

慢性粒细胞白血病患者骨髓间质干细胞 TGF- β 1 和 SCF 表达变化及意义^{*}

罗 鸣, 陆益龙[△], 王 欢, 李 姣, 余先球, 薛红梅, 巴 荣, 朱 彦

(江苏大学附属医院血液科, 江苏镇江 212001)

【摘要】 目的 探讨慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)患者骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)体外干细胞因子(Stem cell factor, SCF)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor - β 1, TGF- β 1)基因表达变化及临床意义。**方法** 5 例慢性期 CML 患者为实验组, 5 例健康人为对照组, 取骨髓单个核细胞行 BMMSCs 体外培养, RT-PCR 法测定两组 BMMSCs 的 SCF、TGF- β 1 基因表达量, 并分析其相关性。**结果** 慢性期 CML 患者 BMMSCs 中 SCF 基因表达水平较对照组明显升高($P < 0.05$), 而 TGF- β 1 表达水平较对照组明显降低($P < 0.01$)。实验组内 SCF 与 TGF- β 1 表达量呈负相关($r = 0.948, P < 0.05$), 对照组两指标间无相关性。**结论** CML 患者 BMMSCs 的 SCF 高表达和 TGF- β 1 低表达有相互影响并对白血病细胞的增殖与凋亡发生影响, 对 CML 发病有促进作用。

【关键词】 慢性粒细胞白血病; 骨髓间质干细胞; 干细胞因子; 转化生长因子- β 1

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.001

中图分类号: R733.72

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)23-2561-02

Expression of SCF and TGF- β 1 in bone marrow mesenchymal stem cells derived from chronic myeloid leukemia LUO Ming, LU Yi-long[△], WANG Huan, LI Jiao, YU Xian-qiu, XUE Hong-mei, BA Rong, ZHU Yan. Department of Hematology, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of stem cell factor (SCF), transforming growth factor - β 1 (TGF- β 1) mRNA of the cultured bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) from chronic myeloid leukemia (CML) in myeloid crisis (MC), and to explore the relationship between the activity change of BMMSCs and pathogenesis of CML. **Methods** The experimental group included five CML patients with five healthy persons as the control. BMMSCs were cultured in vitro. The expression of SCF, TGF- β 1 mRNA of BMMSCs were measured by real-time PCR. **Results** The expression of SCF mRNA in BMMSCs from CML patients was higher ($P < 0.05$) and the expression of TGF- β 1 mRNA was lower in CML patients than in normal. The expression of SCF had nagtive correlation with the expression of TGF- β 1. **Conclusion** The abnormal express of cytokine such as SCF and TGF- β 1 in BMMSCs from CML patients leads to abnormal regulation function to hematopoietic system and affects the cell differentiation and proliferation and apoptosis, which may be closely related to the pathogenesis of CML.

【Key words】 CML; BMMSCs; SCF; TGF- β 1

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是临床常见获得性骨髓增殖性疾病之一, 是以中、晚幼粒细胞恶性增生为主要特征, 骨髓造血微环境对该类细胞的增殖有无影响目前研究不多。对骨髓造血微环境为主的骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)中干细胞因子(stem cell factor, SCF)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor - β 1, TGF- β 1)表达变化进行研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2006 年 12 月至 2007 年 8 月本院门诊及住院患者, 经 MICM 分型确诊 CML 慢性期患者为实验组, 共 5 例(男 3 例, 女 2 例), 中位年龄 53.6 岁; 5 例缺铁性贫血恢复者为健康对照组(男 3 例, 女 2 例), 中位年龄 45.7 岁。

1.2 标本处理 无菌抽取骨髓 4 mL, 肝素抗凝, 1:2 稀释后缓慢转入 1.077 g/mL Ficoll 细胞分离液上层进行密度梯度离心, 取中间有核细胞层。洗涤后按每个平方厘米 5×10^5 单个核细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 每瓶含 5 mL 完全 DMEM 培养液(完全 DMEM 培养液中含青、链霉素 100 U/mL, 100 mL/

L 胎牛血清、50 mL/L 马血清, 0.25 μ g/mL 两性霉素)。置 5% CO₂、饱和湿度、37 $^{\circ}$ C 培养箱培养。3 d 后换液, 去非贴壁细胞, 以后每 3 天换液 1 次。培养 10 d 左右, 贴壁细胞形成融合层, 用 0.25% 胰蛋白酶[用 1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)配制]消化, 按 1:2 的比例接种传代。取第 3 代 BMMSCs 为实验用。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 总 RNA 的提取、cDNA 的合成 当第 4 代细胞铺满整个培养瓶时[(细胞数大约为 $(5 \sim 7.5) \times 10^5$)]后, 加 Trizol (Invitrogen)裂解细胞, 经氯仿、异丙醇提取总 mRNA 并根据逆转录试剂盒操作说明按 20 μ L 体系合成 cDNA。RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 产品, 逆转录试剂盒为 TOYOBO 产品。

1.3.2 标准品制作 β -actin、SCF 及 TGF- β 1 扩增片段经切胶回收纯化后, 分别与 pDM18-T 质粒载体连接, 转化 DH5 α 感受态大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 扩菌, 菌液经聚合酶链反应(PCR)鉴定阳性质粒, 纯化提取质粒制成标准品。测定质粒浓度后,

^{*} 基金项目: 镇江市社会发展基金(2005048)。 [△] 陆益龙 E-mail: zjluy1@126.com。

按照公式 $\frac{C \times 10^9}{2(M+W) \times 324.5} \times 6.02 \times 10^{23}$ (copy/ μ L) 计算质粒数(M 为基因片段长度, W 为质粒长度), 按 $10^8 \sim 10^2$ 梯度稀释质粒, 定量 PCR 仪测定并绘制标准曲线。重复 3 次检测该标准品的线性范围和重复性。

1.3.3 引物设计及合成 应用 PRIMER 5.0 软件辅助设计引物, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物的序列见表 1。

表 1 β -actin、SCF、TGF- β 1 基因 PCR 引物系列

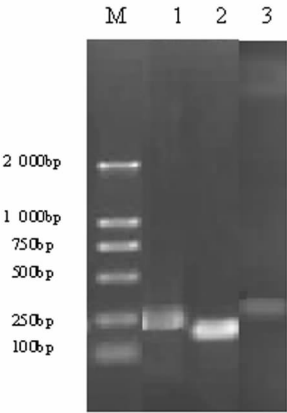
基因	引物序列 (5'-3')	产物长度
β -actin	Sense: CACGAACTACCTTCAACTCC	262 bp
	Anti-sense: CATACTCCTGCTTGCTGATC	
SCF	Sense: AAACGTGTGAGATGTGTGACACC	221 bp
	Anti-sense: GAACCAACAGTCGTCAACATCC	
TGF- β 1	Sense: GGTGGAAACCCACAACGAAATC	322 bp
	Anti-sense: GCTAAGGCGAAAGCCCTCAAT	

1.3.4 基因定量测定 反应体系为 20 μ L, 其中: Realtime Master Mix 10 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 引物各 0.4 μ L (10 pmol/ μ L), 用 ddH₂O 补足至 20 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 4 s, 56 $^{\circ}$ C 5 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s (共 40 循环); 70 $^{\circ}$ C 10 min; 融解曲线分析。为了避免引物二聚体的干扰, 使用 4 步法, β -actin 在 88 $^{\circ}$ C 读取荧光, SCF、TGF- β 1 在 82 $^{\circ}$ C 读取荧光。Real-time PCR 试剂盒为 TOYOBO 产品 (Rotor-gene3000 real-time cyler, Corbett Research)。根据标准曲线计算 SCF、TGF- β 1 基因表达量。

1.4 统计学方法 用 SPSS 13.0 统计软件行实验结果分析, SCF、TGF- β 1 基因表达相对量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。SCF、TGF- β 1 相关性通过线性相关分析检验。

2 结 果

2.1 β -actin、SCF 及 TGF- β 1 标准曲线构建 扩菌后取菌液通过 PCR 鉴定阳性质粒, 产物电泳显示清晰的阳性条带 (见图 1), 成功构建标准品。 β -actin、SCF 及 TGF- β 1 基因的标准曲线由荧光定量 PCR 附带软件 (Rotor-Gene vev4.06) 绘制, 标准曲线相关性较好, 相关系数 r 分别为 0.999、0.999、0.982。同时溶解曲线分析示 PCR 产物单一, 反应特异性较好。

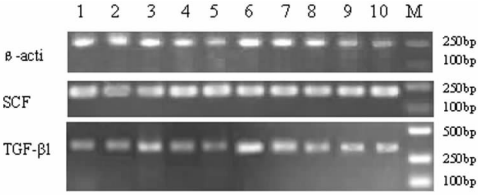


注: M 表示 Marker, 1 表示 β -actin; 2 表示 SCF; 3 表示 TGF- β 1。

图 1 质粒内 SCF、TGF- β 1 基因表达

2.2 β -actin、SCF 及 TGF- β 1 基因表达定量检测 两组标本经定量 PCR 扩增 3 个基因后以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳比较, 电泳结果显示实验组及对照组各标本均表达 β -actin、SCF、TGF- β 1 基因, 电泳条带清晰, 未见明显杂带 (见图 2)。根据标准曲线

获得, 实验组和对照组 SCF 拷贝数分别为: $(5.208 \pm 1.763) \times 10^6$, $(2.192 \pm 2.127) \times 10^5$, TGF- β 1 基因拷贝数分别为: $(5.934 \pm 0.915) \times 10^5$, $(3.678 \pm 2.646) \times 10^7$, 二者比较差异有统计学意义 (t 值分别为 2.441、3.977; P 分别小于 0.05、0.01)。



注: 1~5 实验组; 6~10 对照组; M 表示 Marker。

图 2 实验组、对照组 BMMSCs 中 SCF、TGF- β 1 基因表达

2.3 SCF 与 TGF- β 1 表达量相关分析 结果显示: 实验组内 SCF 与 TGF- β 1 表达量呈负相关 ($r = 0.948$, $P < 0.05$), 对照组两指标间无相关。

3 讨 论

CML 是造血系统恶性疾病, 以中晚幼粒细胞大量增殖为特征。其白血病干细胞具有质的异常, 多数具有 Ph1⁺ 染色体及 Bcr/Abl 融合基因。而造血微环境中 BMMSCs 是造血调控的主要组分之一, 通过与造血细胞直接接触和表达多种细胞因子, 实现对造血细胞增殖和分化的调节作用。

在 BMMSCs 表达的多种细胞因子中, SCF 可促进造血干细胞的增殖、分化以及存活^[1], 是造血正调控因子。有研究还发现, CML 祖细胞对 SCF 介导的细胞增殖作用具有较正常造血细胞更高的敏感性, 且 SCF 还可以协助 CD34⁺ 细胞逃避化疗药物引起的损害^[2]。对血管平滑肌细胞进行研究发现, SCF 在抗内皮细胞凋亡中起重要作用并提示 SCF 主要通过抑制 caspase-3 表达, 通过 Akt-Bcl-2 途径使 Bcl-2 表达增高而发挥抗凋亡作用^[3]。由此推论, CML 患者 BMMSCs 异常升高 SCF 必然会促进白血病细胞扩增、聚集, 同时 SCF 的抗细胞凋亡作用使白血病细胞凋亡减少。本实验发现 CML 患者 BMMSCs 的 SCF 异常高表达可能导致 CML 白血病细胞过度增殖参与 CML 发病。

在骨髓造血微环境骨内, 细胞因子间常具有多方面作用或其自身受多方面调节, TGF- β 1 能够明显的下调小鼠 IL-1、IL-3、G-CSF、GM-CSF、C-Kit、Flt3-L 以及 TPO 等细胞因子受体表达而实现造血负调控作用。有资料显示, 内源性 TGF- β 1 表达或激活方面的缺陷以及 TGF- β 1 受体或受体后水平缺陷都可使生长抑制作用消失而导致血细胞的恶性增殖^[4]; 有实验证实^[5], CML 患者来源的 BMMSCs 在加入有丝分裂原刺激后的 T 细胞可明显抑制 T 细胞的增殖与分化, 这种抑制作用完全依赖于 TGF- β 1 和 HGF (hepatocyte growth factor) 的作用。对长期化疗的急性淋巴细胞白血病患者骨髓细胞长期培养 (LTBMC) 研究也发现, 与正常骨髓相比, 混合培养上清液内 TGF- β 1 水平明显升高, 说明化疗可通过 TGF- β 1 水平的升高而下调骨髓基质细胞的功能^[6]; 以上均说明 TGF- β 1 与白血病的发病密切相关。本结果示 CML 患者 BMMSCs 体外 TGF- β 1 低表达会导致其造血负调控作用减弱, 从而加速了 CML 白血病细胞的大量增殖。

BMMSCs 是造血微环境实现造血调控的主要细胞, 常通过细胞因子及细胞因子间形成的网络实现调控作用, 本研究发现 CML 患者 BMMSCs 中 SCF 与 TGF- β 1 两者间表达水平的相关性正说明这一点。有研究发现, TGF- β 1 (下转第 2564 页)