

a lowering of c-Myc level could lead to apoptosis by first deactivating the proliferation pathway<sup>[12]</sup> and preventing cell cycle progression. Treatments that caused apoptotic death of several cell types had been shown to first drastically lower c-Myc expression<sup>[13, 14]</sup>.

While the accumulation of sub-G1 cells and apoptosis took place after 18 hours of THH treatment, c-Myc protein showed a drastic decrease after only a short period of THH treatment (> 99% decrease in 2–4 hours). This is consistent with the current thinking that c-Myc is one of the earlier signals in cell growth regulation. The above results showed that THH extract initially caused a decrease in c-Myc protein level in HL-60 cells, by either transcriptional or translational regulation mechanisms. Subsequently cellular metabolism is affected<sup>[7]</sup> and cells stop at the hypodiploid sub-G1 phase and eventually enter apoptosis.

**Acknowledgement** This work is supported by an Applied Research Grant of City University of Hong Kong.

## References

- [1] Zhao X Z. Effects of *Astragalus membranaceus* and *Tripterygium hypoglauum* on natural killer cell activity of peripheral blood mononuclear in systemic lupus erythematosus [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1992, 12: 669–671.
- [2] Wang X, Zhuo R, He Z. Aneuploid induction by water ex-

tract from *Tripterygium hypoglauum* (Levl.) Hutch. in mouse bone marrow cells [J]. *Mutagenesis*, 1993, 8: 395–398.

- [3] Cao J, Nusse M. *Tripterygium hypoglauum* induced apoptosis in Jurkat and two other cell lines [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1999, 44(11): 1169–1173.
- [4] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239–257.
- [5] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, 88: 347–354.
- [6] Desbarats L, Schneider A, Muller D, et al. Myc: a single gene controls both proliferation and apoptosis in mammalian cells [J]. *Experimentia*, 1996, 52: 1123–1129.
- [7] Dang C V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 1–11.
- [8] Mosmann T. Cytotoxicity assay based on diphenyltetrazolium bromide [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55–63.
- [9] Martin S J, Reutelingersperger C P, McGahan A J, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl [J]. *J Exp Med*, 1995, 182: 1545–1556.
- [10] Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J P, et al. Analysis of cell death by flow cytometry, in cell growth and apoptosis [M]. (Studzinski G P ed), Oxford: Oxford University Press, 1995.
- [11] Sonenshein G E. Down-modulation of c-Myc expression induces apoptosis of B lymphocyte models of tolerance via clonal deletion [J]. *J Immuno*, 1997, 158: 1994–1997.
- [12] Prendergast G C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc [J]. *Oncogene*, 1999, 18: 2967–2987.
- [13] Packham G, Cleveland J L. c-Myc and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1242: 11–28.
- [14] Pu L X, Zhang T M. Effects of triptolide on T lymphocyte functions in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1990, 11: 76–79.

## 用寡核苷酸芯片研究血虚小鼠造血相关细胞因子基因表达谱

佟丽<sup>1</sup>, 陈苏红<sup>1</sup>, 马增春<sup>1</sup>, 黄坚<sup>2</sup>, 丁雨<sup>2</sup>, 王升启<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学科学院放射医学研究所 全军生物芯片重点实验室, 北京 100850; 2. 深圳益生堂生物企业有限公司, 广东 深圳 518026)

**摘要:**目的 应用细胞因子寡核苷酸表达谱芯片检测血虚小鼠不同脏器组织内造血相关细胞因子差异表达情况, 寻找差异表达基因, 为血虚证治疗药物机制研究及治疗药物筛选奠定基础。方法 采用  $5.5 \text{ Gy}^{60}\text{Co}\gamma$  射线照射 Balb/c 小鼠, 制备血虚模型。在不同时间点提取正常和血虚小鼠不同组织总 RNA, 反转录成不同荧光标记的 cDNA 探针, 与表达谱芯片进行杂交, 对扫描数据进行分析获得血虚小鼠造血相关细胞因子基因的差异表达情况。结果 在各组织中共发现 21 个差异表达的基因。这些基因的功能大致分为 3 类: 促细胞生长或增殖, 免疫调节, 诱导血细胞形成或促造血祖细胞形成集落。结论 照射后上述细胞因子基因的下调, 使机体的造血功能下降, 造成血虚, 证明细胞因子间形成造血调节网络, 整体调节机体造血。这与中医的全局理论是一致的。实验证明应用芯片技

\* 收稿日期: 2002-09-10

基金项目: 全军医药卫生科研基金课题 (01Z019); 北京市科委资助项目 (H010210220113)

作者简介: 佟丽 (1974–), 女, 辽宁人, 军事医学科学院放射医学研究所 2000 级硕士研究生, 研究方向为中药四物汤补血作用机制的基因组学研究。E-mail: tongli29@sina.com

\* 通讯作者 Tel, Fax: (010) 66932211 E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

术,从分子水平研究血虚形成的机制是可行的,可为进一步的血虚证治疗药物的筛选提供依据。

关键词: 细胞因子; 寡核苷酸芯片; 基因表达谱; 血虚

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0625-05

## Accessing gene expression profile of blood deficiency mice using hematopoietic-related cytokine oligonucleotide microarrays

TONG Li<sup>1</sup>, CHEN Su-hong<sup>1</sup>, MA Zeng-chun<sup>1</sup>, HUANG Jian<sup>2</sup>, DING Yu<sup>2</sup>, WANG Sheng-q<sup>1</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China;

2. Shenzhen Yishengtang Biological Products Co., Ltd, Shenzhen 518026, China)

**Abstract** **Object** To study the hematopoietic-related genes differential expression in blood deficiency mice tissues using oligonucleotide microarray in order to lay a fundation of investigating on the treatment mechanism of blood deficiency and screening the treatment drugs. **Methods** Balb/c mice were irradiated with 5.5 Gy <sup>60</sup>Co- $\gamma$  to make model of blood deficiency in mice. The total RNAs were isolated from different tissues with Trizol reagent by one-step method at different time, then reverse-transcribed into cDNA probe with the incorporation of fluorescent dUTP. The mixed probe was hybridized to the self-made microarrays, then scanned and analyzed with Bio-information software. **Results** There were 21 hematopoietic-related genes expressed decreasingly in all the detected tissues except spleen irradiated with <sup>60</sup>Co- $\gamma$ . The functions of all differential expression genes were classified into three classes: prompting cell growth or proliferation, regulating immunization, inducing the colonizing of the hematopoietic progenitor cells. **Conclusion** The hematopoietic-related genes which changed in blood deficiency mice play important roles in a network to regulate the hematopoietic system. The network-regulation agree with the "whole theory" in Chinese medical science. The experiments have confirmed that it is possible to explore the hematopoietic mechanism at molecular level with the microarrays, and the further study can be carried out in this field.

**Key words** cytokine; oligonucleotide microarray; gene expression profile; blood deficiency

血虚是临床常见的症候,尤其是放化疗副反应所致贫血。血虚是恶质病治疗所面临的障碍。对其形成机制有很多的研究,但目前为止在基因水平上尚无深入的研究。如果能够寻找到血虚证状态下特定基因表达的改变,将从根本上阐明血虚证的形成机制,并为其药物治疗提供靶标,为筛选治疗药物提供理论基础。生物技术的发展,特别是基因芯片技术的成熟与实际应用,使得基因水平上的研究成为可能。本实验设计并制备了造血相关寡核苷酸芯片<sup>[1]</sup>,利用其快速、平行、高通量、相对准确的检测特点,研究辐射致血虚小鼠不同组织造血相关基因表达谱,探索分子水平上形成血虚的机制,为血虚证的临床治疗提供相关的数据,同时为本课题的进一步研究奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 组织材料: Balb/c小鼠 40只(购自军事医学科学院动物中心),雌性,体重 16~20 g,6~8周龄。按体重随机分为两组:空白组(10只),血虚模型组(30只)。血虚模型组采用 5.5 Gy <sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线照射。照后不同时间点分批断颈处死小鼠(每个时间点随机取 10只),立即取胸腺、脾脏、肾脏等器官组织,迅速液氮冻存储用。骨髓有核细胞参照 Dexter's<sup>[2]</sup>

方法制备并提取总 RNA

1.2 主要试剂及仪器: Trizol试剂(Gibco BRL公司), RNasin 40 U  $\mu$ L (Gibco BRL公司), Superscript II reverse transcriptase (200 U  $\mu$ L Gibco BRL公司), Cy3/Cy5-dUTP (1 mmol/L, Amersham Pharmacia), 阳性对照 pGL3 mRNA 及芯片由本实验室制备。DU640 核酸蛋白紫外分析仪(Backman公司), ScanArray 3000 扫描仪(General Scanning公司), Imagine 4.0 分析软件(Bio-discovery, Inc)。<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线照射由军事医学科学院 Co 源中心完成。

1.3 寡核苷酸芯片的制备:从 Genbank 中检索并选取 74 个造血相关的鼠源细胞因子基因的 mRNA 序列,用 Mprobe 软件设计备选探针,长 40 mer。经 Blast 分析从其中筛选出基因特异性寡核苷酸探针。PE8909 DNA 大规模合成仪合成 5'氨基修饰的寡核苷酸探针。3% SSC 点样液溶解探针至浓度为 0.5  $\mu$ g  $\mu$ L。点样仪将探针点于本实验室自制的醛基化基片上,放置过夜备用。

1.4 荧光标记探针的制备:按 Trizol 试剂说明书提取各脏器组织的总 RNA<sup>[3]</sup>, DU640 紫外分析仪测定纯度及浓度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总

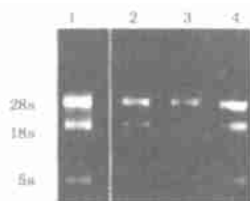
RNA的完整性<sup>[4]</sup>。取各组织总 RNA 约 80 $\mu$ g 置于 EP管中,分别加入阳性对照 pGL3 mRNA 0.3 $\mu$ g 进行反转录,用 Cy3-dUTP 标记空白组 cDNA, Cy5-dUTP 标记不同时间点模型组的 cDNA 取另一组标本总 RNA 进行反向的荧光标记,即 Cy3-dUTP 标记不同时间点模型组的 cDNA, Cy5-dUTP 标记空白组。如此实验重复两次 cDNA 产物溶于 2 $\mu$ L MiliQ 水中备用。

1.5 杂交:将已溶解的 cDNA 探针与 6 $\mu$ L 杂交液充分混匀,96 $^{\circ}$ C 水浴变性 2 min 后立即冰浴。将等量的空白组 cDNA 探针杂交液分别与不同时间点血虚组 cDNA 探针杂交液混合,均匀铺到芯片上,用盖玻片封片,置于密封湿润的杂交仓中,42 $^{\circ}$ C 杂交 3 h。杂交完毕,室温下分别用洗液 A (1 $\times$  SSC, 0.2% SDS),洗液 B (0.2 $\times$  SSC),洗液 C (0.1 $\times$  SSC) 梯度洗片,室温干燥。

1.6 激光共聚焦扫描及结果分析: Scan Array 3000 扫描仪扫描芯片, Imagine3.0 分析软件对扫描数据进行定量分析。

## 2 实验结果

2.1 总 RNA 的纯度及完整性鉴定:紫外分析仪测定总 RNA 纯度在 1.70~1.85 甲醛变性 1% 琼脂糖凝胶电泳显示总 RNA 完整性较好,没有 DNA 污染,电泳图见图 1。



1 对照 2 照后 2 h 3 照后 6 h 4 照后 12 h  
1-blank control 2-2 h after irradiation  
3-6 h after irradiation 4-12 h after irradiation  
图 1 小鼠总 RNA 的甲醛变性电泳图 (骨髓)

Fig. 1 Agarose electrophoresis of total RNA in mice (bone marrow)

2.2 表达谱芯片扫描结果:杂交后的芯片用 Scanarray 3000 扫描仪扫描。扫描获得的图谱显示照射后随着时间的延长,血虚组低表达基因逐渐增加。

2.3 差异表达基因的筛选结果:应用 Imagine 4.0 分析软件筛选差异基因,标准是:①两种相互比较的信号荧光强度值至少有一个大于 600,或者其中一个约为 0,另一个信号值大于 1 000;②信号荧光强度的比值大于 1.5 或小于 0.66 进行信号归一化校正的点为 pGL3 及看家基因。分析过程仅以图 2 为

例说明。图 2 给出的是对照射后 6 h 骨髓组织实验结果进行差异分析的散点图。图中对角线上及其附近的点代表无差异表达的基因,左上方远离对角线的点代表血虚组中表达下调的基因,右下方远离对角线的点代表血虚组中表达上调的基因。图中实心点代表差异表达基因。

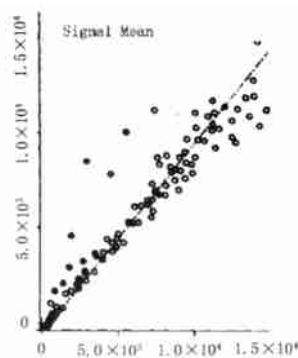


图 2 辐照后 6 h 基因表达谱分析散点图 (骨髓, pGL3 及看家基因校正)

Fig. 2 Scatter-plot of 6 h after irradiation (bone marrow, normalized by house-keeping genes and positive control pGL3)

经分析比较发现,照射后血虚组不同脏器组织中差异表达的基因共有 21 个。各脏器中 GM-CSF, G-CSF, SCF, EPO 等因子基因表达量较高,但表达没有差异。表 1~4 中依次给出分析结果。

## 3 讨论

细胞因子是体内细胞相互作用的主要介质,在免疫应答、造血等各个方面起着关键的作用<sup>[5]</sup>。其异常的增多、减少,异常的分布或细胞因子网络失衡常常与疾病相关。实验结果显示,辐照后不同的时间点各脏器组织血虚组均有表达下调的基因,这些差异表达的细胞因子基因的功能大致分为 3 类:促细胞生长或增殖,免疫调节,诱导血细胞的形成或促进造血祖细胞的集落形成。他们的表达下调,使细胞因子间形成的造血调节网络整体调节功能下降,造成血虚,这与中医理论中的全局观念是一致的。

骨髓是生血、造血的主要器官,也是对辐照高度的敏感的器官之一。辐射损伤造血干细胞的同时,也破坏了造血细胞与其微环境之间的通讯。实验中检测到辐照后 2 h 参与免疫应答的细胞因子基因 IL-2 首先下调,6 h 后间接促进造血的 IL-4, IL-8R 表达下调,提示造血系统机能开始下降,到 12 h 时,促红细胞生成的 PDGF-R 促 GM-CSF 生成的 IL-18 及主要造血因子 G-CSF 本身均呈下调。同时参与信号转导的一些细胞因子也下调,这些造血相关基因

下调,并随时间延长呈增多的趋势,最终导致造血功能下降,血液中血细胞减少,形成中医的血虚。所获得的差异表达基因,有可能是血虚形成机制中主要节点或造血网络调控中的成员。

实验所选的其他脏器组织均有髓外造血的功能,其造血相关细胞因子基因表达的改变反映机体的造血功能的改变。脾脏组织在照射后 12 h 发现一个上调的基因 IL-12b,该因子具有直接促进骨髓干细胞的增殖和形成集落作用。脾脏具有髓外造血功能,当骨髓辐照后损伤较大,造血功能下降时,脾脏将可能发挥其髓外造血的功能。该细胞因子基因表达的上调,是造血调控系统在脾脏的应激性反应,以发挥其直接促进骨髓干细胞的增殖和形成集落作用,维持机体造血功能。肾脏组织在辐照后 6 h 出现了大量的下调基因,需要注意的是 C-fos, JUN 两个

原癌基因表达的下调,他们均是在核中参与转录调控的基因。由此推测血虚的形成可能是在基因的转录过程中就已经开始了。胸腺和脾脏辐照后 2, 6 h 未检测到差异表达的基因,可能是辐照后短时间内的基因表达改变程度用芯片难以检测到所致,需要进一步的实验验证。

实验表明细胞因子寡核苷酸表达谱芯片能够快速平行检测因子基因表达情况,寻找到药物影响的靶基因,可作为药物高通量筛选及药物作用机制研究的技术平台。同时所获得的阶段性结果为进一步研究补血中药的作用机制及有效部位奠定基础。

表达谱芯片技术常用于定性检测,在定量检测方面有一定的局限性<sup>[6~8]</sup>。实验中发现用单一的阳性对照基因或内源性看家基因作为信号归一化校正基因,对扫描数据进行定量分析时结果不一致。原因

表 1 <sup>60</sup>Co-γ 照射后小鼠骨髓中差异表达基因

Table 1 Different expression of genes in bone marrow of mice irradiated with <sup>60</sup>Co-γ

组别	名称	基因库查询号	比值 (模型:空白)	基因功能
2 h	IL-2	M MIL04	0.44: 1 0.46: 1	在机体的免疫应答中起着重要的作用。
6 h	AREG	NM -009704	0.57: 1 0.51: 1 0.47: 1	表皮生长因子家族成员,能刺激某些细胞的生长,也能抑制包括肿瘤细胞的生长。与 EGF 竞争细胞表面受体而发挥作用。
	IL-4	M USIL4CDAN	0.42: 1 0.41: 1 0.47: 1	主要作用于 T 细胞,能增强体液免疫,增强杀伤细胞的杀伤能力,增加造血细胞的集落。
	IL-8R	MU SILK8	0.58: 1 0.46: 1	GTP 结合蛋白相关受体超家族成员,几乎所有的细胞上都有该受体。
12 h	AREG	NM -009704	0.35: 1 0.50: 1	同上。
	CD4	NM -013488	0.25: 1 0.65: 1	具有黏附功能,主要表现在 T 细胞上,介导信号转导。
	CDBb	NM -009858	0.53: 1 0.62: 1 0.51: 1 0.31: 1	T 细胞上主要的分化抗原,具有黏附和信号转导的功能。
	G-CSF	MU SGCSF	0.56: 1 0.45: 1	主要作用是促进骨髓造血细胞增殖分化形成粒细胞集落,诱导中性粒细胞的终末分化和增强中性粒细胞的功能。
	IL-18	M N -008360	0.47: 1 0.53: 1	主要功能是诱导 Th1 细胞产生 INF-γ,诱导 T 细胞产生 GM-CSF,促进 T 细胞增殖和增强 NK 活性。
	IL-2-R	MU SIL2REC	0.54: 1 0.49: 1	由 3 条链组成,α 链是 IL-2 特异的;β 链属于造血因子受体家族;γ 链与 IL-4, 7, 13 等受体的 γ 链相同。可溶性 IL-2R 作为免疫抑制剂。
	PDGF-R	NM -008808	0.50: 1 0.53: 1	间接促进红细胞的生成,能促进间叶来源的细胞分裂、生长,促 DNA 合成,诱导细胞分化。

表 2 <sup>60</sup>Co-γ 照射后小鼠胸腺中差异表达基因

Table 2 Different expression of genes in thymus of mice irradiated with <sup>60</sup>Co-γ

组别	名称	基因库查询号	比值 (模型:空白)	基因功能
2 h	无			
6 h	无			
12 h	IL-18	NM -008360	0.63: 1 0.61: 1	主要诱导 INF-γ 的产生,诱导 T 细胞产生 GM-CSF,促进 T 细胞的增殖。
	IL-2-R	MU SIL2REC	0.48: 1 0.58: 1	IL-2 受体。由 3 条链组成,α 链是 IL-2 特异的;β 链属于造血因子受体家族;γ 链与 IL-4, 7, 13 等受体的 γ 链相同。可溶性 IL-2R 作为免疫抑制剂。

表 3 <sup>60</sup>Co-γ 照射后小鼠肾脏中差异表达基因

Table 3 Different expression of genes in kidney of mice irradiated with <sup>60</sup>Co-γ

组别	名称	基因库查询号	比值 (模型：空白)	基因功能
2 h	IL-12b	NM -008352	0. 63 <sup>±</sup> 1 0. 63 <sup>±</sup> 1	有致炎和免疫调节作用。可直接促进骨髓干细胞的增殖和形成集落,但有 NK 细胞存在时具有抑制骨髓造血、抗肿瘤的作用。
6 h	β <sub>2</sub> M	NM -009735	0. 52 <sup>±</sup> 1 0. 43 <sup>±</sup> 1	是由人体淋巴细胞、单核细胞等合成的一种小分子量蛋白质,合成后作为 HL A 的轻链广泛存在于除红细胞和胎盘滋养层细胞以外的其他多种细胞的细胞膜上。
	C-FO S	NM -010234	0. 57 <sup>±</sup> 1 0. 20 <sup>±</sup> 1	原癌基因,在细胞核中与多种基因转录调控有关。
	EGF	NM -010113	0. 63 <sup>±</sup> 1 0. 48 <sup>±</sup> 1	表皮生长因子。
	FGF-R1	NM -010206	0. 40 <sup>±</sup> 1 0. 34 <sup>±</sup> 1	存在于 FGF 敏感的细胞表面,FGFR1 具有酪氨酸激酶活性,属于 Ig 受体超家族。
	HGF	M USHGF1	0. 59 <sup>±</sup> 1 0. 11 <sup>±</sup> 1	与细胞表面的一种 c-met 原癌基因产物 MET (该蛋白是受体的 β 链) 结合后诱导细胞产生一系列的反应。低浓度时有抑制某些肿瘤细胞生长的作用。
	IL-4	M U S I L 4 C D N A	0. 35 <sup>±</sup> 1 0. 23 <sup>±</sup> 1	主要作用于 T 细胞,能增强体液免疫,增强杀伤细胞的杀伤能力,增加造血细胞的集落。
	IL-9	NM -008363	0. 31 <sup>±</sup> 1 0. 57 <sup>±</sup> 1	Th <sub>2</sub> 细胞产生的细胞因子,主要促进胚胎细胞造血,诱导和维持肥大细胞生长,诱导成熟 T 细胞增殖。IL-9 有可能是正常造血的调节物。
	LIF-R	NM -993584	0. 61 <sup>±</sup> 1 0. 28 <sup>±</sup> 1 0. 32 <sup>±</sup> 1	其 α 链上有造血因子受体结构域及 LIF 结合部位。
	M I P	M M M I P	0. 63 <sup>±</sup> 1 0. 50 <sup>±</sup> 1	促进细胞的趋化,刺激肥大细胞和嗜碱性细胞释放组织胺,是急性炎症性肉芽肿介质,促进细胞黏附。
	PDGF-R	M M P D G F R E	0. 59 <sup>±</sup> 1 0. 38 <sup>±</sup> 1	间接促进红细胞的生成,能促进间叶来源的细胞分裂、生长,促 DNA 合成,诱导细胞分化。
12 h	AREG	NM -009704	0. 56 <sup>±</sup> 1 0. 35 <sup>±</sup> 1 0. 53 <sup>±</sup> 1	表皮生长因子家族成员,能刺激某些细胞的生长,也能抑制包括肿瘤细胞的生长。其与 EGF 竞争细胞表面受体而发挥作用。
	C-FO S	NM -010234	0. 65 <sup>±</sup> 1 0. 66 <sup>±</sup> 1	同上。
	JUN	NM -010591	0. 63 <sup>±</sup> 1 0. 43 <sup>±</sup> 1 0. 54 <sup>±</sup> 1	核转录因子癌基因,其表达的蛋白与 DNA 结合,参与多种基因的转录调控。
	V E G F	NM -009505	0. 27 <sup>±</sup> 1 0. 59 <sup>±</sup> 1	能诱导血管生成,介导缺氧引起的血管形成。血管内皮细胞对 V E G F 有高特异性增殖反应。

表 4 <sup>60</sup>Co-γ 照射后小鼠脾脏中差异表达基因

Table 4 Different expression of genes in spleen of mice irradiated with <sup>60</sup>Co-γ

组别	名称	基因库查询号	比值 (模型：空白)	基因功能
2 h	无			
6 h	无			
12 h	IL-12-b	NM -008352	1. 51 <sup>±</sup> 1 1. 57 <sup>±</sup> 1	有致炎作用和免疫调节作用。可直接促进骨髓干细胞的增殖和形成集落,但有 NK 细胞存在时具有抑制骨髓造血、抗肿瘤的作用。

可能是看家基因的表达有时也会发生变化<sup>[7]</sup>。为了能够更好的定量,将外源定量加入的阳性对照基因探针信号和内源细胞自主表达的看家基因探针信号联合起来,作为信号校正基因。这样外源定量加入的阳性对照既可监测整个反转录过程的质与量,又可消减 cy3 和 cy5 荧光标记时掺入率的差别;而细胞分泌的内源看家基因可综合监测总 RNA 质与量等不同方面的因素,提高芯片定量的相对准确性。

References

[1] Huang J, Chen S H, Tong L, *et al.* Preparation and analysis of oligonucleotide microarray for expression detection of mouse cytokine-associated gene [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2002, 18(4): 105-108.  
[2] Dexter T M, Moore M A S, Sherider A P C. Maintenance of

hemapoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras *in vitro* [J]. *J Exp Med*, 1997, 145: 1612-1616.  
[3] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270(5235): 467-470.  
[4] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.  
[5] Sun W M, Wang H Q. *Research Methods on Cytokines* (细胞因子研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.  
[6] Chee M, Yang R, Hubbell E, *et al.* Accessing genetic information with high-density DNA arrays [J]. *Science*, 1999, 274(5287): 610-614.  
[7] Bartosiewicz M, Trounstein M, Barker D, *et al.* Development of a toxicological gene array and quantitative assessment of this technology [J]. *Arch Biophys*, 2000, 376(1): 66-73.  
[8] Milner N, Mir K U, Southern E M. Selecting effective anti-sense reagent on combinatorial oligonucleotide arrays [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 537-541.