



抑制性消减杂交技术检测骨髓CD34⁺细胞基因差异表达

用动员的外周血造血干细胞进行移植治疗各种血液和非血液疾病,比用来源于骨髓的造血干细胞移植具有很多优越性,包括造血功能重建快、感染和出血机会少,供者容易接受等,但其中的机制尚不完全清楚。有人认为是从经过动员的外周血中分离出的单个核细胞中一些辅助细胞如CD14⁺细胞或CD4⁺等起了重要作用[1][2][3]。CD34作为造血干细胞公认的标志,有的学者就从CD34⁺细胞的表型、代谢和细胞周期研究它们不同的特性[4][5][6][7]。抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是由mRNA差别显示技术(DDRT-PCR)发展而来的一种检测方法,该方法利用杂交二级动力学原理,在检测2份标本基因表达差异方面具有以下特点:(1)极大降低了假阳性率,由于SSH方法采用2次扣除杂交和2次PCR,保证了该方法具有较高特异性;(2)具有高度灵敏性,由于在反应中将丰度不同的单链分子含量归一化,保证了低丰度mRNA检测成功;(3)SSH发在1次反应中,可同时分离出上百个差异表达的基因,这一点远胜于DDRT-PCR。本研究中我们即利用SSH技术从分子生物学水平检测骨髓和动员外周血中CD34⁺细胞基因表达的差异,为更好地认识和进一步研究造血干细胞提供帮助。

1 材料和方法

1.1 标本获取

通过骨髓穿刺从一健康供者获取约20 ml骨髓,用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞。之后同一供者给予格拉诺赛特(粒细胞集落刺激因子,日本中外制药产品)250 μg/d,共5~6 d动员后,用CS3000 plus(美国, Baxter公司)分离外周血单个核细胞。

1.2 分离CD34⁺细胞

所有试剂均购自德国Miltenyi Biotec公司,按照试剂盒说明书操作。调整细胞数 $\leq 10^8$,加含0.5%牛血清白蛋白、2 mmol/L EDTA的PBS缓冲液(pH7.2)300 μl,再加入Reagent A1、Reagent A2各100 μl,6~12 °C孵育15 min。加PBS缓冲液洗涤,离心去上清。加PBS缓冲液400 μl重悬细胞,加100 μl的Reagent B,6~12 °C孵育15 min。PBS洗涤细胞,500 μl PBS缓冲液重悬细胞,磁场中过柱。最后用1 ml PBS缓冲液冲洗出细胞。计数所得细胞数,流式细胞仪检测纯度均在90%以上。

1.3 mRNA的提取

采用德国QIAGEN公司的Mini Oligotex Direct mRNA试剂盒,操作按说明书进行。提取的mRNA用于合成双链cDNA。

1.4 合成双链cDNA

采用Clontech公司的PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒,按说明书操作。模板为上步提取的mRNA。

1.5 SSH差异筛选

采用Clontech公司的PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒,原理见参考文献[8]。以骨髓标本为实验

组，外周血标本为驱动组，操作按说明书进行。将扩增的产物直接连接到pT-Adv载体上，转化TOP10 F' E. coli，氨苄青霉素、X-Gal/IPTG筛选阳性克隆，菌液直接送上海生工公司测序。

1.6 在GenBank中进行序列比较

将测序所得到的序列通过网上([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))与美国国立医学图书馆的GenBank进行同源性比较。

1.7 RNA斑点杂交

将序列分析后所得的差异表达基因的cDNA制成标记探针，分别与骨髓和外周血CD34⁺细胞中的RNA进行斑点杂交，尼龙膜为Schleicher & Schuell公司产品，具体方法参照说明书和分子克隆实验指南[9]。

2 结果

2.1 SSH结果

随机挑出40个阳性克隆进行测序，发现有21个基因在来源于骨髓的CD34⁺细胞中表达增高，这21个基因片段与GenBank中基因进行同源性比较，获知这些片段相对应的基因，结果见表1。

表 1 SSH 技术检测骨髓 CD34⁺ 细胞差异表达基因
**Tab.1 Differentially expressed genes of bone marrow
 CD34⁺ cells assayed by SSH technique**

Clone	Size (bp)	Gene	Result of hybrid
J21	456	NF-IL6-β	+
J03	234	B-myb gene	+
J35	338	Cathepsin G gene	+
J40	356	Myeloperoxidase	+
J09	487	Proteinase 3	+
J36	512	Neutrophil elastase	+
J12	478	RR2 ribonucleotide reductase	+
J26	399	PAC-1	+
J29	611	Gro-β	+
J20	547	MIP 1	+
J02	199	Cyclin A	+
J22	222	Cyclin E1	+
J25	367	Cdc28	+
J14	367	Ki-67 cell proliferation antigen	+
J28	498	TSG-14	+
J15	755	Kinesin-like 1	+
J31	811	CD83	+
J04	478	Ligase 1	+
J10	698	MCM	+
J38	522	E2F-1	+

表1 SSH技术检测骨髓CD34⁺细胞差异表达基因Tab.1 Differentially expressed genes of bone marrow CD34⁺ cells assayed by SSH technique

2.2 RNA斑点杂交

为了证实SSH检测结果，我们用RNA斑点杂交技术对差异表达的21个基因进行验证，结果证实在骨髓和外周血CD34⁺细胞中，这21个基因表达存在着差异(图1)。

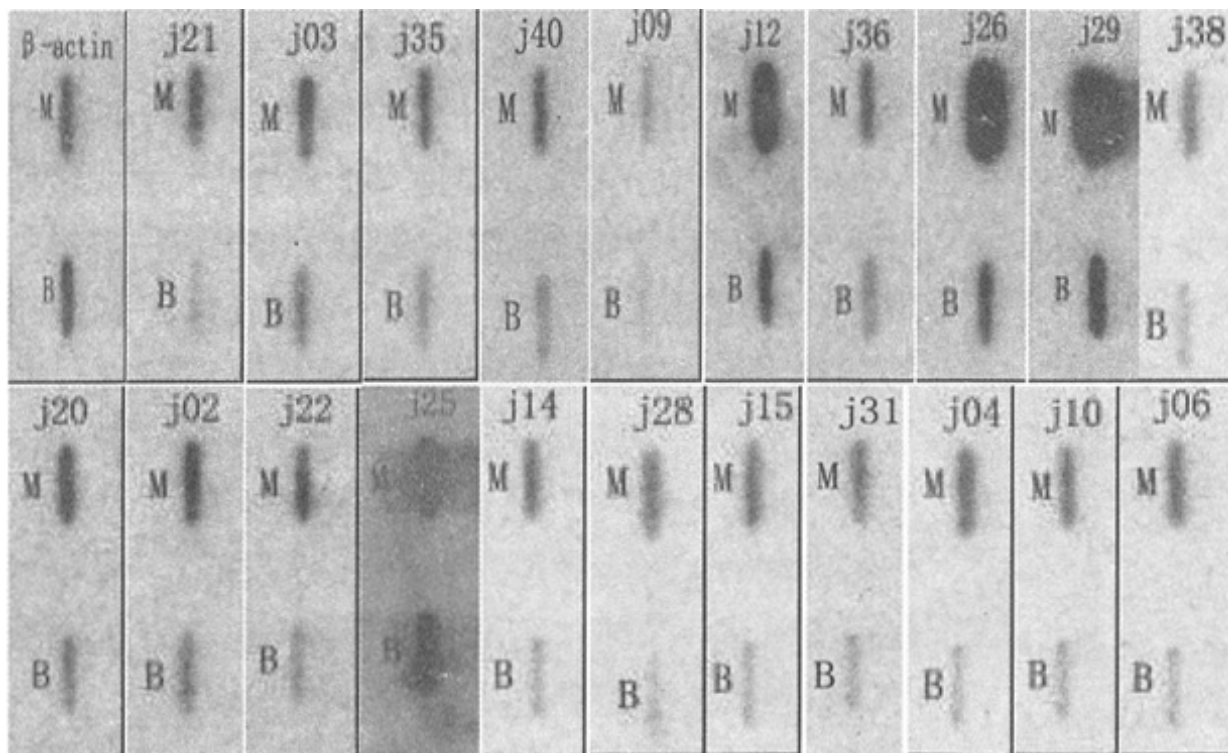


图1 差异基因的狭缝杂交方法分析

Fig.1 Analysis of differentially expressed genes by slot blotting
M: Bone marrow; B: G-CSF mobilized peripheral blood

3 讨论

目前造血干细胞移植不但已成功用于白血病、再生障碍性贫血、自身免疫性疾病的治疗，而且近年来的研究发现造血干细胞还可分化为神经、肝和心肌等细胞，造血干细胞的研究越来越被重视。目前造血干细胞还没有明确、特异性的标记，但CD34抗原作为造血干/祖细胞标记之一已被广泛地接受，而且已应用于临床。目前临床上移植造血干细胞数量即以CD34⁺细胞作为标志，而单纯以CD34⁺细胞进行移植也已在临床上开展。CD34⁺细胞仍然具有很强的异质性，虽然同时增加其他标记如CD38、HLA-DR等能够减少异质性，但是所得到的细胞数会减少，无法进行后续实验。

CD34⁺细胞基因表达研究也有报道，标本分别有来自骨髓和脐血[10][11]。本实验采用的SSH技术能够快速得到表达差异基因，并且能够发现新的基因。此技术要求严格的配对比较，一方高表达，意味着另一方低表达。从研究动员外周血CD34⁺细胞特性出发，骨髓高表达则动员外周血就低表达。本实验发现骨髓CD34⁺细胞

高表达的基因主要有2类: (1)与细胞周期和DNA合成相关的基因; (2)C/EBP(CCAAT/增强子结合蛋白)转录因子家族。

与细胞周期和DNA合成相关的基因如cyclin A、cyclin E1、RR2及Ki-67等与S期、G₂-M期转化有关。这些基因的低表达说明动员外周血CD34⁺细胞相对处于较静息状态。其他如PAC-1、cdc28和kinesins等基因的低表达则与细胞处于非周期性增殖有关。细胞增殖活跃自然使DNA复制相关基因高表达,与此相关的基因如ligase 1的产物通过与细胞核抗原相互作用后介导DNA复制[12]。MCM(mini-chromosome maintenance)蛋白在DNA复制中也扮演重要的角色[13],而E2F-1通过激活MCM基因而促进细胞周期进行下去[14]。总之,更多的骨髓CD34⁺细胞处于细胞增殖周期,而大部分动员的CD34⁺细胞处于G₀期。说明骨髓造血微环境对造血干细胞具有重要意义,造血干细胞只有在其适合的环境中才能增殖。

粒细胞集落刺激因子本身是一种抗炎免疫调节剂,主要通过抑制IL-1、TNF- α 和IFN- γ 的产生或抑制它们活性发挥作用。同时许多炎症因子的前身受控于C/EBP和B-myb。这也是为何动员外周血CD34⁺细胞趋化因子、髓过氧化物酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、GRO β 和蛋白酶3等表达降低的原因。

动员外周血和骨髓CD34⁺细胞在基因表达上有明显的不同,而这些基因表达差异所具有的意义仍有待进一步探讨。例如,实验发现从基因表达方面看,外周血CD34⁺细胞增殖不如骨髓的活跃,而临床上外周血造血干细胞移植却比骨髓移植恢复得快。同时由于SSH的技术含量非常高,不可能做大量标本研究,受此限制,结果的代表性有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Mielcarek M, Martin P, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells [J]. Blood, 1997, 89(5): 1629-34.
- [2] Mielcarek M, Graf L, Johnson G, et al. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T cell proliferation [J]. Blood, 1998, 92(1): 215-22.
- [3] Tanaka J, Mielcarek M, Torok-Storb B. Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cell [J]. Blood, 1998, 91(1): 347-52.
- [4] Roberts AW, Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines[J]. Blood, 1995, 86(6): 1600-5.
- [5] Korbling M. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy subject [J]. Curr Opin Hematol, 1998, 5(2): 209-14.
- [6] Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor[J]. Curr Opin Hematol, 1998, 5(2): 221-5.
- [7] Gyger M, Stuart RK, Pereaute C. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(1): 1-16.
- [8] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-30.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed, New York: Cold spring harbor Laboratory Press, 1989. 372-3.
- [10] Zhou GL, Chen JJ, Lee S, et al. The pattern of gene expression in human CD34⁺ stem/progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13966-71.
- [11] Mao M, Fu G, Wu JS, et al. Identification of genes expressed in human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length

cDNA cloning[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17): 8175-80.

[12] Tomkinson AE, Mackey ZB. Structure and function of mammalian DNA ligases[J]. *Mutat Res*, 1998, 407(1): 1-9.

[13] Chong JP, Thommes P, Blow JJ. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(1): 102-6.

[14] Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, et al. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F[J]. *Oncogene*, 1999, 18(23): 2299-309.

参考文献:

[1] Mielcarek M, Martin P, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood mononuclear cells [J]. *Blood*, 1997, 89(5): 1629-34.

[2] Mielcarek M, Graf L, Johnson G, et al. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T cell proliferation [J]. *Blood*, 1998, 92(1): 215-22.

[3] Tanaka J, Mielcarek M, Torok-Storb B. Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cell [J]. *Blood*, 1998, 91(1): 347-52.

[4] Roberts AW, Metcalf D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines[J]. *Blood*, 1995, 86(6): 1600-5.

[5] Korbling M. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy subject [J]. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5(2): 209-14.

[6] Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5(2): 221-5.

[7] Gyger M, Stuart RK, Pereaault C. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 26(1): 1-16.

[8] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025-30.

[9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed, New York: Cold spring harbor Laboratory Press, 1989. 372-3.

[10] Zhou GL, Chen JJ, Lee S, et al. The pattern of gene expression in human CD34⁺ stem/progenitor cells [J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13966-71.

[11] Mao M, Fu G, Wu JS, et al. Identification of genes expressed in human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17): 8175-80.

[12] Tomkinson AE, Mackey ZB. Structure and function of mammalian DNA ligases[J]. *Mutat Res*, 1998, 407(1): 1-9.

[13] Chong JP, Thommes P, Blow JJ. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(1): 102-6.

[14] Ohtani K, Iwanaga R, Nakamura M, et al. Cell growth-regulated expression of

mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F[J]. *Oncogene*, 1999, 18(23): 2299-309.

[回结果列表](#)