

# 大电导钙激活钾通道对大鼠骨髓间充质 干细胞增殖的影响

罗家宇 吴方昊 何跃曾 李肖明朝\*

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

**摘要** 为了观察开放和拮抗大电导钙激活钾通道(big conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel, BKca)对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖的影响并探讨其机制, 该研究分离培养了大鼠BMSCs, 采用BKca通道特异性开放剂(NS1619)和拮抗剂(IBTX)干预, MTT、平板克隆测定细胞增殖活力及细胞克隆形成能力; 流式细胞术分析细胞凋亡及细胞周期分布; Western blot、定量PCR检测周期蛋白cyclin D1基因和蛋白表达水平; 整细胞膜片钳技术分析细胞膜电生理特性。结果显示, NS1619干预组与对照组相比, BMSCs细胞膜 $\text{K}^+$ 通道外向电流振幅增大, 细胞增殖能力和克隆形成能力增强, 凋亡减少。此外, 开放BKca通道明显促进细胞从 $G_1$ 期向S期过渡, cyclin D1蛋白及mRNA表达上调, 而拮抗BKca通道则相反。推测, BKca通道通过调节细胞周期进程最终影响细胞增殖, 该作用可能与其具有调控细胞膜 $\text{K}^+$ 电流的电生理特性有关。

**关键词** 大电导钙激活钾通道; 骨髓间充质干细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 钾离子电流

## Effect of Big Conductance $\text{Ca}^{2+}$ -Activated $\text{K}^+$ Channel on Proliferations of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Luo Jiayu, Wu Fanghao, He Yue, Zeng Li, Xiao Mingzhao\*

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To investigate the effect of big conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel (BKca) on proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and explore relevant mechanism, BMSCs were isolated from rats bone marrow and expanded *in vitro* for three generations. BMSCs were treated with BKca specific opener (NS1619) and blocker (IBTX) separately. Proliferative activity and colony formation ability were determined by MTT and Tablet cloning. Cell cycle distribution and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Western blot and Q-PCR were used to detect the mRNA and protein levels of cyclin D1. Membrane ionic currents were recorded by whole-cell patch clamp technique. Compared with control group, the group of NS1619 exhibited a higher proliferative activity, colony formation ability and lower apoptosis rate. Additionally, the amplitude of outward  $\text{K}^+$  currents were enhanced in membrane. The results of flow cytometry, Q-PCR and Western blot suggested that activation of BKca facilitated cell progress from  $G_1$  to S phase and improved the expression levels of mRNA and protein of cyclin D1. However, the result of blockade of BKca was contrary to activation of BKca. According to our speculation, BKca could promote the proliferation of rat BMSCs. The mechanism might be related to the regulation

收稿日期: 2013-08-31 接受日期: 2013-12-11

重庆市自然科学基金(批准号: 2009BB5411)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89012505, E-mail: xzm.2004@163.com

Received: August 31, 2013 Accepted: December 11, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of CQ CSTC (Grant No.2009BB5411)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89012505, E-mail: xzm.2004@163.com

网络出版时间: 2014-03-03 12:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0269.html>

of cell cycle. Furthermore, the electrophysiology properties of BKca play a crucial role in cell proliferation.

**Key words** BKca; BMSCs; cell proliferation; cell cycle; K<sup>+</sup> currents

大电导钙激活钾通道(big conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, BKca)由Slo基因家族编码,是依赖细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度和电压双重激活的跨膜钾通道,能介导细胞K<sup>+</sup>的外流,使细胞膜超极化,由于其电导大(200~250 PS)、表达密度高,所以在调节细胞膜静息电位和细胞兴奋性中发挥重要作用<sup>[1]</sup>,当前文献报道BKca参与了多种细胞增殖。

大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有自我更新、多向分化潜能<sup>[2]</sup>、免疫原性低、体内长期存活等特性,常被当作种子细胞用于细胞组织工程。Deng等<sup>[3]</sup>发现, BMSCs表达多种K<sup>+</sup>通道,并表现出相应电生理功能。但其电生理功能是否参与BMSCs增殖,还未见报道。

当前干细胞在基础和临床实验中具有较大研究价值,离子通道在细胞生理活动中扮演着重要角色。本实验通过体外干预BMSCs细胞膜BKca的功能,探讨BKca对BMSCs增殖的调控机制,为进一步的体内研究及临床应用提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料与试剂

4周龄SPF级雄性SD大鼠购自重庆医科大学动物中心;胎牛血清购自Gibco公司;DMSO、IBTX、NS1619购自Sigma公司;兔抗大鼠cyclin D1抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,小鼠抗β-actin抗体、HRP标记的羊抗兔、羊抗小鼠IgG购自碧云天生物技术研究所,RNAiso Plus、逆转录试剂盒RR047A、SYBR Premix Ex Taq II 购自TaKaRa公司,PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。

### 1.2 大鼠BMSCs分离及培养

按照文献<sup>[4]</sup>方法获取大鼠骨髓,并利用全骨髓贴壁法通过不断更换培养基纯化大鼠BMSCs。含10% FBS的DMEM-F12培养液培养并稳定传至第3代备用。

### 1.3 药物准备及细胞分组

MTT预实验中我们发现NS1619浓度30 μmol/L、IBTX 100 nmol/L,药物干预2 d对细胞生长影响最大,所以后续实验以此为干预条件。NS1619根据说

明书溶于DMSO,三蒸水稀释至330 μmol/L;IBTX用三蒸水稀释至1 100 nmol/L,-20 °C避光储存。将第3代处于对数生长期的BMSCs细胞分为4组:Control组(等量生理盐水)、DMSO组(溶剂对照组,培养液加入DMSO使其终浓度为0.205%,与Control相等)、NS1619组、IBTX组。

### 1.4 BKca对大鼠BMSCs增殖活力及克隆形成能力的影响

MTT法检测细胞增殖活力。对数生长期细胞以1.0×10<sup>4</sup>/mL,接种于96孔板。按上述分组干预,并设空白调零组。于0, 1, 2, 3, 4 d,常规MTT显色,酶标仪读取D<sub>570</sub>值,绘制细胞增殖曲线。平板克隆法检测细胞克隆生成能力。对数生长期细胞以1 000/孔,接种于24孔板,分组干预同前。第14 d固定细胞,瑞氏染液染色。倒置显微镜下计数,大于50个细胞即为一个克隆,计算细胞的克隆形成率。

### 1.5 BKca对大鼠BMSCs细胞周期及凋亡的影响

消化离心干预后细胞,PBS洗2次,加入500 μL binding buffer、2 μL Annexin V-FITC混匀后,加入5 μL碘化丙啶,混匀。避光、室温反应5 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。相同方法收集细胞,加入预冷70%乙醇(充分吹打)固定,4 °C过夜,去除固定液并加入RNase和PI,避光染色30 min,流式细胞仪检测周期分布。实验重复3次。

### 1.6 BKca对大鼠BMSCs周期蛋白表达的影响

采用Western blot法,提取各组细胞总蛋白,BCA测定蛋白浓度。取40 μg蛋白,经12% SDS-PAGE分离后,电转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉37 °C封闭2 h。兔抗大鼠cyclin D1抗体(1:400稀释)和小鼠抗β-actin抗体(1:1 000稀释),4 °C过夜。TBST洗膜后,HRP标记的羊抗兔、羊抗小鼠IgG(均1:1 000稀释),37 °C孵育1 h;TBST洗涤,ECL显影。以β-actin为内参对照,计算各个样本条带和内参条带的光密度比值。

### 1.7 BKca对大鼠BMSCs周期蛋白mRNA表达水平的影响

采用Q-PCR法,收集各组细胞,提取总RNA, RNA电泳检测RNA完整性,紫外分光光度计检测其浓度、纯度。逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。

以各组cDNA为模板, 引物序列如下: *cyclin D1*基因: 上游: 5'-AGG AGC AGA AGT GCG AAG AG-3', 下游: 5'-GGC GGA TAG AGT TGT CAG TGT A-3'; *β-actin*: 上游: 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3', 下游: 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。SYBR GREEN荧光染料试剂进行Q-PCR相关操作, 总反应体系10 μL。扩增条件: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 55 °C延伸30 s, 共40循环, 软件自带的熔解曲线检测程序观察扩增产物特异性。每个样本设置3个重复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各组间的差异。

**1.8 BKca对大鼠BMSCs细胞膜外向K<sup>+</sup>电流的影响**

整细胞膜片钳技术检测细胞膜离子电流。细胞爬片: 实验前将载玻片移入细胞外液(NaCl 141 mmol/L、KCl 4 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 1 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、Glucose 10 mmol/L, pH7.2)。拉制2 μm的玻璃电极, 灌以电极内液(KCl 140 mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 0.5 mmol/L、HEPES 10 mmol/L、EGTA 1 mmol/L、Mg-ATP 5 mmol/L、游离Ca<sup>2+</sup> 0.001 mmol/L, pH7.4), 电极入液电阻2~5 MΩ, >1 GΩ高阻抗封接。再稍加负压破膜全细胞状态形成后, 电位钳制-50 mV, 去极化刺激-60 mV~+150 mV、阶跃10 mV、钳制时间300 ms, 记录全细胞膜K<sup>+</sup>电流和细胞膜电容。电流密度(I<sub>d</sub>)以电流幅值与膜电容相比(pA/pF)表示, 以消除不同细胞大小的影响, 绘制电流-电压关系(I-V)曲线。

**1.9 统计学分析**

计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 应用SPSS

17.0统计软件行单因素方差分析, 以P<0.05为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组细胞增殖活力及克隆形成能力**

MTT及平板克隆结果显示, 与Control组相比, NS1619对细胞增殖活力及克隆形成能力有明显促进作用(P<0.05), 而IBTX干预对细胞明显抑制(P<0.05), DMSO对细胞增殖无明显影响(P>0.05)(图1、图2和表1)。

**2.2 各组细胞的凋亡和周期分布比较**

凋亡结果显示, Control组与DMSO组无显著差异; NS1619组凋亡率小于Control组; IBTX组凋亡率大于Control组。周期结果显示, 与Control组相比, 开放BKca通道能明显促进细胞进入S期, 反之, 拮抗BKca通道能将细胞阻滞在G<sub>1</sub>期, 但G<sub>2</sub>期分布比较无显著差异。Control组与DMSO组周期分布比较无统计学意义(图3、图4和表2)。

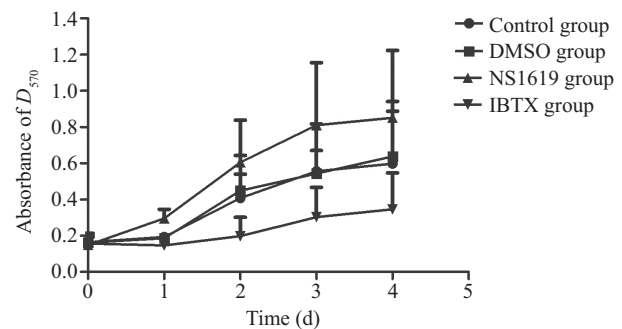
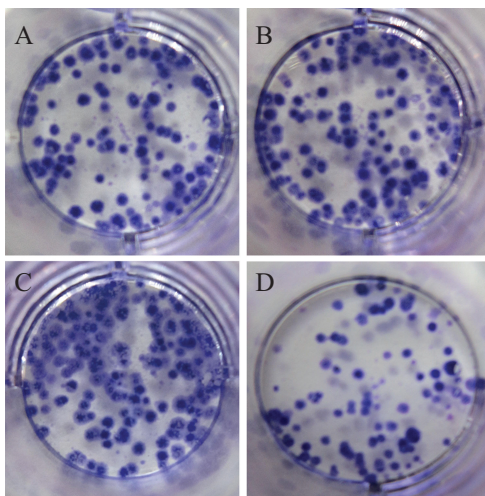
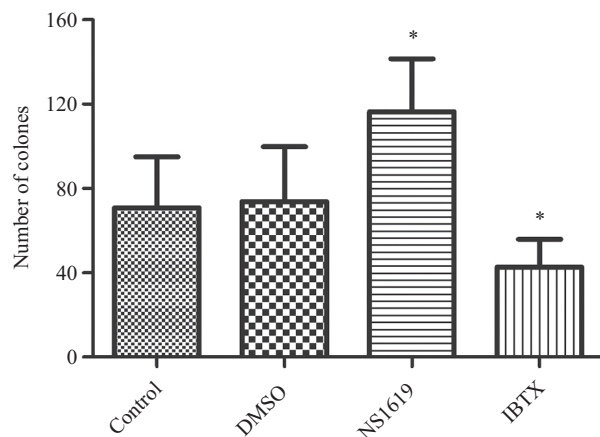


图1 细胞增殖曲线图

Fig.1 Proliferation curve of BMSCs in various groups



(E)



A: Control组; B: DMSO组; C: NS1619组; D: IBTX组; E: 各组细胞克隆形成数。\*P<0.05, 与Control组比较。

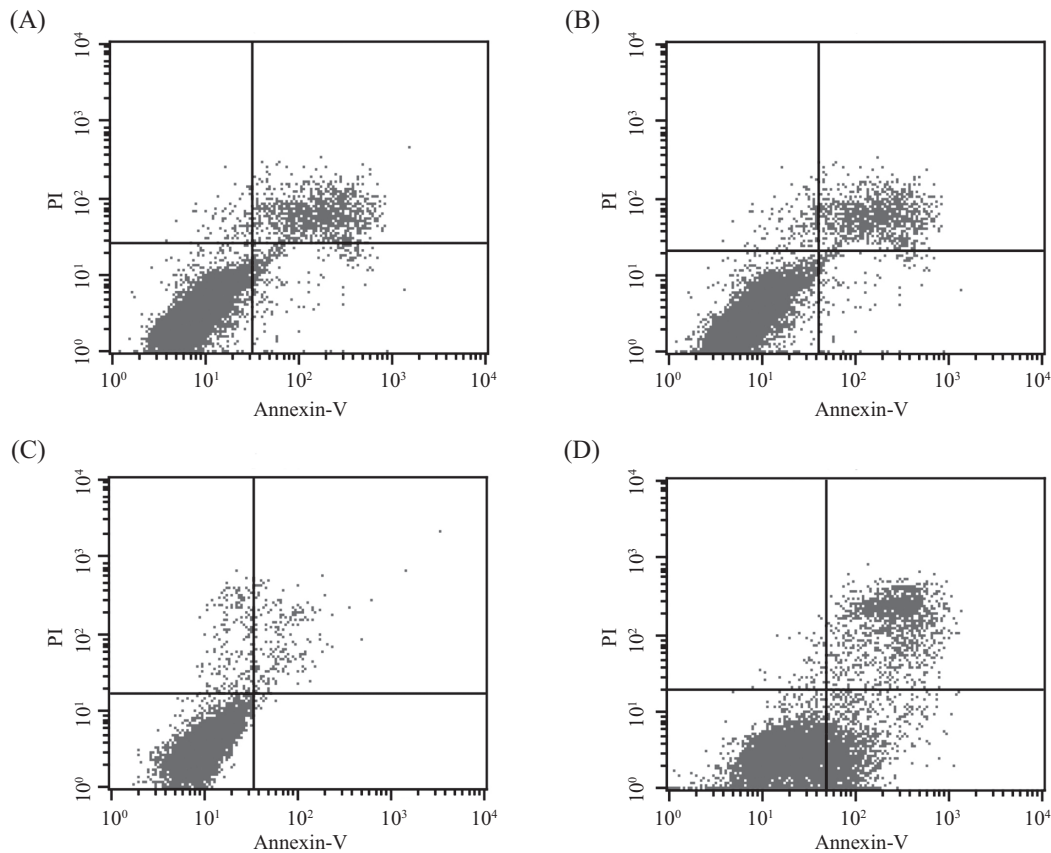
A: Control group; B: DMSO group; C: NS1619 group; D: IBTX group; E: number of colonies in various groups. \*P<0.05 vs Control group.

图2 各组细胞克隆形成能力差异

Fig.2 Colony formation ability of four groups

表1 各组细胞吸光值和集落形成数( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 1 Absorbance value and Number of colony formation of BMSCs in various groups ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别 Groups	各时间段吸光度( $D_{570}$ ) Absorbance value ( $D_{570}$ )				克隆数 Number of colonies
	1 d	2 d	3 d	4 d	
Control group	0.19±0.02	0.41±0.13	0.56±0.26	0.60±0.34	70.83±24.17
DMSO group	0.19±0.02	0.45±0.19	0.54±0.13	0.64±0.25	73.83±25.93
NS1619 group	0.30±0.05	0.60±0.23*	0.81±0.34*	0.85±0.37*	116.50±25.08*
IBTX group	0.15±0.01*	0.20±0.10*	0.30±0.16*	0.35±0.20*	42.67±13.24*

\* $P<0.05$ , 与Control组比较。\* $P<0.05$  vs Control group.

A: Control组; B: DMSO组; C: NS1619组; D: IBTX组。

A: Control group; B: DMSO group; C: NS1619 group; D: IBTX group.

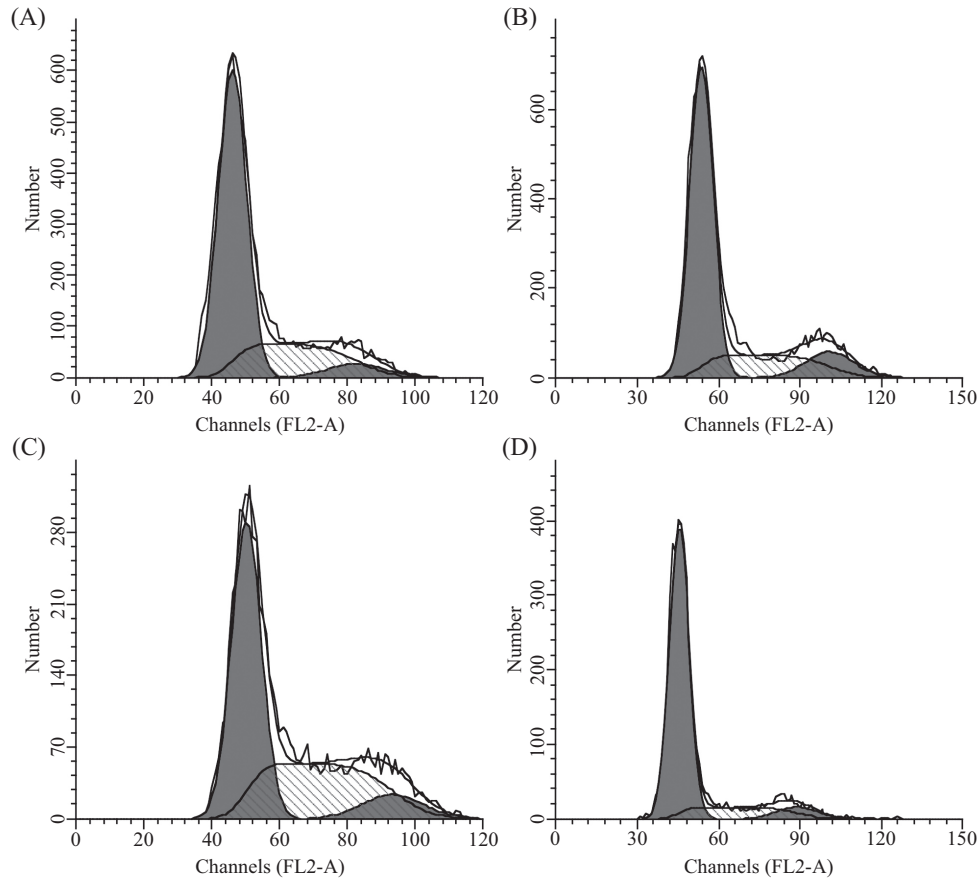
图3 各组细胞凋亡率

Fig.3 Flow cytometry of apoptosis rates of BMSCs in various groups

表2 各组细胞的细胞周期分布及凋亡率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 2 Distributions of cell cycles and apoptosis rates of BMSCs in various groups ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别 Groups	周期分布百分率(%) Distributions of cell cycles rates (%)			凋亡率(%) Apoptosis rate (%)
	G <sub>1</sub> 期 G <sub>1</sub> phase	S期 S phase	G <sub>2</sub> 期 G <sub>2</sub> phase	
Control group	63.49±4.41	28.82±2.88	7.69±3.11	14.24±4.38
DMSO group	69.00±7.99	18.77±9.89	12.24±1.97	12.68±1.66
NS1619 group	44.18±8.18**	47.02±9.72*	8.88±4.08	3.55±1.22*
IBTX group	82.01±3.09**	10.06±4.06*	7.92±2.66	30.27±6.24**

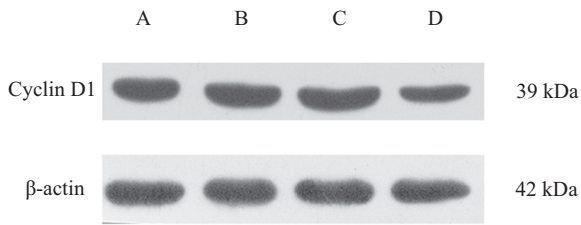
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与Control组比较。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Control group.



A: Control组; B: DMSO组; C: NS1619组; D: IBTX组。  
A: Control group; B: DMSO group; C: NS1619 group; D: IBTX group.

图4 各组细胞周期分布

Fig.4 Flow cytometry of cell cycles of BMSCs cells in various groups



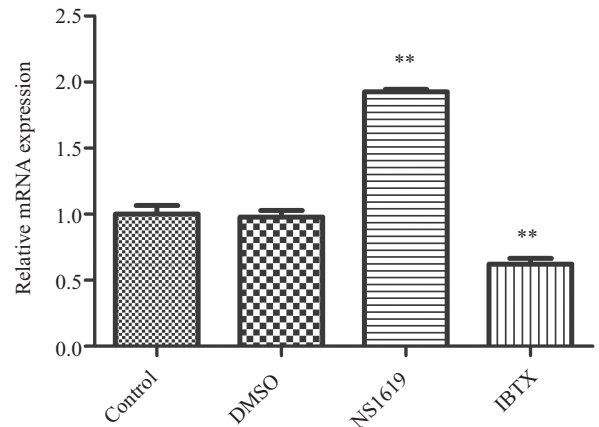
A: Control组; B: DMSO组; C: NS1619组; D: IBTX组。  
A: Control group; B: DMSO group; C: NS1619 group; D: IBTX group.

图5 各组细胞cyclin D1蛋白表达水平

Fig.5 Determination of expression levels of cyclin D1 in various groups by Western blot

2.3 各组细胞cyclin D1蛋白和mRNA表达差异

Western blot结果显示, 干预2 d后, Control组、DMSO组、NS1619组和IBTX组蛋白相对表达量(实验组灰度值/内参灰度值)分别为 $0.71 \pm 0.06$ 、 $0.72 \pm 0.04$ 、 $0.94 \pm 0.17$ 和 $0.51 \pm 0.05$ , 开放BKca能上调cyclin D1蛋白表达( $P < 0.05$ ), 而拮抗BKca则下调cyclin D1表达( $P < 0.05$ ), DMSO组与Control组比较均无统计学差异



\*\* $P < 0.01$ , 与Control组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs Control group.

图6 Q-PCR检测各组BMSCs中cyclin D1的mRNA相对表达量  
Fig.6 Relative mRNA expression of cyclin D1 mRNA in BMSCs of various groups by Q-PCR

( $P > 0.05$ )(图5)。

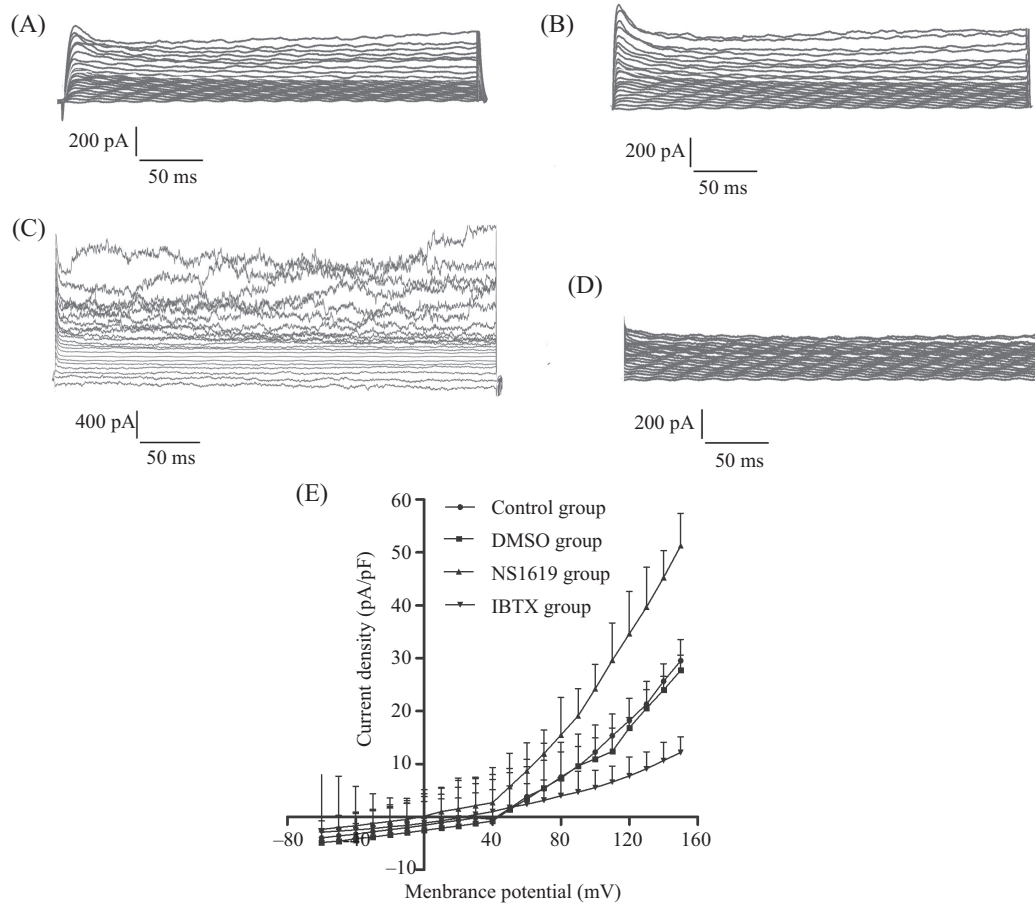
Q-PCR结果显示, DMSO组、NS1619组和IBTX组 cyclin D1的 mRNA表达量分别为Control组的

( $0.98 \pm 0.05$ )倍、( $1.92 \pm 0.02$ )倍和( $0.62 \pm 0.04$ )倍, DMSO组与Control组比较无统计学差异( $P > 0.05$ ) (图6)。

## 2.4 BKca对各组细胞的细胞膜K<sup>+</sup>电流的影响

上述刺激引出了一系列较大幅值外向K<sup>+</sup>电流, 但NS1619组电流振幅波动较大。NS1619组、DMSO组、NS1619组BKca在40 mV开始激活, 随

膜去极化幅度增加而增加, 当去极化在150 mV时NS1619组I<sub>d</sub>( $51.26 \pm 6.18$ )pA/pF较Control( $29.55 \pm 4.01$ )组明显升高( $n=3, P < 0.01$ ), IBTX组I<sub>d</sub>( $12.19 \pm 2.94$ )较Control组明显降低( $P < 0.01$ ), Control组与DMSO组( $27.71 \pm 2.90$ )比较无统计学差异(图7)。



A: Control组; B: DMSO组; C: NS1619组; D: IBTX组; E: I-V曲线。

A: Control group; B: DMSO group; C: NS1619 group; D: IBTX group; E: I-V curve.

图7 各组细胞BKca电流比较及I-V曲线

Fig.7 BKca currents and I-V curves of various groups

## 3 讨论

BKca广泛表达在哺乳动物多种组织细胞中, 如神经细胞、血管平滑肌细胞等。BKca的激活依赖细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度的增加和细胞膜电势的改变, 并且负反馈调节Ca<sup>2+</sup>内流。由于BKca能显著改变细胞膜电势和细胞兴奋性, 因此在许多生理活动中扮演重要角色, 如平滑肌收缩、神经递质释放等<sup>[5]</sup>。当前研究报道, BKca参与前列腺癌细胞、心肌成纤维细胞等多种细胞增殖<sup>[6-8]</sup>, 但确切机制尚不清楚。Bur等<sup>[9]</sup>认为, 抑制BKca活性导致细胞内高K<sup>+</sup>, 细胞外

液大量进入胞内, 胞质空泡形成, 线粒体内质网肿胀, 导致细胞凋亡。此外, Saleem等<sup>[10]</sup>认为, BKca与TRPC6(瞬时电位受体通道)相互作用调节胞内Ca<sup>2+</sup>浓度, 而Ca<sup>2+</sup>作为第二信使参与细胞基因转录与增殖调控。Ouadid-Ahidouch等<sup>[11]</sup>对乳腺癌细胞的研究结果显示, BKca在不同细胞周期表达率及表达密度明显不同, G<sub>1</sub>早期表达开始增高, G<sub>1</sub>晚期表达最高, 到S期缓慢下降, 抑制BKca导致细胞在S期累积。这些研究提示我们, 在BMSCs中BKca是否通过改变细胞膜电流影响细胞周期进程, 最终调控细胞增殖。

本实验膜片钳结果显示, BMSCs引出的外向 $K^+$ 电流可被NS1619和IBTX影响, 说明BMSCs表达功能性BKca通道, 并且NS1619可使I-V曲线上移, IBTX使I-V曲线下移, 说明我们对BKca的干预影响了细胞膜 $K^+$ 的跨膜流动。这与我们前期研究得出BMSCs过表达BKca会导致细胞外 $K^+$ 浓度升高,  $Ca^{2+}$ 浓度降低<sup>[12]</sup>的结果相符。干预后, BMSCs细胞增殖能力和克隆形成能力明显高于对照组, 细胞凋亡率也降低。IBTX组结果却与之相反, 说明BKca对BMSCs细胞增殖产生正调控。从细胞周期改变的结果来看, NS1619干预后与Control组比较, S期细胞比例升高说明BKca促进细胞从 $G_1$ 向S过渡, 而IBTX组 $G_1$ 期细胞比例升高, 说明细胞被阻滞在了 $G_1$ 期。此外, NS1619组cyclin D1 mRNA和蛋白表达水平也较对照组高。因此, 我们认为BKca通过调控周期进程参与BMSCs增殖。其调控机制可能因为激活BKca通道, 导致外向 $K^+$ 流动增加, 负反馈调节电压门控钙通道开放并促进 $Ca^{2+}$ 进入细胞内与钙调蛋白结合成 $Ca^{2+}$ -CaM复合体: (1)启动DNA合成促进细胞由 $G_1$ 向S期过渡; (2)诱导核膜解体促进 $G_2$ 向M期过渡; (3)参与染色体移动促进细胞进入有丝分裂后期。此外, 跨膜离子流动调节细胞可能通过影响周期蛋白和周期依赖性蛋白激酶表达来促进细胞从 $G_1$ 向S期过渡, 这与Henney等<sup>[13]</sup>研究相符。但Abdullaev等<sup>[14]</sup>认为, BKca并未参与人胶质瘤细胞的增殖。Han等<sup>[15]</sup>提出开放BKca会诱导卵巢癌细胞凋亡。目前, 还不清楚为什么BKca对不同类型的细胞增殖产生不同调控作用, 我们推测某些类型细胞对细胞内 $K^+$ 浓度较敏感, BKca介导大量 $K^+$ 外流使细胞内 $K^+$ 耗竭激活Caspase凋亡途径, 或者引起细胞皱缩, 最终导致细胞凋亡。

综上所述, 我们推测BKca通过影响周期蛋白表达和改变细胞膜离子流动来调控BMSCs周期进程, 进而促进细胞增殖和克隆形成, 抑制凋亡。这为BMSCs的基础研究和临床治疗提供了相关依据。实验中我们发现, 膜片钳记录NS1619组外向 $K^+$ 电流振幅波动较大, 我们至今还未能解释其原因, 此外, BKca的4个 $\alpha$ 亚基和4个 $\beta$ 亚基对BKca电生理功能有什么影响, 这也是我们以后研究的方向。

### 参考文献 (References)

1 Dinardo MM, Camerino G, Mele A, Latorre R, Conte Camerino

- D, Tricarico D. Splicing of the rSlo gene affects the molecular composition and drug response of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(7): e40235.
- 2 Rahaman MN, Mao JJ. Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91(3): 261-84.
- 3 Deng XL, Sun HY, Lau CP, Li GR. Properties of ion channels in rabbit mesenchymal stem cells from bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(1): 301-9.
- 4 聂永华, 肖明朝, 苟欣, 汤为学, 陈力学, 蔡贤福. 骨髓间充质干细胞改善糖尿病大鼠勃起功能障碍的研究. *重庆医科大学学报*(Nie Yonghua, Xiao Mingzhao, Gou Xin, Tang Weixue, Chen Lixue, Cai Xianfu. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on improving erectile dysfunction in diabetic rats. *Journal of Chongqing Medical University*) 2012; 37(10): 854-8.
- 5 Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(12): 921-31.
- 6 Bloch M, Ousingsawat J, Simon R, Schraml P, Gasser TC, Mihatsch MJ, *et al.* KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* 2007; 26(17): 2525-34.
- 7 He ML, Liu WJ, Sun HY, Wu W, Liu J, Tse HF, *et al.* Effects of ion channels on proliferation in cultured human cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(2): 198-206.
- 8 Oeggerli M, Tian Y, Ruiz C, Wijker B, Sauter G, Obermann E, *et al.* Role of KCNMA1 in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(8): e41664.
- 9 Bury M, Girault A, Megalizzi V, Spiegl-Kreinecker S, Mathieu V, Berger W, *et al.* Ophiobolin A induces paraptosis-like cell death in human glioblastoma cells by decreasing BKCa channel activity. *Cell Death Dis* 2013; 4: e561.
- 10 Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, *et al.* The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(4): F959-70.
- 11 Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Ahidouch A, Delcourt P, Prevarskaya N. Cell-cycle-dependent expression of the large  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316(1): 244-51.
- 12 何跃, 肖明朝, 聂永华, 何卫阳, 秦国东, 罗家宇. 慢病毒介导KCNMA1体外转染大鼠间充质干细胞及功能测定. *中国细胞生物学学报*(He Yue, Xiao Mingzhao, Nie Yonghua, He Weiyang, Qing Guodong, Luo Jiayu. Transfection of the KCNMA1 lentiviral into the mesenchymal stem cells *in vitro* and its function assay. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2012; 34(11): 1110-6.
- 13 Henney NC, Li B, Elford C, Reviriego P, Campbell AK, Wann KT, *et al.* A large-conductance (BK) potassium channel subtype affects both growth and mineralization of human osteoblasts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(6): C1397-408.
- 14 Abdullaev IF, Rudkouskaya A, Mongin AA, Kuo YH. Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation. *PLoS One* 2010; 5(8): e12304.
- 15 Han X, Xi L, Wang H, Huang X, Ma X, Han Z, *et al.* The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(2): 205-9.