

1,4-苯醌抑制人骨髓间充质干细胞中 copine 1、copine 3 的表达

张敏, 朱丽瑾, 余珉, 贾振宇, 陈钧强, 赵允武, 张幸, 肖芸

(浙江省医学科学院, 浙江 杭州 310013)

摘要: 目的 建立人骨髓间充质干细胞(hBM-MSCs)体外培养系统,检测1,4-苯醌(1,4-BQ)对hBM-MSCs中copine 1、copine 3表达的影响。方法 采用密度梯度离心和流式细胞技术分离、鉴定hBM-MSCs; 10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 1,4-BQ染毒24 h后,实时定量PCR技术和蛋白免疫印迹检测hBM-MSCs中copine 1、copine 3 mRNA和蛋白质表达情况。结果 hBM-MSCs稳定表达CD29、CD44,几乎不表达CD34、CD45;实时定量PCR的结果证实,在mRNA水平1,4-BQ染毒剂量在10 $\mu\text{mol/L}$ 即可引起copine 1表达降低,25 $\mu\text{mol/L}$ 可引起copine 3表达水平降低。蛋白免疫印迹试验结果证实1,4-BQ为25 $\mu\text{mol/L}$ 和50 $\mu\text{mol/L}$ 分别引起copine 1和copine 3表达降低。结论 1,4-BQ可在转录水平和蛋白质水平抑制hBM-MSCs中copine 1和copine 3的表达,本研究结果有助于进一步阐明苯及其代谢物1,4-BQ的血液毒性机制。

关键词: 1,4-苯醌; copine 1; copine 3; 人骨髓间充质干细胞(hBM-MSCs)

中图分类号: R135.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2012)04-0251-04

Expression of copine 1 and copine 3 in human bone marrow mesenchymal stem cells could be inhibited by 1,4-benzoquinone

ZHANG Min, ZHU Li-jin, YU Min, JIA Zhen-yu, CHEN Jun-qiang, ZHAO Yun-wu, ZHANG Xing, XIAO Yun

(Zhejiang Provincial Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract: **Objective** Establishing culture system in vitro of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) to measure the effect of 1,4-benzoquinone (1,4-BQ) on the expression of copine 1 and copine 3 in hBM-MSCs. **Methods** hBM-MSCs were collected and identified by standard density gradient centrifugation and flow cytometry analysis, respectively; mRNA and protein level of copine 1 and copine 3 were assayed by real time quantitative PCR and Western blot analysis separately after exposure to 10, 25 or 50 $\mu\text{mol/L}$ 1,4-BQ for 24 h. **Results** hBM-MSCs stably expressed CD29 and CD44, but hardly expressed CD34 or CD45. Real time PCR assay indicated that copine 1 and copine 3 were down-regulated at transcriptional level when the exposure dose of 1,4-BQ was as low as 10 $\mu\text{mol/L}$ and 25 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Western blot assay confirmed that both copine 1 and copine 3 were down-regulated as well at the exposure level of 1,4-BQ lowered to 25 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ respectively. **Conclusions** The results suggested that the expression of copine 1 and copine 3 in hBM-MSCs were all repressed by 1,4-BQ at both mRNA and protein levels, it will give important further insights into the molecular mechanism of hematopoietic toxicity of benzene and its metabolites such as 1,4-BQ.

Key words: 1,4-benzoquinone(1,4-BQ); copine 1; copine 3; human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs)

慢性苯中毒主要表现为造血系统的损害,苯还是一种间接致癌物,其代谢物1,4-苯醌(1,4-benzoquinone, 1,4-BQ)等是造成骨髓造血功能损害并导致白血病的最最终毒物^[1]。骨髓中除造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)外,还存在另外一种干细胞,即间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),其可调节HSCs定居、增殖、分化、发育和成熟。copine 1和copine 3

是钙离子依赖性膜结合蛋白,与乳腺癌、前列腺癌、卵巢肿瘤等发生关系密切。本研究拟采用人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBM-MSCs)为靶细胞,探讨1,4-BQ对细胞中copine 1和copine 3表达影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和抗体

1,4-BQ(色谱纯,美国Sigma公司),PBS配成100 mmol/L储存液,备用。胎牛血清, L-DMEM细胞培养液(美国Invitrogen公司)。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、甘氨酸、蛋白质定量试剂盒(美国Bio-rad公司)。骨髓单核细胞分离液Ficoll-Paque,蛋白酶抑制剂,尿素,硫脲,3-环

收稿日期: 2012-02-27; 修回日期: 2012-03-27

基金项目: 浙江省科技厅科研院所专项资金(2008F1027); 浙江省自然科学基金(Y207394, Y2090518); 浙江省卫生厅支撑学科建设基金(11-ZC02)

作者简介: 张敏(1978—),女,助理研究员,从事职业卫生研究。

通讯作者: 肖芸, E-mail: yunxiao12345@yahoo.cn

己胺-1-丙磺酸 (CHARPS), 二硫苏糖醇 (DTT)、丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺 (美国 GE 公司)。超纯 RNA 提取试剂盒、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (北京康为世纪生物技术有限公司)。逆转录试剂 (Fermentas 公司)。定量 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara 公司)。PE 标记的 CD29、CD34、CD44、CD45 鼠抗人单克隆抗体 (美国 BD 公司)。兔抗人 copine 1、copine 3、GAPDH 多单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 仪器

SE250 型 mini 垂直电泳系统、TE22 mini 转膜仪 (美国 GE 公司), FluorChem FC2 凝胶成像仪器 (Alpha 公司), LightCycler 2.0 定量 PCR 仪 (德国 Roche 公司), FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 hBM-MSCs 分离、培养、表面抗原鉴定 (流式细胞术)

取自愿捐献者骨髓 0.5 ml (经捐献者知情同意和伦理学委员会审查通过), 采用 Ficoll-Paque 细胞分离液密度梯度离心法分离骨髓单核细胞, 含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液, 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 每 3 d 换液一次, 弃上清液, 选择培养法逐步纯化贴壁生长的 hBM-MSCs。取传代培养的第 3 代 hBM-MSCs, 调节浓度为 1.0 × 10⁶/ml, 分别加入小鼠抗人 PE-CD29、PE-CD44、PE-CD34、PE-CD45 抗体或 PE IgG1 同型对照, 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞表面抗原。

1.4 各组 copine 1 和 copine 3 基因表达水平检测 (实时定量 PCR 技术)

1 μ -BQ 染毒 24 h 后, 按试剂盒说明书分别提取 10、25 和 50 μ mol/L 组和对照组细胞总 mRNA。总 RNA 3 μ g、Oligo (dT)₁₈ 引物 1 μ l、DEPC 水加至 12 μ l 混匀按照试剂盒步骤逆转录合成 cDNA。实时定量 PCR 方法参照参考文献 [2], 反应体系如下: 2 × SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μ l、10 μ mol/L 上下游引物各 0.4 μ l、cDNA 2 μ l、H₂O 7.2 μ l, 混匀后进行实时定量 PCR 扩增。反应结束后, 由软件自动分析并显示结果循环阈值 (cycle threshold, Ct) 和实时定量荧光值动态曲线。以 GAPDH 作内对照, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析目的基因的相对表达量。copine 1 上游引物: 5'-ACCTTGTTTCAGCTGTCCATTTC-3', 下游引物: 5'-AGTTCGCACCCGTTTCAGTC-3'; copine 3: 上游引物: 5'-TTGTGT-TATGTGGAGCAATGCC-3', 下游引物: 5'-CCACAGT-GTCTAAACTGTAGC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ACG-GATTTGGTCTGTTGGG-3', 下游引物: 5'-CTCGCTCCT-

GGAAGATGGTG-3'。

1.5 各组 copine 1 和 copine 3 蛋白表达水平检测 (Western blot 技术)

硫脲裂解法提取细胞总蛋白, Bradford 法蛋白定量, 取 20 μ g 蛋白质样品进行 10% SDS-PAGE 转移至 PVDF 膜; 封闭 1 h; 含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液 (PBST) 洗膜 3 次 加一抗 copine 1 (1:100)、copine 3 (1:100) 和内参 GAPDH (1:1000) 4 °C 过夜; PBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:5000) 孵育 1 h; PBST 洗膜 3 次, 加 ECL 后凝胶成像系统曝光显影, Alpha Fluorchem FC2 软件采集图像和分析灰度值。目的蛋白相对表达强度 = 目的蛋白吸光度值 / 内参蛋白吸光度值。

1.6 统计学处理

计量资料结果以均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS14.0 统计分析软件包进行单因素方差分析, 各组间的统计学差异采用 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hBM-MSCs 分离、培养、表面抗原鉴定结果

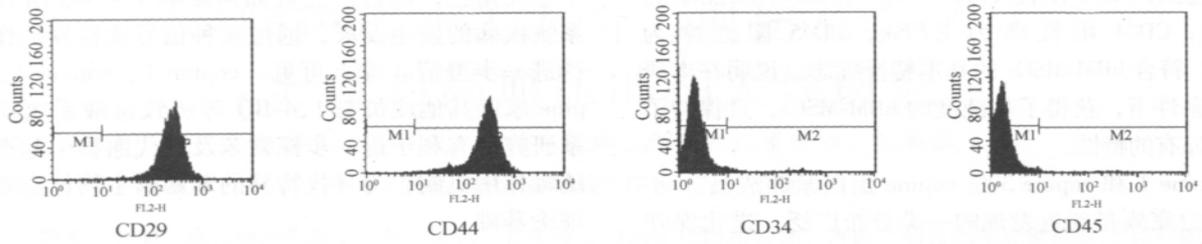
分离的骨髓单个核细胞于接种后 48 h 可见贴壁生长的梭形细胞, 6 d 左右出现典型的纺锤形细胞, 2 周左右细胞生长迅速, 出现致密的细胞层, 细胞排列成束状或旋涡状, 细胞铺满 25 cm² 细胞培养瓶底部, 传代细胞扩增时间为 6 d 左右。取第 3 代 hBM-MSCs, 流式细胞仪分析 hBM-MSCs 表面抗原标记。结果 hBM-MSCs 阳性表达 CD29 (99.87%)、CD44 (99.82%), 而低表达 CD34 (1.57%)、CD45 (0.62%), 见图 1。

2.2 各组 copine 1 和 copine 3 基因表达水平的比较

10、25、50 μ mol/L 1 μ -BQ 染毒 hBM-MSCs 24 h 后, 与正常对照组比较, 基因 copine 1 和 copine 3 的 mRNA 水平随着 1 μ -BQ 浓度的增加有下降的趋势, copine 1 在 10、25、50 μ mol/L 1 μ -BQ 刺激下 mRNA 水平下降有统计学意义 ($P < 0.05$)。copine 3 在 25、50 μ mol/L 的 1 μ -BQ 刺激下 mRNA 水平下降有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

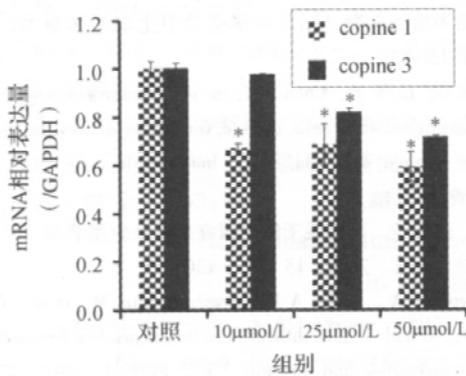
2.3 各组 copine 1 和 copine 3 蛋白表达水平的比较

10、25、50 μ mol/L 1 μ -BQ 染毒细胞 24 h 后, 与正常对照组比较, 基因 copine 1 和 copine 3 的蛋白表达量随着 1 μ -BQ 浓度的增加有下降的趋势, 25、50 μ mol/L 1 μ -BQ 剂量组 copine 1 蛋白表达量比对照组下降且有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。50 μ mol/L 1 μ -BQ 剂量组 copine 3 蛋白表达量比对照组下降且有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



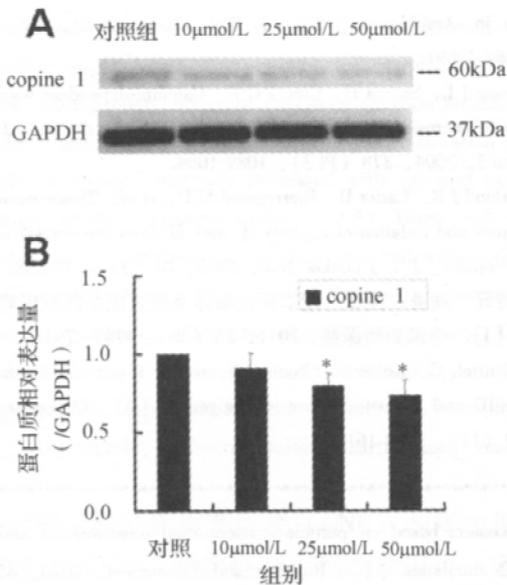
注: CD29 阳性率为 99.87%, CD44 阳性率为 99.82%, CD34 阳性率为 1.57%, CD45 阳性率为 0.62%。

图1 hBM-MSCs 表面抗原流式检测结果



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图2 1,4-BQ 对 copine 1, copine 3 基因表达水平的影响

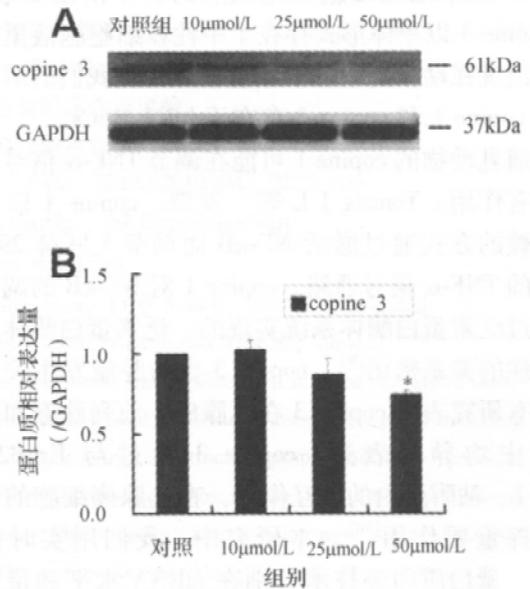


注: A—不同剂量 1,4-BQ 染毒后, copine 1 蛋白在 10% SDS-PAGE 胶上的表达图谱; B—不同剂量 1,4-BQ 染毒后, copine 1 蛋白表达量的改变。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图3 1,4-BQ 对 copine 1 蛋白表达水平的影响

3 讨论

骨髓中除了 HSCs 以外, 还存在另一类干细胞——MSCs, HSCs 维持造血, 而 MSCs 可能通过分泌细胞因子等途径为 HSCs 提供赖以生存的微环境。已有研究表



注: A—不同剂量 1,4-BQ 染毒后, copine 3 蛋白在 10% SDS-PAGE 胶上的表达图谱; B—不同剂量 1,4-BQ 染毒后, copine 3 蛋白表达量的改变。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图4 1,4-BQ 对 copine 3 蛋白表达水平的影响

明 MSCs 参与了白血病的发生、发展过程, 并与白血病细胞的耐药、抗凋亡、免疫逃逸特性有关^[3]。骨髓中 MSCs 含量极少, 每 $10^4 \sim 10^5$ 个单核细胞中含有 1 个 MSCs, 在无造血细胞和分化刺激存在的情况下贴壁生长, 原代扩增需要 10 ~ 15 d, 传代细胞扩增时间为 7 d 左右, 细胞呈均一、典型的成纤维细胞形态, 可聚集成均匀的集落, 表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞表面标志, 包括: ①黏附分子, 如 CD166、CD44 等; ②生长因子和细胞因子受体, 如白介素受体、 γ -干扰素受体、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等; ③整合素家族成员, 包括 CD29、CD49 等; ④其他, 如 CD90、CD105 等, 但不表达造血细胞的表面标志, 如 CD34、CD45 等^[4]。在本研究的培养条件下, 原代培养的 hBM-MSCs 要经过大约 2 周时间才能铺满 25 cm^2 细胞培养瓶底部, 而传代细胞扩增时间为 6 d 左右。流式细胞技术对细胞的表面抗原检

测结果显示 CD29 阳性率为 99.87%，CD44 阳性率为 99.82%，CD34 阳性率为 1.57%，CD45 阳性率为 0.62%，符合 hBM-MSCs 的基本特征标志。说明在本研究培养条件下，获得了高纯度的 hBM-MSCs，且保持了该细胞原有的特性。

copine 1 和 copine 3 是 copine 蛋白家族成员。copine 蛋白家族是新近发现的一类分布广泛、进化保守的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白^[5]，该家族成员在胞内信号转导过程中发挥重要作用^[6,7]。有报道从人中性粒细胞中可同时分离出 copine 1 和 copine 3^[8]。copine 1 在中性粒细胞分化成熟的各个阶段都表达，而 copine 3 以单体形式存在于中性粒细胞胞液里，它主要出现在幼稚的中性粒细胞前体中。我们的研究证实了 copine 1 和 copine 3 存在于 hBM-MSCs。

哺乳动物的 copine 1 可能在调节 TNF- α 信号途径方面有作用。Tomsig J L 等^[7]发现，copine 1 以钙离子依赖的方式通过激活 NF- κ B 而调节人胚肺 293 细胞中的 TNF- α 信号通路，copine 1 对 NF- κ B 的调节又是通过泛素蛋白酶体系统实现的。泛素蛋白酶体系统与癌症的关系密切^[9]。copine 3 也与肿瘤发生关系密切，有研究表明 copine 3 在乳腺癌、前列腺癌和卵巢肿瘤中均异常表达。copine 3 通过与 ErbB2、C 激酶 1、粘附蛋白的相互作用，在乳腺癌细胞的转移中发挥重要作用^[10]。本研究中，我们用实时定量 PCR 和蛋白质印迹技术分别在 mRNA 水平和蛋白质水平探讨了 1,4-BQ 对 hBM-MSCs 中 copine 1 和 copine 3 表达的影响。结果表明：1,4-BQ 染毒 24 h，剂量达到 10 μ mol/L 就可引起 copine 1 在 mRNA 水平表达下降，剂量达到 25 μ mol/L 才会引起 copine 3 表达下降。而剂量达到 25 μ mol/L 方引起 copine 1 在蛋白质水平表达下降，50 μ mol/L 方引起 copine 3 表达下降。这提示 copine 1 和 copine 3 在苯及其代谢物 1,4-BQ 等所引起的白血病等血液系统疾病中扮演

了重要角色，但它们究竟如何影响 1,4-BQ 所致血液系统疾病的发生发展，通过何种信号途径发挥作用仍待进一步澄清。综上所述，copine 1、copine 3 及 copine 家族其他成员与 1,4-BQ 等所致血液系统疾病关系研究将有利于进一步探索苯及其代谢物引起造血系统毒作用机制，为寻找特异的苯暴露生物标志物提供理论基础。

参考文献:

- [1] 肖芸, 姚耿东, 张幸. 苯及其代谢物血液毒性机制研究进展 [J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21 (4): 247-250.
- [2] 肖芸, 朱丽瑾, 鞠莉, 等. 三甲基氯化锡诱导的非洲绿猴肾细胞蛋白质表达谱改变 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29 (10): 721-725.
- [3] Zhao Z G, Li W M, Chen Z C, *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia [J]. Immunol Invest, 2008, 37 (7): 726-739.
- [4] 余勤, 连俊兰. 间充质干细胞研究进展及应用前景 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15 (2): 130-133.
- [5] Perestenko P V, Pooler A M, Noorbakhshnia M, *et al.* Copines-1, -2, -3, -6 and -7 show different calcium-dependent intracellular membrane translocation and targeting [J]. FEBS J, 2010, 277 (24): 5174-5189.
- [6] Li Y, Gou M, Sun Q, *et al.* Requirement of calcium binding, myristoylation, and protein-protein interaction for the copine BON1 function in Arabidopsis [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (39): 29884-29891.
- [7] Tomsig J L, Sohma H, Creutz C E. Calcium-dependent regulation of tumour necrosis factor-alpha receptor signalling by copine [J]. Biochem J, 2004, 378 (Pt 3): 1089-1094.
- [8] Cowland J B, Carter D, Bjerregaard M D, *et al.* Tissue expression of copines and isolation of copines I and III from the cytosol of human neutrophils [J]. J Leukoc Biol, 2003, 74 (3): 379-388.
- [9] 王青元, 周颖, 凌斌. 泛素蛋白酶体系统组成及其在疾病中的作用 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26 (30): 4789-4791.
- [10] Heinrich C, Keller C, Boulay A, *et al.* Copine III interacts with ErbB2 and promotes tumor cell migration [J]. Oncogene, 2010, 29 (11): 1598-1610.

(上接第 246 页)

手段，可以得到一个复杂情况下暴露剂量的评估值，比较准确地预测工作环境中有害物质的暴露水平，对职业病发生的控制具有参考价值。

参考文献:

- [1] Kassomenos P, Karayannis A, Panagopoulos I, *et al.* Modelling the dispersion of a toxic substance at a workplace [J]. J Environmental Modelling & Software, 2008, 23 (1): 82-89.
- [2] Kwang-Chul Noha, Hyuk-Soon Kimb, Myung-Do Oh. Study on contamination control in a minienvironment inside clean room for yield en-

hancement based on particle concentration measurement and airflow CFD simulation [J]. Building and Environment, 2010, 45 (4): 825-831.

- [3] Choi J I, Edwards J R. Large eddy simulation and zonal modeling of human-induced contaminant transport [J]. Indoor Air, 2008, 18 (3): 233-249.
- [4] 王东东. 基于 FLUENT 的危险性气体泄漏扩散研究 [D]. 南开大学, 2008.
- [5] 刘洪波, 邓特刚, 李小松, 等. 基于 CFD 的污泥脱水机房恶臭扩散分布规律研究 [J]. 环境工程学报, 2009, 3 (5): 875-880.