

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01372

同源盒基因 Nkx2-5 促进 5-氮胞苷诱导的单层 P19 细胞表达心肌标志物

张金平¹, 王慧娟¹, 邵素霞¹, 尹青¹, 史玉兰², 赵春芳¹, 张雷^{1*}

1. 河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017

2. 白求恩军医学院生理学教研室, 石家庄 050081

[摘要] **目的:**探讨同源盒基因 Nkx2-5 基因在 5-氮胞苷(5-aza)诱导单层生长的 P19 细胞向心肌细胞分化中的作用。**方法:**以稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞为实验组, P19 细胞为对照组。两组细胞均单层培养并以 5-aza (1 μ mol/L) 诱导, 倒置显微镜下观察细胞的生长状态; 在诱导后 4、8、12、16 d, 以 RT-PCR 检测转录因子 GATA-4、 α -肌球蛋白重链(α -MHC)和心房利钠多肽(ANP)基因的表达。**结果:**对照组经 5-aza 诱导后 ANP 没有表达; GATA-4 在 8、12、16 d 有表达; α -MHC 在 12、16 d 有表达。实验组 5-aza 诱导后, GATA-4 在诱导 4、8、12、16 d 有表达; α -MHC 和 ANP 都是在 5-aza 诱导后的 8、12 和 16 d 表达。两组结果比较显示实验组 GATA-4 和 α -MHC 基因的表达时间提前; 两组除 α -MHC 在 12 d 的表达无差异外, 其他取材时间点实验组两个基因的表达量与对照组相比均增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**Nkx2-5 促进 5-aza 诱导的单层生长的 P19 细胞向心肌分化。

[关键词] Nkx2-5; 5-氮胞苷; P19 细胞; 心肌分化

[中图分类号] R 321.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1372-04

Nkx2-5 gene promotes expression of cardiac markers in 5-azacytidine-induced monolayer P19 cells

ZHANG Jin-ping¹, WANG Hui-juan¹, SHAO Su-xia¹, YIN Qing¹, SHI Yu-lan², ZHAO Chun-fang¹, ZHANG Lei^{1*}

1. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Department of Physiology, Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081

[ABSTRACT] **Objective:** To study the role of Nkx2-5 gene in 5-azacytidine-induced differentiation of monolayer P19 cells into myocardial cells. **Methods:** The experiment was divided into two groups: an experimental group and a control group. The cells in the experimental group were P19 cells stably expressing Nkx2-5 gene, and cells in the control group were P19 cells. Under the monolayer-culture condition, the cells of two groups were induced by 5-azacytidine (1 μ mol/L). The growth of cells were observed by inverted microscope. On the 4th day, 8th day, 12th day and 16th day after induction, RT-PCR was used to detect the expression of GATA-4, α -MHC and ANP gene. **Results:** In control group, there was no ANP expression after induction; GATA-4 expression was seen on the 8th day, 12th day, and 16th day after induction; and α -MHC expression was found on the 12th day and 16th day. In experimental group, the expression of GATA-4 was detected on the 4th day, 8th day, 12th day and 16th day after induction; Alpha-MHC and ANP expression was noticed on the 8th day, 12th day and 16th day after induction. RT-PCR results showed that the expression of GATA-4 and α -MHC in the experimental group was earlier than that in the control group. And at all time points of observation, the expression of GATA-4 and α -MHC in the experimental group was significantly increased compared with that in the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), except for α -MHC expression on the 12th day.

Conclusion: Nkx2-5 gene can promote 5-azacytidine-induced differentiation of monolayer P19 cells into myocardial cells.

[KEY WORDS] Nkx2-5; 5-azacytidine; P19 cell; myocardial differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1372-1375]

同源盒基因 Nkx2-5 又称为心脏特异性同源盒基因 (cardiac specific homeobox gene, Csx), 属于 NK 型同源盒基因家族中 NK-2 型成员, 是所有脊椎

动物心脏发生中最早表达的转录因子之一, 也是目前研究最多的、与心脏发育和心肌分化密切相关的转录因子之一。研究表明, Nkx2-5 的表达对于胚胎

[收稿日期] 2009-04-09 **[接受日期]** 2009-09-02

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划(07275555). Supported by Science and Technology R&D Program of Hebei Province(07275555).

[作者简介] 张金平, 博士, 讲师. E-mail: zhangjinping@gmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0311-86266082, E-mail: zhanglei@hebm. edu. cn

心肌细胞的形成极为重要^[1-2]。研究发现, 过表达 Nkx2-5 的 P19 细胞只聚集培养不需诱导剂即可向心肌细胞分化^[3-4]。而可溶性骨形成蛋白(BMP)4 可诱导过表达 Nkx2-5 的 P19 细胞单层培养时向心肌细胞分化^[5]。近来有研究表明 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-aza) 诱导可致 P19 细胞单层融合培养时向心肌分化, 且该过程可能是 BMP 信号分子参与调节的^[6]。我们推测外源表达 Nkx2-5 的 P19 细胞在 5-aza 诱导下单层培养时应更高效地向心肌分化。因此本实验设计比较 5-aza 诱导单层生长的 P19 细胞和稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞向心肌分化的不同效果, 为探讨 Nkx2-5 基因在心肌发生中的作用和机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 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^[4]。氮胞苷 5-aza(Sigma 公司), 一步法 RT-PCR 试剂盒、TRIzol、引物、1 000 bp DNA Ladder(北京赛百盛公司)。溴化乙啶、DEPC(Sigma 公司)。Lipofectamine2000 转染试剂、 α -MEM 培养基干粉、G418(Invitrogen 公司)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。

1.2 实验分组 实验分为两组, 实验组为稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞, 对照组为 P19 细胞。实验组采用复苏之后 4~12 代的稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞, 将 pEGFP-N1-Nkx2-5 质粒 DNA 和转染试剂 Lipofectamine 2000 按照 1 : 3 的比例转染, 培养 18~24 h, 用荧光显微镜观察融合绿色荧光蛋白的表达。后加入含有 700 mg/L G418 的 α -MEM 培养液进行筛选, 连续培养 2 周, 取存活细胞。两组细胞均以 $(1.0 \sim 3.0) \times 10^3$ /ml 的密度接种, 加入 5-aza (终浓度为 1 μ mol/L), 每 2 d 换液 1 次。诱导培养后在倒置显微镜下观察细胞的生长状况。

1.3 RT-PCR 检测 取诱导后 4、8、12、16 d 的细胞, TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 一步法 RT-PCR, 先在逆转录酶(AMV)催化下合成 cDNA, 随即以 cDNA 为模板在 U-Taq 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。GATA-4 引物: sense 5'-TA GCA GGC AGA AAG CAA GG-3', antisense 5'-AGC ACG AGG CAG ACA AGA A -3'; α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC) 引物: sense 5'-CCT GGG CAA GTC TAA CAA-3', antisense 5'-ACA AAG TGA GGG TGG GTG-3'; 心房利钠多肽(atri-

al natriuretic peptide, ANP) 引物: sense 5'-GGC AGA GAC AGC AAA CAT C-3', antisense 5'-ACA CAC CAC AAG GGC TTA G-3'; β -actin 引物: sense 5'-GCT GTC CCT GTA TGC CTC T-3', antisense 5'-TTG ATG TCA CGC ACG ATT T-3'。逆转录和扩增体系: 总 RNA 2 μ l, 10 \times 缓冲液 2 μ l, 25 U/ μ l AMV 0.2 μ l, 10 mmol/L dNTPs 1 μ l, 10 pmol/L 正义引物 1 μ l, 10 pmol/L 反义引物 1 μ l, 5 U/ μ l U-Taq 多聚酶 1 μ l, 40 U/ μ l RNasin 0.25 μ l, DEPC 水至 20 μ l。逆转录反应条件: 45 $^{\circ}$ C 30 min。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C (GATA-4)/54 $^{\circ}$ C (α -MHC)/ 56 $^{\circ}$ C (ANP)/ 55 $^{\circ}$ C (β -actin) 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 BIO-1D 软件对电泳条带进行定量分析。

1.4 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计, 两组间的比较采用 *t* 检验, 组内不同时间点的比较采用单因素方差分析, 当方差分析有统计学差异时进一步采用 *q* 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 实验组细胞的稳定筛选和 5-aza 单层诱导时两组细胞的形态学变化 在 P19 细胞转染质粒 pEGFP-N1-Nkx2-5 之后的 24 h, 将转染细胞以 1 : 10 传代, 用含有 700 μ g/ml G418 的 α -MEM 培养液筛选 14 d, 大多数细胞都具有绿色荧光(图 1A、1B), 这些细胞为稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞。两组细胞在单层培养时, 5-aza 诱导下, 细胞均渐聚集成小区生长, 中心细胞密集, 周边细胞爬出, 并伸出突起, 逐渐呈现梭形形状, 放射状排列(图 1C)。

2.2 RT-PCR 检测 GATA-4、 α -MHC 和 ANP 的表达

2.2.1 ANP 对照组单层培养的 P19 细胞在 5-aza 诱导后, ANP 没有表达(图 2A); 实验组 ANP 在诱导后的 8、12 和 16 d 表达(图 2B), 且随着时间延长其表达量逐渐增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$ 图 2C)。

2.2.2 GATA-4 对照组 GATA-4 在 5-aza 诱导后 4 d 没有表达, 8、12、16 d 有表达(图 2A), 且 16 d 时的表达量与 8 d 比增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 2D); 实验组 GATA-4 在诱导后 4、8、12、16 d 均有表达(图 2B), 其表达量均高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 且随着时间延长其表达量逐渐增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2D)。

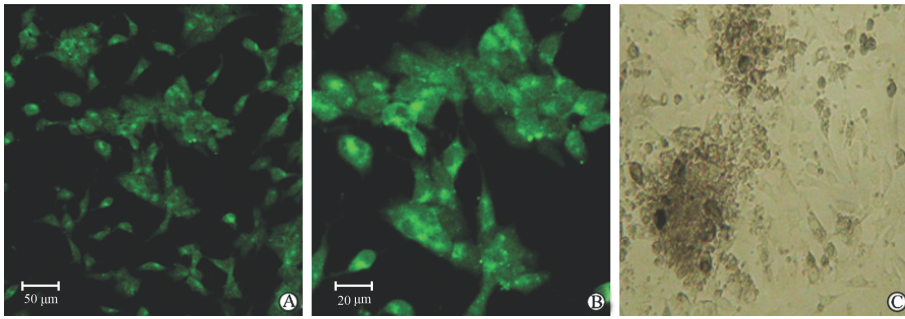


图1 实验组稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞(A,B)及 5-aza 诱导后细胞形态学变化(C)

Fig 1 Expression of Nkx2-5 and morphological changes induced by 5-aza of experimental group

A,B:Cells of experimental group were selected by G418 for two weeks and most cells expressed fused green fluorescent protein;C:The morphological changes of experimental group cells induced by 5-aza(Original magnification:×400)

2.2.3 α-MHC 对照组 α-MHC 在诱导后 12、16 d 时有表达(图 2A),但 12、16 d 的表达差异无统计学意义(图 2E);实验组 α-MHC 在诱导后的 8、12 和 16 d 有表达(图 2B),且随着时间延长其表达量逐渐

增高,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2E)。实验组在 5-aza 诱导后 α-MHC 的表达时间提前,且在诱导后 16 d 时其表达量高于对照组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2E)。

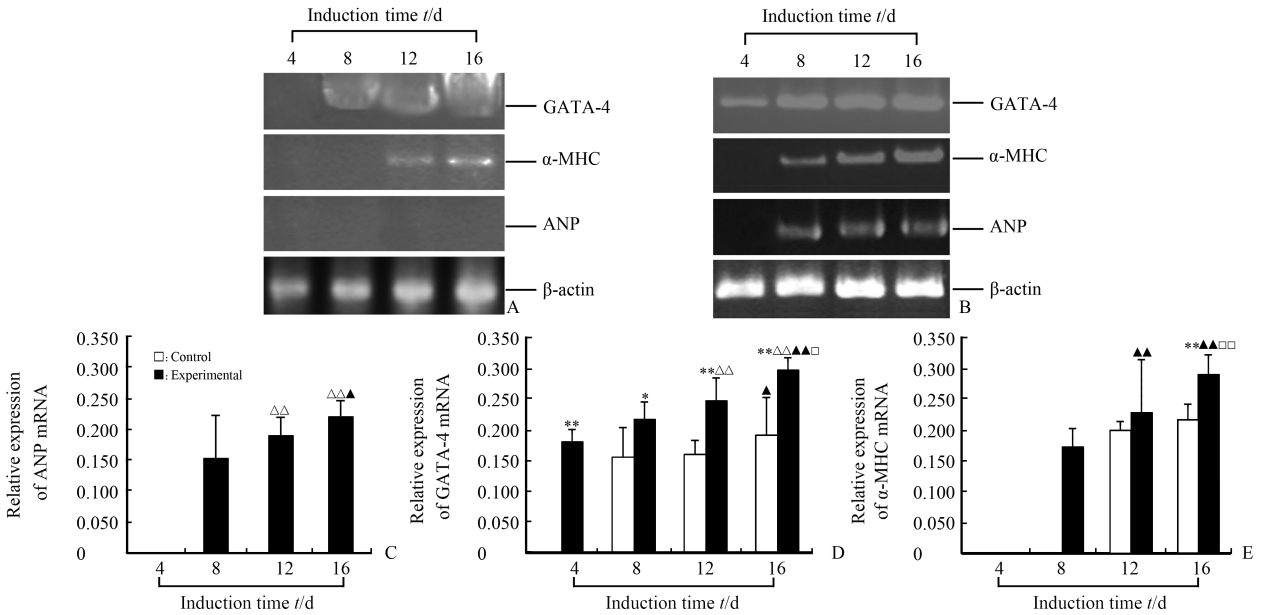


图2 RT-PCR 检测两组细胞 5-aza 诱导后 ANP、GATA-4 和 α-MHC 的表达

Fig 2 The expression of ANP,GATA-4 and α-MHC in 2 groups was detected with RT-PCR

A,B:The expression of ANP,GATA-4 and α-MHC in control group(A) and experimental group(B); C-E:The relative expression of ANP(C), GATA-4(D) and α-MHC(E) in control and experimental groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 4th day; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 8th day; $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$ vs 12th day

3 讨论

研究表明,5-aza 诱导单层 P19 细胞向心肌分化过程可能是 BMP 信号分子参与调节的^[6],而 Nkx2-5 基因又是 BMP 信号途径的下游效应基因,推测外源表达 Nkx2-5 的 P19 细胞在 5-aza 诱导下应更高效地向心肌分化。因此本实验设计用 5-aza 分别诱导单层培养的 P19 细胞和稳定表达 Nkx2-5 的 P19

细胞,通过 RT-PCR 方法检测心肌相关特异转录因子和心肌特异基因的表达。有研究发现,P19 细胞的亚系 P19CL6 细胞在 1% DMSO 的诱导和单层贴壁高汇合度细胞培养时,可以高效分化为跳动的心肌细胞^[7]。5-aza 诱导单层 P19 细胞向心肌分化时的高细胞密度培养条件和 P19CL6 向心肌分化的培养条件非常相似。Choi 等^[6]研究表明,1 μmol/L 的浓度对单层生长的 P19 细胞有较好的心肌诱导作用,因此本实

验中 5-aza 的诱导浓度也采用 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

GATA-4 是目前研究最多、且与心脏发育密切相关的另一转录调控因子, 在心肌发育中起重要调节作用。GATA-4 的表达对许多心脏结构基因, 如 α -MHC、 β -MHC、cTnC、cTnI 等的表达有重要调控作用^[8]。 α -MHC 基因编码心肌特异性 α 肌球蛋白重链, 组成心肌收缩蛋白, ANP 基因编码心肌特异功能蛋白, 均属于心特异基因。本研究结果显示: 对照组单层生长的 P19 细胞经 5-aza 诱导后有心肌早期转录因子 GATA-4 基因和心肌结构蛋白基因 α -MHC 转录水平的表达, 提示 5-aza 可诱导单层培养的 P19 细胞向心肌分化, 这与 Choi 等^[6]的研究结果一致。实验组即单层培养的稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞经 5-aza 诱导后, 在转录水平表达心肌早期转录因子 GATA-4 和心肌特异基因 α -MHC 和 ANP, 3 种基因表达量均随着诱导时间的增加呈逐渐增高趋势。这说明表达 Nkx2-5 的 P19 细胞在 5-aza 诱导下, 单层培养时可以逐渐地向心肌细胞分化, 在转录水平逐渐增加心肌早期标志物、心特异结构基因和心特异功能基因的表达。两组心肌早期转录因子 GATA-4 基因表达时间均较早, 而心肌特异结构基因 α -MHC 和功能基因 ANP 的表达时间较晚, 推测 5-aza 诱导激发的信号途径首先引起 Nkx2-5 的表达或通过激发的信号途径与过表达的 Nkx2-5 基因发生作用, 再启动 GATA-4 表达, 之后 Nkx2-5 和 GATA-4 通过相互协同作用启动 α -MHC 和 ANP 的表达^[2,9], 进而引起 P19 细胞的心肌发生。

两组结果比较显示, 实验组心肌早期标志物和心特异基因的表达时间均较对照组早, 且在本实验的大多取材时间点, 实验组的基因表达量都较对照组高; 实验组有心特异功能蛋白编码基因的表达而对照组没有。这些结果提示在 5-aza 诱导条件下, 单层培养的稳定表达 Nkx2-5 基因的 P19 细胞能更早、更高效地向心肌细胞分化, 说明 Nkx2-5 基因能够促进 5-aza 诱导的单层培养的 P19 细胞向心肌分化。虽有研究证实 5-aza 暴露在单层生长的 P19 细胞可引起 BMP-2 和 BMP-4 基因表达升高^[10], 5-aza 引发的心肌分化部分依靠一种 BMP 1A 型受体 Bmpr 1a 发挥作用^[11-12], 但是 5-aza 诱导在单层培养的 P19 细胞如何引起 BMP 途径的活化, 又如何调控 Nkx2-5 的活性从而诱发心肌发生尚不清楚。在 5-aza 诱导稳定表达 Nkx2-5 的 P19 细胞心肌发生事件中, 是不是由于过表达的 Nkx2-5 基因放大了 5-aza 引起的 BMP 信号途径而增强了心肌发生有待证实。5-aza 诱导下单层培养的稳定表达 Nkx2-5 基

因的 P19 细胞是否适合作为一种体外模型进行心脏发育和心肌分化的研究, 还有待心肌特异分化方面的验证及其向心肌分化效率的进一步实验。

综上所述, 本实验初步证实 5-aza 可以使表达 Nkx2-5 基因的 P19 细胞不经细胞聚集只单层培养即向心肌分化, Nkx2-5 具有促进 5-aza 诱导的单层培养的 P19 细胞向心肌分化的作用。进一步研究心肌分化中的信号通路和 Nkx2-5 之间的精确调控关系, 将为心肌细胞的分化提供更高的转化效率。

[参考文献]

- [1] Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: its role in cardiac development and diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 107: 252-268.
- [2] Nakashima Y, Ono K, Yoshida Y, Kojima Y, Kita T, Tanaka M, et al. The search for Nkx2-5-regulated genes using purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with Nkx2-5 gene targeting[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390: 821-826.
- [3] Jamali M, Rogerson P J, Wilton S, Skerjanc I S. Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 42252-42258.
- [4] 张金平, 张雷, 王慧娟, 王多, 赵昱, 尹青, 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: 725-729.
- [5] Jamali M, Karamboulas C, Rogerson P J, Skerjanc I S. BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis[J]. *FEBS Lett*, 2001, 509: 126-130.
- [6] Choi S C, Yoon J, Shim W J, Ro Y M, Lim D S. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36: 515-523.
- [7] Habara-Ohkubo A. Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells[J]. *Cell Struct Funct*, 1996, 21: 101-110.
- [8] Zhao R, Watt A J, Battle M A, Li J, Bondow B J, Duncan S A. Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice[J]. *Dev Biol*, 2008, 317: 614-619.
- [9] Small E M, Krieg P A. Transgenic analysis of the atrial natriuretic factor (ANF) promoter: Nkx2-5 and GATA-4 binding sites are required for atrial specific expression of ANF[J]. *Dev Biol*, 2003, 261: 116-131.
- [10] Riazi A M, Takeuchi J K, Hornberger L K, Zaidi S H, Amini F, Coles J, et al. NKX2-5 regulates the expression of beta-catenin and GATA 4 in ventricular myocytes[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e5698.
- [11] Ménard C, Grey C, Méry A, Zeineddine D, Aimond F, Pucéat M. Cardiac specification of embryonic stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93: 681-687.
- [12] Klaus A, Saga Y, Taketo M M, Tzahor E, Birchmeier W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 18531-18536.