

· 基础研究 ·

## K<sub>ATP</sub>开放剂对骨髓间充质干细胞凋亡和向心肌细胞转化心肌标志物的影响

刘晓静, 胡星星, 邓波, 段鹏, 朱庆磊\*

(解放军总医院心内科, 北京 100853)

**【摘要】目的** 研究K<sub>ATP</sub>开放剂对大鼠骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)凋亡和向心肌细胞转化心肌标志物的影响。**方法** 培养4周雄性SD大鼠的BM-MSCs, 以二氮嗪(Dia)和吡那地尔(Pin)预处理细胞, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导细胞凋亡, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。在K<sub>ATP</sub>开放剂处理2h后提取各组细胞总mRNA, 实时定量PCR法检测心肌特异基因肌钙蛋白I(cTnI)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、缝隙连接蛋白43(Cx43)以及α重链蛋白(α-MHC)的mRNA表达情况。提取细胞蛋白, Western印迹法检测cTnI、CK、CK-MB蛋白的表达情况。**结果** Dia和Pin 50mol/L预处理可明显降低BM-MSCs凋亡率( $P < 0.05$ )。Dia和Pin处理2h, 能使BM-MSCs的cTnI、CK、Cx43 mRNA表达显著增加( $P < 0.05$ ); 同时明显增加CK、CK-MB蛋白表达( $P < 0.05$ )。**结论** Dia和Pin能增加BM-MSCs向心肌细胞的转化心肌标志物的表达, 并具有抗凋亡的作用。

**【关键词】** 二氮嗪; 吡那地尔; 骨髓间充质干细胞; 凋亡

**【中图分类号】** R963

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.01.011

## Effects of K<sub>ATP</sub> opener on apoptosis and cardiac biomarkers in rat bone marrow mesenchymal stem cells during differentiation into cardiomyocytes

LIU Xiao-Jing, HU Xing-Xing, DENG Bo, DUAN Peng, ZHU Qing-Lei\*

(Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**【Abstract】 Objective** To determine the effect of ATP sensitive potassium channel (K<sub>ATP</sub>) openers on the apoptosis of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and on the cardiac biomarkers in the differentiation of the cells into cardiomyocytes. **Methods** BM-MSCs were isolated from 4-week-old male SD rats, and then amplified and preconditioned by K<sub>ATP</sub> openers, diazoxide (Dia) and pinacidil (Pin). The cell apoptosis was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the apoptosis rate was detected by flow cytometry. After the BM-MSCs were treated with 2 K<sub>ATP</sub> openers respectively for 2h, the total mRNA was extracted for the expression levels of cardiac specific genes, including cardiac-specific troponin I (cTnI), creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), connexin 43 (Cx43) and α-heavy chain protein (α-MHC). Western blotting was used to detect the expression of cTnI, CK and CK-MB. **Results** Both Dia and Pin of 50mol/L significantly decreased the apoptosis rate of BM-MSCs ( $P < 0.05$ ). After 2h preconditioning, Dia and Pin obviously increased the mRNA levels of cTnI, CK, CK-MB and Cx43 ( $P < 0.05$ ), and enhanced the protein levels of CK and CK-MB ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** K<sub>ATP</sub> openers enhance the expression of cardiac biomarkers in the differentiation of BM-MSCs into cardiomyocytes, and also exert anti-apoptotic effect.

**【Key words】** diazoxide; pinacidil; bone marrow mesenchymal stem cells; apoptosis

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81070200).

Corresponding author: ZHU Qing-Lei, E-mail: qlzhu@yahoo.com

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 是一种具有多向分化潜能的细胞, 具有强大的自我复制能力和多向分化潜能, 可以在不同的诱导条件下分化为成骨细胞、脂肪细

胞、软骨细胞、肌细胞、神经细胞、心肌细胞等, 被认为是组织工程/再生医学领域中重要的种子细胞和基因治疗中理想的靶细胞<sup>[1]</sup>。但是, 当BM-MSCs被植入体内时, 会受到各种诱导条件及体内环境的

收稿日期: 2015-09-14; 修回日期: 2015-10-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81070200)

通信作者: 朱庆磊, E-mail: qlzhu@yahoo.com

限制,使得移植细胞的存活率和转化率均不高<sup>[2]</sup>。如何优化BM-MSCs向心肌细胞的转化率以及如何提高转化的心肌细胞在受损心肌组织内的存活率和滞留率,是利用BM-MSCs移植治疗心力衰竭研究中亟待解决的关键问题。

二氮嗪(diazoxide, Dia)和吡那地尔(pinacidil, Pin)是ATP敏感性钾离子通道(ATP sensitive potassium channel,  $K_{ATP}$ )开放剂中的两种,可以特异性激活 $K_{ATP}$ ,提高缺氧耐受性,产生细胞保护的作用<sup>[3]</sup>。有研究表明<sup>[4]</sup>,Pin能升高人胚胎干细胞的生存率。Dia和Pin能否提高BM-MSCs的存活率以及能否促进BM-MSCs向心肌细胞转化,均未见报道。本文则研究了 $K_{ATP}$ 开放剂对BM-MSCs存活率和向心肌细胞转化心肌标志物的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品和试剂

低糖-DMEM培养基、胰蛋白酶-EDTA(HycLone,美国),胎牛血清(Gibco,美国),Dia、Pin、二甲基亚砷(Sigma公司,美国),逆转录试剂盒和Real time PCR试剂盒(ABI,美国),肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)和 $\beta$ -actin抗体(Cell Signaling,美国)。

### 1.2 BM-MSCs的分离和培养

取4周龄雄性SD大鼠1只,颈椎脱臼法处死,于75%乙醇浸泡10min。移入弯盘,剪开双后肢皮肤,尽量完整地剪下双后肢的股骨和胫骨,去除骨头上附着的肌肉筋膜等,PBS中浸泡。移入超净工作台,PBS冲洗2次,浸入低糖-DMEM培养基中。剪去双侧干骺端暴露骨髓腔,用新鲜完全培养基反复冲洗骨髓至骨头发白,收集全部冲洗液于15ml离心管中,2000转/min,离心5min,弃去上清液,用完全培养基重悬细胞,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温孵箱中,培养1.5h后,移取皿中培养基入新的培养皿以去除已经贴壁的成纤维细胞,并标记为P<sub>0</sub>代。将P<sub>0</sub>代细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温孵箱中继续培养。24h后半量换液,72h全量换液。以后每2~3d换液,每日置于倒置显微镜下观察细胞生长情况和形态特征。80%~90%融合时传代,备用。

### 1.3 凋亡率测定

实验分为3组。(1)对照组:加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>终浓度为100 $\mu$ mol/L,孵育4h。(2)Pin组:在对照组的基础

上加入终浓度为50 $\mu$ mol/L的Pin,孵育2h。(3)Dia组:在对照组的基础上加入终浓度为50 $\mu$ mol/L的Dia,孵育2h。

PBS清洗后,用胰酶消化细胞,收集细胞,2000转/min离心5min倒掉上清液,加入300 $\mu$ L的1 $\times$ 结合缓冲液(binding buffer)重悬细胞,加入5 $\mu$ L的膜联蛋白A5-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)染液,混匀,避光室温孵育15min后,加入5 $\mu$ L的碘化丙啶(propidine iodide, PI)染色,作用5min后加入200 $\mu$ L Binding Buffer,混匀,采用流式细胞仪(Beckman Coulter公司,美国)进行凋亡测定。

### 1.4 实时定量PCR测定

参考文献<sup>[5]</sup>,以TRIzol(Life,美国)提取各组总RNA,NanoDrop2000测定RNA浓度后,进行逆转录反应合成cDNA。使用SYBR荧光试剂盒(ABI,美国),以1 $\mu$ L cDNA产物为模板,加入20 $\mu$ L反应体系,采用ABI-7900 Real time PCR测定仪采集实时定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, QPCR)中SYBR荧光信号。以36 $\beta$ 4基因作为内参基因,所有样本做3个平行复孔,试验数据以2- $\Delta$ CT表示,引物序列如下。(1)36B4。Forward: 5'CAGAGGTGCTGGACATCACAGAG3'。Reverse: 5'GGCAACAGTCGGGTAGCCAATC3'。(2)CK。Forward: 5'GGCTTCACTCTGGACGATGTCA3'。Reverse: 5'GTCTTATGCTTGTCTGTGGGTTTG3'。(3)CK-MB。Forward: 5'ATGTGGAATGAGCG-TTTAGGAT3'。Reverse: 5'TCTTTGGGAAG-CGGCTATCTT3'。(4)心肌特异性肌钙蛋白I(cardiac-specific troponin I, cTnI)。Forward: 5'ATGACCTGCGTGGCAAGTTTAA3'。Reverse: 5'TTCTCAATGTCCTCCTTCTTACC3'。(5)缝隙连接蛋白43(connexin 43, Cx43)。Forward: 5'ATTCGTGTCTGTGCCACCCTC3'。Reverse: 5'TCCCGTACTTGAAGTCTTGATTT3'。(6) $\alpha$ 重链蛋白( $\alpha$ -heavy chain protein,  $\alpha$ -MHC)。Forward: 5'CAGAACACCAGCCTCATCAAC3'。Reverse: 5'TTCTCCTCTGCGTTCCTACAC3'。

### 1.5 Western印迹测定

收集各组细胞,根据细胞的量加入相应量的RIPA细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,重悬混匀后于冰上振荡15min,再于4℃、15000g离心20min后,取上清,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。总蛋白上样(30 $\mu$ g/孔),10%十二烷基硫酸钠聚丙烯

酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 采用半干转膜法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF) 上, 然后5%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 于摇床上室温封闭2h。按适当比例用5%BSA稀释配制一抗, 4℃孵育过夜, 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBS-Tween, TBST) 漂洗3次, 二抗室温孵育2h, 漂洗3次, 化学荧光辣根过氧化物酶底物 (chemiluminescent HRP substrate, ECL) 法发光, 显影并定影。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学处理。所有数据资料均以均数 ± 标准差表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组间数据资料比较通过方差分析。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $K_{ATP}$ 开放剂对BM-MSCs凋亡的影响

100mol/L的 $H_2O_2$ 与BM-MSCs共孵育24h, 可诱导BM-MSCs凋亡, 凋亡率为66.9%。预先加入50mol/L  $K_{ATP}$  开放剂Pin或者Dia, 均可观察到凋亡率的显著下降 ( $P < 0.05$ ), 分别降低至37.7%和21.6%。提示Dia和Pin可以明显降低BM-MSCs凋亡率 (图1)。

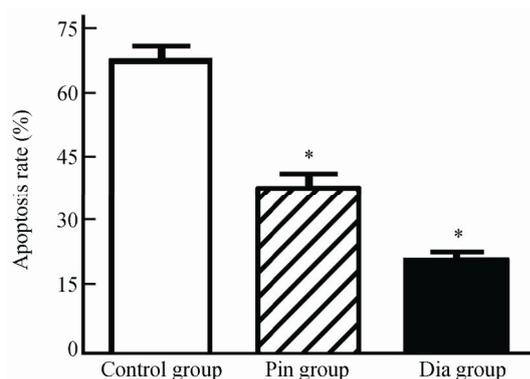


图1 二氮嗪和吡那地尔对BM-MSCs凋亡率的影响  
Figure 1 Effects of diazoxide and pinacidil on the apoptosis rate of BM-MSCs ( $n = 6$ )

BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; Pin: pinacidil; Dia: diazoxide. Compared with control group, \* $P < 0.05$

### 2.2 $K_{ATP}$ 对心肌标志物mRNA表达的影响

BM-MSCs经Pin和Dia预处理后, 心肌标志物cTnI、Cx43、CK以及CK-MB的mRNA相对表达量均有明显增加, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 图2)。在Pin和Dia的作用下: cTnI mRNA表达分别增加16.8

倍和11.5倍; Cx43 mRNA分别增加2.5倍和2.9倍; CK mRNA分别增加16.2倍和15.4倍; CK-MB mRNA分别增加15.0和13.8倍。提示Pin和Dia均可上调BM-MSCs心肌标志物转录水平的表达。

### 2.3 $K_{ATP}$ 对心肌标志物蛋白表达的影响

以Pin和Dia 50mol/L预处理BM-MSCs 2h后, BM-MSCs中的CK和CK-MB蛋白表达水平均显著增加 ( $P < 0.05$ ; 图3)。在Pin和Dia的作用下: CK分别增加6.8倍和6.7倍; CK-MB分别增加6.7倍和5.4倍。提示Pin和Dia均可上调BM-MSCs心肌标志物翻译水平的表达。

## 3 讨论

BM-MSCs经体外诱导后具有增殖分化为心肌样细胞的能力, 将其移植于缺血的心肌可明显改善心功能。但是, BM-MSCs的低成活率和低转化率限制了其治疗效果和临床应用。缺血预处理能提高包括心脏在内的多种组织器官的功能和耐受力, 产生保护作用<sup>[6]</sup>。其中,  $K_{ATP}$ 起关键作用<sup>[7]</sup>。 $K_{ATP}$ 开放剂包括比卡林 (bimakalim)、Pin、阿普卡林 (aprikalim)、Dia等<sup>[8]</sup>。Dia已经被证实具有抗凋亡以及提高细胞生存率的作用<sup>[9]</sup>。Pin具有舒张血管、保护心脏以及抗低毒的作用。Barbaric等<sup>[10]</sup>研究发现, Pin有提高人胚胎干细胞生存率的作用<sup>[11]</sup>。在本次实验中, 我们探讨了在Pin和Dia干预下BM-MSCs的凋亡率、及向心肌细胞分化心肌标志物的影响, 发现经过Dia以及Pin预处理的BM-MSCs能显著降低凋亡率, 提高存活率, 为BM-MSCs进一步发挥自身作用提供了可能。Dia可能是通过在凋亡早期促进细胞色素c进入细胞浆以及保持线粒体膜的完整性来发挥其抗凋亡效应<sup>[12]</sup>。同时它还能增加缺氧状况下肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF), 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的分泌, HGF以及bFGF能激活蛋白激酶B磷酸化, 进而起到促进核因子 $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 家族的作用, 提高细胞生存率<sup>[13]</sup>。Pin可提高凋亡抑制基因Bcl-2的表达, 减轻缺血缺氧后的细胞凋亡<sup>[14]</sup>, 且Pin能明显减轻心肌细胞缺氧复氧时细胞内的钙超载<sup>[15]</sup>。这些可能是 $K_{ATP}$ 开放剂抗凋亡保护BM-MSCs的机制。

此外, 我们还发现经过Dia和Pin预处理能增加BM-MSCs心肌特异基因CK、CK-MB、cTnI、Cx43转录和翻译水平的表达。众所周知, cTnI、肌钙蛋白T、CK及CK-MB、Cx43等心肌特异性蛋白的表达增加,

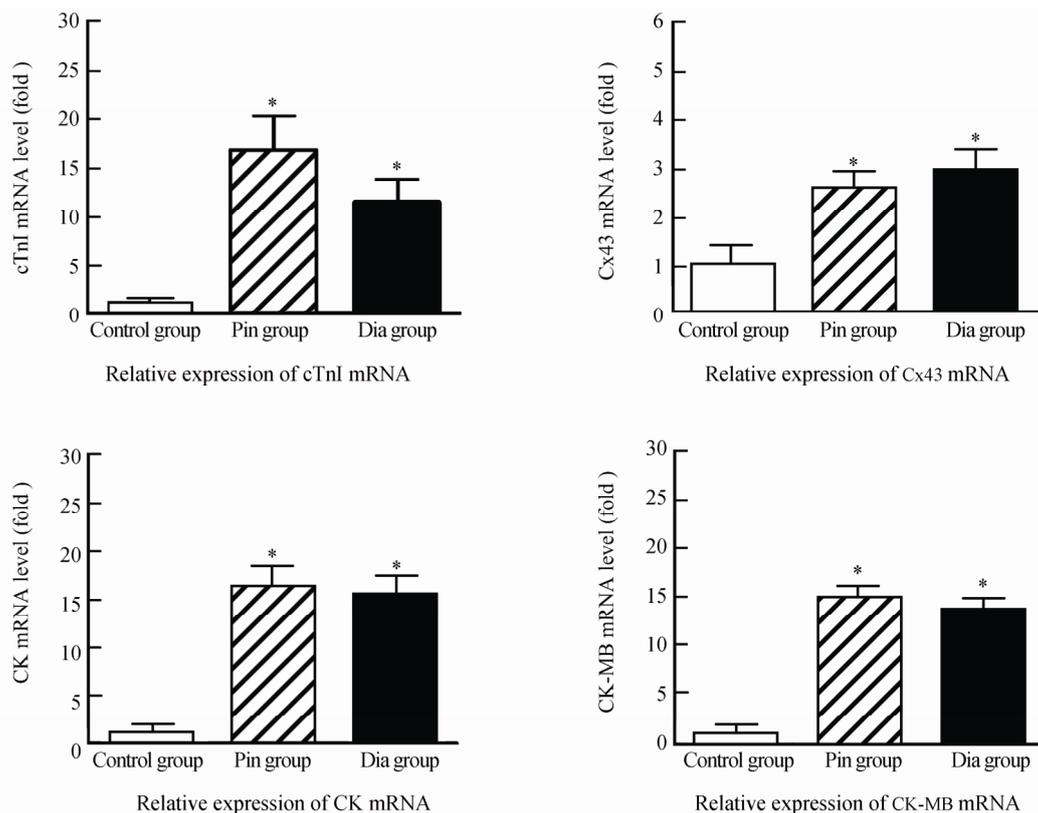


图2 二氮嗪和吡那地尔对BM-MSCs向心肌细胞转化心肌标志物基因mRNA的影响

Figure 2 Effects of diazoxide and pinacidil on the mRNA level of cardiac biomarkers in trans-differentiation of BM-MSCs into cardiomyocytes (n = 6)

BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; Pin: pinacidil; Dia: diazoxide; cTnI: cardiac-specific troponin I; CX43: connexin 43; CK: creatine kinase; CK-MB: creatine kinase isoenzyme. Compared with control group, \*P < 0.05

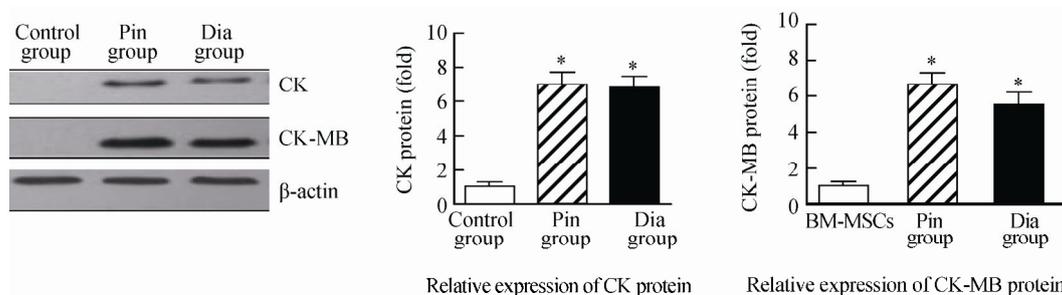


图3 二氮嗪和吡那地尔对BM-MSCs CK和CK-MB蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of diazoxide and pinacidil on the CK and CK-MB protein expression of BM-MSCs (n = 6)

BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; Pin: pinacidil; Dia: diazoxide; CK: creatine kinase; CK-MB: creatine kinase isoenzyme. Compared with control group, \*P < 0.05

可作为BM-MSCs向心肌样细胞转化的一种表现,且Cx43是心脏组织的一种缝隙连接蛋白,参与维持心脏功能。实验研究证实其与细胞生存有关,可以用Cx43的表达水平来表示诱导的细胞转化效率<sup>[16,17]</sup>。我们的研究表明,Dia和Pin不仅对BM-MSCs有抗凋亡的作用,而且可增加BM-MSCs向心肌细胞转化心肌标志物的表达,提示K<sub>ATP</sub>开放剂诱导了BM-MSCs向心肌细胞的转化。而K<sub>ATP</sub>开放剂是如何诱导BM-MSCs向心肌细胞的分化以及在整体动物水平是否也能促进BM-MSCs向心肌细胞的转化等问题仍需要进一步地研究和探讨。

【参考文献】

[1] Hu XX, Zhu QL. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in treatment of myocardial infarction: recent advances[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2014, 13(1): 71-75. [胡星星, 朱庆磊. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死的进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2014, 13(1): 71-75.]

[2] Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease[J]. Circ Res, 2011, 109(8): 923-940.

[3] Zhu QL, He AX, Wang SW. ATP sensitive potassium

- channels and cardiovascular diseases[J]. *Advan Cardiovasc Dis*, 2003, 24(6): 455-458. [朱庆磊, 何爱霞, 王士雯. ATP敏感性钾通道与心血管系统疾病[J]. *心血管病学进展*, 2003, 24(6): 455-458.]
- [4] Barbaric I, Jones M, Buchner K, *et al*. Pinacidil enhances survival of cryopreserved human embryonic stem cells[J]. *Cryobiology*, 2011, 63(3): 298-305.
- [5] Qi Y, Xu Z, Zhu Q, *et al*. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38 $\alpha$  MAPK during insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2013, 62(11): 3887-3900.
- [6] Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1113-1151.
- [7] Grover GJ, Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(4): 677-695.
- [8] Qi X, Wang H, Xie WP, *et al*. Effects of iptakalim on intracellular free calcium concentration of cultured rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2008, 24(1): 67-70. [齐 栩, 王 虹, 解卫平, 等. 埃他卡林对兔肺动脉平滑肌内皮细胞钙浓度的影响[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(1): 67-70.]
- [9] Kis B, Rajapakse NC, Snipes JA, *et al*. Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons[J]. *J Neurochem*, 2003, 87(4): 969-980.
- [10] Barbaric I, Jones M, Buchner K, *et al*. Pinacidil enhances survival of cryopreserved human embryonic stem cells[J]. *Cryobiology*, 2011, 63(3): 298-305.
- [11] Cui X, Wang H, Guo H, *et al*. Transplantation of mesenchymal stem cell preconditioned with diazoxide, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, promotes repair of myocardial infarction in rats[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 220(2): 139-147.
- [12] Afzal MR, Haider HKh, Idris NM, *et al*. Preconditioning promotes survival and angiomyogenic potential of mesenchymal stem cells in the infarcted heart via NF-kappaB signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(6): 693-702.
- [13] Jia CH, Zhang H, Li J, *et al*. Pinacidil, an ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits ischemic apoptosis via up-regulating Bcl-2 expression in PC12 cells[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2009, 25(7): 927-931. [贾春红, 张 鸿, 李 佳, 等. ATP敏感性钾通道开放剂吡那地尔增高Bcl-2表达而抑制PC12细胞缺血性凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(7): 927-931.]
- [14] Cheng HX, Zhang RQ, Jia GL, *et al*. Effects of pinacidil on intracellular free calcium concentration of cultured neonatal rat cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation[J]. *J Med Postgrad*, 2003, 16(8): 580-582. [程何祥, 张荣庆, 贾国良, 等. 吡那地尔对低氧/复氧乳鼠心肌细胞内游离钙浓度的影响[J]. *医学研究学报*, 2003, 16(8): 580-582.]
- [15] Wang D, Shen W, Zhang F, *et al*. Connexin43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischaemic heart[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(4): 415-423.
- [16] Taniguchi Ishikawa E, Gonzalez-Nieto D, Ghiaur G, *et al*. Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(23): 9071-9076.

(编辑: 吕青远)