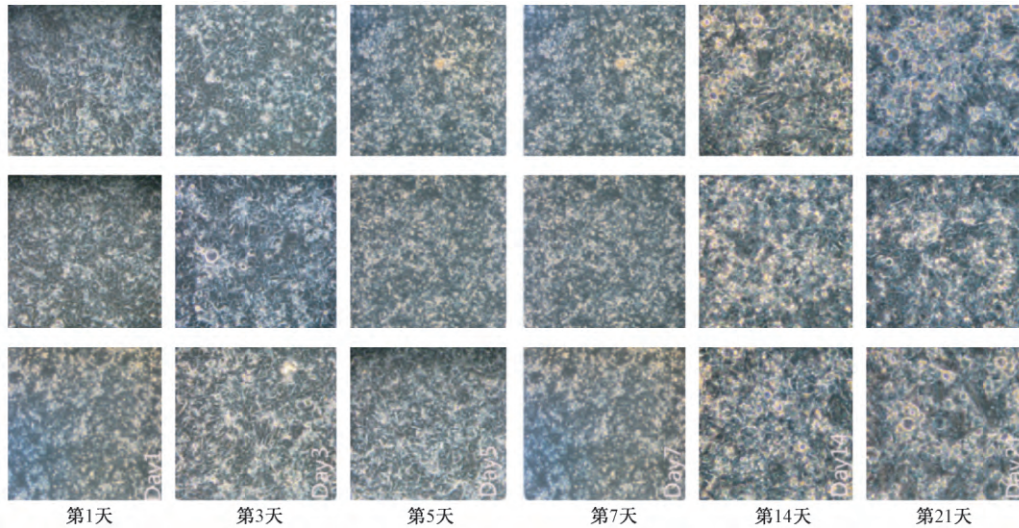


图3 转染后各组细胞形态功能变化

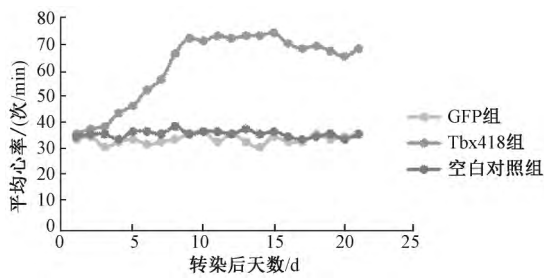


图4 转染后3周各组心率变化

载体 4d 后 qRT-PCR 检测相关基因表达变化情况，发现起搏功能相关基因 HCN4 mRNA 表达水平明显高于 GFP 组 ($P < 0.05$)；Tbx18 组较 GFP 组 KIR2.1、SCN5A、CX43 等心室肌特异性基因表达明显减低。分析显示 hiPSC-CM 在后续培养过程中持续表达窦房结细胞的特异性结构基因 HCN4，其表达量随时间延续而增加。

讨论

位于窦房结中心区的结细胞是典型的起搏细胞，细胞较小，呈梭形或长梭形，细胞中仅有散在的

肌丝，几乎没有线粒体和内质网。结细胞的自律性基础来源于产生 4 期自动去极化的 If 电流，而 HCN4 通道是产生 If 电流的特异性离子通道^[4-5]。已有研究利用基因技术使棕色脂肪源性干细胞、间充质干细胞过表达 HCN 通道，从而获得具有一定自律性的起搏样细胞^[6]。这些方法的不足之处在于，基因转染单个或多个离子通道虽有一定起搏功能，但其细胞表型与窦房结相差甚远，且对自主神经调控反应差，干细胞移植其潜在的致癌风险较大等。因此进一步的研究方向转移到窦房结发育过程中关键的转录因子家族上来，尝试从窦房结胚胎发育的上游调控的角度构建生物起搏器^[7]，其中转录因子 Tbx18 的研究结果最令人瞩目^[8]。

Tbx18 属于转录因子 T-box 家族，位于染色体 6q14-q15，是胚胎发育期重要的转录因子，目前已有较多在体及离体实验研究表明 Tbx18 能影响窦房结的发育，且 Tbx18 的转录激活因子能诱发心外膜和平滑肌的分化作用^[9-10]。Kapoor 等^[2]以病毒为载体将一组转录因子 (Shox2、TBX3、TBX5、TBX18、

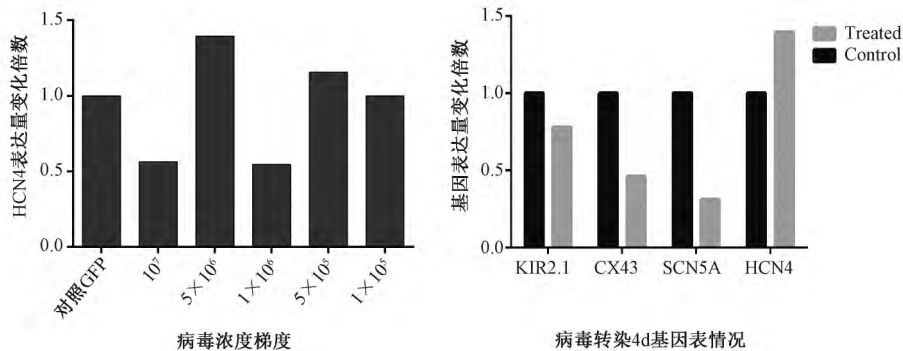


图5 转染后起搏细胞相关基因的表达改变情况

TBX20) 分别转入新生心室肌细胞, 结果发现只有 Tbx18 增加心肌细胞自律性, 并且 HCN4 表达增加, 动作电位和细胞形态显示出窦房结样改变。因此, 本研究中我们选择导入转录因子 TBX18, 以使工具细胞获得起搏功能。

以细胞为基础构建的生物起搏器的研究已经能产生起搏功能。细胞生物起搏指将具有起搏功能或可分化为具有起搏功能的细胞移植到受损的传导组织中, 进行细胞修复或替代^[11]。常用的种子细胞如胚胎干细胞、间充质干细胞、成体细胞等, 但胚胎干细胞的免疫原性、致畸性及伦理问题限制了其发展, 间充质干细胞移植的转化及调节机制尚不明确, 且其长期疗效及安全性尚需进一步评估。近年来体细胞重编程^[12-14] (reprogram) 及 iPSC 定向分化技术的^[15] 迅速发展, 为种子细胞提供了良好的选择。目前 iPSC 细胞在心血管疾病研究和治疗中的应用主要在药物筛选及遗传性心脏疾病的模型建立, 用于移植治疗的研究还处于基础实验阶段, 细胞移植的安全性及其功能表达的持久性需要进一步随访评价。

我们使用 Tbx18 的腺病毒载体对 hiPSC-CMs 进行了转染, 荧光显微镜显示转染成功, 由于之前并没有关于 Ad-Tbx18 转染人源性诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞的报道, 我们首先对转染的安全性和有效性进行评估。结合倒置显微镜的观察结果, 我们认为 MOI = 50 为最适宜的转染滴度, 并在后续实验中利用此滴度进行转染。通过 21 天显微镜下观察细胞形态, 发现细胞体积变小、细胞间连接减少、细胞形态似长梭形, 类似于窦房结细胞, 转染后细胞搏动频率明显增加且不依赖 Tbx18 的持续表达, 在转染 72h 后, Tbx18 转染细胞较对照组出现了 HCN4 表达明显增高, 说明转染了 Tbx18 的 hiPS-CMs 出现了向起搏结细胞转化的趋势, 预计 hiPS 心肌细胞可作为较稳定的种子细胞。

本实验中存在问题: 如人窦房结细胞缺少特异性表达的基因或蛋白标志, 仅能使用心率变化或具有起搏功能的离子通道基因变化来提示细胞转化, 无法确定转化后的细胞即为窦房结细胞; 未进行膜片钳等实验验证单个细胞是否具有起搏细胞特异性动作电位; 转化后的细胞能否长久生存等, 这些问题有望在后续进一步的实验中得到解决。

综上所述, 本实验中我们采用人诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞为工具, 导入转录因子 Tbx18 后, hiPS-CMs 的形态和功能发生改变, 从起初具有紧密细胞间联系的多边形变为长梭形细胞, 细胞搏

动频率显著增加, 起搏相关基因表达明显增加, 心室肌特异性基因表达下调, 使原本纯度 70% 以上的心室肌细胞大部分向窦房结样细胞转化, 成功构建了类窦房结样起搏细胞。本实验探索了人源性诱导多潜能干细胞分化的心肌细胞向起搏细胞转化的方法, 进一步目标希望能探索出诱导多潜能干细胞向不同种类心肌细胞定向分化的方法。

参考文献

- [1] Chauveau S, Brink P R, Cohen I S. Stem cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: a review[J]. *Cytherapy*, 2014, 16(7): 873-880.
- [2] Kapoor N, Liang W, Marbn E, et al. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of TBX18[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(1): 54-62.
- [3] Hu Y F, Dawkins J F, Cho H C, et al. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block[J]. *Sci Translational Med*, 2014, 6(245): 245ra94.
- [4] Dario DiFrancesco. The role of the funny current in pacemaker activity[J]. *Circ Res*, 2010, 106(3): 434-446.
- [5] Verkerk A O, Wilders R. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: An update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current[J]. *Inter J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3071-94.
- [6] Zhou Y, Yang X. e0031 Character of pacemaker current in mesenchymal stem cells transfected with HCN4 genes[J]. *Heart*, 2010.
- [7] Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2): 212-222.
- [8] Cai C L, Martin J C, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 104.
- [9] Lu Fan, She Qiang. Function and research progress of Tbx18 during heart development[J]. *Adv Cardiovasc Dis*, 2013, 34(6): 814-818.
- [10] Thomas G, Carsten R, Ludtke TH, et al. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells[J]. *Circ Res*, 2011, 108(7): 813-823.
- [11] Ruhparwar A, Tebbenhanns J, Niehaus M, et al. Transplanted fetal cardiomyocytes as cardiac pacemaker. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002 21: 853-857.
- [12] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-676.
- [13] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [14] Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods*, 2011; 8: 409-412.
- [15] Ma J, Guo L, Fiene S J, et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents[J]. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*, 2011, 301(5): H2006.

(2017-08-16 收稿)