

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:34 网络出版地址: http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.022.html

## 小鼠骨髓间充质干细胞 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚群自身抗凋亡基因研究

贺继刚, 李洪荣, 桂龙升, 李永武, 严丹, 王平

**摘要** 目的 探讨小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)亚群 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 抗凋亡的分子基础。方法 以小鼠心脏干细胞表面分化抗原检测 BMSCs 后以 CD45、CD31 为标准分选得到 4 个亚群。体外将 4 个亚群采用无血清低氧(5%)培养,流式细胞术检测各组的凋亡率。分别将细胞注入心梗 48 h 小鼠体内于注射后 48 h 完成心功能测定。可见 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 组抗凋亡能力最强,心脏彩超提示心功能恢复亦优于其他各组。采用基因芯片完成 Agilent 小鼠全基因 4 × 44K 芯片从分子水平对 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚群抗凋亡能力进行探讨。结果 将 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 与其他组有关于凋亡基因进行聚类分析及 Network 结果共同比较可见两者无交集,以上述差异基因 4 倍表达为标准,因而以 Network 结果为主。可见 NFκB1、RB1、E2F1 为感兴趣基因。结论 小鼠 BMSCs 为一多克隆的细胞群体。SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 抗凋亡及改善心功能方面优于其他亚群;其分子机制在于 NFκB1、RB1、E2F1 基因表达较其他亚组多见。

**关键词** 小鼠骨髓间充质干细胞;亚群;基因

中图分类号 R 654.2

2015-09-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460073);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(编号:2014FB089)

作者单位:云南省第一人民医院心脏大血管外科,昆明 650032

作者简介:贺继刚,男,博士,硕士生导师;

王平,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: jiggang-he999@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1757-05

心脏干/祖细胞(cardiac stem/progenitor cells, CSCs/CPCs)在心肌中含量很少,约占1%,有多个亚群,目前报道为6个亚群<sup>[1]</sup>,包括侧群细胞、干细胞抗原-1(stem cell antigen-1, SCA-1)阳性祖细胞、胰岛素样受体-1(islet 1, ISL-1)阳性祖细胞、特异表面抗原-1(stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1)阳性祖细胞、c-KIT 阳性祖细胞和心肌球来源的祖细胞。本实验拟通过采用 CSCs 6 个亚群分化抗原为标志,对小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)进行分选。结果以 CD45 及 CD31 为标准可以筛选得到 4 组小鼠 BMSCs 亚群 SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>/31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>/31<sup>+</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>/31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>/31<sup>+</sup>。将各亚群采用无血清、低氧(5%)培养,流式细胞术检测各组凋亡率。再分别将细胞注入心梗模型建模 48 h 小鼠体内于细胞注射后 48 h 行心梗模型小鼠心功能测定。研究<sup>[2]</sup>显示 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚组细胞抗凋亡能力最强,注射 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚组细胞的心梗模型小鼠心功能改善亦优于其它各亚组。要回答以上现象仅仅靠细胞表面分化抗原是远远不够的。该研究采用基因芯片技术完成 Agilent 小鼠全基因 4 × 44K 芯片从分子水平对上述问题答

*coxsackievirus* B3 (CVB<sub>3</sub>), while mice in control group were treated with the same amount of virus-free DMEM cultivate liquid. 10 mice of each group were sacrificed on 3, 7, 14, and 28th day after VMC modeling and their blood and heart tissues were collected. The serum NT-proBNP levels in two groups of mice were detected by ELISA. Pathological changes in myocardial tissue were examined with hematoxylin and eosin stain. The relationship between serum NT-proBNP concentration and cardiac pathology score of VMC group at different time points were analyzed. **Results** The serum NT-proBNP levels of VMC group were significantly higher than that of control group ( $P < 0.05$ ). There was a significant statistical difference between NT-proBNP levels of VMC group at different time points ( $P < 0.05$ ). The NT-proBNP level was positively correlated with myocardial histopathology scores ( $r = 0.829, P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum NT-proBNP levels may reflect severity of myocardial injury in mice with VMC. NT-proBNP can be used as one of serum indicators to judge the risk stratification in mice with VMC.

**Key words** viral myocarditis; mice; N-terminal pro-brain natriuretic peptide

案进行了探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 小鼠 BMSCs 的培养** 全骨髓培养小鼠 (C57BL/6) BMSCs 胰酶消化传代至第 3 代时采用 CD11b 的磁珠负选, 去除造血干祖细胞。继续传代至第 7 代。

**1.2 小鼠 BMSCs 亚群的分选** 采用 6 种小鼠心肌干细胞亚群表面分化抗原, 利用流式细胞术按照前述操作对小鼠 BMSCs 进行筛查可得 SSEA-1-PE (1.1%)、ISL-1-PE (0.8%)、CD31-PC7 (48.0%)、CD45-PE (30.7%) 和 c-KIT-FITC (1.6%)。而后按 CD31 及 CD45 两个分化抗原的阴性及阳性检测结果, 利用磁珠将 BMSCs 分为 4 个亚群, 分别为 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> 和 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 细胞亚群。

**1.3 主要试剂和仪器** 基因杂交试剂盒 (Agilent technologies)、单标荧光 RNA 试剂盒 (Agilent technologies)、无 RNA 酶的 DNA 酶试剂盒 (Agilent technologies)、杂交炉 (Agilent technologies Santa Clara)、安捷伦微阵列扫描仪 (Agilent technologies Santa Clara)。

**1.4 方法** 将各亚群及未分选群细胞体外采用低氧 (5%)、无血清培养 (C57BL/6 小鼠 BMSCs 培养基 美国 Cyagen Biosciences 公司) 流式细胞术检测各亚群及未分选群的凋亡率。并将各亚群及未分选群注入心梗 48 h 小鼠体内 48 h 后行心脏彩超。

**1.4.1 基因芯片检测** 所用芯片为 Agilent 小鼠全基因 4 × 44K 芯片 (design ID: 014868), 共有 4 个标本, 需要完成 4 张上述芯片。

**1.4.2 样品 RNA 的放大和标记** 实验样品 RNA 采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒, 单色荧光标记低输入快速放标记试剂盒 (Cat#5190-2305, 美国 Santa Clara 公司) 和标准操作流程对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大和标记, 并用微型 RNA 酶试剂盒 (Cat#74106, 德国公司 QIAGEN 公司) 纯化标记好的 cRNA。样品 RNA 质检方法: 安捷伦 2100 生物分析。样品 RNA 质检标准: RIN ≥ 7.0 和 28S/18S > 0.7。

**1.4.3 芯片杂交** 按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒, 在滚动杂交炉中以 65 °C、10 r/min 滚动杂交 17 h, 杂交 cRNA 上样量 1.65 μg, 并在洗缸中洗片, 洗片所用的试剂为基

因表达洗涤液试剂盒。

**1.4.4 结果扫描** 完成杂交的芯片采用安捷伦微阵列扫描仪进行扫描, 软件设置染料通道: 绿色, 扫描分辨率 = 5 μm, PMT 100%, 10%, 16 位。用特征提取软件 10.7 读取数据, 最后采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理, 所用的算法为 Quantile。

## 1.5 数据分析

**1.5.1 聚类分析** 检测样本为小鼠 BMSCs 4 组亚群。分别为 SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>/31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>/31<sup>+</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>/31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>/31<sup>+</sup> 4 个亚组, 将其行 Agilent mRNA 芯片检测, 获得数据。对原始数据采用均一化、去背景并设置一定标准, 筛选差异基因, 行 GO、pathway 及网络分析。对调节细胞凋亡的基因构建聚类图。

**1.5.2 基因网络分析** 同时整合 3 种相互作用关系: ① KEGG 数据库中基因调控、基因表达蛋白间的相互作用、蛋白修饰等关系; ② 通过已有高通量实验, 如已被酵母双杂交实验等证实蛋白-蛋白相互作用; ③ 通过 KEGG 数据库中提到的基因之间相互作用。下载 KEGG 数据库中 pathway 数据, 通过 R (<http://www.r-project.org/>) 下的 KEGGSOAP (<http://www.bioconductor.org/packages/2.4/bioc/html/KEGGSOAP.html>) 软件包, 分析基因组范围内基因之间相互作用。

蛋白与蛋白之间的相互作用数据自 MIPS 数据库下载 (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/>)。将从 KEGG 数据库中筛选出的基因采用 co-citation 算法, 下载 PubMed 数据库中的文献摘要, 将摘要分解为句子, 分析每个句子中存在的共同基因名称, 即 co-citation 基因。并将每对 co-citation 基因, 统计出此基因出现的频率。而当基因对出现频率越高, 则表明基因间互相作用可能性越大。如将 PubMed 数据库中文献的总数记作  $N$ , 基因对中的两个基因在 PubMed 数据库中独立出现的频率, 分别记作  $m$ 、 $n$ 。假设实际中基因对中的两个基因同时出现次数为  $k$ , 利用超几何分布, 就可以算出完全随机条件下出现大于  $k$  次 co-citation 概率:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} p(i|n, m, N)$$

其中

$$p(i|n, m, N) = \frac{n! (N-n)! m! (N-m)!}{(n-i)! i! (n-m)! (N-n-m+i)! N!}$$

最后通过综合考虑以上3种数据结果,将其整合为基因间的相互关系网络。该网络通过 medusa 软件进行图形展示。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。各细胞亚群间比较采用单因素方差分析,统计假设检验均为双侧。

## 2 结果

**2.1 BMSCs 各亚群抗凋亡能力** 体外 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> 及未分选组采用低氧(5%)、无血清培养并采用流式细胞术检测各组的凋亡率。比较 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚群与其余各亚群及未分选群的凋亡率,上述实验共进行4次,将4次结果进行统计;SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 及未分选组的凋亡率分别为(48.26 ± 21.18)%、(45.36 ± 24.19)%、(46.06 ± 17.82)%、(16.49 ± 6.46)%、(44.48 ± 17.25)%。表明 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 抗凋亡能力优于其他亚群及未分选群,差异有统计学意义( $F = 6.34 P < 0.05$ )。见表1。

**2.2 BMSCs 各亚群对心肌梗死小鼠心功能的影响**

各亚群及未分选群采用 DIR 标记,注入18只心肌梗48h后小鼠体内。于注射后48h检测小鼠心功能。比较 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 亚群与其余各亚群及未分选群改善心功能的情况。与 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>、SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> 及未分选组比较,SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 的左室射血分数(EF%)、左室环比收缩

(FS%) 较其他亚组及未分选组均有明显改善,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组干细胞注射48h左室舒张末期直径(LVIDd)及左室收缩末期容积(LVIDs)变化幅度基本相同。见表2。

**2.3 小鼠 BMSCs 各亚群抗凋亡相关基因比较** 以 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 细胞为主,挑选其与其他3组间存在差异基因的表达,做聚类分析,可见 Park2、Prkcb、Frzb、Dmpk 基因较其他组表达明显降低。Lcn2、Egr3、Pik3r3、Mdm4、Cul7、Fcerlg、Map3kg 基因较其他组表达明显增高。见图1。基因网络分析 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 细胞在抗凋亡方面与其他组差异基因的表达网络图及直方图见图2,从图中可见 NFkB1、RB1、E2F1、HIF1A、IFNG、ATM、EGFR、KR1T1、EP300、TLR4 连接度较高,表达较其他基因多,认为是一些关键基因。

将 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 与其他组的抗凋亡基因的聚类分析及 Network 结果共同比较可见两者无交集,对4个组分别做两两比较。如果某个基因在任何两组间存在4倍变化(取对数后的倍数变化值为2),则认为该基因存在差异表达。可见 NFkB1、RB1、E2F1 为引起 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 抗凋亡的关键基因。

## 3 讨论

DNA 芯片(也称为基因芯片或生物芯片)是 DNA 附着在固体表面点的集合。来源于 Southern 印迹,其原理就是将已知基因片段或序列固定到固体表面,而后采用探针标记及杂交的方法对需要测定的序列或片段进行检测<sup>[3]</sup>。实验通过采用以上原理完成了小鼠 Agilent 全基因4 × 44 K 基因芯片,

表1 低氧、无血清环境下各亚群及未分选群培养24h凋亡率(%)

项目	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /CD31 <sup>-</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /CD31 <sup>+</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD31 <sup>-</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	未分选
第1次	16.81	18.23	19.84	13.83	19.48
第2次	54.96	31.80	50.51	26.13	54.19
第3次	58.93	67.57	54.96	12.34	57.45
第4次	62.34	63.85	58.94	13.76	46.78

表2 心梗48h注射BMSCs后48h心脏彩超检测心功能差值( $\bar{x} \pm s$ )

指标	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /CD31 <sup>-</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> /CD31 <sup>+</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD31 <sup>-</sup>	SCA-1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup>	未分选	未注射干细胞	F值
EF%	32.810 ± 5.780	29.580 ± 4.320	29.870 ± 1.650	35.780 ± 4.470*	12.780 ± 2.740	0.600 ± 0.070	5.424
FS%	22.770 ± 4.370	21.630 ± 3.840	23.870 ± 3.780	25.340 ± 3.320*	7.760 ± 1.240	0.300 ± 0.004	5.455
LVIDd(mm)	-1.160 ± 0.090	-1.180 ± 0.070	-1.170 ± 0.560	-1.150 ± 0.620	1.020 ± 0.430	0.070 ± 0.003	1.008
LVIDs(mm)	-0.690 ± 0.002	-1.650 ± 0.003	-1.350 ± 0.760	-0.580 ± 0.030	1.010 ± 0.020	0.080 ± 0.009	1.386

与同一指标其余组比较: \*  $P < 0.05$

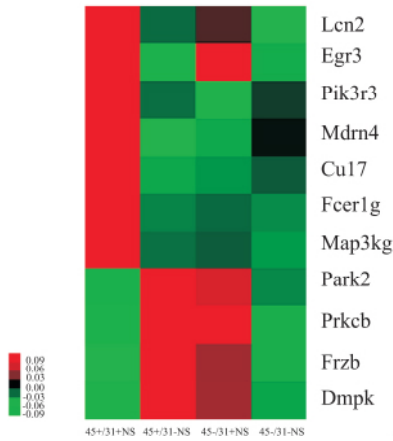


图1 聚类分析

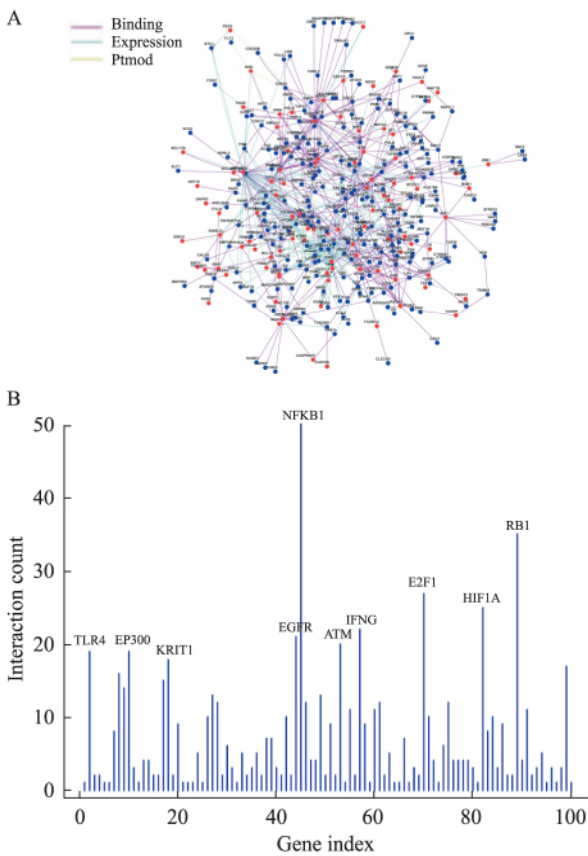


图2 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>细胞在抗凋亡方面与其他组差异基因的网络图及直方图

A: 蓝色节点代表差异表达基因; 连接边紫色: 结合; 蓝色: 表达调控; 绿色: 转录后修饰; B: 横轴代表每个基因, 纵轴代表每个基因的连接度

从分子水平对小鼠 BMSCs 4 个亚群生物学差异进行探讨。以 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>亚群细胞为主, 对表达基因中涉及到有关抗凋亡的基因将表达量最低及最高的基因行聚类分析可见 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>亚组细胞表达的 Prkcb、Park2、Dmpk、Frzb 基

因较其它亚组表达明显降低。而 Pik3r3、Lcn2、Egr3、Mdrn4、Map3kg、Cul7、Fcer1g 基因则较其它亚组表达明显增高。Network 分析是指以基因间的关系作为分析单位, 在指定的基因群中, 寻找彼此的关系, 进而将基因链接成一个网络, 而在这个指定的基因群中, 如果其表达的越多, 则其连接度就越高。将 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>亚组与其它亚组抗凋亡基因进行聚类及 Network 分析, 比较两种分析的结果可见两个结果并无交集, 对 4 个亚组做两两比较。如果某个基因在任何两组间的表达出现 4 倍变化 (取对数后倍数变化值为 2), 可以考虑此基因表达存在差异。固通过 Network 结果提示: RB1、NFkB1、E2F1 基因是引起 SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>亚组抗凋亡能力优于其它亚组抗凋亡能力的关键基因。

NF-κBP(核因子 105) 是由 NF-κB1 基因编码蛋白质<sup>[4]</sup>。该基因主要编码一个 105 ku 的蛋白质, 通过蛋白酶 26S 加工翻译进一步产生 50 ku 蛋白质。蛋白质 105 ku 是特定的蛋白转录酶抑制剂, 蛋白 50 ku 是 NF-κB 蛋白复合物结合亚基。NF-κB 是一种转录因子, 可以通过氧化自由基、细胞内、外各种刺激因子如紫外线、细胞因子、病毒或细菌的产物被激活。激活后的 NF-κB 转位进入细胞核, 参与并刺激多种生物学功能基因表达; 已知在不同类型细胞及特定条件下有超过 200 个基因是 NF-κB 目标。NF-κB 还可以通过抑制凋亡基因的启动, 从而延长细胞生命<sup>[5]</sup>。

视网膜母细胞瘤蛋白 (RB1)<sup>[6]</sup> 是肿瘤抑制蛋白, 其在多种癌细胞上功能是缺失的。RB1 主要的一项功能是通过抑制细胞生长周期, 从而阻止细胞过度生长, 直至细胞准备分裂。其还可以激活染色体重塑酶, 如乙酰化酶及甲基化酶, 完成细胞的重塑。RB1 属于口袋型蛋白质家族, 其家族成员有一个共同的口袋状结合位点用于和其它蛋白质相连<sup>[7]</sup>。如高危型人乳头状瘤病毒感染后的细胞可以产生出致癌蛋白, 通过灭活及绑定 RB1, 导致细胞过度增生, 产生癌症。RB1 基因也可通过减弱 p53 基因功能而发挥重要抗凋亡作用。RB1 的高表达促进了细胞抗凋亡能力。

转录因子 E2F1 是由人 E2F1 基因编码蛋白<sup>[8]</sup>。此基因编码的蛋白质是 E2F 家族成员中的一种转录因子。E2F 家族成员在抑制细胞生长周期和抑制促癌蛋白激活中, 发挥着非常重要的作用, 同时其也是小 DNA 肿瘤病毒蛋白质转化目标。E2F 蛋白所包含的多数家庭成员都可以发现几个进化上高度保守域。

包含 DNA 结合域,此区域决定调控分化的转录因子(DP)的分化,此结构域富含肿瘤抑制蛋白关联域及酸性氨基酸。而肿瘤抑制蛋白关联域是嵌入转录域中的。此蛋白和另外两种成员(E2F3 及 E2F2)都拥有一个调节细胞生长周期的蛋白质结合域。在调节细胞生长周期中优先与 PRB 蛋白相互结合。其通过介导细胞生长增殖并减弱非依赖及依赖 p53 基因所介导的细胞凋亡,从而发挥抗凋亡的作用<sup>[9]</sup>。

综上所述,小鼠 BMSCs 为一多克隆的细胞群体。SCA-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> 抗凋亡方面优于其他亚群。其分子机制在于 NFκB1、RB1、E2F1 基因表达较其他亚组多见。

### 参考文献

- [1] Bollini S, Smart N, Riley P R. Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50 (2): 296–303.
- [2] 贺继刚, 沈振亚, 滕小梅, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞亚群在心肌梗死中抗凋亡能力的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(3): 556.
- [3] Maskos U, Southern E M. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 20 (7): 1679–84.
- [4] Skarnes W C, Rosen B, West A P, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function [J]. *Nature*, 2011, 474 (7351): 337–42.
- [5] Murphree A L, Benedict W F. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis [J]. *Science*, 2010, 223(4640): 1028–33.
- [6] Korenjak M, Brehm A. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 15 (5): 520–7.
- [7] Münger K, Howley P M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions [J]. *Virus Res*, 2011, 89 (2): 213–28.
- [8] Neuman E, Sellers W R, McNeil J A, et al. Structure and partial genomic sequence of the human E2F1 gene [J]. *Gene*, 2009, 173 (2): 163–9.
- [9] Kong H J, Yu H J, Hong S, et al. Interaction and functional cooperation of the cancer-amplified transcriptional coactivator activating signal cointegrator-2 and E2F-1 in cell proliferation [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1 (13): 948–58.

## Genetic research of mouse bone marrow mesenchymal stem cells subsets SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> itself anti-apoptotic ability

He Jigang, Li Hongrong, Gui Longsheng, et al

(Dept of Cardiovascular, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032)

**Abstract Objective** To investigate the molecular basis of the anti-apoptosis effects of the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset of mice bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** After the mice cardiac stem cell surface differentiation antigen was used to detect the BMSCs, four subsets were obtained, with CD45, CD31 as the sorting standard. These four groups were grown *in vitro* in serum-free cultures under hypoxia (5%). The apoptosis rate of each group was measured by flow cytometry. The cell cultures were injected into mice with 48 h myocardial infarction to determine the cardiac function after another 48 h. Among the four groups, the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset demonstrated the highest anti-apoptotic effect. Color sonography showed that the recovery of cardiac function in the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset was relatively better than that in the other groups. An agilent whole mice genome 4 × 44K chip was used to study the anti-apoptosis effects of the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset at the molecular level. **Results** Clustering analysis and network of the apoptosis genes was performed on the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset against the other subsets. Results of network and Clustering analysis showed the absence of an intersection between groups. A fourfold difference in the expression of the above mentioned genes were set as the standard for differential expression based on the network results. NFκB1, RB1, and E2F1 were identified as the genes of interest. **Conclusion** BMSCs belong to a polyclonal cell population. The SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset is relatively better than the other subsets in terms of its anti-apoptosis effects and improvement in cardiac function. The molecular mechanism of SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> activity may involve NFκB1, RB1, and E2F1 because the expression is more common in the SCA-1<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> / CD31<sup>+</sup> subset than in the other subsets.

**Key words** BMSCs; subgroup; gene