

· 基础研究 ·

工频磁场对骨髓间充质干细胞基因表达谱的影响

张海军 吴华 刘伟军 郝海虎 赵文春

【摘要】目的 用基因芯片技术筛选经工频磁场刺激后骨髓间充质干细胞(MSCs)的差异表达基因,并初步探讨磁场定向分化骨髓 MSCs 的机制。**方法** 体外培养 SD 大鼠 MSCs,取第三代细胞用磁场刺激,提取暴磁组和未暴磁对照组(对照组)细胞总 RNA,反转录制备杂交探针并运用大鼠 Oligo 基因芯片进行杂交,扫描信号并分析结果;选取感兴趣基因进行半定量逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)验证。**结果** 与对照组细胞相比,在暴磁组细胞中发现表达差异显著的基因有 153 个,其中 74 个基因表达上调,79 个基因表达下调,这些差异表达基因主要涉及细胞增殖分化、代谢、转录调控、应激及信号转导等多个方面。RT-PCR 结果显示,与对照组相比,暴磁组的 MSCs Dusp1、Rab1 mRNA 表达水平上调,与芯片结果一致。**结论** 在 50 Hz、1.2 mT 的磁场作用下 MSCs 的基因表达发生了变化,这些基因主要是细胞增殖分化调控基因、转录调控基因、代谢相关基因及应激基因等,为进一步研究磁场对 MSCs 的分化机制奠定了基础。

【关键词】 电磁场; 基因表达谱; 骨髓间充质干细胞; 基因芯片

The effect of electromagnetic fields on gene expression profiles in bone marrow mesenchymal stem cells

ZHANG Hai-jun*, WU Hua, LIU Wei-jun, HAO Hai-hu, ZHAO Wen-chun. * Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, Email: wuhua@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To screen for differential expression of genes in bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) stimulated by electromagnetic fields (EMFs) and to study the mechanism of differentiation of the bone marrow MSCs induced by EMFs. **Methods** Mouse bone marrow MSCs were isolated and cultured in vitro. The third-passage cells were stimulated by EMFs, then the total RNA was extracted, purified to cDNA and reversely transcribed to yield a cRNA probe. The cRNA probes from stimulated and control cells were labelled with Cy5 and Cy3, respectively. The two samples were hybridized with a mouse oligo microarray, and the hybridization signals were scanned. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify the interesting genes: Dusp1 and Rab1. **Results** A total of 153 differentially expressed genes were found comparing the stimulated group and the control group. There were 74 up-regulated genes and 79 down-regulated genes in the stimulated group. Semi-quantitative RT-PCR confirmed that the Dusp1 and Rab1 mRNA expression levels of the stimulated group were up-regulated. **Conclusion** The gene expression profiles of the bone marrow MSCs were altered after EMF exposure. The genes are involved in cell proliferation and differentiation, transcription control, metabolism and response to stress. These results provide deeper insight into the mechanism of differentiation of the bone marrow MSCs.

【Key words】 Electromagnetic fields; Gene expression profiles; Bone marrow mesenchymal stem cells; Gene chips

电磁场在矫形外科领域已日益受到重视,它作为一种非侵入性疗法在骨折延迟愈合和骨不连等的治疗中有着良好的疗效。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有多向分化潜能的细胞,有强大的增殖与分化能力。已有研究表明,磁场对骨髓 MSCs

有促进增殖和分化成骨的作用^[1,2],但对其具体的作用机制尚无明确的解释。基因芯片(gene chip)是近年出现的一种基因表达谱分析技术,是功能基因组研究的重要工具之一,现已发展成为医学研究领域的一项重要技术。为证实经过磁场刺激的骨髓 MSCs 在分子生物学水平也存在差异,我们利用基因芯片技术对其进行了基因组的表达分析、比较,希望找到差异表达的基因并分析其功能,为今后进一步研究和探讨磁场对骨髓 MSCs 的分化机制奠定良好的基础。本研究利用寡聚核苷酸芯片技术观察磁场对骨髓 MSCs 基因表达谱的影响,并对感兴趣基因进行了半定量逆转录多聚

基金项目:国家自然科学基金面上项目(50477043)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(张海军、吴华、刘伟军、郝海虎);海军工程大学电力电子技术应用研究所(赵文春)

通讯作者:吴华,Email: wuhua@yahoo.com.cn

酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)鉴定及功能分析。

材料与方法

一、主要仪器及试剂

主要试剂:达尔伯克低糖必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium-low glucose, DMEM-LG)、优质胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、胰蛋白酶(Amersco 公司)、TRIzol 试剂(Life Technologies 公司)、RNeasy 试剂盒、PCR 纯化试剂盒(QIAGEN 公司)、Cy3/Cy5 染料(Amersham Pharmacia Biotech 公司)。

主要仪器:电磁场发生器(海军工程大学电机系设计与制造)、倒置相差显微镜(OLYMPUS, 日本)、台式微型离心机、冷冻桌面离心机(Eppendorf 公司)、芯片扫描仪(Amersham Pharmacia Biotech 公司)、恒温杂交箱(Shellab 公司)、紫外分光光度计(Beckman Coulter 公司)及凝胶成像仪(Vilber 公司)等。

二、材料

SD 大鼠 4 只,4~5 周龄,体重为 100~120 g,雌雄不限,由同济医学院实验动物中心提供。

三、实验方法

1. 骨髓 MSCs 的分离和体外培养:将大鼠颈椎脱位处死后,用 75% 酒精浸泡 10 min,在无菌操作台上分离双侧股骨,去除股骨周围肌肉组织,剪去包括骺板在内的两骺端。用 20 ml 的注射器抽取 10 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM-LG 培养基(内含青霉素、链霉素各 100 U/ml)冲洗骨髓腔,将冲洗液反复吹打制成骨髓细胞悬液,计数并调整细胞密度约 5×10^6 个/ml 后直接将其接种于 50 ml 的培养瓶内,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养,接种后约 6 h 换液,以后每 2~3 d 换液 1 次。由于骨髓冲洗液中红细胞、白细胞及造血干细胞在体外主要呈悬浮状态,故通过体外单层细胞培养并定期换液可将其剔除,所余的贴壁生长细胞主要为骨髓 MSCs。约 7~10 d 后,当细胞铺满单层时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。

2. 实验分组及培养环境:取生长良好的第 3 代细胞,调节细胞密度至约 1×10^4 个/ml,将其分种于 A、B、C、D 4 个 50 ml 培养瓶,每瓶 4 ml,其中 A、C 2 瓶作为暴磁组,于接种后约 36 h 后放置于置有磁场发生器的、37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养,磁场强度为 1.2 mT,频率为 50 Hz,暴磁时间为每次 30 min,间隔 12 h,共 6 次;B、D 2 瓶放置于同样条件但无磁场发生器的培养箱中培养相同时间作为对照组。

3. 总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)的提取及鉴定:在最后 1 次暴磁后约 12 h,将 4 瓶细胞用 TRIzol

试剂一步法分别提取总 RNA,用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和完整性。

4. 芯片和待测标本探针的制备及杂交、洗涤:深圳微芯生物公司的大鼠基因的 Oligo 库从 Qiagen 公司购买。并设有大鼠的 4 个管家基因以及点样标记物 HEX 作为阳性对照,8 个与大鼠基因没有同源性的 70mer 酵母基因片段(Y1-Y8)及点样载体溶液 DMSO 作为阴性对照。其中暴磁组样品总 RNA 标记 CY5 荧光分子,对照样品标记 CY3 荧光分子。将等荧光量的 CY3/CY5 探针进行混合,65℃ 水浴 5 min 后立刻置于冰上 10 min,将变性的探针加到芯片上,盖上盖玻片,放入杂交舱并封好,于 42℃ 空气浴摇床中杂交 18 h。杂交后以洗脱液洗涤,用气罐轻轻吹干表面直至玻片完全干燥。

5. 扫描和数据处理:玻片完全干燥后,利用扫描仪进行扫描,随后进行数据分析和处理。

6. RT-PCR 法鉴定差异基因的表达:实验分为暴磁组和对照组。以 ACTB 作为内参照进行 PCR 扩增。各引物对序列分别为:ACTB 5' 引物 CTG GCA TTG TGA TGG ACT CCG G 3' 引物 ATG GAT GCC ACA GGA TTC CAT A,扩增长度为 380 bp,循环 21 次;Dusp1 5' 引物 GTC TTC AAC TTC CCT GTC TCC 3' 引物 CTT TCC CTT CTG CCC TGT,扩增长度为 362 bp,循环 26 次;Rab1 5' 引物 GTG CTA AGA ACG CAA CGA A 3' 引物 CTA ACC AAC CAC GGG AAA C,扩增长度为 449 bp,循环 24 次。

四、统计学分析

采用成组设计的 *t* 检验进行分析。

结 果

一、总 RNA 检测结果

TRIzol 试剂提取暴磁组与对照组样本总 RNA,经紫外分光光度计检测 A260/A280 均在 1.7~1.9 之间;琼脂糖凝胶电泳定性分析,结果均可见清晰的 28 s 和 18 s 的 RNA 条带(图 1),证明 RNA 没有降解,纯度较高,符合实验要求。

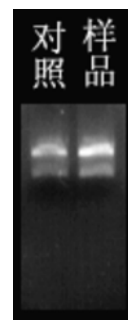


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

二、差异表达基因筛选结果

对芯片杂交结果进行分析,经管家基因均衡后用以下两个条件作为判断基因表达差异的标准:①Cy3 和 Cy5 信号的比值 >2.0 或 <0.5 ;②Cy3 和 Cy5 信号值其中之一必须 $>1\ 000$ 。与对照组细胞相比,在暴磁组中存在显著性表达差异的基因有 153 个,其中发生上调表达变化的有 74 个,发生下调表达变化的有 79 个(图 2)。部分差异表达基因功能分类见表 1 和表 2。

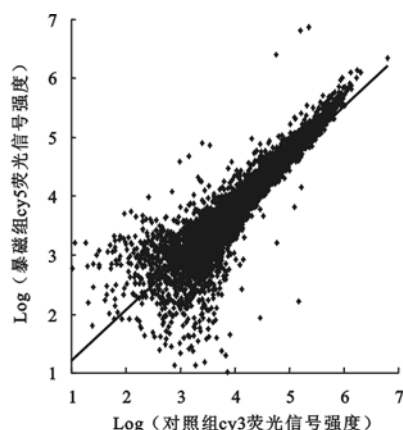


图 2 CY3/CY5 荧光杂交信号强度相关性散点图

表 1 电磁场辐射后表达上调的部分基因

基因库序号	基因名称	基因功能
NM_053769	Dusp1	双重特异性磷酸酶 1
NM_031090	Rab1	ras 癌基因家族成员
NM_133390	Giot2	促性腺素可诱导性卵巢转录因子
NM_133557	Cda08	T 细胞免疫调节蛋白
NM_031326	Tfam	转录因子 A,线粒体
NM_031014	Atic	5-氨基咪唑-4-氨甲酰 核苷酸甲酰基转移酶
NM_017259	Btg2	B 细胞易位基因 2,抗增殖
NM_053999	Ppp2r2a	蛋白质磷酸酶 2,调节亚单位 B
NM_012678	Tpm4	原肌球蛋白 4
NM_017230	Padi3	肽基精氨酸脱羧酶,III 型
XM_225695	Zfp236	锌指蛋白 236
NM_138836	Prss8	丝氨酸蛋白酶 8
NM_013159	Ide	胰岛素降解酶
NM_130406	Faf1	Fas 关联因子 1
NM_031328	Bcl1	B 细胞慢性淋巴细胞白血病/淋巴瘤 10

表 2 电磁场辐射后表达下调的部分基因

基因库序号	基因名称	基因功能
NM_138882	Pspla1	特异性磷脂酰丝氨酸 磷脂酶 A1
NM_031109	Rps10	核糖体蛋白 S10
NM_013414	Bglap2	骨 γ -羧基谷氨酰胺蛋白 2
NM_031624	Igfbp1	免疫球蛋白结合蛋白 1
NM_022529	Mrpl23	线粒体核糖体蛋白 L23
XM_223580	Mrps24	线粒体核糖体蛋白 S24
XM_345894	Rn30007079	转录延伸因子 B
NM_012595	Ldhd	乳酸脱氢酶 B
NM_031335	LOC83503	聚合酶 II
XM_217610	R004990_01	脂酰辅酶 A 硫酯酶类似物

三、RT-PCR 鉴定结果

我们选择了两个感兴趣的基因 Dusp1 (dual specificity phosphatase 1) 和 Rab1 (Rab1, member ras oncogene family) 做 RT-PCR 验证,对结果进行扫描、拍照,并用软件分析。从凝胶电泳图可以看到磁场辐射后的骨髓 MSCs 所选两个基因的 mRNA 水平均有不同程度的上调,与芯片结果一致(图 3)。



内参照基因

目标基因

图 3 内参照基因及目标基因 (Rab1 和 Dusp1) 的 RT-PCR 扩增结果电泳图

讨 论

基因芯片是一种快捷、高通量分析基因表达的有效工具,在分子生物学水平同时研究成千上万条基因的表达,现已被应用于基因表达谱检测、基因功能研究、探索疾病的原因及机制、发现可能的诊断等多方面。Tomioka 等^[3]利用芯片技术研究口腔鳞状上皮细胞癌患者的基因表达,结果表明有 47 个基因与其肿瘤发生相关,为探索口腔鳞状上皮细胞癌发生的分子机制以及预测其侵袭性提供了新的思路和线索。在磁场对细胞基因表达的影响方面,Chang 等^[4]研究了 15 Hz、0.1 mT 的电磁场对新生小鼠颅骨成骨细胞的增殖分化活性以及基因表达水平的影响,结果表明电磁场能促进成骨细胞增殖,降低其碱性磷酸酶活性,使骨保护素 mRNA 表达上调,RANKL (the receptor activator of NF-kappaB ligand, NF- κ B 配体的受体激活因子) mRNA 表达下调,在探索电磁场对成骨细胞的具体作用机制上取得重大进展。Czyz 等^[5]以半定量 RT-PCR 技术检测出 50 Hz 电磁场辐射后的 p53 缺陷性多能胚胎干细胞的 c-jun、p21 和 egr-1 基因表达水平上调,从而间接地验证抑癌基因 p53 对电磁场细胞效应的影响可能是通过改变转录调控基因的表达水平来实现的。

我们选择了 2 个基因进行 RT-PCR 验证。Dusp1 又名丝裂素活化蛋白激酶磷酸酶 1 (mitogen activated protein kinase phosphatase 1, MKP1),是一种典型的早期快反应基因 (immediate early gene, IEG),在组织中分布广泛,在心脏及肝脏中的含量最高。其表达蛋白是一种双重底物特异性蛋白磷酸酶,可使丝裂素活化

蛋白激酶上的苏氨酸/酪氨酸去磷酸化而失活,在环境应激的细胞反应以及细胞增殖的负向调控过程中起着重要的作用。多种环境因素(如细胞有丝分裂素、氧化应激、热休克、紫外线辐射、高渗透压、激素、缺氧及 Ca^{2+} 等)均能够诱导 Dusp1 基因的表达^[6,7]。此外,有研究表明,Dusp1 基因是肿瘤抑制基因 P53 的转录对象,发挥诱导细胞周期停滞和凋亡的重要作用^[8]。Denkert 等^[9]也证实,与正常组织相比,Dusp1 基因在原发性卵巢肿瘤组织中的表达明显降低。就此而言,Dusp1 基因可能有类似肿瘤抑制基因的作用。Rab1 是 ras 癌基因家族成员,编码蛋白是一种调节型的单体 GTPase,由大约 200 个氨基酸组成,局限于内质网和高尔基体中,其活性的调节是通过形成 Rab-GDP 结合体及 GTP 水解的循环来实现的,在由囊泡介导的、从内质网到高尔基体的胞内蛋白质转运过程中起着重要作用^[10]。同时 Rab1 也调节 G 蛋白偶联受体(血管紧张素 II 一型受体、 β_2 肾上腺素能受体)从内质网到细胞表面的转运过程及其在细胞表面的表达,从而调控受体介导的信号转导^[11]。

本实验中所选用基因特异寡聚核苷酸芯片特异性高、杂交时间短,从而排除了用传统 cDNA 芯片测定基因表达谱时所存在的特异性差、须建立 cDNA 探针库、杂交时间长等缺点。

通过分析本芯片实验结果,我们发现骨髓 MSCs 经 50 Hz、1.2 mT 电磁场辐射后基因表达谱发生改变,这些差异表达基因可分为细胞增殖分化调控基因、转录调控基因、细胞代谢相关基因、应激反应相关基因以及一些功能混杂基因和功能未知基因 5 个主要的功能群,为我们选择电磁场辐射相关水平的系统研究提供了参考依据。同时我们应该看到虽然对某些差异表达基因有一定了解,但对许多表达差异基因的功能及其在磁场对骨髓 MSCs 分化过程中的具体作用还不太清

楚,深入研究这些电磁场辐射相关基因的作用将为电磁场的临床运用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 方真华,吴华,马伟明,等. 50Hz 电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:1-4.
- [2] 赵敏,许建中,周强,等. 脉冲电磁场诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:5-8.
- [3] Tomioka H, Morita K, Hasegawa S, et al. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med, 2006, 35:206-211.
- [4] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics, 2004, 25:457-465.
- [5] Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, et al. Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells-the role of tumour suppressor p53. Mutat Res, 2004, 557:63-74.
- [6] Liu C, Shi Y, Du Y, et al. Dual-specificity phosphatase DUSP1 protects overactivation of hypoxia-inducible factor 1 through inactivating ERK MAPK. Exp Cell Res, 2005, 309:410-418.
- [7] Ryser S, Tortola S, vanHaasteren G, et al. MAP Kinase Phosphatase-1 gene transcription in rat neuroendocrine cells is modulated by a calcium-sensitive block to elongation in the first exon. J Biol Chem, 2001, 276:33319-33327.
- [8] Li M, Zhou JY, Ge Y, et al. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. J Biol Chem, 2003, 278:41059-41068.
- [9] Denkert C, Schmitt WD, Berger S, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. Int J Cancer, 2002, 102: 507-513.
- [10] Allan BB, Moyer BD, Balch WE. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. Science, 2000, 289:444-448.
- [11] Duvernay MT, Filipeanu CM, Wu G. The regulatory mechanisms of export trafficking of G protein-coupled receptors. Cell Signal, 2005, 17:1457-1465.

(修回日期:2006-09-07)

(本文编辑:松 明)

· 短篇论著 ·

早期康复训练配合理疗对腰椎间盘突出症患者术后神经功能恢复的影响

李庆波 王传英 肖宛平 王集锴

腰椎间盘突出症是常见病之一,临床针对反复发作并有神经压迫症状的患者,若经正规非手术治疗无效或疗效较差,多采用手术治疗;但患者术后往往忽视康复干预,结果容易出现较多并发症,严重影响患者手术疗效,其中最常见的并发症为术后残

留腰痛^[1]。本研究通过给予腰椎间盘突出症患者术后积极康复治疗,观察其对神经功能及并发症的影响。现将相关结果报道如下。

一、资料与方法

共选取 2000 年 7 月至 2006 年 4 月间来我院就诊的 176 例(共 196 个患椎间盘)腰椎间盘突出症患者,所有患者均给予椎板开窗减压术或髓核摘除术。于手术结束后将上述患者分为康

作者单位:250033 济南,山东大学第二医院骨科(李庆波、王集锴);遵义医学院附属医院康复科(王传英、肖宛平)