

干细胞因子 mRNA 在原代白血病细胞的表达

吴彬袁茹袁刘晓力袁尹芳袁文兰袁周淑芸第一军医大学南方医院血液科广东 广州 510515 宛

摘要目的 观察白血病原代细胞中干细胞因子(SCF) mRNA 的表达情况并探讨其与预后的关系。方法 以巢式逆转录多聚酶链反应检测了 49 例两种类型白血病骨髓原代白血病细胞中 SCF mRNA 的表达情况。结果 在 19 例急性淋巴细胞白血病(ALL)中 SCF mRNA 5 例阳性 14 例阴性。30 例急性髓性白血病(AML)中 24 例 M₁~M₄ 亚型者表达 SCF mRNA 4 例 M₅ 及 2 例 M₆ 为阴性。两组间有显著差异 P<0.05。在 29 例 SCF 阳性者中 8 例 27.6% 属难治性白血病。在 20 例 SCF 阴性者中 12 例 60.0% 为难治性白血病 P<0.05。结论 ANLL 组的 SCF 表达率显著高于 ALL。SCF 阴性提示患者预后较差其确切机制有待进一步研究。

关键词 干细胞因子; 白血病细胞; 巢式逆转录聚合酶链反应

中图分类号 R446.6; R733.7 文献标识码 文章编号 000-2588(2001)11

吴彬袁茹袁刘晓力袁尹芳袁文兰袁周淑芸第一军医大学南方医院血液科广东 广州 510515 宛

WU Bin, FENGRu, LIUXiao-li, YINFang, XUANWen-lan, ZHOUSHu-yun

Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515 China

To observe the expression of stem cell factor (SCF) mRNA in primary human leukemia cells and investigate its significance in deciding the prognosis of leukemia patients. Primary leukemia cells were isolated from the bone marrow of 49 patients with leukemia, and the expression of SCF mRNA determined by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Among the 19 patients with acute lymphatic leukemia (ALL), 5 were positive and 14 negative for SCF mRNA. In cases of acute myeloid leukemia (AML), 24 of M₁ to M₄ subtypes were found positive for SCF mRNA but 4 of M₅ subtype and 2 of M₆ subtype were negative. There was a significant difference between ALL and AML groups (P<0.05). Eight (27.6%) cases were refractory leukemia in the total of 29 patients who were positive for SCF, while 12 (60.0%) were refractory among the 20 patients negative for SCF (P<0.05). The expression rate of SCF was significantly higher in AML than in ALL cases, and the negative expression of SCF mRNA might be indicative of unfavorable prognosis, but the exact mechanism needs further investigation.

stem cell factor; leukemia cells; nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction

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。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。但 SCF 在原代白血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。

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) M₁~M₆ 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、2mmol/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。

引物 A: 5'-AATGCGTGGACTATCTGCCG-3' 引物 B: 5'-CCTGGGTCTGGGCTCTTGA-3' 引物 C: 5'-ATCTGCAGGAATCGTGTGACT-3' 引物 D: 5'-CTCGTTATCCAACAATGACT-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'-GGCAAAA-CATCCATCCCGG-3'。上述引物及探针由上海生工

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

收稿日期 001-04-06

基金项目 国家自然科学基金 (39770831) 广东省自然科学基金 (970833)

作者简介 吴彬 (1963- 男，湖南南皮人，1997 年毕业于第一军医大学，博士，主治医师。电话 020-85141617

生物工程公司合成

1.2 方法

1.2.1 逆转录反应 取肝素抗凝的骨髓 4~5ml 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 20ml 总反应液中含总 RNA 2~3mg RNAsin 40 U 0.1 mol/L DTT 2 滋 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 益孵育 90min 95 益 5min 后进行 PCR 反应

1.2.2 PCR 反应 第一步 PCR 反应在 50ml 总反应液中进行含 RT 反应液 5ml TaqDNA 多聚酶 2 U 20 pmol/ml 外侧引物 A 各 2 ml 10 伊 PCR 反应缓冲液 5 ml 2 mmol/L dNTP 5 ml 少许矿物油覆盖 PCR 循环 35 个周期 每一周期为 94 益变性 65 益 57 益退火 70 益 72 益延伸 100 益 先 95 益预变性 5min 反应终止时 72 益 10 min 第二步 PCR 反应 取 1ml 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 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 检验

2 结果

2.1 原代白血病细胞 SCF 的表达 表 1

24 例阳性为 M₁~M₄ 6 例阴性中 4 例 M₅ 2 例 M₆

表 1 不同类型白血病的 SCF 表达情况

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

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

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 M₁~M₄ 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

2.3 SCF 与临床疗效的关系 表 2

M₅ M₄ M₃ M₁ ALL 3T3 HL₆₀

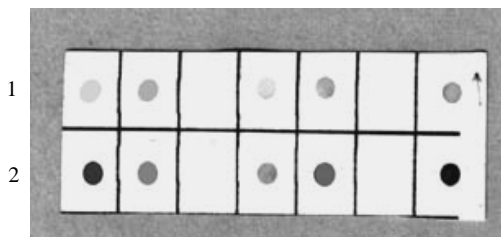


图 1 PCR 产物的斑点杂交分析结果

1. Southern blot with the first RT-PCR products; 2. Southern blot with the next RT-PCR products

表 2 SCF 表达与临床疗效的关系

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 经标准诱导化疗两个疗程未获得完全缓解 第 1 次完全缓解后 6 个月内复发者 早期复发 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 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 髓系造血基因的配体 KL 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 人骨髓基质细胞 SCF mRNA 拷贝仅为 9 依 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 M₁~M₄ 型 ANLL 均阳性 4 例 M₅ 及 2 例 M₆ 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 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^[8]曾报道，B 细胞型 ALL 表达 SCF，T 细胞型不表达，但在 M₁~M₄ 型 ANLL 均有 SCF 表达，M₅ 则无表达。与我们试验结果相符。我们还发现 2 例 M₆ 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糖蛋白受体结合来实现的^[5-7]。是否存在其他机制目前还不清楚。

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 受体糖蛋白在 T 细胞白血病细胞系 M₅、M₆ 等均有过量表达，而且此类患者的化疗疗效和预后较差，其机制是糖蛋白诱导 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^[8-10]。由于我们没有检测糖蛋白的表达，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. 糖蛋白的鉴定、纯化、和生物学特性。造血干细胞因子

tor from buffy coat conditioned medium. *Cell*, 1990, 63:195-201.

[2] Teyssier Le Discorde M, Prost S, Nandrot E. 糖蛋白的时空分布及其配体，干细胞因子表达在人类胚胎造血过程中。 *Br J Haematol*, 1999, 107(2):247-53.

[3] Ferrari S, Grand A, Manfredini R. 糖蛋白 1, 3, 6, 干细胞因子及其受体在急性白血病细胞和正常外周血淋巴细胞和单核细胞中的表达。 *Eur J Haematol*, 1993, 50:141-8.

[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。 *中华血液学杂志*, 1995, 16(6):283-7.

[5] Williams DE, Eisenman J, Baird A. 糖蛋白的鉴定。 *Cell*, 1990, 63:167-74.

[6] Huang E, Nocka K, Beier DR. 糖蛋白的造血生长因子 SL 基因编码的配体。 *Cell*, 1990, 63:225-33.

[7] Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG. 糖蛋白的造血生长因子 SL 基因编码的配体。 *Cell*, 1995, 23:1104-14.

[8] Pietsch T, Kyas U, Steffens U. 糖蛋白的造血生长因子 (糖蛋白) 对骨髓白血病细胞的增殖：异质性在反应和协同作用中的造血生长因子。 *Blood*, 1992;80(5):1199-206.

[9] Sincok PM, Ashman LK. 糖蛋白和功能性药物外流相关在急性髓系白血病。 *Leukemia*, 1997, 11(11):1850-7.

[10] Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM. 糖蛋白受体 (糖蛋白 CD117) 在大多数不成熟类型的急性髓系恶性肿瘤中表达，也是其特征性亚群的急性髓系白血病。 *Br J Haematol*, 1996, 92:562-4.

第三军医大学学报

欢迎订阅 欢迎投稿

第三军医大学学报为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术刊物。1979 年创刊以来先后被确定为《中国科技论文统计源期刊》和《中国临床医学类核心期刊》、《中国特种医学类核心期刊》、《中国综合性医药卫生类核心期刊》并被《中国科学技术期刊文摘》、《中国生物学文摘》、《中国医学文摘》、《中国期刊网》、《中国学术期刊光盘版》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》、《俄罗斯文摘杂志》、《A 辑》和《美国化学文摘》、《CA 辑》等国内外 20 余家重要数据库和权威性文摘期刊所收录。

本刊登载校内外广大医疗、教学、科研工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、科研简报、经验交流、个案与短篇等。

本刊为月刊，国内统一刊号 CN51-1095/R，国际标准刊号 ISSN1000-5404，国内邮发代号 78-91，国外邮发代号 M6529。每季定价 10.00 元，全年 120.00 元。请及时向当地邮局订阅，漏订者可直接汇款至本刊编辑部。

通讯地址：重庆市高滩岩第三军医大学学报编辑部

电话：023-68752187

传真：023-68753851

邮编：400038

E-mail: Leng@mail.tmmu.com.cn

网址: www.chinainfo.gov.cn/periodical/dsjydx/index.htm