

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.40.002

[http://www.crter.org]

焦淑贤, 胡彬, 赵林, 刘晓华, 冯智慧.  $Ca^{2+}$ 参与骨髓间充质干细胞存活增殖及向肝细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(40):7028-7033.

## $Ca^{2+}$ 参与骨髓间充质干细胞存活增殖及向肝细胞的诱导分化

焦淑贤, 胡彬, 赵林, 刘晓华, 冯智慧(青岛市中心血站输血医学研究所, 山东省青岛市 266071)

### 文章亮点:

1 实验结果显示肝细胞生长因子诱导后的骨髓间充质干细胞 AAT 表达阳性细胞较多, 提示肝细胞生长因子成功诱导了骨髓间充质干细胞向肝样细胞转化。

2 Flou-3/AM是一种新型的、无细胞毒性的、胞膜通透性、可激发出可见光的敏感性钙指示剂, 实验采用荧光探针fluo3/AM标记细胞内游离 $Ca^{2+}$ , 结果提示 $[Ca^{2+}]_i$ 参与了肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝样细胞的定向分化过程。

3 尼莫地平是作用广泛的特异性 $Ca^{2+}$ 通道阻断剂。实验利用不同浓度的尼莫地平对诱导分化中的骨髓间充质干细胞进行干预, 结果表明加入尼莫地平干预后, 诱导形成的肝样分化细胞明显减少。提示阻断 $Ca^{2+}$ 不仅阻断了骨髓间充质干细胞向肝细胞定向分化过程, 也影响了骨髓间充质干细胞正常代谢过程。

### 关键词:

干细胞; 骨髓间充质干细胞; 骨髓间充质干细胞;  $Ca^{2+}$ ; 肝细胞生长因子; 细胞因子; 细胞分化; ERK; 干细胞图片文章

### 主题词:

干细胞; 间质干细胞; 肝细胞生长因子; 细胞分化

### 基金资助:

青岛市科技发展计划(09-1-1-25-nsh)\*, 课题名称: 骨髓基质干细胞对失代偿性病毒性肝炎修复的中长期影响

### 摘要

**背景:** 骨髓间充质干细胞增殖和分化中的具体机制仍不清楚,  $Ca^{2+}$ 信号、骨髓间充质干细胞增殖与分化信号如何协调和交叉成复杂信号网络等问题仍有待研究阐明。

**目的:** 探讨细胞内 $Ca^{2+}$ 在骨髓间充质干细胞向肝细胞定向诱导分化过程中的作用。

**方法:** 用全骨髓贴壁法从大鼠骨髓中分离骨髓间充质干细胞后进行纯化和扩增, 并加入肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化, 应用流式细胞技术分别检测肝细胞生长因子诱导分化骨髓间充质干细胞和对照骨髓间充质干细胞内游离 $[Ca^{2+}]_i$ 。将不同浓度的尼莫地平加入肝细胞生长因子诱导的骨髓间充质干细胞(肝细胞生长因子组)培养液中进行干预后分为 3 组: 肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平 50 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平 100 mg/L组, 在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况并用免疫细胞化学法检测AAT的表达; 并用RT-PCR检测对照组和尼莫地平干预组钙调蛋白mRNA的表达, 免疫印迹法检测上述各组磷酸化ERK的表达。

**结果与结论:** ①加入肝细胞生长因子诱导分化的骨髓间充质干细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 显著高于对照组( $P < 0.05$ )。②加入较大剂量的尼莫地平干预后, 未见分化细胞且骨髓间充质干细胞的生长状态差; 肝细胞生长因子+尼莫地平各组表达AAT的阳性细胞很少。③与对照组比较, 肝细胞生长因子组和肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L组钙调蛋白mRNA表达显著增加了( $P < 0.05$ ), 肝细胞生长因子+尼莫地平 50 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平 100 mg/L组与对照组比较组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。说明 $Ca^{2+}$ 不仅参与细胞因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的定向分化, 而且也参与维持骨髓间充质干细胞的存活和增殖。

## Intracellular $Ca^{2+}$ is involved in survival, proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes

Jiao Shu-xian, Hu Bin, Zhao Lin, Liu Xiao-hua, Feng Zhi-hui (Institute of Transfusion Medicine, Qingdao Blood Center, Qingdao 266071, Shandong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The mechanism of differentiation and proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells remains unclear. In addition, issues such as how signal pathways such as  $Ca^{2+}$  and bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation signals form complex signal network remain poorly understood.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of  $Ca^{2+}$  in the induced differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes.

**METHODS:** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells were isolated from rat bone marrow using whole bone marrow adherence method, purified, amplified, and induced with hepatocyte growth factor.  $[Ca^{2+}]_i$  in the

焦淑贤, 女, 1970年生, 山东省青岛市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事输血和造血干细胞移植的研究。  
qd\_hla@163.com

并列第一作者: 胡彬, 女, 1973年生, 山东省青岛市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事输血和造血干细胞移植的研究。

通讯作者: 冯智慧, 硕士, 主治医师, 青岛市中心血站输血医学研究所, 山东省青岛市 266071  
zhaolinqd@163.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)40-07028-06

收稿日期: 2013-01-09

修回日期: 2013-02-26

(20121109007/W · A)

Jiao Shu-xian, Associate chief physician, Institute of Transfusion Medicine, Qingdao Blood Center, Qingdao 266071, Shandong Province, China  
qd\_hla@163.com

Hu Bin, Associate chief physician, Institute of Transfusion Medicine, Qingdao Blood Center, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Jiao Shu-xian and Hu Bin equally contributed to this paper.

Corresponding author: Feng Zhi-hui, Master, Attending physician, Institute of Transfusion Medicine, Qingdao Blood Center, Qingdao 266071, Shandong Province, China  
zhaolinqd@163.com

Received: 2013-01-09

Accepted: 2013-02-26

directional differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells and control bone marrow-derived mesenchymal stem cells were detected with flow cytometry. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced with hepatocyte growth factor were mixed with nimodipine of different concentration, and cells were divided into three groups: hepatocyte growth factor+ nimodipine 10 mg/L, 50 or 100 mg/L groups. Cell growth was observed with inverted phase contrast microscope and alpha 1-antitrypsin expression of the cells was confirmed by immunocytochemistry. The calcineurin M and the activation of extracellular signal regulated kinase pathway was detected by reverse transcription-PCR and western blotting, respectively.

**RESULTS AND CONCLUSION:**  $[Ca^{2+}]_i$  in the directional differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells was higher than in the control group ( $P < 0.05$ ). After addition of a larger dose of nimodipine, no differentiation of cells was observed and growth of bone marrow-derived mesenchymal stem cells was getting worse. There were few alpha 1-antitrypsin positive cells in the nimodipine groups. Calcineurin M expression was significantly increased in directional differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells and small dose of nimodipine than the controls ( $P < 0.05$ ). However, no significant difference was found among middle, high dose nimodipine and control groups ( $P > 0.05$ ). These findings indicate that  $Ca^{2+}$  could participate in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes included with cytokines, and also maintain the survival and proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

**Subject headings:** stem cells; mesenchymal stem cells; hepatocyte growth factor; cell differentiation

**Funding:** the Qingdao Science and Technology Support Plan Project, No. 09-1-1-25-nsh\*

Jiao SX, Hu B, Zhao L, Liu XH, Feng ZH. Intracellular  $Ca^{2+}$  is involved in survival, proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(40):7028-7033.

## 0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是骨髓内的非造血干细胞, 属于一种多能干细胞<sup>[1]</sup>, 即具有自我复制、高度增殖的能力和双向分化的潜能。在体内特定的微环境或体外特定的培养条件下, 骨髓间充质干细胞可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞以及肌细胞等多种间充质来源的细胞<sup>[2-3]</sup>。还可以分化为外胚层的神经元细胞、神经胶质细胞以及内胚层的肝细胞。将扩增的自体骨髓间充质干细胞体内移植或体外重塑形成自体的器官重新置入机体, 以替代损伤的细胞或组织器官, 不仅具有非常重要的理论意义, 也具有良好的临床应用前景。

对于各种原因造成的肝功能衰竭, 目前认为肝器官移植和细胞替代是比较有效的治疗方法。但是由于目前供体肝脏缺乏, 费用昂贵, 并存在免疫排斥问题, 限制了肝器官移植在临床的广泛应用, 因此利用骨髓间充质干细胞容易获得、可体外扩增及双向分化的特性, 用干细胞工程诱导分化产生的肝细胞, 为肝损伤性疾病的细胞替代治疗提供了可能性, 对肝功能衰竭的临床治疗有重要的价值。

细胞分化不仅有细胞核和基因的主导作用, 而且有细胞质和环境因素对分化的重要调控作用。细胞分化的调控涉及众多的细胞外信号物质、细胞外基质和营养因素等, 本质是影响核转录因子活性的细胞信号的转导。实验探索细胞内  $Ca^{2+}$  在体外诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞定向分化过程中的作用, 以及  $Ca^{2+}$  对其相关信号转导通路和细胞增殖分化有密切联系的 ERK 信号转导通路的影响, 为临床上通过细胞移植治疗肝脏疾病提供实验基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 分组对照细胞学实验。

**时间及地点:** 实验于2012年3至9月在青岛市中心血站中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠, 四五周龄, 体质量 80-100 g, 由青岛市药检所动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

**细胞内  $Ca^{2+}$  在骨髓间充质干细胞向肝细胞诱导分化中的作用实验主要药品、试剂及仪器:**

药品、试剂及仪器	来源
尼莫地平	山西振东泰盛制药有限公司
低糖 DMEM 培养基液、胎牛血清	Gibco 公司
胰蛋白酶	上海吉泰科技有限公司
肝细胞生长因子	PeptoTech
反转录试剂盒	Takara 公司
$Ca^{2+}$ 荧光探针 (Fluo-3/AM)	Biotium Inc
注射用尼莫地平 (2 mg)	云南创立生物医药
IX-70 型倒置显微镜	日本 Olympus 公司
MCO-15AC 型 $CO_2$ 孵育箱	日本 SANYO 公司
流式细胞仪	德国 partec 公司
PVDF 膜	Millipore 公司
ECL 试剂盒	Pierce Biotechnology 公司

**实验方法:**

**大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定:** 骨髓间充质干细胞的分离培养采用全骨髓细胞培养法, 使用流式细胞仪进行细胞鉴定。具体方法见参考文献[4]。

**细胞的诱导分化:** 将培养至第3代的骨髓间充质干细胞消化后按 $2 \times 10^8 L^{-1}$ 细胞浓度接种于8个50 mL培养瓶中, 4-6 h后向其中4瓶加入肝细胞生长因子(终浓度200 mg/L), 每3 d换液1次, 换液后重新加入肝细胞生长因子记作G1-G4, 另4瓶不加诱导剂只加培养液作为对照组记作C1-C4每天镜下观察, 培养至21 d时, 中止培养对对照组进行肝样分化细胞的鉴定, 具体方法见参考文献[4]。

**荧光探针负载测定细胞内 $Ca^{2+}$ 的浓度( $[Ca^{2+}]_i$ ):** 诱导3周后各组细胞, 加入荧光探针Fluo-3/AM(终浓度5 mmol/L) 37 °C负载30 min, 洗去未进入细胞的Fluo-3/AM, 每组取少许作细胞滴片, 在荧光显微镜下以480 nm波长激发, 观察并照相。其余避光保存, 流式细胞仪检测。自动数每管5 000个细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 。计算并记录平均 $[Ca^{2+}]_i$ 。

**尼莫地平干预实验:** 将培养至第3代的骨髓间充质干细胞消化后按 $2 \times 10^8 L^{-1}$ 细胞浓度接种于预先置有小盖玻片的6孔板中, 4-6 h细胞贴壁后, 随机分为5组: ①对照组。②肝细胞生长因子组(肝细胞生长因子诱导分化, 终浓度200 mg/L)。③肝细胞生长因子+尼莫地平10 mg/L组(等量肝细胞生长因子+钙离子通道阻断剂尼莫地平10 mg/L)。④肝细胞生长因子+尼莫地平50 mg/L组(等量肝细胞生长因子+尼莫地平50 mg/L)。⑤肝细胞生长因子+尼莫地平100 mg/L组(等量肝细胞生长因子+尼莫地平100 mg/L)。每组3个复孔, 每天观察细胞的形态变化, 21 d时终止培养, 倒置显微镜下照相, 细胞爬片用40 g/L多聚甲醛固定10 min后免疫细胞化学法检测AAT的表达, 具体方法见参考文献[4]。

**RT-PCR 检测钙调蛋白 mRNA 的表达:** 应用NucleospinRNA 试剂盒提取对照组、肝细胞生长因子诱导分化组各组细胞的总RNA, 总RNA抽提后的质量和完整性由琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。将RNA反转录成cDNA(PrimeScript), 应用相应的引物进行PCR反应。以GAPDH的表达量作为内参, 用图像分析软件Image 1.62(NIH, 美国)分析琼脂糖凝胶显色条带灰度值, 并进行比较。PCR反应引物由Takara公司合成。

#### PCR反应引物:

##### 钙调蛋白:

Forward primer: 5' -GGC TGA CCA ACT GAC TGA AGA G-3',  
Reverse primer: 5' -GTT TAC CTG ACC ATC CCC ATC G-3'。

##### GAPDH:

Forward primer: 5' -GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG -3',  
Reverse primer: 5' -GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT -3'。

**反应条件如下:** 94 °C预变性2 min, 94 °C变性45 s, 51 °C退火45 s和72 °C延伸2 min共进行35个循环, 未延伸72 °C 10 min。

**免疫印迹法检测P-ERK的表达:** 将对照组、肝细胞生长

因子诱导分化组(肝细胞生长因子组、肝细胞生长因子+尼莫地平10 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平50 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平100 mg/L组)各组细胞收集加入50  $\mu$ L RIPA细胞裂解, 用组织研磨棒研磨, 冰水浴中超声3次, 至均匀透明置冰上; 4 °C, 12 000 r/min(离心半径8 cm), 离心10 min, 取上清, 蛋白定量, 95 °C, 5 min变性, -20 °C保存。样品经SDS-PAGE, 转移至PVDF膜上; 用封闭液室温封闭1 h, TBST洗膜, 10 min  $\times$ 3次; 加入一抗室温轻摇1 h, TBST洗膜, 10 min  $\times$ 3次; 加入HRP标记的二抗, 室温轻摇1 h, TBST洗膜, 10 min  $\times$ 3次; ECL 试剂盒显色3 min, X射线片显影。以GAPDH的表达量作为内参, 用图像分析软件Image 1.62 (NIH, 美国)分析蛋白显色条带灰度值, 并进行比较。

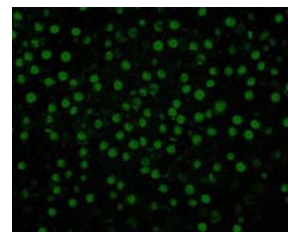
**主要观察指标:** ①骨髓间充质干细胞的鉴定。②肝细胞生长因子诱导组与对照组 $[Ca^{2+}]_i$ 。③尼莫地平干预实验结果。④RT-PCR检测钙调蛋白mRNA的表达。⑤Western Blotting检测P-ERK的表达。

**统计学分析:** 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果用SPSS 12.0软件进行方差分析, 组内进行t 检验。

## 2 结果 Results

**2.1 骨髓间充质干细胞的鉴定** 培养至第3代的骨髓间充质干细胞经流式细胞仪检测显示CD13<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, 证实为骨髓间充质干细胞, 具体参数见参考文献[5]。

**2.2 肝细胞生长因子组与对照组 $[Ca^{2+}]_i$ 的比较** 肝细胞生长因子诱导组与对照组的细胞收集后用Fluo-3/AM负载后在荧光显微镜下照相, 负载的细胞发绿色荧光, 见图1。



注: 负载的细胞发绿色荧光, 说明负载成功。

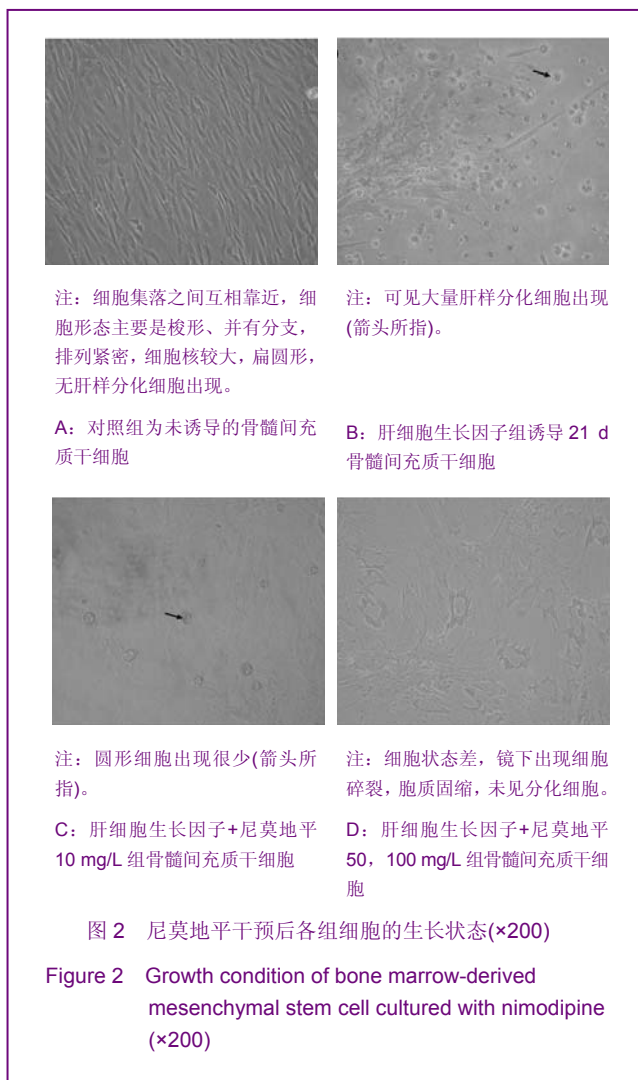
图1 钙离子探针Fluo-3/AM负载的骨髓间充质干细胞( $\times 200$ )

Figure 1 Bone marrow-derived mesenchymal stem cell loaded by Fluo-3/AM ( $\times 200$ )

图1结果说明负载成功, 流式细胞仪检测每组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ , 两组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果显示, 肝细胞生长因

子组骨髓间充质干细胞平均 $[Ca^{2+}]_i$  ( $37.00 \pm 4.58$ ) nmol/L, 对照组骨髓间充质干细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 为( $47.90 \pm 3.10$ ) nmol/L, 两组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 尼莫地平干预实验结果** 对照组细胞集落之间互相靠近, 细胞形态主要是梭形、并有分支, 排列紧密, 细胞核较大, 扁圆形, 无肝样分化细胞出现, 见图2A; 肝细胞生长因子组在21 d时有大量肝样分化细胞出现, 见图2B; 肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L组的圆形细胞出现很少, 见图2C; 肝细胞生长因子+尼莫地平 50, 100 mg/L的细胞状态差, 镜下出现细胞碎裂, 胞质固缩, 未见分化细胞, 见图2D。



5个组肝细胞特异性标志AAT的表达, 见图3, 结果显示肝细胞生长因子组AAT表达阳性细胞较多, 胞浆染色深, 见图3B; 尼莫地平各组能表达AAT的阳性细胞很少, 见图3C, D; 对照组未见AAT阳性细胞表达, 见图3A, 对照组与尼莫地平各组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 而尼莫地平10, 50, 100 mg/L组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。见表1。

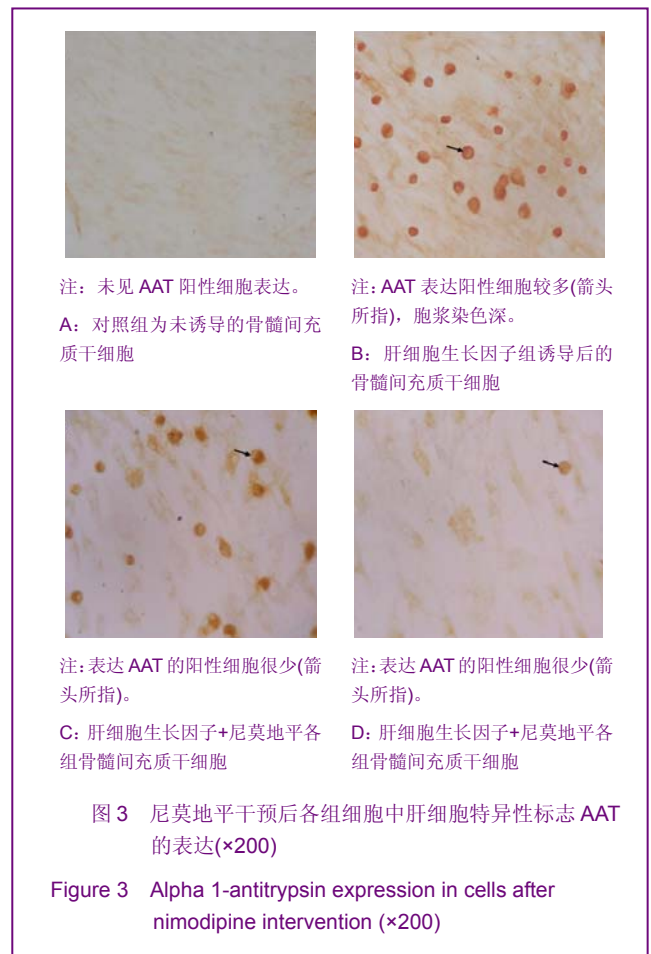
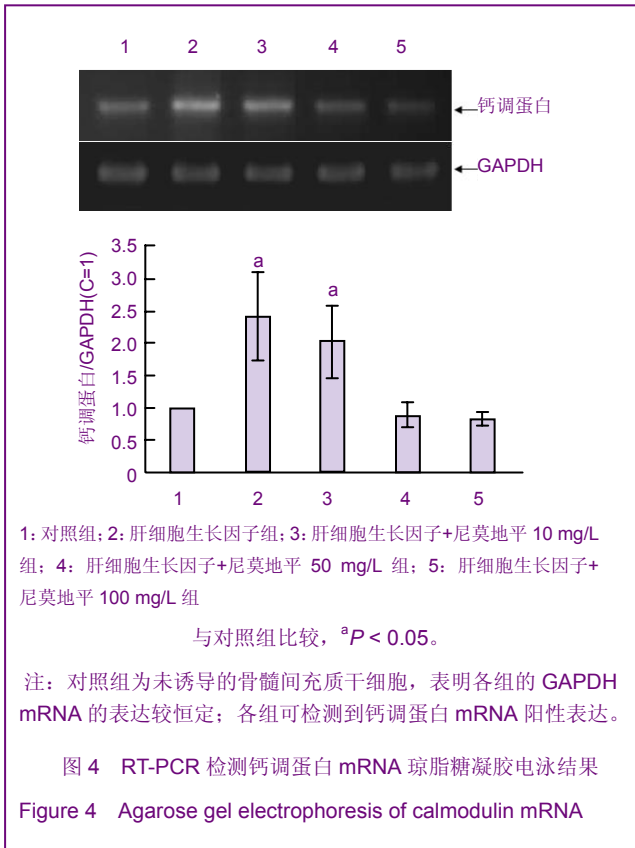


表1 对照组及肝细胞生长因子各组骨髓间充质干细胞免疫组化 AAT 表达结果  
Table 1 Alpha 1-antitrypsin expression in each group as detected by immunohistochemistry ( $\bar{x} \pm s$ )

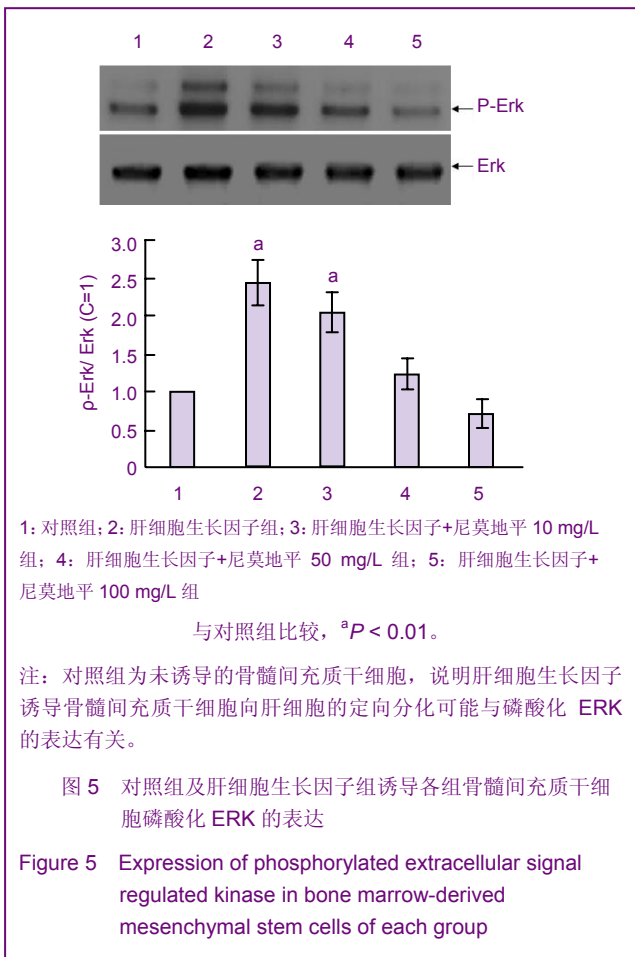
组别	AAT 阳性细胞数(个)	染色积分
对照组	23.8 $\pm$ 7.1	38.1 $\pm$ 6.2
肝细胞生长因子组	102.5 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>	237.6 $\pm$ 19.2 <sup>a</sup>
肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L 组	31.8 $\pm$ 3.2	52.7 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>
肝细胞生长因子+尼莫地平 50 mg/L 组	18.4 $\pm$ 16.3	38.9 $\pm$ 14.8
肝细胞生长因子+尼莫地平 100 mg/L 组	20.7 $\pm$ 5.6	32.4 $\pm$ 10.3

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。  
注: 对照组为未诱导的骨髓间充质干细胞, 说明肝细胞生长因子成功诱导了骨髓间充质干细胞向肝样细胞转化。

**2.4 RT-PCR检测钙调蛋白mRNA的表达** 由琼脂糖凝胶电泳结果可见, 各组的GAPDH mRNA的表达较恒定; 而钙调蛋白mRNA在各组也可检测到阳性表达, 见图4; 与对照组比较, 肝细胞生长因子组和肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L组钙调蛋白mRNA表达增加了1.95倍( $P < 0.05$ )和1.48倍( $P < 0.05$ ), 肝细胞生长因子+尼莫地平50 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平100 mg/L组与对照组比较, 组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。



## 2.5 免疫印迹法检测P-ERK的表达 见图5。



各组ERK的表达较恒定; 而P-ERK在各组也可检测到阳性表达, 与对照组比较, 肝细胞生长因子组和肝细胞生长因子+尼莫地平 10 mg/L组P-ERK的表达增加了 1.44和1.05倍( $P < 0.01$ ); 肝细胞生长因子+尼莫地平 50 mg/L组、肝细胞生长因子+尼莫地平 100 mg/L组与对照组比较组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论 Discussion

间充质干细胞是一类典型的成体干细胞, 能够自我更新, 具有较强增殖能力和多向分化潜能。在哺乳动物体内, 间充质干细胞分布于间质的部位, 如骨髓、关节、脂肪组织、肝、肾等<sup>[6]</sup>。其中, 骨髓来源的间充质干细胞是一类取材方便、分离和培养技术成熟、有广泛应用前景的种子细胞。

目前有关骨髓间充质干细胞诱导为肝细胞的方法有较多报道, 多采用肝细胞生长因子为主的多个细胞因子组合来进行诱导分化<sup>[7]</sup>。AAT是肝细胞特异性标志之一, 实验结果显示肝细胞生长因子诱导后的骨髓间充质干细胞的AAT表达阳性细胞较多, 提示肝细胞生长因子成功诱导了骨髓间充质干细胞向肝样细胞转化。

$Ca^{2+}$ 广泛分布于人体细胞内和体液中,  $Ca^{2+}$ 作为胞内多功能信使之一“主动”参与一切外来信号调控细胞功能的信号传导过程, 在细胞的发生、生长、死亡等过程中起着重要作用<sup>[8-9]</sup>。在哺乳动物非应激细胞里, 多种复杂机制共同作用将 $Ca^{2+}$ 浓度稳定 $10^{-7}$  mol/L的基态水平, 这个过程是一个动态平衡。研究表明细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的变化主要受以下3个系统调控<sup>[10-11]</sup>: ①细胞膜外的钙跨膜内流, 如电压依赖性和受体依赖性钙通道, 激活钙通道, 引起胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。②胞浆内钙贮存池释放, 分布在肌浆网(SR)的Ryanodine敏感受体、1, 4, 5-三磷酸肌醇敏感受体可分别被Ryanodine和1, 4, 5-三磷酸肌醇激活, 贮存池钙释放进入胞浆。③细胞核膜的1, 4, 5-三磷酸肌醇敏感受体与1, 4, 5-三磷酸肌醇结合后, 钙通道开放, 使贮存在核膜间隙内的钙释放入核浆及胞浆中。有证据表明细胞外 $Ca^{2+}$ 内流, 导致一种信号小分子物质的释放操纵钙池 $Ca^{2+}$ 排空<sup>[12]</sup>。细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度变化是多种受体激动信号传递过程的中心环节。细胞内游离 $Ca^{2+}$ 不仅维持膜两侧的跨膜钙浓度梯度, 介导细胞对外界刺激的应答反应, 对实现信息的跨膜传导, 而且作为重要的第二信使参于细胞的增殖、分化、腺体的分泌、神经递质的释放等细胞的功能活动。细胞内 $Ca^{2+}$ 通道的产生与其细胞增殖分化过程有密切关系。刚从机体分离出的细胞具备所有的 $Ca^{2+}$ 通道, 在对数增殖期的细胞 $Ca^{2+}$ 通道可以一过性的缺乏。当体外培养的细胞增殖呈密集状态时, 因接触抑制, 细胞仅1, 4, 5-三磷酸肌醇敏感受体通道保持非极化状态。

实验结果表明 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 参与了肝细胞提取液诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的定向分化过程。细胞因子通过多种信号途径的发挥调节作用。钙调神经磷酸酶是一种受 $\text{Ca}^{2+}$ 及钙调蛋白调节的多功能信号酶,通过使活化T细胞核因子转位入核,调节核内一系列基因的表达,在细胞通信过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。丝裂素活化蛋白激酶是细胞增殖与分化信号转导的共同通路,是细胞中多种信号向核内传递的共同途径,参与细胞多种的信号的转导。细胞外各种刺激信号通过不同的信息传递通路,共同交汇于蛋白激酶C,激活的蛋白激酶C通过依赖或非依赖ras机制激活丝裂素活化蛋白激酶,由此形成蛋白激酶C-丝裂素活化蛋白激酶级联反应。ERK是丝裂素活化蛋白激酶重要的分支,与细胞的增殖和分化有着密切的联系,尤其是肝细胞生长因子起作用的重要通路<sup>[14]</sup>,作者以前的研究也证明了ERK通路在肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞诱导分化过程中表达明显上调<sup>[5]</sup>。

实验采用荧光探针fluo3/AM标记细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 。Fluo-3/AM是一种新型的、无细胞毒性的、胞膜通透性、可激发出可见光的敏感性钙指示剂,能以甲酯形式特异性地与细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 结合,并在一定波长激发光激发后产生荧光(激发波长488 nm,发射光波长620 nm),荧光强度的变化可指示胞内游离钙浓度的变化。荧光显微镜可检测其浓度的瞬时变化,流式细胞仪可记录荧光强度的变化,检测胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的空间分布以及胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化幅度<sup>[15]</sup>。实验通过用流式细胞检测仪对诱导分化细胞和未诱导的骨髓间充质干细胞对照组细胞进行检测,结果显示诱导分化形成的细胞的胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 比对照组高。提示 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 参与了肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的定向分化过程。

尼莫地平是作用广泛的特异性 $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻断剂。实验利用不同剂量的尼莫地平对诱导分化中的骨髓间充质干细胞进行干预,结果表明加入尼莫地平干预后,诱导形成的肝样分化细胞明显减少。加入较大剂量的(50 mg/L、100 mg/L)尼莫地平干预后,不仅未见分化细胞,而且骨髓间充质干细胞的生长状态差,可见细胞内出现颗粒、胞质收缩、碎裂,片状细胞脱落现象。提示阻断 $\text{Ca}^{2+}$ 不仅阻断了骨髓间充质干细胞向肝细胞定向分化过程,也影响了骨髓间充质干细胞正常代谢过程。

总之,实验结果表明 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 参与了肝细胞生长因子诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞的定向分化、增殖过程。但是 $\text{Ca}^{2+}$ 在骨髓间充质干细胞增殖和分化中的具体机制仍不清楚, $\text{Ca}^{2+}$ 信号、骨髓间充质干细胞增殖与分化信号的时空信号如何协调和交叉成复杂信号网络等问题仍有待研究以进一步阐明。

**作者贡献:** 设计、实施、评估者为本文作者,均受过专业培训。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 混溶钙池-在软组织和体液的钙以游离或结合形式存在,这部分钙统称为混溶钙池。占人体内总钙量约1%[全身软组织含钙量总共占0.6%-0.9%(大部分被隔绝在细胞内的钙储存小囊内);细胞外液中只有0.1%的钙]。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 裴雪涛.干细胞技术[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [2] Bianco P, Riminucci M. Bone marrow stromal cells:nature, biology and potential application.Stem Cells.2001; 19(3): 180-192.
- [3] Mertelsmann R.Plasticity of bone marrow derived stem cells.Hematother Stem Cell Res.2000;9(6):957-960.
- [4] Feng Z, Li C, Jiao S, et al.In Vitro Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Hepatocytes. Hepato-Gastroenterology 2011; 58: 2081-2086.
- [5] 赵林,冯智慧,焦淑贤全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞及其生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2011, 15(32):5923-5927.
- [6] Baksh D,Song L,Tuan RS.Adult mesenchymal stem cells:characterization , differentiation and application in cell and gene therapy.J Cell Mol Med. 2004;3:301-316.
- [7] Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, et al.Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes.World J Gastroenterol.2005;11:7461-7465.
- [8] Berridge MJ,Bootman MD.LIPPP. Calcium: alifeanddeathsignal. Nature. 1998;395:645-648.
- [9] Brown EM, Vasilier PM, Hebert SC.Calcium ions as extracellular messengers. Cell. 1995;83:679-82.
- [10] Bers DM, Perez-Reyes E.  $\text{Ca}^{2+}$  channels in cardiac myocytes: structure and function in  $\text{Ca}^{2+}$  influx and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release. Cardiovasc Res.1999;42:339-360.
- [11] Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, et al. Cardiac myocyte volume,  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. Am J Physiol.1997;272: H2425-2435.
- [12] Distelhorst C W, McCormick TS. Bcl-2 acts subsequent to and independent of  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes to inhibit apoptosis in thap sigargin and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. Cell Calcium. 1996;19(6):473-483.
- [13] Moldentin JD, Lu J R, Antos CL, et al. A calcineurin transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell.1998;93: 215-228.
- [14] Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM: Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. Kidney Int.2000; 57(4):1426-1436.
- [15] Kao JP, Harootunian AT.Tsien RY. Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3.J Biol Chem 1989;264:8179-8184.