

# 芯片分析自发恶性转化的大鼠骨髓间充质干细胞的基因表达谱

高芸, 单忠艳, 滕卫平, 王红, 张红梅

中国医科大学附属第一医院 内分泌研究所, 沈阳 110001

**摘要:** 为解析骨髓间充质干细胞(MSCs)自发恶性转化的遗传学基础, 探讨其临床可用性和安全性。采用密度梯度离心法和贴壁筛选法分离大鼠 MSCs, 流式细胞仪分析细胞同源性, 体外培养 6 个月后获得自发恶性转化的 MSCs。应用基因芯片分析自发恶性转化的 MSCs 中差异表达的基因, 进一步采用实时定量 RT-PCR 验证芯片分析结果。MSCs 发生自发恶性转化后, 有 44 条差异表达基因, 其中 21 条基因表达上调, 23 条基因表达下调。经实时定量 RT-PCR 检测差异表达基因结果与芯片分析结果一致。Wnt、SHH、Notch、TGF $\beta$ /BMPs 等信号转导通路上的若干基因在 MSCs 自发恶性转化中起到重要作用。

**关键词:** 间充质干细胞, 基因表达谱, 基因芯片, 自发恶性转化

## Gene expression profile of rat mesenchymal stem cell spontaneous transformation determined by cDNA microarray analysis

Yun Gao, Zhongyan Shan, Weiping Teng, Hong Wang, and Hongmei Zhang

Institute of Endocrinology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

**Abstract:** To study the genetic basis of spontaneous transformation of mesenchymal stem cells (MSCs) and clinical application value MSCs were isolated by combining utilization of density gradient centrifugation and adherence screening. After cell homogeneity analysis by flow cytometry, spontaneous transformation MSCs were isolated after six-month *in vitro* expansion. Then cell total RNA was obtained with Trizol reagent and studied for gene expression profile. Differentially expressed genes between normal MSCs and spontaneous transformation MSCs in cDNA microarray were determined by real-time RT-PCR for validation of the microarray data. Forty-four genes were differentially expressed after spontaneous transformation of MSCs, among which 21 were up-regulated and 23 down-regulated. The result of real-time RT-PCR was in accordance with that of the cDNA microarray. Several genes in SHH, Notch, TGF $\beta$ /BMPs signal pathway play an important role in spontaneous transformation of MSCs.

**Keywords:** mesenchymal stem cell, gene expression profile, cDNA microarray, spontaneous transformation

骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓中的一种非造血干细胞, 具有

**Received:** May 31, 2008; **Accepted:** October 7, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30740087).

**Corresponding author:** Yun Gao. Tel: +86-24-23252956; E-mail: gaoyungao@hotmail.com

国家自然科学基金项目(No. 30740087)资助。

自我更新、增殖及多向分化的潜能,在体外可被诱导分化为骨、软骨、肌肉、脂肪和神经等组织细胞,是替代疗法、细胞移植和基因治疗首选的种子细胞之一<sup>[1,2]</sup>。MSCs易于分离、体外扩增及进行遗传修饰,成为基因治疗的理想靶细胞。由于活体内MSCs数量少且缺乏特征性标志,不能预期分离,最近的资料都是基于对体外培养扩增的细胞所做的研究结果。但是,体外培养的MSCs可能在基因表达、分化能力、扩增潜能和免疫表型方面发生显微镜难以发现的变化。随着研究的深入,一些研究者相继报道了干细胞在体外长期培养后会自发恶性转化<sup>[3,4]</sup>,因此MSCs在临床应用中的安全性仍不是很清楚。本研究采用基因芯片分析,解析MSCs发生自发恶性转化的分子机制,为MSCs的合理应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 大鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)的分离和培养

骨髓取自生后6~8周的大鼠股骨,DMEM(GIBCO)洗涤,离心沉淀血细胞,叠加到密度为1.073的percoll分离液(Sigma)上,离心后小心抽取单核细胞层,用间充质干细胞培养液(StemCell Technologies, Canada)悬起,接种到培养瓶(COSTAR)中,37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。细胞接近融合后继代培养,第3次传代的MSCs作为正常MSCs。体外培养6个月以上,获得自发恶性转化的MSCs,用于基因芯片分析。

### 1.2 流式细胞仪分析

采用间接荧光标记法,特异性一抗CD34、CD44、CD45及荧光(FITC)标记二抗均购自美国SANTA CRUZ公司。

### 1.3 接种实验

用立体定向装置分别将 $1 \times 10^6$ 个正常MSCs和自发恶性转化的MSCs植入大鼠脑内(垂直于颅骨;坐标:前囟后4 mm、右侧2 mm,硬膜下3 mm),4周后进行脑组织切片染色,观察是否有实体瘤形成<sup>[5]</sup>。

### 1.4 RNA的提取

收集约 $1 \times 10^7$ 个正常大鼠MSCs和自发恶性转化的大鼠MSCs,用TRIzol(Invitrogen, CA)提取细胞总RNA,采用RNA 6000 Nano芯片实验室试剂盒

(Agilent Technologies)检验所提RNA的含量及纯度,确认总RNA中18S、28S RNA的完整性。

### 1.5 基因芯片检测及分析

基因芯片Rat Genome230 2.0 arrays由美国Affymetrix公司提供(含30 000个点),依次进行杂交、洗片、扫描与分析操作。应用Affymetrix Microarray Suite软件进行图像处理, GeneSpring GX (Agilent Technologies)软件分析荧光信号强度和比值。

### 1.6 定量RT-PCR检测芯片分析的结果

取2 μg总RNA逆转录,以GAPDH基因的表达作为内参,进行实时定量PCR检测,每样本设3个复孔,以相对定量方法计算基因表达差异。PCR反应条件为95°C预变性5 min; 95°C 20 s, 56°C 20 s, 72°C 20 s,共40个循环。

## 2 结果

### 2.1 大鼠MSCs的培养和流式细胞仪分析

结合密度梯度离心法和贴壁筛选法,从大鼠股骨骨髓中分离MSCs,用流式细胞仪分析MSCs的特征性表面标志,以确定培养MSCs的同源性。根据检测结果,CD34(造血细胞系标志)、CD45(白细胞表面标志)均为阴性;CD44(HCAM)表达阳性(>95%)。另外,CD71、Sca21、Thy21(CD90)等干细胞表面抗原都可检测到。

### 2.2 自发恶性转化的大鼠MSCs的获得和同种异体移植实验

研究显示,MSCs在6~8周的体外扩增期内是相对安全的,但长时间体外培养,MSCs会发生自发恶性转化。在进行恶性胶质瘤基因治疗的研究中,发现大鼠MSCs体外长期继代培养6个月以后,大部分MSCs进入衰老期,少数MSCs细胞形态明显变小,增殖速度明显加快,发生自发恶性转化。将自发恶性转化的MSCs和传代第3次的正常MSCs分别接种于大鼠脑内,进行同种异体移植实验。结果发现,自发恶性转化的MSCs接种后出现实体瘤,而正常MSCs接种组没有发现异常增生(图1)。

### 2.3 总RNA抽提结果

自发恶性转化的MSCs的 $A_{260}/A_{280}$ 值为1.75,而对照正常的MSCs的 $A_{260}/A_{280}$ 值为1.82,电泳结果证实提取到高纯度的总RNA(图2)。

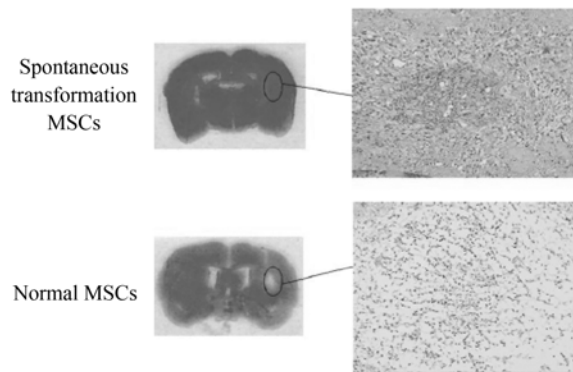


图1 比较自发恶性转化的MSCs和正常MSCs接种大鼠脑后的成瘤性

Fig. 1 Comparison of hyperplasia formation after implant spontaneous transformation MSCs or normal MSCs into SD rat brain.

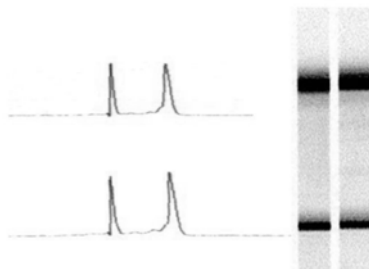


图2 RNA电泳图

Fig. 2 Lab-on chip electrophoresis.

表1 MSCs自发恶性转化中表达上调的基因

Table 1 Gene up-regulation in spontaneous transformation of MSCs

Gene name	Ratio	Function
Secreted frizzled-related protein 2 ( <i>Sfrp2</i> )	118.50	Signal transduction
Frizzled-related protein ( <i>Frzb</i> )	49.49	Signal transduction
Matrix metalloproteinase 13 ( <i>MMP13</i> )	16.82	Proteolysis
Matrix metalloproteinase 11 ( <i>MMP11</i> )	9.11	Proteolysis
Secreted frizzled-related protein 1 ( <i>SFRP1</i> )	7.13	Signal transduction
SRY-box containing gene 4 ( <i>Sox 4</i> )	3.52	Regulation of transcription
Smoothed homolog ( <i>Smo</i> )	3.20	Signal transduction
Signal transducer and activator of transcription 1 ( <i>Stat 1</i> )	3.06	Regulation of transcription
V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog ( <i>Maf</i> )	3.03	Regulation of transcription
Pleckstrin homology domain containing, family G member 5 ( <i>Plekhg5</i> )	2.95	Signal transduction
Peroxisome proliferator activated receptor delta ( <i>PPARD</i> )	2.93	Signal transduction
<i>Notch 1</i>	2.76	Epithelial to mesenchymal transition
Matrix metalloproteinase 14 ( <i>MMP14</i> )	2.75	Proteolysis
V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene, protein B ( <i>MafB</i> )	2.57	Regulation of transcription
Minichromosome maintenance deficient 3 ( <i>MCM3</i> )	2.41	Cell cycle
Hairy and enhancer of split 1 ( <i>Hes1</i> )	2.29	Signal transduction
Signal transducer and activator of transcription 3 ( <i>Stat 3</i> )	2.16	Regulation of transcription
Radical fringe gene ( <i>Rfng</i> )	2.15	Signal transduction
Signal transducer and activator of transcription 2 ( <i>Stat 2</i> )	2.12	Regulation of transcription
Cell division cycle 25 ( <i>Cdc25</i> )	2.04	Cell cycle
Cyclin-dependent kinase 4 ( <i>Cdk4</i> )	2.02	Cell cycle

## 2.4 自发恶性转化的MSCs的基因表达图谱变化

为了从基因表达的角度探讨自发恶性转化的MSCs和正常MSCs之间的差异,本试验采用芯片分析基因表达图谱。基因芯片分析的结果显示,有44条基因的表达有显著性差异(表达差值在2倍以上,即Ratio < 0.5或者Ratio > 2),其中上调基因21条(表1),下调基因23条(表2)。上调最高比值达118.5倍,下调最低比值达0.02。针对芯片分析中表达有变化的基因设计特异性引物采用实时定量RT-PCR分析确认基因芯片的分析结果,并重点关注一些跟干细胞增殖分化密切相关的基因。结果显示,与正常MSCs相比较,在自发恶性转化的MSCs中,细胞周期相关基因如*MCM3*、*cdc25*、*CDK4*高表达,Wnt受体的竞争性拮抗物*Frzb*、*Sfrp1*、*Sfrp2*的表达显著升高。此外,*Notch1*、*Smo*、*Hes1*的表达也升高,同时发现基质金属蛋白酶*MMP11*、*MMP13*、*MMP14*的表达也显著升高,提示基质金属蛋白酶的表达升高将导致自发恶性转化的MSCs侵袭能力增强。另一方面,在自发恶性转化的MSCs中,TGF-β信号转导通路上的相关基因,如*TGFβ2*、*TGFβ3*、*TGFβ receptor 1*、*BMP3*和*BMP5*的表达减弱。此外,*FGF*

表 2 MSCs 自发恶性转化中表达下调的基因

Table 2 Gene down-regulation in spontaneous transformation of MSCs

Gene name	Ratio	Function
<i>CD133</i>	0.02	Cell surface antigens
Neuregulin 1 ( <i>Ng1</i> )	0.02	Embryonic development
Down syndrome critical region gene 1-like 1 ( <i>Dscr111</i> )	0.04	Embryonic development
Neuregulin 1 ( <i>Nrg1</i> )	0.06	Nervous system development
<i>CD38</i>	0.07	Cell surface antigens
Fibroblast growth factor 1 ( <i>FGF1</i> )	0.07	Signal transduction
Fibroblast growth factor 18 ( <i>FGF18</i> )	0.08	Signal transduction
Melanoma cell adhesion molecule ( <i>MCAM</i> )	0.11	Cell adhesion
SRY-box containing gene 11 ( <i>Sox11</i> )	0.13	Regulation of transcription
Transforming growth factor, beta 2 ( <i>TGFβ2</i> )	0.15	Signal transduction
Bone morphogenetic protein 3 ( <i>BMP3</i> )	0.20	Signal transduction
Bone morphogenetic protein 5 ( <i>BMP5</i> )	0.26	Signal transduction
Moesin ( <i>MSN</i> )	0.27	Cell motility
Retinoblastoma 1 ( <i>RB1</i> )	0.30	Cell cycle
Decorin ( <i>DCN</i> )	0.32	Extracellular matrix organization
Nerve growth factor, beta ( <i>NGFB</i> )	0.34	Nervous system development
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A ( <i>CDKN2A</i> )	0.35	Cell cycle
Transforming growth factor, beta 3 ( <i>TGFβ3</i> )	0.36	Signal transduction
Sulfatase 1 ( <i>Sulf1</i> )	0.39	Apoptosis
<i>Numb</i>	0.41	Nervous system development
Transforming growth factor, beta receptor 1 ( <i>TGFβR1</i> )	0.42	Embryonic development
Inhibitor of DNA binding 1 ( <i>ID1</i> )	0.47	Regulation of transcription
Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 ( <i>TGFβi1</i> )	0.50	Regulation of transcription

和干细胞标识蛋白 *CD133* 的表达显著下降。一些参与调节神经发育和分化的基因, 如 *Ng1*、*Nrg1* 和 *NGFB* 等的表达也减弱。

### 3 讨论

MSCs 可特异性聚集到肿瘤或者损伤部位, 为肿瘤基因靶向治疗和组织再生提供了新的细胞载体<sup>[6,7]</sup>。随着 MSCs 在临床的广泛应用, 它潜在的恶性转化能力引起普遍的关注, 给其在临床应用的长期安全性提出了警示。由于活体内 MSCs 数量少且缺乏特征性标志, 不能预期分离, 因此最近的资料都是采用体外培养扩增的 MSCs 进行再生修复和基因治疗的实验研究。用离体培养系统来处理 MSCs, 增加了外界因素对细胞的影响, 易导致细胞的不稳定。随着研究的深入, 一些研究者相继报道 MSCs 在体外长期培养后会自发恶性转化, 移植至动物体内, 出现瘤样增生<sup>[8,9]</sup>。本试验在进行恶性胶质瘤基因治疗研究时, 发现大鼠 MSCs 体外长期继代培养 6 个月

以后, 出现自发恶性转化的 MSCs, 其增殖速度明显加快, 且具有很强的侵袭移动能力, 接种大鼠脑内出现实体瘤。

为了解析 MSCs 的可用性和安全性, 研究自发恶性转化 MSCs 的生物学特性和发生转化的分子机制, 以第 3 次传代的正常 MSCs 做对照, 用基因芯片筛选自发恶性转化的 MSCs 中表达有差异的基因图谱。芯片结果显示, MSCs 自发恶性转化后, 在干细胞的自我更新、多向分化潜能等生物学特性中扮演重要角色的 Wnt、SHH、Notch、TGFβ/BMPs 等信号转导通路上的若干基因的表达谱发生了变化, 提示这些信号转导通路在 MSCs 自发恶性转化中起到重要作用。

此外, 成体干细胞和肿瘤干细胞有一定程度的相似性, 共享一些信号传导通路, 如 Wnt、SHH、Notch 途径; 成体干细胞体外扩增成瘤既是对肿瘤干细胞学说的进一步证实, 也为研究肿瘤发生的干细胞起源提供了重要的模型。研究 MSCs 如何失去

自身的调控能力而发生恶性转化的分子机制,也为肿瘤干细胞发生、发展的研究提供参考。

## REFERENCES

- [1] Mauney JR, Blumberg J, PirumM, *et al.* Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bones scaffolds *in vitro*. *Tissue Eng*, 2004, **10**(1-2): 81-92.
- [2] Kon E, Muraglia A, Corsi A, *et al.* Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 2000, **49**(3): 328-337.
- [3] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 2005, **65**(8): 3035-3039.
- [4] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, *et al.* Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*, 2006, **24**(4): 1095-1103.
- [5] Li S, Gao Y, Tokuyama T, *et al.* Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. *Cancer Lett*, 2007, **251**(2): 220-227.
- [6] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 10344-10349.
- [7] Nakamizo A, Marini F, Amano T, *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*, 2005, **65**: 3307-3318.
- [8] Wang Y, Huso DL, Harrington J, *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, 2005, **7**(6): 509-519.
- [9] Xu W, Qian H, Zhu W, *et al.* A novel tumor cell line cloned from mutated human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells. *Oncol Rep*, 2004, **12**(3): 501-508.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 逆境植物细胞生物学

简令成 王红著

978-7-03-022365-4 ¥ 70.00 2008年12月出版

#### 内容简介

本书分为两篇。第一篇是正常条件下植物细胞的结构与功能,包括11章,系统地叙述了植物细胞内各种细胞器的结构与功能,作为逆境中细胞结构与功能变化对比分析的基础。第二篇是低温、干旱和盐胁迫下植物细胞结构与功能的反应与适应,包括13章,叙述了各类细胞器的结构与功能、物质代谢以及基因表达在逆境中的变化,全面反映了当今国际上在植物抗寒、抗旱和抗盐机制及基因工程研究中细胞和分子水平上的最新研究成果,内容丰富,具有较高的学术水平。

本书可供综合性高等院校、农林院校及科研机构植物生物学、植物生理学、细胞生物学、分子生物学等专业的研究人员与教学人员、研究生和大学生参考。

