



## 干细胞因子mRNA在原代白血病细胞的表达

干细胞因子(Stem cell factor, SCF)是参与正常造血调控的重要细胞因子之一,可在体内外协同其他造血生长因子刺激粒细胞系、红细胞系、淋巴细胞系和巨核细胞系增殖分化[1][2]。人类骨髓的纤维细胞和血管内皮细胞、皮肤、胎盘组织及部分起源于造血组织的肿瘤细胞系均可见SCF的表达[3]。但SCF在原代白血病细胞是否表达及其与急性白血病预后的关系,目前尚不清楚。我们应用巢式逆转录聚合酶链反应检测了49例不同类型的白血病患者骨髓原代白血病细胞内SCF mRNA的表达情况,旨在探讨SCF与急性白血病预后的关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象

1.1.1 病例选择 1998年5月~2001年5月我院收治的白血病患者49例,男37例、女性12例。其中急性淋巴细胞白血病(ALL)19例,急性非淋巴细胞白血病(ANLL)M<sub>1</sub>~M<sub>6</sub>型30例,所有患者均经FAB分型确诊。

1.1.2 细胞株 K562和HL-60细胞为阳性对照,NIH3T3细胞为阴性对照,上述细胞株均为我科实验室保存。

1.1.3 主要试剂及仪器 M-MLV逆转录酶、Taq DNA多聚酶、2 mmol/L dNTP等均为美国Promega公司产品,PE480 DNA热循环仪为美国PE产品。根据文献我们设计合成了下述两对巢式引物[4][5]。

引物A: 5'-AATGCGTGGACTATCTGCCG-3'; 引物B: 5'-CCTGGGTTCTGGGCTCTTGA-3' 引物C: 5'-ATCTGCAGGAATCGTGTGACT-3'; 引物D: 5'-CTCGCTTATCCAACAATGACT-3' 其中引物A、B为外侧引物,引物C、D为内侧引物。

寡核苷酸探针:根据文献[4]中报道的SCF部分cDNA序列,合成一段与此cDNA序列互补的DNA片段作为寡核苷酸探针,其碱基序列为:5'-GGCAAACATCCATCCCGG-3'。上述引物及探针由上海生工生物工程公司合成。

#### 1.2 方法

1.2.1 逆转录反应(RT) 取肝素抗凝的骨髓4~5 ml,密度梯度法分离单个核细胞(MNC),TRIzol RNA抽提试剂盒提取细胞株及MNC的总RNA并进行定量。20 ml总反应液中,含总RNA 2~3 mg、RNasin 40 U、0.1 mol/L DTT 2 μl、M-MLV逆转录酶200 U、2 mmol/L dNTP 2 ml、20 pmol/ml外侧下游引物B 1 ml,37 °C 孵育90 min、95 °C 5 min后进行PCR反应。

1.2.2 PCR反应 第一步PCR反应在50 ml总反应液中进行,含RT反应液5 ml,Taq DNA多聚酶2 U,20 pmol/ml外侧引物A、B各2 ml,10×PCR反应缓冲液5 ml,2 mmol/L dNTP 5ml,少许矿物油覆盖。PCR循环35个周期,每一周期为94 °C变性65 s,57 °C退火70 s,72 °C延伸100 s,先95 °C预变性5 min,反应终止时72 °C 10 min。第二步PCR反应:取1 ml第一次PCR产物加入第二步PCR反应液中,并加入内侧巢式引物C、D各2 ml(20 pmol/ml),其他试剂及PCR循环条件同第一步PCR反应。

1.2.3 PCR产物的检测及斑点杂交 取7 ml二次PCR反应产物,2 ml DNA标准相对分子质量,2.5%琼脂

糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外荧光显影并照相。寡核苷酸的地高辛加尾标记及斑点杂交根据说明书进行。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS软件对数据进行 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 原代白血病细胞SCF的表达(表1)

表 1 不同类型白血病的 SCF 表达情况  
Tab.1 Expression of SCF in patients with different subtypes of leukemia

Group	n	SCF expression		Positivity rate (%)
		Positive	Negative	
ALL	19	5	14	26.3*
ANLL	30	24	6	80.0*

\* $\chi^2=13.88, P<0.001$

24例阳性为 $M_1 \sim M_4$ ，6例阴性中4例 $M_5$ 、2例 $M_6$ 。

### 2.2 PCR产物的斑点杂交

为了证实PCR产物确系人SCF的靶序列，我们进行了斑点杂交，结果见图1。K562细胞、HL-60细胞、5例ALL、24例 $M_1 \sim M_4$ 的第一次PCR产物和第二次PCR产物的斑点杂交均为阳性，但第一次PCR产物呈弱阳性，其余的原代白血病细胞和NIH3T3细胞两次PCR产物的斑点杂交均为阴性。

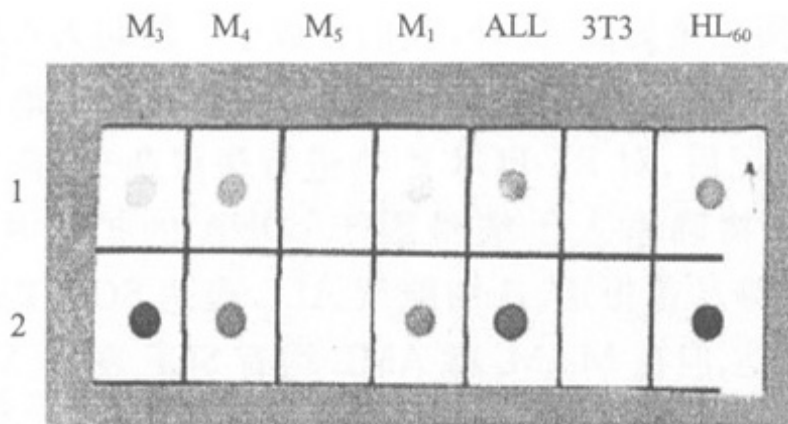


图1 PCR产物的斑点杂交分析结果

Fig.1 Southern blot analysis of the RT-PCR products

### 2.3 SCF与临床疗效的关系(表2)

表 2 SCF 表达与临床疗效的关系

Tab. 2 Relationship between SCF expression and the effectiveness of clinical intervention of leukemic

Group	Total	Refractory	Common	Refractory rate (%)
SCF(-)	20	12	8	60.0*
SCF(+)	29	8	21	27.6*

$$*\chi^2=5.148, P=0.023$$

在29例SCF阳性和20例SCF阴性患者中，分别有8例和12例为难治性急性白血病。难治性急性白血病的诊断采用以下回顾性诊断标准：①经标准诱导化疗两个疗程未获得完全缓解；②第1次完全缓解后6个月内复发者(早期复发)；③第1次完全缓解后6个月以上复发，再用原诱导方案治疗不能获得完全缓解者；④两次以上复发者。

### 3 讨论

SCF是一种作用于造血早期阶段多系细胞刺激因子，又称肥大细胞生长因子(MGF)、c-kit癌基因的配体(KL) [1] [5] [6]。天然SCF有两种形式，即可溶型和膜结合型，它们为同一编码mRNA在不同位点剪切所致，两种形式的SCF都有生物学活性。SCF分布较广，但表达量很低，曾有人报道[7]人骨髓基质细胞SCF mRNA拷贝仅为(9±3)个，估计其他细胞的表达量会更低。

我们采用敏感的巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对49例急性白血病患者的原代白血病细胞进行了检测。结果发现在19例 ALL中5例阳性，14例阴性；24例M<sub>1</sub>~M<sub>4</sub>型ANLL均阳性；4例M<sub>5</sub>及2例M<sub>6</sub>阴性，ALL与AML SCF表达存在显著差异(P<0.005)。本实验阳性对照为人的白血病细胞株K562和HL-60，国外已有报道[8]二者均表达SCF。阴性对照用来自小鼠成纤维细胞的NIH3T3细胞系，虽然小鼠与人的SCF有83%的同源性，但是我们合成的一对外侧引物中有6个碱基与小鼠SCF的cDNA序列不同。因此，从理论上讲不可能出现阳性PCR产物，事实正是如此。另外，我们合成了一段与人干细胞因子cDNA特异性互补的寡核苷酸探针，经地高辛加尾标记后，对RT-PCR产物进行斑点杂交，证实了PCR产物确系人干细胞因子cDNA的扩增片段。Ferrari等 [3]曾报道，B细胞型ALL表达SCF，T细胞型不表达，但在M<sub>1</sub>~M<sub>4</sub>型ANLL均有SCF表达，M<sub>5</sub>则无表达，与我们试验结果相符。我们还发现2例M<sub>6</sub>阴性，国内外未见报道。

一般认为，细胞因子要发挥生物学活性可能与以下方面有关：①结构正常且具有活性的细胞因子；②相应的受体数量、结构及活性；③相应的信号传递途径；④调节其他相应的细胞因子及受体的表达；⑤调节相应的基因表达水平如某些原癌基因等。有关SCF的作用机制，多数认为SCF的造血调控作用是通过与c-kit受体结合来实现的[5] [6] [7]，是否存在其他机制目前还不完全清楚。

本实验发现SCF与临床疗效有明显相关性(P<0.05)。我们发现SCF阴性患者临床化疗效果较差，国外有研究报道SCF受体c-kit在T细胞白血病细胞、M<sub>5</sub>、M<sub>6</sub>等均有过量表达，而且此类患者的化疗疗效和预后较差，其机制是c-kit诱导P蛋白的表达，P蛋白可将细胞毒性药物泵出细胞外而产生多药耐药[8] [9] [10]。由于我们没有检测c-kit的表达，SCF阴性患者疗效较差是否与此机制有关有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoieting stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium [J]. Cell, 1990, 63(1): 195-201.

[2] Teyssier Le Discorde M, Prost S, Nandrot E, et al. Spatial and temporal mapping

of c-kit and its ligand, stem cell factor expression during human embryonic haemopoiesis [J]. Br J Haematol, 1999, 107(2): 247-53.

[3] Ferrari S, Grand A, Manfredini R, et al. Expression of interleukins 1, 3, 6, stem cell factor and their receptors in acute leukemia blast cells and in normal peripheral lymphocytes and monocytes [J]. Eur J Haematol, 1993, 50(3): 141-8.

[4] 柳柏林, 李 彬, 靳卫东等. 人及小鼠干细胞因子的cDNA克隆及其序列分析 [J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(6): 283-7.

[5] Williams DE, Eisenman J, Baird A, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene[J]. Cell, 1990, 63(1): 167-74.

[6] Huang E, Nocka K, Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor SL is encoded by the SL locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus [J]. Cell, 1990, 63(1): 225-33.

[7] Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG, et al. Stem cell factor is encoded at the SL locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor[J]. Cell, 1995, 23(10): 1104-14.

[8] Pietsch T, Kyas U, Steffens U, et al. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors[J]. Blood, 1992; 80(5): 1199-206.

[9] Sincock PM, Ashman LK. Expression of c-kit and functional drug efflux are correlated in de novo acute myeloid leukaemia[J]. Leukemia, 1997, 11(11): 1850-7.

[10] Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, et al. Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukemia [J]. Br J Haematol, 1996, 92(3): 562-4.

#### 参考文献:

[1] Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoieting stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium [J]. Cell, 1990, 63(1): 195-201.

[2] Teyssier Le Discorde M, Prost S, Nandrot E, et al. Spatial and temporal mapping of c-kit and its ligand, stem cell factor expression during human embryonic haemopoiesis [J]. Br J Haematol, 1999, 107(2): 247-53.

[3] Ferrari S, Grand A, Manfredini R, et al. Expression of interleukins 1, 3, 6, stem cell factor and their receptors in acute leukemia blast cells and in normal peripheral lymphocytes and monocytes [J]. Eur J Haematol, 1993, 50(3): 141-8.

[4] 柳柏林, 李 彬, 靳卫东等. 人及小鼠干细胞因子的cDNA克隆及其序列分析 [J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(6): 283-7.

[5] Williams DE, Eisenman J, Baird A, et al. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene[J]. Cell, 1990, 63(1): 167-74.

[6] Huang E, Nocka K, Beier DR, et al. The hematopoietic growth factor SL is encoded by the SL locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus [J]. Cell, 1990, 63(1): 225-33.

[7] Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG, et al. Stem cell factor is encoded at the SL locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor[J].

Cell, 1995, 23(10): 1104-14.

[8] Pietsch T, Kyas U, Steffens U, et al. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand ) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors[J]. Blood, 1992; 80(5): 1199-206.

[9] Sincock PM, Ashman LK. Expression of c-kit and functional drug efflux are correlated in de novo acute myeloid leukaemia[J]. Leukemia, 1997, 11(11): 1850-7.

[10] Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, et al. Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid malignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukemia [J]. Br J Haematol, 1996, 92(3): 562-4.

---

[回结果列表](#)