

毛蕊异黄酮对人诱导多能干细胞内皮分化的影响及机制

崔胜男¹, 刘传国², 杨雯晴^{1,2}, 郑志娟², 张丹^{2,3}<https://doi.org/10.12307/2024.167>

投稿日期: 2023-04-20

采用日期: 2023-06-15

修回日期: 2023-07-05

在线日期: 2023-07-28

中图分类号:

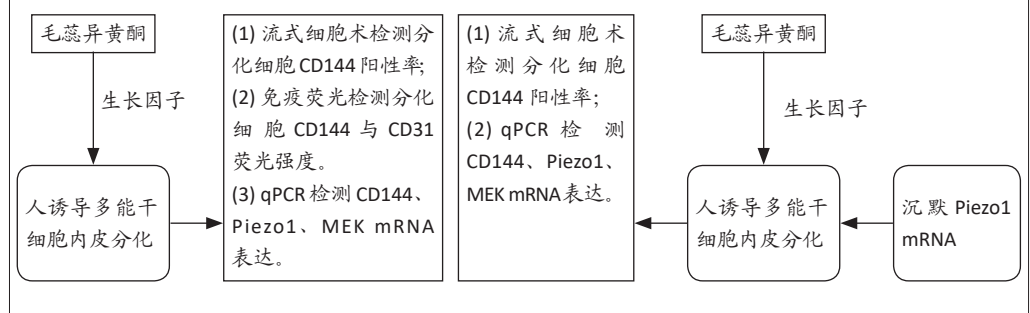
R459.9; R394.2; R542.2

文章编号:

2095-4344(2024)19-03031-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 毛蕊异黄酮促进人诱导多能干细胞的内皮分化过程



文题释义:

毛蕊异黄酮: 在黄芪、当归等植物中可分离得到, 为异黄酮类活性化合物, 具有抗氧化、促血管新生的生物活性。

内皮分化: 使用生长因子定向诱导人诱导多能干细胞经过中胚层、血管内皮祖细胞的分化过程最终得到成熟内皮细胞。

摘要

背景: 内皮损伤是心血管疾病的诱因之一, 人诱导多能干细胞易于获得、分化能力强、排异性较小, 其内皮分化细胞可被用作心血管疾病研究的理想细胞。

目的: 探讨毛蕊异黄酮对人诱导多能干细胞定向内皮分化的作用及机制, 为微血管再生提供技术支持。

方法: 将人诱导多能干细胞分为对照组与毛蕊异黄酮1.25, 2.5 μg/mL组, 进行内皮定向诱导分化。诱导分化8 d后, 采用流式细胞术检测各组细胞内皮细胞标志物CD144阳性率, 免疫荧光技术检测CD144、CD31荧光表达。利用慢病毒RNAi-GFP puromycin沉默人诱导多能干细胞Piezo1 mRNA, 再进行内皮定向诱导分化, 诱导分化8 d后, 采用流式细胞术检测分化细胞CD144阳性率, qPCR检测CD144、Piezo1、MEK的mRNA表达水平。

结果与结论: ①与对照组相比, 毛蕊异黄酮1.25, 2.5 μg/mL组CD144阳性率显著升高($P < 0.05$); 毛蕊异黄酮2.5 μg/mL组CD144、Piezo1、MEK mRNA表达水平提高($P < 0.05$); 毛蕊异黄酮2.5 μg/mL组CD144($P < 0.01$)和CD31($P < 0.001$)荧光表达显著升高; ②与shNT组相比, shNT+毛蕊异黄酮1.25, 2.5 μg/mL组CD144阳性率和CD144、Piezo1、MEK mRNA表达显著升高($P < 0.05$), 与shPiezo1组相比, shPiezo1+毛蕊异黄酮1.25, 2.5 μg/mL组CD144阳性率和CD144、Piezo1、MEK mRNA表达无显著变化($P > 0.05$); ③实验结果提示2.5 μg/mL毛蕊异黄酮能够促进人诱导多能干细胞内皮分化, 毛蕊异黄酮可以通过靶向调节Piezo1表达水平, 促进下游MEK表达, 从而促进人诱导多能干细胞内皮分化。

关键词: 毛蕊异黄酮; 人诱导多能干细胞; 内皮细胞; 内皮分化

Effects and mechanisms of calycosin on endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells

Cui Shengnan¹, Liu Chuanguo², Yang Wenqing^{1,2}, Zheng Zhijuan², Zhang Dan^{2,3}¹Innovative Institute of Traditional Chinese Medicine; ²Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China; ³Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China

Cui Shengnan, Master, Innovative Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China

Corresponding author: Zhang Dan, Doctoral supervisor, Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China; Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China

Co-corresponding author: Zheng Zhijuan, Lecturer, Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China

山东中医药大学, ¹中医药创新研究院, ²实验中心, 山东省济南市 250355; ³中医药经典理论教育部重点实验室, 山东省济南市 250355

第一作者: 崔胜男, 1995年生, 山东省济南市人, 汉族, 2023年山东中医药大学毕业, 硕士, 主要从事中西医结合防治心血管疾病研究。

通讯作者: 张丹, 博士生导师, 山东中医药大学实验中心, 山东省济南市 250355; 中医药经典理论教育部重点实验室, 山东省济南市 250355

共同通讯作者: 郑志娟, 讲师, 山东中医药大学实验中心, 山东省济南市 250355

<https://orcid.org/0000-0001-7172-7088> (郑志娟)

基金资助: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(82174337), 项目负责人: 杨雯晴; 山东“高校20条”资助项目(2020GXRC017),

项目参与人: 崔胜男, 郑志娟, 张丹

引用本文: 崔胜男, 刘传国, 杨雯晴, 郑志娟, 张丹. 毛蕊异黄酮对人诱导多能干细胞内皮分化的影响及机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(19):3031-3036.



Abstract

BACKGROUND: Endothelial injury is one of the causes of cardiovascular diseases. Human induced pluripotent stem cells are easy to obtain, have strong differentiation ability, and have less exclusiveness, and their endothelial differentiated cells can be used as ideal cells for cardiovascular disease research.

OBJECTIVE: To investigate the effect and mechanism of calycosin on endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells and to provide technical support for microvascular regeneration.

METHODS: Human induced pluripotent stem cells were divided into control group and calycosin group (1.25, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and growth factors were added to induce single-layer endothelial differentiation. After the induction of differentiation for 8 days, the positive rate of endothelial cell marker CD144 was detected by flow cytometry. Fluorescent expressions of CD144 and CD31 were detected by the immunofluorescence method. Lentivirus RNAi GFP puromycin was used to silence human-induced pluripotent stem cell Piezo1 mRNA followed by endothelial directed differentiation. After 8 days of differentiation, the positive rate of CD144 in differentiated cells was detected by flow cytometry. The mRNA expression levels of CD144, Piezo1 and MEK were detected by qPCR.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the positive rate of CD144 was significantly increased in the 1.25 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calycosin groups ($P < 0.05$). The expressions of CD144, Piezo1, and MEK mRNA were increased in the 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calycosin group ($P < 0.05$). The fluorescence expressions of CD144 ($P < 0.01$) and CD31 ($P < 0.001$) were significantly increased in the 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calycosin group. (2) Compared with the shNT group, CD144 positive rate and CD144, Piezo1, MEK mRNA expressions were significantly increased in the shNT + calycosin 1.25, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups ($P < 0.05$). Compared with the shPiezo1 group, the positive rate of CD144 and mRNA expressions of CD144, Piezo1 and MEK had no significant changes in the shPiezo1+calycosin 1.25, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups ($P > 0.05$). (3) It is concluded that 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ calycosin promotes the differentiation of human-induced pluripotent stem cells into endothelial lineages. Calycosin promotes the downstream MEK expression, thereby promoting the endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells by targeting the expression level of Piezo1.

Key words: calycosin; human induced pluripotent stem cell; endothelial cell; endothelial differentiation

Funding: Youth Science Foundation Project of National Natural Science Foundation of China, No. 82174337 (to YWQ); Shandong "20 Universities" Funded Project, No. 2020GXRC017 (to CSN, ZZ, ZD)

How to cite this article: CUI SN, LIU CG, YANG WQ, ZHENG ZJ, ZHANG D. Effects and mechanisms of calycosin on endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(19):3031-3036.

0 引言 Introduction

血管内皮受损是导致心血管疾病的主要原因之一^[1-2]。血管新生是修复内皮损伤治疗心血管疾病的有效途径，人多潜能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 具有强大的自我更新与分化潜力，来源稳定，可通过重编程定向分化为内皮细胞，被用于心血管疾病的细胞替代治疗^[3-7]。由于常规分化实验具有投入高、效率较低等局限性，因此在临床应用前需要寻找更有效的分化方法，以保证临床应用的高效性和安全性。Piezo1 作为机械性离子通道在机体生长、血管发育及各项生理活动中有重要作用，激活 Piezo1 下游 MEK 可发挥促进 hiPSCs 分化的作用^[8-13]。

毛蕊异黄酮 (Calycosin, CA) 主要存在于黄芪等药用植物中，已被证实具有抗氧化、抗炎、促进细胞增殖、促血管生成等生物学作用，且已有研究发现毛蕊异黄酮具有上调血管内皮生长因子水平、促进脑微血管内皮细胞血管新生的作用^[14-16]。因此研究毛蕊异黄酮对 hiPSCs 的内皮分化作用，可以为细胞替代治疗血管疾病提供有效策略。该研究通过体外细胞培养实验，探讨毛蕊异黄酮对 hiPSCs 增殖和向内皮细胞分化的作用及机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验，组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 5 月至 2023 年 1 月在山东中医药大学医学科研平台完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 hiPSCs 购买自北京赛贝生物技术有限公司，货号 Lot CA4024106。实验使用的细胞均为复苏的第 5 代或第 6 代细胞，其生长特性、细胞表型、分化能力均符合人多潜能干细胞鉴定标准。

1.3.2 实验试剂 毛蕊异黄酮 (CAS 号: 20575-57-9, 相对分子质量: 284.26, 质量分数 $\geq 98\%$, Lot B20846); 人多潜能干

细胞培养基 (北京赛贝生物技术有限公司, Lot CA1014500); 人多潜能干细胞铺底液 (北京赛贝生物技术有限公司, Lot CA3003100); CCK-8 细胞活力试剂盒 (上海碧云天公司, Lot C0038); 1640 培养基 (索莱宝公司, 20220520); ECM 培养基 (Thermo Fisher Scientific 公司, Lot 36011); Y27632(STEMCELL 公司, Lot #00000); 二甲基亚砜 (美国 Sigma-Aldrich 公司, Lot D8418); B27(Gibco 公司, Lot 17504-044); CHIR99021 (Selleckchem 公司, Lot S1263); 血管内皮生长因子 (PEPROTECH 公司, Lot 0214423); 碱性成纤维细胞生长因子 (PEPROTECH, Lot 100-18B); SB431542(Selleckchem 公司); Vazyme Script™ RT reagent 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, Lot R233); ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司, Lot R711); 封闭用山羊血清 (上海中杉金桥, Lot ZLI-9056); CD144 抗体 (CST 公司, Lot 2500S); CD31(CST 公司, Lot 3528S); Alexa Fluor 488(CST 公司, Lot #4412); Alexa Fluor 488(Thermo Fisher Scientific 公司, Lot 2284614)。

1.3.3 实验仪器 恒温培养箱 (HealForce 公司, HF90); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司, CK41); 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, Nanodrop One); 高分辨率实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, QuantStudio5); 激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司, LSM880); 分析型流式细胞仪 (德国 Beckman 公司, CytoFLEX S)。

1.4 实验方法

1.4.1 hiPSCs 预处理 将 6 孔板经铺底工作液孵育后，吸除铺底液，将细胞按 1×10^4 /孔密度接种于 6 孔板，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱培养，每天换液。当细胞密度达到 50% 时，以 1 : 6 的比例进行传代，参照文献 [17-18] 方法进行单层内皮细胞诱导分化，分为对照组与毛蕊异黄酮组 (1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，分别加入含毛蕊异黄酮终质量浓度为 0, 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的诱导分化培养基。hiPSCs 向内皮细胞分化共需要 8 d，分为中胚层分化和内皮分化 2 个阶段。

在分化的第 1, 2 天, 属于中胚层分化阶段 1, 用含 6 $\mu\text{mol/L}$ CHIR99021、1 \times B27 的 1640 培养基进行培养, 显微镜下观察细胞从颗粒状转变为长梭形; 在分化的第 3, 4 天, 属于中胚层分化阶段 2, 用含有 3 $\mu\text{mol/L}$ CHIR99021、1 \times B27 的 1640 培养基进行培养, 显微镜下可观察到细胞形态发生变化, 细胞边缘呈多角状; 在分化的第 5-8 天, 属于内皮分化阶段, 用含有 50 ng/mL 血管内皮生长因子、10 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 $\mu\text{mol/L}$ SB431542 的 ECM 培养基进行培养, 显微镜下可观察到细胞呈鹅卵石状。分化第 8 天结束时, 用 ECM 完全培养基进行培养。

1.4.2 CCK-8 检测 hiPSCs 活力 取对数生长期 hiPSCs, 消化后制备成 $1\times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度的细胞悬液, 加入 96 孔板, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中贴壁培养 24 h, 加入终质量浓度分别为 0, 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{g/mL}$ 毛蕊异黄酮的人多潜能干细胞培养基培养 48 h, 每个浓度梯度设置 3 个平行复孔, 然后加入 CCK-8 溶液孵育 4 h, 用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值 (A)。细胞活力 = $A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.4.3 流式细胞术检测毛蕊异黄酮对 hiPSCs 内皮分化的作用 设置空白组 (细胞不加抗体)、对照组、毛蕊异黄酮 1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组, 将 hiPSCs 分化 8 d 的细胞消化制备为单细胞悬液, 以每管 2×10^5 个细胞加入 1.5 mL EP 管中, 100 μL 5% BSA 缓冲液重悬细胞, 每管加入 20 μL CD144-PE-A 抗体混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 流式细胞仪检测 CD144 阳性表达率。FlowJo_V10 进行数据处理, 以空白组为阴性对照组, 分出 CD144 阳性细胞群, 并计算各组细胞 CD144 阳性率。

1.4.4 qPCR 检测细胞中 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 表达水平 实验分组同 1.4.3, 收集各组 hiPSCs 分化 8 d 后的细胞, 使用 Trizol 试剂抽提总 RNA; 用 Vazyme ScriptTM RT reagent 试剂盒按照说明书反转录为 cDNA, 用 SYBR Green Premix EX TaqTM 试剂盒进行实时定量 PCR。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算细胞中 Piezo1、CD144 和 MEK 的 mRNA 表达水平, GAPDH 作为内参。基因引物序列见表 1。

表 1 | qPCR 引物序列
Table 1 | Primer sequences of qPCR

基因	引物序列
GAPDH	F: 5'-CAG TCG CGC TTG CAG ATA GTC CT-3'
	R: 5'-ACG CCT CCA CCA TCG ATA TCC TC-3'
CD144	F: 5'-AAA CAC CTC ACT TCC CCA TC-3'
	R: 5'-ACC TTG CCC ACA TAT TCT CC-3'
Piezo1	F: 5'-AGA TCT CGC ACT CCA T-3'
	R: 5'-CTC CTT CTC ACG AGT CC-3'
MEK	F: 5'-CTA CAC GCA GTT GCA GTA CAT-3'
	R: 5'-CAG CAG GAT CTG GAT CTC CC-3'

1.4.5 免疫荧光法检测毛蕊异黄酮对 hiPSCs 内皮分化的作用 取各组 hiPSCs 分化 8 d 后的细胞, 使用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗 3 次; 使用 1% TritonX-100 室温透膜 1 h, PBS 清洗 3 次; 加入封闭液 (PBS 为母液 + 体积分数 10% 山羊血清) 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 加入封闭液稀释的 CD144、CD31 一抗 (1 : 300), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次; 加入封闭液稀释的 Alexa Fluor 488 荧光二抗 (1 : 500) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS

清洗 3 次; 加入 DAPI, 避光染核 5 min, PBS 清洗 3 次, 激光共聚焦显微镜观察, 激发光用 405 nm, 488 nm 激发, ZEN black 摄取图像。每组 3 个重复样本, 每个样本圈取 10 个细胞, ZEN blue 计算平均荧光强度值。

1.4.6 慢病毒感染 hiPSCs 沉默 Piezo1 mRNA 表达 采取慢病毒 RNAi 沉默 hiPSCs 中的 Piezo1。慢病毒来自吉凯基因, 序列 hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin。将 1×10^6 个 hiPSCs 接种至 6 孔板, 设置为 Piezo1 沉默组 (shPiezo1)、阴性对照组 (shNT)、正常组。病毒效价为 1×10^8 TU/mL, 感染复数为 50。感染 72 h 后, 通过绿色荧光细胞表达数判断转染效率, 用含 5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的培养基筛选感染的 hiPSCs。每 24 h 更换 1 次培养基, 直至正常组细胞被嘌呤霉素全部杀死, 感染组荧光效率达到 100%。将嘌呤霉素质量浓度降低至 1 $\mu\text{g/mL}$, 继续对感染细胞进行筛选和扩增, 同时收集细胞进行毛蕊异黄酮干预和内皮细胞诱导分化, 诱导分化第 8 天采用流式细胞术检测 CD144 阳性率, 具体方法同 1.4.4。

1.4.7 qPCR 检测细胞中 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 表达水平 实验分组同 1.4.6, 收集各组 hiPSCs 分化 8 d 后的细胞, 采用 1.4.4 方法检测 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 表达水平。

1.5 主要观察指标 ① hiPSCs 及其分化的细胞形态变化; ② hiPSCs 分化的内皮细胞相关标志物 CD144、CD31 的荧光表达; ③ hiPSCs 分化的内皮细胞 CD144 阳性表达; ④ hiPSCs 分化的内皮细胞相关基因 CD144、Piezo1、MEK mRNA 表达。

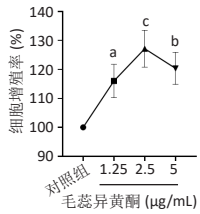
1.6 统计学分析 应用 GraphPad Prism software version 8 进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经山东中医药大学统计学教研室生物统计学专家审核。

2 结果 Results

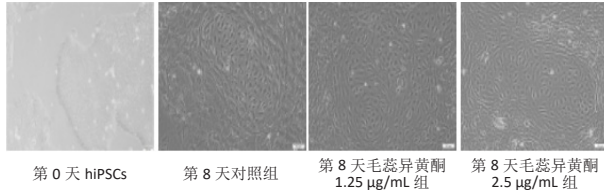
2.1 毛蕊异黄酮对 hiPSCs 活力的作用 如图 1 所示, 与对照组相比, 1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 毛蕊异黄酮可以促进 hiPSCs 增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 增殖呈浓度依赖性, 具有较明显的效果。与毛蕊异黄酮 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, 毛蕊异黄酮 5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞增殖受到抑制, 活力下降。根据以上结果, 可初步使用 1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 毛蕊异黄酮干预 hiPSCs 向内皮细胞诱导分化, 根据诱导分化结果筛选毛蕊异黄酮最佳干预质量浓度。

2.2 毛蕊异黄酮对 hiPSCs 及其分化内皮细胞形态的影响 如图 2 所示, 在分化前 1 d (即第 0 天) 使用倒置显微镜拍摄, 可见细胞克隆边缘光滑, 形态均一, 排列整齐, 细胞呈小颗粒状分布。使用不同质量浓度毛蕊异黄酮 (1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$) 持续干预 hiPSCs, 分化第 8 天, 倒置显微镜下观察到细胞边缘清晰, 呈鹅卵石状, 在形态上细胞已具有内皮细胞特征。

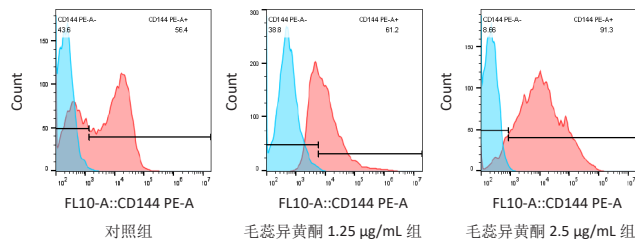
2.3 毛蕊异黄酮对 hiPSCs 分化的内皮细胞 CD144 阳性表达的影响 如图 3 所示, 流式细胞术检测结果显示, 与对照组 (56.4%) 相比, 毛蕊异黄酮 1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组 CD144 阳性率 (61.2%, 91.3%) 有明显提高, 提示在分化培养基中加入毛蕊异黄酮可显著提高内皮标志物 CD144 阳性率。



图注：与对照组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.001$
图 1 | CCK-8 检测毛蕊异黄酮干预后人诱导多能干细胞的增殖情况
Figure 1 | CCK-8 assay for detecting proliferation of human induced pluripotent stem cells treated with calycosin



图注：分化第 0 天可见 hiPSCs 克隆边缘光滑、形状均一、排列整齐，细胞呈小颗粒状分布；分化第 8 天 hiPSCs 呈内皮样光滑鹅卵石状形态。hiPSCs：人诱导多能干细胞
图 2 | hiPSCs 分化前细胞形态 (×20) 与毛蕊异黄酮干预 hiPSCs 分化第 8 天的细胞形态 (×10)
Figure 2 | Morphology of human induced pluripotent stem cells before differentiation (×20) and morphology of human induced pluripotent stem cells treated with calycosin on day 8 (×10)



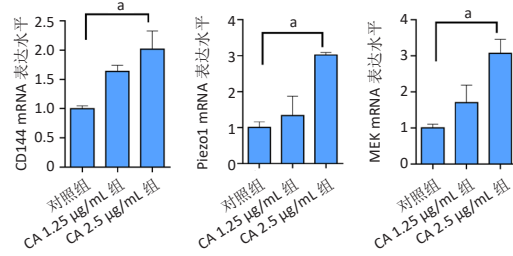
图注：分化第 8 天 hiPSCs 呈内皮样光滑鹅卵石状形态。hiPSCs：人诱导多能干细胞
图 3 | 流式细胞术检测各组人诱导多能干细胞内皮分化第 8 天 CD144 的阳性率
Figure 3 | CD144 positive rate on day 8 of endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in each group detected by flow cytometry

2.4 hiPSCs 内皮分化第 8 天 Piezo1、CD144、MEK mRNA 表达水平 如图 4 所示，与对照组相比，毛蕊异黄酮 1.5，2.5 μg/mL 组 CD144、Piezo1、MEK mRNA 表达均有所提高，毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

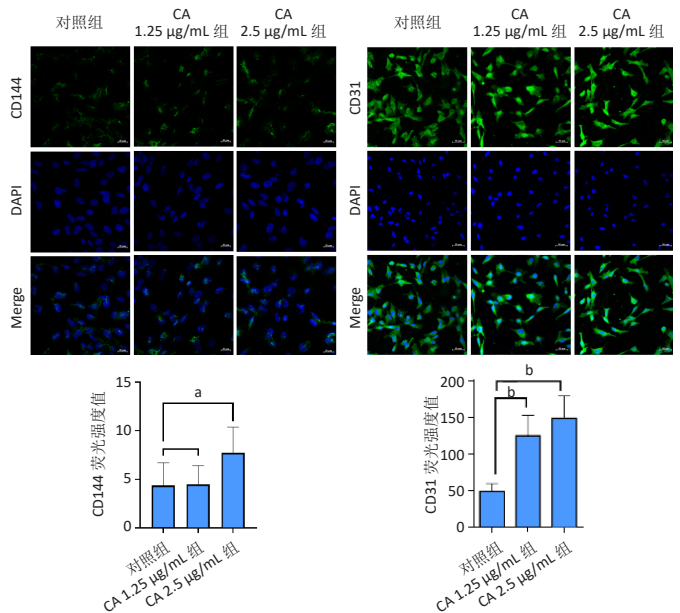
2.5 毛蕊异黄酮对 hiPSCs 分化的内皮细胞 CD144、CD31 荧光强度表达的影响 如图 5 所示，与对照组相比，毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组 CD144 荧光强度无明显提高 ($P > 0.05$)，CD31 荧光强度明显提高 ($P < 0.001$)；毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组 CD144 和 CD31 荧光强度均明显提高，差异有显著性意义 ($P < 0.001$)。

2.6 沉默 Piezo1 mRNA 后 hiPSCs 中 Piezo1 mRNA 的表达 如图 6 所示，与 shNT 组相比，shPiezo1 组 Piezo1 mRNA 表达显著下降，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

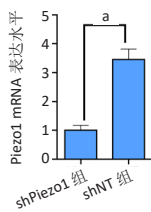
2.7 沉默 Piezo1 mRNA 后 hiPSCs 内皮分化第 8 天 CD144 阳性率 如图 7 所示，流式细胞术检测分化第 8 天细胞，结果显示与 shNT 组 (56.8%) 相比，shNT+ 毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组与 shNT+ 毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组 CD144 阳性率 (61.4%，69.9%) 有明显提高，与 shPiezo1 组 (8.78%) 相比，shPiezo1+



图注：^a $P < 0.05$ 。CA：毛蕊异黄酮
图 4 | 人诱导多能干细胞内皮分化第 8 天 CD144、Piezo1、MEK 的 mRNA 表达
Figure 4 | Expression of CD144, Piezo1, and MEK mRNA on day 8 of endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells



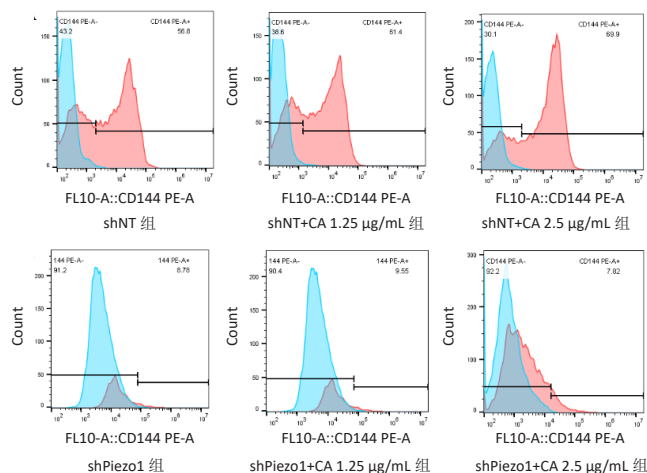
图注：^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.001$ 。CA：毛蕊异黄酮
图 5 | 免疫荧光检测各组人诱导多能干细胞内皮分化第 8 天 CD144 与 CD31 的表达
Figure 5 | CD144 and CD31 expression on day 8 of endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells in each group detected by immunofluorescence method



图注：^a $P < 0.05$
图 6 | 沉默 Piezo1 mRNA 后人诱导多能干细胞中 Piezo1 mRNA 的表达
Figure 6 | Piezo1 mRNA expression level of human induced pluripotent stem cells after Piezo1 mRNA silencing

毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组与 shPiezo1+ 毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组 CD144 阳性率 (9.55%，7.82%) 无明显提高。

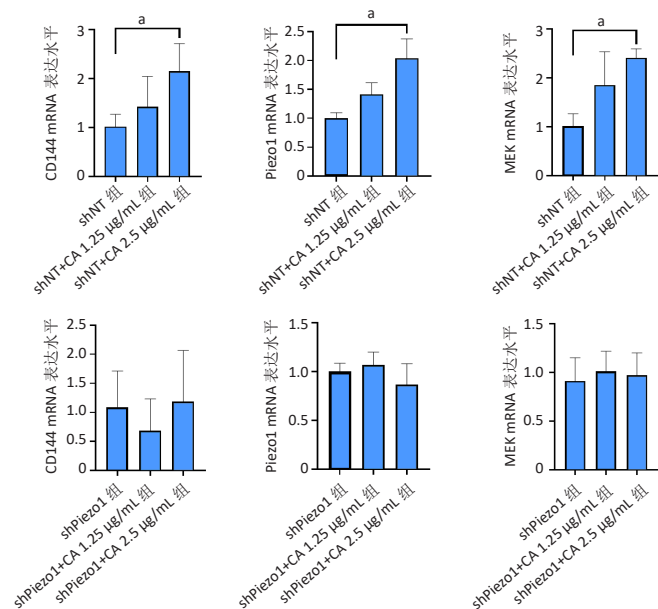
2.8 沉默 Piezo1 mRNA 后 hiPSCs 内皮分化第 8 天 CD144、Piezo1、MEK 的表达 如图 8 所示，与 shNT 组相比，shNT+ 毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组与 shNT+ 毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组 CD144、Piezo1、MEK mRNA 表达有明显提高 ($P < 0.05$)，与 shPiezo1 组相比，shPiezo1+ 毛蕊异黄酮 1.25 μg/mL 组与 shPiezo1+ 毛蕊异黄酮 2.5 μg/mL 组 CD144、Piezo1、MEK mRNA 水平无明显提高 ($P > 0.05$)。



图注：CA 为毛蕊异黄酮

图 7 | 沉默 Piezo1 mRNA 后人诱导多能干细胞内皮分化第 8 天 CD144 阳性率

Figure 7 | CD144 positive rate on day 8 of endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells after Piezo1 mRNA silencing



图注：^a $P < 0.05$ 。CA：毛蕊异黄酮

图 8 | 沉默 Piezo1 mRNA 后人诱导多能干细胞内皮分化第 8 天 CD144、Piezo1、MEK 的 mRNA 表达

Figure 8 | Expression of CD144, Piezo1, and MEK mRNA on day 8 of endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells after Piezo1 mRNA silencing

3 讨论 Discussion

hiPSCs 是一类具有高度增殖、自我更新、多向分化潜能的细胞，在特定的诱导条件下可向内皮细胞分化，代替修复损伤的血管内皮，在再生医学中有重要的价值^[19-24]。激活机械性离子通道 Piezo1 对血管发育和干细胞分化有重要作用，机械力及化学激活 Piezo1 促发的钙离子内流，可以引发一系列细胞内信号活化，其中 MAPK 信号通路蛋白磷酸化能够促进细胞分化、增殖^[18]。MEK 是 MAPK 家族核心成员之一，激活 MEK 信号可活化 MAPK 信号并进入细胞核产生转录因子 (如 ETS2、JUN) 促进下一步分化、增殖与迁移^[25-27]。Piezo1 参与钙离子内流，进而激活 MEK 信号，最终引起胞

内变化，产生分化活动。CD144(VE-Cadherin) 与血管内皮生长因子可作为检测分化成功与否的标志。CD144 广泛存在于成熟内皮细胞中，其表达与血管生成相关，血管内皮生长因子是血管内皮细胞的高度特异性有丝分裂原，在促进干细胞由中胚层细胞向内皮细胞诱导分化中发挥着关键的作用，是血管生成初期重要的细胞因子^[28-33]。CD144 与 CD31 是内皮细胞标志物或表面抗原，可反映内皮细胞亚群水平，在内皮细胞特异性表型转化中可作为检验转化成功与否的重要指标^[31, 34]。有研究发现，毛蕊异黄酮可参与活化 MEK/ERK 信号通路^[16, 35-36]。

该研究探讨了毛蕊异黄酮对 hiPSCs 向内皮细胞定向分化的促进作用，采用 8 d 单层细胞诱导分化方案，诱导成的细胞呈椭圆状，可连续传代。流式细胞术检测阴性对照组 CD144 阳性率为 56.4%，毛蕊异黄酮 1.25, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组 CD144 阳性率分别为 61.2%，91.3%。qPCR 检测毛蕊异黄酮 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 表达水平提高 ($P < 0.05$)。免疫荧光法检测发现，与对照组相比，毛蕊异黄酮 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 组 CD144 平均荧光强度无显著差异 ($P > 0.05$)，CD31 有明显差异 ($P < 0.001$)；毛蕊异黄酮 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 CD144 与 CD31 荧光表达均有提高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

研究发现，机械力及化学刺激 Piezo1 引起的钙离子内流可激活 MEK 信号，引发胞内 MAPK 信号蛋白磷酸化^[18, 25-26]。将 Piezo1 基因沉默后，shPiezo1 组 hiPSCs 虽然经过 8 d 的内皮分化孵育，但 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 表达及流式 CD144 阳性率与未分化时相比没有出现显著差异。尽管 shPiezo1 组 hiPSCs 分别加入了毛蕊异黄酮参与了内皮分化，但都没有出现 Piezo1、CD144 和 MEK mRNA 水平及 CD144 阳性率的显著提高，这说明了毛蕊异黄酮在失去了 Piezo1 这个作用靶点后，没有显著激活 Piezo1 通路，也没有显著激活下游 MEK 信号通路，与以往研究中 Piezo1 促进下游 MEK/ERK 通路的结果一致^[37]。

结论：毛蕊异黄酮可以通过靶向调节 Piezo1 表达水平，促进下游 MEK 表达，从而促进 hiPSCs 内皮分化。研究毛蕊异黄酮参与 hiPSCs 的内皮分化机制，为血管再生疾病的细胞治疗和血管类器官研究提供了新的策略。

致谢：感谢山东中医药大学医学科研平台提供的帮助。

作者贡献：崔胜男负责实验实施、论文撰写，郑志娟、刘传国负责实验数据分析处理，崔胜男负责细胞培养、指标检测，张丹、杨雯晴负责数据和文章的校对，郑志娟负责实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 数据“说”全球心血管疾病负担 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2023, 31(3):5.
- [2] GAĆ P, CZERWIŃSKA K, MACEK P, et al. The importance of selenium and zinc deficiency in cardiovascular disorders. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021;82:103553.
- [3] 彭阿建, 欧阳范馨, 张熙, 等. 黄芪甲苷干预的 EPC-Exos 对高糖诱导损伤间充质干细胞向内皮分化的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022, 24(4):1593-1602.
- [4] 曹雪洁, 陶佳平, 曲爱娟, 等. 血管壁干细胞与血管重塑相关性疾病 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11):921-929.
- [5] VIDONI C, FERRARESI A, SECOMANDI E, et al. Autophagy drives osteogenic differentiation of human gingival mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):98.
- [6] POETSCH MS, STRANO A, GUAN K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells*. 2022;40(6):546-555.
- [7] MAROTTA D, RAO C, FOSSATI V. Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Handling Protocols: Maintenance, Expansion, and Cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2022;2454:1-15.
- [8] 陶军, 谭红梅. 机械门控阳离子通道 Piezo1 与动脉粥样硬化研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1):9-16, 33.
- [9] 刘轩辰, 帖晓瑛, 刘玉林, 等. 何首乌提取物对失重小鼠骨质疏松和骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2021, 47(6):1386-1396.
- [10] 首健, 霍云龙. 机械力信号与部分心血管疾病的发生 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1):34-40.
- [11] SOLIS AG, BIELECKI P, STEACH HR, et al. Mechanosensation of cyclical force by PIEZO1 is essential for innate immunity. *Nature*. 2019; 573(7772):69-74.
- [12] SHINGE SAU, ZHANG D, DIN AU, et al. Emerging Piezo1 signaling in inflammation and atherosclerosis; a potential therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2022;18(3):923-941.
- [13] LUO C, LÜ D, ZHENG L, et al. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells by coupling substrate stiffness and microtopography. *Biomater Sci*. 2021;9(10):3776-3790.
- [14] DENG M, CHEN H, LONG J, et al. Calycosin: a Review of its Pharmacological Effects and Application Prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021;19(7):911-925.
- [15] PAN L, ZHANG XF, WEI WS, et al. The cardiovascular protective effect and mechanism of calycosin and its derivatives. *Chin J Nat Med*. 2020; 18(12):907-915.
- [16] TANG JY, LI S, LI ZH, et al. Calycosin promotes angiogenesis involving estrogen receptor and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in zebrafish and HUVEC. *PLoS One*. 2010;5(7): e11822.
- [17] GU M. Efficient Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Endothelial Cells. *Curr Protoc Hum Genet*. 2018;98(1):e64.
- [18] HARDING A, CORTEZ-TOLEDO E, MAGNER NL, et al. Highly Efficient Differentiation of Endothelial Cells from Pluripotent Stem Cells Requires the MAPK and the PI3K Pathways. *Stem Cells*. 2017;35(4):909-919.
- [19] 桑婉玥, 李耀东. 人诱导多能干细胞在心血管疾病中的应用及研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(12):1020-1024.
- [20] 冯芳. 聚多巴胺-多肽粗糙表面调控人诱导多能干细胞体外生长及成骨向诱导分化的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [21] 邵文柱, 张阳, 阮海文, 等. 人源诱导多能干细胞体外定向分化为功能性肝细胞的方法研究 [J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(2): 225-231.
- [22] 徐佳佳, 李洋洋, 仲光尚, 等. 人诱导多能干细胞体外定向分化为多巴胺能神经元祖细胞 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(2):175-182.
- [23] MARCHEQUE J, BUSSOLATI B, CSETE M, et al. Concise Reviews: Stem Cells and Kidney Regeneration: An Update. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(1):82-92.
- [24] BAHMAD HF, ELAJAMI MK, DAOUK R, et al. Stem Cells: In Sickness and in Health. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(3):262-276.
- [25] 巩婷婷, 司凯, 刘会平, 等. MAPK 级联调控细胞生长及其在免疫、炎症及癌症中作用的研究进展 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2022, 47(12):1721-1728.
- [26] KIDDER BL. Direct Reprogramming of Mouse Embryonic Fibroblasts to Induced Trophoblast Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2020;2117: 285-292.
- [27] 刘博, 冯潇, 赵洁, 等. 转录因子 Jun 在小鼠睾丸发育过程中的表达及定位 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2022, 31(1):11-15.
- [28] 张蕊, 张同存. 整合素 integrin β 4 调控 VEGF 诱导的骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化 [J]. 天津科技大学学报, 2017, 32(1):13-17.
- [29] 李鹏, 周长勇, 尹磊, 等. 低氧对人脐带间充质干细胞活性和内皮分化能力的影响及 VEGF 的干预作用 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2013, 38(4):329-340.
- [30] 汪雁归, 毛萧萧, 杨天伦. 体外定向诱导胚胎干细胞分化为内皮细胞及其与脐静脉内皮细胞的比较 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2017, 42(4):374-379.
- [31] 曹百川, 曾高峰, 高云兵, 等. 热休克内皮细胞诱导骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞分化 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(19): 3023-3028.
- [32] HU Z, WU Y, ZHOU M, et al. Generation of reporter hESCs by targeting EGFP at the CD144 locus to facilitate the endothelial differentiation. *Dev Growth Differ*. 2018;60(4):205-215.
- [33] 刘莲, 汪萍萍, 肖晓, 等. VEGF、FGF2 和 BMP4 联合通过 ERK 通路高效诱导 hiPSCs 向内皮细胞分化 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2022, 31(1):1-10.
- [34] 左芯萌, 王振华, 高利平. 血管细胞外基质胶促进骨髓 CD34+ 祖细胞分化为内皮细胞的实验研究 [J]. 天津医药, 2023, 51(3):225-229.
- [35] ZHANG Y, ZHANG JQ, ZHANG T, et al. Calycosin Induces Gastric Cancer Cell Apoptosis via the ROS-Mediated MAPK/STAT3/NF- κ B Pathway. *Onco Targets Ther*. 2021;14:2505-2517.
- [36] GAO J, LIU ZJ, CHEN T, et al. Pharmaceutical properties of calycosin, the major bioactive isoflavonoid in the dry root extract of Radix astragali. *Pharm Biol*. 2014;52(9):1217-1222.
- [37] MOUSAWI F, PENG H, LI J, et al. Chemical activation of the Piezo1 channel drives mesenchymal stem cell migration via inducing ATP release and activation of P2 receptor purinergic signaling. *Stem Cells*. 2020;38(3):410-421.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)