

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.16.027

牦牛血清对 H9c2 细胞增殖及衰老的影响*

白玉婷¹, 格日力², 王立生³, 苏晓灵^{1△}

(1. 青海省人民医院心血管内科, 西宁 810001; 2. 青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001;
3. 青岛大学附属医院医学研究中心分子诊断与再生医学科, 山东青岛 266000)

[摘要] 目的 研究在其他培养条件相同的情况下不同类型新生牛血清对 H9c2 细胞体外培养的影响, 为更加合理选择 H9c2 细胞生长适应的血清类型提供参考依据。方法 采用牦牛血清、Hyclone 血清、四季青血清 3 种牛血清对 H9c2 细胞进行培养, 通过细胞计数法和 CCK8 法测定细胞生长的细胞数量及活力, 并在镜下观察细胞形态, 以比较 3 种血清细胞培养的效果, 采用 q-PCR 测定 p21、p16、p38、p53 表达情况以了解细胞衰老情况。结果 牦牛血清培养细胞的细胞数在第 2~6 天均显著高于四季青血清, 在第 2 天显著高于 Hyclone 血清, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 其他时间点比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); Hyclone 血清培养细胞的细胞数在第 3~6 天均显著高于四季青血清 ($P < 0.05$)。牦牛血清培养细胞的细胞倍增数在第 24、48、72、96、120 小时均显著高于 Hyclone 血清和四季青血清, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), Hyclone 血清培养细胞的细胞倍增数在第 24 小时显著高于四季青血清, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余时间点比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 此外, 与牦牛血清和 Hyclone 血清比较, 四季青血清 H9c2 细胞 p21、p53 表达最高。结论 牦牛血清的细胞培养效果优于 Hyclone 血清和四季青血清, H9c2 细胞可能更适应于在牦牛血清中生长。

[关键词] 牦牛血清; H9c2 细胞; 细胞增殖; 细胞衰老

[中图分类号] Q253 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)16-2835-04

Effect of yak serum on proliferation and senescence of H9c2 cells*

BAI Yuting¹, GE Rili², WANG Lisheng³, SU Xiaoling^{1△}

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining, Qinghai 810001, China; 2. Research Center for High Altitude Medicine, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China; 3. Department of Molecular Diagnosis and Regenerative Medicine, Medical Research Center, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of different types of newborn calf serum on H9c2 cells in vitro culture under the same other culture conditions to provide the reference for more reasonably select suitable serum of H9c2 cell growth. **Methods** The three kinds of yak serum, hyclone serum and Sijiqing serum were adopted to culture the H9c2 cells. The cells number and the cell vitality were detected by the cell count method and CCK8 method. The cellular morphology was observed by microscope to compare the cell culture effects. The expression levels of p21, p16, p38 and p53 were measured by Q-PCR in order to understand the cell senescence situation. **Results** The cells number cultured by yak serum on 2, 6 d was significantly higher than that by Sijiqing serum ($P < 0.05$), its cells number on 2 d was significantly higher than that in the hyclone group ($P < 0.05$), and the difference at other time points had no statistical significance ($P > 0.05$). The cells number cultured by hyclone serum on 3-6 d was significantly higher than that in the Sijiqing serum ($P < 0.05$); the doublings number of the cells cultured by yak serum at 24, 48, 72, 96, 120 h was significantly higher than that in the hyclone serum and Sijiqing serum, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), the doublings number of the cells cultured by hyclone serum at 24 h was significantly higher than that in the Sijiqing serum, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and the difference at other time points had no statistical significance ($P > 0.05$); in addition, compared with the yak serum and hyclone serum, the expression level of p21 and p53 in the Sijiqing serum H9c2 cells was the highest. **Conclusion** The

* 基金项目: 青海省“高端创新人才千人计划”; 青海省心血管疾病临床医学研究中心建设项目(2019-SF-L1)。 作者简介: 白玉婷(1987-), 副主任医师, 博士, 主要从事高原医学的研究。 △ 通信作者, E-mail: 1677329234@qq.com。

cell culture effect of yak serum is better than that of hyclone serum and Sijiqing serum. H9c2 cells may be more adapt to grow in the yak serum.

[Key words] yak serum; H9c2 cells; cell proliferation; cell senescence

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)是一种广泛用于非计数型原代细胞和永生化细胞培养的具有代表性的添加剂。FBS 的精确组成成分尚不清楚,因为这种添加剂包含各种未知的天然小分子和比例不同的蛋白质(批次之间成分变化)。牦牛是一种生存于海拔 3 500 m 以上的野生牛种,是青藏高原及中国周边地区的标志^[1]。牦牛可以充分利用其他牲畜难以利用的高山草原,并为高海拔居民提供了必要的资源,是高海拔居民生存的手段^[2]。牦牛与低海拔牛在解剖学和生理学方面有许多不同之处,除通过消除低氧导致的血管收缩而生活在高海拔地区外^[3],其心肺增大、缺氧性肺血管收缩不足、觅食能力增强、能量代谢增加使其能更好适应高海拔地区。牦牛作为理解适应的分子基础模型动物,其最小生物信息学在整个基因组测序之前便已完成^[4],但牦牛的非正常存活生物学机制及其对高原氧化应激的反应机制目前尚不清楚^[5],其对细胞的增殖及衰老有何影响至今少见相关文献报道。本研究通过与其他品种 FBS 进行比较,研究了牦牛血清对胚胎大鼠心肌细胞(H9c2 细胞)生长、增殖及衰老的影响,以期找到 H9c2 细胞生长更相适应的血清。

1 材料与方法

1.1 材料

H9c2 由中国人民解放军军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所传代保存。试剂为杜氏改良 Eage 培养基(DMEM)培养液、二甲亚砜、CCK8 试剂、血清(四季青、Hyclone)等。

1.2 方法

1.2.1 H9c2 细胞培养

使用含 10% 牦牛血清、Hyclone 血清、四季青血清加 DMEM 培养液培养 H9c2 细胞,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱,每 2 天更换 1 次培养基,待细胞长至

对数生长期时进行试验。

1.2.2 牦牛血清的制备

取静脉血,室温下静置 1 h,2 500 r/min 离心 15 min,分离血清,并经 0.22 μm 滤膜滤过,30 min 水浴灭活。

1.2.3 细胞计数法

取待测细胞和对照细胞悬液各 10 μL,滴于细胞计数板上,在低倍镜下计数 4 个大方格内的细胞。边缘压线细胞以数上不数下,数左不数右的原则进行。

1.2.4 H9c2 细胞增殖检测

将 H9c2 细胞以 5×10³ 细胞/mL 密度(100 μL)接种于 96 孔板中,每组 5 个复孔,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24、48、72 h。培养结束前每孔加入 10 μL CCK8,37 °C 避光孵育 2 h 后用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定吸光度(A)值。

1.2.5 q-PCR 测定

用 Trizol 法提取总 RNA,逆转录获取 cDNA,配置好 q-PCR 反应液后以 4 副孔加样,瞬时离心去气泡后采用 ABI 7500 FAST q-PCR 仪进行标准 PCR 扩增程序:50 °C 20 s,95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同血清对 H9c2 细胞生长的影响

牦牛血清培养细胞的细胞数在第 2~6 天均显著高于四季青血清,在第 2 天显著高于 Hyclone 血清,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);其他时间点比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05);Hyclone 血清培养细胞的细胞数在第 3、4、5、6 天均显著高于四季青血清,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 3 种血清对 H9c2 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

时间	牦牛血清	Hyclone 血清	四季青血清	<i>F</i>	<i>P</i>
第 1 天	2.233±0.208	2.600±0.000	2.533±0.153	5.150	0.050
第 2 天	4.467±0.058 ^a	3.067±0.208 ^a	3.067±0.058 ^a	117.600	0.000
第 3 天	6.100±0.100 ^{ab}	6.700±0.200 ^{ab}	4.267±0.058 ^{ab}	271.187	0.000
第 4 天	8.667±0.231 ^{abc}	8.033±0.153 ^{abc}	6.733±0.252 ^{abc}	62.452	0.000
第 5 天	13.667±1.155 ^{abcd}	13.667±1.528 ^{abcd}	8.533±0.723 ^{abcd}	18.867	0.003
第 6 天	16.333±1.155 ^{abcde}	18.333±1.155 ^{abcde}	12.167±1.258 ^{abcde}	20.961	0.002
<i>F</i>	193.630	182.084	111.810		
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000		

^a:*P* < 0.01,与第 1 天比较;^b:*P* < 0.05,与第 2 天比较;^c:*P* < 0.05,与第 3 天比较;^d:*P* < 0.01,与第 4 天比较;^e:*P* < 0.01,与第 5 天比较。

2.2 不同血清对 H9c2 细胞增殖的影响

牦牛血清培养细胞的细胞倍增数在第 24、48、72、96、120 小时均显著高于 Hyclone 血清和四季青血清, Hyclone 血清培养细胞的细胞倍增数在第 24 小时显著高于四季青血清 ($P < 0.05$), 其余时间点比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 不同血清对 H9c2 细胞 p21、p16、p38、p53 表达的影响

四季青血清 p21、p53 表达均显著高于牦牛血清和 Hyclone 血清, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。3 种血清 p16、p38 mRNA 表达比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 2 3 种血清对 H9c2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

时间 (h)	牦牛血清	Hyclone 血清	四季青血清	F	P
24	2.224 ± 0.079	2.278 ± 0.078	1.917 ± 0.086	23.083	0.000
48	4.709 ± 0.310 ^a	3.442 ± 0.295 ^a	3.068 ± 0.185 ^a	40.909	0.000
72	7.024 ± 0.385 ^{ab}	5.231 ± 0.103 ^{ab}	5.212 ± 0.079 ^{ab}	78.713	0.000
96	7.114 ± 0.286 ^{abc}	5.353 ± 0.230 ^{abc}	4.893 ± 0.498 ^{abc}	43.081	0.000
120	8.680 ± 0.085 ^{abcd}	6.424 ± 0.068 ^{abcd}	6.293 ± 0.374 ^{abcd}	142.714	0.000
F	373.773	340.992	141.939		
P	0.000	0.000	0.000		

^a: $P < 0.001$, 与第 24 小时比较; ^b: $P < 0.001$, 与第 48 小时比较; ^c: $P < 0.05$, 与第 72 小时比较; ^d: $P < 0.01$, 与第 96 小时比较。

表 3 3 种血清对 H9c2 细胞 p21、p16、p38、p53 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p21	p16	p38	p53
牦牛血清	1.007 ± 0.116	1.003 ± 0.110	1.003 ± 0.145	1.013 ± 0.211
Hyclone 血清	1.950 ± 0.442	1.293 ± 0.057	1.113 ± 0.169	1.680 ± 0.474
四季青血清	2.270 ± 0.733 ^a	1.233 ± 0.244	1.170 ± 0.202	2.007 ± 0.418 ^a
F	5.200	2.820	0.714	5.194
P	0.049	0.137	0.527	0.049

^a: $P < 0.05$, 与牦牛血清、Hyclone 血清组相比。

3 讨 论

血清是从牛胎血液中所获得的体外培养基的常见补充物, 包含生长因子、激素、维生素、氨基酸、脂肪酸和细胞生长所需的微量元素, 因此, 早期即被引入细胞生物学研究中^[6]。血清作为真核细胞体外培养的补充物, 在心肌细胞生长、繁殖过程中发挥着重要作用。不同血清对心肌细胞的生长影响不同, 因此, 找到与 H9c2 细胞生长相适应的血清显得尤为重要。

牦牛能很好地适应高寒草原环境, 在空气稀薄、温度低、紫外线强、草短等恶劣高原环境下自由生活和繁殖^[7]。据文献报道, 牦牛血中的低聚肽抗氧化能力及脂质过氧化抑制能力均显著优于商品化大豆低聚肽, 且牦牛血低聚肽还可缓解缺氧导致的机体应激损伤, 具有潜在药用价值^[8]。但在以往, 牦牛血未能得到良好的利用及研究, 本研究通过比较 3 种不同品种 FBS 对 H9c2 细胞生长及增殖发现, H9c2 细胞在含有牦牛血清的培养基中生长状态良好, 细胞活力好, 增殖倍数优于 Hyclone 血清和四季青血清, 提示与 Hyclone 血清和四季青血清比较, H9c2 细胞可能更适应于在牦牛血清中生长。

衰老是细胞、组织和器官结构和功能渐进性恶化

的生物过程, 细胞衰老的典型特征是不可逆的细胞周期阻滞, 可能由 DNA 损伤、氧化应激、营养剥夺、致癌损伤或化疗毒性引起^[9]。目前有研究表明, 细胞衰老具有两面性, 一方面在衰老过程中衰老细胞在各种组织中积累, 导致发生许多与年龄相关的疾病, 如动脉粥样硬化、癌症、脂肪肝变性、阿尔茨海默病、纤维化肺病和骨关节炎^[9-12], 而消除这些衰老细胞可以延长寿命^[13]。另一方面衰老细胞在胚胎发育、肿瘤抑制、伤口愈合和组织修复等过程中发挥着多种有益作用^[14]。细胞增殖和衰老是一个复杂的过程, 涉及多种细胞成分和信号通路, 其中 p21、p53 肿瘤抑制基因家族是与衰老相关的最具特征性的因素^[15], 而 p16 是由大多数衰老细胞表达的用于鉴定衰老的关键标记物^[16]。p38 作为一种有丝分裂原激活的蛋白激酶, 可被外界信号和炎性细胞因子激活, 参与细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡等多种细胞生物学过程^[17]。因此, 本研究通过检测上述指标发现, 与牦牛血清和 Hyclone 血清比较, 四季青血清 H9c2 细胞 p21、p53 表达最高, 而 p38、p16 表达无明显差异, 提示 p21、p53 过度表达可能导致 H9c2 细胞衰老进而影响 H9c2 细胞的生长和增殖。而 LÓPEZ-OTÍN 等^[18]和 MU-

NOZ-ESPIN 等^[19]研究也表明,在衰老细胞中不可逆细胞周期阻滞主要是由细胞周期抑制剂——p16、p21、p53 上调所致。然而,牦牛血清与其他血清的不同之处及其如何影响细胞生长、增殖及衰老尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] XIONG X, LI J, WANG L, et al. Low oxygen tension and relative defined culture medium with 3, 4-Dihydroxyflavone are beneficial for Yak-Bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryo [J]. *Reprod Domest Anim*, 2014, 49(1):126-133.
- [2] XIONG X, LAN D, LI J, et al. Zebularine and scriptaid significantly improve epigenetic reprogramming of yak fibroblasts and cloning efficiency[J]. *Cell Reprogram*, 2013, 15(4): 293-300.
- [3] ZHOU J W, ZHONG C L, LIU H, et al. Comparison of Nitrogen utilization and urea kinetics between yaks (*Bos grunniens*) and indigenous cattle (*Bos taurus*) [J]. *J Anim Sci*, 2017, 95(10):4600-4612.
- [4] QIU Q, ZHANG G, MA T, et al. The yak genome and adaptation to Life at high altitude [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(8):946-949.
- [5] SHAO B, LONG R, DING Y, et al. Morphological adaptations of yak (*Bos grunniens*) tongue to the foraging environment of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *J Anim Sci*, 2010, 88(8): 2594-2603.
- [6] ASWAD H, JALABERT A, ROME S. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro [J]. *BMC Biotechnol*, 2016, 16:32.
- [7] MIAO F, GUO Z, XUE R, et al. Effects of grazing and precipitation on herbage biomass, herbage nutritive value, and yak performance in an alpine meadow on the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127275.
- [8] 党艺航, 罗华秀, 达娃卓玛, 等. 牦牛血粉的质量标准研究 [J]. *华西药学杂志*, 2020, 35(5): 584-586.
- [9] MACHADO-OLIVEIRA G, RAMOS C, MARQUES A, et al. Cell senescence, multiple organelle dysfunction and atherosclerosis [J]. *Cells*, 2020, 9(10):2146.
- [10] BAKER D J, CHILDS B G, DURIK M, et al. Naturally occurring p16 (Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan [J]. *Nature*, 2016, 530(7589):184-189.
- [11] OGRODNIK M, MIWA S, TCHKONIA T, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15691.
- [12] SCHAFFER M J, WHITE T A, IJIMA K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:14532.
- [13] SIKORA E, BIELAK-ZMIJEWSKA A, MOSIENIAK G. What is and what is not cell senescence [J]. *Postepy Biochem*, 2018, 64(2):110-118.
- [14] VICTORELLI S, PASSOS J F. Telomeres and cell senescence - size matters not [J]. *EBioMedicine*, 2017, 21:14-20.
- [15] CZARKWIANI A, YUN M H. Out with the old, in with the new: senescence in development [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 55:74-80.
- [16] CAMPISI J, D'ADDA DI FAGAGNA F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 729-740.
- [17] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298(560):1911-1912.
- [18] LÓPEZ-OTÍN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6):1194-1217.
- [19] MUNOZ-ESPIN D, SERRANO M. Cellular senescence: from physiology to pathology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7):482.

(收稿日期:2021-11-12 修回日期:2022-04-22)