

血液疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000510

内参基因 GAPDH 和 β -actin 在 BMP9 诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化过程中的表达情况

杨伦韵, 张晓艳, 廉 静, 罗进勇, 唐 敏

(重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察常用内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和 β 肌动蛋白(β -actin)在骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic proteins 9, BMP9)诱导的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化过程中表达情况, 以确定相关研究的内参基因。**方法:**检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)确定 BMP9 诱导的 MSCs (包括 C3H10、C2C12 和 MEF)向成骨分化; 以 real-time PCR 分别检测 0、1、3、5、7 d GAPDH 和 β -actin 的 mRNA 表达水平; 以 Western blot 检测 GAPDH 和 β -actin 蛋白。**结果:**(1) β -actin 在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中 mRNA 表达水平逐渐升高, 0 d 与 5 d β -actin 的 mRNA 表达量存在统计学差异(C3H10、C2C12 和 MEF 的 P 值均为 0.000, GAPDH 的 mRNA 表达水平未见明显改变($P>0.05$); β -actin 蛋白表达量随成骨分化逐渐增加, 而 GAPDH 蛋白表达未见明显变化。**结论:**在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中, GAPDH 比 β -actin 更适合做内参。

【关键词】内参基因; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 骨形态发生蛋白 9

【中图分类号】R322.71; R329.21

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-30

Expression of GAPDH and β -actin during osteogenic differentiation of BMP9-induced mesenchymal stem cell

Yang Lunyun, Zhang Xiaoyan, Lian Jing, Luo Jinyong, Tang Min

(Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the changes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin gene expression during bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation to the osteogenic lineage induced by bone morphogenetic proteins 9 in order to select more suitable reference genes. **Methods:** Alkaline phosphatase (ALP) was used as a marker to identify BMP9-induced MSCs' osteogenic differentiation; and mRNA and protein of GAPDH and β -actin were detected by real-time PCR and Western blot respectively on 0, 1, 3, 5, 7 d during MSCs' osteogenic differentiation. **Results:** (1) mRNA expression of β -actin was significantly increased during osteogenic differentiation; there were significant differences in mRNA expression of β -actin between d0 and d5; no apparent change was observed in GAPDH. Results showed that the protein level of β -actin was increased gradually especially on d5 and d7, while no apparent change was observed in GAPDH. **Conclusion:** During BMP9 induced MSCs' osteogenic differentiation, GAPDH is more suitable than β -actin as internal reference gene.

【Key words】reference gene; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; bone morphogenetic proteins 9

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类存在骨髓等组织内的非造血干细胞,

作者介绍: 杨伦韵, Email: lunyun1989@163.com,

研究方向: 骨重建。

通信作者: 唐 敏, Email: catom@126.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC2012jjA10004); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (KJ130305)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150309.0025.007.html>
(2015-03-09)

其可分化为成骨、成脂、成肌等多种细胞^[1-5], 因此在再生医学中, 其一直被作为种子细胞用于多种组织的修复, 也被用于难治性骨折、骨质疏松等骨科疾病治疗的研究。课题组前期研究发现骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic proteins 9, BMP9)比广泛应用的 BMP2、BMP7 等具有更强的体内体外成骨作用^[6], 但具体机制需要进一步研究。在机制研究中, 选择合适的内参基因非常重要, 一般选择不受处理

因素影响,表达稳定的管家基因,以消除不同标本由于 RNA 提取以及逆转录效率不同导致的结果差异。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和 β 肌动蛋白(β -actin, β -actin)存在众多生物体中,被认为具有几乎所有组织都高水平表达、在同种细胞或组织中的表达恒定的特点,因此被广泛运用于 RT-PCR、Western blotting 等实验作为内参,其也是目前成骨分化的研究中常用的内参。然而并没有文献报道对 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化中的 GAPDH 和 β -actin 表达变化进行分析,了解其是否受处理因素的影响,适合成为相关研究的恰当的内参。本研究主要目的是观察和比较 GAPDH 和 β -actin 在 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化过程中的 mRNA 和蛋白水平变化情况,以确定哪个基因更适用于 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化研究中的内参基因。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒及主要试剂

AdBMP9(芝加哥大学医学中心何通川教授惠赠并由本实验室保存),小鼠 MSCs-C3H10, C2C12, MEF(重庆医科大学分子实验室保存),DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(GIBCO 公司),青/链霉素(Hyclone 公司),PBS 粉(北京中杉公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Promega 公司),SYBR II (TaKaRa 公司),凝胶成像仪(BIO-RAD 公司),荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的培养及其诱导分化 复苏细胞,在 10%胎牛血清,1%青霉素/链霉素的 DMEM 高糖培养基中,在 37 °C, 5% CO₂ 条件下进行培养,对数期传代。将 MSCs 接种于 24 孔板中,待细胞融合至 30%~40%时感染适当滴度的 AdBMP9 (30%左右),诱导其向成骨分化。

1.2.2 成骨指标-ALP 染色 MSCs 在 AdBMP9 处理 0、1、3、5、7 d 后,吸去培养基, PBS 清洗 2 次,加入 0.1 mg/ml naphthol AS-MX 碱性磷酸酶溶液和 0.6 mg/ml Fast Blue RR salt 混合液 200 μ l 进行染色,30 min 后观察染色结果。

1.2.3 GAPDH 和 β -actin 基因表达水平的检测 将不同的 MSCs 接种于 6 孔板中,在细胞融合至 40%~60%后,感染适当滴度的 AdBMP9,诱导 MSCs 向成骨分化。分别在 0、1、3、5、7 d 时收集细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,通过琼脂糖电泳验证 mRNA 的质量并进行定量,取 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA,用实时定量 PCR 检测各组细胞内参基因 mRNA 的表达情况。实时定量 PCR 的反应体系为 10 μ l。反应条件为:95 °C 2 min;95 °C 10 s,57 °C 30 s,72 °C 20 s,40 个循环。为

了尽可能减少实验本身所导致误差,本研究在 96 孔上同时对 2 个内参基因进行实时定量 PCR。所有引物均由上海百力格生物技术有限公司合成,基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列、产物大小和退火温度

Tab.1 Primer sequences, product size and temperature

引物名	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(°C)
β -actin	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	165	58
	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'		
GAPDH	5'-GGCTGCCGAGAACATCAT-3'	122	57
	5'-CGGACACATTGGGGGTAG-3'		
ALP	5'-CCCATGTGTATGGCGTAT-3'	123	58.5
	5'-CGGTAGGGAGAGCACAGC-3'		

1.2.4 GAPDH 和 β -actin 蛋白表达水平的检测 采用 Western 印迹方法检测 2 种常见内参基因蛋白水平的表达:不同的 MSCs 接种于 6 孔板中培养,在细胞融合至 40%~60%后,加入 AdBMP9 进行诱导(感染量 30%左右),使其向成骨分化,分别在诱导 0、1、3、5、7 d 时收集各组细胞备用。用冰 PBS 洗涤细胞 3 次,并将残余液体吸净。6 孔板每孔加 0.2 ml 细胞裂解液,置于冰上 5 min;用橡皮刮刮下细胞,移入离心管;4 °C 13 000 g 离心 20 min,取上清至另一个 EP 管中,并加入 50 μ l 的 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,最后沸水浴 5~10 min,分装后-20 °C 保存备用。配制浓缩胶和分离胶,100 V 恒压电压下 SDS-PAGE 凝胶电泳,200 mA 恒流电流转膜,依次加一抗和二抗孵育、洗膜,化学法发光底物进行显影。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行统计分析,数据以平均值和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 种 MSCs 在 BMP9 诱导下成骨分化情况

BMP9 腺病毒诱导 MSCs 0、1、3、5、7 d 后,ALP 的活性逐渐增强,在第 7 天时最强(图 1),表明 MSCs 成骨诱导成功。

2.2 BMP9 诱导成骨分化过程中 2 种内参基因 mRNA 水平的变化

如图 2 所示, β -actin 的 mRNA 水平在 3 种 MSCs 诱导分化过程中并不稳定,尤其在 5 d 有明显的增加,与诱导 0 d 时相比较差异有统计学意义($P<0.01$)。但 GAPDH 在诱导分化过程中未见明显变化。

2.3 BMP9 诱导下成骨分化过程中 2 种内参蛋白水平的表达情况

Western blot 结果显示在 3 种 MSCs 诱导分化过程中, β -actin 的表达不稳定。在诱导分化第 5 天尤为明显。而 GAPDH 的表达未见明显变化,与 mRNA 的表达情况相吻合。

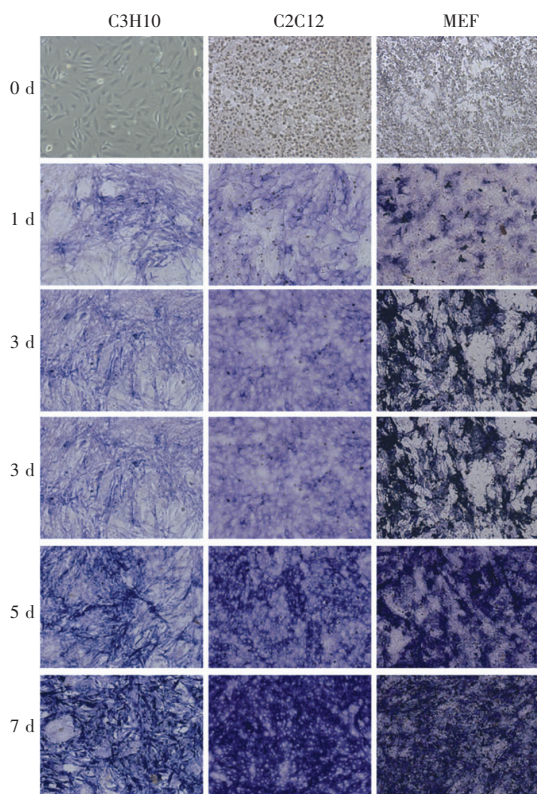
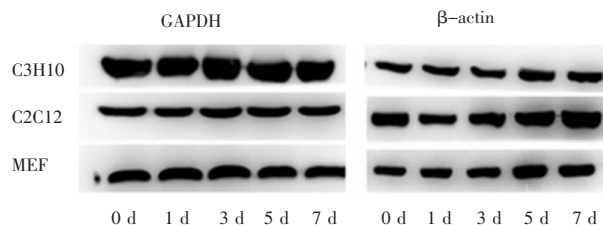


图 1 3 种 MSCs 成骨分化指标 ALP 染色 (100 ×)

Fig.1 The ALP staining of MSCs at 0, 1, 3, 5, 7 d (100 ×)

图 2 3 种 MSCs 分化过程中 GAPDH 和 β -actin 的蛋白表达情况Fig.2 Protein expression of GAPDH and β -actin during MSCs osteogenic differentiation

2.4 MSCs 成骨分化早期指标 ALP 相对于不同内参其 mRNA 水平的变化

作为成骨早期指标 ALP, 本研究选择了 ALP 作为靶基因, 选用该 2 种内参基因 GAPDH、 β -actin 进行校正, 以评估两者在 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化过程中作为内参基因的价值。如表 3 所示, 在 C3H10、C2C12、MEF 3 种 MSCs 中, 由 GAPDH 作为内参时, 第 5 天 ALP mRNA 水平分别升高倍数分别为 23.384、33.891、33.045; 而以 β -actin 为内参, 其升高倍数分别为 3.326、5.596、1.655。用 GAPDH 作为内参基因作校正得出的 ALP 表达量与图 1 所示更趋于一致, 故相对来说 GAPDH 更适合作为 MSCs 成骨分化过程中的内参基因。

表 2 3 种 MSCs 分化过程中 GAPDH 和 β -actin 的 mRNA 的表达情况Tab.2 mRNA expression of GAPDH and β -actin during MSCs osteogenic differentiation

分组	GAPDH mRNA 水平 (n=3)			β -actin mRNA 水平 (n=3)		
	C3H10	C2C12	MEF	C3H10	C2C12	MEF
0 d	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.092 ± 0.043	1.000 ± 0.000
1 d	1.071 ± 0.252	1.314 ± 0.269	1.183 ± 0.368	4.247 ± 0.692	1.000 ± 0.000	2.352 ± 0.839
3 d	1.115 ± 0.189	1.667 ± 0.423	1.118 ± 0.364	4.986 ± 0.273	2.106 ± 0.643	6.115 ± 2.432
5 d	1.255 ± 0.208	2.295 ± 0.688	1.254 ± 0.208	8.403 ± 0.490	7.240 ± 1.405	12.803 ± 1.985
7 d	1.239 ± 0.218	1.887 ± 0.558	1.339 ± 0.277	5.422 ± 0.412	7.044 ± 1.182	4.558 ± 1.156
F 值	0.943	3.325	1.313	109.334	39.938	25.543
P 值	0.478	0.056	0.330	0.000	0.000	0.000
P1 值	0.664	0.480	0.348	0.000	0.900	0.318
P3 值	0.485	0.149	0.066	0.000	0.184	0.003
P5 值	0.141	0.070	0.202	0.000	0.000	0.000
P7 值	0.164	0.095	0.099	0.000	0.000	0.200

注: P1, 1 d 与 0 d 比较, $P < 0.05$; P3, 3 d 与 0 d 比较, $P < 0.05$; P5, 5 d 与 0 d 比较, $P < 0.05$; P7, 7 d 与 0 d 比较, $P < 0.05$

表 3 2 种内参基因校正成骨早期指标 ALP 的相对表达量

Tab.3 Relative expression of the two commonly reference genes

分组	ALP mRNA 水平/GAPDH (n=3)			ALP mRNA 水平/ β -actin (n=3)		
	C3H10	C2C12	MEF	C3H10	C2C12	MEF
0 d	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.092 ± 0.043	1.000 ± 0.000
5 d	23.384 ± 1.231	29.558 ± 4.681	26.712 ± 4.531	3.326 ± 0.857	5.596 ± 0.683	1.655 ± 0.444
t 值	-31.475	-10.566	-9.828	-4.699	-11.646	-2.550
P 值	0.001	0.009	0.010	0.042	0.007	0.126

3 讨论

RT-PCR 和 real-time PCR 是检测基因表达的常用方法,尤其是后者实现了 PCR 由定性到定量,具有快速准确、灵敏性高、特异性强等特点。作为一种强有力检测基因表达谱的方法,需要在分析中选用一种或多种合适的内参基因,以对目的基因的表达量进行校正从而提高该方法的灵敏度和重复性。理想的用于归一化的基因应在所研究的各种试验因素条件下均恒定表达。但是,大量的研究结果表明任何一种内参基因在所有的试验条件下都恒定表达是不可能的,在不同类型的细胞、在细胞生长的不同阶段,内参基因的表达都有可能变化。因此,在进行基因表达分析前都应该进行内参基因的验证,选定表达较为稳定的内参基因用于对目的基因表达量的校正,以期获得比较真实可靠的结果^[7]。

MSCs 成骨细胞分化的过程中基因表达分析中常用的内参基因有 18 S rRNA、GAPDH 和 β -actin 等,也有采用基于几何归一化策略(BestKeeper 指数),平均 3 个管家基因 GAPDH、泛素化蛋白 C(Ubiquitin C)和 RNA 聚合酶 II (RNA Polymerase II) 的表达水平作为内参基因的表达水平,但遗憾的是在这些研究中并没有更多的证据证实,所选择的内参基因没有随着处理因素发生变化,从而确保在这些研究中作为内参基因的可靠性,这或许是导致研究重复性差,甚至出现相反结论的原因之一^[8-9]。

基于上述的观点,本工作对在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化中最常用的两种管家基因 GAPDH 和 β -actin 表达稳定性进行了分析,结果显示 GAPDH 在 C3H10、C2C12、MEF 3 种 MSCs 中表达较为稳定,其 mRNA 和蛋白表达不受 BMP9 的影响;而 β -actin 则表现出较大波动,该结果与 Goossens K 等人提出 β -actin 表达并不稳定,不适合于做内参基因^[10]的观点相似;而与 Quiroz^[11]的在干细胞向成骨分化研究中提出的 β -actin 与 GAPDH 等比较稳定性更高不一致;其可能的原因与选择的细胞株,处理因素有关。

本文结果表明,在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中,常用的内参基因 GAPDH 相对来说表达

比较稳定,而 β -actin 在成骨分化过程中的表达则发生了较为明显的改变,可能与 β -actin 为细胞的骨架蛋白,在 BMP9 诱导的成骨分化过程中,与细胞形态有关,发生了明显改变。因此本研究的结论是在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中,选择 GAPDH 作为内参基因较 β -actin 更为科学。

参考文献

- [1] Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy[J]. Int J Mol Sci, 2013(14): 17986-18001.
- [2] Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal stem cells in bone regeneration[J]. Adv Wound Care, 2013, 2(6): 306-316.
- [3] Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study[J]. Transplantation, 2013, 95(12): 1535-1541.
- [4] Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial[J]. Stem Cells, 2014, 32(5): 1254-1266.
- [5] Vangsness CT Jr, Farr J 2nd, Boyd J, et al. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2014, 96(2): 90-98.
- [6] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther, 2004, 11(11): 1312-1320.
- [7] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 611-622.
- [8] Yang X, Hatfield JT, Hinze SJ, et al. Bone to pick: the importance of evaluating reference genes for RT-qPCR quantification of gene expression in craniosynostosis and bone-related tissues and cells[J]. BMC Res Notes, 2012(5): 222-231.
- [9] Jacobi A, Rauh J, Bemstein P, et al. Comparative analysis of reference gene stability in human mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation[J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(4): 1034-1042.
- [10] Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos[J]. BMC Dev Biol, 2005(5): 27.
- [11] Quiroz FG, Posada OM, Gallego-Perez D, et al. Housekeeping gene stability influences the quantification of osteogenic markers during stem cell differentiation to the osteogenic lineage[J]. Cytotechnology, 2010, 62(2): 109-120.

(责任编辑:冉明会)