

PBS缓冲液冲洗出细胞遥计数所得细胞数流式细胞仪检测纯度均在 90%以上遥

1.3 mRNA 的提取

采用德国 QIAGEN 公司的 MiniOligotexDirect mRNA 试剂盒操作按说明书进行遥提取的 mRNA 用于合成双链 cDNA遥

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遥模板为上步提取的 mRNA遥

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遥以骨髓标本为实验组袁外周血标本为驱动组遥操作按说明书进行遥将扩增的产物直接连接到 pT-Adv 载体上袁转化 TOP10F' E.coli袁氨苄青霉素尧-Gal/IPTG 筛选阳性克隆袁菌液直接送上海生工公司测序遥

1.6 在 GenBank 中进行序列比较

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

1.7 RNA 斑点杂交

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

2 结果

2.1 SSH 结果

随机挑出 40 个阳性克隆进行测序袁发现有 21 个基因在来源于骨髓的 CD34+ 细胞中表达增高袁这 21

个基因片段与 GenBank 中基因进行同源性比较袁获知这些片段相对应的基因袁结果见表 1遥

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	Resultofhybrid
J21	456	NF-IL6	+
J03	234	B-mybgene	+
J35	338	CathepsinGgene	+
J40	356	Myeloperoxidase	+
J09	487	Proteinase3	+
J36	512	Neutrophilelastase	+
J12	478	RR2ribonucleotidereductase	+
J26	399	PAC-1	+
J29	611	Gro-茁	+
J20	547	MIPI	+
J02	199	CyclinA	+
J22	222	CyclinE1	+
J25	367	Cdc28	+
J14	367	Ki-67cellproliferationantigen	+
J28	498	TSG-14	+
J15	755	Kinesin-like1	+
J31	811	CD83	+
J04	478	Ligase1	+
J10	698	MCM	+
J38	522	E2F-1	+
J06	337	CXCR4	+

2.2 RNA 斑点杂交

为了证实 SSH 检测结果袁我们用 RNA 斑点杂交技术对差异表达的 21 个基因进行验证袁结果证实骨髓和外周血 CD34+ 细胞中袁这 21 个基因表达存在着差异遥图 1 冤

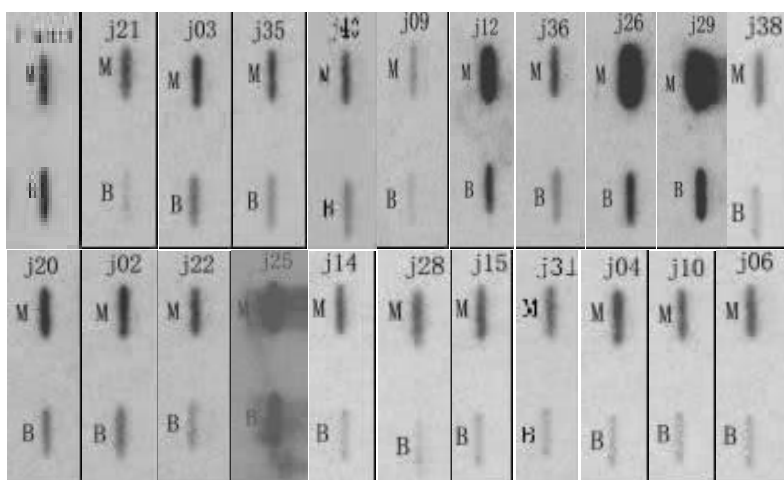


图 1 差异基因的狭缝杂交方法分析
Fig.1 Analysis of differentially expressed genes by slot blotting
M:Bonemarrow;B:G-CSFmobilized peripheralblood

3 讨论

目前造血干细胞移植不但已成功用于白血病尧再生障碍性贫血尧自身免疫性等疾病的治疗袁且近

年来的研究发现造血干细胞还可分化为神经尧心肌等细胞袁造血干细胞的研究越来越被重视遥目前造血干细胞还没有明确尧特异性的标记袁但 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 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 β CAAT/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 β cyclin E1 β R2 及 Ki-67 等与 S 期 β 2-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 β dc28 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 MCM(mini-chromosomemaintenance) 蛋白在 DNA 复制中也扮演重要的角色而 E2F-1 通过激活 MCM 基因而促进细胞周期进行下去 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 β NF- κ B 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 β 髓过氧化物酶 β 中性粒细胞弹性蛋白酶 β 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如实验发现从基因表达方面看动员外周血 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. *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. *Blood*, 1998, 92(1):215-22.
- 3 Tanaka J, Mielcarek M, Torok-Storb B. Impaired induction of the CD28-responsive complexing granulocyte colony-stimulating factor mobilized CD4 T cell. *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. *Blood*, 1995, 86(6):1600-5.
- 5 Korbling M. Effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy subject. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5(2):209-14.
- 6 Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5(2):221-5.
- 7 Gyger M, Stuart RK, Pereault C. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor. *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 tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12):6025-30.
- 9 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 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. *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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17):8175-80.
- 12 Tomkinson AE, Mackey ZB. Structure and function of mammalian DNA ligases. *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. *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. *Oncogene*, 1999, 18(23):2299-309.