

小鼠造血干细胞增殖和分化的分子生物学证据*

刘存仁** 贺福初 吴祖泽
(北京放射医学研究所 100850)

60年代初, Till 和 McCulloch^[1]建立的脾结节实验技术, 推动了造血干细胞的实验研究。在以往的研究中, 人们较多采用辐射诱发染色体畸变和逆转录病毒载体中的外源基因作为细胞遗传标志来追踪、观察造血干细胞的增殖与分化特性^[2-6], 但这类标志本身对细胞增殖和分化可能具有一定的影响。吴祖泽等^[7-9]首次报道采用天然的性染色体作为细胞遗传标志并结合 C 带染色技术, 深入系统地研究了脾结节生成细胞(CFC-S)的增殖与分化性能。最近, Lepault 等^[10]采用流式细胞仪通过分析淋巴细胞的特异表面抗原探讨了 CFC-S 分化为 T 和 B 细胞的性能。本文在原来工作的基础上, 选择 Y 染色体特异的性别决定基因(sex-determining region of the Y chromosome, Sry)作为新的细胞遗传标志, 采用聚合酶链反应(PCR)技术进一步探讨造血干细胞的增殖与分化特性, 以期对它的性能有更深入的认识。

材料与方 法

一、动物

LACA 纯系雌、雄小鼠, 体重为 18—22 克, 由本院动物繁殖中心提供。

二、试剂

PCR 系统为美国 Promega 公司生产, 常规试剂均为国产的分析纯或化学纯品。

三、照射条件

⁶⁰Co γ 射线, 剂量率为 113.2—136.4 k/min。

四、供体骨髓细胞悬液制备

用颈椎脱臼法处死三只供体小鼠, 每只小鼠取一根股骨, 用注射器吸取 RPMI 1640 培养液, 将骨髓细胞全部冲出, 最后通过 4 号针头制成单细胞悬液, 计数后调整细胞浓度待用。

五、脾结节(CFU-S)测试

按 Till 和 McCulloch^[1]的方法, 对 8.5 Gy 照射的雌性小鼠, 由尾静脉输注适量雄鼠骨髓细胞, 13 天后, 从脾脏上切取单个 CFU-S 进行测试。

六、骨髓细胞重建造血能力的测试

雌性小鼠经 8.5 Gy 急性全身照射后, 由尾静脉输注 2×10^6 个雄鼠骨髓有核细胞, 6 周以后, 测试存活小鼠的造血重建。

七、骨髓中 CFC-S 自我更新及重建造血能力的测试

第一受体雌性小鼠经 8.5 Gy 照射后, 由尾静脉输注适量的雄性小鼠骨髓细胞, 经体内生长 13 天后, 从第一受体脾脏上任意切取一个或 4—5 个 CFU-S, 用 0.81 ml RPMI 1640 培养液制成单细胞悬液, 再输注给经 9 Gy 照射的第二受体雌性小鼠, 经体内生长 13 天后, 测试 CFC-S 的自我更新能力或经 7—8 周以后, 测试存活小鼠的造血重建。

八、基因组 DNA 的制备

取受体小鼠脾脏、胸腺、淋巴结以及 CFU-S 放入有少量生理盐水的小平皿内, 用注射器芯轻轻挤压, 去除膜块, 然后经 4 号针头反复抽打, 制成单细胞悬液。骨髓细胞则按上述方法四制备。细胞经沉淀、洗涤后, 按照 John 等^[12]的方法提取细胞基因组 DNA。

九、引物设计

我们根据文献中报道的小鼠 Y 染色体特异的 Sry 核苷酸序列^[11]以及引物的设计要求合成了 Y₁、Y₂ 一对引物, 它们的核苷酸序列分别为 Y₁: 5'TAGAGAGCATGGAGGGCCAT 3', Y₂: 5'GTATGTGATGGCATGTGGGT 3'。同时我们采用编码肌形成蛋白(myogenin) 的一对引物^[13]略作改变后作为本文的内对照引物, 它们的核苷酸序列为 M₁: 5'TTACGTCCATCGTGGACAGCA 3' 和 M₂: 5'TGGGCTGG-

* 国家自然科学基金重点资助项目。

** 现在山东大学生物系(济南, 250100)。

GTGTTAGTCTTA 3', 分别对应于大鼠肌形成蛋白 cDNA 序列第 656—676 和 882—901 部位^[14]。

十、PCR 的操作程序、参数及扩增产物的检测

将 PCR 试剂按顺序依次加入到 0.5 ml PCR 专用离心管中, 混匀经短暂离心后即上 PCR 扩增仪进行扩增。扩增反应的温度及时间参数如下: 94°C 60 秒; 65°C 70 秒; 72°C 50 秒; 40—60 次循环。PCR 扩增完毕, 在上述离心管中加入一定体积的三氯甲烷—异戊醇(24:1)离心分相后, 取 10 μl 反应液经含有溴化乙锭的 2—3% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下可直接观察结果并照相。

结 果

一、正常雌、雄小鼠基因组 DNA 的 Sry PCR 检测

将 Y₁、Y₂ 和 M₁、M₂ 二对引物分别加入到含有雄鼠基因组 DNA 作扩增模板的反应体系中, 经 PCR 扩增后, 各产生一条特异区带, 经与标准分子量电泳带比较得知, Y₁、Y₂ 一对引物指导扩增的区带分子量约在 328 bp 以上, 与预期的 347 bp 基本相符, 是 Y 染色体特异顺序 Sry 基因扩增带。而 M₁、M₂ 一对引物所扩增的区带分子量约在 267 bp 以下, 与预期的 246 bp 也基本一致, 是内对照肌形成

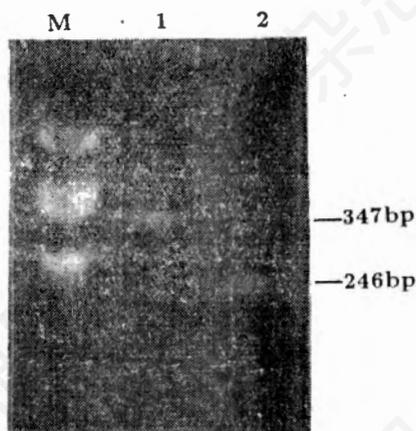


图 1 以 LACA 雄鼠基因组 DNA 作扩增模板, 用两对引物分别进行 PCR 的产物电泳图谱

M: pGEM-3 Zf(+)DNA Hae III,
1: 引物 Y₁、Y₂,
2: 引物 M₁、M₂

蛋白基因扩增带(图 1)。

在一个反应体系中同时加入上述二对引物, 若加入雄鼠来源的基因组 DNA 作扩增模板, 经 PCR 扩增后, 电泳图谱上可以观察到两条特异区带, 经与图 1 比较得知, 位置在前的区带为内对照肌形成蛋白基因扩增带, 位置在后的区带为 Y 染色体特异顺序 Sry 基因扩增带。当用雌鼠来源的基因组 DNA 时, 仅见到位置在前的一条特异区带, 即内对照肌形成蛋白基因扩增带, 而无 Sry 基因扩增带(图 2)。

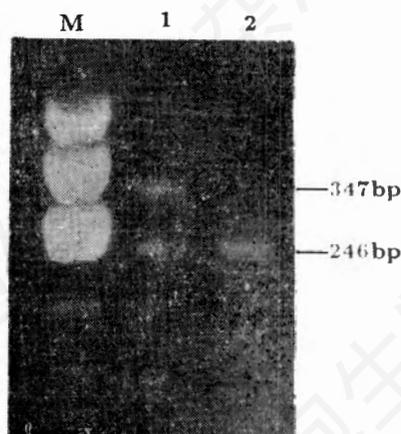


图 2 以不同性别小鼠基因组 DNA 作扩增模板, Y₁、Y₂ 和 M₁、M₂ 两对引物在同一反应体系中进行 PCR 的产物电泳图谱

M: 同图 1, 1: LACA 雄鼠, 2: LACA 雌鼠

二、骨髓 CFU-S 及其自我更新能力的 Sry PCR 测试

将一定数量的雄鼠骨髓细胞输注给经 γ 线照射的第一受体雌性小鼠, 体内生长 13 天后, 从脾脏上任意切取单个 CFU-S, Sry PCR 扩增结果显示, 所有 CFU-S 均为供体来源的 XY 细胞类型(图 3)。将上述脾脏上切取的单个 CFU-S 再输注给经 γ 线照射的第二受体雌性小鼠, 13 天后按同样方式测试脾脏上生成的 CFU-S, 结果仍为供体来源的 XY 细胞类型, 表明骨髓中 CFU-S 在其增殖分化过程中具有

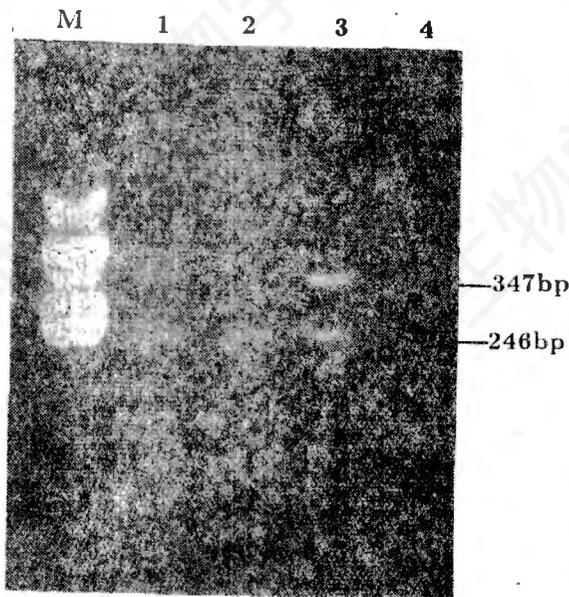


图3 以正常雌、雄小鼠和CFU-S来源的基因组DNA作扩增模板进行Sry PCR扩增的产物电泳图谱。

M: 同图1, 1: LACA雄鼠, 2: LACA雌鼠, 3: CFU-S 1, 4: CFU-S 2。

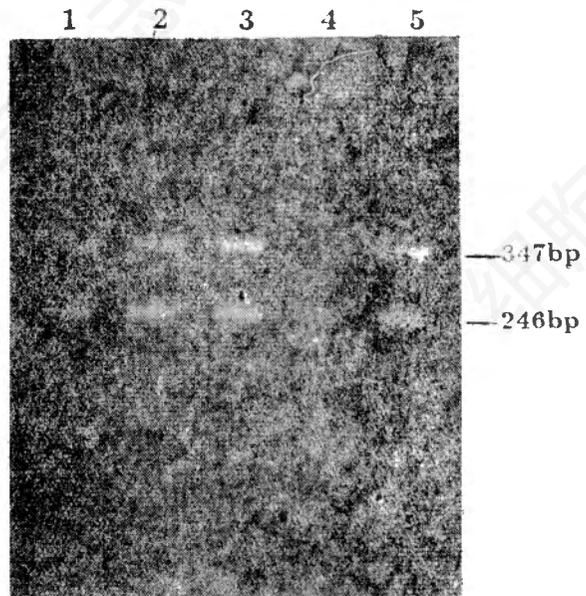


图4 以造血重建受体小鼠不同组织来源的基因组DNA作扩增模板进行Sry PCR扩增的产物电泳图谱。

1. 骨髓 2. 脾脏 3. 胸腺, 4. 肝脏 5. 淋巴结

自我更新能力。

三、骨髓细胞重建造血能力的Sry PCR测试

为了解骨髓细胞重建造血的能力,我们在移植骨髓后41天、47天、54天、80天和142天分别取存活小鼠的骨髓、脾脏、胸腺、淋巴结以及肝脏细胞基因组DNA进行Sry PCR扩增,结果表明,骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结中均具有供体来源的XY细胞,它们是骨髓细胞长期重建造血的结果,而肝中无供体来源的细胞存在。图4是一存活54天的造血重建小鼠其Sry PCR测试结果。

四、骨髓中CFU-S重建造血能力的Sry PCR测试

将单个或4—5个CFU-S注射给受体雌性小鼠发现,输注后30天的小鼠存活率分别为

60%(单个)和80%(4—5个),而对照小鼠仅为20%,注射4—5个CFU-S的小鼠其存活率高于注射单个CFU-S的小鼠;结果表明,输注CFU-S能显著提高小鼠的存活率。为了证明CFU-S的重建造血能力,我们测试了上述部分存活小鼠的骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结中细胞的来源(表1),Sry PCR扩增结果显示,上述组织中均有供体来源的XY细胞,表明骨髓中的CFU-S具有长期重建髓系和淋巴系造血的性能。

表1 CFU-S重建受体小鼠造血能力的Sry PCR测试结果

编号	移植后时间(天)	CFU-S注射剂量(个)	Sry PCR测试结果			
			骨髓	脾脏	胸腺	淋巴结
1	52	1	+	+	+	+
2	63	1	+	+	+	+
3	62	4—5	+	+	+	+
4	74	4—5	+	+	+	+

注:表中“+”示Sry PCR阳性。

讨 论

本文选择 Y 染色体特异的 Sry 基因^[11]作为新的细胞遗传标志,采用 PCR 技术通过扩增 Sry 基因部分序列来追踪、观察造血干细胞的增殖与分化特性。该方法具有简便、灵敏和特异等优点,它与以往报道中所采用的辐射诱发染色体畸变或逆转录病毒载体中的外源基因作细胞遗传标志进行的研究^[2-6]相比,避免了外界因素本身对细胞增殖分化可能带来的影响,因此实验结果更为准确。

造血干细胞是生成血细胞的原始细胞,它具有自我更新和多向分化特性。在造血干细胞的增殖和分化性能研究中,脾结节实验技术^[1]的建立起了重要的推动作用。采用辐射诱发染色体畸变或天然的性染色体作为细胞遗传标志,Becker 等^[4]和吴祖泽等^[7]分别证实了每个 CFU-S 的生成是起源于单一 CFU-S 增殖与分化的结果。我们将第一受体中形成的 CFU-S 再输注给第二受体小鼠,仍能观察到 CFU-S 的生成,Sry PCR 扩增结果表明,它们均为供体来源的 XY 细胞,可见 CFU-S 在其增殖分化过程中具有自我更新能力。应用单个 CFU-S 移植技术和染色体 C 带显色证明了 CFC-S 是一类生成血细胞的原始细胞,它不仅具有向髓系细胞分化的能力,同时具有向淋巴细胞分化的能力,因而是一类淋巴-髓系干细胞^[7]。最近,Lepault 等^[10]对 CFU-S 分化为 T 和 B 细胞的性能进行了深入的探讨,研究发现,在 75% 用单个 12 天 CFU-S 重建的小鼠中可检测到供体来源的胸腺细胞,而在所有 12 天 CFU-S 重建的小鼠中均产生 B 细胞,结果表明,绝大多数 12 天 CFU-S 在其增殖和分化过程中仍具有分化为 T 细胞和 B 细胞的性能。我们采用 Sry PCR 技术对骨髓细胞和骨髓中 CFU-S 的长期重建造血能力进行了测试,在存活小鼠的骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结中均具有供体来源的 XY 细胞分布,表明受体小鼠的造血重建是骨髓中的 CFU-S 具有自我更新和多向分化

的性能所致。

摘 要

本文采用 Y 染色体特异的性别决定基因 (Sry) 作为新的细胞遗传标志,通过 PCR 技术来追踪观察造血干细胞的增殖与分化性能。该方法具有简便、灵敏和特异等优点。雌性受体小鼠输注雄鼠骨髓细胞和 13 天脾结节 (CFU-S₁₃) 细胞后,Sry PCR 测试受体小鼠的 CFU-S 结果表明,它们均为供体来源的 XY 细胞。用 Sry PCR 测试骨髓细胞和骨髓中脾结节生成细胞 (CFU-S) 的长期重建造血能力,结果表明,在存活雌性小鼠的骨髓、脾脏、胸腺和淋巴结中均有供体来源的 XY 细胞分布。

关键词: 脾结节生成单位 造血干细胞
性别决定基因 聚合酶链式反应

参 考 文 献

- [1] Till, J. E. and McCulloch, E. A., 1961, *Radiat. Res.*, 14: 213.
- [2] Wu, A. M. et al., 1968, *J. Exp. Med.*, 127: 455.
- [3] Abramson, S. et al., 1977, *J. Exp. Med.*, 145: 1567.
- [4] Becker, A. J. et al., 1963, *Nature*, 197: 452.
- [5] Lemischka, I. R. et al., 1986, *Cell*, 45: 917.
- [6] Keller, G. et al., 1985, *Nature*, 318: 149.
- [7] 吴祖泽等, 1984, 中华血液学杂志, 5(2): 106.
- [8] 吴祖泽等, 1984, 解放军医学杂志, 9(5): 325.
- [9] Wu, Chu-tse et al., 1986, *Exp. Hematol.*, 14: 307.
- [10] Lepault, F. et al., 1993, *Blood*, 81: 950.
- [11] Gubbay, J. et al., 1990, *Nature*, 346: 245.
- [12] John, S. W. M. et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19: 408.
- [13] Koopman, P. et al., 1991, *Nature*, 351: 117.
- [14] Wright, W. E. et al., 1989, *Cell*, 56: 607.