



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献

在线投稿 | 稿件查询 | 期刊阅读

搜索: 请输入您想要的信息 | 搜索 | 高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献 >> 血液内科

血液内科

骨髓增生异常综合征患者间充质干细胞SDF-1基因的表达

发表时间: 2011-10-9 10:29:10 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 张翼,达万明 作者单位: 解放军总医院血液科, 北京 100853

【摘要】本研究探讨骨髓基质细胞衍生因子-1(SDF-1)在骨髓增生异常综合征(MDS)患者骨髓间充质干细胞(MSC)中的表达水平。采集MDS的骨髓标本,分离、培养和扩增MSC,观察细胞形态并进行表型鉴定;以实时定量RT-PCR法检测间充质干细胞SDF-1基因和内参照磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的表达水平,并与健康供者的表达水平相比较。结果发现, MDS患者骨髓间充质干细胞SDF-1基因的表达水平经GAPDH校正后为 1.53 ± 0.92 ,与对照组(5.51 ± 0.99)相比差异非常显著($P < 0.01$)。结论: SDF-1基因在MDS患者骨髓间充质干细胞中的表达显著升高, SDF-1基因的异常表达可能影响MDS患者骨髓微环境的造血调控作用,是否可对MDS的发病机制及治疗提供新的思路值得进一步探讨。

【关键词】 骨髓增生异常综合征

Abstract This study was aimed to investigate the expression level of stromal cell derived factor-1 gene (SDF-1) in bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) of patients with myelodysplastic syndrome (MDS). The MSC from bone marrow samples of MDS patients were isolated, cultured and expanded, the morphology and immunophenotype of MSC were analyzed. The expression levels of SDF-1 and internal reference GAPDH in MSC of MDS patients were detected by real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-RT-PCR) method and were compared with expression levels of healthy donors. The results showed that the expression levels of SDF-1 in MDS patients were significantly different from those in healthy donors (1.53 ± 0.92 vs 5.51 ± 0.99) ($P < 0.01$). SDF-1 gene expression levels in bone marrow MSC of MDS patients were significantly higher than that in MSC derived from healthy donors. It is concluded that the abnormal expression of SDF-1 gene in MSC may influence the regulation of hematopoiesis of the bone marrow microenvironment in MDS patients and it is worthy of further investigation for new clue on etiological mechanism and treatment of MDS.

Key words myelodysplastic syndrome; mesenchymal stem cell; SDF-1 gene; real-time quantitative RT-PCR

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 是一组以血细胞的质和量异常为特征的血液系统异质性疾病, 迄今为止发病机制尚不明确。多数研究者认为, MDS由造血干细胞的恶性克隆性增殖引起, 关于骨髓造血微环境是否参与其发病目前还存在争论[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓造血微环境的重要成分, 我们在新近的研究中发现, 来源于MDS患者的骨髓间充质干细胞, 其体外支持造血的功能显著弱于健康者来源的MSC[2], 由此设想, 骨髓造血微环境特别是间充质干细胞功能的异常可能涉及MDS的发病机制。基质细胞衍生生长因子-1(SDF-1)属于CXC型趋化因子, 在骨髓间充质细胞中高表达, 与表达于CD34+造血干/祖细胞及白血病细胞上的受体CXCR4特异性结合, 在骨髓微环境对造血的调控中发挥重要作用。近年来的研究还发现, SDF-1/CXCR4与急、慢性白血病等血液系统肿瘤中恶性造血细胞的生长与增殖密切相关[3], 但对其在MDS发病中的作用尚缺少研究。为此我们进行了初步研究, 以实时定量RT-PCR法检测了SDF-1基因在MDS患者骨髓MSC中的

特色服务
Serves

- 论文推荐
- 著书代理
- 统计学分析
- 学分获取
- 专业修稿
- 专业审稿
- 英文翻译
- 写作辅导

期刊约稿

- 中国社区医师
- 医学信息
- 吉林医学
- 按摩与康复医学
- 临床合理用药杂志

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

职称晋升政策汇总
让您的晋升不留下半点遗憾

表达, 并与健康人MSC的表达水平相比较。

材料和方法

研究对象

8例未经治疗的MDS患者, 依照2000年WHO诊断标准, 7例为难治性贫血(RA), 1例为难治性贫血伴原始细胞增多(RAEB), 其中男8例, 女2例, 中位年龄52(34-78)岁。髂骨穿刺获得骨髓穿刺物10 ml, 标本加肝素抗凝。同时采集8例健康供者的骨髓标本作为对照。

间充质干细胞的分离及培养

骨髓标本置于1.077 g/ml的Ficoll分离液(Biochrom公司)上, 400×g离心20分钟, 收集单个核细胞, 用PBS洗2次, 以(2-4)×10⁵/cm²的密度接种于75 cm²培养瓶中, 置37℃、5%CO₂培养箱中培养, 培养体系为Dexter完全培养液(Invitrogen公司)。72小时后去除非贴壁细胞, 每周换液2次。待细胞生长至瓶底90%融合时, 以0.25%的胰蛋白酶消化, 1:3传代。

RNA提取

用TRIzol试剂 (Invitrogen公司) 从间充质干细胞中提取总RNA。紫外分光光度仪测定260和280 nm处的吸光值, 计算RNA浓度和纯度。

cDNA逆转录合成

逆转录反应体系为20 μl, 包括标本RNA 1 μg, 随机引物100 ng和逆转录酶等, 42℃条件下反应 1 小时, -20℃保存备用。

实时定量RT-PCR检测

SDF-1 基因引物由Prime ExpressTM软件 设计完成, 上游引物: 5' -GCCTGAGCTACAGATGCCCA-3' ;下游引物: 5' -TTCGGGTCAATGCACTTGT-3' 。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的表达作为内参照, 其上游引物: 5' -GAAGGTGAAGTCGGAGTC-3' ;下游引物: 5' -GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' 。在ABI Prism 7700(美国Applied Biosystems Corporation, Norwalk公司)实时荧光定量PCR仪上进行实时定量扩增。反应体系25 μl, 包括上、下游引物各0.3 μmol/L, Sybr Green PCR Master mix(美国Applied Biosystems Corporation, Norwalk公司) 12.5 μl及10 ng cDNA。

标准曲线的制作

为保证PCR扩增的有效性分析及分析的准确性, 首先从人Stro-1+MSC细胞系(法国Morad.Bensidhoum博士建系并提供)中提取总RNA, 逆转录合成cDNA, 连续稀释为0.1-50 ng/5 μl的浓度系列, 进行SDF-1和GAPDH的实时扩增, 制作标准曲线。以cDNA浓度为横坐标, CT值(cycle at threshold, 即PCR扩增过程中荧光信号开始由本底进入指数增长期的拐点所对应的循环次数), 计算曲线的相关系数r值, 以>0.99认为结果可靠。

SDF-1基因表达的计算方法

以CT值代表PCR扩增的相对产量;ΔCT 表示靶基因SDF-1基因与GAPDH基因的之间CT差值, 即ΔCT(MDS患者SDF-1基因)=CT(MSD患者SDF-1基因)-CT(GAPDH), ΔCT(正常供者SDF-1基因)=CT(正常供者SDF-1基因)-CT(GAPDH);ΔΔCT=ΔCT(MDS患者SDF-1基因)-ΔCT(正常供者SDF-1基因)。

统计学处理

以ANOVA检验比较靶基因SDF-1在MDS患者和健康供者骨髓间充质干细胞中的表达, 以P<0.01表示差异具有统计学意义。

结 果

MDS患者间充质干细胞的形态及表型鉴定

从MDS患者骨髓中获取的单个核细胞接种于培养瓶中, 72小时后去除悬浮细胞即可见贴壁细胞, 细胞呈典型的成纤维细胞样, 2-3周后出现致密的贴壁层(图1)。经流式细胞仪检测细胞表达CD73(SH3)、CD105(SH2)及CD90(Thy-1), 而CD34、CD45等造血细胞标记为阴性, 符合MSC的形态学和表型特点。

标准曲线的r值

从人Stro-1+MSC细胞系中提取总RNA, 以50 ng/5 μl, 10 ng/5 μl, 1 ng/5 μl, 0.1 ng/5 μl 4种浓度的cDNA 进行定量PCR反应, 依照产物的CT值建立标准曲线, 曲线的相关系数r值为0.9957, 大于0.99, 表明引物设计准确, 产物扩增效率良好, 分析可靠(图2)。

SDF-1基因在MDS患者骨髓间充质干细胞中的表达水平

我要立即投稿
--最便捷的绿色通道

在线客服...

QQ留言 1254635326
QQ交谈 4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

SDF-1基因在MDS患者和健康供者骨髓间充质干细胞中均有表达,其中CT(MSD患者SDF-1基因)为 16.31 ± 0.70 , CT(MDS患者GAPDH)为 14.78 ± 0.89 , Δ CT(MDS患者SDF-1基因)为 1.53 ± 0.92 ;对照组正常供者CT(SDF-1基因)、CT(GAPDH)及 Δ CT值分别为 19.03 ± 0.51 , 14.52 ± 1.98 , 4.51 ± 0.99 。计算 $\Delta\Delta$ CT= $1.53-4.51=-2.98$,这说明SDF-1基因在MDS患者间充质干细胞中的表达水平高于对照组,经ANOVA检验进行统计学分析,发现两组间差异具有显著性($P<0.01$)(附表)。Table.Relative expression levels of gene SDF-1 in bone marrow mesenchymal stem cells of MDS patients and healthy donors as measured by real-time quantitative RT-PCR (略)

讨论

骨髓增生异常综合征(MDS)是造血系统恶性克隆性疾病,以髓内造血活跃的同时伴有外周造血细胞一系或多系的减少为特征。多数研究认为,这种无效造血是由于干细胞水平的细胞遗传学及分子生物学的异常最终导致造血细胞凋亡过剩所致,但迄今为止该病的确切发病机制尚不完全明了。骨髓造血微环境(hematopoietic microenvironment)是造血系统的重要组成部分,通过产生和分泌细胞因子及细胞外基质等对造血细胞的生成和分化发挥着极其重要的作用。有研究表明,MDS患者的骨髓基质细胞在体外并不能支持CD34⁺细胞的生长[4],这可能与异常表达IL-6和TNF- α 等细胞因子有关[5, 6],但骨髓造血微环境在MDS的发病中到底扮演了何种角色,是否为该病的重要致病因素,目前仍无定论。

基质细胞衍生因子-1(SDF-1)是骨髓基质表达的高效趋化因子,与其受体——表达于CD34⁺造血干/祖细胞(HSC/HPC)上的CXCR4特异性结合后在HSC/HPC的归巢、定居骨髓、维持正常造血及由骨髓动员至外周血的过程中发挥着重要作用[7, 8]。研究表明,SDF-1/CXCR4还参与维持多种恶性血细胞的存活及其在骨髓等部位的浸润,因而被认为参与了急性和慢性白血病、淋巴瘤及多发性骨髓瘤等血液系统恶性肿瘤的发病[3]。关于SDF-1/CXCR4在MDS患者骨髓中表达的报道尚为鲜见,只有Matsuda等[9]在其初步研究中通过ELISA法发现,MDS患者的骨髓表达高水平的SDF-1,其CD34⁺细胞的凋亡显著高于正常对照组,CXCR4在CD34⁺细胞的表达在两组间无显著差异,但对SDF-1的趋化能力在MDS组却显著减弱。

间充质干细胞(MSC)是造血微环境的重要成分,近年来关于其多向分化等生物学特性及支持造血、免疫抑制等功能已屡见报道[10-12],但MDS患者的间充质干细胞的生物学特性、功能及其是否参与MDS发病的研究却鲜有报道。在最近的研究中,我们以MDS患者的MSC为滋养层,接种脐血单个核细胞进行体外造血支持实验,结果显示MDS组的细胞总数和CFU-GM计数显著低于正常对照组,由此我们推论MDS患者骨髓间充质干细胞的异常可能与MDS的发病有关。MSC是SDF-1重要的表达细胞,因此我们试图从分子水平探讨SDF-1在MDS患者骨髓间充质干细胞中的表达,以实时定量RT-PCR法检测靶基因和内参照基因(GAPDH)基因的表达水平,并与健康供者的表达水平相比较。结果发现,实验组靶基因的表达水平经GAPDH校正后为 1.53 ± 0.92 ,与对照组的 4.51 ± 0.99 相比差异显著,说明该基因在MDS患者MSC中显著高表达,与Matsuda等报道的MDS患者MSC从蛋白质水平高表达SDF-1的结果一致,进一步支持了我们关于骨髓造血微环境,特别是间充质干细胞的异常涉及MDS发病机制的推断,进而为我们以SDF-1/CXCR4为靶分子治疗MDS的新设想提供了初步的支持,有关这方面的更加深入的研究正在进行中。

【参考文献】

- 1 Deeg HJ. Marrow stroma in MDS: culprit or bystander? *Leuk Res*, 2002; 26: 687-688
- 2 张翼, 达万明. 骨髓增生异常综合症患者间充质干细胞的生物学特性及体外支持造血的实验研究. *中国实验血液学杂志*, 2005; 13: 839-842
- 3 Prochazkova J, Kylarova D, Vranka P, et al. Comparative study of apoptosis-detecting techniques: TUNEL, apostain, and lamin B. *Biotechniques*, 2003; 35: 528-534
- 4 Aizawa S, Nakano M, Iwase O, et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk Res*, 1999; 23: 239-246
- 5 Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, et al. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*, 2002; 26: 677-686
- 6 Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 2003; 27: 583-591
- 7 Rollins BJ. Chemokines. *Blood*, 1997; 90: 909-928
- 8 Aiuti A, Webb IJ, Bleu C, et al. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 1997; 185: 111-120
- 9 Matsuda M, Morita Y, Hanamoto H, et al. CD34⁺ progenitors from MDS patients are unresponsive to SDF-1, despite high levels of SDF-1 in bone marrow plasma. *Leukemia*, 2004; 18: 1038-1040
- 10 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284 (5411): 143-147

最热点击



创新之冠花落谁家?



医学编辑中心成立了



考试第一练兵平台



看视频学在线投稿

相关文章



- ▶ 骨髓增生异常综合征患者间充质干细胞SDF-1基因的表达 2011-10-9
- ▶ MDS病人血清血管内皮生长因子水平检测 2011-8-3
- ▶ 2-甲氧基雌二醇诱导骨髓增生异常综合征MUTZ 1 细胞凋亡机制的研究 2010-12-15
- ▶ 阿米福汀联合促红素治疗骨髓增生异常综合征1例 2010-7-26

0
顶

0
踩

- ★ 加入收藏夹
- 👤 复制给朋友
- 🌐 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论 **重置**

▲ 上一页

当前第1页，共1页

▼ 下一页