

研究报告

hhlim 促进 DMSO 诱导的 P19 细胞向心肌分化*

郑 斌¹⁾ 温进坤¹⁾** 韩 梅¹⁾ 周爱儒²⁾

¹⁾ 河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017;

²⁾ 北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 为了确定 hhlim 是否参与胚胎期的心肌分化和发育过程, 用可表达 hhlim 蛋白和 hhlim 反义 RNA 的真核表达质粒转染 P19 胚胎干细胞, 经 G418 筛选得到稳定表达 hhlim 和 hhlim 反义 RNA 的 P19 细胞克隆后, 观察 hhlim 对 P19 细胞向心肌分化和发育的影响。结果显示, Nkx2.5 和 GATA-4 在未被外源性 hhlim 基因转染的 P19 细胞中不表达。DMSO 刺激细胞 2 天后, GATA-4 开始表达, 3 天后 Nkx2.5 的表达活性显著升高。hhlim 的过表达不但有利于 P19 细胞的存活和生长, 而且还可以使 Nkx2.5 和 GATA-4 的表达比对照细胞提前 1 天。反义 hhlim 细胞株被 DMSO 诱导 5 天后, 细胞仍呈集落化生长。同时, Nkx2.5 和 GATA-4 开始表达的时间明显延滞。结果表明, hhlim 能促进 P19 细胞向心肌细胞分化, 其作用是通过促进转录因子 GATA-4 和 Nkx2.5 的表达而实现的。

关键词 hhlim 基因, 心肌细胞, 转录因子, P19 细胞, 分化

学科分类号 Q78

在胚胎发生过程中, 高等脊椎动物的心脏是由胚胎干细胞较早分化形成的一个器官。心脏的发育是一个极其复杂的过程, 它涉及若干个基因在不同时间、不同空间的先后表达及心肌细胞的分化形成过程。目前已知, 调控心脏发育相关基因表达的转录因子有 Nkx, GATA 和 LIM 家族成员^[1]。LIM 蛋白是一类富含半胱氨酸且分子结构中具有一个或多个锌指结构的蛋白质家族, 该家族成员广泛参与多种细胞的发育与分化调节及多种基因的转录调控^[2,3]。hhlim 最初是从胎儿心脏中分离和克隆的与心脏发生相关的基因, 该基因仅在心脏高表达且参与心肌肥厚的发生发展过程^[4,5]。为了进一步确定 hhlim 是否参与胚胎期的心肌分化和发育过程, 本文构建可表达 hhlim 蛋白和 hhlim 反义 RNA 的真核表达质粒, 将其转染 P19 胚胎干细胞, 经 G418 筛选得到稳定表达 hhlim (hhlim 过表达细胞株) 和 hhlim 反义 RNA (反义 hhlim 细胞株) 的 P19 细胞克隆后, 在细胞和分子水平上观察 hhlim 对 P19 细胞向心肌分化和发育的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

含全长 hhlim cDNA 的 pcD2-hhlim 表达质粒为北京大学医学部陈光慧教授馈赠, 表达 hhlim 反义 RNA 质粒 (pEGFP-hhlim) 的构建参见文献 [6], P19 细胞 (ATCC, CRL-1825) 购自中国协和医科大学细胞中心。

1.2 细胞培养和转染

P19 细胞在含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中进行培养, 每 2 天亚克隆一次。待细胞生长至 80% 密度时, 用脂质体介导法分别转染 pcD2-hhlim 和 pEGFP-hhlim, 经 200 mg/L G418 (Sigma 公司) 对细胞进行筛选后, 用有限稀释法获得稳定表达 hhlim 蛋白或其反义 RNA 的细胞克隆。用 0.8% DMSO 对 hhlim 过表达细胞株、反义 hhlim 的细胞株和对照细胞诱导不同时间后, 常规固定细胞, HE 染色, 光镜观察。

1.3 细胞免疫荧光染色

将上述筛选得到的 hhlim 过表达细胞株及反义 hhlim 细胞株接种于玻片, 用 0.8% DMSO 诱导不同时间后, 4% 多聚甲醛固定, 1% Triton X-100-TBS 4℃ 处理过夜, 封闭后依次加入兔抗鼠 hhlim 一抗和荧光标记的羊抗兔二抗, 室温反应 2 h, 甘油封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.4 RNA 提取和 RT-PCR

用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法分别从 DMSO 诱导不同时间的各组细胞中提取 RNA, 按照 Taqman Gold RT-PCR 试剂盒说明进行反转录后, 用按

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000056905), 国家自然科学基金资助项目 (30300132) 和河北省自然科学基金资助项目 (2004000644)。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 0311-6265563

E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

收稿日期: 2003-12-15, 接受日期: 2003-12-29

hhlim cDNA 序列设计的引物（上、下游引物分别为：5' GCTGTCTCAGCACAGACA 3'和 5' CACAGATGGCACAGCGGA 3'）、GATA-4 cDNA 引物（上、下游引物序列分别为：5' TCATTAAGCCTCAGCGCCGCCT 3'和 5' CTCACCCTCGGCATTACGAC 3'）和 Nkx2.5 cDNA 引物（上、下游引物序列分别为：5' ACCTGTCTGATCTGTCCTCT 3' 和 5' TGCCTTCTGGGTTGTCTGCC 3'）进行 PCR. 每组实验平行做三管，用 GeneAmp 5700 SDS 软件进行数据分析.

1.5 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. 用改良酚法测定蛋白质含量后，取 50 μg 蛋白质样品经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜和脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜后，依次加入兔抗鼠 hhlim 一抗和羊抗兔二抗室温反应 2 h，四氯-1-萘酚显色.

1.6 hhlim 在胚胎发育过程中的表达变化

取孕龄不同天数小鼠胚胎常规固定脱水，包埋，切片后，按试剂盒说明书进行免疫组化染色，光镜下对 hhlim 在体内的分布进行时空定位.

2 结 果

2.1 hhlim 基因在 P19 细胞向心肌分化过程中的表达变化

P19 细胞是一种较为理想的用于研究细胞分化和发育的工具细胞，不同的刺激因素或相同因素作用不同时间可诱导 P19 细胞分化为不同的细胞. 如图 1 所示，用 DMSO 诱导 P19 细胞 7 天后，可检测到心肌特异性 α-actin 的表达，说明 DMSO 诱导可使其分化为心肌细胞（图 1a）.

RT-PCR 结果显示，心肌分化相关转录因子 Nkx2.5 和 GATA-4 在未被 DMSO 处理的 P19 细胞中不表达，0.8% DMSO 诱导 2 天后，GATA-4 开始表达，3 天后 Nkx2.5 的表达被显著诱导. 在对照细胞中，hhlim 具有很低的表达活性，DMSO 诱导 4 天后，其表达显著升高（图 2）. 对 hhlim 进行蛋白质印迹分析的结果与其 mRNA 表达情况相一致（图 1b）. hhlim 的表达在视黄酸诱导 P19 细胞向神经细胞分化过程中不发生明显变化（结果未显示），由此提示 hhlim 可能参与心肌发育和分化的过程.

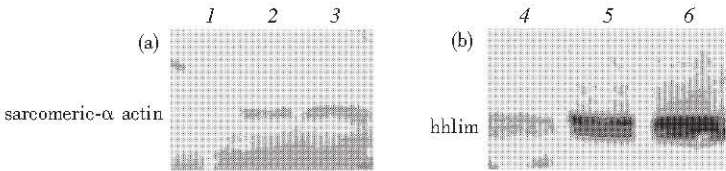


Fig. 1 Expression of sarcomeric-α actin and hhlim protein during P19 cell differentiation into cardiomyocytes
1: 0 d; 2: 7 d; 3: 8 d; 4: 1 d; 5: 5 d; 6: 7 d.

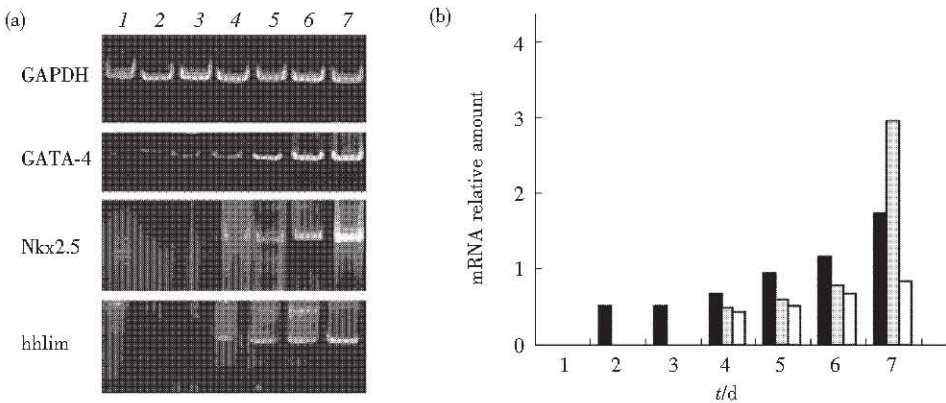


Fig. 2 Expression of cardiac marker genes during P19 cell differentiation into cardiomyocytes
(a) RT-PCR product. 1: 1 d; 2: 2 d; 3: 3 d; 4: 4 d; 5: 5 d; 6: 6 d; 7: 7 d. (b) densitometric scanning.
■: GATA-4; ▒: Nkx2.5; □: hhlim.

2.2 hhlim 过表达促进 P19 细胞向心肌分化

在不给予 DMSO 诱导的条件下, hhlim 过表达细胞株不能分化为具有心肌细胞形态和生化特性的细胞. 与对照细胞相比, hhlim 过表达细胞株经 DMSO 诱导后, 其细胞分化开始时间明显早于同等

浓度 DMSO 诱导的对照细胞 (图 3). 同时, 心肌分化相关转录因子 Nkx2. 5 和 GATA-4 的表达也较对照细胞 (图 2) 提前 1 天 (图 4). 这些结果说明, hhlim 可以明显加快 P19 细胞被 DMSO 诱导的向心肌细胞分化的进程.

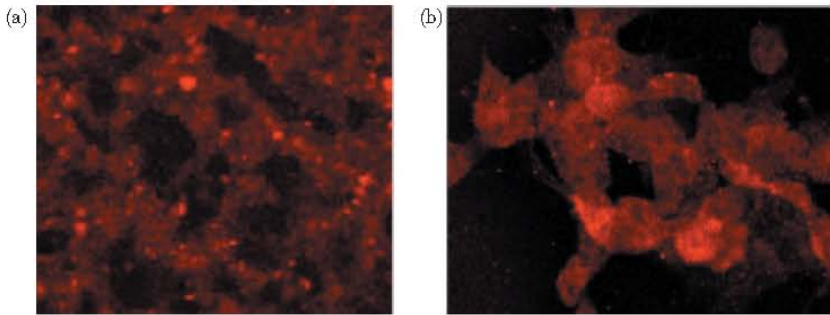


Fig. 3 Immunohistochemistry for detecting hhlim protein in P19 cell and P19-hhlim-overexpression cells (a) P19 cells at day 6 after DMSO treatment; (b) P19-hhlim-overexpression cells at day 6 after DMSO treatment.

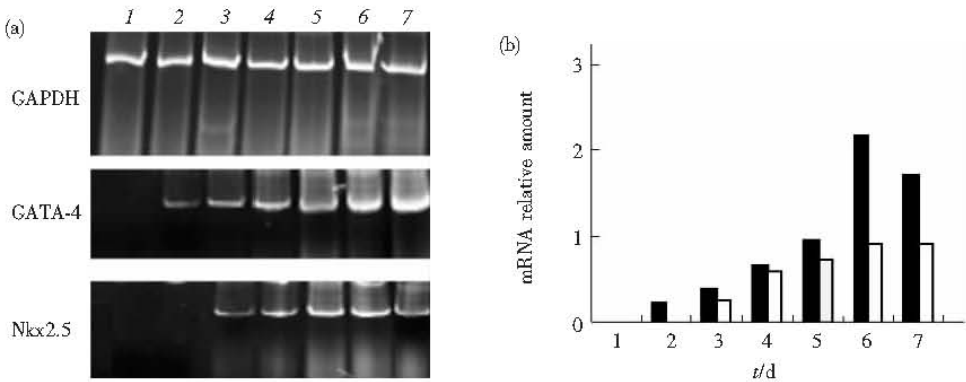


Fig. 4 P19 cell differentiation into cardiomyocytes induced by DMSO was stimulated by hhlim overexpression (a) RT-PCR product. 1: 1 d; 2: 2 d; 3: 3 d; 4: 4 d; 5: 5 d; 6: 6 d; 7: 7 d. (b) densitometric scanning. ■: GATA-4; □: Nkx2. 5.

2.3 抑制 hhlim 表达延缓 P19 细胞向心肌分化

对照细胞被 DMSO 诱导 5 天后, 细胞集落开始伸展, 并逐渐分化为心肌细胞. 反义 hhlim 细胞株

被 DMSO 诱导 5 天后, 细胞仍呈集落化生长, 并伴有细胞死亡现象 (图 5, 6). 与对照细胞 (图 2) 相比, 反义 hhlim 细胞株心肌分化相关转录因子

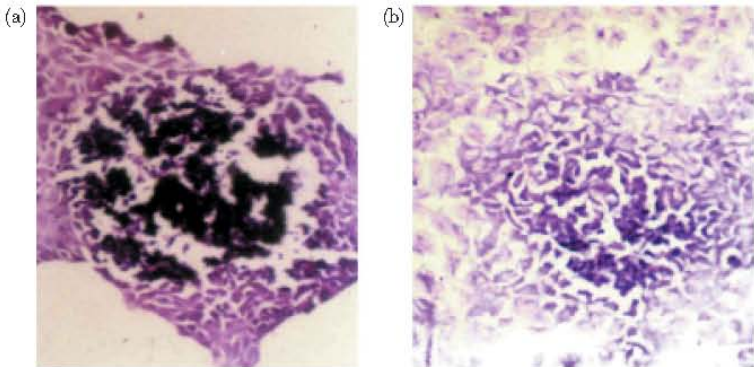


Fig. 5 Phase-contrast photomicrograph of cultures showing morphologies of P19 cells and P19-hhlim-deficient cells at day 5 after DMSO-induced differentiation HE staining. (a) P19-hhlim-deficient cells; (b) P19 cells.

Nkx2.5 和 GATA-4 开始表达的时间明显延滞 (图 7). 给予视黄酸诱导, 反义 hhlim 细胞株向神经细胞分化的进程不受影响 (结果未显示). 上述结果

说明, hhlim 只影响 P19 细胞向心肌细胞的分化, 对其向其他中胚层细胞的分化无明显影响.

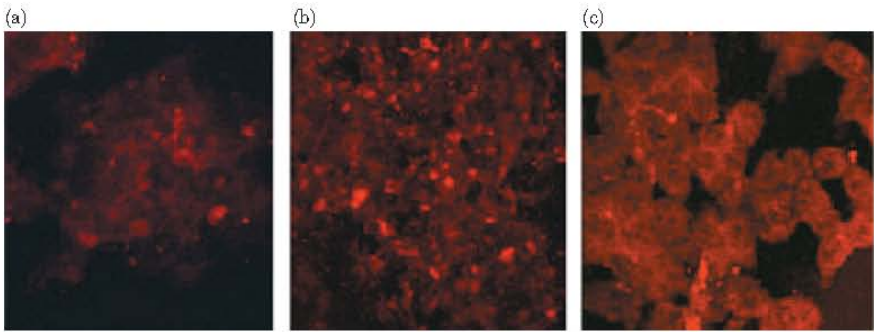


Fig. 6 Immunohistochemistry for detecting hhlim protein in P19 cells and P19-hhlim-deficient cells after DMSO-induced differentiation
(a) P19-hhlim-deficient cells at day 5 after DMSO treatment; (b) P19 cells at day 5 after DMSO treatment;
(c) P19 cells at day 7 after DMSO treatment.

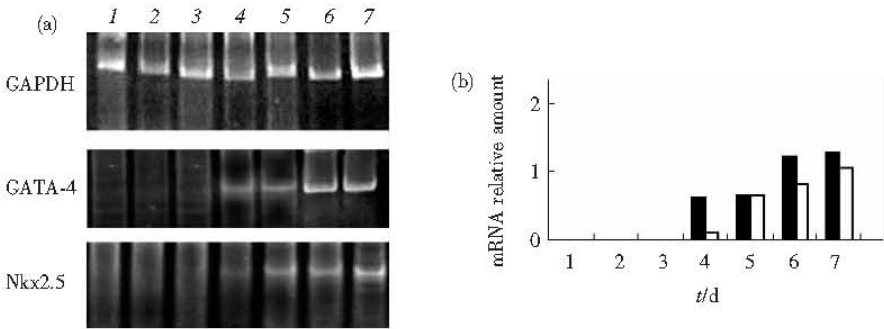


Fig. 7 P19 cell differentiation into cardiomyocytes induced by DMSO was inhibited by hhlim antisense RNA
(a) RT-PCR product. 1: 1 d; 2: 2 d; 3: 3 d; 4: 4 d; 5: 5 d; 6: 6 d; 7: 7 d. (b) densitometric scanning.
■: GATA-4; □: Nkx2.5.

2.4 hhlim 在胚胎发育中的时空定位变化

为了研究 hhlim 在 小鼠胚胎不同发育阶段的表达变化, 我们对胚胎第 7 天 (E7)、第 11 天

(E11) 和第 15 天 (E15) 胎鼠全胚胎进行免疫组化检测. 结果显示, 在 E7 时, hhlim 在各部分组织中均有表达, E15 时主要集中在中胚层 (图 8).

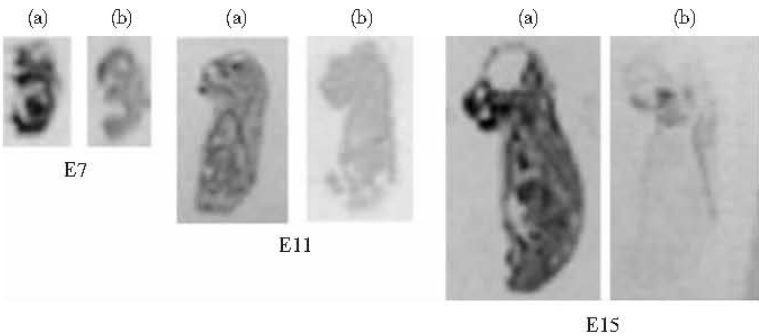


Fig. 8 Expression of hhlim in different time of embryo development
(a) HE staining; (b) Immunohistochemistry.

3 讨 论

心脏的形成是胚胎发育过程中的一个重要事件, 心肌细胞形成是心脏发育的重要组成部分. 但是, 目前对于调节心肌发育的分子机制知之甚少^[7]. 心肌与骨骼肌均起源于中胚层并表达一系列相同的基因, 但二者分化机制并不完全相同. 已经证明, 一些对骨骼肌分化起重要作用的调节因子, 如 MyoD、myogenin 对心肌分化毫无作用, 而一些心肌分化相关转录因子, 如 Nkx2.5 和 GATA-4 的表达也只与心肌发育相关^[8~11]. LIM 蛋白家族在各种细胞的分化和发育过程中发挥重要的作用. Lim1 调节垂体细胞和胰岛细胞的分化^[12]; CRP2/SmLIM 与血管平滑肌细胞的分化密切相关^[13]; MLP 作为肌分化的正调控因子参与骨骼肌和心肌的分化^[14]. hhlml 仅在心脏高表达, 除骨骼肌轻度表达外, 其他组织器官均无表达^[4]. 体外实验发现, hhlml 在心肌发育过程中的表达谱与心肌分化相关基因 Nkx2.5 和 GATA-4 非常相似, 推测其可能参与心肌分化和发育的调节过程.

P19 细胞是一种较为理想的用于研究细胞分化和发育的工具细胞, 不同的刺激因素或相同因素作用不同时间可诱导 P19 细胞分化为不同的细胞. 视黄酸可以诱导 P19 细胞分化为神经细胞, DMSO 诱导可使其分化为心肌细胞和骨骼肌细胞^[15]. 本文发现, 在常规培养的 P19 细胞中 hhlml 表达活性很低, DMSO 诱导 3 天后, hhlml 表达活性被显著诱导. hhlml 在 P19 细胞向心肌分化过程中的表达谱与已知的心肌分化相关基因 Nkx2.5 和 GATA-4 相一致, 在视黄酸诱导 P19 细胞向神经细胞分化过程中 hhlml 表达无明显变化, 由此可以推测, hhlml 参与心肌分化和发育的调节过程. 本文用可稳定表达 hhlml 的 P19 细胞克隆证实, hhlml 在 P19 细胞中的强制性表达可促进细胞的生长, 但不能使其分化为心肌细胞. 用 DMSO 对 hhlml 过表达细胞进行诱导后, 其集聚和分化及 Nkx2.5 和 GATA-4 开始表达的时间较未转染细胞显著提前, hhlml 反义 RNA 可使 Nkx2.5 和 GATA-4 开始表达的时间明显延滞, 细胞集落伸展及分化时间后延. 用视黄酸对这种细胞进行诱导不影响其分化进程, 抑制 hhlml 表达对 P19 细胞向神经细胞分化的进程不受影响. 这些结果说明, 虽然 hhlml 单独不能诱导 P19 细胞分化为心肌细胞, 但可以促进 P19 细胞的存活和生

长, 并明显加快 P19 细胞被 DMSO 诱导的向心肌分化的进程.

参 考 文 献

- 1 Molkenin J D. The zinc finger containing transcription factors GATA-4, -5 and -6 ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*, 2000, **275** (50): 38949 ~ 38952
- 2 Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 2000, **91** (1~2): 5 ~ 17
- 3 郑 斌, 温进坤, 韩 梅. LIM 蛋白家族的研究进展, 生理科学进展, 2002, **33** (4): 305 ~ 309
Zheng B, Wen J K, Han M. *Prog Physiol Sci*, 2002, **33** (4): 305 ~ 309
- 4 陈光慧, 周子振, 张继峰, 等. 应用三元递减法筛选特异性心脏生长相关基因. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (3): 295 ~ 300
Chen K H, Zhou Z Z, Zhang J F, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (3): 295 ~ 300
- 5 郑 斌, 温进坤, 韩 梅, 等. hhlml 基因表达产物的亚细胞定位及其在细胞肥大中的意义. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (1): 67 ~ 71
Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (1): 67 ~ 71
- 6 郑 斌, 温进坤, 韩 梅, 等. hhlml 对心肌肥大的影响及其作用机制探讨. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (3): 427 ~ 430
Zheng B, Wen J K, Han M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (3): 427 ~ 430
- 7 Sussman M A, Meculloch A, Borg T K. Dance band on the titanic biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 2002, **91** (10): 888 ~ 898
- 8 Jamali M, Rogerson P J, Wilton S, *et al.* Nkx2.5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem*, 2001, **276** (45): 42252 ~ 42258
- 9 Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Cell Dev Bio*, 1999, **10** (1): 85 ~ 91
- 10 Sepulveda J L, Vlahopoulos S, Iyer D, *et al.* Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (28): 25775 ~ 25782
- 11 Toko H, Zhu W, Takimoto E, *et al.* Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem*, 2002, **277** (27): 24735 ~ 24743
- 12 Ohashi K, Hosoya T, Takahashi K, *et al.* A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **276** (3): 1178 ~ 1185
- 13 Jain M K, Kashiki S, Hsieh C M, *et al.* Embryonic expression suggests an important role for CRP2/SmLIM in the developing cardiovascular system. *Circ Res*, 1998, **83** (10): 980 ~ 985
- 14 Zolk O, Caroni P, Bohm M. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. *Circulation*, 2000, **101** (23): 2674 ~ 2677
- 15 Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development*, 1997, **124** (12): 2387 ~ 2395

Overexpression of hhlm Enhances Cardiomyogenesis of Embryonic Stem Cells*

ZHENG Bin¹⁾, WEN Jin-Kun¹⁾ **, HAN Mei¹⁾, ZHOU Ai-Ru²⁾

(¹⁾ Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

²⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing University Health Science Center, Beijing 100083, China)

Abstract In order to determine the importance of hhlm in cardiomyocyte differentiation and to define the hierarchy of transcription factors during cardiac development, the cardiac differentiation profile of the pluripotent P19 cells was characterized at cellular and molecular level. Genes that express early in the cardiogenesis of the embryo include GATA-4 and Nkx2.5. The time course of expression of these genes during *in vitro* differentiation of P19 cells into cardiomyocytes was established using RT-PCR. GATA-4 is expressed at day 2 after treatment with DMSO, and Nkx2.5 at day 3. hhlm is almost undetected until day 4 after DMSO treatment. Western blot had the same results, which showed that hhlm might participate in the cardiac differentiation pathway. P19-hhlm-overexpressing cells did not show morphological or biochemical evidence of cardiomyogenesis without DMSO treatment, but overexpression of hhlm had a benefit effect on cell aggregates that were especially obvious in the absence of DMSO. Moreover, when hhlm-overexpressing cells were treated with DMSO, the expression of Nkx2.5 and GATA-4 appeared earlier compared with the control. hhlm-deficient P19 cells induced by DMSO retained the ability to differentiate into cardiomyocytes. The time course of expression of Nkx2.5 and GATA-4 in the hhlm-deficient clones was significantly reduced, whereas these clones treated by RA produced neuroectodermal derivatives. Then it was concluded that lack of hhlm expression specifically inhibits cardiomyocyte formation of P19 cells without affecting neuronal differentiation pathway. These data showed that overexpression of hhlm could enhance cardiogenesis of embryonic stem cells whose mechanism might be involved in upregulation of the expression of Nkx2.5 and GATA-4.

Key words hhlm gene, cardiomyocyte, transcription factor, P19 cells, differentiation

* This work was supported by The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000056905), The National Natural Science Foundation of China (30300132) and National Natural Science Foundation of Hebei Province (2004000644).

** Corresponding author. Tel: 86-311-6265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

Received: December 15, 2003 Accepted: December 29, 2003