

· 论 著 ·

造血干细胞向淋巴系祖细胞增殖分化过程中 HOXC4 基因表达的研究*

邹 艳, 刘文君[△], 翟雪松, 陈 艾

(泸州医学院附属医院儿科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨人类脐血造血干细胞(HSC)向淋巴系祖细胞增殖分化过程中 HOXC4 基因表达的情况及全反式维甲酸(ATRA)对 HOXC4 基因表达的影响。**方法** (1)采用造血干/祖细胞体外培养技术,以 ATRA 持续干扰人类造血干细胞,观察人类脐血 HSC 经植物血凝素(PHA-M)诱导后,在培养过程第 3、7、12 天的淋巴细胞集落形成单位(CFU-TL)生成情况。(2)采用实时荧光定量 PCR 技术检测 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程中 HOXC4 基因的表达水平。(3)用 RNA 表达相对量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)表示 HOXC4 基因相对表达量,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 HOXC4 基因的变化情况。**结果** (1)人脐血 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程中,HOXC4 基因呈规律的表达。(2)随培养时间推移,HOXC4 基因在增殖分化的第 7 天表达最强烈,第 12 天表达明显降低。(3)与正常组比较,ATRA 可上调 HOXC4 基因的表达。**结论** HOXC4 基因在人脐血 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程中呈现规律表达,提示 HOXC4 基因与人类造血干细胞向淋巴系祖细胞增殖分化过程密切相关,是其调控基因之一。ATRA 能显著上调 HOXC4 基因的表达。

关键词:造血干细胞;淋巴系祖细胞;HOXC4 基因;全反式维甲酸;实时荧光定量 PCR

中图分类号:R331.14

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)14-1839-03

Research of the expression of HOXC4 gene in the differentiation and proliferation of the hematopoietic stem cell to lymphocytic progenitor cell*

ZOU Yan, LIU Wen-jun[△], ZHAI Xue-song, et al.

(Department of Pediatrics, Lu Zhou Medical College, 646000, China)

Abstract: Objective To observe the expression of homeobox(HOX)C4 gene in the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cell(HSC) to lymphocytic progenitor cell. And the differentiation progress was interfered by all-trans retinoic acid(ATRA) to observe the influence of ATRA on HOXC4 gene in this experiment. **Methods** (1)By the colony culture in vitro, the impact of ATRA on the hematopoietic stem-progenitor cell(HSPC) was surveyed, then observe the cell growth of colony forming unit-T lymphocyte(CFU-TL) in the differentiation progress of hematopoietic stem cell to lymphocytic progenitor cell which induced by PHA on the third, seventh, and twelfth day. (2) the expression of HOXC4 gene in the proliferation and differentiation of the HSC to lymphocyte progenitor cell in vitro was detected with real time fluorescence quantitative polymerize chain reaction(RT-FQ-PCR). (3)The results were showed by means plus or subtracting standard deviation. **Results** (1)HOXC4 gene really has a regulatory function in the proliferation and differentiation progress of the HSC to lymphocytic progenitor cell. (2)Compared with the expression of HOXC4 gene on day 3, the quantity of HOXC4 gene was obviously higher on day 7 and lower on day 12 respectively in each group. (3)Compared with the expression of HOXC4 gene of normal group, the one of the ATRA group was up-regulated remarkably. **Conclusion** HOXC4 gene express regularly in the differentiation and proliferation of the hematopoietic stem cell to lymphocytic progenitor cell in human cord blood, which shows that there has a positive relationship between HOXC4 gene and the differentiation and proliferation of the hematopoietic stem cell to lymphocytic progenitor cell. ATRA can up-regulate the expression of HOXC4 gene.

Key words: hematopoietic stem cell; lymphocyte progenitor cell; HomeoboxC4 gene; all-trans retinoic acid; RT-FQ-PCR

许多疾病与造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的异常增殖分化有关,如:白血病就是 HSC 突变所致的克隆性恶性肿瘤^[1]。HOX 基因在造血细胞中表达,研究发现 HOX 基因在造血细胞内异常表达可促进急性白血病的发生和发展^[2]。同时也有研究发现 HOX 基因的表达受全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)调控^[3]。本文采用造血干/祖细胞体外培养技术,实时荧光定量 PCR 等技术,研究人类 HSC 向淋巴系祖细胞的正常增殖分化过程中 HOXC4 基因的表达情况。同时以 ATRA 为诱导剂,持续干扰培养体系,探讨人类 HSC 向淋巴系祖细胞的正常增殖分化过程中 HOXC4 基因的表达情况及 ATRA 是否能调节 HOXC4 基因的表达。

1 资料与方法

1.1 脐血标本来源 10 例脐血标本均来自本院产科,为正常足月顺产新生儿断脐后的胎盘段脐带血,孕母均健康。

1.2 ATRA 由泸州医学院药房配制提供,浓度 50 $\mu\text{mol/L}$,使用前分装,以 RPMI-1640 培养液稀释后,加入培养体系的终浓度为 $6 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

1.3 脐血单个核细胞(CBMC)的分离及造血祖细胞培养 CBMC 的分离采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法,淋巴系造血祖细胞培养方法按照本室建立的方法进行^[4],采用小牛血清体外细胞培养法加以改进。培养体系为:CBMC 悬液 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ 、10%小牛血清、1%植物血凝素(PHA-M)、10%的 PHA-

* 基金资助:四川省教育厅重点基金资助项目(2004A058)。 [△] 通讯作者,电话:13980259012;E-mail:lwjlyfy@yahoo.com.cn。

表 1 目的基因的引物及探针序列

项目	上游引物	下游引物
HOXC4	5'-AGCAACCCATAGTCTACCCA-3'	5'-GTGGTCCTTCTCCATTTCA-3'
GAPDH	5'-CCTCAAGATCATCAGCAAT-3'	5'-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3'
HOXC4-TM	5'-FAM-CTGTCTCGAGCGCTTGGGT-TAMRA-3'	
GAPDH-TM	5'-FAM-ACCACAGTCCATGCCATCAC-TAMRA-3'	

TCM, 5×10^{-4} mmol/L 2-巯基乙醇(2-ME)、ATRA(6×10^{-8} mol/L)、适量的 RPMI-1640 培养基。

1.4 实验分组 (1)正常组:不加 ATRA,代之以等量的 RPMI-1640 培养液。(2)ATRA 组:在培养体系分组中加入 ATRA,终浓度 6×10^{-8} mol/L。

1.5 HOXC4 基因表达的检测

1.5.1 细胞总 RNA 提取 按 TrizolTM RNA Isolation Reagent RNA 提取液说明书进行,提取细胞总 RNA,经无 RNA 酶的 DNA 酶消化去除残留的 DNA,分袋 -80°C 冻存。

1.5.2 逆转录步骤 取 2 μL 总 RNA,按 SuperscriptTM 逆转录试剂盒说明书进行逆转录,得到模板 cDNA 于 -10°C 保存备用。

1.5.3 引物与探针的设计与合成 设计的引物及探针序列如表 1。

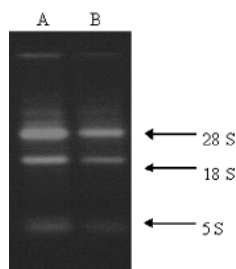
1.5.4 常规 PCR 扩增 以 cDNA 为模板,以人磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照基因进行 PCR 扩增。其扩增的 cDNA 产物于 1.2% 琼脂糖上电泳,紫外照相,进行成像分析,同时 -20°C 保存用于实时荧光定量 PCR 扩增检测。

1.5.5 实时荧光定量 PCR 扩增 HOXC4 基因 反应体系在 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪上行 PCR,对 PCR 反应过程中的每一循环的系统荧光强度进行实时(real-time)检测,通过对荧光强度的分析来达到等量检测的目的。扩增条件:(1) 94°C 1 min。(2) 94°C 10 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min,45 个循环。

1.6 数据分析及统计学方法 数据由 FTC2000 型荧光定量 PCR 仪自带软件完成,根据比较阈值法计算出目的基因(HOXC4)的相对含量,目的基因的相对含量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。以 $\bar{x} \pm s$ 表示 HOXC4 基因的变化情况,使用单因素方差分析,组间均数两两比较用 LSD 法,两组间基因相对表达量比较采用配对设计 *t* 检验,所有统计工作由统计软件 SPSS15.0 完成。

2 结果

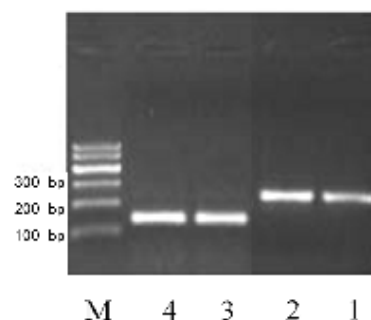
2.1 总 RNA 电泳图 提取的总 RNA 有 28 S、18 S、5 S 共 3 条清晰的电泳带(图 1),无 DNA 污染条带,无明显降解条带,表明提取的总 RNA 纯度较高,可用于 PCR 扩增。



A: 正常组; B: ATRA 组。

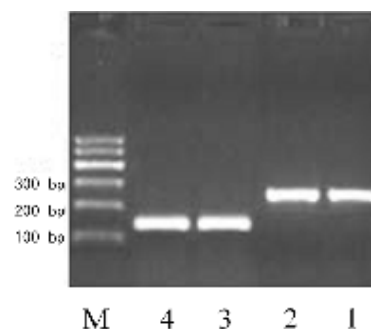
图 1 总 RNA 电泳图

2.2 HOXC4 基因扩增电泳图 第 3、7、12 天各个时间点 HOXC4 基因电泳条带在两组中均表达明显,见图 2~4。



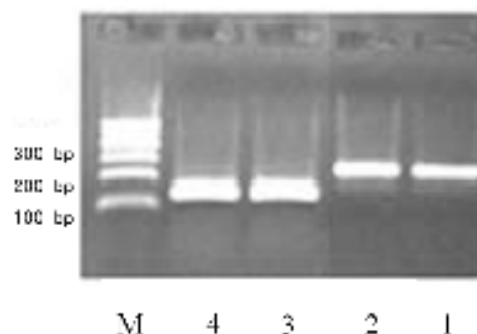
1,2 为 HOXC4;3,4 为 GAPDH 内参基因;1,3 为正常组;2,4 为 ATRA 组。

图 2 HOXC4 基因 PCR 电泳图(第 3 天)



1,2 为 HOXC4;3,4 为 GAPDH 内参基因;1,3 为正常组;2,4 为 ATRA 组。

图 3 HOXC4 基因 PCR 电泳图(第 7 天)



1,2 为 HOXC4;3,4 为 GAPDH 内参基因;1,3 为正常组;2,4 为 ATRA 组。

图 4 HOXC4 基因 PCR 电泳图(第 12 天)

2.3 正常组中 HOXC4 基因的表达情况 HOXC4 基因在 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程的各培养时间点均表达。随着时间的推移,HOXC4 基因的表达于第 7 天达高峰(表 2),这与在倒置显微镜下观察到的细胞集落生长情况一致。表明 HOXC4 与 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程密切相关,且

可能是其主控基因之一。

表 2 正常组 HOXC4 基因在不同时间点的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

时间(d)	n	HOXC4-mRNA 表达
3	10	0.91±0.04
7	10	1.34±0.05*
12	10	0.87±0.03◆▲

与第 3 天表达情况比较,* : P<0.05;与第 3 天表达情况比较,◆ : P>0.05;与第 7 天表达情况比较,▲ : P<0.05。

表 3 ATRA 对 HOXC4 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	HOXC4-mRNA 表达		
	3 d	7 d	12 d
正常组	0.91±0.04	1.34±0.05	0.87±0.03
ATRA 组	1.07±0.10*	1.64±0.19*	1.02±0.09*

与正常组相同时间点比较,* : P<0.05。

2.4 ATRA 对 HOXC4 基因表达的影响 ATRA 组 HOXC4 基因的表达在各时间点均比正常组明显上调,这与在倒置显微镜下观察,ATRA 组集落生长较正常组好的情况相一致。表明 ATRA 能上调 HOXC4 基因的表达。且随着时间的推移,第 7 天时,正常组和 ATRA 组 HOXC4 基因的表达均最强,而第 12 天时表达明显降低(表 3)。提示 ATRA 可能通过调控 HOXC4 基因的表达影响造血干/祖细胞的增殖分化。

3 讨 论

HOX 基因以其种族特异性和阶段特异性方式在造血细胞增殖分化中起调控作用。HOX 家族基因各亚族在不同的造血细胞中表达有所不同,并在造血的不同阶段发挥各自的作用^[5]。越来越多的证据表明,在造血细胞内,HOX 基因的异常表达可使细胞分化成熟障碍,造血能力降低,甚至可以导致血液系统疾病的发生和发展。

HOXC 簇基因主要参与淋巴系的造血,Daga 等^[6]研究表明整个胸腺细胞发育过程中均有 HOXC4 的表达。HOXC4 在 CD34⁺ 细胞中过量表达可增强集落形成细胞和早期细胞的增殖潜能,而且长期培养启动细胞(LTC-IC)明显扩增,因而认为 HOXC4 也是一种促进造血的早期调控因子。HOXC4 同源蛋白激活 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞及自然杀伤细胞的增殖和分化。有研究也发现 HOXC4、HOXC6 在 B 和 T 淋巴细胞成熟过程中表达。HOXC4、HOXC6 基因随着淋巴系细胞的分化,其表达水平进一步上升。这些结果说明,HOXC4 不仅与淋巴系细胞发育和分化有关,而且参与了早期造血调控。本实验中 HOXC4 基因在正常组、ATRA 组均表达。且在表达上呈现时间规律性,即 HOXC4 基因在 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化的第 3 天开始表达,随时间推移,第 7 天表达最强烈,第 12 天表达明显降低。同时,镜下观察细胞生长情况,第 3 天细胞集落开始形成,随时间推移,第 7 天时细胞集落最密集,第 12 天细胞集落明显减少。可知,HOXC4 基因与 HSC 向淋巴系祖细胞的正常增殖分化过程密切相关,其表达强弱与细胞集落的形成呈现一致性。提示 HOXC4 基因可能是淋巴系增殖分化的主控基因之一。

ATRA 是一种可诱导某些癌变细胞向正常细胞逆转或分

化的药物,目前已在临床上被广泛用于癌症特别是急性早幼粒白血病(AML)的治疗。研究表明这种作用实现的前提之一是维甲酸受体 α (RAR α) 的活化,另一方面是由于同源盒 HOX 家族基因的存在。RAR α 被维甲酸激活后,可与某些 HOX 基因 5'调控区上的 ATRA 应答元件(RARE)结合,重新启动特定白血病细胞(如 HL-60、NB4)因癌变而关闭了的分化程序,实现 ATRA 诱导癌变细胞向成熟分化的治疗效应^[7]。

有研究报道 ATRA 能刺激粒系白血病细胞向终末细胞分化,而且 ATRA 在哺乳动物胚胎时期就可以干扰造血干/祖细胞的增殖^[8]。郝思国等^[9]认为,浓度为 10⁻⁶ ATRA 能诱导 HSPC 向粒系分化而抑制其向红系和巨核系分化,同时增加扩增细胞的凋亡,提示较高浓度对 HSPC 的扩增不利,小剂量 ATRA 能够促进 HSPC 的扩增,减少扩增细胞的凋亡。本实验在研究大量文献的基础上,用终浓度为 6×10⁻⁸ mol/L 的 ATRA 加入正常培养体系进行诱导,结果发现,在此浓度下 ATRA 能显著上调 HSC 向淋巴系祖细胞增殖分化过程中 HOXC4 基因的表达,但 ATRA 浓度与 HOXC4 基因表达量的关系如何,改变 ATRA 浓度将如何影响 HSC 向淋巴系祖细胞的增殖分化过程,还需要更进一步的研究。

参考文献:

- [1] 曾韞,娄世锋,张萍,等. 49 例急性白血病细胞遗传学分析[J]. 重庆医学,2008,37(18):2057.
- [2] Choll C, Bansal D, Döhner K, et al. The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4):865.
- [3] Bel-Vialar S, Itasaki N, Krumlauf R. Initiating HOX gene expression in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HOXB genes in two distinct groups[J]. Development, 2002, 129(22):5103.
- [4] 刘文君,刘斌,郭渠莲,等. 更昔洛韦和黄芪对巨细胞病毒感染所致造血祖细胞增殖抑制的影响[J]. 中华儿科杂志,2004,42(7):490.
- [5] Morgan R, Whiting K. Differential expression of HOX genes upon activation of leukocyte sub-populations[J]. Int J Hematol, 2008, 87(3):246.
- [6] Daga A, Podesta M, Capra MC, et al. The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34⁺ cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors[J]. Exp Hematol, 2000, 28(5):569.
- [7] Urahama N, Ito M, Sada A, et al. The role of transcriptional coactivator TRAP220 in myelomonocytic differentiation[J]. Genes Cells, 2005, 10(12):1127.
- [8] Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling[J]. Exp Hematol, 2005, 33(9):1055.
- [9] 郝思国,孙关林,邬维礼. 全反式维甲酸对人脐血 CD133⁺ 细胞体外短期扩增中生物学特性的影响[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(11):689.