

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.001>

· 论著 ·

多肽 pATMtide 在先天性心脏病中的作用

冯梦文, 尹安雯, 程子杰, 徐佳, 章浩, 张奇军, 李华, 钱玲梅

(南京医科大学第一临床医学院心内科, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 研究多肽pATMtide在P19细胞(小鼠畸胎瘤细胞)的分化及斑马鱼心脏发育中的作用, 探讨其与先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)之间的关系。**方法:** 从已报道的CHD羊水多肽图谱中筛选出1条表达明显上调的多肽pATMtide。在体外实验中, 通过加入外源性多肽pATMtide, 检测其对P19细胞分化的影响; 在体内实验中, 将多肽pATMtide通过显微注射技术注入到斑马鱼受精卵, 观察其对斑马鱼心脏发育的影响。**结果:** 与对照组相比, 加入外源性多肽pATMtide明显抑制了P19细胞的分化, 心脏发育各相关标志物表达水平明显下调。斑马鱼实验表明: 多肽pATMtide可造成斑马鱼心脏发育畸形。**结论:** 多肽pATMtide可影响P19细胞分化并导致斑马鱼心脏发育畸形, 表明多肽pATMtide与CHD的形成有一定的关系。

[关键词] 多肽; 先天性心脏病; P19细胞; 斑马鱼; 显微注射

Effect of pATMtide on congenital heart disease

FENG Mengwen, YIN Anwen, CHENG Zijie, XU Jia, ZHANG Hao, ZHANG Qijun, LI Hua, QIAN Lingmei

(Department of Cardiology, First Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract **Objective:** To investigate the function of pATMtide in the heart development of zebra fish and differentiation of P19 cells. **Methods:** An obvious up-regulated polypeptide pATMtide was found from our previous study. In vitro experiment, the effect of pATMtide on P19 cells differentiation were detected; and in vivo experiment, after microinjecting the zygotes zebra fish with pATMtide, the cardiac development of zebra fish was observed. **Results:** The differentiation and related cardiac biomarkers of P19 cells are reduced as well as the heart development of zebrafish after adding pATMtide. **Conclusion:** The differentiation and development are influenced after adding pATMtide. It indicates that pATMtide may play an important role in congenital heart disease.

Keywords peptides; congenital heart disease; P19 cells; zebra fish; microinjection

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是由各种原因导致的心脏、血管在胚胎发育过程中出现障碍, 致使心脏形态结构、功能

及代谢异常^[1]。在全球范围内, CHD的发病率约为8%, 占有主要先天性畸形的1/3, 且呈逐年上升趋势^[2]。在我国, CHD的发病率已上升

收稿日期 (Date of reception): 2017-11-29

通信作者 (Corresponding author): 钱玲梅, Email: lmqian@njmu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81370278, 81570209)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81370278, 81570209).

至出生缺陷第1位^[3], 成为婴幼儿死亡及致残的主要原因, 严重影响了人口素质及生活质量。多肽是指含50~100个氨基酸的小分子蛋白^[4], 近年来已有研究^[5-6]表明多肽在多种生理和病理过程中发挥重要作用, 但多肽在CHD发病机制中的研究尚少。本研究组之前的研究^[7]对3例单纯性室间隔缺损与正常对照胎儿羊水进行液相色谱串联质谱法检测, 筛选出一批显著差异表达的多肽, 并从中挑选出表达明显上调的多肽pATMtide作为研究对象, 探讨其在CHD中的可能作用。P19细胞(小鼠畸胎瘤细胞)在含1%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的培养条件下能分化成具有搏动功能的心肌细胞, 且其发育相关基因的表达及电生理学特征基本模拟了正常小鼠心肌发育过程, 是研究心肌细胞分化的良好模型^[8]。斑马鱼因其受精卵体外发育、胚胎透明、在发育过程中缺乏功能性心血管系统却仍具有生存能力, 是研究心脏发育的理想脊椎动物模型^[9]。本文拟检测pATMtide对P19细胞分化与斑马鱼心脏发育的影响, 以探究其在CHD中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

PBS, FBS, α -MEM培养基, 青霉素/链霉素购自美国Gibco公司; Trizol购自美国Life公司; DMSO购自美国Sigma公司; 反转录试剂盒、定量qPCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; CCK-8试剂盒购自日本同仁公司。

1.1.2 多肽

多肽序列为QNILIN。穿膜序列为RKKRRQRRR-A, 由上海科肽公司合成。

1.1.3 细胞

P19细胞株购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection)。

1.1.4 斑马鱼

野生型斑马鱼均为Tubingen品系, 购自南京尧顺禹生物科技有限公司。

1.1.5 临床样本

实验组为超声诊断为室间隔缺损的23~25周胎龄胎儿羊水样本。对照组样本为孕周匹配的非疾病因素人工流产胎儿羊水。收集前胎儿母亲已签署知情同意书, 实验伦理已获得南京医科大学第一临床医学院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 P19细胞的培养及诱导分化

P19细胞培养在含5% CO₂的37 °C恒温培养箱中, 所用 α -MEM培养基含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素。取对数生长期的P19细胞消化后加入1%DMSO悬浮培养以诱导P19细胞分化, 3~4 d后细胞开始聚集形成类胚体, 在7 d后转移到6孔培养板中, 每2 d更换培养基。在细胞分化的第0, 4, 8, 10天收集细胞提取RNA并用倒置显微镜观察形态变化。

1.2.2 斑马鱼的培养及胚胎的收集

斑马鱼饲养于28.5 °C标准养殖系统, 人工控制14 h光照/10 h黑暗, 取卵的前1 d晚上将雌鱼与雄鱼置于交配缸中, 第2天早上拿掉挡板, 雄鱼即可与雌鱼交配产卵, 约30 min后收集受精卵, 受精卵用于显微注射。

1.2.3 P19细胞的增殖与周期

利用CCK-8试剂盒检测细胞增殖, 细胞以500个/孔的密度接种于96孔板, 分别于0, 24, 48, 72及96 h加入CCK-8, 孵育2 h后检测吸光度值。使用无血清培养基饥饿培养P19细胞12 h后, 再用完全培养基培养24, 48 h, 加入50%乙醇用于细胞周期分析。

1.2.4 RNA提取、反转录及定量PCR

收集不同时间点的细胞, 按照RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)步骤提取RNA, 然后测定RNA浓度。通过TaKaRa反转录试剂盒对RNA进行反转录, 按照定量qPCR试剂盒步骤行定量PCR。通过2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法对结果进行分析, 所有目的基因通过甘油醛-3-磷酸脱氢酶作归一化处理。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0软件对数据进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)来表示, 组间以单因素方差t检验分析比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pATMtide 生物信息学分析

本实验中选取的多肽序列为QNILIN, 其前体蛋白为丝氨酸蛋白激酶(ataxia telangiectasia mutated kinase, ATM), ATM参与细胞周期检查点、DNA修复和细胞凋亡等多种生物过程。QNILIN位于ATM的第2 874~2 879个氨基酸之间, 因此将其命名为pATMtide。对pATMtide进行信息学分析, 结果显示其在物种间(人、小鼠、斑马鱼)具有高度同源性(图1A); 基因本体分析发现ATM与心脏发育有

关(图1B, 1C); 免疫荧光图片显示pATMtide位于细胞浆(图1D)。

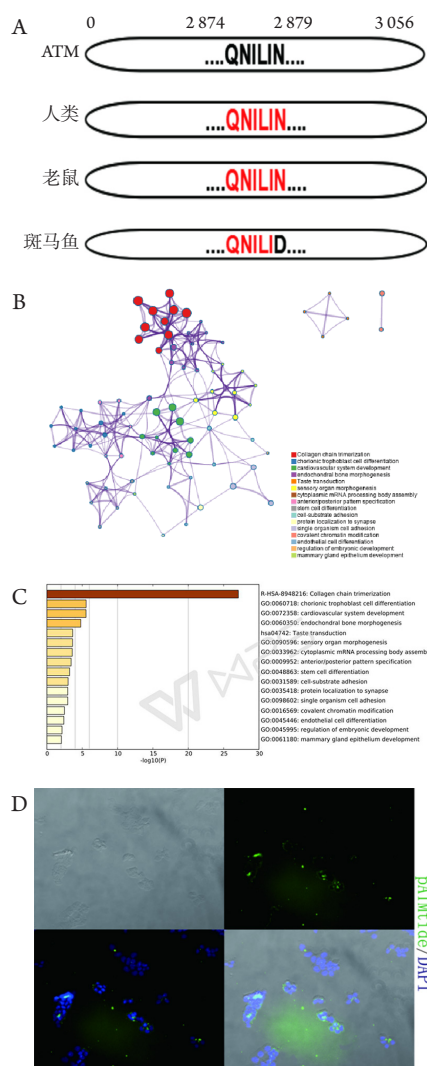


图1 ATM的生物信息学分析

Figure 1 Bioinformatics analysis of ATM

(A)pATMtide在ATM中的位置及其在不同物种中的同源性; (B-C)ATM的GO分析; (D)pATMtide在细胞中的定位。
(A) Position of pATMtide in ATM and the homology of pATMtide in different species; (B-C) Gene ontology analysis of ATM; (D) Localization of pATMtide in cells.

2.2 pATMtide 对 P19 细胞增殖和周期的影响

利用CCK-8法检测pATMtide对P19细胞增殖的影响。结果显示: 对照组与加肽组差异无统计学意义($P>0.05$, 图2A)。利用流式细胞仪分析细胞周期, 对照组与加肽组之间差异也无统计学意义($P>0.05$, 图2B)。因此, pATMtide不影响P19细胞的细胞增殖和细胞周期。

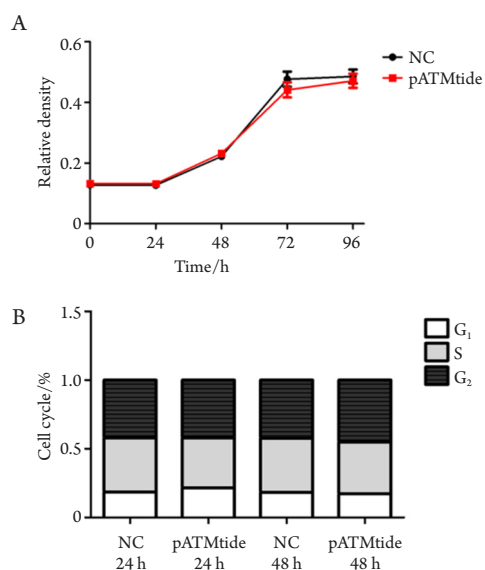


图2 pATMtide对P19细胞增殖和周期的影响

Figure 2 Effect of pATMtide on cell proliferation and cycle

(A)加入pATMtide后P19细胞的增殖; (B)加pATMtide后P19细胞的周期。

(A)Proliferation of P19 cells after adding pATMtide; (B) Cycle of P19 cells after adding pATMtide.

2.3 pATMtide 对 P19 细胞分化的影响

本研究探讨了pATMtide是否可对P19细胞的分化产生影响。与4~10 d对照组相比, 多肽处理组在大小、形态等方面均发生了明显变化, 类胚体变得不规则, 第10天心肌细胞跳动频率下降, 个数减少, 差异有统计学意义($P<0.05$; 图3A, 3B)。随后检测了心脏发育相关标志物GATA4, cTnT, NKX2.5和MEF2C的表达, 与对照组相比, 加肽组心脏发育相关标志物表达水平在P19细胞分化成心肌细胞的第8~10天发生下调(图3C)。因此, pATMtide可抑制P19细胞分化。

2.4 pM3K4tide 对斑马鱼心脏发育的影响

为观察多肽对斑马鱼心脏发育的影响, 本研究对斑马鱼卵进行显微注射, 将10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的pM3K4tide分别注入胚胎期斑马鱼, 在发育的不同阶段观察斑马鱼的存活率及形态。结果显示: 不同浓度的pM3K4tide均可影响斑马鱼的胚胎发育, 呈剂量依赖性, 且随着时间延长, 斑马鱼存活率逐渐下降(图4A)。基于此, 本文选择斑马鱼存活率较低的48, 72 h为观察时间点, 结果显示: 与对照组相比, 加肽组斑马鱼心率下降, 心房心室扩大, 心室壁变薄, 心包明显水肿(图4B~D), 表明pM3K4tide可影响斑马鱼心脏正常发育过程。

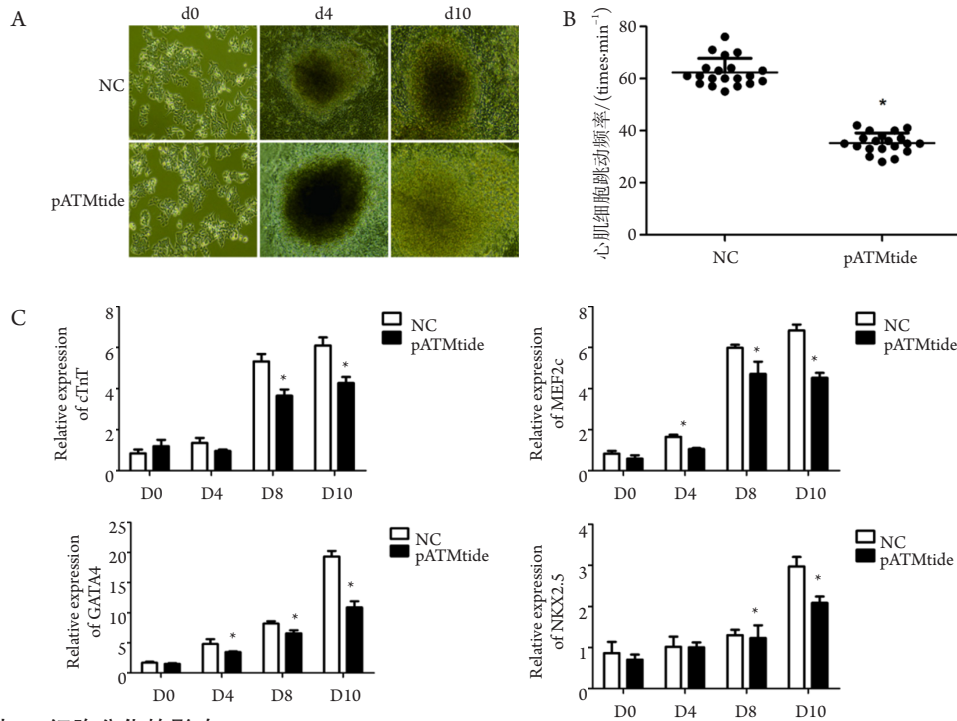


图3 pATMtide对P19细胞分化的影响

Figure 3 Effect of pATMtide on P19 differentiation

(A)P19分化的形态学改变(×200); (B)P19心肌细胞跳动频率(n=20); (C)与心脏发育有关的基因的表达水平($\bar{x} \pm s$)。与对照组比较, *P<0.05。

(A) Morphology of P19 cells during differentiation (×200); (B) Beating rate of P19 cells (n=20); (C) Expression levels of genes associated with heart development ($\bar{x} \pm s$). Compared with the control group, *P<0.05.

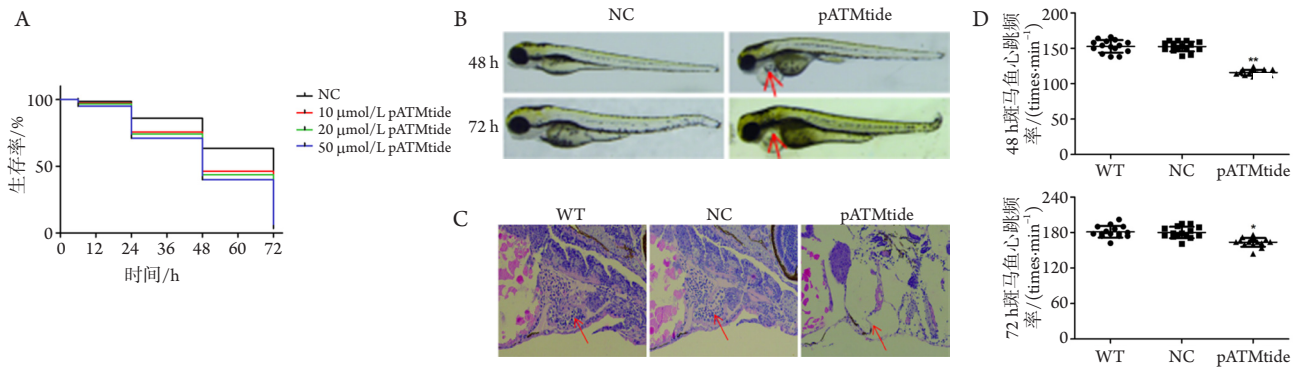


图4 pATMtide对斑马鱼心脏发育的影响

Figure 4 Influence of pATMtide on the development of zebrafish

(A)斑马鱼pATMtide显微注射后生存率; (B)斑马鱼发育的形态学; (C)斑马鱼pATMtide显微注射后(HE, ×200); (D)斑马鱼心脏跳动频率(n=15)。与WT组、对照组相比, *P<0.05。

(A) Survival rate of zebrafish post microinjection with pATMtide; (B) Morphology during zebrafish development; (C) Slices of zebrafish post microinjection with pATMtide (HE, ×200); (D) Heart rate of zebrafish (n=15). Compared with the WT group and control group, *P<0.05.

3 讨论

pATMtide是从室间隔缺损胎儿羊水多肽表达图谱中选择的含量上调的多肽。本研究对收集的

室间隔缺损23~25周胎龄胎儿羊水样本检测显示:pATMtide在CHD中显著增高。利用P19细胞和斑马鱼发育模型进行研究,结果显示:pATMtide能抑制P19细胞的分化,影响斑马鱼心脏发育甚至导致

其在发育中死亡, 表明pATMtide与CHD的发生有一定的关系。

生物信息学分析表明: pATMtide定位于ATM蛋白的第2 874~2 879个氨基酸, 与心脏发育等多种生物过程有关。已有研究^[10-11]发现: ATM参与许多疾病的发生, 其水平异常亦可导致心脏结构和功能的改变。研究^[12]表明: 敲除ATM基因的小鼠室间隔壁厚度和左心室内径减小、心肌细胞横截面积增大、基底纤维化增加。进一步研究^[12-13]发现: ATM影响心脏发育的作用与p53, JNKs及Akt信号通路的激活有关。

目前研究^[14]已发现: 多肽的作用方式多种多样, 主要涉及与膜受体、蛋白质的相互作用, 其能特异性识别与结合细胞表面的受体, 从而发挥激动剂、抑制剂或变构调节剂的功能, 调控受体下游的信号通路, 发挥其生物学功能。本研究中pATMtide是否通过影响ATM的功能致使心脏发育异常, 进而引发CHD, 仍需进一步检测ATM表达水平、活性变化及JNKs与Akt信号通路的激活情况, 并通过挽救策略, 深入论证其具体的作用机制。

综上所述, 本文研究了pATMtide在细胞水平和动物水平对心脏发育的影响, 发现其能抑制P19细胞的分化, 影响斑马鱼心脏正常发育, 论述了pATMtide与CHD之间的相关性。未来仍需深入研究, 以期探究CHD的发生发展机制提供新思路, 为CHD的防治提供新的分子靶点。

参考文献

- 刘小清, 麦劲壮, 庄建. 先天性心脏病流行病学研究方法新认识[J]. 中国循环杂志, 2011, 26(1): 74-76.
LIU Xiaoqing, MAI Jinzhuang, ZHUANG Jian. New understanding of epidemiological research methods of congenital heart disease[J]. Chinese Circulation Journal, 2011, 26(1): 74-76.
- van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(21): 2241-2247.
- 黎洁雯. 先天性心脏病的流行趋势及流行病学分析[J]. 心血管康复医学杂志, 2017, 26(1): 60-63.
LI Jiewen. Trend and epidemiological analysis of congenital heart disease[J]. Chinese Journal of Cardiovascular Rehabilitation Medicine, 2017, 26(1): 60-63.
- 孙立春, COY David H. 多肽药物研究进展[J]. 上海医药, 2014, 35(5): 55-60.
SUN Lichun, COY David H. The development in peptide-based drugs[J]. Shanghai Medical & Pharmaceutical Journal, 2014, 35(5): 55-60.
- 郁夏凤, 刘锦纷. 蛋白质组学与先天性心脏病形成机制的研究现状[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(7): 696-698.
YU Xiaofeng, LIU Jinfen. The research on the proteomics with the formation mechanism of the congenital heart disease[J]. The Journal of Clinical Pediatrics, 2011, 29(7): 696-698.
- 谢尉, 王俊, 杨翌, 等. 多肽组学在疾病研究中的应用[J]. 卫生研究, 2013, 42(6): 1031-1035.
XIE Yu, WANG Jun, YANG Yi, et al. Application of proteomics in disease research[J]. Journal of Hygiene Research, 2013, 42(6): 1031-1035.
- 李杏. 单纯性室间隔缺损胎儿羊水多肽组学分析及其自然闭合影响因素的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
LI Xing. Analysis of amniotic fluid polypeptide in simple ventricular septal defect fetus and its influencing factors of natural closure[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2016.
- 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.
- Tu S, Chi NC. Zebrafish models in cardiac development and congenital heart birth defects[J]. Differentiation, 2012, 84(1): 4-16.
- Stracker TH, Roig I, Knobel PA, et al. The ATM signaling network in development and disease[J]. Front Genet, 2013, 4: 37.
- Roberts NJ, Jiao Y, Yu J, et al. ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer[J]. Cancer Discov, 2012, 2(1): 41-46.
- Foster CR, Zha Q, Daniel LL, et al. Lack of ataxia telangiectasia mutated kinase induces structural and functional changes in the heart: role in β -adrenergic receptor-stimulated apoptosis[J]. Exp Physiol, 2012, 97(4): 506-515.
- Foster CR, Singh M, Subramanian V, et al. Ataxia telangiectasia mutated kinase plays a protective role in β -adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 353(1/2): 13-22.
- 李芸, 王菲, 王兴, 等. 内源性多肽的潜在作用方式与功能预测[J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(1): 41-43.
LI Yun, WANG Fei, WANG Xing, et al. Potential mode of action and function prediction of endogenous peptides[J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2017, 25(1): 41-43.

本文引用: 冯梦文, 尹安雯, 程子杰, 徐佳, 章浩, 张奇军, 李华, 钱玲梅. 多肽pATMtide在先天性心脏病中的作用[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(2): 227-231. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.001
Cite this article as: FENG Mengwen, YIN Anwen, CHENG Zijie, XU Jia, ZHANG Hao, ZHANG Qijun, LI Hua, QIAN Lingmei. Effect of pATMtide on congenital heart disease[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(2): 227-231. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.02.001