

# Cramp 过表达对小鼠骨髓造血干细胞功能的影响

石桂英, 陈显达, 陈陟阳, 马小茗, 鞠振宇

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

**【摘要】** 目的 研究 Cramp 蛋白过表达对小鼠骨髓造血干细胞自我更新和分化能力的影响。方法 应用流式细胞仪分析 Cramp 过表达转基因小鼠及同龄野生型小鼠的骨髓、脾脏、胸腺等组织器官中各种细胞的比例; 分选骨髓造血干细胞, 体外培养, 观察其克隆形成能力。结果 与野生型小鼠相比, Cramp 过表达转基因小鼠的骨髓、脾脏、胸腺等组织器官中各种细胞的比例、骨髓造血干细胞的克隆形成能力等均无明显变化。结论 本研究中, Cramp 过表达转基因小鼠骨髓造血干细胞的自我更新和分化能力无明显变化。

**【关键词】** Cramp 过表达; 转基因小鼠; 骨髓造血干细胞

**【中图分类号】** R331.2; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0013-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.004

## Influence of Cramp Over Expression on the Function of Hematopoietic Stem Cell

SHI Gui-ying, CHEN Xian-da, CHEN Zhi-yang, MA Xiao-ming, JU Zhen-yu

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** to study the role of Cramp gene in the self-renew and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs). **Methods** cells from the bone marrow, spleen and thymus were analyzed by flow cytometry. HSCs were sorted and cultured in vitro. **Results** Compared with wild type mice, there are no great differences in the cell percentage and function of bone marrow, spleen and thymus in Cramp over expression mice. **Conclusions** Compared with the wild type mice, there was no great difference in the HSCs' differentiation and single cell clone in Cramp over expression transgenic mice.

**【Key words】** Cramp over expression; Transgenic mouse; Hematopoietic stem cells

端粒(telomere)是真核细胞染色体末端的特殊核蛋白复合体,其包括一段非编码的TTAGGG重复序列和与之相连的端粒结合蛋白(telomere binding protein)<sup>[1]</sup>。端粒是一种保护性结构,不具有编码蛋白质的功能,但在维持染色体末端稳定及避免染色

体被核酶降解等方面起重要作用。在人类衰老及慢性病中都伴有端粒的缩短<sup>[2-5]</sup>,端粒缩短被认为是细胞衰老的生物学标志。端粒酶(telomerase)是一种核糖核蛋白DNA聚合酶,它是一种自身携带RNA组分为复制模板的罕见的逆转录酶,其主要功

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费[DWS201010]。

[作者简介] 石桂英(1977-),女,主管技师,研究方向:衰老与再生。

[通讯作者] 鞠振宇,男,研究员,研究方向:衰老与再生, E-mail: zhenyuju@hotmail.com。

能是合成端粒,以维持端粒长度的稳定性<sup>[1]</sup>。端粒酶变异会导致端粒缩短,从而影响组织的稳态维持,使人<sup>[6]</sup>和小鼠<sup>[7,8]</sup>的寿命缩短。端粒酶基因敲除小鼠没有端粒酶基因,随着传代次数的增加,端粒逐渐缩短,第三代端粒酶基因敲除小鼠即为短端粒小鼠,其衰老具有端粒依赖性<sup>[8]</sup>。Jiang 等以第四代端粒酶基因敲除小鼠为模型,研究发现在端粒损伤老龄小鼠中,有 4 种蛋白高表达,是端粒功能缺陷及 DNA 损伤引起的衰老和疾病相关的生物标记物,Cramp 蛋白为其中之一<sup>[9]</sup>。

小鼠 Cramp 蛋白是由 Gallo 等<sup>[10]</sup>首先分离鉴定的,该类蛋白与之前在人、猪、牛、兔、羊等动物中发现的抗菌肽前体,具有高度保守的区域即 cathelin,因此,将这一大类抗菌肽命名为 cathelicidins。目前已知其主要功能是抗菌活性,此外,还具有抑制组织损伤、促进创伤修复、结合内毒素、诱导血管生成等多种生物学功能。炎性衰老是目前国际衰老理论的研究热点<sup>[11-13]</sup>,Cramp 蛋白作为一种炎症因子,在老龄短端粒模型小鼠中高表达,而正常老龄野生型小鼠中其表达量未见明显升高<sup>[9]</sup>,该蛋白在衰老中的作用值得深入研究。本研究中,我们应用 12 月龄 Cramp 过表达转基因小鼠和同龄野生型小鼠进行了初步研究,以了解该基因在衰老过程中对不同组织器官的影响,为深入研究 Cramp 在衰老中的作用和机制提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 Cramp 高表达转基因小鼠

该小鼠由本所构建并繁育 [SCXK(京)2009-0007]。动物饲养在 SPF 动物房内,脱颈椎处死后,取组织进行流式分析、分选。

### 1.2 PCR 方法鉴定 Cramp 转基因小鼠的基因型

用 2 周龄小鼠尾尖提取基因组 DNA,PCR 鉴定基因型。反应条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。转基因阳性小鼠的 PCR 鉴定引物:上游引物为 5'-GGCTGTGGCGGTCCTACTATC-3',下游引物为 5'-TCACCACCCCTGTTCTT-3',产物长度 271 bp,引物由上海生物工程技术有限公司合成,PCR 试剂购自宝生物工程有限公司。

### 1.3 流式分析

小鼠脱颈椎处死后,取脾脏、胸腺,置于冰上预冷的染色缓冲液(含 1% BSA 的 PBS)中,脾脏纵剖

成 2 份,1 份用 10% 中性福尔马林溶液固定,1 份用载玻片研磨成细胞悬液;胸腺用载玻片研磨成细胞悬液,将细胞悬液用 50 μm 尼龙滤膜过滤后收集到 15 mL 离心管中,用 PBS 定容至 10 mL,混匀后,取 10 μL 细胞液,稀释 10 倍后计数细胞数。细胞悬液离心,1000 rpm,10 min,将细胞浓度调整为  $1 \times 10^8$  细胞/mL。分别取  $10^6$  细胞标记荧光抗体(BD 公司)。

骨髓及脾脏细胞的分析中用 B220-FITC、CD115-PE、CD4-Percep-cy5.5、CD8-Percep-cy5.5、Gr1-PE-Cy7、CD11c-APC、CD11b-APC-Cy7,分别标记 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和粒细胞;CD71-PE、Ter119-APC,标记不同发育阶段的红细胞比例;IgD-FITC、CD43-PE、B220-PE-Cy7、IgM-APC,标记不同发育阶段的 B 淋巴细胞;CD34-FITC、Flt3-PE、IL7R-Percep-cy5.5、Sca1-PE-Cy7、cKit-APC、Ter119-Bio、Gr1-Bio、Mac-1-Bio、B220-Bio、IL-7R-Bio、CD4-Bio、CD8-Bio、Bio-APC-Cy7,标记骨髓造血干细胞。上述抗体加入细胞悬液,冰上避光,30 min;加 1 mL 染色缓冲液,离心 2600 rpm 5 min,弃上清,加 200 μL 染色缓冲液重悬细胞,用 50 μm 尼龙滤膜过滤,冰上避光备用。

胸腺细胞用 CD8-FITC、CD4-APC、CD3-PerCP-Cy5.5 分别标记 CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup> 细胞,冰上避光 30 min;加 200 μL 染色缓冲液,离心 2600 rpm 5 min,弃上清,加 200 μL 染色缓冲液重悬细胞,用 50 μm 尼龙滤膜过滤,冰上避光备用。

### 1.5 统计分析方法

组间资料分析采用 Student *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 Cramp 过表达对造血系统的影响

为了解 Cramp 过表达对造血系统的影响,我们分析了 Cramp<sup>+</sup>转基因小鼠和野生对照小鼠的骨髓、胸腺、脾脏等组织的细胞组成情况。结果显示 Cramp 过表达对小鼠骨髓、脾脏的 B220<sup>+</sup>淋巴细胞、CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>细胞的比例没有影响,骨髓中造血干细胞(c-kit<sup>+</sup>、sca1<sup>+</sup>、lin<sup>-</sup>,KSL)没有影响,对胸腺各类 T 淋巴细胞的比例也没有明显影响(图 1)。

### 2.2 Cramp 过表达对骨髓造血干细胞克隆形成能力的影响

为了进一步研究 Cramp 过表达对骨髓造血干细胞分化能力的影响,我们分选出单个骨髓造血干

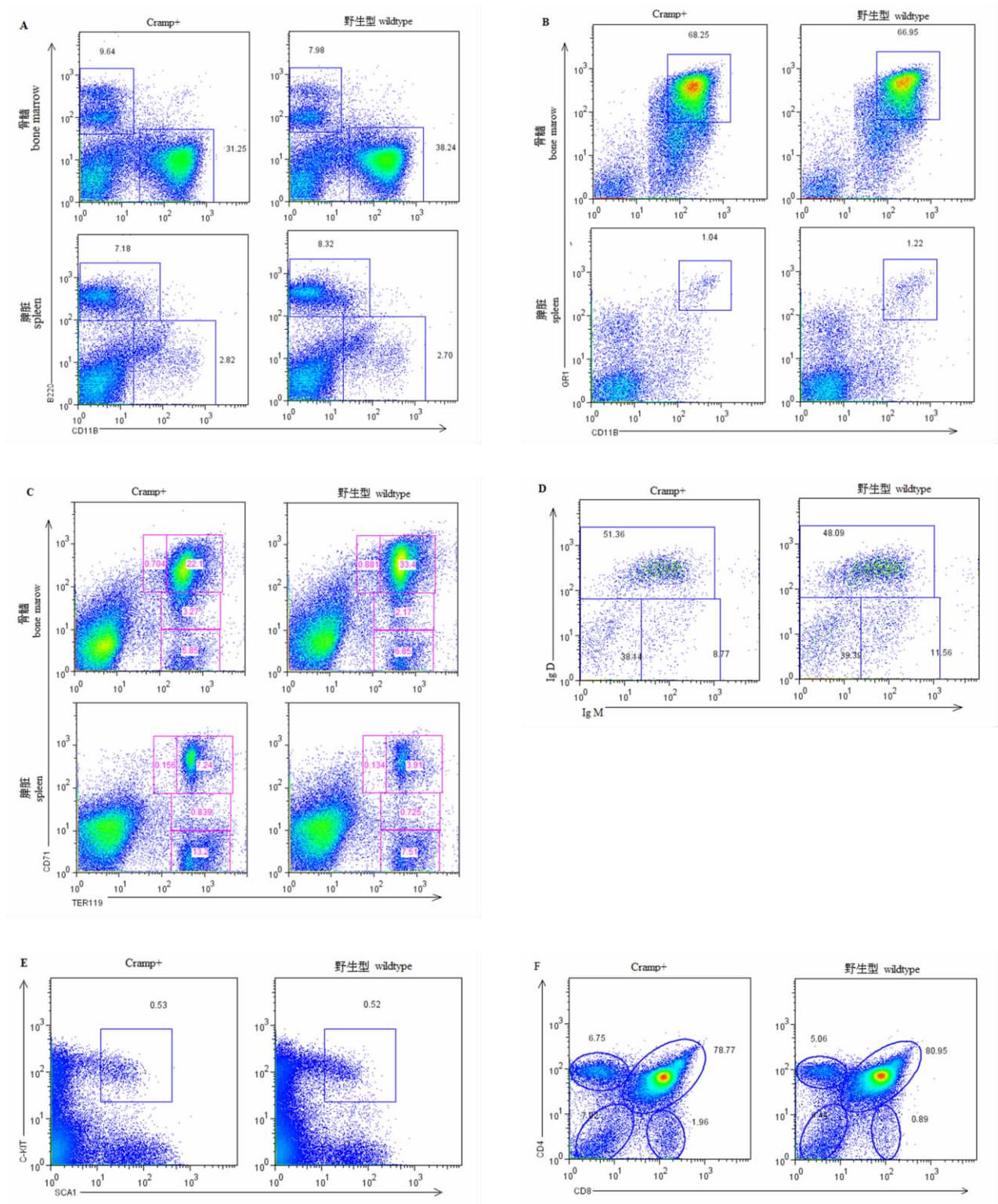


图 1 骨髓、脾脏、胸腺细胞流式分析图

Fig. 1 Analysis of bone marrow, spleen and thymus

注: A: 骨髓及脾脏中 B220<sup>+</sup> 及 CD11b<sup>+</sup> 细胞流式分析图; B: 骨髓及脾脏中 CD11b<sup>+</sup>、Gr1<sup>+</sup> 双阳性细胞流式分析图; C: 骨髓及脾脏中红细胞流式分析图; D: 骨髓 preB( IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup> )、未成熟 B 淋巴细胞( IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> )、成熟 B 淋巴细胞( IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> ) 流式分析图; E: 骨髓造血干细胞( lin<sup>-</sup>、c-kit<sup>+</sup>、sca1<sup>+</sup> ) 流式分析图; F: 胸腺细胞流式分析图

Note: A: analysis of B220<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup> cells of bone marrow and spleen; B: analysis of CD11b<sup>+</sup>, Gr1<sup>+</sup> double positive cells of bone marrow and spleen; C: analysis of erythroid of bone marrow and spleen; D: analysis of pre B( IgD<sup>-</sup> IgM<sup>-</sup> ), immature B( IgD<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> ), and mature B( IgD<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> ) of bone marrow; E: analysis of HSC( lin<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, sca1<sup>+</sup> ) of bone marrow; F: analysis of thymic cells

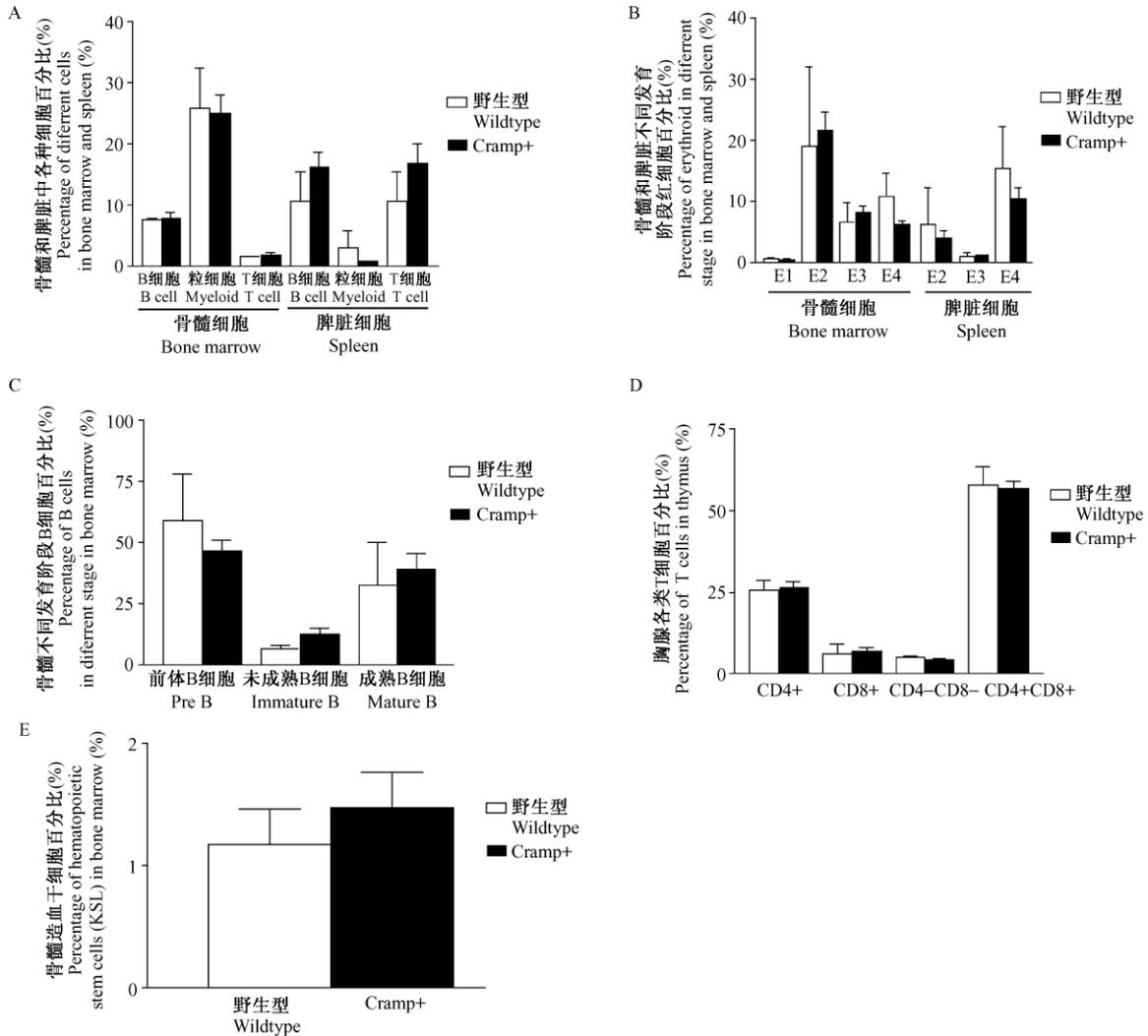


图 2 骨髓、脾脏、胸腺中各种细胞所占比例

Fig. 2 Percentages of different cells in bone marrow, spleen and thymus

注: A: 骨髓、脾脏中 B 细胞、粒细胞、T 细胞所占比例; B: 骨髓、脾脏中不同发育阶段红细胞所占比例; C: 骨髓中不同发育阶段 B 细胞所占比例; D: 胸腺中各类 T 细胞所占比例; E: 骨髓中造血干细胞( $c-kit^+$ ,  $sca1^+$ ,  $lin^-$ ) 所占比例

Note: A: percentages of B cells, myeloid cells, and T cells of bone marrow, spleen and thymus; B: percentages of different development stages erythroid of bone marrow and spleen; C: percentages of different development stages B cells of bone marrow; D: percentages of different kinds of T cells of thymus; E: percentages of HSC( $lin^- c-kit^+ sca1^+$ ) of bone marrow

细胞( $ckit^+$ ,  $sca1^+$ ,  $lin^-$ ) 进行体外培养,结果显示 Cramp 过表达对骨髓造血干细胞克隆形成能力无明显影响。

### 3 讨论

已有研究发现 Cramp 蛋白是端粒损伤引起的衰老的生物标记物<sup>[9]</sup>,为研究 Cramp 对骨髓造血干细胞的影响,我们构建了 CMV-Cramp 过表达转基因小鼠<sup>[14]</sup>。本实验中,我们应用流式细胞术,分析了脾脏、胸腺、骨髓等组织器官中各类细胞的比例,结

果发现在正常生理状态下,与同龄野生型小鼠相比,Cramp 过表达小鼠脾脏、骨髓中 B 细胞、粒细胞及红细胞的比没有显著差异,这说明 Cramp 过表达对骨髓造血干细胞的发育分化没有显著影响;对胸腺细胞的分析发现,Cramp 过表达小鼠各类 T 细胞的比例与野生型相比没有显著差异,可见,Cramp 过表达对 T 细胞的发育没有显著影响;同时分选骨髓造血干细胞,并进行体外单克隆形成实验,发现 Cramp 过表达对骨髓造血干细胞的数量及自我更新能力没有显著影响。

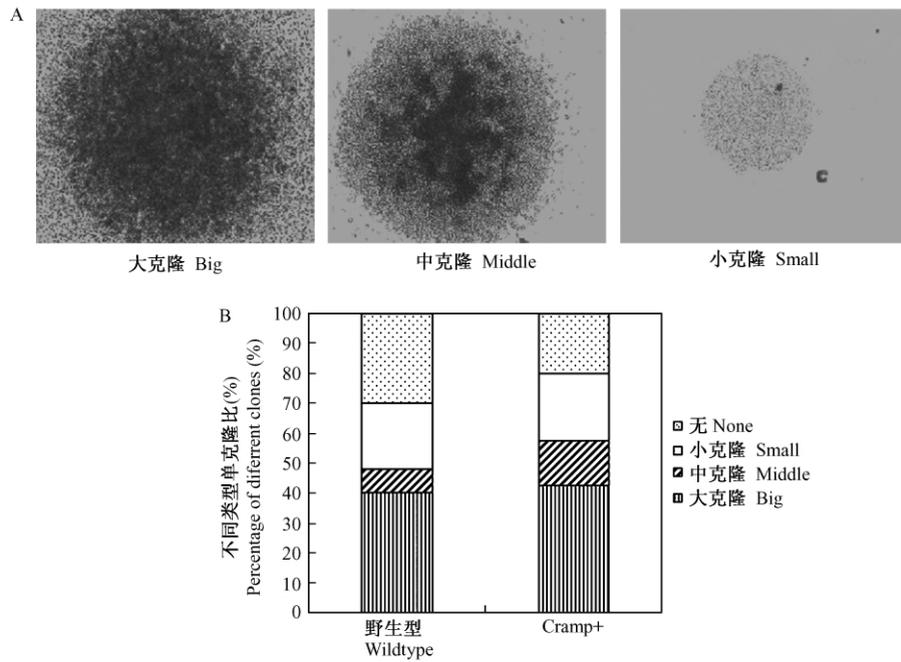


图 3 骨髓造血干细胞克隆形成能力

Fig. 3 Colony Forming potential of HSCs

注: A: 单克隆图片; B: 不同类型单克隆的比例

Note: A: single cell clones; B: percentages of different kinds single cell clones

通过本研究,未发现 Cramp 过表达对小鼠造血系统有明显影响,这可能有以下原因:一方面,本研究中,Cramp 过表达转基因小鼠尚未完全导入 C57BL/6J 背景,这种杂合背景可能会影响 Cramp 过表达的表型;另一方面,本研究中,未分离 Cramp 过表达转基因小鼠的骨髓,进行竞争性骨髓移植及连续移植实验,竞争性骨髓移植是评价造血干细胞造血重建能力和长期自我更新能力的标准实验。因此,Cramp 过表达对骨髓造血干细胞的影响,还需在 C57BL/6J 纯合背景下,通过竞争性骨髓移植及连续移植实验进行验证。

参考文献:

[ 1 ] Harley CB , Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer [J]. Current opinion in genetics & development , 1995 , 5: 249 - 255.  
 [ 2 ] Harley CB , Futcher AB , Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts [J]. Nature , 1990 , 345: 458 - 460.  
 [ 3 ] Keller G , Brassat U , Braig M , Heim D , Wege H , Brummendorf TH. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis , disease progression and targeted therapy [J]. Hematological oncology , 2009 , 27: 123 - 129.  
 [ 4 ] Lechel A , Holstege H , Begus Y , et al. Telomerase deletion limits progression of p53-mutant hepatocellular carcinoma with short telomeres in chronic liver disease [J]. Gastroenterology , 2007 , 132: 1465 - 1475.  
 [ 5 ] Savale L , Chaouat A , Bastuji-Garin S , et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic

obstructive pulmonary disease [ J ]. American journal of respiratory and critical care medicine , 2009 , 179: 566 - 571.  
 [ 6 ] Mitchell JR , Wood E , Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita [ J ]. Nature , 1999 , 402: 551 - 555.  
 [ 7 ] Hao LY , Armanios M , Strong MA , et al. Short telomeres , even in the presence of telomerase , limit tissue renewal capacity [ J ]. Cell , 2005 , 123: 1121 - 1131.  
 [ 8 ] Rudolph KL , Chang S , Lee HW , et al. Longevity , stress response , and cancer in aging telomerase-deficient mice [ J ]. Cell , 1999 , 96: 701 - 712.  
 [ 9 ] Jiang H , Schiffer E , Song Z , et al. Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2008 , 105: 11299 - 11304.  
 [ 10 ] Gallo RL , Kim KJ , Bernfield M , et al. Identification of CRAMP , a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse [ J ]. J Biol Chem , 1997 , 272: 13088 - 13093.  
 [ 11 ] Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? [ J ] Nutrition reviews , 2007 , 65: S173 - 176.  
 [ 12 ] Goto M. Inflammaging ( inflammation + aging ): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? [ J ]. Bioscience trends , 2008 , 2: 218 - 230.  
 [ 13 ] Navarrete-Reyes AP , Montana-Alvarez M. Inflammaging. Aging inflammatory origin [ J ]. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion , 2009 , 61: 327 - 336.  
 [ 14 ] 石桂英 , 全雄志 , 陈显达 , 等. Cramp 转基因小鼠的构建及鉴定 [ J ]. 中国比较医学杂志 , 2010 , 20( 9 ): 12 - 15.

(修回日期)2011-05-08