

具有维持造血干/祖细胞能力的新型豆类凝集素的分离、纯化及功能鉴定*

谢小燕 谢超 李锦 白慈贤 裴雪涛**

(军事医学科学院输血研究所, 北京 100850)

摘要 一种分离自豆类的新型凝集素不仅具有凝集活性, 还具有体外长期维持造血干/祖细胞的能力。由眉豆 (*Dolichos lablab*) 中分离得到了这种多亚基的凝集素——FRIL (Flt3 receptor-interacting lectin), 并对它进行了核酸和蛋白质序列分析。免疫细胞分析显示, 它的受体是 CD34⁺ 造血干/祖细胞所特有的。在培养基中添加这种凝集素可长期维持 CD34⁺ 细胞存活和增殖能力。以 Flt3 配基 (FL) 作为对照, 在 28 天的培养时间内, 相对于 FL, FRIL 可维持细胞较高的 G0/G1 期比例 (80% 以上 G0/G1 期) 和长期培养中 (14 天以上) 1.5 倍以上的集落形成量。可见 FRIL 通过滞留造血干/祖细胞于 G0/G1 期而维持它们的自我更新潜能。

关键词 凝集素, 造血干/祖细胞, 维持培养

学科分类号 Q71

凝集素在动植物中广泛存在, 许多植物凝集素都能作为动物细胞信号转导的外源刺激因子, 在各种生理反应中发挥作用, 因此越来越多的凝集素得到开发利用。最近发现的一种植物凝集素 FRIL, 能用于离体条件下长期维持造血干/祖细胞的自我更新能力^[1], 这一特性的利用将有助于解决造血干/祖细胞体外扩增和移植中出现的许多问题, 拓展其临床应用的范围。

造血干细胞移植已经是目前常用的各种恶性、非恶性血液肿瘤疾病和大剂量癌症化疗患者骨髓重建的治疗手段, 但造血干细胞的来源及数量稀少, 许多人都试图通过离体 (*ex vivo*) 的手段扩增造血干/祖细胞, 但干细胞增殖和自我更新与其保持多向分化潜能之间往往产生矛盾^[2]。相反, 如果能将造血干/祖细胞长期维持在静止期, 对于使细胞周期同步化以利于下一步的基因治疗, 清除残余的肿瘤细胞同时保护造血干细胞, 以及调整合适的时机进行细胞扩增或移植都十分有利。FRIL 是目前从植物中提取的唯一具有这种功能的天然物质, 由于中国具有丰富的植物资源, 因此我们试图获取、验证其功能并进一步开发这样的凝集素为造血干/祖细胞移植提供帮助。

Flt3 的配基 FL 是公认的维持造血干/祖细胞最合适的细胞因子之一, 但它同样可诱导静息的干细胞进行增殖与分化, 导致具重建功能的干细胞减少^[3]。由于 FRIL 也是 Flt3 的配基, 因此我们以 FL 为对照, 验证了 FRIL 在造血干/祖细胞维持方面的功能。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂盒

眉豆购自中国农业科学院。植物 RNA 提取试剂盒为 Omega Bio-tek 公司产品, 其他各种分子生物学内切酶、连接酶及 RT-PCR 试剂盒、pMD-18T 载体均为 TaKaRa 公司产品。蔗糖、麦芽糖、甘露糖、葡萄糖购自上海试剂厂, α -甲基 α -D-甘露糖苷、3-O α -D 甘露糖、BSA、甲基纤维素、2-巯基乙醇、HRP 为 Sigma 公司产品。亲和层析介质 mannose-Sepharose matrix 为 Pharmacia 公司产品, 自装层析柱。脐血取自北京中西医结合医院。磁性细胞分离仪和 CD34⁺ 细胞分离试剂盒 (miniMACS magnetic cell sorting system) 购自 Miltenyi Biotech GmbH 公司。RPMI 1640、胎牛血清、马血清和 TRIzol 为 Gibco 公司产品。造血集落培养试剂盒为 Stem Cell 公司的 MethocultTM SF。淋巴细胞分离液购自天津血液学研究所。rhIL3、rhG-CSF、rhGM-CSF 等均购自 Peprotech 公司。细胞培养板为 Nunc 公司产品。CD34⁺ 培养基为含 10% 胎牛血清、1% BSA 的 RPMI 1640。

1.2 FRIL cDNA 的克隆和序列测定

植物 RNA 的提取依照 EaZy Nucleic Acid

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999053903), 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA216151), 国家高技术“863”计划重大专项课题 (2002AA205051) 和北京市科委自然科学基金资助项目 (H020220010190)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-06-04, 接受日期: 2003-07-16

(E. Z. N. A.) 植物 RNA 提取试剂盒说明进行, 以 RNA PCR 试剂盒 (AMV) Ver. 2.1 反转录成 cDNA, 利用引物 FRIL-L (5' CGTCACAGAACGC-CTCTTGTA 3'), FRIL-U (5' CGCATGTTTCC-CAGTAAGGTTA 3'), 经 94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 45 s) 35 个循环, 72℃ 7 min 反应获得 FRIL cDNA, 连接入 pMD-18T 载体中, 挑选多个经鉴定正确插入的克隆送博亚公司进行序列测定。

1.3 植物凝集素的提取

称取 50 g 眉豆, 研磨成粉, 以 5 倍体积 Tris 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L $CaCl_2$, pH 8.0) 匀浆, 4℃ 平衡 4 h 以上; 4℃ 20 000 g 高速离心 20 min, 取上清; 以冰醋酸调 pH 至 4.0, 同上高速离心取上清; 40% NaOH 调 pH 至 8.0, 同上高速离心取上清, 即凝集素粗提液。粗提液以 PEG 6000 浓缩至原来的 1/10 体积, 与预装柱并经 Tris 缓冲液平衡后的亲和层析介质结合, 4℃ 反应 4 h 以上, 接着用 Tris 缓冲液洗涤至没有蛋白质流出, 再以 200 mmol/L α -甲基 α -D-甘露糖苷洗脱得到凝集素 FRIL 纯溶液。获得的凝集素经 BECKMAN-COULTER DU640 核酸-蛋白质分析仪定量后, 分装成小管, -80℃ 冻存。

1.4 凝集素蛋白 N 端测序

取大量纯化的 FRIL 蛋白, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分开各亚基, 通过半干转移法转移至 PVDF 膜上, 考马斯亮蓝染色确定条带并剪下, 以 491A 蛋白质序列分析仪经自动 Edman 降解测定 N 端前 5 个氨基酸序列 (军事医学科学院仪器中心色谱实验室完成)。

1.5 凝集素活性的测定

抽取家兔耳缘静脉血, 处理后用生理盐水配成 2% 红细胞悬液^[4]。在 V 型凝血板上, 将 FRIL 以 PBS 倍比稀释 (1:2), 每孔加 25 μ l, 再加入 2% 新鲜血球悬液 25 μ l, 振荡摇匀后, 25℃ 放置 1~2 h, 肉眼观察, 无凝集现象时红细胞沉积在 V 型孔底部呈大红点状, 有凝集现象时呈网状不下沉, 将产生凝集现象时的 FRIL 最大稀释浓度定为一个凝血单位。

1.6 糖抑制试验

各种糖配成 1 mol/L 浓度, 在 V 型凝血板上以 PBS 按 1:10 的梯度倍比稀释, 每孔加 25 μ l, 再往各孔添加 3 个凝血单位的 FRIL 25 μ l, 以及 2% 新鲜血球悬液 50 μ l, 25℃ 放置 1~2 h, 肉眼观察抑制结果, 能与红细胞竞争结合 FRIL 的糖将导致红细胞的沉积。

1.7 凝集素受体表达谱分析

培养、收集各种细胞, 制成爬片或涂片^[5], 以 4% 多聚甲醛固定。清洗后, 在细胞涂片或爬片上滴加标记 HRP 的 FRIL, 室温下反应 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再滴加稀释好的底物反应, 显微镜下观察显色结果, 显色合适时流水冲洗结束反应, 并以苏木素复染细胞核。

收集各种细胞约 10^6 , 依 TRIzol Reagent 说明书提取细胞总 RNA, 经 RNA PCR 试剂盒反转录成 cDNA, 利用 Flt3 特异引物 (F: 5' TCAAGTGC-TGTGCATACAATTCCC 3', R: 5' CACCTGTACC-ATCTGTAGCTGGCT 3') 鉴定各种细胞中 Flt3 受体的表达情况, 并以 β -actin 特异引物 (F: 5' TACCACTGGCATCGTGATGGACT 3', R: 5' TCCT-TCTGCATCCTGTCCGCAAT 3') 为内参, 半定量 PCR 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25 个循环, 72℃ 7 min 检测 Flt3 的表达差异。

1.8 脐血单个核细胞及 CD34⁺细胞的分离

1.8.1 脐血 MNC (mononuclear cell) 的制备: 取 4 h 内采集的肝素抗凝脐血按 1:1 的比例与 PBS 混匀, 再加入总体积 1/4 的含 0.5% 甲基纤维素的生理盐水, 室温静置 30 min, 至血浆与红细胞形成界面, 吸取血浆层, 1 500 r/min 离心 8 min, 用 PBS 悬浮, 按 1:1 的比例缓慢叠加到淋巴细胞分离液 Ficoll (1.077 $\pm$ 0.000 2) g/L 界面上, 采用密度梯度离心法 (20℃ 1 500 r/min 离心 20 min) 分离脐血 MNC。用尖嘴吸管吸取 MNC 层 (中间界面白膜层), 用大体积 PBS 洗涤 3 次, 调整细胞浓度备用。

1.8.2 脐血 CD34⁺细胞的标记: 每 10^8 脐血单个核细胞 (MNC) 悬浮于 300 μ l 4℃ 预温的分离缓冲液 (PBS 中添加 2 mmol/L EDTA, 0.5% 牛血清白蛋白), 加 100 μ l 非特异性阻断抗体 FcR 封闭剂, 混匀。然后再加 100 μ l 磁珠偶联的 CD34 单克隆抗体 (QBEND10), 混匀, 6~12℃ 孵育 30 min。用分离缓冲液洗两次, 1 500 r/min 离心 4 min, 以除去未结合的抗体, 然后用 1 ml 分离缓冲液悬浮备用。

1.8.3 脐血 CD34⁺细胞的分选: 将分离柱置于磁场中, 以 1 ml 分离缓冲液冲洗分离柱, 将标记的脐血 MNC 悬液缓慢加入并通过分离柱, 待其自然流出后用 500 μ l 分离缓冲液洗涤不结合的细胞, 共 4 次。将分离柱移出磁场, 加 1 ml 分离缓冲液加压洗脱吸附细胞, 收集组分为 CD34⁺细胞。

1.9 CD34⁺细胞的培养

细胞以 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ /ml 的浓度培养于含

10% FBS、0.5% BSA 的 RPMI 1640 培养基中，分别添加 FRIL、FL、(FRIL + FL) 培养，FRIL、FL 添加的终浓度均为 300 $\mu\text{g/L}$ ，不更换培养基，于一定时间收集细胞用于检测。

1.10 细胞周期分析

培养一定时间的细胞以 PBS 洗涤后，每 10^6 细胞用 1 ml 70% 冷乙醇固定，4℃ 冰箱过夜。用 PBS 洗去乙醇，加入 200 μl PBS 配置的 1 g/L RNaseA，37℃ 作用 30 min，再加入 400 μl (含 1.0% Triton X100、0.9% NaCl) 50 mg/L 的 PI 染液重悬，进行 DNA 染色，4℃ 避光 30 min。最后 PBS 洗涤 3 次，以 FACS Sort 流式细胞仪读取分析数据。

1.11 混合集落培养

2 000 ~ 8 000 个细胞接种于 0.5 ml (含 5 $\mu\text{g/L}$ GM-CSF、5 $\mu\text{g/L}$ IL-3、50 $\mu\text{g/L}$ SCF、2 U/mL EPO、 5×10^{-5} mol/L 2-ME、10% FBS、10% HS)

的甲基纤维素预混培养基 MethoCult™ SF 中，按 24 孔板中每孔 0.5 ml 加入，培养至 16 天计数形成的各种集落。细胞计数采用血球计数板，取 3 次计数平均值。集落计数在倒置显微镜 (Nikon) 下直接观察，大于 50 个细胞的为一个集落，取 3 个平行孔的平均值。集落密度即每 10^4 个细胞形成的集落数。

1.12 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，经单因素方差分析与两因素析因方差分析 (SAS 软件) 检验判断组间差异和两因素之间的交互作用。

2 结 果

2.1 凝集素的序列测定

取新生的眉豆苗提取 RNA，RT-PCR 扩增 FRIL 序列，并插入 T 载体中，随机选择 4 个正确

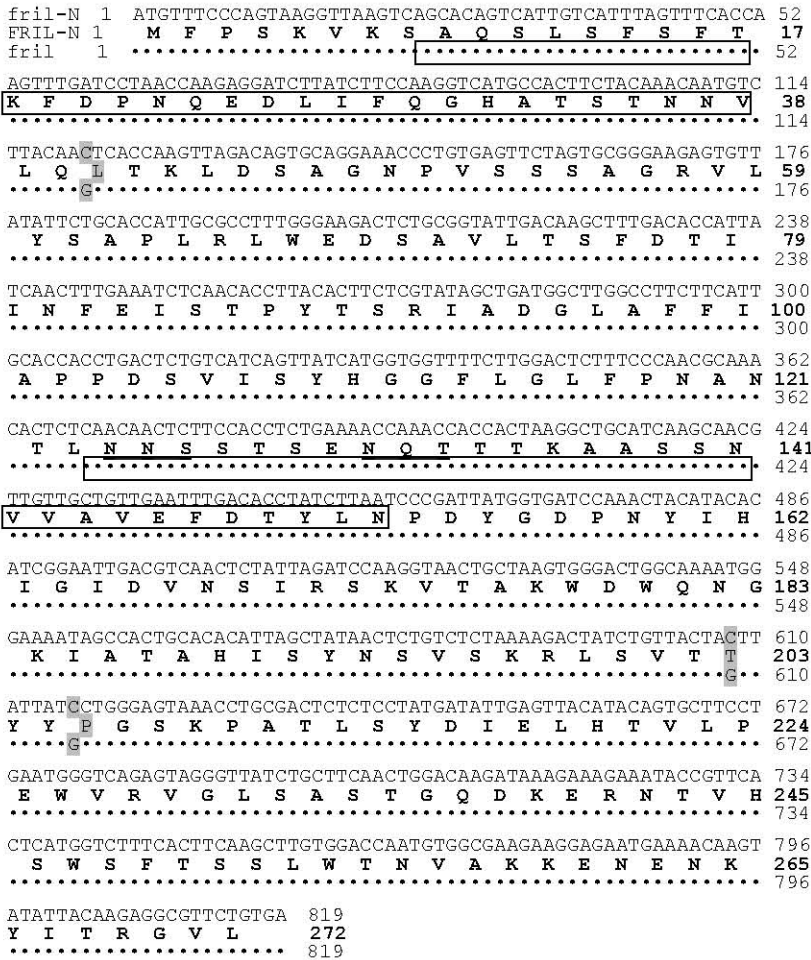


Fig. 1 The cDNA sequence and derived protein sequence of cloned FRIL
fril-N represents the cloned FRIL cDNA, FRIL-N is its derived protein sequence, and fril represents the sequence of FRIL cDNA quoted from GenBank. The underlined parts are potential N-linked glycosylation sites, mutated sites are emphasized, and the main coding segments of α , β subunit are framed.

的克隆以通用引物进行测序, 其结果一致. 与 GenBank 中的 FRIL 序列相比有 3 个碱基的突变, 相应导致其编码蛋白质序列的 3 个突变 (图 1), 但通过蛋白质成熟过程的剪接、修饰, 其终产物可能与已有的 FRIL 蛋白质序列相一致.

2.2 凝集素的纯化、N 端测序及其生化特性

大约每 50 g 干眉豆可获得粗提蛋白 1.8 g, 获得纯 FRIL 27 mg. 经 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 纯化的 FRIL 含 5 个亚基, 分别是 1 个 β 亚基和 4 个 α 亚基^[6] (图 2), N 端测序结果见表 1, 在检测的范围内与文献 [6] 提供序列相同, 但 $\alpha 2$ 亚基还出现 N 端缺失一个氨基酸的组分.

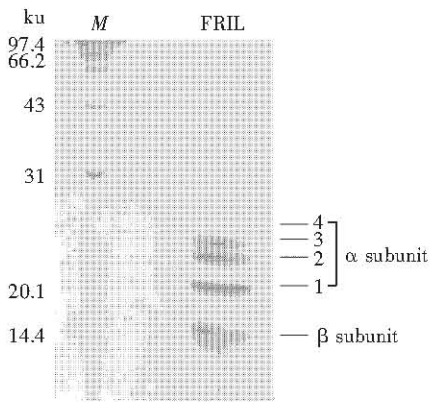


Fig. 2 15% SDS-PAGE analyses purified FRIL
M: middle range protein molecular mass marker.

Table 1 The N-terminal sequencing result of part of the FRIL subunits

subunit	amino acid sequence of N-terminal
β	AQSLSF
$\alpha 1$	TTTKAA
$\alpha 2$	DSSTS/SSTSE

凝集实验证实, 纯化的 FRIL 在稀释到 300 $\mu\text{g/L}$ 左右仍有凝集活性, 因此设定这个浓度为一个凝血单位. 糖抑制实验结果见表 2. 由表 2 看出, FRIL 主要与 α -D-甘露糖有很高的亲和性, 亲和层析纯化 FRIL 也正是利用这一特性来进行的.

Table 2 Glucose inhibition assays detecting the affinity property of FRIL

Glucose	The effective diluent concentration in competitive reaction/ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
saccharose	10^{-2}
maltose	10^{-2}
α -D-mannose	10^{-3}
glucose	10^{-1}
α -methyl α -D-mannoside	—
3-O α -D-mannose	10^{-5}

2.3 表达 FRIL 受体的细胞谱系

利用 HRP 标记的 FRIL 筛查了部分造血系细胞和人的肿瘤细胞, 发现在检测范围内 FRIL 仅与少数造血系肿瘤细胞 (HEL、KG1a) 及 $\text{CD}34^+$ 造血干/祖细胞特异结合, 而且与 $\text{CD}34^+$ 细胞的结合率不能达到 100% (图 3a), 推测在 $\text{CD}34^+$ 细胞中还有一部分 FRIL 受体弱表达的细胞亚群. 而 FRIL 不与其他细胞发生作用也确保了它用于造血调控的专一性.

同时提取各种造血系细胞和人的肿瘤细胞 RNA, 反转录成 cDNA 后用 Flt3 特异引物进行扩增, 同时以 β -actin 特异引物为内参, 半定量检测各细胞系中 Flt3 受体的表达情况, 结果与组化结果大致相符 (图 3b), 只有 HEL 的检测出现组化阳性、PCR 检测阴性的现象, 推测作为白血病细胞, 它产生了突变的 FRIL 受体, 而非野生型的 Flt3.

2.4 FRIL 体外长期维持 $\text{CD}34^+$ 造血干/祖细胞

通过免疫磁珠法分离 $\text{CD}34^+$ 细胞, 平均每份脐血 65 ml, 大约可以获得单个核细胞 $(1.8 \pm 1.2) \times 10^8$ 个, $\text{CD}34^+$ 细胞 $(2.6 \pm 1.9) \times 10^6$ 个. 取多次分离的细胞培养结果进行分析.

分别在 FRIL、FL 培养的 0、3、7、14、21、28 天收集细胞, 以流式细胞仪分析细胞周期 (图 4). 由图 4 中看出, FRIL 培养的 $\text{CD}34^+$ 造血干/祖细胞在 28 天的培养过程内始终有 80% 以上的细胞维持在 G0 期, 而 FL 总是比 FRIL 活化了更多的造血干/祖细胞进入细胞周期 (各组 $P < 0.05$). -80°C 长期冻存的 FRIL 活性没有明显变化.

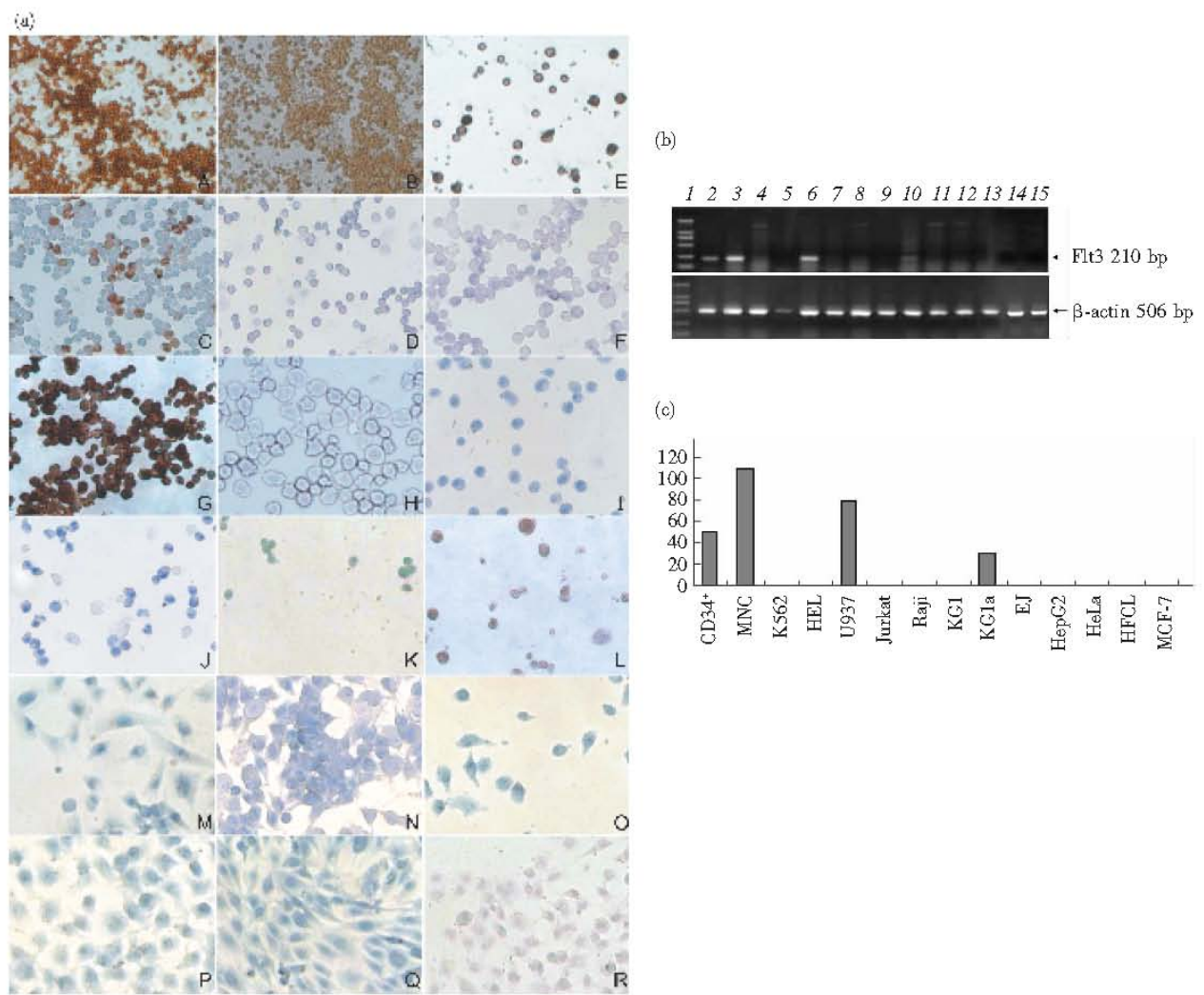


Fig. 3 The expression of the specific FRIL receptors on different cells and cell lines detected by HRP-FRIL and semi-quantitative RT-PCR

CB is human umbilical cord blood, MNC is mononuclear cell, K562 and HEL are human erythroleukemia cell line, U937 and KG1 are human acute myelogenous cell line, KG1a is human myeloblastic cell line, Jurkat is human T lymphoblastoid cell line, HeLa is human cervix epithelioid carcinoma cell line, MCF-7 is human breast cancer cell line, EJ1 is bladder carcinoma cell line, HFCL is human stromal fibroblast cell line, HepG2 is human hepatocellular carcinoma cell line, and HEK 293 is human embryonic kidney cell line. (a) shows the results of histochemistry detection ($\times 100$), within which only the negative control of CD34⁺ and CB are displayed. A: CB (+), B: CB (-), C: CD34⁺ (+), D: CD34⁺ (-), E: MNC, F: K562, G: HEL, H: U937, I: Jurkat, J: Raji, K: KG1, L: KG1a, M: EJ1, N: HEK293, O: HepG2, P: HeLa, Q: HFCL, R: MCF-7. (b) shows semi - quantitative RT - PCR result. 1 : Marker, 2 : CD34⁺, 3 : MNC, 4 : K562, 5 : HEL, 6 : U937, 7 : Jurkat, 8 : Raji, 9 : KG1, 10 : KG1a, 11 : EJ1, 12 : HepG2, 13 : HeLa, 14 : HFCL, 15 : MCF-7. (c) The expression of Flt3 in different cells.

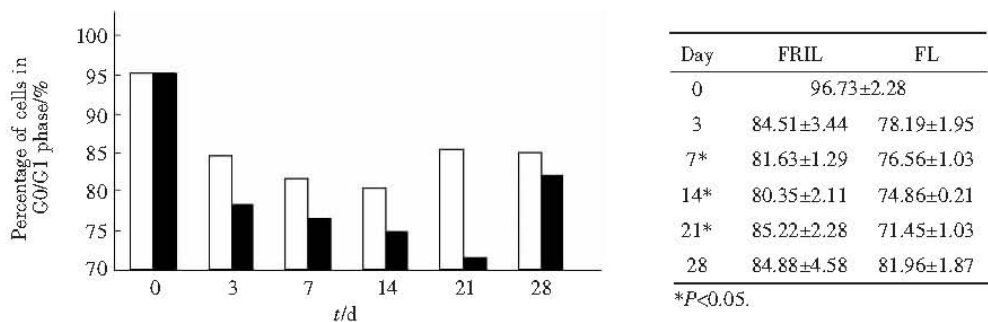


Fig. 4 The percentage of CD34⁺ hematopoietic stem cells staying in G0/G1 stage after treated with FRIL or FL
□: FRIL; ■: FL.

在集落形成的能力上, 14 天之前 FRIL 培养的细胞集落形成能力弱于 FL 组, 其后则维持高于 FL 的水平(表 2). 长期培养体现出 FRIL 在维持造血干/祖细胞多能性上的优势.

Table 3 The colony forming ability of CD34⁺ hematopoietic stem cells treated with FRIL, FL, FRIL and FL combination, respectively

Day	Medium	Myeloid	Erythroid	Mix
0		824 ± 141	8 ± 3	83 ± 10
3	FL	1001 ± 165	10 ± 7	17 ± 21
	FRIL	790 ± 202 ¹⁾	21 ± 17	8 ± 6
	FL + FRIL	863 ± 392	0	16 ± 15
	Blank	795 ± 28	35 ± 14	17 ± 8
7	FL	902 ± 252	34 ± 30	107 ± 95
	FRIL	818 ± 376	35 ± 22	90 ± 84
	FL + FRIL	836 ± 240	119 ± 97	107 ± 91
	Blank	432 ± 107	0	0
14	FL	260 ± 137	11 ± 10	15 ± 13
	FRIL	326 ± 121 ¹⁾	21 ± 13 ¹⁾	23 ± 9 ¹⁾
	FL + FRIL	272 ± 147 ³⁾	0 ³⁾	5 ± 5 ³⁾
	Blank	0	0	0
21	FL	130 ± 126	1 ± 1	4 ± 3
	FRIL	295 ± 117 ²⁾	6 ± 4 ¹⁾	12 ± 9 ¹⁾
	FL + FRIL	347 ± 303 ⁴⁾	0 ⁴⁾	0 ³⁾
	Blank	0	0	0
28	FL	120 ± 64	0	1 ± 1
	FRIL	172 ± 60 ¹⁾	0	1 ± 2
	FL + FRIL	180 ± 74	2 ± 2	1 ± 1
	Blank	0	0	0

Note: Colony culture were began with 2 000 cells per 0.5 ml for cells in 0, 3, 7 day, 3 000 cells per 0.5 ml for cells in 14 day, 4 000 cells per 0.5 ml in 21day and 8 000 cells per 0.5 ml in 28 day, respectively.
¹⁾ $P < 0.05$ compared with the FL group, ²⁾ $P < 0.01$ compared with the FL group, ³⁾ $P < 0.001$ there are cross react between FRIL and FL, ⁴⁾ $P < 0.05$ there are cross react between FRIL and FL.

3 讨 论

凝集素是动植物体内的一类蛋白质或糖蛋白, 与细胞表面蛋白或脂类复合物中的单糖或寡糖链具有高度特异的结合能力. 近年来, 凝集素常常作为免疫激活剂或肿瘤细胞的探针应用于生物医学^[7], 造血调控则是凝集素的一条全新的应用途径.

机体造血是通过造血干细胞的自我更新和定向分化实现的. 造血干/祖细胞的增殖和分化受多种因素的调节, 细胞因子是其中最为关键的因素之一, 而 FL 就是目前最常用的体外维持造血干细胞的细胞因子之一. FL 的生物学功能表现在调节早期造血, 其受体多在原始的造血祖细胞中表达. FL 与其他细胞因子协同可诱导所有髓系祖细胞的生长, 并可维持 CD34⁺ 细胞的体外长期扩增. FL

的受体是酪氨酸激酶受体 (RTK) Flt3, 它对造血干细胞的自我更新起着关键的调控作用^[8].

由于凝集素对免疫系统的前体细胞具有有丝分裂原作用, 又能特异地识别某些肿瘤细胞, 而这些细胞一定程度上都具有干细胞的特征, 推测凝集素对干细胞的增殖分化也可能具有一定作用. FRIL 就是在寻找与 Flt3 相关的新刺激因子过程中被发现的^[9], 它与 FL 共用一个受体——Flt3, 它表现出的功能也与 FL 有很多相似性.

本实验分离纯化得到的凝集素 FRIL 经验证, 编码序列与已报导序列存在 3 个碱基的突变, 表达产物是多亚基蛋白, $\alpha 2$ 亚基还出现 N 端缺失一个氨基酸的组分, 是否影响其功能还有待进一步验证. FRIL 具有凝血活性, 选择性结合 α -D-甘露糖残基. 更重要的是, 它能够相对特异地结合造血干/祖细胞, 具有长期维持培养的造血前体细胞自我更新和多潜能性的能力. FRIL 受体表达谱分析显示, FRIL 受体主要出现在造血干/祖细胞上, 在部分处于分化较早期的白血病细胞表面也有 FRIL 受体表达, 并且与野生型 Flt3 受体有区别. FRIL 能将造血干/祖细胞维持在 G0/G1 期, 在 28 天的维持培养过程中, 以 FRIL 培养的 CD34⁺ 细胞 G0/G1 期的比例总在 80% 以上, 超出 FL 的作用水平, 同时比较细胞数上的差别, 推测 FRIL 延长了造血干细胞的细胞周期, 减少了进入分裂和增殖过程的细胞数. 以 FRIL 长期培养 CD34⁺ 细胞相对 FL 表现出较高的集落形成能力, 可见 FRIL 更适用于长期保存造血干/祖细胞的多能性.

在 FRIL 与 FL 的对照使用中也发现, 以 FRIL 培养的 CD34⁺ 细胞前 14 天形成集落的能力弱于 FL 培养的细胞, 14 天后才超出 FL, 形成的集落数一般都在 FL 组的 1.5 倍以上. 推测 FL 造成短期的造血干/祖细胞分裂增殖, 使得它们前期更容易响应细胞因子的刺激产生集落. FRIL 在抑制前体细胞增殖分化方面略优于 FL, 但也不能避免增殖分化的发生, 也可能它对已进入 S/G2/M 期的细胞不再有抑制作用. 合用 FRIL 和 FL 培养的造血干/祖细胞表现出介于单用 FRIL 或 FL 培养之间的增殖特性和分裂、分化能力, 推测 FRIL 与 FL 之间可能存在不同的下游信号响应途径, 因为凝集素大多是多价的, 它们很可能和细胞表面的糖分子形成复杂的交叉连接, 从而区别于 RTK 配体与受体的简单二聚化现象, 提高了亲和力, 相应地改变了细胞的响应方式. 也可能 FRIL 在 Flt3 之外另有受体存

在, 这一点在受体表达谱的检测上也有提示. FRIL 的响应机制及其受体也将成为我们下一步研究的重点.

有研究显示, FL 能明显地、选择性地增强髓系前体细胞的产生^[10], 在我们的混合集落培养实验中也能观察到, 以 FRIL 培养的 CD34⁺ 细胞其产生红系集落的能力总是高于以 FL 培养的细胞, 但二者共用却出现不稳定的结果, 其原理有待进一步探讨. 一旦证实 FRIL 的作用不会导致造血细胞各系分化比例的改变, 则将成为 FRIL 离体培养造血干/祖细胞应用上的另一个优点.

在不更换培养基的情况下, 单独使用 FRIL 可以在长达 28 天的时间内, 维持造血干/祖细胞的自我更新能力, 而 FL 必须与其他细胞因子联合使用才能实现长期体外培养的目的^[11], 同时还产生了增殖和分化. 如果将 FRIL 用于离体 (*ex vivo*) 培养造血干细胞, 经一定时间的作用, 可能使多能性的干细胞得到纯化. 若配合化疗药物, 还能清除血液中的肿瘤细胞, 且对于基因疗法中细胞的同步化也有帮助. 利用我国的植物资源, 开发这一类凝集素, 可能成为一种较廉价的细胞因子, 在研究和应用中发挥作用.

参 考 文 献

- 1 Kollet O, Moore J G, Aviram R, *et al.* The plant lectin FRIL supports prolonged *in vitro* maintenance of quiescent human cord blood CD34⁺ CD38⁻ /SCID repopulating stem cells.

- Exp Hematol, 2000, **28** (6): 726 ~ 736
- 2 唐佩弦. 造血干祖细胞移植的生物学基础. 中国病理生理杂志, 2000, **16** (10): 932 ~ 934
- Tang P X. Chinese Pathophysiology, 2000, **16** (10): 932 ~ 934
- 3 Namikawa R, Muench M O, Roncarolo M G. Regulatory roles of the ligand for Flk2/Flt3 tyrosine kinase receptor on human hematopoiesis. Stem Cells, 1996, **14** (4): 388 ~ 395
- 4 孙 册, 朱 政, 莫庆汉. 凝集素. 北京: 科学出版社, 1986. 20
- Sun C, Zhu Z, Mo Q H. Lectin. Beijing: Science Press, 1986. 20
- 5 斯佩克特 D L, 戈德曼 R D, 莱因万德 L A. 黄培堂, 等译. 细胞实验指南. 北京: 科学出版社, 2001. 951 ~ 964
- Spector D L, Goldman R D, Leinwand D L. Translated by Huang P T, *et al.* Cell: A Laboratory Manual. Beijing: Science Press, 2001. 951 ~ 964
- 6 Colucci G, Moore J G, Feldman M, *et al.* cDNA cloning of FRIL, a lectin from *Dolichos lablab*, that preserves hematopoietic progenitors in suspension culture. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96** (2): 646 ~ 650
- 7 赵寅生. 凝集素生物学功能及应用. 安徽农业大学学报, 2001, **28** (4): 445 ~ 448
- Zhao Y S. Anhui Agricultural University, 2001, **28** (4): 445 ~ 448
- 8 Rosnet O, Birnbaum D. Hematopoietic receptors of class III receptor-type tyrosine kinases. Crit Rev Oncog, 1993, **4** (6): 595 ~ 613
- 9 Moore J G, Fuchs C A, Hicklin D J, *et al.* A new red kidney bean lectin called FRIL specifically stimulates proliferation of 3T3 fibroblasts transfected with the Flk2/Flt3 receptor. Blood, 1997, **90**: 1366a
- 10 Banu N, Deng B, Lyman S D, *et al.* Modulation of haematopoietic progenitor development by FLT-3 ligand. Cytokine, 1999, **11** (9): 679 ~ 688
- 11 Muench M O, Roncarolo M G, Menon S, *et al.* FLK-2/FLT-3 ligand regulates the growth of early myeloid progenitors isolated from human fetal liver. Blood, 1995, **85** (4): 963 ~ 972

Extraction, Purification and Function Analysis of a New Lectin Which Can Maintain The Multipotential of Hematopoietic Stem/progenitor Cells *In vitro**

XIE Xiao-Yan, XIE Chao, Li Jin, Bai Ci-Xian, Pei Xue-Tao**

(Department of Stem Cell Biology, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract A new lectin extracted from *lablab* can maintain the multipotential of hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro* for a long time in addition to its hemagglutination property. This new lectin FRIL (Flt3-receptor interacting lectin) was purified from *Dolichos lablab*, its biological speciality was identified and its receptors were located on hematopoietic stem/progenitor cells. When CD34⁺ cells were cultured in the presence of this lectin or its counterpart FL, within the 28 days of culture, FRIL can keep more cells in G0/G1 phase (beyond 80%) and 1.5 fold colony forming cells more than FL does after 14-day's culture. So, it is concluded that FRIL maintain HSC/HPCs' self-renewal property by halting its cell cycles.

Key words lectin, hematopoietic stem/progenitor cells, maintain

* This work was supported by grants from Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999053903), State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA216151 and 2002AA205051) and The Funds for Nature Science Research of Beijing (H020220010190).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: June 4, 2003 Accepted: July 16, 2003