

## 研究报告

# 抑制 NHE1 活性对干细胞向心肌分化的影响

雷蕾, 窦琳, 闫龙, 窦忠英, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

**摘要:**  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换蛋白 1(NHE1) 在心肌细胞发育过程中发挥重要的调节功能。为深入探索 NHE1 活性对干细胞向心肌分化过程中产生的影响, 采用二甲基亚砜(DMSO)诱导 P19 干细胞向心肌细胞分化, 同时在培养液中添加 NHE1 抑制剂 EMD87580, 对诱导后形成的类胚体进行检测。通过细胞形态观察、免疫组织化学染色及检测心肌特异表达基因等方法证明, 经诱导形成的类胚体贴壁生长后, 会向心肌细胞分化并出现跳动细胞团。而经过抑制剂处理的 P19 干细胞尽管能够形成类胚体且贴壁培养后细胞仍具有增殖活力, 细胞团周边也较整齐, 但未出现向心肌细胞分化的现象。这一结果表明, 抑制 NHE1 的活性, 能够影响 P19 干细胞向心肌细胞的分化作用。

**关键词:** P19 干细胞, 心肌细胞, EMD87580, NHE1, 二甲基亚砜

## Effect of NHE1 on Stem Cell Differentiation into Cardiomyocytes

Lei Lei, Lin Dou, Long Yan, Zhongying Dou, and Huayan Wang

College of Veterinary Medicine, Shanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

**Abstract:** Sodium/proton exchanger 1 (NHE1) plays an important role in the cardiomyocyte development. To study the effect of NHE1 activity in stem cells differentiation into cardiomyocytes, we treated P19 stem cells with dimethyl sulfoxide (DMSO) to initiate cardiomyocyte differentiation. In separate experiments, P19 cells were incubated with NHE1 specific inhibitor EMD87580 during the DMSO induction. The formed embryoid bodies (EBs) were detected with cell morphology detection, immunohistochemistry staining and RT-PCR analysis of expression of cardio-specific gene markers. Results showed that P19 cells were able to differentiate into cardiomyocytes and form the beating cell clusters. However, when cells treated with NHE1 inhibitor EMD87580, they could still form the EBs and proliferate when cell clusters adhered on the culture plate, but cells were unable to differentiate. This observation indicates that inhibition of NHE1 activity affected P19 stem cells differentiating into cardiomyocytes.

**Keywords:** P19 cell, cardiomyocyte, EMD87580, NHE1, dimethyl sulfoxide

由心血管障碍造成的心肌缺血会直接导致局部心肌细胞受损, 影响心脏正常功能。采用细胞移植疗法对受损心肌细胞进行修复, 是目前干细胞和再生医学研究的热点之一。采用肌肉祖细胞<sup>[1]</sup>、胎儿

心肌细胞<sup>[2]</sup>或骨髓间充质干细胞<sup>[3]</sup>进行细胞移植的研究已有报道, 但由于这类细胞向心肌细胞分化的潜能有限, 很难作为理想的移植细胞用于临床应用。胚胎干细胞具有多分化潜能并可以在体外进行

**Received:** March 24, 2008; **Accepted:** May 25, 2008

**Supported by:** Outstanding Talents Fund of Northwest A&F University (No. 01140405).

**Corresponding author:** Huayan Wang. Tel/Fax: +86-29-87080068; E-mail: hhwang101@163.com.

西北农林科技大学拔尖人才支持计划 (No. 01140405) 资助。

大量增殖和向心肌细胞诱导, 为临床细胞移植和研究提供种子细胞<sup>[4]</sup>。P19 细胞是从小鼠畸胎瘤中分离得到的具有多分化潜能的胚胎瘤干细胞系<sup>[5]</sup>, 可以形成向 3 个胚层分化的类胚体<sup>[6,7]</sup>, 在一定诱导条件下可特异性的向心肌细胞分化<sup>[8-11]</sup>。在 P19 细胞向心肌细胞分化过程中, 心肌细胞特异基因开始表达, 并出现心肌电生理学特征, 这些现象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及相关基因转录调控的理想体外细胞系统<sup>[12]</sup>。

$\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换蛋白(NHE)是维持细胞内 pH 值稳定所需的 1 种跨膜蛋白, 其功能是将细胞内的 1 个  $\text{H}^+$  离子外流置换细胞外 1 个  $\text{Na}^+$  离子内流, 通过这种交换保持细胞内 pH 值稳定。目前已发现 9 种 NHE 的同功蛋白<sup>[13]</sup>, 其中 NHE1 是唯一在哺乳动物心肌细胞膜上发现的 NHE 亚型<sup>[13-17]</sup>。NHE1 蛋白活性变化对心肌缺血所导致的心肌细胞酸中毒起着关键的调控作用<sup>[18]</sup>。心肌缺血时会导致肌细胞内 pH 值下降, 激活  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换蛋白将  $\text{H}^+$  离子外流, 同时使细胞内  $\text{Na}^+$  离子浓度升高, 这一过程又促进  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换, 最终导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  离子代谢紊乱, 使心肌细胞损伤。因此, 抑制 NHE1 蛋白的活性, 可以显著缓解心肌缺血/再灌注所引发的病理症状。

小分子化合物 EMD87580(2-methyl-4,5-di-(methylsulfonyl)-benzoyl-guanidine)是 NHE1 特异性抑制剂, 它能够有效抑制心肌细胞中 NHE1 的活性。在 P19 干细胞向心肌细胞诱导分化过程中, NHE1 基因的表达水平会发生变化。为深入了解 NHE1 蛋白在心肌细胞分化过程中所起的调控作用, 我们用抑制剂 EMD87580 阻断 P19 细胞中 NHE1 蛋白活性, 观察它对 P19 细胞向心肌分化过程中的影响, 进一步揭示 NHE1 蛋白的功能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

P19 细胞(ATCC, CRL-1825); DMEM 培养液(Gibco 公司产品); 新生牛血清(银香国际); 胰蛋白酶、青链霉素、乙二胺四乙酸(EDTA)钠、二甲基亚砜(DMSO)、EMD87580、鼠  $\alpha$ -actin 单克隆抗体(Sigma 公司产品); TRIzol(Invitroge 公司); dNTP(TaKaRa 公司); 反转录试剂盒(Fermentat 公司); DAB 显色试剂

盒、免疫组化试剂盒(北京中杉金桥); PCR Marker(博大泰克); PCR 引物由上海生工合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 P19 细胞培养

从液氮中取出冻存细胞, 立即投入 37°C 水浴中快速融化, 移入含有 5 mL DMEM 完全培养液(含 10%新生牛血清, 青霉素 100 u/mL, 链霉素 100 u/mL)的 60 mm 塑料皿中, 于 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 隔天换液。2 d 后用消化液(含 0.25%胰蛋白酶+0.04% EDTA)消化, 按 1:3 比例传代。

#### 1.2.2 类胚体形成和诱导分化

将 P19 细胞以  $10^5/\text{mL}$  的密度悬浮在诱导培养液(生长培养液+1% DMSO)中并接种于 Petri 塑料(细菌用)培养皿中, 于 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 隔天换液。诱导 4 d 后可形成大小、密度均一的类胚体。将类胚体接种于 35 mm 塑料(细胞用)培养皿中, 换普通生长培养液贴壁培养, 隔天换液, 倒置显微镜观察细胞分化过程中形态变化。

在进行抑制 NHE1 活性实验中, 诱导培养液和生长培养液中分别加入 10  $\mu\text{mol/L}$  EMD87580 抑制剂, 用同样的方法诱导类胚体形成以及分化, 在倒置显微镜下观察细胞分化过程中形态变化。

#### 1.2.3 免疫组织化学分析

为了检测实验中细胞是否开始向心肌细胞分化, 取诱导分化第 4、7、11 天的细胞以及未经诱导的细胞进行免疫组织化学染色。将培养液去掉, PBS 漂洗 1~2 次, 用 4%多聚甲醛在室温固定 30 min 后, PBS 漂洗 3 次, 每次持续 1 min。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温作用 5~10 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 每次持续 5 min。用 5%~10%的山羊血清室温孵育 10 min 后加入抗  $\alpha$ -actin 的多克隆抗体, 于 4°C 保温过夜。PBS 漂洗 3 次, 每次持续 5 min, 然后加入标有辣根过氧化物酶的兔抗鼠二抗, 室温孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 每次持续 5 min, 与辣根过氧化物酶底物溶液室温孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次持续 5 min。DAB 显色, 观察显色状况, 及时清洗终止。

#### 1.2.4 RT-PCR 检测

用 RT-PCR 方法测定 P19 细胞诱导分化过程中 mNHE1 等心肌特异表达基因表达的变化。分别于 0 d、3 d、5 d、8 d、11 d, 收集诱导处理后的细胞, 实验组细胞经抑制剂 EMD87580 处理后于 2 d 和 4 d 收取

细胞。用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 测定  $A_{260}/A_{280}$  比值, 计算总 RNA 含量, 取相同量的总 RNA 进行反转录反应, 分别用表中所列出的心肌细胞特异表达基因引物和干细胞多能性基因引物进行 PCR 反应。

PCR 扩增反应条件为: 94°C 预变性 2 min, 然后 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 循环 30 个 (GAPDH: 25 个循环), 72°C 终末延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

表 1 检测心肌细胞特异表达基因的引物  
Table 1 Primers for determining cardio-specific genes

Gene		Sequences of the primers (5'-3')	Length (bp)	GenBank accession No.
<i>Tbx5</i>	sence	GCCGATACAGATGAGGGCTTTGG	491	NM_011537
	anti-sence	CAGGTGGTTGTTGGTGAGTTTGAGC		
<i>mNHE1</i>	sence	CCCTCACGTGCGCACACCC	192	NM_016981
	anti-sence	GACGTCTGATTGCAGGAAGG		
<i>MEF2C</i>	sence	GAGGATAATGGATGAGCGTAA	418	NM_025282
	anti-sence	GGACACTGGGATGGTAACTGG		
<i>GATA-4</i>	sence	CGAGGGTGAGCCTGTATGTAA	404	NM_008092
	anti-sence	TGGCCTGCGATGTCTGAGTGA		
<i>GAPDH</i>	sence	ATCAACGGCACAGTCAAGG	668	NM_008084
	anti-sence	CAGTGTAGCCCAAGATGCCCT		

表 2 检测干细胞多能性基因的引物  
Table 2 Primers for pluripotent genes in stem cell

Gene		Sequences of the primers (5'-3')	Length (bp)	GenBank accession No.
<i>Nanog</i>	sence	TGGTGTCTTGCTCTTTCTGTGGG	624	NM_028016
	anti-sence	GCACTTCATCCTTTGGTTTTG		
<i>Sox2</i>	sence	ATGTATAACATGATGGAGACGGAG	659	NM_011443
	anti-sence	TTCATGTAGGTCTGCGAGCTG		
<i>Oct-4</i>	sence	TTCAGACTTCGCCTCCTCACCC	600	NM_013633
	anti-sence	TTGTCGGCTTCCTCCACCCACTT		
<i>Dppa-4</i>	sence	ATGGAGACTGCTGGAGACA	891	NM_028610
	anti-sence	TTATCCTTCGAGGCTCTTAGT		

## 2 结果

### 2.1 细胞培养与诱导分化

复苏后未分化的 P19 细胞大小均一、分散, 呈圆形。在 60 mm 细胞培养皿上接种  $3 \times 10^5$  细胞, 传代后 3~4 h 开始有细胞贴壁, 贴壁后细胞呈上皮样细胞生长, 经 24 h 培养可达到皿底 60% 左右 (图 1A), 48 h 后细胞生长密集。

为了使类胚体形成并定向分化为心肌细胞, 用含有 1% DMSO 培养液诱导 1 d, 细胞开始聚集在一起形成体积较小形状不规则的球体。诱导 4 d 后, 细胞聚集呈现致密的球形类胚体 (图 1B)。将类胚体接种到细胞培养皿上培养后呈贴壁生长, 类胚体中央细胞体积较小、增殖速度较快, 而类胚体周围细胞

向外延伸生长, 边缘开始分化, 逐渐形成生长晕。贴壁培养约 4 d 可见较大的杆状细胞或梭形细胞, 约 11 d 可见细胞平行排列, 细胞间彼此纵向相连 (图 1C, D)。

### 2.2 免疫组化分析

为了检测诱导分化细胞在不同时间段内对心肌细胞特异性抗原的表达, 进行了免疫组织化学染色。染色结果显示, 经 DMSO 诱导的 P19 细胞贴壁生长 4 d 后, 出现  $\alpha$ -actin 阳性细胞 (图 2A)。继续贴壁生长 7~11 d, 细胞仍表现  $\alpha$ -actin 阳性, 细胞单个或成群分布在生长晕周围, 形态呈星形或梭形纵向排列 (图 2B, C)。而未经 DMSO 诱导的 P19 细胞类胚体贴壁培养 11 d 后, 不表达  $\alpha$ -actin 蛋白, 说明未经诱导的细胞未向心肌细胞分化 (图 2D)。

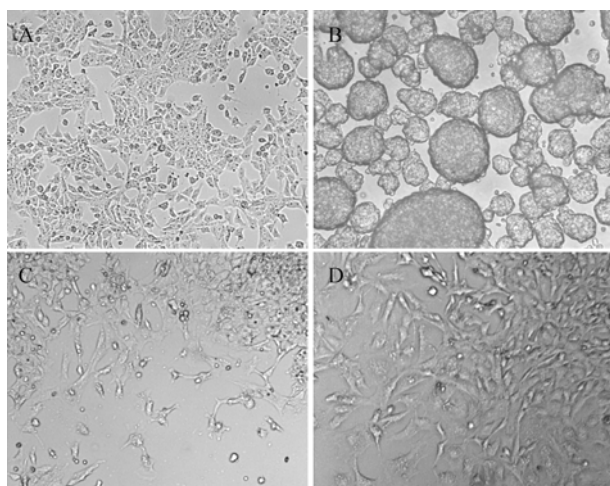


图 1 P19 细胞诱导分化(100×)

Fig. 1 Induction and differentiation of P19 cells

(A) normally cultured P19 cells; (B) embryoid body of P19 cells incubating with DMSO for 4 days in the suspension culture. After 2-day in suspension culture, the aggregates grow to dish surface for 4 days (C) and 11 days (D); (Magnification 100×)

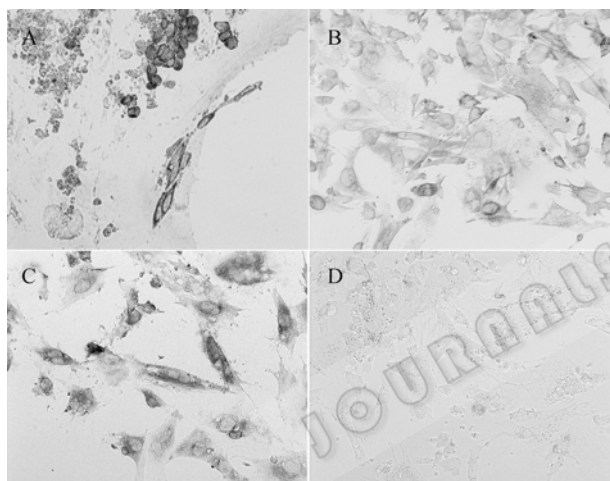


图 2 免疫组化检测 P19 细胞向心肌分化(200×)

Fig. 2  $\alpha$ -actin staining of induced P19 cells cultured for different days

After DMSO treatment, P19 cells were cultured for 4 days (A), 7 days (B), 11 days (C). The control P19 cells without DMSO treatment were cultured for 11 days (D); (Magnification 200×)

### 2.3 心肌细胞表面标记物分析

为了检测诱导后细胞向心肌分化过程中心肌细胞表面特异标记物的表达变化, 以及心肌细胞重要功能基因 *NHE1* 的表达变化, 收集了诱导分化后 3 d、5 d、8 d、11 d 的细胞, 并以未诱导的 P19 细胞作为阴性对照, 进行 RT-PCR 检测。实验结果显示, 分化的细胞表达与心肌细胞相关的转录因子 *GATA-4*、*MEF2C*、*Tbx5* 以及 *NHE1* 等基因。并且随着诱导分化时间的延长, 这些基因的表达量也逐渐增加(图 3)。

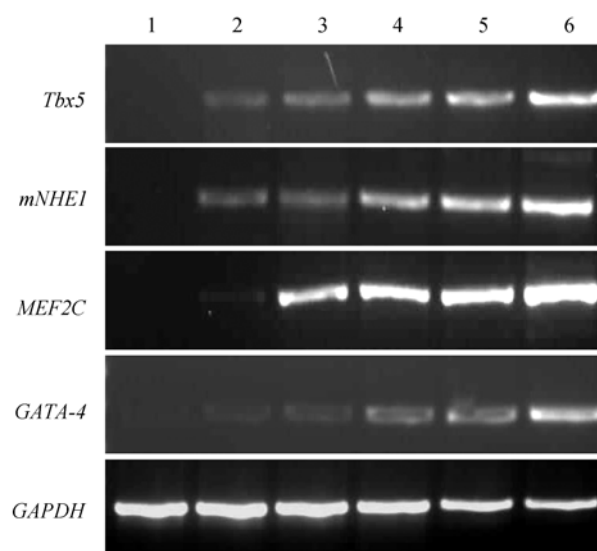


图 3 RT-PCR 检测不同分化时期心肌特异基因的表达

Fig. 3 RT-PCR analysis of cardio-specific genes expression

1: P19 cells as negative control; 2: induced and cultured for 3 days; 3: induced and cultured for 5 days; 4: induced and cultured for 8 days; 5: induced and cultured for 11 days; 6: positive control from the normal mouse heart tissue

### 2.4 EMD87580 抑制剂对 P19 细胞向心肌诱导分化的影响

经过 DMSO 处理 4 d 的类胚体贴壁生长 2 d 和 4 d 后, 可见边缘有细胞向外生长, 出现自发分化现象, 分化的细胞呈梭性或长条形(图 4A, B)。而经过 EMD87580 抑制剂处理过的细胞, 所形成的类胚体贴壁生长 2 d 和 4 d 后, 整个细胞团保持生长活力, 细胞团边缘整齐, 较少有细胞向外生长, 表明未出现分化现象(图 4C, D)。

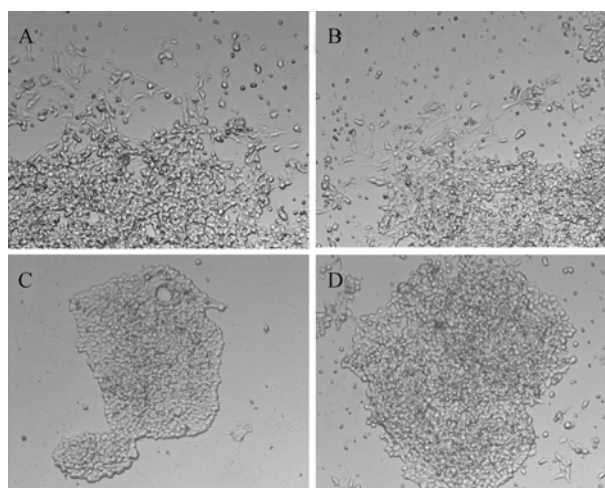


图 4 EMD87580 抑制 P19 细胞分化(100×)

Fig. 4 EMD87580 inhibiting P19 cells differentiation

After induction the aggregates attached and grew for 2 days (A) and 4 days (B), cells start to spontaneously differentiation; After inhibitor treatment the aggregates still can attach and grow 2 days (C) and 4 days (D), however, cells didn't show the differentiation; (Magnification 200×)

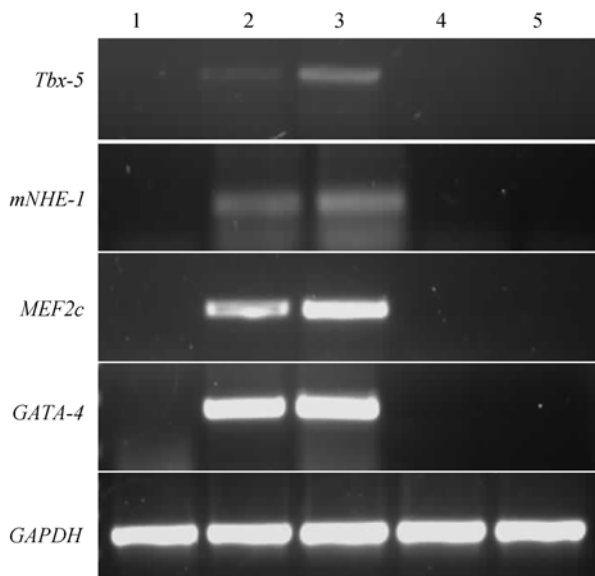


图5 RT-PCR检测 EMD87580 处理后 P19 细胞基因表达变化

Fig. 5 RT-PCR analysis of gene expression of P19 cells after EMD87580 treatments

1: P19 cell as negative control; 2: differentiation for 2 days; 3: differentiation for 4 days; 4: DMSO and EMD treated cells for 2 days; 5: DMSO and EMD treated cells for 4 days

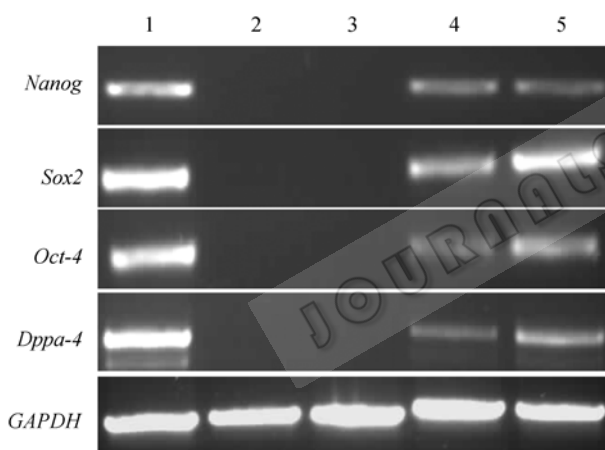


图6 EMD87580 抑制 P19 细胞诱导分化后干细胞多能性因子 RT-PCR 检测

1. 未经诱导 P19 细胞; 2. 诱导分化 2 天; 3. 诱导分化 4 天; 4. 加抑制剂后诱导分化 2 天; 5. 加抑制剂后诱导分化 4 天

Fig. 6 Pluripotency genes RT-PCR result of aggregates attach to dish surface after suspension culture with 1% DMSO induction and EMD87580 inhibitor

1. P19 cell as negative control; 2. DMSO treated P19 cells for 2 days; 3. DMSO treated P19 cells for 4 days; 4. DMSO and EMD treated P19 cells for 2 days; 5. DMSO and EMD treated P19 cells for 4 days

为了检测 EMD87580 对诱导后细胞向心肌分化的影响,收集了诱导后 2 d 和 4 d 的细胞。以未诱导的 P19 细胞为阴性对照, DMSO 诱导的细胞为实验组对照,与经 DMSO 和 EMD87580 双重处理的细胞进

行 RT-PCR 检测。实验结果显示, DMSO 诱导的实验组细胞表达多种心肌细胞特异性标记(图 5 泳道 2、3),但胚胎干细胞的特异性标记如 *Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Dppa4* 等未能检测到,表明诱导的细胞已经分化(图 6 泳道 2、3)。而经 EMD87580 处理并用 DMSO 诱导的细胞不表达心肌细胞特异性基因标记(图 5 泳道 4、5),但仍然表达干细胞的特异性标记(图 6 泳道 4、5)。上述结果表明, EMD87580 通过抑制 *NHE1* 基因影响 P19 细胞向心肌细胞的诱导分化。

### 3 讨论

P19 干细胞与 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同性<sup>[19]</sup>。与 ES 细胞相比, P19 细胞在无需饲养层和白血病抑制因子条件下单层生长并保持有正常二倍体核型。P19 干细胞具有多分化潜能,在不同细胞诱导剂,如 5-氮胞苷、视黄酸、催产素以及 DMSO 等处理下,可以向心肌细胞分化<sup>[5,20,21]</sup>。形成具有三胚层结构的类胚体对于细胞定向诱导分化至关重要。本研究在制作类胚体时选用防止细胞贴壁的培养皿,直接将计数好的细胞悬液加入培养皿中,隔天更换诱导培养液,悬浮培养 4 d,形成的类胚体致密而且密度和大小均一。与采用“悬滴-悬浮法”制备类胚体的方法比较,所用时间短,避免了悬滴培养的繁琐操作,并且形成的类胚体数量远远多于悬滴法,有利于大批量进行细胞定向诱导分化实验。

在试验中发现采用 1% DMSO 进行细胞诱导,可使 P19 细胞高效地向心肌细胞分化。细胞在培养皿中经 10 d 诱导会出现心肌样跳动细胞团。经基因表达分析测定,在诱导过程中与心肌发育有关的转录因子,如心脏形成关键基因 *Tbx5*、*GATA4*、肌细胞增强因子 2(MEF2)等都在诱导 2 d 后出现,并且随着诱导时间的延长这些基因的表达量也不断增加。证明干细胞经诱导后开始逐渐分化形成心肌细胞。

*NHE1* 除具有调节细胞内 pH 稳定的功能外,还对细胞容量和离子浓度起调节作用。近来的研究表明,在细胞增殖时 *NHE1* 的活性增加使细胞内出现微碱环境,从而调节细胞内 DNA 复制和代谢酶的活性,表明 *NHE1* 也在细胞增殖和凋亡过程中起重要作用。在试验中我们发现,用特异性抑制剂 EMD87580 抑制 *NHE1* 的活性,会阻断 P19 细胞向心肌细胞的分化。经 EMD87580 处理的 P19 细胞可以正常的形成

类胚体, 但将类胚体贴壁培养后, 细胞团未出现向外扩散生长的分化细胞, 仍然保持团状并且边缘较整齐, 细胞团中心部位也未出现死亡细胞。而通过观察发现在正常诱导分化的 P19 细胞团中心部位通常会有部分细胞变黑出现死亡, 这可能是由于细胞生长较快使细胞团营养不足所造成。我们发现在干细胞向心肌细胞分化过程中 NHE1 的表达量也随着增加(图 3), 而抑制剂 EMD87580 对 NHE1 蛋白活性的抑制会降低细胞增殖的速度, 但并不影响 NHE1 基因的持续表达及其对维持细胞功能的作用。对经 EMD87580 处理的细胞进行分子生物学检测结果也表明, 与心肌细胞发育相关的转录因子未见表达, 而细胞仍然表达胚胎干细胞的特异性标记。未经抑制剂处理的细胞表达心肌细胞发育相关的转录因子, 但胚胎干细胞的特异性标记消失, 这是因为心肌细胞属于中胚层, 而 *Sox2* 基因的表达最早在桑椹胚期能检测到, 随后在内细胞中短暂表达, 接着分布在外胚层, *Oct4* 基因当细胞进入分化状态后其表达就消失<sup>[22]</sup>。这一现象说明当 EMD87580 抑制了 NHE1 的活性后, P19 干细胞就不能有效的向心肌细胞分化。NHE1 蛋白的 C 末端功能域位于胞浆内, 具有细胞信号转导功能, 一些生长因子、有丝分裂原、激素等信号会通过 C 末端功能域的介导来调节 NHE1 的活性。这一功能域还存在与钙调蛋白结合的两个位点, 通过调控细胞内第二信使钙, 发挥信号转导功能。NHE1 蛋白是通过其 C 末端的信号转导功能直接影响干细胞向心肌细胞分化, 还是通过调控细胞内酸碱度微环境间接影响干细胞分化, 这一分子机理还有待进一步深入研究。

## REFERENCES

- [1] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **41**: 1078–1083.
- [2] Fujii T, Yau TM, Weisel RD, *et al.* Cell transplantation to prevent heart failure: A comparison of cell types. *Ann Thorac Surg*, 2003, **76** (6): 2062–2070.
- [3] Saito T, Kuang JQ, Lin CC, *et al.* Transcoronary implantation of bone marrow stromal cells ameliorates cardiac function after myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **126**(1): 114–123.
- [4] Rajasingh J, Bord E, Hamada H, *et al.* STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplanted in a mouse model of myocardial infarction. *Circ Res*, 2007, **101**(9): 910–918.
- [5] Paquin J, Danalache BA, Bogdan A, *et al.* Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(14): 9550–9555.
- [6] McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 1993, **37**(1): 135–140.
- [7] Robertson EJ. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1987.
- [8] Friend C, Scher W, Holland JG, *et al.* Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells *in vitro*: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **68**: 378–382.
- [9] Kimhi Y, Palfrey C, Spector I. Maturation of neuroblastoma cells in presence of dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**: 462–466.
- [10] Tralka TS, Rabson AS. Cilia formation in cultures of human lung cancer cells treated with dimethyl sulfoxide. *J Natl Cancer Inst*, 1976, **57**: 1383–1388.
- [11] Lako M, Lindsay S, Lincoln J, *et al.* Characterization of Wnt gene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro*: role of Wnt3 in enhancing haematopoietic differentiation. *Mech Dev*, 2001, **103**: 49–59.
- [12] van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, *et al.* P19 embryonal carcinoma cells: a suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardio Res*, 2003, **58** (2): 410–422.
- [13] Karmazyn M, Sawyer M, Fliegel L. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: a target for cardiac therapeutic intervention. *Curr Drug Targets*, 2005, **5**: 323–335.
- [14] Sardet C, Franchi A, Pouysseur J, *et al.* Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Cell*, 1989, **56**: 271–280.
- [15] Fliegel L. Regulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity. *Basic Res Cardiol*, 2001, **96**: 301–305.
- [16] Fliegel L, Sardet C, Pouyssegur J, *et al.* Identification of the protein and cDNA of the cardiac Na/H exchanger. *FEBS Lett*, 1991, **279**: 25–29.
- [17] Wang H, Fliegel L, Lucchesi PA, *et al.* Phosphorylation and regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger through mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry*, 1997, **36**: 9151–9158.
- [18] Slepko E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *NRC Res*, 2002, **80**: 499–508.
- [19] Hescheler J, Fleishmann BK, Lentini S, *et al.* Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res*, 1997, **36**: 149–162.
- [20] Sakai T, Liu L, Shishido Y, *et al.* Identification of a novel, embryonal carcinoma cell-associated molecule, nucling, that is pp-regulated during cardiac muscle differentiation. *J Biochem (Tokyo)*, 2003, **133**(4): 429–436.
- [21] Choi SC, Lim DS. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Exp Mol Med*, 2004, **36**(6): 515–523.
- [22] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Dev*, 2003, **17**: 126–140.