

羊水干细胞体外培养早期和后期基因表达谱分析

焦扬^{1,2,3)}, 刘建军^{1,2,3)}, 冯国华⁴⁾, 于明^{1,2,3)}, 赵洪波^{1,2,3)}

(1) 昆明医科大学分子临床医学研究院; 2) 云南省干细胞与再生医学重点实验室; 3) 云南省干细胞与再生医学工程研究中心; 4) 昆明医科大学生物医学工程中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨羊水干细胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 体外培养早期和后期全基因组表达规律。**方法** 在公共基因芯片数据库 GEO 中找到羊水干细胞相关的基因芯片数据, 使用 R 和 Bioconductor 软件包对其进行统计学分析, 筛选差异表达基因, 并进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。**结果** 通过线性模型没有找到差异表达基因, 而通过秩积法找到 217 个上调探针, 278 个下调探针。对这些差异表达基因进行功能富集, 上调的生物过程是胶原纤维组织相关过程、细胞外基质组织、胞外结构组织、骨骼系统发育、细胞粘附等。下调过程最显著的是核分裂过程, 有丝分裂以及细胞周期相关过程。上调的通路为 ECM 受体交互通路和焦点粘附通路。下调通路分别是细胞周期, 细胞因子受体交互通路, p53 信号通路和卵母细胞减数分裂通路。**结论** 体外培养中 AFSCs 能很好地维持基因的表达。

[关键词] 羊水干细胞; 体外培养; 基因表达

[中图分类号] Q813.1+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)05-0018-05

Genome Wide Expression of Amniotic Fluid Stem Cells in Early and Late Passage during in Vitro Culture

JIAO Yang^{1,2,3)}, LIU Jian-jun^{1,2,3)}, FENG Guo-hua⁴⁾, YU Ming^{1,2,3)}, ZHAO Hong-bo^{1,2,3)}

(1) Institute of Molecular and Clinical Medicine, Kunming Medical University; 2) Yunnan Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine; 3) Yunnan Engineering Research Center of Stem Cell and Regenerative Medicine; 4) Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** This study was purposed to investigate the changes of biological properties and expression patterns of the amniotic fluid stem cells (AFSCs) during in vitro culture. **Methods** The gene chip data of amniotic fluid stem cells were obtained from GEO database and statistically analyzed using R and Bioconductor to identify the differentially expressed genes, then do the Gene Ontology analysis and KEGG pathway analysis. **Results** We did not find differentially expressed genes by linear model using limma package, but 495 differentially expressed probes were identified by RankProd, including 217 up-regulated and 278 down-regulated probes. Further analysis with Gene Ontology functional categories showed that the up-regulated genes were concentrated in those related to collagen fibril organization, extracellular matrix organization, extracellular structure organization, skeletal system development, cell adhesion and biological adhesion and the down-regulated probes in late passage were associated with nuclear division, mitosis, and cell cycle. The up-regulated pathway was ECM-receptor interaction and focal adhesion. Cell cycle, cytokine-cytokine receptor interaction, p53 signaling pathway and oocyte

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2012FB152)

[作者简介] 焦扬 (1984~), 女, 云南昆明市人, 硕士, 助理实验师, 主要从事羊水干细胞方面的研究工作。刘建军与焦扬对本文有同等贡献。

[通讯作者] 赵洪波. Email: zhao.hongbo@hotmail.com

meiosis were down-regulated. **Conclusion** AFSCs maintain their genome-wide expression profile during in-vitro culture.

[**Key words**] Amniotic fluid stem cells; In vitro cultures; Gene expression

干细胞基础研究和临床应用中, 体外培养是最基础和必不可少的阶段, 这一阶段干细胞的生长情况以及生物学性状的保持直接影响着体内移植治疗的效用. 干细胞移植已经开始应用于一部分病例的临床试验, 但如何避免体外传代培养及移植后干细胞的衰退、死亡和干细胞样特征丢失, 维持其长期存活、发育、分化并行使功能依然是一系列复杂而重要的问题. 这些问题限制了其在临床的广泛应用.

近年研究表明羊水 (amniotic fluid, AF) 中存在干细胞, 可以分化为多种成体细胞, 有望成为一种新的干细胞来源, 且可避免胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 的伦理问题及 ASC 的局限性^[1]. 羊水易于获取, 不对胎儿和母体造成损害, 羊水干细胞在体外培养方法简单, 不需要滋养层细胞, 易于扩增, 细胞生长迅速, 不具有成瘤性. 而且, 羊水多潜能干细胞还具有较强的向 3 个胚层分化的能力, 更贴近未来临床应用^[2]. 羊水多潜能干细胞细胞系可传代 250 代还保持正常的端粒长度和核型^[3]. 故研究 AFSCs 体外培养基因表达的机制并寻求有效手段维持和促进其长期存活具有重要临床意义. 本研究利用公共基因芯片数据库 GEO 中的芯片数据, 对体外培养羊水干细胞后期与早期的相关基因进行挖掘, 并进行 GO 分析和 KEGG 信号通路分析, 以获得其表达规律.

1 材料与方法

1.1 基因表达数据

在 GEO 数据库中用 “Amniotic fluid stem cells” 关键词检索, 在检索结果中选择 GSE39839 芯片数据进行挖掘. GSE39839 是由 Jadhav AR 等人提交. 实验采用 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (GPL570) 平台, 数据类型是单通道芯片数据. 5 个体外培养早期 AFSCs (2~3 代) 和 5 个体外培养晚期 AFSCs (6~7 代), 细胞类型为 c-kit 阳性细胞. 在培养至 2~3 世代时采用 MACS 分选方法分离得到 c-kit 阳性细胞和 c-kit 阴性细胞. 一部分 c-kit 阳性细胞继续培养至 6~7 世代用 MACS 分选.

1.2 数据预处理

数据预处理用 R 软件 (2.15.2) 及 Bioconductor 项目 (2.11.0)^[4]. 数据集先用 RMA (Robust Multichip Averaging) 算法进行背景校正^[5], 标准化及 log₂ 转化, 所用软件包为 affy^[6]. 标准化后的数据采用四分位数间距 (interquartile range, IQR) 来衡量其变异程度, 去掉 IQR 小于 0.5 的基因. 若有多个探针对应同一个基因, 我们保留变异程度最大的一个.

1.3 差异表达基因筛选

R 分析差异表达基因的包有很多, 但目前运用最广泛的 Bioconductor 包是 limma^[7]. 该模型将标准及信号强度的关系使用线性模型进一步强化, 使用的是基于经验贝叶斯方法来确定差异表达的基因, 准确率较高, 是目前使用最广泛的方法. 该包既可以分析复杂实验, 包括各个 RNA 目标之间的比较; 同时也可以分析简单实验. 其核心理念是为每个基因的表达数据找到合适的线性模型. 运用经验贝叶斯分析 (empirical Bayes) 和其他收缩方法, 借用跨基因的信息, 即使实验的芯片数量很少, limma 依然能够获得稳定的数据分析.

同时, 笔者用 RankProd 方法进行差异表达基因筛选, 该方法使用的是非参数结果排序法来判断两组对照实验之间基因是否上调或者下调. 与其他方法相比, 对 Affymetrix 芯片的分析具有更高的敏感性和选择性^[8], 特别是在小样本量的数据分析中.

1.4 功能注释分析

通过 DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 分析工具来进行基因功能注释和基因富集分析^[9]. DAVID 是基于 web 的工具, 提供由高通量技术产生的基因组水平数据集 (诸如表达谱和蛋白组平台) 的注释和分析的整合解决方案. 分析结果和图形显示保留动态链接到主要的数据库和外部数据仓库.

2 结果

2.1 差异表达基因分析

通过线性模型没有找到差异表达的探针. 而通过秩积法以 FDR < 0.05 为标准筛选得到 217 个上调探针, 278 个下调探针, 对应 138 个上调基因

和 203 个下调基因。排序前 10 的上调基因和下调基因见表 1 和表 2。

2.2 GO 分析

在羊水干细胞体外培养过程中, 后期与早期相比显著上调的生物过程见表 3。其中胶原纤维组织相关基因上调最为显著。其他过程包括细胞外基质组织、胞外结构组织、骨骼系统发育、细胞粘附等。下调过程最显著的是核分裂过程, 有丝分裂。其他过程主要是细胞周期相关(表 4)。

2.3 通路分析

通过 DAVID 的 KEGG 库进行通路分析, 上调通路分别是 ECM 受体交互通路和焦点粘附通路(表 5)。下调通路 4 个, 分别是细胞周期、细胞因子受体交互通路、p53 信号通路和卵母细胞减数分裂通路(表 6)。

3 讨论

干细胞在临床上的应用, 必须解决的首要课题是如何保持细胞在体外不断增殖的同时又维持着不分化状态, 即自我更新。这需要许多生长因子和间质细胞的共培养。不同组织来源的干细胞的培养条件不尽相同。在应用前还需依据靶组织类型对培养干细胞进行定向分化诱导。准确的分化诱导是应用干细胞治疗的基础。这需要与干细胞发育有关的信号调节及微环境的影响进行详细研究。

对获得的芯片数据, 运用最广泛使用的 limma 包就行分析, 没有得到差异表达基因。而用 Rank Prod 非参数方法得到 217 个上调探针, 278 个下调探针, 也仅占有所有探针的 0.9%。说明羊水干细胞

表 1 排名前 10 的上调探针
Tab. 1 Top 10 up-regulated probes

探针名	基因号	基因名	倍数值	FDR 值
212942_s_at	13 609	<i>KIAA1199</i>	0.0696	0.0000
210794_s_at	12 743	<i>MEG3</i>	0.2378	0.0050
227662_at	4 589	<i>SYNPO2</i>	0.2277	0.0033
206950_at	14 535	<i>SCN9A</i>	0.2259	0.0025
226211_at	12 743	<i>MEG3</i>	0.2674	0.0020
244455_at	9 005	<i>KCNT2</i>	0.2661	0.0033
201295_s_at	6 848	<i>WSB1</i>	0.2667	0.0029
229199_at	14 535	<i>SCN9A</i>	0.2611	0.0038
229566_at	14 972	<i>LOC645638</i>	0.2775	0.0044
226210_s_at	12 743	<i>MEG3</i>	0.2962	0.0040

表 2 排名前 10 的下调探针
Tab 2 Top 10 down-regulated probes

探针名	基因号	基因名	倍数值	FDR 值
223775_at	14873	<i>HHIP</i>	6.8255	0.0000
230425_at	5086	<i>EPHB1</i>	4.5966	0.0033
237466_s_at	14873	<i>HHIP</i>	5.5063	0.0050
39402_at	9172	<i>IL1B</i>	5.9659	0.0040
201150_s_at	15808	<i>TIMP3</i>	3.9182	0.0033
214974_x_at	14570	<i>CXCL5</i>	5.5656	0.0057
205067_at	9172	<i>IL1B</i>	5.5562	0.0050
201324_at	4971	<i>EMP1</i>	4.0723	0.0044
1556037_s_at	14873	<i>HHIP</i>	4.3306	0.0060
205016_at	15771	<i>TGFA</i>	5.0482	0.0073

表 3 羊水干细胞体外培养过程中后期与早期相比显著上调的生物过程

Tab. 3 Up-regulated biological process in AFSCs during in-vitro culture compared to early passage

GO 收录号	GO 名称	基因数	P 值	Benjamini 值
GO:0030199	collagen fibril organization	7	1.51E-08	1.40E-05
GO:0030198	extracellular matrix organization	9	1.71E-07	7.90E-05
GO:0043062	extracellular structure organization	10	4.79E-07	1.48E-04
GO:0001501	skeletal system development	11	1.76E-05	0.004 071
GO:0007155	cell adhesion	14	2.17E-04	0.039 376
GO:0022610	biological adhesion	14	2.20E-04	0.033 378
GO:0007507	heart development	8	2.76E-04	0.035 878
GO:0032964	collagen biosynthetic process	3	3.41E-04	0.038 753

表 4 羊水干细胞体外培养过程中后期与早期相比显著下调的生物过程

Tab. 4 Down-regulated biological process in AFSCs during in-vitro culture compared to early passage

GO 收录号	GO 名称	基因数	P 值	Benjamini 值
GO:0000280	nuclear division	28	4.16E-20	6.50E-17
GO:0007067	mitosis	28	4.16E-20	6.50E-17
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	28	6.71E-20	5.24E-17
GO:0048285	organelle fission	28	1.20E-19	6.26E-17
GO:0000279	M phase	31	1.48E-18	5.77E-16
GO:0000278	mitotic cell cycle	32	4.26E-18	1.33E-15
GO:0022403	cell cycle phase	33	1.23E-17	3.20E-15
GO:0051301	cell division	27	9.28E-16	1.98E-13
GO:0022402	cell cycle process	35	2.36E-15	4.56E-13
GO:0007049	cell cycle	39	3.18E-14	5.53E-12
GO:0007059	chromosome segregation	13	1.73E-10	2.71E-08
GO:0051726	regulation of cell cycle	21	2.15E-09	3.06E-07
GO:0010564	regulation of cell cycle process	13	9.66E-09	1.26E-06
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	14	2.88E-08	3.46E-06

表 5 体外培养羊水干细胞后期与早期比上调通路

Tab. 5 Up-regulated pathways in AFSCs during in-vitro culture compared to early passage

通路收录号	通路名称	基因数	P 值	Benjamini 值
hsa04512	ECM-receptor interaction	7	1.58E-05	7.56E-04
hsa04510	Focal adhesion	7	0.001884	0.044246

表 6 体外培养羊水干细胞后期与早期比下调通路

Tab. 6 Down-regulated pathways in AFSCs during in-vitro culture compared to early passage

通路收录号	通路名称	基因数	P 值	Benjamini 值
hsa04110	Cell cycle	10	2.46E-05	0.001 891
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	12	4.11E-04	0.015 698
hsa04115	p53 signaling pathway	6	0.001 637	0.041 181
hsa04114	Oocyte meiosis	7	0.002 618	0.049 212

在体外培养过程中能较好地维持基因的表达。

通过非参数方法得到的基因进行 GO 功能分析, 在上调的生物过程中, 主要是细胞外基质相关基因。而胶原纤维和细胞外基质参与了细胞骨架的部分功能, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 是由动物细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子, 主要是一些多糖和蛋白, 或蛋白聚糖。这些物质构成复杂的网架结构, 支持并连接组织结构、调节组织的发生和细胞的生理活动。为细胞的生存及活动提供适宜的场所, 在支持、连接、维持组织形态方面起重要作用^[10], 而且具有调节细胞黏附、生长、分化, 促进细胞迁移、增殖、离子交换和信息传递的功能^[11]。结果显示, ECM 在体外培养过程中上调, 可能参与了其增殖和迁移等多方面的功能改变。ECM 和细胞骨架均参与细胞连接是多细胞有机体中细胞相互联系和协同作用的重要基础。有助于细胞群体的稳定性和功能的发挥。

在哺乳动物中, 如果细胞的 DNA 受损或者遭受到其它类型的损伤时, p53 蛋白能够阻止其细胞周期从 G₁ 进入 S 期。如果损伤很小, p53 蛋白通过阻止 G₁ 期细胞进入 S 期, 使受损的 DNA 或染色体有时间得以修复; 若 DNA 或染色体损伤严重时, p53 蛋白能触发凋亡机制以去除受损的细胞。羊水混合物中包含有各种类型胎儿的体内细胞。由于羊水混合物中所包含细胞的“年龄”都比较小, 因此这些细胞遭受周围环境引起的诱发突变的可能性就很小, 从遗传学角度来说它们会更稳定。而笔者的分析结果显示 p53 信号通路下调, 有助于细胞从 G₁ 期进入 S 期, 则细胞的增殖状态较好。

AFSCs 作为一种新的干细胞来源, 由于其取材方便, 不涉及伦理学问题, 细胞培养无需饲养层及其多能干细胞的特性, 已引起了广大研究者的关注。但目前 AFSCs 的研究在很多方面还有待深入。深入研究羊水干细胞的生物学特性, 探索其在体外培养的条件和方法, 具有重要的理论意义和临床应用前景。诱导羊水干细胞使其分化成为所需细胞可为组织器官修复提供重要组件, 这也是笔者今后研究的重点。

通过分析全基因组表达谱, 羊水干细胞在体外培养时, 后期与早期相比, 基因的表达相对稳定,

但当用于临床治疗时, 还是应在有限的传代次数中获得功能正常的细胞。

[参考文献]

- [1] PRUSA A R, MARTON E, ROSNER M, et al. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18 (7) : 1 489 - 1 493.
- [2] SIEGEL N, ROSNER M, HANNEDER M, et al. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases [J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(4):256 - 264.
- [3] DE COPPI P, BARTSCH G J R, SIDDIQUI M M, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1):100 - 106.
- [4] GENTLEMAN R C, CAREY V J, BATES D M, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(10):80.
- [5] IRIZARRY R A, HOBBS B, COLLIN F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data [J]. *Biostatistics*, 2003, 4(2):249 - 264.
- [6] GAUTIER L, COPE L, BOLSTAD B M, et al. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3):307 - 315.
- [7] SMYTH G K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments [J]. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004, 3: Article3.
- [8] KADOTA K, NAKAI Y, SHIMIZU K. Ranking differentially expressed genes from Affymetrix gene expression data: methods with reproducibility, sensitivity, and specificity [J]. *Algorithms Mol Biol*, 2009, 4: 7.
- [9] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44 - 57.
- [10] KAO G, HUANG C C, HEDGECOCK E M, et al. The role of the laminin beta subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans* [J]. *Dev Biol*, 2006, 290(1):211 - 219.
- [11] KADLER K E, HILL A, CANTY-LAIRD E G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(5):495 - 501.

(2013 - 02 - 10 收稿)