

Microsatellite DNA and its application prospect in radiation field

SHI Shuang

(Department of Radiation Medicine, Beijing University, Beijing 100083, China)

Abstract Microsatellite DNA is the main part of repeat sequence in eukaryotic genome. Ubiquitous distribution, high polymorphism, low spontaneous mutation and easy for detection, all these characters make it an ideal genetic marker for gene localization, gene mapping, population study, individual identification, etc. Besides, it also closely correlates with some tumors and genetic disorders. In radiation field, microsatellite DNA has also been widely used in detecting ionizing radiation induced mutagenesis, teratogenesis and carcinogenesis.

Key words microsatellite DNA; ionizing radiation

文章编号: 1001-098X(2000)05-0234-03

造血干细胞“归巢”机制的探讨

姜福全

(第二军医大学放射医学教研室, 上海 200043)

摘要: 近年来, 诸如骨髓、外周血、脐血等多种来源的造血干细胞(HSC)移植在临床上日益广泛地开展起来, 同时关于干细胞归巢机制的研究也有所进展。造血干细胞的归巢是一个多步骤过程。经研究发现, 在归巢中涉及了干细胞表面和造血微环境中的一系列分子与细胞因子。本文综述了其中一些研究较多的分子与因子, 并对今后的研究提出了自己的看法。

关键词: 造血干细胞; 归巢

中图分类号: R331.2

文献标识码: A

目前常用的移植方法是从外周静脉输注造血干细胞(HSC), HSC随血液循环, 最初出现在包括骨髓、脾、肝、肺、甲状腺等多个器官, 而后特异性地停留在骨髓(鼠类还有脾)中, 这一过程称为“归巢”。目前认为, HSC的“归巢”经历了一系列过程: ① HSC与骨髓微血管内皮结合; ② 结合的HSC通过内皮进入血管外; ③ HSC与骨髓微环境中的基质细胞结合^[1]。

许多研究者针对HSC“归巢”中要通过内皮细胞屏障这一过程进行了研究。Shirota等将小鼠全身照射100~200cGy剂量, 然后在电子显微镜下研究小鼠骨髓内的变化, 主要发现内皮细胞的浆膜出现分离和脱落, 尤其是在其靠近血管腔的一面; 另外内皮细胞肿胀, 核周空间的扩大也反映了内皮细胞屏障的破坏; 并且发现在低剂量照射的时候这些变化是可逆的, 在1~2周内恢复; 而大剂量照射就使骨

髓与血液屏障受到的破坏不能被修复^[2]。Hendrikx等将纯化的干细胞用荧光染料PKH-26标记后分别移植给经致死量(1000cGy)照射的小鼠和未照射的小鼠, 结果发现干细胞在未照射小鼠中的“归巢”数目比照射小鼠高2.5倍^[3]。Stewart等用50~100cGy剂量预处理小鼠后, 再移植 $10 \times 10^6 \sim 40 \times 10^6$ 个骨髓细胞, 可达到40%~100%的嵌合率, 其原因是100cGy的照射仅对干细胞有毒性, 而对骨髓中其他成份无毒性, 因而对宿主和供者干细胞的比较起到了调节作用, 从而证明了低剂量照射对于提高移植效率是有益的^[4]。

正常成人由骨髓造血, 骨髓中的HSC存在于“龛位”中, 龛位由成纤维细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等多种基质细胞构成, 骨髓中的这些基质细胞合成、分泌大量的细胞外基质分子, 包括胶原蛋白I、II、III、IV型, 各种糖蛋白如纤维结合素、层粘连蛋白、血小板凝血酶敏感蛋白等, 各种粘多糖如透明质酸、软骨素衍生物和硫酸乙酰肝素等。这些基质细胞和这些特异的骨髓细胞外基质构成了造血微环境, 这对造血干细胞的生存、增殖起重要作用^[5]。

首先, 体外实验尤其是骨髓细胞长期体外培养

收稿日期: 2000-04-06

作者简介: 姜福全(1978-), 男, 山东烟台人, 第二军医大学硕士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目(39770329)

审校者: 第二军医大学放射医学教研室 项莺松

(LTMC)中,发现了一些在归巢中可能起作用的分子。Mohle R等设计了一个体外实验模型:将人的骨髓内皮细胞系 BMEC-1在 3 μ m 微孔膜上培养,无需生长因子,这些骨髓内皮细胞就可增殖,并像体内一样可在细胞表面表达粘附分子,由于接触抑制,它们不能无限增殖,于是在膜上形成了单层骨髓内皮细胞。由 G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)动员到外周血的 CD34⁺ 细胞被加到 BMEC-1 细胞层上,通过 BMEC-1 的 CD34 细胞表面 CD38 相对高, L-selectin 相对低,且有统计学意义,而加用 LFA-1(leukocyte function-associated antigen 1)抗体后通过 BMEC-1 细胞层的 CD34 细胞明显减少,提示这些分子可能在归巢中起作用^[6]。

Schofield 等^[7]证实, E-selectin 和 VCAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) 在内皮细胞 (HMECs) 上有表达,而且使用 E-selectin 抗体预处理内皮细胞后,动员的 CD34⁺ 细胞与 IL- β 刺激的骨髓内皮细胞粘附抑制率达 93.9%,而 VCAM-1 抗体无此明显作用,抑制率仅 5.4% 左右。

RAO 等^[8]在体外实验发现,用 ICAM-1 抗体处理骨髓基质细胞明显减少了 CD34⁺ 细胞与基质细胞的粘附,并且经电泳证明其分子量为 85 000,从而推测 ICAM-1 在归巢过程中亦起作用。

Konno M 等亦做了 LTMC 的研究:当体系中加入甘露糖 mannosyl-BSA 后,培养体系中的细胞总数和 CFU-C (colony-forming unit-culture) 数目上升速度均于 1 周后明显下降,当去除 mannosyl-BSA 后这种抑制作用又消失,而半乳糖也有相似的作用。Hardy CL 等实验证实脾切除的动物模型中 gal/man (半乳糖 甘露糖) 仍对植入有抑制作用,使 CFU-S (colony-forming unit-spleen)、CFU-C 明显下降,从而证实了 Konno M 的结果^[9]。

Papayannopoulou 等^[10]发现,干细胞表面 VLA-4 的和骨髓基质中的 VCAM-1 在归巢中作用较大。用 VLA-4 抗体预处理供鼠干细胞之后再将其移植给经致死剂量照射的小鼠,相对于未经 VLA-4 抗体预处理的对照组, HSC 的归巢在移植后 3h 明显减少,而外周血和脾中的 HSC 增多;用 VCAM-1 抗体预处理受鼠可观察到相似的结果。另外,用 VLA-4 抗体或 VCAM-1 抗体处理正常鼠可诱导 HSC 动员,从而也证实了动员和归巢在分子机制上是相关的。VLA-4 的配体除了 VCAM-1 之外,还有 CS1, 但用 CS1 预处理骨髓细胞和 CS1 抗体处

理受鼠不降低 CFU-S 数目;而 VLA-4 抗体和 VCAM-1 抗体同时应用或单独应用其中一种,植入效率无统计学的差异^[10]。这与 Jacobsen K 研究结果相一致,从而证实了 VLA-4 和 VCAM-1 在归巢中起作用^[11]。这一观点同时得到 Vermulen M 等的证实,并进一步指出, VLA-4/VCAM-1 仅在骨髓中起作用,而 CD44 则在骨髓和脾中皆起作用^[12]。Papayannopoulou 等进一步探索了 VLA-4/VCAM-1 的作用机制,他们使用 HGFR 缺陷鼠、IL-7R 缺陷鼠、IL-3R 缺陷鼠、W/W^v 鼠、S1/S1^d 鼠等一系列动物模型,结果发现 VLA-4 的作用不依赖于 G-CSF、IL-7 和 IL-3,但依赖于 kit,并且使用 VLA-4 抗体后 c-kit 下调^[13]。Prosper T 也证实了虽然 CD34 细胞表面有 $\alpha\beta 1$ 与 $\alpha\beta 1$ 表达,但干细胞粘附微环境只依赖于 $\alpha\beta 1$ 而非 $\alpha\beta 1$ 。VLA-4/VCAM-1 即属于 $\alpha\beta 1$ ^[14]。

许多细胞因子,诸如 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)、KL (kit ligand)、IL-1、IL-7、IL-8、IL-11 等皆可促进干细胞动员,增加外周血中的干细胞数目。起初假设细胞因子可能的机制有二:①增加了外周血干细胞池的大小,这可能是细胞因子促增殖或减少凋亡的作用;②不改变在骨、脾、外周血中的干细胞总数目,而只是重新分配^[5]。Papayannopoulou T 和 Charles F 等发现,在灵长类和鼠类中使用 VLA-4 抗体和 G-CSF 或 kit ligand (SCF) 比单用任一种有更明显的动员效果,从而证实了 integrin 抗体与细胞因子在动员干细胞上有协同作用^[15]。Prosper 等^[14]发现:G-CSF 动员后的外周血 CD34⁺ 细胞 VLA-4 表达减少。Bellucci R 等^[16]也证实了 G-CSF 诱导动员使 CD34 细胞 VLA-4、L-selectin、c-kit、LFA-1 下调。

Shiota Y 等在此方面的工作也探讨了细胞因子的作用机制:在体外实验中,用 IL-3、GM-CSF 培养骨髓细胞,增加了植入效率,并且用¹²⁵I 标记的糖蛋白探针检测受体上调,此后在体内研究中用 IL-3、GM-CSF 培养两个克隆的细胞系 FDCP-1 和 FDCP-miX,结果发现每个细胞系上受体呈剂量依赖性上调,这与中性粒细胞粘附分子上调而提高肺内皮粘附相似,并且发现归巢受体合成、转移到膜受体细胞因子促进,而细胞因子不影响受体代谢^[17]。

虽然目前在干细胞归巢机制上有所进展,但其中的信号转导通路尚不清楚。除了已发现的分子之外,在归巢过程中还可能有其他干细胞表面受体参

与;而就这些已发现的受体与分子而言,它们在归巢中的各自地位也不太明确。这一系列问题的解决很大程度上依赖于新的动物模型的获得,从而在体内特异性地研究某一因子或受体对归巢的作用。同时,从“龕位”角度来研究骨髓中基质细胞的标志,将有利于我们发现新的因子和粘附分子。

参考文献:

- [1] Hardy CL. The homing of hematopoietic stem cells to the bone marrow [J]. *Am J Med Sci*, 1995, 309: 260-266.
- [2] Shiota T, Tavassoli M. Alterations of bone marrow sinus endothelium induced by ionizing irradiations in the homing of intravenously transplanted marrow cells [J]. *Blood Cells*, 1992, 18: 197-214.
- [3] Hendrikx PJ, Martens CM, Hagenbeek A, et al. Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24: 129.
- [4] Stewart FM, Zhong S, Wu C, et al. Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts [J]. *Blood*, 1998, 91, 3681-3687.
- [5] Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hematopoietic progenitor cells [J]. *Acta Haematol*, 1997, 97: 97-104.
- [6] Mohle R, Moore MAS, Nachman RL, et al. Transendothelial migration of CD34⁺ and mature hematopoietic cells: an in vivo study using a human bone marrow endothelial cell line [J]. *Blood*, 1997, 89: 72-80.
- [7] Schofield KP, Rushton G, Hamphries M J, et al. Influence of interleukin-3 and other growth factors on $\alpha 4 \beta 1$ integrin-mediated adhesion and migration of human hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 1997, 90: 1858-1866.
- [8] Rao SGA, Chitnis VS, Deora A, et al. An ICAM-1 like cell adhesion molecule is responsible for CD34 positive haemopoietic stem cells adhesion to bone marrow stroma [J]. *Cell Biol Int*, 1996, 20: 255-259.
- [9] Konno M, Hardy CL, Tavassoli M. Murine spleen culture homing of hematopoietic progenitor cells to spleen is not mediated by a similar mechanism to that in marrow [J]. *Exp Haematol*, 1990, 18: 65-68.
- [10] Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, et al. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hematopoietic progenitors between bone marrow and spleen [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9647-9651.
- [11] Jacobsen K, Kravitz J, Kineade PW. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice [J]. *Blood*, 1996, 87: 73-82.
- [12] Vermeulen M, Pesteur FL, Gagnerault M, et al. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine haemopoietic cells and progenitor cells [J]. *Blood*, 1998, 92: 894-900.
- [13] Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B. Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway [J]. *Blood*, 1998, 91: 2231-2239.
- [14] Prosper F, Stroneck D, McCarthy JB, et al. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of $\alpha 4 \beta 1$ integrin expression and function [J]. *J Clin Inv*, 1998, 101: 2456-2467.
- [15] Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, et al. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice [J]. *Blood*, 1997, 90: 4779-4788.
- [16] Bellucci R, De-Propris MS, Buccisano F, et al. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34⁺ cells during mobilization with G-CSF [J]. *Bone Marrow Transplantat*, 1999, 23: 1-8.
- [17] Shiota Y, Minguell J, Zanjani ED, et al. Induction of upmodulation of homing receptors in cloned hemopoietic progenitors by growth factors [J]. *Bone Marrow Transplantat*, 1992, 9: 123-127.

Mechanism of hematopoietic stem cell homing

Jiang Fu-qian

(Department of Radiomediology, the Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

Abstract The clinical transplantation of hematopoietic stem cell (HSC) originating from many sources such as bone marrow, peripheral blood and cord blood has been widely applied in recent years. At the same time, the development of the study on the mechanism of HSC homing which involves multi-procedures has been achieved. And a lot of molecular and cytokines on the surface or in the microenvironment of HSC are functioning in homing. The purpose of this article is to review those molecular and cytokines on which more studies have been focused in the past.

Key words hematopoietic stem cell; homing