文章编号:1000-5404(2006)14-1461-03

论著

白血病原代骨髓基质细胞诱导Jurkat细胞基因差异表达研究

李忠俊[1],陈幸华[2] (第三军医大学新桥医院:[1]输血科,[2]血液科,重庆 400037)

提 要:目的 研究白血病骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)诱导Jurkat细胞相关基因表达的变化。**方法** 采用Percoll体外分离正常人、初治急性白血病患者BMSCs;采用抑制性消减杂交技术建立白血病BMSCs诱导Jurkat细胞差异表达基因的cDNA文库;并对差异表达的基因进行初步鉴定与分析。**结果** 成功地建立了白血病BMSCs诱导的Jurkat细胞上调和下调差异表达基因的cDNA文库;初步筛选克隆到30个上调差异表达基因和22个下调差异表达基因cDNA片段;这些基因功能主要与细胞周期调控、细胞凋亡、细胞能量代谢有关。**结论** 白血病BMSCs能诱导Jurkat细胞基因发生差异表达。

关键词: 骨髓基质细胞;基因克隆;抑制消减杂交
中图法分类号: R394-33;R394.2;R733.7 **文献标识码:** A

Screening differentially expressed genes in human leukemia cell line Jurkat induced by bone marrow stromal cells from leukemia patients

LI Zhong-jun[1], CHEN Xing-hua[2] ([1]Department of Blood Transfusion, [2]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To screen and analyze the differentially expressed genes of Jurkat cells cocultured with bone marrow stromal cells(BMSCs) from leukemia patients. **Methods** Suppression subtractive hybridization (SSH) was employed to establish subtracted cDNA library of differentially expressed genes in Jurkat cells cocultured with BMSCs from leukemia patients *in vitro*. The cDNA fragments were sequenced and analyzed. **Results** The differentially expressed gene cDNA library of Jurkat cells cocultured with BMSCs from leukemia patients *in vitro* was developed by SSH. Primary screening was done by reverse northern hybridization. Thirty up-regulated and 22 down-regulated cDNA fragments were isolated and sequenced, and sequence homology was performed by BLAST in GenBank. These genes were related to cell cycle regulation, cellular apoptosis and energy metabolism. The information of differentially expressed genes in Jurkat cells implied that their secretion function, cell cycle and apoptosis were affected by BMSCs from leukemia patients. **Conclusion** BMSCs from leukemia patients might influence gene expression of Jurkat cells. The differentially expressed genes might be significantly associated with the protection of BMSCs from leukemia patients on Jurkat cells during Daunorubicin exposure.

Key words: bone marrow stromal cells; gene cloning; suppression subtractive hybrydization

骨髓造血微环境在机体造血发育过程中具有十分重要的作用,其主要成员是骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)[1]。其与白血病细胞的生存、分化、增殖、凋亡也密切相关[2]。有关正常BMSCs和已建系基质细胞株的相关研究显示,BMSCs能保护白血病细胞、抑制化疗药物诱导白血病细胞凋亡,这种保护作用有赖于两种细胞直接接触和细胞因子网络的形成[3]。但正常BMSCs、基质细胞株不能真实地模拟白血病患者骨髓造血微环境功能,因为白血病患者在发生造血实质细胞恶性改变的同时,BMSCs结构、功能也有相应改变[4]。结构和功能异常的白血病BMSCs对白血病细胞的影响如何?目前尚缺乏系统深入研究。本研究旨在筛选BMSCs共培养体系中Jurkat

基金项目: 第三军医大学创新基金资助项目(2004D110)
Supported by the Research Foundation for Innovation of Third Military Medical University (2004D110)
作者简介: 李忠俊(1974-),男,湖南省隆回县人,博士,主治医师,讲师,主要从事骨髓微环境与残留白血病、临床输血相关方面的研究。电话:(023)68755319
通讯作者: 陈幸华,电话:(023)68755609
收稿日期: 2005-08-21;**修回日期:** 2005-11-09

细胞的差异表达基因。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含 M-MLV RNase H⁻ 点突变逆转录酶、LA *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司；X-Gal、IPTG 载体购自上海生工生物技术公司；宿主菌 DH5α：自制；载体 PMD18-T 购自 TaKaRa 公司；RNA 酶抑制剂（RNasin）为 Promega 公司产品；高纯度 PCR 产物提纯试剂盒购自上海博亚生物技术公司；抑制性消减杂交试剂盒：Clonetech 公司产品；Northern blot 试剂盒：Pierce 公司产品。

1.2 细胞

人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞购自美国典型培养物保存中心（American type culture collection，ATCC）。BMSCs：人急性淋巴细胞白血病患者骨髓原代分离培养。

1.3 BMSCs 分离培养及其与 Jurkat 细胞体外共培养

具体方法参考文献[5]。Jurkat 细胞悬浮培养于含 10% FCS、90% RPMI1640 培养基中，37 ℃ 5% CO_2 饱和湿度条件下悬浮培养[5]。

1.4 原代白血病 BMSCs 诱导 Jurkat 细胞差异表达基因筛选

采用抑制性消减杂交方法筛选，采用细胞总 RNA 合成 cDNA 文库，具体操作参见试剂盒说明书。

1.5 反向 Northern blot 验证筛选片段

具体操作参见试剂盒说明书。

1.6 序列测定

取所冻存菌液 500 μl，于 37 ℃复苏 30 min，直接送上海生工公司测序。测得的序列输入计算机，通过 Internet 进入 GenBank 基因序列数据库，利用 BLAST 程序对所有序列进行同源性比较。

2 结果

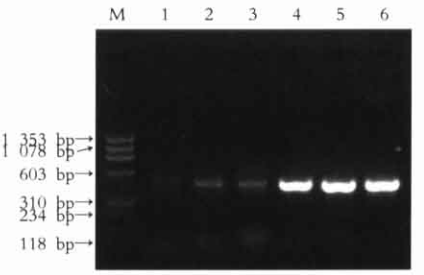
2.1 采用 Percoll 分离骨髓单个核细胞，贴壁培养 BMSCs

细胞贴壁培养 24 h 后倒置显微镜下观察见：部分细胞贴壁生长，细胞呈梭形、圆形、不规则型等形态特征，其间残留部分造血实质细胞。继续培养 BMSCs 集落增多，达到 80% 局部或全部融合状态时以 0.25% 胰酶 37 ℃消化传代培养。经 ^{60}Co 照射后与 Jurkat 细胞共培养进行实验。

2.2 抑制性消减杂交

本实验中合成的双链 cDNA 文库长度为 0.2～5 kb，其中在 900 bp 有一较亮条带，可能代表 Jurkat 细胞中表达较丰富的基因。经 *Rsa* Ⅰ酶切后，cDNA 长度明显缩短，条带前移。

2 次抑制性消减后，有 2 个验证实验可观察消减效率：一是通过 PCR 扩增消减前后的看家基因 G3PDH，观察其量的改变；二是观察第 2 次抑制性 PCR 扩增产物的异同也可初步了解消减效率。用 G3PDH 基因验证的结果表明，以未进行消减杂交的第 2 次 PCR 产物为模板扩增 23 个循环即可观察到产物条带，而已消减杂交后的第 2 次 PCR 产物为模板则需扩增 28 个循环方可观察到产物条带，且条带亮度较弱，说明通过抑制性消减杂交后，悬浮培养组和白血病 BMSCs 共培养组 Jurkat 细胞中共同表达的基因在第 2 次 PCR 产物中已明显减少（图 1）。



M：DNA 标准；1，4：23 个循环；2，5：28 个循环；3，6：33 个循环

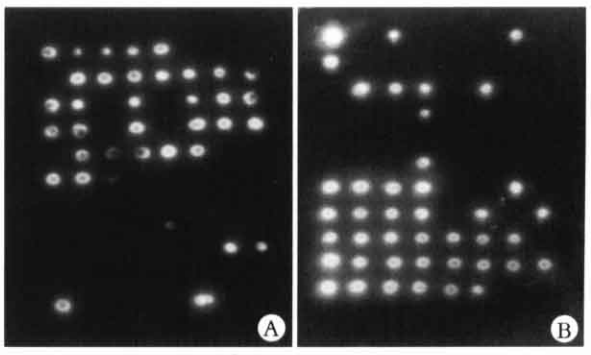
图 1 G3PDH 杂交效率分析

正向和反向消减杂交产物的第 2 次 PCR 产物与 PMD18-T 载体连接后，转化 DH5α，每 50 μl 菌液涂布的平皿上约有 100 个克隆菌落中生长，99% 的菌斑为白色。质粒自连对照的 2 个平皿均未见白色菌落，表明转化效率较高。

挑选正向和反向消减杂交文库保存菌液分别 43、40 管，PCR 扩增检测插入效率和插入片段的长度，凝胶电泳显示均有插入片段，片段长度在 100～600 bp（图 1），表明消减文库构建成功。

2.3 反向 Northern 杂交

反向 Northern 杂交结果（图 2）显示，来自于正向消减文库的 43 个 cDNA 克隆中有 30 个 cDNA 克隆与实验组 cDNA 杂交时信号强，但与对照组 cDNA 杂交时无信号或信号明显减弱，它们均可能为共培养后上调表达基因片段。来自反向消减杂交文库的 40 个 cDNA 克隆，有 22 个 cDNA 克隆与实验组 cDNA 杂交时无信号或信号较弱，但与对照组 cDNA 杂交时信号强，他们可能是共培养后下调表达的基因片段。



A：正向；B：反向

图 2 正向和反向杂交文库的筛选

2.4 测序结果和同源性比较

将反向 Northern 杂交证实为真阳性差异表达的 30 个上调表达克隆和 22 个下调表达克隆送上海博亚生物公司测序。

测得的序列通过 Internet 利用 BLAST 软件与 GenBank 基因序列数据库中的序列进行同源性比较。初步筛选和分析了 30 个上调表达克隆和 22 个下调表达克隆。上调表达克隆中，功能上较肯定的基因有：组蛋白（histone 1，H2a）、细胞色素 C 氧化酶 V 亚基（cytochrome c oxidase subunit Vb，COX5B）、CRIF1（CR6 interacting factor 1）、半乳糖凝集素-1（Galectin-1）、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位 1（NADH dehydrogenase 1）、核糖体蛋白大亚基 18a（Ribosomal protein L18a）；下调表达克隆中，功能上较肯定的基因有核糖体蛋白小亚基 11（Ribosomal protein S11）。

3　讨论

我们前期实验研究发现，正常 BMSCs 和白血病 BMSCs 均能保护 Jurkat 细胞逃避柔红霉素（daunorubicin，DNR）的杀伤作用，且白血病 BMSCs 保护效应强于正常 BMSCs。实验结果显示，BMSCs 的这种保护效应可能与诱导 Jurkat 细胞出现 G_0/G_1 期阻滞有关[5,6]。但白血病细胞与 BMSCs 共培养体系中两者相互作用共刺激后怎样发挥抑制凋亡的作用？共培养后诱导了哪些细胞因子表达异常涉及凋亡抑制？共培养后白血病细胞表达细胞因子变化情况以及如何在降低凋亡发生过程中发挥作用？这些情况目前少见系统研究报道，有待进一步深入研究。

本研究应用抑制消减杂交方法通过正向和反向消减杂交，成功地分离到白血病 BMSCs 诱导 Jurkat 细胞的一些差异表达基因的 cDNA 片段，建立了其正向和反向基因差异表达的 cDNA 文库。初步筛选和分析了 30 个上调表达克隆和 22 个下调表达克隆。上调表达克隆中，功能上较肯定的基因有：组蛋白、细胞色素 C 氧化酶 V 亚基、CRIF1、半乳糖凝集素-1、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位 1、核糖体蛋白大亚基 18a；下调表达克隆中，功能上较肯定的基因有核糖体蛋白小亚基 11。这些差异表达基因的功能主要涉及以下 3 个方面：①与细胞周期调控相关；②与细胞凋亡相关；③与胞内能量代谢障碍相关。

在差异表达基因文库中，与细胞周期调控相关的基因包括 CRIF1、Galectin1 基因。Park 等[7]应用酵母双杂交技术筛选 CR6/OIG37/Gadd45γ 相互作用蛋白时发现了一种 25×10^3 的蛋白，命名为 CRIF1（CR6-interacting factor 1）。人体在甲状腺、心脏、淋巴结、气管、肾上腺等组织器官高表达 CRIF1 基因，但它的高表达水平有何生物学意义尚少见报道。初步证实它能与生长抑制和 DNA 损伤修复基因 Gadd45 家族的 3 个成员（Gadd45α、MyD118/Gadd45β、CR6/OIG37/Gadd45γ）相互作用发挥对细胞周期的负调控作用。CRIF1 定位在细胞核内，与 Gadd45 毗邻，通过抑制 Cdk1-cyclin B1 和 Cdk2-cyclin E 复合物的激酶活性和组蛋白 H1 激酶活性使细胞出现 G_1 期阻滞。体外实验中，上调 NIH3T3 细胞 CRIF1 表达水平后，G_1 期细胞比例增加；降低 CRIF1 表达水平后，G_1 期细胞减少，而 S 期细胞比例增加。Gadd45 能叠加 CRIF1 的这种细胞周期阻滞功能。提示 CRIF1 通过调节 G_1/S“限制点”参与细胞周期分布和细胞生长过程。而 Galectin1 是半乳糖凝集素家族的重要成员，具有多种生物学功能：调节细胞－细胞、细胞－基质的相互作用，与肿瘤的转移、浸润、生长、凋亡、细胞周期调控和黏附有关，参与细胞的增殖、分化和局部免疫调节[8]。结合我们前期实验结果分析，这些差异表达的基因可能参与 BMSCs 诱导的 Jurkat 细胞 G_0/G_1 期阻滞。深入研究 BMSCs 保护 Jurkat 细胞过程中 Jurkat 细胞 G_0/G_1 期阻滞的具体机制将有助于阐明 BMSCs 抑制化疗药物诱导 Jurkat 细胞凋亡的分子机制。

本实验条件下实验结果提示，与白血病 BMSCs 共培养后，诱导 Jurkat 细胞一些基因表达发生改变，这些基因的差异表达可能与白血病 BMSCs 抑制 DNR 诱导的 Jurkat 凋亡有关。

参考文献：

[1] CORAZZA F, HERMANS C, FERSTER A, *et al*. Bone marrow stroma damage induced by chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children[J]. Pediatr Res, 2004, 55 (1): 152－158.

[2] HARVEY K, DZIERZAK E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell－mediated HSC support during development[J]. Stem Cells, 2004, 22(3): 253－258.

[3] LISOVSKY M, ESTROV Z, ZHANG X, *et al*. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax[J]. Blood, 1996, 88(10): 3987－3997.

[4] ZHANG W, KNIELING G, VOHWINKEL G, *et al*. Origin of stroma cells in long－term bone marrow cultures from patients with acute myeloid leukemia[J]. Ann Hematol, 1999, 78 (7): 305－314.

[5] 李忠俊，滕本秀，陈幸华，等. 白血病骨髓基质细胞对白血病细胞屏蔽效应的体外实验研究[J]. 癌症，2005，24(6)：672－675.

[6] 刘　耀，陈幸华，张　曦，等. 人脐血基质细胞自发分泌多种造血生长因子的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：643－645.

[7] PARK K C, SONG K H, CHUNG H K, *et al*. CR6-interacting factor 1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and inhibits its transactivation[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19 (1): 12－24.

[8] RABINOVICH G A. Galectin-1 as a potential cancer target[J]. Br J Cancer, 2005, 92(7): 1188－1192.

（编辑　陈聪连）