

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.24.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 24-0013-09

TMSN-AA 纳米复合物促进人胚胎干细胞 向心肌细胞分化的潜在机制研究*

任明明, 韩振, 陈立波, 李敬来, 冯钢, 许志锋, 黄磊, 欧阳春

(北京大学深圳医院, 广东 深圳 518036)

摘要: **目的** 研究优化后的 TMSN-AA 纳米复合物促进人胚胎干细胞 (hESCs) 心肌分化的可能性, 并探讨其诱导心肌分化的潜在机制。 **方法** 采用优化抗坏血酸 (AA) 负载的荧光 TRITC 介孔二氧化硅纳米粒子 (TMSN-AA) 作为诱导剂, 诱导 hESCs 细胞心肌分化。通过荧光定位检测该诱导剂进入细胞情况, 流式细胞仪检测其进入细胞后对细胞存活与凋亡的影响, Western blot 检测 TMSN-AA 诱导后, 心肌标记基因 *cTnI*、*FLK-1* 以及干性基因 *OCT4* 和 *SOX2* 的表达以及相关信号通路 ERK1/2 的激活情况。 **结果** 荧光定位发现 TMSN-AA 可以靶向进入 hESCs 细胞, 流式细胞仪分析结果显示, 二氧化硅和荧光染料四甲基罗丹明修饰介孔二氧化硅不会影响 hESCs 的存活和凋亡; 且 TMSN-AA 诱导后, 干性基因 *OCT4* 和 *SOX2* 均下调, 且上调心肌标记基因 *cTnI* 和 *FLK-1* 的表达。Western blot 检测结果显示, TMSN-AA 的处理可以激活 ERK1/2 信号通路, 同时证实, 该过程 Akt 信号通路并未参与其中。 **结论** 优化后的 TMSN-AA 纳米载体可以成功进入 hESCs 细胞, 并靶向诱导其心肌分化, 而该诱导过程, 至少在一定程度上是通过激活 ERK1/2, 而不是 Akt 信号通路实现的。

关键词: 人胚胎干细胞; 抗坏血酸; 介孔二氧化硅纳米粒子

中图分类号: R34

文献标识码: A

Effect of TMSN-AA nanocomposites on promoting differentiation of hESCs into cardiomyocytes*

Ming-ming Ren, Zhen Han, Li-bo Chen, Jing-lai Li, Gang Feng, Zhi-feng Xu, Lei Huang, Chun Ouyang
(Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of TRITC mesoporous silica nanoparticles (TMSN-AA) nanocomposite in promoting differentiation of hESCs into cardiomyocyte and potential mechanisms. **Methods** TMSN-AA loaded with ascorbic acid (AA) was used as an stimulation to induce differentiation of hESCs into cardiomyocytes. Expression of *cTnI*, *FLK-1*, *SOX2* and *OCT4* were measured by western blot. Activation of ERK1/2 pathway was also detected. **Results** Fluorescence localization analysis showed that TMSN-AA successfully moved into hESCs. Flow cytometry analysis indicated that MSN and TMSN did not affect hESCs growth. Expressions of *cTnI* and *FLK-1* were up-regulated while *OCT4* and *SOX2* were down-regulated by TMSN-AA. Western blot suggested that TMSN-AA treatment activated ERK1/2 signaling pathway without involvement of Akt signaling pathway. **Conclusion** TMSN-AA nanocarrier may be a good approach for induction of hESCs differentiation through activating ERK1/2 signaling pathway.

Keywords: human embryonic stem cells (hESCs); ascorbic acid (AA); mesoporous silica nanoparticles (MSN)

收稿日期: 2017-10-13

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (No: A2016145)

[通信作者] 韩振, E-mail: hanzhen0431@sohu.com

心血管疾病是当今威胁人类健康最严重的疾病之一,高居致死病因的首位^[1]。由于成年心肌细胞不具有再生性,因此,在心肌坏死的治疗过程中,心脏移植成为重要的治疗手段^[2]。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)是心脏再生医学领域最有希望的细胞源,其具有无限分化的能力和增殖能力,从 hESCs 衍化生成的心肌细胞可以通过细胞移植取代病损心肌而恢复心脏功能。优化心肌细胞分化的方法,从而获得足够数量和纯度的心肌细胞是进行细胞移植治疗的关键^[3-5]。

心脏发育是精密且细致的过程^[6]。然而如何实现人类胚胎干细胞高效转化为均一的心肌细胞仍然充满挑战。近年来,随着纳米技术在生物医学领域越来越广泛的应用,逐渐成为生物医学研究的新型热点,其中介孔纳米二氧化硅(mesoporous silica nanoparticles, MSN)作为一种纳米药物输送载体,在体外研究中得到了更广泛的应用^[7-8]。本研究采用优化的介孔二氧化硅纳米输送体系作为诱导剂,探讨体外诱导 hESCs 定向心肌分化可行性及其可能的调控机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞系

hESCs (X-01 系)购自上海斯丹赛生物技术有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

硅酸四乙酯(tetraethyl orthosilicate, TEOS)、氨丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyl trimethoxysilane, APTES)、十六烷基三甲基溴化铵(cetrimonium bromide, CTAB)、乙醇、氢氧化钠(sodium hydroxide, NaOH)、四甲基罗丹明(tetramethyl rhodamine, TRITC)盐酸(hydrochloric acid, HCl)、抗坏血酸(ascorbic acid, AA) cTnl (ab47003)、FLK-1 (ab2349)、SOX2 (ab97959) 及 OCT (ab19857) 抗体(购自 Abcam 公司), ERK1/2、p-ERK1/2、Akt、p-Akt 及 PD98059 (购自 Cell Signaling Technology), GAPDH 抗体(购自碧云天生物公司), IME- II 倒置相差显微镜(购自日本 Olympus 公司), Nikon 数码相机和 MCV-16BSU 超净工作台(购自日本 Sanyo 公司), 高速离心机 3 ~ 18 k (购自美国 Sigma 公司), PCR 仪(购自德国 Biometra 公司)(PCR Stepone plus)。

1.3 MSN 纳米粒子的合成

MSN 和荧光包被 MSN 的制备参考文献^[9-10], 基于

两步法微调后制备而成, 首先将 12 μ l APTES 加入到 5.5 mg TRITC 和 3 ml 无水乙醇的溶液中, 随后在惰性气体中搅拌 2 h。然后将 TRITC-APTES 溶液加入 2.5 ml TEOS, 避光搅拌 12 h。取另 1 个容器, 将 0.5 g CTAB 溶于 240 ml 超纯水与 1.75 ml NaOH (2 mol/L) 的溶液中, 并在 50 $^{\circ}$ C 剧烈搅拌。待 CTAB 溶液的温度稳定后, 加入含有 TEOS 和 TRITC-APTES 的乙醇溶液, 50 $^{\circ}$ C 避光搅拌 24 h。过滤样品并用甲醇洗涤。为了去除颗粒的孔中表面活性剂, 将 850 mg 颗粒分散在 90 ml 甲醇和 5 ml 氢氯酸(12.1 mol/L)的溶液中并回流 24 h。然后将颗粒过滤, 用甲醇充分洗涤, 并在室温下干燥。MSN 的合成则是省略上述第一步。

1.4 MSN 特性

采用光谱仪(Shimadzu UV-2450)测定紫外-可见吸收光谱。通过粒度分析仪系统(90 Plus, Brookhaven Instruments)测量 MSN 的流体动力学尺寸分布特征和 ζ 电位。在 200 kV 的加速电压通过 JEOL 模型 JEM-2010 透射电子显微镜得到 TEM 图像。为制备 TEM 样品, 将 MSN 溶液滴分散在碳涂覆的 300 目铜格栅(Carbon Type-B, Ted Pella, Inc)上, 将乙酸铀酰溶液(2%, 10 μ l)滴加到网格上进行阴性染色。

1.5 TMSN 与 TMSN-AA 的合成

将 TRITC 负载二氧化硅纳米颗粒(TRITC mesoporous silica nanoparticles, TMSN) (50 mg) 和 AA (5 mg) 加入 5 ml 超纯水中并搅拌 24 h, 然后将混合物以 7 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。通过使用紫外-可见分光光度法, 比较原始溶液和上清液的吸光度值, 以确定装载在 TMSNs 内的 AA 的量。用超纯水超声处理载有药物的 TMSN 并洗涤 2 次以除去吸附在表面而不是孔内的 AA。TMSN 纳米载体的负载效率为: 1 mg/ml, TMSN 可负载 0.12 mg/ml 的 AA。

1.6 细胞培养

将人胚胎干细胞(hESCs)常规培养于 DMEM (Gibco) 培养基与 Ham's F-12 培养基 1 : 1 混合的培养基中, 其中含有 1.2 g/L 碳酸氢钠, 2.5 mmol/L L-谷氨酰胺, 15 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 0.5 mmol/L 丙酮酸钠, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇, 4 ng/ml bFGF 和 15% 胎牛血清。将 hESCs 细胞接种在没有饲养层细胞的超低培养板中, 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养。

1.7 RNA 提取与 RT-PCR 检测靶基因 mRNA 水平

以 PBS 处理组作为阴性对照组, TMSNs, AA 和 TMSN-AA 分别处理 hESCs 细胞 14 d 后, 使用 Trizol (Invitrogen) 从 hESCs 细胞中提取总 RNA, 并用分光光度计 (Nano Drop 2000)。参照说明书, 使用逆转录酶试剂盒 (Takara) 将总 RNA (2 μ g) 逆转录成 cDNA。通过使用 SYBR Green (TaKaRa) 在 ABI Prism 7300 实时 PCR 系统中实时测定靶基因的 mRNA 水平。所用引物的序列见附表。

附表 目的基因引物序列

基因名	引物序列	长度 /bp
SOX2	正向: 5'-GTGAGCGCCCTGCAGTACAA-3'	20
	反向: 5'-GCGACTAGGACATGCTGTAGGTG-3'	23
OCT4	正向: 5'-TGAAGCTGCAGAAGGAGAAGCTG-3'	23
	反向: 5'-GCAGATGGTCGTTTGCTGA-3'	20
Flk1	正向: 5'-CAAACCTCAATGTGTCTCTTTGG-3'	23
	反向: 5'-CTTCCCTCATCCTCCTGCTAC-3'	21
cTn-T	正向: 5'-CGAGGCTCACTTTGAGAACA-3'	20
	反向: 5'-CTCTGCCCGACCTCTCT-3'	17
GAPDH	正向: 5'-CATGAAAGTATGACAAGAGCCT-3'	22
	反向: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'	22

1.8 MTT 法检测细胞活力

通过 MTT 测定法测量细胞活力。将 hESCs 细胞以 5 000 个 / 孔的密度接种在 96 孔板中, 以 PBS 处理组为对照组, 不同浓度的 MSN 纳米颗粒和 TMSN 纳米颗粒孵育 48 h。在每个测定中, 加入 5 mg/ml MTT, 孵育 4 h。然后加入 150 μ l 100% 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma), 缓慢振荡 5 min 使沉淀溶解。然后用波长 490 nm 的酶标仪 (Bio-Rad) 测量吸光度。细胞活力计算为样品孔的吸光度与对照孔的吸光度之比, 以百分数表示, 将未处理细胞的存活率指定为 100%。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。两两比较, 若方差齐时, 采用 SNK 检验 (Student-Newman-Keuls 法); 若方差不齐时, 采用 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blot 条带由相关软件处理后, 采用

Image J2x 软件对免疫印迹条带扫描后进行半定量分析并用同一张膜上相应泳道的 GAPDH 或 β -actin 条带的灰度进行校正。用 Graph Pad Prism 6 软件做图。

2 结果

2.1 MSN 的合成与特性

透射电子显微镜显示制备的 MSN 具有均匀的粒度和高度分散的球形 (见图 1A)。通过动态光散射 (DLS) 技术对 MSN 的流体动力学尺寸分布进行表征 (见图 1B), MSN 的大小分布为 (94.9 ± 8.3) nm。为观察 hESCs 细胞中 MSN 的吸入情况, 将 MSN 与荧光染料 TRITC 结合发现 TMSNs 的吸收光谱在 580 nm 附近达到峰值 (见图 1C)。采用 TMSN-AA 诱导剂诱导 hESCs 细胞 (见图 1D), TMSN-AA 的 ζ 电位值保持正电荷 (+22.7) mV, 并与细胞膜具有强烈的静电相互作用。

2.2 TMSN 进入 hESCs 细胞的体外检测结果

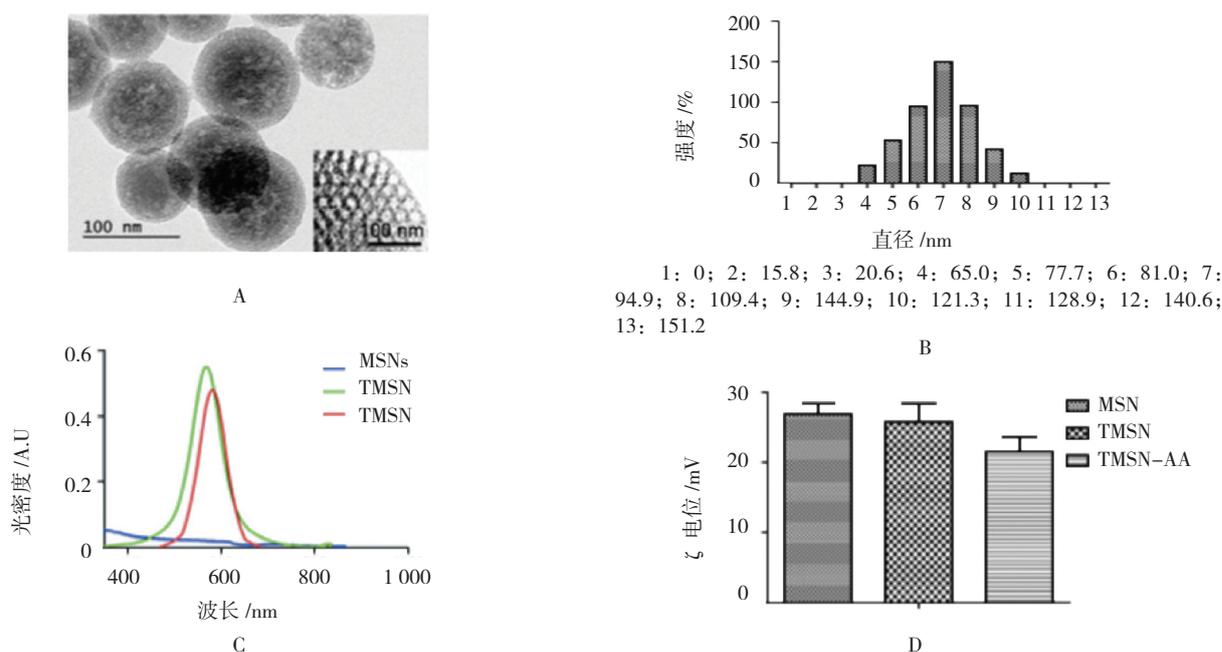
TRITC 的荧光是橙色, 与用 MSN 处理的细胞比较, 用 TMSN 处理的 hESCs 细胞中呈橙色荧光。PBS 作为阴性对照组, 显示细胞无背景荧光干扰, 提示 TMSN 可以成功靶向进入 hESCs 细胞中。见图 2。

2.3 MSN 和 TMSN 对 hESCs 存活与凋亡的影响

hESCs 细胞用 10~200 μ g/ml 的不同浓度的 MSN 或 TMSN 处理 48 h (见图 3A)。经处理的 hESCs 细胞的细胞存活率即使在最高浓度下也保持在 80% 以上。与 PBS 处理的细胞 (空白组) 比较, MSN 和 TMSN 纳米颗粒处理的 hESCs 细胞无凋亡 (见图 3B、3C)。

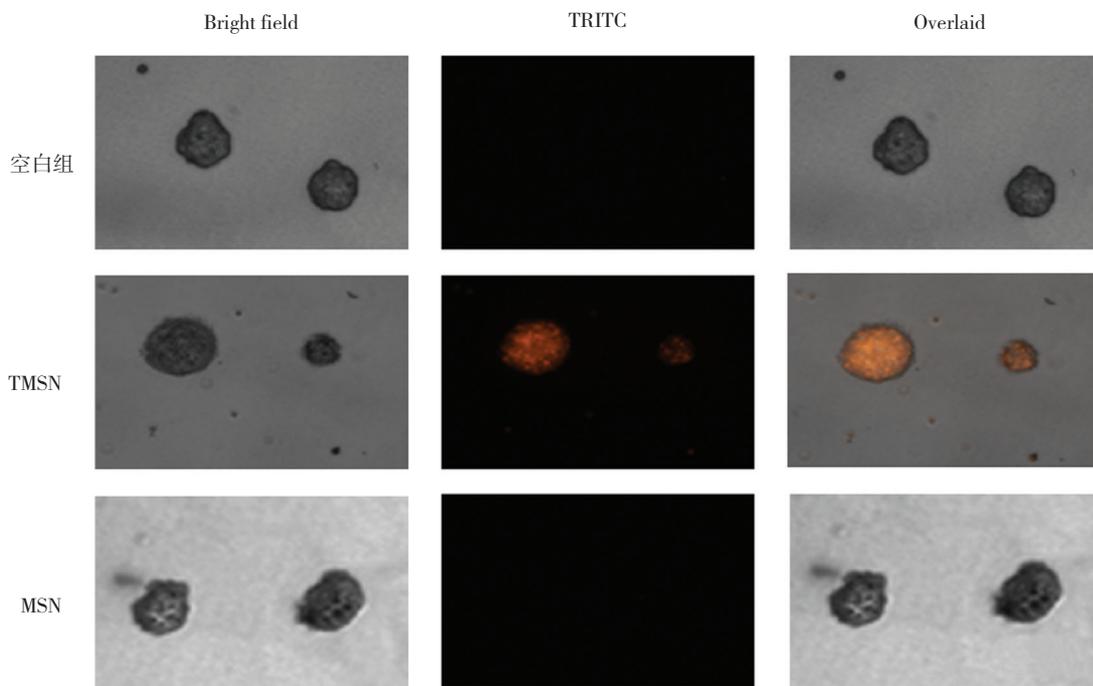
2.4 TMSN-AA 纳米复合体对 hESCs 向心肌细胞分化的影响

TMSN-AA 纳米复合体可以有效地诱导人类胚胎干细胞分化为心肌细胞, 显著下调 OCT4 ($F = 29.115$, $P = 0.000$)、SOX2 ($F = 49.986$, $P = 0.000$) 的蛋白水平以及 mRNA 水平 OCT4 ($F = 42.655$, $F = 0.000$), SOX2 ($F = 49.194$, $P = 0.000$), 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时上调心肌标记基因 *cTnI* ($F = 687.525$, $P = 0.000$) 和 FLK-1 ($F = 512.688$, $P = 0.000$) 的蛋白表达以及 mRNA 水平 *cTnI* ($F = 560.089$, $P = 0.000$) 和 FLK-1 ($F = 106.881$, $P = 0.000$), 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 相对于单独添加 AA, 由 TMSN 输送的 AA 用于诱导 hESCs 细胞分化成心肌细胞效果更为明显, 效率更高, 其跳动细



A: MSN 的代表性 TEM 图像。B: 超纯水中 MSN 的 DLS 测量。C: 通过 UV-vis-NIR 光谱吸收 MSN、TRITC 和 TMSN。TRITC 是一种明亮的橙色荧光染料, 发射波长约为 576 nm。D: MSN、TMSN 和 TMSN-AA 的表面 ζ 电位。这 3 种 MSN 纳米复合物具有正电荷, 并可通过静电相互作用与细胞表面结合

图 1 MSN 的形态、粒度以及 3 种不同 MSN 纳米复合物的特性表征



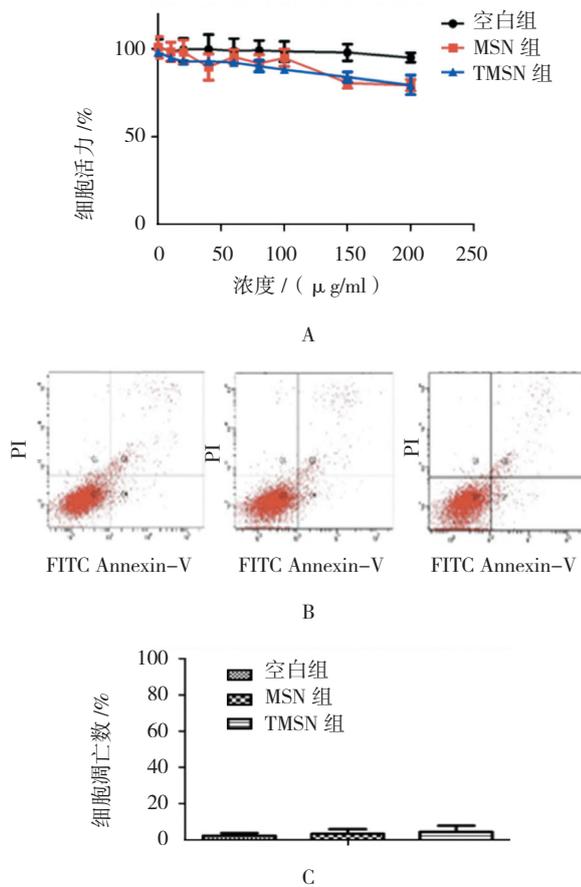
hESCs 细胞分别用 PBS (空白组)、MSN 和 TMSN 处理 12 h, TRITC: 橙色荧光染料。标尺: 100 μ m

图 2 荧光修饰的介孔二氧化硅 (TMSNs) 可以成功进入 hESCs 细胞

胞比例和心率均优于单独添加 AA, 波动细胞百分率 ($F=386.835, P=0.000$), 自发搏动率 ($F=171.830, P=0.000$) 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

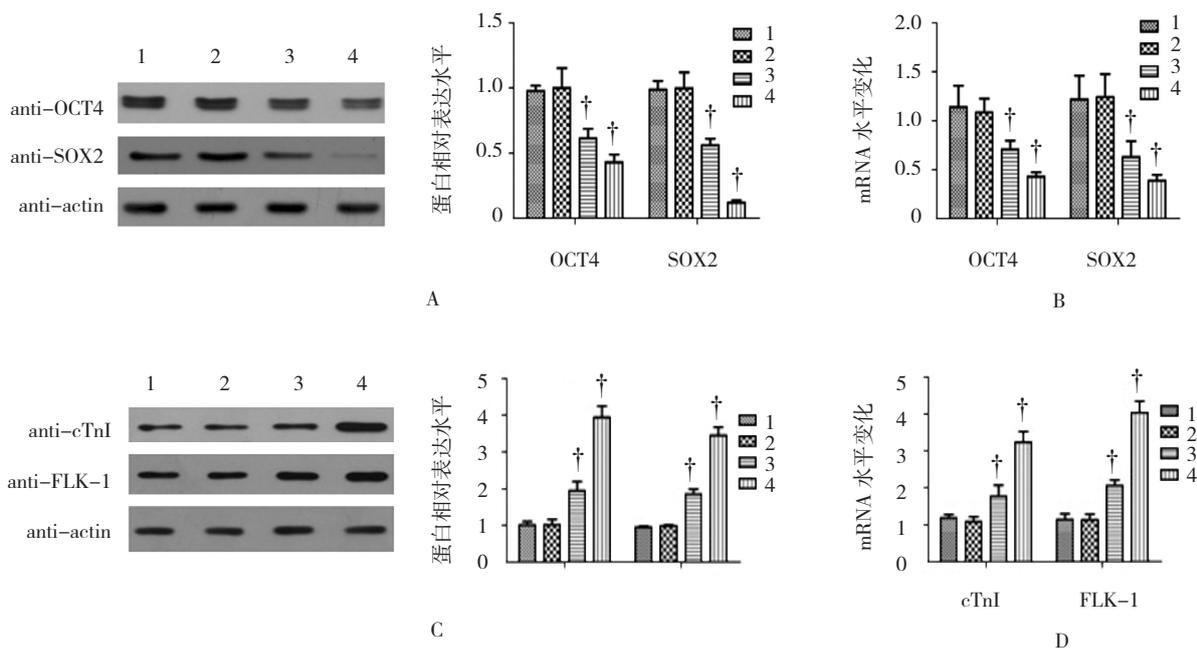
2.5 TMSN-AA 对 hESCs 心肌分化影响的菌落观察

未经诱导分化的 hESC 呈现紧密、并且平坦的菌落, 菌落中的细胞显示出高的细胞核与细胞质的比例



A: 用 PBS (空白组)、MSN 和 TMSN 纳米颗粒处理 48 h ($n=3$) 的人 ES 细胞的细胞活力百分率; B、C: FITC Annexin-V 和碘化丙啶 (PI) 含有用 PBS、MSN 和 TMSN 纳米颗粒处理 72 h 后处理的人 ES 细胞的凋亡测定

图 3 MSN 和荧光染料四甲基罗丹明修饰的 TMSN 对 hESCs 存活与凋亡的影响

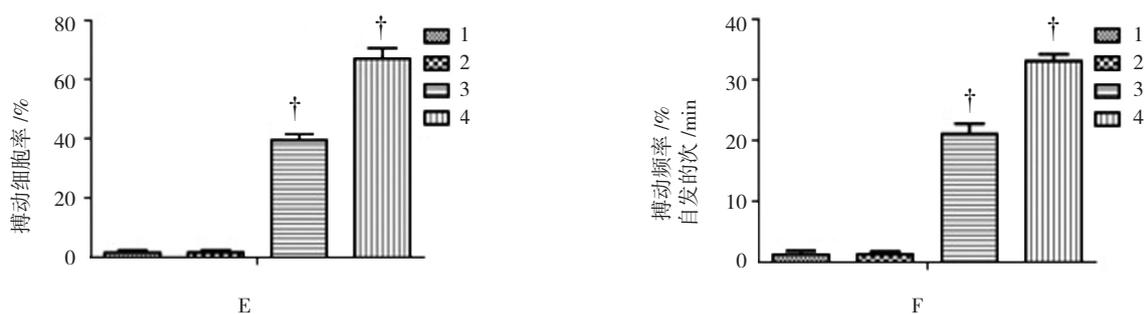


(见图 5A1)。而单独使用 AA 处理后的细胞, 可通过囊性腔的外观发现部分 hESCs 逐渐成熟 (见图 5A2)。使用 TMSN-AA 处理相同时间后, 在贴壁培养条件下, hESCs 细胞中心出现搏动区 (见图 5A3)。免疫荧光检测心脏特异性蛋白的表达。发现在跳动完整的 hESCs 中, cTnI 和 α -肌动蛋白均仅在 EB 的跳动区域染色阳性 (见图 5B)。在从 hESCs 的搏动区域分散的细胞中, cTnI 在单细胞水平与 α -actinin 或 α -actin 共表达。此外, 有组织的肌节条纹的比对模式在双重染色的分离的收缩细胞中可见 (见图 5C)。

对 hESC 衍生的心肌细胞的体外功能, 笔者将该细胞的诱导作用进行药理学评价。发现随着硝苯地平 (Nifedipine) 剂量的增加, 细胞跳动频率下降。当浓度达到 $10 \sim 6 \text{ mol/L}$ 时, 细胞完全停止搏动。另一方面, 异丙肾上腺素 (Isoprenaline) 处理后, 细胞则是以剂量依赖的方式提高收缩频率 (见图 5D), 上述结果表明, hESCs 经 TMSN-AA 诱导后, 可分化为功能性心肌细胞。

2.6 TMSN-AA 纳米复合物在促进 hESCs 向心肌细胞分化的过程中 ERK1/2 信号通路的变化

诱导后的 hESCs 采用 TMSN-AA 处理 120 min 后, 检测发现 ERK1/2 信号通路被激活, 其在 TMSN-AA 刺激后 1 min 即被激活, 并持续到 120 min ($F=321.805, P=0.000$), 见图 6A。采用 $1.5 \times 10^6 \text{ mol/L}$ ERK1/2 抑制剂 PD98059 处理后, 观察 hESCs 细胞的搏动频率以及 α -MHC 的表达水平, 与空白组比较, 差异有统计

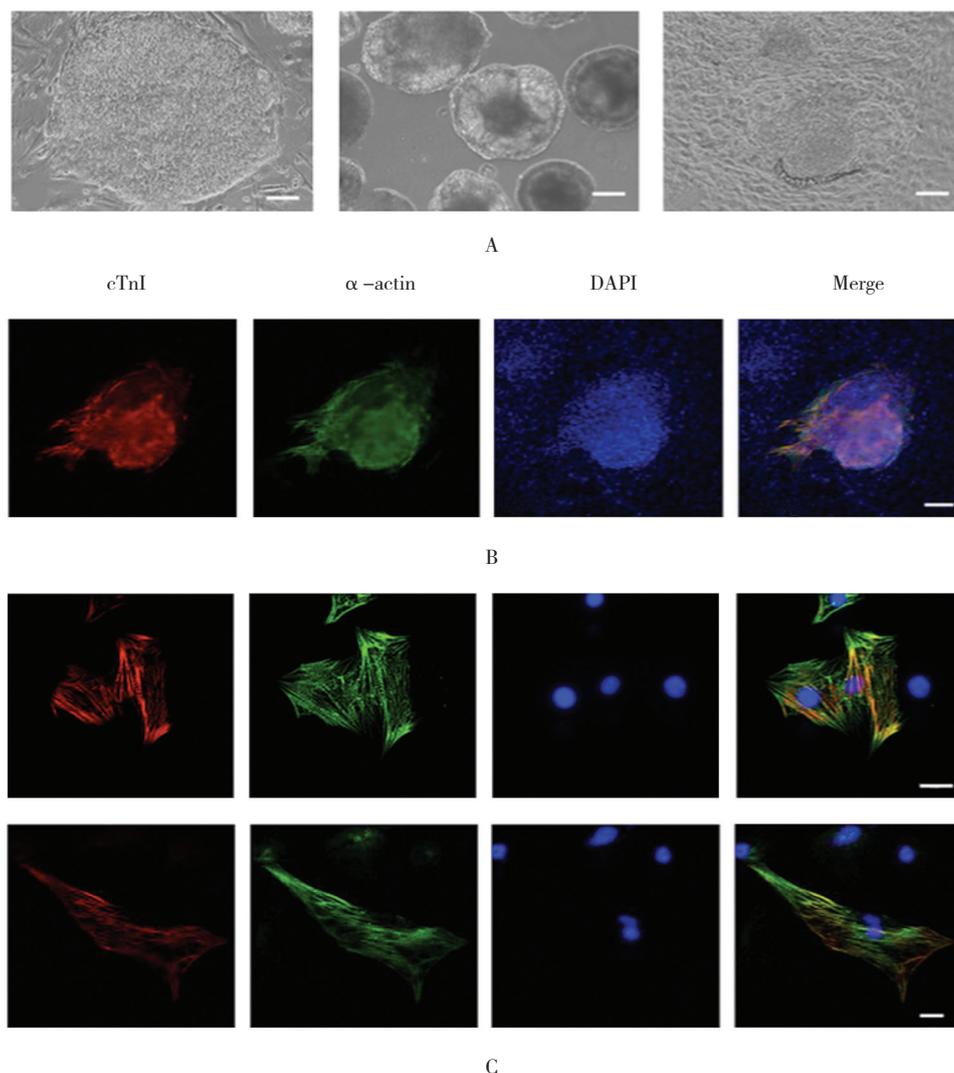


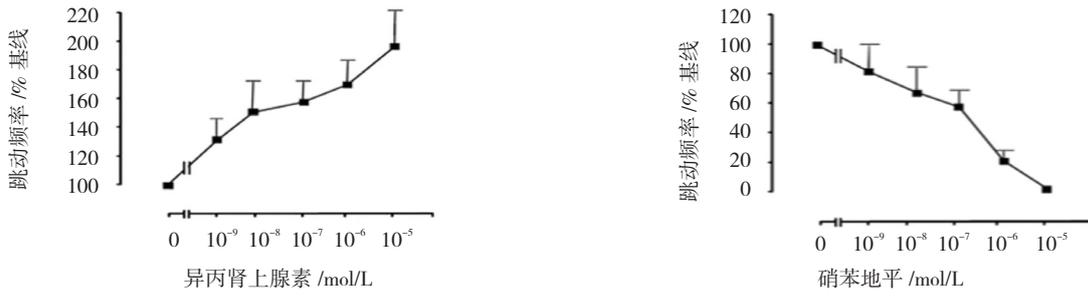
1: 空白组; 2: TMSN 组; 3: AA 组; 4: TMSN-AA 组。A: 细胞内 *OCT4* 和 *SOX2* 基因的表达 (Western blot); B: PBS, TMSN, AA 和 TMSN-AA 处理组中 *OCT4* 和 *SOX2* 基因的相 mRNA 表达水平 (RT-PCR); C: 心肌标记基因 *cTnI* 和 *FLK-1* 表达 (Western blot); D: 各组中 *cTnI* 和 *FLK-1* 基因的 mRNA 表达水平 (RT-PCR); E: 搏动细胞百分率 (相差显微镜); F: 自发搏动率 (相差显微镜)。† 与空白组比较, $P < 0.05$

图 4 hESCs 细胞中 TMSN 递送的抗坏血酸 (AA) 对其干细胞基因表达和对 hESCs 细胞心肌分化的影响

学意义 ($F=444.847, P=0.000$), 见图 6B、6C。在本过程中发现, Akt 信号通路并未参与, 与对照组比较差异无统计学意义 ($F=27.338, P=0.000$), 见图 6D, 其中处理组 α -MHC 的 mRNA 水平升高, 与空白组比较,

差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 $10 \sim 5 \text{ mol/L}$ 渥曼青霉素处理并不影响其表达进行 20 d 的处理而不改变, 与空白组比较, 差异无统计学意义 ($F=11.071, P=0.0689$), 见图 6E、6F。

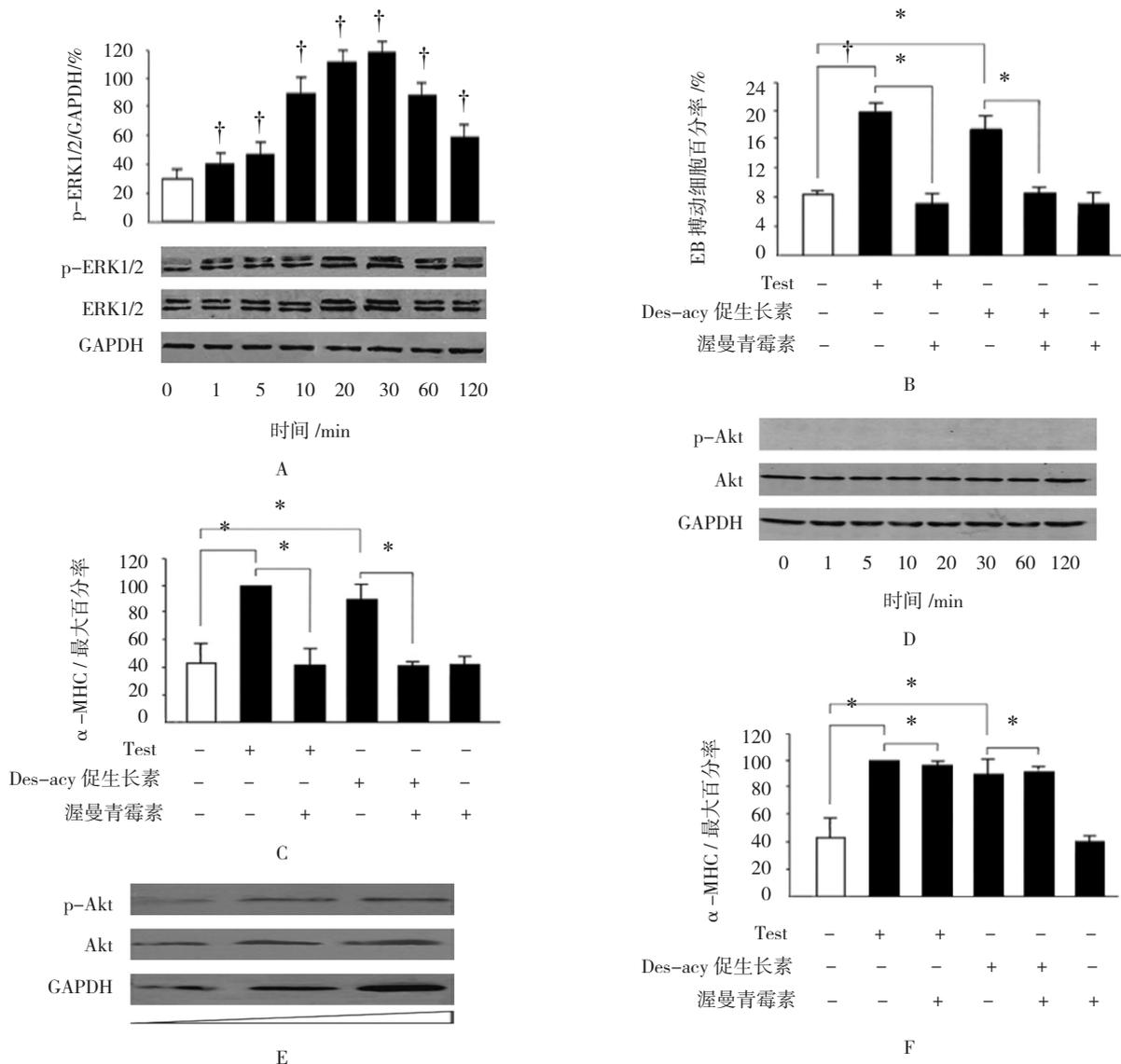




D

A: ①未分化的 hESC 集落的形态; ② AA 单独处理 14 d 后的 hESCs 细胞; ③ TMSN-AA 处理 14 d 后的 hESCs 细胞; B: 心脏特异性蛋白 cTnI 和 α -actinin 在同一跳动 hESCs 细胞中的共表达; C: 从 hESCs 的跳动区域分散的细胞中 cTnI 和 α -actinin 或 α -actinin 的免疫荧光双染的共聚焦图像; D: 异丙肾上腺素 (Isoprenaline) 和硝苯地平 (Nifedipine) 对分化第 14 天 hESCs 跳动频率的影响。标尺: $50\mu\text{m}$

图 5 功能性心肌细胞与 hESCs 的分化



A: ERK1/2 信号通路的激活情况; B: ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 ($1.5\mu\text{mol/L}$) 对 TMSN-AA 作用下分化第 20 天的搏动 hESCs 细胞百分率的影响; C: ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 作用后 α -MHC mRNA 的表达; D: 在诱导后的 hESCs 中, Akt 信号通路的激活情况; E: 不同量的 p-Akt 蛋白的阳性对照输入; F: PI3K 抑制剂渥曼青霉素 (Wortmannin, $10\mu\text{mol/L}$) 对 α -MHC mRNA 表达的影响。
 \dagger 与诱导前比较, $P < 0.05$; * 组间比较, $P < 0.05$

图 6 TMSN-AA 诱导 hESCs 心肌分化时 ERK1/2 的信号通路的变化

3 讨论

心肌细胞死亡是心肌梗死后导致心力衰竭和死亡的关键因素。心脏是终末分化的器官,再生能力十分有限,成体心脏自身无法有效补充心梗缺血区死亡的心肌细胞,而死亡的心肌细胞最终由纤维疤痕取代导致心力衰竭发生、发展^[11]。迄今为止,治疗慢性心力衰竭的唯一方法就是心脏移植,但是由于供体数量的限制以及高昂的治疗费用,因而受到极大的限制^[12]。因此,迫切需要发展治疗心肌梗死及继发性心力衰竭的新方法,以降低心肌梗死和心力衰竭的死亡率。

hESCs 是来源于早期人胚胎未分化内质网细胞的特异性干细胞,其具有在体外通过某些特定的因子诱导,无限增殖和分化成任何细胞的潜能,被认为是全能干细胞,对各类细胞的再生起重要作用^[13]。根据其分化的不同细胞类型,目前已经有大量的研究用于组织修复等。到目前为止,可通过细胞移植治疗的疾病范围已经包括糖尿病、创伤性脊髓损伤、杜氏肌营养不良、心脏病或视听受损等^[11, 14]。但由于受分化程序繁琐且时间较长,分化效率低等限制,虽然已经证实 AA、DMSO 及 5-Aza-2'-脱氧胞苷等具有诱导干细胞分化的能力,但该药物的诱导效率很大程度上取决于细胞摄取量以及拟胚体的形成,所以在应用方面长期裹足不前^[7, 15]。而干细胞,抑或是癌细胞表面所具有的独特的外排泵可以使细胞免受药物或其他物质刺激,进而产生多药耐药能力等^[3, 16],因此,如何精准的实现药物呈递,促进细胞摄取,进而诱导其分化成为了近年来的研究热点^[17]。

作为纳米载体,具有独特和可调的介孔结构,高负载能力和无与伦比的生物相容性的 MSN 已经被用作广泛的治疗剂的有效药物递送平台,用于治疗各种类型的疾病。在本研究中,MSNs 通过溶胶-凝胶法制备,并优化已发表的程序^[18]。没有荧光染料 TRITC 的 MSN 没有吸收峰。在合成中,TEOS 用作二氧化硅前体,在表面活性剂的表面凝结,并在生成的胶束表面周围形成二氧化硅壁,使 MSN 带正电荷 (+27 mV) 和具有阳性电荷的 TMSN 电荷 (+26.2 mV)。研究发现荧光修饰的介孔二氧化硅 (TMSNs) 可以成功地进入 hESCs,并且以荧光修饰的介孔二氧化硅 (TMSNs) 为载体输送抗坏血酸 (AA) 可以诱导 hESCs 的分化。更为重要的是,通过荧光修饰的介孔二氧化硅 (TMSNs) 输送的 AA 可以有效地诱导 hESCs 分化为

心肌细胞,上调心肌标记基因 cTnI 和 FLK-1,同时下调多能性标志物 OCT4 及 SOX2^[19]。此外,相对于单独添加 AA,由荧光修饰的介孔二氧化硅 (TMSNs) 输送的 AA 用于诱导人 ES 细胞分化成心肌细胞更有效,上述结果证实 TMSN-AA 可以靶向诱导 hESCs 的分化。

ERK1/2 信号通路在早期胚胎发育过程中具有多种重要的生物学作用^[20]。有报道称,在小鼠中植入前胚体中,FGF/ERK1/2 突进参与内胚层发育^[21],在脊椎动物中,实验表明,ERK1/2 信号通路传导对神经外胚层和中内胚层分化^[22-23]。在本研究中,TMSN-AA 可以激活 ERK1/2 促进 hESCs 的心肌分化,加入其特异性抑制剂 PD98059 后,ERK1/2 信号通路被抑制,hESCs 心肌分化下降,进一步证实 ERK1/2 信号通路在 hESCs 心肌分化过程中的作用。除此之外,本研究还研究另一信号通路 PI3K/Akt 在 hESCs 心肌分化过程中作用,结果发现,TMSN-AA 诱导期分化过程中,PI3K/Akt 信号通路为参与这一过程,进一步使用抑制剂渥曼青霉素也证实了这一结论。笔者的研究表明,ERK1/2 信号通路对 TMSN-AA 诱导 hESCs 心肌分化起着重要作用,而 PI3K/Akt 信号通路在这一过程中并未被激活。

综上所述,笔者成功构建 TMSN-AA 纳米载体,并证实其可以通过激活 ERK1/2 信号通路促进 hESCs 的心肌分化。为今后化学药物与纳米材料联合使用构建心肌药物递送系统提供的很好的参考与思路,为再生医学领域中进一步研究体外诱导细胞分化乃至于实现临床应用提供很好的研究基础。

参 考 文 献:

- [1] Investigators WMPP. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators[J]. *Journal of Clinical Epidemiology*, 1988, 41(2): 105-114.
- [2] REINLIB L, FIELD L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute[J]. *Circulation*, 2000, 101(18): 182-187.
- [3] WU J C, CHEN I Y, SUNDARESAN G, et al. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography[J]. *Circulation*, 2003, 2(3): 1302-1305.
- [4] DAI W, FIELD L J, RUBART M, et al. Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts[J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2007, 43(4): 504-516.
- [5] MIN J Y, YANG Y, SULLIVAN M F, et al. Long-term improvement

- of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells[J]. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, 2003, 125(2): 361.
- [6] LB B, AJ W, JL C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium[J]. *Nature*, 2004, 428(6983): 668-673.
- [7] SHARON L, PAIGE S T, CRISTI L. et al. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development[J]. *Cell*, 2012, 151(1): 221-232.
- [8] WANG Y, ZHAO Q, HAN N, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications[J]. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2015, 11(2): 313-327.
- [9] LU J, LIONG M, SHERMAN S, et al. Mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: energy-dependent cellular uptake and delivery of paclitaxel to cancer cells[J]. *Nanobiotechnology*, 2007, 3(2): 89.
- [10] YUSHEN LIN, CHIHPIH TSAI, HSINGYI HUANG, et al. Well-ordered mesoporous silica nanoparticles as cell markers[J]. *Chemistry of Materials* 2005, 17(18): 1-6.
- [11] REZANIA A, BRUIN J E, ARORA P, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(11): 1121.
- [12] MOTHE A J, TATOR C H. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(11): 3824.
- [13] CHONG J J, YANG X, DON C W, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts[J]. *Nature*, 2014, 510(7504): 273-277.
- [14] RONAGHI M, NASR M, EALY M, et al. Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells & Development*, 2014, 23(11): 1275.
- [15] CUARANTA-MONROY I, SIMANDI Z, KOLOSTYAK Z, et al. Highly efficient differentiation of embryonic stem cells into adipocytes by ascorbic acid[J]. *Stem Cell Research*, 2014, 13(1): 88-97.
- [16] DONNENBERG V S, MEYER E M, DONNENBERG A D. Measurement of multiple drug resistance transporter activity in putative cancer stem/progenitor cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009(568): 261-279.
- [17] 罗春花. 人胚胎干细胞 (hESCs) 的生长与分化调控 [D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
- [18] LI K, SUN H, SUI H, et al. Composite mesoporous silica nanoparticle/chitosan nanofibers for bone tissue engineering[J]. *Rsc Advances*, 2015, 5(23): 17541-17549.
- [19] BI W, DENG J M, ZHANG Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation[J]. *Nature Genetics*, 2015, 22(1): 85.
- [20] 杨进, 高美娟, 魏蕊, 等. Ghrelin 通过激活 ERK1/2 信号通路促进人胚胎干细胞分化为心肌细胞 [C]. 北京: 中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议论文汇编, 2012.
- [21] NA J, FURUE M K, ANDREWS P W. Inhibition of ERK1/2 prevents neural and mesodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal[J]. *Stem Cell Research*, 2010, 5(2): 157.
- [22] GRAICHEN R, XU X, SR, BALAKRISHNAN T, et al. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK[J]. *Differentiation*, 2008, 76(4): 357.
- [23] YAO Y, LI W, WU J, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(22): 12759-12764.

(王荣兵 编辑)