

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.001

P³⁸MAPK 通路在 BMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化中的作用

张 芬, 陈 沅, 孙文静, 陈 露, 陈妙月, 朱高慧
(重庆医科大学附属儿童医院心血管内科, 重庆 400014)

【摘 要】目的:研究 P³⁸ 丝裂原活化蛋白激酶(P³⁸ mitogen-activated protein kinases, P³⁸MAPK)通路在骨形态发生蛋白 9(Bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化中的作用。方法:免疫印迹检测经 pAdEasyBMP9 诱导 24 h 的 C3H10T1/2 干细胞磷酸化 P³⁸MAPK 和 P³⁸MAPK 表达水平,免疫荧光定位磷酸化 P³⁸MAPK;SB203580 抑制 C3H10T1/2 干细胞磷酸化 P³⁸MAPK 活性,pAdEasyBMP9 诱导 21 d 时免疫印迹检测心肌特异性蛋白 CX43、cTnT 表达,免疫荧光检测心肌特异性蛋白 cTnT、 α -MHC 表达,RT-qPCR 检测心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 表达。结果:pAdEasyBMP9 促进磷酸化 P³⁸MAPK 表达增高,却不影响 P³⁸MAPK 表达水平;磷酸化 P³⁸MAPK 有表达于胞浆和胞核、仅表达于胞核的不同状态。SB203580 可显著性地抑制由 pAdEasyBMP9 诱导的 C3H10T1/2 干细胞 CX43、cTnT、 α -MHC、GATA4、MEF2C 表达。结论:pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞能激活 P³⁸MAPK 通路,并促进其向心肌样细胞分化。

【关键词】骨形态发生蛋白 9;C3H10T1/2 干细胞;心肌样细胞;P³⁸ 丝裂原活化蛋白激酶

【中国图书分类法分类号】R725.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-17

Role of P³⁸ mitogen-activated protein kinases signaling pathway in the differentiation of bone morphogenetic protein 9 induced C3H10T1/2 stem cell into myocardiocytes

ZHANG Fen, CHEN Yuan, SUN Wenjing, CHEN Lu, CHEN Miaoyue, ZHU Gaohui
(Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To investigate the role of P³⁸ mitogen-activated protein kinases(P³⁸MAPK) signal pathway in the differentiation of bone morphogenetic protein 9(BMP9) induced C3H10T1/2 stem cell into myocardiocytes. **Methods:**The phospho-P³⁸MAPK and P³⁸MAPK were measured by Western blot at 24 h after the C3H10T1/2 stem cell being transfected with pAdEasyBMP9 and the phospho-P³⁸MAPK was detected by immunofluorescence at 24 h after the C3H10T1/2 stem cell being transfected with pAdEasyBMP9. The cardiac-specific proteins cTnT and CX43 were measured by Western blot, the cardiac-specific proteins cTnT and α -MHC were measured by immunofluorescence, the cardiac-specific gene GATA4 and MEF2C expressions were detected by RT-qPCR at 21 d after the C3H10T1/2 stem cell being transfected with pAdEasyBMP9 and treated with SB203580. **Results:**Transfection with pAdEasyBMP9 produced rapid increase in phospho-P³⁸MAPK and little change in P³⁸MAPK. Phospho-P³⁸MAPK expressed in nucleus and cytoplasm or in different states of nucleus. SB203580 significantly inhibited the pAdEasyBMP9-induced expression of CX43, cTnT, α -MHC, GATA4, MEF2C in C3H10T1/2 stem cell. **Conclusions:**P³⁸MAPK signal pathway can be activated in C3H10T1/2 stem cell after being transfected with pAdEasyBMP9 and can promote the myocardiocytes differentiation.

【Key words】bone morphogenetic protein 9;C3H10T1/2 stem cell;cardiomyocytes;P³⁸ mitogen-activated protein kinases

本课题前期从体内和体外两个方面研究证实,经 pAdEasyBMP9 和 pAdEasyBMP13 诱导,能使具有多向分化潜能 C3H10T1/2 干细胞分化为心肌样细胞并改善心肌梗大鼠心功能^[1-3]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路

是细胞内重要的信号传导系统之一,参与细胞的形成、运动、分化、生长、增殖等多种生理过程^[4]。P³⁸ 丝裂原活化蛋白激酶(P³⁸ mitogen-activated protein kinases, P³⁸MAPK)是哺乳动物 MAPK 通路中的一条经典途径^[5],属应急激活的蛋白激酶,遵循 MAPK 通路的 3 级酶促级联反应 MAPKKK-MAPKK(MEKK)-MAPK^[6],P³⁸MAPK 磷酸化后,活化各种转录因子^[7]。本实验在成功建立骨形态发生蛋白 9(Bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导 C3H10T1/2 干细胞向

作者介绍:张 芬(1986-),女,硕士,

研究方向:干细胞移植。

通信作者:陈 沅,女,教授,Email:cy111938@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30772361)。

心肌样细胞分化的基础上,检测 C3H10T1/2 干细胞经高滴度 pAd-EasyBMP9 诱导后 P³⁸MAPK 通路的激活情况以及磷酸化 P³⁸MAPK 特异性抑制剂 SB203580 处理经 pAd-EasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞心肌特异性蛋白和基因表达情况。本研究发现,pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 能激活 P³⁸MAPK 通路,并促进其向心肌样细胞分化。

1 材料与方法

1.1 材料

C3H10T1/2 干细胞、pAdEasyBMP9、pAdEasyGFP 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室惠赠;RT-qPCR 引物序列由华大基因-上海鼎安生物技术有限公司合成;RT-qPCR 染料购置于卓诺生物公司;抗体购置于英国 Abcam、美国 CST 公司;SB203580 购置于美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

从液氮罐中取出冻存的 C3H10T1/2 干细胞和 pAdEasy-BMP9,细胞复苏、培养及感染方法同文献[1]。在 pAdEasyBMP9 诱导 12 h 的 C3H10T1/2 干细胞分别添加终浓度为 5 μmol/L、10 μmol/L 溶解于 DMSO 的 SB203580,倒置显微镜下观察细胞生长情况和形态变化,连续培养 21 d。

1.3 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞 P³⁸MAPK 通路激活的检测

1.3.1 Western blot 检测磷酸化 P³⁸MAPK、P³⁸MAPK 表达 配好 SDS-PAGE 胶,60 V 电泳 30 min,120 V 电泳 1 h,半干转仪中将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上(1 mA/cm²),室温下 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline tween-20, TBST)封闭 2 h,加入鼠抗鼠磷酸化 P³⁸MAPK 抗体(1:2 000),4 ℃孵育过夜。TBST 缓慢震荡洗膜 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(1:250),4 ℃孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 ECL 试剂 1~2 min 后曝光显影,观察磷酸化 P³⁸MAPK 表达变化;TBST 洗膜 3 次,同上加入兔抗鼠 P³⁸MAPK 抗体(1:1 000),4 ℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000),4 ℃孵育 2 h,ECL 曝光显影,观察 P³⁸MAPK 表达变化。

1.3.2 免疫荧光技术检测磷酸化 P³⁸MAPK 方法参照文献[2]。

1.4 P³⁸MAPK 通路阻断后 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化的检测

1.4.1 实验分组 A 组:未经处理的 C3H10T1/2 干细胞;B 组:pAdEasyGFP 诱导的 C3H10T1/2 干细胞;C 组:pAdEasyBMP9 诱导的 C3H10T1/2 干细胞;D 组:SB203580 处理经 pAdEasy-BMP9 诱导的 C3H10T1/2 干细胞;E 组:DMSO 处理经 pAd-EasyBMP9 诱导的 C3H10T1/2 干细胞。

1.4.2 Western blot 检测心肌特异性蛋白 cTnT、CX43 表达方法同上述。

1.4.3 免疫荧光检测心肌特异性蛋白 cTnT、α-MHC 表达方法参照文献[2]。

1.4.4 RT-qPCR 检测心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 表达参照文献[2]中的引物序列,RT-qPCR 反应条件:SY4.5 μl; cDNA 模板 1 μl;引物正反链分别 0.2 μl;三蒸水 4.1 μl。

经过解链温度 95 ℃;扩增温度 95 ℃;退火温度 60 ℃;延伸温度 60 ℃;40 个循环扩增,得到各个基因的扩增量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列及扩增片段

基因名称	引物序列(5'~3')	引物长度 (bp)
GATA4	正义链 CCCTCCCGCAGGATTTCT	18
	反义链 AGAGGCCCAACTCGCTCAA	19
MEF2C	正义链 GCGCAGGGAATGGATACGG	19
	反义链 TGCCAGGTGGGATAAGAACG	20
β-actin	正义链 CACACCCGCCACCACTTCG	19
	反义链 GTCCTTCTGACCCATTCCACC	22

1.5 统计学分析

实验所有数据采用 SPSS 17.0 软件处理,检验前均进行正态齐性检验,结果以中位数表示,秩和检验显示差异性时进一步组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞形态

倒置显微镜下,pAdEasyBMP9 诱导 21 d 的 C3H10T1/2 干细胞连接紧密,排列整齐,见图 1。

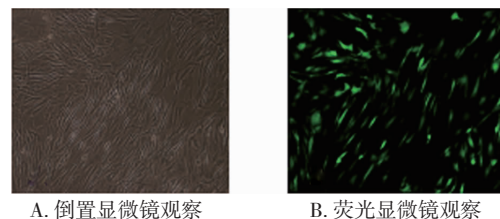


图 1 C3H10T1/2 干细胞观察结果 (200 ×)

Fig.1 C3H10T1/2 stem cells in inverted microscope and fluorescent microscope (200 ×)

2.2 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞 P³⁸MAPK 通路激活的检测

2.2.1 Western blot 检测磷酸化 P³⁸MAPK、P³⁸MAPK 表达 各组 C3H10T1/2 干细胞均能检测出磷酸化 P³⁸MAPK 和 P³⁸MAPK 表达,但磷酸化 P³⁸MAPK 表达有差异性(P<0.05);P³⁸MAPK 表达未见差异性(P>0.05)。磷酸化 P³⁸MAPK 组间比较发现,C 组明显较 B 组表达高(P<0.05);A 组表达量比 B、C 两组低(P<0.05),差异有统计学意义,见图 2、表 2。



图 2 Western blot 检测磷酸化 P³⁸MAPK、P³⁸MAPK、β-actin 表达

Fig.2 Expressions of phospho-P³⁸MAPK, P³⁸MAPK and β-actin in C3H10T1/2 stem cells detected by Western blot

表 2 磷酸化 P³⁸MAPK 以 P³⁸MAPK 做参照;P³⁸MAPK 以 β -actin 做参照时表达

Tab.2 Expressions of phospho-P³⁸MAPK regulated by P³⁸MAPK and P³⁸MAPK regulated by β -actin

组别	磷酸化 P ³⁸ MAPK	P ³⁸ MAPK
A组	0.02 ^{ab}	1.00
B组	0.54 ^a	1.00
C组	1.00	1.00

注:1. 秩和检验;磷酸化 P³⁸MAPK $P < 0.05$, P³⁸MAPK $P > 0.05$; 2. Mann-Whitney U 检验;a, 与 C 组比较, $P < 0.05$; b, 与 B 组比较, $P < 0.05$

2.2.2 免疫荧光检测磷酸化 P³⁸MAPK 表达 取经 pAdEasy-BMP9 诱导 24 h 的 C3H10T1/2 干细胞免疫荧光检测, 结果显示磷酸化 P³⁸MAPK 有表达于胞浆和胞核或仅表达于胞核的不同状态, 见图 3。

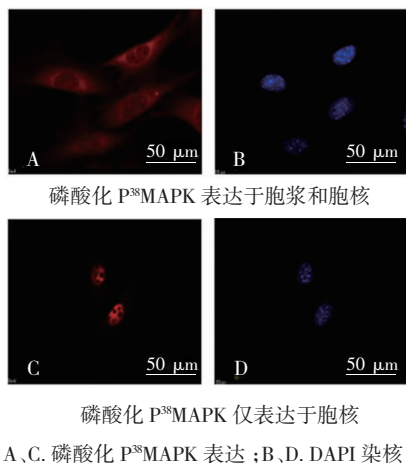
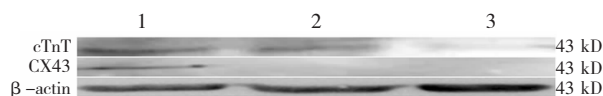


图 3 免疫荧光技术检测磷酸化 P³⁸MAPK 表达 (400 ×)

Fig.3 Expressions of phospho-P³⁸MAPK in C3H10T1/2 stem cells detected by immunofluorescence (400 ×)

2.3 P³⁸MAPK 通路阻断后 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化的检测

2.3.1 Western blot 检测各组 C3H10T1/2 干细胞心肌特异性蛋白 cTnT、CX43 表达 取终浓度分别为 0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 处理经 pAdEasyBMP9 诱导的 C3H10T1/2 干细胞培养 21 d 时 Western blot 检测 cTnT、CX43 表达, 结果显示 0 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 时, 能检测出 cTnT 和 CX43 表达, 5 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 时, 能检测出少量 cTnT 表达, 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 时, 未能检测出 cTnT 和 CX43 表达, 见图 4。



1. SB203580 终浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$; 2. SB203580 终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$; 3. SB203580 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$

图 4 SB203580 处理经 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞 cTnT、CX43 表达

Fig.4 Expressions of cTnT and CX43 in C3H10T1/2 stem cells after being transfected with pAdEasyBMP9 and treated with SB203580 of different concentrations

以终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 阻断 P³⁸MAPK 通路, 21 d 时分别检测各组细胞 cTnT 和 CX43 表达, 发现 A、B、D 组均未能检测出 cTnT 和 CX43 表达, 但在 C 组和 E 组却发现 cTnT 和 CX43 表达, 见图 5。

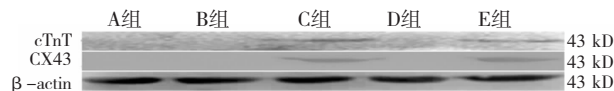


图 5 Western blot 检测 cTnT、CX43 表达

Fig.5 Expressions of cTnT and CX43 in C3H10T1/2 stem cells detected by Western blot

2.3.2 免疫荧光检测各组 C3H10T1/2 干细胞心肌特异性蛋白 cTnT、 α -MHC 表达 以终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 阻断 P³⁸MAPK 通路, 21 d 时检测各组细胞 cTnT、 α -MHC 表达, 发现 C 组和 E 组有 cTnT、 α -MHC 表达, 但 A、B、D 组均未能检测出, 与 Western blot 检测结果相一致, C 组 cTnT 表达见图 6。

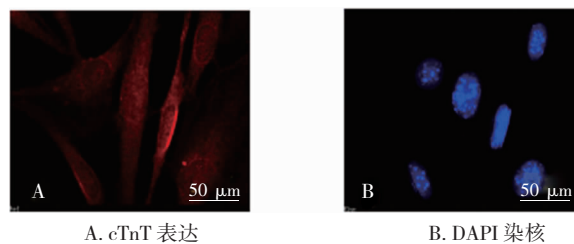


图 6 免疫荧光检测 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞 21 d 时 cTnT 表达 (400 ×)

Fig.6 Expressions of cTnT in C3H10T1/2 stem cells at 21d after being transfected with pAdEasyBMP9 detected by immunofluorescence (400 ×)

2.3.3 RT-qPCR 检测各组 C3H10T1/2 干细胞心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 表达 以终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 阻断 P³⁸MAPK 通路, 21 d 时检测各组细胞 GATA4、MEF2C 表达, 各组均能检测到 GATA4、MEF2C 表达, 但扩增量上显示差异性 ($P < 0.05$); 组间比较发现, C 组表达量和 E 组明显高于 A 组和 B 组 ($P < 0.05$); A 组和 B 组表达量又明显高于 D 组 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 见表 3。

表 3 RT-qPCR 检测 GATA4、MEF2C 表达

Tab.3 Expressions of GATA4、MEF2C in C3H10T1/2 stem cells detected by RT-qPCR

组别	GATA4	MEF2C
A组	1.00	1.00
B组	0.94	0.97
C组	3.78 ^a	3.23 ^a
D组	0.47 ^{ab}	0.49 ^{ab}
E组	3.56 ^a	3.19 ^a

注: 1. 秩和检验; $P < 0.05$; 2. Mann-Whitney U 检验; a, 与 A 组比较, $P < 0.05$; b, 与 C 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

由于干细胞移植在心脏疾病中的应用前景, 有

关于细胞向心肌细胞分化及其机制,一直是近年研究的热点,本实验将以 C3H10T1/2 干细胞为基础,进一步研究 BMP9 诱导干细胞向心肌细胞分化过程中的作用机制。

BMP9 属于转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员,通过与其丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合而介导胞内信号的传递,该受体可分为 I 型和 II 型两种^[8,9],BMP 配体与 I 型和 II 型异源四聚复合体受体结合时可以激活依赖 Smad 的 BMP 信号传导系统;与 I 型或 II 型受体组成的同源复合体结合时,激活的是丝裂原活化蛋白激酶通路^[10]。磷酸化 P³⁸MAPK 可以活化多种转录因子如 ELK1/2、ATF1/2、AP1、NF- κ B、CREB 等。本研究中我们发现 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞使磷酸化 P³⁸MAPK 增加,磷酸化 P³⁸MAPK 有表达于胞浆和胞核、仅表达于胞核的不同状态,说明 pAd-EasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞可以促进 P³⁸MAPK 的磷酸化,激活 P³⁸MAPK 通路;胞浆内的磷酸化 P³⁸MAPK 和胞核内的磷酸化 P³⁸MAPK 可能通过激活多条传导途径中的下游转录因子,来介导 pAdEasyBMP9 对 C3H10T1/2 干细胞的诱导作用,其具体作用机制还有待进一步研究。

SB203580 是第 1 个被报道的 P³⁸MAPK 阻滞剂,曾被用来研究 P³⁸MAPK 介导的细胞活素产物级联反应。它是吡咯异咪唑啉衍生物,可特异性地与两种序列非常相近的蛋白质结合并抑制磷酸化 P³⁸MAPK 的活性,阻断 P³⁸MAPK 通路^[11,12]。本研究中,pAdEasyBMP9 诱导组和 DMSO 组培养 21 d 时 Western blot 和免疫荧光检测出有心肌特异性蛋白 cTnT、CX43、 α -MHC 表达,SB203580 组和空白组、pAdEasyGFP 组培养 21 d 时均无心肌特异性蛋白 cTnT、CX43、 α -MHC 表达,实验结果说明 pAdEasy-BMP9 能通过 P³⁸MAPK 通路诱导 C3H10T1/2 干细胞分化成为具有收缩功能基础的心肌样细胞,阻断 P³⁸MAPK 通路后 pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化的作用减弱。RT-qPCR 检测发现各组均出现了 GATA4 与 MEF2C 表达,但是从扩增量上 pAdEasyBMP9 诱导组及 DMSO 组明显高于空白组和 pAdEasyGFP 组,空白组和 pAdEasy-GFP 组又明显高于 SB203580 组。RT-qPCR 检测结果说明 pAdEasyBMP9 通过 P³⁸MAPK 通路使 C3H10T1/2 干细胞在时间以及空间序列上更倾向于向心肌样细胞分化,阻断 P³⁸MAPK 通路可以减弱其诱导分化作用。

综上所述,pAdEasyBMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞能激活 P³⁸MAPK 通路,并促进其向心肌样细胞分化。

参 考 文 献

- [1] 谭金童,陈 沅,向 平.BMP9 对 C3H10T1/2 干细胞向心肌细胞分化的影响[J].重庆医科大学学报,2009,34(6):672-676.
Tan J T,Chen Y,Xiang P.The influence of BMP9 in myocardiocytes differentiation of stem cell in vitro[J].Journal of Chongqing Medical University,2009,34(6):672-676.
- [2] 韦 皓,陈 沅,沈 彪,等.BMP13 在 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化过程中的作用[J].第三军医大学学报,2011,33(8):813-817.
Wei H,Chen Y,Shen B,et al.Effect of BMP13 in myocardiocytes differentiation of C3H10T1/2 stem cell in vitro[J].Journal of Third Military Medical University,2011,33(8):813-817.
- [3] 沈 彪,韦 皓,陈 沅.BMP13 转染 C3H10T1/2 细胞对改善心肌梗大鼠心功能的影响[J].重庆医科大学学报,2011,36(6):677-680.
Shen B,Wei H,Chen Y.BMP13 on C3H10T1/2 cells to improve cardiac function in myocardial infarction rats[J].Journal of Chongqing Medical University,2011,36(6):677-680.
- [4] 顾 萍,温 雅,马芹颖,等.骨髓基质细胞条件培养液通过 P³⁸信号转导通路诱导中脑神经干细胞分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(37):7329-7332.
Gu P,Wen Y,Ma Q Y,et al.P³⁸ signal-transduction pathway mediates the differentiation of mesencephalic neural stem cells induced by bone marrow stromal cell-conditioned medium[J].Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2007,11(37):7329-7332.
- [5] Brester J L,De V T,Dwyer N,et al.An osmosensing signal transduction pathway in yeast[J].Science,1993,259(5102):1760-1763.
- [6] Mu J Y,Chen X G.The progress of the study on the mitogen-activated protein kinase pathways[J].Chinese Bulletin of Life Science,2002,14(4):208-211.
- [7] John M,Avruch K J.Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J].Physiological Reviews,2001,81(2):807-869.
- [8] Massague J,Attisano L,Wrana J T.The TGF- β family and its composite receptor[J].Trends in Cell Biology,1994,4(5):172-178.
- [9] Matthews D A,Russell W C.Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease[J].General Virology,1995,76(Pt8):1959-1969.
- [10] Yamaguchi A,Komori T,Suda T.Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins,hedgehogs and Cbfa1[J].Endoc Rev,2000,21(4):393-411.
- [11] Obata T,Brown G E,Yaffe M B.MAP kinase pathways activated by stress:the P³⁸MAPK pathway[J].Critical Care Medicine,2000,28(1):67-77.
- [12] Clark J,Sarafraz N,Marber M.Potential of P³⁸MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease[J].Pharmacology & Therapeutics,2007,116(2):192-206.

(责任编辑:关蕴良)