论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1778-04

5-氮胞苷诱导外源表达 Nkx2-5 的 P19 细胞向心肌分化的研究

张金平,赵 静,王慧娟,赵秀军,赵春芳,张 雷 (河北医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,石家庄 050017)

摘 要:目的 研究在单层培养条件下,5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza)诱导表达 Nkx2-5 的 P19 细胞向心肌分化的可能性和效率。**方法** 实验分为实验组和对照组,实验组细胞为稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞,对照组为 P19 细胞。2 组细胞均在单层培养条件下,以 5-aza(1 μmol/L)诱导。倒置显微镜观察细胞的生长状态;诱导 4、8、12、16 d,Western blot 检测 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的表达;并用免疫荧光双标检测 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达。**结果** 实验组和对照组细胞在 5-aza 诱导下,生长缓慢,死亡细胞数目增多。随贴壁细胞密度增加,形成类似于聚集体贴壁生长的状态,中心细胞小、密集,周边细胞呈放射状排列,胞体长梭形,伸出突起。实验组诱导 8、12、16 d 检测到 α-sarcomeric actin 和 cTnT 2 种蛋白的表达和共表达,表达量呈增多趋势;诱导 12、16 d 时 α-sarcomeric actin 的表达量与 8 d 比差异有统计学意义($P<0.01$),诱导 16 d 的表达量与 12 d 比差异有统计学意义($P<0.01$);cTnT 在诱导 12、16 d 的表达量与 8 d 比差异有统计学意义($P<0.01$)。对照组没有 2 种蛋白的表达和共表达。**结论** 5-aza 可诱导单层生长的表达 Nkx2-5 的 P19 细胞向心肌分化。

关键词: 5-aza;Nkx2-5;P19 细胞;心肌分化
中图法分类号: R322.11;R329-33;R329.21 **文献标识码:** A

5-azacytidine induces Nkx2-5-exogenously-expressed P19 cells to differentiate toward cardiomyocytes

ZHANG Jin-ping, ZHAO Jing, WANG Hui-juan, ZHAO Xiu-jun, ZHAO Chun-fang, ZHANG Lei (Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To explore the possibility and efficiency of the myocardial differentiation of P19 cells that exogenous expressing Nkx2-5 gene under monolayer culture condition with 5-azacytidine (5-aza) induction. **Methods** P19 cell line was divided into 2 groups, experimental group and control group. The cells of experimental group were P19 cells which expressed Nkx2-5 gene constantly. While control group were common P19 cells. Under the monolayer culture condition, the cells of 2 groups were induced by 5-aza at a concentration of 1 μmol/L. The growth state of cells were observed by inverted microscopy. In 4, 8, 12 and 16 d after induction, Western blot analysis was used to detect the expression of α-sarcomeric actin and cTnT. The co-expression of α-sarcomeric actin and cTnT was detected with immunofluorescence methods. **Results** With 5-aza inducing monolayer culture, the cells of experimental group and control group all grew slowly. The number of dead cells was increased. As the attached cells increased in number, they gathered and formed a state similar to adherent aggregates-like structure. The cells in the center of the aggregates were small and dense, while the surrounding cells became longer, changed into spindle-like shape with extended processes and arranged in radial way. In experimental group, the expression and co-expression of α-sarcomeric actin and cTnT were detected in 8, 12 and 16 d after 5-aza induction. The expressions of the 2 proteins were gradually increased. Statistical analysis showed that the expression of α-sarcomeric actin in 16 d and 12 d was significantly increased compared with that in 8 d ($P<0.01$). The expression of α-sarcomeric actin in 16 d was significantly higher than that in 12 d ($P<0.01$). The expression of cTnT in 16 d and 12 d was significantly higher than that in 8 d ($P<0.01$). In control group, the expression of the 2 proteins was not detected. **Conclusion** 5-aza induces monolayer cultured P19 cells with exogenous expression of Nkx2-5 gene to cardiac differentiation.

Key words: 5-azacytidine; Nkx2-5; P19 cells; myocardial differentiation

5-aza 是一种胞嘧啶类似物,作为一种去甲基化药物,主要用于诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向心肌分化的研究[1]。近来有研究者发现 5-aza 不仅在结合 P19 细胞的聚集培养时导致有效的心肌分化[2],而且在 P19 细胞单层融合培养

作者简介:张金平,女,河北省邯郸市人,博士,讲师,主要从事心脏形态学和病理学方面的研究。电话:(0311)86266082, E-mail: zhangjinping@gmail.com
通信作者:张 雷,电话:(0311)86266719,E-mail: zhanglei@hebmu.edu.cn
收稿日期:2008-12-23;修回日期:2009-03-26

时,5-aza 诱导也可致心肌分化,研究推测在 P19 细胞单层培养心肌分化事件中,5-aza 可能引起骨形态形成蛋白(bone morphogenic protein,BMP)信号途径而影响转录因子 Nkx2-5 的活性[3]。外源表达 Nkx2-5 的 P19 细胞能否在 5-aza 诱导、单层培养时更高效向心肌分化,从而作为一种培养方法简单、高效的心肌分化体外模型来研究心脏发育和心肌分化? 因此本实验设计比较 5-aza 对单层生长的 P19 细胞和稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞诱导时向心肌分化的不同效果,探讨该培养方法的可行性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验细胞和转染质粒　　P19 细胞系(ATCC,CRT-1825)购自中国协和医科大学细胞中心,pEGFP-N1-Nkx2-5 质粒由本实验室构建保存。

1.1.2　主要试剂　　5-氮胞苷(Sigma 公司),Lipofectamine 2000 转染试剂、α-MEM 培养基干粉、G418(Invitrogen 公司),胎牛血清(杭州四季青生物有限公司),鼠抗 α-sarcomeric actin 单克隆抗体、生物素标记的羊抗鼠二抗 IgG、avidin-Cy3 标记的三抗和 FITC 标记的羊抗鼠二抗(武汉博士德生物公司),免疫荧光用鼠抗 cTnT 单克隆抗体(NeoMarkers 公司),Western blot 用鼠抗 cTnT 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2　方法

1.2.1　实验分组　　实验分为实验组和对照组,实验组细胞为稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞,对照组细胞为 P19 细胞。

1.2.2　实验组细胞的转染和稳定筛选　　采用复苏之后 4 ~ 12 代的 P19 细胞,按照 Lipofectamine 2000 说明书,将 pEGFP-N1-Nkx2-5 质粒 DNA(μg)和转染试剂 Lipofectamine 2000(μl)按照 1∶3转染,培养 18 ~ 24 h,用荧光显微镜观察外源基因融合绿色荧光蛋白的表达。后加入含有 700 mg/L G418 的 α-MEM 培养基进行筛选,连续培养 2 周,详细步骤参见文献[4],存活细胞为实验组的细胞。

1.2.3　2 组细胞的 5-aza 诱导培养　　2 组细胞均以(1.0 ~ 3.0) × 10^3/ml 接种,加入 5-aza,使 5-aza 的终浓度为 1 μmol/L,之后每 2 天换液 1 次。在培养期间使 5-aza 的终浓度始终保持为 1 μmol/L。诱导培养后在倒置显微镜下观察细胞的生长状况。

1.2.4　Western blot 检测 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的表达

取诱导 4、8、12、16 d 的细胞,提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝试剂盒定量。以 50 μg/孔的上样量进行 5% 浓缩胶及 10% 分离胶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离 α-sarcomeric actin 和 cTnT,转膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,然后用相应抗体杂交,最后用 ECL 显色。Bio-1D 软件对电泳条带进行定量分析。

1.2.5　免疫荧光双标检测 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达

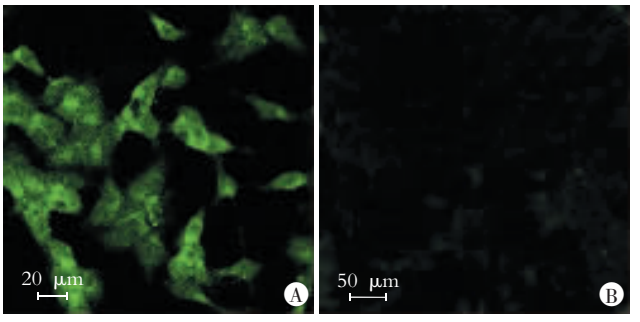
取诱导 4、8、12、16 d 的细胞,4% 多聚甲醛固定,3% 甲醇-H_2O_2 室温孵育 10 min,室温 1% Triton/PBS 透化处理 30 min。以 10% 正常山羊血清封闭,37 ℃ 30 min。滴加鼠 α-sarcomeric actin 抗体(1∶100 稀释)4 ℃冰箱过夜。滴加生物素标记的二抗 IgG 工作液孵育,37 ℃ 45 min。滴加 avidin-Cy3 标记三抗(1∶50 稀释,红色荧光)37 ℃ 30 min。滴加鼠 cTnT 抗体(1∶100 稀释)4 ℃ 冰箱过夜。滴加 TITC 标记的二抗孵育(1∶50 稀释,绿色荧光),37 ℃ 45 min。甘油封片,避光 4 ℃保存。PBS 代替一抗作阴性对照。Leica TCS-SP2 激光共聚焦扫描显微镜观察并照相。

1.2.6　统计学处理　　数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组内比较采用单因素方差分析,当方差分析有显著性差异时进一步用 q 检验做两两比较。

2　结果

2.1　细胞的稳定筛选结果

实验组 P19 细胞转染质粒 pEGFP-N1-Nkx2-5 之后的 24 h,将转染细胞按 1∶10 传代,用含有 700 mg/L G418 的 α-MEM 培养基筛选 14 d,大多数细胞都具有绿色荧光(图 1A),这些细胞为稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞。而对照组 P19 细胞没有观察到绿色荧光(图 1B)。

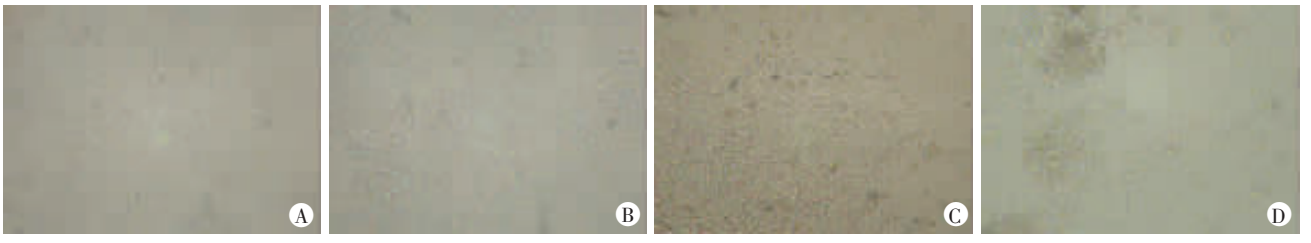


A: 实验组;B:对照组

图 1　激光共聚焦扫描显微镜观察 P19 细胞稳定筛选结果

2.2　5-aza 单层诱导时细胞形态学变化

2 组细胞在 5-aza 诱导下单层培养,3 d 时出现细胞生长缓慢,每天有多个细胞死亡变圆漂浮(图 2A)。细胞随着培养天数的延长,6 d 时细胞数目增多并聚集成小区生长,形成类似于细胞聚集体贴壁生长的状态(图 2B)。10 d 时中心细胞密集,周边细胞爬出,胞体变长,并伸出突起(图 2C)。随诱导时间延长,16 d 时聚集体贴壁样结构更加典型,在聚集体样结构的周边细胞胞体呈梭形、放射状排列(图 2D)。2 组在培养过程中都没有观察到细胞跳动出现。



A: 诱导 3 d; B:诱导 6 d; C:诱导 10 d; D:诱导 16 d

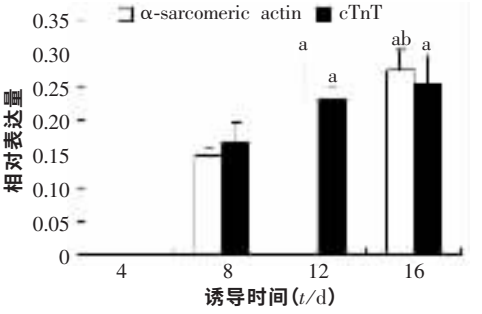
图 2　5-aza 诱导后不同时间实验组 P19 细胞形态学观察　(倒置显微镜 ×200)

2.3 Western blot 检测 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的表达结果

实验组 α-sarcomeric actin 和 cTnT 在 5-aza 诱导后的 4 d 都没有表达，5-aza 诱导后的 8、12 d 和 16 d 时有表达，且 α-sarcomeric actin 和 cTnT 在诱导 8、12 d 和 16 d 时的表达量逐渐增高。统计结果显示：诱导 12、16 d 时 α-sarcomeric actin 的表达量与 8 d 比差异有统计学意义（$P<0.01$），诱导 16 d 的表达量与 12 d 比差异也有统计学意义（$P<0.01$）。cTnT 在诱导 12、16 d 的表达与 8 d 比差异有统计学意义（$P<0.01$，图 3）。对照组没有出现 α-sarcomeric actin 和 cTnT 相应分子量条带，2 种蛋白都没有表达。

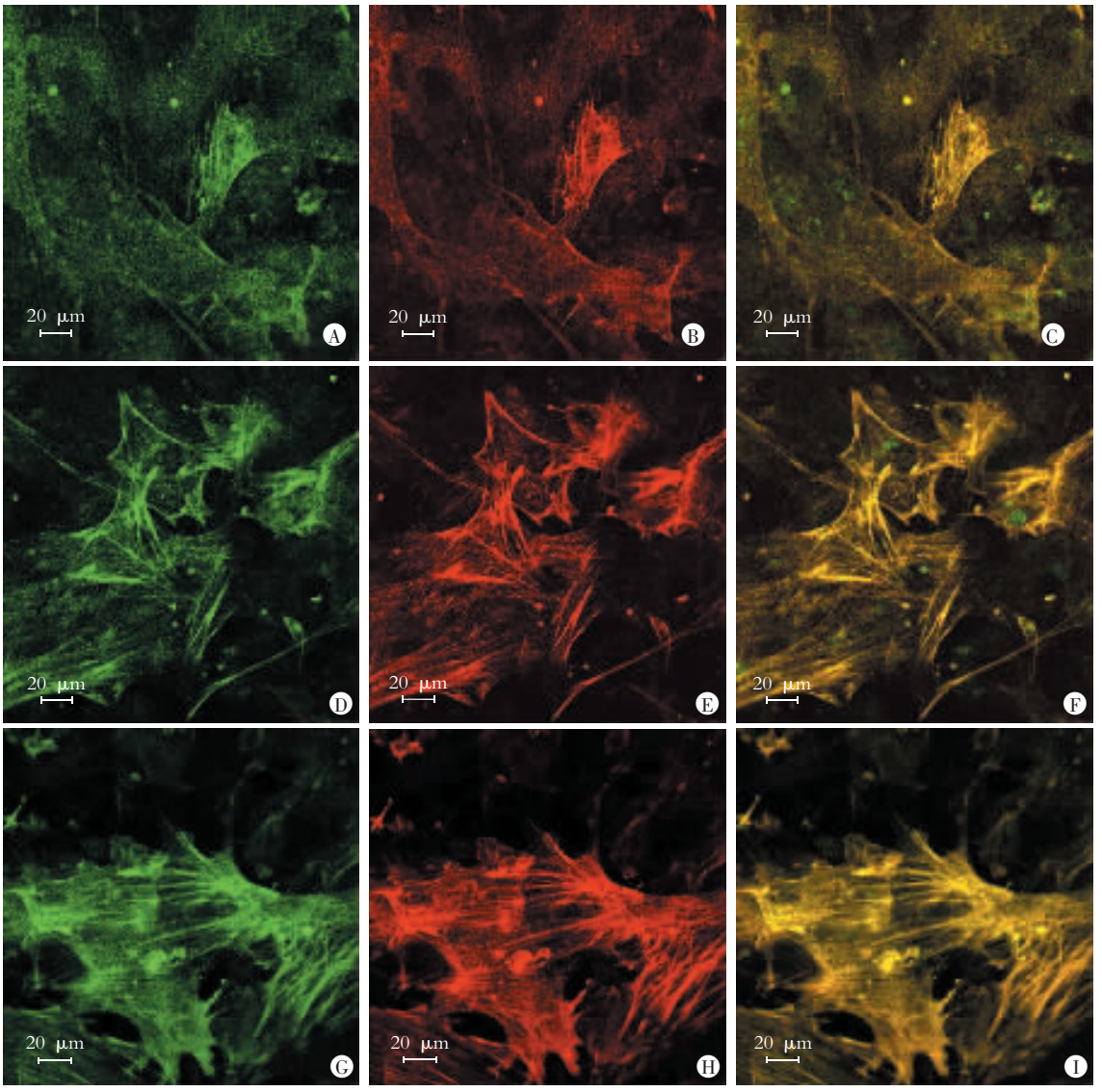
2.4 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达结果

实验组在 5-aza 诱导 4 d，没有 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达，8、12、16 d 时出现共表达，2 种蛋白在同一细胞相同部位重叠表达。8 d 时共表达量细胞较少，细胞质中 α-sarcomeric actin（红色）和 cTnT（绿色）共表达处融合为黄色荧光，单核，位于细胞中央（图 4A－C）。12 d 时共表达的细胞增多，黄色融合荧光亮度增强，细胞轮廓较清楚，单个或成群存在，胞质中有黄色荧光束状丝样结构（图 4D－F）。16 d 时共表达的细胞和荧光表达亮度进一步增多，黄色荧光束状结构更加明显（图 4G－I）。对照组 P19 细胞在 5-aza 诱导下，单层培养后的 4、8、12、16 d 均没有检测到红色和绿色荧光以及融合荧光，没有 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达。



a：$P<0.01$，与 8 d 比较；b：$P<0.01$，与 12 d 比较

图 3 5-aza 诱导后不同时间实验组 P19 细胞中 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的表达



绿色：cTnT；红色：α-sarcomeric actin；黄色：共表达；A-C：诱导 8 d；D-F：诱导 12 d；G-I：诱导 16 d

图 4 免疫荧光双标检测 5-aza 诱导后不同时间实验组 P19 细胞中 α-sarcomeric actin 和 cTnT 的共表达 （激光共聚焦扫描显微镜）

3　讨论

P19 胚胎癌细胞(embryonal carcinoma cells,EC)是一种能够在体外培养的多能干细胞,经诱导可分化为包括心肌在内的多种细胞。在 P19 细胞向心肌分化时,一般认为聚集培养和诱导剂如二甲基亚砜(DMSO)等的结合培养是 2 个必需条件[5]。近来有研究报道 5-aza 可诱导单层的 P19 细胞向心肌分化。在 5-aza 诱导单层 P19 细胞的心肌分化事件中,伴有 BMP-2 和 BMP-4 基因的表达提高,因此作者推测由此引发的心肌分化是由 BMP 信号分子参与调节的[3]。BMP 信号途径是诱导心肌细胞发生的重要信号途径,可溶性 BMP-4 可以越过细胞聚集而调控 Nkx2-5 的活动从而引起 P19 细胞的心肌分化,而单层生长的稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞并不向心肌分化[6,7]。既然 5-aza 可以激活 BMP 信号途径,而 BMP 途径又是调控 Nkx2-5 转录活性的上游信号途径[8,9],那么推测 5-aza 必定也可以使稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞在单层培养时有效的向心肌细胞分化。因此本实验用 5-aza 分别诱导单层培养的 P19 细胞和表达 Nkx2-5 的 P19 细胞,比较其向心肌分化的差异,探索一种较好的心脏发育体外模型。

5-aza 有较强的细胞毒性作用,在 P19 细胞聚集培养时,可以有效对抗 5-aza 的细胞毒性,即使 5、10 μmol/L 的 5-aza 也不会引起明显的细胞死亡[2],但是在单层培养的 P19 细胞这样高的 5-aza 浓度细胞基本不生长,大部分细胞坏死、变圆、漂浮。作者通过实验发现,1 μmol/L 的浓度对单层生长的 P19 细胞有较好的诱导心肌分化的作用[3],因此本实验中 5-aza 的诱导浓度也采取 1 μmol/L。

对照组和实验组的结果差异说明:5-aza 不能诱导单层培养的 P19 细胞在蛋白水平表达横纹肌和心肌标志物,与文献[3]结果不同,可能是 5-aza 的配制、存放条件不同以及操作手法不同造成的;5-aza 诱导使单层培养的稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞表达横纹肌标志物 α-sarcomeric actin 和心肌标志物 cTnT 2 种骨架蛋白的表达于相同细胞相同部位重叠共表达,说明 5-aza 诱导和单层培养使稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞具有了心肌收缩的一些结构基础,特异向心肌分化。2 种蛋白都是在诱导 8、12 d 和 16 d 表达和共表达,且表达量逐渐增高,进一步确定了本实验中 5-aza 诱导和单层培养使稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞逐渐地特异地向心肌细胞分化。本实验中所测蛋白的表达时间和文献上其他诱导方法引起的同类产物的表达时间基本相同[2,3,7]。

我们的实验也证实了 5-aza 和 BMP-4 一样可以使稳定表达 Nkx2-5 基因的 P19 细胞只单层培养即向心肌细胞分化。一般认为在 P19 细胞,细胞聚集是诱导心肌发生必需的,但是在聚集中发生的分子机制还不清楚[5]。本实验中 5-aza 单层培养时如何调控 Nkx2-5 的转录从而越过聚集培养诱发 P19 细胞心肌发生还有待进一步研究。有可能 5-aza 通过去甲基作用引起 BMP 信号的活化进而引起 SMAD1 活化,再由 SMAD1 引起 Nkx2-5 的转录和心肌发生[3],或者在 5-aza 诱导稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞中,Nkx2-5 基因放大了 5-aza 引起的 BMP 信号途径而导致了 P19 细胞的心肌发生。

P19CL6 细胞是 P19 胚胎癌细胞的亚系,P19CL6 细胞向心肌分化的条件是 1% DMSO 的诱导和单层贴壁高汇合度细胞培养,可以高效分化为跳动心肌细胞[10]。这种情况和本实验中以及文献[3]报道的 5-aza 诱导的单层 P19 细胞心肌分化的高细胞密度相似,但是在本实验中由于分化效率太低,5-aza 诱导单层培养稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞虽向心肌细胞分化,但是其效果还远远不如 P19CL6 细胞,因此不适合作为体外模型来进行心脏发育和心肌分化的研究。实验组向心肌分化效率低的原因可能是 P19 细胞表达 Nkx2-5 的量不稳定或过少造成的,或许进一步筛选出稳定高表达 Nkx2-5 的 P19 细胞系,再由 5-aza 诱导单层培养可以出现高效的心肌分化。

参考文献:

[1] 朱　静, 邓　兵, 王金南, 等. 5-aza 诱导干细胞经乙酰化特异 RNAi 后心肌细胞发育相关基因检测[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 535－538.

[2] 尹　青, 赵　昱, 陈　炜, 等. 应用5-氮胞苷体外诱导 P19 细胞分化为心肌细胞[J]. 解剖学报, 2007, 38(3): 325－329.

[3] Choi S C, Yoon J, Shim W J, *et al*. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(6): 515－523.

[4] 张金平, 张　雷, 王慧娟, 等. 外源表达 Nkx2-5 基因诱导 P19 细胞向心肌分化[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(6): 725－729.

[5] Van-der-Heyden M A, Defize L H. Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation[J]. Cardiovasc Res, 2003, 58(2): 292－302.

[6] Jamali M, Karamboulas C, Rogerson P J, *et al*. BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis[J]. FEBS Lett, 2001, 509(1): 126－130.

[7] Jamali M, Rogerson P J, Wilton S, *et al*. Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis[J]. J Biol Chem, 2001, 276(45): 42252－42258.

[8] Shi Y, Katsev S, Cai C, *et al*. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates[J]. Dev Biol, 2000, 224(2): 226－237.

[9] Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, *et al*. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(10): 7096－7105.

[10] Habara-Ohkubo A. Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells[J]. Cell Struct Funct, 1996, 21(2): 101－110.

(编辑　邓强庭)