

Cramp 基因敲除对小鼠骨髓造血干细胞的影响

石桂英, 白琳, 鞠振宇

(中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 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 基因敲除在衰老过程中对小鼠造血干细胞的作用。**方法** 应用流式细胞仪分析 3 月龄及 12 月龄 Cramp 基因敲除小鼠及同窝野生型小鼠的骨髓造血干细胞的比例及不同发育阶段 B 淋巴细胞的比例。**结果** 与野生型小鼠相比, 12 月龄 Cramp 基因敲除小鼠的骨髓长期造血干细胞增多, 多潜能造血祖细胞减少; 前体 B 淋巴细胞和未成熟 B 淋巴细胞减少, 成熟 B 淋巴细胞增多。**结论** 在衰老过程中, Cramp 基因敲除对骨髓造血干细胞及 B 淋巴细胞发育有重要影响。

【关键词】 Cramp 基因敲除小鼠; 流式细胞术; 骨髓造血干细胞; B 淋巴细胞

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)09-0013-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2012. 009. 003

Influence of Cramp Knockout on the Function of Hematopoietic Stem Cell

SHI Gui-ying, BAI Lin, JU Zhen-yu

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

【Abstract】 Objective To study the influence of Cramp gene knockout on the function of hematopoietic stem cell in aging. **Methods** Cells from the bone marrow of different age Cramp knockout and wild type mice were analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with 12 months old wild type mice, percentage of long term hematopoietic stem cell decreased, multipotent hematopoietic progenitor increased; percentages of pre B and immature B cells decreased, and mature B cells increased in Cramp knockout mice. **Conclusion** Cramp gene knockout plays an important role in hematopoietic stem cell and the development of B lymphocytes in aging.

【Key words】 Cramp knockout mouse; Flow cytometry; Hematopoietic stem cell; B lymphocyte

小鼠 Cramp 蛋白是由 Gallo 等^[1]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^[2-4], 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^[5], 该蛋白在衰老中的作用值得深入研究。为了进一步研究 Cramp 蛋白在衰老中的作用, 我们从德国引进了 Cramp 基

【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, 女, 主管技师, 研究方向: 衰老与再生。

【通讯作者】 鞠振宇, E-mail: zhenyuju@hotmail.com。

因敲除小鼠,对不同月龄的 Cramp 基因敲除小鼠和同龄野生型小鼠的骨髓细胞,应用流式细胞仪分析了骨髓造血干细胞及不同发育阶段 B 细胞的比例。

1 材料和方法

1.1 Cramp 基因敲除小鼠

该小鼠由德国引进,在本所繁育【SCXK(京)2009-0007;SYXK(京)2011-0022】。动物饲养在 SPF 动物房内,分别在 3 月龄、12 月龄时,脱颈椎处死小鼠进行实验。

1.2 PCR 方法鉴定 Cramp 基因敲除小鼠的基因型

用 2 周龄小鼠尾尖提取基因组 DNA,普通 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。基因敲除小鼠的 PCR 鉴定引物:CRAMP 1A:5' CCAGGGACTTCCATCCAGTAGAC 3', CRAMP 1B:5' AGACTGCCTTGGGAAAAGCG 3', CRAMP 2A:5' TGTTCCTCAGATCCTTGGGAGC 3', CRAMP 2B:5' AATTTCTTGAACCGAAAGGGC 3', PCR 产物长度,野生型为 241 bp,CRAMP 敲除为 88 bp,杂合子同时有上述两条片段。引物由上海生物工程有限公司合成,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,取后肢骨,置于冰上预冷的染色缓冲液(含 1% BSA 的 PBS)中,用 5 mL 注射器将骨髓细胞冲出,并吹打成细胞悬液,将细胞悬液用 50 μ m 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 μ L 细胞悬液,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 1×10^8 个细胞/mL。分别取 10^6 细胞标记荧光抗体(BD 公司)。

骨髓造血干细胞的分析中用如下抗体进行标记:CD34-FITC、Flt3-PE、IL7R- Percp-cy5.5、Sca1- PE-Cy7、cKit- APC、Ter-119- Biotin、Gr-1- Biotin、Mac-1- Biotin、B220- Biotin、IL-7R- Biotin、CD4- Biotin、CD8- Biotin、Biotin - APC-Cy7。长期造血干细胞(LT-HSC)表面标记为 Lin- Sca1⁺ cKit⁺ CD34⁻ Flt3⁻,短期造血干细胞(ST-HSC)表面标记为 Lin- Sca1⁺ cKit⁺ CD34⁺ Flt3⁻,多潜能造血祖细胞(MPP-HSC)表面标记为 Lin- Sca1⁺ cKit⁺ CD34⁺ Flt3⁺。IgD-FITC、CD43-PE、B220-PE-Cy7、IgM-APC,标记不同发育阶段

的 B 淋巴细胞。前体 B 细胞(Pre B)表面标记为 B220⁺ CD43⁻ IgD⁻ IgM⁻,未成熟 B 细胞表面标记为 B220⁺ CD43⁻ IgD⁻ IgM⁺,成熟 B 细胞表面标记为 B220⁺ CD43⁻ IgD⁺ IgM⁺。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 μ L 染色缓冲液重悬细胞,用 50 μ m 尼龙滤膜过滤,冰上避光备用。

1.4 统计分析方法

数据分析采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间资料分析采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cramp 基因敲除小鼠基因型鉴定

为了建立 Cramp 基因敲除小鼠衰老研究队列,我们应用 Cramp 基因杂合小鼠配对繁殖,对子代小鼠进行基因型鉴定,保留 Cramp 基因敲除纯合及同窝野生型小鼠。基因型鉴定结果见图 1。

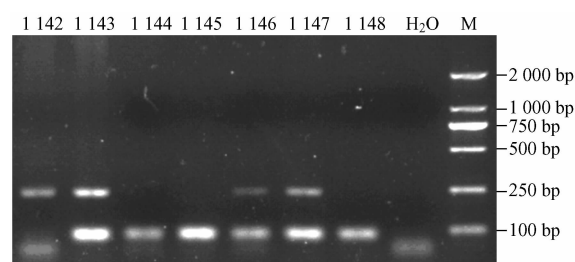


图 1 Cramp 基因敲除小鼠基因型鉴定结果

Fig. 1 Genotyping of Cramp knockout mice

注:1142~1148 为小鼠编号,H₂O 为阴性对照,M 为 DNA marker。

1141、1144、1145、1148 为 Cramp 基因敲除小鼠,1142 为同窝野生型小鼠,1143、1146、1147 为 Cramp 基因杂合小鼠。

Note: 1142~1148: No. of different mice, H₂O: negative control.

1141、1144、1145、1148: Cramp gene knockout mice, 1142: littermate wildtype mouse, 1143、1146、1147: Cramp gene heterozygote mice, M: DNA marker.

2.2 Cramp 基因敲除对小鼠骨髓造血干细胞的影响

为了了解衰老过程中,Cramp 基因敲除对小鼠骨髓造血干细胞的影响,我们分析了 3 月龄及 12 月龄 Cramp 基因敲除小鼠及同窝野生对照小鼠长期造血干细胞(LT-HSC)、短期造血干细胞(ST-HSC)、及多潜能造血祖细胞(MPP-HSC)的比例,结果发现与野生型小鼠相比,12 月龄 Cramp 基因敲除小鼠 LT-HSC 显著减少($P = 0.0025$,图 2A),MPP-HSC 显著增加($P = 0.0073$,图 2B)。

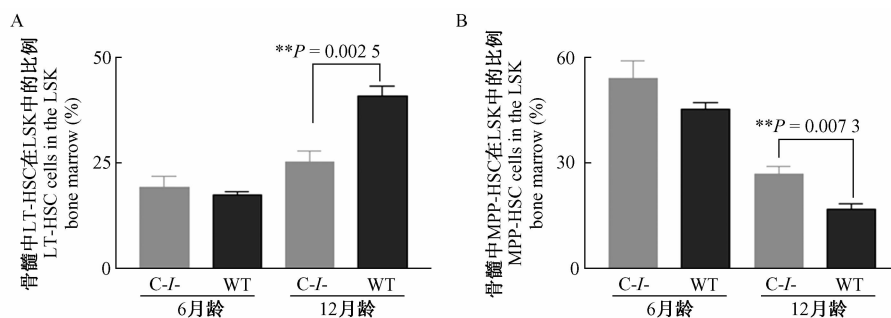


图 2 长期造血干细胞、多潜能造血祖细胞在骨髓 LSK 中的比例

Fig. 2 Percentage of LT-HSC、MPP-HSC in the bone marrow LSK cells

注: LSK: 骨髓中 lineage⁻、Scal⁺、cKit⁺ 细胞; C-/-: Cramp 基因敲除小鼠; WT: 同窝野生型小鼠。

Note: LSK: lineage⁻, Scal⁺, cKit⁺ cells in the bone marrow; C-/-: Cramp gene knockout mouse; WT: littermate wildtype mouse.

2.2 Cramp 基因敲除对小鼠 B 淋巴细胞发育的影响

为了研究 Cramp 基因敲除在衰老过程中对小鼠 B 细胞发育的影响,我们分析了不同月龄 Cramp 基因敲除小鼠及同龄对照小鼠骨髓中不同发育阶段的 B 淋巴细胞的比较,结果显示,12 月龄 Cramp 基因敲除小鼠骨髓前体 B 淋巴细胞 ($P = 0.02$) 和未成熟 B 淋巴细胞 ($P = 0.0274$) 显著减少,而成熟 B 淋巴细胞 ($P = 0.0002$) 显著增加 (图 3)。

3 讨论

随着人口老龄化,关于衰老的研究成为国际研究热点。衰老是全身系统性组织、器官功能退化,

关于衰老已有多种假说,如端粒和端粒酶、炎性衰老等。已有研究发现,在端粒损伤衰老小鼠模型中,四种蛋白的表达量增加,其中包括 Cramp 蛋白^[4],在人类相关研究中也发现,随着年龄的增长,Cramp 蛋白在人的血浆及各组织器官中的表达量增加,并且其表达量与端粒长度呈反比^[6],上述研究均表明 Cramp 蛋白是衰老过程中的一个重要生物标记物。Cramp 蛋白在衰老过程中究竟有何作用,对造血系统有没有影响,目前未见相关报道。

已有研究表明,在衰老过程中,小鼠骨髓造血干细胞数量增多,其中主要是增殖活化的造血干细胞数量增多^[7,8,9]。但是,骨髓造血干细胞增殖活性

(下转第 20 页)

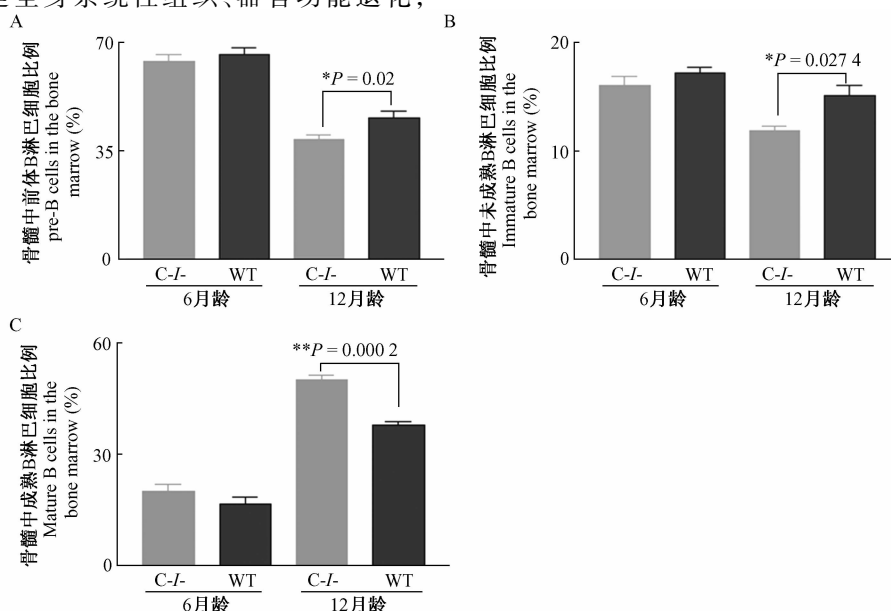


图 3 Cramp 基因敲除对小鼠 B 淋巴细胞发育的影响

Fig. 3 Influences of Cramp gene knockout on mice B lymphocytes development

注: C-/-: Cramp 基因敲除小鼠; WT: 同窝野生型小鼠。

Note: C-/-: Cramp gene knockout mouse; WT: littermate wildtype mouse.

就抑制 Th1 型超敏反应,在一定程度上体现了中医药对机体调控作用的特色^[9]。本文通过免疫药效功能评价体系对中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉一同进行免疫调节作用研究,观察两者是否具有差异。

实验结果显示,中国被毛孢、蝙蝠蛾拟青霉和冬虫夏草均具有免疫调节作用,但两者在作用强度和作用靶向性各有倾向。在免疫增强方面,中国被毛孢和蝙蝠蛾拟青霉均可显著提高小鼠吞噬指数和半数溶血值;同时也均能促进 T、B 淋巴细胞增殖能力,但蝙蝠蛾拟青霉作用要强于中国被毛孢;中国被毛孢还能显著提高 NK 细胞活性,而蝙蝠蛾拟青霉在本研究中未发现。在免疫抑制方面,中国被毛孢除能抑制小鼠耳廓肿胀程度外,还能抑制小鼠脾脏和胸腺增大,而蝙蝠蛾拟青霉对胸腺增大无作用,中国被毛孢免疫抑制作用要强于蝙蝠蛾拟青霉。

因此,通过检测中国被毛孢菌粉和蝙蝠蛾拟青霉菌粉对先天性免疫系统 NK 活性、吞噬指数的影响及对适应性免疫系统细胞免疫、体液免疫的影响,结果表明中国被毛孢、蝙蝠蛾拟青霉均具有免疫调节作用,但中国被毛孢免疫抑制作用及增强天然免疫系统作用要强于蝙蝠蛾拟青霉,而对适应性免疫系统增

强作用蝙蝠蛾拟青霉略强于中国被毛孢。

参考文献:

- [1] 蒋毅,姚一建. 冬虫夏草无性型研究概况[J]. 菌物系统, 2003,22(1):161~176.
- [2] 赵锦,王宁,陈月琴等. 冬虫夏草无性型的分子鉴别. 中山大学学报(自然科学版)1999. 38(1):121.
- [3] 王宁,陈月琴,章卫民等. 虫草属多元起源的分子生物学证据. 中山大学学报(自然科学版). 2000, 39(14):70.
- [4] 魏鑫丽,印象初,郭英兰等. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析. 菌物学报. 2006,25(2):192.
- [5] 杨金玲,肖薇,何惠霞,等. 蝙蝠蛾拟青霉与冬虫夏草关系的分子系统学研究[J]. 药科学报,2008,43(4):421~426.
- [6] 徐孝平,王辉,陈民利,等. 盐酸奥芬米洛对二硝基氟苯诱导小鼠迟发型变态反应的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(6):617.
- [7] 王辉,林琳,陈民利,等. 盐酸奥芬米洛对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 实验动物与比较医学,2008, 28(3):177.
- [8] 寿旗扬,傅惠英,陈方明,等. 中国被毛孢发酵物对 NOD 小鼠 1 型糖尿病的预防作用[J]. 中草药. 2010,41(8):1311~1315.
- [9] Li CY, Chiang CS, Tsai mL, et al. Two-sided effect of Cordyceps sinensis on dendritic cells in different physiological stages[J]. Journal of Leukocyte Biology. 2009,85(6):987~995.

[修回日期]2012-08-25

(上接第 16 页)

提高,仅使造血干细胞数量增加,而不能增强其干细胞功能,生成淋巴细胞的能力降低,所以,老龄小鼠 B 淋巴细胞及 T 减少^[7,8]。本研究发现随年龄增长,Cramp 基因敲除后,骨髓长期造血干细胞(LT-HSC)减少,而骨髓多潜能造血祖细胞(MPP-HSC)增多;同时,骨髓中前体 B 淋巴细胞和未成熟 B 淋巴细胞减少,而成熟 B 淋巴细胞增多。这说明 Cramp 基因在骨髓造血干细胞及 B 淋巴细胞发育及衰老中具有重要作用,其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Franceschi C. Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? [J]. Nutrition reviews. [Review]. 2007;65:S173~176.
- [3] Goto M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? [J]. Bioscience trends. [Review]. 2008;2:218~230.

- [4] Navarrete-Reyes AP, Montana-Alvarez M. Inflammaging. Aging inflammatory origin [J]. Revista de investigacion clinica. [Review]. 2009;61:327~336.
- [5] 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.
- [6] Jiang H, Chen W, Qu L, et al. ELISA for aging biomarkers induced by telomere dysfunction in human plasma[J]. Journal of biomedicine & biotechnology. 2010;2010:121947.
- [7] Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:9194~9.
- [8] Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells[J]. Journal of Experimental Medicine 2000;192:1273~80.
- [9] Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation[J]. PLoS Biology 2007; 5:e201.

[修回日期]2012-08-25