文章编号:1000-5404(2013)07-0589-06

论著

表达SDF-1/HOXB4融合基因的间充质干细胞对造血干细胞体外扩增及干性维持的作用

张 佩[1],陈婷婷[1],叶 枫[2],裴 莉[1],符 刚[1],徐双年[1],邹仲敏[2],张 勇[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院血液科[1],军事预防医学院毒理学研究所[2])

[摘要] **目的** 构建SDF-1、HOXB4和SDF-1/HOXB4融合基因腺病毒表达载体,转染体外培养的间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs),比较其对$CD34^+$细胞体外扩增及干性维持的影响。**方法** 全基因合成SDF-1/HOXB4基因序列,以其为模板,经PCR、酶切及测序鉴定,构建表达SDF-1、HOXB4和SDF-1/HOXB4的3种腺病毒载体,转染至293A细胞进行包装和病毒滴度测定,并转染体外培养的MSCs,分别为SDF-1组、HOXB4组和S-H组,转染空腺病毒载体的为阴性对照,转录水平及蛋白水平检测MSCs中外源基因表达。4组MSCs和$CD34^+$细胞共培养7 d,计数细胞并检测其$CD34^+$表达。**结果** 测序表明3种腺病毒载体构建成功,在293A细胞中成功包装并获取病毒,RT-PCR和Western blot检测3个基因在MSCs细胞中稳定高表达,MSCs和$CD34^+$细胞共培养,扩增细胞数目SDF-1组(9.52±2.24)、S-H组(8.11±2.34)显著高于对照组(4.85±2.53,$P<0.05$),S-H组($CD34^+$表达为1.85%)较SDF-1组(1.20%)、HOXB4组(1.28%)更利于$CD34^+$细胞干性维持。**结论** 表达SDF-1/HOXB4融合基因的MSCs对$CD34^+$细胞体外扩增及干性维持作用更好。

[关键词] 腺病毒载体;间充质干细胞;造血干细胞;共培养;融合蛋白
[中图法分类号] R329.2; R394-33; R394.2 [文献标志码] A

Effect of SDF-1/HOXB4 fusion gene-modified mesenchymal stem cells on amplification and stemness maintenance of hematopoietic stem cells *in vitro*

Zhang Pei[1], Chen Tingting[1], Ye Feng[2], Pei Li[1], Fu Gang[1], Xu Shuangnian[1], Zou Zhongmin[2], Zhang Yong[1] ([1]Department of Hematology, Southwest Hospital, [2]Institute of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish mesenchymal stem cells (MSCs) expressing SDF-1, HOXB4 and SDF-1/HOXB4 fusion gene respectively, and to compare their effects on the amplification and stemness maintenance of umbilical cord blood $CD34^+$ cells *in vitro*. **Methods** The SDF-1/HOXB4 fusion gene was synthesized, based on which SDF-1 and HOXB4 gene were obtained by PCR, and adenovirus vectors respectively expressing above gene fragments were constructed. Virus particles were packaged in 293A cells and the titer of the virus was determined. MSCs infected with different virus supernatants were divided into a SDF-1 group, a HOXB4 group and a SDF-1/HOXB4 fusion gene group (S-H group), and MSCs infected with the adenovirus lack of target genes was used as control. The mRNA and protein expression of exogenous genes were detected. The 4 groups of MSCs were co-cultured with umbilical cord blood $CD34^+$ cells for 7 d, and then total cell counting and the ratio of $CD34^+$ cells were measured. **Results** The adenovirus vectors respectively expressing SDF-1, HOXB4 and SDF-1/HOXB4 were successfully constructed, and the MSCs infected with harvested virus supernatants stably and highly expressed the exogenous genes. The modified MSCs of the SDF-1 group (9.52±2.24) and S-H group (8.20±2.34) could significantly increase the total number of hematopoietic cells as compared with the control group (4.85±2.53, $P<0.05$), and the S-H group (the proportion of $CD34^+$ cells 1.85%) showed better effect on stemness maintenance of umbilical cord blood $CD34^+$ cells as compared with the SDF-1 group (1.20%) and HOXB4 group (1.28%). **Conclusion** The SDF-1/HOXB4 fusion gene-modified MSCs can improve the amplification and stemness maintenance of HSCs *in vitro*.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970868)
[通信作者] 张 勇,电话:(023)68754129,E-mail:brave_zhang@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130227.1337.007.html(2013-02-27)

[**Key words**] adenovirus vector; mesenchymal stem cells; hematopoietic stem cells; co-culture; fusion gene

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30970868). Corresponding author: Zhang Yong, Tel: 86-23-68754129, E-mail: brave_zhang@hotmail.com

造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是造血功能损伤后促使其恢复的重要有效手段。近年来,随着人们对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的基础和临床研究进展,很多研究证实MSCs与造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)联合移植能在一定程度上促进造血干细胞的植入和造血重建[1-2],但移植后HSCs归巢率有限且自我增殖活性有限,成为制约骨髓造血重建的瓶颈问题。如何充分利用二者在骨髓中结构和功能的密切相关性,促进骨髓重建提高HSCs归巢效率,提高其自我更新能力是目前研究的热点和难点。MSCs作为造血微环境主要细胞成分能选择性粘附并支持$CD34^+$增殖和迁移,在这个过程中趋化因子SDF-1及其受体CXCR4对HSCs的归巢和植入起到了重要的调节作用。趋化因子SDF-1在骨髓中呈浓度梯度分布,可趋化HSCs从外周向骨髓的回巢,并最终进入干细胞壁龛,MSCs高表达的SDF-1能有效介导HSCs增殖和迁移。HOXB4基因是编码一类具有同源盒DNA依赖的结构域核蛋白,是一种特异性的转录因子,局部高表达HOXB4基因,可以调节HSCs增殖与自我更新,促进造血重建。HOXB4基因对于调节HSCs自我更新与分化间的平衡起着重要作用,能够有效地增强$CD34^+$细胞自我更新能力。本研究结合SDF-1/CXCR4之间的趋化作用和HOXB4可维持干细胞干性的作用,构建SDF-1基因和HOXB4基因的融合分子,通过腺病毒感染使MSCs高表达该融合蛋白,使其在1个细胞中同时表达2个基因,在与脐血$CD34^+$细胞体外共培养模型上,探讨SDF-1/HOXB4融合基因对调节HSCs扩增与自我更新的影响。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞

pIRES2-EGFP载体、pDONR221载体、pAd/CMV/V5-DEST载体、pMD-18T载体、DH5α感受态细胞、293A细胞均为Invitrogen公司产品。

1.2 药品及试剂

platinum PFX Polymerase高保真酶、platinum HIFI *Taq* Polymerase高保真酶、Buffer tango、10 × Loading buffer、$MgSO_4$、dNTP、ddH_2O、platinum PFX polymerase、氨苄青霉素或卡那霉素抗生素溶液、BP clonase Ⅱ enzyme mix、LR clonase Ⅱ enzyme mix均为Invitrogen公司产品。

培养基DMEM + 10%胎牛血清、Lipofectamine 2000、Opti-MEM培养液、0.05% Trypsin、无血清培养基均购自Invitrogen公司。逆转录及PCR试剂盒购自TaKaRa公司。*Xho* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ限制性内切酶(MBI公司),Ligase、*Pac* Ⅰ(NEB公司)。测序和PCR引物由Invitrogen公司完成。

培养基DMEM-F12 + 10%胎牛血清购自HyClone公司。MACS磁性分离试剂盒、PE标记的鼠抗人CD34抗体及其对照IgG2a购自Miltenyi公司。FITC标记的鼠抗人CD45、CD44、CD90及对照IgG2b、IgG1购自BD公司。淋巴细胞分离液(TBD公司),甲基纤维素培养基H4434购自STEMCELL公司。SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,HRP化学发光检测试剂盒购自康为世纪,SDF-1一抗购自CellSigaling公司,HOXB4一抗购自Epitomics公司,二抗购自博士德公司。

1.3 腺病毒载体构建

1.3.1 全基因合成SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4序列 对所需合成的SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4全序列进行分析,进行单链Oligo的设计及合成,并在序列的两端分别添加限制性酶切位点*Xho* Ⅰ及*Eco*R Ⅰ;利用PCR将合成的Oligo拼接成完整的基因;将序列装入pMD-18T载体并转化至感受态细胞DH5α,测序并通过重叠PCR将基因序列中突变的2个位点修复,质粒经再次测序验证重组克隆中基因序列是否正确,融合基因约1 044 bp,348个氨基酸。含有正确SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4序列的质粒编号为S-H。

1.3.2 pAd-SDF-1-IRES-EGFP、pAd-HOXB4-IRES-EGFP、pAd-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP腺病毒载体的构建及鉴定 用已构建质粒S-H为模板,根据SDF-1和HOXB4序列信息,设计2对PCR扩增引物扩增带有*Xho* Ⅰ及*Eco*R Ⅰ酶切位点的SDF-1基因序列和HOXB4基因序列,进行扩增、电泳回收条带。将回收的带有酶切位点的SDF-1片段和HOXB4片段酶切,回收片段。将S-H质粒酶切并电泳回收片段。同时目的载体pIRES2-EGFP也进行酶切回收片段。回收的SDF-1、HOXB4和SDF-1/HOXB4片段和目的载体pIRES2-EGFP进行连接到感受态细胞DH5α中,测序验证,构建出3种含有正确基因序列的GFP共表达质粒。

针对共表达质粒设计扩增引物,以已构建的共表达质粒为模板,扩增带attB1和attB2位点SDF-1-IRES-EGFP、HOXB4-IRES-EGFP、SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-EGFP片段,扩增、回收条带,使用Invitrogen公司BP重组反应体系:回收产物(30 ng/μL) 5 μL,pDONR221 vector(150 ng/μL)1 μL,BP clonase Ⅱ enzyme mix 2 μL,ddH_2O 2 μL。25 ℃反应1 h,加入1 μL的蛋白酶K,37 ℃反应10 min,取5 μL重组反应液转化100 μL的DH5α感受态细胞,使BP重组质粒到载pDONR221上,再筛选阳性克隆并测序验证,保留测序验证正确的BP重组质粒,将正确的BP重组质粒利用Invitrogen公司LR重组反应体系:BP重组质粒(150 ng/μL) 1 μL,pAd/CMV/V5-DEST (150 ng/μL) 1 μL,LR clonase Ⅱ enzyme mix 2 μL,ddH_2O 6 μL。同样方法重组到腺病

毒载体 pAd/CMV/V5-DEST 上,筛选测序验证正确的 LR 重组质粒。构建出正确的 pAd-SDF-1-IRES-EGFP、pAd-HOXB4-IRES-EGFP、pAd-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP 腺病毒载体。

1.3.3 腺病毒的包装和滴度的测定 按照文献[3]方法进行腺病毒的包装,采用免疫法检测腺病毒滴度。所用一抗为兔抗腺病毒多抗,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗,DAB 显色和计数,每孔至少计数 3 个视野,计算每孔感染单位。

$$\text{每孔感染单位(ifu/mL)} = \frac{(\text{平均阳性细胞数/视野}) \times (\text{视野数/孔})}{\text{病毒(mL)} \times \text{稀释倍数}}$$

1.4 骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

骨髓间充质干细胞按密度梯度离心法[4-5]培养至第 3 代。细胞常规消化后以 PE 标记的鼠抗人 CD34 抗体,以鼠源 IgG2a 作为阴性对照,FITC 标记的鼠抗人 CD45、CD44、CD90 抗体孵育,以鼠源 IgG2b、IgG1、IgG1 作为阴性对照,流式细胞仪检测标记抗体含量。

1.5 SDF-1、HOXB4 和 SDF-1/HOXB4 融合基因在间充质干细胞中的表达

1.5.1 转录水平检测 3 个基因在间充质干细胞中的表达 间充质干细胞传至第 3 代,根据腺病毒表达载体的病毒滴度转染细胞,其中 pAd-SDF1-IRES-EGFP 腺病毒的 MSCs 为 SDF-1 组,转染 pAd-HOXB4-IRES-EGFP 腺病毒的 MSCs 为 HOXB4 组,转染 pAd-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP 腺病毒的 MSCs 为 S-H 组,转染空腺病毒载体的 MSCs 为阴性对照组。每隔 24 小时全量换液,连续 3 次,第 5 天观察荧光效果并提取转染后细胞的 RNA 和蛋白,按照 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒说明书进行扩增,引物由上海生工生物工程有限公司合成,SDF-1 上下游引物:5′-GCCTGAGCTACAGATGCC-3′,5′-AGCTTTCTCCAGGTACTCCT-3′。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 1 min;然后 94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 1 min。扩增片段为 185 bp。HOXB4 上下游引物:5′-AGCGATTACCTACCCAGCGACC-3′, 5′-AGGAGCCCGAGGGGACAGAC-3′, SDF-1-HOXB4 上下游引物:5′-GCCTGAGCTACAGATGCC-3′,5′-AGGAGCCCGAGGGGACAGAC-3′。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 1 min;然后 94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环;最后72 ℃ 延伸 1 min。扩增片段分别为 207 bp 和 394 bp。电泳检测基因表达。

1.5.2 Western blot 测定 提取转染病毒 5 d 后 MSCs 细胞的总蛋白并电泳转膜检测含量,S-H 组分别用 SDF-1 和 HOXB4 抗体检测。

1.6 体外分离人脐血源性 $CD34^+$ 干细胞并扩增

由本院妇产科产妇志愿者提供人脐血标本,按照骨髓密度分离法,进行单个核细胞分离,利用 MASC 进行 $CD34^+$ 细胞磁珠纯化,细胞过柱 2 次。纯化前后细胞悬液分别取样计数,取 2×10^5 个细胞以鼠抗人单克隆抗体 CD34-PE 10 μL 标记细胞,鼠源 IgG2 10 μL 作为对照,流式细胞术测定 $CD34^+$ 细胞的纯度。

按照甲基纤维素培养基说明方法,1 000 个 $CD34^+$ 细胞接入 1 mL 甲纤培养基中,37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养 14 d,进行造血集落的观察。

取转染空腺病毒载体的 MSCs 细胞和转染了 3 种腺病毒的细胞铺入 24 孔板,共 4 组,复种 3 孔,每孔接种 1×10^4 个细胞,^{60}Co γ 射线照射,照射剂量 30 Gy,制备滋养层,接入新鲜分选后的 $CD34^+$ 细胞,每孔接入 1×10^4 个细胞,用无血清培养基联合细胞因子 SCF(100 ng/mL)、IL-3(50 ng/mL)和 GM-CSF(25 ng/mL),培养 7 d 后,计数 $CD34^+$ 细胞。再消化收集所有细胞标记 $CD34^+$ 荧光抗体计数 10 000 个细胞进行流式检测。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件,对体外扩增的细胞数目进行单因素方差分析。

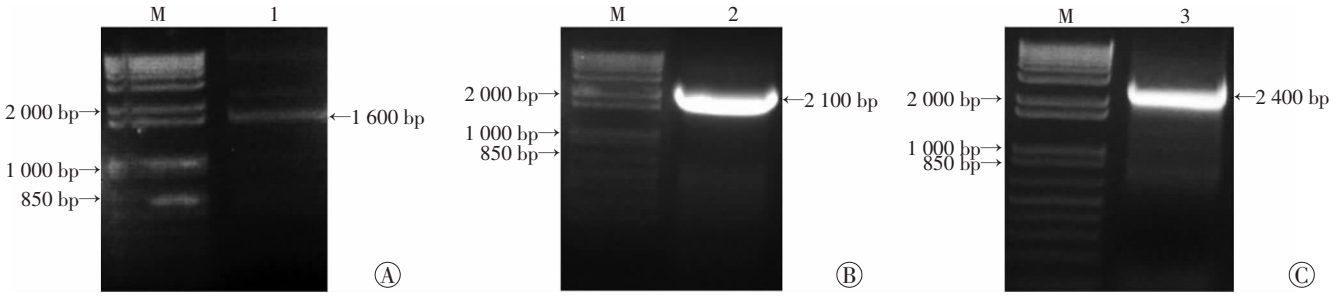
2 结果

2.1 腺病毒载体的构建

用全基因合成并测序获得正确的 SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4 融合基因序列。以其作为 PCR 模版,获得了序列正确的 SDF-1 和 HOXB4 序列。S-H 质粒和 pIRES-EGFP 载体用 *Xho* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ酶切连接,SDF-1/HOXB4 融合基因位于 IRES 上游。PCR 扩增带有 attB1 和 attB2 位点的 SDF-1-IRES-EGFP、HOXB4-IRES-EGFP 和 SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-EGFP 片段(图 1),测序验证。腺病毒载体 pAd-SDF-1-IRES-EGFP、pAd-HOXB4-IRES-EGFP、pAd-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP 构建成功。

2.2 腺病毒的包装和滴度测定

将 3 种腺病毒表达载体转染 293A 细胞,转染后 10 ~ 13 d 80% 出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),荧光显微镜下可以看到绿色荧光(图 2),收集病毒上清,检测腺病毒滴度,Ad-SDF-1-IRES-EGFP 病毒的滴度为 1.05×10^{11} ifu/mL,Ad-HOXB4-IRES-EGFP 病毒的滴度为 1.2×10^{11} ifu/mL,Ad-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP 病毒的滴度为 1×10^{11} ifu/mL。



M:标准;1:SDF-1-IRES-EGFP 酶切产物;2:HOXB4-IRES-EGFP 酶切产物;3:SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP 酶切产物

图 1 3 种腺病毒载体 SDF-1-IRES-EGFP(A)、HOXB4-IRES-EGFP(B)、SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP(C)的酶切鉴定

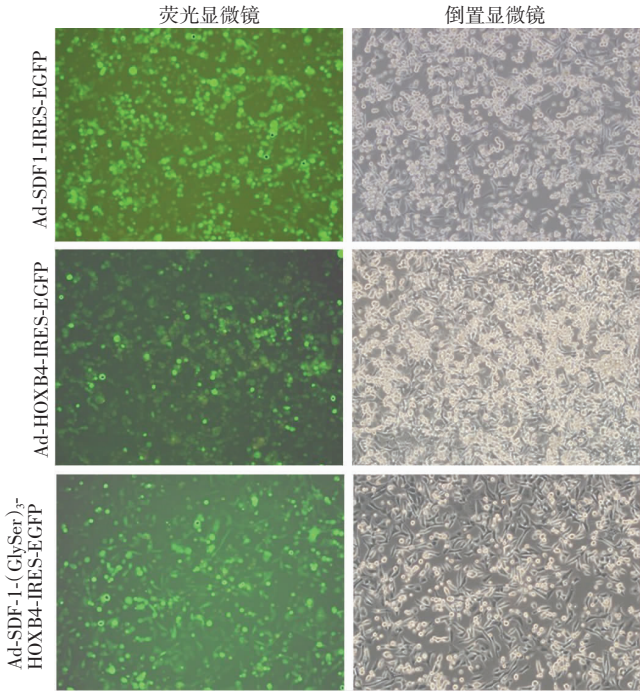
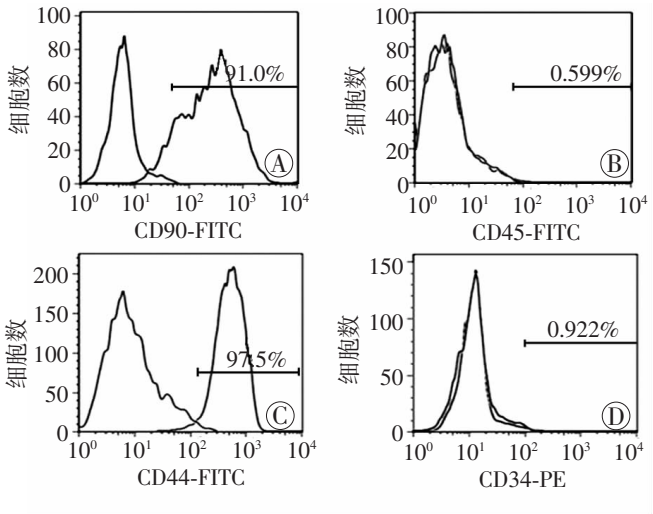


图2 荧光显微镜与倒置显微镜观察3种重组腺病毒转染293A细胞 （×100）

2.3 MSCs的分离培养及病毒转染

成功培养了MSCs。对MSCs的表型进行流式细胞术分析，结果显示CD90表达率为91.0%，CD34表达率为0.992%，CD45表达率为0.599%，CD44表达率为97.5%，符合MSCs的表型特点（图3）。



A:CD90;B:CD45;C:CD44;D:CD34

图3 流式细胞术检测人MSCs细胞的表型结果

2.4 转染腺病毒载体的MSCs细胞

将扩增的高滴度的病毒转染处于对数生长期的MSCs细胞，48 h后可见感染的绿色荧光，转染率约为90%（图4）。

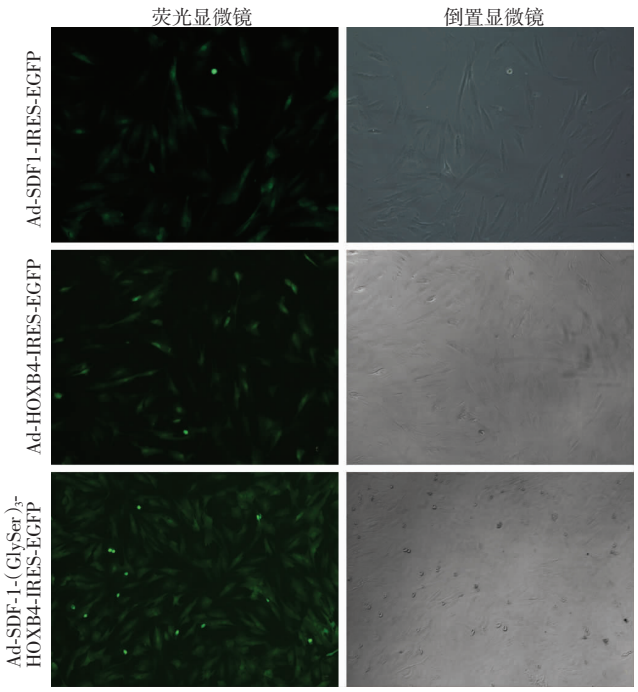
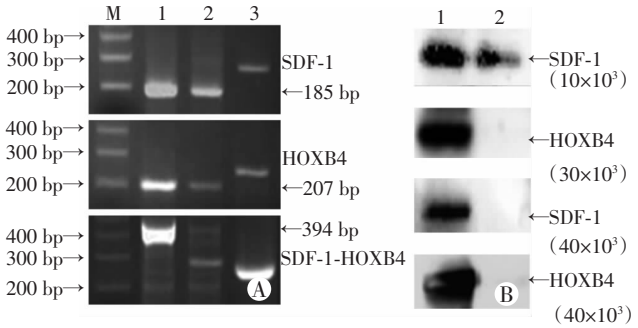


图4 荧光显微镜与倒置显微镜观察3种腺病毒转染MSCs细胞 （×100）

2.5 RT-PCR、Western blot检测MSCs中目的基因的表达

3种腺病毒转染培养的人骨髓MSCs，用RT-PCR（图5A）和Western blot（图5B）检测外源基因的表达，证实目的基因均高表达。转染后，SDF-1在mRNA和蛋白水平均高表达，而内源性的表达水平较低；外源性HOXB4的表达水平高，内源性HOXB4在mRNA水平可以检测到，但蛋白水平只有低水平表达；SDF-1-HOXB4融合基因在mRNA和蛋白水平均有高水平表达。

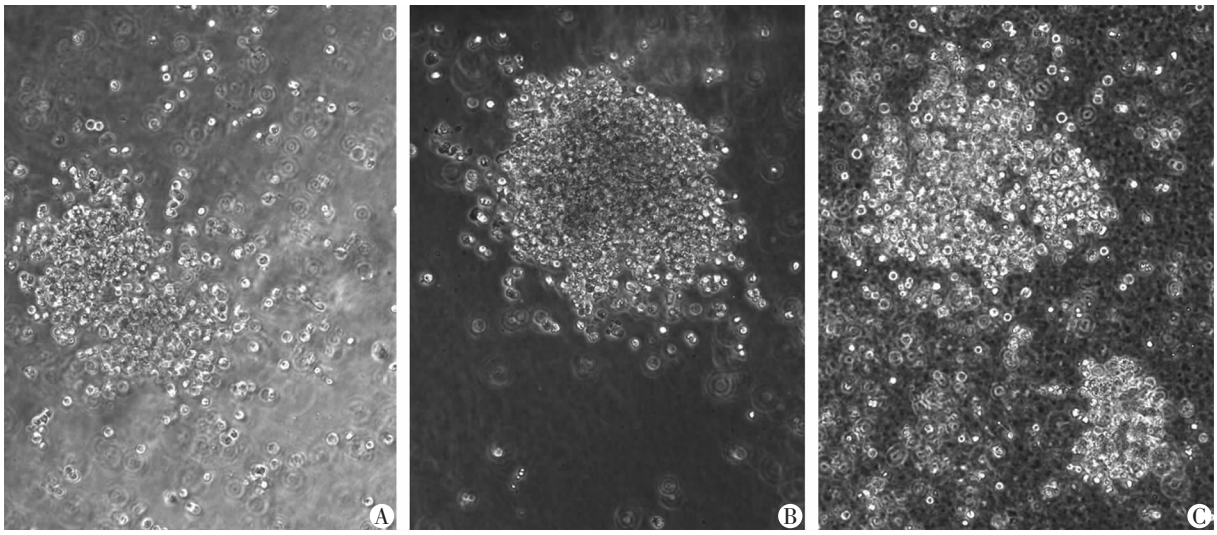


M:标准;1:腺病毒感染;2:空载体;3: GAPDH

图5 RT-PCR（A）与Western blot（B）检测3种腺病毒在MSCs细胞中的表达

2.6 $CD34^+$细胞的分离及鉴定

利用MASC分得脐血$CD34^+$干细胞，进行流式细胞术检测，细胞纯度由分选前的2.87%上升至分选后的99.2%。甲基纤维素培养基培养造血集落，$CD34^+$细胞接入7 d后，首先出现爆式红系集落。培养14 d后红系祖细胞集落（CFU-E）、巨核细胞集落（CFU-M）、粒系祖细胞集落（CFU-G）和混合集落（CFU-GEMM）陆续出现，结果提示分选后细胞干性和分化能力都比较好（图6）。



A:CFU-M;B:CFU-E;C:CFU-G

图6 CD34⁺细胞的流式细胞术检测及集落培养 （普通显微镜×100）

2.7 各组MSCs对干细胞扩增的影响

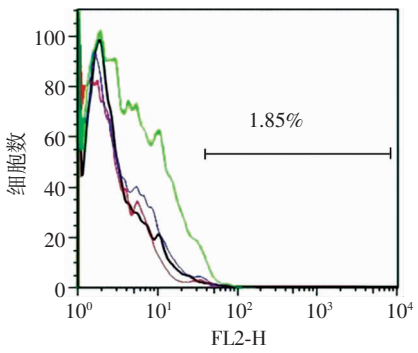
与分离的CD34⁺细胞体外共培养7 d后,扩增细胞数目3个实验组都要高于阴性对照组(表1),其中SDF-1和S-H组与对照组之间差异显著($P<0.05$),HOXB4组和对照组相比无统计学差异($P>0.05$)。3个实验组之间扩增细胞数目SDF-1和S-H 2组、S-H和HOXB4 2组相比无统计学意义($P>0.05$),SDF-1和HOXB4 2组间有显著差异($P<0.05$)。

S-H组扩增后CD34⁺细胞为1.85%,其比例明显高于其他几组,阴性对照组CD34⁺细胞的表达为0.59%、SDF-1组表达为1.20%、HOXB4组表达为1.28%。虽然3个实验组之间CD34⁺细胞比例差异无统计学意义,即维持干性的作用差别不大。但是,可以明显看到SDF-1-HOXB4细胞组的荧光强度曲线的右侧线明显右移,该组细胞的总体CD34荧光信号显著加强,出现一群临界表达CD34的细胞(图7)。

表1 各组扩增脐血CD34⁺细胞的数目（$n=5$, $\bar{x}\pm s$）

组别	扩增细胞($\times10^4$)	CD34⁺表达(%)
SDF-1组	9.52 ± 2.24^{ab}	1.20 ± 0.08
HOXB4组	5.74 ± 2.43	1.28 ± 0.02
S-H组	8.11 ± 2.34^{a}	1.85 ± 0.45
对照组	4.85 ± 2.53	0.59 ± 0.25

a:$P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与HOXB4组比较



红色:SDF-1组;蓝色: HOXB4组;绿色: S-H组;黑色:阴性对照组

图7 FCM检测不同饲养层细胞体外扩增脐血CD34⁺细胞7 d后细胞表型

3 讨论

如何在体外最大化扩增HSC并保持其趋化性和干性一直是HSCs研究中的热点。在扩增HSCs的过程中,HSCs会向骨髓各系分化和成熟,最终也会失去其趋化效应,增大移植失败的概率。所以如何使HSCs最大化的维持其干性一直是骨髓移植研究的重点。

趋化因子SDF-1及其一对一的受体CXCR4对HSCs的归巢和植入起到了重要的调节作用。内皮细胞、成骨细胞和MSCs细胞均表达SDF-1,而其受体CXCR4在造血细胞广泛表达,包括早期的CD34⁺、CD38⁻和髓系、淋系定向祖细胞[6]。MSCs高表达的SDF-1能介导HSCs迁移,吸引其向骨髓回归定植并刺激其增殖。Hattori等[7]利用SDF-1腺病毒载体给SCID小鼠静脉注射后,发现出现了造血细胞迁移现象,并且小鼠血浆中白细胞和血小板都有增加。

HOXB4作为同源盒(HOX)基因家族的一个成员,表达强弱与维持干细胞的自我更新密切相关,在早期的造血细胞中高表达,随着HSCs向各系血液细胞分化和成熟,HOXB4表达逐渐下降直至消失[8]。体内实验表明增加HOXB4在小鼠骨髓细胞中的表达能够在体内外显著增强HSCs的更新能力。Tang等[9]利用重组HOXB4明显提高了骨髓移植失败者HSCs的扩增,也有研究表明转染了HOXB4的MSCs在体外有利于支持脐血CD34⁺细胞的扩增并保持其干性[10]。

在本实验中我们首先构建了pAd-SDF-1-IRES-EGFP、pAd-HOXB4-IRES-EGFP和pAd-SDF-1-$(GlySer)_3$-HOXB4-IRES-EGFP腺病毒载体,腺病毒载体作

为真核细胞载体具有表现多方面的优势,安全性好,不会进行病毒基因整合,不会引起插入突变。其结构和功能研究都比较清楚,结构上也比较稳定,能有效地把外源基因转染到靶细胞中,感染性强,病毒繁殖滴度高。在载体中的GFP是目前唯一无种属差别在细胞内稳定表达的基因,其产物对细胞无毒性,表达检测结果可靠,实验中目的基因和GFP用IRES间隔连接使两者之间的表达互不影响,同时GFP也成为目的基因表达高低的一个可靠指标。然后我们用含SDF-1、HOXB4和SDF-1/HOXB4融合蛋白的腺病毒感染骨髓MSCs。通过转录水平和蛋白水平的检测,实验结果提示:SDF-1、HOXB4和融合基因都可以成功转染MSCs细胞,并稳定高表达。MSCs和HSCs共培养后扩增细胞数目SDF-1和S-H组都要高于对照组($P<0.05$),其中SDF-1最高,S-H组次之,2组扩增细胞数目相比无统计学意义($P>0.05$),提示可能与SDF-1本身具有促进增殖效应和特有的趋化性有关,其吸引了更多的$CD34^+$细胞。Van-Overstraeten-Schlogel等[11]也发现,SDF-1/CXCR4轴能显著促进造血细胞在体外的扩增并维持其活性。但是融合基因S-H组对$CD34^+$细胞干性维持荧光强度曲线的右侧线明显右移,该组细胞的总体CD34荧光信号显著加强,出现一群临界表达CD34的细胞,HOXB4组CD34荧光信号也要稍高于SDF-1和阴性对照,提示可能是HOXB4增强HSCs的自我更新能力。总的结果表明了在共培养时融合基因SDF-1/HOXB4能更有效地提高$CD34^+$细胞在体外的增殖和干性维持。

综上所述,在本实验中S-H组扩增的$CD34^+$荧光强度曲线比其他几组明显右移,荧光显著加强,扩增的细胞数目3个实验组都要高于对照组,且SDF-1和S-H组与对照组之间差异显著,虽然S-H组的扩增细胞数目略低于SDF-1组,但2组相比并无统计学意义。本研究结果提示通过转入融合基因的MSCs作为饲养层细胞,可以更加有效地在体外扩增脐血$CD34^+$细胞,这为以后利用多种基因联合应用来扩增造血干细胞和维持其干性提供了新思路。但是HOXB4作为转录因子过高表达可能会对细胞其他生物学方面造成影响,提高HOXB4的表达水平可增强$CD34^+$细胞的增殖和自我更新,与此同时也减弱了细胞的短期分化能力[12-13]。所以本研究中的融合基因是否会对造血细胞自身特性或者分化能力造成影响,是否在体内还能发挥同样功能还需进一步探讨。

参考文献:

[1] Poloni A, Leoni P, Buscemi L, *et al*. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced-intensity conditioning regimen[J]. Leukemia, 2006, 20(2): 329-335.

[2] 贾新涛, 穆媛媛, 贾潇潇, 等. 人脐血$CD34^+$细胞在NOD/SCID小鼠上有效重建造血系统[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1136-1140.

[3] 钟诚, 姜振东, 张学渊. 大鼠促红细胞生成素重组腺病毒载体的构建及其在大鼠SGNs中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1818-1821.

[4] Jung S, Panchalingam K M, Rosenberg L, *et al*. *Ex vivo* expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media[J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 123030.

[5] 钟波, 叶枫, 王涛, 等. 不同活性的survivin基因启动子片段的克隆及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1115-1118.

[6] Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, *et al*. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure[J]. Blood, 2009, 113(7): 1504-1512.

[7] Hattori K, Heissig B, Tashiro K, *et al*. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells[J]. Blood, 2001, 97(11): 3354-3360.

[8] Sauvageau G, Lansdorp P M, Eaves C J, *et al*. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct $CD34^+$ subpopulations of human bone marrow cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(25): 12223-12227.

[9] Tang Y, Chen J, Young N S. Expansion of haematopoietic stem cells from normal donors and bone marrow failure patients by recombinant hoxb4[J]. Br J Haematol, 2009, 144(4): 603-612.

[10] 费小明, 周小玉, 王丽霞, 等. 转HOXB4基因人骨髓MSC促进脐血$CD34^+$细胞体外扩增[J]. 江苏医药, 2010, 36(4): 428-432.

[11] Van-Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells[J]. Eur J Heamatol, 2006, 76(6): 488-493.

[12] Schiedlmeier B, Klump H, Will E, *et al*. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound *in vivo* competitive growth advantage on human cord blood $CD34^+$ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation[J]. Blood, 2003, 101(5): 1759-1768.

[13] Kaplan D, Kaye N, Liu F, *et al*. The functional duality of HoxB4 in hematopoietic reconstituting cells[J]. Cytometry A, 2013, 83(1): 127-133.

(**收稿**:2012-12-10;**修回**:2013-01-24)

(编辑 王 红)