

## 降钙素基因相关肽对 c-kit<sup>+</sup> 心脏干细胞生存活力的影响

龙仙萍, 郑小宇, 邓文文, 石蓓

(遵义医学院附属医院心内科, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 降钙素基因相关肽; c-kit<sup>+</sup>心脏干细胞; 细胞存活率; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨降钙素基因相关肽(CGRP)对缺氧状态下 c-kit<sup>+</sup>心脏干细胞(c-kit<sup>+</sup>CSC)生存活力的影响及其可能的机制。**方法** 体外建立细胞缺氧模型,实验随机分为缺氧细胞组、CGRP+缺氧细胞组、CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组和对照组(不缺氧细胞);通过 CCK-8 法检测细胞的活力,采用流式细胞仪和线粒体膜电位法来检测细胞凋亡。**结果** 在缺氧状态下,缺氧细胞组细胞增殖活力较对照组下降,CGRP 作用缺氧细胞后不同时间点,与缺氧细胞组比较,细胞增殖活力均增加( $P<0.05$ ),尤其以 30 min 和 60 min 最为明显;与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组在 30 min 和 60 min 细胞增殖活力明显下降( $P<0.05$ )。流式细胞仪结果显示:与对照组比较,缺氧细胞组早期凋亡率最高( $P<0.05$ );与缺氧细胞组比较,CGRP+缺氧细胞组早期凋亡率降低( $P<0.05$ );与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组早期凋亡率增高( $P<0.05$ )。线粒体膜电位结果显示:与缺氧细胞组比较,CGRP+缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值增高( $P<0.05$ );与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值降低( $P<0.05$ )。**结论** CGRP 能够促进缺氧状态下 c-kit<sup>+</sup>CSC 增殖存活,抑制细胞早期凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Influence of CGRP on the Cell Activity of c-kit<sup>+</sup> Cardiac Stem Cells

LONG Xian-Ping, ZHENG Xiao-Yu, DENG Wen-Wen, and SHI Bei

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] Calcitonin Gene Related Peptide; c-kit<sup>+</sup> Cardiac Stem Cells; Cell Activity; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the survival activity of c-kit<sup>pos</sup> cardiac stem cells (c-kit<sup>+</sup> CSC) in hypoxia, and research its potential mechanism. **Methods** c-kit<sup>+</sup> CSC was obtained by enzyme digestion and immune magnetic bead separation. Then serum-free hypoxia model of c-kit<sup>+</sup> CSC was established in vitro. The models were randomly divided into hypoxia group, CGRP+hypoxia group, CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+hypoxia group and control group (no hypoxia). The activity of cells was detected by cell counting kit (CCK-8 kit), the apoptosis of cells were detected by flow cytometry (FCM) and mitochondrial membrane potential. **Results** Under hypoxia condition, compared with the control group, the activity of c-kit<sup>+</sup> CSC was significantly decreased in the hypoxia group ( $P<0.05$ ), but compared with the hypoxia group, the activity of c-kit<sup>+</sup> CSC was significantly increased in CGRP+hypoxia group at different time points of CGRP effect on hypoxia cells ( $P<0.05$ ), especially in 30 min and 60 min; When inhibiting the effect of CGRP on hypoxia, compared with CGRP+hypoxia group, the activity of c-kit<sup>+</sup> CSC was significantly decreased in the CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+hypoxia group at 30 min and 60 min after hypoxia ( $P<0.05$ ). In terms of apoptosis, compared with the control group, the early apoptosis rate was the highest in hypoxia group ( $P<0.05$ ); After CGRP treating c-kit<sup>+</sup> CSC in hypoxia, we could find that CGRP+hypoxia group had a lower early apoptosis rate ( $P<0.05$ ), when inhibiting the effect of CGRP on hypoxia, the early apoptosis rate was the highest in CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+hypoxia group, but there was no significant difference in early apoptosis rate between hypoxia group and CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+hypoxia group ( $P>0.05$ ). Mitochondrial membrane potential showed, compared with the hypoxia group, red fluorescence and green fluorescence ratio increased in

[收稿日期] 2016-01-20

[修回日期] 2016-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81360021);贵州省国际合作项目[黔科合外 G 字(2013)7037 号]

[作者简介] 龙仙萍, 硕士, 副主任医师, 主要从事心肌梗死后心肌细胞再生修复的基础及临床研究, E-mail 为 longxianping1201@163.com。郑小宇, 硕士。通讯作者石蓓, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心肌梗死后心肌细胞再生修复的基础及临床研究, E-mail 为 shibei2147@163.com。

CGRP+hypoxia group ( $P<0.05$ ), when inhibiting the effect of CGRP on hypoxia, compared with the CGRP+hypoxia, the red fluorescence and green fluorescence ratio decreased in CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+hypoxia group ( $P<0.05$ ). **Conclusion**

CGRP can promote the proliferation and survival of c-kit<sup>+</sup>CSC under hypoxia, and inhibit the early apoptosis of the cell.

心脏中含有干细胞特征的细胞群,它们具有多向分化潜能,能够自我更新并且维持心肌细胞内环境的稳定,被称之为心脏干细胞(cardiac stem cells, CSC)<sup>[1]</sup>。相关研究显示无论是通过移植或者动员内源性的心脏干细胞,均能够促进心肌再生和血管生成,从而改善心脏功能<sup>[2]</sup>。心脏干细胞表面标记有 c-kit、Sca-1、Islet-1、SSEA-1、MDR-1 等,其中, c-kit<sup>+</sup>心脏干细胞(c-kit<sup>pos</sup> cardiac stem cells, c-kit<sup>+</sup>CSC)具有最强的增殖能力,心脏干细胞对心肌修复中主要是 c-kit<sup>+</sup>CSC<sup>[3]</sup>。然而,无论是何种干细胞系,心肌梗死后恶劣微环境(缺血缺氧)使移植或动员的细胞存活率低,有文献报道干细胞通过心肌内或冠状动脉内注射到心肌后 1 周,仅有不到 5%的移植细胞被检测到<sup>[4]</sup>。如何增强固有或移植细胞抵御心肌梗死后恶劣微环境,增加细胞存活率并发挥效应,是当前的研究重点。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种扩血管神经肽,广泛分布于神经系统和心血管系统中<sup>[5]</sup>。在氧化应激条件下 CGRP 通过调节 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路来促进心肌细胞存活<sup>[6]</sup>。除此外,也有研究显示 CGRP 通过恢复大鼠心肌细胞 Bcl-2/Bax 活性抑制去甲肾上腺素诱导心肌细胞凋亡<sup>[7]</sup>,从上述可知 CGRP 可通过不同细胞凋亡途径抑制细胞凋亡作用。但 CGRP 对 c-kit<sup>+</sup>CSC 是否也有作用呢?为了进一步观察 CGRP 对 c-kit<sup>+</sup>CSC 的作用,本实验拟通过 CGRP 处理缺氧状态下 c-kit<sup>+</sup>CSC,观察 CGRP 对细胞存活及凋亡情况的影响,以期为心肌梗死后提高 c-kit<sup>+</sup>CSC 移植治疗效果提供实验室理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

随机选择清洁级 4~6 周龄 SD 小鼠,雌雄不限,购自第三军医大学实验动物中心。

### 1.2 主要试剂与溶液

Ham's/F-12 培养基(Hyclone),小鼠碱性成纤维生长因子(FGF- $\beta$ )(Peprotech),大鼠/小鼠 CGRP 多肽、大鼠/小鼠 CGRP<sub>8-37</sub>多肽(Phoenix Pharmaceuticals, INC),兔抗小鼠 RAMP1 多克隆抗体、兔抗小鼠 RCP 多克隆抗体、兔抗小鼠 CRLR 多克隆抗体

(Santa Cruz),线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)。

### 1.3 小鼠 c-kit<sup>+</sup>CSC 的获取

参考课题组前期细胞培养方法<sup>[8]</sup>,取 4~6 周龄小鼠全身肝素化后行颈椎脱臼处死,在无菌操作下迅速分离小鼠双侧心耳,充分剪碎成大小为 1 mm<sup>2</sup>的组织块;然后置于 15 mL 离心管中,加入 0.1% II 型胶原酶,于 37℃ 恒温水浴锅中边摇晃边消化约 1 h;1200 r/min 离心 5 min,弃上清。Ham's/F-12 完全培养基重悬并分装于细胞培养瓶内,37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育。

待细胞铺满瓶底至 80%~90%时,弃培养基,加入 0.05% 胰蛋白酶消化分离贴壁细胞,1200 r/min 离心 5 min,弃上清。1% BSA 封闭非特异性位点,含 1% FBS 的 Ham's/F-12 培养基 5 mL(不含双抗)重悬细胞,加入兔抗小鼠 c-kit 抗体(1:250),垂直混合仪上 4℃ 旋转孵育 1 h;1200 r/min 离心 5 min,弃上清,Ham's/F-12 培养基 3 mL 重悬细胞,加入羊抗兔二抗包被磁珠(1:150),再次置于垂直混合仪上,4℃ 孵育半小时。孵育完毕后将细胞悬液置于 DYNAL 磁力架上,移液枪轻轻吸除管中液体(不可触碰管壁一侧附着的棕褐色磁珠),培养基重悬细胞,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育,每隔 2 天全量换液一次。待 c-kit<sup>+</sup>CSC 铺满瓶底至 80%~90%时,流式细胞仪检测细胞表面抗原 c-kit、CD34 和 CD45 的表达。

### 1.4 建立体外 CSC 缺氧模型<sup>[9]</sup>

取 c-kit<sup>+</sup>CSC,并将培养基更换为无血清 Ham's/F-12 培养基后继续孵育 24 h,使细胞达到同步化状态。移至 37℃ 三气培养箱中进行缺氧处理,培养箱内 3 种气体比例分别为 N<sub>2</sub> 94%、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 1%,缺氧 12 h 进行后续实验。

### 1.5 CCK-8 法检测细胞生存活力

实验分为缺氧细胞组、CGRP+缺氧细胞组、CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组和对照组(不缺氧细胞),参考文献[7] CGRP<sub>8-37</sub>浓度为 1×10<sup>-6</sup> mol/L, CGRP 浓度为 1×10<sup>-8</sup> mol/L。各组处理时间分别为 0、10、30、60、90、120 min,未经任何处理的正常细胞为对照组,并设不接种细胞的空白孔,加入等体积 Ham's/F-12 培养液,每组各 5 个复孔。每孔加入

10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱内继续孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。

### 1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

实验分组同上,收集四组细胞,Ham's/F-12 完全培养基重悬细胞,取  $1 \times 10^5$  个重悬细胞,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合液+5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀并重悬细胞。室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$ )避光孵育 10 min 后,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 190  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合液+10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶(PI)染色液混匀并重悬细胞,冰浴避光放置。另设三管对照,分别为空白细胞管、仅加 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 管及仅加 10  $\mu\text{L}$  PI 管。上机前向各管中再加入 300  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合液,枪头轻轻吹打混匀,进行流式细胞仪检测。

### 1.7 线粒体膜电位检测细胞凋亡

分组同前,消化、离心收集细胞,Ham's/F-12 完全培养基重悬细胞,接种于 35 mm 培养皿中,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个。培养至 90% 融合后吸除培养基,用 PBS 洗涤细胞一次,加入 1 mL 细胞培养基及 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀。细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。在孵育期间,按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液(5 $\times$ )加入 4 mL 蒸馏水的比例,配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$ ),并放置于冰浴。37 $^{\circ}\text{C}$  孵育结束后,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$ )洗涤 2 次。加入 2 mL 细胞培养液,激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.8 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间资料比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 c-kit<sup>+</sup> CSC 的分离、培养及鉴定

原代 CSC 贴壁生长 10 天后,倒置显微镜下可

见细胞形态呈一致的长梭状或多角形,分布不均匀(图 1A)。待原代细胞基本铺满细胞瓶底时,行免疫磁珠分选法分选出 c-kit<sup>+</sup> CSC 继续培养,细胞生长大约 5 天时,高倍显微镜下可见细胞体积与未分选前相比稍有增大,形态不规则,周围附有数个半透明折光度强的圆形小磁珠(图 1B)。

磁珠分选后,待细胞生长达到 80% 融合时,选取三组生长良好的 CSC,每集约  $1 \times 10^6$  个细胞行 FACS 检测,结果示 CSC 表面抗原的表达情况为:c-kit 86.0%,CD34 4.0%,CD45 4.2%(图 2)。其结果与 Keith 等<sup>[3]</sup> 人心脏干细胞流式细胞仪鉴定结果一致。

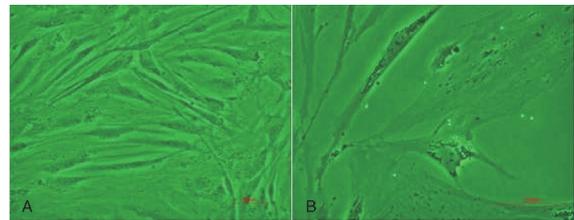


图 1. 原代 CSC 及 c-kit<sup>+</sup> CSC A 为原代培养 10 天 CSC(100 $\times$ ),B 为磁珠分选后 c-kit<sup>+</sup> CSC(200 $\times$ )。

Figure 1. The cultivation of rat c-kit<sup>+</sup> CSC

### 2.2 CGRP 对 c-kit<sup>+</sup> CSC 生存活力的影响

CGRP 作用缺氧 c-kit<sup>+</sup> CSC 后 10、30、60、90 及 120 min,CCK-8 法检测 CGRP 对细胞活力的影响,结果显示应用 CGPR 干预缺氧细胞后,与缺氧细胞组比较,细胞生存活力均增强,差异具有统计学意义,尤其以 CGPR 干预后 30 min 和 60 min 的差异更为明显;应用 CGRP 拮抗剂干扰 CGRP 作用后(CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组),与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP 对细胞的生存活力在 30 min 和 60 min 受到抑制,差异具有统计学意义,随着时间延长抑制作用不明显。细胞缺氧后其细胞生存活力较正常细胞(对照组)下降(表 1)。

表 1. CCK-8 法检测各组 c-kit<sup>+</sup> CSC 存活情况( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1. CCK-8 method was used to detect the survival of c-kit<sup>+</sup> CSC in each group( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

作用时间	对照组	缺氧细胞组	CGRP 组+缺氧细胞组	CGRP+CGRP <sub>8-37</sub> +缺氧细胞组
10 min	0.6914 $\pm$ 0.0043	0.6338 $\pm$ 0.013	0.6938 $\pm$ 0.010	0.6804 $\pm$ 0.0181
30 min	0.6977 $\pm$ 0.0071	0.6341 $\pm$ 0.0218	0.9111 $\pm$ 0.0172 <sup>a</sup>	0.8080 $\pm$ 0.0036 <sup>b</sup>
60 min	0.7285 $\pm$ 0.0117	0.6419 $\pm$ 0.0135	0.9185 $\pm$ 0.0102 <sup>a</sup>	0.8048 $\pm$ 0.0132 <sup>b</sup>
90 min	0.7344 $\pm$ 0.0099	0.6404 $\pm$ 0.0087	0.8411 $\pm$ 0.0138 <sup>a</sup>	0.8277 $\pm$ 0.0109
120 min	0.7628 $\pm$ 0.0187	0.6067 $\pm$ 0.0066	0.7987 $\pm$ 0.0060 <sup>a</sup>	0.8234 $\pm$ 0.0109

a 为  $P < 0.05$ ,与缺氧细胞组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 CGRP+缺氧细胞组比较。

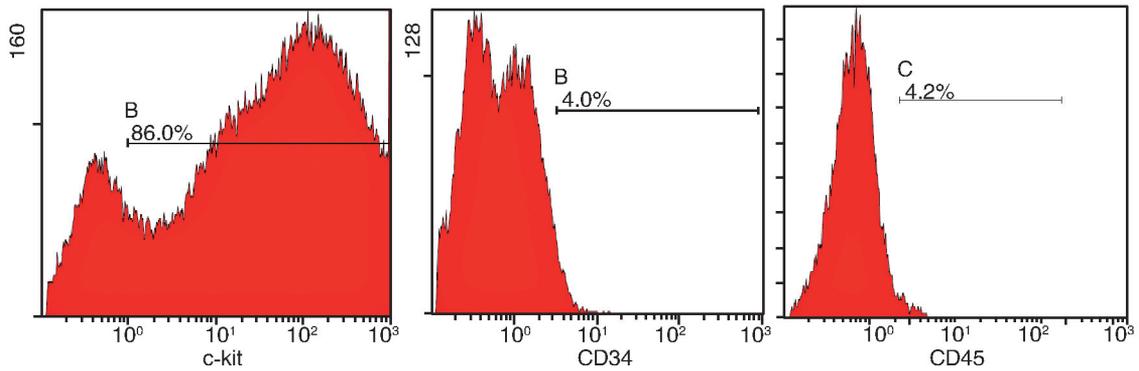


图 2. 流式细胞术检测 CSC 细胞表面抗原

Figure 2. CSC cell surface antigen was detected by flow cytometry

2.3 CGRP 对缺氧 c-kit<sup>+</sup>CSC 凋亡的影响

2.3.1 流式细胞术结果 使用流式细胞术检测 CGRP 对缺氧状态下 c-kit<sup>+</sup>CSC 凋亡的影响,结果显示与缺氧细胞组比较,CGRP+缺氧细胞组早期细胞凋亡率明显降低,存活细胞数增加 ( $P<0.05$ ),且晚期细胞凋亡率也比缺氧细胞组降低 ( $P<0.05$ );但阻

断 CGRP 作用后,与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+ $CGRP_{8-37}$ +缺氧细胞组早期及晚期细胞凋亡率增加,存活细胞数目减少 ( $P<0.05$ )。与缺氧细胞组比较,CGRP+ $CGRP_{8-37}$ +缺氧细胞组早期及晚期细胞凋亡率减少,细胞存活数目增加,但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ;图 3)。

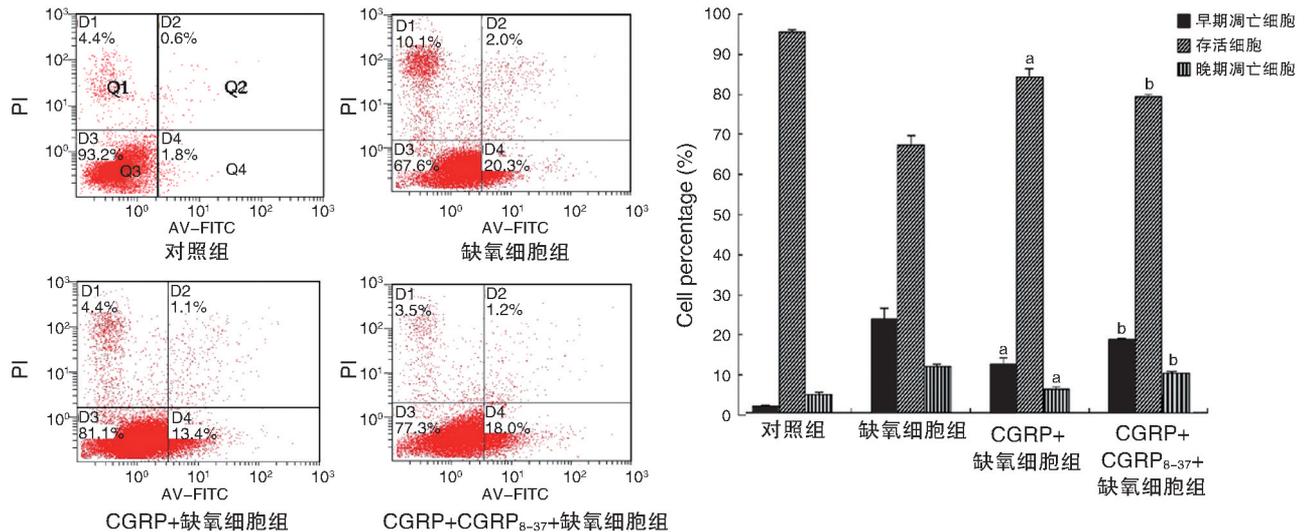


图 3. 流式细胞仪检测 CGRP 对缺氧 c-kit<sup>+</sup>CSC 细胞存活的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) Q1 为坏死细胞, Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为存活细胞, Q4 为早期凋亡细胞。a 为  $P<0.05$ , 与缺氧细胞组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 CGRP+缺氧细胞组比较。

Figure 3. The influence of CGRP on c-kit<sup>+</sup>CSC survival by Flow cytometry ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

2.3.2 免疫荧光技术检测线粒体膜电位 与缺氧细胞组比较, CGRP+缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值增高 ( $P<0.05$ ) (表示早期凋亡的细胞减少), 加入 CGRP 拮抗剂后, 与 CGRP+缺氧细胞组比较, CGRP+ $CGRP_{8-37}$ +缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值降低 ( $P<0.05$ ) (表示早期凋亡的细胞增多), 且与缺氧细胞组相比差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ; 图 4 和图 5)。

3 讨论

c-kit<sup>+</sup>CSC 是目前修复梗死心肌的理想候选细胞, 但 c-kit<sup>+</sup>CSC 与其它干细胞一样均逃脱不了移植后细胞存活率低的问题<sup>[10]</sup>。细胞生存活力主要体现在两方面: 即细胞早期凋亡量减少和增殖量升高, 最终可使存活细胞数增加。而细胞凋亡是程序性细胞死亡的形式之一, 其中有多因素和多基因参

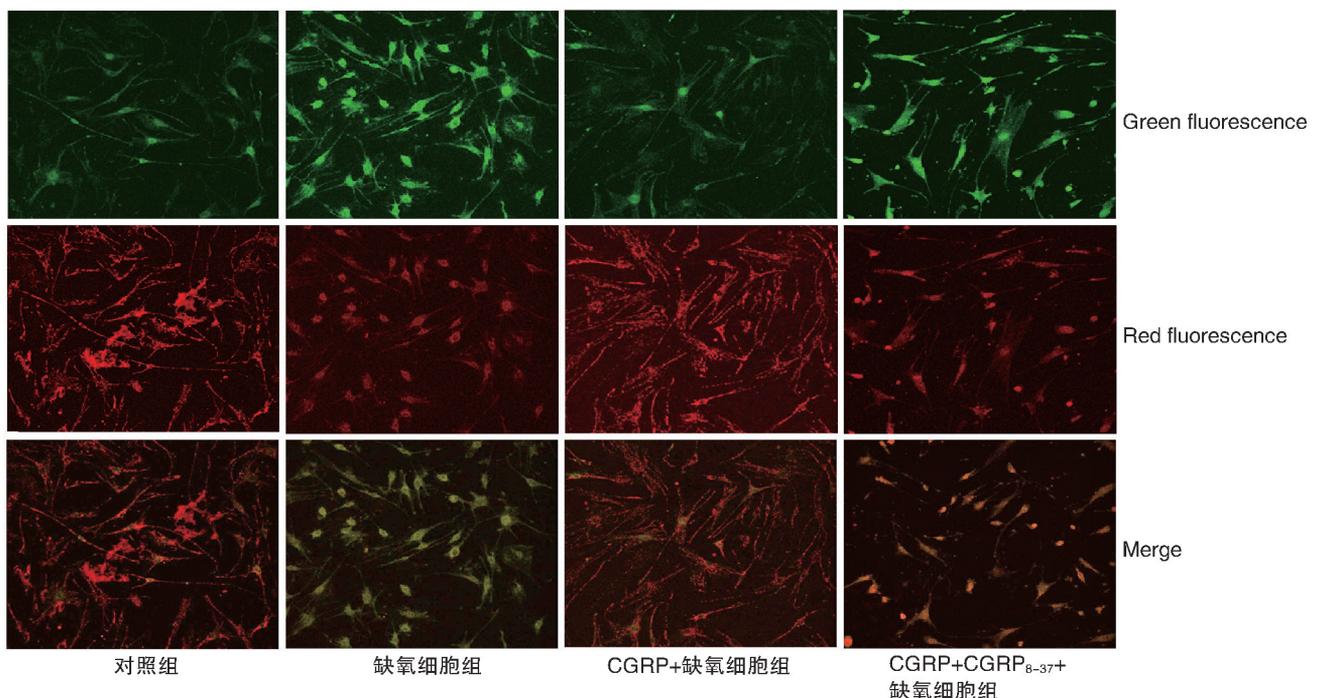


图 4. JC-1 检测 CGRP 对缺氧状态下  $c\text{-kit}^+$ CSC 凋亡的影响 (200 $\times$ )

Figure 4. The influence of CGRP on apoptosis of  $c\text{-kit}^+$ CSC in hypoxia by JC-1 detection (200 $\times$ )

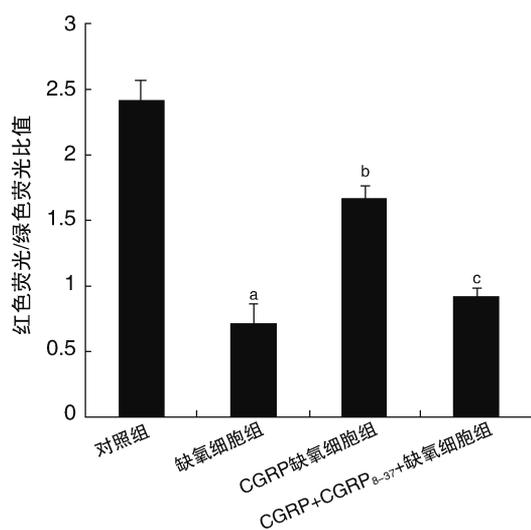


图 5. 各组红色荧光/绿色荧光比值 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缺氧细胞组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 CGRP+缺氧细胞组比较。

Figure 5. The red/green fluorescence ratio ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

与调控。当细胞受到各种不利因素作用后,例如,缺血缺氧环境,细胞内预存的凋亡程序被激活,凋亡相关基因表达从而引起程序性的细胞死亡增加。本课题为了进一步观察缺氧环境中  $c\text{-kit}^+$ CSC 存活情况,建立  $c\text{-kit}^+$ CSC 缺氧模型,流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示:与对照组比较,缺氧  $c\text{-kit}^+$ CSC 早、晚期凋亡率及死亡率均最高,存活率最低 ( $P <$

0.05)。体外实验结果与 Ellison 等<sup>[10]</sup>人研究结果一致,恶劣的微环境(缺血缺氧环境)使细胞早晚期凋亡增加,因而使移植或固有细胞发挥效应作用明显减弱。如何增加移植或固有细胞抵御恶劣微环境来增加细胞存活率是目前研究干细胞研究的重点问题。

CGRP 广泛分布于神经系统和心血管系统中,其治疗脑血管疾病已得到公认,其作用机制与抑制炎症因子生成及促进血管生成有关。除此外,也有研究显示:使用 CGRP 处理后的单核巨噬细胞及树突状细胞能够抑制  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-12p40}$  和  $\text{CCL4}$  等炎症因子产生<sup>[11]</sup>。目前多项研究显示 CGRP 在心血管系统中的保护作用。Sueur 等<sup>[12]</sup>人研究显示: $\text{H}_2\text{O}_2$  模拟氧化应激状态诱导 H9c2 心肌细胞损伤,使用 CGRP 预处理后则可以减少一半的细胞凋亡,增强细胞的存活能力。除此外也有研究显示 CGRP 可通过上调  $\text{Bcl-2/Bax}$  的比值来抑制去甲肾上腺素诱导的心肌细胞凋亡<sup>[7]</sup>。前期课题研究显示 CGRP 抑制血管平滑肌细胞凋亡,减轻血管成形术后再狭窄<sup>[13]</sup>。上述研究表明 CGRP 可以调节多种细胞免受炎症因子作用,除此外还可抑制多种细胞凋亡。

那么 CGRP 对  $c\text{-kit}^+$ CSC 是否也会发挥同样的效应? 目前国内外文献尚未见报道。本实验建立细胞缺氧模型,应用 CGRP 作用缺氧  $c\text{-kit}^+$ CSC 不同时间,

CCK-8 法检测结果显示:与缺氧细胞组比较,加 CGRP 作用缺氧细胞后细胞活力增强,尤其以 CGRP 干预后 30 min 和 60 min 的差异更为明显,与缺氧细胞组比较差异均有显著性;应用 CGRP 拮抗剂拮抗 CGRP 作用后,CGRP 对缺氧细胞增殖活力影响在 30 min 和 60 min 明显较弱,但随着拮抗时间延长抑制作用不明显增加。以上说明 CGRP 对缺氧细胞的增殖活性有影响作用。对凋亡影响研究显示:与缺氧细胞组比较,CGRP+缺氧细胞组早晚期细胞凋亡率均降低,存活细胞数增加;但阻断 CGRP 作用后,与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组早期及晚期细胞凋亡率增加,存活细胞数目减少。与缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组早期及晚期细胞凋亡率减少,细胞存活数目增加,但差异无统计学意义。上述实验观察到 CGRP 能够抑制缺氧下 c-kit<sup>+</sup>CSC 凋亡作用,为了进一步证实 CGRP 对缺氧 c-kit<sup>+</sup>CSC 凋亡的影响,本实验从另一种凋亡途径观察细胞凋亡的情况。

众所知之,线粒体通路在细胞凋亡信号转导途径中有着重要的意义,凋亡诱导信号等可作用于线粒体膜,使其跨膜电位明显下降和膜转换孔开放,导致线粒体膜通透性增高、凋亡蛋白酶 9 前体激活、凋亡诱导因子表达增加及细胞色素 C 释放等<sup>[14]</sup>。特异性的抑制线粒体通路还可以保护心肌细胞而避免其损伤<sup>[15-16]</sup>。因而,本实验拟从线粒体膜电位变化情况来间接反映 CGRP 对细胞凋亡的影响,结果显示与缺氧细胞组比较,CGRP+缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值增高,说明早期存活细胞多,加入 CGRP 拮抗剂后,与 CGRP+缺氧细胞组比较,CGRP+CGRP<sub>8-37</sub>+缺氧细胞组红色荧光/绿色荧光比值降低,说明早期凋亡的细胞增多;线粒体膜电位的变化进一步支持流式细胞仪检测细胞凋亡的结果。

本研究建立体外细胞缺氧模型,观察到 CGRP 能够促进缺氧 c-kit<sup>+</sup>CSC 增殖活力增强,抑制细胞早期凋亡,这对增强心脏干细胞抵御移植后不利微环境的能力、提高其治疗效果提供了新的方向。

#### [参考文献]

- [1] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Mechanisms of myocardial regeneration[J]. Trends Cardiovasc Med, 2011, 21(2): 52-58.
- [2] Cai C, Guo Y, Teng L, et al. Preconditioning human cardiac stem cells with an HO-1 inducer exerts beneficial effects after cell transplantation in the infarcted murine heart [J]. Stem Cells, 2015, 33(12): 3 596-607.
- [3] Keith MC, Bolli R. "String theory" of c-kit( pos) cardiac cells: a

new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results [J]. Circ Res, 2015, 116(7): 1 216-230.

- [4] Kara A, Akin S, Ince C. The response of the microcirculation to cardiac surgery [J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2016, 29(1): 85-93.
- [5] Recobera A, Russob A F. Calcitonin gene-related peptide: an update on the biology [J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3): 241-246.
- [6] Umoh NA, Walker RK, Millis RM, et al. Calcitonin gene-related peptide regulates cardiomyocyte survival through regulation of oxidative stress by PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. Ann Clin Exp Hypertens, 2014, 2(1): 1 007.
- [7] Ma YX, Guo Z, Sun T. CGRP inhibits norepinephrine induced apoptosis with restoration of Bcl-2/Bax in cultured cardiomyocytes of rat [J]. Neurosci Lett, 2013, 549: 130-134.
- [8] Shi B, Long X, Zhao R, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells carrying the human receptor activity-modifying protein 1 gene improves cardiac function and inhibits neointimal proliferation in the carotid angioplasty and myocardial infarction rabbit model [J]. Exp Biol Med, 2014, 239(3): 356-365.
- [9] Pellitteri R, Catania MV, Bonaccorso CM. Viability of olfactory ensheathing cells after hypoxia and serum deprivation: implication for therapeutic transplantation [J]. J Neurosci Res, 2014, 92(12): 1 757-766.
- [10] Ellison G, Vicinanza C, Smith AJ, et al. Adult c-kit<sup>pos</sup> cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair [J]. Cell, 2013, 154(12): 827-842.
- [11] Altmayr F, Jusek G, Holzmann B. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide causes repression of tumor necrosis factor transcription and suppression of ATF-2 promoter recruitment in Toll-like receptor-stimulated dendritic cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(6): 3 525-531.
- [12] Sueur S, Pesant M, Rochette L, et al. Antiapoptotic effect of calcitonin gene-related peptide on oxidative stress-induced injury in H9c2 cardiomyocytes via the RAMP1/CRLR complex [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39(6): 955-963.
- [13] 石蓓, 璀璨, 龙仙萍, 等. CGRP 修饰的间充质干细胞及其 CGRP 受体对血管平滑肌细胞增殖及表型转化的影响 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(30): 2 372-376.
- [14] Marín-García J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21(2): 123-136.
- [15] Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, et al. Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the American heart association [J]. Circ Res, 2016, PMID: 27126807.
- [16] Huang H, Wu K, You Q. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(2): 396-402.

(此文编辑 许雪梅)