



氯化钴诱导 hiPSC-CMs 体外缺氧模型的建立

朱梦怡¹, 柯敏霞¹, 王皓^{2,3}, 齐念民^{2,3}, 吴月红¹

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 杭州标模生物科技有限公司, 杭州 310018;
3. 上海丽坤生物科技股份有限公司, 上海 201499)

摘要: 为进一步了解缺氧性心血管疾病的发病机制, 通过使用 CHIR99021 和 IWP2 抑制剂的组合诱导和单层诱导分化方法获得人诱导性多能干细胞来源心肌细胞 (Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs), 并在 hiPSC-CMs 的培养系统中加入氯化钴进行处理, 通过 CCK-8 检测、Hoechst 荧光染色分析、台盼蓝染色分析、qRT-PCR 检测和 Western blot 检测确定最佳处理浓度和时间。CCK-8 检测结果显示, 低浓度 CoCl_2 (100、300 $\mu\text{mol/L}$) 处理显著提高 hiPSC-CMs 细胞活力 ($p < 0.01$), 高浓度 CoCl_2 (900、1200 $\mu\text{mol/L}$) 处理显著抑制 hiPSC-CMs 细胞活力 ($p < 0.001$), 并且作用趋势呈剂量和时间依赖性, 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理对于 hiPSC-CMs 的细胞活力影响不明显 ($p < 0.05$); Hoechst 荧光染色结果显示, CoCl_2 处理 24 h 和 48 h 后, 低浓度 CoCl_2 处理对细胞无影响, Hoechst 染色阳性细胞数量少 ($p > 0.05$), 高浓度 CoCl_2 处理剂量依赖性增加阳性细胞数量 ($p < 0.0001$), 且 48 h 处理组的结果与 24 h 处理组无显著差异; 台盼蓝染色结果表明, CoCl_2 处理可剂量依赖性促进细胞凋亡; CoCl_2 处理后, 促凋亡相关基因 *Bax* 和蛋白 *Bax* 表达呈剂量依赖性上调 ($p < 0.001$), 抗凋亡相关基因 *Bcl-2* 和蛋白 *Bcl-2* 表达呈剂量依赖性下调 ($p < 0.001$); CoCl_2 处理可剂量依赖性促进 hiPSC-CMs 细胞的凋亡。通过 qRT-PCR 检测和 Western blot 检测确定 600 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳处理浓度, 24 h 为最佳处理时间, 证明了该处理条件既不影响 hiPSC-CMs 细胞活力又可致其缺氧凋亡, 建立了氯化钴诱导的 hiPSC-CMs 体外缺氧模型。论文结果为体外探索缺氧引起的心血管疾病的发病机制和寻找新的治疗靶点与药物提供了可靠的工具。

关键词: 缺氧性心血管疾病; 人诱导性多能干细胞来源心肌细胞 (hiPSC-CMs); 氯化钴 (CoCl_2); 心肌缺氧损伤模型
中图分类号: Q291 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2021) 01-0084-10

Establishment of a CoCl_2 -mediated *in vitro* hiPSC-CMs hypoxia model

ZHU Mengyi¹, KE Minxia¹, WANG Hao^{2,3}, QI Nianmin^{2,3}, WU Yuehong¹

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Hangzhou Biaomo Biosciences Co., Ltd., Hangzhou 310018, China;
3. Asia Stem Cell Therapies Co., Ltd, Shanghai 201499, China)

Abstract: To further understand the pathogenesis of hypoxic cardiovascular disease, hiPSC-CMs (human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes) were obtained by using the combined induction of CHIR99021 and IWP2 inhibitors and single-layer induction differentiation methods, and cobalt chloride (CoCl_2) was added to the culture system of hiPSC-CMs for treatment. The optimal treatment concentration and time were determined by CCK-8 detection, Hoechst fluorescent staining analysis, trypan blue staining analysis, qRT-PCR analysis, and Western blot analysis. The results of CCK-8 detection showed that low concentration of CoCl_2 (100, 300 $\mu\text{mol/L}$) significantly enhanced the viability of hiPSC-

收稿日期: 2020-09-24 网络出版日期: 2020-11-11

基金项目: 企业委托研发项目 (16040135-J)

作者简介: 朱梦怡 (1995-), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生, 主要从事干细胞方面的研究。

通信作者: 吴月红, E-mail: wuyuehong2003@163.com

CMs ($p < 0.01$), and high concentration of CoCl_2 (900, 1200 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the viability of hiPSC-CMs ($p < 0.001$). Besides, the action trend was dose-dependent and time-dependent. 600 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 had no significant effect on the viability of hiPSC-CMs ($p < 0.05$). The results of the Hoechst fluorescence staining assay showed that after 24 h and 48 h of CoCl_2 treatment, low concentration of CoCl_2 treatment had no significant effect on cells, and the number of positive cells dyed by Hoechst decreased ($p > 0.05$). High concentration of CoCl_2 treatment dose-dependently increased the number of positive cells ($p < 0.0001$), and there was no significant difference between the results of 48 h treatment group and the 24 h treatment group. The results of the trypan blue staining assay showed that CoCl_2 dose-dependently promoted apoptosis. After CoCl_2 treatment, pro-apoptotic gene *Bax* and protein Bax expression presented dose-dependent up-regulation ($p < 0.001$). Anti-apoptotic gene *Bcl-2* and protein Bcl-2 expression presented dose-dependent down-regulation ($p < 0.001$). CoCl_2 treatment could dose-dependently promote hiPSC-CMs apoptosis. qRT-PCR test and Western blot test were used to determine 600 $\mu\text{mol/L}$ as the optimal treatment concentration and 24 h as the optimal treatment time, proving that the treatment conditions neither affected the viability of hiPSC-CMs nor caused hypoxia apoptosis. The CoCl_2 -mediated *in vitro* hypoxia model of hiPSC-CMs was established. The paper provides a reliable tool for exploring the pathogenesis of hypoxic-cardiovascular diseases and finding new therapeutic targets and drugs.

Key words: hypoxic cardiovascular disease; human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs); cobalt chloride (CoCl_2); myocardial hypoxia injury model

0 引言

缺氧性疾病是一种常见且频繁发生的疾病^[1],在由缺氧引起的疾病中,心脏对外部变化的敏感程度较大,因此心血管疾病已成为缺氧性疾病的重要组成部分^[2]。心肌细胞的损伤存在于多种心血管疾病的发展过程中,并可导致心血管功能障碍^[3]。对缺氧性心血管疾病有关的研究是当前疾病研究的重要组成部分,但由于研究材料和方法的缺乏以及一系列伦理道德问题,其研究进展受到了阻碍^[4-5]。动物模型是目前最常用的体外研究缺氧性心血管疾病发病机制的实验对象^[6],然而动物和人类在基因组学、蛋白组学、生理学、药理学和病理学等多方面有很大不同^[7]。人诱导性多能干细胞来源心肌细胞(Human induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes, hiPSC-CMs)体外分化技术的出现为缺氧性心血管疾病发病机制的研究和新药的开发带来了曙光^[8]。

人诱导性多能干细胞(Human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)是基于将特定的转录因子转导至已经分化的体细胞中,并且经过重新编程而生成的一种细胞,其类似于人类胚胎干细胞(Human embryonic stem cells, hESCs),可以自我更新并维持未分化状态^[9-13]。hiPSCs和hESCs在许多方面都相似,如生长特性、发育特性、表观遗传

特性、细胞形态、基因组学和蛋白质组学表达以及干细胞标志物表达^[14-17]。人类胚胎干细胞来源的心肌细胞(Human embryonic stem cells-derived stem cells, hESC-CMs)在与缺氧性心血管疾病相关的研究中更常用,但其涉及的伦理道德问题使其应用受到限制,hiPSC-CMs已被证实可用于许多医学领域,如心脏发育、药物筛选和药物开发的基础研究等^[13]。随着干细胞研究的进一步发展,hiPSC-CMs显示出了较大临床应用前景。

氯化钴(Cobalt chloride, CoCl_2)是目前用于体外诱导缺氧最常见的化学物质^[18-20],可以通过多种方式模拟缺氧反应。 CoCl_2 介导的缺氧机制非常复杂,涉及多种途径,如 Co^{2+} 的活化、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白的积累和活性氧的积累反应^[18]。 CoCl_2 模拟的缺氧将增加HIF-1 α 蛋白在细胞中的表达水平^[21-22],已被广泛用于探索各类实验模型中的心脏气传感机制,对缺氧性心血管疾病的发病机制和治疗策略的探索是目前较为重要的研究方向之一。本文分析 CoCl_2 对hiPSC-CMs的细胞活力及凋亡的影响,探索既可致其缺氧凋亡又不过度影响其细胞活力的处理条件,旨在建立 CoCl_2 诱导的hiPSC-CMs体外缺氧模型,为今后体外探索缺氧性心血管疾病的发病机理和寻找新的治疗靶点提供可用的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

hiPSCs 细胞系(DYR0100)和 hESC 细胞系(H9)由本实验室保存,本实验所用的细胞均在含有 5.0% 二氧化碳的 37 °C 培养箱中进行培养。mTeSR™1 培养基和 Accutase™ 酶均购自美国 STEM CELL 公司,诱导所用的 CHIR99021 和 IWP2 抑制剂购自美国 MedChemExpress 公司,第一链反转录试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司,RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,无胰岛素及含胰岛素的 B27 试剂购自 BD 公司,Trizol 试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,SYBR Premix Ex Taq 试剂购自大连 Takara 公司,Triton X-100 试剂购自 Sigma 公司,CoCl₂ 粉末购自中国国药,Hoechst 荧光染色试剂盒购自南京碧云天公司,台盼蓝染色液购自美国 Sigma 公司,所用抗体均购自美国 Abcam 公司,所用引物均由自上海生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 干细胞的培养

实验中所用的干细胞均使用标准 mTeSR™1 培养基进行培养,每隔 2 d 给细胞更换新鲜的培养基。当细胞密度到达 80%~90%时,进行传代。传代时利用 Accutase™ 酶进行消化,将其与细胞一起

孵育 3 min,后用移液枪将细胞轻轻吹打下来。将收集起来的细胞悬液转移至新的 15 mL 离心管中进行 1000 r/min 离心,弃上清,加入 8 mL 温热的新鲜培养基,用移液枪轻轻吹打至细胞团分散成单个细胞,最后将含有细胞的悬液以 1:4 的比例铺于基质胶包被的培养皿中继续培养。

1.2.2 心肌细胞的分化

为了直接分化生成心肌细胞,以 1:6 的比例将培养皿中的干细胞铺于基质胶包被的 12 孔板上,并培养 2 d 至其密度至 85%。在第 0 天,将细胞用含有 6 μmol/L GSK-β 抑制剂 CHIR99021 的无胰岛素 RPMI/B27 培养基处理 2 d,转移至补充有 3 μg/mL Wnt 信号通路抑制剂 IWP2 的无胰岛素 RPMI/B27 培养基中培养 3 d 后,将培养基更改为无胰岛素 RPMI/B27 培养基,在第 7 天时更改为含胰岛素的 RPMI/B27 培养基进行持续培养,直至第 21 天细胞分化完成。

1.2.3 逆转录定量 PCR(RT-PCR)鉴定心肌细胞特异性结构基因表达

使用 TRIzol® 试剂提取心肌细胞的总 RNA,并按照制造商的说明书使用第一链反转录试剂盒合成 cDNA。以基因 *ACTB* 作为参考基因进行 RT-PCR 检测。通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,并使用 GelRed® 核酸凝胶染料进行染色,然后通过 UV 透射显像及 Gel Doc™ EZ System 拍照,引物信息见表 1。

表 1 RT-PCR 检测引物信息

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>ACTB</i>	AGCGAGCATCCCCAAAGTT	GGGCACGAAGGCTCATCATT
<i>TNNT2</i>	TTCACCAAAGATCTGCTCCTCGCT	TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGTGG
<i>TNNI3</i>	CTGCAGATTGCAAAGCAAGA	CCTCCTTCTTCACCTGCTTG
<i>MYL7</i>	GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA	GCGAACATCTGCTCCACCTCA
<i>MYL2</i>	ACATCATCACCCACGGAGAAGAGA	ATTGGAACATGGCCTCTGGATGGA

1.2.4 免疫荧光鉴定心肌细胞特异性结构蛋白表达

在室温下,利用 4.0% 的多聚甲醛固定细胞,处理时间为 15 min。并利用 0.1% 的 Triton X-100 试剂对细胞进行通透处理,处理时间为 10 min,并利用 10.0% 山羊血清进行封闭处理,时间为 1 h,用抗心肌肌钙蛋白 T(cTNT)和 α-肌动蛋白(α-actinin)的一抗对样品进行染色;染色完毕后,弃一抗,用 PBS 清洗细胞,添加带有荧光标记的二抗,并在室温条件下进行避光孵育,时间为 1 h,再次用 PBS 清洗细胞,用 50 μL 的 DAPI 染色液,在室温下进行孵育,时间为 3~5 min。孵育完毕后用 PBS 清洗干净,用倒置荧光显微镜 TE2000-U(Nikon,日本)拍照记录。

1.2.5 CoCl₂ 处理

用 RPMI 1640 培养基完全溶解 CoCl₂ 粉末,CoCl₂ 母液的终浓度为 12 mol/L,稀释后,用 CoCl₂ 工作液处理 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs。处理浓度分别为 0、100、300、600、900 μmol/L 和 1200 μmol/L,处理时间分别为 12、24、36、48 h 和 72 h。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞活力

将细胞接种至 96 孔板中,密度为 1×10⁴ 个/孔,根据制造商的说明书,使用 CCK-8 试剂盒分析细胞,使用酶联免疫吸附测定仪 AMR-100(杭州奥盛仪器有限公司)检测每个孔在 450 nm 波长处的吸光度值,并进行分析。

1. 2. 7 Hoechst 荧光染色法检测细胞凋亡

将细胞接种至 12 孔板中,密度为 2×10^5 个/孔。根据制造商的说明书,使用 Hoechst 荧光染色测定试剂盒对细胞进行处理,使用荧光显微镜进行成像分析。

1. 2. 8 台盼蓝染色法检测细胞凋亡

将细胞接种至 6 孔板中,密度为 2×10^5 个/孔。在室温下用 4.0% 多聚甲醛固定 15 min,用 PBS 洗涤细胞,并在室温下用 0.4% 的台盼蓝染色溶液进行染色。用 ddH₂O 洗涤细胞并在室温下风干后,用光学显微镜(Nikon,日本)进行成像分析。

1. 2. 9 Western blot 法检测细胞凋亡

添加蛋白裂解液(IP Buffer+1 μ L/mL Aprotinin, 1 μ L/mL Leupeptin, 10 μ L/mL PMSF, 10 μ L/mL Vanadate)后将细胞置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中裂解过夜后,以

1. 3×10^4 g/min 离心 30 min,将上清液收集起来,并测定可溶性蛋白的浓度。根据目的蛋白的大小配制 SDS-PAGE 胶,蛋白上样量为 18 75 μ L。开始时电压为 80 V,每隔 10 min 观察条带,当其进入分离胶后,将电压调至 120 V。用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h,用一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后用二抗室温孵育 1 h,最后在超灵敏化学发光成像仪 Tanon5500(上海天能科技有限公司,中国)曝光并拍照。

1. 2. 10 实时定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞凋亡

将获得的 cDNA 用 SYBR Premix Ex Taq 试剂和 7500 Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems, ABI7500,美国)进行 qRT-PCR 分析,以 GAPDH 作为参照基因,通过公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 的相对表达量,对结果进行统计绘图,引物信息见表 2。

表 2 qRT-PCR 检测引物信息

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>Bax</i>	CCCCGAGAGGTCTTTTTC	TGTCCAGCCCATGATGGTTC
<i>Bcl-2</i>	GAACTGGGGGAGGATTGTGG	AAAGCCAGCCTCCGTTATCC

1. 2. 11 统计分析

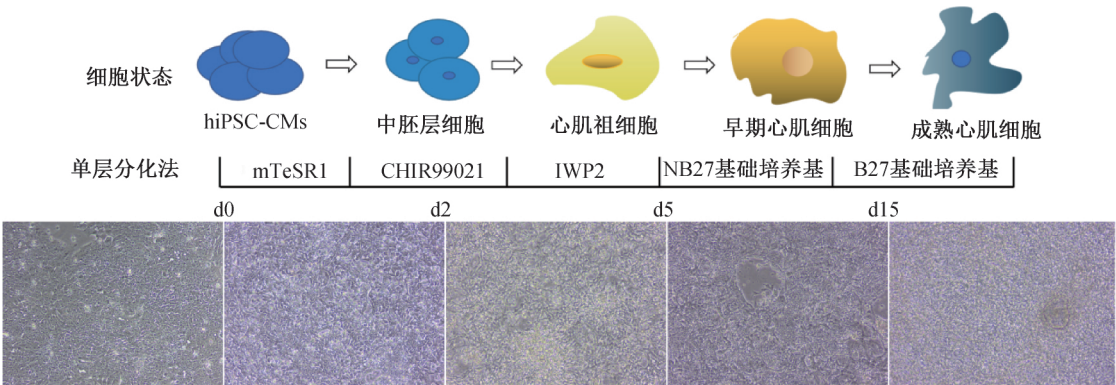
所有数据均显示了 3 个独立实验的平均值,它们之间差异的显著性显示为平均值 \pm SD。ns,无显著性,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 和**** $p < 0.0001$ 。

2 结果与讨论

2. 1 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 的分化和鉴定

体外诱导 hiPSCs 分化生成心肌细胞的过程见图 1(a),由图 1(a)可知,分化开始时,细胞形态逐渐改变,第 1 天和第 2 天会有较多细胞死亡,随着分化进行,周边不断增殖出新的细胞,第 8 天出现局部小灶型地搏动,第 10 天左右出现成片的单层搏动细胞。收集诱导获得的 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 的总 RNA 后,利用 RT-PCR 鉴定心肌细胞特异性结构基因的表

达,结果如图 1(b)和图 1(c)所示。图 1(b)一(c)表明,诱导获得的人干细胞来源心肌细胞(Human pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes, hPSC-CMs)均表达心肌细胞相关结构基因 *TNNI3* 和 *TNNT2*,所获得的 hPSC-CMs 均表达心房样心肌细胞 marker 基因 *MYL7*,并且所得到的 hiPSC-CMs 表达心室样心肌细胞 maker 基因 *MYL2*,证明所获得的 hiPSC-CMs 是含有心房、心室亚型混合的心肌细胞群体。将成片跳动的心肌样细胞消化,使其成为单个的细胞之后,以合适的密度重新铺板,24 h 后可观察到有部分细胞已恢复搏动。利用免疫荧光法进行鉴定,结果如图 1(d)和图 1(e)所示。图 1(d)一(e)结果表明诱导获得的 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 均表达心肌细胞特异性结构蛋白 α -actinin 和 cTNT。



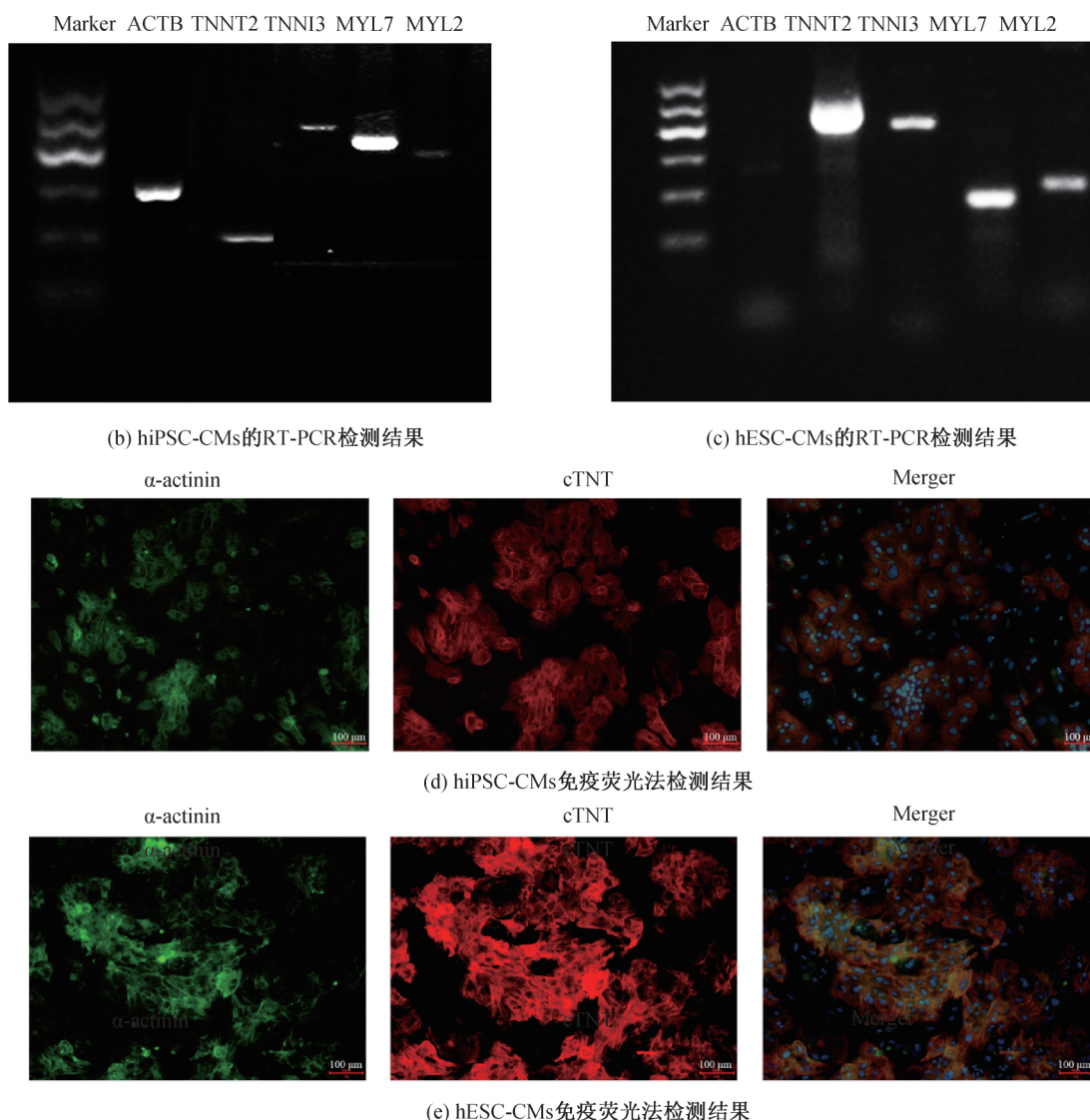


图1 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 的分化与鉴定

2.2 CoCl₂ 诱导的 hiPSC-CMs 体外缺氧模型的建立

2.2.1 检测 CoCl₂ 处理对 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 细胞活力的影响

将不同浓度的 CoCl₂ 添加至 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 的培养体系中,以检测 CoCl₂ 对心肌细胞活力的影响,结果如图 2 所示。图 2(a)的结果表明,用低浓度 CoCl₂ (100、300 μmol/L) 处理 hiPSC-CMs 不同时间后,实验组的 OD 值显著高于对照组 ($p < 0.01$),并且 100 μmol/L 实验组和 300 μmol/L 实验组的结果趋势一致,当 CoCl₂ 浓度增加到 600 μmol/L 时,实验组的 OD 值几乎与对照组相同,即 hiPSC-CMs 的细胞活力不受影响;当 CoCl₂ 的浓度增加到 900 μmol/L 和 1200 μmol/L 时,实验组的 OD 值显著低于对照组 ($p < 0.001$),高浓度 CoCl₂ 处理可以显著抑制 hiPSC-CMs 的细胞活力,并且 OD 值的下调呈现出处理时间依赖性;

100 μmol/L 处理组和 300 μmol/L 处理组的结果趋势一致,且与 900 μmol/L 处理组相比,1200 μmol/L 处理组的细胞活力过低,不利于后续实验;对于 12 h 处理组,与其他组相比,实验组和对照组的 OD 值差异相对较小,36 h 处理组的结果与 24 h 处理组的结果相似,其中 24 h 更具可操作性,48 h 处理组细胞活力变化差异性显著,72 h 处理组细胞活力过低,不利于后续实验操作。因此,最终选择 24 h 和 48 h 作为后续实验的处理时间,300、600 μmol/L 和 900 μmol/L 作为后续实验的处理浓度。图 2(b) 为 CCK-8 法检测 CoCl₂ 处理对 hESC-CMs 的细胞活力影响的结果图,图 2(b) 结果显示,用作对照的 hESC-CMs 的结果与 hiPSC-CMs 趋势一致,证实所获得的 hiPSC-CMs 可以代替 hESC-CMs 用于后续模型建立,克服了 hESC-CMs 模型的缺陷。

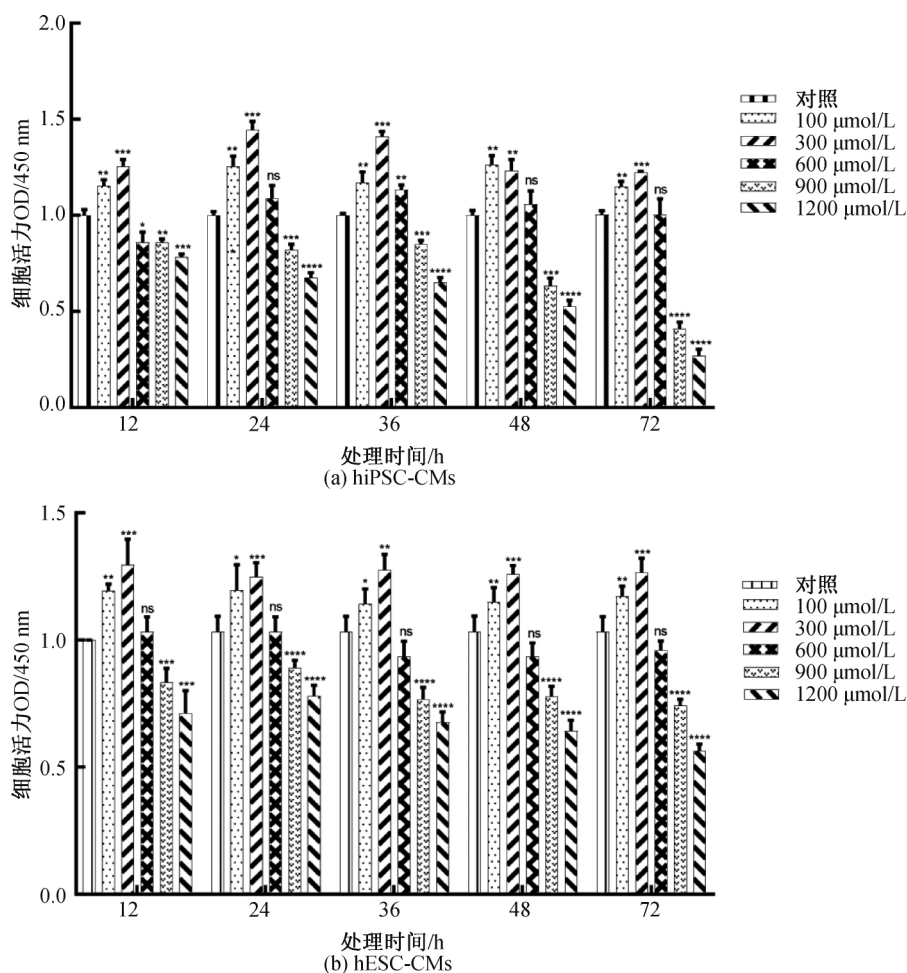
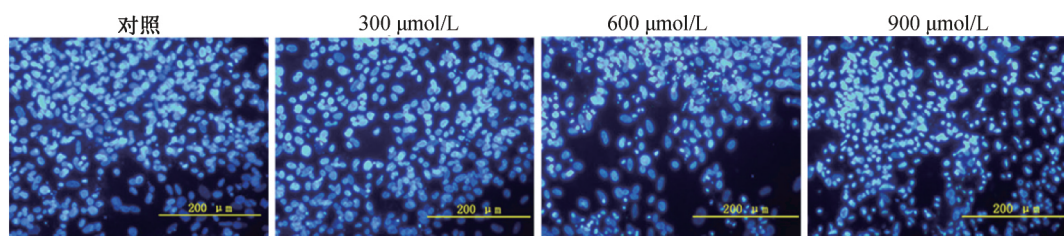


图 2 CCK-8 法检测 CoCl_2 处理对两种培养体系中心肌细胞活力的影响

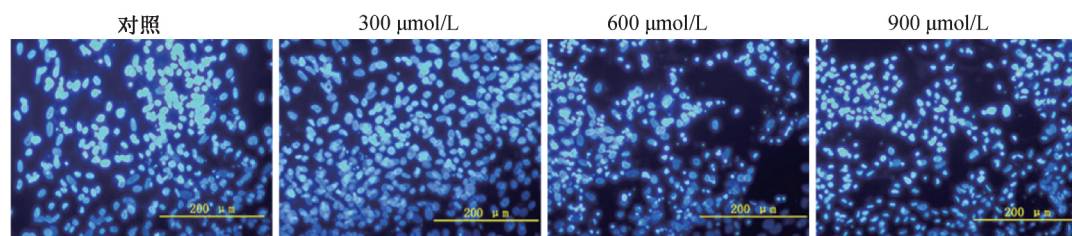
2.2.2 检测 CoCl_2 处理对 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 细胞凋亡的影响

为分析 CoCl_2 对 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 细胞凋亡的影响,本文使用 Hoechst 荧光染色液对细胞进行染色。图 3(a)是 CoCl_2 处理 24 h 后 hiPSC-CMs 的荧光染色情况,图 3(a)的结果表明,在荧光显微镜下观察,当用 300 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度 CoCl_2 处理 hiPSC-CMs 24 h 时,大多数细胞呈现出均匀的淡蓝色,与对照组相比没有明显的细胞凋亡现象 ($p > 0.05$),当 CoCl_2 的浓度增加到 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,存在致密浓染现象的细胞数目显著增加 ($p < 0.0001$),当 CoCl_2 的浓度增加到 900 $\mu\text{mol/L}$ 时,大多数细胞出现凋亡现象 ($p < 0.0001$)。图 3(c)是 CoCl_2 处理 hPSC-CMs 24 h 后 Hoechst 荧光染色的定量分析图,图 3(c)结果表明高浓度 CoCl_2 处理剂量依赖性促进 hiPSC-CMs 的细胞凋亡。图 3(d)是 CoCl_2 处理 48 h 后 hiPSC-CMs 的荧光染色情况,图 3(d)结果表明,在处理 48 h 后,结果与 24 h

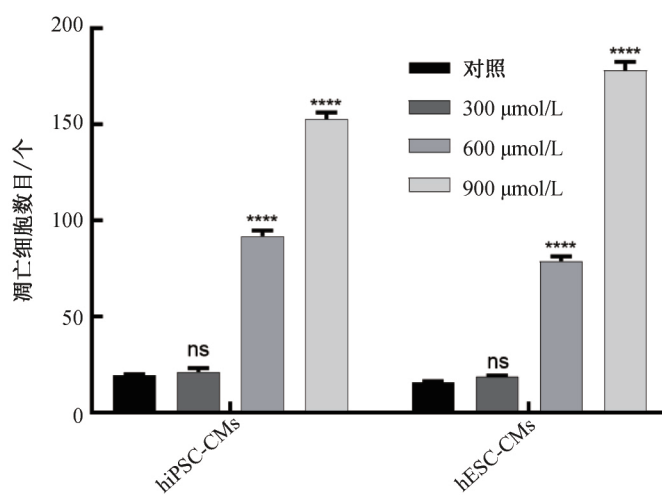
处理后的趋势一致,证实在后续的实验中应选择 24 h 作为处理时间。图 3(f)是 CoCl_2 处理 hPSC-CMs 48 h 后 Hoechst 荧光染色的定量分析图,图 3(f)结果表明 48 h 处理组的结果与 24 h 处理组的结果趋势一致。用不同浓度的 CoCl_2 处理 hESC-CMs 24 h (图 3(b))和 48 h (图 3(e))的结果与 hiPSC-CMs 实验组趋势一致,进一步证实了所获得的 hiPSC-CMs 可以替代 hESC-CMs 用于后续模型的建立。台盼蓝染色液对 hiPSC-CMs 进行染色结果如图 4(a)所示,图 4(a)的结果显示,300 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度 CoCl_2 处理 24 h 时,只有少数细胞显示出台盼蓝染色阳性,大多数细胞没有凋亡现象;当 CoCl_2 浓度增加到 600 $\mu\text{mol/L}$ 时,台盼蓝染色阳性细胞数目显著高于对照组;而当 CoCl_2 浓度增加到 900 $\mu\text{mol/L}$ 时,大多数细胞均显示出台盼蓝染色阳性,大多数细胞存在凋亡现象,用不同浓度的 CoCl_2 处理 hESC-CMs 24 h,其结果与 hiPSC-CMs 实验组趋势一致(图 4(b))。



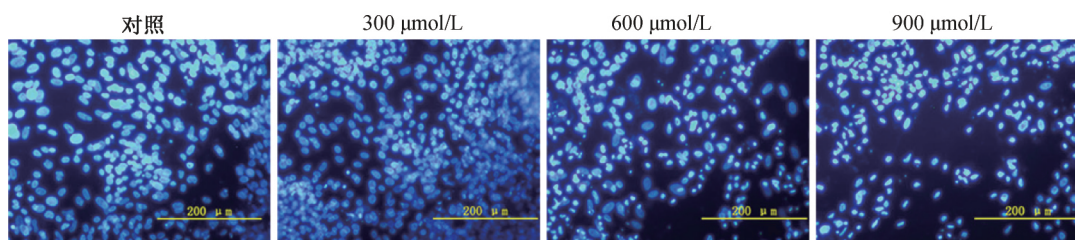
(a) hiPSC-CMs 24 h处理组



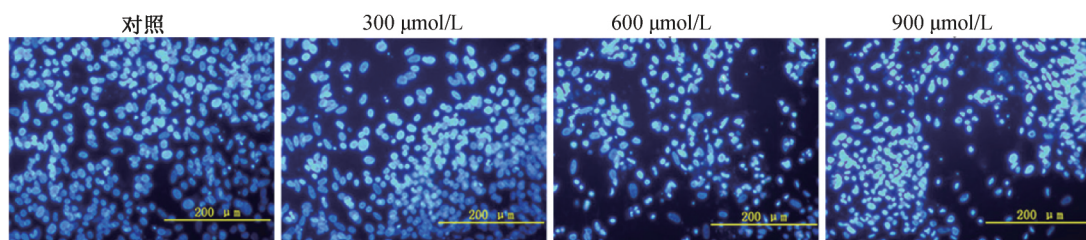
(b) hESC-CMs 24 h处理组



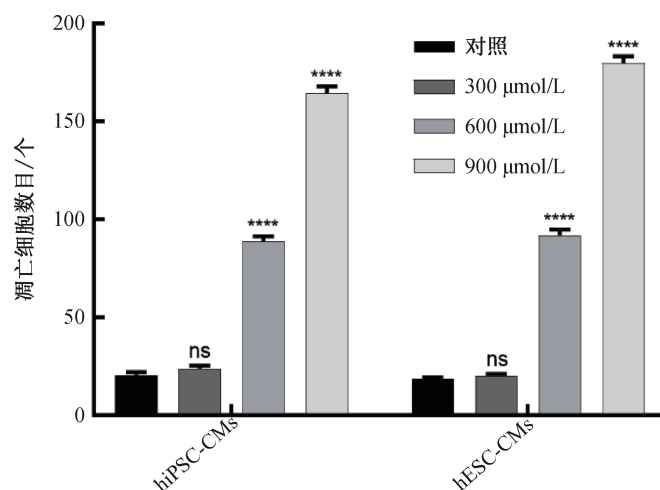
(c) 24 h处理组定量分析



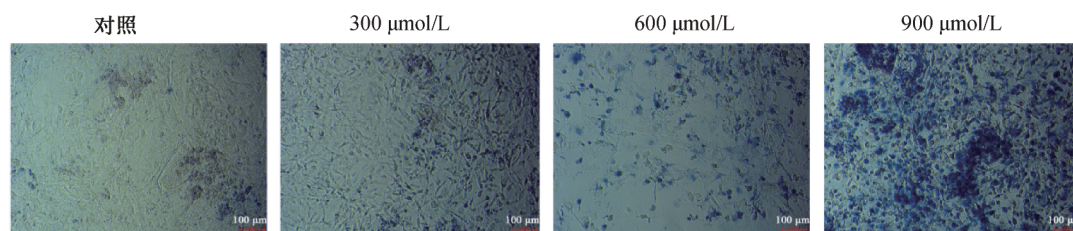
(d) hiPSC-CMs 48 h处理组



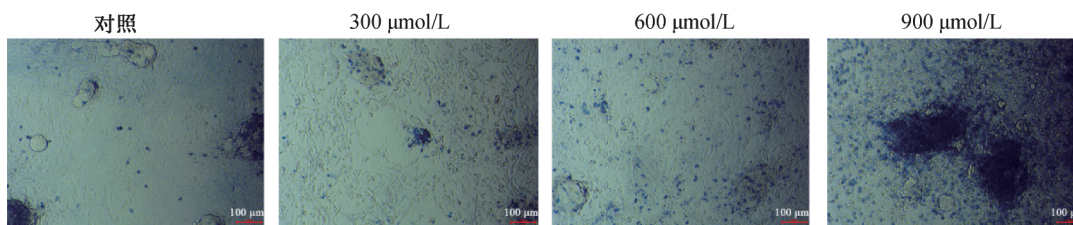
(e) hESC-CMs 48 h处理组



(f) 48 h处理组定量分析

图 3 Hoechst 荧光染色法检测 CoCl_2 处理对两种培养体系中心肌细胞凋亡的影响

(a) hiPSC-CMs



(b) hESC-CMs

图 4 台盼蓝染色法检测不同浓度 CoCl_2 处理对两种培养体系中心肌细胞凋亡的影响

为了进一步定量检测 CoCl_2 对 hiPSC-CMs 和 hESC-CMs 细胞凋亡的影响, 本文通过 qRT-PCR 检测和 Western Blot 检测对凋亡相关分子进行分析, 结果如图 5 所示。图 5(a) 是 CoCl_2 处理后 hiPSC-CMs 凋亡相关基因表达的 qRT-PCR 检测结果, 图 5(a) 表明与对照组相比, hiPSC-CMs 的实验组中促凋亡基因 *Bax* 的表达以剂量依赖性方式上调 ($p < 0.001$), 并且抗凋亡基因 *Bcl-2* 的表达以剂量依赖性方式下调 ($p < 0.001$)。图 5(b) 是 CoCl_2 处理后 hESC-CMs 凋亡相关基因表达的 qRT-PCR 检测结果, 图 5(b) 表明用不同浓度的 CoCl_2 处理 hESC-CMs, 并通过 qRT-PCR 检测进行分析, 结果与 hiPSC-CMs 实验组趋势一致。图 6(a) 是 CoCl_2 处理后 hiPSC-CMs 凋亡相关蛋白表达的 Western Blot 检测结果, 图 6(a) 显示不同浓度的 CoCl_2 处理 hiPSC-CMs 24 h 后, 与对照组相比, 300 $\mu\text{mol/L}$ 处

理组中促凋亡蛋白 *Bax* 的表达显著下调 ($p < 0.001$), 而 600 $\mu\text{mol/L}$ 和 900 $\mu\text{mol/L}$ 处理组中促凋亡蛋白 *Bax* 的表达显著上调 ($p < 0.0001$), 图 6(b) 为 Western Blot 检测结果的灰度分析, 图 6(b) 结果表明有显著性差异。与 *Bax* 相反, 实验组中抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 的表达以剂量依赖性方式下调 ($p < 0.0001$), 结果有显著性差异, 表明高浓度的 CoCl_2 可以显著促进 hiPSC-CMs 的凋亡, 低浓度的 CoCl_2 可能对 hiPSC-CMs 具有保护作用。图 6(c) 是 CoCl_2 处理后 hESC-CMs 凋亡相关蛋白表达的 Western Blot 检测结果, 与 hiPSC-CMs 实验组的结果趋势一致, 但低浓度的 CoCl_2 不能显著降低凋亡相关蛋白 *Bax* 的表达, 即低浓度 CoCl_2 的保护作用较 hiPSC-CMs 实验组相比不明显, 图 6(d) 为 Western blot 检测结果的灰度分析, 图 6(d) 结果表明有显著性差异。

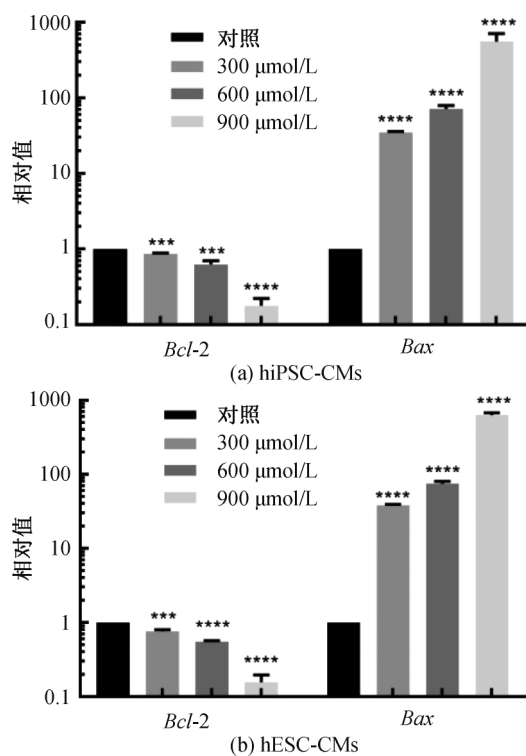


图5 qRT-PCR检测CoCl₂处理对两种培养体系中心肌细胞凋亡相关基因表达的影响

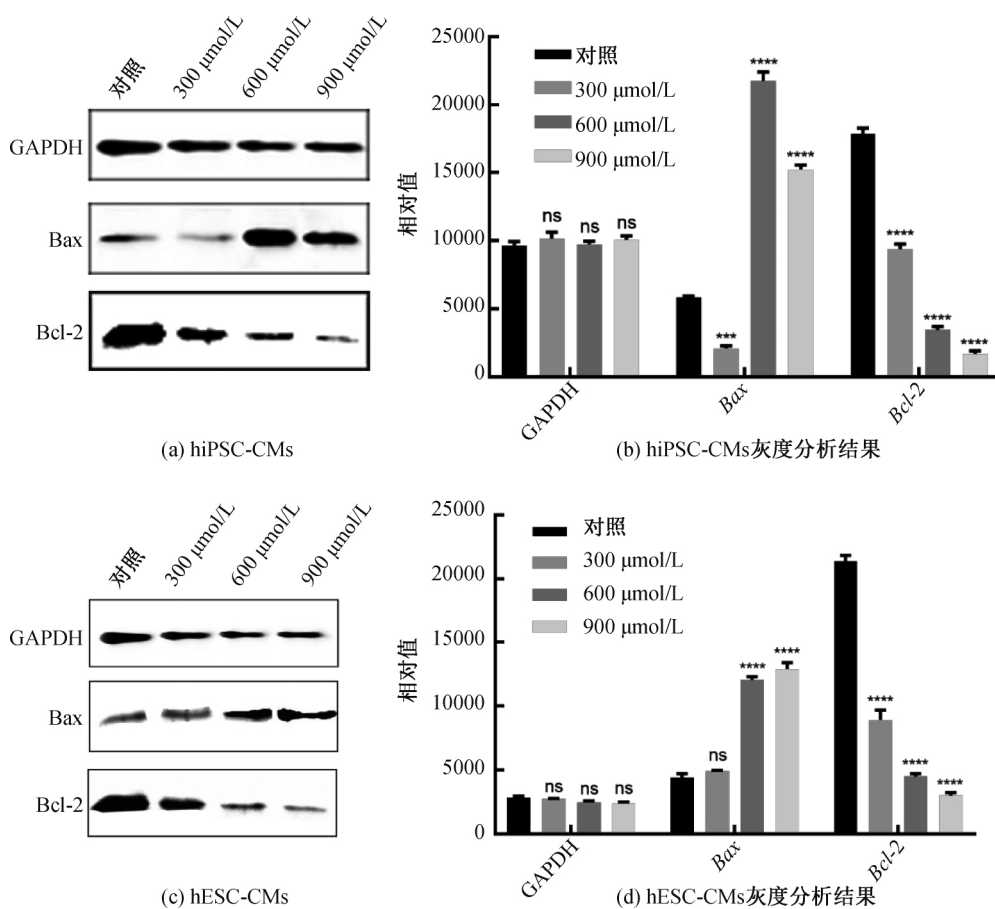


图6 Western blot检测CoCl₂处理对两种培养体系中心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

3 结 论

本文通过 Wnt 信号通路抑制剂时序组合诱导分化法和单层诱导分化法的结合, 获得大量 hiPSC-CMs 细胞并进行了鉴定, 主要结果如下:

a) 检测 CoCl_2 处理对 hiPSC-CMs 的细胞活力的影响, 其结果表明 $100 \mu\text{mol/L}$ 和 $300 \mu\text{mol/L}$ 的低浓度 CoCl_2 处理显著提升 hiPSC-CMs 细胞活力; $600 \mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 处理对 hiPSC-CMs 细胞活力无影响; $900 \mu\text{mol/L}$ 和 $1200 \mu\text{mol/L}$ 的高浓度 CoCl_2 处理显著抑制 hiPSC-CMs 的细胞活力, 作用趋势呈现处理剂量依赖性和处理时间依赖性。

b) 检测 CoCl_2 处理对 hiPSC-CMs 的细胞凋亡的影响, 其结果表明 $300 \mu\text{mol/L}$ 的低浓度 CoCl_2 处理对 hiPSC-CMs 的细胞凋亡无显著影响, $600 \mu\text{mol/L}$ 和 $900 \mu\text{mol/L}$ 的高浓度 CoCl_2 处理可促进 hiPSC-CMs 的细胞凋亡, 作用趋势呈现处理剂量依赖性。

c) 利用 hiPSC-CMs 体外培养体系的优点, 以 $600 \mu\text{mol/L}$ 为最适处理浓度, 24 h 为最适处理时间建立 CoCl_2 诱导的 hiPSC-CMs 体外缺氧模型。

参考文献:

- [1] 陈志明. 慢病之源, 危害巨大: 警惕慢性缺氧的信号[J]. 健康指南(中老年), 2019(11): 24-25.
- [2] 李建勇, 王彬尧. 缺氧诱导因子 1 与心血管疾病的关系[J]. 国际心血管病杂志, 2001, 28(4): 195-197.
- [3] 高蓓蕾. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬对高糖高脂所致心肌损伤的保护作用[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2017: 12-20.
- [4] 滕海林, 管英俊. 干细胞向心肌细胞诱导分化的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2003, 9(2): 164-166.
- 刘秀秀, 周斌. 成体哺乳动物心肌细胞增殖及其调控[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2019, 25(3): 365-374.
- [5] 黄明, 熊可, 李霄, 等. 心力衰竭动物模型的研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(6): 534-540.
- [6] 辛玉虎, 郭忻. 在体动物心肌损伤模型述评[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(S1): 38-41.
- [7] Tancos Z, Ujhelly O, Pirity M K, et al. 223 isolation of rabbit pluripotency genes to generate rabbit induced pluripotent stem cells[J]. Reproduction, Fertility and Development, 2012, 24(1): 223-224.
- [8] 王帅飞, 王军, 郎希龙, 等. 诱导多能性干细胞在心脏疾病领域的研究和应用[J]. 中国体外循环杂志, 2014 (3): 186-189.

- [9] Kossack N, Meneses J, Shefi S, et al. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells[J]. Stem Cells, 2009, 27(1): 138-149.
- [10] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency[J]. Cell, 2008, 133(2): 250-264.
- [11] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells[J]. Current Biology, 2008, 18(12): 890-894.
- [12] 张璐彦, 秦玉明, 杨世伟. 人类诱导性多能干细胞在心脏病发病机制中的研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(2): 152-154.
- [13] Fujitani N, Furukawa J, Araki K, et al. Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(6): 2105-2110.
- [14] 阮志刚, 郑岷戈, 刘靖, 等. 诱导性多能干细胞的诱导培养和鉴定[J]. 解剖学研究, 2010, 32(6): 441-444.
- [15] Wang L N, Su W J, Du W, et al. Gene and microRNA profiling of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2015, 11(2): 219-227.
- [16] Munoz J, Low T Y, Kok Y J, et al. The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells[J]. Molecular Systems Biology, 2011, 7(1): 550-563.
- [17] 陈睿, 余燕玲, 江婷, 等. 二氯化钴诱导缺氧对肌细胞萎缩的调控机制研究[J]. 中国运动医学杂志, 2018, 37(5): 52-57.
- [18] 张迪, 胡艳阁, 耿乐乐, 等. 氯化钴诱导缺氧对血管周细胞血管生成素-1 表达影响的研究[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2018, 13(6): 432-438.
- [19] 张风, 王清兰, 刘成海, 等. 氯化钴诱导人肝窦内皮细胞缺氧模型特点[J]. 肝脏, 2018, 23(3): 217-220.
- [20] 邹荣军, 齐玲, 石婉婷, 等. 氯化钴诱导神经细胞缺氧损伤的机制及应用[J]. 生理科学进展, 2015(2): 129-132.
- [21] Kim E J, Yoo Y G, Yang W K, et al. Transcriptional activation of HIF-1 by ROR α and its role in hypoxia signaling [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008, 28(10): 1796-1802.
- [22] Lan A P, Liao X X, Mo L Q, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells[J]. PLoS One, 2011, 6(10): 25921-25933.

(责任编辑: 唐志荣)