

种因素,如实际药物浓度的制约,但它至少可以作为现有疗法的一种有益补充。该研究还使我们看到通过药物等保守方法对椎间盘退变进行有效干预的可行性。中医中药在对多种椎间盘相关疾病的治疗上有着丰富的经验和良好的疗效,将烟酰胺有选择地与优秀中医药疗法相结合以干预椎间盘退变将不失为一种有益的新思路。

参考文献

- [1] Chiba K, Andersson GB, Masuda K, et al. A new culture system to study the metabolism of the intervertebral disc in vitro. *Spine*, 1998, 23(17): 1821 ~ 1827
- [2] Kuroki H, Nakagawa Y, Mori K, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model. *Arthritis Res Ther*. 2004, 6(6): R492 ~ 504
- [3] 朱庆三, 瞿饒生, 许则民, 等. 腰椎间盘中胶原及蛋白含量的测定. *中华外科杂志*, 1994, 8(32): 463 ~ 465
- [4] Berglund M, Wüig M, Torstensson M, et al. Assessment of mR-NA levels for matrix molecules and TGF- β 1 in rabbit flexor and peroneus tendons reveals regional differences in steady-state expression. *J Hand Surg*. 2004, 29(2): 165 ~ 169
- [5] 熊晓芊, 邵增务, 杨述华. 聚集蛋白聚糖与椎间盘退变的研究进展. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15(1): 54 ~ 56
- [6] Namazi MR. Nicotinamide: a potential addition to the anti-psoriatic weaponry. *FASEB J*. 2003, 17(11): 1377 ~ 1379
- [7] Rannou F, Richette P, Benallaoua M, et al. Cyclic tensile stretch modulates proteoglycan production by intervertebral disc annulus fibrosus cells through production of nitrite oxide. *J Cell Biochem*, 2003, 90(1): 148 ~ 157
- [8] Kohyama K, Saura R, Doita M, et al. Intervertebral disc cell apoptosis by nitric oxide: biological understanding of intervertebral disc degeneration. *Kobe J Med Sci*. 2000, 46(6): 283 ~ 295

· 基础研究 ·

中药治疗激素性骨坏死的蛋白质组学分析

刘建仁¹ 樊粤光¹ 王海彬¹ 史风雷¹ 熊莉华¹ 何伟¹ 彭宣宪² 王三英²

(1. 广州中医药大学附一属院 广州 510405; 2. 厦门大学生命科学学院)

摘要 目的: 用蛋白质组学的研究方法进行激素性骨坏死的病理和中药作用机理的研究, 有利于临床治激素性骨坏死。方法: 按照常用激素性骨坏死的造模方法, 建立大鼠坏死模型, 并设立中药治疗组及空白对照组, 经过 6 周处理后经骨形态学检查, 确定骨坏死造模成功, 处死动物取股骨和肱骨, 提取骨组织蛋白质样品, 双向电泳分离, 得到各组骨组织总蛋白质分子解剖图谱, 用图像分析软件, 找到各组间差异蛋白质点, 进一步行胶内酶切, MADITOF/MS 质谱分析, 得到各差异点的蛋白质指纹图谱, 结合蛋白质生物信息库 (Matrix science Ltd database), 对各蛋白质进行初步鉴定。结论: 初步鉴定了 3 个差异蛋白, 分别为阻凝蛋白重链 B、磷脂谷胱甘肽过氧分酶及泛素化酶 E2 (MW: 17 kd), 初步认为这三种蛋白质在激素性骨坏死的发病及中药治疗过程中发挥着重要调控作用。

关键词 双向电泳 肽质量指纹谱 基质辅助激光解吸/飞行时间质谱 骨坏死 激素 蛋白质组学 中药

中图分类号: Q816 文献标识码: B 文章编号: 1005-0205(2005)05-0004-07

Bone Proteomic Analysis About Chinese Medicine Action on Rat Glucocorticoid-induced Model of Osteonecrsis. Liu Jianren, Fan Yueguang, Wang Haibing, et al. *The Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China*

ABSTRACT Objective: To study the mechanism about glucocorticoid-induced osteonecrosis and Chinese Medicine action on osteonecrosis in proteomics, it is beneficial to prevention and cure this disease. **Methods:** Rat was randomly divided into three groups: control group, osteonecrosis model group and Chinese Medicine therapy group. In the present proteomic study, we characterized the potential effects of glucocorticoids and Chinese Medicine on protein expression in rat bone. Using two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, and Matrix science Ltd database, we elementarily

收稿日期: 2004-10-18

基金项目: 获得国家自然科学基金资助 (30273631, 3010244); 广东省自然科学基金 (020778); 广东省教育厅基金 (202011)

作者简介: 刘建仁 (1972-), 男 (回族), 湖南省桃江人, 主治医师。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

identified three variational proteins. **Conclusion:** Three proteins were identified as proteins similar to Myosin heavy chain B, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and ubiquitin-conjugating enzyme E2-17kD. These proteins have been documented to be glucocorticoid-related proteins. These results can provide valuable experimental evidences for the research of the molecular mechanism of osteonecrosis response to glucocorticoids and Chinese Medicine in bone.

KEY WORDS: Proteomics Two-dimensional electrophoresis MALDI-TOF/MS Glucocorticoids Osteonecrosis Chinese Medicine

糖皮质激素作为临床一线药物,广泛地应用于治疗系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、白血病、顽固性皮炎以及肾病综合征等疾病^[1,2],而伴随来的严重并发症——骨坏死,特别是股骨头坏死,由于其产生的疼痛及最终的股骨头塌陷、骨性关节炎、关节功能丧失,给患者带来严重的身心损害和经济负担,引起了世界各国的广泛关注。

目前国内外围绕该病开展的病理药理研究,取得了一定的进展,主要有以下几种认识:骨质疏松学说^[3];细胞毒性学说^[4,5];血液高黏滞学说^[6];静脉瘀滞、骨内高压学说^[7];脂质代谢紊乱学说^[8];另外,Manolagas等^[9]发现激素长期作用下的骨组织,成骨细胞分裂增殖明显抑制,细胞凋亡加剧;Xudong Li等^[10]发现地塞米松能够抑制骨髓间质细胞向成骨细胞转化的转录因子 Cbfa1/Runx2 表达,而促进骨髓间质细胞向脂肪样细胞转化的转录因子 PPAR γ 2 的表达;等等。总之,由于涉及的病理变化复杂,准确的发病机理尚有待进一步深入研究;行之有效的治疗药物和手段,依然有待开发和研究。

祖国医学则在治疗本病上显示了潜在的优势,普遍认为其病因主要可归纳为先天不足、肾气亏虚、气滞血瘀、痰湿内阻、外邪侵袭等几个方面,中医药防治采用综合治疗,早期活血通络,后期补肝肾、壮筋骨来拮抗激素诱导股骨头坏死,取得了较好疗效。中药生脉成骨胶囊是我们课题组治疗激素性股骨头坏死的有效方,已经获得国家新药开发证书,并进入新药二期临床试验。我们在临床研究中发现,该药应用以后,能够显著改善患者疼痛,加速死骨吸收,促进新骨形成,表现出较强的成骨活性^[11-13]。然后中药的作用机理复杂,用目前的研究手段还不能完全阐明其准确的作用机理或作用靶点,严重影响中药的推广应用。

蛋白质组学(Proteomics)是一种高通量筛选技术,已经成为当前生命科学的一个重要热点,随着人类基因组计划的完成,人们发现其并不能够完全解释生命的全部现象,作为生命活动的直接参与者——蛋白质被提到了首要位置,而药物作用的途径,也势必通过蛋白质来发挥作用,因此开展蛋白质组学的药物作用机理研究也就十分必要。

本研究针对激素性骨坏死模型组,中药治疗组及

空白对照组骨组织总蛋白质的双向电泳图谱进行比较,获得了3个差异点。随后对这3个差异点进行了质谱分析,得到其肽质量指纹谱,通过数据库 MASCOT 软件搜索进行了初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 动物来源 清洁级雄性 SD 大鼠(由广州中医药大学实验动物中心提供),体重 0.18~0.22 kg,年龄 13~15 周,在广州中医药大学实验动物中心标准清洁级动物房饲养。

1.1.2 试剂 丙烯酰胺,双甲叉丙烯酰胺,Tris-base,SDS,巯基乙醇,Triton X-100,Urea,TEMED,过硫酸氨和考马斯亮蓝 R250 等购自上海生物工程技术服务有限公司;两性载体电解质和甘氨酸购自北京经科试剂公司;三氟乙酸(TFA)为日本东京化成工业株式会社产品;碘乙酰胺,购自 Sigma 公司;测序级胰蛋白酶购自 Promega 公司;乙氰(CAN)为国产生色谱纯;其它试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 中药 中药生脉成骨胶囊(广州中医药大学新药开发中心提供);灌胃前制备成混悬液。

1.1.4 主要仪器设备 质谱仪(德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM MALDI-TOF),圆盘电泳槽和高压稳压稳流电源(北京六一仪器厂产品)、普通台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、低温高速离心机(Beckman 公司)。

1.2 动物处理 按照文献方法^[14],清洁级 SD 雄性大鼠购进后在标准清洁级动物房中饲养 3~5 天,随机分组,20 只作为模型组,每 4 天按照 10 mg/kg 剂量在双侧臀部肌肉注射甲基强地松龙 1 次;20 只作为中药治疗组,每 4 天按照 10 mg/kg 体重剂量在双侧臀部肌肉注射甲基强地松龙 1 次,同时第 4 周起停用激素,每天按照体表面积折算(人与大鼠)方法给予等同剂量生脉成骨胶囊混悬液灌胃治疗;10 只作为对照组,每 4 天按照 1 ml/kg 体重剂量在双侧臀部肌肉注射生理盐水一次。

1.3 动物骨组织蛋白样品提取和处理 SD 大鼠经过 6 周激素处理,并取样行骨骼形态学检查,确定骨坏死造模成功,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,放血处死,冰上操作,迅速取下其肱骨及股骨骨干,剔除骨膜及两

端软骨部分,用蒸馏水反复冲洗,将残留血液冲洗干净,将骨放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管,标记后置冻盒中,先在 -20 冰箱中预冻 30 分钟后再转入 -70 冰柜中保存备用;也可直接取用新鲜鼠骨提取蛋白质样品。取 1 g 新鲜鼠骨,放在盛有液氮的研钵果研磨粉碎,并缓慢加入 3 ml 样品提取液(1.44 g 尿素,0.46 g 硫脲,0.12 g CHAPS,0.047 g DTT,0.015 g Tris-base,30 μ l 100 mmol/L PMSF),放在 4 冰箱中裂解提取蛋白质过夜,约 14 h 后取出^[15,16]。然后 12000 r/min 离心 30 min,取上清液体放入 0.01 M PBS 中透析 24 hrs,取样品,加入 10 倍体积 -20 预冷的丙酮, -20 冰箱中静置 2 h,10000 r/min 离心 10 min,保留沉淀,4 中丙酮挥发,加入 5 倍上清体积的裂解液(7mol/L 尿素,4% CHAPS,100mmol/L DTT,40 mmol/L Tris,0.5% 的两性电解质 PH5-7,2mol/L 硫脲),2 h 后 10000r/min 离心 10 min 上样。

1.4 双向电泳 双向电泳按文献^[17]的方法稍做改进进行。用 PH5-7 的两性电解质配制 IEF 胶条。第一向预电泳 200V 15 min,300V 30 min,400V 2 h,上样后电压 400V 12 h 后调到 600V 6 h。电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色。GDS80000pc 凝胶成像分析系统扫描,进行图像分析。

1.5 质谱样品的制备 比较三组双向电泳图谱,找到差异蛋白,从胶上切下,切成 1 mm³ 大小置于 0.5 ml 的 Eppendorf 管中,按文献^[18]的方法处理样品。

1.6 质谱分析 质谱样品使用德国 BRUKER 公司的 ReFlexTM/MALDI-TOF 质谱仪进行分析,采用

反射模式,离子源加速电压 1 为 20KV,加速电压 2 为 23KV,N₂ 激光波长 337 nm,脉冲 3 ns,离子延迟 2000 ns,真空度 1.4 \times 10⁻⁷ Torr,质谱信号单次扫描累加 20 次,用标准 Marker 峰作为外标校正质谱峰,正离子谱测定,获得肽质量指纹图谱。

1.7 数据库的查询 通过 Matrix Science Ltd 网站提供的 MASCOT 软件(<http://www.matrixscience.com/cgi/search-from-select.html>) 进行查询,查询条件:分子量、等电点未作限定,肽片段分子量的误差范围 \pm 0.2Da,未水解的酶切位点数为 2,蛋白种属选择大鼠,离子选择 [M+H]⁺ 和 Monoisotopic,修饰选 Carbamidomethyl(C),半胱氨酸为碘乙酰胺处理。

2 结果

2.1 不同对照组大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱的比较 空白对照组、激素性骨坏死模型组及中药治疗组骨蛋白的双向电泳图谱(见图 1)。从图 1 可见,三级图谱非常相似,蛋白点主要集在 p 5~7 和 M_w10~1000KD 区域。从整个图谱来分析,肉眼可以辨别约 300 多个蛋白点,且蛋白点之间区分比较清晰,可以对其进行蛋白质表达的差异分析。

对 A、B、C 三个不同对照组大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱比较,从中发现了 3 个差别明显的蛋白,分别命名为 P1、P2、P3,其分子量依次为 95 kd,18.5 kd,16.7kd。

采用双向电泳图谱分析软件(Genomic Solutions Investigator HT Analyzer version 2.02)对差异蛋白的相对含量进行分析,结果见图 2。

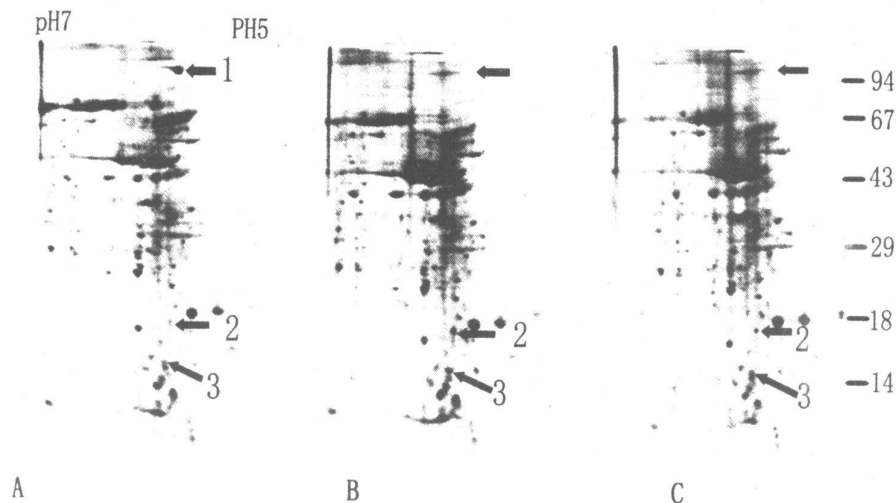


图 1 不同对照组大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱的比较

2.2 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析 对 3 个差异蛋白进行 MALDI-TOF 分析,得到各自的肽质量指纹图谱如图 3。从图谱中可见,三个肽质量指纹图谱信号较强,基线平稳,适合进一步数据库检索鉴定。

根据得到的肽质量指纹图谱数据,及分子量范围和其它有关参数,通过 Matrix science 网站提供的 MASCOT 软件查询与之相匹配的蛋白,搜索结果见表 1。

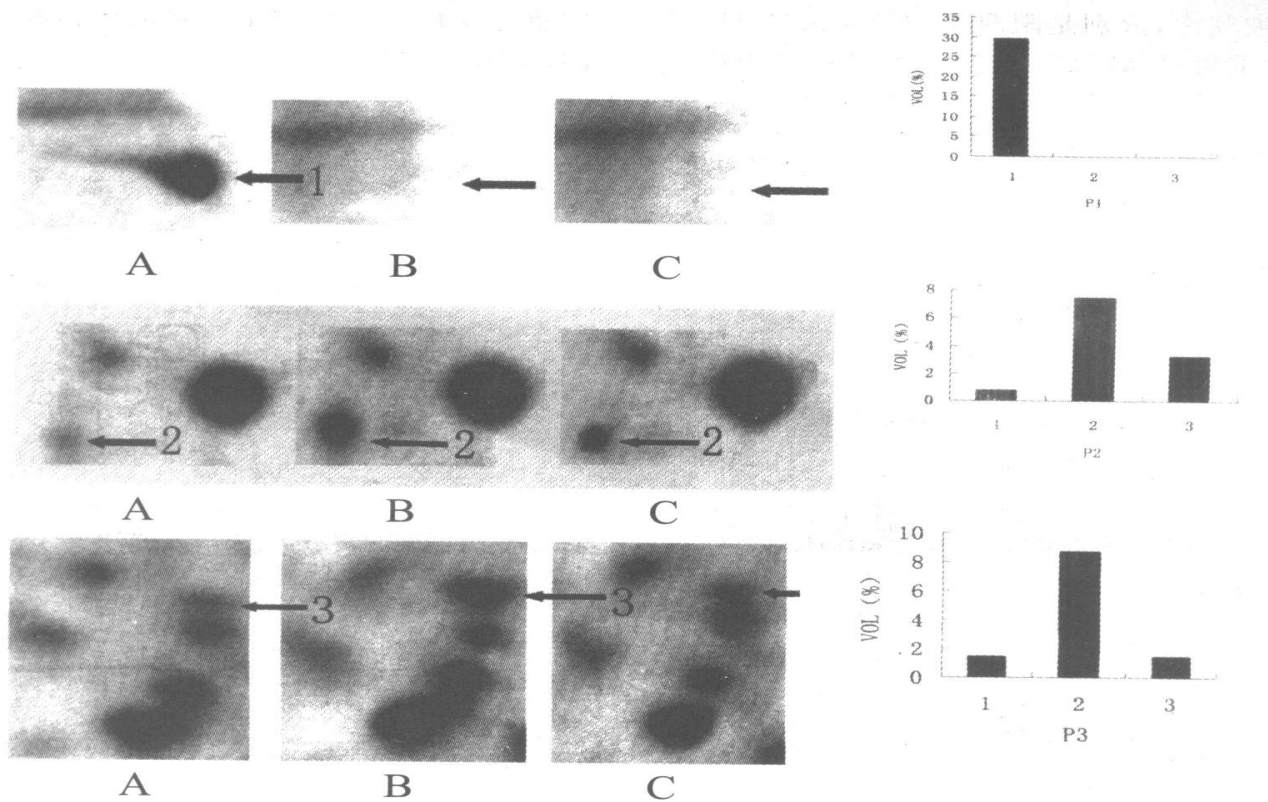


图 2 不同对照组大鼠骨组织蛋白双向电泳图谱差异点(箭头表示)放大图谱

由搜索结果可看出, P1 为阻凝蛋白质链 B (myosin heavy chain B), P2 为磷脂谷胱甘肽过氧化酶(Phospholipid hydroperoxide glutathione), P3 为

泛素化酶 E2- 17KD(ubiquitin- conjugating enzyme E2- 17kD)

表 1 P1, P2, P3 在数据库搜索的结果

Proteins	Total score	Matched peptide	Accession	Description	PI/ Mw
P1	65	14	P127772	myosin heavy chain II B [Segment] CHAIN 1: Phospholipid	5. 31/ 95703. 5
P2	24	5	P36970	hydroperoxide glutathione- Rattus norvegicus (Rat).	8. 51/ 18664. 61
P3	34	4	P23567	ubiquitin- conjugating enzyme E2- 17kD	7. 67/ 16676

3 讨论

我们通过比较分析不同处理组间骨组织蛋白质组的分子解剖图谱, 找到了与激素诱导骨坏死及中药治疗相关的差异蛋白质点, 从质和量两方面进行了比较, 发现了三个差异蛋白质点, 分别命名为 P1、P2、P3。

P1 搜索到一种蛋白质与之相匹配, 即阻凝蛋白重链 B。阻凝蛋白是一种广泛存在于真核生物的细胞骨架蛋白, 它与肌动蛋白细丝一起通过 ATP 水解作用为

细胞提供动力来源。近年来, 人们通过分子克隆的方法, 鉴定了一系列阻凝蛋白的同源物, 构建了一个阻凝蛋白分子超家族^[19, 20]。阻凝蛋白 是其中最常见的一种, 其分子结构已经研究清楚, 由一对重链和两对轻链构成。所有脊椎动物细胞都含有一种非肌肉性阻凝蛋白 分子, 而这种非肌肉性阻凝蛋白 分子在细胞自身活动诸如细胞浆移动、迁移和形态改变方面, 起着重要作用^[21-24]。至今, 已有两种同源的非肌肉性阻凝蛋

值得注意的是,有研究证实地塞米松(一种糖皮质激素),能够减少阻凝蛋白重链 B 的合成,增加阻凝蛋白重链 B 对碱性蛋白酶的敏感性,而碱性蛋白酶也能够降解阻凝蛋白重链 B^[26]。

本研究中,我们发现在激素性骨坏死模型组及中药治疗组中,阻凝蛋白重链 B 较对照组明显却失,这与上述报道相符合,提示阻凝蛋白重链 B 是一种激素敏感性蛋白,在激素性骨坏死的发病过程中可能发挥了重要作用。

P2 在数据库中检索到一种与之相匹配的蛋白质,即磷脂谷胱甘肽过氧化酶。该酶能够促进磷脂过氧化物、胆固醇及相关酯类降解,它在保护哺乳动物因摄入脂质过氧化物而产生毒性损害方面发挥作用,特别是在动物胚胎期。它还能够抵抗辐射及氧化损害。目前研究显示,氧化反应物(ROS)和抗氧化剂在许多细胞生理反应中,即能够起第二信使的作用,也能够影响细胞信号通路。过量的氧化反应物或者抗氧化保护系统缺乏都可以导致一系列有害反应,主要涉及到衰老、退行性病变以及癌症的发生等等。

此外有研究显示,糖皮质激素能够对氧化反应物相关的细胞通路产生作用,这主要表现在中风,低血糖反应时,糖皮质激素能够加剧神经降解作用。此外,糖皮质激素还能够提高由氧介导的神经毒性损害作用^[27]。

还有许多激素性骨坏死动物实验证实,糖皮质激素诱导的骨坏死,其中一种病理机制可能源于骨细胞内大量脂质的堆积^[28]。

而本研究中我们发现在激素性骨坏死模型组中,磷脂谷胱甘肽过氧化酶大量表达,这提示着糖皮质激素可能导致了大量的氧化反应物的堆积,机体为了消除或对抗氧化反应物的毒性损害,应激性地产生了大量磷脂谷胱甘肽氧化酶来降解;而在中药治疗组中,磷脂谷胱甘肽过氧化酶的表达又有明显减少(但相对对照组还是显著增加),这提示活血化瘀中药可能有直接抗氧化反应物的作用,也可能通过抑制了氧化反应物产生,达到治疗的作用。

P3 在数据中搜索到一种与之相匹配的蛋白质,即泛素化酶 E2(MW:17KD)。我们知道蛋白质的泛素化是由许多酶调节实现的。目前已经证实有泛素激活酶 E1、泛素化酶 E2 以及泛素联接酶。在这些酶中,不同的泛素化酶 E2 成员及泛素联接酶成员作用机理基本一致,都具有相同的酶作用底物及组织特异性。研究证实,泛素化酶 E2 能够促进泛素小分子与靶蛋白结合,并选择性地介导降解异常蛋白及寿命短的蛋白。泛素化酶 E2 成员还在介导泛素化蛋白质水解过程中起重要作用。

研究显示,检测不同组织来源的 RNA,泛素化酶 E2(MW:17KD)具有广泛的组织分布性,但主要集中在睾丸组织中。该酶在蛋白质的泛素化过程发挥重要作用^[30]。

另外,在脓血症中,肌肉的耗损主要是通过泛素化-溶酶体蛋白质水解途径来实现的,这其中部分是由糖皮质激素介导的^[26]。

本研究中,我们发现在激素性骨坏死模型组中,泛素化酶 E2(MW:17KD)大量表达,这提示着糖皮质激素可能通过泛素化酶 E2(MW:17KD)途径完成了对某些蛋白质的降解;而在中药治疗组中,泛素化酶 E2(MW:17KD)的表达又有明显减少,这提示着活血化瘀中药可能有直接拮抗泛素化酶 E2(MW:17KD)的作用,防止蛋白质降解来起到治疗的作用。

总之,我们通过蛋白质组学研究的方法,研究了激素性坏死模型组、中药治疗组以及对照组的骨组织蛋白质组的表达变化情况,并利用质谱分析结合蛋白质数据查询,初步鉴定了其中的差异蛋白质点,经过分析,结合文献资料总结,这些蛋白质在不同疾病中都确实与糖皮质激素作用相关,这为揭示激素性骨坏死的发病机理和中药的治疗机理,提供了全新的实验证据,能够大大推进我们从分子水平认识激素性骨坏死的发病机理,并为中药的作用机理找到确实的依据,为推广其临床应用,提供了宝贵数据。

参考文献

- [1] Mankin, H. J. 1992. Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). *N Engl J Med*, 326: 1473 ~ 1479
- [2] Mont, M. A. and Hungerford, D. S. 1995. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg*, 77A: 459 ~ 474
- [3] Arlot ME. Bone Histology in adults with aseptic necrosis. *Bone Joint Surg (Am)*, 1983, (65): 1139
- [4] Golimcher MJ, Kenzora TE. The biology of osteonecrosis of the femoral head and its clinical implications. *Clin Orthop*, 1979, (140): 273
- [5] Warner JP, Philip JH, Brods KY, et al. Studies of nontraumatic osteonecrosis. *Clin orthop*, 1987, (225): 128
- [6] Jones JP. Intravascular coagulation and osteonecrosis. *Clin orthop*, 1992, (277): 41
- [7] Axletts. Ischemia and necrosis of bone. *Baltimore London, Williams & Wilkins*, 1980, 28
- [8] Parrell E, Willra m H. Orticosteroid-induced avascular necrosis. *Bone Joint surg(Am)*, 1971, (53): 859
- [9] Manolagas SC, Weinstein RS. 1999. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 14: 1061 ~ 1066
- [10] Xudong Li, Quanjun cui, Chinghai Kao, Gwo-Jaw Wang and Gary Baliana. 2003. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ and

- increasing Cbfa1/Runx2 expression on bone marrow mesenchymal cell cultures. Bone 33: 652 ~ 659
- [11] 徐传毅, 何伟, 方斌, 等. 生脉成骨方对股骨头坏死型胶原表达的调节作用研究. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(6): 574 ~ 576
- [12] 樊粤光, 徐光毅, 何伟, 等. 生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死血管内皮细胞功能的调节及意义. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(9): 675 ~ 677
- [13] 袁浩, 方斌, 何伟, 等. 生脉成骨胶囊治疗激素性股骨头坏死的实验研究. 中医正骨, 1999, 11(8): 451 ~ 452
- [14] Yamamoto, T, Irisa T, Sugioka, Y and Sueishi, K, 1997. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. Arthritis Rheum, 40: 2055 ~ 2064
- [15] 梁前进. 野生鲫鱼和五个金鱼代表品种的肌肉蛋白电泳分析. 动物学研究, 1994, 15(2): 68 ~ 75
- [16] 任惠民. 正常及重症肌无力肌肉蛋白成分的比较. 中国临床神经科学, 2000, 8(4): 260 ~ 262
- [17] 夏其昌. 蛋白质化学研究技术和进展. 北京: 科学出版社, 1997
- [18] 陈子君, 王三英, 彭宣宪. 温度对人肺癌细胞 A549 蛋白表达的影响. 实验生物学报, 2003, 35(3): 179 ~ 183
- [19] Sellers J. R. Goodson H. V, and Wang, F. J. Muscle Res. Cell Motil, 1996, 17: 7 ~ 22
- [20] MERMALL V, Post, P. L, and Moosker, M. S. Unconventional myosins in cell movement, membranetraffic, and signal transduction. Science, 1998, 279: 527 ~ 533
- [21] Spudich, J A. In pursuit of myosin function. Cell Reg, 1989, 1: 1 ~ 11
- [22] Katsuragawa, Y, Yanagisawa, M. Inoue, A, and Masaki, T. Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Eur, J. Biochem. 1989, 184: 611 ~ 616
- [23] Kawamoto, , and Adelstein, R. S. Chicken nonmuscle myosin heavy chains: differential expression of two mRNAs and evidence for two different polypeptides. J. Cell Biol, 1991, 112: 915 ~ 924
- [24] Chen , W, Ji, J. G, Xu, X. M, He, S. Z, Ru, B. G. Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins, International Journal of Developmental Neuroscience, 2003, 21: 209 ~ 216
- [25] Masayuki Takahashi, Takaaki Hirano, Keiji Uchida, and Akihiko Yamagishi. Developmentally regulated expression of a non-muscle myosin heavy chain B inserted isoform in rat brain. Biochemical and biophysical research communications, 1999, 259: 29 ~ 33
- [26] Teet Seeme, Priit Kaasik, Ando Pehme, Karin Alev, Eva- Maria Riso. The effect glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 86: 201 ~ 206
- [27] McIntosh L. J and Sapolsky R. M. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity, Neurotoxicology, 1996, 17(3 ~ 4)
- [28] Fisher, D.E. The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis. Clin Orthop, 1978, 130: 68 ~ 80
- [29] Jane P. Jensen , Paul W. Bates, Mei Yang, Richard D. Vierstra, and Allan M. Weissman. Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes. The journal of Biological Chemistry, 1995, 270(51): 30408 ~ 30414
- [30] Wing SS, Jain P. Molecular cloning, expression and characterization of a ubiquitin conjugation enzyme (E2(17) kD) highly expressed in rat testis. Biochem J. Jan 1995, 305(1): 125 ~ 132

· 基础研究 ·

小鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化为神经元样细胞的实验研究

朱小虎 陈霞平 阮绪芝

(郧阳医学院附属太和医院 十堰 442000)

摘要 目的: 探讨体外诱导小鼠骨髓间充质干细胞(mouse marrow mesenchymal stem cells, mMSCs)分化为神经元样细胞的条件。方法: 密度梯度离心结合差异贴壁法分离、纯化 mMSCs, 胰蛋白酶消化传代扩增 mMSCs。用最适浓度的 β - 巯基乙醇(BME) + 神经生长因子(NGF)、NGF+ 全反式维甲酸(ATRA)、NGF+ BME+ ATRA 作为诱导剂, 观察诱导期间细胞的形态变化, 并用免疫细胞化学法鉴定神经烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF)的表达, 行甲苯胺蓝染色显示尼氏小体。结果: (1) 免疫细胞化学显示 NGF+ BME+ ATRA 诱导组诱导效率最高, 78% 细胞表达 NSE, 80% 细胞表达 NF; (2) 各诱

收稿日期: 2004- 11- 21

作者简介: 朱小虎(1974-), 男(汉族), 湖北省武汉市人, 主治医师。