

· 论 著 ·

造血干细胞移植患者骨髓单个核细胞幼红巨噬细胞黏附蛋白表达的探讨*

毛晓露^{1,2#}, 刘 峰¹, 李归宁¹, 陈治中¹, 胡丽华^{1△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院输血科, 武汉 430022; 2. 武汉市中心医院检验科 430014)

摘要:目的 研究造血干细胞移植(HSCT)患者骨髓造血功能与幼红巨噬细胞黏附蛋白(EMP)表达的关系。方法 抽取 46 例 HSCT 患者移植前(HSCT 前组)及移植后 30、90、180 d(HSCT 后 30、90、180 d 组)骨髓 3~5 mL,另选 10 例健康骨髓捐献者作为正常对照组,分离骨髓单个核细胞。用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 EMP 核酸和蛋白的表达,分析 EMP 表达与骨髓造血功能之间的关系。结果 各实验组均可检测到 EMP mRNA 表达,其中 HSCT 前组 EMP mRNA 表达最低,红系造血岛数量最少。正常对照组和 HSCT 前组未检测到 EMP 蛋白。HSCT 后各组均检测到 EMP 蛋白,结果无明显差异($P>0.05$),其 EMP mRNA 表达水平和红系造血岛数量均明显高于 HSCT 前组和正常对照组($P<0.05$)。结论 EMP 的表达与红系造血岛的数量有关,在评价骨髓造血功能时有一定的应用价值。

关键词:幼红巨噬细胞黏附蛋白;造血干细胞移植;单个核细胞;红系造血岛

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.003

中图分类号:R457.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)24-3309-03

Erythroblast macrophage protein expression in mononuclear cells in bone marrow of patients after hematopoietic stem cell transplantation*

MAO Xiao-lu^{1,2#}, LIU Feng¹, LI Gui-ning¹, et al.

(1. Department of Blood Transfusion, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Central Hospital of Wuhan, 430014, China)

Abstract: Objective To explore the Erythroblast macrophage protein(EMP)mRNA and protein expression in patients before and after hematopoietic stem cell transplantation(HSCT). **Methods** With the RT-PCR and Western blot method, the expression of EMP mRNA and protein in mononuclear cell(MNC)of bone marrow(BM) were measured in 10 healthy donors and 46 patients with hematologic diseases before HSCT and in 30,90 and 180 days after HSCT respectively. The morphology of bone marrow cells was also checked by Wright/Giemsa staining and erythroblastic islands were counted to evaluate the hematologic function of bone marrow. **Results** The expression of EMP mRNA and the erythroblastic islands count were lowest in the group before HSCT among all the five experiment groups($P<0.05$). The EMP protein were not detectable in the donor group and the group before HSCT. In the three groups after HSCT, the erythroblastic islands count and the expression of EMP mRNA and protein were higher than that of the other two groups respectively($P<0.05$), but there were no significant deference among the three groups($P>0.05$). **Conclusion** The expression of EMP correlates with its role in erythroblastic island formation and it may have some potential implications to evaluate the hematologic function of bone marrow.

Key words: erythroblast macrophage protein; bone marrow transplant; hematopoiesis; erythroblastic island

幼红巨噬细胞黏附蛋白(erythroblast macrophage protein, EMP)是一种表达于红系造血岛中心巨噬细胞和周围幼红细胞表面的黏附蛋白,可介导红细胞和巨噬细胞之间的相互作用,参与红细胞的成熟与分化^[1]。造血干细胞移植(HSCT)是血液病患者和肿瘤患者常用的治疗方法,常以骨髓红系造血岛的形成和增殖作为 HSCT 成功的指标,但临床上骨髓造血分子机制还不清楚。本文旨在探讨 EMP 表达和骨髓造血功能的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 46 例 HSCT 移植患者均来自 2008 年 6 月至 2009 年 11 月本院血液科住院患者,均符合血液病的相关诊断标准^[2]。31 例接受异体移植,均为未去除 T 细胞的 HLA 相合的供者骨髓;15 例接受自体移植。其中男 20 例,女 26 例,

平均年龄 32 岁;慢性粒细胞性白血病 26 例,急性粒细胞性白血病 8 例,多发性骨髓瘤 6 例,何杰金淋巴瘤 3 例,再生障碍性贫血 3 例,均经骨髓细胞形态学、细胞化学染色及免疫表型分析确定。分别在 HSCT 前(HSCT 前组)和 HSCT 后 30、90、180 d(HSCT 后 30、90、180 d 组)抽取骨髓 3~5 mL。另选 10 例健康骨髓捐献者作为正常对照组,其中男 6 例,女 4 例,平均年龄 28 岁。

1.2 试剂 Ficoll 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂),总 RNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司,德国),cDNA 逆转录试剂盒(Fermentas 公司,美国),引物(TaKaRa 公司,中国),兔抗人 EMP 抗体(Abcam 公司,美国),羊抗鼠 actin 抗体(Abcam 公司,美国),蛋白质相对分子质量标准(BIO-RAD 公司,美国),Western blot 检测试剂盒(Santa 公司,美国)。

* 基金项目:湖北省卫生厅重点专项资助课题(CGX2008-2)。 # 华中科技大学 2008 级博士研究生。 △ 通讯作者,E-mail: xhhLh@126.com。

1.3 形态学分析 骨髓涂片经瑞氏染色,在光镜下至少观察 200 个有核细胞,并计数有核红细胞的比例,观察骨髓增生程度并计数红系造血岛的数量。

1.4 骨髓单个核细胞的分离 采集骨髓 3~5 mL,用 EDTA-K₂ 抗凝,采用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞。将骨髓与相同体积的 Hank 液混匀制成细胞悬液,缓慢加入淋巴细胞分离液,细胞悬液与总体积比约为 2:3,以 2 000 r/min、4 °C 离心 30 min,吸取上中层液面的单个核细胞层,再用 Hank 液洗涤 3 次备用。

1.5 EMP mRNA 的 RT-PCR 分析 取分离好的单个核细胞,提取细胞总 RNA,将 mRNA 逆转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。EMP 上游引物为:5'-ACC CGA CCC TCA AGG TGC CC-3',EMP 下游引物为:5'-GTG GCC GTC TCA CGC CTC TC-3',片段长度为 475 bp。 β -actin 作为内参照,其上游引物为:5'-TTC CTG GGC ATG GAG TCC T-3', β -actin 下游引物为:5'-TGA CTT CAT TGT GCT GGG TG-3',片段长度为 187 bp。标准 20 μ L 反应体系中包括 2 μ L cDNA,2 μ L 10 \times 反应 buffer,2 μ L MgSO₄ (25 mmol/L),10 μ L RNase FreeH₂O,1 μ L Taq(0.5 u),1 μ L dNTP(10 mM),上游和下游引物(10 pmol/L)各 1 μ L。扩增条件为:95 °C 60 s,60 °C 45 s,72 °C 60 s,共 30 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳,并测定 EMP/ β -actin 灰度值。任取 3 份 PCR 产物进行测序。

1.6 Western blot 分析 取分离好的单个核细胞,加入适量裂解液裂解 30 min 后移至 1.5 mL 离心管中,以 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min,取上清液,加入上样缓冲液,煮沸 5 min。取标本 60 μ g 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转移至 PVDF 膜,用封闭液进行封闭,加入 EMP 一抗,孵育、洗涤,再加入羊抗鼠二抗,孵育、洗涤、X 光胶片上曝光、显影、定影,将胶片进行扫描,测定 EMP/ β -actin 灰度值。

1.7 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学分析结果 所有标本均经骨髓细胞形态学分析以评估骨髓的造血功能,HSCT 后 30、90、180 d 组分别与正常对照组和 HSCT 前组比较,红系造血岛数量均明显增加($P < 0.05$),HSCT 后 30、90、180 d 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

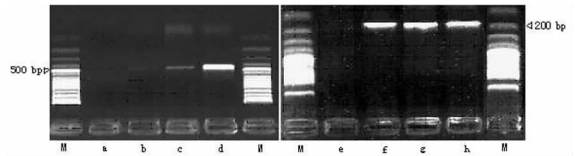
表 1 骨髓细胞形态学分析($\bar{x} \pm s$)

组别	骨髓增生程度	造血岛数量(个)
正常对照组	活跃	21.4 \pm 4.5
HSCT 前组	低下或极度低下	3.2 \pm 1.4
HSCT 后 30 d 组	活跃	43.3 \pm 4.1*
HSCT 后 90 d 组	非常活跃	46.2 \pm 3.6*
HSCT 后 180 d 组	活跃	44.7 \pm 4.2*

*: $P < 0.05$,与正常对照组、HSCT 前组比较。

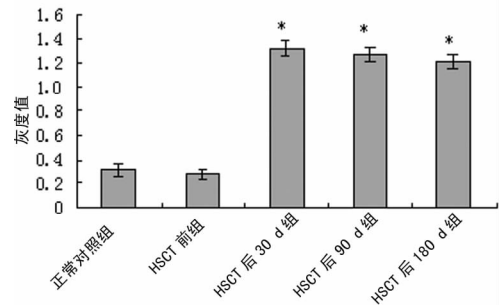
2.2 EMP mRNA 的检测 RT-PCR 产物经测序证实与 NM-001017405 同源。正常对照组和 HSCT 前组骨髓 EMP/ β -actin 平均灰度值分别为 0.31 \pm 0.05 和 0.28 \pm 0.04。HSCT 后 30、90、180 d 组患者骨髓 EMP/ β -actin 平均灰度值分别为 1.32 \pm

0.07、1.27 \pm 0.06、1.21 \pm 0.06,此 3 组分别与正常对照组、HSCT 前组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),HSCT 后 30、90、180 d 组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1、2。



左为 EMP 基因;右为 β -actin 基因;M 为 Marker;a、e 为空白对照;其他为骨髓标本。

图 1 骨髓单个核细胞 EMP mRNA 电泳图



*: $P < 0.05$,与正常对照组、HSCT 前组比较。

图 2 骨髓单个核细胞 EMP/ β -actin 灰度值

2.3 EMP 蛋白的检测 正常对照组和 HSCT 前组中未检测到 EMP 蛋白,而在 HSCT 后 30、90、180 d 组均能检测到 EMP 蛋白,其 EMP/ β -actin 平均灰度值分别为 0.42 \pm 0.03、0.38 \pm 0.04 和 0.41 \pm 0.03,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。1 年后,随访 8 名 HSCT 患者,复查骨髓造血岛数量有所减少,骨髓增生程度显示为活跃,用相同方法进行检测,结果均呈阴性。

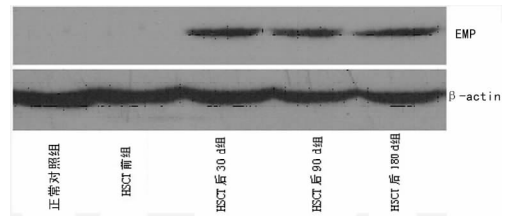


图 3 EMP 蛋白表达的 Western blot 检测结果

3 讨论

红系造血岛存在于胎儿肝脏和成人骨髓中,以巨噬细胞为中心及其周围不同成熟阶段的红细胞组成^[1,3-5]。虽然已了解造血岛的细胞组成,但是其细胞之间相互作用的分子基础还不是很清楚。红细胞-巨噬细胞、红细胞-红细胞之间均发生广泛的相互作用,促进红细胞去核化和最终成熟。在红细胞的终末分化中,红细胞和巨噬细胞均表达许多细胞黏附蛋白^[6-9],但只有少数明确的分子支持红系造血岛的形成。其中最早发现的黏附蛋白是红细胞上的 $\alpha_4\beta_1$ 整联蛋白和巨噬细胞上的 VCAM-1^[10]。目前研究已较清楚的还有巨噬细胞表达的 α_v 整联蛋白和红细胞间黏附蛋白 ICAM-4 之间的相互作用^[11]。

EMP 是首先由 Hanspal 和 Hanspal^[1] 发现的表达于骨髓红系造血岛中心巨噬细胞和幼红细胞表面的一种新的黏附蛋白,参与红细胞和巨噬细胞之间的相互作用,是红细胞成熟分

化所必需的黏附蛋白^[3-5]。HSCT 是血液病患者和肿瘤患者常用的治疗方法,从形态上观察骨髓红系造血岛的重建或增加是 HSCT 成功的常用标准^[12]。然而,形态学判断造血情况具有一定的主观性。本研究检测 46 例进行 HSCT 患者移植前、后骨髓中 EMP 在核酸和蛋白水平表达的变化,结合骨髓涂片的形态特征,研究 EMP 表达与骨髓造血功能之间的关系。

所有实验组中,HSCT 前组 EMP mRNA 表达最低,EMP/ β -actin 平均灰度值为 0.28 ± 0.04 ,骨髓涂片显示骨髓增生低下或极度低下,造血岛数量最少,平均造血岛数为 (3.2 ± 1.4) 个;HSCT 后 30、90、180 d 组和正常对照组 EMP/ β -actin 平均灰度值分别为 1.32 ± 0.07 、 1.27 ± 0.06 、 1.21 ± 0.06 和 0.31 ± 0.05 ,均显示骨髓增生活跃(表 1)。与 HSCT 前组和正常对照组相比,HSCT 后 30、90、180 d 组 EMP mRNA 表达水平和造血岛数量均明显增高($P < 0.05$),3 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 产物序列经测序证实与 NM-001017405 同源,即人类幼红巨噬细胞黏附蛋白 mRNA 序列。虽然所有实验组均可检测到 EMP mRNA 表达,但只在 HSCT 后 30、90、180 d 组中检测到 EMP 蛋白表达,且这 3 组之间核酸和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组和 HSCT 前组未检测到 EMP 蛋白,可能与这两组造血岛数量和检测方法的灵敏度有关,只有当造血岛达到一定数量才能用 Western blot 方法检测到 EMP 蛋白。HSCT 1 年后 8 位随访者骨髓造血岛数量有所减少,用相同方法检测不到 EMP 蛋白。以上结果表明,随着骨髓造血岛数量增加,EMP mRNA 表达也有所增加,EMP 蛋白为阳性时,其 EMP mRNA 的表达水平明显高于 EMP 蛋白呈阴性的标本,此结果尚需进一步证实。

总之,本研究在临床上证实了 EMP 的表达与骨髓造血岛的形成有密切的关系,对评估骨髓造血功能有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30 kD heparin-binding protein is involved in this contact[J]. *Blood*, 1994, 84(15): 3494.
- [2] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科

学出版社,1998:33.

- [3] Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages [J]. *Blood*, 1998, 92(8): 2940.
- [4] Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 1997, 4: 142.
- [5] Chasis JA. Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13: 137.
- [6] Nemer P, Gane Y, Colin, et al. The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16686.
- [7] Southcott M, Tanner M, Anstee D. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system [J]. *Blood*, 1999, 93: 4425.
- [8] Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 1997, 4: 142.
- [9] Parsons SF, Spring FA, Chasis JA, et al. Erythroid cell adhesion molecules Lutheran and LW in health and disease [J]. *Bailliere Clin Hematol*, 1999, 12: 729.
- [10] Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen-4 Vascular cell adhesion molecule-1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands [J]. *J Exp Med* 1995, 181: 411.
- [11] Mankelov TJ, Spring FA, Parsons SF, et al. Identification of critical amino-acid residues on the erythroid intercellular adhesion molecule-4 (ICAM-4) mediating adhesion to alpha integrins [J]. *Blood*, 2004, 103: 1503.
- [12] Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(2): 108.

(收稿日期:2010-06-18 修回日期:2010-07-22)

(上接第 3308 页)

- 内皮祖细胞分离和培养 [J]. 郧阳医学院学报, 2009, 28(5): 448.
- [10] 陈剑飞, 黄岚, 宋明宝, 等. 高敏 C 反应蛋白对骨髓内皮祖细胞的黏附和增殖抑制作用 [J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2559.
- [11] 姜靖, 黄岚, 赵晓辉, 等. Klotho 水平与小鼠月龄相关并抑制其骨髓源性内皮祖细胞衰老 [J]. 重庆医学, 2009, 38(24): 3111.
- [12] Allegra A, Coppolino G, Bolignano D, et al. Endothelial progenitor cells: pathogenetic role and therapeutic perspectives [J]. *J Nephrol*, 2009, 22(4): 463.
- [13] Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endotheli-

al progenitor cells [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(8): 890.

- [14] Müller P, Kazakov A, Jagoda P, et al. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 106.
- [15] Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(9): 1584.
- [16] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3): 413.

(收稿日期:2010-08-02 修回日期:2010-08-19)