

造血干细胞相关 microRNAs 的 筛选及其促分化研究*

孙建国¹⁾ 廖荣霞^{2)**} 张亮³⁾ 娄桂予²⁾ 周度金²⁾ 陈正堂¹⁾

(¹⁾第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037; ²⁾第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400038;

³⁾北京博奥生物芯片技术有限公司, 北京 102206)

摘要 为了获得人脐血造血干细胞(HSCs)的 microRNAs(miRNAs)表达谱, 并对相关 miRNAs 功能进行初步鉴定. 利用免疫磁珠(MACS)和流式细胞仪(FACS)细胞分选技术分离人脐血造血干细胞(HSCs), 分别提取细胞总 RNA 并分离小分子 RNA, 经荧光标记后与 miRNAs 基因芯片杂交, 获得 HSCs 的 miRNAs 表达谱, 集落形成实验(CFC)研究在 HSC 中高表达 miR-520h 对 HSC 的促分化作用. 成功分离人脐血 CD34⁺ 细胞和 HSC, 经基因芯片杂交获得 31 个造血干细胞相关 miRNAs, 其中 22 个为低表达, 9 个为高表达; 经实时定量 RT-PCR 验证 miR-520h 显著升高, CFC 实验表明其可增加多种集落形成, 具有促进 HSC 向祖细胞分化的作用. 上述结果表明, 人脐血 HSC 具有自身特征性 miRNAs, 参与并调控 HSC 生物学功能, 为深入探讨 miRNAs 在造血系统发育中的作用打下基础.

关键词 造血干细胞, miRNAs, 生物芯片, 实时定量 PCR

学科分类号 Q78, R73

MicroRNAs(miRNAs)是一类约 19~25 nt 的小分子非编码单链 RNA, 通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 不完全互补配对, 抑制蛋白质翻译过程^[1]. 在胚胎或成体干细胞中存在特异的 miRNA, 其在维持干细胞“自我更新”、“多向分化潜能”中起着重要作用^[2~3].

造血干细胞(HSCs)是目前研究最为深入的成体干细胞, 其具有向髓系、淋巴系祖细胞的多向分化的功能. 目前, HSCs 中 miRNAs 表达状况尚未见报道, miRNAs 在 HSCs 发育中的作用尚知之甚少.

微阵列技术的发展使 miRNA 基因组研究成为可能, 包含所有已知的哺乳动物 miRNA 序列的微阵列随着 miRNA 数据库(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)的不断扩展而发展^[4]. 我们利用北京博奥生物芯片有限公司研制的哺乳动物 miRNAs 检测微阵列, 筛查了 HSCs 相关 miRNAs 表达谱, 并初步探讨了其对 HSCs 生物学功能的调控作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 miRNA 微阵列和引物合成. 哺乳动物

miRNA 微阵列由博奥生物芯片有限责任公司制作^[5], 针对人 435 个(包含通过种属保守性分析预测在人类基因组中存在而尚未得到证实的 PREDICTED_MIR^[6])、小鼠 261 个成熟 micro RNA, 共 517 条探针(数据来自 2005 年 10 月 Sanger 的数据库). 实时定量 PCR 引物由上海英俊生物有限公司合成.

1.1.2 实验试剂. Ficoll-Paque™ Plus 淋巴细胞分离液和 MethoCult 完全甲基纤维素培养基为加拿大 Stem cell 科技公司产品; CD34⁺ 细胞免疫磁性分离试剂盒(MACS)为德国 Miltenyi 公司产品; Flt-3 配体(FL)、干细胞因子(SCF)、促血小板生成素(TPO)、白介素 3(IL-3)、白介素 6(IL-6)等细胞因子为美国 Peprotech 公司产品; 直接荧光抗体 CD34-FITC、CD38-PE 为美国 BD 公司产品; X-Vivo 15™ 无血清培养基为美国 Cambrex

* 国家自然科学基金项目(30400241, 30672076)和中国博士后科学基金资助项目(2005038478).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68752672, E-mail: liaorongxia@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-03-30, 接受日期: 2007-09-10

(Biowhittaker)产品; miRNA Probe Construction Kit、miRNA Isolation Kit、miR-520 h前体以及siPORT™ NeoFX™ Lipid-Based Agent for transfection为美国Ambion公司产品; Trizol、NCode™ miRNA Amplification System 和Superscript II试剂盒为美国Invitrogen公司产品; Lightcycler-faststart DNA master SYBR green I为美国Roche公司产品; 细胞培养基及胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司; 牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖/枸橼酸钠(ACD-A)、磷酸盐缓冲液(PBS)等常规生物化学试剂购自华美生物工程公司。

1.1.3 人脐血的采集。人脐血样品取自北京海淀区妇幼保健院, 用肝素抗凝, 室温保持, 4 h内用于实验。

1.2 方法

1.2.1 单个核细胞(MNC)的分离。首先向50 ml离心管中加入15 ml Ficoll-Paque, 然后将PBS (含2% FBS)2倍稀释的血液样品30 ml小心缓慢地铺在Ficoll-Paque表面, 室温下400 g离心30 min, 吸取血浆-Ficoll界面处的MNC(白膜层), 再用PBS洗涤2次。

1.2.2 MACS柱分离CD34⁺细胞。向细胞中加入100 μ l试剂A(FC blocking)、100 μ l试剂B(磁珠)和预冷的MACS缓冲液(PBS+5% BSA+6% ACD)300 μ l, 冰上孵育30 min, 以5~10 ml预冷MACS缓冲液洗涤2次。以500 μ l的MACS缓冲液重悬后, 在磁场下经MACS过柱, 0.5 ml的MACS缓冲液洗柱4次, 然后撤去磁场, 用MACS缓冲液2 ml收集CD34⁺细胞。

1.2.3 CD34⁺细胞扩增培养及FACS细胞分选。CD34⁺细胞以 1×10^4 浓度进行X-Vivo 15™无血清培养基扩增培养, 同时按100 μ g/L终浓度添加FL、SCF、TPO、IL-3和IL-6五种细胞因子, 37℃、5% CO₂孵箱培养1周后进行FACS细胞分选。收集CD34⁺细胞, 适量PBS+2% FBS重悬, 按抗体使用说明加入CD34-PE抗体、CD38-FITC抗体进行染色, 冰上孵育30 min后, PBS洗涤2~3次, 上机进行分选CD34⁺细胞和CD34⁺CD38⁻细胞(HSCs)。

1.2.4 集落形成实验(CFC)。按试剂盒说明进行。简述如下: 细胞按 1×10^4 /ml悬浮, 取0.3 ml加入3 ml MethoCult甲基纤维素半固体培养基中, 充分混匀后, 用注射器吸取1.1 ml, 分别接种至3个35 mm培养皿中, 37℃、5% CO₂, 湿度>95%培养10~12天。显微镜下观察, 分别计数红系祖细胞集落形成

单位(CFU-E)、爆式红系祖细胞集落形成单位(BFU-E)、粒单系祖细胞集落形成单位(CFU-GM)和多向祖细胞集落形成单位(CFU-GEMM)。

1.2.5 小分子RNA样品的分离与荧光标记(由北京博奥生物芯片有限公司完成)。取分离的CD34⁺细胞和HSCs细胞, Trizol一步法提取细胞总RNA。分光光度计定量。甲醛变性胶电泳质检总RNA的质量。取1~2 μ g用miRNA Isolation Kit分离小于100 nt的小分子RNA片段, 经NCode™ miRNA Amplification System进行扩增, 首先用polyA聚合酶进行poly(A)加尾, 其次在SuperScript™ III 反转录酶催化下转录cDNA第一链, 然后在Klenow 催化下利用T7启动子进行体外转录及小分子RNA的扩增。利用T4 RNA连接酶对扩增后RNA样品进行荧光标记、无水乙醇沉淀后用于微阵列杂交。

1.2.6 微阵列杂交、芯片扫描及数据分析(由北京博奥生物芯片有限公司完成)。将荧光标记后小分子RNA溶于16 μ l杂交液中(15%甲酰胺、0.2% SDS、3 $\times$ SSC、50 $\times$ Denhardt's), 于42℃与微阵列杂交过夜。杂交结束后, 微阵列玻片于42℃在含0.2% SDS的2 $\times$ SSC漂洗4 min, 再在0.2 $\times$ SSC室温漂洗4 min。玻片甩干后, 用LuxScan 10K/A双通道激光扫描仪进行扫描, 采用SAM 2.1软件分析有统计意义的差异表达位点。实验重复2次。

1.2.7 实时定量PCR(由北京博奥生物芯片有限公司完成)。取0.05 μ g总RNA在Superscript II 反转录酶作用下反转录形成第一链cDNA, 以实时定量miRNAs特异引物和第一链cDNA为模板进行PCR反应, 使用Roche公司Light Cycler PCR仪, 试剂为Lightcycler-faststart DNA master SYBR green I, 反应条件: 镁离子浓度3 mmol/L, 引物浓度0.25 μ mol/L, 95℃变性15 s, 60℃退火30 s, 重复40个循环。70℃至95℃绘制溶解曲线, 电泳检测PCR扩增情况, 并进行数据分析。PCR反应以U6 RNA作为内参照, 其引物为: 5' ctcgcttcggcagcaca 3'和5' aacgcttcacgaatttgctg 3'; 实验miRNAs实时定量PCR引物序列为: miR-526b*, 5' gtcgtatccagt-gcagggtccgaggtattcgactggatacagacgcctct 3'和5' acgcaagtgtcttcttttaga 3'; miR-127, 5' gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacagccaa 3'和5' tcggatccgtctgagcttg 3'; miR-129, 5' gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacgaage 3'和5' ctttttcgggtctgggct 3'; miR-520h, 5' gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatacagacactcta 3'和5' acgcaaaagtgc-

ttcccttag 3'; miR-4 52, 5' gtcgtatccagtgcagggtccg-aggtattcgactggatacagctctca 3' 和 5' cgtgtttgcagagg-aaactga 3'; miR-365, 5' gtcgtatccagtgcagggtccgagg-tattcgactggatacagcataagg 3' 和 5' cgtaatgccccctaaaa-atcc 3'.

1.2.8 miR-520h对HSC的促分化研究. CD34⁺细胞培养及扩增方法同前, 以miR-520 h前体转染细胞为实验组, 未转染的CD34⁺细胞为对照组. 转染方法按siPORTTM NeoFXTM说明书进行, 简述如下: 取5 μ l siPORT NeoFX脂质体用MEMI培养基稀释为100 μ l, 取2.5 μ mol/L的miR-520 h前体12.5 μ l用MEMI稀释为100 μ l, 二者混匀后室温下孵育10 min, 加入6孔板, 取2 300 μ l细胞悬液(1×10^5 /ml)覆盖在脂质体上, 放入37℃、5% CO₂孵箱培养. 转染后24 h后实时定量PCR验证miR-520 h表达水平, 并进行CFC实验, 12天后计数各种CFU数目. 转染后72h后FACS检测细胞CD34、CD38表达量. 实验重复6次.

1.2.9 生物信息学分析. 利用网络共享软件miRanda 3.0(<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>), 分析miR-520 h的作用靶点, 初步推断其参与HSCs功能调控的分子机制.

1.3 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS11.0软件, 2组间均数的显著性检验用 t 检验. $P < 0.05$ 差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 分选鉴定CD34⁺和CD34⁺CD38⁻细胞

经CD34-PE、CD38-FITC 2种抗体染色后, FACS成功获得CD34⁺细胞和CD34⁺CD38⁻细胞, 分别接种MethoCult甲基纤维素半固体培养基, 孵育12天后, 显微镜下观察集落形成情况, 分别观察到各种细胞集落形成单位, 表明成功获得目的细胞(图1).

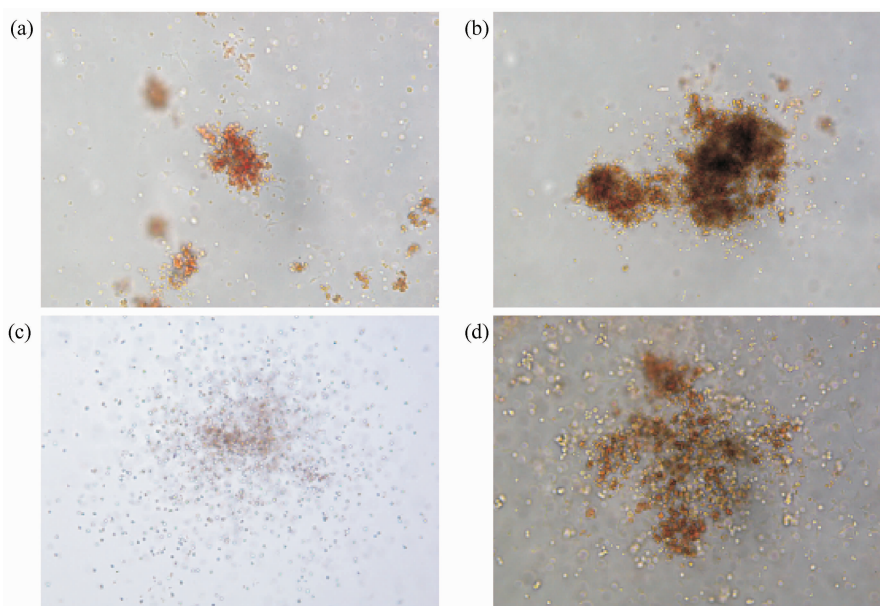


Fig. 1 Colony-forming cell (CFC) assays of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells

At the 12th day of incubation, both the CD34⁺ cells and the CD34⁺CD38⁻ cells generated the following colonies: CFU-E, BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM (a, b, c and d).

2.2 miRNAs表达检测

CD34⁺细胞和HSCs细胞经miRNAs表达微阵列扫描和数据分析, 进行了2次重复的杂交实验, 内参照的信号值较一致, 表明芯片检测结果较稳定(图2). 与CD34⁺细胞miRNAs表达微阵列比较, HSCs细胞共筛选出31个差异miRNAs分子, 其中

25%低于CD34⁺细胞的miRNAs为22个, 分别为miR-129、miR-19a、miR-142-3p、miR-15a、miR-19b、miR-16、miR-27a、miR-20a、miR-142-5p、miR-21、miR-27b、miR-18a、miR-106b、miR-144、miR-451、miR-20b、miR-181a、miR-106a、miR-101、miR-130a、

miR-17-5p 和 miR-93, 4 倍高于 CD34⁺ 细胞的 miRNAs 为 9 个, 分别为 miR-520h、miR-526b*、miR-452、miR-127、miR-365、PREDICTED_MIR100、PREDICTED_MIR105、PREDICTED_MIR149 和 PREDICTED_MIR209. 其中预测的 PREDICTED_MIR 为 4 个. Georgantas^[7] 单纯检测分析了 CD34⁺ 细胞的 miRNAs 表达状况, 共获得 33 个

miRNAs 分子, 其中包括 miR-16、miR-20、miR-106、miR-181、miR-106、miR-130、miR-17 和 miR-93 等多个 miRNAs 分子, 与本实验所检测的 CD34⁺ 细胞 miRNAs 表达谱接近. 因此, 本实验通过与 CD34⁺ 细胞相比较, 更进一步获得了 HSCs 相关 miRNAs 表达谱.

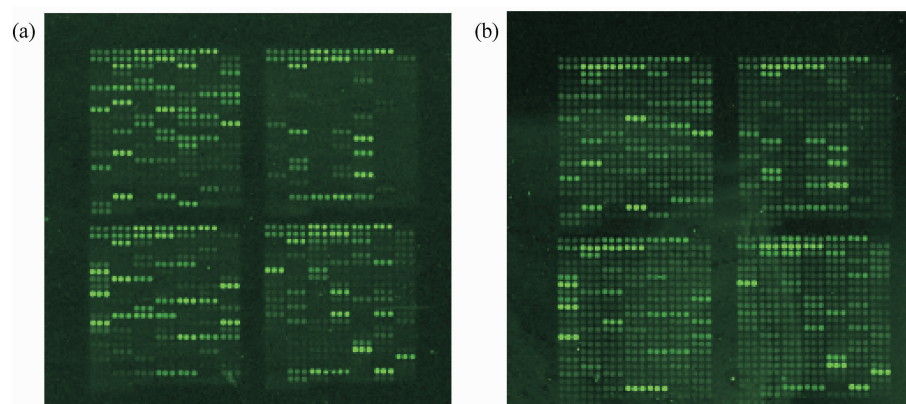


Fig. 2 Microarrays demonstrated miRNA expression profiles

(a), (b) corresponding to CD34⁺ hematopoietic cells and CD34⁺CD38⁻ HSCs.

2.3 实时定量PCR分析

由于小RNA在芯片杂交前进行了扩增实验, 因此芯片杂交结果可能存在较高的假阳性, 为此, 选择6个miRNAs进行实时定量PCR分析给予验证. 其中, 5 个高表达的 miRNAs: miR-520h、

miR-452、miR-127、miR-365、miR-526b*和1个低表达的miRNA: miR-129. 结果表明, 与CD34⁺ 细胞相比较, HSCs 中 miR-520h 表达升高约 5 倍, miR-526b* 表达升高 1.5 倍、而 miR-129 降低约 16%, 与芯片结果符合率为 50% (图3).

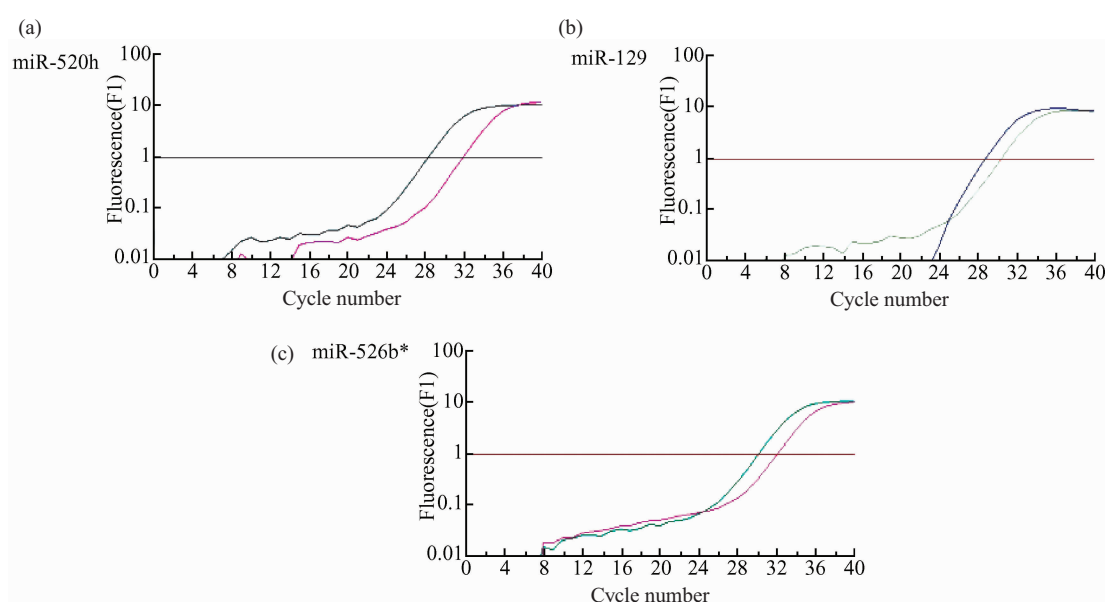


Fig. 3 Detection on miRNAs in CD34⁺ and HSCs cells by real time PCR

(a) miR-520h overexpression in HSCs than CD34⁺ cells. —: CD34⁺; —: HSCs. (b) miR-129 underexpression in HSCs than CD34⁺ cells. —: CD34⁺; —: HSCs. (c) miR-526b* overexpression in HSCs than CD34⁺ cells. —: CD34⁺; —: HSCs.

2.4 miR-520 h促进HSC分化研究

转染24 h后进行实时定量PCR实验验证miR-520 h表达水平,结果表明,实验组较对照组miR-520h表达增高达10倍(图4). 转染24 h后进行CFC实验表明,对照组集落计数,CFU-E、BFU-E、CFU-GM和CFU-GEMM分别为(28.50 ± 4.32)、(37.83 ± 5.60)、(57.67 ± 5.16)和(1.50 ± 0.55),而实验组CFU-E、BFU-E、CFU-GM和CFU-GEMM分别为(37.83 ± 7.70)、(46.5 ± 4.85)、(68.17 ± 7.73)和(1.67 ± 0.52). 经 t 检验统计学分析表明,CFU-E、

BFU-E、CFU-GM集落计数有统计学差异($P < 0.05$, $n=6$),表明miR-520h有促进HSCs向各系祖细胞分化作用(表1).

Table 1 Colony-forming ability of CD34⁺ cells after miR-520h transfection ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Groups	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM
Control	28.50 ± 4.32	37.83 ± 5.60	57.67 ± 5.16	1.50 ± 0.55
Test group	$37.83 \pm 7.70^*$	$46.50 \pm 4.85^*$	$68.17 \pm 7.73^*$	1.67 ± 0.52

* $P < 0.05$.

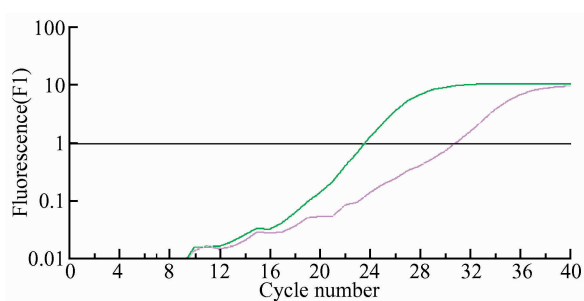


Fig. 4 Detection on miR-520h expression in CD34⁺ cells before or after transfection

miR-520 h expression in CD34⁺ cells after transfection 10 fold higher than control. —: Control; —: Test group.

转染后72 h, FACS进行细胞表型分析发现,对照组CD34⁺和CD34⁺CD38⁻细胞比例分别为(22.91 ± 2.03)%和(12.57 ± 0.81)%,而实验组CD34⁺和CD34⁺CD38⁻细胞比例分别为(30.43 ± 2.34)%和(13.08 ± 1.08)%. 经 t 检验统计学分析表明,与对照组相比,实验组CD34⁺细胞比例较高,有统计学差异($P < 0.05$, $n=6$),而CD34⁺CD38⁻比例相差不大,无统计学差异($P > 0.05$, $n=6$),表明miR-520 h可维持HSCs的CD34阳性表型,但并不增加HSCs比例(图5).

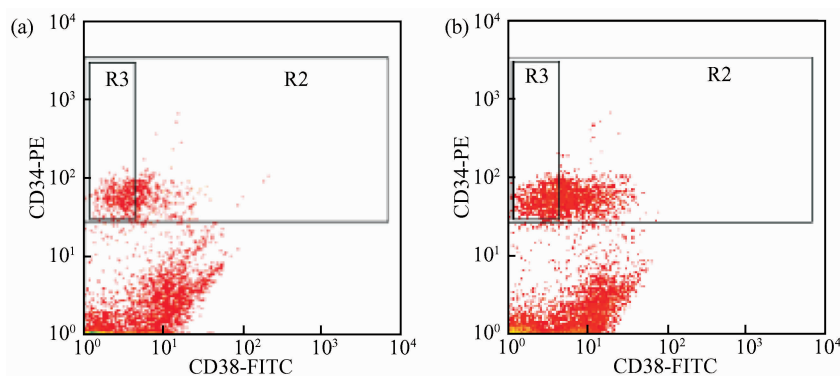


Fig. 5 FACS analysis of miR-520h in remaining CD34 expression of HSCs

(a) Control. (b) Test group.

2.5 生物信息学分析

miRanda 3.0对miR-520h进行靶点预测,共有1 016个可能的作用靶点,挑选其中可能与干细胞功能密切相关的作用靶点进行分析,以初步探讨miR-520h在调控HSCs中的分子机制. ABCG2: ABCG2是一个在包括HSCs、角膜上皮干细胞等的多种成体干细胞中高表达的分子,在细胞分化、肿瘤耐药等方面具有重要的调控作用^[8,9]; ID 1 (DNA

结合抑制剂1): ID 1是一个具有螺旋-环-螺旋结构的负性蛋白,在神经干细胞分化中起负调控作用,参与干细胞分化的信号转导,可对脐血来源的神经干细胞样细胞的生长和分化起负性转录调控作用^[10]. 其他可能的靶基因如SRP19 (一种信号识别蛋白) 以及SMAD6 (一种转录调控因子)等,都是参与转录、信号转导等的调控蛋白^[11,12]. 因此,miR-520h很可能通过复杂的网络,对细胞生长尤其

是干细胞中的某些关键基因起负性作用, 从而参与干细胞生物功能的调控, 其具体的分子机制还有待进一步明确.

3 讨 论

miRNA是干细胞发育进程重要调控分子, 其参与干细胞的发育调控是一个全新的领域, 对干细胞功能研究具有重要意义. 我们以miRNA微阵列平台, 以CD34⁺细胞为参照, 筛选到31个造血干细胞相关miRNAs, 其中低表达miRNAs有22个, 高表达miRNAs有9个, 预测的miRNAs为4个. 由于造血干细胞数量少, 分离困难, 所获小分子RNA量有限, 在芯片杂交前必须进行小分子RNA的体外扩增, 所得芯片杂交测值为放大的信号, 在进行差异基因比较时, 假阳性可能较大, 6个miRNAs进行实时定量PCR验证的结果表明, 与芯片的符合率为50%, 其他筛选到的miRNAs有待进一步实时定量PCR来验证.

本项目研究结果表明, 利用基因芯片来获取HSCs相关(乃至特异的)miRNAs是可行的, 对于探明miRNAs在HSCs自我更新、多向分化潜能中的作用, 建立了一条可行的技术路线. MiR-520 h有明显的促进HSCs向祖细胞分化的作用, 生物信息学分析表明, 其作用靶点包括与细胞生长、增殖、干细胞功能维持相关的基因. 因此, HSCs相关miRNAs表达谱的建立, 为探讨其参与HSCs生物学特性的调控奠定了基础, 为探讨miRNAs作为促进HSCs定向分化以及生物治疗靶点的探索, 提供了实验依据.

致谢 本课题在北京大学生命科学院苏都莫日根教授实验室完成, 衷心感谢实验室全体成员的热心帮助与大力协作. 北京大学生命科学院杜立颖老师对流式分选实验提供了大力支持, 谨致谢意.

参 考 文 献

- 1 Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 2003, **113** (6): 673~676
- 2 Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 2003, **5** (2): 351~358
- 3 Ishii H, Saito T. Radiation-induced response of micro RNA expression in murine embryonic stem cells. *Med Chem*, 2006, **2** (6): 555~563
- 4 Barad O, Meiri E, Avniel A, *et al.* MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*, 2004, **14** (12): 2486~2494
- 5 廖荣霞, 孙建国, 陈正堂, 等. 乳腺癌miRNA表达谱筛选及初步分析. 第三军医大学学报, 2006, **28** (22): 2209~2212
- 6 Liao R X, Sun J G, Chen Z T, *et al.* *Acta Acad Med Mili Tert (Chin)*, 2006, **28** (22): 2209~2212
- 6 Xie X, Lu J, Kulbokas E J, *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005, **434** (7031): 338~345
- 7 Georgantas R W, Hildreth R, Morisot S, *et al.* CD34⁺ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: A circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (8): 2750~2755
- 8 Paiva C S, Chen Z, Corrales R M, *et al.* ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells*, 2005, **23** (1): 63~73
- 9 Krishnamurthy P, Ross D D, Nakanishi T, *et al.* The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*, 2004, **279** (23): 24218~242215
- 10 Jurga M, Buzanska L, Malecki M, *et al.* Function of ID1 protein in human umbilical cord blood-derived neural stem-like cells. *Neur Res*, 2006, **84** (5): 993~1002
- 11 Oubridge C, Kuglstatter A, Jovine L, *et al.* Crystal structure of SRP19 in complex with the S domain of SRP RNA and its implication for the assembly of the signal recognition particle. *Mol Cell*, 2002, **9** (6): 1251~1261
- 12 Berghorn K A, Clark-Campbell P A, Han L, *et al.* Smad6 represses Dlx3 transcriptional activity through inhibition of DNA binding. *J Biol Chem*, 2006, **281** (29): 20357~20367

Screening of Hematopoietic Stem Cell-correlative MicroRNAs and Analysis of Their Differentiation-promoting Function*

SUN Jian-Guo¹⁾, LIAO Rong-Xia²⁾, ZHANG Liang³⁾, LOU Gui-yu²⁾, ZHOU Du-jin²⁾, CHEN Zheng-Tang¹⁾

¹⁾Cancer Institute of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

³⁾Capitalbio Corporation, National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China)

Abstract In order to obtain MicroRNA (miRNAs) expression profiles of human hematopoietic stem cells (HSCs), and to preliminarily investigate functions of HSC-correlative miRNAs, by using miniMACS magnetic beads and fluorescence-activated cell sorting (FACS), isolated hematopoietic stem cells (HSCs) were isolated from human umbilical cord blood and performed total RNA extraction. Next, using a microarray, miRNA gene expression profiles of HSCs were obtained. CFC assays were performed to research on differentiation-promoting function of miR-520h, enriched in HSCs. Results showed that CD34⁺ hematopoietic cells and HSCs were successfully isolated from human umbilical cord blood, and 31 HSCs-correlative miRNAs were screened by microarray. Among them, 22 were low in HSCs, and 9 were high. The result of real time RT-PCR confirmed high expression of miR-520h in HSCs. CFC assays showed that miR-520h promotes differentiation of HSCs into progenitor cells. In conclusion, human HSCs have a set of specific miRNAs that contribute to regulation of HSCs functions, which pave the way for exploring the roles of miRNAs in development of hematopoietic system.

Key words hematopoietic stem cells, microRNAs, microarray, real time PCR

*This work was supported by grants from The National Science Foundation of China (30400241, 30672076) and Postdoctoral Science Funds of China (2005038478).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68752672, E-mail: liaorongxia@mail.tmmu.com.cn.

Received: March 30, 2007 Accepted: September 10, 2007