文章编号:1000-5404(2005)06-0485-05

论著

c-myb对胚胎干细胞体外造血分化及定型的影响

陈洁平[1], Deborah Clarke[2], Constanze Bonifer[2] ([1]第三军医大学西南医院血液内科,重庆 400038; [2] Molecular Medicine Unit, St. James's University Hospital, University of Leeds, Leeds LS9 7TF, UK)

提 要: 目的 通过体外胚胎干细胞培养体系对ES细胞进行c-myb等位基因打靶,建立c-myb+/+及c-myb-/- ES细胞模型的基础上,探讨转录因子c-myb在造血定型和分化中的作用。**方法** 通过体外ES细胞去除LIF半固体介质EBs的造血分化体系,采用甲基纤维素克隆形成分析和real-time PCR观察c-myb+/+及c-myb-/- ES细胞,比较分析其不同分化过程及阶段中造血各系形成和相关基因表达变化。**结果** c-myb+/+及c-myb-/- ES胚胎体(EBs)大小及形态相似,c-myb+/+ES EBs形成显著多于c-myb-/-。c-myb+/+组CFU-E出现在第6天,高峰为第8天;c-myb-/-组也有相似的改变,但其CFU-E数目少于c-myb+/+。c-myb+/+组CFU-M高峰为第7天;c-myb-/-也有相似的改变,但其CFU-M数目高于c-myb+/+。c-myb+/+CFU-GM出现在第7天,高峰为第12天,而c-myb-/-未见CFU-GM形成。real-time PCR分析显示,c-myb-/-及c-myb+/+ β-globin, zeta-globin, Lys, C-fms基因表达无显著变化。**结论** 低水平的c-myb不影响祖细胞的扩增,但影响其终末分化。低水平的c-myb表达在造血定型中对红系的发育具有一定的影响,而对巨噬细胞的发育成熟无明显影响。c-myb的表达水平对造血分化相关基因的表达没有明显的影响。

关键词: c-myb;胚胎干细胞分化;造血定型
中图法分类号: R329.1; R329.24; R394.2 **文献标识码**: A

Roles of c-myb in haemopoietic differentiation and commitment of embryonic stem cells *in vitro*

CHEN Jie-ping[1], Deborah Clarke[2], Constanze Bonifer[2] ([1]Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]Molecular Medicine Unit, St. James's University Hospital, University of Leeds, Leeds LS9 7TF, UK)

Abstract: Objective The c-myb is an important transcription factor in early haemopoietic system development and differentiation. We wish to use ES cell culture system by gene target getting cell models of c-myb+/+ and c-myb-/- ES *in vitro* in order to examine the detailed roles of the transcription factor c-myb in haemopoietic commitment and differentiation. **Methods** Haemopoietic differentiation was initiated by seeding ES cells in methylcellulose medium in the absence of LIF. The embryoid bodies of c-myb+/+ and c-myb-/- ES were analyzed by methylcellulose colony assay and real-time PCR to compare the formation of each haemopoietic system on different differentiation stage and procedure and relative gene expression. **Results** The formation of embryoid bodies was similar for both c-myb+/+ and c-myb-/- ES cells with the exception that the size and frequency of EBs reduced in the case of the c-myb-/- cells. The number of embryoid bodies increased more markedly in c-myb+/+ than that in c-myb-/-. Erythroid progenitors (CFU-E) were first present in c-myb+/+ group at 6 d after *in vitro* differentiation, and their number reached the peak at 8 d. Similar kinetics were seen for the formation of CFU-Es in c-myb-/- group, but their number was lower than that in c-myb+/+ group, and the colonies were generally small. CFU-M were first detectable at 7 d, and the peak levels were present at 7 d in c-myb+/+ group. Similar kinetics were seen for the formation of CFU-M in c-myb-/- group, but their number was lower than that in the c-myb+/+ group. CFU-GM was first detectable at 7 d, and the peak levels were present at 12 d in c-myb+/+ group. CFU-GM was not detected in c-myb-/- group. Real-time PCR analysis showed that there was no change in the gene expressions of β-globin, zeta-globin, Lys, and C-fms in the two groups of c-myb+/+ and c-myb -/-. **Conclusion** Low levels of c-myb are suff-

作者简介:陈洁平(1962-),女,贵州省贵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤基因治疗及干细胞诱导分化方面的研究,发表论文40篇。电话:(023)68765196

收稿日期:2004-12-06;修回日期:2005-01-10

icient to allow progenitor expansion, but progression of progeniters towards terminal differentiation is significantly altered. Low levels of c-myb can influence erythropoiesis development, but precursor cells capable of differentiating into macrophages are present in haemopoietic commitment. The levels of c-myb can not change the gene expressions of β-globin, zeta-globin, Lys, and C-fms.

Key words: c-myb; ES cell differentiation; haemopoietic commitment

c-myb 作为一种重要的转录因子参与了造血系统生长和分化过程[1~4]。已有研究显示失活 c-myb 基因的纯合鼠有正常的卵黄囊造血,但不能发育胎肝的成年造血[5,6],表明 c-myb 表达水平与造血分化密切相关。一种低水平表达 c-myb 的 ES 细胞模型将有助于认识 c-myb 对造血定型的影响,对阐明 c-myb 在造血中的作用意义重大。本研究旨在对 ES 细胞 c-myb 等位基因打靶,建立 c-myb + / + 及 c-myb-/- ES 细胞模型的基础上,通过体外 ES 细胞去除 LIF 半固体介质 EBs 的造血分化体系,采用甲基纤维素克隆形成分析及 real-time PCR 等观察 c-myb + / + 及 c-myb-/- ES 细胞,比较分析其不同分化过程及阶段中造血各系形成和相关基因表达变化。了解 c-myb 功能及表达水平对造血定型的各阶段及各系分化的影响,为探索 c-myb 在诱导胚胎干细胞造血分化中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞生长

c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞(英国利兹大学 St. James's 医院临床科学研究所)生长于经丝裂霉素处理的 STO 纤维原细胞上,采用含有 LIF 的 DMEM-ES 培养基。每 2 ~ 3 d 传代。

1.2 c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞的体外造血分化

采用胰酶收获 ES 细胞,计数后重悬于小量的 IMDM-ES 培养基中,按 3×10^3/ml 的细胞数加入含甲基纤维素的 IVD (*in vitro* dierentiation)介质中,置于培养皿中 37 ℃培养,于不同时间点收获胚胎体(embryoid bodies, EBs)。

1.3 c-myb + / + 和 c-myb-/- EBs 的甲基纤维素克隆形成分析

c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞经 IVD 介质培养得到 EBs。于不同时间点:4、5、6、7、8、9、10、12、14 d 收集 EBs,PBS 洗涤后的 EBs 置于 0.2% 的胶原酶中,37 ℃孵化 40 min,使用 20 级针分离 EBs,按每毫升 CFU-混合介质加入 1×10^5 细胞,进行克隆形成分析。于不同时间点分别计算 CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-M。

1.4 Real-time PCR 检测 c-myb + / + 和 c-myb-/-ES 细胞诱导造血分化过程的相关基因表达

c-myb + / + 和 c-myb-/-ES 细胞经 IVD 介质培养得到 EBs。于不同时间点收集 EBs,PBS 洗涤,使用 Trizol 提取 EBs 的 RNA,反转录成 cDNA。Real-time PCR 检测 β-globin, zeta-globin, Lys, C-fms 等基因的表达。

2 结果

2.1 c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞生长

c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞在 STO 纤维原细胞上呈克隆样生长,多于 2 ~ 3 d ES 细胞克隆达 20 ~ 30 个细胞,每 2 ~ 3 d 须传代 1 次,细胞能保持未分化状态。见图 1。

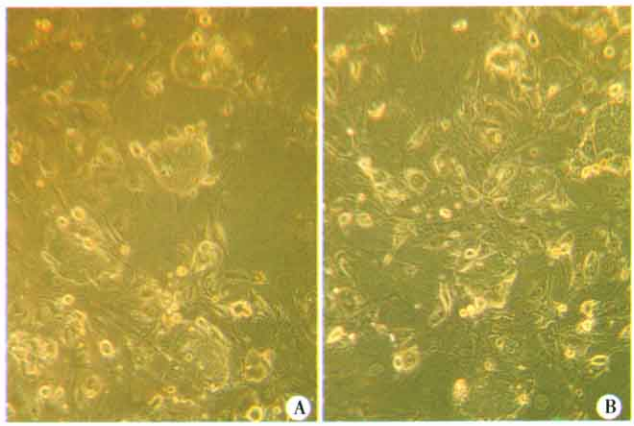


图 1 c-myb + / + (A)和 c-myb-/-(B)ES 细胞

Fig 1 c-myb + / + (A) and c-myb-/- (B) ES cells

2.2 c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞的体外造血分化

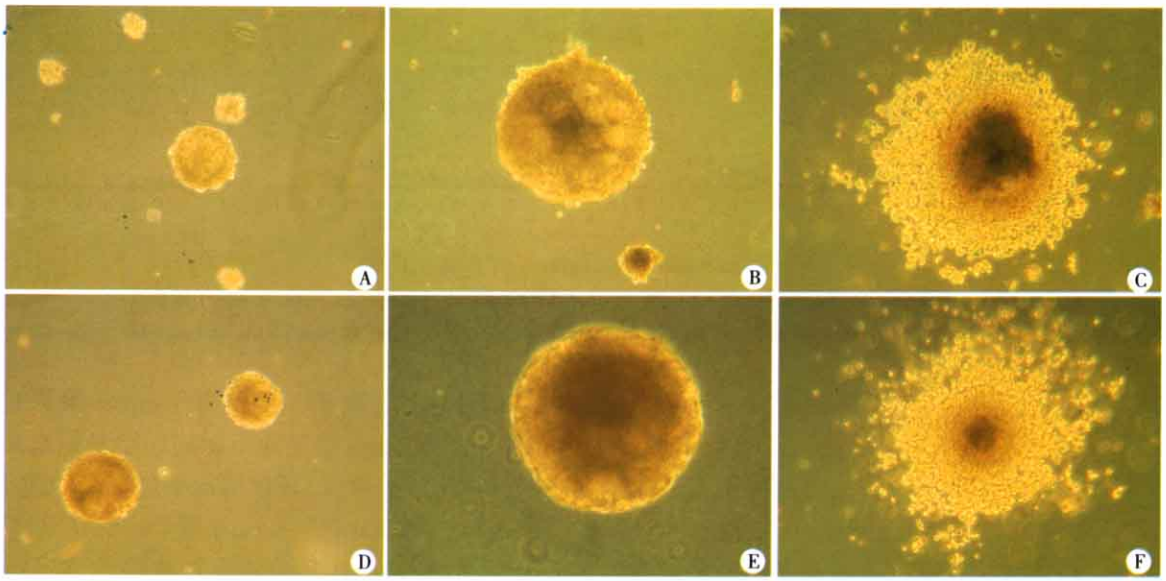
在 IVD 介质中,c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞 EBs 形成数目相似,分别为(890 ± 35)/皿和(720 ± 46)/皿。形成 EBs 体积 c-myb-/-组小于 c-myb + / + 组。c-myb + / + 和 c-myb-/-组 ES 细胞均能够产生终末分化的血细胞。造血分化的所有形态学水平均出现相似的改变,两组 ES 细胞均于 8 ~ 11 d 产生"血岛"及"单核细胞晕"等相似的细胞动力学变化。见图 2。

2.3 c-myb + / + 和 c-myb-/- EBs 克隆形成分析

收集 4 ~ 14 d EBs, 按每毫升 CFU-混合介质加入 1×10^5 细胞,进行克隆形成分析。在体外诱导分化中 c-myb + / + EBs 组 CFU-E 出现于 6 d,其高峰为 8 d。c-myb-/- EBs 组与 c-myb + / + EBs 组有相似的细胞动力学改变,但 c-myb + /loxp EBs 组 CFU-E 形成数目少于 c-myb + / + EBs 组,且形成克隆小而干。c-myb + / + EBs 组 CFU-M 出现于 7 d,其高峰为 7 d。c-myb-/- EBs 组与 c-myb + / + EBs 组有相似的细胞动力学改变,但 c-myb-/- EBs 组除 10 d 外,CFU-M 形成数目均高于 c-myb + / + EBs 组。见图 3、4。

2.4 Real-time PCR 检测 c-myb + / + 和 c-myb-/- ES 细胞诱导造血分化过程的相关基因表达

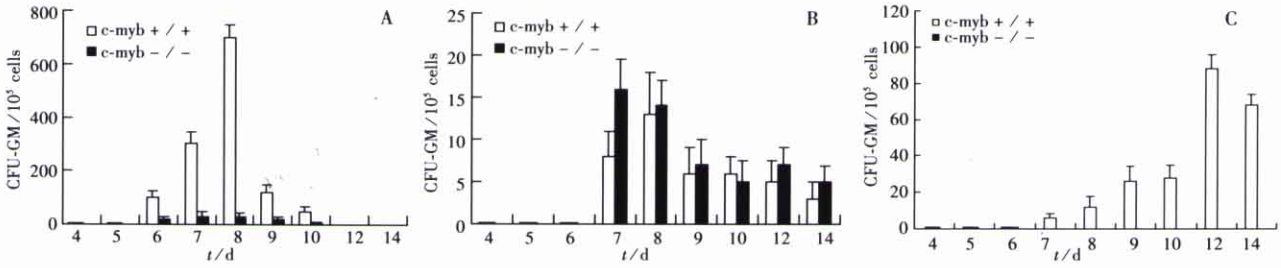
Real-time PCR 分析显示,c-myb + / + 和 c-myb-/- EBs β-globin, zeta-globin, Lys, C-fms 基因表达水平无明显差别,见图 5。



A：c-myb + / + EBs 4 d；B：c-myb + / + EBs 7 d；C：c-myb + / + EBs 13 d；D：c-myb-/- EBs 4 d；E：c-myb-/- EBs 7 d；F：c-myb-/- EBs 13 d

图 2　c-myb + / + EBs 和 c-myb-/- EBs 第 13 天可见“血岛”及“单核细胞晕”

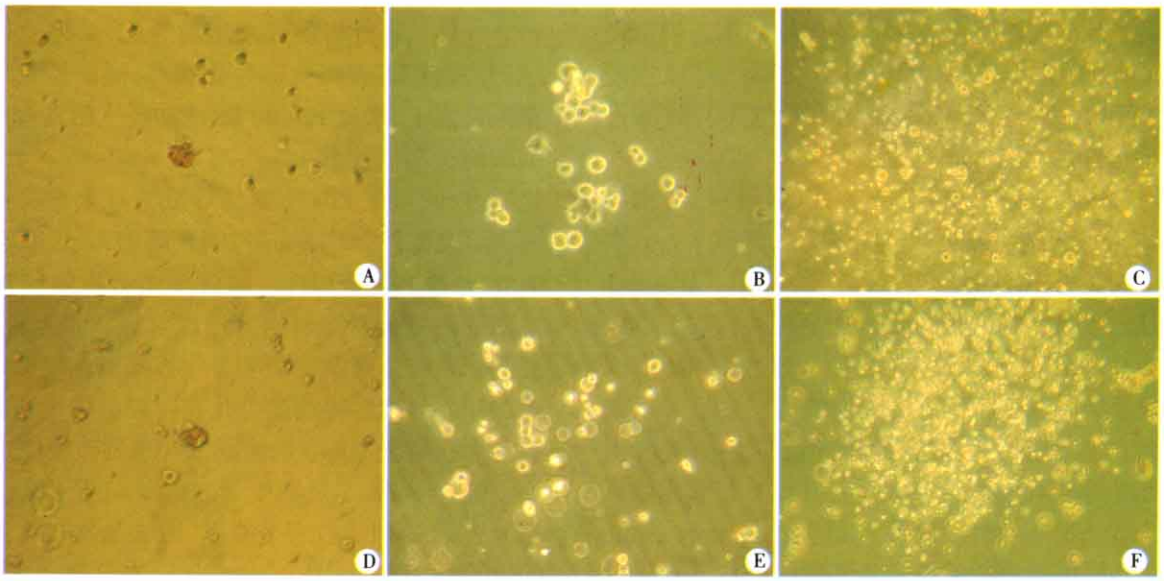
Fig 2　Embryoid bodies of both c-myb + / + and c-myb-/-: Blood islands' and a halo of monocytic cells could be seen at 13 d



A：CFU-E；B：CFU-M；C：CFU-GM

图 3　c-myb + / + 和 c-myb-/- EBs 克隆形成分析

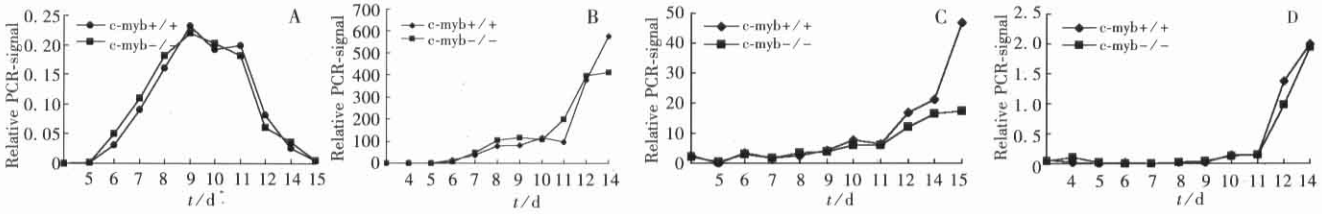
Fig 3　Colony assay in c-myb + / + and c-myb-/- embryoid bodies



A：c-myb + / + EBs CFU-E；B：c-myb + / + EBs CFU-M；C：c-myb + / + EBs CFU-GM；D：c-myb-/- EBs CFU-E；E：c-myb-/- EBs CFU-M；F：c-myb-/- EBs CFU-GM

图 4　c-myb + / + EBs 和 c-myb-/- EBs 克隆形成

Fig 4　Colony assay in c-myb + / + and c-myb-/- embryoid bodies



A: zata-globin; B: beta-globin; C: C-fms; D: Lys

图5 Real-time PCR 分析 c-myb+/+ 和 c-myb-/- EBs β-globin, zeta-globin, Lys, C-fms 基因表达

Fig 5 Real-time PCR analysis of gene expressions of β-globin, zeta-globin, Lys, and C-fms in c-myb+/+ and c-myb-/- embryoid bodies

3 讨论

研究显示失活 c-myb 基因的纯合鼠有正常的卵黄囊造血,但因不能发育成胎儿肝脏的成年造血而导致胚胎在妊娠 15 d 死亡。这是 c-myb 参与造血的最有力证据,表明 c-myb 表达水平与造血分化密切相关[5,6]。然而,在纷繁复杂的造血系统分化过程中,c-myb 怎样参与,其表达水平的变化对于整个造血定型将发生什么样的影响等,是目前国内外普遍关注的难点和热点问题。ES 细胞作为研究造血分化的理想模型为探讨单个转录因子在造血中的作用提供了理想的平台,通过建立 ES 细胞模型即 c-myb-/-与 c-myb+/+ 野生型 ES 细胞进行体外诱导分化及分化相关基因转录水平变化的比较研究,对于阐明 c-myb 在造血分化中的角色,乃至揭示整个造血系统中生长和分化的相关机制均具有十分重要的意义。本研究使用的是去除白血病抑制因子(LIF)的半固体介质胚胎体(EBs)形成实验。利用这一系统可以较全面地研究单个转录因子 c-myb 在造血定型及分化巨噬细胞系中的详细作用。利用野生型及 c-myb 敲除鼠 ES 细胞体外分化系统可以方便地分析 c-myb 在调节 ES 细胞分化中的作用与时间进程,有助于阐明 c-myb 的作用机制。

运用 ES 细胞体外诱导分化系统,通过对 ES 细胞纯合 c-myb-/-及野生 c-myb+/+ 的研究,观察 c-myc 在造血定型中的作用。我们研究发现 c-myb-/-及 c-myb+/+ 组 ES 细胞具有相同的 EBs 产生能力,两组 CFU-E 及 CFU-M 均分别出现于 6 d 及 7 d,而 CFU-GM 形成仅见于野生型 c-myb+/+ 组。我们的研究显示了以前并不清楚的这种 c-myb 缺乏引起的改变。虽然两组 CFU-E 出现的时间相似,但 c-myb-/-组 CFU-E 形成数目显著低于 c-myb+/+ 组。继往的研究已经显示 c-myb 缺乏引起胎肝的造血缺陷而导致胚胎的死亡[5]。相应的解释是胚胎的原始造血在 c-myb 缺乏时不受影响,而成年造血受到影响,因为原始的有核红细胞依旧存在。相比两组 CFU-M 形成数目极其相似。c-myb+/+ 组 CFU-GM 出现于 7 ~ 14 d,c-myb-/-组未出现 CFU-GM。表明 c-myb 缺乏并不影响胚胎早期造血,而在造血分化的成熟阶段,其作用却举足轻重,可能决定着造血系统的定性分化。Sumner 等[6]的研究也显示尽管 c-myb-/-产生的造血细胞是非常有限的,除原始红细胞外,在 c-myb-/-胚胎肝脏中出现仅有的成熟细胞是巨核细胞和巨噬细胞。Allen 等[7]在 c-myb-/-ES 细胞和 rag-/-宿主胚泡之间的嵌合体成年胸腺中鉴定出少量非常不成熟的 c-myb-/-胸腺细胞。这些研究显示成年淋巴及髓系的造血定型受到不同程度的影响。目前已经能够区别原始及终末巨噬细胞祖细胞[8]。通常认为原始巨噬细胞的发育来源于非系的前体细胞,而以后在发育过程中出现的巨噬细胞则来源于多潜能祖细胞。目前在我们的体外诱导分化中尚不能区别 c-myb 独立的 CFU-Ms 是原始的、终末的或是混合的。但可以看到 c-myb 缺乏未影响 CFU-M 的形成,而 CFU-GM 的形成则受到显著的抑制,与文献[9]报道一致。

在动力学分析中,使用在 c-myb-/-鼠 ES 细胞体外诱导分化系统分析巨噬细胞的分化,结果发现在去除 LIF 并保持 ES 细胞的非分化状态,同时加入特殊的造血生长因子,来自 EBs 的 ES 成功产生出含有成熟造血细胞的血岛。比较 c-myb-/- 和 c-myb+/+ ES 细胞分化能力,证实在 EBs 中血岛形成的频率没有改变。进一步研究体外分化 c-myb-/- ES 细胞,通过联合克隆形成分析结果发现 $CD34^+$ 的成年多系祖细胞被阻断在早期阶段并且不能增生及形成克隆。相反地,胚胎造血的非系前体细胞定型和分化被抑制在巨噬细胞和红系之间。早期巨噬细胞分化和巨噬前体细胞的克隆形成能力在缺乏 c-myb 的情况下并不发生改变。

纯合 c-myb-/-及野生 c-myb+/+ 组 EBs 红系相关基因表达相似。红系相关基因 β-globin 和 zeta-globin 的表达在 c-myb-/-及 c-myb+/+ 组之间无明显差别。两组 β-globin 表达开始于 6 d,高峰为 14 d,zeta-globin 表达开始于 6 d,高峰为 9 d,显然红系相关基因的表达高峰滞后于 CFU-E。原始的红系细胞能表达初始的和

成年的球蛋白[10]，因此，我们的两组红系相关基因表达结果相似并不表示 c-myb-/-的红系定向造血能够发生，而这些结果也表明 EBs 前体细胞造血定型多数被阻断，少数产生终末分化。c-myb-/-及 c-myb+/+ 组之间巨噬细胞相关标志基因 c-fms 和 lysozyme 的 RNA 表达结果显示相似，这与 CFU-M 出现的结果一致，表明 EBs 的分化过程好像从祖细胞定型到终末分化，c-fms 和 lysozyme 的表达水平逐渐增加。说明巨噬细胞是一个相当稳定的群体，一旦分化他们能在培养条件下存活几周。

通过比较 c-myb+/+ ES 和 c-myb-/-ES 在造血分化方面的作用以及该过程中造血相关因子的改变，探讨 c-myb 功能对造血定型的各阶段及各系发育的影响，阐明了 c-myb 在这一过程中所起的关键性作用，即低水平的 c-myb 不影响祖细胞的扩增，但影响其终末分化。低水平的 c-myb 表达在造血定型中对红系的发育具有一定的影响，而对巨噬细胞的发育成熟无明显影响。c-myb 的表达水平对造血分化相关基因的表达没有明显的影响。

参考文献：

[1] Karafiat V, Dvorakova M, Pajer P, *et al*. The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors[J]. Blood, 2001, 98(13): 3668-3676.

[2] Lieu Y K, Kumar A, Pajerowski A G, *et al*. Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(41): 14853-14858.

[3] Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells[J]. Int Rev Immunol, 2001, 20(1): 83-105.

[4] Bjerrgaard M D, Jurlander J, Klausen P, *et al*. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow[J]. Blood, 2003, 101(11): 4322-4332.

[5] Mucenski M L, McLain K, Kier A B, *et al*, A functional c-myb gene is requied for normal murine fetal hepatic hematopoiesis[J]. Cell, 1991, 65(4): 677-689.

[6] Sumner R, Crawford A, Mucenski M, *et al*. Initiation of adult myelopiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor[J]. Oncogene, 2000, 19(30): 3335-3342.

[7] Allen R D 3rd, Bender T P, Siu G. c-Myb is essential for early T cell development[J]. Genes Dev, 1999, 13(9): 1073-1078.

[8] Faust N, Huber M C, Sippel A E, *et al*. Different macrophage populations develop from embryonic/fetal and adult hematopoietic tissues[J]. Exp Hematol, 1997, 25(5): 432-444.

[9] Kumar A, Lee C M, Reddy E P. c-Myc is essential but not sufficient for c-Myb-mediated block of granulocytic differentiation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11480-11488.

[10] Trimborn T, Gribnau J, Grosveld F, *et al*. Mechanisms of developmental control of transcription in the murine alpha- and beta-globin loci[J]. Genes Dev, 1999, 13(1): 112-124.

（编辑　陈聪连）

（上接 484 页）

旁横纹肌肉瘤好发于年轻人和儿童。横纹肌肉瘤有 2 个发病年龄高峰，即 2～6 岁和 15～19 岁。约 70% 的病例在 10 岁以前发病，而第 2 个高峰主要在 15～19 岁。本例患儿发病年龄为 15 岁，正是该病发生的第 2 个高峰期。患儿发病较为隐秘，病情发展快。儿童横纹肌肉瘤是恶性程度极高的软组织肿瘤，易复发和转移，病死率高[2]。横纹肌肉瘤以淋巴结转移为主，本例患儿有腹股沟淋巴结转移，其胸椎破坏造成脊髓压迫有可能是睾旁横纹肌肉瘤转移造成，也可能是胸椎本身发生横纹肌肉瘤造成[3]。但同时有两个部位发生横纹肌肉瘤的可能性小，分析是睾旁横纹肌肉瘤转移可能性大。横纹肌肉瘤有 4 种病理类型，分别为胚胎型、小泡型、多泡型、混合型，绝大多数睾旁横纹肌肉瘤为胚胎型。免疫组化方法的应用，使横纹肌肉瘤的诊断更准确、敏感[4]。目前常用的 6 种免疫组织化学标志物——波纹蛋白（vimentin，Vim）、结蛋白（desmin，Des）、肌红蛋白（myoglobin，MG）、肌球蛋白（myosin，MS）、平滑肌肌动蛋白（smooth-muscle actin，SMA）、肌节肌动蛋白（sarcomeric actin，Sr-A）应用于横纹肌肉瘤（RMS）诊断中。6 种标志物在横纹肌肉瘤中的阳性率由高到低依次为 Vim、MG、MS、Des、Sr-A；特异度由高到低为 Sr-A、Des、SMA、MG、Vim；实验有效率由高到低是 Des、MG、Sr-A、SMA、Vim。Vim 和 MG 对横纹肌肉瘤的灵敏度最高，但二者的特异性均较差；而特异性最佳的 Sr-A 和 Des 在横纹肌肉瘤中表达的阳性率却不高。因此，对分化较差的横纹肌肉瘤必须采用多种抗体进行标记，建议优先联合使用 Des、MG 和 Sr-A[5]。本病例就是通过免疫组化检查明确诊断为胚胎性横纹肌肉瘤。

关键词：横纹肌肉瘤；免疫组化

中图法分类号：R738.7　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 夏和顺，夏克敏. 睾旁横纹肌肉瘤（7 例临床病理与超微结构研究）[J]. 中华泌尿外科杂志，1990，11(2)：112.

[2] 孔志强. 儿童横纹肌肉瘤的早期诊治与预后[J]. 国际医药卫生导报，C 版医学学术，2001(5)：55.

[3] 王　迅，刘寿坤，毛瑛飞，等. 原发胸椎横纹肌肉瘤 1 例[J]. 临床骨科杂志，2002，5(4)：287-288.

[4] Tsokos M. The role of immunocytochemistry in the diagnosis of rhabdomyosarcoma[J]. Arch Pathol Lad Med, 1986, 110(4): 776.

[5] 信明军，施诚仁，张忠德. 儿童横纹肌肉瘤免疫组织化学诊断评估[J]. 中华小儿外科杂志，2001，22(3)：141-143.

（编辑　汪勤俭）