

# GATA-3 基因在白血病骨髓基质细胞中的表达

吴秀丽<sup>1</sup>, 李扬秋<sup>1</sup>, 王震<sup>1</sup>, 陈少华<sup>1</sup>, 杨力建<sup>1</sup>, 罗更新<sup>1</sup>

张涓<sup>1</sup>, 朱康儿<sup>1</sup>, 韩忠朝<sup>2</sup>

**The Expression of Transcription Factor GATA-3 Gene in Bone Marrow Stromal Cells from Patients with Leukemia**

WU Xiu-li<sup>1</sup>, LI Yang-qiu<sup>1</sup>, WANG Zhen<sup>1</sup>, CHEN Shao-hua<sup>1</sup>, YANG Li-jian<sup>1</sup>, LUO Geng-xin<sup>1</sup>, ZHANG Huan<sup>1</sup>, ZHU Kang-er<sup>1</sup>, HAN Zhong-chao<sup>2</sup>

1. Institute of Hematology, Medical College, Ji nan University, Guangzhou 510632, China; 2. Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences and the Peking Union of Medical College

**Abstract :Objective** To investigate the expression of transcription factor GATA-3 gene in the bone marrow stromal cells (BMSCs) from patients with leukemia or normal controls. **Methods** The expression of GATA-3 gene was analyzed by using RT-PCR-ELISA in the BMSCs from 34 normal cases and 42 cases with leukemia. The semi-quantitative expression levels of GATA-3 gene in the BMSCs from patients with leukemia were compared with normal controls. **Results** The expression of GATA-3 gene could be detected in the BMSCs from both normal controls and the cases with leukemia. The expression rates of GATA-3 gene in the BMSCs from acute myelocytic leukemia (AML) and chronic myelocytic leukemia (CML) were similar to the normal controls, whereas the expression rate in the BMSCs from acute lymphocytic leukemia (ALL) was significant lower than the normal controls ( $P < 0.05$ ). The rank of expression level of GATA-3 gene in the BMSCs was "AML > ALL > normal > CML". **Conclusion** The expression of GATA-3 gene could be identified in the BMSCs from normal controls and patients with leukemia. It may influence the regulation of hematopoiesis in the BMSCs and the change of expression pattern may play a certain role in pathogenesis and development of leukemia.

**Key words:** GATA-3 gene; Leukemia; Bone marrow stromal cells; RT-PCR-ELISA

**摘要:**目的 了解转录因子 GATA-3 基因在白血病和正常骨髓基质细胞 (BMSC) 中表达的情况。方法 体外扩增培养 BMSC, 运用 RT-PCR-ELISA 方法检测 GATA-3 基因的表达情况, 并对其相对表达水平进行半定量比较。结果 GATA-3 基因在正常和白血病的 BMSC 中均有一定的表达。BMSC 中急性髓性白血病 (AML) 和慢性粒细胞白血病 (CML) 组的 GATA-3 基因表达率与正常组比较无明显差异, 而急性淋巴细胞白血病 (ALL) 组的 GATA-3 表达率比正常组低, 且 AML 的 BMSC 中 GATA-3 基因表达水平 > ALL > 正常 > CML。结论 转录因子 GATA-3 基因可在正常和白血病骨髓基质细胞中表达, 并可能影响骨髓微环境的造血调控作用, 其表达模式的改变可能与白血病发生发展有一定的关系。

**关键词:** GATA-3 基因; 白血病; 骨髓基质细胞; RT-PCR-ELISA

中图分类号: R733.7; Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)01-0001-03

## 0 引言

近年的研究发现转录因子与造血微环境的造血调控作用关系密切<sup>[1]</sup>。转录因子 GATA 家族基因在造血系统表达广泛并参与造血调控, GATA-3 对调节造血细胞尤其是 T 细胞等免疫细胞的发育和

分化起着重要的作用且与血液病发病关系密切, 但 GATA-3 能否在骨髓微环境的基质细胞中表达并参与调节微环境造血调控作用尚不清楚。本文对 GATA-3 基因在白血病和正常骨髓基质细胞中的表达情况进行了初步研究。

## 1 资料和方法

### 1.1 研究对象

经临床骨髓细胞形态学和细胞遗传学确诊的未经治疗的白血病患者骨髓标本 42 例, 包括 18 例

收稿日期: 2004-02-17; 修回日期: 2004-05-10

基金项目: 国家攀登计划资助项目 (95-专-10); 广东省医学科研基金资助项目 (A2000312)

作者单位: 1. 510632 广州, 暨南大学医学院血液病研究所; 2. 中国协和医科大学血液学研究所

AML (3 例 M1、5 例 M2、3 例 M3、1 例 M4、4 例 M5 和 2 例 M6)、7 例 ALL 和 17 例 CML, 年龄 5 ~ 65 岁, 男 24 例, 女 18 例; 骨髓涂片形态学检查正常的非血液病患者的骨髓标本 34 例作为对照, 年龄 14 ~ 72 岁, 男 13 例、女 21 例。

### 1.2 BMSC 的培养

按常规方法用 Ficoll 淋巴细胞分离液 (密度 1.077) 分离骨髓单个核细胞 (BMMNC)。利用 IMDM 培养基, 按已报道方法培养 BMSC<sup>[2]</sup>。

### 1.3 BMSC 的传代、收集和鉴定

培养第 4 ~ 5 天时, 在倒置光显微镜下观察贴壁细胞 (即 BMSC) 和悬浮细胞的生长情况。视细胞扩增情况予以半量或 2/3 量换液, 并将取出的培养液中的悬浮细胞离心、计数后按常规方法提取 RNA 和合成 cDNA。约 4 周后贴壁细胞可达 80% 瓶壁面积, 可予以消化传代。消化传代 2 ~ 3 次后收集贴壁细胞提取 RNA。BMSC 主要以成纤维细胞和内皮细胞为主, 因此选取人成纤维细胞表面蛋白和 vWF (内皮细胞表达的抗原) 作为 BMSC 的表面识别标记, 用间接免疫荧光法鉴定 BMSC<sup>[2]</sup>。

### 1.4 RT-PCR-ELISA

应用 PCR-ELISA 试剂盒进行检测 (Roche 公司), 分别用目的基因 GATA-3 (上游引物: 5'-ATCACAAAA TGAACGGACA GA, 下游引物: 5'-GCACTTTTTGGATTTGCTA GA, 探针: 5'-biotin-TAACAGACCCCTGACTATGAA GAA G) 和  $\beta$ -M 基因引物<sup>[2]</sup> 进行 PCR 扩增。PCR 总反应体系 25  $\mu$ L, 其中含有 1  $\mu$ L cDNA、0.75 U Taq DNA 聚合酶、地高辛 (DIG) 标记的 dNTP 混合物 200  $\mu$ mol/L (包括 200  $\mu$ mol/L dATP、dCTP 和 dGTP, 190  $\mu$ mol/L dTTP 和 10  $\mu$ mol/L DIG-dUTP)、1  $\times$  PCR 缓冲液 (不含 MgCl<sub>2</sub>)、0.4  $\mu$ mol/L 引物, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 及超纯水。GATA-3 基因的 PCR 反应条件为 94 3min, 94 变性 1min, 62 退火 1min, 72 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 10min;  $\beta$ -M 基因的 PCR 反应的退火温度为 58 1min, 共 30 个循环, 其余条件同上。PCR 产物进一步用于 ELISA 检测, 操作方法按已报道方法进行<sup>[2]</sup>。

### 1.5 数据处理及统计学分析

用卡方检验对白血病组和正常组的 GATA-3 基因表达率进行比较; 以  $\beta$ -M 基因表达作为内参照<sup>[5]</sup> 分别对 GATA-3 基因的表达水平进行标准化处理, 采用计量资料秩和检验, 通过比较 GATA-3 基因 A<sub>405</sub> 值/  $\beta$ -M 基因 A<sub>405</sub> 值的比值来进行白血病组和正常组的 GATA-3 基因表达水平的半定量比较。

## 2 结果

### 2.1 BMSC 的体外扩增及鉴定结果

于倒置光显微镜下直接观察 BMSC 的形态, 发现其主要为梭形的成纤维细胞, 少数为内皮细胞、脂肪细胞和巨噬细胞等, BMSC 的间接免疫荧光鉴定结果也证实了成纤维细胞和内皮细胞这两种主要细胞成分的存在。

### 2.2 GATA-3 基因的表达情况

根据 RT-PCR-ELISA 中阴性对照和阳性对照的实测结果, 确定 A<sub>405</sub> < 0.020 为阴性值。GATA-3 基因的 BMSC 组和骨髓细胞组中均可见部分 RT-PCR-ELISA 阴性的结果。AML、ALL 和 CML 组 BMSC 中的 GATA-3 基因表达率分别与正常组进行两两比较, 发现仅 ALL 组的 GATA-3 基因表达率与正常组的差异有统计学意义, ALL 组的 GATA-3 基因表达率 (42.9%) 比正常的 (79.4%) 低; AML、ALL 和 CML 组的骨髓细胞中 GATA-3 基因表达率与正常组相比均无显著性差异, 见表 1。

表 1 GATA-3 基因在白血病和正常组中的表达率

组别	BMSC			骨髓细胞		
	阳性例数	表达率 (%)	P*	阳性例数	表达率 (%)	P*
AML	13	72.2	0.558	11	78.6	0.123
ALL	3	42.9	0.047	5	83.3	0.355
CML	11	64.7	0.256	13	92.9	1.000
正常	27	79.4		24	96.0	

\* 采用卡方检验, P < 0.05 有统计学意义

### 2.3 GATA-3 基因的表达水平

看家基因  $\beta$ -M 的 RT-PCR-ELISA 检测结果均为阳性, 说明  $\beta$ -M 基因在 BMSC 和骨髓细胞的标本中均有表达。以看家基因  $\beta$ -M 的表达水平作为内参照, 分别对 GATA-3 基因的表达水平进行标准化处理, 采用秩和检验, 对白血病组和正常组的 BMSC 及骨髓细胞中 GATA-3 的基因表达水平分别进行半定量比较。发现各组 BMSC 中 GATA-3 基因表达水平的差异具有统计学意义 (Kruskal-Wallis 检验, P = 0.047), 再将 AML、ALL、CML 和正常组分别进行两两比较 (Mann-Whitney 检验), P 均 < 0.05, 平均秩的比较提示 AML 的 GATA-3 基因表达量 > ALL > 正常 > CML。各组骨髓细胞中 GATA-3 基因表达水平的差异亦具有统计学意义 (Kruskal-Wallis 检验, P = 0.013), 再将 AML、ALL、CML 和正常组分别进行两两比较, P 均 < 0.05, 平均秩的比较提示 ALL 的 GATA-3 基因表达量 > 正常 > AML > CML。

### 3 讨论

转录因子 GATA-3 属锌指家族转录因子,主要调节 T 细胞等免疫细胞发育、增殖和分化,被称为“T 细胞的特异性活化子”,并可调节 TCR 基因的表达<sup>[3,4]</sup>。GATA-3 还可调控 Th2 与 Th1 的形成,特异地通过对 Th2 细胞的正调控作用来直接抑制 Th1 细胞的发育,从而调节 Th 向 Th2 分化发育,并在胸腺细胞发育过程中调控 CD8<sup>+</sup> 基因的表达<sup>[5]</sup>。近年来认为 GATA-3 主要是通过调节免疫细胞的生长发育来调控造血。

既往的研究发现,GATA-3 可在多种类型的白血病中表达<sup>[6]</sup>。提示 GATA-3 对于正常造血和病态造血都有着重要的调控作用,但它对骨髓微环境造血调控的影响尚不清楚,分析 GATA-3 在 BMSC 中的表达情况,有助于了解在正常和病态造血中转录因子对微环境造血的正性和负性调控作用。

本研究发现转录因子 GATA-3 基因在各类白血病和正常的 BMSC 中都有一定的表达;在白血病骨髓细胞中有广泛的表达。AML 和正常 BMSC 中 GATA-3 基因的表达率较高(分别为 72.2% 和 79.4%),而 ALL 和 CML 中 GATA-3 基因的表达率较低(分别为 42.9% 和 64.7%);提示 GATA-3 基因在正常 BMSC 中广泛表达,而白血病的微环境中基质细胞的 GATA-3 基因表达可能发生了变化,GATA-3 基因在白血病基质中的异常表达可能支持白血病细胞的增殖。本研究检测的 GATA-3 在 AML、ALL 和 CML 中的表达率,与我们以往报道的差异不大,但本研究所检测的正常标本的表达率较高,可能与 GATA-3 基因表达广泛而 BMSC 和骨髓细胞成分复杂有关,亦可能是选用敏感的检测方法使阳性率增高。因为所检测的 ALL 诊断没有表型分型,而 GATA-3 不表达于 B-ALL,故本研究检测的 GATA-3 阴性的 ALL 病例可能是 B-ALL 或是 GATA-3 缺陷/突变的非 B-ALL,还有待进一步的确定。

进一步分析 GATA-3 基因在 BMSC 中的表达水平,结果显示 AML 的 BMSC 中 GATA-3 基因表达量 > ALL > 正常 > CML ( $P$  均 < 0.05);对 GATA-3 基因在骨髓细胞中的表达水平进行比较,发现 ALL 骨髓细胞中 GATA-3 基因表达量 > 正常 >

AML > CML ( $P$  均 < 0.05)。微环境中 GATA-3 的异常表达可能支持病态造血调控,亦可能与 GATA-3 基因异常重排有关。ALL 的 BMSC 和骨髓细胞中 GATA-3 的表达量高于正常,可能与 ALL 中存在免疫细胞(T 细胞等)恶性克隆有关;AML 的骨髓基质中 GATA-3 表达上调,而骨髓造血细胞中表达下调,推测 AML 的骨髓微环境中可能存在恶性克隆而使 GATA-3 表达上调。GATA-3 的表达上调可能通过影响免疫相关基因表达来调控 Th 细胞从而影响细胞的免疫功能,在白血病发病的免疫机制中起一定的作用。而 CML 的 BMSC 和骨髓细胞中 GATA-3 的表达量均低于正常,推测 CML 的 GATA-3 异常低表达可能是由于 GATA-3 基因发生突变引起功能改变,参与白血病的发生<sup>[7]</sup>。

本研究首先提供了 GATA-3 基因在白血病患者和正常人 BMSC 的表达情况,为了解 BMSC 在造血调控分子机制中的作用提供了进一步的资料,但所检测的白血病病例数还偏少,有待进一步扩增样本量,提供更为全面的资料。

#### 参考文献:

- [1] Hall BM, Fortney JE, Gibson LF. Alteration of nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) expression in bone marrow stromal cells treated with etoposide [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61 (10): 1243-1252.
- [2] 吴秀丽,李扬秋,王震,等. GATA-1 和 GATA-2 基因在再障和正常人骨髓基质细胞中的表达[J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2003, 9(5): 383-387.
- [3] Debacker C, Catala M, Labastie MC. Embryonic expression of the human GATA-3 gene [J]. *Mech Dev*, 1999, 85 (1-2): 183-187.
- [4] Smith VM, Lee PP, Szychowski S, et al. GATA-3 dominant negative mutant. Functional redundancy of the T cell receptor alpha and beta enhancers [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270 (4): 1515-1520.
- [5] Farrar JD, Ouyang W, Lohning M, et al. An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3 [J]. *J Exp Med*, 2001, 193(5): 643-650.
- [6] Minegishi N, Morita S, Minegishi M, et al. Expression of GATA transcription factors in myelogenous and lymphoblastic leukemia cells [J]. *Int J Hematol*, 1997, 65(3): 239-249.
- [7] 李扬秋,杨力建,陈少华. CML 中转录因子 GATA-3 的表达和突变分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 1999, 7(4): 265-267.

[编辑:张麟;校对:贺文]