

p22-phox 在 P19 细胞向心肌细胞分化前后的变化

吴继军¹ 韩卫星¹ 刘超² 陈晓蓉² 王成³ 卢挪挪¹

摘要 目的 探讨 P19 细胞向心肌细胞分化前后 p22-phox 水平的变化。方法 贴壁培养 P19 细胞,取合适细胞株,应用 0.9% 二甲基亚砜(DMSO) 诱导培养,收集诱导不同时间的细胞,通过 Western blot 检测其肌钙蛋白 I(cTnI) 水平,以确定分化,并行 Western blot 检测 P19 细胞向心肌细胞分化前后细胞中 p22-phox 蛋白水平。结果 ① P19 细胞经 0.9% DMSO 诱导分化后,于第 8 天开始检测到 cTnI 表达阳性,后 cTnI 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。② P19 细胞向心肌细胞分化后细胞内 p22-phox 水平较分化前高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 p22-phox 在 P19 细胞向心肌细胞分化后表达增加,氧化应激水平增高。

关键词 P19 细胞; 心肌细胞; 细胞分化; 氧化应激; p22-phox
中图分类号 R 331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0009-04

氧化应激是指体内生成的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 水平和抗氧化系统水平失衡,ROS 生产过多或(和) 机体抗氧化能力减低,致使 ROS 清除不足,在体内聚积,导致组织器官的氧化性损伤^[1-3]。它是导致心血管疾病常见的一个中间者,然而其引起心血管危险的发生又不同于其他常见的危险因素,成为众多危险因素引起心血管疾病的一个共同途径,对于氧化应激标志物的研究已成为目前研究的焦点^[4]。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶是由 1 个三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP) 酶结合蛋白 Rac、2 个膜亚基 p22-phox、gp91-phox 以及 3 个胞质亚基 p40-phox、p47-phox、p67-phox 组成的复合体,是机体内生成 ROS 的主要酶之一^[5-6]。因此,细胞内 p22-phox 的水平在一定程度上反映细胞内氧化应激水平。该研究通过检测 p22-phox 水平来反映 P19 细胞向心肌样细

胞分化前后氧化应激水平的变化。

1 材料与方法

1.1 材料 P19 细胞株由安徽医科大学组胚学教研室组织工程干细胞研究所提供,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、 α -MEM 培养基购自美国 HyClone 公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司,蛋白提取试剂盒购自凯基公司,肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI) 单克隆抗体购自美国 Chemicon 公司, p22-phox 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 P19 细胞复苏、培养和传代 将水浴箱预热至约 37 °C,从液氮中取出冻存的 P19 细胞,快速放入水浴箱中,不停摇晃,使其迅速融化。待冻存管内冰晶完全融解后立即转入 5 ml 离心管,加 α -MEM 完全培养液 3 ml(含 90% α -MEM、10% FBS、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml),1 000 r/min 离心 5 min,吸去上清液,再次加入完全培养液 2 ml,轻轻吹打、重悬细胞,待细胞悬液分布均匀后取适当细胞悬液转入组织培养皿,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长满培养皿底面约 75%,弃去上清液,以无菌 PBS 洗 2 次,加胰酶 1 ml,放入培养箱消化约 5 min 后取出,加入等量完全培养液吹匀,以一定密度传代。

1.2.2 P19 细胞向心肌细胞诱导 将胰酶消化后的 P19 细胞以 1×10^6 个/ml 的密度接种到 10 cm 细菌培养皿,加入诱导培养液 10 ml(含 0.9% DMSO 的完全培养液),悬浮培养。第 3 天用 7 ml 诱导培养液不完全换液。待第 4 天形成大量细胞聚集体,吸取适量该细胞聚集体转入 6 cm 组织培养皿进行贴壁培养,后每 2 d 以完全培养液换液 1 次。

1.2.3 Western blot 测定细胞中 p22-phox 及 cTnI 水平 蛋白提取试剂盒提取蛋白后以 BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,100 °C 水浴 5 min,置于冰上代用。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,12% 浓缩胶以 120 V 电压电泳,5% 分离胶以 150 V 电压电泳。后取出凝胶,以 40 mA 恒流低温转膜过

2014-09-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81070210)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

安徽医科大学² 组胚学教研室组织工程干细胞研究所、

³诊断学教研室,合肥 230032

作者简介: 吴继军,男,硕士研究生;

韩卫星,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hwx5712@aliyun.com

夜。取出 PVDF 膜 ,TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min , 1% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h ,后分别加以 p22-phox 及 cTnI 一抗于 4 °C 孵育过夜 ,TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min ,二抗孵育 2 h ,再以 TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min ,压片曝光。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析 ,cTnI 蛋白水平及分化前后细胞内 p22-phox 蛋白水平的比较采用配对设计定量资料的 *t* 检验 , Western blot 结果目的条带应用软件 Image J 进行灰度值计算 ,检验水准取 *P* = 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态观察 胰酶消化完接种好的未诱导分化的 P19 细胞大略呈圆形 ,胞体较小 ,分散均匀 ,约 2 h 可见细胞开始贴壁 ,呈扁平的不规则多边形 ;第 4 天可见有大量胚胎样小体形成 ,悬浮生长 ,形态各异 ,大小不一 ,多数呈圆形 ,小体表面有囊状突起 ;第 8 天可见细胞贴壁生长 ,分布密集 ,多数呈梭状。见图 1。

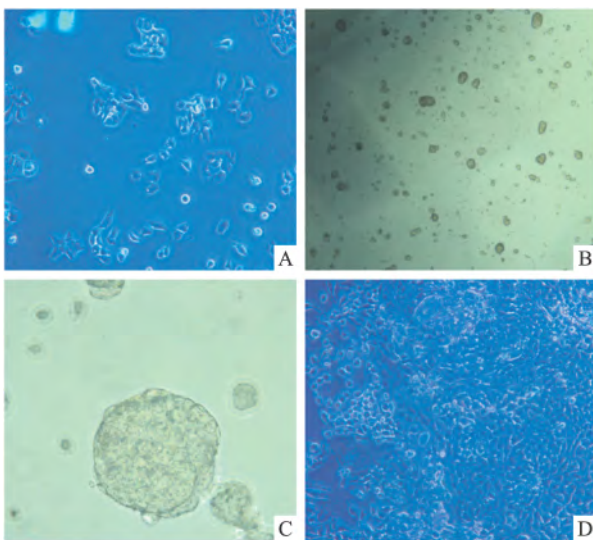


图 1 P19 细胞向心肌细胞分化过程中形态变化

A: 分化前正常贴壁生长的 P19 细胞 ×200; B: 分化第 4 天悬浮生长 ×40; C: 分化第 4 天悬浮生长 ×400; D: 分化第 8 天贴壁生长 ×100

2.2 P19 细胞向心肌细胞诱导分化过程中 cTnI 检测

P19 细胞经过含 0.9% DMSO 的培养液诱导 ,cTnI 于第 8 天呈现阳性 ,第 10 天水平高于第 8 天 ,差异有统计学意义 (*t* = 31.758 *P* = 0.000) ;第 12 天水平高于第 10 天 ,差异有统计学意义 (*t* = 12.394 *P* = 0.000) 。见图 2。

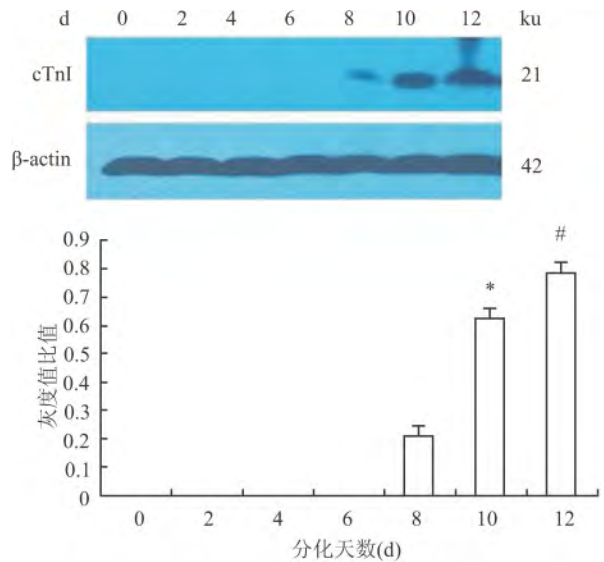


图 2 P19 细胞向心肌细胞分化过程中 cTnI 蛋白表达 (*n* = 4) 与第 8 天比较: * *P* < 0.05; 与第 10 天比较: # *P* < 0.05

2.3 P19 细胞分化前后 p22-phox 水平的变化

诱导分化第 10 天细胞内的 p22-phox 水平明显高于正常未分化的 P19 细胞 ,差异有统计学意义 (*t* = 3.261 *P* = 0.017) 。见图 3。

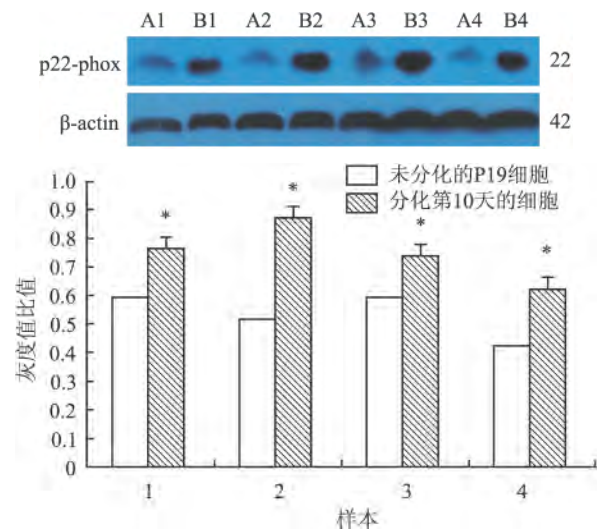


图 3 P19 细胞向心肌细胞分化前后 p22-phox 蛋白表达 (*n* = 4)

A: 未分化的 P19 细胞; B: 分化第 10 天的细胞; 1、2、3、4: 样本号; 与未分化的 P19 细胞比较: * *P* < 0.05

3 讨论

氧化反应调节着正常机体内的多种生理反应 ,对于机体的平衡起着重要作用 ,调节的失衡可导致一系列不良影响。随着机体各组织器官的发育、衰老 ,其氧化应激水平也在不断变化。氧化应激损伤的严重性主要取决于分子靶标、氧化应激水平的高

低以及氧化应激的具体产生机制,其与心血管疾病、神经退行性疾病以及癌症等诸多疾病的发生有着密切联系^[7]。心血管各种疾病与氧化应激水平的关系尤为密切,如高血压病、动脉粥样硬化等心血管常见病^[8-9]。氧化应激的作用表现主要在于影响细胞的生长、增殖、迁移以及激活等方面,在机体某些病理条件下,ROS与组织炎症、细胞增殖激活障碍和内皮功能紊乱等方面有着密切联系。

P19细胞是目前试验中用来研究干细胞向心肌细胞分化较为常用的细胞之一,本研究表明其向心肌细胞分化后p22-phox蛋白表达增加,表明心肌细胞在其分化过程中氧化应激水平升高。氧化应激在干细胞生长分化的过程中发挥着重要作用,细胞内的低水平ROS对于保持其未分化状态以及维持自我更新极为重要,而高水平ROS的生成将会导致干细胞的分化、衰老乃至凋亡^[10]。本研究结果也证实了细胞内氧化应激水平的增高是P19细胞产生分化的一个重要因素。氧化应激水平升高使干细胞产生分化,但同时高水平氧化应激也导致其分化后降低或丧失了自我更新修复能力,引起细胞、组织的衰老和凋亡。心肌细胞内高水平的氧化应激与心肌组织的多种疾病如心衰、心肌梗死等有着重要联系^[11-12]。在心肌疾病治疗的一些传统药物中,如 β 受体阻滞剂、AT1受体拮抗药以及血管紧张素转换酶抑制剂等都对NADPH氧化酶的活性有着一定的抑制作用。因此,抗氧化剂的研究和使用在心血管疾病的治疗方面显得很重要,然而抗氧化药物的使用仍然停留在传统治疗药物中。虽然目前对于抗氧化剂在心血管疾病的应用有一定报道,但抗氧化剂尚未在临床中作为心血管疾病的常规用药,其临床疗效也有待评价。

本研究局限于基础研究,缺少动物实验乃至进一步临床研究,未能进一步研究心肌细胞内高水平氧化应激状态对心肌组织乃至整个心脏的具体影响。

参考文献

- [1] Raedschelders K, Ansley D M, Chen D D. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133 (2): 230-55.
- [2] 鹿敏, 刘晓颖, 韩卫星. 多巴胺受体和脂筏对高血压患者细胞NADPH氧化酶的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48 (3): 211-5.
- [3] Ansley D M, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 232-41.
- [4] Ho E, Karimi Galoughi K, Liu C C, et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 483-91.
- [5] Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 277-94.
- [6] Shin M H, Moon Y J, Seo J E, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(4): 635-45.
- [7] Popolo A, Autore G, Pinto A, et al. Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic renal failure [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(5): 346-56.
- [8] Crowley S D, Song Y S, Sprung G, et al. A role for angiotensin II type 1 receptors on bone marrow-derived cells in the pathogenesis of angiotensin II-dependent hypertension [J]. *Hypertension*, 2010, 55(1): 99-108.
- [9] 王成, 韩卫星, 吴继军, 等. 缬沙坦对冠脉内皮细胞氧化应激过程中gp91phox的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49 (6): 739-42.
- [10] Zhou D, Shao L, Spitz D R. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells [J]. *Adv Cancer Res* 2014, 122: 1-67.
- [11] Ahmed Z, Tang W H. Pharmacologic strategies to target oxidative stress in heart failure [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2012, 9(1): 14-22.
- [12] Ansley D M, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 232-41.

The changes of the expression of p22-phox before and after P19 cells differentiating into cardiac myocytes

Wu Jijun¹, Han Weixing¹, Liu Chao², et al

¹Dept of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Tissue Engineering Stem Cell Institute of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the change of the expression of p22-phox before and after P19 cells differenti-

同型半胱氨酸对内皮细胞肌球蛋白轻链激酶表达的影响

吴燕, 王怡, 江巧玲, 周佳丽, 周青, 汪渊, 朱华庆

摘要 目的 研究同型半胱氨酸(Hcy)对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)运动能力以及肌球蛋白轻链激酶(MLCK)表达的影响。方法 不同浓度的Hcy处理人脐静脉内皮细胞后,MTT法检测Hcy对HUVEC增殖的影响,划痕实验检测Hcy对细胞迁移的影响,免疫组化法及Western blot法检测MLCK表达的变化。结果 随着浓度的升高,Hcy对HUVEC的增殖有显著的抑制作用,对HUVEC的迁移有明显的促进作用,免疫组化法及Western blot法结果显示Hcy可以增强MLCK的表达。结论 Hcy对HUVEC的迁移具有促进作用,可能是Hcy通过上调MLCK的表达所致。

关键词 同型半胱氨酸;动脉粥样硬化;人脐静脉内皮细胞;肌球蛋白轻链激酶

中图分类号 R 966; R 541.4; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0012-04

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是大多数心脑血管疾病的重要病理基础,给人类健康带来极大的威胁,而其发病机制非常复杂,其中内皮细胞损伤被认为是动脉粥样硬化的始动环节^[1-2]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含巯基氨基酸,是人体内甲硫氨酸代谢过程的中间产物,近年来,大量研究^[3]证明同型半胱氨酸可以损伤内皮细胞,是

致AS的一个独立危险因素。肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)是一种钙调素依赖酶,能催化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化,引起内皮细胞收缩,细胞骨架重排,从而调节内皮细胞的通透性^[4]。该研究通过采用同型半胱氨酸处理人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),初步探讨了Hcy对HUVEC增殖、迁移能力的影响以及在此过程中MLCK表达的变化,为Hcy致AS的发生和发展机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC购于美国ATCC公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司;DMEM高糖培养基购于美国Gibco公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、Hcy购于美国Sigma公司,MTT用PBS配制成5%母液,Hcy用纯化水配制成200 mmol/L母液,分别过滤除菌,-20℃避光保存。BCA定量试剂盒、ECL显色试剂盒均购于美国Pierce公司;免疫组化染色试剂盒、DAB试剂盒购于北京中杉金桥公司;鼠抗人β-actin、MLCK均购于美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞,培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的高糖DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱。当细胞处于对数生长期时,用0.25% (含0.53 mmol/L EDTA)的胰蛋白酶消化传代。

2014-09-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070232、81270372)

作者单位:安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:吴燕,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq@126.com

ating to cardiac myocytes. **Methods** Appropriate P19 cells were chosen which were cultured *in vitro* with 0.9% dimethyl sulfoxide(DMSO), then the induced cells were collected at different times. Western blot of cardiac troponin I(cTnI) was used to identify cell differentiation, and detect the level of p22-phox before and after the differentiation. **Results** ① On the 8th day cTnI was detected positive in P19 cells which were cultured with 0.9% DMSO, then the expression of cTnI was increased, with statistical significance($P < 0.05$). ② The expression of p22-phox in differentiated P19 cells was higher than that in undifferentiated P19 cells, with statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of p22-phox increases during the differentiation of P19 cells to cardiac myocytes, and the level of oxidative stress increases.

Key words P19 cells; cardiac myocytes; cell differentiation; oxidative stress; p22-phox