

FCCP对P19细胞向心肌细胞诱导分化的影响

金瑾¹,周丽娟¹,史春梅²,钱玲梅¹,盛燕辉^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心脏科,江苏南京210029;²南京医科大学附属南京妇幼保健院儿童保健科,江苏南京210004)

[摘要] 目的:探讨羰基-氰-对-三氟甲氧基苯肼(carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)对P19细胞向心肌细胞诱导分化的影响。方法:在P19细胞向心肌细胞诱导分化的过程中加入5 μmol/L的FCCP,同时设立阴性对照组,显微镜观察分化过程中不同时间点P19细胞形态的变化,并采用real-time PCR和蛋白质印迹法分别检测GATA4、NKX2.5及cTnT在分化过程中的mRNA和蛋白表达水平。结果:FCCP处理组P19细胞形成的胚胎样小体较对照组体积小,结构较松散,形态不均一。在整个分化过程中,FCCP处理组GATA4、NKX2.5及cTnT基因均有表达,但整个动态表达过程较对照组延迟;Western blot结果显示,FCCP处理组GATA4、NKX2.5蛋白在第5、7、9天的表达量均较对照组低;在第11天,两组间GATA4蛋白的表达量差异无统计学意义;而NKX2.5在FCCP处理组的表达量仍低于对照组。FCCP处理组和对照组cTnT蛋白在分化第5、7天的表达量差异无统计学意义,而在第9、11天cTnT蛋白表达量FCCP组均较对照组低。结论:FCCP可抑制P19细胞向心肌细胞诱导分化的进程。

[关键词] 心肌细胞;P19细胞;FCCP;分化;线粒体

[中图分类号] R361

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1647-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131201

Effect of FCCP on differentiation of P19 cell to cardiomyocytes

Jin Jin¹, Zhou Lijuan¹, Shi Chunmei², Qian Lingmei¹, Sheng Yanhui^{1*}

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Pediatrics, Nanjing Maternity and Child Health Hospital of NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of FCCP on differentiation of P19 cells to cardiomyocytes. **Methods:** P19 cells were treated with 5 μmol/L FCCP and untreated cells were used as controls, the morphologic changes of P19 cells at indicated time during the differentiation were observed and photographed under an inverted microscope. The expressions of GATA4, NKX2.5 and cTnT were detected using Real-time PCR and Western blot in the differentiated process. **Results:** Compared to the control group, the embryoid bodies formed in the FCCP treated group were smaller and were loosely structured. The expressions of GATA4, NKX2.5 and cTnT were observed in the two groups, while FCCP treated cells present with a slower dynamic changes during the differentiation. Western blotting results showed that the protein expressions of GATA4, NKX2.5 in the FCCP treated group on day 5, 7 and 9 were lower than that of the control group, respectively. For the expression of GATA4 protein on day 11, there was no significant difference between the two groups, while the expression of NKX2.5 protein in the FCCP treated group was lower compared with the control group. The protein expressions of cTnT on day 5, 7 showed no significant difference within the two groups, and with further differentiation, the expression of cTnT protein in the FCCP treated group increased but was still lower than the control group on day 9, 11, respectively. **Conclusion:** FCCP inhibited the differentiation of P19 cells to cardiac myocytes.

[Key words] cardiomyocytes; P19 cell; FCCP; differentiation; mitochondria

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1647-1651]

[基金项目] 国家自然科学基金(81070138);江苏省自然科学基金(BK2010582);江苏省人才基金(WSN-020);江苏省六大人才高峰计划(2009029)

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

脊椎动物的心脏是胚胎发育过程中最早形成并行使功能的器官,它的发生需经过一系列重要的形态发生事件,包括细胞决定、细胞迁移和细胞分化等,这些过程的正常进行才能保证胚胎心脏的协调发育,稍有异常都有可能影响心脏的发育导致先天性心脏病的发生^[1]。尽管从基因和分子水平研究胚胎心脏形成及发育机制为先心病的防治提供了一些有用的线索^[1-2],但是这远远不能满足人们对于阐述关于调控心脏正常发育的复杂机制的需要。在哺乳动物所有类型细胞中心肌细胞拥有最大的线粒体密度,线粒体功能的轻微变化就可引起心肌细胞的巨大变化^[3],因此,近年来人们越来越多地从线粒体水平来研究心脏的形成及发育机制^[4-6]。

已知羰基-氰-对-三氟甲氧基本胺(carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)是线粒体氧化磷酸化解偶联剂^[7],可破坏线粒体内膜,使线粒体膜去极化,形成质子漏,从而导致氧耗增加而不影响细胞磷酸化,使ATP生成显著减少^[7-8]。因此,本研究拟以线粒体解偶联剂FCCP为工具药,通过作用于P19细胞(中胚层来源的细胞株,可定向分化为具有搏动能力的心肌细胞)^[9],探讨FCCP对P19细胞来源的心肌细胞分化过程的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

P19细胞(美国菌种保藏中心, ATCC); α -MEM培养基、胎牛血清(FBS, Wisent公司, 加拿大);FC-CP、DMSO(Sigma公司, 美国);TRIzol试剂(Invitrogen公司, 美国);逆转录试剂盒(Roche公司, 美国);PCR引物由上海英骏公司合成;蛋白抽提试剂盒(Pierce公司, 美国);GATA4、NKX2.5抗体(Santa Cruz公司, 美国);cTnT抗体(Abcam公司, 美国);Tubulin抗体(Affinity公司, 美国);辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 P19细胞向心肌细胞诱导分化和FCCP处理

采用10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的 α -MEM培养液,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养P19细胞株。分化过程(以分化前为第0天,开始诱导为第1天,以后以此类推):取对数生长期的P19细胞,消化后以 1×10^6 个/ml的密度接种于10 cm的细菌培养皿中(对照组和FCCP组各选用6个皿进行重复试验),悬浮培养进行诱导分化(含有1% DMSO完全培养基)。在第3天用新鲜的分化培

养液置换出培养皿中等量的培养液,第4天吸取胚胎样小体30~40个接种于6 cm组织培养皿中,使其贴壁生长(完全培养基中不含1% DMSO)。每2 d换完全培养液1次。FCCP处理组细胞在第0天加入DMSO溶解的5 μ mol/L的FCCP,直至整个分化过程完成,同时设等量DMSO干预的细胞为对照组,并通过倒置显微镜观察两组细胞在整个分化过程中的形态学变化。

1.2.2 GATA4、NKX2.5及cTnT基因实时荧光定量RT-PCR检测

用TRIzol法提取细胞总RNA,测定D(260 nm)/D(280 nm)为1.8~2.0, RNA定量后取1 μ g逆转录为cDNA,用实时荧光定量RT-PCR法(ABI 7500型PCR仪)检测不同时间点细胞中GATA4、NKX2.5及cTnT的表达水平。GATA4基因上游引物序列:5'-ACGGAAGCCCAAGAACCTG-3';下游引物序列:5'-GCTGCTGTGCCCATAGTGAG-3';NKX2.5基因上游引物序列:5'-GACAGCGGCAGGACCAGACT-3';下游引物序列:5'-GCCATAGGCATTGAGACCCAC-3';cTnT基因上游引物序列:5'-GAAGGAAAGGCA-GAACCG-3';下游引物序列:5'-ACCCTCCAAAGTG-CATCA-3'。荧光定量PCR反应体系25 μ l, PCR扩增反应条件:50 $^{\circ}$ C 2 min、95 $^{\circ}$ C 10 min后,以95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 1 min循环40次。

1.2.3 蛋白印迹法(Western blot)测定GATA4、NKX2.5、cTnT蛋白表达水平

用RIPA细胞裂解液裂解细胞后,提取细胞总蛋白并用BCA法测定蛋白质含量,取50 μ g蛋白质样品经电泳分离、转膜、5%脱脂奶粉封闭后,依次加入兔抗鼠GATA4、NKX2.5、cTnT一抗4 $^{\circ}$ C过夜,羊抗兔二抗室温反应1 h, ECL发光显影。

1.3 统计学方法

应用SPSS16.0统计软件,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 P19细胞向心肌细胞分化的形态变化

P19细胞复苏后2~3 h开始贴壁,贴壁后细胞呈多角不规则形生长,细胞生长良好,能在1~2 d铺满瓶底。经1% DMSO诱导分化后,第3天就可观察到细胞聚集成胚胎样小体,第4天将胚胎样小体移入培养皿继续培养,可见小体边缘细胞逐渐爬出形

成生长晕。对照组细胞第 3 天观察,胚胎样小体近似球形,大小趋于一致,边缘光滑;而 FCCP 处理组细胞形成的胚胎样小体体积小,形态不规则,边缘不光滑。第 7 天,对照组胚胎样小体生长晕中的细胞生长迅速,生长晕扩大较快;FCCP 处理组胚胎样小

体边缘细胞生长较慢,生长晕扩大不明显。第 11 天,对照组胚胎样小体生长晕中细胞连接紧密,并有自发节律收缩的心肌细胞簇,跳动频率不等;FCCP 组胚胎样小体生长晕中细胞相对较少,跳动的心肌细胞簇很少(图 1)。

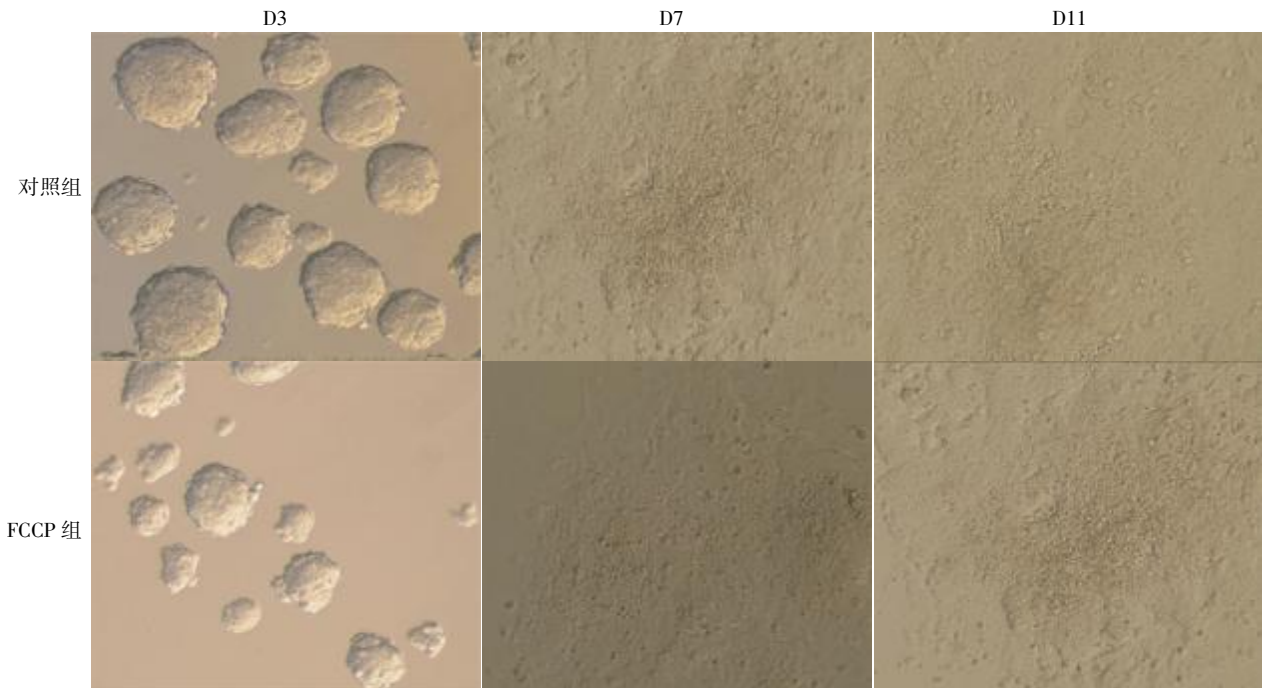


图 1 P19 细胞向心肌细胞分化的形态变化($\times 100$)

Figure 1 The morphology of P19 cells during differentiation($\times 100$)

2.2 P19 细胞诱导分化过程中 GATA4、NKX2.5 及 cTnT mRNA 表达水平的变化

GATA4 基因 mRNA 在对照组和 FCCP 组均有表达,在分化第 5、7、9 天 FCCP 处理组的表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。分化第 11 天,GATA4 基因 mRNA 表达量在两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。NKX2.5 基因 mRNA 在对照组和 FCCP 组均有表达,分化第 9 天 NKX2.5 基因 mRNA 表达量在两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$),而在分化第 5、7、11 天,FCCP 处理组的表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。cTnT 基因 mRNA 在对照组和 FCCP 组均有表达,在分化第 0、5、7 天,cTnT 基因 mRNA 表达量在两组间的差异无统计学意义($P > 0.05$),而在分化第 9、11 天,FCCP 处理组的表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.3 P19 细胞诱导分化过程中 GATA4、NKX2.5 及 cTnT 蛋白表达水平的变化

Western blot 检测结果显示分化第 5、7、9、11 天

GATA4、NKX2.5 蛋白均有表达;其中在第 5、7、9 天,GATA4 蛋白在 FCCP 组表达量均较对照组低,而在第 11 天 GATA4 蛋白在两组之间的表达无明显差异;分化第 5、7、9、11 天,NKX2.5 蛋白在 FCCP 组的表达量显著低于对照组细胞;分化第 5、7 天,cTnT 蛋白的表达量在 FCCP 组和对照组之间无明显差异,而分化第 9、11 天,FCCP 组的 cTnT 蛋白的表达量明显低于对照组细胞(图 3,表 1)。

3 讨论

先天性心脏病(congenital heart disease,CHD),简称先心病,不仅是目前最常见的出生缺陷,而且也是一直是引起婴幼儿死亡的首要原因^[1,7],其病因尚未完全阐明,因此先心病的各种发病机制成为了人们的研究热点。P19 细胞是从 C3H/He 雄性小鼠畸胎瘤^[10]中分离得到的一种能在体外培养的多功能干细胞,在 1%的 DMSO 诱导下,能分化为心肌细胞,因此该细胞已被广泛应用于研究心肌细胞的发生、发育。本研究采用 P19 细胞在 1%的 DMSO 诱导下分

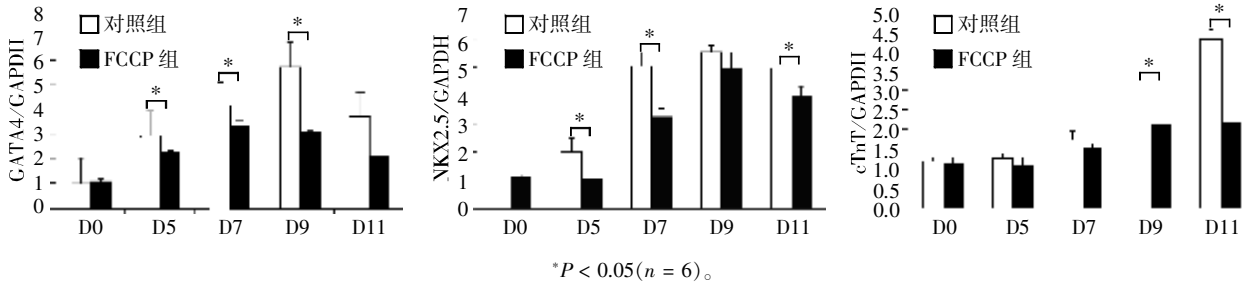


图2 对照组与 FCCP 组 P19 细胞在诱导分化过程中 GATA4、NKX2.5 和 cTnT mRNA 的表达变化

Figure 2 The expression levels of GATA4, NKX2.5, cTnT mRNA in control group and FCCP treated group during the differentiation

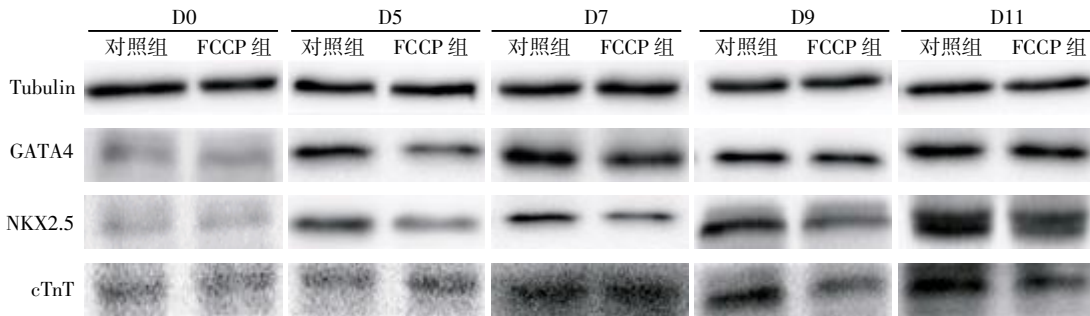


图3 对照组和 FCCP 组细胞 GATA4、NKX2.5 和 cTnT 蛋白在不同时间的表达情况

Figure 3 The protein expression of GATA4, NKX2.5 and cTnT in the control group and FCCP treated group at different time

表1 对照组和 FCCP 组细胞 GATA4、NKX2.5 和 cTnT 蛋白在不同时间的表达情况

Table 1 The IOD values of protein expression of GATA4, NKX2.5 and cTnT in the control group and FCCP treated group at different time (x ± s)

| 诱导时间 | GATA4 | | NKX2.5 | | cTnT | |
|------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | 对照组 | FCCP 组 | 对照组 | FCCP 组 | 对照组 | FCCP 组 |
| D0 | 0.21 ± 0.01 | 0.22 ± 0.03 | 0.27 ± 0.03 | 0.25 ± 0.02 | 0.42 ± 0.07 | 0.43 ± 0.05 |
| D5 | 0.59 ± 0.02 | 0.42 ± 0.01* | 0.44 ± 0.03 | 0.26 ± 0.04* | 0.44 ± 0.06 | 0.45 ± 0.06 |
| D7 | 0.70 ± 0.06 | 0.59 ± 0.04* | 0.54 ± 0.04 | 0.33 ± 0.03* | 0.50 ± 0.04 | 0.47 ± 0.02 |
| D9 | 0.93 ± 0.03 | 0.77 ± 0.04* | 0.76 ± 0.02 | 0.45 ± 0.05* | 0.58 ± 0.02 | 0.38 ± 0.03* |
| D11 | 1.01 ± 0.01 | 0.99 ± 0.08 | 0.97 ± 0.03 | 0.58 ± 0.02* | 0.77 ± 0.05 | 0.52 ± 0.03* |

与对照组比较, *P < 0.05。

化为心肌细胞这个经典模型来探讨线粒体解偶联剂 FCCP 对心肌分化进程的影响。考虑到很多关于 FCCP 的细胞水平的研究所用的浓度都在 2~10 μmol/L^[11-14], 且本研究前期实验过程中发现 FCCP 浓度 >5 μmol/L 时, 诱导过程中 P19 细胞不能形成胚胎样小体, 所以本小组最终选用 5 μmol/L 的浓度用于后续实验。

GATA4 是 GATA 锌指转录因子家族的一员, 该家族转录因子在进化过程中高度保守^[15], 是心脏早期发育的关键转录因子之一。研究表明, GATA4 基因表达障碍将导致心脏发生多种畸形^[16-17], 如原始心管形成障碍、房间隔缺损等。NKX2.5 是脊椎动物心脏发育过程中最早表达的转录因子, 它参与了心肌前体细胞的分化, 该基因表达异常也将导致严重

的先天性心脏疾病^[18]。而 cTnT 是心肌细胞特异性标志物, 通过检测其表达水平可以推测 P19 细胞向心肌细胞分化的程度。因此, 本研究通过检测 FCCP 处理组和正常对照组的 GATA4、NKX2.5 及 cTnT mRNA 和蛋白水平的表达变化来说明 FCCP 是否能够影响 P19 细胞向心肌细胞分化的进程。显微镜观察显示 FCCP 影响 P19 细胞向心肌细胞分化过程中胚胎样小体的形成, 且无论是从 GATA4、NKX2.5 及 cTnT mRNA 或其蛋白表达水平来看, FCCP 可在一定程度上阻止 P19 细胞向心肌细胞分化的进程, 提示 FCCP 可能通过引起线粒体功能障碍从而导致 P19 细胞向心肌细胞分化进程的延缓; 在此过程中本研究结果显示, 于分化的第 9 天 NKX2.5 mRNA 表达 FCCP 组与对照组无显著差异, 但在分化的第

11 天两组之间又出现了差异,鉴于此种现象,我们推测在 DMSO 的作用下,FCCP 组细胞能够向心肌细胞诱导分化,但是 FCCP 在一定程度上抑制了此基因的转录水平,使 NKX2.5 的转录只能持续较短的时间。此外,在分化第 9 天,两组细胞 NKX2.5 蛋白表达量差异有统计学意义,这也许与 FCCP 抑制了 NKX2.5 蛋白的表达或加速了该蛋白的降解有关,但是其具体机制仍然需要进一步研究。当然,先天性心脏病的发生是一个极其复杂的病理生理过程,本研究只在一定程度上说明线粒体功能障碍可以影响 P19 细胞向心肌细胞分化的进程从而模拟先天性心脏病的发生,至于线粒体功能障碍如何引起先天性心脏病的发生、发展还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bajolle F,Zaffran S,Bonnet D. Genetics and embryological mechanisms of congenital heart diseases [J]. Arch Cardiovasc Dis,2009,102(1):59-63
- [2] Nemer M. Genetic insights into normal and abnormal heart development [J]. Cardiovasc Pathol,2008,17(1):48-54
- [3] De Santis ML,Hammamieh R,Das R,et al. Adipocyte-fatty acid binding protein induces apoptosis in DU145 prostate cancer cells[J]. J Exp Ther Oncol,2004,4(2):91-100
- [4] St JJ,Ramalho-Santos J,Gray HL,et al. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells[J]. Cloning Stem Cells,2005,7(3):141-153
- [5] Karamanlidis G,Bautista-Hernandez V,Fynn-Thompson F, et al. Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease[J]. Circ Heart Fail,2011,4(6):707-713
- [6] Lloyd RE,McGeehan JE. Structural analysis of mitochondrial mutations reveals a role for bigenomic protein interactions in human disease [J]. PLoS One,2013,8(7):e69003
- [7] Linsinger G,Wilhelm S,Wagner H,et al. Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal [J]. Mol Cell Biol,1999,19(5):3299-3311
- [8] Monteiro JP,Martins AF,Lucio M,et al. Interaction of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) with lipid membrane systems:A biophysical approach with relevance to mitochondrial uncoupling [J]. J Bioenerg Biomembr,2011,43(3):287-298
- [9] van der Heyden MA,Defize LH. 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
- [10] McBurney MW,Jones-Villeneuve EM,Edwards MK,et al. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line [J]. Nature,1982,299(5879):165-167
- [11] Aronis A,Komarnitsky R,Shilo S,et al. Membrane depolarization of isolated rat liver mitochondria attenuates permeability transition pore opening and oxidant production[J]. Antioxid Redox Signal,2002,4(4):647-654
- [12] Caputo C,Bolanos P. Effect of mitochondria poisoning by FCCP on Ca²⁺ signaling in mouse skeletal muscle fibers [J]. Pflugers Arch,2008,455(4):733-743
- [13] Leyssens A,Nowicky AV,Patterson L,et al. The relationship between mitochondrial state,ATP hydrolysis,[Mg²⁺]_i and [Ca²⁺]_i studied in isolated rat cardiomyocytes [J]. J Physiol,1996,496 (Pt1):111-128
- [14] Serafim TL,Matos JA,Sardao VA,et al. Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells--nuclear vs. mitochondrial effects [J]. Biochem Pharmacol,2008,76(11):1459-1475
- [15] Arceci RJ,King AA,Simon MC,et al. Mouse GATA-4:A retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart[J]. Mol Cell Biol,1993,13(4):2235-2246
- [16] Bisping E,Ikeda S,Kong SW,et al. Gata4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103(39):14471-14476
- [17] Posch MG,Perrot A,Schmitt K,et al. Mutations in GATA4,NKX2.5,CRELD1,and BMP4 are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects [J]. Am J Med Genet,2008,146A(2):251-253
- [18] Bartlett HL,Sutherland L,Kolker SJ,et al. Transient early embryonic expression of Nkx2-5 mutations linked to congenital heart defects in human causes heart defects in *Xenopus laevis*[J]. Dev Dyn,2007,236(9):2475-2484

[收稿日期] 2013-06-07