

P19 세포의 신경세포로의 분화

김소연, 김선옥¹, 이철상¹, 이영돈, 서해영

아주대학교 의과대학 해부학교실, ¹생명공학연구소

〈 조 록 〉

생쥐의 배자에서 유래한 기형암종세포(teratocarcinoma cell)인 P19 세포가 retinoic acid (RA) 처리에 의해 신경세포로 분화되는지를 신경세포-특이 단백질의 발현을 통해 확인하고 2-mercaptoethanol (2-ME) 및 ascorbic acid (AA)가 P19 세포의 분화과정에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. RA에 의해 분화된 P19 세포는 신경세포의 형태적 특징을 나타내었고 신경세포-특이 단백질인 neural cell adhesion molecule (NCAM), neuron-specific enolase (NSE) 및 calss III β -tubulin의 발현이 크게 증가한 반면 별아교세포의 특이 단백질인 glial fibrillary acidic protein (GFAP)의 발현은 관찰할 수 없었다. 또한 AA와 2-ME이 P19 세포의 분화에 미치는 영향을 조사한 결과, AA를 처리한 경우에 있어서 신경세포-특이 단백질이 발현되는 세포의 비율은 AA를 처리하지 않은 경우보다 증가하는 경향을 보였으나 2-ME은 RA에 의한 P19 세포의 분화과정에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다. 본 연구의 결과는 retinoic acid에 의해 P19 세포가 신경세포로 분화된다는 사실을 보여주는 것으로 신경세포의 분화 및 신경세포이식 연구에 있어서 P19 세포의 이용 가능성을 제시하고 있다.

찾아보기 낱말 : P19 세포, retinoic acid, 신경세포 분화, NCAM, NSE, β -tubulin

서 론

생쥐 배자에서 유래한 기형암종(teratocarcinoma)세포인 P19 세포는 배양조건에 따라 배자막내배엽, 신경세포, 근육세포, 상피세포, 연골세포 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있기 때문에 분화연구의 실험모델로 많이 이용된다(Martin 등, 1975a, b; Nicolas 등, 1975). P19 세포의 분화유도물질로는 근육세포로의 분화에 이용되는 dimethylsulfoxide (DMSO)와 신경세포와 별아교세포로의 분화에 이용되는 retinoic acid (RA)가 잘 알려져 있다(Jones-Villeneuve 등, 1982; Mcburney 등, 1982, 1988). 형태발생 뿐만 아니라 기형발생에도 관여하는 RA는 세포핵 안에 존재하는 수용체, RAR/RXR을 통해 작용함으로써 P19 세포가 신경세포, 신경아교세포 또는 섬유모세포 등으로 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Jones-Villeneuve 등, 1983). RA는 신경세포 분화에 관여하는 것 외에도 HeLa 세포와 HL-60 세포에서 apoptosis를 유발한다고 보고된 바 있다(Nagy 등, 1995).

Cyclic AMP (cAMP)와 항산화작용을 가진 ascorbic acid (AA)는 중추신경계의 primary stem cell에서 도파민성 신경세포의 분화와 생존에 효과적이라고 알려져 있다(Kalir와 Mytilineou 등, 1991; Branton 등, 1998; Yan 등, 2001). 또한 2-mercaptoethanol (2-ME)은 골수조직에 존재하는 stromal cell

에서 신경세포로의 분화를 촉진하며(Woodbury 등, 2000) embryonic stem (ES) cell에서는 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 억제하여 산소독성을 완화 시킴으로써 apoptosis를 억제하는 것으로 보고된 바 있다(Castro-Obregon 등, 1996). 이러한 점에서 AA와 2-ME는 P19 세포의 분화 과정에도 관여할 가능성이 높을 것으로 예상된다.

본 연구에서는 RA 처리에 의해 P19 세포가 신경세포로 분화되는지를 면역조직화학적 방법과 western 분석을 이용하여 신경세포-특이 단백질의 발현을 통해 확인하고 P19 세포의 분화과정에 2-ME 혹은 AA가 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

P19 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 0.25% trypsin-EDTA과 fetal bovine serum은 Gibco-BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였다. All-trans-retinoic acid, 2-mercaptoethanol, ascorbic acid 및 poly-D-lysine은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서, laminin은 Upstate Biotechnology사(Old Barn Road, NY, U.S.A.) 제품

을 사용하였다. 일차항체는 모두 단일클론항체로서 anti-class III β III-tubulin (Tuj-1)은 BabCO사 (Richmond, California, U.S.A.), anti-neuronal cell adhesion molecule (NCAM) 항체는 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.), 그리고 anti-neuron-specific enolase (NSE)는 DAKO사 (Glosrup, Denmark), 제품을 사용하였고 이차 항체로는 Vector사 (Burlingame, CA, U.S.A.) 제품인 fluorescein anti-mouse IgG와 peroxidase anti-mouse IgG를 사용하였다. 대조염색에 사용한 propidium iodide는 Molecular Probe사 (Leiden, The Netherlands)에서 구입하였다.

2. P19 세포의 배양 및 분화 유도

P19 세포는 10% FBS와 0.1 mM의 2-ME이 포함된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 3일마다 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA로 바닥에 부착된 세포들을 분리시킨 다음 계대배양 하였다. P19 세포를 분화시키기 위해서는 우선 1 × 10⁵개/ml 농도의 세포를 0.5 μM의 RA를 포함하는 배양액 내에서 3~4일간 배양하여 100~1,000개의 세포로 이루어진 배아모양체 (embryoid body)의 형성을 유도하였으며 이 과정은 배양세포가 바닥에 붙지 않는 박테리아용 페트리 접시를 사용하였다. 세포덩어리가 형성되면 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 세포들을 서로 분리시키고 이를 laminin (20 μg/ml)과 poly-D-lysine (0.1 mg/ml)으로 바닥을 처리한 세포배양용 35 mm 페트리 접시로 옮겼다. 약 12시간 후 세포가 바닥에 붙어 안정화되면 0.5% FBS를 포함하는 배양액으로 교환하고 2일마다 동일한 배양액으로 갈아주었다. 세포분화에 미치는 2-ME의 영향을 조사하기 위해서는 2-ME를 제거한 동일한 배양액을 사용하였으며 AA의 영향은 200 μM의 AA를 위와 동일한 배양액에 가한 후 변화를 관찰하였다.

3. 면역형광염색

분화를 유도한 세포를 4% paraformaldehyde로 30분간 고

정하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세 번 씻은 후 blocking 용액 (10% normal horse serum, 0.1% BSA 및 0.03% TritonX-100)으로 45분간 처리하여 항체의 비특이적인 반응을 제거하였다. 일차항체로서 Tuj-1 (1 : 500), anti-NCAM (1 : 250)와 4°C에서 12~16시간 반응시키고 0.03%의 TritonX-100이 포함된 PBS로 세 번 세척하였다. 이차항체 반응은 fluorescein anti-mouse IgG (1 : 500)로 상온에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 세 번 세척하였다. 대조염색은 이차항체의 첫번째 세척이 끝난 후 propidium iodide로 5분간 반응시키고 PBS로 두 번 세척하였다. 신경세포로 분화된 정도는 면역형광염색 후 현미경사진을 찍은 다음 신경세포-특이 단백질이 발현되는 세포의 수를 세고 이를 propidium iodide에 염색된 전체세포의 수로 나누어 %로 표시하였다.

4. Western 분석

배양된 세포를 RIPA 완충용액 (50 mM Tris-Cl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF)로 모은 후 이를 12,000 × g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 이를 일정한 단백질 농도가 되도록 하여 8% 또는 12% SDS-polyacrylamide gel에 얹은 후 70 V에서 2시간 전기영동하였다. 분리된 단백질은 transblotting장치를 이용하여 transfer 완충용액 (25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol)에서 10 V의 전압을 1시간 동안 걸어 PVDF membrane으로 옮겼다. 상온에서 한 시간동안 5% skim milk가 포함된 TTBS (0.1% Tween 20, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5)로 처리한 후 일차항체반응 (Tuj-1; 1 : 1000, anti-NCAM; 1 : 500, anti-NSE; 1 : 500, anti-GFAP; 1 : 500)을 4°C에서 16시간 동안 시행하였다. 이차항체로서 HRP-anti-mouse IgG (1 : 5000)와 상온에서 1시간 동안 반응시키고 TTBS로 세 번 씻은 후 ECL (enhanced chemiluminescence) kit를 이용하여 X-ray 필름에 노출시켰다.

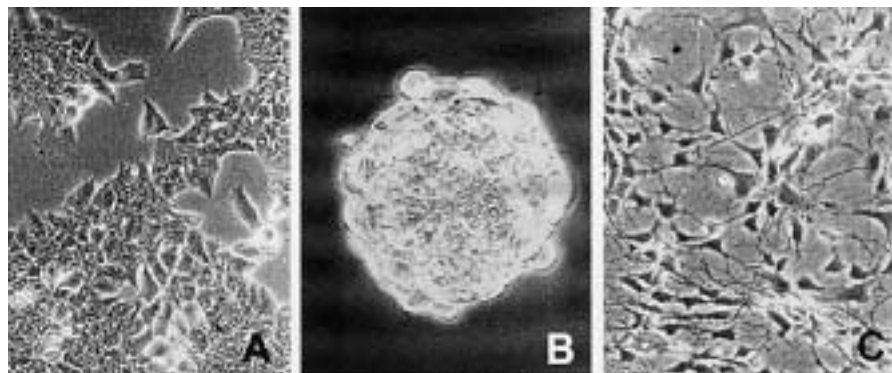


Fig. 1. The photograph of P19 cell cultures. Normal P19 cells (A) on tissue culture dish, embryoid body in petri dish (B) and neuronal differentiated P19 cells (C). Scale bars = 50 μM (× 200)

결 과

1. P19 세포의 분화 유도

분화되지 않은 P19 세포는 세포돌기를 형성하지 않고 다각형 모양을 띠면서 서로 밀집되는 경향을 나타낸다(Fig. 1 A). P19 세포의 분화를 위해 10^5 개/ml 농도의 세포를 $0.5 \mu\text{M}$ 의 RA와 0.1mM 의 2-ME이 첨가된 배양액에서 3일간 배양하여 세포덩어리인 배자체(embryoid body)의 형성을 유도하였다(Fig. 1B). 이 세포밀집체로부터 분리한 세포들을 0.5%의 낮은 혈청농도 조건에서 배양한 결과 약 2일째부터 세포돌기들이 형성되기 시작하였다. 약 4~5일이 지나면 분화된 세포들은 긴 세포돌기를 갖고 있는 거의 완전한 신경세포의 형태적 특징을 나타내었으며 이들은 서로 얽혀 그물구조를 이루는 양상을 띠었다(Fig. 1C).

2. 면역형광염색

분화된 P19 세포가 신경세포의 특성을 갖는지를 조사하기 위하여 신경세포에서 특이적으로 발현되는 class III β -tubulin 단백질에 대한 면역형광염색을 Tuj1 항체를 사용하여 시행하였으며(Fig. 2A, B) 대조염색으로서 모든 세포의 핵을 확인할 수 있는 propidium iodide (PI) 염색을 시행하였다(Fig. 2C, D).

RA를 처리하지 않은 경우 Tuj1 항체에 의한 면역반응은 거의 나타나지 않은 반면(Fig. 2A, C) RA를 처리한 경우에는 세포돌기가 발달한 많은 세포에서 높은 면역반응을 나타내었다(Fig. 2B, D). 또 다른 종류의 신경세포-특이 단백질인 NCAM에 대한 면역조직화학 염색에서도 Tuj1 항체에 의한 면역반응과 같은 결과를 얻어 P19 세포는 RA에 의해 신경세포로 분화되는 것을 확인하였다(Fig. 2E, F).

항산화물질로 알려져 있는 AA가 P19 세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 RA와 함께 $200 \mu\text{M}$ 의 AA를 처리한 결과 Tuj-1에 대해 양성반응을 나타내는 세포의 수는 RA만을 처리하여 분화를 일으킨 경우보다 증가하였고 이들 세포는 세포덩어리로부터 넓게 퍼져 나가는 양상을 보였다(Fig. 3). P19 세포로부터 신경세포로 분화하는 정도를 정량적으로 나타내기 위해 Tuj-1에 염색된 세포와 PI에 의해 염색되는 세포의 수를 계수하여 그 비율을 산출한 결과 AA를 처리한 경우 Tuj-1에 염색된 세포의 비율은 AA를 처리하지 않은 경우에 비해 약 12% 증가하였다(Fig. 4). 그러나 2-ME을 첨가하지 않은 조건에서 RA에 의해 분화된 세포는 2-ME을 첨가한 조건에서 분화된 세포와 형태적인 차이를 보이지 않았으며 Tuj-1에 염색된 세포의 비율도 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

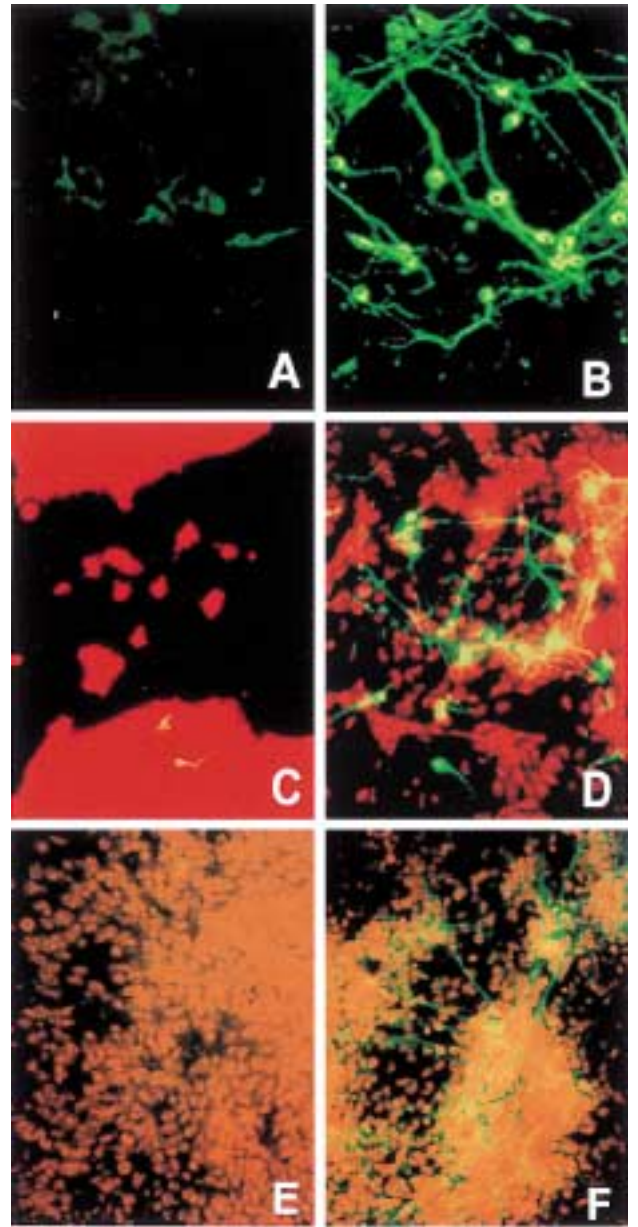


Fig. 2. Immunocytochemistry of differentiated P19 cells by Tuj1 after the EB formation. Differentiated P19 cells in the absence of RA (A, C, E) and in the presence of RA (B, D, F). Tuj1 (green) stained cells (A, B), Tuj1 (green) and PI (red) counter stained cells (C, D) and NCAM (green) and PI (red) counter stained cells (E, F). Scale bars = $50 \mu\text{M}$ ($\times 200$)

3. Western분석을 통한 신경세포-특이 단백질의 발현

본 연구에서는 P19 세포의 분화에 따른 신경세포-특이 단백질의 발현을 면역조직화학 염색과 함께 western 분석을 통해 조사하였다. 본 연구에서 사용한 anti-NCAM은 조직 내에서 180 kDa, 140 kDa 및 120 kDa 크기의 NCAM을 인식하는 항체로 분화된 P19 세포에서는 180 kD의 NCAM만 검출된

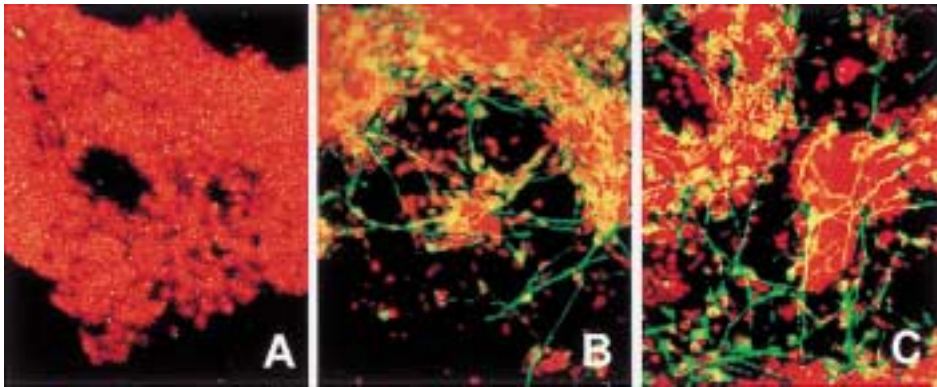


Fig. 3. Immunocytochemistry of differentiated P19 cells by TuJ1. Differentiated P19 cells in the absence of RA and AA (A), in the presence of RA and in the absence of AA (B) and in the presence of RA and AA (C). Scale bars = 50 μ m ($\times 100$)

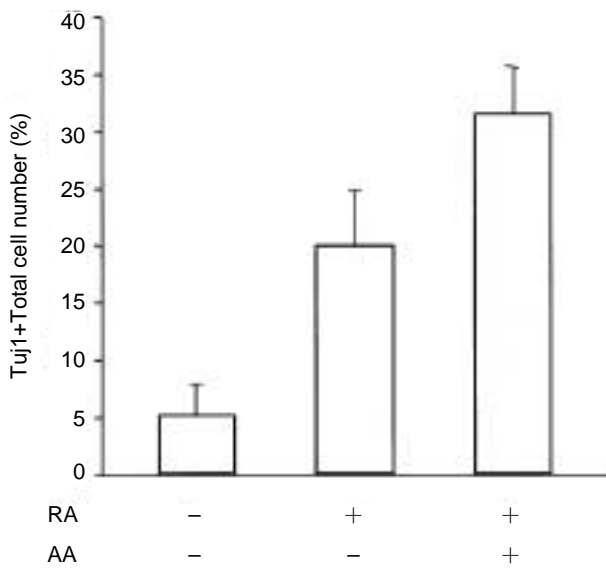


Fig. 4. Quantitation of TuJ1 (green) and PI (red) counter stained cells of Fig 3. TuJ1 positive cells / PI positive total cells (%).

반면 뇌조직에서는 180 kDa 및 140 kDa 크기의 NCAM을 확인할 수 있었다. β -tubulin과 NSE는 각각 50 kDa 및 46 kDa의 크기의 단일 띠로 확인되었다.

RA가 존재하지 않는 조건에서 배양된 P19 세포에서는 NCAM과 NSE의 발현이 관찰되지 않았으며 β -tubulin의 발현은 매우 미약하였다(Fig. 5, lane 1, 2). 그러나 P19 세포를 RA로 처리한 결과 분화된 세포에서의 신경세포-특이 단백질의 발현은 크게 증가하였으며 특히 RA에 의한 이들 단백질의 발현에 있어서 2-ME는 전혀 영향을 미치지 않았다(Fig. 5, lane 3, 4). 또한 별모양아교세포에서 특이적으로 발현되는 glial fibrillary associated protein (GFAP)는 어떤 조건에서도 관찰되지 않았다.

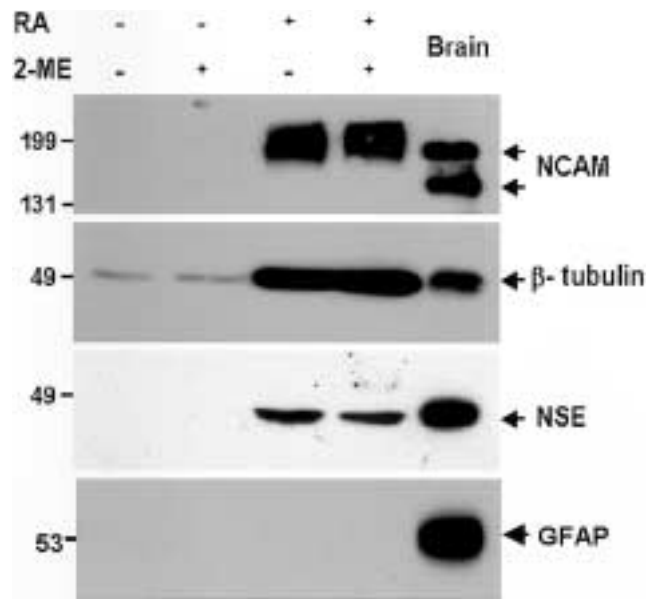


Fig. 5. Western blot analysis of neuronal differentiated P19 cells in the absence (lane 1, 2) and the presence of RA (lane 3, 4). Withdrawal (lane 1, 3) and treatment (lane 2, 4) of β -mercaptoethanol showed no differences in the western blot analysis. α -NCAM (A), α -NSE (B), α -TuJ1 (C) and α -GFAP (D).

고 찰

Embryonic carcinoma (EC) 세포는 착상후의 배자를 외배엽 혹은 생식용선에 이식하거나 생식 세포에서 자발적으로 생겨나는 암종 세포에서 기원한다. 이들은 세가지 배엽으로의 분화가 가능하나 F8 세포의 경우 egg cylinder ectoderm의 분화가 용이하고 본 실험에 사용한 P19 세포의 경우 섬유아세포, 근육세포 혹은 신경세포로 쉽게 분화하는 등 세포주 간의 차이를 보인다. 또한 이들은 간세포(stem cell)의 특징이 되는 Oct4, Rex1, SSEA-1, Fornsman antigen 등을 발현하고 미

분화 암종 세포인 teratocarcinoma와 chimera의 형성 능력을 가진다.

Retinoic acid (RA)는 발생과정 중인 닭의 limb bud형성에 중요한 형태원(morphogen)으로써 알려져 왔다(Melton 등, 1991). RA는 세포에 존재하는 결합 단백질과 핵 수용체를 경유하여 작용을 하며 특히 P19 세포에서 신경세포와 성상교세포 등이 섞인 불균질한 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Bain 등, 1995).

본 연구에서는 RA에 의해 분화된 P19 세포가 신경세포의 특성을 갖고 있음을 NCAM, class III β -tubulin 및 NSE 등의 신경세포-특이 단백질의 발현을 통해 확인하였다. P19 세포의 분화를 위하여 P19 세포를 RA로 처리하여 100~1,000개의 세포들이 밀집된 상태의 배자모양 덩어리(embryoid body)의 형성을 유도하였고 이들을 낮은 혈청농도에서 배양하여 형태적으로 신경세포의 특징을 갖는 세포로 분화시켰다. P19 세포는 RA가 없이도 배자모양 덩어리를 형성하지만 이 경우 대부분의 세포는 배자막내배엽세포로 분화한다고 알려져 있다(Jones-Villeneuve 등, 1982). 본 연구의 western 분석결과에 의하면 분화되지 않은 P19 세포에서 class III β -tubulin은 매우 미약하게 검출되었지만 NCAM과 NSE는 전혀 발현되지 않았다. 그러나 RA에 의해 분화된 세포에서는 β -tubulin의 뚜렷한 증가와 함께 180kDa의 NCAM과 NSE의 높은 발현이 관찰되어 이들 세포가 신경세포임을 확인할 수 있었다. NCAM은 단일 유전자에서 mRNA가 생성될 때 선택적 접합에 의하여 180kDa 이외에 140, 120kDa의 단백질로 만들어질 수 있다는 것이 알려져 있다(Naegele 등, 1991). 본 연구의 P19에서 유래한 신경세포에서는 양성 대조군으로 사용한 생쥐의 뇌에서 발견되는 NCAM 중 180kDa에 해당되는 단백질이 관찰되었다. 이는 RA가 신경세포의 분화를 유도시키지만 그때 생성되는 세포가 성숙한 생쥐의 뇌에서 발견되는 신경세포와 다소 차이가 있거나, 생쥐 뇌에는 여러 종류의 신경세포가 존재하며 P19에서 유래한 신경세포는 그 중의 한 종류에 해당하기 때문으로 사료된다. 또 다른 연구자의 보고에 의하면 RA는 신경세포 뿐 아니라 별아교세포로의 분화도 촉진한다고 알려진 바 있으나(Jones-Villeneuve 등, 1983) 본 연구자들은 RA를 첨가하였을 때 별아교세포의 특이 단백질인 GFAP 발현은 관찰할 수 없었다. 이러한 차이는 P19 세포의 분화를 유도하는 방법의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 기존의 연구에서는 배자모양 덩어리를 형성시킨 다음에 RA를 처리하였지만 본 연구에서는 RA가 처음부터 존재하는 조건에서 배자모양 덩어리의 형성을 유도하였다. 따라서 이러한 방법은 P19 세포를 이용하여 신경세포를 효율적으로 얻고자 하는데 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 AA가 P19 세포의 분화에 미치는 영향을 조사한 결과 신경세포-특이 단백질이 발현되는 세포의 비율이 증가하는 경향을 보였다. AA 자체는 신경세포로의 분화

를 촉진시키지 않았으므로(미제시 결과) AA 자체가 신경세포로의 분화를 유도하는 능력은 없었다. 따라서 AA는 RA의 효과를 증가시키거나 분화 과정에서 생성되는 reactive oxygen species (ROS)에 의한 신경세포의 사멸을 억제함으로써 분화된 신경세포의 수를 증가시키는 것으로 사료된다. 이와 같은 사실은 AA와 cyclic AMP가 중추신경계에서 분리한 신경줄기세포가 도파민성 신경세포로 분화할 때 생존율을 증가시킨다는 기존의 연구 결과를 뒷받침한다(Kalir와 Mytilineou 등, 1991; Branton 등, 1998). 이러한 사실은 RA와 같은 분화 유도물질을 사용할 때, 세포사멸 유발물질인 ROS를 효과적으로 제거할 수 있는 항산화물질을 동시에 사용하면 신경세포 분화율을 높일 수 있는 가능성을 시사한다.

2-ME는 배자암종(embryonal carcinoma, EC) 세포의 배양에 선택적으로 사용되지만 EC 세포와 유사한 성질을 나타내는 embryonic stem (ES) 세포의 배양에는 필수적으로 알려져 있다. ES세포에서 2-ME는 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 antioxidants처럼 ROS의 생성을 감소시킴으로써 apoptosis를 억제한다고 알려져 있다. 또한 ES 세포에서 2-ME는 apoptosis를 억제할 뿐 아니라 신경세포 분화를 억제하여 단순한 2-ME의 제거만으로도 신경세포로의 분화가 가능하다는 결과가 보고된 바 있다(Castro-Obregon 등, 1996). 또한 2-ME는 생쥐 배자를 이용한 신경세포의 배양시 신경세포의 성숙을 위해 소의 혈청과 함께 필수적으로 요구된다고 보고된 바 있어(Katayama 등, 1994) P19 세포의 분화과정에 역할을 할 가능성이 높을 것으로 예상하였다. 그러나 본 연구에서는 2-ME의 존재 여부와 상관없이 RA에 의해 분화된 세포들 사이에서 형태학적인 차이를 관찰할 수 없었으며 신경세포-특이 단백질의 발현양상도 차이를 나타내지 않아 P19 세포를 신경세포로 분화시키는데 2-ME가 필수적인 성분이 아님을 확인하였다.

본 연구에서는 P19 세포가 RA에 의해 신경세포로 분화되며 이 분화과정은 AA와 같은 항산화 물질에 의해 촉진됨을 확인하였다. 미분화세포로부터 신경세포를 효과적으로 얻어내는 것은 신경계 발생에 있어서 신경세포의 분화과정을 연구하는데 유용한 정보를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 최근 신경손상 질병의 치료법의 하나로 개발 중인 세포이식 치료법에서 충분한 신경세포 수의 확보차원에서 중요한 문제라고 할 수 있다. 그러나 이를 위해서는 분화유도물질을 통한 접근법과 함께 세포분화에 관여하는 유전자의 조절을 통한 접근법이 병행되어야 할 것이다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2000-DP0362) to HSK.

참 고 문 헌

- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI : Embryonic Stem Cells Express Neuronal Properties *in vitro*, *Dev Biol* 168: 342-357, 1995.
- Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI : Retinoic Acid Promotes Neural and Represses Mesodermal Gene Expression in Mouse Embryonic Carcinoma Cells in Culture, *Biochem Biophys Res Comm* 223: 691-694, 1996.
- Branton RL, Love RM, Clarke DJ : cAMP induced during cell suspension preparation improves survival of dopaminergic neurons *in vitro*, *Neuroreport* 9: 3223-3227, 1998.
- Castro-Obregon S, Covarrubias L : Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation, *FEBS Letters* 381: 93-97, 1996.
- Darmon M, Bottenstein J, Sato G : Neural differentiation following culture of embryonic carcinoma cells in a serum-free defined medium, *Dev Biol* 85: 463-473, 1981.
- Jetten AM, Jetten MER, Sherman MI : Stimulation of differentiation of several murine embryonic carcinoma cell lines by retinoic acid, *Exp Cell Res* 124: 381-391, 1979.
- Johnson JE, Zimmerman K, Satio T, Anderson DJ : Induction and Repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonic carcinoma cells, *Development* 114: 75-87, 1982.
- Jones-Villeneuve EM, Mcburney MW, Rogers KA, Kalnins VI : Retinoic Acid Induces Embryonic Carcinoma Cells to Differentiate into Neurons and Glial Cells, *J Cell Biol* 94: 253-262, 1982.
- Jones-Villeneuve EM, Rudnicki MA, Harris JF, Mcburney MW : Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonic carcinoma cells, *Mol Cell Biol* 3: 2271-2279, 1983.
- Kalir HH, Mytilineou C : Ascorbic acid in mesencephalic cultures: Effects on dopaminergic neuron development, *J Neurochem* 57: 458-464, 1991.
- Katayama M, Ishii K : 2-Mercaptoethanol-independent survival of fetal mouse brain neurons cultured in a medium of human serum, *Brain Res* 656: 409-12, 1994.
- Martin GR, MJ Evans : Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1441-1445, 1975a.
- Martin GR, MJ Evans : Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation *in vitro*, *Cell* 6: 467-474, 1975b.
- McBurney MW, Rogers BJ : Isolation of Male Embryonic Carcinoma Cells and Their Chromosome Replication Patterns, *Dev Biol* 89: 503-508, 1982.
- McBurney MW, Jones-Villeneuve EMV, Edward MKS, Anderson PJ : Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonic carcinoma cell line, *Nature* 299: 165-167, 1982.
- McBurney MW : P19 embryonic carcinoma cells, *Int J Dev Biol* 37: 135-140, 1983.
- McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Crag J : Differentiation of embryonic carcinoma-derived neurons in cell culture, *J Neurosci* 8: 1063-1073, 1988.
- Melton DA : Pattern forming during animal development, *Science* 252: 234-241, 1991.
- Naegele JR, Barnstable CJ : A carbohydrate epitope defined by monoclonal antibody VC1.1 is found on N-CAM and other cell adhesion molecules, *Brain Res* 559: 118-29, 1991.
- Nagy L, Thomazy VA, Shipley GL, Fesus L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna RA, Davies PJ : Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines, *Mol Cell Biol* 15: 3540-3551, 1995.
- Nicolas JF, Dubois P, Jakob H, Gallard J, Jakob P : Teratocarcinome de la souris: Differentiation en culture d'une lignee de cellules primitives a potentialites multiples, *Ann Microbiol (Paris)* 126A: 3-22, 1975.
- Roy B, Taneja R, Chambon P : Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes an induction of embryonic carcinoma cell differentiation by an RA receptor α (RAR α)-, RAR β -, or RAR γ -selective ligand in combination with a retinoid X receptor specific ligand, *Mol Cell Biol* 15: 6481-6487, 1995.
- Schmidt JW, Brugge JS, Nelson WJ : pp60src tyrosine kinase modulates P19 embryonic carcinoma cell fate by inhibiting neuronal but not epithelial differentiation, *J Cell Biol* 116: 1019-1033, 1992.
- Smolich BD, Papkoff J : Regulated Expression of Wnt Family Members during Neuroectodermal Differentiation of P19 Embryonic Carcinoma Cells: Overexpression of Wnt-1 Perturbs Normal Differentiation-Specific Properties, *Dev Biol* 166: 300-310, 1994.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB : Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neuron, *J Neurosci Res* 61: 364-370, 2000.

— Abstract —

Neuronal Differentiation of P19 Cells

Soyeon Kim, Sun-Uk Kim¹, Chul-Sang Lee¹,
Young-Don Lee, Hae Young Suh-Kim

Department of Anatomy, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, South Korea,
¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

P19, murine embryonal carcinoma (EC) cells can be induced to differentiate into neurons in the presence of retinoic acid (RA). To investigate neuronal differentiation of P19 cells in details, P19 aggregates were obtained in the presence or absence of RA, ascorbic acid (AA) and 2-mercaptoethanol (2-ME) in bacteriological Petri dishes. When the aggregates were transferred into the serum depleted medium, P19 cells exhibited dramatic morphological changes. Cells contained long and thin processes as detected in differentiated neurons. Western blot analysis showed that treatment of RA and AA induced expression of neuron-specific markers such as NCAM, NSE and Tuj1. Expression of GFAP was not detected, suggesting that P19 cells differentiate into neurons under our experimental condition. Immunocytochemical studies also revealed that treatment of RA and AA increased expression of NCAM and Tuj1. On the contrary, 2-ME was ineffective in the neuronal differentiation of P19 cells, which is consistent the results from the western blot analysis. These results suggest that differentiated P19 cells have similar characteristics to those of typically differentiated neurons. This study also suggests that P19 cells may provide useful tools to study neuronal differentiation *in vitro*.

Key words : P19 cell, Differentiation, Neuron