

低频脉冲电磁场诱导大鼠骨髓间充质干细胞 ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 表达^{*}

李 凯¹, 姜 建², 姚晓林¹, 邱飞远¹, 严中琴¹, 吴文超³, 刘小菁³, 李 良^{1,3 Δ}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物医学工程研究室(成都 610041); 2. 四川大学华西医院
心血管内科(成都 610041); 3. 四川大学华西医院 心血管疾病研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨低频脉冲电磁场(PEMFs)对大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs) α -辅肌动蛋白-2(ACTN2)、 α -肌动蛋白(α -actin)和肌钙蛋白 T-2(TNNT2)表达的影响。**方法** 采用差速贴壁分离方法获取 rBMSCs, 选用第 3 代 rBMSCs 用于实验。实验分为 4 组: ①PEMFs 诱导组, 给予 50 Hz、1 mT 低频 PEMFs 刺激, 30 min/d, 分别刺激 10 d、15 d 和 20 d; ②5-氮胞苷(5-Aza)诱导组, 给予 10 μ mol/L 5-Aza 诱导 1 d, 然后采用完全培养液培养 10 d、15 d 和 20 d; ③PEMFs+5-Aza 诱导组: 采用 10 μ mol/L 5-Aza 诱导 1 d 后, 再给予 PEMFs 诱导组相同的处理; ④对照组, 采用完全培养液培养 10 d、15 d 和 20 d。通过倒置相差显微镜逐日连续观察细胞的生长状况和形态特征。采用实时荧光定量 PCR 方法检测 ACTN2 和 TNNT2 的 mRNA 表达, 采用 Western blot 方法检测 ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 的蛋白表达。**结果** 在各时间点, PEMFs 诱导组、5-Aza 诱导组和 PEMFs+5-Aza 诱导组的 ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 mRNA 表达与蛋白表达明显高于对照组。**结论** PEMFs 可促进体外培养的 rBMSCs 向心肌样细胞分化。

【关键词】 α -辅肌动蛋白-2 α -肌动蛋白 肌钙蛋白 T-2 脉冲电磁场

Expression of ACTN2, α -actin and TNNT2 in Rat Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Induced by Low Frequency Pulsed Electromagnetic Fields LI Kai¹, JIANG Jian², YAO Xiao-lin¹, QIU Fei-yuan¹, YAN Zhong-qin¹, WU Wen-chao³, LIU Xiao-jing³, LI Liang^{1,3 Δ} . 1. Institute of Biomedical Engineering, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Laboratory of Cardiovascular Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: lilianghx@163.com

【Abstract】 Objective To study the expression of Actinin, alpha 2 (ACTN2), α -actin and Troponin T type 2 (TNNT2) in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (rBMSCs) induced by low frequency pulsed electromagnetic fields (PEMFs). **Methods** The rBMSCs were isolated by adherence method and the third-generation of the rBMSCs were randomly divided into PEMFs groups, 5-Azacytidine groups (5-Aza), PEMFs +5-Aza group and control groups. PEMFs groups with complete medium were exposed to 50 Hz, 1 mT PEMFs for 30 min every day, lasting for 10 d, 15 d and 20 d, respectively. 5-Aza groups were induced by 10 μ mol/L 5-Aza for 1 day, then the medium was changed to complete medium without 5-Aza. PEMFs +5-Aza group were firstly induced by 10 μ mol/L 5-Aza for 1 day, and then were exposed to PEMFs according to the way of PEMFs group. And control groups were only cultured with complete medium. rBMSCs' growth status and morphological features were observed by inverted phase microscope. The mRNA expressions of ACTN2 and TNNT2 were determined by real-time fluorescent quantitation PCR. And the protein expression of the ACTN2, α -actin and TNNT2 were detected with Western blot method. **Results** The result showed that the mRNA expression level of the ACTN2 and TNNT2 and the protein expression level of the ACTN2, α -actin and TNNT2 were significantly higher in the PEMFs group, 5-Aza group and PEMFs+5-Aza group when compared with the control group. **Conclusion** PEMFs may induce rBMSCs differentiation into cardiomyocyte-like cells *in vitro*.

【Key words】 Actinin, alpha 2 α -actin Troponin T type 2 Pulsed electromagnetic fields

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem

cells, BMSCs) 由于具备增殖力强、多向分化潜能等特点, 被广泛用于干细胞治疗^[1,2]。研究表明, BMSCs 在一定的环境条件和刺激下能够向心肌样细胞分化。目前诱导 BMSCs 向心肌样细胞分化主要是利用 5-氮胞苷(5-azacytidine, 5-Aza)化学方法

^{*} 国家自然科学基金(No. 10972149, 30770534, 11072163)和四川省应用基础研究项目(No. 07JY029-077)资助

Δ 通讯作者, E-mail: lilianghx@163.com

诱导。据报道,骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)与成纤维细胞生长因子-4(fibroblast growth factors 4, FGF-4)联合作用能促进非心源性的细胞向心肌样细胞分化,改善心肌功能^[3,4]。但这些化学因子诱导效率低,且不适合临床的应用。近年来,电磁场的治疗作用逐渐被大家所认知并受到关注^[5]。最近的一些研究表明,电磁场具有复杂的生物学效应,不仅对细胞的增殖和周期产生影响,而且对细胞分化也有作用,脉冲电磁场(pulse electromagnetic field, PEMFs)治疗可导致哺乳动物细胞水平的生物化学变化,加速组织修复^[6]。因此,本研究假设低频 PEMFs 可以促进体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs)向心肌样细胞分化,在体外给予 rBMSCs 加载 PEMFs,并以 5-Aza 作为阳性对照组,采用实时荧光定量 PCR 方法、Western blot 方法检测 PEMFs 诱导对 rBMSCs 的 α -辅肌动蛋白-2(actinin, α 2, ACTN2)、 α -肌动蛋白(α -actin)和肌钙蛋白 T-2(troponin T type 2, TNNT2)基因和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要仪器和试剂

2 月龄 SD 大鼠,雌性,体质量为 100~150 g,购自四川大学实验动物中心,XT-2000B 骨质疏松治疗仪购自天津希统电子设备公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒与逆转录聚合酶链反应试剂盒均购自 TOYOBO 公司,胎牛血清(FBS)和 DMEM/F12 (HG)培养基购自 Gibco 公司,蛋白裂解液(RIPA)购自碧云天公司, β -肌动蛋白(β -actin,内参)抗体和 ACTN2 抗体购自 Santa 公司, α -actin 抗体和 TNNT2 抗体购自 Abcam 公司,Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自 Immobilon 公司,辣根酶标记的山羊抗小鼠抗体购自中杉金桥公司,5-Aza 和 RNA 酶抑制剂(DEPC)购自 Sigma 公司,底物化学发光(ECL)试剂盒和蛋白定量(BCA)试剂盒购自 Thermo 公司,缓冲液 Tris-Buffered Saline and Tween 20(TBST)购自碧云天公司。DMEM/F12 (HG)完全培养基:DMEM/F12(HG)+15%胎牛血清+100 U/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素。

1.2 rBMSCs 的分离、培养及鉴定

将 SD 大鼠采用断颈法处死,在无菌条件下分离股骨、胫骨,剔除软组织和骨膜,切除两端骨髓。

用 15 mL 注射器吸取 10 mL DMEM/F12(HG)培养基将骨髓冲入 15 mL 离心管内,轻轻吹散细胞,2000 r/min,离心 10 min,弃上清。加入 DMEM/F12(HG)完全培养基,血细胞计数板计数,以 3.2×10^6 cells/cm² 的密度接种于 25 cm² 的培养瓶,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 孵箱中培养。细胞于接种 3 h 首次换全液,弃培养上清(含未贴壁细胞);以后每 8 h 换液 1 次。第 3 d 后,每 3~4 d 换全液 1 次,待细胞生长至 70%~80% 融合状态,即用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。采用本实验室方法^[7,8]对第 3 代 rBMSCs 进行鉴定,我们所分离获得的 rBMSCs 不表达 CD34、CD45,表达 CD29、CD44,且在体外诱导条件下具有向成骨、成脂和成软骨分化的能力,符合国际 rBMSCs 鉴定标准^[9]。因此,我们选用第 3 代 rBMSCs 用于实验。实验细胞接种前进行台盼蓝细胞活力计数,细胞活力均在 98% 以上。

1.3 PEMFs 发射系统

本实验采用的 PEMFs 发射系统为 XT-2000B 骨质疏松治疗仪,所提供脉冲电磁场频率为 50 Hz,强度 1 mT。

1.4 实验分组

选用第 3 代 rBMSCs 用于实验。实验随机分为 PEMFs 诱导组、5-Aza 诱导组、PEMFs + 5-Aza 诱导组和对照组。

1.4.1 PEMFs 诱导组 将 rBMSCs 接种于 25 cm² 培养瓶,然后将培养瓶置于无菌盒内,放在 XT-2000B 骨质疏松治疗仪指定区域加载 PEMFs 刺激。PEMFs 参数为 50 Hz、1 mT,每天刺激 30 min,分别持续 10、15、20 d。

1.4.2 5-Aza 诱导组 接种于 25 cm² 培养瓶内的 rBMSCs 经 10 μ mol/L 5-Aza 诱导 1 d 后,换 DMEM/F12(HG)完全培养基,分别培养 10、15、20 d。

1.4.3 PEMFs+5-Aza 诱导组 将接种于 25 cm² 培养瓶内的 rBMSCs 给予 10 μ mol/L 5-Aza 诱导 1 d 后,换 DMEM/F12 (HG) 完全培养基,加载 PEMFs 刺激,其余培养条件和取样品时间同 PEMFs 诱导组。

1.4.4 对照组 将 rBMSCs 接种于 25 cm² 培养瓶内,采用完全培养基培养,不给予 rBMSCs 任何处理,取样品时间同 PEMFs 诱导组。

1.5 检测指标

1.5.1 rBMSCs 形态学变化 采用倒置相差显微镜连续观察 rBMSCs 形态特征的变化。

1.5.2 ACTN2 mRNA 和 TNNT2 mRNA 检测 在实验第 10、15、20 d,利用 Trizol 分别收集对照组、5-Aza 诱导组、PEMFs 诱导组和 PEMFs+5-Aza 诱导组的总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性后利用紫外分光光度计检测各组总 RNA 浓度,每组取 1.5 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA,然后以 1 μL cDNA 进行荧光定量 PCR 检测,总体系为 10 μL。目的基因相对表达量用目的基因的测量值与内参 GAPDH 测量值的比值表示。GAPDH(内参)、ACTN2 和 TNNT2 mRNA 的 real-time PCR 引物序列见表 1。

表 1 GAPDH mRNA、ACTN2 mRNA 和 TNNT2 mRNA 的 real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time PCR for GAPDH mRNA, TNNT2 mRNA and ACTN2 mRNA		
Gene	Primer sequence (5'-3')	Produce size (bp)
GAPDH	F:CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	118
	R:GGCATGGACTGTGGTCATGA	
ACTN2	F:GCCCTCATCCACAGACAC	200
	R:TGGTAGAAGCAGGAAACG	
TNNT2	F:AGGAAGACGAGCAAGAGG	187
	R:AAGTTGGGCATGAAGAGC	

1.5.3 ACTN2、α-actin 和 TNNT2 蛋白检测 在实验第 10、15、20 d,分别弃掉对照组、5-Aza 诱导组、PEMFs 诱导组和 PEMFs+5-Aza 诱导组的细胞培养液,用 4℃ 预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,加入 RIPA 蛋白裂解液,冰上裂解约 30 min,然后 12 000 r/min,4℃ 离心 10 min,取上清。利用 BCA 试剂盒对总蛋白进行定量,水浴变性 5 min,取含 20 μg 蛋白质的样品上样,经 100 g/L SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜上,37℃,5%脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入 1:100 稀释的内参 β-actin、1:100 稀释的 ACTN2 抗体、1:200 稀释的 α-actin 抗体和 1:300 稀释的 TNNT2 抗体,4℃ 过夜。第 2 d 用 TBST 清洗 3 次,分别加入 1:5000 稀释的辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗,37℃ 孵育 2 h,TBST 清洗 3 次,加入 ECL 利用凝胶成像仪检测蛋白条带。灰度值用 Image Lab 软件进行分析。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差别比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行,组间两两比较采用 SNK 方法,α=0.05。

2 结果

2.1 rBMSCs 形态学变化

通过倒置相差显微镜连续观测,对照组细胞呈多角形与纺锤形;与对照组相比,5-Aza 诱导组、PEMFs 诱导组和 PEMFs+5-Aza 诱导组的细胞更加集聚,并呈长梭状分布,甚至形成了链状结构^[10](图略)。

2.2 PEMFs 对 rBMSCs 中 ACTN2 和 TNNT2 mRNA 表达的影响

如表 2 所示,对照组培养 10、15 和 20 d, rBMSCs 中 ACTN2 mRNA 与 TNNT2 mRNA 表达量在不同时点间比较均无明显差异($P>0.05$)。与相应对照组比较,5-Aza 诱导组 rBMSCs 中 ACTN2 mRNA 表达量分别增加 5.64 倍(10 d)和 5.67 倍(15 d)(P 均 <0.01),TNNT2 mRNA 表达量分别增加 18.40 倍(10 d)、20.02 倍(15 d)和 1.38 倍(20 d)(P 均 <0.01);PEMFs 诱导组 rBMSCs 中 ACTN2 mRNA 表达量增加 3.93 倍(10 d, $P<0.01$),TNNT2 mRNA 表达量分别增加 14.78 倍(10 d)、5.73 倍(15 d)和 1.73 倍(20 d)(P 均 <0.05)。但 PEMFs 诱导组 rBMSCs 中 ACTN2 mRNA 和 TNNT2 mRNA 表达量分别比相应 5-Aza 诱导组低 72%(15 d, $P<0.01$)和 68%(15 d, $P<0.01$)。

2.3 PEMFs 与 5-Aza 联合作用对 rBMSCs 中 ACTN2 和 TNNT2 mRNA 表达的影响

如表 2 所示,与相应对照组比较,在实验第 15 d,PEMFs+5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 mRNA 表达量增加 2.09 倍($P<0.05$);而 TNNT2 mRNA 表达量增加了 4.57 倍($P<0.05$)。在实验第 10 d,PEMFs+5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 mRNA 表达量和 TNNT2 mRNA 表达量分别比相应 PEMFs 诱导组低 73%和 85%(P 均 <0.01);在实验第 20 d,TNNT1 mRNA 表达量比相应 PEMFs 诱导组低 37%($P<0.01$)。而 PEMFs+5-Aza 诱导组与相应 5-Aza 诱导组比较,其 ACTN2 mRNA 表达量分别降低 79%(10 d)和 54%(15 d),TNNT2 mRNA 表达量分别降低 88%(10 d)和 74%(15 d)(P 均 <0.01)。

2.4 PEMFs 对 rBMSCs 中 ACTN2、α-actin 和 TNNT2 蛋白表达的影响

结果见附图、表 3。对照组培养 10、15 和 20 d, rBMSCs 中的 ACTN2、α-actin、TNNT2 蛋白表达量在不同时点间比较均无明显差异($P>0.05$)。与相应对照组比较,5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 蛋白表达量分别增加 151.74 倍(10 d)、71.40 倍(15 d)和 27.13 倍(20 d)(P 均 <0.01),α-

actin 蛋白表达量分别增加 7.98 倍(10 d)、29.92 倍(15 d)和 4.06 倍(20 d)(P 均 <0.01),TNNT2 蛋白表达量分别增加 98.88 倍(10 d)、164.30 倍(15 d)和 22.14 倍(20 d)(P 均 <0.01);PEMFs 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 蛋白表达量分别增加 138.31 倍(10 d)、54.11 倍(15 d)和 97.02 倍(20 d)(P 均 <0.01), α -actin 蛋白表达量分别增加 5.99 倍(10 d, $P<0.01$)、16.56 倍(15 d, $P<0.01$),

TNNT2 蛋白表达量分别增加 93.40 倍(10 d)、96.91 倍(15 d)倍和 22.43 倍(20 d)(P 均 <0.01)。与相应 5-Aza 诱导组比较,PEMFs 诱导组 rBMSCs 中 ACTN2 蛋白表达量增加 2.48 倍(20 d, $P<0.01$),而 α -actin 蛋白表达量分别降低 23%(10 d, $P<0.05$)和 44%(15 d, $P<0.01$),TNNT2 蛋白表达量降低 41%(15 d, $P<0.01$)。

2.5 PEMFs 与 5-Aza 联合作用对 rBMSCs 中

表 2 ACTN2 mRNA 和 TNNT2 mRNA 的 real-time PCR 结果($n=3$)
Table 2 Real-time PCR results of ACTN2 mRNA and TNNT2 mRNA ($n=3$)

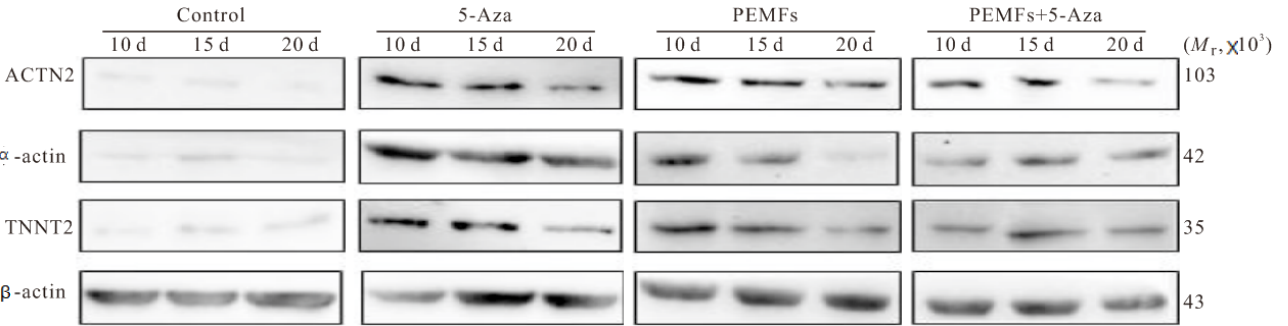
Group	ACTN2			TNNT2		
	10 d	15 d	20 d	10 d	15 d	20 d
Control	0.290±0.027	0.284±0.024	0.284±0.070	0.045±0.017	0.044±0.001	0.048±0.004
5-Aza	1.925±0.514 *	1.894±0.535 *	0.217±0.021△△	0.873±0.115 *	0.925±0.219 *	0.114±0.002 * *,△△
PEMFs	1.430±0.439 *	0.537±0.169××,△△	0.181±0.102△△	0.710±0.282 *	0.296±0.052 * *,××,△	0.131±0.026 * *,△△
PEMFs+5-Aza	0.392±0.066××,##	0.877±0.274 * *,××,△	0.143±0.036 *	0.105±0.014××,##	0.245±0.017 * *,××,△△	0.083±0.014 ##

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. Control; ×× $P<0.01$, vs. 5-Aza; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs. PEMFs; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$, vs. 10 d

ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 蛋白表达的影响

结果见附图、表 3。与相应对照组比较,PEMFs +5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 蛋白表达量分别增加 92.92 倍(10 d)、55.13 倍(15 d)和 46.79 倍(20 d)(P 均 <0.01), α -actin 蛋白表达量分别增加 4.38 倍(10 d)、25.50 倍(15 d)和 14.72 倍(20 d)(P 均 <0.01),TNNT2 蛋白表达量分别增加 44.30 倍(10 d)、139.40 倍(15 d)和 44.12 倍(20 d)(P 均 <0.01)。与相应 5-Aza 诱导组比较,PEMFs+5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 蛋白表达量在第 10 d、15 d 分别降低 39%(10 d, $P<0.01$)、23%(15 d $P<$

0.05),在第 20 d 增加 0.70 倍(20 d, $P<0.05$); α -actin 蛋白表达量在第 10 d 降低 41%($P<0.01$),第 20 d 增加 2.1 倍($P<0.01$);TNNT2 蛋白表达量在第 10 d 降低 55%($P<0.01$),第 20 d 增加 0.9 倍($P<0.01$)。与相应 PEMFs 诱导组比较,PEMFs+5-Aza 诱导组 rBMSCs 中的 ACTN2 蛋白表达量分别降低 33%(10 d, $P<0.01$)和 51%(20 d, $P<0.01$); α -actin 蛋白表达量在第 10 d 降低 23%,在第 15 d 和第 20 d 分别增加 0.51 倍和 3.72 倍(P 均 <0.05);TNNT2 蛋白表达量在第 10 d 降低 52%($P<0.01$),第 15 d 和 20 d 分别增加 0.43 倍($P<0.05$)和 0.93 倍($P<0.01$)。



附图 不同诱导条件对 rBMSCs 中 ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 蛋白表达的影响

Fig Effect of different inducible conditions on the expression of ACTN2, α -actin and TNNT2 protein

表 3 ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 蛋白的 Western blot 结果($n=3$)

Table 3 Western blot results of ACTN2, α -actin and TNNT2 ($n=3$)

Group	ACTN2			α -actin			TNNT2		
	10 d	15 d	20 d	10 d	15 d	20 d	10 d	15 d	20 d
Control	0.005±0.001	0.012±0.003	0.004±0.002	0.007±0.003	0.002±0.001	0.003±0.001	0.006±0.001	0.004±0.004	0.007±0.001
5-Aza	0.793±0.051 *	0.843±0.061 *	0.123±0.019 * *,△△	0.067±0.004 *	0.074±0.007 *	0.017±0.003 * *,△△	0.598±0.017 *	0.611±0.048 *	0.168±0.054 * *,△△
PEMFs	0.724±0.114 *	0.642±0.082 *	0.429±0.031 * *,××,△△	0.052±0.012 * *,×	0.042±0.012 * *,××	0.011±0.001△△	0.565±0.144 *	0.362±0.048 * *,××,△	0.171±0.064 * *,△△
PEMFs+5-Aza	0.488±0.106 * *,××,##	0.653±0.076 * *,×	0.209±0.064 * *,×,##,△△	0.040±0.007 * *,××,##	0.063±0.008 * *,#,△	0.052±0.009 * *,××,##	0.271±0.043 * *,××,##	0.519±0.108 * *,△△,##	0.328±0.076 * *,××,##

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. Control group; × $P<0.05$, ×× $P<0.01$, vs. 5-Aza group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs. PEMFs group; △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$, vs. 10 d

3 讨论

近年来,心血管疾病(cardiovascular disease, CAD)对人类的威胁日益严重,而心肌梗塞型心脏病发作是导致 CAD 患者死亡的主要原因。由于心肌梗塞会引起大量的心肌细胞坏死,而成熟的心肌细胞又缺失分裂再生功能,所以最终导致终末期心衰。临床研究表明 BMSCs 可以用于 CAD 的临床治疗,而现阶段诱导 BMSCs 向心肌方向分化的手段主要有化学药物诱导、生物因子诱导和心肌微环境诱导等。Makino 等^[11]相继报道化学药物 5-Aza 能够成功诱导 BMSCs 向心肌细胞方向分化。有研究显示,PEMFs 不仅对细胞的增殖能力和周期产生影响,对细胞的分化也有一定作用。朱淑霞等^[12]研究发现低频的 PEMFs 对心肌细胞的分化有一定的影响。因此本文联合 PEMFs、5-Aza 的诱导方式,探讨低频 PEMFs 诱导对 rBMSCs ACTN2、 α -actin 和 TNNT2 蛋白表达的影响。

α -辅肌动蛋白(α -actinin)属于血影蛋白超家族,是细胞骨架和细胞黏附的连接蛋白,与肌动蛋白连接将细肌丝固定在肌节的 Z 盘上,在调节细胞的生长、迁移和黏附中发挥重要的作用^[13,14]。目前发现的 α -actinin 共有 4 种,其中 α -actinin-2(ACTN2)存在于心脏中,研究发现在心肌闰盘处,肌膜形成连续性皱褶的顶部有 ACTN2 的存在,其与心肌细胞的延长相关^[15]。肌动蛋白(actin)是组成微丝的一种主要结构,有 3 种亚型即 α -actin、 β -actin 和 γ -actin,主要参与肌肉的收缩、胞质内物质的运输及信号的传递等。 α -actin 的表达是由激素和细胞增殖所调节,包括致癌转化和动脉粥样硬化等的病理条件会改变其表达。肌钙蛋白分为肌钙蛋白 C、肌钙蛋白 I 和肌钙蛋白 T,骨骼肌中主要是肌钙蛋白 C,而心肌中则为肌钙蛋白 T(TNNT2),两者氨基酸序列不同,结构上差别也很大。TNNT2 主要参与调节心肌的舒张和收缩,是心肌特异性的标志物之一^[16]。

本研究中选用 ACTN2、 α -actin、TNNT2 作为检测指标,其中, α -actin 参与细胞骨架与肌肉内细肌丝的形成,属于较早期表达的蛋白,而 ACTN2 和 TNNT2 则为心肌特异性蛋白,属于晚期表达的蛋白,所以结合 3 种蛋白的表达,能够说明 rBMSCs 向心肌样细胞分化。实验结果显示,PEMFs 诱导组中 3 种蛋白的相对表达量均随着时间的增加而降低,10 d 时表达最高。但 5-Aza 作为一种去甲基化药物对细胞有损伤作用,这种潜在的危险限制了它的临

床应用^[17]。而 PEMFs 则属于物理刺激,并已广泛用于骨关节疾病的治疗^[18]。PEMFs+5-Aza 诱导组中 3 种蛋白的表达量均随着时间的增加呈现先增加后降低的趋势,15 d 时表达最高。可能是因为联合作用时,起初的促进作用较为明显;随着时间的增加,20 d 较 15 d 则呈现降低的趋势,一方面可能因为化学因子的消耗,另一方面也可能因为表达心肌相关蛋白的细胞随着培养时间的增加发生凋亡,而新生的细胞则未表达相关蛋白,所以蛋白的表达在 20 d 时降低。本实验得出结论:单纯的 PEMFs 诱导 rBMSC 向心肌样细胞分化,10 d 效果最佳,而 PEMF+5-Aza 诱导 15 d 效果最佳,但本实验中未出现跳动的心肌细胞,所以相关诱导实验还有待进一步地深入。

参 考 文 献

- 1 Beyer Nardi N, Da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*, 2006;174:249-282.
- 2 Abdel Aziz MT, Eiasmar MF, Haidara M, *et al.* Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cardiovascular complication in diabetic rats. *Med Sci Monit*, 2008;14(11):249-255.
- 3 Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precordial mesoderm is spetranient, and cooperative. *Dev Dyn*, 2000;218(2):383-393.
- 4 Yoon J, Min BG, Kim YH, *et al.* Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol*, 2005;60(3):277-284.
- 5 Johansen C. Electromagnetic fields and health effects-epidemiologic studies of cancer, diseases of the central nervous system and arrhythmia-related heart disease. *Scand J Work Environ Health*, 2004;30(Suppl 1):1-80.
- 6 Marko SM. Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagnetic Biology & Medicine*, 2007;26(3):257-274.
- 7 何学令, 姚晓玲, 冯 贤等. 力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响. *医用生物力学*, 2011;26(2):116-120.
- 8 景荣洲. 几种培养基促兔骨髓间充质干细胞增殖效应的比较. 四川:四川大学华西基础医学与法医学院, 2011.
- 9 Dominici M, Blanc KL, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006;8(4):315-317.
- 10 冯 贤, 何学令, 李 凯等. 脉冲电磁场诱导大鼠骨髓间充质干细胞体外心肌样细胞分化的研究. *生物医学工程杂志*, 2011;28(4):676-682.

义,这点与 Haasper 等^[14]的研究相一致。创伤后第 2 d 的 PCT 值和创伤后第 1 d 的 IL-6 值均可作为脓毒症的独立预测因素,且 PCT 优于 IL-6,而 CRP、WBC 不能作为区分脓毒症和 SIRS 的指标。这与 Wanner 等^[8]认为创伤早期 PCT 的水平升高仅可作为多器官功能衰竭(MOF)发生的一项独立预测因子,不能作为鉴别有无脓毒症的发生的指标有所不同,可能与研究对象入院条件不同等多因素有关,可进一步研究证实。

综上所述,本研究发现,与其他标志物如 IL-6、CRP 和 WBC 比较,创伤后第 2 d 血浆 PCT 作为评估儿童创伤严重程度及脓毒症的发生,是一个更好的生物学标记物。创伤后 PCT 水平的增高不仅与感染有关,而且还与创伤的严重程度相关。PCT 在鉴别儿童创伤后脓毒症和非脓毒症有重要的作用。但本研究有一定的局限性,样本量偏小,下一步的研究需要加大样本量,并尝试多个生物学标记物联合使用提高预测价值。

参 考 文 献

- Kochanek KD, Kirmeyer SE, Martin JA, *et al.* Annual summary of vital statistics: 2009. *Pediatrics*, 2012; 129(2): 338-348.
- Meisner M, Adina H, Schmidt J. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Crit Care*, 2006; 10(1): R1.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, *et al.* Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2001; 345(19): 1368-1377.
- Goldstein B, Giroir B, Randolph A, *et al.* International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*, 2005; 6(1): 2-8.
- Tepas JJ, Mollitt DL, Talbert JL, *et al.* The pediatric trauma score as a predictor of injury severity in the injured child. *J Pediatr Surg*, 1987; 22(1): 14-18.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, *et al.* High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*, 1993; 341(8844): 515-518.
- Mimoz O, Benoist JF, Edouard AR, *et al.* Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med*, 1998; 24(2): 185-188.
- Wanner GA, Keel M, Steckholzer U. Relationship between procalcitonin plasma levels and severity of injury, sepsis, organ failure, and mortality in injured patients. *Crit Care Med*, 2000; 28(4): 950-957.
- Hensler T, Sauerland S, Lefering R, *et al.* The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma. *Shock*, 2003; 20(5): 420-426.
- Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*, 2008; 36(3): 941-952.
- Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, *et al.* Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, 2006; 34(7): 1996-2003.
- Simon L, Saint-Louis P, Amre DK, *et al.* Procalcitonin and C-reactive protein as markers of bacterial infection in critically ill children at onset of systemic inflammatory response syndrome. *Pediatr Crit Care Med*, 2008; 9(4): 407-413.
- Benoist JF, Mimoz O, Assicot M, *et al.* Serum procalcitonin, but not c-reactive protein, identifies sepsis in trauma patients. *Clin Chem*, 1998; 44(8 Pt 1): 1778-1779.
- Haasper C, Kalmbach M, Dikos GD, *et al.* Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis. *Technol Health Care*, 2010; 18(2): 89-100.

(2012-04-05 收稿, 2012-06-13 修回)

编辑 沈 进

(上接第 674 页)

- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest*, 1999; 103(5): 697-705.
- 朱淑霞, 宋治远, 罗向东等. 电磁场干预大鼠骨髓间充质干细胞向心肌方向诱导分化的研究. *武警医学院学报*, 2009; 18(5): 377-379.
- Corgan AM, Singleton C, Santoso CB, *et al.* Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function. *Biochem J*, 2004; 378(Pt 3): 1067-1072.
- Hu H, Gao X, Sun Y, *et al.* Alpha-actinin-2, a cytoskeletal protein, binds to angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 329(2): 661-667.
- Chiu C, Lind JM, Bagnall RD, *et al.* Genome-wide linkage analysis identifies α -Actinin-2 as a causative gene in familial

hypertrophic cardiomyopathy. *Heart, Lung and Circulation*, 2009; 18(Sup 3): S4.

- Payne RC, Blustein BL, Morris DL, *et al.* Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial. *Circulation*, 2001; 104(5): 26-27.
- Rosca AM, Burlacu A. Effect of 5-azacytidine: evidence for alteration of the multipotentiality of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2011; 20(7): 1213-1221.
- Jansen JH, van der Jagt OP, Punt BJ, *et al.* Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an *in vitro* study. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010; 11: 188.

(2012-03-06 收稿, 2012-06-22 修回)

编辑 于长谋