

# 二甲基亚砷对 P19 细胞体外分化为心肌细胞的影响

尹青 陈炜 赵昱 李莉 张雷\* 龚森

(河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017)

**摘要** 体外应用不同浓度二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)诱导 P19 细胞向心肌细胞分化, 通过免疫细胞化学、流式细胞、RT-PCR 方法检测  $\alpha$ -横纹肌肌动蛋白( $\alpha$ -sarcomeric actin,  $\alpha$ -SA)、心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT)及 GATA-4、 $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -MHC) mRNA 表达。结果显示, DMSO 处理结合悬浮培养可诱导部分 P19 细胞分化为节律跳动的心肌细胞, 分化的细胞  $\alpha$ -SA、cTnT 表达阳性, 同时表达心肌特异 GATA-4、 $\alpha$ -MHC mRNA。1.0%DMSO 组  $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞免疫荧光强度及 GATA-4、 $\alpha$ -MHC mRNA 表达水平明显高于 0.5% 及 0.8%DMSO 组。表明 DMSO 的诱导作用与其浓度有关。

**关键词** P19 细胞; 心肌细胞; 二甲基亚砷

缺血性心脏病是一种常见疾病, 已成为人类疾病死亡的第一杀手。心肌缺血引起损伤区心肌细胞的大量不可逆性缺失、存活的功能性心肌细胞数量下降等, 这些因素最终导致心功能衰竭的发生, 这已成为心血管疾病死亡的主要原因。近年来, 细胞移植已成为心血管疾病治疗领域中的热点。如何获得大量可供移植的心肌干细胞并进行移植, 是人们面临的主要问题。P19 细胞是从小鼠畸胎瘤中分离得到的具有多分化潜能的干细胞, 通过条件培养其可在体外诱导为包括心肌细胞在内的多种类型的细胞, 在向心肌细胞分化过程中 P19 细胞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细胞发育过程, 被认为是研究心肌细胞发育的良好体外模型系统<sup>[1]</sup>。研究表明<sup>[1-3]</sup>, 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)处理结合非黏附聚集培养可诱导 P19 细胞分化为心肌细胞。以往的研究中采用不同浓度 DMSO 及不同培养方法诱导细胞分化, 心肌细胞分化率不尽相同。本实验应用 0.5%、0.8%、1.0% 浓度 DMSO 结合悬浮培养体外诱导 P19 细胞向心肌细胞分化, 探讨 DMSO 浓度对 P19 细胞向心肌细胞分化的影响, 摸索稳定的心肌细胞诱导和培养方法, 提高心肌细胞分化率, 为体外大量诱导分化心肌细胞的研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 P19 细胞的诱导分化培养<sup>[4]</sup>

P19 细胞(ATCC, CRL-1825, 购自中国协和医科

大学细胞中心)按常规方法培养。取对数生长的细胞, 分别用含 DMSO 浓度为 0.5%、0.8% 及 1.0% 的分化培养基分散细胞, 调节细胞密度为  $0.25 \times 10^6$  个/ml 接种于铺有琼脂的培养皿中(0 天), 7 天后形成细胞聚集体。将细胞聚集体接种于 24 孔培养板中(每孔中 1~2 个聚集体), 用不含 DMSO 的生长培养基继续培养。

### 1.2 倒置显微镜观察细胞跳动情况

从 DMSO 诱导后 1 天开始, 每天用倒置显微镜观察。

### 1.3 免疫荧光双标染色

P19 细胞及诱导后 11、15、19 天的细胞, 用 4% 多聚甲醛固定。3% 甲醇-双氧水温度育。0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复。10% 正常山羊血清封闭。首先, 滴加  $\alpha$ -横纹肌肌动蛋白( $\alpha$ -sarcomeric actin,  $\alpha$ -SA)抗体(Sigma)4 °C 冰箱过夜, 滴加生物素标记的二抗 IgG 工作液, 37 °C 1 h, 滴加亲和素-Cy3, 37 °C 1 h; 然后, 在同一标本片上滴加心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)抗体(NeoMarker)4 °C 冰箱过夜, 滴加 FITC 标记的二抗, 37 °C 1 h。60% 甘油-缓冲液封片。激光共聚焦扫描显微镜(Leica TCS-SP2)观察。用一抗稀释液(0.05% Triton X-100-0.01 mol/L PBS)替代  $\alpha$ -SA 及 cTnT 抗体作为阴性对照, 其余步骤相同。

收稿日期: 2007-01-29 接受日期: 2007-06-07

\* 通讯作者。Tel: 0311-86266719, E-mail: zhanglei@hebmu.edu.cn

#### 1.4 流式细胞仪检测 $\alpha$ -SA、cTnT 的表达

P19 细胞及诱导后 19 天的细胞, 用 70% 乙醇固定。调节细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/ml, 加入  $\alpha$ -SA、cTnT 单克隆抗体, 37 °C 避光温育 30 min。FIFC 标记羊抗小鼠 IgG 工作液, 37 °C 避光温育 30 min, 机检。用 PBS 替代单克隆抗体作阴性对照。

#### 1.5 RT-PCR 检测 GATA-4、 $\alpha$ -肌球蛋白重链 ( $\alpha$ -myosin heavy chain, $\alpha$ -MHC) mRNA 表达

GATA-4 上游引物: 5'-TAGCAGGCAGAA-AGCAAGG-3', 下游引物: 5'-AGCACGAGGCAG-ACAAGAA-3'; 扩增产物为 392 bp。 $\alpha$ -MHC 上游引物: 5'-CCTGGGCAAGTCTAACAA-3', 下游引物: 5'-ACAAAGTGAGGGTGGGTG-3'; 扩增产物为 345 bp。内参照物  $\beta$ -肌动蛋白上游引物: 5'-GCTGTC-CCTGTATGCCTCT-3', 下游引物: 5'-TTGATGTCA-CGCACGATTT-3'; 扩增产物为 222 bp。常规抽提细胞总 RNA。取总 4  $\mu$ l RNA, 在 M-MLV 逆转录酶作用下合成 cDNA。以 cDNA 为模板按下述参数进行 PCR 扩增: 95 °C 变性 1 min; 54 °C (GATA-4、 $\beta$ -肌动蛋白)/52 °C ( $\alpha$ -MHC) 退火, 1 min; 72 °C 延伸, 90 s; 循环 40 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 50 min), Goodview 染色, 紫外透射仪上观察, 读胶仪读取各条产物带的吸光度值并照相。

#### 1.6 统计学处理

所有数据运用 SPSS12.0 统计软件分析, 各项检测结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 记录, 组间比较用单因素方差分析, 当方差分析有显著性差异时, 进一步用  $q$  检验作两两比较。

## 2 结果

### 2.1 DMSO 诱导及细胞聚集体形成

实验中分别选用 0.5%、0.8%、1.0% 的 DMSO 作为诱导剂, 同时于光滑的琼脂铺层上培养 P19 细胞, 观察到细胞悬浮生长、增殖速度减慢并开始聚集, 在不同浓度 DMSO 作用下, 细胞聚集体的形态大小不同。0.5% DMSO 组: 细胞聚集体形成较早, 体积迅速增大, 至第 7 天大部分聚集体离散, 只有少量体积较小的聚集体形态较规则呈球形。0.8% DMSO 组: 7 天时部分体积较大聚集体的边缘细胞脱落、形态不规则, 部分聚集体外表光滑呈球形。1.0% DMSO 组: 细胞增殖速度较慢, 逐渐形成细胞聚集体, 且体积大小趋于一致, 形态均为较规则球形, 悬浮生长, 7 天时

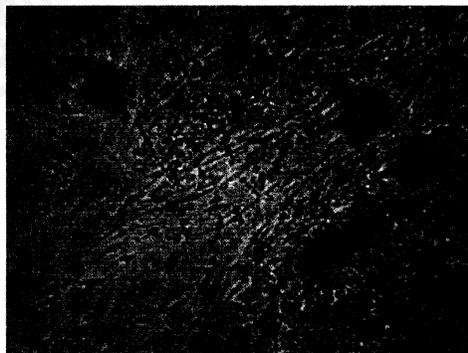


图 1 黏附培养至 11 天, 1.0% DMSO 组可见大量梭形细胞在聚集体的生长晕中纵向排列 (100 $\times$ )

可见部分聚集体中出现自律跳动细胞团片。未经诱导的 P19 细胞黏附生长, 无聚集体形成, 2 天可达 70%~80% 融合。

### 2.2 心肌样细胞的生长分化、形态学改变

细胞聚集体接种于 24 孔板中后开始贴壁生长。接种 8 h 后细胞逐渐由聚集体边缘长出, 在聚集体周围形成生长晕。聚集体中央细胞增殖速度较快, 细胞体积较小, 具有高核质比, 为未分化细胞; 随培养时间延长, 聚集体中央区域出现接触性抑制, 细胞大量死亡形成坏死区。各组黏附培养 11 天后, 可见生长晕中出现体积较大的杆状或梭形细胞, 细胞间彼此纵向平行排列 (图 1)。至 14 天, 在 0.8%、1.0% DMSO 组可见自发性节律收缩的心肌样细胞簇出现, 散在或成片分布于生长晕中, 细胞跳动频率 85~130 次/min。0.8% DMSO 组出现节律跳动细胞的细胞聚集体少于 1.0% DMSO 组, 而 0.5% DMSO 组未见跳动细胞出现, 可能是由于心肌细胞分化率较低, 未能观察到。

### 2.3 心肌样细胞 $\alpha$ -SA、cTnT 的表达

免疫荧光双标染色结果显示, 未经诱导的 P19 细胞  $\alpha$ -SA、cTnT 表达均呈现阴性 (图 2, A~C); 经 DMSO 诱导后 11、15、19 天的细胞, 均可见  $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞, 细胞单个或成群分布于生长晕中, 呈柱状或梭形纵向排列 (图 2, D~F)。1.0% DMSO 组阳性细胞数量多于 0.5% 及 0.8% 组; 同时, 随培养时间的延长, 各组阳性细胞呈现增多趋势。流式细胞检测结果表明, 各组黏附培养至 19 天, 1.0% DMSO 组  $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞荧光强度均明显高于 0.5%、0.8% DMSO 组 ( $P < 0.05$ ), 而 0.5%、0.8% 两组间未见明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3、图 4, 图 5)。

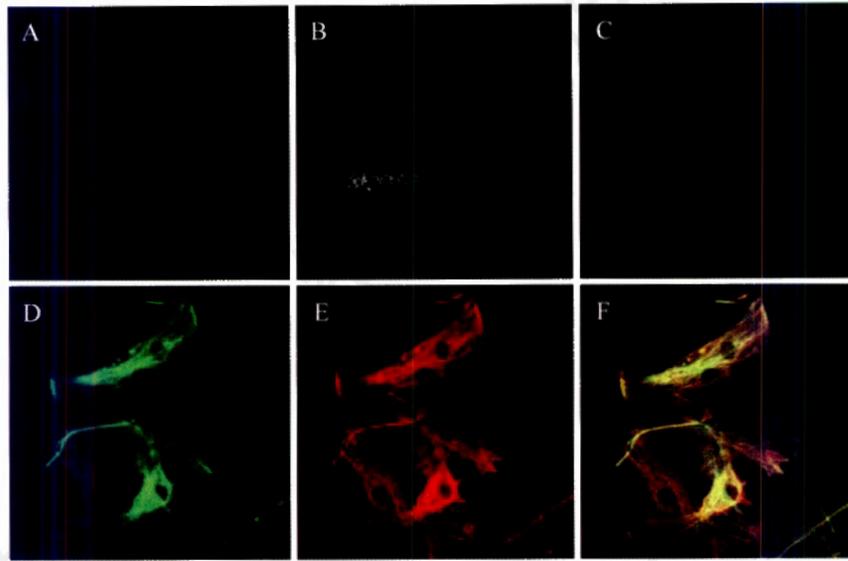


图2 免疫荧光染色显示, P19 细胞胞质中 cTnT(A)、α-SA(B)表达阴性, 共表达呈阴性(C); 1.0% DMSO 组诱导后 15 天, P19 细胞来源的心肌细胞胞质中 cTnT (D, 绿色)、α-SA(E, 红色)表达阳性, 共表达呈黄色(F)(400×)

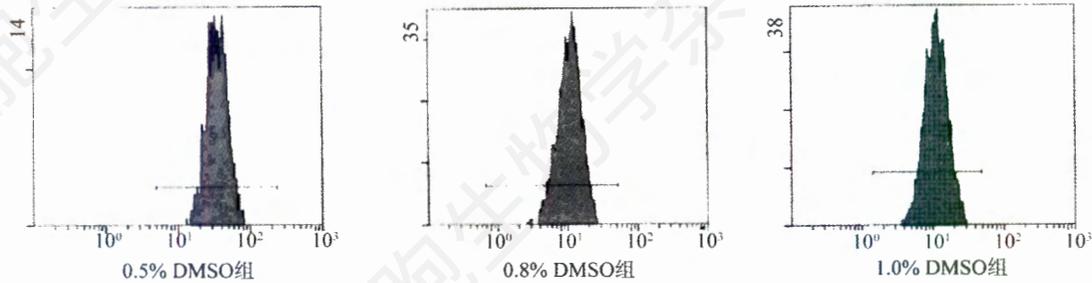


图3 P19 细胞经 DMSO 诱导后 19 天, α-SA 阳性细胞的流式细胞检测

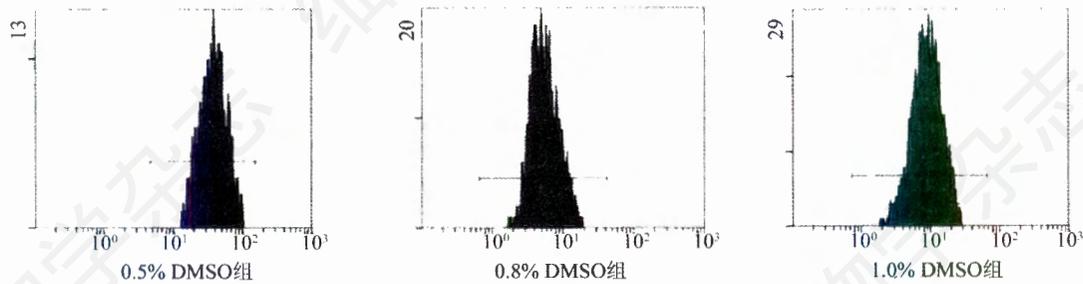


图4 P19 细胞经 DMSO 诱导后 19 天, cTnT 阳性细胞的流式细胞检测

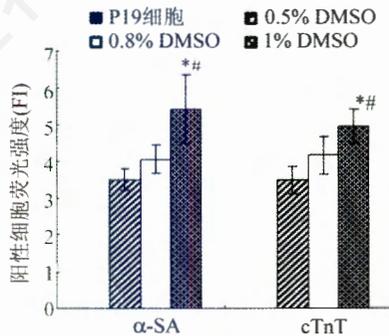


图5 P19 细胞及不同浓度 DMSO 诱导后 19 天细胞, α-SA、cTnT 阳性细胞荧光强度(FI)比较( $\bar{x} \pm s$ ) 与 0.5% DMSO 相比, \* $P < 0.05$ ; 与 0.8% DMSO 相比, # $P < 0.05$ 。

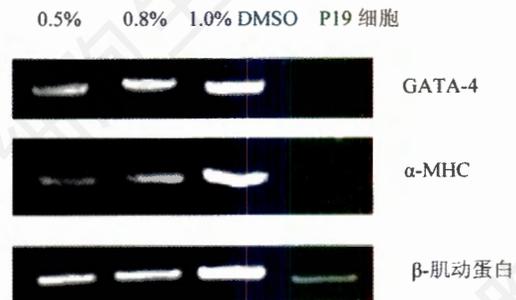


图6 P19 细胞及不同浓度 DMSO 诱导后 12 天细胞, GATA-4 和 α-MHC mRNA 表达的 RT-PCR 分析

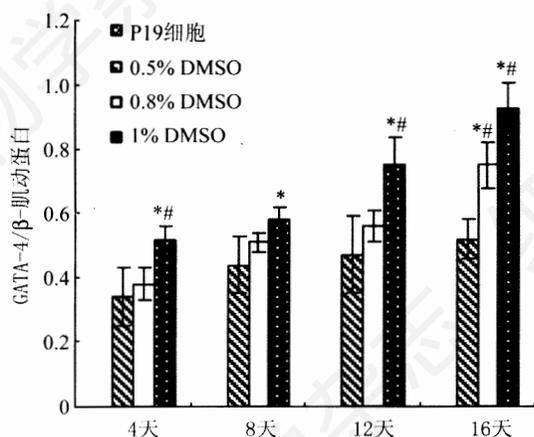


图7 P19细胞及不同浓度DMSO诱导后细胞GATA-4 mRNA的表达(GATA-4/ $\beta$ -肌动蛋白,  $\bar{x} \pm s$ )

与0.5%DMSO相比, \* $P < 0.05$ ; 与0.8%DMSO相比, # $P < 0.05$ 。

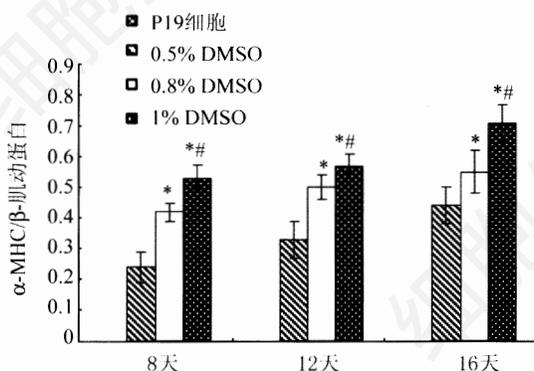


图8 P19细胞及不同浓度DMSO诱导后细胞 $\alpha$ -MHC mRNA的表达( $\alpha$ -MHC/ $\beta$ -肌动蛋白,  $\bar{x} \pm s$ )

与0.5%DMSO相比, \* $P < 0.05$ ; 与0.8%DMSO相比, # $P < 0.05$ 。

## 2.4 心肌样细胞 GATA-4、 $\alpha$ -MHC mRNA 的表达变化

RT-PCR 结果显示, 心肌细胞分化相关转录因子 GATA-4、 $\alpha$ -MHC 在 DMSO 诱导的各组均有表达(图 6), GATA-4 于诱导后第 4 天开始表达, 而  $\alpha$ -MHC 于诱导后 8 天表达, 且随培养时间延长, GATA-4、 $\alpha$ -MHC 的表达逐渐增强。以  $\beta$ -肌动蛋白的表达量作为内对照, 通过计算 GATA-4、 $\alpha$ -MHC 与  $\beta$ -肌动蛋白的比值对二者的表达进行半定量分析, 在各检测时间点 1.0%DMSO 组 GATA-4、 $\alpha$ -MHC 的表达明显高于其他两组( $P < 0.05$ )(图 7, 图 8), 0.5% 与 0.8% 两浓度组间亦存在差异。未经诱导的 P19 细胞未见 GATA-4、 $\alpha$ -MHC mRNA 表达。

## 3 讨论

P19 细胞是从小鼠畸胎瘤中分离得到的具有多分化潜能的 EC 细胞, 与 ES 细胞在分化潜能、超微结构、细胞表面抗原和生化特性等方面具有相似性。与 ES 细胞相比, P19 EC 细胞在无需饲养层和白血病抑制因子(leukemia inhibitor factor, LIF)条件下单层培养即可保持未分化状态, 更易于培养、易于进行基因操作; 通过分化培养过程 EC 细胞可从恶性表型转化为非恶性表型<sup>[5]</sup>。P19 细胞的体外分化有两个必需因素<sup>[6]</sup>: 一是诱导剂类型, 二是诱导过程中必须要有细胞的聚集, 不同诱导剂及同种诱导剂不同浓度诱导的细胞类型不同。类胚体形成与药物诱导相结合可诱导 P19 细胞形成所有三个胚层来源的多种类型的细胞, 似乎与 ES 细胞具有相同的分化机制。应用 P19 细胞在心肌发育过程中发育相关基因的表达与小鼠胚胎发育过程相似的特性, 其常被作为研究心肌细胞早期分化过程中特异基因表达、电生理特性等的模型系统<sup>[1]</sup>。

DMSO 是一种强极性的简单有机化合物, 它能溶解多种脂溶性化合物并增加药物的渗透性, 具有抗氧化、抗炎反应及细胞保护作用。DMSO 是最早发现的一种细胞系特有的分化诱导剂<sup>[7]</sup>, 可诱导多种细胞的分化, 其作用机制主要是抑制 c-myc 基因表达; 同时, DMSO 能使细胞内储存的钙释放, 而细胞内钙浓度增高在诱导细胞分化中可能起重要作用<sup>[8]</sup>。目前, DMSO 亦常被用于胚胎性干细胞定向诱导分化为心肌细胞分化的研究中<sup>[1-3,9]</sup>, 但 DMSO 浓度对心肌细胞定向分化的影响还不十分确定。在细胞分化实验中, DMSO 浓度多选用 0.2%~1.0% 之间, 我们在实验中发现低浓度对 P19 细胞的诱导作用不明显, 而 DMSO 浓度高于 1.0% 时, 细胞大量死亡, 很少聚集, 故本实验对 0.5%、0.8% 及 1.0%DMSO 的诱导作用进行了比较。本实验结果显示在悬浮生长阶段 1.0% DMSO 可抑制细胞增殖, 形成良好的细胞聚集体, 生长至 7 天时部分聚集体中出现节律跳动的细胞团片, 表明 P19 细胞被成功诱导为心肌样细胞。 $\alpha$ -SA、cTnT 均为细胞骨架蛋白,  $\alpha$ -SA 可在骨骼肌、心肌细胞表达, cTnT 则只在心肌特异性表达。在细胞分化过程中,  $\alpha$ -SA 的表达略早于 cTnT 的表达。黏附培养 11 天后, 各组细胞聚集体生长晕中均可见  $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞。随培养时间延长, 阳性细胞逐渐增多, 同时我们注意到聚集体的形态大小与细胞分化密切相关。1.0%DMSO 组形成的聚集体较大、形状

规则且体积趋于一致,黏附培养后细胞分化较好, $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞较 0.5%、0.8% DMSO 组多,0.5%、0.8% DMSO 组存在大量未分化细胞。流式细胞检测结果显示 1.0% DMSO 组  $\alpha$ -SA、cTnT 阳性细胞荧光强度明显高于 0.5%、0.8% DMSO 组( $P < 0.05$ ),表明 1.0% 浓度的 DMSO 可更有效的诱导 P19 细胞定向分化为心肌细胞。由此可见,在 P19 细胞向心肌细胞分化的过程中,在体积较大较规则的聚集体中心心肌细胞分化率更高。DMSO 可能通过对细胞增殖的调控影响细胞聚集体的形成,从而影响细胞分化。

GATA-4 是目前研究最多、且与心脏发育密切相关的转录调控因子之一,在心肌发育中起重要调节作用,是心脏前体细胞的最早期标志之一。GATA-4 的表达对许多心脏结构基因,如  $\alpha$ -MHC、 $\beta$ -MHC、肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)、cTnC、cTnI 等的表达有重要调控作用<sup>[10,11]</sup>。本研究结果显示,于 DMSO 诱导后 4 天表达 GATA-4,随培养时间延长其表达逐渐增强。1.0% DMSO 组 GATA-4 的表达明显高于 0.5%、0.8% 组( $P < 0.05$ ),表明 DMSO 对 GATA-4 的表达具有诱导作用。 $\alpha$ -MHC 与 cTnC、cTnI、心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)、心肌脑钠素(brain natriuretic peptide, BNP)等均是心肌特异的基因标志。在 ES 细胞心肌细胞分化诱导实验中,类胚体形成的 6~7 天可出现  $\alpha$ - 和  $\beta$ -MHC 表达。心肌细胞在开始形成时以  $\beta$  型 MHC 表达占优势,继续培养则以表达  $\alpha$  型 MHC 为主,其表达时相与胚胎发育一致<sup>[12]</sup>。本实验中于诱导后第 8 天检测到  $\alpha$ -MHC 的表达,随培养时间延长其表达逐渐增强,1.0% DMSO 组在各时间点  $\alpha$ -MHC 的表达均

明显高于其他两组,与转录因子 GATA-4 的表达结果相一致,表明 GATA-4 的表达可导致大量 mRNA 编码心肌细胞特异基因  $\alpha$ -MHC,加速心肌细胞分化标志基因的表达,促进心肌细胞分化。

不同浓度 DMSO 诱导与聚集体形成培养相结合可诱导 P19 细胞分化为心肌细胞,但其过程还不十分清楚。本实验通过对  $\alpha$ -SA、cTnT 及 GATA-4、 $\alpha$ -MHC mRNA 表达的检测表明,DMSO 浓度在 0.5%~1.0% 之间变化时高浓度 DMSO 诱导心肌细胞分化效果较好,或许 DMSO 通过影响细胞的聚集,激活心肌细胞早期转录因子的功能,进而调节心肌细胞特异基因的表达,最终导致心肌细胞分化。进一步深入研究 DMSO 作用的分子机制,有利于在体外实验模型中研究建立高度标准化的、最适于心肌形成分化的培养条件,在此基础上才有可能为细胞治疗心血管疾病提供大量均一化的可移植细胞。

#### 参考文献(References)

- [1] van der Heyden MA *et al.* *Cardiovasc Res*, 2003, **58**: 410
- [2] McBurney MW *et al.* *Nature*, 1982, **299**: 165
- [3] Lipskaia L *et al.* *Cell Physiol*, 1998, **176**: 50
- [4] 尹青等. *解剖学报*, 2006, **37**: 219
- [5] van der Heyden MA *et al.* *Cardiovasc Res*, 2003, **58**: 292
- [6] Martin GR *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**: 1441
- [7] 张翠沐. *抗肿瘤药物的药理与临床应用*, 郑州: 河南医科大学出版社, 1999, 361
- [8] Rephaeli A *et al.* *Cancer Biochem Biophys*, 1990, **11**: 119
- [9] Ventura C *et al.* *Circ Res*, 2000, **87**: 189
- [10] Davidson SM *et al.* *Dev Biol*, 2000, **218**: 146
- [11] Kasahara H *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 4570
- [12] Ng WA *et al.* *Pediatr Res*, 1997, **41**: 285

## The Effects of Dimethyl Sulfoxide on the Differentiation of Cardiomyocyte from P19 Cells *in Vitro*

Qing Yin, Wei Chen, Yu Zhao, Li Li, Lei Zhang\*, Miao Gong

(Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** P19 cells were induced to differentiate toward cardiomyocytes *in vitro* by the different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO). Immunocytochemistry, flow cytometry and RT-PCR test were used to detect the expression of  $\alpha$ -sarcomeric actin ( $\alpha$ -SA)、cardiac troponin T (cTnT) and GATA-4,  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC) mRNA in differentiated cells. It was shown that DMSO treatment together with suspension culture can induce P19 cells to differentiate into spontaneously contracting cardiomyocytes. The cells shown  $\alpha$ -SA- and cTnT-positive and expressed cardiomyocyte specific GATA-4 and  $\alpha$ -MHC mRNA. The fluorescence intensity of  $\alpha$ -SA and cTnT positive cells and the expression of GATA-4 and  $\alpha$ -MHC mRNA in 1.0% DMSO treated group were significantly higher than that in 0.5% and 0.8% DMSO treated group. Our data suggested that the differentiation efficiency of P19 cells into cardiomyocytes is related with the concentration of DMSO.

**Key words** P19 cell; cardiomyocyte; dimethyl sulfoxide

Received: January 29, 2007 Accepted: June 7, 2007

Corresponding author. Tel: 86-311-86266719, E-mail: zhanglei@hebmu.edu.cn