本、新加坡、马来西亚均有多种基因型及亚型的流行，而且不同阶段可出现不同的 EV71 基因型。而中国除 2008 年安徽省阜阳市报道出现 A 基因外[11]，其余均为 C4 基因型。因此，对 EV71 监测有利于了解该病毒的变异，并对其传播途径、预防和控制具有重要的意义。

参考文献

1 Tee KK, Lam TT, Chan YF, *et al*. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene[J]. J Virol, 2010, 84(7): 3339 - 3350

2 周世力，李琳琳，何雅青，等. 我国分离的肠道病毒 71 型(SHZH03 病毒株)全基因组核苷酸序列分析[J]. 病毒学报，2004，20(1): 1 - 11

3 董晓楠，应剑，陈应华. 1970 ~ 2004 年全球肠道病毒 71 型分离株的分子流行病学分析[J]. 科学通报，2007，52(9): 1021 - 1027

4 Oberste MS, Maher K, Kilpatrick, DR, *et al*. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73: 1941 - 1948

5 Foo DG, Alonso S, Chow VT, *et al*. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide[J]. Microbes Infect, 2007, 9(11): 1299 - 1306

6 Foo DG, Alonso S, Phoon MC, *et al*. dentification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. Virus Res, 2007, 125(1): 61 - 68

7 Foo DG, Macary PA, Alonso S, *et al*. dentification of human CD4 T - cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71[J]. Viral Immunol, 2008, 21(2): 215 - 224

8 Shao MA, Jian SL, Jing JW, *et al*. Genetic analysis of the VP1 region of Human enterovirus 71 strains isolated in Fuyang, China, during 2008[J]. Virologica Sinica, 2009, 24(3): 162 - 170

9 Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, *et al*. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications[J]. Rev Med Virol, 2007, 17(6): 371 - 379

10 Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, *et al*. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11): 778 - 790

11 Yu H, Chen W, Chang H, *et al*. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008[J]. Virus Genes, 2010, 41(1): 1 - 4

(收稿：2011 - 03 - 23)

(修回：2011 - 04 - 07)

自噬相关基因 MAPLC3 在放射损伤人骨髓间充质干细胞中的表达

陈　哲　白　海　潘耀柱　王存邦　欧剑锋　赵　强

摘　要　目的　探讨人骨髓间充质干细胞(hBMMSCs)放射损伤后自噬水平的变化。**方法**　利用 X 线 8Gy 照射体外培养的 hBMMSCs，应用反转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)技术检测自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule - associated protein 1 light chain 3，MAPLC3)的 mRNA 表达。**结果**　正常对照组中 MAPLC3 呈低表达，而 8GyX 线照射后 2h 其表达明显升高($P < 0.05$)。**结论**　hBMMSCs 放射应激时存在自噬的活化。

关键词　放射损伤　人骨髓间充质干细胞　自噬　MAPLC3

Expression of Autophagy - related Gene MAPLC3 in Human Mesenchymal Stem Cells with Irradiation Injury. *Chen Zhe, Bai Hai, Pan Yaozhu, et al. The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Gansu 730000, China*

Abstract　Objective　To investigate the chang of autophagy level in hBMMSCs after irradiation injury. **Methods**　Cultured hBMMSCs were irradiated with 8Gy X - rays in this study. The mRNA expression of MAPLC3 in hBMMSCs was analyzed by RT - PCR at 2h after irradiation. **Results**　The mRNA expression of MAPLC3 in irradiation exposed group was significantly higher than that in normal control group($P < 0.05$). **Conclusion**　Autophagy could be activated in hBMMSCs exposed to irradiation.

Key words　Irradiation injury; Human mesenchymal stem cells; Autophagy; MAPLC3

作者单位：730000　兰州大学第二临床医学院(陈哲、白海、潘耀柱、王存邦、欧剑锋、赵强)；730050　兰州军区兰州总医院血液病研究所(陈哲)

通讯作者：白海，主任医师，电子信箱：baihai98@ tom. com

骨髓间充质干细胞(BMMSCs)具有重要的造血支持和调控作用,是造血微环境中的主要细胞。在现代生活中,放射事故和肿瘤放射治疗时,辐射是造血系统损伤的常见原因,放射后 BMMSCs 结构和功能的完整性是造血恢复重建的基础[1]。最近临床观察发现[2],异基因干细胞移植后患者骨髓的 HSCs 来源于供者,而 BMMSCs 主要源于自身,这表明 BMMSCs 具有一定的放射抗性。自噬是广泛存在于真核细胞中的适应性调节机制,是细胞在各种应激条件下维持自身稳态和生存的重要手段[3]。目前,自噬是否参与了 hBMMSCs 的辐射损伤应激反应尚未见报道。本研究通过检测放射损伤 hBMMSCs 中自噬相关基因 MAPLC3 的表达,以明确放射应激时 hBMMSCs 自噬水平的变化,并探讨其意义。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:CD34 - PE、CD44 - PE、CD45 - FITC、CD71 - FITC、HLA - DR - FITC 荧光标记的鼠抗人单克隆抗体购自 eBioscience 公司, Total RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,PCR 反应引物由上海生工生物工程有限公司合成。流式细胞仪购自 Becton Dickinson 公司,X 线粒子加速器为美国瓦里安公司产品。

2. 实验分组及处理:取处于对数生长期的第 4 代 hBMMSCs,随机分为正常对照组和照射组。室温下,用 6MV - X 射线照射照射组细胞,源靶距 100cm,吸收剂量率 0.4Gy/min,总吸收剂量 8Gy,照后 2h 收集各组细胞,进行 RT - PCR 检测。

3. hBMMSCs 的分离、培养及鉴定:取正常供者骨髓 5ml,按本室已建立的方法进行 hBMMSCs 的分离和培养,传至第 4 代时,进行 hBMMSCs 成脂诱导分化能力检测和流式细胞术表面标记鉴定,然后用于实验[4]。

4. RT - PCR 检测自噬相关基因 MAPLC3mRNA 的表达:收集各实验组细胞,按照说明书提取总 RNA,进行反转录及 PCR 扩增。引物序列:目的基因 MAPLC3 的上游引物为 5′ - TTCTTCCTCCTGGTGAATGG - 3′,下游引物为 5′ - GTGGGTGCCTACGTTCTGAT - 3′,扩增片段为 253bp。内参 GAPDH 的上游引物为 5′ - TCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTA - 3′,下游引物为 5′ - TGGCATGGACTGTGGTCATGAGTC - 3′,扩增片段为 525bp。目的基因的扩增条件为:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 40s,55℃ 退火 40s,72℃ 延伸 40s,共 30 个循环,72℃ 充分延伸 10min。内参 GAPDH 的扩增条件为:94℃ 预变性 5min,94℃ 变性 40s,61℃ 退火 40s,72℃ 延伸 40s,共 30 个循环,72℃ 充分延伸 10min。取 5μlPCR 产物,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,经凝胶图像分析仪观察、拍照并分析各条带的积分光密度值(IOD 值),从而计算出目的基因 mRNA 的相对表达量,即目的基因与 GAPDH 条带 IOD 值的比值。实验重复 3 次。

5. 统计学方法:所有实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 17.0 统计软件进行两独立样本的 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. hBMMSCs 形态及鉴定:体外培养的 hBMMSCs 贴壁生长,显示典型长梭形外观,呈鱼群状、辐射状、漩涡状、菊花状生长(图 1)。成脂诱导 14 天后,可见大部分细胞由原来的长梭形变为圆形或多角形,胞内充满高折光性葡萄串状白色大脂滴,胞核被挤向一侧,油红 O 染色呈阳性(图 2)。流式细胞术检测显示 CD34、CD45 和 HLA - DR 表达阴性,CD44、CD71 表达阳性。以上结果表明本研究所培养细胞符合 hBMMSCs 的生物学特性。

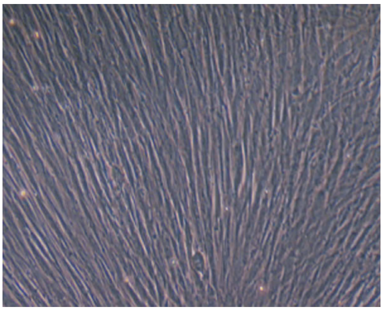

图 1　第 4 代 hBMMSCs(×200)

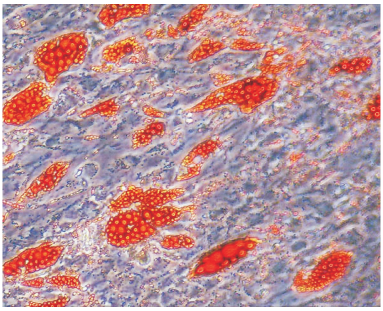

图 2　hBMMSCs 成脂分化诱导,油红 O 染色(×200)

2. 放射前后 hBMMSCs 中自噬相关基因 MAPLC3mRNA 的表达:RT - PCR 检测结果显示,正常对照组中 MAPLC3 呈低表达,而 8GyX 线照射后 2h 其表达明显升高($P < 0.05$)。经凝胶图像分析仪分析显示,正常对照组与照射组的相对表达量分别为 0.2066 ± 0.007、0.5823 ± 0.0141($P < 0.05$,图 3)。

讨　　论

自噬作为一种保守的促生存机制,广泛存在于真核细胞的生理和病理过程中。当面临饥饿、缺氧、放

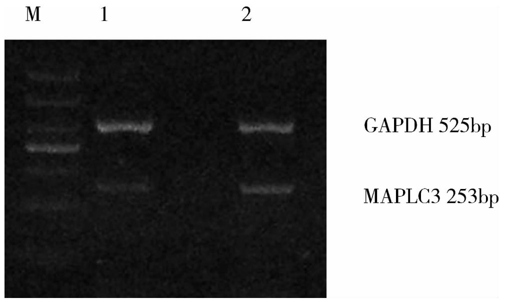

图 3　放射损伤 hBMMSCs 中自噬相关基因 MAPLC3 的表达

M. 1000bp DNA 标记;1. 正常对照组;2. 照射组

射等刺激时,自噬反应能够很快激活,细胞中衰老、受损的细胞成分、有害物质等即被双层膜或多层膜包裹形成自噬体,然后通过溶酶体的降解 - 再循环途径,维持内环境的稳定,帮助细胞渡过难关[3]。自噬基因缺失的新生小鼠面对饥饿应激时,不到 12h 就会死亡[5]。自噬基因缺陷的心肌细胞也会出现心肌肥大和收缩功能障碍[6]。而放射应激时自噬反应的激活能够减轻小鼠骨骼肌纤维的放射损伤[7]。那么,hBMMSCs 放射损伤时是否存在自噬的活化,目前还不清楚。

本研究以骨髓移植预处理方案常用的单次全身照射剂量 8Gy 照射 hBMMSCs 后 2h,MAPLC3 的表达水平明显升高,是放射前的 2.8 倍[8]。MAPLC3 是哺乳动物中酵母 ATG8 基因的同源物,在参与自噬体形成的两个泛素样蛋白系统之一起关键作用,可以靶向定位于前自噬体和自噬泡膜上,在自噬泡形成之后仍可继续与膜表面结合,是目前确认的自噬体标志物[9]。我们的研究结果表明 hBMMSCs 放射应激时存在自噬的活化。根据目前相关的研究结果,我们推测自噬可能参与了放射后 hBMMSCs 的损伤修复,提高了其放射抗性,从而有利于放射后的造血恢复。但是,自噬的促生存机制是自限性的,在一定条件下也会引起自噬性细胞死亡[3]。因此,关于自噬在 hBMMSCs 放射应激时的作用仍需进行更加深入的研究。

参考文献

1　Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000,28(8):875 - 884

2　Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, *et al*. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue[J]. Ann Hematol, 2005,84(11):722 - 727

3　Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell[J]. Eukaryot Cell, 2002,1(1):11 - 21

4　何晓霞, 白海, 王存邦, 等. 人骨髓间充质干细胞中 Toll 样受体的表达特征[J]. 中国实验血液学杂志, 2009;17(3):695 - 699

5　Kuma A, Hatano M, Matsui M, *et al*. The role of autophagy during the early neonatal starvation period[J]. Nature, 2004,432(7020):1032 - 1036

6　Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, *et al*. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. Nat Med, 2007,13(5):619 - 624

7　Hino M, Wada S, Tajika Y, *et al*. Heavy ion microbeam irradiation induces ultrastructural changes in isolated single fibers of skeletal muscle[J]. Cell Struct Funct, 2007,32(1):51 - 56

8　Kim SY, Lee JW, Cho BS, *et al*. Unrelated donor bone marrow transplants for severe aplastic anemia with conditioning using total body irradiation and cyclophosphamide[J]. Bio Blood Marrow Transplant, 2007,13(7):863 - 870

9　Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al*. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. EMBO J, 2000,19(21):5720 - 5728

(收稿:2011 - 04 - 11)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统启事

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由卫生部主管,中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。中文科技期刊数据库统计源期刊,中文科技期刊数库核心期刊,中国学术期刊全文数据库收录期刊,中国学术期刊引证报告统计源期刊。《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站:http://www. yxyjzz. cn,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话:010 - 52328679(单政编辑)。

《医学研究杂志》编辑部