

## P19 细胞向心肌样细胞分化前后 gp91-phox 的变化

吴继军 韩卫星 刘超 陈晓蓉 王成 卢挪挪

**【摘要】** 目的:探讨诱导 P19 细胞向心肌样细胞分化前后 gp91-phox 水平的变化。方法:P19 细胞经 0.9% 二甲亚砜(DMSO)于细菌培养皿中悬浮诱导培养 4 d,待细胞聚集体形成,吸取聚集体接种于组织培养皿,贴壁培养至第 13 天。行 Western blot 检测肌钙蛋白 I(cTnI),以鉴定心肌样细胞的分化,并检测 P19 细胞向心肌样细胞分化前后细胞中 gp91-phox 蛋白水平。结果:(1)经 0.9% DMSO 诱导分化,P19 细胞于第 7 天开始表达 cTnI,随后 cTnI 表达明显增高并趋于稳定;(2)P19 细胞分化为心肌样细胞后细胞内 gp91-phox 蛋白水平较分化前高( $P < 0.05$ )。结论:P19 细胞向心肌样细胞分化后 gp91-phox 表达上调,氧化应激水平增加。

**【关键词】** P19 细胞;心肌样细胞;细胞分化;氧化应激;gp91-phox

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.05.016

## Changes of gp91-phox expression before and after the differentiation of P19 cells to cardiomyocyte-like cells

WU Ji-jun<sup>1</sup>, HAN Wei-xing<sup>1</sup>, LIU Chao<sup>2</sup>, CHEN Xiao-rong<sup>2</sup>, WANG Cheng<sup>1</sup>, LU Nuo-nuo<sup>1</sup>. 1. Department of Cardiovascular Medicine of the First Affiliated Hospital; 2. Department of Tissue Engineering Stem Cell Institute of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Anhui 230022, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the changes of gp91-phox expression before and after the differentiation of P19 cells to cardiomyocyte-like cells. **Methods:** P19 cells were cultured with 0.9% dimethyl sulfoxide(DMSO) in suspension for 4 days to form aggregation. Then the aggregates were transferred to tissue culture dishes for further cultivation up to the 13th day. Cardiac troponin I (cTnI) was detected by Western blot to identify cell differentiation, then the expression levels of gp91-phox were detected by Western blot before and after the differentiation. **Results:** (1) P19 cells induced by 0.9% DMSO were cTnI-positive at the 7th day, afterwards the expression of cTnI was gradually increased and maintained at a stable level. (2) The expression of gp91-phox in differentiated P19 cells was higher than that in undifferentiated cells ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The expression of gp91-phox was up-regulated after the differentiation of P19 cells to cardiomyocyte-like cells indicating the increased oxidative stress level during this process.

**【Key words】** P19 cells; Cardiomyocyte-like cells; Cell differentiation; Oxidative stress; Gp91-phox

氧化应激是指体内生成的活性氧(ROS)水平和抗氧化系统水平失衡,ROS 生产过多和(或)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<sup>[1-3]</sup>。磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)氧化酶是机体内生成 ROS 的主要酶之一,是由 1 个小分子的 GTP 酶结合蛋白

Rac, 2 个膜亚基 p22-phox、gp91-phox 以及 3 个胞浆亚基 p40-phox、p47-phox、p67-phox 组成的复合物<sup>[4]</sup>。细胞内 gp91-phox 的水平在一定程度上可以代表细胞内氧化应激的水平。

P19 细胞是一种胚胎癌细胞,由 McBurney 于 1982 年在 C3H/He 雄性小鼠畸胎瘤中分离得到,是一种可以在体外培养的多能干细胞,是目前用来研究干细胞向心肌样细胞分化较为常用的细胞之一<sup>[5]</sup>。本研究通过检测 gp91-phox 的水平来探讨 P19 细胞向心肌样细胞分化前后氧化应激水平的变化。

基金项目:国家自然科学基金(81070210)

作者单位:230022 安徽医科大学第一附属医院心血管内科(吴继军,韩卫星,王成,卢挪挪);安徽医科大学组胚学教研室组织工程干细胞研究所(刘超,陈晓蓉)

通信作者:韩卫星,Email:hwxs57@yahoo.com.cn

## 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;胰蛋白酶、二甲基亚砷(DMSO)购自 Sigma 公司; $\alpha$ -MEM 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;心肌肌钙蛋白 I (cTnI)单克隆抗体购自 CHEMICON 公司;gp91-phox 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;全蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 P19 细胞复苏、培养和传代 水浴箱预热至 37℃,从 -80℃ 冰箱中取出冻存的 P19 细胞,立即放入 37℃ 水浴箱中并不停摇晃,至冰晶完全融解。转入 5 ml 离心管,加入  $\alpha$ -MEM 完全培养液 3 ml,以 1 000 转/分离心 5 min,弃上清,加入  $\alpha$ -MEM 完全培养液 2 ml,吹打、重悬细胞,取适当细胞悬液转入培养皿,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中。待细胞长至底面积的 75%左右,弃培养液,用 PBS 洗 2 遍,加入胰酶消化液 1 ml,置于培养箱内消化 5 min,取出加入等量完全培养液轻轻吹匀分散,离心重悬后再以适当密度传代。

1.2.2 诱导分化 将 P19 细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 的密度接种于 10 cm 细菌培养皿,加入 0.9% DMSO 诱导培养液 10 ml,置于培养箱悬浮培养,计为第 1 天。第 3 天以 7 ml 诱导培养液进行不完全换液。

第 4 天大量细胞聚集体形成,吸取细胞聚集体转入 6 cm 组织培养皿,贴壁培养,每 2 d 以完全培养液换液 1 次。

1.2.3 Western blot 用蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,100℃ 水浴 5 min,置于冰上。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,再以 40 mA 恒流转膜过夜。取出 PVDF 膜,洗膜后以 1%脱脂奶溶液封闭 1 h,加一抗于 4℃ 孵育过夜。洗膜后加入二抗孵育 2 h,压片曝光,应用软件 Image J 进行灰度值计算。

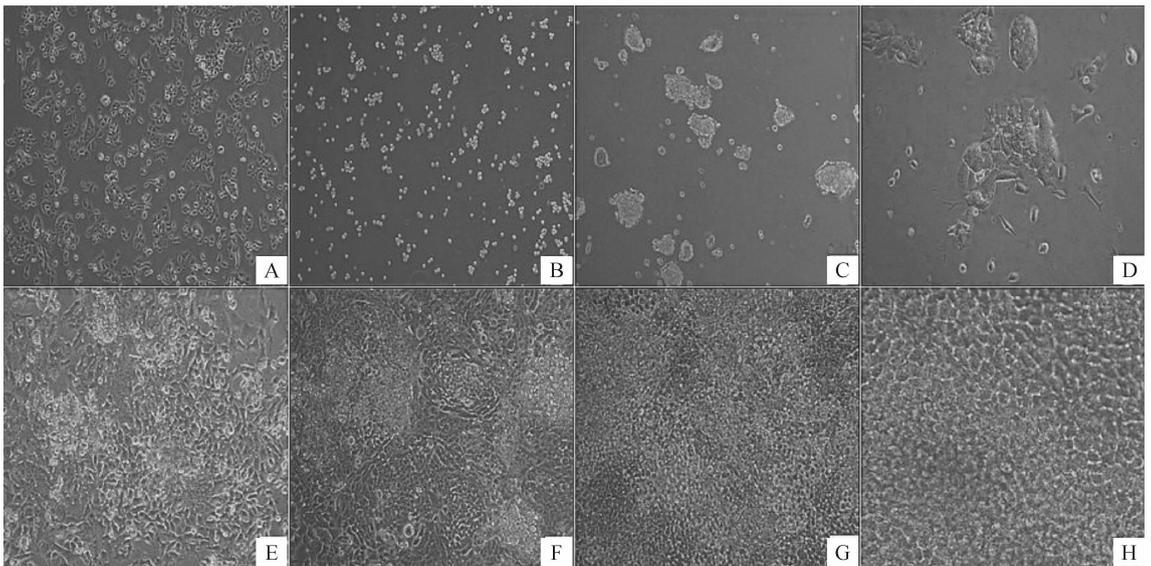
### 1.3 统 计 学 分 析

应用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,分化前后细胞内 gp91-phox 蛋白水平的比较采用配对设计定量资料的 *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 细 胞 形 态

诱导前 P19 细胞贴壁生长,呈扁平的不规则多边形;诱导 1 d 后 P19 细胞大略呈圆形,胞体较小,分散均匀,偶可见少数细胞团块形成;诱导 3 d 后可见有大量的细胞团块形成,大小不一,形态各异,多数呈圆形;第 5 天细胞在培养皿中以集落的方式贴壁生长;第 7 天细胞生长密集,梭形细胞增多,各集落间相互连接;第 9 天细胞密集度较之前明显增高;第 11 天部分细胞集落中央部分变黑,呈日晕状;第 13 天细胞呈高密度生长,细胞集落中央坏死区明显(见图 1)。



注:A 为诱导前( $\times 100$ );B 为第 1 天( $\times 100$ );C 为第 3 天( $\times 100$ );D 为第 5 天( $\times 200$ );E 为第 7 天( $\times 100$ );F 为第 9 天( $\times 100$ );G 为第 11 天( $\times 100$ );H 为第 13 天( $\times 200$ )

图 1 P19 细胞向心肌样细胞分化过程中的形态变化

### 2.2 心肌样细胞分化鉴定

经 0.9% DMSO 诱导, P19 细胞内 cTnI 于第 7 天开始呈阳性, 9 d 后 cTnI 水平明显增高, 并趋于稳定(见图 2)。

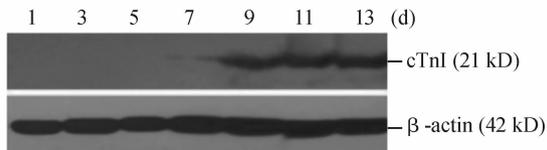
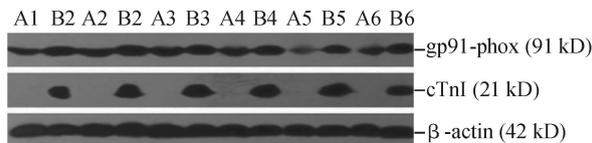


图 2 分化过程中 cTnI 蛋白的表达

### 2.3 分化前后 gp91-phox 水平的变化

取第 9 天 cTnI 表达稳定的细胞和未诱导的 P19 细胞, 比较两者 gp91-phox 水平的差异。诱导分化后第 9 天的细胞 gp91-phox 水平明显高于未分化细胞 ( $P < 0.05$ , 见图 3)。



注: A 为诱导前; B 为诱导后第 9 天 ( $n = 6, P = 0.037$ )。

图 3 分化前后 gp91-phox 蛋白的比较

## 3 讨论

氧化应激在干细胞生长分化过程中起重要作用。低水平 ROS 对维持干细胞的未分化状态和自我更新极其重要, 而高水平 ROS 将促使干细胞分化、衰老及凋亡, 其程度与 ROS 水平密切相关<sup>[6]</sup>。高水平 ROS 通过使线粒体外膜渗透性增加, 诱导产生线粒体渗透性移位, 导致细胞色素 C 及凋亡诱导因子等多种促凋亡因子外渗, 促进细胞凋亡<sup>[7]</sup>。因此, 干细胞内 ROS 水平的严格控制对维持组织稳定, 保持自我修复, 延长组织寿命有重要作用。氧化应激水平增高是促使干细胞分化的一个重要因素, 同时高水平氧化应激也是其分化后自我更新修复能力减弱或丧失, 以及导致细胞衰老、凋亡的重要原因。

病理状态下体内高水平的氧化应激易导致心肌细胞衰老和凋亡, 与多种心肌疾病, 如心力衰竭、急性心肌梗死等都有着密切联系<sup>[8-9]</sup>。成人体内心肌干细胞的发现为心肌梗死及心力衰竭的治疗提供了新的方向。然而, 在心肌梗死等病理情况下, 心肌干细胞的分化过程被扰乱, 受损心肌不能得到

及时更新, 会最终导致心肌肥大甚至心力衰竭。

P19 细胞是研究干细胞向心肌样细胞分化的常用细胞, DMSO 作为其诱导剂也被国内外众多研究者使用<sup>[10]</sup>。本研究发现, P19 细胞向心肌样细胞分化后 gp91-phox 蛋白表达增加, 表明其在分化过程中氧化应激水平升高, 与上述研究结果一致。然而, 本研究缺少动物实验乃至进一步临床研究, 仅发现 P19 细胞向心肌样细胞分化后氧化应激水平增高, 未能进一步探讨高水平氧化应激对分化后心肌样细胞的功能、心肌组织乃至整个心脏的具体影响, 这将成为下一步研究的重要目标。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2):230-255.
- [ 2 ] Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(6):313-319.
- [ 3 ] Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart[J]. *J Pathol*, 2013, 229(2):232-241.
- [ 4 ] Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4):277-294.
- [ 5 ] McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns [J]. *Dev Biol*, 1982, 89(2): 503-508.
- [ 6 ] Zhou D, Shao L, Spitz DR. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells[J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 122: 1-67.
- [ 7 ] Pervaiz S, Taneja R, Ghaffari S. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells[J]. *Antioxid Redox Signaling*, 2009, 11( 11) : 2777-2789.
- [ 8 ] Jasmin, Spray DC, Campos de Carvalho AC, et al. Chemical induction of cardiac differentiation in p19 embryonal carcinoma stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(3): 403-412.
- [ 9 ] Sawyer DB. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? [J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(2): 120-124.
- [ 10 ] Smith RS Jr, Agata J, Xia CF, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction[J]. *Life Sci*, 2005, 76( 21):2457-2471.

(收稿:2013-11-27 修回:2014-08-07)

(本文编辑:梁英超)