

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.16.018

左归丸对去卵巢大鼠骨髓间充质干细胞基因表达谱时间序列的影响

赵旭^{*}, 郝传铮¹, 杨仁旭², 徐俊伟¹

(1. 南通大学附属医院, 江苏省南通市西寺路 20 号, 226001; 2. 成都中医药大学附属医院)

摘要 目的 通过分析骨质疏松模型大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 基因表达谱时间序列变化趋势, 在基因组学层面探索左归丸防治绝经后骨质疏松症的分子机制。方法 72 只大鼠随机分为假手术组、模型组、戊酸雌二醇组和左归丸组, 每组 18 只。除假手术组外其余各组大鼠摘除双侧卵巢建立绝经后骨质疏松症模型。手术 2 周后, 戊酸雌二醇组和左归丸组分别给予戊酸雌二醇片溶液 (浓度为 0.01 mg/ml) 和左归丸溶液 (浓度为 0.5 g/ml) 灌胃, 假手术组和模型组用等量蒸馏水灌胃, 每次 1 ml/100 g, 每日 1 次, 灌胃至手术后第 4、8 和 12 周末 (每个时间点 6 只大鼠)。12 周末时检测各组大鼠股骨远端骨密度、胫骨近端骨密度、腰椎骨密度。无菌分离各组大鼠的股骨和胫骨, 培养 BMSCs, 表达谱芯片检测各组 BMSCs F2 代细胞基因表达情况, 采用 SPSS18.0 软件筛选差异表达基因 (DEGs), 并采用 STEM 法进行时间序列分析, 通过 DAVID 进行功能与通路富集。结果 模型组大鼠股骨远端骨密度、胫骨近端骨密度、腰椎骨密度均显著低于假手术组 ($P < 0.01$); 左归丸组和戊酸雌二醇组大鼠 3 个骨骼位点的骨密度均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。左归丸组-模型组对比组中时间序列显著趋势 DEGs 多达 56 个。其中第 4 周末显著下调基因 Ppiv、Rb1cc1、Il6 和 Rock1 富集到细胞增殖、自噬凋亡、信号通路和细胞分化等。结论 左归丸可能通过影响细胞增殖、自噬凋亡、信号通路和细胞分化等多途径, 广泛调控 BMSCs 基因表达, 最终减少骨量丢失。

关键词 绝经后骨质疏松症; 骨髓间充质干细胞; 左归丸; 基因表达谱; 时间序列; 富集分析

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 患者骨密度降低, 骨组织微结构退变, 易发生骨折。现代医学认为, PMOP 由体内缺乏雌激素引起, 可通过补充外源雌激素进行治疗, 但越来越多证据显示, 雌激素会增加罹患激素依赖性肿瘤的风险^[1]。中医理论认为, 肾主骨生髓, 妇女绝经后肾精日衰, 天癸匿绝, 精不生髓, 髓难养骨而引发本病。我们既往研究证实, 左归丸能有效抑制去卵巢造成的大鼠骨量丢失^[2-3]。本研究以骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 为载体, 设计特征性时间序列, 采用高通量基因表达谱芯片及生物信息挖掘技术进行研究, 从全基因组表达层面深入揭示左归丸防治 PMOP 的时间规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 7 月龄未孕 SD 雌性大鼠 72 只, 体重 (305 ± 45) g, 由南通大学比较医学研究中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (苏) 2008-0010。饲养条件: 室温 22 ~ 24℃, 空气湿度 55% ~ 70%, 大鼠自主摄取标准颗粒饲料及饮水。

1.2 主要试剂与仪器

CD45、CD90 及同型对照流式细胞检测试剂 (美国 BioLegend 公司, 货号分别为 202207、202523、400150), 澳洲胎牛血清 (美国 Hyclone 公司, 货号 SH3004.83), 细胞培养用胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 货号 25200-056), 青霉素-链霉素双抗 (美国 Hyclone 公司, 货号 sv30010); 总 RNA 抽提试剂盒 Trizol (美国 Invitrogen 公司, 货号 15596-018); 大鼠全基因 4 × 44K 单通道表达谱

基金项目: 国家自然科学基金 (81102622); 南通大学人才引进项目 (03080481)

* 通讯作者: zhaoxu197966@163.com

芯片 (美国 Agilent 公司, Design ID: 014879)。Achilles Express 型双能 X 线骨密度检测仪 (美国 Gelunar 公司), Aria2/3 型流式细胞检测仪 (美国 Becton Dickinson 公司), Agilent Bioanalyzer2100 质检仪、G2545A 滚动杂交炉、G2565CA 芯片扫描仪及 Feature Extraction software 10.7 芯片扫描与读取软件 (美国 Agilent 公司)。

1.3 实验药物

左归丸浸膏制备: 药材均由南通大学附属医院药剂科提供, 熟地黄 24 g、山药 12 g、山萸肉 12 g、枸杞子 12 g、菟丝子 12 g、川牛膝 9 g、龟甲胶 12 g、鹿角胶 12 g。制备方法参考文献 [2], 水浴浓缩成含 1 g/ml 生药的浸膏, 置于 4℃ 冰箱保存, 使用前加蒸馏水稀释至 0.5 g/ml。戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司广州分公司, 国药准字 J20080036), 研磨后以双蒸水混悬为 0.01 mg/ml 溶液。

1.4 动物分组、造模与给药

大鼠适应性喂养 3 天后, 采用随机数字表法分为假手术组、模型组、左归丸组和戊酸雌二醇组, 每组 18 只。模型组、左归丸组与戊酸雌二醇组雌鼠经手术摘除双侧卵巢复制绝经后骨质疏松症模型 [4], 假手术组雌鼠切除卵巢旁等量脂肪组织。左归丸组、戊酸雌二醇组雌鼠于手术后第 14 天开始分别给予左归丸溶液和戊酸雌二醇片溶液 1 ml/100g 灌胃, 每日上午 10 点灌胃 1 次。假手术组与模型组予等量蒸馏水灌胃。各组大鼠分别连续灌胃至手术后第 4 周末、第 8 周末及第 12 周末, 每个时间点设 6 只大鼠。

1.5 骨密度检测

为验证造模成功及戊酸雌二醇片和左归丸对骨密度的影响, 第 12 周末无菌条件下选取各组大鼠的第 4~6 腰椎、左侧股骨远端及胫骨近端标本, 使用双能 X 线骨密度检测仪测定骨密度。

1.6 BMSCs 培养及纯度鉴定

为了获得足量高纯度的 BMSCs, 在相应时间点颈部脱臼处死各组大鼠, 无菌条件下分离大鼠股骨和胫骨 (第 12 周末取右侧骨), 参考文献 [5] 方法进行全骨髓贴壁 BMSCs 培养与传代纯化。流式细胞法检测各组 F2 代细胞表面表达 CD90 和 CD45 的阳性率, 鉴定细胞纯度。

1.7 基因表达检测与分析

1.7.1 基因表达谱获取 使用 Trizol 试剂盒抽提各组不同时间点 F2 代细胞样品总 RNA, 所得总

RNA 经 Agilent 质检仪检测 (检测标准为: $RIN \geq 7.0$ 且 $28S/18S > 0.7$) 合格后进入芯片试验; RNA 单通道标记、芯片杂交、清洗、染色、扫描和数据处理均由生物芯片上海国家工程研究中心完成。

1.7.2 差异表达基因 (DEGs) 筛选 采用 SPSS 18.0 统计软件对 3 个时间点内各组基因表达数据分别两两比较, 筛选所有时间点各比较组 DEGs, 得到 6 个对比组, 分别是: 模型组-假手术组、左归丸组-模型组、左归丸组-假手术组、戊酸雌二醇组-模型组、戊酸雌二醇组-假手术组和左归丸组-戊酸雌二醇组。DEGs 的筛选阈值设为: $P < 0.05$, 差异倍数均值 > 2 或 < 0.5 。

1.7.3 DEGs 时间序列的短时间序列表达挖掘器 (STEM) 分析 时间序列分析采用适用于 8 个时间点以下的 STEM (Short Time-series Expression Miner, <http://www.cs.cmu.edu/~jernst/stem>) 法 [6], 对上述 6 个对比组行时间序列分析: 合并同一个对比组在 3 个时间点的 DEGs; 取并集中的 DEGs 在实验组芯片上的表达值做 STEM 分析, 计算 P 值。时间序列分析的阈值设为 $P < 0.05/16$ 。将具有统计学意义的 DEGs 定义为时间序列显著趋势 DEGs。

1.7.4 时间序列显著趋势 DEGs 富集分析 应用在线分析工具 DAVID [7], 基于基因本体 (GO) 分类标准数据库 (<http://www.geneontology.org>) 分析显著趋势 DEGs 参与的生物学功能, 包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组分 (CC)。此外, 以 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 分析显著趋势 DEGs 参与的生物学通路。富集分析的阈值设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠骨密度检测结果比较

表 1 示, 模型组大鼠股骨远端骨密度、胫骨近端骨密、腰椎骨密度均显著低于假手术组 ($P < 0.01$); 左归丸组和戊酸雌二醇组大鼠 3 个骨骼位点的骨密度均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 左归丸组大鼠胫骨近端骨密度亦低于假手术组 ($P < 0.05$)。

2.2 各组 BMSCs 纯度鉴定结果

各组 F2 代细胞的 CD90 阳性表达率均 $> 95\%$, 而 CD45 阳性表达率均 $< 5\%$, 表明 F2 代细胞中 BMSCs 含量较高, 纯度达到芯片检测要求。

2.3 不同时间点各对比组 DEGs 筛选结果

对不同时间点各对比组的基因表达谱进行

表 1 各组大鼠术后第 12 周末骨密度比较 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	股骨远端骨密度	胫骨近端骨密度	腰椎骨密度
假手术组	6	0.224 ± 0.009	0.263 ± 0.025	0.180 ± 0.024
模型组	6	$0.203 \pm 0.011^{**}$	$0.221 \pm 0.014^{**}$	$0.151 \pm 0.022^{**}$
戊酸雌二醇组	6	$0.226 \pm 0.013^{\Delta\Delta}$	$0.258 \pm 0.006^{\Delta\Delta}$	$0.188 \pm 0.010^{\Delta\Delta}$
左归丸组	6	$0.218 \pm 0.013^{\Delta}$	$0.249 \pm 0.008^{*\Delta\Delta}$	$0.192 \pm 0.019^{\Delta\Delta}$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

DEGs 筛选, 结果如表 2 所示。第 4 周末左归丸组-模型组探针水平的 DEGs 多达 264 个, 远多于其他时间点及同一时间点的其他对比组。

表 2 各对比组不同时间点差异表达基因数

对比组	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
模型组-假手术组	78	82	22
左归丸组-模型组	264	47	102
左归丸组-假手术组	90	10	24
戊酸雌二醇组-模型组	16	23	13
戊酸雌二醇组-假手术组	85	30	6
左归丸组-戊酸雌二醇组	40	13	17

2.4 STEM 分析结果

2.4.1 各对比组 DEGs 时间序列表达变化趋势

模型组-假手术组、戊酸雌二醇组-模型组、左归丸组-模型组和左归丸组-假手术组的 DEGs 有显著的时间序列表达变化趋势: 1) 模型组-假手术组的 DEGs 第 8 周末表达量显著上调, 随后下调 (对照各基因所属时间点, 该组 DEGs 均为第 8 周差异基因); 2) 戊酸雌二醇组-模型组、左归丸组-模型组和左归丸组-假手术组的 DEGs 第 8 周末期间表达量显著上调, 随后保持恒定。结合差异基因归属时间点可见, 模型组-假手术组、戊酸雌二醇组-模型组、左归丸组-模型组和左归丸组-假手术组显著趋势基因均为第 4 周差异基因, 由于 STEM 分析将

第 4 周数据行归零处理后直观表现为上述趋势, 此 4 组实际显著时间序列趋势为第 4 周时明显下调, 8 周后达平台状态而与相应对照组无差异。而戊酸雌二醇组-假手术组及左归丸组-戊酸雌二醇组无显著时间序列变化趋势。

2.4.2 时间序列显著趋势 DEGs 筛选

表 3 示, 1) 模型组-假手术组、戊酸雌二醇组-模型组、左归丸组-模型组和左归丸组-假手术组分别有 12、10、56 和 13 个显著趋势 DEGs, 左归丸组-模型组的显著趋势 DEGs 最多; 2) 戊酸雌二醇组-模型组与左归丸组-模型组有 2 个共同显著趋势 DEGs, 即 *Ppig* 与 *Rb1cc1*, 其可能是戊酸雌二醇与左归丸的共同治疗靶点; 3) 左归丸组-模型组与左归丸组-假手术组有 7 个共同显著趋势 DEGs, 从左归丸组-模型组显著趋势 DEGs 中去除这 7 个基因后, 剩余 48 个基因可能是左归丸的治疗靶点。

2.5 显著趋势 DEGs 富集分析结果

2.5.1 模型组-假手术组显著趋势 DEGs 富集分析结果

表 4 示, *Foxn1* 参与调控胸腺 T 细胞分化、淋巴细胞平衡等生物功能, 与免疫调控相关。*Slc39a4* 参与锌饥饿反应功能与矿物质吸收通路等, 与矿物质代谢相关。*Ctrb1* 参与胰源性分泌、蛋白质消化与吸收等, 与蛋白质合成相关。

表 3 各对比组具有显著时间序列表达变化趋势的差异表达基因

显著趋势基因集合	基因数	基因
模型组-假手术组	12	<i>Clec4f</i> , <i>Ctrb1</i> , <i>Fam117a</i> , <i>Fam65c</i> , <i>Foxn1</i> , <i>Gpr114</i> , <i>Loc100364568</i> , <i>Loc307727</i> , <i>Mept114</i> , <i>Mog</i> , <i>Plac1</i> , <i>Slc39a4</i>
戊酸雌二醇组-模型组	10	<i>Arid1a</i> , <i>Avil</i> , <i>Loc100910319</i> , <i>Lpl</i> , <i>Mat2a</i> , <i>Ppig</i> , <i>Rb1cc1</i> , <i>Rgd1564617</i> , <i>Rpl13a</i> , <i>Tnfsf15</i>
左归丸组-模型组	56	<i>Sept7</i> , <i>Ankrd12</i> , <i>Arhgap5</i> , <i>Atrx</i> , <i>Casp8ap2</i> , <i>Ccdc173</i> , <i>Ccdc88a</i> , <i>Cenpf</i> , <i>Cep290</i> , <i>Cxcl12</i> , <i>Esco1</i> , <i>Esm1</i> , <i>Fgf7</i> , <i>Gcc2</i> , <i>Gls</i> , <i>Gria3</i> , <i>Hist1h1t</i> , <i>Hmgns5</i> , <i>Irf7</i> , <i>Il6</i> , <i>Kif20b</i> , <i>Kitlg</i> , <i>Loc100909757</i> , <i>Loc100910779</i> , <i>Loc100912366</i> , <i>Loc682206</i> , <i>Loc691249</i> , <i>Loc691257</i> , <i>Lrrcc1</i> , <i>Mis18bp1</i> , <i>Pcf11</i> , <i>Pcm1</i> , <i>Phip</i> , <i>Ppig</i> , <i>Pt-pn4</i> , <i>Rb1cc1</i> , <i>Rgd1311357</i> , <i>Rgd1561413</i> , <i>Rgd1562465</i> , <i>Rock1</i> , <i>Rock2</i> , <i>Samd9l</i> , <i>Scara5</i> , <i>Scn7a</i> , <i>Sme4</i> , <i>Sme6</i> , <i>Thoc2</i> , <i>Tpr</i> , <i>Ube2v2</i> , <i>Vps13a</i> , <i>Zfp292</i> , <i>Zfp386</i> , <i>Zfp40</i> , <i>Zfp518a</i> , <i>Zfp52</i> , <i>Zfp638</i>
左归丸组-假手术组	13	<i>Adecy5</i> , <i>Adora2a</i> , <i>Cd74</i> , <i>Cep290</i> , <i>Cxcl12</i> , <i>Iqcf1</i> , <i>Loc100912366</i> , <i>Loc301231</i> , <i>Rgd1562465</i> , <i>Rt1-Da</i> , <i>Scara5</i> , <i>Scn7a</i> , <i>Vps13a</i>
戊酸雌二醇组-模型组 $\cap$ 左归丸组-模型组	2	<i>Ppig</i> , <i>Rb1cc1</i>
左归丸组-模型组 $\cap$ 左归丸组-假手术组	7	<i>Cep290</i> , <i>Cxcl12</i> , <i>Loc100912366</i> , <i>Rgd1562465</i> , <i>Scara5</i> , <i>Scn7a</i> , <i>Vps13a</i>

注: $\cap$, 交集

表 4 模型组-假手术组显著趋势差异表达基因的富集分析结果

编码	功能或通路	功能类型	基因	P 值
GO: 0033081	Regulation of T cell differentiation in thymus	BP	<i>Foxn1</i>	1.67×10^{-4}
GO: 0002260	Lymphocyte homeostasis	BP	<i>Foxn1</i>	4.01×10^{-5}
GO: 0034126	Positive regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	BP	<i>Mog</i>	3.37×10^{-5}
GO: 0034224	Cellular response to zinc ion starvation	BP	<i>Slc39a4</i>	6.74×10^{-5}
mo04978	Mineral absorption-Rattusnorvegicus (rat)	-	<i>Slc39a4</i>	1.33×10^{-2}
mo04972	Pancreatic secretion-Rattusnorvegicus (rat)	-	<i>Ctrb1</i>	4.63×10^{-3}
mo04974	Protein digestion and absorption-Rattusnorvegicus (rat)	-	<i>Ctrb1</i>	4.53×10^{-2}

注: BP: 生物过程

表 5 戊酸雌二醇组-模型组显著趋势差异表达基因的富集分析结果

编码	功能或通路	功能类型	基因	P 值
GO: 0003755	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	MF	<i>Ppig</i>	3.70×10^{-3}
GO: 0000413	Protein peptidyl-prolylisomerization	BP	<i>Ppig</i>	1.61×10^{-2}
GO: 0016363	Nuclear matrix	CC	<i>Ppig</i>	2.80×10^{-2}
GO: 0070969	ULK1-ATG13-FIP200 complex	CC	<i>Rb1cc1</i>	1.01×10^{-3}
GO: 0045793	Positive regulation of cell size	BP	<i>Rb1cc1</i>	4.42×10^{-3}
GO: 0000407	Pre-autophagosomal structure	CC	<i>Rb1cc1</i>	4.42×10^{-3}
GO: 0034045	Pre-autophagosomal structure membrane	CC	<i>Rb1cc1</i>	4.42×10^{-3}
GO: 0010506	Regulation of autophagy	BP	<i>Rb1cc1</i>	5.38×10^{-3}
GO: 0043066	Negative regulation of apoptotic process	BP	<i>Rb1cc1</i>	1.32×10^{-2}
GO: 0001934	Positive regulation of protein phosphorylation	BP	<i>Rb1cc1</i>	1.55×10^{-2}
GO: 0000045	Autophagic vacuole assembly	BP	<i>Rb1cc1</i>	2.54×10^{-2}
GO: 0042107	Cytokine metabolic process	BP	<i>Tnfrsf15</i>	8.05×10^{-6}
GO: 0005123	Death receptor binding	MF	<i>Tnfrsf15</i>	9.62×10^{-5}
GO: 0007250	Activation of NF-kappa B-inducing kinase activity	BP	<i>Tnfrsf15</i>	2.79×10^{-4}
mo04060	Cytokine-cytokine receptor interaction-Rattusnorvegicus (rat)	-	<i>Tnfrsf15</i>	2.93×10^{-2}

注: BP, 生物过程; MF: 分子功能; CC: 细胞组分

表 6 左归丸组-模型组显著趋势差异表达基因的富集分析结果 (前 10 个)

编码	功能或通路 (Rattusnorvegicus, rat)	功能类型	基因数	基因	P 值
GO: 0005615	Extracellular space	CC	4	<i>Il6</i> 、 <i>Cxcl12</i> 、 <i>Fgf7</i> 、 <i>Kitlg</i>	8.94×10^{-7}
GO: 0090026	Positive regulation of monocyte chemotaxis	BP	1	<i>Cxcl12</i>	3.53×10^{-6}
GO: 0006954	Inflammatory response	BP	1	<i>Il6</i>	1.20×10^{-5}
GO: 0032060	Blebassembly	BP	1	<i>Rock1</i>	3.97×10^{-5}
GO: 0045616	Regulation of keratinocyte differentiation	BP	2	<i>Rock2</i> 、 <i>Rock1</i>	3.97×10^{-5}
GO: 0008083	Growth factor activity	MF	3	<i>Il6</i> 、 <i>Fgf7</i> 、 <i>Kitlg</i>	1.63×10^{-4}
GO: 0006275	Regulation of DNA replication	BP	2	<i>Cdc88a</i> 、 <i>Esco1</i>	1.98×10^{-4}
GO: 0034453	Microtubule anchoring	BP	2	<i>Pcm1</i> 、 <i>Gcc2</i>	2.50×10^{-4}
GO: 0070091	Glucagon secretion	BP	1	<i>Il6</i>	3.05×10^{-4}
GO: 0070861	Regulation of protein exit from endoplasmic reticulum	BP	1	<i>Gcc2</i>	3.05×10^{-4}
mo05323	Rheumatoid arthritis	-	2	<i>Cxcl12</i> 、 <i>Il6</i>	8.73×10^{-5}
mo05020	Prion diseases	-	1	<i>Il6</i>	2.24×10^{-4}
mo00471	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	-	1	<i>Gls</i>	3.77×10^{-4}
mo04270	Vascular smooth muscle contraction	-	2	<i>Rock1</i> 、 <i>Rock2</i>	4.78×10^{-4}
mo05132	Salmonella infection	-	3	<i>Rock1</i> 、 <i>Il6</i> 、 <i>Rock2</i>	4.92×10^{-4}
mo04062	Chemokine signaling pathway	-	3	<i>Rock1</i> 、 <i>Cxcl12</i> 、 <i>Rock2</i>	5.45×10^{-4}
mo04672	Intestinal immune network for IgA production	-	2	<i>Cxcl12</i> 、 <i>Il6</i>	7.70×10^{-4}
mo04620	Toll-like receptor signaling pathway	-	1	<i>Il6</i>	1.06×10^{-3}
mo04623	Cytosolic DNA-sensing pathway	-	1	<i>Il6</i>	1.25×10^{-3}
mo04621	NOD-like receptor signaling pathway	-	1	<i>Il6</i>	1.25×10^{-3}

注: BP, 生物过程; MF: 分子功能; CC: 细胞组分

2.5.2 戊酸雌二醇组-模型组显著趋势 DEGs 富集分析结果 表 5 示, *Ppig* 参与肽脯氨酰顺反异构化功能, 是细胞核基质的组成成分。*Rb1cc1* 主要参与溶酶体生成、凋亡负调控、细胞磷酸化正调控等, 与自噬、凋亡相关。*Tnfrsf15* 主要参与细胞因子代谢、激活 NF- κ B 诱导激酶活性功能、细胞因子-细胞因子受体互作通路等, 与细胞因子、免疫、炎症、应激、淋巴形成等生理活动相关。

2.5.3 左归丸组-模型组显著趋势 DEGs 富集分析结果 表 6 示, 参与显著富集条目较多的基因是 *Il6* 与 *Rock1*。其中, *Il6* 参与风湿性关节炎、肠道免疫、Toll-like 受体信号通路和 NOD-like 受体信号通路等 KEGG 通路, 与炎症反应、免疫调控和信号通路等相关。*Rock1* 主要参与角质细胞分化等 GO 功能, 参与沙门氏菌感染和趋化因子信号通路等 KEGG 通路, 与细胞分化、炎症反应和信号通路等相关。

3 讨论

相比单时间点差异基因的筛选研究, 时间序列分析可以在时间变化全程层面, 以共同调控趋势变化为研究主线去分析基因表达谱改变, 锁定关键基因群, 继而深入揭示可能与疾病或表型相关的基因及这些基因在时间维度上的共同作用规律^[8-9]。本实验采用高通量表达谱技术及时间序列研究为主要研究手段, 探讨去卵巢对 BMSCs 基因表达谱的影响, 并且左归丸与戊酸雌二醇防治 PMOP 的分子机制。

本研究结果显示, 1) 去卵巢对 BMSCs 基因表达的影响以第 8 周最为明显, 且以上调为主。经时间序列显著趋势 DEGs 富集分析发现, 去卵巢可能通过调控 *Foxn1*、*Slc39a4* 和 *Ctrb1* 的表达影响大鼠的免疫调控、矿物质代谢、蛋白质消化和吸收等过程, 进而影响蛋白质合成与骨代谢平衡, 引起骨质疏松。2) 戊酸雌二醇和左归丸对去卵巢大鼠 BMSCs 基因表达谱的调控均以早期的下调作用为主, 且二者存在共同的靶基因 *Ppig*、*Rb1cc1*。*Ppig* 编码肽脯氨酰异构酶 G, 即亲环蛋白 G, 催化肽基脯氨酸的顺反异构化, 导致底物蛋白功能改变, 主要影响细胞周期调控和细胞增殖^[10]。戊酸雌二醇和左归丸可能通过下调 *Ppig* 表达水平, 促进骨代谢相关细胞保持正常周期与增殖, 从而减少骨丢失。*Rb1cc1* 编码 RB1 诱导卷曲蛋白 1, 作为一种转录因子, 它包含一个核定位信号, 一个亮氨酸拉链结构域和一个卷曲螺旋结构^[11], 参与溶酶体生成, 而

溶酶体在骨吸收中起重要作用^[12]。因此, 推测 *Rb1cc1* 间接参与骨吸收, 戊酸雌二醇和左归丸可能经由下调其表达水平, 减弱溶酶体自噬, 抑制骨丢失。

戊酸雌二醇和左归丸调控 BMSCs 基因表达谱改变之区别: 1) 在调控基因数目方面, 左归丸明显多于戊酸雌二醇。二者虽均在第 4 周末发挥对相关基因的早期干预, 也存在上述共同靶点, 但左归丸组-模型组显著趋势 DEGs 数目为 56 个, 而戊酸雌二醇组-模型组显著趋势 DEGs 仅有 10 个, 提示左归丸可能通过更多的途径引起 BMSCs 靶基因表达改变, 继而影响骨髓微环境, 调控骨代谢。左归丸组-模型组显著趋势 DEGs 中除上述与戊酸雌二醇组-模型组中共同的 2 个靶基因外, 还存在其他关键靶点。*Il6* 是一种炎性细胞因子, 具有广泛生物学效应。多项研究显示, 骨质疏松患者的 *Il6* 水平明显高于正常人, 而 *Il6* 也是雌激素治疗 PMOP 的重要靶点^[13]。*Il6* 主要通过参与 RANKL-RANK-OPG 促进破骨细胞活化、增强骨吸收^[14]。本研究表明, 左归丸可能通过早期下调 *Il6* 表达水平, 减弱破骨细胞活化, 抑制骨吸收。*Rock1* 编码 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1, 是 Rho 蛋白下游效应器, 与机体氧化应激反应有关, 广泛参与肿瘤、糖尿病、心脑血管疾病等的发生与发展。有研究表明, *Rock* 抑制剂可通过负向调控 TNF- α 诱导的 Ras/Rho/MAPK 通路和激活经典 Wnt/ β -catenin 通路, 促进成骨细胞分化^[15]。本研究发现, 第 4 周末左归丸组大鼠 BMSCs 中 *Rock1* 水平明显低于模型组, 提示左归丸可能经由下调 *Rock1* 表达水平促进成骨细胞分化, 减少骨量丢失。

参考文献

- [1] Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Egan KM, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002, 11(7): 593-600.
- [2] 郑云霞, 杨仁旭. 滋肾丸对去卵巢骨质疏松雌鼠的骨组织形态学的改善作用及机制的实验研究 [J]. 四川中医, 2006, 24(2): 16-18.
- [3] 陈红, 杨仁旭. 滋肾丸抗去势雌鼠骨质疏松症的实验研究 [J]. 湖北医学院学报, 2007, 22(1): 20-22.
- [4] 邓红文, 刘耀中. 骨质疏松学前沿 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 312-317.
- [5] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725.

- [6] Ernst J, Nau G, Bar-Joseph Z. Clustering short time series gene expression data [J]. Bioinformatics, 2005, 21(suppl 1): i159-i168.
- [7] Dennis GJ, BT S, Hosack D, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. Genome Biol, 2003, 4(5): P3.
- [8] Storey J, Xiao W, Leek J, et al. Significance analysis of time course microarray experiments [J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(36): 12837-12842.
- [9] Androulakis I, Yang E, Almon RR. Analysis of timeseries gene expression data: methods, challenges, and opportunities [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2007, 9: 205-228.
- [10] 曹强, 郭军. 肽基脯氨酰顺反异构酶 Pin1 的分子结构与调节机制 [J]. 医学研究生学报, 2009, 22(5): 531.
- [11] Chano T, Ikegawa S, Kontani K, et al. Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells [J]. Oncogene, 2002, 21(8): 1295-1298.
- [12] Chenette E. Autophagy proteins regulate bone resorption [J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(1): 50.
- [13] Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(9): 4971-4979.
- [14] Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(1): 49-60.
- [15] Qiao L, Kang K, Heo J. Simvastatin promotes osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cell via canonical Wnt/beta-catenin signaling [J]. Mol Cell, 2011, 32(5): 434-444.

Effect of *Zuogui Pill* (左归丸) on the Time Sequence of Gene Expression Profile of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Ovariectomized Rats

ZHAO Xu¹, HAO Chuangzheng¹, YANG Renxu², XU Junwei¹

(1. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu province, 226001; 2 Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the molecular pathogenesis of *Zuogui Pill* in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis in genomic level by analyzing bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) gene expression time sequence variation trend in osteoporosis model rats. **Methods** Seventy-two rats were randomly divided into sham operation group, model group, estradiol valerate and group and *Zuogui Pill* group, with 18 rats in each group. In addition to the sham operation group, the rats in the other groups were removed with bilateral ovary to establish the postmenopausal osteoporosis models. Two weeks after surgery, the estradiol valerate and group and the *Zuogui Pill* group were gavaged with estradiol valerate and tablets solution (0.01 mg/ml) and *Zuogui Pill* solution (0.5 g/ml) respectively, the rats in sham operation group and the model group were gavaged with the same volume of distilled water, with 1 ml/100 g each time, 1 time a day until the 4th, 8th, and 12th weekend after surgery (6 rats at each time point). At the end of the 12th week, the bone mineral density of the distal femur bone, proximal tibia bone, and lumbar vertebrae bone of the rats in each group were detected. The femur bone and tibia bone of the rats in each group were parted under sterile environment, bone marrow mesenchymal stem cells were cultured, gene expression of BMSCs F2 cells in each group were detected by expression profile chip, differential expression genes (DEGs) were selected by SPSS18.0 software, and STEM method was used to analyze the time sequence, and Function and pathway enrichment was evaluated by DAVID. **Results** The bone mineral density of the distal femur bone, proximal tibia bone and the lumbar vertebrae bone of rats in the model group were significantly lower than those in the sham operation group ($P < 0.01$); The bone mineral density of the 3 bone sites in the *Zuogui Pill* group and estradiol valerate group were higher than those in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In *Zuogui Pill* group, model group and the control group, time sequence significant trend DEGs is up to 56. At the end of the fourth week, genes Pp1g, Rb1cc1, Il6 and Rock1 were significantly down regulated and were concentrated to cell proliferation, autophagy and apoptosis, signaling pathway and cell differentiation, etc. **Conclusion** *Zuogui Pill* can widely regulate expression of BMSCs gene through many ways, such as cell proliferation, autophagy and apoptosis, signal transduction, cell differentiation, etc., which can finally reduce the loss of bone mass.

Keywords postmenopausal osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; *Zuogui Pill*; gene expression profile; time sequence; enrichment analysis

收稿日期: 2014 - 10 - 11; 修回日期: 2015 - 03 - 09

编辑: 邓 媛