

多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷ 抑制心肌分化的细胞实验研究

许 耿^{1,2}, 朱金改¹, 喻博识¹, 韩树萍¹, 顾海涛², 余章斌¹

摘要 目的 前期发现多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可在动物水平显著抑制胚胎期心脏发育。该研究拟进一步在 P19 细胞系水平探究³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷抑制心肌分化的作用和机制。**方法** 利用 PepDraw Tool、Uniprot 和 ProtParam 在线生物信息学分析网站,对多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷的结构、保守性和理化性质进行生物信息学分析。在荧光显微镜下观察 FITC 标记的多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷进入 P19 细胞的情况。通过倒置显微镜观察多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷对 P19 细胞分化的影响。实时定量 PCR 及蛋白质免疫印迹法检测多肽对心肌分化标志基因肌钙蛋白 cTnT 和转录因子 GATA4 表达的影响。实时定量 PCR 检测多肽对 Notch1 信号通路关键分子 Notch1 和下游 Hey1 及 Hey2 的影响。**结果** 生物信息学分析结果显示多肽位于其前体蛋白 Talin 的 301~307 氨基酸位点,其分子量小、结构稳定、亲脂性高,且前体蛋白保守性高。荧光显微镜下可见 FITC 标记的多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可以穿过细胞膜进入 P19 细胞内。与对照组比较,多肽组细胞部分坏死,生长形态紊乱,细胞厚薄不一。实时定量 PCR 与蛋白质免疫印迹法检测显示,与对照组比较,多肽组的分化相关基因 GATA4 及 cTnT 的 mRNA 及蛋白表达量均有不同程度下降。实时定量 PCR 检测显示,与对照组比较,多肽组 Notch1 通路的相关

基因 Notch1、Hey1 及 Hey2 的 mRNA 表达均有不同程度下降。**结论** 多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷可能是通过抑制 Notch1 通路关键因子的表达发挥抑制心肌分化的生物功能。

关键词 法洛四联症; 心肌分化; 内源性多肽; Notch1 信号通路; P19 细胞系

中图分类号 R 331.3+6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)02-0238-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.013

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)由各种因素导致的胚胎时期心脏和血管发育障碍,造成心脏形态、功能及病理生理异常^[1-2]。心脏发育是一个时空调控的过程,包括对基因表达和信号通路的精确控制,如 Notch 信号通路,以及一系列重要的形态变化,而心肌分化是心脏发育的一个重要组成部分,心肌分化的异常往往是导致 CHD 发生的关键^[3]。多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷是从法洛四联症流产胎儿心肌组织中发现的一条生物学活性肽^[4]。前期的研究揭示该多肽可以抑制斑马鱼的心脏发育,导致斑马鱼胚胎期心脏的发育及功能异常^[5],但其在细胞水平抑制心肌分化的影响及机制尚无报道。P19 细胞是来源于小鼠畸胎瘤中的多功能干细胞,具有自我复制能力和分化潜能,是研究胚胎期心肌分化的良好的细胞模型^[6-7]。因此,该研究拟在 P19 细胞水平检测多肽³⁰¹ LARSLKT³⁰⁷对心肌细胞分化的影响,并初步探究其发挥功能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

2020-08-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81870240); 南京市卫生科技发展专项资金杰出青年项目(编号: JQX18010)

作者单位: ¹ 南京医科大学附属妇产医院(南京市妇幼保健院) 儿科, 南京 210004

² 南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院) 小儿心胸外科, 南京 210029

作者简介: 许 耿,男,硕士研究生;

余章斌,男,副主任医师,研究生导师,责任作者, E-mail: zhangbinyu@njmu.edu.cn

blank control group, the mRNA and protein levels of EZH2 decreased in the model group ($P < 0.05$), and further decreased in the experimental group ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the mRNA and protein levels of Nrf2, NQO1 and HO-1 increased in the model group ($P < 0.05$), and further increased in the experimental group ($P < 0.05$). Chip results showed that the level of H3K27me3 in the model group was lower than that in the blank control group ($P < 0.05$), and further decreased in the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** The down-regulation of EZH2 expression in ADLI and the inhibition of EZH2 expression can alleviate the degree of liver injury. The effect of EZH2 on ADLI may be realized through the modification of H3K27me3 in the Nrf2 promoter region, and then through the regulation of Nrf2-ARE antioxidant stress pathway.

Key words anti-tuberculosis drug liver injury; EZH2; Nrf2-ARE pathways; H3K27me3

1.1.1 试剂与主要仪器 TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒、SYBR Green Master Mix(日本 TaKaRa 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司); PBS、 α -MEM 培养基、FBS 胎牛血清、青霉素-链霉素(美国 Gibco 公司); Dapi(4,6-二氨基-2-苯基吡啶, Sigma); 0.25% 胰蛋白酶(美国 Servicebio 公司); Real-time PCR 仪(型号: ViiA7, 美国 UVP 公司); 恒温培养箱(上海茸研仪器公司); 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); 兔抗人 cTnT 和 GATA4 抗体(武汉三鹰公司); 羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司)。

1.1.2 细胞 P19 细胞购自美国典型培养物保藏中心。

1.1.3 多肽 多肽 LARSLKT、乱序肽 ALKTLRS 和 FITC 标记的多肽 FITC-LARSLKT 均委托上海科肽公司合成。

1.2 方法

1.2.1 P19 细胞培养与分化 将 P19 细胞置于 α -MEM 完全培养基(含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素)中,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每隔 2 d 更换 1 次新鲜培养液,待细胞融合度达到 90% 左右时,用胰酶进行消化,并依据细胞的生长状况按一定比例进行传代培养。取对数生长期的 P19 细胞进行消化,并将消化后的细胞置于诱导培养基(在 α -MEM 完全培养基中加入 1% DMSO 即为诱导培养基)中,调整其细胞浓度为 1×10^6 /ml,取 15 ml 细胞悬液加入到直径 9 cm 的培养皿中,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每隔 2 d 更换 1 次新鲜的诱导培养基。诱导当天记为第 0 天,3~4 d 后细胞开始聚集形成类胚体,将其转移到 6 孔培养板中,每孔 10 个类胚体,并换成 α -MEM 完全培养基继续培养,每隔 2 d 更换 1 次新鲜的 α -MEM 完全培养基。在诱导细胞分化的第 0、4、10 天,用倒置显微镜观察形态变化并收集细胞提取 RNA。

1.2.2 多肽的基本生物信息学分析 在线 Pep-Draw Tool (<http://www.tulane.edu/>) 和 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具绘制多肽的结构和分析其理化性质,通过 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 蛋白数据库确定该肽在前体蛋白中的位置,Blast 法分析该条多肽的保守性。

1.2.3 荧光多肽入胞实验 在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中,用 α -MEM 完全培养基培养 P19 细胞,每隔 2 d 换 1 次培养液,至 50% 左右融合度时加入荧光

素标记多肽,培养箱孵育 1 h,用甲醇固定 10 min,加入 Dapi 对细胞核进行染色,并进行图像采集。

1.2.4 RNA 提取、反转录、定量 PCR 收集诱导第 0、4、10 天的细胞,按说明书所述,总 RNA 用 TRIzol 分离提取 RNA。通过 TaKaRa 反转录试剂盒对 RNA 反转录。实时定量 PCR 采用 SYBR Green Master Mix 在 Real-Time PCR 仪中进行,结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析,所有目的基因通过 GAPDH 作归一化处理,引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 目的基因的引物

| 目的基因 | 正向引物 | 反向引物 |
|--------|------------------------------|------------------------------|
| Notch1 | 5'-GATGGCCTCAATGGGTACAAG-3' | 5'-TCGTGTGTGTGATGTCACAGT-3' |
| Hey1 | 5'-GGCGGACGAGAATGAAA-3' | 5'-TCAGGTGATCCACAGTCATCTG-3' |
| Hey2 | 5'-AAGCGCCTTGTGAGGAAAC-3' | 5'-GCTAGTGTGCGGTAATTGGAC-3' |
| GATA4 | 5'-CCAACTGCCAGACTACCAC-3' | 5'-GGACCAGGCTGTCCAAGA-3' |
| cTnT | 5'-TGAGACAGAGGAGGCAACGTAG-3' | 5'-CTGCCTTCTCTCCCGCTCAT-3' |
| GAPDH | 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' | 5'-TCCACCACCCCTGTGCTGTA-3' |

1.2.5 蛋白质免疫印迹实验(Western blot) 收集诱导分化第 10 天的细胞,使用 RIPA 法提取总蛋白,并添加蛋白酶抑制剂(PMSF),BCA 法检测蛋白浓度。SDS/PAGE 凝胶分离蛋白,并将蛋白转移到 PVDF 膜上,使用 GATA4、cTnT 及 GAPDH 抗体孵育蛋白,最后用超敏 ECL 化学发光试剂盒检测曝光蛋白条带,并将 GAPDH 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷的生物信息学分析 生物信息学分析结果揭示,多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷由 7 个氨基酸组成(图 1A),相对分子质量为 787.49 kDa,等电点的 pH 值为 11.52,净电荷为 2 e,疏水性为 +11.22 Kcal/mol,不稳定指数为 59.21。通过 UniProt 网站分析发现其位于 Talin 蛋白的 301~307 氨基酸位点,并发现其在人、大鼠、小鼠、马、鸡 Talin 蛋白的该段多肽序列高度一致(图 1B),提示多肽的保守性较高,可能在生物的生命进程中发挥重要作用。

2.2 FITC 标记多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷对 P19 细胞的亲和力研究 为了探究多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷对 P19 细胞的亲和力,本研究向融合度约 50% 的 P19 细胞加入 FITC 标记的多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷,结果中发现 P19

细胞中富集绿色荧光(图2),表明多肽可以进入P19细胞。

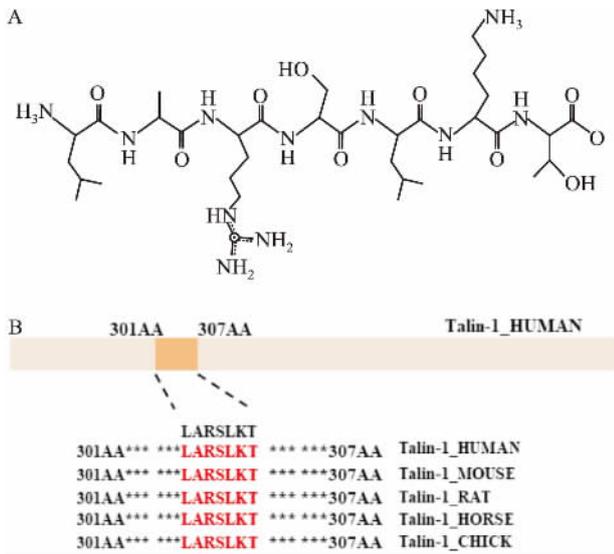


图1 多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷的生物信息学分析
A: 多肽的结构; B: 多肽前体蛋白保守性分析

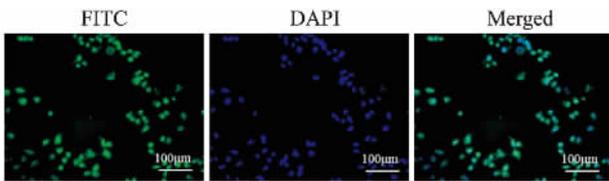


图2 FITC 标记多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷对 P19 细胞的亲和力研究

2.3 多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷抑制 P19 细胞分化 为了研究多肽能否抑制细胞分化,使用倒置显微镜观察 P19 细胞诱导分化成心肌的过程。诱导分化第 4 天,与对照组及乱序肽组比较,多肽组生成的细胞体不规则,边缘粗糙不平,形态较差。诱导分化第 10 天,对照组及乱序肽组以胚胎样小体为中心均匀向四周辐散生长,而多肽组细胞部分碎裂,向外生长形态紊乱,细胞厚薄不一(图 3)。结果提示多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷可抑制 P19 细胞分化。

2.4 多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷抑制 P19 细胞分化相关

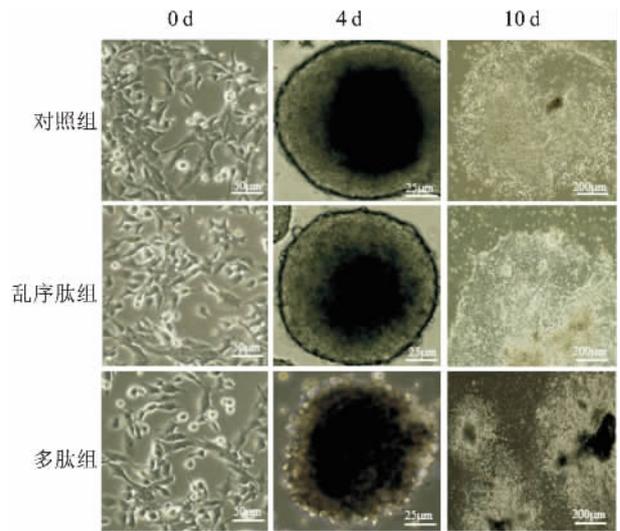


图3 多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷抑制 P19 细胞分化

基因表达 为了进一步研究多肽对 P19 细胞分化的影响,本研究对心肌分化标志物 GATA4 及 cTnT 进行了 qPCR 检测。结果表明,与对照组及乱序肽组比较,多肽组的心肌分化标志物 GATA4 及 cTnT 基因 mRNA 表达在诱导分化第 4 天及第 10 天下降,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 2、3、图 4A、B),提示多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷可抑制 P19 分化标志基因 mRNA 的表达。Western blot 实验显示,与对照组 GATA4 (0.54 ± 0.03) 和 cTnT (0.47 ± 0.05) 及乱序肽组 GATA4 (0.57 ± 0.02) 和 cTnT (0.47 ± 0.01) 比较,多肽组的心肌分化标志物 GATA4 (0.28 ± 0.02) 和 cTnT (0.19 ± 0.01) 的蛋白表达量下降,GATA4 表达差异有统计学意义($F = 132.698, P < 0.001$),cTnT 表达差异有统计学意义($F = 47.489, P < 0.001$) (图 4C、D),提示多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷可抑制 P19 分化标志基因 GATA4 和 cTnT 的蛋白表达。

2.5 多肽³⁰¹LARSCLKT³⁰⁷可能通过抑制 Notch1 信号通路表达,发挥抑制 P19 细胞分化作用 为了研究多肽对 P19 细胞分化的可能作用机制,本研究收

表 2 第 4 天各组基因 mRNA 相对表达量

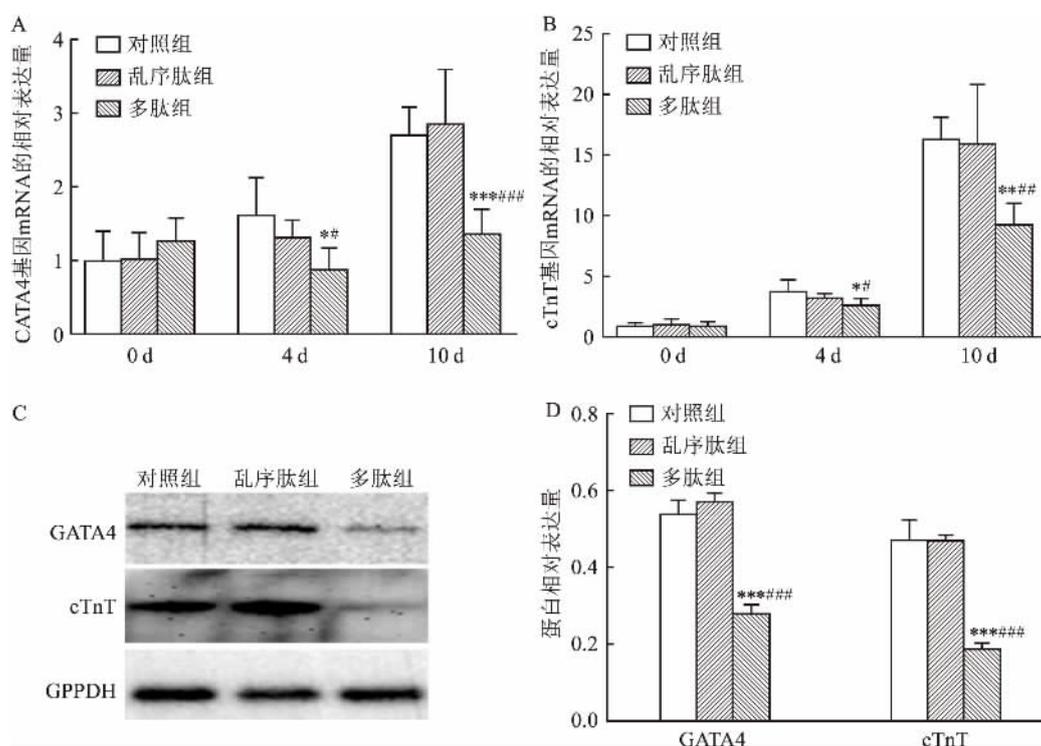
| 组别 | GATA4 | cTnT | Notch1 | Hey1 | Hey2 |
|-----|----------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| 对照 | 1.60 ± 0.51 | 3.86 ± 0.73 | 1.05 ± 0.12 | 1.10 ± 0.15 | 3.42 ± 0.93 |
| 乱序肽 | 1.32 ± 0.21 | 3.26 ± 0.25 | 1.03 ± 0.13 | 1.15 ± 0.19 | 2.72 ± 0.69 |
| 多肽 | 0.88 ± 0.27* # | 2.60 ± 0.48* # | 0.64 ± 0.17* # | 0.98 ± 0.03 | 2.10 ± 0.13* # |
| F 值 | 5.290 | 6.620 | 12.568 | 0.717 | 3.801 |
| P 值 | 0.070 | 0.021 | 0.000 | 0.581 | 0.020 |

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与乱序肽组比较: # $P < 0.05$

表3 第10天各组基因 mRNA 相对表达量

| 组别 | GATA4 | cTnT | Notch1 | Hey1 | Hey2 |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 对照 | 2.70 ± 0.37 | 16.31 ± 1.74 | 1.23 ± 0.09 | 1.49 ± 0.22 | 6.77 ± 0.74 |
| 乱序肽 | 2.86 ± 0.72 | 16.00 ± 4.67 | 1.23 ± 0.14 | 1.59 ± 0.31 | 6.07 ± 1.24 |
| 多肽 | 1.36 ± 0.32* # | 9.28 ± 1.64* # | 0.39 ± 0.05* # | 1.08 ± 0.16* # | 4.03 ± 0.64* # |
| F 值 | 13.149 | 10.341 | 141.957 | 6.381 | 12.674 |
| P 值 | 0.001 | 0.002 | 0.000 | 0.005 | 0.000 |

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与乱序肽组比较: # $P < 0.05$

图4 多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷抑制 P19 细胞分化相关基因 mRNA 及其蛋白表达

A: GATA4 基因 mRNA 的相对表达量; B: cTnT 基因 mRNA 的相对表达量; C: 分化第 10 天心肌的 cTnT 蛋白及 GATA4 蛋白的表达; D: 蛋白的相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与乱序肽组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

集了诱导分化第 0、4、10 天的 P19 细胞,对心脏发育相关通路 Notch1 信号通路的 Notch1 受体及靶基因 Hey1 及 Hey2 进行了 qPCR 检测,与对照组和乱序肽组比较,除第 4 天 Hey1 组外,多肽组的 Notch1、Hey1 及 Hey2 基因 mRNA 表达在第 4 天及第 10 天均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2、3 和图 5),提示多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷可能通过抑制 Notch1 通路来影响 P19 细胞分化。

3 讨论

CHD 是新生儿围产期死亡的主要原因之一,是最常见的出生缺陷。近年来,研究发现多肽能够影响心脏的发育与功能,多肽作为参与心肌分化调控的关键因子,与心血管疾病的发生密切相关^[8]。多肽 ELABELA 可作为内源性的生长因子激活胚胎干

细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,从而改变细胞周期,维持胚胎干细胞正常的自我增殖,对血管和心脏的发育至关重要^[9]。多肽能与膜受体、蛋白质相互作用,特异性识别结合细胞表面的受体,从而发挥激动剂、抑制剂或变构调节剂的功能,调控受体下游的信号通路,发挥其生物学功能^[10]。

多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷是本课题组从法洛四联症流产胎儿心肌组织表达图谱中发现的一条表达异常的内源性多肽,前期研究发现多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷可以影响斑马鱼胚胎的心脏发育及功能,其可能是介导 CHD 发生的原因之一^[5]。该多肽来源于 Talin 蛋白,生物学活性多肽往往发挥与前体蛋白相关的功能。已有研究报道 Talin 蛋白是细胞黏附的关键蛋白,参与维持心脏 Z 盘稳定和內皮完整性,提示多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷可能在心脏的功能及结构的维持方

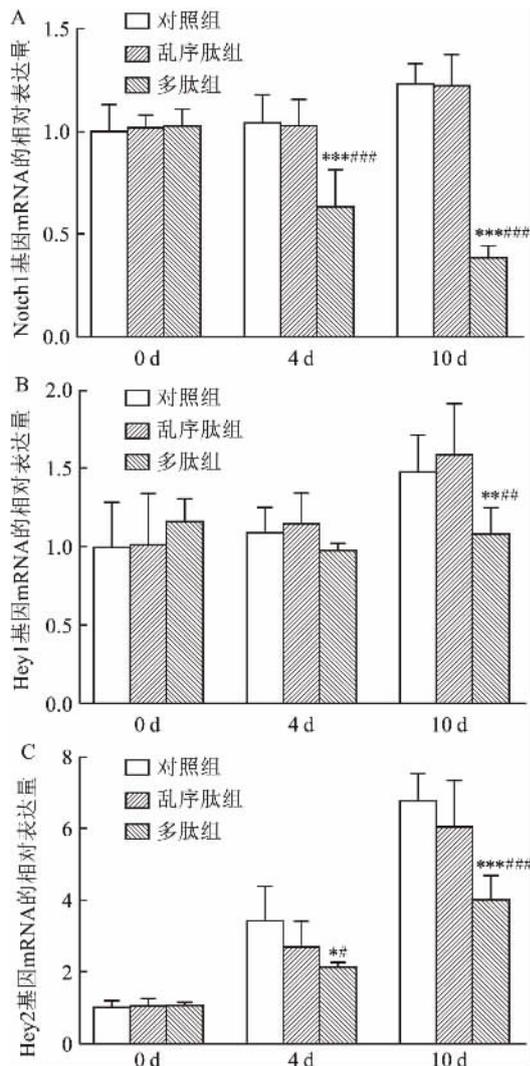


图5 多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷抑制Notch1信号通路相关基因mRNA表达

A: Notch1 基因 mRNA 的相对表达量; B: Hey1 基因的 mRNA 相对表达量; C: Hey2 基因的 mRNA 相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与乱序肽组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

面具有重要意义^[11]。

对多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷进行了生物信息学分析,发现该多肽位于 Talin 蛋白的 301 ~ 307 氨基酸位点,其分子量小、稳定性高、脂溶性好、保守性高,进一步的亲和力实验证实了该多肽可以进入细胞来发挥其作用。胚胎样小体的形成是 P19 细胞分化为心肌细胞过程中的关键环节。在对 P19 细胞进行分化处理后发现,加入多肽的胚胎样小体在诱导分化第 4 天呈现形态不规则,边缘毛糙,状态较差;将形成的胚胎小体进行贴壁处理,加入多肽的细胞部分碎裂,向外生长形态紊乱,细胞厚薄不一,提示多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷能够抑制 P19 细胞形成胚胎样小体。同

时,本研究对诱导分化的 P19 细胞的分化标志基因 cTnT 及 GATA4 进行了检测。cTnT 是一种提示心肌晚期分化的心肌特异性蛋白,GATA4 属于心脏 GATA 亚家族,是心脏发育的重要转录因子。发现多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷能够抑制 P19 细胞心肌分化基因 mRNA 及其蛋白的表达。综上所述,多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷能够抑制 P19 细胞分化心肌

Notch1 信号通路在心室肌小梁形成和 EMT 等心脏发育的过程中起着重要作用,同时也是心肌分化的关键通路。Notch1 基因主要表达于原始心血管流出道内膜层,它对原始心血管内膜细胞亚类的调节具有重要意义,该基因也是 Hey1 和 Hey2 基因的上游基因。有研究报道 Hey1 基因缺失的纯合小鼠死于生后的第 1 周,该小鼠出现了三尖瓣畸形、室间隔缺损和法洛四联症,血流动力学分析还显示了小鼠左心室功能的下降^[12];敲除 Hey2 基因的小鼠会出现一个大的膜性室间隔缺损,同时伴随有双侧心室肥大^[13]。本研究对 Notch1、Hey1 和 Hey2 基因的表达进行了检测,发现多肽组 Notch1、Hey1 和 Hey2 基因的表达低于对照组及乱序肽组,表明多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷可以影响 Notch1 信号通路关键基因 Notch1、Hey1 和 Hey2 的表达。这提示了多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷对 P19 细胞分化的抑制作用可能是通过下调 Notch1 信号通路的表达来完成的,但其具体机制需要进一步的研究,例如采取转录组学,挽救实验等验证多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷对 Notch1 信号通路的调控作用。

综上所述,本文研究了多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷在细胞水平对心脏发育的影响,发现其能抑制 P19 细胞的分化,其作用可能是通过下调 Notch1 信号通路的表达来完成的。这为 CHD 的预防提供了新思路 and 实验依据,但由于心脏发育是多基因多通路共同调控作用的结果,多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷抑制心脏发育的具体机制以及参与其中相互作用的其他信号仍有待进一步研究。

参考文献

[1] Liu Y, Chen S, Zuhlke L, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970 - 2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies [J]. International Journal of Epidemiology, 2019, 48(2): 455 - 63.

[2] Arslani K, Roffler N, Zurek M, et al. Patterns of incidence rates of cardiac complications in patients with congenital heart disease [J]. Can J Cardiol, 2018, 34(12): 1624 - 30.

[3] Gunthel M, Barnett P, Christoffels V M. Development, prolifera-

- tion, and growth of the mammalian heart [J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26(7): 1599–609.
- [4] Zhang J, Liang D, Cheng Q, et al. Peptidomic analysis of fetal heart tissue for identification of endogenous peptides involved in tetralogy of fallot [J]. *DNA and Cell Biology*, 2017, 36(6): 451–61.
- [5] 胡银, 刘恒, 严湘芸, 等. 多肽³⁰¹LARSLKT³⁰⁷对斑马鱼胚胎早期心脏发育的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5): 678–84.
- [6] Cheng Z, Zhang Q, Yin A, et al. The long non-coding RNA uc.4 influences cell differentiation through the TGF-beta signaling pathway [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(2): e447.
- [7] Kanungo J. Retinoic acid signaling in P19 stem cell differentiation [J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(9): 1184–98.
- [8] Dorr K M, Conlon F L. Proteomic-based approaches to cardiac development and disease [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 48(23): 150–7.
- [9] Ho L, Tan S Y, Wee S, et al. ELABELA is an endogenous growth factor that sustains hESC self-renewal *via* the PI3K/AKT pathway [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(4): 435–47.
- [10] 李 芸, 王 菲, 王 兴, 等. 内源性多肽的潜在作用方式与功能预测 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2017, 25(1): 41–3.
- [11] Wu Q, Zhang J, Koh W, et al. Talin1 is required for cardiac Z-disk stabilization and endothelial integrity in zebrafish [J]. *FASEB Journal*, 2015, 29(12): 4989–5005.
- [12] Luxan G, Damato G, Macgrogan D, et al. Endocardial Notch signaling in cardiac development and disease [J]. *Circ Res*, 2016, 118(1): e1–18.
- [13] Macgrogan D, Munch J, De La Pompa J L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2018, 15(11): 685–704.

Effect of peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ on myocardial differentiation

Xu Geng^{1,2}, Zhu Jingai¹, Yu Boshi¹, et al

(¹Dept of Pediatric, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004; ²Dept of Pediatric Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029)

Abstract Objective Previous study has found that peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ can significantly inhibit fetal cardiac development *in vivo*. This study intends to further explore the role and mechanism of ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ in inhibiting myocardial differentiation at P19 cell. **Methods** The structure, conservation, physical and chemical property and precursor proteins of peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ were analyzed by PepDraw Tool, Uniprot and ProtParam online. The entry of FITC-labeled peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ into P19 cells was observed under a fluorescence microscope. After adding peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷, the differentiation of P19 cells was observed by inverted microscope. The expression of troponin cTnT and transcription factor GATA4 were detected by qPCR and Western blot assay to analyze the specific marker gene of myocardium. The expressions of Notch1, Hey1 and Hey2 were detected by qPCR to analyze the effect of peptides on Notch1 pathway in P19 cell. **Results** Bioinformatics analysis showed that the peptide was located at the 301–307 amino acid site of its precursor protein Talin, which is a small molecule peptide with stable structure, high lipophilicity and high sequence conservation. FITC-labeled peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ can enter the P19 cell under the fluorescence microscope. Compared with the control group, the cells in the peptide group were partially necrotic, with disordered growth and morphology. The qPCR and Western blot assay showed that the differentiation related genes GATA4 and cTnT in the peptide group both decreased at different levels. The qPCR showed that the Notch-related genes Notch1, Hey1 and Hey2 in the peptide group decreased at different levels. **Conclusion** Peptide ³⁰¹LARSLKT³⁰⁷ may inhibit the biological function of myocardial differentiation by inhibiting the expression of key factors of Notch1 pathway.

Key words tetralogy of fallot; myocardial differentiation; endogenous peptides; Notch1 signaling pathway; P19 cell line