

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000073

ERK5 信号通路参与 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞
向心肌样细胞的分化

耿雪静, 陈 沅, 陈 露, 孙文静, 刘书霞

(重庆医科大学附属儿童医院心血管内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究细胞外信号调节激酶 5(extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5)信号通路在骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)诱导 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化中的作用。**方法:**用 AdBMP9 和 AdGFP 转染 C3H10T1/2 细胞, 流式细胞术检测转染效率, Western blot 检测磷酸化 ERK5(phosphorylation ERK5, p-ERK5)和 ERK5 的表达水平, 免疫荧光检测 p-ERK5 在细胞内的表达位置; ERK5 特异性抑制剂 BIX02189 预处理细胞再经 AdBMP9 诱导, Western blot 检测 p-ERK5 和 ERK5 表达水平, RT-qPCR 检测心肌特异性基因肌细胞增强因子(myocyte enhancer factor, MEF)2C、GATA 结合蛋白 4(GATA binding protein 4, GATA4)表达, Western blot 检测心肌特异性蛋白缝隙连接蛋白 43(connexin 43, CX43)、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)表达。**结果:**AdGFP 与 AdBMP9 的转染效率达 50%左右, 经 AdBMP9 诱导后的细胞 p-ERK5 表达明显增高($P<0.01$), 免疫荧光结果显示 BMP9 组 p-ERK5 表达明显增强且主要集中于胞核; 15 $\mu\text{mol/L}$ BIX02189 可完全抑制 p-ERK5 的表达($P<0.01$), 且明显降低了由 AdBMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 GATA4、MEF2C 基因与 CX43、cTnT 蛋白表达($P=0.000$)。**结论:**BMP9 可以通过激活 ERK5 信号通路调控 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化。

【关键词】细胞外信号调节激酶 5; 骨形态发生蛋白 9; 心肌样细胞; 肌细胞增强因子 2C

【中图分类号】R725.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-24

Involvement of ERK5 signaling pathway in the cardiomyocyte-like
differentiation of C3H10T1/2 cells induced by bone morphogenetic protein 9

Geng Xuejing, Chen Yuan, Chen Lu, Sun Wenjing, Liu Shuxia

(Department of Cardiology, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To investigate the role of ERK5 signal pathway in the differentiation of C3H10T1/2 cells into cardiomyocyte-like cells induced by bone morphogenetic protein 9 (BMP9). **Methods:** C3H10T1/2 cells were infected with recombinant adenovirus AdBMP9 and AdGFP, and the transfection efficiency was detected by flow cytometry. Expression levels of phosphorylated ERK5 (p-ERK5) and ERK5 were detected by Western blot and the expression sites of p-ERK5 in the cell were detected by immunofluorescence. C3H10T1/2 cells were preprocessed with ERK5 special inhibitor BIX02189 and induced by AdBMP9. Expression levels of p-ERK5 and ERK5 were detected by Western blot; expression levels of myocardial specificity gene myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) and GATA4 were measured by real-time fluorescence quantitative PCR and expression levels of myocardial specificity protein connexin 43 (CX43) and cardiac troponin T (cTnT) were detected by Western blot. **Results:** The transfection efficiencies of AdGFP and AdBMP9 were about 50% and the expression level of p-ERK5 after being induced by AdBMP9 was significantly higher ($P<0.01$). Immunofluorescence showed that the expression of p-ERK5 of BMP9 group was obviously increased and mainly concentrated in the nucleus. 15 $\mu\text{mol/L}$ BIX02189 completely inhibited the expression of p-ERK5 ($P<0.01$) and significantly inhibited the AdBMP9 induced expression of MEF2C, GATA4 genes and CX43, cTnT proteins in C3H10T1/2 cells ($P=0.000$). **Conclusion:** The ERK5 signal pathway can be activated by BMP9 to promote cardiomyocyte-like differentiation from C3H10T1/2 cells.

【Key words】 extracellular signal-regulated kinase 5; bone morphogenetic protein 9; cardiomyocyte; myocyte enhancer factor 2C

作者介绍: 耿雪静, Email: xuejingss@126.com,
研究方向: 干细胞移植及其分化机制。

通信作者: 陈 沅, Email: cy111938@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30772361)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000073.html>

由于心肌细胞为永久性细胞,受损伤后只能以瘢痕组织修复,临床药物、介入和手术治疗都不能代替坏死的心肌,所以如何修复坏死心肌细胞是心血管研究领域的重要课题,随着细胞分子领域研究的深化及细胞移植技术的推广,干细胞移植治疗心肌疾病越来越备受关注,使人们看到了修复和再生受损心肌细胞的希望。C3H10T1/2 细胞最初是 Reznikoff 等^[1]从 C3H 小鼠胚胎分离建立的细胞株,功能上与骨髓间充质干细胞相似,且连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能。课题组前期研究发现经 BMP9 诱导可使具有多向分化潜能的 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化^[2-3]。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)家族,研究发现其是心脏发育的关键因子^[4],但是关于 BMPs 诱导干细胞分化的机制并不明了。有研究证明 BMPs 可以激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路,主要是 P38MAPK 及 ERK1/2 通路,参与细胞的分化、生长、增殖等生理活动^[3,5],ERK5 通路作为 MAPK 家族的一员,研究发现其在血管生成、心脏发展、血管完整性维持中都有重要作用^[6],因此进一步研究 BMP9 与 ERK5 通路间的关系必将对诱导干细胞向心肌细胞分化的研究奠定基础。

本实验利用 AdBMP9 感染 C3H10T1/2 细胞,检测 C3H10T1/2 细胞经 BMP9 诱导后 ERK5 通路的激活情况及特异性抑制剂 BIX02189 预处理后经 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞心肌特异性基因和蛋白表达情况,以初步探讨 ERK5 是否参与了 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化的过程。

1 材料与方法

1.1 材料

C3H10T1/2 细胞、BMP9 腺病毒(AdBMP9)、空载腺病毒(AdGFP)(美国芝加哥大学分子肿瘤实验室惠赠);优质胎牛血清(Hyclone 公司);RT-qPCR 引物序列(华大基因-上海鼎安生物技术有限公司合成);RT-qPCR 染料(天根生物技术公司);RNA 提取试剂盒(BioTeke 公司);反转录试剂盒(TaKaRa 公司);兔抗鼠 p-ERK5、兔抗鼠 ERK5 多克隆抗体(Cell signaling 公司);兔抗鼠 CX43、鼠抗鼠 cTnT 单克隆抗体(Abcam 公司);山羊抗兔 Dylight549 荧光二抗及 β -actin 鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔及兔抗鼠二抗(北京康为世纪生物技术有限公司);BIX02189(Selleck 公司)。

1.2 细胞培养及处理

C3H10T1/2 细胞的复苏、培养及转染同参考文献^[2]。转染前 1 h 加入 BIX02189 预处理细胞,转染后倒置显微镜下观察细胞生长情况和形态变化,连续培养 3 周。

1.3 检测腺病毒的转染效率及转染后 ERK5 信号通路的激活情况

1.3.1 流式细胞术检测转染效率 细胞经随机分组转染处理 24 h 后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)漂洗 3 次,0.25%的胰酶消化后离心, PBS 漂洗细胞后离心,用 PBS 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml 置于 1.5 ml 的 EP 管内上流式细胞仪检测绿色荧光的表达,用未转染的细胞作为阴性对照。

1.3.2 Western blot 检测 p-ERK5、ERK5 的表达 实验分组:(1)空白组:未转染组;(2)绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)组;AdGFP 转染组;(3)BMP9 组;AdBMP9 转染组,细胞经随机分组后根据预实验摸索加入适量的腺病毒液使 24 h 后转染效率维持在 50%左右,转染处理 24 h 后提取全蛋白,BCA 法测蛋白浓度,经 $5 \times$ 上样缓冲液处理后 $50 \mu\text{g}/\text{孔}$ 上样跑胶,半干转膜,室温封闭 1 h,室温一抗(均按 1:1 000 稀释)孵育 1 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日摇床复温 1 h 后 Tris 缓冲液(tris buffered saline tween, TBST)洗膜 10 min $\times$ 3 次,加入山羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次,化学发光剂曝光显影,凝胶图像分析系统采集图像,Quantity One 软件分析条带灰度值,以 p-ERK5 与 ERK5 的比值, ERK5 与内参 β -actin 的比值作为 p-ERK5 及 ERK5 的相对表达量,重复 3 次后进行统计分析。

1.3.3 免疫荧光技术定位 p-ERK5 在细胞内的表达 细胞爬片 48 h 后转染处理,24 h 后经 PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次后,4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,1% TritonX-100 破膜 10 min, PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,山羊封闭血清封闭 30 min,室温孵育兔抗鼠 p-ERK5 一抗(1:100)1 h 后放 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日室温复温后 PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,加入 Dy-light549 标记山羊抗兔二抗(1:400)室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核 15 min 后 PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次,甘油封片后荧光显微镜下观察并拍照,其中蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核,红色荧光为目的蛋白 p-ERK5 表达。

1.4 Western blot 检测 BIX02189 预处理后 p-ERK5 的表达及心肌特异性标志物的表达

1.4.1 Western blot 检测不同浓度 BIX02189 预处理后 p-ERK5 的表达 实验分组:(1)BMP9 组;(2)BMP9+BIX02189 $5 \mu\text{mol/L}$ 组; $5 \mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理后 AdBMP9 腺病毒转染组;(3)BMP9+BIX02189 $10 \mu\text{mol/L}$; $10 \mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理后 AdBMP9 转染组;(4)BMP9+BIX02189 $15 \mu\text{mol/L}$ 组; $15 \mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理后 AdBMP9 转染组,细胞经 0、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理 1 h 后再经 AdBMP9 转染 24 h 后提取全蛋白进行检测,方法同 1.3.2,重复 3 次后进行统计分析。

1.4.2 RT-qPCR 检测 C3H10T1/2 细胞经 BIX02189 $15 \mu\text{mol/L}$ 预处理后心肌特异性基因 MEF2C、GATA4 表达 实验分组:(1)空白组;(2)GFP 组;(3)BMP9 组;(4)BMP9+二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组;DMSO 预处理后 AdBMP9 转染组;(5)BMP9+BIX02189 $15 \mu\text{mol/L}$ 组; $15 \mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理后 AdBMP9 转染组。细胞传代接种到 6 孔板内,随机分组后经 DMSO 或 BIX02189 预处理 1 h 后再经 AdGFP 或

AdBMP9 转染后培养 1 周,离心柱法提取总 RNA,测 RNA 浓度,反转录为 cDNA 后放 -80°C 保存。经过解链温度 95°C ;扩增温度 95°C ;退火温度 60°C ;延伸温度 60°C ;40 个循环扩增,得到各个基因的起始拷贝数,根据 Ct 值比较基因的表达量。用 β -actin 做内参, $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct 目的基因}-\text{Ct 内参基因})-(\text{Ct 空白组}-\text{Ct 内参基因})$, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 为基因的相对表达量,重复 3 次后进行统计,引物序列同参考文献[3]。

1.4.3 Western blot检测BIX02189 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 预处理后C3H10T1/2细胞的 cTnT 和 CX43 表达水平 分组同 1.4.2,细胞随机分组处理后连续培养 3 周提取全蛋白进行检测,方法同 1.3.2, CX43、cTnT 与内参 β -actin 的比值作为 CX43 和 cTnT 的相对表达量,重复 3 次后进行统计分析。

1.5 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件处理。结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 C3H10T1/2 细胞形态观察

倒置显微镜下可见 BMP9 组的 C3H10T1/2 细胞培养 3 周后连接紧密,排列整齐,呈长梭形,而空白组细胞排列紊乱,呈多边形或不规则形,如图 1。

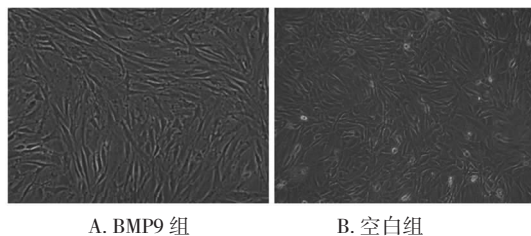


图 1 倒置显微镜下的 C3H10T1/2 细胞 (100 $\times$)

Fig.1 C3H10T1/2 cells in inverted microscope (100 $\times$)

2.2 腺病毒的转染情况及 ERK5 通路的激活情况

2.2.1 流式细胞术检测转染效率 加入腺病毒处理 24 h 后 2 组间无明显差别,达到 50 % 左右,如图 2。

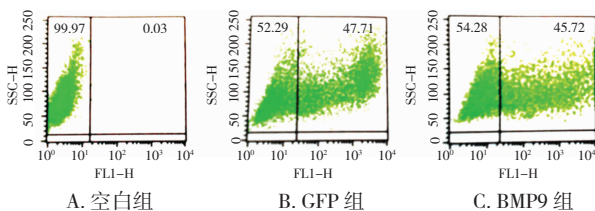


图 2 流式细胞术检测转染效率

Fig.2 Transfection efficiency detected by flow cytometry

2.2.2 Western blot 检测 p-ERK5、ERK5 的表达情况 结果显示各组 C3H10T1/2 细胞均能检测出 p-ERK5 和 ERK5 的表达,但 ERK5 表达未见差异性 ($P=0.793$), p-ERK5 表达有差异性, p-ERK5 组间比较发现 BMP9 组较空白组、GFP 组表达明显增高,差异有统计学意义 ($P=0.000, 0.001$),见表 1 及图 3。

表 1 Western blot 检测 p-ERK5、ERK5 表达

Tab.1 Expression of phosphor-ERK5 and ERK5 detected by

Western blot			
蛋白名称	空白组	GFP组	BMP9组
p-ERK5	0.259 ± 0.128	0.437 ± 0.072^a	0.967 ± 0.138^b
ERK5	0.997 ± 0.107	1.050 ± 0.159	0.979 ± 0.119

注:a, p-ERK5, 与 BMP9 组相比 $P<0.01$; b, p-ERK5, 与空白组相比 $P<0.001$

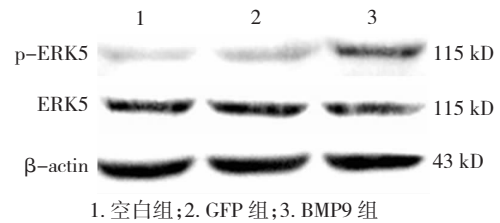


图 3 Western blot 检测 p-ERK5、ERK5 表达

Fig.3 Expression of phosphor-ERK5 and ERK5 detected by Western blot

2.2.3 免疫荧光检测 p-ERK5 表达定位 结果显示各组细胞的胞质、胞核均可见 p-ERK5 的表达,空白组与 GFP 组无明显差别,但经 AdBMP9 诱导后 p-ERK5 的表达明显增强,且主要集中于胞核,见图 4。

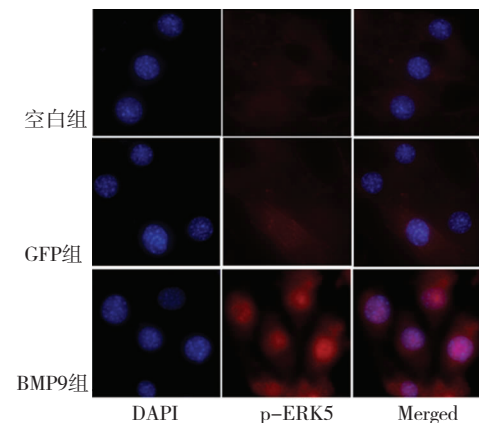


图 4 免疫荧光检测 p-ERK5 的细胞定位 (400 $\times$)

Fig.4 Cellular localization of p-ERK5 detected by immunofluorescence (400 $\times$)

2.3 特异性抑制剂 BIX02189 处理后 ERK5 通路的激活情况及心肌特异性标志物的表达

2.3.1 Western blot 检测 BIX02189 预处理 p-ERK5 和 ERK5 表达情况 结果显示加入 BIX02189 后 ERK5 的表达无明显差异 ($P=0.622$), 而 p-ERK5 表达随着药物浓度的增加逐渐降低 ($P=0.001$), 加入 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ BIX02189 预处理组检测不到 p-ERK5 表达,因此后续选择 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的浓度来研究阻断 ERK5 通路的激活后心肌特异性基因及蛋白的表达情况,见表 2 及图 5。

2.3.2 RT-qPCR 检测心肌特异性基因 MEF2C、GATA4 表达 结果显示各组均有基因的表达,MEF2C 组间比较发现 BMP9 组、BMP9+DMSO 组相对表达量无统计学差异 ($P=0.997$),且 BMP9 组及 BMP9+DMSO 组均明显高于空白组、

表 2 Western blot 检测经 BIX02189 预处理后 p-ERK5、ERK5 表达

Tab.2 Expression of p-ERK5 and ERK5 in C3H10T1/2 cells after being treated with BIX02189 detected by Western blot

蛋白名称	BMP9组	BMP9 + BIX02189 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	BMP9 + BIX02189 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	BMP9 + BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组
p-ERK5	0.852 $\pm$ 0.127	0.605 $\pm$ 0.183	0.368 $\pm$ 0.197	0.039 $\pm$ 0.034 ^a
ERK5	1.021 $\pm$ 0.061	1.081 $\pm$ 0.081	0.961 $\pm$ 0.127	1.016 $\pm$ 0.140

注:a,p-ERK5,与 BMP9 组,BMP9+BIX02189 5 $\mu\text{mol/L}$ 组,BMP9+BIX02189 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 $P < 0.05$

表 3 RT-qPCR 检测 MEF2C、GATA4 表达

Tab.3 Expression of MEF2C and GATA4 detected by RT-qPCR

基因名称	空白组	GFP组	BMP9组	BMP9 + DMSO 组	BMP9 + BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组
MEF2C	1	0.998 $\pm$ 0.121	3.674 $\pm$ 0.464 ^a	3.673 $\pm$ 0.386 ^a	0.357 $\pm$ 0.065 ^b
GATA4	1	0.967 $\pm$ 0.098	3.665 $\pm$ 0.435 ^a	3.628 $\pm$ 0.498 ^a	0.829 $\pm$ 0.094

注:a,GATA4 MEF2C,与空白组,GFP 组,BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 $P=0.000$;b,MEF2C,与空白组,GFP 组相比 $P < 0.05$

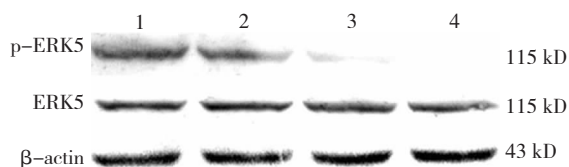
表 4 Western blot 检测 cTnT、CX43 表达

Tab.4 Expression of cTnT and CX43 detected by Western blot

蛋白名称	空白组	GFP组	BMP9组	BMP9 + DMSO 组	BMP9 + BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组
cTnT	0.015 $\pm$ 0.016	0.007 $\pm$ 0.006	0.161 $\pm$ 0.033 ^a	0.190 $\pm$ 0.026 ^a	0.006 $\pm$ 0.005
CX43	0.167 $\pm$ 0.117	0.245 $\pm$ 0.072	0.921 $\pm$ 0.054 ^a	0.876 $\pm$ 0.044 ^a	0.244 $\pm$ 0.031

注:a,CX43 cTnT,与空白组,GFP 组,BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 $P=0.000$

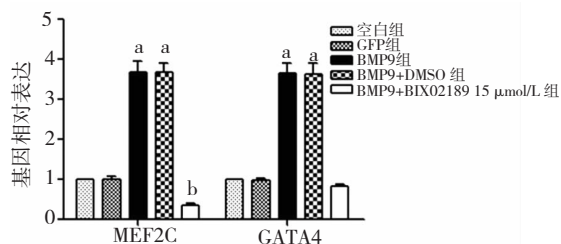
GFP组的表达(均为 $P=0.000$),而 BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组的 MEF2C 基因表达量显著低于其余 4 组($P=0.017$ 、 0.018 、 0.000 、 0.000),空白组与 GFP 组间表达量无统计学意义($P=0.992$);GATA4 组间比较发现 BMP9 组、BMP9+DMSO 组相对表达量无明显差异($P=0.885$),且都明显高于空白组、GFP 组、BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组的表达(均为 $P=0.000$),空白组、GFP 组与 BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组之间无明显差异(P 均 >0.5),见表 3 及图 6。



1. BMP9 组;2. BMP9+BIX02189 5 $\mu\text{mol/L}$ 组;3. BMP9+BIX02189 10 $\mu\text{mol/L}$ 组;4. BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 5 Western blot 检测经 BIX02189 预处理后 p-ERK5、ERK5 表达变化

Fig.5 Expression of p-ERK5 and ERK5 in C3H10T1/2 cells after being treated with BIX02189 detected by Western blot

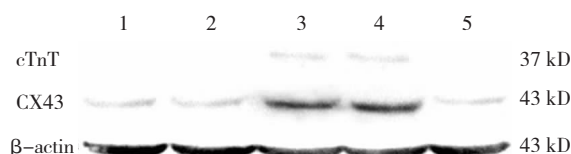


a;GATA4 MEF2C,与空白组,GFP 组,BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组相比 $P=0.000$;b,MEF2C,与空白组,GFP 组 $P < 0.05$

图 6 qRT-PCR 检测 MEF2C、GATA4 表达

Fig.6 Expression of MEF2C and GATA4 detected by qRT-PCR

2.3.3 Western blot 检测心肌特异性蛋白 cTnT 和 CX43 表达 结果显示 BMP9 组与 BMP9+DMSO 组间 cTnT 表达无明显差异性($P=0.123$),高于其余 3 组 cTnT 表达(均为 $P=0.000$);各组均可见 CX43 表达,在 BMP9 组与 BMP9+DMSO 组间无明显差异($P=0.456$),但这 2 组 CX43 表达均较其余 3 组高且差异有统计学意义(均为 $P=0.000$),而空白组、GFP 组、BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组的 CX43 表达未见统计学差异(P 均 >0.2),见表 4 及图 7。



1. 空白组;2. GFP 组;3. BMP9 组;4. BMP9+DMSO 组;
5. BMP9+BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 7 Western blot 检测 cTnT 及 CX43 表达

Fig.7 Expression of cTnT and CX43 detected by Western blot

3 讨论

心肌疾病是目前临床发病率较高的疾病之一,间充质干细胞作为种子细胞,被广泛应用于干细胞移植治疗心肌疾病中^[7]。心肌形成基因包括 Nkx-2 家族基因、bHLH 家族基因、MEF2 家族基因、GATA 家族基因等。MEF2C 是所有 MEF2 基因中在心脏中表达最早的,因 MEF2C 基因突变会引起心血管发育畸形^[8],GATA4 是心脏发育重要的转录因子,其转录活性和 DNA 亲和力受转录后蛋白共价修饰的调

节,并影响下游目的基因和相关转录因子表达、心肌细胞生长和心脏发育^[9],是心脏前体细胞的最早期标志之一。本实验采用 BMP9 通过腺病毒载体转染到 C3H10T1/2 细胞,以 MEF2C、GATA4 以及心肌特异性蛋白 CX43、cTnT 作为识别干细胞向心肌细胞分化的标志,来研究 BMP9 诱导干细胞向心肌细胞分化的能力及其机制。

MAPK 信号传递途径是刺激信号从细胞表面到细胞核内的重要传递者,ERK5 作为 MAPK 家族中的一员,是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,负责传递丝裂原信号的信号转导蛋白。它正常定位于胞浆,当激活后转位至胞核,才可调节转录因子活性,产生调控细胞生长、发育、分裂及细胞间功能的同步性等多种生理功能^[6],ERK5 的直接酶作用底物是转录因子 MEF2C,MEF 蛋白与 ERK5 的 C 端结合,被 ERK5 磷酸化后增强其转录活性^[10]。本实验中 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞 24 h 后结果显示,ERK5 的表达没有明显变化,而 p-ERK5 表达明显增强,免疫荧光显示胞质、胞核均可见 p-ERK5 的表达,但主要集中于胞核且胞核的表达明显增强,这说明经 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞激活了 ERK5 信号通路,促进了胞浆内 p-ERK5 向胞核内的转移,p-ERK5 可能通过激活多条转导途径中的下游转录因子介导了 BMP9 对 C3H10T1/2 细胞的诱导作用。

BIX02189 是由 Tatake 等^[11]研究确定的 ERK5 抑制剂,不但可通过特异性抑制 ERK5 的唯一上游激酶 MAPK 激酶 5(MAPK kinases 5,MEK5)的催化功能阻断 ERK5 磷酸化,同时该阻断剂也可抑制其下游底物 MEF2C^[10]的转录与激活,与前一阻断途径双重阻断 ERK5 信号通路的转导。本实验通过设计了不同的浓度梯度得出 BIX02189 15 $\mu\text{mol/L}$ 可以抑制 BMP9 诱导后 ERK5 通路的激活,且显著降低了由 BMP9 诱导的心肌特异性基因 GATA4、MEF2C 及心肌特异性蛋白 cTnT、CX43 的表达量,抑制剂处理后 MEF2C 的表达量甚至显著低于未处理的细胞,这说明 BIX02189 对 MEF2C 的转录与激活发挥了一定的抑制作用,与 Tatake 等^[11]的研究一致。课题组前期试验研究也发现,BMP9 可以通过 P38MAPK 信号通路介导其诱导向心肌样细胞分化的过程^[3],而 P38MAPK 也可以激活 MEF2C 并增强其转录^[8],这或许可以解释 MEF2C 并未完全被抑制的原因,而 MEF2C 是否还受到其他的信号转导途径的激活,还需要进一步研究。

关于 ERK5 与心肌发育的关系,国内外学者做

了大量的研究发现,ERK5 基因缺陷小鼠表现出多种胚胎外血管和胚胎心血管发育迟缓^[12],研究还表明 MEK5/ERK5 的激活可以降低心肌的缺血再灌注损伤^[13],这些都揭示了 MEK5/ERK5 信号通路在心血管系统发育中的重要作用。本实验也证实,BMP9 可通过激活 ERK5 信号通路调控 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化,而 MEK5-ERK5-MEF2C 信号转导途径参与其中发挥了正向调控作用,为干细胞向心肌细胞分化及其机制的研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division[J]. *Cancer Res*, 1973, 33(12): 3231-3238.
- [2] 谭金童, 陈 沅, 向 平. BMP9 对 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(6): 672-676.
- [3] 张 芬, 陈 沅, 孙文静, 等. P38MAPK 通路在 BMP9 诱导 C3H10T1/2 干细胞向心肌样细胞分化中的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(8): 657-660.
- [4] Wang J, Greene SB, Martin JF. BMP signaling in congenital heart disease: new developments and future directions[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011, 91(6): 441-448.
- [5] Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction[J]. *J Biochem*, 2010, 147(1): 35-51.
- [6] Nithianandarajah -Jones GN, Wilm B, Goldring CE, et al. ERK5: Structure, regulation and function[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(11): 2187-2196.
- [7] Elnakish MT, Hassan F, Dakhallah D, et al. Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: translation to bedside reality[J]. *Stem Cells Int*, 2012, 2012: 646038.
- [8] Xu J, Gong NL, Bodi I, et al. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(14): 9152-9162.
- [9] 俞立玮, 桂永浩. Gata4 转录后蛋白共价修饰[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(10): 800-803.
- [10] Kasler HG, Victoria J, Duramad O, et al. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(22): 8382-8389.
- [11] Tatake RJ, O'Neill MM, Kennedy CA, et al. Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 120-125.
- [12] Regan CP, Li W, Boueher DM, et al. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9248-9253.
- [13] Cameron SJ, Itoh S, Baines CP, et al. Activation of big MAP kinase1 (BMK1/ERK5) inhibits cardiac injury after myocardial ischemia and reperfusion[J]. *FEBS Lett*, 2004, 566(1-3): 255-260.

(责任编辑: 关蕴良)