

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.012

利用表达谱基因芯片筛选溃疡性结肠炎差异表达基因*

魏妮 郭长存 沙素梅 徐斌 白 彬 余鹏飞 吴开春[△]

(第四军医大学西京消化病医院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:利用人类全基因组表达谱芯片技术,分析溃疡性结肠炎患者和健康者基因表达谱差异,筛选出溃疡性结肠炎相关基因。**方法:**采用 Trizol 法提取 8 例溃疡性结肠炎患者和 8 例健康对照者结肠粘膜组织总 RNA 并纯化,逆转录合成 cDNA,利用荧光染料 Cy3 标记 aaUTP,转录合成标记的 cRNA,并与 Agilent 人类全基因组表达谱芯片杂交,扫描荧光信号图像,对芯片原始数据进行归一化处理,利用倍数差异和 t 检验计算筛选出相关差异表达基因,采用 DAVID 在线分析系统进行基因的功能注释和关联分析,明确差异基因的生物学功能,并对部分差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证。**结果:**筛选出溃疡性结肠炎结肠粘膜组织差异表达基因 4132 个,其中上调基因 2004 个,下调基因 2128 个。选取 6 条差异表达基因进行 PCR 验证,结果有 3 条基因表达上调,3 条基因表达下调,表达趋势与芯片结果一致。**结论:**溃疡性结肠炎患者与健康对照者基因表达存在明显差异,分析这些差异表达基因有助于我们探索溃疡性结肠炎的发病机制,为疾病的治疗提供理论依据。

关键词:溃疡性结肠炎;基因表达谱芯片;差异表达基因

中图分类号:R574.62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)01-53-05

Identification of Differential Expression Genes Related to Ulcerative Colitis by Gene Expression Profiles Chip*

WEI Ni, GUO Chang-cun, SHA Su-mei, XU Bin, BAI Bin, YU Peng-fei, WU Kai-chun[△]

(Xijing Hospital of Digestive Diseases, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To detect and compare the gene expression profile between ulcerative colitis patients and healthy control using cDNA microarray method and screen differential expression genes related with UC. **Methods:** Total RNA was extracted and purified from 8 UC patients and 8 controls. The first and second cDNA strains were generated and transcribed into cRNA, fluorescence dye Cy3 was used to label the cRNA. The labeled cRNA was used to hybrid with the Agilent expression profile chip, the fluorescence signal was scanned by the computer and the original data was normalized. The differential expression genes was screened by t-test and identified the biological function of genes by the DAVID online analysis system. Parts of these genes were analyzed by real-time PCR. **Results:** 4132 genes were differentially expressed in gene profile of UC, 2004 were up-regulated and 2128 down-regulated. The expression trend of six genes for further verification was consistent with the array(3 up-regulated and 3 down-regulated). **Conclusions:** Distinctly different expression profiles exist in UC patients and healthy control, analyzing these genes may help clarify the pathogenesis of UC and provide the theoretical basis for the treatment of diseases.

Key words: Ulcerative colitis; Gene expression profiles chip; Differential expression genes

Chinese Library Classification(CLC): R574.62 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2015)01-53-05

前言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种非特异性的,累及结肠粘膜的慢性炎症疾病。病变往往由直肠起病,向近端结肠扩散。临床上病人主要以腹痛、腹泻、大便次数增多并伴有黏液脓血、里急后重等为主要表现,其中血便是本病的特征性表现。病程多反复发作,迁延不愈。流行病学资料显示 UC 的发病率和患病率呈明显的增高趋势^[1]。目前的研究发现,UC 的发病主要与环境、遗传、免疫、感染等因素相关^[2]。通过对双生子溃疡发病的研究发现同卵双生子的患病率明显高于异卵双生子;

研究发现,溃结还具有家族聚集现象,溃结患者家属中亲属的发病率明显高于普通人群,我国学者通过对 186 例炎症性肠病患者的研究发现,溃结患者中有阳性家族史者占到了 19.8%,其家庭成员的发病情况分别为后代 8.9%、姐妹 8.8%、父母 3.5%^[3],这些均表明遗传因素在溃结的发病机理中起了重要作用。本研究以此为出发点,通过采用人类全基因组表达谱芯片技术,分析溃结患者基因表达谱,筛选出差异表达基因,为发现溃结的发病机理提供依据。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(43411C1452)

作者简介:魏妮(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:炎症性肠病遗传学研究, E-mail: 15877656896@163.com

△ 通讯作者:吴开春, E-mail: kaicwu@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-06-18 接受日期:2014-07-17)

1.1 组织材料

8例溃疡性结肠炎患者(均经过病理证实)病变肠粘膜组织取自2012年11月至2013年10月于西京消化病医院内镜中心就诊的门诊病人年龄45~72岁,平均57岁。8例正常结肠粘膜组织取自我院就诊的结肠息肉病人,年龄46~70岁,平均58岁,取结肠粘膜组织均得到患者本人同意。所取得新鲜组织立即存放液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 结肠粘膜组织总 RNA 提取 将结肠粘膜组织样本和液氮充分研磨混匀;采用 Trizol 法提取样本中的总 RNA,并用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)对总 RNA 进行纯化。使用 Agilent 2100 Bioanalyser 检测总 RNA,合格样品 RNA 完整性计数(RIN)≥7.0,rRNA28S/18S≥0.7。

1.2.2 芯片杂交 总 RNA 纯化后,一步法合成 cDNA 第一链和第二链,转录合成并纯化 aaUTP 标记的 cRNA,荧光染料(Cy3)标记 cRNA 并片段化,最后与芯片进行杂交。操作按照安捷伦芯片操作指南进行。

1.2.3 芯片的选择 本实验采用 Agilent 公司提供的人类全基因组表达谱芯片(4×44K)进行实验,该芯片包含的信息全面,汇总了目前研究报道的人类全基因组信息,可为实验提供更加精准的结果。

1.2.4 芯片扫描 采用 Axon Instrument 芯片扫描仪扫描,分辨率为 5 μm。对芯片原始数据进行归一化处理,然后根据倍数差异(2倍以上)和 t 检验筛选差异表达基因,利用 David 在线数据库分析系统对差异基因进行 Pathway 和 GO 的统计分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测差异表达基因 选择 6 条差异表达基因进行 PCR 验证。所有样本总 RNA 各取 2 μg,将其逆转录为 cDNA。引物来自于 Takara 公司设计,序列见表 1。RT-PCR 反应体系 20 μL:SYBR Premix Ex Taq10 μL,上游引物和下游引物各 0.8 μL,cDNA 2 μL,无 RNase 水 6.4 μL,反应条件为:95℃ 预变性 30sec;95℃ 变性 5sec,60℃ 30sec,共进行 40 个循环。扩增结束后,95℃ 5sec,60℃ 1min 后逐步升温至 95℃ 进行融解曲线分析,确定扩增产物的特异性。50℃ 30sec 冷却。最后检测各样本 Ct 值,利用公式计算出各基因的表达倍数。

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果

提取 16 个样本的总 RNA,对每个样本行 Agilent 2100 Bioanalyser 检测,合格样品要求 RNA 完整性计数(RIN)≥7.0,rRNA28S/18S≥0.7,检测结果显示 16 个样品的 RNA 完整性好,无降解,符合芯片实验要求,见表 2。

2.2 差异表达基因分析

采用 Agilent 人类全基因表达谱芯片检测两组样本的差异表达基因,差异基因通过 David 在线数据库分析系统进行 GO 和 Pathway 的统计分析。筛选两组间差异倍数(经 log2 转换)2 倍以上的基因为差异表达基因,筛选出 4132 个差异表达基因,其中 2004 个表达上调,2128 个表达下调,进一步增大筛选标准至 4 倍,筛选出 55 个差异显著基因,其中上调基因 41 个,下调基因 14 个。我们对这 55 个差异显著的基因进行聚类分析,结果见图 1。如图所示,两组样本间基因表达差异大。

2.3 差异基因的 GO 分析结果

研究将筛选出来的差异表达基因进行 GO 功能分析,涉及生物过程(Biological Process)213 个、细胞组分(Cellular Component)66 个、分子功能(Molecular Function)62 个。GO 富集分析中,P 值小于 0.05 的 GO 为显著性 GO。我们将部分结果展示如表 3。

2.4 差异基因 Pathway 分析结果

Pathway 分析结果显示差异基因主要涉及细胞周期、细胞代谢、DNA 复制、DNA 损伤修复、免疫应答、炎症反应、细胞凋亡等。部分结果展示如表 4。

2.5 实时荧光定量 PCR 验证芯片结果

我们从筛选出的差异表达基因中选出差异倍数较高的 6 条基因进行验证。芯片结果显示,ARHGAP32、PNKD、VLDLR 等 3 条基因表达上调;PLCB1、SH3BP5L、PAM 则表达下调。荧光定量 PCR 结果显示,ARHGAP32、PNKD、VLDLR 等 3 条基因在实验组(UC 组)的相对表达量高于对照组,而 PLCB1、SH3BP5L、PAM 在实验组的表达量低于对照组,与芯片结果吻合。结果如图 2,3。

表 1 实时荧光定量 PCR 验证基因的引物序列

Table 1 Genes and primer sequences by identified real-time PCR

Gene name	Forward Primer(5'→3')	Reverse Primer(5'→3')
ARHGAP32	CGGATACCTCAGCACAGTCCAC	AAATCTGGAGGCATGGCTATGAA
PNKD	CCATGAAAGCTGTGGGACTG	CATACTCGCCCGTGTGGAC
VLDLR	CAGTGACAAATGGTCGCTGTA	CGAAGTCAGATTACAGCACACGTC
PLCB1	AGCAGATCGGAAGCGAGTTGA	TCGAGGGCAAAGGTTGTTGA
SH3BP5L	CCTGCCCGTGTGTAACCTGTA	CAGGCCCTGTAAGTTCTGCTTTG
PAM	AATCAAGGGCCTTTGGAGCA	CTCAGTGCTAAGCCGGTCAAAC

3 讨论

溃疡性结肠炎是一种发生于结肠粘膜组织的慢性非特异性炎症疾病,发病的具体原因还不明确。目前的研究认为,溃疡性结肠炎可能是由多因素共同作用导致,包括环境因素、感染

因素、免疫因素和遗传因素。其中遗传因素起着重要作用。研究发现,同卵双生子的患病率高于异卵双生子^[4];UC 患病一致率在同卵双生子中为 6%-16%,而在异卵双生子中仅为 3%^[5];5.7-15.5%的溃疡病人他们的一级亲属也是患者^[6]。随着芯片技术的广泛应用,对溃疡性结肠炎遗传学方面的研究不断增

多。本研究通过比较溃疡性结肠炎病人和健康对照两者间结肠 因,为后续发病机制的研究提供依据。
粘膜组织间的表达差异,希望找到与溃疡发病有关的易感基

表 2 16 个样品 RNA 质检结果
Table 2 The RNA results of 16 samples

Samples	Amount(μ g)	A260/280	RIN	rRNA28S/18S
1	48.22	2.28	7.0	2.4
2	58.30	2.11	7.6	2.0
3	40.22	2.26	7.3	1.5
4	35.53	1.73	7.5	1.6
5	16.83	2.23	7.4	1.5
6	98.64	2.26	7.1	1.9
7	18.68	1.94	7.0	2.6
8	53.32	2.29	7.8	2.6
9	19.25	2.00	7.6	1.8
10	34.29	2.03	7.8	2.0
11	27.98	2.09	8.1	2.6
12	21.96	2.05	7.3	1.7
13	28.00	2.06	7.1	1.4
14	27.73	2.03	7.0	3.0
15	29.50	2.13	7.7	1.8
16	25.28	2.04	8.1	1.8

表 3 生物过程排列前 10 位 GO 结果
Table 3 The GO results of biological process

GO Terms	Count	%	P Value
GO:0006793~phosphorus metabolic process	200	5.52	0.0221
GO:0008104~protein localization	185	5.10	0.0129
GO:0016310~phosphorylation	173	4.77	0.005
GO:0043067~regulation of programmed cell death	169	4.66	0.023
GO:0042592~homeostatic process	164	4.53	0.0042
GO:0045184~establishment of protein localization	163	4.50	0.0134
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	162	4.47	0.0007
GO:0015031~protein transport	161	4.44	0.0156
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	158	4.36	0.0086
GO:0008219~cell death	157	4.33	0.0051

表 4 部分 Pathway 功能分析的结果
Table 4 The results of pathway

Pathway Name	Count	%	P Value
hsa03440:Homologous recombination	13	0.36	0.0025
hsa00020:Citrate cycle (TCA cycle)	12	0.33	0.0190
hsa04150:mTOR signaling pathway	17	0.47	0.0223
hsa05340:Primary immunodeficiency	12	0.33	0.461
hsa04910:Insulin signaling pathway	34	0.94	0.0498
hsa00480:Glutathione metabolism	15	0.41	0.0656
hsa03010:Ribosome	23	0.63	0.0708
hsa04950:Maturity onset diabetes of the young	9	0.25	0.0756
hsa00531:Glycosaminoglycan degradation	8	0.22	0.0774
hsa00410:beta-Alanine metabolism	8	0.22	0.0962

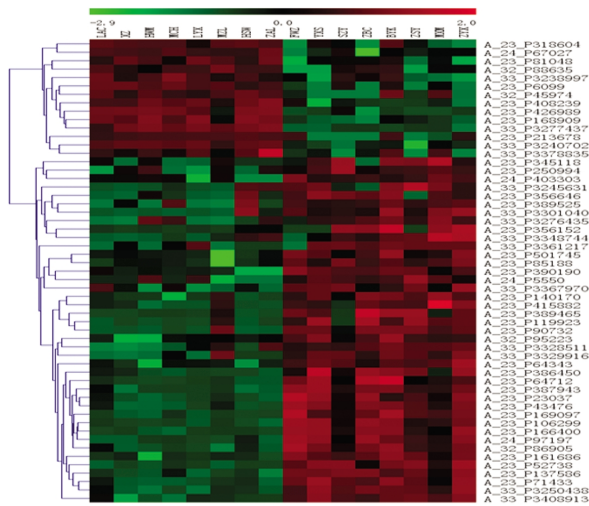
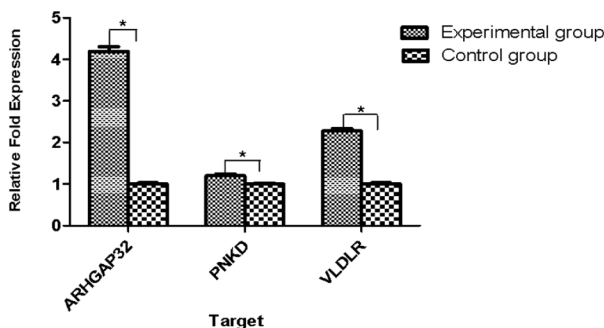
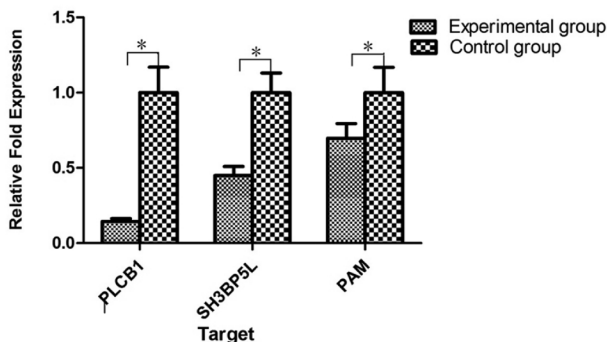


图 1 16 个样本差异基因聚类分析图

Fig.1 Differential gene cluster analysis of 16 samples

图 2 基因 ARHGAP32、PNKD、VLDLR 在实验组中表达上调($P < 0.05$)Fig.2 Genes ARHGAP32, PNKD, VLDLR were up-regulated in experimental group($P < 0.05$)图 3 基因 PLCB1、SH3BP5L、PAM 在实验组中表达下调($P < 0.05$)Fig.3 Genes PLCB1, SH3BP5L, PAM were down-regulated in experimental group($P < 0.05$)

本研究中,我们通过 Agilent 人类全基因表达谱芯片筛选出差异表达基因 4132 个,表达上调 2004 个,表达下调 2128 个。差异表达的基因中,部分基因已经在文献中报道,例如 S100 蛋白家族和 HLA-II 基因。S100 蛋白家族是一组钙结合蛋白,这个家族共有 20 多个家族成员,都可以与钙离子结合,而这个家族中的 S100A8 和 S100A9 是其中较为重要的成员,它们主要是由单核细胞、中性粒细胞和巨噬细胞分泌^[7]。研究发现,S100A8 和 S100A9 与炎症的发生有关,其在炎症性肠病的发生发展中也起了一定作用。它可通过与肠细胞膜上的受体结合进一步激活巨噬细胞,引起炎症因子的释放,在溃疡病人中这

两种蛋白的分泌量增大,并且其分泌量与肠道炎症的严重程度相关^[8,9]。芯片结果显示 S100A8 和 S100A9 这两个基因表达上调,提示可能与炎症因子大量释放相一致。人类白细胞抗原 II 类基因(HLA-II)与溃疡性结肠炎有关。研究发现,HLA-II 的 DR 区的多态性与 UC 易感性密切相关^[10,11];在对此区的一个深入研究发现,HLA 的 DR 区上的 DRB1*1502 位点和 DRB1*0103 位点分别与重症型的 UC 及 UC 炎症的广泛病变有关,其中 DRB1*0103 还与 UC 的肠外表现相关^[12-14]。HLA-DRB1 基因在 UC 人群中表达上调^[15],而我们的芯片结果显示 HLA-DRB1 基因表达下调,与文献报道的相反,其原因有待进一步的研究。

同时我们对差异基因进行了 Pathway 和 GO 功能富集分析。Pathway 分析结果显示差异表达基因涉及细胞周期、细胞代谢、细胞凋亡、炎症免疫反应等。GO 的分析结果显示,许多基因都涉及炎症反应通路(GO: 0002819;GO:0002712)。在与溃疡性结肠炎相关的获得性免疫(adaptive immunity)应答这条通路中涉及 16 条基因,其中上调的基因 11 条,下调基因 5 条。而 B 细胞介导的免疫反应涉及 9 条基因,上调基因 6 条,下调基因 3 条。其他差异基因则主要与细胞代谢、细胞凋亡有关。

本研究应用荧光定量 PCR 检测部分差异表达基因,检测结果与芯片结果一致,证实本次基因芯片筛查结果可靠。所选的 6 条基因中,3 条表达上调,3 条表达下调,均为芯片中表达量高的基因。上调的 3 条基因中,ARHGAP32 基因为 Rho 蛋白 GTP 酶活化蛋白 32 基因,是一种新发现的肿瘤标志物^[16]。Rho GTP 酶可调控细胞迁移,并且可能影响肿瘤的侵袭和转移^[17]。PNKD 为发作性运动障碍的简称,是一种核基因编码的线粒体蛋白。VLDLR 为极低密度脂蛋白受体的简称,VLDLR 是低密度脂蛋白受体家族成员之一。VLDLR 高表达于脂肪组织、心脏、骨骼肌等组织上,除此之外 VLDLR 还表达于包括巨噬细胞在内的免疫细胞上^[18,19],参与细胞的增殖和迁移。下调的 3 条基因中,PLCB1 为磷脂酶 C- β 1 的简称,活化的 PLC 通过一系列细胞外信号分子来调控细胞功能,文献报道显示 PLC 通路在调控白细胞功能方面可能起了重要作用^[20]。PAM 为聚丙烯酰胺的简称,主要参与细胞代谢。SH3BP5L 为 SH3 结构域蛋白 5 样基因,它有 SH3 结构域,研究发现 SH3 结构域主要介导蛋白间或蛋白内的交互作用,参与细胞信号转导、细胞骨架、膜转运等途径^[21,22]。芯片结果中筛出的表达量高的这 6 条差异基因在溃疡性结肠炎的发生发展中是否起作用、起了什么样的作用,还有待我们的进一步研究。

综上所述,溃疡性结肠炎的发生发展涉及了多种生物学过程,提示疾病的发生是多基因共同作用的结果。通过基因芯片研究,我们得到了溃疡性结肠炎相关差异表达基因谱,发现了在病变组织中差异表达的基因,但是这些基因在疾病的发生发展到起了哪些作用还有待我们进一步的研究。下一步我们可针对差异表达的基因进行功能学的研究,希望从中找到与疾病相关的差异基因,为阐明溃疡的发病机制提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, et al. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(8): 1266-1280

- [2] 桑力轩, 刘汉立, 姜敏. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2249-2254
Sang Li-xuan, Liu Han-li, Jiang Min. Progress of research into the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. World Chinese J Digestology, 2007, 15(20): 2249-2254
- [3] 宫健伟. 溃疡性结肠炎发病机制概述 [J]. 胃肠病学, 2007, 12(1): 58-60
Gong Jian-wei. Summarize in pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2007, 12(1): 58-60
- [4] Charlie W Lees, Jack Satsangi. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(5): 513-534
- [5] Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics[J]. Gastroenterology, 2003, 124(7): 1767-1773
- [6] Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA, et al. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease [J]. Clin Gastroenterol, 1980, 9(2): 271-277
- [7] Foell D, Wittkowski H, Vogl T, et al. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(1): 28-37
- [8] Schnekenburger J, Schick V, Kruger B, et al. The calcium binding protein S100A9 is essential for pancreatic leukocyte infiltration and induces disruption of cell-cell contacts[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(2): 558-567
- [9] Foell D, Wittkowski H, Ren Z, et al. Phagocyte-specific S100 protein are released from affected mucosa and Promote immune responses during inflammatory bowel disease [J]. J Pathol, 2008, 216 (2): 183-292
- [10] Reinshagen M, Loeliger C, Kuehnl P, et al. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany [J]. Gut, 1996, 38(4): 538-542
- [11] Heresbach D, Alizadeh M, Reumaux D, et al. Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis?[J]. J Autoimmun, 1996, 9(6): 777-784
- [12] Heel DA, Fisher SA, Kirby A, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(7): 763-770
- [13] Bakker PI, McVean G, Rioux JD, et al. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC[J]. Nat Genet, 2006, 38(10): 1166-1172
- [14] Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(23): 3628-3635
- [15] 廖应雷, 李红纳, 杜艳, 等. NAT1、CXCL9、BPI 和 HLA-DQB1 在溃疡性结肠炎中的表达[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(22): 4084-4086
Miu Ying-lei, Li Hong-na, Du Yan, et al. Expression of NAT1, CXCL9, BPI and HLA-DQB1 in patients with Ulcerative colitis [J]. J Practical Medicine, 2010, 26(22): 4084-4086
- [16] Kandpal R.P. Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes [J]. Curr Protein Pept Sci, 2006, 7(4): 355-365
- [17] Ridley AJ. Rho proteins and cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(1): 13-19
- [18] Chen X, Guo Z, Okoro EU, et al. Up-regulation of ATP binding cassette transporter A1 expression by very low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E receptor 2 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3751-3759
- [19] Du Y, Yang M, Wei W, et al. Macrophage VLDL receptor promotes PAFAH secretion in mother's milk and suppresses systemic inflammation in nursing neonates[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1008
- [20] Cuifen Hou, Thomas Kirchner, Monica Singer, et al. In vivo activity of a Phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 309: 697-704
- [21] Ferraro E, Peluso D, Via A, et al. SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: 451-454
- [22] Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other prolinerecognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction[J]. Biochem J, 2005, 390(3): 641-653

(上接第 38 页)

- [18] Ritter E, Perry A, Yu J, et al. Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells[J]. Ann Surg, 2008, 247 (2): 310-314
- [19] Meng H, Zhang Z, Zhang R, et al. Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors [J]. Neurosci Lett, 2006, 393(2-3): 97-101
- [20] Schmidt A, Ladage D, Schinköthe T, et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(7): 1750-1758
- [21] Tropel P, Platel N, Platel JC, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2868-2876