

类糖尿病环境对 P19 细胞分化为心肌细胞的影响

方旭,杨荣*,徐春阳,张浩,钱玲梅,盛燕辉,孔祥清

(南京医科大学第一附属医院心血管科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨在类糖尿病环境下诱导 P19 细胞向心肌细胞分化过程中心肌转录因子 GATA 结合蛋白 4(GATA binding protein 4, GATA4)和心肌特异标志物心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)的表达水平。方法:体外类糖尿病环境下,诱导 P19 细胞向心肌细胞分化,通过 Real-time PCR 和蛋白质印迹法分别检测其 cTnT 和 GATA4 在不同时间点的 mRNA 以及蛋白表达水平。结果:在分化过程中,类糖尿病组 P19 细胞分化形成的胚胎样小体较正常组增殖缓慢,形成的生长晕松散零乱。类糖尿病环境下 GATA4 mRNA 的表达量在分化第 6、8、10 天 (0.05 ± 0.06 、 0.11 ± 0.04 、 0.45 ± 0.12) 均明显低于同时时间点的对照组 (1.00 ± 0.04 、 0.44 ± 0.06 、 0.78 ± 0.20), cTnT mRNA 的表达量 (0.12 ± 0.03 、 0.07 ± 0.04 、 0.46 ± 0.11) 均明显低于同时时间点的对照组 (1.02 ± 0.25 、 0.25 ± 0.02 、 0.71 ± 0.21)。蛋白质印迹法结果用积分光密度值量化数据,类糖尿病环境下分化第 6、8、10 天 GATA4 蛋白表达 (0.40 ± 0.06 、 0.25 ± 0.03 、 0.92 ± 0.13) 均明显低于同时时间点的对照组 (0.69 ± 0.09 、 0.75 ± 0.08 、 1.05 ± 0.07)。类糖尿病环境下分化第 6、8 天 cTnT 蛋白表达 (0.39 ± 0.08 、 0.37 ± 0.05) 均明显低于同时时间点的对照组 (0.79 ± 0.05 、 0.54 ± 0.07)。统计结果表明在分化第 6、8 天时,类糖尿病环境下 GATA4 和 cTnT mRNA 和蛋白的表达量与对照组相比,差异均有统计学意义。结论:类糖尿病环境培养降低了 P19 细胞向心肌细胞的分化。

[关键词] 类糖尿病环境;P19 细胞;分化;心肌细胞

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-621-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20130511

The effects of diabetes-like environment on P19 cell for myocardial cell differentiation

Fang Xu, Yang Rong*, Xu Chunyang, Zhang Hao, Qian Lingmei, Sheng Yanhui, Kong Xiangqing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate myocardial transcription factor GATA4 and myocardial specific marker cardiac troponin T (cTnT) expression of P19 cells differentiated into cardiomyocytes in diabetes-like environment. **Methods:** P19 cells were induced to myocardial cells in supplemented diabetic teratogenic medium. Real-time PCR and Western blot were performed to detect GATA4 and cTnT expressions in the two groups on differentiated process. **Results:** Compared with the control group, the elementary bodies (EB) that cultured in diabetes-like environment propagated obviously slower and the aggregation outgrowths were scattering and sparse. The volumes of GATA4 in diabetes-like environment medium on day 6, 8 and 10 (0.05 ± 0.06 , 0.11 ± 0.04 and 0.45 ± 0.12) of culture were significantly lower than the same time of the control group (1.00 ± 0.04 , 0.44 ± 0.06 and 0.78 ± 0.20) of culture respectively. The volumes of cTnT in diabetes-like environment medium on day 6, 8 and 10 (0.12 ± 0.03 , 0.07 ± 0.04 and 0.46 ± 0.11) of culture were significantly lower than the same time of the control group (1.02 ± 0.25 , 0.25 ± 0.02 and 0.71 ± 0.21) of culture respectively. Western blot assay resulted with the integral optical density (IOD) values of quantitative data. The protein expressions of GATA4 in diabetes-like environment medium on day 6, 8 and 10 (0.40 ± 0.06 , 0.25 ± 0.03 and 0.92 ± 0.13) of culture were significantly lower than the same time of the control group (0.69 ± 0.09 , 0.75 ± 0.08 and 1.05 ± 0.07). The protein expressions of cTnT in diabetes-like environment medium on day 6 and 8 (0.39 ± 0.08 , 0.37 ± 0.05) of culture were significantly lower than the same time of the control group (0.79 ± 0.05 , 0.54 ± 0.07). There were significant differences between the day 6 and 8 groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** P19 cell induced decreasingly to myocardial cell differentiation in diabetes-like environment culture.

[Key words] diabetes-like environment; P19 cell; differentiation; myocardial cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 621-625]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30901473);江苏省卫生厅科教兴卫工程重点学科开放课题(ZX07200905)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yr@njmu.edu.cn

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)作为出生缺陷的首位畸形越来越引起人们重视^[1]。CHD的发病机制也一直是科研工作者研究的重点,目前一些遗传基因引起CHD的研究取得了突破^[2],特定基因的缺陷会导致某些类型CHD^[3],但是约85%~90%的CHD仍然无法用遗传因素解释。近年来,糖尿病合并妊娠(pregestational diabetes mellitus, PGDM)与胎儿心脏发育缺陷的相关性越来越受关注^[4],临床研究显示PGDM孕妇妊娠早期控制血糖可减少婴儿的发育畸形。动物实验证实,糖尿病孕鼠的后代会出现主动脉右移,右心室双出口,主动脉-肺动脉共干联合室间隔缺损^[5]。P19细胞是有向心肌细胞分化能力的胚胎干细胞系,研究其在类糖尿病环境下分化过程中心肌转录因子的表达,对阐明CHD的发病机制有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

P19细胞系来源于中国科学院上海细胞库;DMEM/F12培养液、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶/2.21 mmol/L EDTA、青链霉素(南京国维森特公司);细胞培养所需耗材、RIPA试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL化学发光试剂盒(南京国莱普泰公司)。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、(\pm)-3-羟基丁酸钠(sodium γ -hydroxybutyrate, BHOB)、乙酰乙酸盐(美国Sigma公司);葡萄糖(韩国Biosharp公司)。TRIzol、Oligo合成产品(美国Invitrogen公司);FSU SYBR Green Master (Rox)、Transcriptor 第一链cDNA合成试剂盒(美国Roche公司);心肌转录因子GATA结合蛋白4(GATA binding protein 4, GATA4)、心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)多克隆抗体(美国Abcam公司);GAPDH抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 P19细胞复苏及培养

DMEM/F12的培养液中加入10%胎牛血清及1%青、链霉素配制完全培养液。从液氮中取出P19细胞,快速复苏后移入15 ml离心管,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入5 ml完全培养液重悬细胞,将细胞尽量吹散后移入25 cm²培养瓶,37℃、5% CO₂培养箱中孵育,2 h左右细胞开始贴壁,4~5 h倒置显微镜观察细胞贴壁数量较多,予换液以去除冻存液对细胞的损伤。1~2 d换液,消化,按 1×10^5 个/ml

传代培养^[6]。

1.2.2 类糖尿病环境下P19细胞的诱导分化

类糖尿病环境下培养细胞称为糖尿病致畸(diabetic teratogenicity, DT)组,由完全培养液加入3 mg/ml葡萄糖,2 g/L BHOB、10 μ g/ml乙酰乙酸盐和1%DMSO配制成诱导液模拟糖尿病环境诱导分化^[7]。对照组用完全培养液加入1%DMSO的诱导液诱导分化^[8]。取复苏5代的P19细胞, 1×10^5 个/ml培养至铺满25 cm²培养瓶为止。胰酶消化后,加入5 ml培养液吹散细胞,平均分至5个10 cm培养皿中,在含1%DMSO的诱导液中培养,记为分化过程第1天(Day 1),以后类推。Day 3,用7 ml上述诱导液置换皿内等量培养液,换液时先将培养皿一侧稍垫高放置少许时间,等皿内悬浮细胞沉到皿底后再用移液器吸取上层液体。Day 5,倒置显微镜下可观察到一些细胞聚集成团样生长的胚胎样小体,用移液管轻轻吹下后移至6 cm培养皿中用普通培养液继续培养^[9]。每2 d换液1次,显微镜观察细胞生长情况和形态变化,并于Day 6、8、10分别提取DT组和对照组的总RNA和总蛋白,置于-70℃冰箱中备用。

1.2.3 Real-time PCR

测定P19细胞诱导分化过程中GATA4、cTnT mRNA的表达水平,比较DT组与对照组的区别。用TRIzol一步法提取总RNA,测定A₂₆₀/A₂₈₀比值为1.8~2.0, RNA定量后取1 μ g,以Oligo(dT)18为随机引物,在M-MLV逆转录酶作用下进行逆转录,反应体系20 μ l。取逆转录产物2 μ l为模板进行PCR扩增,PCR反应体系为20 μ l。GATA4上下游引物分别为:5'-cacccaatctcgatatgttga-3', 5'-gcacaggtagtgtccgctc-3'。cTnT上下游引物分别为:5'-cgaccacctgaatgaagacc-3', 5'-ttcccacgagtttggagac-3'。内参GAPDH上下游引物分别为:5'-aggctggtgtgaacggattg-3', 5'-ggggtcgtgatggcaaca-3'。每组实验平行做3孔,用7500 System SDS软件进行数据分析。

1.2.4 蛋白质印迹

用RIPA细胞裂解液裂解各组细胞,提取细胞总蛋白并用BCA法测定蛋白质含量后,取50 μ g蛋白质样品经电泳分离、转膜和脱脂奶粉封闭后,依次加入兔抗鼠GATA4和cTnT一抗4℃过夜和羊抗兔二抗室温反应2 h, ECL发光显影。

1.3 统计学方法

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS11.0统计软件进行统计分析,两独立样本的比

较经方差齐性检验后,进一步选择 t 检验或 t' 检验, $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置显微镜观察

未分化的 P19 细胞为贴壁细胞,复苏后细胞呈圆形或椭圆形,大小相似,体积较小,分散均匀,2~3 h 开始贴壁,贴壁后呈扁平不规则多角形(图 1)。生长速度良好,1~2 d 后可铺满瓶底。1%DMSO 诱导分化 Day 4 镜下可观察到细胞聚集成胚胎样小体,将胚胎样小体移入 6 cm 培养皿继续培养后,可见小体边缘细胞开始快速克隆增殖,并逐渐从边缘爬出形成生长晕。

对照组 Day 6 观察胚胎样小体形状近似球形,边缘光滑,体积趋于一致。DT 组 Day 6 观察胚胎样小体与对照组体积大小相近,但形状不规整,边缘较不规则,生长晕松散。对照组 Day 8 观察胚胎样小体边缘的细胞生长迅速,增殖较快,生长晕扩大明显。DT 组 Day 8 观察胚胎样小体边缘细胞增殖缓慢,生长晕零落。对照组 Day 10 观察细胞数量较多,连接

紧密,细胞形态多样化。DT 组 Day 10 细胞相对较少,梭形细胞多(图 2)。

2.2 P19 细胞诱导分化过程中 GATA4 和 cTnT mRNA 表达水平的变化

Real-time PCR 方法测定结果显示,在分化 Day 6、8、10 检测 GATA4 表达水平,DT 组均不同程度低于对照组。且经统计学分析后,Day 6、8 时 2 组 GATA4 mRNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。分化 Day 6、8、10 检测到 cTnT 的表达量也同样呈现出 DT 组均低于对照组的情况,Day 6 与 Day



图 1 正常 P19 细胞贴壁后呈扁平不规则多角形
Figure 1 P19 cells is irregular polygon after adhered flat

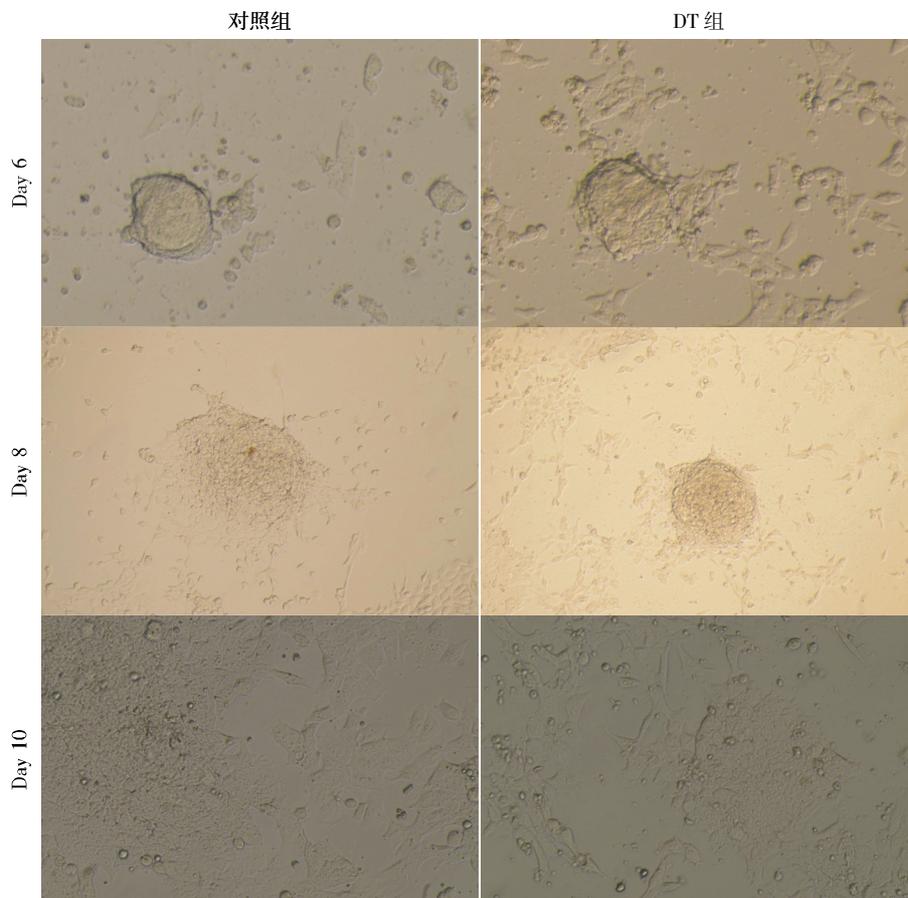


图 2 不同时间时对照组和 DT 组细胞的形态学观察
Figure 2 The morphology observation of cells in control and DT group at different time

8时2组 cTnT mRNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.3 P19 细胞诱导分化过程中 GATA4 和 cTnT 蛋白表达水平的变化

Western blot 检测结果显示分化 Day 6、8、10 时两种蛋白均有表达 (图 3), 使用 Gel-Pro Analyzer V4.0 分析灰度条带并量化数据(表 2), 比较积分光

密度(OD)值示:GATA4 在 P19 细胞分化的 Day 6、8、10 各时间点的蛋白表达均呈现 DT 组低于正常组的现象。cTnT 蛋白表达在 P19 细胞分化的 Day 6、8 时, 呈现 DT 组低于正常组的现象, 而 Day 10 时两组 cTnT 蛋白表达差异不明显。统计结果显示分化 Day 6、Day 8 时, 两组 GATA4 和 cTnT 蛋白表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 类糖尿病环境与正常环境下 GATA4 和 cTnT mRNA 在 P19 细胞分化第 6、8、10 天时表达水平变化

Table 1 Transcription of GATA4 and cTnT mRNA in diabetes-like environment medium and the normal medium on Day 6, 8, 10 ($\bar{x} \pm s$)

观察时间	GATA4			cTnT		
	对照组	DT 组	P 值	对照组	DT 组	P 值
Day 6	1.00 ± 0.04	0.05 ± 0.06	< 0.001	1.02 ± 0.25	0.12 ± 0.03	0.023
Day 8	0.44 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.001	0.25 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.030
Day 10	0.78 ± 0.20	0.45 ± 0.12	0.070	0.71 ± 0.21	0.46 ± 0.11	0.141

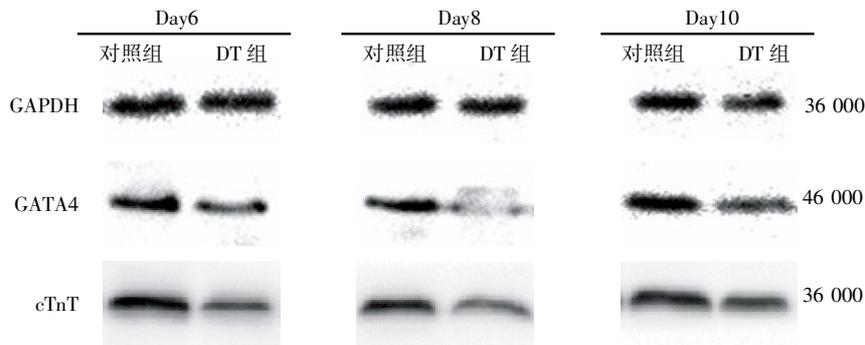


图 3 2 组细胞 GATA4 和 cTnT 的蛋白表达水平

Figure 3 The protein expression of GATA4 and cTnT in two groups

表 2 类糖尿病环境与正常环境下 GATA4 和 cTnT 在 P19 细胞分化第 6、8、10 天时蛋白表达 IOD 值比较

Table 2 IOD values of protein expression of GATA4 and cTnT in diabetes-like environment medium and the normal medium on Day 6, 8, 10 ($\bar{x} \pm s$)

观察时间	GATA4			cTnT		
	对照组	DT 组	P 值	对照组	DT 组	P 值
Day 6	0.69 ± 0.09	0.40 ± 0.06	0.009	0.79 ± 0.05	0.39 ± 0.08	0.002
Day 8	0.75 ± 0.08	0.25 ± 0.03	< 0.001	0.54 ± 0.07	0.37 ± 0.05	0.025
Day 10	1.05 ± 0.07	0.92 ± 0.13	0.185	0.68 ± 0.03	0.72 ± 0.04	0.236

3 讨论

CHD 在出生缺陷中列于首位, 亦作为中国内地 5 岁以下儿童的首位死亡原因, 发病率 0.8%, CHD 的发病机制成为研究热点。研究发现母亲糖尿病和高体质指数会增加新生儿心脏畸形的风险^[10]。妊娠前已患有糖尿病的孕母相较 PGDM, 更易发生胚胎发育畸形^[11]。孕母糖尿病引起的胎儿畸形最多见的就是心脏和神经管发育畸形^[12]。通过分析全基因组表达, 发现参与多个信号通路如细胞凋亡、增殖、迁

移和分化发展过程的基因存在异常表达^[13]。本研究通过对比特定基因在不同环境中 P19 细胞向心肌细胞分化过程中的表达量变化, 从分子生物学角度探讨孕母糖尿病与胚胎心脏畸形的关系。

GATA4 是 GATA 锌指转录因子家族的一员, 在心脏发育中有重要作用, 多项研究发现患者 GATA4 基因有不同类型的突变, 显示出其突变与人类 CHD 的发病机制有着重要的关联^[14]。研究它的表达可以反映心肌细胞发育情况^[15]。而 cTnT 是心肌特异标志物, 通过检测其表达水平可以了解 P19 细胞向心肌

细胞分化的程度。本研究的结果显示 GATA4 与 cTnT 在类糖尿病培养环境下的表达均小于同时时间段的正常对照组,这提示类糖尿病环境影响了 P19 细胞的正常分化,使其分化率减低。发生机制可能与高糖环境有关,异常的血糖水平增加氧化应激,破坏机体正常的氧化/还原的动态平衡,造成生物大分子的氧化损伤,干扰正常的生命活动^[16]。高血糖会引起三羧酸循环中电子供体生成增加,呼吸链功能抑制从而引起活性氧生成过多,进而诱导细胞凋亡。另外高糖环境增加了铜锌超氧化物歧化酶蛋白和凋亡基因 Bax/Bcl-2 比率,使机体抗氧化能力下降,也加重氧化应激的发生。P19 细胞在分化过程中受高糖环境的影响,降低了分化能力,其与细胞分化相关的基因表达也随之下降。

Zabihi 等^[15]的研究中证实糖尿病环境对卵黄囊有致畸性,造成大鼠卵黄囊形态学上的发育异常以及降低血管内皮细胞生长因子-A 蛋白的分布,而用叶酸干预可以部分纠正这些畸形的发生。这提示了孕母糖尿病对胎儿致畸作用的发病机制与过氧化应激造成的细胞过度凋亡有关。因而探讨抗氧化剂干预后是否可以纠正类糖尿病环境对 P19 细胞分化的不利影响是我们后续的研究方向。

综上所述,本研究证实了类糖尿病环境会对 P19 细胞向心肌细胞的分化产生负面影响,且造成心肌转录因子 GATA4 和心肌特异标志物 cTnT 的表达下降,从分子生物学角度探讨类糖尿病环境与心肌细胞分化之间的关系,为阐述糖尿病与 CHD 的发病机制提供了参考。

[参考文献]

[1] van der Bom T,Zomer AC,Zwinderman AH,et al. The changing epidemiology of congenital heart disease[J]. *Nat Review Cardio*,2011,8(1):50-60

[2] 张金平,王慧娟,史玉兰,等. Nkx2-5 基因诱导 P19 细胞分化中心肌标志物的表达[J]. *南方医科大学学报*,2010,30(12):2658-2662

[3] 汪 剑,卓莉莉,姜之文,等. Csx/Nkx2.5 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2008,28(5):605-608

[4] Garne E,Loane M,Dolk H,et al. Spectrum of congenital anomalies in pregnancies with pregestational diabetes[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*,2012,94(3):134-140

[5] Yang J,Ko SJ,Kim BS,et al. Enhanced cardiomyogenic differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells[J]. *Korean Circulation J*,2009,39(5):198-204

[6] Ryu S,Kohen R,Samuni A,et al. Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage[J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*,2007,79(8):604-611

[7] Cedergren MI,Selbing AJ,Källén BA,et al. Risk factors for cardiovascular malformation --a study based on prospectively collected data[J]. *Scand J Work Environ Health*,2002,28(1):12-17

[8] Poudel B,Bilbao D,Sarathchandra P,et al. Increased cardiogenesis in P19-GFP teratocarcinoma cells expressing the propeptide IGF-1Ea[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2011,416(3-4):293-299

[9] 王 俊,陈 斌,陈亦江,等. 5-氮胞苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2012,32(5):631-635

[10] Madan P,Buas M,Johnson J,et al. Maternal diabetes and cardiovascular malformations in The newborn;a population-based case-control study[J]. *J Am Coll Cardiol*,2013,61(10):e561-e561

[11] Corrigan N,Brazil DP,McAuliffe F, et al. Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*,2009,85(6):523-530

[12] Zhao Z. Endoplasmic reticulum stress in maternal diabetes-induced cardiac malformations during critical cardiogenesis period[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*,2012,95(1):1-6

[13] Vijaya M,Manikandan J,Parakalan R, et al. Differential gene expression profiles during embryonic heart development in diabetic mice pregnancy [J]. *Gene*,2013,516(2):218-227

[14] Hu DL,Chen FK,Liu YQ,et al. Gata-4 promotes the differentiation of P19 cells into cardiac myocytes[J]. *Int J Mol Med*,2010,26(3):365-372

[15] Zabihi S,Eriksson UJ,Wentzel P. Folic acid supplementation affects ros scavenging enzymes,enhances VEGF-a, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats[J]. *Reprod Toxicol*,2007,23(4):486-498

[16] Sarikabadi YU,Aydemir O,Aydemir C,et al. Umbilical cord oxidative stress in infants of diabetic mothers and its relation to maternal hyperglycemia[J]. *J Pediatr Endocrinol Metabol*,2011,24(9-10):671-674

[收稿日期] 2012-12-19