

实时荧光定量 PCR 技术诊断人骨肉瘤 MG63 细胞系中 β -catenin 基因表达的临床分析*

林国叶, 谢志平(南京军区福州总医院骨科, 福州 351100)

【摘要】 目的 分析实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)诊断人骨肉瘤 MG63 细胞系中 β -catenin 基因表达。**方法** 培养人骨肉瘤 MG63 细胞系, 对其进行分组, 对照组细胞使用 10% 的胎牛血清以及含有青霉素和链霉素的 DME 高糖培养基培养。而刺激组则在此基础上用 100 ng/mL 的 wnt3a 细胞进行培养。分别在第 0、1、2、3、4 天分别采集 3 个孔的细胞, 采用细胞消化的方式计算细胞个数, 采用 FQ-PCR 检测人骨肉瘤 MG63 细胞系中 β -catenin 基因表达。**结果** 在细胞生长的第 0、1 天, 两组 MG 细胞数量对比差异无统计学意义($P > 0.05$); 而在第 2、3、4 天两组的细胞个数对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。 β -catenin 基因表达与 wnt3a 的蛋白刺激浓度呈非正相关关系, 在各个浓度中, 以 100 ng/mL 的 wnt3a 蛋白刺激 β -catenin 基因表达最高, 其他几个浓度的 β -catenin 基因表达对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。100 ng/mL 的 wnt3a 蛋白刺激在培养 6 h 时 β -catenin 基因表达最高, 并且在 6 h 前, β -catenin 基因表达会随时间延长而增加。6 h 后 β -catenin 基因表达对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FQ-PCR 能够反映人骨肉瘤 MG63 细胞中 β -catenin 基因表达。

【关键词】 人骨肉瘤细胞; β -catenin; 实时荧光定量 PCR 技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.22.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)22-3307-02

Clinical analysis on real time FQ-PCR technique for diagnosing β -catenin gene expression in human osteosarcoma MG63 cell line* LIN Guo-ye, XIE Zhi-ping (Department of Orthopedics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou, Fujian 351100, China)

【Abstract】 Objective To analyze the real time FQ-PCR technique for diagnosing β -catenin gene expression in human osteosarcoma MG63 cell line. **Methods** Human osteosarcoma cell line MG63 was cultured and grouped. The control group used 10% fetal bovine serum and the culture medium containing high glucose DME penicillin and streptomycin. On this basis the stimulation group was cultured by using 100ng/mL wnt3a cell culture. The cells in 3 holes were collected on 0, 1, 2, 3, 4 d respectively and the cells number was counted by adopting the cell digestion way. FQ-PCR was adopted to detect the β -catenin gene expression in human osteosarcoma cell line MG63. **Results** On 0, 1 d of the cell growth, the MG cells number had no statistical difference between the two groups; while which on 2, 3, 4 d had statistically significant differences between the two groups($P < 0.05$). The β -catenin gene expression showed a non-positive correlation with the stimulation concentration of wnt3 protein, in various concentrations, the β -catenin gene expression stimulated by 100 ng/mL wnt3a protein was highest, the differences in the β -catenin gene expression had no statistical difference among other concentrations($P > 0.05$). The β -catenin gene expression stimulated by 100 ng/mL wnt3a protein for 6 h culture reached highest, moreover before 6 h, the β -catenin gene expression was increased with time lapse. The β -catenin gene expression after 6 h had no statistical difference($P > 0.05$). **Conclusion** FQ-PCR can reflect the β -catenin gene expression in human osteosarcoma MG63 cells.

【Key words】 human osteosarcoma; β -catenin; FQ-PCR

在儿童和青少年人群中, 骨肉瘤是最常见的骨肿瘤之一^[1]。本文主要是探讨利用实时荧光定量 PCR 技术(FQ-PCR)技术诊断人骨肉瘤 MG63 细胞中 β -catenin 的表达。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人骨肉瘤细胞株 MG63(中国科学院上海生物细胞研究所提供)、10%胎牛血清(上海泛柯实业有限公司购买, 北美血源)、青霉素(成都力思特制药股份有限公司生产)、链霉素(瑞阳制药有限公司生产)、DMEM 高糖培养基(购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)、胰蛋白酶(购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)及自制的磷酸盐缓冲液(PBS)。wnt3a 蛋白干粉(购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司), 荧光定量

PCR 试剂盒(购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)及 β -catenin(购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)和 GAPDH 引物(引物序列 F: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'; R: 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3', 购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。

1.2 仪器 二氧化碳恒温培养箱, 高速冷冻离心机, 超洁净工作台, ABI Prism 7500 型荧光定量 PCR 仪以及倒置显微镜。

1.3 方法

1.3.1 人骨肉瘤 MG63 细胞系培养 将 MG63 细胞接种在 48 孔板中, 对照组细胞使用 10% 的胎牛血清及含有青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基培养。而刺激组则在此基础上

* 基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2012J01410)。

作者简介: 林国叶, 女, 副主任医师, 本科, 主要从事骨科研究。

用 100 ng/mL 的 wnt3a 细胞培养进行培养。分别在第 0、1、2、3、4 天分别采集 3 个孔的细胞,采用细胞消化的方式计算细胞个数。观察加入 wnt3a 蛋白刺激液的刺激组及没有加入 wnt3a 蛋白刺激液的对照组 MG63 细胞的增殖情况。

1.3.2 不同浓度的 wnt3a 蛋白刺激人骨肉瘤 MG63 细胞 将 wnt3a 母液分别稀释成浓度为 0、50、100、150、200 ng/mL 的 wnt3a 蛋白溶液,加入已经接种了 MG63 细胞传代的 6 孔板中,每个孔大约有 4×10^5 个细胞。所有的 MG63 细胞均在 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,并且细胞贴壁 24 h 后才会加入不同浓度的 wnt3a 蛋白溶液刺激细胞 24 h。

1.3.3 观察 β-catenin 基因表达情况 所有细胞增殖结果观察均采用 FQ-PCR 测定 β-catenin 基因表达情况。根据目的基因 β-catenin 和内参基因有相似的扩增效率,根据 Licak 公式可以计算得到目的基因 β-catenin 的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学分析软件进行分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 刺激组和对照组 MG63 细胞增殖比较($\bar{x}\pm s,\times 10^5$)

组别	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照组	0.25±0.01	0.57±0.02	1.21±0.04	3.00±0.07	3.34±0.03
刺激组	0.23±0.04	0.60±0.01	2.07±0.03	4.05±0.05	6.18±0.02
<i>t</i>	2.925	3.091	4.109	3.892	5.215
<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 不同浓度的 wnt3a 蛋白刺激人骨肉瘤 MG63 细胞 β-catenin 基因表达

浓度	目的基因	管家基因	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白	18.00±0.012	12.48±0.20	5.24±0.05	0	1
50 ng/mL	17.18±0.11	13.05±0.15	4.23±0.08	-(1.39±0.02)	2.55±0.11
100 ng/mL	15.19±0.33	14.06±0.41	2.33±0.09	-(3.24±0.15)	9.21±0.08
150 ng/mL	15.90±0.18	13.55±0.23	2.44±0.01	-(3.18±0.07)	8.61±0.44
200 ng/mL	16.00±0.01	13.70±0.02	2.49±0.06	-(3.14±0.06)	8.61±0.51

表 3 100 mg/mL 浓度不同时间段的 β-catenin 基因表达情况

时间	目的基因	管家基因	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
0 min	18.19±0.12	11.10±0.14	7.14±0.11	0	1
30 min	16.71±0.23	11.31±0.18	5.19±0.11	-(1.69±0.12)	3.18±0.20
1 h	16.59±0.49	12.31±0.49	4.91±0.12	-(2.39±0.10)	5.31±0.16
6 h	16.02±0.21	12.21±0.39	3.84±0.19	-(3.20±0.10)	9.30±0.29
12 h	16.18±0.29	12.27±0.42	3.60±0.26	-(3.39±0.10)	9.51±0.92
24 h	16.20±0.39	12.39±0.72	3.59±0.15	-(3.44±0.15)	10.64±0.39

3 讨 论

骨肉瘤主要在好发在长管状骨的干骺端,并且可以在数月后转移肺部,呼吸衰竭是导致骨肉瘤患者死亡的主要原因^[2-4]。目前对于骨肉瘤已经有完善的放疗和化疗方案,骨肉瘤患者生存率有明显提高。限制骨肉瘤患者长期生存率的两大大因素是肺转移及骨肿瘤复发^[5]。生物学研究结果揭示,Wnt/β-catenin 信号通道是细胞增殖以及分化的关键环节^[6-8]。多项结果证实,Wnt 信号在骨细胞中,特别是对骨肿瘤细胞的

2 结 果

2.1 wnt3a 蛋白刺激液 MG63 细胞增殖 在细胞生长的第 0、1 天刺激组和对照组的 MG 细胞数量对比差异无统计学意义($P>0.05$);而在第 2、3、4 天两组的细胞个数差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 不同浓度的 wnt3a 蛋白刺激人骨肉瘤 MG63 细胞基因表达 β-catenin 基因表达与 wnt3a 的蛋白刺激浓度呈非正相关关系,β-catenin 基因表达不会因为 wnt3a 浓度的增加而增加。在各个浓度中,以 100 ng/mL 的 wnt3a 蛋白刺激 β-catenin 基因表达最高,其他几个浓度的 β-catenin 基因表达对比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3 100 mg/mL 浓度不同时间段的 β-catenin 基因表达情况 表 3 结果显示,在 100 mg/mL 的 wnt3a 蛋白刺激在培养 6 h 时 β-catenin 基因表达最高,并且在 6 h 前 β-catenin 基因表达会随时间延长而增加,6 h 后 β-catenin 基因表达对比差异无统计学意义($P>0.05$)。

生长、集落和迁移能力有明显的抑制^[9]。Wnt 蛋白主要是和 Friz-zled 细胞表面受体结合后激活 GSK3 的信号通路,从而 GSK3 可以和 β-catenin 相结合,使得 β-catenin 的降解被抑制,激发细胞增殖的信号通道^[10]。

本文进行人骨肉瘤 MG63 细胞培养,观察加入 wnt3a 蛋白刺激液的刺激组以及没有加入 wnt3a 蛋白刺激液的对照组 MG63 细胞的增殖情况。在细胞生长的第 0、1 天刺激组和对照组的 MG 细胞数量对比差异无统计学意义(下转第 3311 页)

的患者死于本病,其中肺结核患者大部分死于呼吸衰竭,曾有研究结果提示在结核性晚期即常表现为慢性纤维空洞型,因肺功能严重受损而肺内气体交换出现严重障碍^[4,8]。因此大部分肺结核患者是死于肺功能衰竭。

男女肺部主要构造组成基本一致,都由支气管、细支气管和肺泡组成。肺泡是人体氧气和二氧化碳实施气体交换的场所,男性因为身材普遍较女性高大,女性小气道细胞膜和总细胞壁长度均低于男性,成年男性的气道腔内径是女性的 1.17 倍,因此,男性肺叶、支气管、肺泡数量等明显较女性有优势,加之男性在血液循环能力、肝脏解毒能力、肾脏的透析能力等方面明显强于女性,导致男性肺功能检测指标优于女性。

本研究利用肺功能检测探讨性别等因素对肺结核肺功能的影响,采用统一的调查和观察方法、步骤和问卷,由统一培训的专科医师对门诊就医和病房住院的明确诊断的肺结核患者进行调查和观察。调查表内容包括以下内容:患者的姓名、性别、年龄、民族、籍贯、婚否、职业、出生日期、身高、体质量、初诊时间等一般情况;病程、既往发病规律及治疗等现病史;既往史、个人史、家族史情况等。同时结合患者肺功能情况肺结核的病理分型,作者根据肺功能及肺结核的分型,将患者分为病情较轻的浸润型和病情较重的慢性纤维空洞型,并且根据临床经验,从收集的内容中提取出 10 个相关因素即性别、年龄、吸烟、婚姻、受教育程度、住院次数、用药量、抗生素种类、用药时间、病程等因素进行 Logistic 回归分析,发现年龄、吸烟和性别均是肺结核分型的危险因素,OR 值分别为 1.030、1.340、1.010, b 为正值, $P < 0.05$,为肺结核患者肺功能损伤重的危险因素者。

(上接第 3308 页)
($P > 0.05$);而在第 2、3、4 天两组的细胞个数差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本文的研究结果显示, β -catenin 基因表达与 wnt3a 的蛋白刺激浓度呈非正相关关系, β -catenin 基因表达不会因为 wnt3a 浓度的增加而增加。并且进一步的研究发现用浓度为 100 ng/mL 的 wnt3a 蛋白刺激 β -catenin 基因表达最高,加入 wnt3a 蛋白刺激液的 MG63 细胞明显出现增长。本文是采用 FQ-PCR 技术进行检测诊断,该技术可检测到细胞内 β -catenin 基因的表达,并且其扩增效率及灵敏度高,可以在较为广泛的范围内进行准确定量。从本研究结果中可以发现, Wnt3a 蛋白刺激 β -catenin 基因在 MG63 细胞中的表达和时间的关系,在培养 6 h 前, β -catenin 基因表达量与时间呈正比,而超过 6 h 后 β -catenin 基因表达结果对比差异无统计学意义。

综上所述, FQ-PCR 能够反映人骨肉瘤 MG63 细胞中 β -catenin 基因表达,研究 wnt3a 通道与人骨肉瘤 MG63 细胞中 β -catenin 基因表达的关系对于骨肉瘤细胞的表达以及转移等方面的研究有着重要的指导意义。

参考文献

- [1] 曲绍政. 实时荧光定量 PCR 法检测人骨肉瘤 MG63 细胞系中 β -catenin 基因的表达[D]. 青岛: 青岛大学, 2013.
- [2] 胡旭昌, 王栓科, 康学文, 等. 吉西他滨对人骨肉瘤细胞增殖及肿瘤转移相关基因 1mRNA 表达的影响[J]. 中国全科医学, 2013, 16(29): 3450-3452.

综上所述,肺结核的肺功能障碍呈混合性,同时更进一步说明早期根治肺结核的重要性,以避免肺的正常结构破坏,浸润型转化成慢性纤维空洞型,造成肺功能不可逆的损害。年龄大、吸烟和女性肺结核肺功能损伤较重。其中不同性别肺结核患者的肺功能障碍,男性患者肺功能各项指标均高于女性。

参考文献

- [1] 尹志涛. 我国近 10 年肺结核发病率分析及结核分枝杆菌快速检测方法研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [2] 郭凌, 范立东. 结核病发病率回升因素调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1414.
- [3] 徐青龙. 山西省运城市学生肺结核发病情况分析[J]. 中国健康教育, 2010, 26(10): 804-805.
- [4] 赵文静. 我国糖尿病患者中结核病病例主动发现策略的经济学评价研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [5] 郑新勇. 牛分枝杆菌外膜相关蛋白的原核表达与反应原性鉴定[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2012.
- [6] 柴雪敏. 结核分枝杆菌 Ag85 复合物疫苗研究进展[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- [7] 林定文. 肺结核患者治疗依从性研究进展[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(7): 973-975.
- [8] 项措吉, 赵国琴, 李晓玲, 等. 某民族高校新生结核病防治知识知晓情况调查分析[J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2013, 34(4): 83-85.

(收稿日期: 2015-04-18 修回日期: 2015-09-08)

- [3] 张帆. RNA 干扰 β -catenin 基因对人骨肉瘤 MG63 细胞系生物学行为的影响和机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [4] 卫佳, 陈英华, 吴丽美, 等. 人 S100A6 对人骨肉瘤细胞系 β -catenin 的作用[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(11): 1144-1149.
- [5] 于明东, 李书忠. 实时荧光定量 PCR 法检测人骨肉瘤耐 MTX 细胞系中 RFC、DHFR、GST- π 的 mRNA 表达[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(11): 858-861.
- [6] 张鹏, 李书忠, 张金锋, 等. WIF-1 对人骨肉瘤 MG-63 细胞中 β -catenin 表达的作用研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(21): 115-118.
- [7] 覃莉, 林阳, 陈文坚, 等. 肺癌抑癌基因 1 对人骨肉瘤细胞株 MG63 生长和增殖的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(8): 1704-1706.
- [8] 吴德明, 杨志强, 刘翔, 等. RNAi 沉默 Notch1 基因对人骨肉瘤细胞 MG63 的促凋亡作用[J]. 山东医药, 2013, 53(4): 36-38.
- [9] 覃莉, 林阳, 杨开祥, 等. 稳定表达 TSLC1 基因骨肉瘤 MG63 细胞系的建立及鉴定[J]. 骨科, 2013, 4(2): 66-68.
- [10] 李丽华, 李梅, 赵华福, 等. miR-133a mimics 对骨肉瘤细胞系 MG63 增殖和凋亡作用的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(10): 1869-1872.

(收稿日期: 2015-04-08 修回日期: 2015-09-20)