DOI:10.16016/j.2097-0927.202404018

FGF-2 和三七总皂苷诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化

董子晗[1,2],王海萍[1,2],吕 洋[1],刘 洋[1] 075000 河北 张家口,河北北方学院:基础医学院组织学与胚胎学教研室[1],干细胞与生殖生物学实验室[2]

[摘要] **目的** 探究碱性成纤维细胞生长因子(basic fibro-blast growth factor,FGF-2)和三七总皂苷(Panax notoginseng saponins,PNS)单独或联合诱导对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)向心肌细胞(cardiomyocytes,CMs)分化的影响以及 PNS 和 FGF-2 促分化的作用机制。**方法** 全骨髓贴壁法分离 20~30 g 3 周龄 SD 大鼠的骨髓间充质干细胞,通过流式细胞术鉴定骨髓间充质干细胞的纯度。鉴定纯度合格后通过 PNS 和 FGF-2 单独或联合诱导以及 PNS 和 FGF-2 分别与 LY294002(phosphatidylinositol 3 kinase 抑制剂)联用诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化。根据培养的相应时间点,分为对照组、三七总皂苷组(PNS 组)、碱性成纤维细胞生长因子组(FGF-2 组)、三七总皂苷+碱性成纤维细胞生长因子组(PNS+FGF-2 组)。通过免疫组织化学检测诱导后 Desmin 和 Cx43 的表达水平;Western blot 检测心肌特异性蛋白、有关通路蛋白及细胞凋亡有关蛋白的表达水平;采用 RT-qPCR 检测心肌转录因子表达水平。**结果** 各单独诱导组(FGF-2 组、PNS 组)或联合诱导组(PNS+FGF-2 组)均提高心肌特异性蛋白和基因表达水平($P<0.05$),且最高表达水平出现在联合组。PNS 和 FGF-2 分别与 LY294002 联用,相较于两单独诱导组降低了心肌特异性蛋白和基因的表达水平,降低通路相关蛋白 Akt 的磷酸化水平,且 Bcl-2 水平降低,Bax 水平升高,Bcl-2/Bax 比值减小($P<0.05$)。**结论** PNS 和 FGF-2 均可使骨髓间充质干细胞诱导后向心肌细胞定向分化,且二者的联合诱导是一种更高效的诱导方法。PI3K/Akt 信号通路参与了 PNS 和 FGF-2 促进骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的过程,且 PNS 和 FGF-2 起到减少细胞凋亡的作用。

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子;三七总皂苷;骨髓间充质干细胞;心肌细胞;心肌梗死;PI3K/Akt 通路

[中图法分类号] R285.5;R322.11;R329.21 [文献标志码] A

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes with FGF-2 and Panax notoginseng saponins

DONG Zihan[1,2], WANG Haiping[1,2], LYU Yang[1], LIU Yang[1] [1]Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, [2]Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei Province, 075000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of basic fibro-blast growth factor (FGF-2) and Panax notoginseng saponins (PNS) alone or combined together on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into cardiomyocytes (CMs) and the mechanism of action of PNS and FGF-2 in the differentiation. **Methods** BMSCs were isolated from 3-week-old SD rats (20~30 g) by whole bone marrow adherence, and then the purity of BMSCs was identified by flow cytometry. After the purity was qualified, PNS and FGF-2 alone or in combination, or combined with LY294002 (phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor), were used to induce BMSCs to differentiate. According to the corresponding culture time,

[基金项目] 河北自然科学基金资助项目(C2019405091);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2019066)

[通信作者] 王海萍,E-mail:2646077539@qq.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the cells were divided into control group, PNS group, FGF-2 group, and PNS+FGF-2 group. The expression levels of Desmin and Cx43 after induction were detected by immunohistochemical assay. Western blotting was used to measure the expression levels of myocardium-specific proteins, related pathway proteins, and apoptosis-related proteins. RT-qPCR was conducted to detect the expression of myocardial transcription factors. **Results** The expression levels of myocardium-specific proteins and genes were increased in each single induction group (PNS group and FGF-2 group) and combined induction group (PNS+FGF-2 group, $P<0.05$), and the highest expression levels were observed in the combined group. PNS and FGF-2 combined with LY294002 decreased the expression levels of myocardium-specific proteins and genes, decreased the phosphorylation of pathway-related protein Akt, decreased the level of Bcl-2, increased the level of Bax, and decreased the ratio of Bcl-2/Bax when compared with the 2 single induction groups ($P<0.05$). **Conclusion** Both PNS and FGF-2 can induce BMSCs to differentiate into CMs after induction, and the combined induction is more effective in the differentiation. The PI3K/Akt signaling pathway is involved in the differentiation process by PNS and FGF-2, and PNS and FGF-2 play a role in reducing apoptosis.

[**Key words**] basic fibroblast growth factor; Panax notoginseng saponins; bone marrow mesenchymal stem cells; cardiomyocytes; myocardial infarction; PI3K/Akt pathway

Supported by the Project of Natural Science Foundation of Hebei Province (C2019405091) and the Technology Research Project of Institutions of Higher Education in Hebei Province (ZD2019066). Corresponding author: WANG Haiping, E-mail:2646077539@qq.com

随着时代的发展,生活节拍的加快,随之而来的压力和疾病等也在不断增加,尤其是心血管方面的疾病[1]。心血管病的患病率持续攀升,使得心肌梗死(myocardial infarction,MI)逐渐成为全球性的重大健康挑战。心肌梗死是心血管疾病发病最多的疾病之一,心肌梗死发生后,心脏细胞的丧失会严重影响心脏的功能,鉴于心肌梗死后坏死的心肌细胞存活能力极为有限,探索高效的心肌恢复方法显得格外关键。骨髓间充质干细胞在组织工程学中被列为种子细胞之一[2],精准导向骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化,可以发挥骨髓间充质干细胞的生物功能作用[3]。预处理骨髓间充质干细胞后,通过移植心肌梗死区域来治疗心肌梗死成为了新型治疗方式[4],研究显示,对骨髓间充质干细胞进行移植前的预处理,不论是应用生长因子还是传统中医药,都可以有效地促使骨髓间充质干细胞转化为心肌细胞[5],减少细胞凋亡[6-7],且联合中药处理后的效果更加明显。

FGF-2 和 PNS 都是重要的心肌保护性成分之一[8-10]。FGF-2 是一种在心肌收缩过程中分泌的血管生长因子,心脏成纤维细胞是其丰沛的来源,与心肌细胞紧密关联。这些细胞群体因心肌收缩而被牵引,从而将 FGF-2 释放到细胞外基质,使得 FGF-2 在心脏及其他各类器官的发育和疾病过程中扮演着重要的角色。在传统的中医实践中,三七常被用以治疗血液循环问题。近期研究揭示,三七中的三七总皂苷成分展现了包括促进细胞分化、抗炎作用以及抗氧化能力在内的多重生物活性。三七总皂苷能够刺激人骨髓中某些祖细胞增殖和分化,其作用机制包括在造血微环境中诱导成纤维细胞和淋巴细胞等产生调控因子和高活性的协同生长因子。三七总皂苷在诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化过程中,其作用可能与抗氧化功能和分泌相关诱导因子有关。CD29、CD90 和 CD45 是心肌细胞分化的前期条件,用来鉴定骨髓间充质干细胞的纯度。在骨髓间充质干细胞加药诱导为心肌细胞前,流式细胞术鉴定骨髓间充质干细胞表面标志物 CD29、CD90 和 CD45,以此判断提取的细胞是否为纯化的骨髓间充质干细胞,才可进行后续骨髓间充质干细胞加药诱导心肌细胞实验。GATA 家族有 6 个成员,其中 GATA4、GATA5、GATA6 主要表达在心血管中,而 GATA4 在心脏细胞生长发育的所有阶段均有所表达。Mef-2c 作为高度保守的 MEF2 转录因子家族的成员之一,它在心血管发育中起到了不可或缺的关键调节作用。Mef-2c 在心脏形态形成中同样发挥着重要的作用,属于早期转录因子。GATA4 和 Mef-2c 在分化过程中的表达表明骨髓间充质干细胞正进入心肌分化的初期阶段,并逐渐朝着成熟心肌细胞的方向发育。PI3K/Akt 通路在调节众多病理和生理活动中扮演关键角色,包括细胞分化、增殖、代谢以及存活等方面。PNS 与 FGF-2 均作为 PI3K/Akt 路径的上游刺激元素对其有显著影响。PI3K/Akt 通路调控多种生物活性及功能,已被证实是心血管疾病的关键机制之一。目前很多研究探索 PNS 和 FGF-2 在促进骨髓间充质干细胞增殖及抗凋亡等过程中的影响[11-13],而 PI3K/Akt 通路在 PNS 和 FGF-2 促进骨髓间充质干细胞向心

肌细胞分化及抗凋亡中的作用尚不明确。

因此,本研究采取 PNS 与 FGF-2 对骨髓间充质干细胞进行前处理,随后通过观察细胞形态学变化、蛋白质及基因的表达差异,来分析这些处理对骨髓间充质干细胞向心肌细胞转化效率的促进作用。此外,本研究还在各自独立的处理组中添加了 LY294002,以评估其对特定蛋白表达的影响,并进一步探讨 PNS 和 FGF-2 在促进骨髓间充质干细胞分化以及抗凋亡功能方面的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

健康 SPF 级实验动物 20~30 g 的 SD 大鼠 12 只,3 周龄,雌雄不限,由中国食品药品检定研究院提供[SCXK(京)2019-0008]。PNS 购自大连美伦生物技术有限公司,FGF-2 购自美国 Peprotech 公司;LY294002 购自美国 Cayman 公司;IMDM 培养基购自美国 Corning 公司;胎牛血清购自 VivaCell 公司;胰酶购自 VivaCell 公司;Cx43 抗体购自美国 BD 公司;Desmin 抗体、Akt 抗体和 p-AKT 抗体均购自中国华安生物技术有限公司;PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司;普通光学显微镜购自日本 Olympus 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的提取 剥离大鼠的上肢与下肢骨,完全培养基提前配好备用,反复冲洗骨髓腔,收集细胞,接种于一次性培养瓶,37 ℃,5% CO_2 恒温培养箱培养。2 d 后镜下观察细胞贴壁情况,更换培养基,直到流式细胞鉴定得到纯化的骨髓间充质干细胞,以进行后续实验。

1.2.2 流式鉴定表面抗原 CD29、CD90、CD45 正常培养第 3 代单细胞进行消化并吹打成细胞悬液,统一收集的第 3 代单细胞悬液离心弃上清重悬,加入 CD90-PE-CyTM7、CD29-PE、CD45-FITC 及对应的同行对照抗体,设置空白对照加等量的 PBS,吹打后混匀,在暗处孵化 30 min 后进行离心处理,随后彻底清洗抗体并重新悬浮以确保均匀,借助流式细胞分析技术评估细胞表面标志物的表达水平。

1.2.3 骨髓间充质干细胞的诱导分化及后续培养 将第 3 代来源于大鼠的骨髓间充质干细胞加入现用现配的完全培养基 5 mL,CO_2 恒温培养箱继续培养 2 d,直到这些细胞的融合率达到 75%~85%,分为对照组、三七总皂苷组(PNS 组)、碱性成纤维细胞生长因子组(FGF-2 组)、三七总皂苷+碱性成纤维细胞生长因子组(PNS+FGF-2 组)、三七总皂苷+LY294002 组(PNS+LY294002 组)和 LY294002+碱性成纤维细胞生长因子组(FGF-2+LY294002 组)。进行 3 d 加入诱导剂药物后在 CO_2 恒温培养箱培养诱导至心肌细胞,去除药物诱导剂后,延续 4 周的细胞培养。期间通过显微镜监测细胞形态的演变,并进行摄影记录。

1.2.4 免疫组化染色 在移除药物诱导因子后,各实验组继续进行 4 周的培养,接种于 6 孔板圆形爬片上,待细胞密度最佳时,预冷的磷酸盐缓冲液浸洗 3 遍,依次进行多聚甲醛固定、3%Triton 通透、Desmin 和 Cx43 一抗(均以 1∶100 稀释)4 ℃冰箱过夜。次日室温复温 20 min 加二抗稀释液反应 20 min,显色复染、分化、脱水,芳族烃混合物透明细胞,封片,镜下拍照保存。

1.2.5 Westerm blot 检测 在移除药物诱导因子后,各实验组继续进行 4 周的培养,细胞刮勺刮取瓶底细胞,加入提早预冷的 200 μL 细胞裂解液处理 6 个细胞样本,以提取总蛋白,并通过 BCA 法进行定量分析。接着样品煮沸以实现蛋白质的变性,随后进行电泳、转膜,并使用脱脂奶粉进行封闭处理。依据预实验,本研究配制了以下一抗:Desmin(稀释比例为 1∶5 000)、Cx43(1∶500)、Akt(1∶1 000)、p-Akt(1∶1 000)、Bcl-2(1∶1 000)和 Bax(1∶1 000),并在 4 ℃下孵育过夜。次日将膜与相应的二抗孵育,分别是羊抗人和羊抗鼠抗体(稀释比例均为 1∶10 000),在摇床上孵育 1 h。显影后使用 PS 软件调整图片方向,Image J 软件进行灰度值分析处理。

1.2.6 RT-qPCR 法检测基因表达水平 诱导 48 h 后更换成普通培养基继续培养,提取 1、2 和 4 周细胞的总 RNA,根据试剂盒进行逆转录 cDNA 的合成,根据试剂盒进行 RT-qPCR 检测。GAPDH 上游引物序列:5′-GAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3′,下游引物序列:5′-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3′;GATA4 上游引物序列:5′-AGACCACAATGCACCTTCGG-3′,下游引物序列:5′-GAACAATGTCGGGTGTGCTC-3′;Mef2c 上游引物序列:5′-AGACCACAATGCACCTTCGG-3′,下游引物序列:5′-GAACAATGTCGGGTGTGCTC-3′。反应条件为 95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,45 个循环,对所得 Ct 值进行分析,合成各基因引物序列。

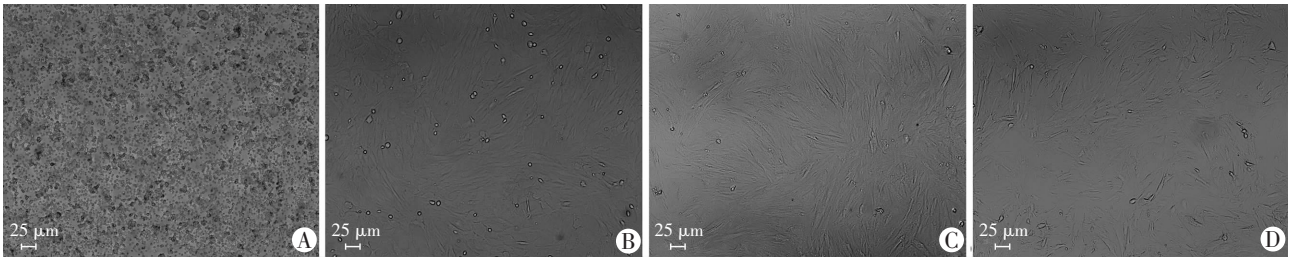
1.3 统计学分析

使用 SPSS 24.0 进行数据统计分析,符合正态分布的数据,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

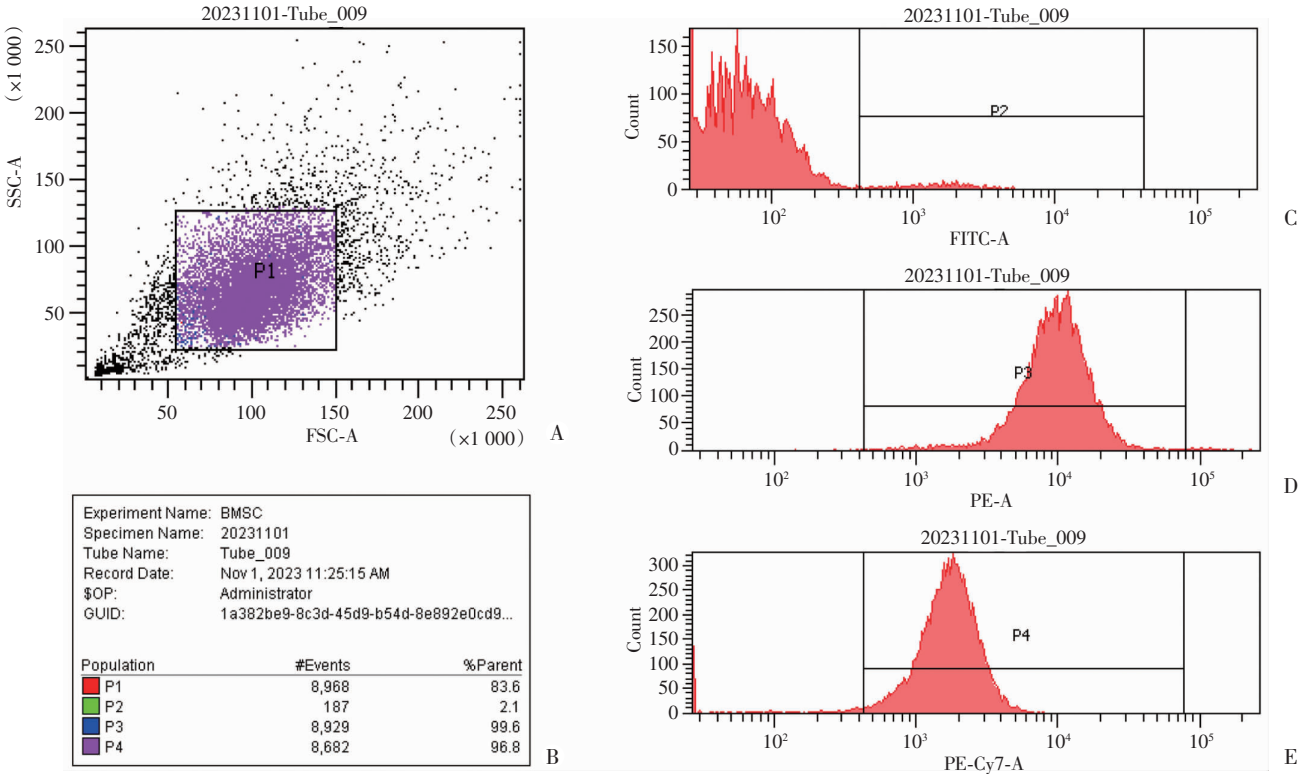
2.1　骨髓间充质干细胞形态学及纯度

在显微镜下初步观察时,原代单核细胞正处于悬浮的状态。6~8 h 开始贴壁,12 h 后即可见细胞进行贴壁生长,直至 48 h 进行首次换液,换走未贴壁细胞。4 d 时细胞体积偏小,形态不一,呈近似圆形或梭形,此时有的细胞近似纤维细胞外观。继续培养细胞至 7 d,细胞持续展现出梭形或扁平的形态。在培养的第 10~14 天,细胞覆盖了整个培养瓶底部,此时细胞的融合集落数量增加,适合进行下一代的培养。当培养至第 6 代时,观察到细胞彼此之间的接触变得更加紧密,其形态呈现一致性,以梭形、漩涡状或平行方向增长。经过 4 周的单一药物诱导后,与对照组相比,这些细胞的形态学变化并不显著。然而,在 PNS 和 FGF-2 共同诱导的实验组中,细胞排列显得尤为密集,见图 1。通过连续的传代,成功纯化了骨髓间充质干细胞。在将细胞传代至第 3 代时,利用流式细胞术对细胞的纯度进行评估,并对其表面抗原 CD29、CD90 和 CD45 的阳性表达率进行鉴定,分别达到了 96.8%、99.6% 和 2.1%,见图 2。这些发现证实本研究方法所提取的骨髓间充质干细胞纯度足以用于药物诱导实验。



A:第 0 天提取的细胞悬浮液;B:BMSCs 第 3 天增长形态呈球形、多边形或纺锤形;C:BMSCs 培养 1 周;D:药物诱导细胞 28 d 时,细胞排列紧密,细胞形状趋于一致,呈平行方向排列,与心肌细胞的形态相似

图 1　倒置显微镜下观察 BMSCs 在不同时期的形态特征



A:细胞采集;B:数据统计;C:表面抗原 CD45-FITC 阳性表达率;D:表面抗原 CD29-PE 阳性表达率;E:表面抗原 CD90-PE-CyTM7 阳性表达率

图 2　流式细胞仪检测 BMSCs 的 CD90、D29 和 CD45 阳性率

2.2　PNS 和 FGF-2 对骨髓间充质干细胞分化的促进作用

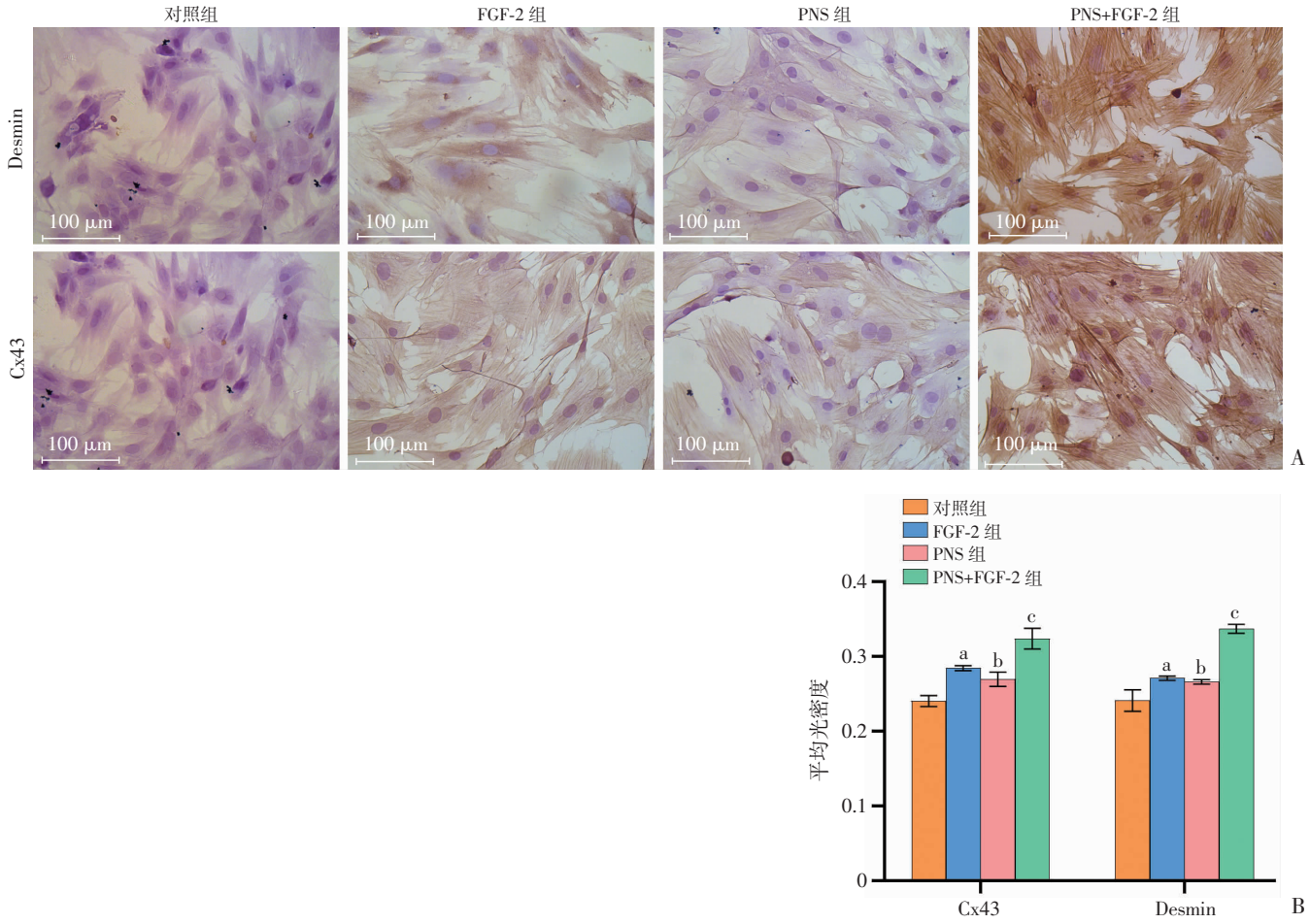
PNS 和 FGF-2 均促进了 Desmin 与 Cx43 蛋白的表达水平提升,通过免疫细胞化学的方法来检测 Desmin 与 Cx43 的存在(图 3);Western blot 检测心肌样细胞 Desmin 和 Cx43 的蛋白表达,结果如图 4 所示。相较于对照组,各诱导组 Desmin、Cx43 的表达量均显著增加,其中 PNS 与 FGF-2 联合组的表达量最高($P<0.05$,$P<0.01$)。

2.3　骨髓间充质干细胞 GATA4 和 Mef-2c 的表达升高

采用 RT-qPCR 技术,对心肌细胞特有的基因 GATA4 及 Mef-2c 的活性进行测量。研究发现,与未处理的对照组相比,FGF-2 组在 1 周和 PNS 组在 2 周时 GATA4 有表达,在共同处理组中,GATA4 的活性显著提升,特别是随着诱导周期的延伸,这一活性在与单独处理组相比时更加明显,并在第 4 周观察达到最高水平($P<0.01$,图 5A)。与对照组相比,PNS 处理组在第 2 周显示出 Mef-2c 的显著活性增加,而 FGF-2 处理组在第 1 周对比对照组也展现出了明显的活性提升,但之后活性呈现下降趋势。在联合处理组中,Mef-2c 的活性随诱导周期的增长而逐步增加,并在第 2 周达到顶峰,尽管之后有所下降,但到第 4 周时 Mef-2c 的活性仍然明显($P<0.01$,图 5B)。

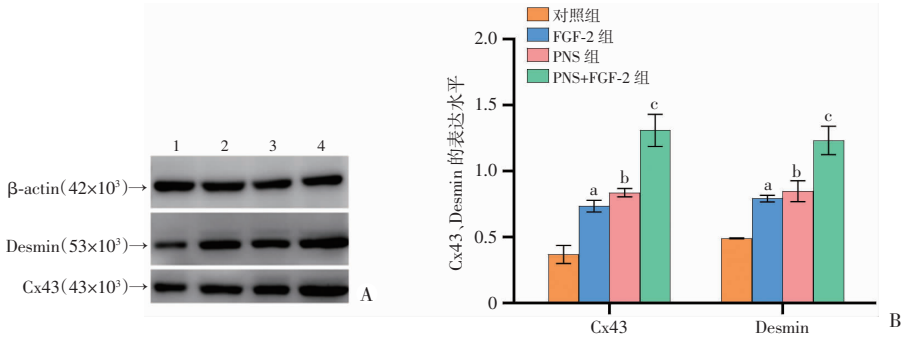
2.4　PNS、FGF-2 通过 PI3K/Akt 信号通路对骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的影响

当 PNS 和 FGF-2 作为独立的诱导因子使用时,本研究添加了抑制剂 LY294002,并通过 Western blot 方法探讨它们在促进骨髓间充质干细胞分化过程中的潜在作用机制。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,单一药物处理组中 Desmin、Cx43 和 Bcl-2 的表达水平显著提升,p-Akt 的活性增强,而 Bax 的表达量有所下降。引入抑制剂 LY294002 后,Desmin 和 Cx43 的表达水平显著降低。加入抑制剂 LY294002 后明显降低了 Desmin、Cx43、p-Akt、Bcl-2 的表达水平,Bax 表达水平升高($P<0.01$,$P<0.05$,图 6)。



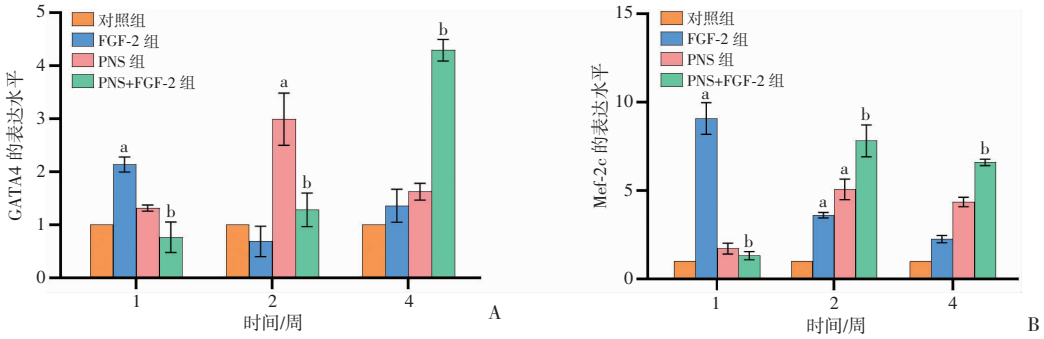
A:免疫组化检测 Desmin、Cx43 的表达水平;B:平均光密度;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与 FGF-2 组和 PNS 组比较

图 3　BMSCs 加药诱导后 4 周细胞的 Desmin 及 Cx43 表达的免疫细胞化学检测



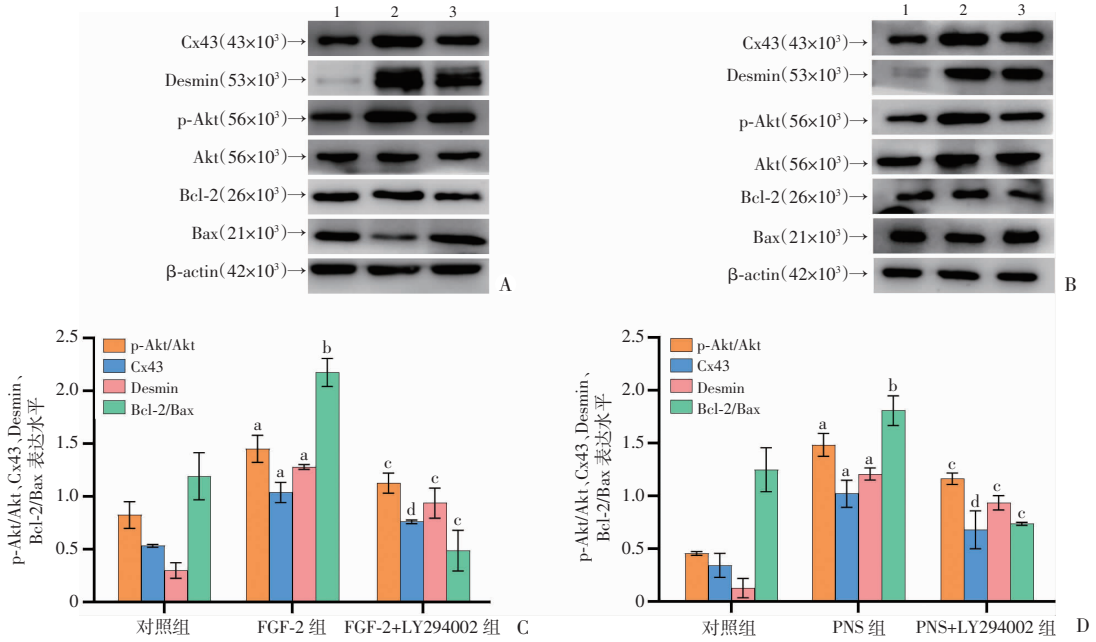
A:BMSCs 加药诱导分化 4 周后细胞 Desmin、Cx43 的 Western blot 结果　1:对照组;2:FGF-2 组;3:PNS 组;4:PNS+FGF-2 组;B:蛋白质表达水平的定量分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,与 FGF-2 组和 PNS 组比较

图 4　Western blot 检测 BMSCs 加药诱导后 4 周细胞 Desmin 和 Cx43 的表达水平



A:GATA4 的表达水平;B:Mef-2c 的表达水平;a:$P<0.01$,与对照组比较; b:$P<0.01$,与 FGF-2 组和 PNS 组比较

图 5　RT-qPCR 检测 BMSCs 加药诱导后第 1、2 和 4 周细胞 GATA4 和 Mef-2c 基因表达水平



A、C:FGF2 与 FGF-2+LY294002 诱导分化 4 周时 Desmin、Cx43、p-Akt、Akt、Bcl-2 和 Bax 的 Western blot 结果及蛋白质表达水平的定量分析;1:对照组;2:FGF-2 组;3:FGF-2+LY294002 组;a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与对照组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 FGF-2 组比较;B、D:PNS 与 PNS+LY294002 诱导分化 4 周时 Desmin、Cx43、p-Akt、Akt、Bcl-2 和 Bax 的 Western blot 结果及蛋白质表达水平的定量分析;1:对照组;2:PNS 组;3:PNS+ LY294002 组;a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与对照组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 PNS 组比较

图 6　Western blot 检测 BMSCs 加药诱导后 4 周细胞 Cx43、Desmin、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax 的表达水平

3 讨论

很多研究表明,BMSCs[14-15]的移植治疗对改善心功能有重要意义,且安全可行[16-17]。凭借其向多种细胞类型分化的能力及低免疫原性,成为治疗 MI 的一种潜在细胞疗法,但其移植后存活率不高影响治疗效果[18]。尽管如此,激发 BMSCs 转化为心肌细胞的高效机制依旧是研究领域的焦点。作为一种普遍的心血管病,MI 是由心脏供血不足引起的细胞死亡。MI 后续引发的心肌细胞减少及心功能衰退,成为需要紧急解决的临床问题。尽管临床上现有技术可以治疗心肌梗死,但均有不足之处。因此,发展一种高效的心肌修复技术,对于改善 MI 患者的预后至关重要,找寻更高效移植细胞在梗死区域后存活是关键问题。王秀力等[19-21]研究结果可知,细胞培养的上清液中细胞生长因子对 BMSCs 的诱导分化过程起重要作用。李志泉等[5, 22-24]用中药 PNS 进行了心肌细胞的诱导分化,PNS 可调控 CX43 蛋白表达水平保护大鼠受损心肌,且对 BMSCs 的凋亡有保护作用[25-26]。以上提示 PNS 和 FGF-2 作为诱导剂的安全性和可操作性。

检测 PNS、FGF-2 单独、联合预处理对 BMSCs 向 CMs 分化的相关心肌标志物。Cx43 是成熟心肌的标志物,Cx43 的正常分布与表达以保证心肌细胞正常的电传导[27],Cx43 可在缺血后对心脏提供保护[28-29]。Desmin 是心肌中最丰富的蛋白质之一,Desmin 参与建立中枢神经系统框架[30]。Desmin 能够促进细胞外和核基质之间的机械化学信号转导和转运过程,其失调会导致心脏疾病[31]。实验结果可知,单独及联合加药组均可提高 Desmin 和 Cx43 表达,但联合组的表达量最高,这表明 BMSCs 经过诱导处理后,各诱导组的心肌样细胞展现出了 CMs 特有的表型,两种诱导剂的联合处理组促进效果更加显著。RT-qPCR 检测早期心肌标志物,结果显示各个加药组均有早期心肌标志物的表达,检测 BMSCs 进入心肌分化早期阶段的标志物 GATA4 和 Mef-2c,结果表明各诱导组 GATA4 和 Mef-2c 均有表达,说明加药诱导的 BMSCs 不断向 CMs 分化。PI3K/Akt 信号通路的作用途径很丰富,PNS 和 FGF-2 两者都是该信号通路的激活剂[32]。Bcl-2 与 Bax 共属于一个家族,通过控制线粒体膜的通透性来调节凋亡激活物。线粒体细胞色素 C 的释放是通过通透性转变气孔,而 Bcl-2 家族蛋白直接调节通透性转变气孔。抗凋亡蛋白 Bcl-2 能够保存膜电位,阻断细胞色素 C 的释放。而 Bax 是前凋亡蛋白,通过影响通透性转变气孔而消除了线粒体的膜电位,促进细胞色素 C 的释放,从而促进细胞凋亡。因此,本研究引入了针对 PI3K 的抑制剂 LY294002,以初步研究 PNS 与 FGF-2 对 BMSCs 定向分化的独立影响是否参与该途径,且 PNS 和 FGF-2 在该途径中对细胞凋亡的作用。蛋白质印迹结果表明通路被抑制后明显降低了 PNS、FGF-2 对 Desmin 和 Cx43 的表达和 p-Akt 的表达水平,说明 PNS、FGF-2 可有效激活该途径,且分别加入抑制剂后也有效调控该途径发挥相关作用。相较于抑制剂组,PNS 组、FGF-2 组 Bax 的表达量明显降低,Bcl-2 的表达量升高。以上实验结果显示,PNS、FGF-2 促使 BMSCs 向 CMs 分化过程有 PI3K/Akt 信号通路的参与,且对细胞凋亡有作用。

综上所述,本研究表明 BMSCs 经过 PNS、FGF-2 的诱导能有效促进 BMSCs 向 CMs 的定向分化,且两者联用处理更加高效。表明两者在分化过程中,该途径 PI3K/Akt 参与并促进了 BMSCs 向 CMs 的分化,且两者在该途径中对细胞起到减少凋亡的作用,为未来的移植提供了进一步的思路。

参考文献:

[1] SCHIRONE L, FORTE M, D'AMBROSIO L, *et al*. An overview of the molecular mechanisms associated with myocardial ischemic injury: state of the art and translational perspectives[J]. Cells, 2022, 11(7): 1165. DOI: 10.3390/cells11071165.

[2] 杨春丽, 陆金芝, 刘贝贝, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的原代培养及鉴定[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(18): 3425-3430. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2023.18.004.
YANG C L, LU J Z, LIU B B, *et al*. Primary culture and identification of bone marrow mesenchymal stem cells from rat[J]. Prog Mod Biomed, 2023, 23(18): 3425-3430. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.18.004.

[3] HICKS M R, PYLE A D. The emergence of the stem cell niche[J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(2): 112-123. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.003.

[4] YAMADA Y, MINATOGUCHI S, KANAMORI H, *et al*. Stem cell therapy for acute myocardial infarction-focusing on the comparison between Muse cells and mesenchymal stem cells[J]. J Cardiol, 2022, 80(1): 80-87. DOI: 10.1016/j.jjcc.2021.10.030.

[5] 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[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(1): 155-160. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.01.026.
WANG Y, WANG H P, LYU Y. Chinese medicine induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2014, 18(1): 155-160. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2014.01.026.

[6] 赖颖蓉, 赵倩琳, 姜丽红. 基于 Bcl-2/Bax/Caspase-3 信号通路探究参红通络方对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞凋

亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(11): 104-110. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240211.
LAI Y R, ZHAO Q L, JIANG L H. Effect of modified Shenhong Tongluo prescription on cell apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury by Bcl-2/Bax/Caspase-3 signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(11): 104-110. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20240211.

[7] 何美云, 荣卓, 赵若楠, 等. 中药活性成分防治缺血性心脏病作用机制研究进展[J]. 安徽医药, 2024, 28(1): 5-10. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.002.
HE M Y, RONG Z, ZHAO R N, *et al*. Research progress on the mechanism of active ingredients of traditional Chinese medicine in preventing ischemic heart disease[J]. Anhui Med Pharm J, 2024, 28(1): 5-10. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.002.

[8] ALVI S B, AHMED S, SRIDHARAN D, *et al*. *De novo* drug delivery modalities for treating damaged hearts: current challenges and emerging solutions[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 742315. DOI: 10.3389/fcvm.2021.742315.

[9] 石春龙, 杨力强, 农复香, 等. 中医药调控间充质干细胞治疗心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(6): 206-211. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2024.06.054.
SHI C L, YANG L Q, NONG F X, *et al*. Research progress on regulation of mesenchymal stem cells by traditional Chinese medicine in treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2024, 51(6): 206-211. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2024.06.054.

[10] 方灿, 崔胜宇, 刘小熊, 等. 碱性成纤维细胞生长因子在心血管疾病中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022,24(2):213-215. DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2022.02.027.
FANG C, CUI S Y, LIU X X, *et al*. Research progress of basic fibroblast growth factor in cardiovascular diseases[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2022, 24(2): 213-215. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2022.02.027.

[11] ZHANG F, WU J, LI X X, *et al*. Angiopoietin-like protein 4 treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviate myocardial injury of patients with myocardial infarction[J]. Nurs Health Sci, 2022, 24(1): 312-321. DOI: 10.1111/nhs.12927.

[12] GUO D Q, YU M, GUO H Z, *et al*. *Panax notoginseng* saponins inhibits oxidative stress-induced human nucleus pulposus cell apoptosis and delays disc degeneration *in vivo* and *in vitro*[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117166. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117166.

[13] ZHENG Y C, CHEN X S, LAN T, *et al*. *Panax notoginseng* saponin reduces *IL-1β*-stimulated apoptosis and endoplasmic reticulum stress of nucleus pulposus cells by suppressing *miR-222-3p*[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(13): 748. DOI: 10.21037/atm-22-3203.

[14] 鲁燕妮, 龙雯, 常晓峰, 等. 改良全骨髓贴壁法分离及培养大鼠骨髓间充质干细胞[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(3): 364-369. DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2023.03.013.
LU Y N, LONG W, CHANG X F, *et al*. Isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells by modified whole bone marrow adherent method[J]. J Shanxi Med Univ, 2023, 54(3): 364-369. DOI: 10.13753/j.issn.1007-6611.2023.03.013.

[15] 廖新爱, 蔡丹妮, 游若兰, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞分离方法的比较与探讨[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 1-9. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.001.
LIAO X A, CAI D N, YOU R L, *et al*. Comparison and discussion of methods for isolating mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(1): 1-9. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.001.

[16] 孙维兴, 赵永超, 赵然尊. 间充质干细胞移植治疗心肌梗死:问题、症结及新突破[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(19): 3103-3109.
SUN W X, ZHAO Y C, ZHAO R Z. Mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of myocardial infarction: problems, crux and new breakthrough[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(19): 3103-3109.

[17] 王治坤, 白少玄, 赵伟, 等. 运动预处理联合骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠心肌梗死[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(1): 65-73.
WANG Z K, BAI S X, ZHAO W, *et al*. Exercise preconditioning combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for myocardial infarction in rats[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(1): 65-73.

[18] 韩敦正, 覃小洲, 潘秀娣, 等. 凋亡诱导因子基因敲减对骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25): 3967-3973. DOI: 10.12307/2024.197.
HAN D Z, QIN X Z, PAN X D, *et al*. Effect of apoptosis-inducing factor gene knockdown on bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for myocardial infarction[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(25): 3967-3973. DOI: 10.12307/2024.197.

[19] 赵亚如, 刘洋, 吕洋, 等. 丁酸钠协同成纤维细胞生长因子2体外诱导骨髓间充质干细胞向心肌细胞分化的研究[J]. 中国医药导报, 2021, 18(27): 21-25, 197.
ZHAO Y R, LIU Y, LYU Y, *et al*. Study of sodium butyrate combined with fibroblast growth factor 2 on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes[J]. China Med Her, 2021, 18(27): 21-

25, 197.

[20] 王秀力, 王洁, 宫海滨. 心肌微环境对诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的影响[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2437-2440, 2410, 2433. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.12.050.
WANG X L, WANG J, GONG H B. Effects of myocardial microenvironment on BMSCs differentiating into cardiomyocyte-like cells[J]. Prog Mod Biomed, 2008, 8(12): 2437-2440, 2410, 2433. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.12.050.

[21] 李春梅, 王秀力, 朱海亮, 等. 心肌细胞培养上清诱导骨髓间充质干细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(36): 6417-6422. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2013.36.006.
LI C M, WANG X L, ZHU H L, *et al*. Supernatant of myocardiocyte induces differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2013, 17(36): 6417-6422. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2013.36.006.

[22] 张宝霞, 张金生, 张阳阳, 等. 三七总皂苷、红景天苷、黄芪有效组分对心肌梗死大鼠模型骨髓间充质干细胞动员作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 137-142. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080137.
ZHANG B X, ZHANG J S, ZHANG Y Y, *et al*. Effect of notoginseng *Radix* et rhizoma saponins, salidroside and effective components of astragali *Radix* in mobilizing bone marrow mesenchymal stem cells in rat myocardial infarction model[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(8): 137-142. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080137.

[23] 李花, 邓常青, 熊艾君, 等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后脑内 NGF 和 bFGF 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2): 219-221, 409. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.02.027.
LI H, DENG C Q, XIONG A J, *et al*. Effect of *Panax notoginseng* saponins on expressions of NGF and bFGF after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Prog Mod Biomed, 2008, 8(2): 219-221, 409. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2008.02.027.

[24] 李志泉, 冼绍祥, 汪朝晖, 等. 三七总皂苷对骨髓间充质干细胞增殖和向心肌样细胞分化的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(6): 470-475. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3213.2007.06.009.
LI Z Q, XIAN S X, WANG C H, *et al*. Effect of *Panax notoginseng* saponins on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into cardiomyogenic cells[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2007, 24(6): 470-475. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3213.2007.06.009.

[25] 肖钰雪, 刘宏岩, 史晓梅, 等. 三七总皂苷对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌 ZO-1、Occludin、Cx43 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 239-243, 260. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2023.03.053.
XIAO Y X, LIU H Y, SHI X M, *et al*. Effects of *Panax notoginseng* saponins on myocardial ZO-1, occludin and Cx43 in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 42(3): 239-243, 260. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2023.03.053.

[26] 王俊, 陈思思, 吴雪莉, 等. 三七总皂苷对 H_2O_2 诱导 BMSCs 凋亡的保护作用及机制研究[J]. 新中医, 2021, 53(19): 1-6. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2021.19.001.
WANG J, CHEN S S, WU X L, *et al*. Study on protective effect and mechanism of total *Panax* notoginseng saponins on apoptosis of BMSCs induced by H_2O_2[J]. J New Chin Med, 2021, 53(19): 1-6. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2021.19.001.

[27] 庞勇, 王于蓝, 高勤. 缝隙连接蛋白 43 在舒芬太尼预处理减轻大鼠离体心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(20): 5068-5072. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2021.19.001.
PANG Y, WANG Y L, GAO Q. Role of connexin 43 in sufentanil preconditioning to alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated rats[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(20): 5068-5072. DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2021.19.001.

[28] YI J, DUAN H W, CHEN K Y, *et al*. Cardiac electrophysiological changes and downregulated connexin 43 prompts reperfusion arrhythmias induced by hypothermic ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2022, 15(6): 1464-1473. DOI: 10.1007/s12265-022-10256-7.

[29] WANG L N, LI Q, DIAO J Y, *et al*. MiR-23a is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury by directly targeting CX43 and regulating mitophagy[J]. Inflammation, 2021, 44(4): 1581-1591. DOI: 10.1007/s10753-021-01443-w.

[30] SINGH S R, KADIOGLU H, PATEL K, *et al*. Is desmin propensity to aggregate part of its protective function?[J]. Cells, 2020, 9(2): 491. DOI: 10.3390/cells9020491.

[31] KUPRYTE M, LESAUSKAITE V, KETURAKIS V, *et al*. Remodeling of cardiomyocytes: study of morphological cellular changes preceding symptomatic ischemic heart failure[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14557. DOI: 10.3390/ijms241914557.

[32] LIU M H, LI G H, PENG L J, *et al*. PI3K/Akt/FoxO3a signaling mediates cardioprotection of FGF-2 against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cells[J]. Mol Cell Biochem, 2016, 414(1/2): 57-66. DOI: 10.1007/s11010-016-2658-5.

(**收稿**:2024-04-03;**修回**:2024-07-12)

(编辑 邓强庭)