

淫羊藿苷对经血源性子宫内膜干细胞 成心肌样细胞分化的影响

杨 芬 刘彦礼* 闫 岩 张大林 吉 祥 林俊堂*

(新乡医学院生命科学技术学院, 河南省医用组织再生重点实验室, 新乡 453003)

摘要 选择安全高效的诱导剂促进干细胞成心肌样细胞分化, 将为干细胞治疗心脏疾病提供更佳的种子细胞, 加强干细胞治疗效果。该研究重在明确淫羊藿苷(icariin, ICA)对经血源性子宫内膜干细胞(menstrual blood-derived endometrial stem cells, MenESC)成心肌样细胞分化的影响。首先, 通过MTT法和划痕实验检测ICA对MenESC增殖和迁移的影响。RT-PCR检测ICA与5氮杂胞苷(5azacytidine, 5azaC)诱导前后心肌特异性转录调控因子肌细胞增强因子-2C(myocyte enhancer factor-2C, *MEF-2C*)、NK2转录因子相关蛋白5(NK2 transcription factor related locus 5, *Nkx2.5*)、GATA结合蛋白4(GATA binding protein 4, *GATA4*)以及心肌特异性标志物人类心房钠尿肽(human atrial natriuretic peptide, *hANP*)、肌钙蛋白I(cardiac tropomyosin I, *cTnI*)、肌钙蛋白T(cardiac tropomyosin T, *cTnT*)基因的表达水平。免疫荧光检测ICA与5azaC诱导后细胞中cTnT的蛋白质水平表达。结果表明, ICA对MenESC的增殖和迁移无显著性影响; 进一步发现, ICA与5azaC诱导MenESC后, 均能显著上调*MEF-2C*、*Nkx2.5*、*GATA4*、*hANP*、*cTnI*及*cTnT*基因的表达; 而最终的免疫荧光结果也证实, ICA诱导后的MenESC阳性表达cTnT。综上所述, ICA可在不影响MenESC增殖和迁移活性的基础上促进其成心肌样细胞分化, 为MenESC在临床上治疗心脏疾病提供新途径。

关键词 经血源性子宫内膜干细胞; 淫羊藿苷; 心肌分化; 心脏疾病

Icariin-Mediated Differentiation of Menstrual Blood-Derived Endometrial Stem Cells into Cardiomyocyte-Like Cells

Yang Fen, Liu Yanli*, Yan Yan, Zhang Dalin, Ji Xiang, Lin Juntang*

(College of Life Science and Technology, Henan Key Lab of Medical Tissue Regeneration, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract Application of safe agents to effectively predifferentiate stem cells into cardiomyocyte-like cells would strength the stem cell-based therapies for heart diseases. The aim of this study is to examine the effect of icariin (ICA) on the cardiogenic differentiation of menstrual blood-derived endometrial stem cells (MenESC). MTT and wound healing assays are used to investigate the effect of ICA on the proliferation and migration of MenESC. Furthermore, RT-PCR and specific fluorescence staining are performed to examine the expression of cardiac-specific transcription factors myocyte enhancer factor-2C (*MEF-2C*), NK2 transcription factor related locus 5

收稿日期: 2016-08-08 接受日期: 2016-09-29

河南省高等学校重点科研项目计划(批准号: 15A180009、14HASTIT032)和新乡医学院研究生科研创新支持计划(批准号: YJSCX201515Y)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0373-3029887, E-mail: liuyanli198512@163.com; E-mail: linjdtin@126.com

Received: August 8, 2016

Accepted: September 29, 2016

This work was supported by the University Key Scientific Research Foundation of Hennan Province (Grant No.15A180009, 14HASTIT032) and Scientific Research Foundation of Xinxiang Medical University (Grant No.YJSCX201515Y)

*Corresponding authors. Tel: +86-373-3029887, E-mail: liuyanli198512@163.com; E-mail: linjdtin@126.com

网络出版时间: 2016-11-22 13:50:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161122.1350.002.html>

(*Nkx2.5*) and GATA binding protein 4 (*GATA4*) and cardiac-specific marker human atrial natriuretic peptide (*hANP*), cardiac tropomyosin I (*cTnI*) and cardiac tropomyosin T (*cTnT*) in MenESC treated with ICA or/and 5-azacytidine (5azaC). Our results demonstrated that ICA had no negative effect on the proliferation and migration of MenESC. Icarin and 5azaC treatment could significantly up-regulate the gene expression of *MEF-2C*, *Nkx2.5*, *GATA4*, *hANP*, *cTnI* and *cTnT* in MenESC. Meanwhile, cardiogenic differentiation was also confirmed by the positive expression of cTnT in MenESC treated with ICA and 5azaC. These results confirmed the safety and effects of cardiogenic differentiation of MenESC treated with ICA, and provided support for the stem cell-based therapies for heart diseases.

Keywords menstrual blood-derived endometrial stem cells; Icarin; cardiogenic differentiation; heart disease

随着心脏疾病发病率的逐年升高, 成体干细胞 (adult stem cells, ASC) 治疗心脏疾病为基础研究和临床应用带来了新的契机^[1]。经血源性子宫内膜干细胞 (menstrual blood-derived endometrium stem cells, MenESC) 凭借其丰富的来源、无创的样本收集方式、较强的增殖活性及多向分化潜能 (在特定诱导培养条件下可向心肌、神经、肝脏、胰腺、肺、骨、脂肪样细胞等分化) 等优势引起了国内外学者的广泛关注^[2-3]。然而, 随着对干细胞移植治疗心脏疾病的深入研究发现, 直接移植 ASC 到心肌梗死部位不仅会引起心律不齐、梗死部位存活率低等问题。同时, ASC 潜在的多向分化能力致使其分化成心肌样细胞的效率及数量非常有限, 从而达不到临床上有效的治疗效果^[4-5]。

近来, 有研究报道, 预先分化后的 ASC 可通过增强其旁分泌作用和体内转分化效率来促进受损组织的修复和再生, 同时降低其在体内分化的不确定性^[6-7]。基于已有研究结果, 我们推测, 若将 MenESC 预先诱导分化为心肌样细胞, 不仅能提高其旁分泌作用和体内转分化效率, 同时可降低其在体内多向分化所引起的副作用, 为临床上治疗心脏相关疾病提供更理想的细胞来源, 提高干细胞治疗效率。然而, 基础研究中常用的干细胞成心肌分化的诱导剂 5-氮杂胞苷 (5-azacytidine, 5azaC) 虽可高效诱导干细胞成心肌样细胞分化, 但由于其细胞毒性高 (临床上作为抗癌药物使用)、安全性低、不良反应大等原因使其诱导后的细胞缺乏临床应用价值。故寻找安全、高效的成心肌样细胞分化诱导剂势必将促进基于 MenESC 治疗心脏疾病的基础和临床研究。因此, 本研究重在明确我国传统中药淫羊藿的主要药效成分淫羊藿苷 (icariin, ICA) 对 MenESC 成心肌样细胞分化的影响, 旨在筛选出安全高效的 MenESC 成心肌样细胞分化诱导剂, 为临床上基于 MenESC 治疗心

脏相关疾病提供新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

利用月经杯收集健康女性志愿者 (25~35 岁) 经血样品 15 mL, 与等量样品保存液 (含 1% 青/链霉素混合液、4% 0.25 mg/mL 两性霉素 B、2% 15 g/L EDTA- Na_2) 充分混匀, 于 4 °C 保存, 48 h 内完成 MenESC 的分离提取。本研究获得新乡医学院伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器

DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司, 成骨成脂及成软骨诱导培养基购自广州威佳科技有限公司, MTT (四甲基偶氮唑盐)、油红 O 及茜素红购自 Sigma 公司, ICA (批号: RA0505SA13) 购自上海源叶生物科技有限公司, 流式抗体 (CD73-FITC、CD90-FITC 及 CD105-PE) 购自 eBioscienc 公司, 免疫荧光抗体 cTnT 购自 Abcam 公司 (编号 ab8295), 二抗购自 Life Technology 公司, RNA 提取试剂盒及 PCR 相关试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司, 反转录试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。SpectraMax i3 酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司, 倒置显微镜购自德国 Leica 公司, Cytomics FC 500 MPL 流式细胞仪购自德国 Beckman Coulter 公司。

1.3 MenESC 的分离培养及传代

将经血样本反复吹打混匀后, 缓慢加入已预先加入等量人淋巴细胞分离液的离心管中, 1 800 r/min 水平离心 25 min, 吸取中间环状白膜层后, PBS 洗 2 次, 1 200 r/min 离心 10 min。随后加入适量完全培养基 (DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 1% 青/链霉素), 吹打混匀后转入细胞培养瓶中, 于 37 °C、5.0% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。培养 2 d 后首次换

液, PBS洗2次充分除去未贴壁细胞及杂质, 随后根据MenESC生长情况, 3~4 d进行换液, 待原代细胞(Passage 0, P0)汇合达70%~80%时, 常规胰蛋白酶消化传代至P3代备用。

1.4 MenESC生物学特性鉴定

表面标志物检测: 取P3代MenESC悬液, 调节密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 分别加入单克隆流式抗体(每份100 μL 细胞悬液)CD73-FITC、CD90-FITC及CD105-PE, 混匀后于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, PBS洗2次后重悬, 流式细胞仪检测相关细胞表面标志物水平。

多向分化潜能检测: 取P3代MenESC, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于12孔板中培养, 待细胞汇合达50%, 进行成骨(DMEM高糖培养基, 5% FBS, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 50 $\mu\text{mol/L}$ 左旋抗坏血酸, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠)、成脂(DMEM高糖培养基, 5% FBS, 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡哆美辛, 0.5 mmol/L IBMX, 10 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素)、成软骨(DMEM高糖培养基, 5% FBS, 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 0.2 mmol/L左旋抗坏血酸, 1%胰岛素-运铁蛋白-硒酸钠, 10 ng/mL TGF- β 3)诱导, 上述不同诱导培养基每3 d换液, 持续诱导21 d。待诱导结束后, PBS冲洗2次, 4%多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗3次, 成骨成脂成软骨诱导分别使用茜素红、油红O染色及阿尔新蓝染色后, 于倒置显微镜下观察。

1.5 ICA对MenESC增殖及迁移的影响

取P3代MenESC, 以 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于96孔板中, 每孔100 μL 细胞悬液, 各组均设5个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0% CO_2 条件下培养, 待细胞完全贴壁(12 h)后, 加入100 μL 培养基溶解的ICA, 使ICA终浓度分别达到 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L和 10^{-9} mol/L, 培养48 h后向各孔中加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL), 继续培养4 h, 弃上清后加入DMSO充分溶解, 于酶标仪上测定各孔吸光值(检测波长570 nm, 参比波长630 nm)。按下式计算增殖指数(proliferation index, PI), $\text{PI} = \text{实验孔吸光值} / \text{对照孔吸光值}$ 。

随后, 取P3代MenESC以 $3 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度接种于6孔板, 每孔1.5 mL, 待细胞融合达90%后, 用1 mL无菌枪头在各孔划一直划痕, PBS冲洗2次。实验组加入2 mL无血清培养基溶解的ICA, 使ICA终浓度分别达到 10^{-6} mol/L和 10^{-7} mol/L(依据MTT结果选择), 对照组加入等体积的无血清培养基, 分别在药物处理12、24、36、48 h后于倒置显微镜下观察并拍照

计数。

1.6 RT-PCR检测ICA及5azaC诱导前后心肌相关基因表达变化

取P3代MenESC, 分别用终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的5azaC培养基和 10^{-6} mol/L的ICA培养基进行诱导, 于诱导第0、7、14 d收集细胞, 按照试剂盒说明提取总RNA。所提取的样品 $D_{260}/D_{280} > 1.8$, 且琼脂糖凝胶电泳后可见明显的28S和18S两条带, 表明RNA提取效果理想。Nanodrop 2 000定量后取200 ng总RNA样品, 应用反转录试剂盒合成cDNA。常规PCR扩增不同诱导时间节点细胞中心肌特异性基因肌细胞增强因子-2C(myocyte enhancer factor-2C, *MEF-2C*)、NK2转录因子相关蛋白5(NK2 transcription factor related locus 5, *Nkx2.5*)、GATA结合蛋白4(GATA binding protein 4, *GATA4*)以及人类心房钠尿肽(human atrial natriuretic peptide, *hANP*)、肌钙蛋白I(cardiac tropomyosin I, *cTnI*)、肌钙蛋白T(cardiac tropomyosin T, *cTnT*)基因的mRNA水平, *GAPDH*作为对照基因, 所需引物如表1所示^[8-10]。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物通过12%聚丙烯酰胺凝胶, 实验结果重复3次以上, 目的基因的量化通过与*GAPDH*条带灰度值比较获得。

1.7 免疫荧光检测ICA诱导细胞中cTnT表达情况

取P3代MenESC, 分别用终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的5azaC培养基和 10^{-6} mol/L的ICA培养基诱导3周后, PBS洗3次, 每次3 min, 4%多聚甲醛固定15 min后, 再用PBS洗3次, 每次3 min。0.5% Triton X-100室温通透20 min, PBS洗3次, 每次3 min, 5%山羊血清室温封闭30 min。吸去封闭液后加入cTnT一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 弃去一抗后PBS洗3次, 每次3 min, 荧光二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h, PBS洗3次, 每次3 min, 常规DAPI染核后于荧光倒置显微镜下观察。

1.8 数据统计

应用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 所有实验数值均以(Mean $\pm$ S.D.)表示, 采用Student's *t*检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

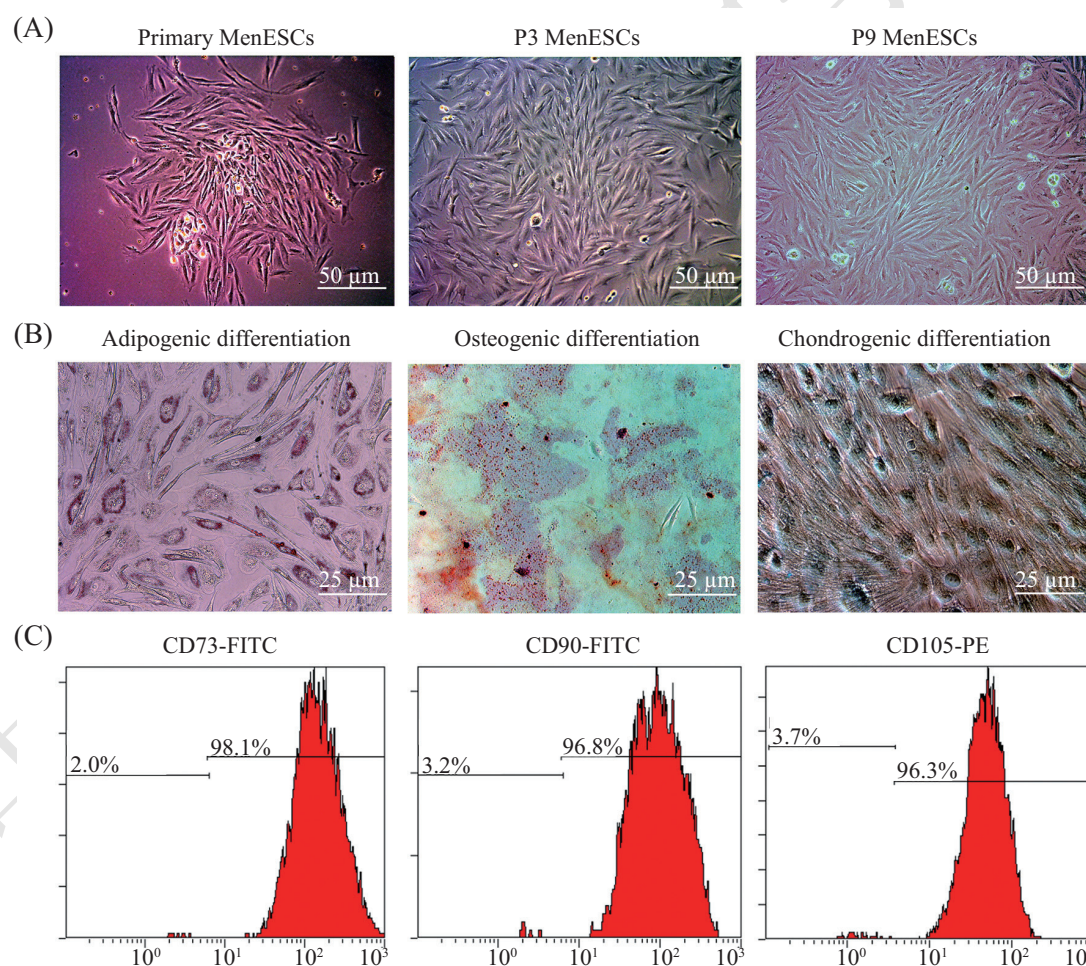
2 结果

2.1 MenESC生物学特性

原代MenESC培养2 d后, 细胞均已贴壁, 继续培养至7 d时, 多数细胞呈长而扁平的梭形, 细胞

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	核苷酸序列(5'→3') Oligonucleotide sequence (5'→3')	大小(bp) Size (bp)
<i>GATA4</i>	Sense: GGC CTG TCA TCT CAC TAC GG Antisense: ATG GCC AGA CAT CGC ACT	72
<i>Nkx2.5</i>	Sense: CAA GTG TGC GTC TGC CTT T Antisense: TTG TCC GCC TCT GTC TTC TC	147
<i>MEF-2C</i>	Sense: ATC TGC CCT CAG TCA GTT GG Antisense: AGA AGG CAG GGA GAG ATT TGA	73
<i>hANP</i>	Sense: GAA CCA GAG GGG AGA GAC AGA G Antisense: CCC TCA GCT TGC TTT TTA GGA G	406
<i>cTnT</i>	Sense: GGC AGC GGA AGA GGA TGC TGA A Antisense: GAG GCA CCA AGT TGG GCA TGA ACG A	150
<i>cTnI</i>	Sense: CCC TGC ACC AGC CCC AAT CAG A Antisense: CGA AGC CCA GCC CGG TCA ACT	250
<i>GAPDH</i>	Sense: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC Antisense: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC	226

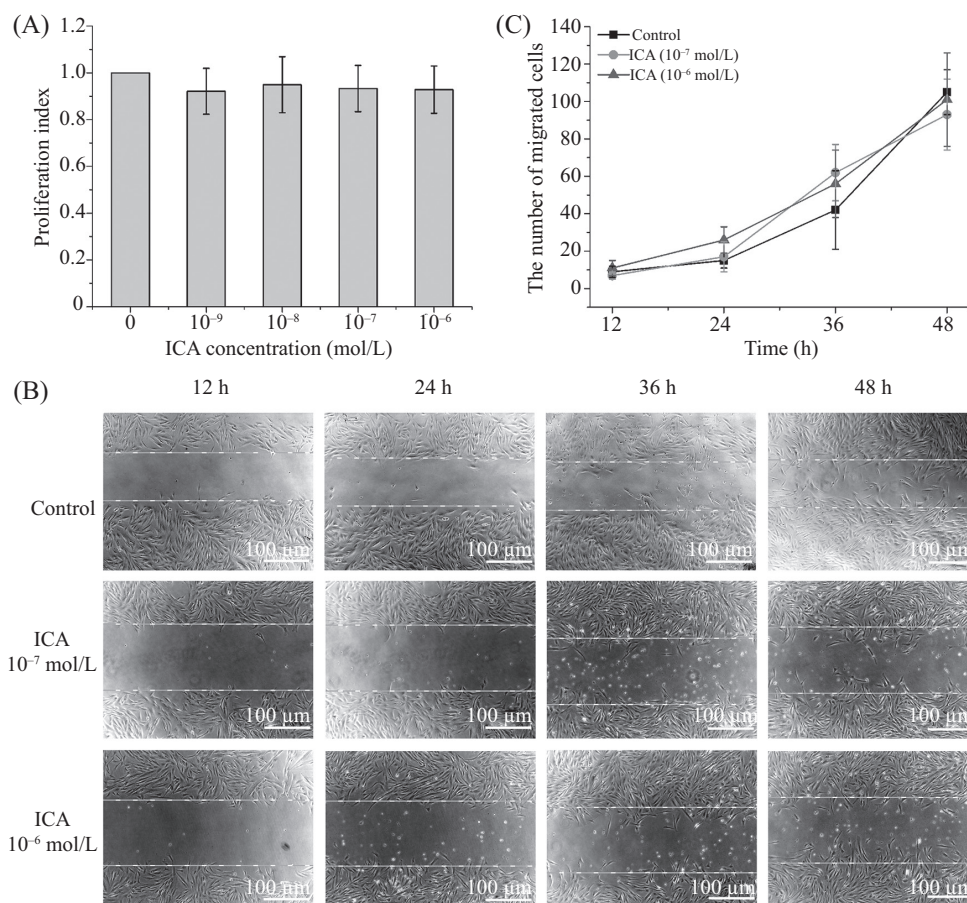


A: 原代、P3和P9 MenESC形态; B: MenESC成脂、成骨及成软骨分化潜能的检测; C: 流式细胞术检测MenESC表面标志物表达。

A: morphology of primary, P3 and P9 MenESC, respectively; B: multilineage differentiation assays of MenESC *in vitro*, including adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiations; C: the phenotype analysis of MenESC by flow cytometry.

图1 MenESC生物学特性

Fig.1 Biological characteristics of MenESC



A: ICA对MenESC增殖的影响; B: ICA对MenESC迁移的影响; C: ICA对MenESC迁移的量化。

A: effect of ICA on the proliferation of MenESC; B: effect of ICA on the migration of MenESC; C: quantification of ICA on the migration of MenESC.

图2 ICA对MenESC增殖及迁移能力的影响

Fig.2 Effect of ICA on the proliferation and migration of MenESC

集落成旋涡状生长,形态均一,排列整齐,传至第3代及第9代细胞形态无明显变化(图1A)。随后, MenESC经成脂诱导后,油红O染色可见明显脂滴形成、经成骨诱导后,可见部分细胞呈立方形聚集样生长,茜素红染色明显可见大片红色钙化斑。经成软骨诱导后,阿尔新蓝染色阳性(图1B)。流式细胞术分析结果进一步表明, MenESC阳性表达3种常用成体干细胞表面标志物CD73、CD90及CD105,且阳性率均在95%以上(图1C)。综上,本研究所提MenESC符合国际上对ASC的界定,为后续实验奠定了基础。

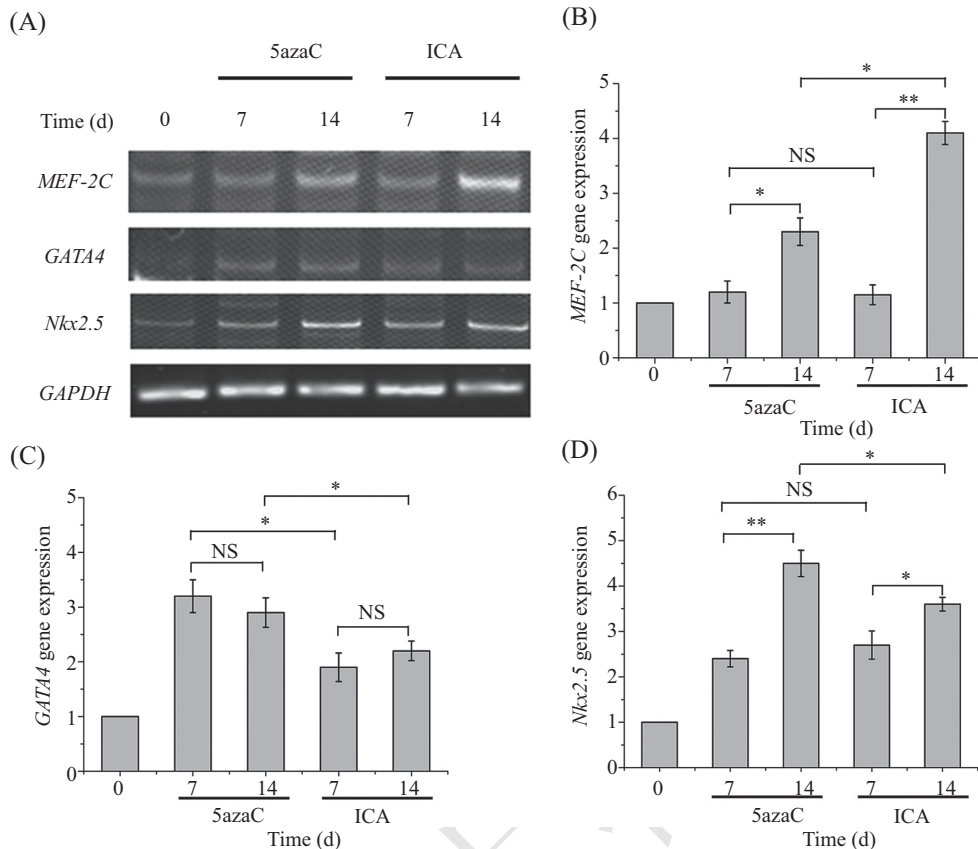
2.2 ICA对MenESC增殖及迁移的影响

MenESC在不同浓度ICA的作用下,增殖活性无明显变化(图2A)。进一步划痕实验结果表明, MenESC在 10^{-6} mol/L和 10^{-7} mol/L浓度的ICA作用下, 12 h后各组仅有极少数细胞迁移过划痕线。继续培养24 h后,各组也仅有少量细胞迁移过划痕线。随

着培养时间的延长,各组迁移过划痕线的细胞数量逐渐增多,但不同时间节点(12、24、36、48 h)迁移过划痕线的细胞数量与对照组比较无统计学差异(图2B和图2C)。该结果表明, ICA对MenESC的增殖和迁移活性无明显抑制作用。

2.3 ICA及5azaC诱导后心肌特异性转录调控因子mRNA水平的变化

RT-PCR结果如图3所示, MenESC经终浓度分别为20 μ mol/L 5azaC和 10^{-6} mol/L ICA诱导7 d后,与诱导0 d组相比,心肌分化转录因子 *Nkx2.5* ($P < 0.05$) 和 *GATA4* ($P < 0.05$) 的mRNA水平显著升高, *MEF-2C* 的mRNA水平无显著性变化。其中ICA诱导组 *GATA4* ($P < 0.05$) 的mRNA水平显著低于5azaC诱导组,但 *Nkx2.5* 的mRNA水平在ICA诱导组与5azaC诱导组中无显著性差异。持续诱导14 d后,各诱导组 *MEF-2C* ($P < 0.05$) 与 *Nkx2.5* ($P < 0.01$) 的mRNA水平与诱导7 d组比较均显著升高,其中ICA诱导组 *MEF-*



A: ICA与5azaC诱导MenESC 14 d后RT-PCR检测*MEF-2C*、*GATA4*和*Nkx2.5* mRNA水平的变化; B~D: *MEF-2C*、*GATA4*和*Nkx2.5* mRNA水平的统计, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: mRNA levels of *MEF-2C*, *GATA4* and *Nkx2.5* were examined by RT-PCR in MenESC treated by ICA and 5azaC for 14 d; B-D: statistical analysis of *MEF-2C*, *GATA4* and *Nkx2.5* mRNA levels, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 ICA诱导MenESC过程中的心肌分化转录因子mRNA水平的变化

Fig.3 mRNA levels of cardiac-specific transcription factors in MenESC during the process of ICA induction

2C($P < 0.05$)的mRNA水平显著高于5azaC诱导组, 但ICA诱导组*Nkx2.5*($P < 0.05$)的mRNA水平则显著低于5azaC诱导组。*GATA4*的mRNA水平较诱导7 d组无显著性变化, 但ICA诱导组*GATA4*($P < 0.05$)的mRNA水平仍显著低于5azaC诱导组。

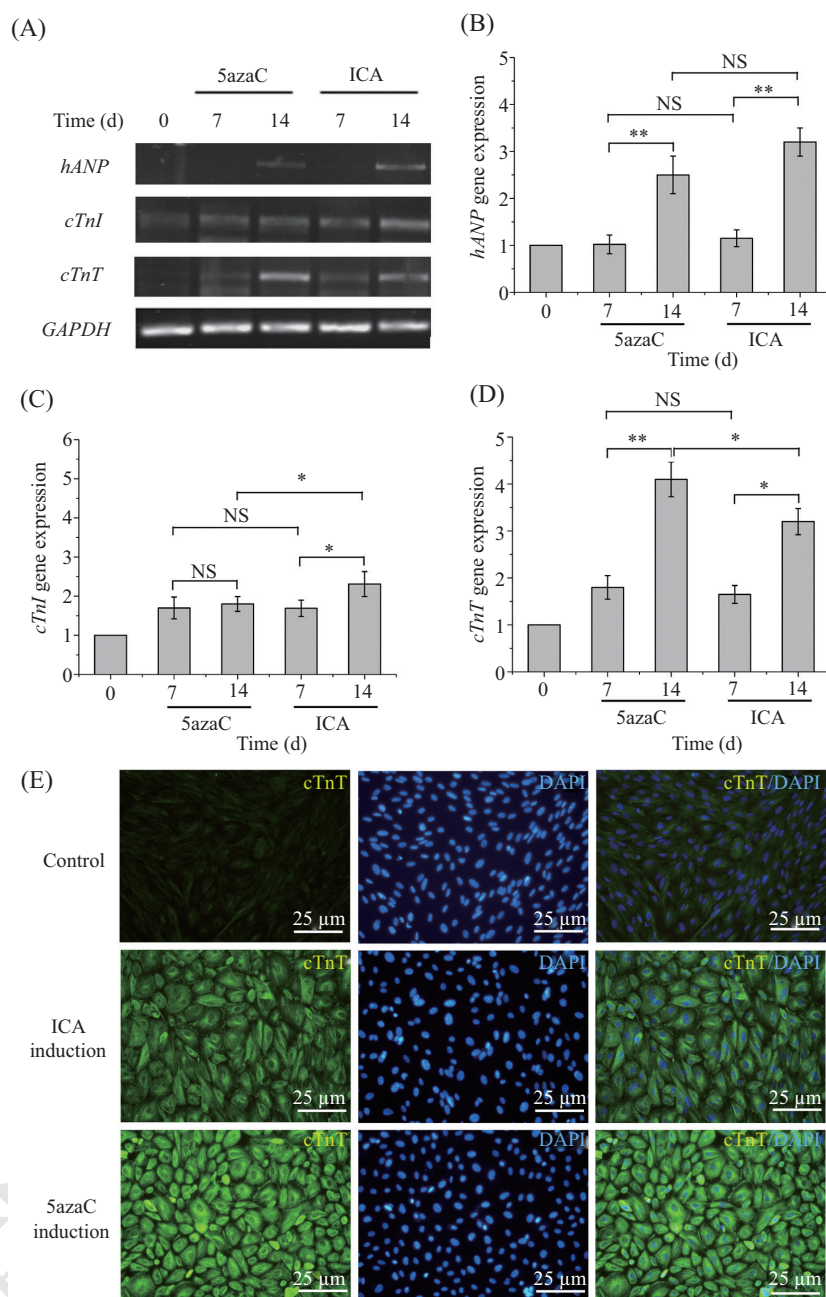
2.4 ICA及5azaC诱导前后心肌特异性标志物mRNA水平的变化

RT-PCR结果如图4A~图4D所示, MenESC经终浓度分别为20 $\mu\text{mol/L}$ 5azaC和 10^{-6} mol/L ICA诱导7 d后, 与诱导0 d组相比, 心肌特异性标志物*cTnI*($P < 0.05$)和*cTnT*($P < 0.05$)的mRNA水平显著升高, ICA诱导组与5azaC诱导组无明显差异。持续诱导14 d后, 各诱导组*hANP*($P < 0.01$)和*cTnT*($P < 0.05$)的mRNA水平与诱导7 d组比较均显著升高($P < 0.05$), 其中*hANP*在各诱导组中无显著性变化, ICA诱导组*cTnT*($P < 0.05$)的mRNA水平则显著低于5azaC诱导组, 而5azaC诱导组中*cTnI*的mRNA水平无显著性变化, 但ICA诱导组中

*cTnI*的mRNA水平则显著升高($P < 0.05$), 与5azaC诱导组有显著性差异。进一步, 免疫荧光结果如图4E所示, MenESC分别经ICA和5azaC诱导4周后均可阳性表达心肌特异性结构蛋白质cTnT, 且二者诱导后的细胞形态相似。但相同诱导时间里及相同曝光条件下, 5azaC能够诱导MenESC更强的表达cTnT, 而ICA诱导cTnT表达的能力较弱, 与上述RT-PCR结果一致。

3 讨论

心脏疾病在全球具有很高的发病率和死亡率, 欧美国家每年约有23万人死于心肌梗死诱发的心脏病, 给患者带来沉重经济负担, 而且严重影响其生活质量^[11]。而近年来干细胞疗法为心脏疾病的治疗带来新的希望, 已有研究报道, 移植到心肌梗死部位的干细胞(来源于胚胎、脐带血、脐带、骨髓以及脂肪等组织)可通过向心肌细胞转化来补充损



A~D: ICA与5azaC诱导MenESC 14 d后, RT-PCR检测*hANP*、*cTnI*和*cTnT* mRNA水平的变化; E: ICA与5azaC诱导MenESC 4周后, 免疫荧光检测cTnT蛋白质水平的变化。

A~D: mRNA levels of *hANP*, *cTnI* and *cTnT* were examined by RT-PCR in MenESC treated by ICA and 5azaC for 14 d; E: protein levels of cTnT was examined by immunofluorescence in MenESC treated by ICA and 5azaC for 4 weeks. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 ICA诱导MenESC心肌特异性标志物的表达变化

Fig.4 Expression of cardiac-specific markers in ICA treated MenESC

失的心肌细胞, 不同程度地改善心脏功能和缩小心肌梗死区域^[1]。尽管干细胞疗法在心肌梗死治疗中的有效性在前期大量基础及临床前研究中已获得验证, 但目前临床实验常用的细胞类型(胚胎干细胞和骨髓间充质干细胞等)所存在的关键问题, 如伦理问题、创伤性的样本收集方法和低增殖能力限制

了该类干细胞的广泛应用^[12-13]。因此, MenESC一经报道, 便凭借其丰富的来源、无创的样本收集方式、较强的增殖活性及多向分化潜能获得了国内外的广泛关注^[2-3]。

淫羊藿苷(ICA)作为我国传统中药淫羊藿的主要活性成分, 以其为主要成分的多种制剂在临床应

用广泛。ICA可通过抗氧化作用及调节内分泌等方式来改善患者心血管系统功能,对心脑血管系统具有良好的保护作用^[14]。已有报道表明,ICA在一定浓度下既可促进BMSC的增殖,同时促使BMSC分泌更多细胞因子。而且与5azaC协同使用时可显著提高BMSC成心肌样细胞分化效率,使诱导后的细胞大量表达心肌修复相关因子,移植入心肌梗死模型动物体内后能有效改善心肌梗死后的心脏功能^[15]。本研究首先明确ICA对MenESC的增殖和迁移活性无显著影响,确保ICA对MenESC诱导的安全性。而MenESC经ICA诱导后,细胞中心肌分化转录因子*MEF-2C*、*Nkx2.5*和*GATA4*的表达均显著升高。进一步MenESC经ICA诱导后,细胞中心肌特异性标志物*hANP*、*cTnI*和*cTnT*的表达均显著升高,并且免疫荧光结果也确认ICA诱导可促进MenESC阳性表达心肌特异性结构蛋白质cTnT。上述结果表明,ICA可有效促进MenESC向心肌样细胞分化,且其较低的毒副作用为广泛的临床使用提供了保障。

对于ICA诱导ESC成心肌分化的潜在机制,国内有课题组早期发现,ICA可通过调节p53信号通路调节小鼠ESC的细胞周期,以此平衡凋亡细胞和成心肌分化细胞比例。随后的研究证实,ICA可通过上调cAMP浓度和cAMP/cGMP比例,并增强内源性一氧化氮(nitric monoxide, NO)的释放来促进ESC的早期成心肌分化。进一步研究则发现,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生及p38MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase)活性在ICA促进小鼠ESC体外成心肌分化过程中发挥着重要作用,并且该促进作用的发生是通过下游转录因子NF- κ B(nuclear factor kappa B)和AP-1(activator protein-1)来调节的^[16-19]。近来,有学者报道,ICA可通过诱导小鼠ESC膜受体-代谢型谷氨酸受体5亚型(metabotropic glutamate receptor subtype 5, mGluR5)二聚化引发Homer-PIKE(phosphatidylinositol 3-kinase enhancer)复合物的形成,进一步激活PI3K信号通路,促进ROS的生产,并通过转录因子NF- κ B来促进小鼠ESC的成心肌分化^[20]。但对于ICA诱导ASC成心肌分化的潜在机制则鲜有报道,目前仅有研究表明,ICA可能通过ERK-MAPK信号通路来促进小鼠脂肪间充质干细胞成心肌分化^[21]。

综上所述,ICA可在不影响MenESC增殖和迁移能力的基础上促进其成心肌样细胞分化,为MenESC在临床上治疗心脏疾病提供新途径,但ICA对于

MenESC的成心肌分化机制则有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Young PP, Schäfer R. Cell-based therapies for cardiac disease: A cellular therapist's perspective. *Transfusion* 2015; 55(2): 441-51.
- 2 Gargett CE, Schwab KE, Deane JA. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* 2016; 22(2): 137-63.
- 3 Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: Isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* 2008; 17(3): 303-11.
- 4 Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: Promise, uncertainties, and challenges. *Euro Heart J* 2011; 32(10): 1197-206.
- 5 Rosen MR, Myerburg RJ, Francis DP, Cole GD, Marbán E. Translating stem cell research to cardiac disease therapies: Pitfalls and prospects for improvement. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64(9): 922-37.
- 6 Ling SK, Wang R, Dai ZQ, Nie JL, Wang HH, Li YH, *et al.* Pretreatment of rat bone marrow mesenchymal stem cells with a combination of hypergravity and 5-azacytidine enhances therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Biotechnol Progr* 2011; 27(2): 473-82.
- 7 Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, De Lavareille A, Vanderheyden M, *et al.* Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium. *Am J Physiol-Heart C* 2007; 292(2): H1095-104.
- 8 Moretti A, Bellin M, Jung CB, Thies TM, Takashima Y, Bernshausen A, *et al.* Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J* 2010; 24(3): 700-11.
- 9 Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distanti V, Pazzagli M, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: Normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309(2): 293-300.
- 10 Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 407-14.
- 11 Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2009 update a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119(3): e21-181.
- 12 Zhang F, Pasumarthi KBS. Embryonic stem cell transplantation. *BioDrugs* 2008; 22(6): 361-74.
- 13 Narita T, Suzuki K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev* 2015; 20(1): 53-68.
- 14 Li C, Li Q, Mei Q, Lu T. Pharmacological effects and

- pharmacokinetic properties of icariin, the major bioactive component in *Herba Epimedii*. *Life Sci* 2015; 126: 57-68.
- 15 王 艳, 王海萍, 吕 洋. 中药制剂诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞的分化. *中国组织工程研究*(Wang Yan, Wang Haiping, Lü Yang. Chinese medicine induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2014; 18(1): 155-160.
- 16 Zhu D, Qu L, Zhang X, Lou Y. Icariin-mediated modulation of cell cycle and p53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells. *Eur J pharmacol* 2005; 514(2): 99-110.
- 17 Zhu DY, Lou YJ. Icariin-mediated expression of cardiac genes and modulation of nitric oxide signaling pathway during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006; 27(3): 311-20.
- 18 Ding L, Liang XG, Hu Y, Zhu DY, Lou YJ. Involvement of p38MAPK and reactive oxygen species in icariin-induced cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro*. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 751-60.
- 19 Wo Y, Zhu D, Yu Y, Lou Y. Involvement of NF- κ B and AP-1 activation in icariin promoted cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur J pharmacol* 2008; 586(1): 59-66.
- 20 Zhou L, Huang Y, Zhang Y, Zhao Q, Zheng B, Lou Y, *et al.* mGluR5 stimulating Homer-PIKE formation initiates icariin induced cardiomyogenesis of mouse embryonic stem cells by activating reactive oxygen species. *Exp Cell Res* 2013; 319(10): 1505-14.
- 21 Jin MS, Shi S, Zhang Y, Yan Y, Sun XD, Liu W, *et al.* Icariin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 2010; 344(1/2): 1-9.