

## 白藜芦醇通过上调小鼠胚胎干细胞过氧化物酶体增殖激活受体 $\gamma$ 共激活子 1 $\alpha$ 表达促进其分化为心肌细胞

方海琴<sup>1,2</sup>, 赵君<sup>1</sup>, 崔亚雄<sup>1</sup>, 袁海涛<sup>1</sup>, 杨嵘<sup>1</sup>, 荣靖<sup>1</sup>, 赵增明<sup>1</sup>,  
何俊<sup>1</sup>, 彭双清<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院疾病预防控制中心毒理学评价研究中心, 北京 100071; 2. 国家食品安全风险评估中心卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** **目的** 观察白藜芦醇对小鼠胚胎干细胞(ESC)分化为心肌细胞的调节作用,并探讨其机制。**方法** 采用悬滴悬浮培养法培养 ESC。白藜芦醇 0.44, 4.4 和 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理 ESC 96 h。光学显微镜下记录每组自发心肌搏动数;透射电镜观察细胞内线粒体结构;实时 PCR 方法测定  $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ -MHC)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、PPAR $\gamma$  共激活子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ),核呼吸因子-1 (NRF-1)、线粒体转录因子 A(mtTFA)和线粒体呼吸链复合体 IV(COXIV)的基因表达;Western 蛋白印迹法检测 PPAR $\gamma$ ,  $\alpha$  辅肌动蛋白和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达。**结果** 与正常对照组相比,白藜芦醇 0.44 和 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可增加 ESC 细胞分化为自发搏动的心肌细胞数,并明显上调分化的 ESC 心肌特异性基因  $\alpha$ -MHC 表达,约分别为正常对照组的 5.6 和 3.7 倍;上调心肌细胞特定标识蛋白  $\alpha$  辅肌动蛋白的表达,约为正常对照组的 1.7 和 2.1 倍;提示白藜芦醇可以促进 ESC 分化为心肌细胞。白藜芦醇干预各组均可上调 PPAR $\gamma$  基因和蛋白表达,同时白藜芦醇 0.44 和 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  可以明显上调线粒体生物合成相关因子基因表达;白藜芦醇 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组线粒体数目增多,提示线粒体生物合成可能是 ESC 分化为心肌细胞的重要机制。**结论** 白藜芦醇可以通过激动 PPAR $\gamma$  受体并上调由 PGC-1 $\alpha$  介导的线粒体生物合成,从而促进 ESC 分化为心肌细胞。

**关键词:** 白藜芦醇; 胚胎干细胞; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活子 1 $\alpha$ ; 心肌细胞; 线粒体生物合成

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)02-0156-07

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.006

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)是一类源于囊胚时期内细胞团的特定细胞群,具有分化为体内 3 个胚层来源的各种类型组织细胞的潜能。近年来,ESC 定向诱导分化为心肌细胞研究成为国内外研究人员共同关注的热点之一,获得足量、均一、高纯度、不引起免疫排斥反应且具有再生能力的心肌细胞为心脏疾病的治疗带来了新的希望。动物实验证实,ESC 源的心肌细胞能代替缺失或受损的心肌细胞以恢复和改善心脏功能<sup>[1-2]</sup>。

研究发现,小鼠 ESC 能够通过悬浮培养形成胚体(embryonic body, EB),这些 EB 可进一步分化

为心肌细胞,通过光学显微镜即可观察到这些由 ESC 分化而来的心肌细胞的自发性收缩。进一步研究显示,这一体外分化过程再现了心脏发生和心肌收缩发育的过程<sup>[3]</sup>。基于化合物对 ESC 的细胞毒性与对 ESC 分化为心肌细胞的抑制能力的测试,2001 年欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)接受并批准小鼠 ESC 实验(embryonic stem cell test, EST)用于化合物胚胎发育毒性评价,ECVAM 的 EST 操作流程也成为目前 ESC 分化为心肌细胞的标准操作规程<sup>[4-5]</sup>。但此操作规程是在 ESC 细胞自发分化的基础上制订,并未探讨如何获得足量、均一、高纯度的心肌细胞。因此,按照 EST 的操作规程,ESC 自发向心肌细胞分化的效率并不高,且 ESC 细胞分化为心肌细胞是一个渐进和复杂的过程,目前对于 ESC 诱导分化准确的调控机制尚不清楚。为了提高 ESC 的心肌分化效率,人们纷纷采用改变分化培养条件,在不同时间点添

**基金项目:** 国家科技部国际合作项目(2011DFA32190); 国家自然科学基金项目(81202603)

**作者简介:** 方海琴(1977-),女,助理研究员,主要从事食品毒理学研究;彭双清(1962-),男,研究员,博士生导师,主要从事化学物安全性评价研究。

**通讯作者:** 彭双清, E-mail: pengsq@hotmail.com, Tel: (010)66948462

加不同药物等方法,但只有准确掌握其诱导分化的机制,才有可能在分子水平上精确诱导 ESC 分化为所需的心肌细胞,消除一些不利因素<sup>[6]</sup>。

有研究表明,线粒体的生物合成对 ESC 向心肌细胞分化起正向促进作用<sup>[7-8]</sup>。线粒体生物合成是指在一个细胞的生命周期中线粒体的增殖,以及线粒体的系统合成和个体合成过程。在未分化 ESC 中线粒体的数目以及嵴都较贫乏,而分化的 ESC 发生急剧变化,表现为嵴丰富,数目增加,形成网络化<sup>[9-10]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR $\gamma$ ) 共激活子 1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 是线粒体生物合成的关键调控因子<sup>[11]</sup>。

白藜芦醇是一类含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物,主要存在于葡萄、百合科、蓼科、豆科、花生和虎杖等食用或药用植物,具有抗动脉粥样硬化、抗炎、抗癌、抗氧化和抗血小板聚集等作用。另外,白藜芦醇可降低血液循环中的低密度脂蛋白和胆固醇,增加心肌细胞功能,其对冠心病显著的预防与治疗作用引起人们关注<sup>[12]</sup>,且白藜芦醇对 PPAR $\gamma$  有激活作用<sup>[13]</sup>。本研究将针对白藜芦醇是否在 ESC 分化为心肌细胞中所起到的干预作用与分子调节机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂和主要仪器

小鼠 ESC D3 细胞购自中国科学院上海生物细胞研究所。白藜芦醇购自上海融禾公司(纯度 > 95%)。knockout-DMEM 培养基(Dulbecco modified Eagle medium)、高糖 DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),  $\beta$ -巯基乙醇、非必需氨基酸(NEAA)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)、L-谷氨酰胺,青链霉素双抗和 Trizol 均购自德国 Invitrogen Gibco 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)和明胶购自德国 Sigma 公司。小鼠白血病抑制因子(murine leukemia inhibitory factor, mLIF)购自美国 CHEMICON 公司。PPAR $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$ 、 $\alpha$  肌动蛋白和 GAPDH 一抗购自美国 Abcam 公司,HRP 标记的二抗(山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 抗体)购自中杉金桥生物技术公司,RT-PCR 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司,SYBG 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,引物(表 1)  $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -MHC)、PPAR $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$ 、核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor-1, NRF-1)、线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)和线粒体呼吸链复合体 IV(mitochondrial respiratory chain

Tab. 1 Primer sequence and length of amplified fragments

Gene	Primer	Length/ bp	Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
$\alpha$ -MHC	5'CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG3'	340	55
	5'GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG3'		
PPAR $\gamma$	5'GCCCTTTGGTGACTTTATGGA3'	170	59
	5'GCAGCAGGTTGTCTTGGATGT3'		
PGC-1 $\alpha$	5'CTACGAGTGGATGCTGGAGAT3'	555	60
	5'AGCCAGGAGAAATCAAACAGAG3'		
NRF-1	5'ACGTGCCCTGTGCAGTTGTG3'	340	60
	5'TAAGGATAGGTCGGCGGTTTC3'		
mtTFA	5'CGGCGAATTGGAGATGAACTG3'	333	63
	5'GGTCACTGTCTGCCATGTGGG3'		
COX IV	5'TTGATAACCGAGTCGTTCTGCC3'	128	61
	5'ATTTAGTCGGCCTGGGATGG3'		
GAPDH	5'GCACAGTCAAGGCCGAGAAT3'	313	61
	5'ACGTCAGATCCACGACGGAC3'		

$\alpha$ -MHC:  $\alpha$ -myosin heavy chain; PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator activated receptor; PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 $\alpha$ ; NRF-1: nuclear respiratory factor-1; mtTFA: mitochondrial transcription factor A; COX IV: mitochondrial respiratory chain complex IV.

complex IV, COX IV) 由北京赛百盛公司合成。Bio-Rad Real-Time PCR 仪(美国伯乐公司),透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

### 1.2 细胞培养及白藜芦醇给药干预

自液氮中取出一支冻存的小鼠 ESC,复苏后接种于自制备用的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)滋养层,加入 ESC 完全培养基(15% FBS, 84% knockout-DMEM, 1% HEPES, 1% NEAA, 1% 双抗, 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇, mLIF  $1 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ )维持培养。ESC 集落达 60%~70% 融合时,进行传代。0.25% 胰酶(含 EDTA)消化处于对数生长期的 ESC,用差速贴壁的方法除去 MEF 滋养层细胞,培养基中不再添加 mLIF。消化后的 ESC 单细胞悬液进行计数,取细胞  $3.75 \times 10^4 \text{ L}^{-1}$  悬滴培养于 10 cm 的细菌培养皿盖板上,每滴 20  $\mu\text{l}$ ,悬滴 3 d 后,倒置显微镜下可见每个悬滴中一个 EB,将 EB 移入 60 cm 悬浮培养皿,加入 10 ml 无 mLIF 的 ESC 培养基(FBS 20%, 其余成分同 ESC 完全培养基),放入 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中悬浮培养 2 d 后,将 EB 接种于事先铺被 1% 明胶的 24 孔板内。每孔内一个 EB,加入无 mLIF 的 ESC 分化培养基,轻摇使 EB 移至孔中央,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每日倒置显微镜下观察,1 d 后可见 EB 外层细胞分化。

ESC 形成 EB 贴壁后 24 h,分别加入白藜芦醇 0.44, 4.4 和 44  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  培养,进行后续实验。

### 1.3 ESC 分化为心肌细胞的相关指标的检测

EB 贴壁培养 5 d(白藜芦醇干预 96 h)后,光学显微镜下观察 24 孔板内 EB 自发分化为有自发收缩能力的心肌细胞的发生率,取分化后的细胞进行实时 PCR 和 Western 印迹实验,检测心肌特异性基因  $\alpha$ -MHC 和心肌细胞标志性蛋白  $\alpha$  辅肌动蛋白( $\alpha$ -actinin)的表达。

### 1.4 透射电子显微镜观察分化 ESC 内线粒体结构

用细胞刮刀将正常对照组和白藜芦醇 4.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组细胞刮下,200  $\times g$  离心 5 min,将细胞迅速放入装有预冷固定液(2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛)的尖头 EP 管中固定,二甲砷酸钠缓冲液  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  冲洗后,再采用 1% 锇酸( $\text{OsO}_4$ )固定 2 h。细胞固定后进行乙醇梯度脱水,环氧丙烷置换,环氧树脂包埋,切片,切片厚度为 50~80 nm。样品干燥后,置于铜网上,采用 Philips EM208s 型透射电子显微镜观察,摄片。每组细胞采用 3 张切片,先在低倍镜下进行全面细致的观察,

然后 6000 倍放大倍数下定量拍照。在选定的每张切片上随机拍摄细胞内照片各 5 张。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 法测定 $\alpha$ -MHC, NRF-1, mtTFA 和 COXIV 基因表达

用细胞铲刮取每组 24 个 EB,每组加入 1 ml Trizol,冰浴超声破碎,按 Trizol 试剂盒说明书要求提取胚胎中总 RNA。260 nm 紫外吸收法检测 RNA 含量。各组取 1  $\mu\text{l}$  RNA 逆转录合成第一链 cDNA。以 cDNA 进行扩增反应,加入  $\alpha$ -MHC, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , NRF-1, mtTFA 和 COXIV 等基因的上下游引物各 10 pmol,反应体系总体积 25  $\mu\text{l}$ 。反应条件设置为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ /15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /15 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,进行半定量分析。目的基因的相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  表示,  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目标基因}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{药物组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ 。

### 1.6 Western 印迹法测定分化 ESC 内 PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ 和 $\alpha$ 辅肌动蛋白表达

白藜芦醇干预 96 h 后,各组取 1~2 块 24 孔板内分化培养的 ESC, RIPA 法提取细胞蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度,根据蛋白质浓度确定合适的上样量。蛋白电泳完毕后,采用湿法将蛋白质电转印至 PVDF 膜。根据预染蛋白标记剪取目的蛋白条带, PPAR  $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$ 、 $\alpha$  辅肌动蛋白及 GAPDH 所用一抗的稀释比例为 1:1000。一抗孵育完成后,用 TBST 洗膜, HRP 标记的二抗室温温育 1 h; 使用 LumiGLO<sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate (KPL) 进行发光底物孵育,根据目的蛋白的不同,采用不同的曝光时间。使用 Quantity ONE 软件对目的蛋白进行积分吸光度(integrated absorbance, IA)光密度分析,以 GAPDH 为内参蛋白。目的蛋白相对表达水平 =  $\text{IA}_{\text{目的蛋白}} / \text{IA}_{\text{GAPDH}}$ 。实验重复 3 次。

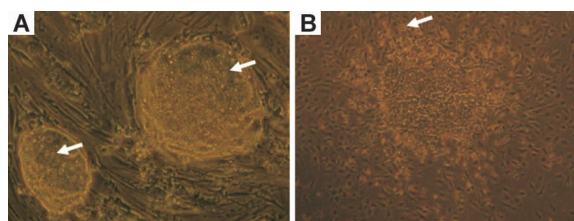
### 1.7 统计学分析

实验数据结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析,统计指标均进行正态性及方差齐性检验,正态分布数据多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,  $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白藜芦醇对 ESC 分化为心肌细胞的影响

小鼠 ESC 在 MEF 上生长良好(图 1A),消化传代时,按悬滴悬浮法制备 EB 并诱导分化(图 1B),分化 10 d 的细胞外围可见多种类型细胞,部分克隆可见心肌自发性节律收缩。



**Fig. 1 Differentiation of embryonic stem cells (ESC) to cardiomyocytes** (original magnification  $\times 200$ ). A: arrows pointed undifferentiated murine ESC; B: arrow pointed differentiated murine ESC.

显微镜下计数观察发生心肌细胞搏动的 EB 数量, 结果显示(表 2), 在 ESC 分化第 10 天, 与正常对照组相比, 白藜芦醇 0.44 与 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组自发搏动的 EB 数明显增加 ( $P < 0.05$ )。

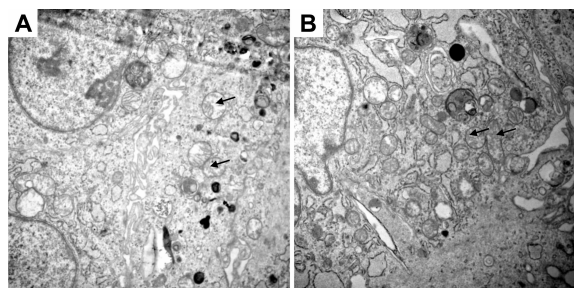
**Tab. 2 Effect of resveratrol on numbers of EB containing contracting myocardial cells in 24-well plates**

Resveratrol/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Number of EB containing contracting myocardial cells
0	14 $\pm$ 2
0.44	17 $\pm$ 2 *
4.4	20 $\pm$ 2 *
44	15 $\pm$ 3

Differentiated ESCs were treated with resveratrol for 96 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , compared with 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.

### 2.2 白藜芦醇对分化的 ESC 内线粒体结构的影响

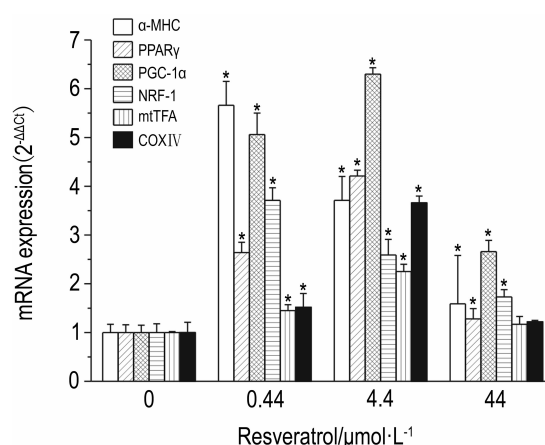
透射电镜结果显示(图 2), 与正常对照组分化的 ESC 细胞相比(图 2A), 白藜芦醇 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  干预 96 h, 其细胞内线粒体更加丰富, 结构完整, 提示白藜芦醇可以上调 ESC 在细胞分化过程中的线粒体生成(图 2B)。



**Fig. 2 Effect of resveratrol on ultrastructure of mitochondria in differentiated ESCs** ( $\times 6000$ ). A: normal control group; B: resveratrol 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 96 h group. Arrows pointed mitochondria in the differentiated murine ESC.

### 2.3 白藜芦醇对分化的 ESC 内 $\alpha$ -MHC, PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, mtTFA 和 COX IV 基因表达的影响

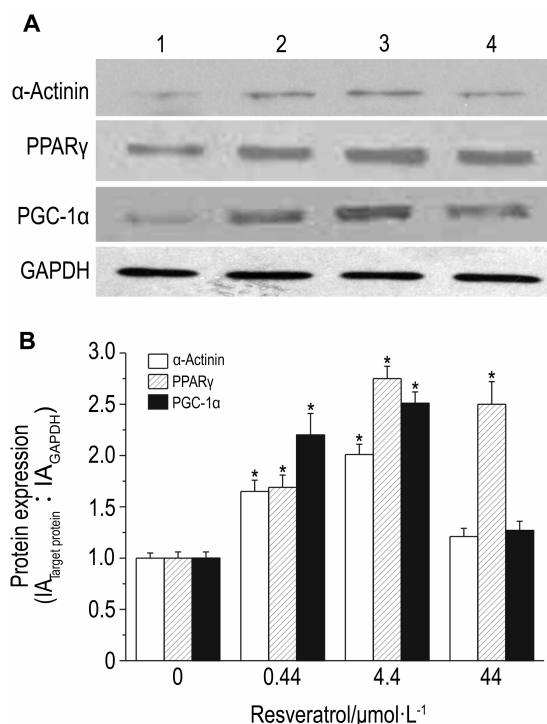
如图 3 所示, 白藜芦醇 0.44, 4.4 与 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  培养 96 h 后, 与正常对照组 ESC 相比, 各组 ESC 内心肌细胞特异基因  $\alpha$ -MHC 表达显著增加, 分别为 466%, 271% 和 59%; PGC-1 $\alpha$  基因表达分别增加了 163%, 321% 和 28%, PGC-1 $\alpha$  基因表达分别增加了 405%, 530% 和 165%, NRF-1 基因表达分别增加了 270%, 159% 和 72%, mtTFA 的基因表达分别增加了 45%, 125% 和 17%, 线粒体生成的标志因子 COXIV 基因表达分别增加 52%, 266% 和 22%。除 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的 mtTFA 和 COXIV 基因表达外, 其他差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



**Fig. 3 Effect of resveratrol on mRNA expression of  $\alpha$ -MHC, PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, mtTFA and COXIV in differentiated murine ESCs.** Differentiated ESC were treated with resveratrol 0, 0.44, 4.4 and 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 96 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , compared with normal control group.

### 2.4 白藜芦醇对分化的 ESC $\alpha$ 辅肌动蛋白、PPAR $\gamma$ 和 PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与正常对照组 ESC 相比, 白藜芦醇干预 96 h 后, 各剂量组心肌细胞标志蛋白  $\alpha$  辅肌动蛋白表达增加, 分别增加了 65%, 101% 和 21%; PPAR $\gamma$  蛋白表达分别增加了 69%, 176% 和 153%; PGC-1 $\alpha$  蛋白表达分别增加了 121%, 149% 和 27%。除白藜芦醇 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的  $\alpha$  辅肌动蛋白和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达外, 其余差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



**Fig. 4 Effect of resveratrol on  $\alpha$ -actinin, PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$  protein expression in differentiated murine ESCs.** Lane 1: normla control; lanes 2, 3 and 4: resveratrol 0.44, 4.4 and 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  treated for 96 h, respectively. B was semiquantitative result of A.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , compared with normal control group.

### 3 讨论

按照 ECVAM 推荐的 ESC 分化为心肌细胞的观察指标,本研究结果发现,在白藜芦醇干预 96 h 后,有自发搏动的 EB 数较对照组明显增加,提示白藜芦醇可以促进 ESC 向心肌细胞的分化。但 ESC 分化为心肌细胞是一个渐进和复杂的过程,包括心肌特异基因的转录、结构蛋白的表达以及离子通道的形成等关键步骤。心肌分化启动首先是心肌特异性转录因子与心肌特异性基因的表达,在整个心肌发育过程中心脏特异性基因  $\alpha$ -MHC 表达相对较早,肌小节蛋白的表达标志心肌细胞分化到成熟阶段<sup>[14-15]</sup>。

为了进一步明确白藜芦醇是否有促进 ESC 向心肌细胞分化的作用,本研究挑选心肌细胞特异性基因  $\alpha$ -MHC 与心肌细胞标识蛋白  $\alpha$  辅肌动蛋白为分子标志物,进一步对分化细胞中心肌细胞特异性成分进行半定量分析。 $\alpha$ -MHC 基因在 ESC 分化为心肌细胞的早期即有表达并持续,而  $\alpha$  辅肌动蛋白的表达则对应着心肌细胞分化成熟阶段<sup>[3]</sup>。通过对  $\alpha$ -MHC 进行实时 PCR 以及  $\alpha$  辅肌动蛋白进行 Western 印迹检测结果发现,白藜芦醇可以上调分

化 ESC 中心肌细胞特定基因和标志蛋白的表达,尤其在浓度 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,白藜芦醇的诱导作用最强,提示白藜芦醇增强转录因子  $\alpha$ -MHC 的表达,继而增强了  $\alpha$  辅肌动蛋白表达,证实白藜芦醇可以促进 ESC 向心肌细胞分化。

用透射电镜观察分化的 ESC 细胞内超微结构,发现白藜芦醇 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  给药 96 h,细胞内线粒体数量更为丰富,嵴结构完整,提示白藜芦醇在促进 ESC 向心肌细胞分化的同时伴随着线粒体生成的增加。

楼宜嘉等<sup>[16-17]</sup>在以淫羊藿诱导小鼠 ESC 向心肌细胞分化的过程中,活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)表达上调,激活 p38MAPK 以及 PGC-1 $\alpha$  和 PPAR $\alpha$ 。已有充分证据表明,PGC-1 $\alpha$  是一个重要的线粒体生物合成调节子<sup>[11]</sup>,提示在 ESC 分化过程中,PGC-1 $\alpha$  介导的线粒体生物合成可能在诱导 ESC 分化为心肌细胞中发挥作用。PGC-1 $\alpha$  有助于协调有氧代谢相关基因的表达,且 PGC-1 $\alpha$  的表达受很多因素影响。业已明确,PGC-1 $\alpha$  可以与大多数核激素受体包括 PPAR $\gamma$  在内的超家族成员,以不同的方式与其发生分子对接,进而调控其生物学功能<sup>[18]</sup>。

很多研究表明,白藜芦醇对 PPAR $\gamma$  受体起激动作用。葛恒等<sup>[13]</sup>在自身不表达 PPAR $\gamma$  蛋白的 U937 细胞中电穿孔共转染 PPAR $\gamma$  表达质粒和其报告质粒,从而构建 PPAR $\gamma$  激动剂筛选模型的方法证实,白藜芦醇为 PPAR $\gamma$  受体的激动剂。李晓寒等<sup>[19-20]</sup>证实,白藜芦醇通过调节 PPAR $\gamma$  的细胞信号转导途径,防御高脂饮食大鼠血脂的升高,并拮抗心肌组织 PPAR $\gamma$ mRNA 的低表达,在心血管疾病发生发展中起保护作用。本研究实时 PCR 实验结果与 Western 印迹实验结果显示,白藜芦醇上调了分化的 ESC 细胞内 PPAR $\gamma$  与 PGC-1 $\alpha$  的基因和蛋白表达。由此推测,白藜芦醇激动 PPAR $\gamma$  受体,同时上调了其辅因子 PGC-1 $\alpha$  的表达。

很多核基因编码的线粒体酶类对 PGC-1 $\alpha$  产生应答,例如 NRF-1 和 NRF-2,它们触发编码呼吸链多肽及 mtDNA 转录和复制蛋白的核基因的表达。NRF-1 和 NRF-2 是转录调节子,作用于编码氧化磷酸化系统亚基组分的核基因的表达。同时,在核内它们通过绑定氧化磷酸化基因启动子的共有序列调节其他与 mtDNA 复制有关的基因的表达<sup>[21]</sup>。mtTFA 是一个转录因子,与 mtDNA D-loop 区的启动子作用,调节线粒体基因组的复制和转录<sup>[22]</sup>。导致分化的 ESC 线粒体丰度和线粒体功能

的变化依赖于线粒体及 mtDNA 的质量。当细胞具有优质的亲本线粒体和 mtDNA 时,将导致线粒体丰度和 mtDNA 分子的增加,最终由于增加了线粒体而使能量供应增加。本研究发现,白藜芦醇干预后,均不同程度地上调了上述信号因子的基因表达。

COXIV 是由核编码的线粒体蛋白,被认为是线粒体和核基因之间转录、翻译及调节等作用的典型,能够对线粒体的生物合成给予最快速的应答。因此,本研究选用 COXIV 作为线粒体生物合成的指标。实时 PCR 结果显示,白藜芦醇在激活分化 ESC 内线粒体生物合成的信号通路后,最终上调了 COXIV 基因的表达。结合线粒体的形态学指标透射电镜超微结构观察发现,经白藜芦醇  $4.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  干预 96 h,分化后的 ESC 细胞内线粒体数量更为丰富,嵴结构完整。至此,本研究初步证实了白藜芦醇对 ESC 向心肌细胞分化的调控作用是通过上调线粒体生成发挥的。

线粒体生物合成增多说明由一种相对较低的活动状态向较高的呼吸功能转化,预示着胞内较高的能量要求,在 ESC 分化过程中此变化类似于胚胎发育中的线粒体受到体内环境的影响,线粒体的活性和分布状况会随着胚胎发育时期的不同而改变<sup>[23]</sup>。研究证实,ESC 细胞向心肌细胞分化过程中,能量代谢和供应方式从糖酵解向有氧代谢转变,因此需要线粒体的数量与功能的增加来维持分化<sup>[9]</sup>。

综上所述,白藜芦醇激活 PPAR $\gamma$  受体,进而上调 PGC-1 $\alpha$  的表达,激活 NRF-1 和 mtTFA,使得 ESC 内线粒体的生物合成增加,线粒体功能增强,线粒体数量与质量的循环改善,进而为 ESC 分化为心肌细胞提供足够的能量,以及良好地适应分化过程中代谢方式转变的需求,最终表现为促进 ESC 分化心肌细胞。

#### 参考文献:

- [1] Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro* [J]. *Cytotechnology*, 1999, **30**(1-3): 211-226.
- [2] Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE, *et al.* Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, **40**(1): 195-200.
- [3] Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects [J]. *Toxicol Lett*, 2004, **149**(1-3): 361-369.
- [4] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, *et al.* The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods [J]. *Altern Lab Anim*, 2002, **30**(2): 151-176.
- [5] Riebeling C, Pirow R, Becker K, Buesen R, Eikel D, Kaltenhäuser J, *et al.* The embryonic stem cell test as tool to assess structure-dependent teratogenicity: the case of valproic acid [J]. *Toxicol Sci*, 2011, **120**(2): 360-370.
- [6] Heng BC, Haider HKh, Sim EK, Cao T, Ng SC. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage *in vitro* [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62**(1): 34-42.
- [7] St John JC, Ramalho-Santos J, Gray HL, Petrosko P, Rawe VY, Navara CS, *et al.* The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte *in vitro* differentiation from human embryonic stem cells [J]. *Cloning Stem Cells*, 2005, **7**(3): 141-153.
- [8] Chung S, Dzeja PP, Faustino RS, Perez-Terzic C, Behar A, Terzic A. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, **4**(Suppl 1): S60-S67.
- [9] Prigione A, Adjaye J. Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon *in vitro* and *in vivo* differentiation of human ES and iPS cells [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, **54**(11-12): 1729-1741.
- [10] Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2011, **29**(3): 486-495.
- [11] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, **98**(1): 115-124.
- [12] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(6): 493-506.
- [13] Ge H, Zhang JF, Wang BY, Wang CQ. Agitation effect of resveratrol on PPAR- $\gamma$  [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, **40**(12): 905-908.
- [14] Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development [J]. *Circ Res*, 2002, **91**(6): 457-469.
- [15] Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle [J]. *J Cell Biol*, 1990, **111**(6 Pt 1): 2427-2436.
- [16] Ding L, Liang XG, Zhu DY, Lou YJ. Icaritin promotes expression of PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and NRF-1 during cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28**(10): 1541-1549.
- [17] Fragomeni G, Merola A, De Franciscis S, Amato F. A haemodynamic model of the venous network of the lower

- limbs[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007, 2007:1002-1005.
- [18] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator[J]. *Endocr Rev*, 2003, 24(1):78-90.
- [19] Li XH, Yin RL, Song M, Zhang D, Cheng NL, Tan XT. Effects of resveratrol on PPAR gamma mRNA expression in heart of hyperlipidemia rats[J]. *Acta Nutr Sin*(营养学报), 2009, 31(1):91-93.
- [20] Li XH, Song M, Yin RL, Tan XT. Effects of resveratrol on PPAR $\gamma$ /AP-1 in heart of rats with high-fat diet[J]. *Chin J Public Health*(中国公共卫生), 2011, 27(5):589-590.
- [21] Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells [J]. *Genes Dev*, 1990, 4(6):1023-1034.
- [22] Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(4):1309-1313.
- [23] Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(12):2621-2633.

## Resveratrol promotes expression of peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$ during cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro*

FANG Hai-qin<sup>1,2</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>, CUI Ya-xiong<sup>1</sup>, YUAN Hai-tao<sup>1</sup>, YANG Rong<sup>1</sup>, RONG Jing<sup>1</sup>, ZHAO Zeng-ming<sup>1</sup>, HE Jun<sup>1</sup>, PENG Shuang-qing<sup>1</sup>

(1. Evaluation and Research Centre for Toxicology, Institute of Disease Prevention and Control, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 2. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To observe the modulation of resveratrol on cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells (ESCs) and investigate the underlying mechanism. **METHODS** The murine ESCs were differentiated as embryonic bodies (EB) in hanging drops and treated by resveratrol 0, 0.44, 4.4 and 44  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 96 h. The number of EB containing spontaneously contracting cells was recorded under the light microscope. The mitochondrial ultrastructure was observed in transmission EM photos. The gene expression of  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC), peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and mitochondrial respiratory chain complex IV (COX IV) was detected by real-time PCR while the expression of  $\alpha$ -actinin, PPAR $\gamma$  and PGC-1 $\alpha$  proteins was measured by Western blotting. **RESULTS** Resveratrol 0.44 and 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  increased the number of contracting myocardial cells in differentiated ESCs. Compared with normal control group, the expression of cardiac-specific  $\alpha$ -MHC genes at the concentration of 0.44 and 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  resveratrol increased 6.6-fold and 4.7-fold, and cardiac-specific  $\alpha$ -actinin protein increased 2.7-fold and 3.1-fold. Furthermore, the increase in the number of mitochondria was observed in transmission EM photos of differentiated ESCs treated by resveratrol 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . PPAR $\gamma$  gene and protein expression were increased in all groups treated by resveratrol at different concentrations. Meanwhile, the expression of genes correlated with mitochondrial biogenesis increased significantly after treatment by resveratrol, especially at the concentration of 0.44 and 4.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION** Resveratrol induces murine ESC differentiation to cardiomyocytes *in vitro* by activating PPAR $\gamma$  and promoting mitochondrial biogenesis modulated by PGC-1 $\alpha$ .

**Key words:** resveratrol; embryonic stem cells; PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; cardiomyocyte; mitochondrial biogenesis

**Foundation item:** The project supported by International Cooperation Project from Ministry of Science and Technology of China (2011DFA32190); and National Natural Science Foundation of China (81202603)

**Corresponding author:** PENG Shuang-qing, E-mail: pengsq@hotmail.com, Tel: (010) 66948462

(收稿日期: 2012-12-27 接受日期: 2013-03-22)

(本文编辑: 乔虹)