

Oct-4 在小鼠骨髓间充质干细胞定向诱导分化中的甲基化状态

王 菊¹, 符毓豪², 王维山³, 王端明¹, 周宗瑶¹

¹石河子大学医学院组织胚胎学教研室, 新疆石河子 832000

²海南省生殖医学中心, 海口 570102

³石河子大学医学院第一附属医院骨科, 新疆石河子 832000

通信作者: 周宗瑶 电话: 0993-2057152, 电子邮件: zongyaozh@163.com

摘要: **目的** 研究 Oct-4 在小鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 定向诱导分化中的甲基化状态。**方法** 全骨髓贴壁筛选法培养小鼠 BMSCs, 通过形态学观察及免疫细胞化学进行鉴定。骨块接种培养法培养小鼠成骨细胞, 采用碱性磷酸酶 (AKP) 及茜素红进行鉴定。诱导小鼠 BMSCs 向成骨细胞分化, 采用间接免疫荧光染色和 RT-PCR 法观察 Oct-4 在小鼠 BMSCs 诱导分化前后的表达情况, 甲基化特异性 PCR 检测 Oct-4 在小鼠 BMSCs 诱导分化前后的甲基化状态。**结果** 分离培养的小鼠 BMSCs 在体外能大量增殖, 形成形态均一的细胞集落, 培养细胞的 CD29、c-Kit 和 CD44 呈阳性表达, CD34 呈阴性表达。诱导 10d 后的细胞及从小鼠颅骨中分离、培养出的成骨细胞, AKP 及茜素红染色呈阳性。间接免疫荧光染色和 RT-PCR 结果显示, Oct-4 在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中表达下调。小鼠 BMSCs 定向诱导分化中 Oct-4 基因启动子区的 CpG 岛出现了甲基化。**结论** 成功在体外培养了小鼠 BMSCs 及小鼠成骨细胞, Oct-4 基因可能参与了成体干细胞多潜能性的维持, Oct-4 基因在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中的表达下调可能是其启动子区 CpG 岛甲基化的缘故。

关键词: Oct-4; 小鼠骨髓间充质干细胞; 分化; 甲基化

中图分类号: [R34] 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)03-0275-06

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.03.007

Oct-4 Methylation in Induced Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells

WANG Ju¹, FU Yu-hao², WANG Wei-shan³, WANG Duan-ming¹, ZHOU Zong-yao¹

¹Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China

²Hainan Provincial Center of Reproductive Medicine, Haikou 570102, China

³Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China

Corresponding author: ZHOU Zong-yao Tel: 0993-2057152, E-mail: zongyaozh@163.com

ABSTRACT: Objective To investigate the methylation Oct-4 in orientation-induced differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Mice BMSCs were isolated and purified from bone marrow by adherent culture, and then identified by morphology and immunocytochemistry. Mouse osteoblastic cells were cultured by bone fragments inoculation, and then identified by alkaline phosphatase (AKP) staining and alizarin red staining. BMSCs were induced to differentiate into osteoblasts *in vitro*. Indirect immunofluorescence staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expressions of Oct-4 in BMSCs before and after induction. The methylation status of Oct-4 gene in mouse BMSCs was explored by a methylation-specific PCR before and after induction. **Results** The isolated mice BMSCs massively proliferated *in vitro* and formed cell colonies with uniform morphology. Positive expressions of CD29, c-Kit, and

CD44 and negative expression of CD34 were found in the isolated cells. After 10 days' induction, both AKP and the alizarin red were positive in cells and osteoblastic cells isolated from mice skull bones. The indirect immunofluorescence staining and RT-PCR also showed that the Oct-4 expression in the directed differentiation of mouse BMSCs was down-regulated. The CpG island of Otc-4 gene promoter in mouse BMSCs became methylated during the induced differentiation. **Conclusions** Mice BMSCs and osteoblasts were successfully cultured *in vitro* in this study. Oct-4 may be involved in the maintenance of adult stem cell pluripotency. The down-regulated expression of Oct-4 gene in mouse BMSCs during the directed differentiation may contribute to the methylation of CpG island in Otc-4 gene promoter.

Key words: Oct-4; bone marrow-derived mesenchymal stem cells; differentiation; methylation

Acta Acad Med Sin, 2013, 35(3): 275-280

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是目前研究最为广泛的一种成体干细胞。随着 BMSCs 的分离培养、细胞系建立以及体外定向诱导分化技术的日趋成熟, 为临床应用带来了极大的便利, 但是有关干细胞定向诱导分化调控机制的研究尚未取得突破性进展。Oct-4 基因既能维持细胞的未分化状态, 又能调控其向细胞的某一特定方向分化, 这种双重作用在发育过程中至关重要, 而 DNA 甲基化是细胞开闭基因表达的一种方式。本研究在体外分离培养了小鼠 BMSCs, 采用成骨诱导剂诱导其向成骨细胞分化, 间接免疫荧光染色和 RT-PCR 法从蛋白和 mRNA 水平观察 Oct-4 在小鼠 BMSCs 诱导分化前后的表达, 并测定了 Oct-4 在小鼠 BMSCs 诱导分化前后的甲基化状态, 以期进一步探讨 Oct-4 在小鼠 BMSCs 增殖分化中的作用, 为小鼠 BMSCs 诱导分化调控机制提供研究思路。

材料和方法

材料和试剂 4~6 周龄 BALB/C 小鼠 [合格证号: SCXK (新) 2003-0001] 购自新疆医科大学实验动物中心。L-DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶 (北京华美公司), 胎牛血清 (fatal bovine serum, FBS, 美国 Hyclon 公司), Oct-4 多克隆抗体、CD34 抗体、CD44 抗体、兔抗 c-Kit 多克隆抗体 (美国 BioLegend 公司), CD29 抗体 (美国 BD 公司), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 IgG (美国 Jackson 公司), 生物素标记的羊抗兔 IgG、SP 法检测试剂盒 (福州迈新生物技术有限公司), 碱性磷酸酶 (AKP) 检测试剂盒、茜素红染色剂 (上海太阳生物有限公司), RT-PCR 试剂盒 (加拿大 Fermentas 公司), Oct-4 甲基化和非甲基化特异性 PCR 引物 (MFP: 5'-GGTTTTAGAAATAATTGG-

TATACGA-3', MRP: 5'-CTATTAACACTACACCCTCTCGA-C-3'; UFR: 5'-TGTTTTAGAAATAATTGGTATATGA-3', URP: 5'-CCTATTAACACTACACCCTCTCAAC-3'; 上海生物工程技术有限公司合成), CpGenome™ DNA Modification Kit (加拿大 Chemicon 公司), TaKaRa IATaq with GC Buffer (日本 TaKaRa 公司), TIANamp Blood DNA kit [天根生化科技 (北京) 有限公司]。

BMSCs 的分离培养 采用全骨髓贴壁筛选法培养细胞: 4~6 周龄 BALB/C 小鼠以颈脱位法处死, 无菌条件下分离小鼠股骨和胫骨, 收集骨髓腔的细胞并以 1×10^6 个/ml 的密度接种于培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 倒置相差光学显微镜下观察细胞形态及生长情况, 适时拍照。

CD29 和 c-Kit 免疫细胞化学鉴定 BMSCs 表型

取第 3 代小鼠 BMSCs, 经 PBS 缓冲液浸洗, 胰酶消化收集细胞离心并重悬细胞, 将重悬细胞以 5×10^3 个/ml 的密度均匀种入已铺好盖玻片的培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。取出盖玻片, 常规细胞免疫化学染色 [CD29 1:200 (体积比), c-Kit 1:50 (体积比)], 设 PBS 代替一抗做空白对照, DAB 显色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

CD29、CD34、CD44 间接免疫荧光染色鉴定 BMSCs 表型 取第 3 代小鼠 BMSCs 和成骨诱导 10 d 后的小鼠 BMSCs 细胞爬片, 经 PBS 缓冲液浸洗、固定, 正常山羊血清室温封闭滴加一抗 [CD29 1:100 (体积比), CD34 1:100 (体积比), CD44 1:100 (体积比)], 设 PBS 代替一抗作为空白对照, 4 °C 孵育过夜, 次日用 PBS 浸洗玻片, 玻片正面滴加二抗, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 IgG 1:100 (体积比), 室温避光孵育 2 h, PBS 浸洗玻片, 甘油 PBS 封片, Carl Zeiss 激光共振焦显微镜观察并扫描成像。

采用骨块接种培养法分离培养成骨细胞 取出生

后 3d 龄 BALB/c 小鼠, 颈脱位法处死, 在无菌操作下取颅骨带骨膜, 反复剪碎至 1 mm × 1 mm 大小的碎片。将上述组织块均匀铺在细胞培养瓶底, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 倒置相差光学显微镜下观察细胞形态及生长情况, 适时拍照。

第 3 代成骨细胞 AKP 染色及茜素红染色 取第 3 代成骨细胞爬片, 甲醛溶液固定, 水洗待干, 按照 AKP 检测试剂盒说明书检测第 3 代成骨细胞 AKP 的活性, 显微镜下观察。取第 3 代成骨细胞爬片, 乙醇固定, 茜素红染色, 蒸馏水冲洗, 甘油明胶封片, 显微镜下观察。

BMSCs 向成骨方向诱导 用含 10% FBS、0.1 mol/L 地塞米松、50 g/ml Vitc 和 10 mmol/L β-甘油磷酸钠的 H-DMEM 培养基, 对第 3 代小鼠 BMSCs 进行诱导培养, 未诱导组平行培养。倒置相差光学显微镜下观察细胞形态及生长情况, 适时拍照。

BMSCs 向成骨方向诱导分化 10 d 后 AKP 酶组织化学染色及茜素红染色 具体步骤同前所述第 3 代成骨细胞 AKP 染色及茜素红染色。

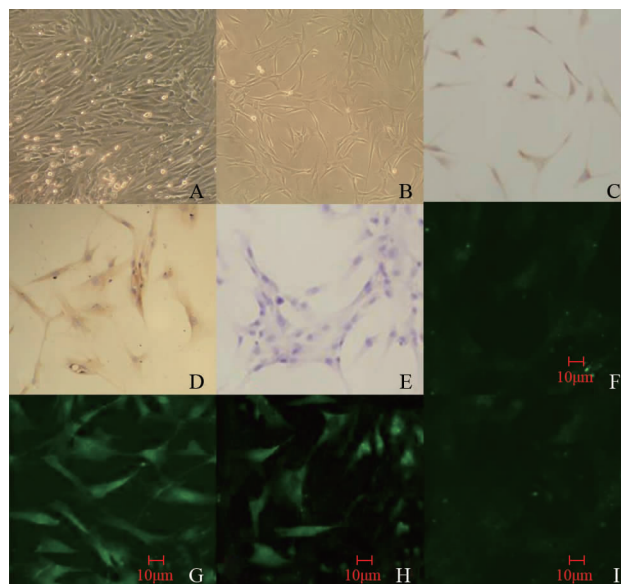
Oct-4 在 BMSCs 成骨诱导分化前后的表达 将未诱导的第 3 代小鼠 BMSCs (阴性对照组)、成骨诱导分化 10 d 后的小鼠 BMSCs (实验组)、第 3 代成骨细胞 (阳性对照组) 均进行间接免疫荧光染色, Oct-4 1:100 (体积比), 二抗异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 IgG 1:100 (体积比), 同时各组分别提取总 RNA, 电泳检测 RNA 完整性。以第 1 链 cDNA 为模板, 分别用 Oct-4 和 β-actin 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物以 1.5% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。设 PBS 代替一抗作为空白对照。

甲基化特异性 PCR 检测 BMSCs 诱导分化前后 Oct-4 基因启动子区甲基化 阴性对照组、实验组和阳性对照组分别按照 TIANamp Blood DNA kit 试剂盒说明书提取细胞 DNA。参照 CpGenome™ DNA Modification Kit S7820 试剂盒说明书对 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰并纯化, 以修饰后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别用 Oct-4 甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增, 为保证实验的准确性, 所用结果经过反复验证。

结 果

BMSCs 的形态学及表型鉴定 小鼠 BMSCs 接种后 24 h 已大量贴壁并伸展开, 有少量血细胞贴壁, 随着更换培养液逐渐去除。48 h 后贴壁细胞明显增多并

分裂增殖, 贴壁细胞呈梭形、多角形成纤维细胞样形态, 大小均一 (图 1A)。第 4 天形成增殖集落, 此后生长速度加快, 第 12 天细胞基本长满融合, 原代培养结束。传代培养细胞已看不到血细胞贴壁, 形态更加均一, 生长加快, 呈涡旋样生长 (图 1B)。第 3 代小鼠 BMSCs 呈梭形、多角形成纤维细胞样形态, 大小均一。免疫细胞化学染色结果显示, 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD29 (图 1C) 和 c-Kit (图 1D) 表达阳性, 阳性反应位于细胞浆, 空白对照的细胞中未见 CD29 和 c-Kit 阳性染色 (图 1E)。间接免疫荧光染色的结果显示, 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD44 (图 1G) 和 CD29 (图 1H) 表达阳性, 均为胞浆、胞膜着色, CD34 表达阴性 (图 1F), 空白对照组未见特异性着色 (图 1I)。



BMSCs: 骨髓间充质干细胞

BMSCs: bone mesenchymal stem cells

A. 原代培养小鼠 BMSCs 48 h 后 (×100); B. 第 3 代小鼠 BMSCs (×100); C. 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD29 免疫细胞化学染色 (×100); D. 第 3 代小鼠 BMSCs 的 c-Kit 免疫细胞化学染色 (×100); E. 空白对照 (×100); F. 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD34 间接免疫荧光染色; G. 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD44 间接免疫荧光染色; H. 第 3 代小鼠 BMSCs 的 CD29 间接免疫荧光染色; I. 空白对照

A. 48 hours after the primary culture of mouse BMSCs (×100); B. the 3rd passage of mouse BMSCs (×100); C. the 3rd passage of mouse BMSCs (immunocytochemistry using CD29, ×100); D. the 3rd passage of mouse BMSCs (c-Kit immunocytochemistry, ×100); E. blank control (×100); F. the 3rd passage of mouse BMSCs (indirect immunofluorescence staining using CD34); G. the 3rd passage of mouse BMSCs (indirect immunofluorescence staining using CD44); H. the 3rd passage of mouse BMSCs (indirect immunofluorescence staining using CD29); I. blank control

图 1 小鼠 BMSCs 形态学及表型鉴定

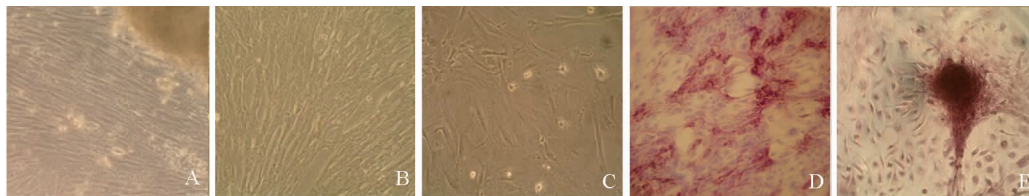
Fig 1 Mouse BMSCs morphology and phenotypic appraisal

成骨细胞的形态学观察及鉴定 新鲜植块培养的最初3d,其周围有大量小而圆的细胞,以造血细胞为主,随培养时间延长,这些细胞逐渐坏死破碎或随更换培养液清除。第3~7天,植块周围有细胞长出,植块初长出的细胞呈长梭形、三角形或不规则多边形,并有数量不等的突起伸出,围绕在植块周围形成所谓“生长晕”,细胞整体形态与成纤维细胞相似,胞浆内颗粒少,核圆,位于细胞中间(图2A)。随培养时间延长,有些植块的细胞生长快,植块周围细胞已开始融合成片,分界较为模糊,细胞明显变短变宽。细胞持续生长可密集重叠形成编织骨状(图2B)。传代后细胞以梭形、三角形为主,呈集落样生长趋势,集落中心细胞排列紧密甚至重叠,周围细胞以突起相连,随着细胞增殖,最终连成一片,可复层生长(图2C)。第3代成骨细胞 AKP 染色显示,大部分细胞胞浆出现红色沉淀物,呈阳性反应(图2D);第3代成骨细胞生长融合成复层后,继续培养,形成钙化结节后进行茜素红染色,结果显示钙化结节染成红紫色(图2E)。

BMSCs 向成骨方向诱导分化前后的形态学及其鉴定 第3代小鼠 BMSCs 在向成骨细胞诱导条件培养基中诱导培养4d后,细胞形态开始发生变化,随着

诱导时间的延长,细胞形态逐渐改变,细胞逐渐增大,诱导培养10d后细胞形态由长梭形逐渐变为多角形、圆形,具有多个突起(图3A),而平行培养的第3代小鼠 BMSCs 呈梭形、成纤维细胞样形态,大小均一(图3B)。AKP 染色:第3代小鼠 BMSCs 向成骨细胞方向诱导培养10d后,AKP 染色可见大多数细胞的胞浆内出现红色沉淀物,呈阳性反应(图3C),而平行培养的第3代小鼠 BMSCs 未见 AKP 阳性反应(图3D)。茜素红染色:第3代小鼠 BMSCs 在成骨细胞诱导培养10d后,茜素红染色呈阳性反应(图3E),而平行培养的第3代小鼠 BMSCs 未见茜素红阳性反应(图3F)。

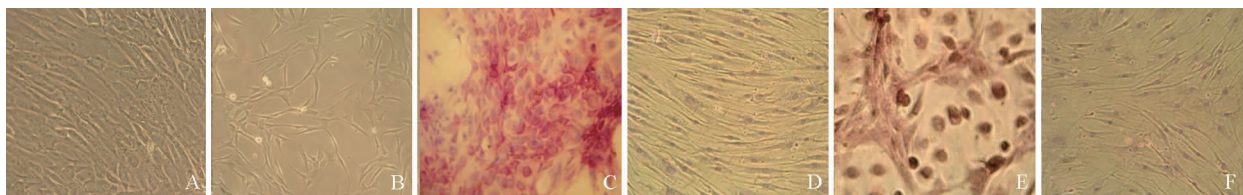
BMSCs 向成骨方向诱导分化前后 Oct-4 表达 间接免疫荧光显色结果显示,Oct-4 在第3代小鼠 BMSCs 呈现阳性(图4A),阳性反应主要定位于细胞核。第3代小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导10d后,第3代成骨细胞及空白对照组未见特异性染色(图4B~D)。RT-PCR检测第3代小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导分化前后 Oct-4 mRNA 表达,结果显示第3代小鼠 BMSCs 有 Oct-4 表达,而第3代小鼠 BMSCs 诱导10d后及第3代小鼠成骨细胞未见 Oct-4 表达(图5)。



A. 原代成骨细胞培养7d后细胞形态; B. 原代成骨细胞培养14d后细胞形态; C. 第3代成骨细胞形态; D. 第3代成骨细胞 AKP 染色图; E. 第3代成骨细胞茜素红染色
A. primary osteoblasts after 7 days of culture; B. primary osteoblasts after 14 days of culture; C. the 3rd passage; D. the 3rd passage (AKP); E. the 3rd passage (Alizarin red)

图2 小鼠成骨细胞的形态学及其鉴定(×100)

Fig 2 Morphology of mouse osteoblasts (×100)

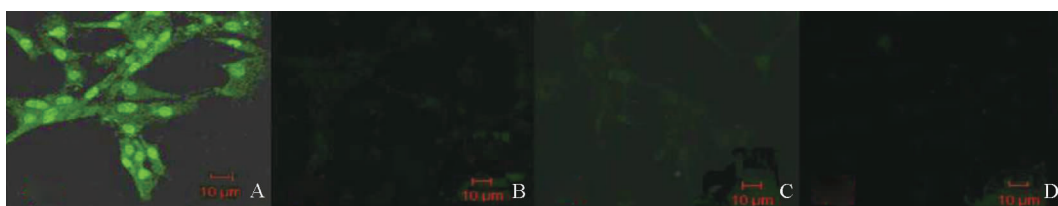


A. 小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导10d后的细胞形态(×200); B. 平行培养的第3代小鼠 BMSCs 的细胞形态(×100); C. 第3代小鼠 BMSCs 向成骨细胞方向诱导培养10d后 AKP 染色(×200); D. 平行培养的第3代小鼠 BMSCs 的 AKP 染色(×200); E. 第3代小鼠 BMSCs 向成骨细胞方向诱导培养10d后茜素红染色(×200); F. 平行培养的第3代小鼠 BMSCs 茜素红染色(×100)

A. 10 days after osteogenic induction (×200); B. the 3rd passage after parallel culture (×100); C. the 3rd passage after 10 days of osteogenic induction (AKP, ×200); D. the 3rd passage after parallel culture (AKP, ×200); E. the 3rd passage after 10 days of osteogenic induction (Alizarin red, ×200); F. the 3rd passage after parallel culture (Alizarin red, ×100)

图3 小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导后的形态学及其鉴定

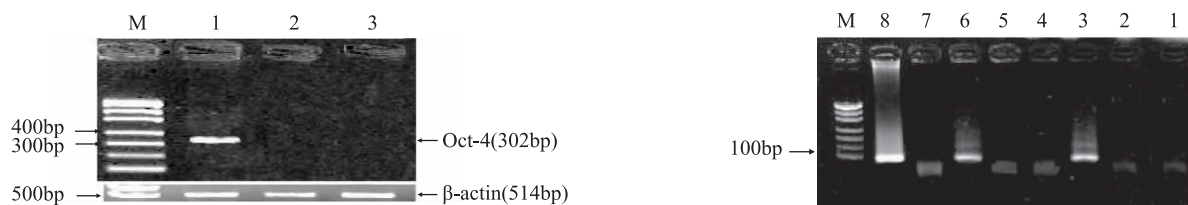
Fig 3 Morphology of mouse BMSCs after osteogenic induction



A. 第3代小鼠 BMSCs; B. 第3代小鼠成骨细胞; C. 第3代小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导培养 10 d 后; D. 空白对照
A. the 3rd passage of mouse BMSCs; B. the 3rd passage of mouse osteoblasts; C. the 3rd passage of mouse BMSCs after osteogenic induction for 10 days; D. blank control

图4 小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导分化前后 Oct-4 间接免疫荧光检测

Fig 4 The Oct-4 indirect immunofluorescence of mouse BMSCs before and after osteogenic induction



M: Marker; 1: 第3代小鼠 BMSCs; 2: 第3代小鼠 BMSCs 成骨诱导 10d 后; 3: 第3代小鼠成骨细胞; Oct-4 扩增产物为 302 bp, β-actin 扩增产物为 514 bp

M: Marker; 1: the 3rd passage of mouse BMSCs; 2: the 3rd passage of mouse BMSCs after osteogenic induction for 10 days; 3: the 3rd passage of mouse osteoblasts; the PCR product of Oct-4 was 302 bp, and the PCR product of β-actin was 514 bp

图5 Oct-4 和 β-actin 基因表达 RT-PCR 结果

Fig 5 RT-PCR results of Oct-4 and β-actin gene expressions

BMSCs 向成骨方向诱导分化前后 Oct-4 基因甲基化检测结果 甲基化检测结果显示, 第3代小鼠 BMSCs 甲基化扩增, 可见非甲基化有条带, 而甲基化未见条带。第3代小鼠 BMSCs 诱导 10 d 后及第3代小鼠成骨细胞甲基化扩增, 可见甲基化条带, 而非甲基化未见条带; 阴性对照均未见条带 (图6)。

讨 论

干细胞分化调控的分子机制一直是生命科学研究领域的焦点, 干细胞从自我更新状态向定向分化的转变过程总是伴随着细胞形态和功能的改变, 这些改变很大程度上是由基因的差别表达决定的, 具体来说就是与干细胞自我更新有关的基因关闭, 而与细胞类型特异性有关的基因转录激活, 因此, 研究干细胞分化的内源性调控因素日益受到重视。

常用分离 BMSCs 的方法有密度梯度离心法、免疫抗体吸附法, 以及贴壁筛选法。目前对 BMSCs 的体外分离、纯化、培养还没有统一公认的标准方法。本研究采用的贴壁筛选法是通过 BMSCs 能贴附于塑

M: Marker; 1: 阴性对照非甲基化扩增; 2: 阴性对照甲基化扩增; 3: 小鼠 BMSCs 非甲基化扩增; 4: 小鼠 BMSCs 甲基化扩增; 5: 小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导 10 d 后非甲基化扩增; 6: 小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导 10 d 后甲基化扩增; 7: 成骨细胞非甲基化扩增; 8: 成骨细胞甲基化扩增

M: Marker; 1: unmethylated amplification products of negative controls; 2: methylated amplification products of negative controls; 3: unmethylated amplification products of mouse BMSCs; 4: methylated amplification products of mouse BMSCs; 5: unmethylated amplification products of mouse BMSCs after osteogenic induction for 10 days; 6: methylated amplification products of mouse BMSCs after osteogenic induction for 10 days; 7: unmethylated amplification products of osteoblasts; 8: methylated amplification products of osteoblasts

图6 甲基化特异性 PCR 结果

Fig 6 Methylation-specific PCR results

料培养物表面生长的特性将 BMSCs 分离、纯化, 此方法较其他两种方法简单易行, 最大程度地缩短了从细胞分离到培养的时间, 减小了细胞受损的机会。目前尚未发现 BMSCs 特异性标记, BMSCs 与造血干细胞共同存在于骨髓中, 但 BMSCs 不表达造血细胞表面抗原 (如造血干细胞标志抗原 CD34^[1]), 它只表达 CD29 (integrin)、CD44、CD90 (Thy21)、c-Kit (CD117) 等基质细胞和间质细胞的特异性表面标志^[2], 因此本研究选用 CD29、c-Kit 和 CD44 作为 BMSCs 的表面标记, 对其进行鉴定。本研究采用贴壁筛选法分离培养小鼠 BMSCs, 观察到从骨髓中分离得到的小鼠 BMSCs 在体外合适的培养条件下能大量增殖, 分离培养的细胞 CD29 和 c-Kit 的表达率约

在 95% 以上, 间接免疫荧光染色显示小鼠 BMSCs 的 CD34 表达阴性, CD29、CD44 表达阳性, 细胞表型稳定, 表明获取的细胞非造血干细胞, 而是纯度较高的小鼠 BMSCs, 为下一步实验研究提供了细胞平台。

Oct-4 是近年研究证明的一种属于 POU 家族的转录因子, 它由 Pou5f1 基因编码产生, 是全能或多能性干细胞标志物, 在维持细胞的干细胞特性上起重要作用。本研究应用 RT-PCR 与间接免疫荧光染色, 结果同时显示, 第 3 代的小鼠 BMSCs 有 Oct-4 表达, 而第 3 代成骨细胞和第 3 代的小鼠 BMSCs 向成骨方向诱导 10 d 后未见 Oct-4 表达, 即 Oct-4 在小鼠 BMSCs 体外定向诱导分化中表达下调或消失, 这种模式类似于 Oct-4 在胚胎干细胞分化中的表达情况^[3-5]。由此可见, Oct-4 基因可能与成体干细胞多潜能性的维持有关。有研究表明, DNA 甲基化是参与抑制基因表达的机制之一^[6]。DNA 甲基化是以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAH) 为甲基供体, 在胞嘧啶 C 的 5 号碳原子上加入 1 个甲基, 使之成为 5-甲基胞嘧啶, S-腺苷甲硫氨酸同时转变为 S-腺苷-同型半胱氨酸的过程^[7-10], 通过不改变 DNA 的一级结构而调控组织特异性基因的表达。组织特异性基因主要与细胞的生长发育、分化有关, 它在特定的组织中保持非甲基化或低甲基化状态, 从而促进基因的表达, 使细胞向特定的组织方向分化。有研究表明, 在胚胎干细胞中 Oct-4 的表达调节是由 Oct-4 启动子区甲基化状态决定的^[11]。基于以上的基础研究, 本研究在小鼠 BMSCs 诱导分化中检测了 Oct-4 基因甲基化状态, 结果显示, 在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中 Oct-4 基因启动子区的 CpG 岛出现了甲基化, 而未诱导的 BMSCs 仍保持非甲基化状态, 提示 Oct-4 基因在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中的表达下调可能是由于其启动子区 CpG 岛甲基化的缘故。

综上, 本研究成功建立了小鼠 BMSCs 和小鼠成骨细胞培养体系, 实验观察到, 在体外分离培养的小鼠成骨细胞与小鼠 BMSCs 诱导 10 d 后都具有成骨细胞的特性, Oct-4 在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中表达下调, 提示 Oct-4 基因可能也参与了成体干细胞多潜能性的维持, 在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中 Oct-4 基因启动子区的 CpG 岛出现了甲基化, 提示 Oct-4 基因在小鼠 BMSCs 定向诱导分化中的表达下调可能是由于其启动子区 CpG 岛甲基化的缘故。本研究为进一步研究 Oct-4 在小鼠 BMSCs 增殖分化中的作用,

探讨 BMSCs 的诱导分化调控机制提供了理论和实验资料。

参 考 文 献

- [1] Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(6): 1235-1249.
- [2] Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential [J]. *Cytotherapy*, 2004, 6(4):372-379.
- [3] Hay DC, Sutherland L, Clark J, et al. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(2):225-235.
- [4] Hattori N, Nishino K, Ko YG, et al. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17063-17069.
- [5] Auffman G, Velde HV, Liebaers I, et al. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development [J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(3):173-181.
- [6] Kremensky M, Kremenska Y, Ohgane J, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(4):884-890.
- [7] Zachary DS, Michelle MC, Tarjei S, et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo [J]. *Nature*, 2012, 10(1038):339-344.
- [8] Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 11(1): 191-203.
- [9] Zemach A, McDaniel IE, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation [J]. *Science*, 2010, 328(5980):916-919.
- [10] Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81:97-117.
- [11] Sato N, Kondo M, Arai K. The orphan nuclear receptor GC-NF recruits DNA methyltransferase for Oct-3/4 silencing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(3): 845-851.

(收稿日期: 2011-11-21)