研究报告

Gadd45a 基因对小鼠造血干细胞功能的影响

马小茗[1],林培容[2],陈陟阳[1],鞠振宇[1]

(1. 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; 2. 北京华信医院,北京　100016)

【摘要】　目的　Gadd45a 基因对小鼠造血干细胞功能的影响。**方法**　流式细胞仪分选小鼠骨髓造血干细胞、体外单克隆培养,竞争性骨髓移植,放射线照射观察生存曲线。**结果**　Gadd45a 基因缺失的小鼠造血干细胞克隆形成能力增强,短期造血重建能力无差异,8. 5Gy 放射线照射后生存情况无差异。**结论**　Gadd45a 基因对小鼠造血干细胞功能起重要作用。

【关键词】　Gadd45a; 基因敲除小鼠; 单克隆; 竞争性骨髓移植

【中图分类号】R332　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2012)05-0009-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 005. 003

The Role of Gadd45a in Mouse Hematopoietic Stem Cell Function

MA Xiao-ming[1], LIN Pei-rong[2], CHEN Zhi-yang[1], JU Zhen-yu[1]

(1. 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; 2. Hua Xin Hospital, Beijing 100016, China)

【Abstract】　Objective　To study the role of Gadd45a gene in mouse hematopoietic stem cell function. **Methods**　Sorting mouse bone marrow hematopoietic stem cells by flow cytometry , which aim to culture monoclonal; Competitive bone marrow transplantation; The survival curves after irradiation. **Results**　Gadd45a gene deletion improves hematopoietic stem cell colony forming ability, but hematopoietic reconstitution capacity and survival situation after8. 5Gy irradiation is no difference. **Conclusion**　Gadd45a gene plays an important role on mouse hematopoietic stem cell function.

【Key words】　Gadd45a; Knockout mice; Monoclonal; Competitive bone marrow transplantation

Gadd45 (Growth arrest and DNA damage inducible gene Gadd45)家族包括 3 个成员:Gadd45α (Gadd45α/Gadd45)、Gadd45b (Gadd45β/MyD118)、Gadd45g(Gadd45γ/CR6),它们在细胞周期、细胞凋亡等方面起到重要的作用[1-3]。Gadd45α 是 Gadd45 基因家族中唯一的 p53 靶基因[4],它在细胞的生命过程中起到重要的作用,其中包括遗传物质稳定性的维持[5]、细胞周期的调控[6]、核苷酸剪切修复[7,8]以及凋亡调控[9,10]等。研究认为,Gadd45 基因家族在生理或环境的压力作用下诱导快速表达,引起细胞周期抑制、DNA 修复、细胞存活或凋亡。Gadd45 作为压力刺激敏感的基因, 其功能主要是与细胞周期调节相关的重要蛋白、分子等相互作用[11]。

造血细胞包括造血干细胞和造血祖细胞,对放射线照射非常敏感。5 ~ 10Gy 的放射线照射剂量很

[**基金项目**]"国家重点基础研究发展计划资助"2011CB964800(2011CB964802)。
[**作者简介**]马小茗(1985 -),女,硕士生,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。

可能导致小鼠造血系统破坏从而导致死亡[12]。已知 Gadd45α 作为压力刺激敏感反应基因，唯一的 Gadd45 家族中 p53 下游的靶基因，而 p53 作为应激反应的重要信号通路，调节细胞的增殖、DNA 修复以及凋亡，从而研究 Gadd45α 基因敲除小鼠造血干细胞的功能意义重大。

1 材料和方法

1.1 动物及设备

本实验所用的小鼠：Gadd45α$^{-/-}$（来自北京协和医学院比较医学中心）小鼠（遗传背景：C57BL/6J）12 周龄；野生型小鼠采用同窝对照小鼠 C57BL/6J（来自北京协和医学院比较医学中心）12 周龄。动物许可证号 SCXK（京）2009-0007。

设备为：美国 BD 公司 Aria 流式细胞仪；Olympus 荧光显微镜；Themro 水套式细胞培养箱；超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 PCR 方法鉴定 Gadd45a$^{-/-}$小鼠基因型

小鼠在出生 10 d 用剪趾法标记，收集剪下的组织，裂解组织提取基因组 DNA，PCR 鉴定基因型，反应条件：94 ℃预变性 3 min；变性 94 ℃ 30 s，退火 60 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 30 s，35 个循环；72 ℃ 延伸 3 min。鉴定引物为 Gadd45a wt：5′-cct ctg ctt acc tct gca caa -3′；Gadd45a cm：5′-gaa gac cta gac agc acg gtt -3′；Gadd45a mt：5′-aga acg aga tca gca gcc tct -3′；Gadd45a$^{-/-}$产物长度 211 bp，WT 产物长度 324 bp，PCR 试剂购自上海生工生物技术有限公司，中国。

1.2.2 骨髓干细胞体外克隆形成实验

选用 12 周龄的 Gadd45α$^{-/-}$及 C57BL/6J 小鼠，常规制备骨髓细胞并进行骨髓长期造血干细胞表面荧光标记，使用流式细胞仪（MACS 富集后）分选表面标记为 Lineage-Sca1$^+$ ckit$^+$ CD34$^-$ Flt3$^-$ 的单个造血干细胞与 U 型底 96 孔板中。将其进行钴 60 来源的放射线照射（irradiation，IR），剂量为 2Gy。照射后在 96 孔板中进行单个干细胞的培养，14d 时记录克隆的数目和大小，比较长期造血干细胞的数量和自我更新能力。

1.2.3 竞争性骨髓移植实验

受体小鼠（CD45.1）经过^{60}Co 全身照射，剂量率 0.5～1 Gy/min，总剂量 9 Gy；供体小鼠、竞争者小鼠（CD45.1/2）处死取股/胫骨，研磨制备细胞悬液，将细胞浓度调至 2×10^7/mL，供体与竞争者骨髓细胞比例按 1∶1，将每组供体骨髓细胞与竞争者骨髓细胞混匀，通过眼后静脉丛或鼠尾静脉注射，每只受体小鼠接受注射液体总量控制在 200～300 μL，含单个核骨髓细胞约 1×10^6 个。

移植后受体均给予抗生素一周（饮水中添加乳酸左氧氟沙星 0.5 mg/mL）。

移植后注意饮食饮水补给，以提高移植成活率。

1.2.4 放射线照射全骨髓移植受体小鼠—生存曲线实验

受体小鼠 C57BL/6J 经过^{60}Co 全身照射，剂量率 0.5～1 Gy/min，总剂量 9 Gy；供体小鼠 Gadd45α$^{-/-}$及同窝对照 C57BL/6J，分别取全骨髓细胞 1×10^6 于 250 μL 无菌 PBS 中，经眼后注射至新的受体小鼠。移植 3 个月造血重建稳定后，给予 8.5Gy 的^{60}Co 照射，观察其存活情况。

2 结果

2.1 PCR 鉴定结果

剪取 10d 的小鼠脚趾，以饱和氯化钠法提取小鼠基因组 DNA，进行 PCR，产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，野生型产物长度为 324 bp，Gadd45a 缺失产物长度 211 bp。

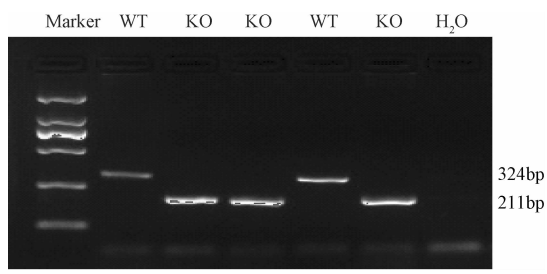

图 1 PCR 鉴定 Gadd45a 基因敲除小鼠的凝胶电泳分析

Fig. 1 PCR genotyping of the Gadd45a kockout mice

注：Marker 为 DL2000 marker，H_2O 为空白对照，WT 为（C57BL/6J）野生型对照，KO 为（Gadd45α$^{-/-}$）基因敲除对照

Note：The marker is the DNA molecular weight marker；H_2O indicates the negative control；WT：wild- type control；KO：Gadd45a gene knockout control

2.2 骨髓干细胞体外克隆实验结果

长期造血干细胞（long-term hematopoietic stem cells，LT-HSC）具有自我更新及多向分化能力，单克隆培养能够很好的反应其功能。应用流式细胞仪将表面标记为 Lineage-Sca1$^+$ ckit$^+$ CD34$^-$ Flt3$^-$ 的 1 个 LT-HSC 细胞分选至 96 孔板一孔中，在含有细胞因子的培养条件下，体外培养 14 d 后观察单克隆形成情况。结果如图 2 所示，图 2A 分别为 C57BL/6J

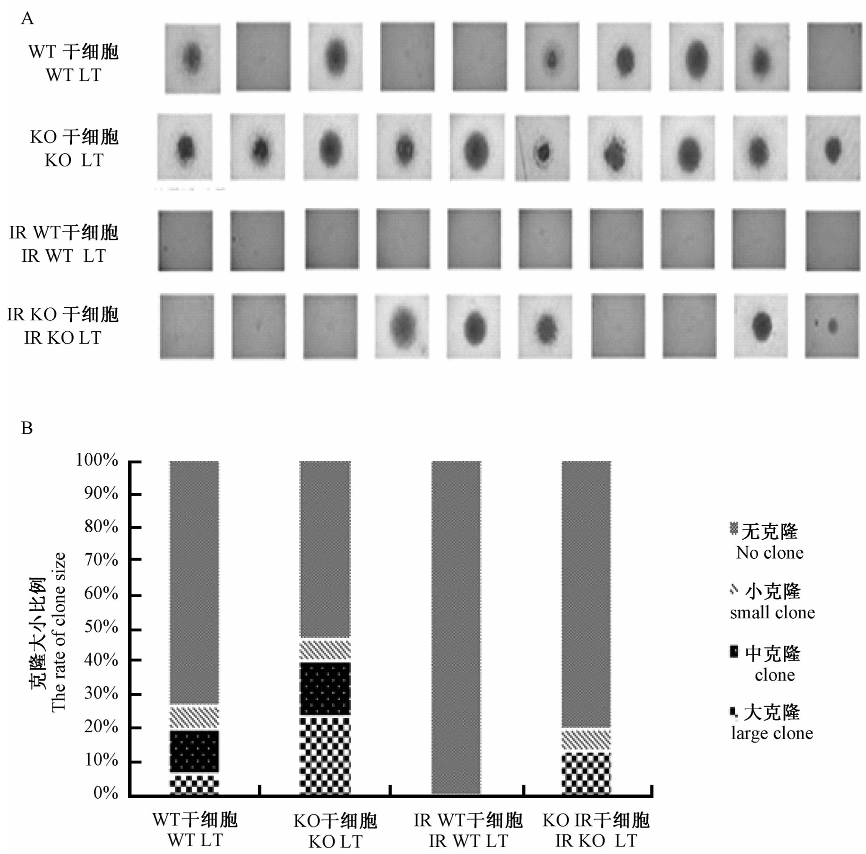

图 2　长期造血干细胞体外克隆结果

Fig. 2　The results of LT-HSC clone forming in vitro

注：A 为 WT LT：C57BL/6J 小鼠的 Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ 克隆结果；KO LT：Gadd45α $^{-/-}$ 小鼠的 Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ 克隆结果；IR WT LT：2Gy 放射线照射后，C57BL/6J 小鼠的 Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ 克隆结果；IR KO LT：2Gy 放射线照射后，Gadd45α －/－ 小鼠的 Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ 克隆结果；B 为 C57BL/6J、Gadd45α －/－ 以及放射线照射后 C57BL/6J、Gadd45α $^{-/-}$ LT-HSC 克隆形成统计结果

Note: A WT LT: The results ofC57BL/6J mice Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ clone forming; KO LT: The results of Gadd45α －/－ mice Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ clone forming; IR WT LT: After 2Gy irradiation, the results of C57BL/6J mice Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ clone forming; IR KO LT: After 2Gy irradiation, the results of Gadd45α $^{-/-}$ mice Lineage-Sca1 $^{+}$ ckit $^{+}$ CD34 $^{-}$ Flt3 $^{-}$ clone forming; B: The statistical results of C57BL/6J、Gadd45α $^{-/-}$ and post-irradiation LT-HSC clone forming

的 LT-HSC 克隆，Gadd45α $^{-/-}$ 的 LT-HSC 克隆，IR 后 C57BL/6J 的 LT-HSC 克隆，IR 后 Gadd45α $^{-/-}$ 的 LT-HSC 克隆。结果显示，Gadd45α $^{-/-}$ 的 LT-HSC 与 C57BL/6J 的相比有显著的抗放射能力。统计结果图 2B 所示，IR 后 C57BL/6J 的 LT-HSC 无克隆形成，而 Gadd45α $^{-/-}$ 的 LT-HSC 仍能形成大克隆，有明显的抗放射能力。

2.3　竞争性骨髓移植实验

竞争性骨髓移植是评价造血干细胞自我更新能力的标准试验。放射性照射摧毁受体小鼠自身免疫系统，并使自身干细胞从龛中移除易于外源供体的植入。供体来源的骨髓造血干细胞在造血重建的过程中，移植后 1 个月时，对外周血细胞的贡献在主要来自于短期骨髓干细胞的造血及分化能力，在 3 个月后则来自于长期干细胞的造血及分化能力。如图 3 所示，竞争性骨髓移植观察造血干细胞功能，Gadd45α 基因敲除小鼠的长期造血干细胞与 C57BL/6J 的相比在一次竞争性骨髓移植 3 个月内并无显著差异。

2.4　放射线照射全骨髓移植受体小鼠—生存曲线实验

Gadd45α 作为压力刺激敏感反应基因，在各种生理或环境的压力作用下诱导快速表达，低剂量的放射线照射长期造血干细胞观察，Gadd45α 基因缺失长期造血干细胞有抵抗低剂量放射线照射的能力；而在连续移植的压力下，Gadd45α 基因缺失的长

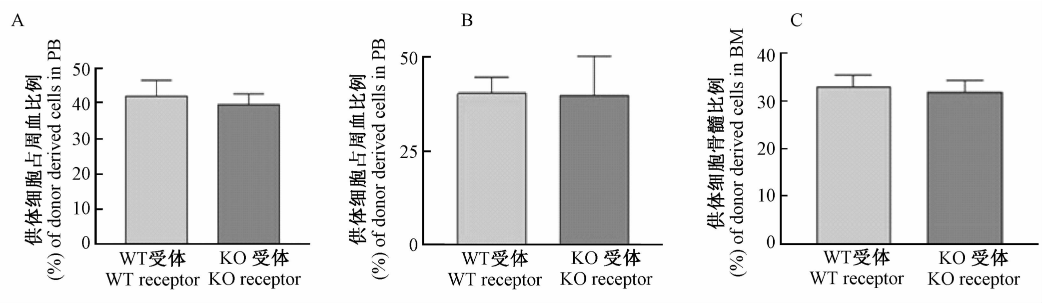

图 3 竞争性骨髓移植结果

Fig. 3 The results of competitive transplantation

注：A 竞争性骨髓移植一个月外周血嵌合率；B 竞争性骨髓移植二个月外周血嵌合率；C 竞争性骨髓移植 3 个月骨髓嵌合率

Note: A: The chimerism of competitive bone marrow transplantation in peripheral blood after the first month; B: The chimerism of competitive bone marrow transplantation in peripheral blood after the second month; C: The chimerism of competitive bone marrow transplantation in bone marrow after the third month

期造血干细胞能力又远远下降。放射线照射是临床放疗的治疗手段，Gadd45α 基因是否能抵抗放射线对造血干细胞功能的影响意义重大。8.5 Gy 的放射线照射全骨髓移植后 3 个月的受体小鼠，观察其生存情况，结果如图 4 所示，8.5 Gy 的放射线损伤，Gadd45α$^{-/-}$ 与 C57BL/6J 全骨髓移植后的受体小鼠存活情况无显著差异。

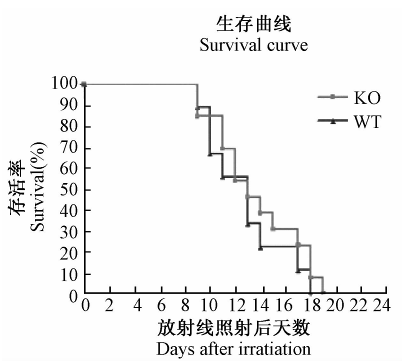

图 4 8.5 Gy 放射线照射后生存曲线

Fig. 4 Survival curves after 8.5 Gy irradiation

注：Gadd45α$^{-/-}$ 与 C57BL/6J 分别为供体全骨髓移植受体小鼠 3 个月后，8.5 Gy 放射线照射受体，红色代表 Gadd45α$^{-/-}$ 移植的受体小鼠生存情况，黑色代表 C57BL/6J 移植的受体小鼠生存情况

Note: Gadd45α$^{-/-}$ and C57BL/6J transplant recipient mice. After 3 months, 8.5 Gy irradiation receptors, red represents the survival of Gadd45α$^{-/-}$ mice, black represents the survival of C57BL / 6J recipient mice

3 讨论

已有研究证明，Gadd45a 作为 p53 下游靶基因，参与众多细胞信号通路的调控，对细胞周期、凋亡等过程中起重要的作用。研究报导，紫外照射刺激下，Gadd45a 通过 Gadd45a-p38-NF-kB 信号通路促进细胞存活[13]。Gadd45a 基因敲除小鼠在紫外的刺激下，骨髓细胞凋亡增加，cIAP-1，Bcl-2，Bcl-xL 等表达下降[14]。

Gadd45a 基因在造血干祖细胞功能中作用鲜有研究，我们建立了 Gadd45a 基因单敲除小鼠，采用流式细胞仪分选骨髓造血干细胞，在 2Gy 的放射线刺激下，检测造血干细胞的克隆形成能力，发现 Gadd45a 基因敲除与 C57BL/6J 相比更加抵抗低剂量辐射，维持造血干细胞功能。为了更进一步了解 Gadd45a 基因敲除对造血干祖细胞功能的影响，进行竞争性骨髓移植实验，连续观察 3 个月的结果显示，Gadd45a 基因敲除小鼠的造血干细胞功能与 C57BL/6J 小鼠的造血干细胞功能相比并无显著差异。Gadd45a 基因对各种生理或环境的压力作用下都会被快速的诱导表达，高剂量放射线照射全骨髓移植 3 个月后的受体小鼠发现，Gadd45a 基因的有无对高剂量的放射线损伤无显著差异。

Gadd45 作为压力刺激敏感的基因，其功能主要是与细胞周期调节相关的重要蛋白、分子等相互作用。低剂量的放射损伤后，Gadd45a 基因敲除小鼠的长期造血干细胞自我更新能力增强，而 Gadd45a 基因的有无对高剂量的放射线损伤反应无显著的差异。竞争性骨髓移植观察 Gadd45a 基因敲除一次移植造血重建功能并无影响。在放射线损伤情况下，Gadd45a 基因缺失短期内可能激活 p38 信号通路促进存活，而高剂量损伤中 Gadd45a 基因缺失没有体现出差异。造血重建能力要通过连续移植长期观察 Gadd45a 基因缺失是否对小鼠造血重建功能有影响，而在一次移植中并没有显现出来。我们推测短期的压力作用下 Gadd45a 基因缺失造血干细胞

DNA 损伤修复加强,p38 信号通路起主导作用,而长期来看 DNA 损伤累积,Gadd45a 与其他信号分子等相互作用最终是体现功能的下降,有待于进一步研究。Gadd45a 基因缺失在放射线损伤后对于骨髓造血干细胞功能的影响,以及其他压力下造血干细胞功能的影响有何不同有也待于进一步研究。Gadd45a 基因对于指导临床治疗中,如何防护对放化疗病人造血功能的影响具有重要的意义。

参考文献:

[1] Fan, W., Richter, G., Cereseto, A., Beadling, C., and Smith, K. A. Cytokine response gene induces p21 and regulates both cell growth and arrest[J]. Oncogene1999, 18:6573 - 6582.

[2] Abdel-Wahab, O. I., Grubbs, E., Viglianti, B. L., Cheng, T. Y., Ueno, T., Ko, S., Rabbani, Z., Curtis, S., Pruitt, S. K., Dewhirst, M. W., and Tyler, D. S. The role of hyperthermia in regional alkylating agent chemotherapy[J]. Clin Cancer Res2004, 10: 5919 - 5929.

[3] Vairapandi, M., Balliet, A. G., Fornace, A. J., Jr., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1 [J]. Oncogene1996, 12: 2579 - 2594.

[4] Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia[J]. Cell 1992,l 71: 587 - 597.

[5] Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T. A., Kim, K. E., Tolosa, E., Ashwell, J. D., Rosenberg, M. P., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, P. M., Morgan, W. F., Deng, C. X., and Fornace, A. J., Jr. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice [J]. Nat Genet1999, 23: 176 - 184.

[6] Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45[J]. Oncogene1999, 18: 2892 - 2900.

[7] Hollander, M. C., Kovalsky, O., Salvador, J. M., Kim, K. E., Patterson, A. D., Haines, D. C., and Fornace, A. J., Jr. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency[J]. Cancer Res 2001, 61:2487 - 2491.

[8] Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C., and Fornace, A. J., Jr. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes[J]. Mol Cell Biol 2000, 20: 3705 - 3714.

[9] Harkin, D. P., Bean, J. M., Miklos, D., Song, Y. H., Truong, V. B., Englert, C., Christians, F. C., Ellisen, L. W., Maheswaran, S., Oliner, J. D., and Haber, D. A. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1[J]. Cell 1999, 97: 575 - 586.

[10] Takekawa, M., and Saito, H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK[J]. Cell 1998, 95: 521 - 530.

[11] Hoffman, B., and Liebermann, D. A. Gadd45 modulation of intrinsic and extrinsic stress responses in myeloid cells[J]. Cell Physiol 2009, 218: 26 - 31.

[12] Yu, H., Shen, H., Yuan, Y., XuFeng, R., Hu, X., Garrison, S. P., Zhang, L., Yu, J., Zambetti, G. P., and Cheng, T. Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation[J]. Blood 2010, 115: 3472 - 3480.

[13] Gupta, M., Gupta, S. K., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition[J]. Biol Chem2006, 281: 17552 - 17558.

[14] Gupta, M., Gupta, S. K., Balliet, A. G., Hollander, M. C., Fornace, A. J., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis [J]. Oncogene2005, 24: 7170 - 7179.

〔修回日期〕2012-02-15