

[文章编号] 1007-3949(2006)14-09-0741-06

• 实验研究 •

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 在心肌细胞分化中的作用

张小勇¹, 唐蔚青¹, 国汉邦¹, Michael Stouffs², Marisa Jaconi², 黎健¹

(1. 卫生部北京老年医学研究所/卫生部北京医院, 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730;

2. Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, Geneva University, 1221 Geneva, Switzerland)

[关键词] 病理学与病理生理学; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶; 活性氧; 胚胎干细胞; 心肌细胞

[摘要] 目的 探讨尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 在心肌细胞分化中的作用。方法 用核糖酶技术获得尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 低表达小鼠胚胎干细胞克隆, 将小鼠胚胎干细胞分化为胚小体。应用荧光染料 2,7-二氯荧光素二酯和定量氮蓝四唑试验检测活性氧水平; 逆转录聚合酶链反应和 Western blot 测定尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 mRNA 水平和心室肌肌球蛋白轻链 2 蛋白表达水平; DNA laddering 检测细胞凋亡; 原位杂交分析尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 在胚胎心脏中的表达。结果 活性氧清除剂 N-乙酰基半胱氨酸、过氧化氢酶和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶抑制剂二甲苯基碘可抑制胚胎干细胞分化成心肌细胞, 而较低浓度(1 nmol/L~100 nmol/L)的过氧化氢可明显促进心肌细胞分化, 但较高浓度(1 μmol/L)的过氧化氢显示出抑制作用($P < 0.001$)。实验发现, 心肌细胞分化过程中内源性活性氧的产生主要来自尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4。应用核糖酶技术抑制胚胎干细胞中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 的表达, 可引起活性氧水平下降($P < 0.001$), 肌球蛋白轻链 2 含量显著降低, 使心肌细胞的分化受到明显的抑制($P < 0.001$)。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 的高水平表达使干细胞产生大量活性氧, 也显著抑制心肌细胞的分化($P < 0.05$)。结论 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 通过产生活性氧在心肌细胞分化中起关键作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4 Regulates Cardiomyocyte Differentiation

ZHANG XiaoYong¹, TANG WeiQing¹, GUO HanBang¹, Michael Stouffs², Marisa Jaconi², and LI Jian¹

(1. Beijing Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, Key Laboratory of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China; 2. Department of Pathology and Immunology, Faculty of Medicine, Geneva University, 1221 Geneva, Switzerland)

[KEY WORDS] Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase; Reactive Oxygen Species; Embryonic Stem Cells; Cardiomyocyte; Differentiation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) in cardiomyocyte differentiation. **Methods** Anti-NOX4 ribozyme clones of mouse embryonic stem (ES) cells were differentiated into embryoid bodies (EBs). To measure reactive oxygen species (ROS) generation, H2DCF-DA and quantitative nitro blue tetrazolium (NBT) test was used. The mRNA levels of NOX were assayed by RT-PCR while the protein level of ventricular myosin light chain 2 (MLC2v) was detected by western blotting. And the apo ptosis of ES cells was detected by DNA laddering. Moreover, NOX4 mRNA in the heart of mouse embryo sections was analyzed by in situ hybridization. **Results** The exposure of embryoid bodies to 1-100 nmol/L H₂O₂ led to an enhanced beating activity, whereas 1 μmol/L H₂O₂ depressed cardiomyocyte differentiation as compared with control conditions ($P < 0.001$). In contrast, ROS scavengers, such as N-acetylcysteine and catalase, and NOX inhibitor diphenyleneiodonium chloride impaired H₂O₂-stimulated cardiogenesis. The results revealed NOX4 as source of ROS responsible for ES cell differentiation into cardiomyocytes. Down regulation of NOX4 expression in ES cells by ribozyme severely reduced ROS generation ($P < 0.001$) and MLC2v expression, resulting in the suppression of cardiomyocyte differentiation ($P < 0.001$). Moreover, NOX4 overexpression increased the production of ROS ($P < 0.05$) and induced ES cell apo ptosis.

Conclusion These results suggested a key role of NOX4 in cardiomyocyte differentiation through the generation of ROS.

作为信号传导通路中的第二信使, 活性氧 (reactive oxygen species) 在心肌细胞生长、分化及心

[收稿日期] 2006-07-05 [修回日期] 2006-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30370582)

[作者简介] 张小勇, 博士研究生, 主要从事心肌细胞分化的分子机理研究, 联系电话 010-58115049, E-mail 为 zhangxy_chs@yahoo.com.cn。唐蔚青, 副研究员, 主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的研究。通讯作者黎健, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 卫生部北京老年医学研究所所长, 主要从事心血管疾病的分子发病机制研究, 联系电话 010-58115048, E-mail 为 lijijiy@hotmail.com。

脏疾病如心肌肥大与心功能衰竭的发生中起关键作用^[1]。体外实验结果表明,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和血管紧张素 I^{E} (angiotensin I^{E}) Ang I^{E} 能引起心肌细胞肥大是因为刺激心肌细胞产生了较高水平的 O_2^- 或 H_2O_2 ,而高水平活性氧的产生则可诱导心肌细胞凋亡^[2]。体内实验证实,心功能衰竭发病过程中伴随着大量活性氧的产生及心肌细胞凋亡的发生。这提示活性氧在心肌细胞分化过程中的重要作用,表明心肌细胞的分化受到内源性活性氧的调控^[3]。目前业已证明,尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)是心血管系统中活性氧的主要来源^[4]。NOX利用NADH或NAD(P)H作为电子供体产生 O_2^- 。最早在吞噬细胞中发现的NOX由跨膜的gp91 phox、p22 phox及细胞质的p47 phox、p67 phox和Rac1等5个亚组组成^[5]。近年来,在不同组织中如结肠、肾脏、脾脏及血管平滑肌细胞中,发现了新的gp91 phox(现亦称为NOX2)同源体,分别称为NOX1、NOX3、NOX4和NOX5^[6]。然而,至今尚无关于心肌细胞分化过程中NOX的表达及其作用的报道。我们应用胚胎干细胞作为细胞模型探讨NOX源性活性氧在心肌细胞分化过程中的影响,将有利于优化体外诱导胚胎干细胞定向分化成心肌细胞的实验条件,有利于探寻控制心肌细胞分化的关键基因与转录因子。

1 材料和方法

1.1 胚胎干细胞培养与分化

小鼠胚胎干细胞系CGR8在37℃含5%的 CO_2 培养箱中培养^[7]。CGR8向心肌细胞的分化采用悬滴法(hanging drop method)^[8]。

1.2 质粒的构建与转染

依照小鼠NOX4编码序列设计核糖酶序列,序列为5'-CAT CTG CAT CTG T-tt cgt cct cac gga ctc atc ag-C TGA ACC TCA-3',其中大写字母为与小鼠NOX4编码序列互补的序列,小写字母为核糖酶环。将该序列克隆到质粒pcDNA3.1(Invitrogen)中的BamHI和SalI酶切位点。

1.2.1 稳定转染 按照Gene Pulser(Bio-Rad)说明书将所构建的质粒以电压240 V和电容500 μF 的条件电转染至CGR8细胞中,用250 mg/L的新霉素G418在LIF存在的条件下筛选出稳定转染的干细胞克隆。通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和核酶保护实验检测出3个NOX4 mRNA水平最大限度

降低的干细胞克隆。

1.2.2 瞬时转染 按照Effectene(Qiagen)转染试剂说明书进行。用荧光显微镜和流式细胞术检测平行转染的绿色荧光蛋白质粒(pcDNA3.1-GFP),显示转染效率为20%~30%。

1.3 RNA的提取和逆转录聚合酶链反应

小鼠胚胎干细胞和胚小体(embryoid bodies, EB)的总RNA用RNA试剂盒(Qiagen)提取。RT-PCR按照EZfTthRNA PCR试剂盒(Perkin Elmer)说明书进行。1 μg RNA于60℃逆转录35 min,然后取100~500 ng的cDNA用于PCR实验。PCR引物序列如下: NOX1为5'-TCC AGA GAA GAA AGG CAG AA-3'和5'-GTC AAG AGG TGG TTT GGA GC-3',扩增片段长度187 bp; NOX2为5'-GCT TGT GGC TGT GAT AAG CA-3'和5'-CCA CAC AGG AAA ACG CCT AT-3',扩增片段长度512 bp; NOX3为5'-AGC TGC CTT ATG CCC TGT ACC TC-3'和5'-AGG CCT TCA ATA ACG CCT CTG TC-3',扩增片段长度347 bp; NOX4为5'-CCT TGA ACT GAA TGC AGC AA-3'和5'-TGG AAC TTG GGT TCT TCC AG-3',扩增片段长度417 bp; β -tubulin为5'-TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC-3'和5'-GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC-3',扩增片段长度317 bp。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃1 min \rightarrow 60℃1 min \rightarrow 72℃1 min,30个循环后,72℃再延伸7 min。取15 μL 反应产物用1.5%琼脂糖电泳检测PCR结果。

1.4 核酶保护实验

核酶保护实验参照标准方法进行^[9]。将小鼠NOX4 cDNA序列(从1到447位核苷酸)克隆到pcDNA3.1载体的BamHI和Asp718I酶切位点,KpnI线性化载体。小鼠GAPDH cDNA序列(从393到522位核苷酸)克隆到pGEM-T载体,NotI将其线性化。T7聚合酶转录出NOX4和GAPDH的反义探针。用Perfect RNA试剂盒(Eppendorf)提取野生型胚胎干细胞和不同NOX4核糖酶干细胞克隆的总RNA。取10 μg 总RNA与反义探针进行杂交,向杂交混合液中添加80 mg/L RNA酶A以消化未结合的探针和其他单链RNA,将保护的片段纯化后用含有8 mol/L脲的5%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,放射自显影定量。

1.5 DNA提取与DNA梯形检测

按照Suicide-Track DNA梯形分离试剂盒(Oncogene)说明书提取DNA。1.5%琼脂糖电泳检测DNA梯形片段。

1.6 Western blot

小鼠胚胎干细胞和胚小体用含150 mmol/L

NaCl、1 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris (pH7.4) 和 1% NP40 的裂解液裂解, 超声 2 s, 离心 30 min ($14\ 000 \times g$, $4\ ^\circ\text{C}$) 分离出可溶蛋白。含有心室肌肌球蛋白轻链 2 (ventricular myosin light chain 2, MLC2v) 的不溶组分用含 50 mmol/L 磷酸甘油 (pH7.4)、1 mmol/L EGTA、0.3% Triton X-100 和 10% 甘油的缓冲液重悬。用 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度, 取 60 μg 蛋白电泳后转移到 PVDF 膜 (Millipore) 上, 用含 0.1% Tween 20 和 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭, 一抗为兔抗 MLC2v 抗血清 (1:500 稀释), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000 稀释), 用 ECL 试剂盒 (Amersham Biosciences) 显色。

1.7 活性氧的检测

胞内的活性氧水平用荧光染料 2,7-二氯氢化荧光素二酯 H2DCF-DA 检测^[10]。以定量氮蓝四唑 (nitro blue tetrazolium, NBT) 试验^[11] 检测细胞内和细胞外总活性氧水平。

1.8 原位杂交

NOX4 上游引物 5'-GTG TGC AGA GAC ATC CAA TC-3' 和下游引物 5'-TGG AGT TTT CTG CTG TGG AC-3' 被用来体外扩增得到 262 个核苷酸的 NOX4 探针, 将其克隆到 pGEM-T 载体上, 使用 RNA-DIG Labeling Mix (Roche Molecular Biochemicals) 试剂盒标记探针。对不同胚胎发育时期的整个胚胎石蜡包埋切片进行去石蜡、再水化, $37\ ^\circ\text{C}$ 蛋白酶 K 消化 30 min。切片在 20% 的甘油中预杂交 30 min 后与地高辛标记的正义和反义探针 (1:100) 杂交过夜。洗涤。加入碱性磷酸酶标记的二抗与样品在 $4\ ^\circ\text{C}$ 杂交过夜。用氮蓝四唑-5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯 (NBT/BCIP) (Sigma) 避光显色, 甘油封片, 光镜下检测。

1.9 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 进行统计处理, 用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性。

2 结果

2.1 活性氧对心肌细胞分化的影响

为了观察心肌细胞分化是否受内源性活性氧的调控, 我们用自由基清除剂如 N-乙酰基半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC, 5 mmol/L) 和过氧化氢酶 (200 kU/L) 或 NOX 抑制剂二甲苯基碘 (diphenyleneodonium chloride, DPI, 2.5 $\mu\text{mol/L}$) 在分化过程的第 4 天处理胚小体 2 h, 在第 8 天观察心肌细胞的生成。此外, 通过加入不同浓度的 H_2O_2 (1、10、100 和 1 000 nmol/L) 进一步分析活性氧对心肌细胞分化的影响。

结果发现, 活性氧清除剂可显著降低心肌细胞的生成数, 尤其是 NOX 抑制剂 DPI 可完全抑制心肌细胞的分化 (表 1)。这些结果说明了从胚胎干细胞向心肌细胞分化的过程可能受到源于 NOX 的活性氧调节。值得注意的是, 不同水平的活性氧对心肌细胞分化具有不同的效应。在分化过程的第 4 天用较低浓度 (1 nmol/L~100 nmol/L) 的过氧化氢处理胚小体 2 h 可明显促进心肌细胞分化, 而较高浓度 ($> 1\ \mu\text{mol/L}$) 的过氧化氢则显示出抑制作用 (表 2), 说明合适水平的活性氧是心肌细胞分化过程中所必需的。

表 1. 自由基清除剂或尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶抑制剂对心肌细胞收缩活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	第 8 天胚小体心搏率
对照组	58.23% \pm 4.15%
NAC	48.33% \pm 3.56% ^a
过氧化氢酶	28.67% \pm 2.53% ^b
DPI	2.02% \pm 1.45% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较

表 2. 过氧化氢对心肌细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

H_2O_2 浓度	第 8 天胚小体心搏率
0 (对照组)	49.33% \pm 6.16%
1 nmol/L	72.16% \pm 1.51% ^a
10 nmol/L	84.73% \pm 2.23% ^b
100 nmol/L	96.20% \pm 1.17% ^b
1 $\mu\text{mol/L}$	28.66% \pm 6.04% ^b

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较

2.2 胚胎干细胞和心肌细胞分化过程中尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的表达

为了确定胚胎干细胞内源性活性氧产生所依赖的 NADPH 氧化酶, 我们应用 RT-PCR 检测了胚胎干细胞中 NOX1、NOX2、NOX3 和 NOX4 mRNA 水平, 如图 1A 所示, NOX4 在小鼠胚胎干细胞中的表达水平最高, NOX3 虽然也在胚胎干细胞中表达, 但表达水平低, 而 NOX1 和 NOX2 在胚胎干细胞中不表达。另外我们分析了心肌细胞分化过程中 NOX 的表达。结果发现, 在心肌细胞分化过程中 NOX4 表达水平升高 (图 1B), NOX2 在分化过程的第 8 天才开始表达, 而 NOX1 和 NOX3 的表达水平没有改变 (结果未显示)。更进一步, 我们应用原位杂交法证实, 在小鼠胚胎发育过程中的胚胎心脏表达 NOX4 (图 1C)。提示内源性活性氧的产生可能主要来自 NOX4。

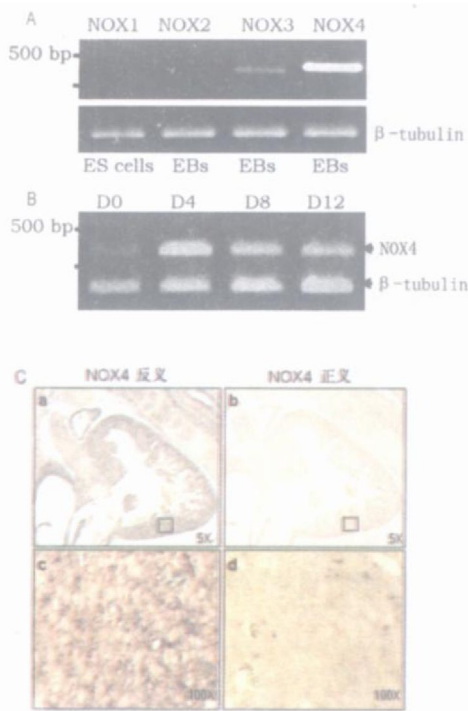


图 1. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的表达 A 为 RT-PCR 检测胚胎干细胞中 NOX1、NOX2、NOX3 和 NOX4 表达; B 为胚小体分化过程中 NOX4 mRNA 水平的变化; C 为原位杂交检测小鼠胚胎心脏中 NOX4 mRNA 表达, 其中 a 和 c 为 NOX4 反义探针, b 和 d 为 NOX4 正义探针。

2.3 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达水平的改变对心肌细胞分化的影响

为了确定 NOX4 在心肌细胞分化过程中所起的作用, 我们应用核糖酶技术抑制 NOX4 的表达。首先我们构建表达 NOX4 核糖酶的载体, 并将其转染入胚胎干细胞。经用 G418 筛选后可得到稳定表达 NOX4 核糖酶的干细胞克隆, 用 RT-PCR 和 RNA 酶保护实验确定这些克隆已缺乏 NOX4 的表达或表达水平很低(图 2), 然后用这些克隆做心肌细胞分化

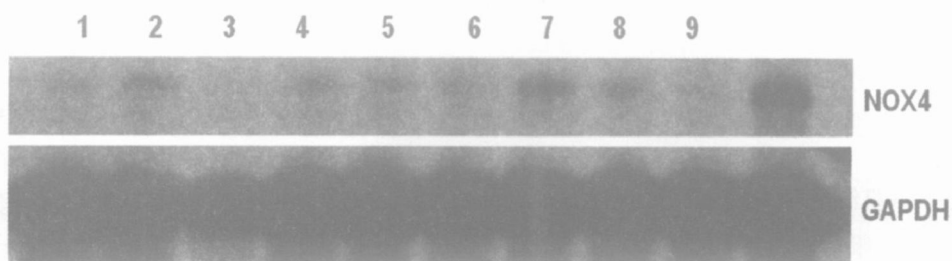


图 2. 核酶保护试验检测稳定表达 NOX4 核糖酶的干细胞克隆 NOX4 的表达抑制 1~9 为抗 NOX4 核糖酶的干细胞克隆, 10 为对照干细胞。

2.5 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 对心肌特异蛋白表达的影响

为了确定 NOX4 低表达是否影响心肌特异蛋白

实验。结果发现, NOX4 的低表达使心肌细胞的生成及其收缩活性受到明显的抑制($P < 0.001$) (表 3)。更进一步, 我们将 NOX4 基因表达载体转染胚胎干细胞, 产生高水平表达 NOX4 的干细胞, 观察 NOX4 的高水平表达对心肌细胞分化的影响。如表 4 所示, NOX4 的高水平表达显著抑制心肌细胞的分化。结果提示 NOX4 在心肌细胞分化过程中起关键作用。

2.4 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达水平的改变对活性氧产生的影响

为了确定 NOX4 是否通过活性氧的产生在心肌细胞分化过程中起关键作用, 我们检测稳定表达 NOX4 核糖酶和高水平表达 NOX4 干细胞中活性氧水平的改变。NBT 实验(表 5) 和 H2DCF-DA 荧光(图 3) 检测结果发现, NOX4 表达的抑制可引起低水平的活性氧产生, 而高水平表达的 NOX4 引起过量活性氧产生(表 4), 导致干细胞发生凋亡(图 4)。但自由基清除剂 NAC (5 mmol/L) 和过氧化氢酶 (200 kU/L) 的加入可以抑制 NOX4 高表达所导致的细胞凋亡的发生。

表 3. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 低表达抑制心肌细胞收缩活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	第 8 天胚小体心搏率
MOCK	59.70% \pm 1.98%
对照	54.02% \pm 3.26%
RF-1	13.33% \pm 3.62% ^a
RF-6	12.77% \pm 3.16% ^a
RF-9	9.17% \pm 4.45% ^a

a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较

的表达, 我们应用 Western blot 检测了在心肌细胞分化过程中 MLC2v 蛋白水平的改变量。如图 5 所示, 与正常心肌细胞相比, NOX4 表达抑制的心肌细胞

中 MLC2v 蛋白水平显著降低, 导致心肌细胞分化的缺陷。

表 4. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 过表达抑制心肌细胞分化及增强活性氧水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	第 8 天胚小体心搏率	NBT(A. U)
CGR8	58.33% \pm 3.39%	1.24 \pm 0.03
CGR8+pcDNA	59.82% \pm 1.98%	1.24 \pm 0.05
CGR8-NOX4	16.67% \pm 3.39% ^c	1.52 \pm 0.04 ^a

a 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.001$, 与 CGR8 比较

表 5. 稳定表达尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 核糖酶的胚胎干细胞活性氧水平下降 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分 组	NBT(A. U.)
对照	1.24 \pm 0.09
RF-1	0.76 \pm 0.05 ^a
RF-6	0.84 \pm 0.05 ^a
RF-9	0.84 \pm 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较

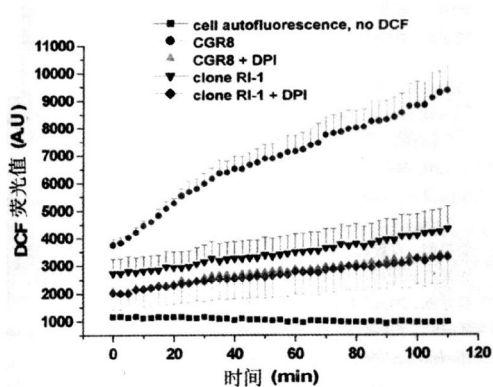


图 3. 稳定表达尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 核糖酶的胚胎干细胞活性氧水平下降

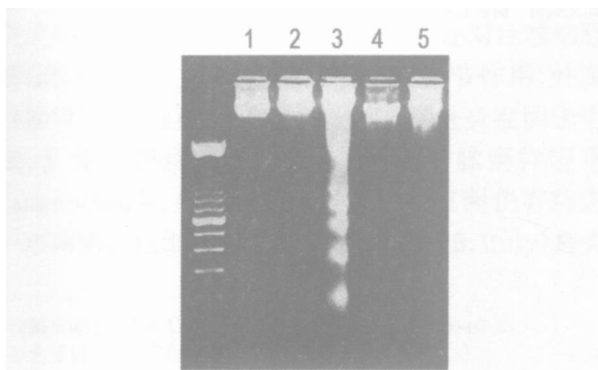


图 4. DNA laddering 检测细胞凋亡情况 1 为 CGR8, 2 为转染空载体, 3 为转染 NOX4, 4 为转染 NOX4+ NAC(5 mmol/L), 5 为转染 NOX4+ 过氧化氢酶(200 kU/L)

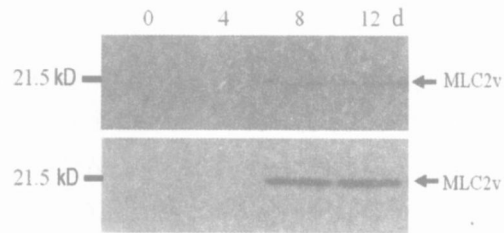


图 5. 心肌细胞分化过程中室肌浆球蛋白轻链 2 的蛋白水平变化 上为克隆 1, 下为对照组

3 讨论

胚胎干细胞具有多潜能性, 能分化成许多种类的细胞, 包括心肌细胞^[12]。干细胞来源的心肌细胞表达一些收缩蛋白, 例如 MLC2v 和 β 肌浆球蛋白重链(β myosin heavy chain, β MHC) 以及 α 辅肌动蛋白(α actinin) 等, 因此在显微镜下可看到与心脏搏动类似的心肌细胞团。因此, 胚胎干细胞为研究心肌细胞的分化提供了一个十分有用的工具。

细胞内活性氧的产生往往是正常代谢的结果, 但它具有潜在的破坏性。在正常情况下, 胞内的清除系统会将活性氧快速消除, 维持细胞氧化还原自稳态。当某些因素作用于细胞使这一稳态失调, 活性氧产生的速率大于清除的速率时, 就会造成活性氧的蓄积, 对细胞功能产生损伤作用。活性氧介导的细胞损伤与许多疾病包括心血管系统损伤的发病机制有关。此外, 活性氧还参与转录因子激活、基因表达、肌肉收缩、细胞生长、凋亡及趋化性的信号传导过程。因此, 活性氧已被看作是细胞增殖与分化过程中信号级联传导的特异第二信使。但活性氧在心肌细胞分化过程中所起的作用尚不十分清楚, 因此, 我们进行了初步的探讨。我们的结果发现, 在心肌细胞分化的第 4 天用低浓度 H_2O_2 (1~ 100 nmol/L) 处理胚小体 2 h, 可以提高心肌细胞分化效率。选择在第 4 天用 H_2O_2 处理, 是由于在这个时间点, 心脏特异的转录因子如肌细胞特异的增强因子 2C (myocyte-specific enhancer factor 2C, MEF2C)、GATA4 和 NKx2.5 刚开始表达, 但心肌特异的一些蛋白如 MLC2v、 β MHC 和 α actinin 等尚未表达, 因此, 外源性 H_2O_2 可以通过刺激转录因子调控 MLC2v 和 β MHC 等基因的表达, 从而促进心肌细胞的分化。相反, 活性氧清除剂可抑制心肌细胞分化, 表明在胚胎干细胞分化成心肌细胞的过程中内源性活性氧的产生起着重要作用。值得注意的是, 不同水平的活性氧对心肌细胞分化具有不同的效应。与较低浓度 H_2O_2

的促进心肌细胞分化作用相反,较高浓度($> 1 \mu\text{mol/L}$)的 H_2O_2 显示出抑制作用。事实上,过量的活性氧能够抑制心肌特异基因的表达^[13,14]。Puceat 等每天用 H_2O_2 处理胚小体,导致心肌细胞分化的抑制,这与我们用高浓度 H_2O_2 处理胚小体的结果相一致,说明合适水平的活性氧是心肌细胞分化过程中所必需的。

活性氧在细胞内可通过多种途径产生,但是对于参与信号传导的活性氧的产生来说,最重要的多酶复合物是NADPH氧化酶(NOX)。在信号分子从胞膜到胞核传递的极短时间内,NOX可以精密地上调或下调胞内活性氧的水平^[15]。相对于黄嘌呤氧化酶及线粒体内的氧化酶,NOX是心血管组织中产生活性氧的主要氧化酶。目前,NOX作为血管和心肌氧化还原状态重要的决定因素而倍受关注,但是从胚胎干细胞分化成心肌细胞的过程中何种NOX表达还不清楚。为了证明在胚胎干细胞增殖与分化中活性氧的产生主要来源于NOX4,除了应用NADPH氧化酶抑制剂DPI,我们主要采取“失去功能”(lose-function)和“获得功能”(get-function)两种策略,分别将NOX4特异的核糖酶或NOX4基因转染入胚胎干细胞,获得极低水平表达NOX4或高水平表达NOX4的胚胎干细胞。通过分析比较这些干细胞和对照干细胞中活性氧水平的不同来证实NOX4是活性氧产生的主要来源。在此基础上,我们通过测定胚小体的搏动功能评估了心肌细胞分化率,用Western blot测定了心肌特异性基因MLC2v的表达水平。我们的结果发现,表达NOX4核糖酶的ES稳定克隆内NOX4表达减少,引起活性氧的大幅度下降和心肌细胞特征性收缩蛋白如MLC2v的表达减少,导致心肌细胞分化的抑制。NOX4的高水平表达引起过量活性氧产生,导致干细胞发生凋亡,显著抑制心肌细胞的分化。我们提供的证据证明了NOX4在心肌细胞分化中所起的关键作用,但是,NOX4及其产生

的活性氧在心肌细胞分化过程中的作用机理信号传导途径尚不清楚,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, Hirofumi S, Nakayama H, Yamaguchi O, et al. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (2): 233-240
- [2] von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Circulation*, 1999, **99** (22): 2934-2941
- [3] Sauer H, Rahimi C, Hescheler J, Wartenberg M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, **476** (3): 218-223
- [4] Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (9): E85-90
- [5] Babior BM. NADPH oxidase: an update [J]. *Blood*, 1999, **93** (5): 1464-476
- [6] 屈顺林,唐蔚青,黎健. 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 228-231
- [7] Li J, Puceat M, Perez-Terzic C, Mery A, Nakamura K, Michalak M, et al. Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2002, **158** (1): 103-113
- [8] Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac specific genes and ionic currents [J]. *Circ Res*, 1994, **75** (2): 233-244
- [9] Irminger-Finger I, Soriano JV, Vaudan G, Montesano R, Sappino AP. In vitro repression of Bcral-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1998, **143** (5): 1329-339
- [10] Brubacher JL, Bols NC. Chemically deacetylated 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a probe of respiratory burst activity in mononuclear phagocytes [J]. *J Immunol Meth*, 2001, **251** (1-2): 81-91
- [11] Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaux N, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (40): 37594-601
- [12] 姜祖韵,袁毅君,陈良标,陆永良,姚行,戴利成,等. 建立绿色荧光蛋白标记的小鼠胚胎干细胞系及向心肌样细胞的分化[J]. *生物工程学报*, 2006, **20** (6): 890-895
- [13] Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress [J]. *Biochem J*, 1999, **342** (Pt3): 481-496
- [14] Puceat M, Travo P, Quinn MT, Fort P. A dual role of the GTPase Rac in cardiac differentiation of stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, **14** (7): 2781-792
- [15] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2001, **11** (4): 173-186

(此文编辑 胡必利)