

抑制性消减杂交技术检测骨髓 CD34⁺ 细胞基因差异表达

陈 捷 袁淑芸 袁茹 澄 第一军医大学南方医院血液科 广州 510515

摘要 目的 检测比较骨髓和动员外周血 2 种来源不同的 CD34⁺ 细胞基因表达的差异。方法 从一健康供者分别获取骨髓和动员外周血分离出 CD34⁺ 细胞。利用抑制性消减杂交技术检测比较该 2 种来源不同的 CD34⁺ 细胞的基因表达差异。结果 在骨髓 CD34⁺ 细胞中共有 21 个基因高表达，主要涉及 2 类基因：与细胞周期 S 期、G₁ 期和 M 期转化相关的基因和 C/EBP 和 CAAT/ 增强子结合蛋白转录因子家族。结论 骨髓和外周血 CD34⁺ 细胞在基因表达上具有明显不同。大部分骨髓 CD34⁺ 细胞处于 S 期、G₁ 期和 M 期，提示骨髓 CD34⁺ 细胞比外周血 CD34⁺ 增殖活跃。

关键词 骨髓 CD34⁺ 细胞 移植 抑制性消减杂交

中图分类号 R551.3;R730.45 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2002)09-0823-03

Identification of differentially expressed genes in bone marrow CD34⁺ cells by suppression subtractive hybridization

CHEN Jie, ZHOU Shu-yun, FENG Ru

Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To understand the differential gene expression profiles between bone marrow cells and mobilized peripheral blood CD34⁺ cells. Methods Suppression subtractive hybridization (SSH) was employed to identify the genes differentially expressed in bone marrow and mobilized peripheral blood CD34⁺ cells obtained from a healthy donor. Results Twenty-one differentially expressed genes were identified that could be categorized into S-phase- or G₁-M cell cycle-related genes and CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) transcription factor family. The genes highly expressed in bone marrow CD34⁺ cells indicated low expression of their counterparts as SSH demands strict paired comparison between the 2 types of CD34⁺ cells of different origins. Conclusion CD34⁺ cells derived from bone marrow are featured by more active proliferation than are those from mobilized peripheral blood.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation; suppression subtractive hybridization; CD34⁺ cells

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，来源于骨髓的造血干细胞移植有很多优越性。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。^{1~3} 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。^{4~6} 抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是由 mRNA 差别显示技术发展而来的一种检测方法。^{7~9} 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 发生在 1 次反应中，可同时分离出上百个差异表达的基因。^{10~12}

收稿日期 2002-07-31

作者简介 陈捷 澄 1963 年生，男，福建福州人，2002 年毕业于第一军医大学，硕士，E-mail: chinsyou@263.net

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 20ml 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（日本中外制药产品）50 μg/d，共 5~6 d。动员后用 CS3000plus (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。¹³ 按照试剂盒说明书操作，调整细胞数至 108 个/ml，含 0.5% 血清白蛋白，0.5 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液，pH 7.2。300 次/min，再加入 Reagent A1 和 Reagent A2 各 100 μl，6~12 益，孵育 15 min。之后加 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，12 益，孵育 15 min。之后加 PBS 洗涤细胞，00 次/min，重悬细胞，最后用 1 ml PBS 缓冲液重悬细胞，过柱，最后用 1 ml PBS 缓冲液重悬细胞，磁场中过柱，最后用 1 ml PBS 缓冲液重悬细胞。

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MiniOligotexDirect 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。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TOP10F' E.coli表达青霉素G-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。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。

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。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-苗	+
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-苗	+
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。结果证实骨髓和外周血CD34⁺细胞中这21个基因表达存在着差异。

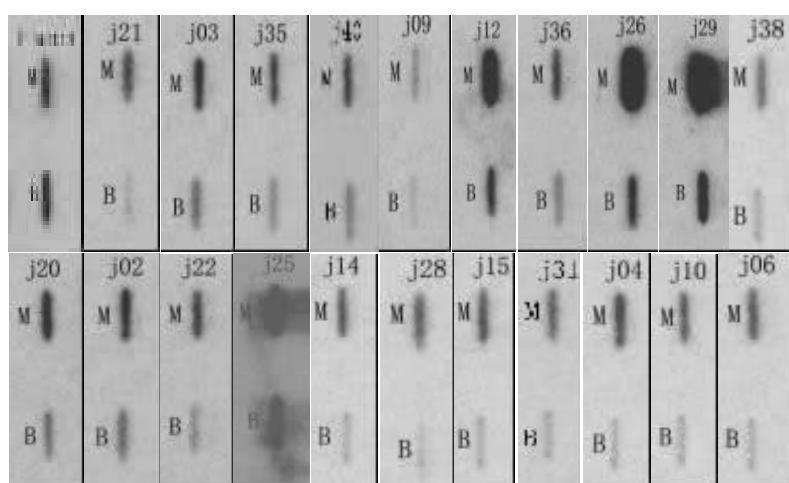


图1 差异基因的狭缝杂交方法分析

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地用于白血病、再生障碍性贫血、自身免疫性疾病等疾病的治疗而且近

年来研究发现造血干细胞还可分化为神经元和心肌等细胞。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。目前临幊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幊上开展。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。本分别有来自骨髓和脐血。¹ 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。由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 和 CAAT/ 增强子结合蛋白及转录因子家族。

与细胞周期和 DNA 合成相关的基因如 cyclin A 和 cyclin E1 及 Ki-67 等与 S 期和 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 和 dc28 及 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。² MCM(mini-chromosome maintenance) 蛋白在 DNA 复制中也扮演重要的角色。³ E2F-1 通过激活 MCM 基因而促进细胞周期进行下去。⁴ 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 和 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。⁵ 这也是为何动员外周血 CD34⁺ 细胞趋化因子表达过氧化酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、GRO 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不同。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。

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。

参考文献院

- 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. Non cycling 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 subjects. *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.