

Flt3配体胞外域的原核表达纯化及对脐血CD34⁺细胞的扩增作用*★

刘 强¹, 郑 瑾², 赵星成³, 尹郸丹¹, 陈任安¹, 刘 利¹, 郝淼旺¹, 梁英民¹

Prokaryotic expression and purification in Flt3 ligand extracellular domain and effects on cord blood CD34⁺ cells amplification

Liu Qiang¹, Zheng Jin², Zhao Xing-cheng³, Yin Dan-dan¹, Chen Ren-an¹, Liu Li¹, Hao Miao-wang¹, Liang Ying-min¹

¹Department of Hematology, ²Department of Traditional Chinese Medicine, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China; ³Department of Medical Genetics and Developmental Biology, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Liu Qiang★, Master, Attending physician, Department of Hematology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
liuqiang@fmmu.edu.cn

Supported by: the National High-Tech Research and Development Plan of China ("863" Program), No. 2006AA02A111*

Received: 2010-11-10
Accepted: 2010-12-13

Abstract

BACKGROUND: Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3 ligand, FL) is a cytokine that affects the growth, survival and/or differentiation of hematopoietic cells through the activation of specific tyrosine kinase receptors, and it is potentially useful for *in vitro* hematopoietic stem cells (HSCs) amplification.

OBJECTIVE: To construct the recombinant prokaryotic expression vector pET32a(+)-hFL^{ext}, and to express and purify hFL^{ext} protein and investigate its effect on expansion of cord blood CD34⁺ cells.

METHODS: The hFL^{ext} gene was cloned and the recombinant expression vector pET32a-hFL^{ext} was constructed and transformed into *E. coli* BL21. The hFL^{ext} protein was expressed under IPTG induction, purified by affinity chromatography with Ni beads. The cord blood CD34⁺ cells were isolated using CD34 microbead kit and incubated with hFL^{ext} alone or in combination with SCF and TPO. The effect of hFL^{ext} on expansion of CD34⁺ cells was examined after 1-week incubation.

RESULTS AND CONCLUSIONS: The recombinant expression vector pET32a-hFL^{ext} was successfully constructed and the hFL^{ext} was successfully expressed as a Trx fusion protein (Trx-hFL^{ext}) in *E. coli* BL21. The Trx-hFL^{ext} with high purity was successfully obtained after degenerating proteins in inclusion bodies with 8M urea, renaturing by gradual dialysis, purifying by affinity chromatography with Ni beads. The purified hFL^{ext} can not only effectively maintain and slightly stimulate the proliferation of cord blood CD34⁺ cells, but also expand profoundly in combination with SCF and TPO, thus paving the way for its application in expanding human hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro* further.

Liu Q, Zheng J, Zhao XC, Yin DD, Chen RA, Liu L, Hao MW, Liang YM. Prokaryotic expression and purification in Flt3 ligand extracellular domain and effects on cord blood CD34⁺ cells amplification. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(19): 3476-3480. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: Fms 样酪氨酸激酶 3 配体(Flt3 配体)是一种重要的生长因子,通过激活特定的酪氨酸激酶受体,调控造血细胞的生长、生存和/或分化,具有促进造血干细胞体外扩增的应用潜力。

目的: 构建 pET32a(+)-hFL^{ext} 原核表达载体,表达、纯化 hFL^{ext} 蛋白,观察其对脐血 CD34⁺ 细胞的扩增作用。

方法: 克隆 hFL^{ext}, 构建 pET32a(+)-hFL^{ext} 重组表达载体。转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导蛋白表达,镍珠亲和层析纯化蛋白。磁珠分选脐血 CD34⁺ 细胞,单独加入 hFL^{ext} 或联合干细胞因子、血小板生成素孵育 1 周,观察体外扩增作用。

结果与结论: 成功克隆 hFL^{ext}, 并构建了 pET32a(+)-hFL^{ext} 重组表达载体。在大肠杆菌 BL21 成功表达 Trx-hFL^{ext} 融合蛋白,经 8 mol/L 尿素变性包涵体蛋白,逐步透析复性,镍珠亲和层析纯化蛋白,成功获得高纯度的 Trx-hFL^{ext} 融合蛋白。Trx-hFL^{ext} 融合蛋白不仅具有维持及轻度刺激 CD34⁺ 细胞体外扩增的作用,并且与干细胞因子及血小板生成素具有协同作用,为造血干/祖细胞体外扩增研究奠定了基础。

关键词: Flt3 配体; CD34⁺; hFL^{ext}; Trx-hFL^{ext}; 载体

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.19.013

刘强, 郑瑾, 赵星成, 尹郸丹, 陈任安, 刘利, 郝淼旺, 梁英民. Flt3 配体胞外域的原核表达纯化及对脐血 CD34⁺ 细胞的扩增作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3476-3480. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

Flt3配体是一种与早期造血调控密切相关的生长因子,其受体Flt3为Ⅲ型酪氨酸激酶受体,主要表达于造血干/祖细胞。当Flt3和Flt3配体发生特异性结合时,其自身酪氨酸激酶被激活,从而磷酸化激活下游一系列蛋白分子,发挥其生物学功能^[1-4]。Flt3配体对早期造血调控密切相关,可调节造血细胞的生长、生存、分化,并且可能对造血干细胞的动员及体外扩增发挥调节作用^[5-6]。Flt3配体基因敲

除小鼠有明显的造血系统缺陷,骨髓中髓系和淋系祖细胞数量明显减少。Flt3配体自身对造血细胞并不具有很强的刺激作用,但其能很好地协同许多造血生长因子例如白细胞3, 6, 11, 12, c-kit配体和GM-CSF等,促进造血祖细胞的增殖^[7-12]。此外,Flt3配体还具有明显的免疫调节作用。Flt3配体联合其他生长因子能够显著扩增DC,刺激T细胞和NK细胞增殖,因此可能在抗肿瘤免疫治疗中发挥作用^[13-18]。

Flt3配体最初由Lyman于1993年从一株鼠T细胞系克隆获得^[19]。其开放读码框编码一个由235个氨基酸组成的I型跨膜蛋白。氨基酸序列

分析显示其N端拥有一个26个氨基酸组成的信号肽, 接着是156氨基酸组成的胞外域, 23个氨基酸组成的跨膜域, 及30个氨基酸组成的胞内域。鼠Flt3配体cDNA编码一个跨膜蛋白, 经蛋白水解生成一可溶性因子^[20]。人Flt3配体无论是可溶性还是表达于细胞表面, 均具有生物学活性^[21], 提示人Flt3配体胞外域(hFL^{ext})足以发挥其生物学功能。

为了获得有功能的人Flt3配体进行造血干/祖细胞体外扩增研究, 利用原核表达系统表达hFL^{ext}, 即其第27-182位氨基酸残基, 并与标记有His标签的Trx蛋白融合, 便于下一步的纯化。纯化获得的Trx-hFL^{ext}融合蛋白进行细胞增殖实验, 证实其生物学活性, 并观察其单独及联合干细胞因子、血小板生成素对分选的脐血CD34⁺细胞体外扩增作用, 为下一步的造血干/祖细胞体外扩增研究奠定基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2009-01/2010-03在第四军医大学医学遗传与发育生物学教研室完成(国家重点实验室)。

材料:

菌株、质粒及试剂	来源
<i>E. coli</i> BL21	本实验室保存
pET32a(+)载体	Novagen 公司
pMD18-T 载体	Takara 公司
镍离子螯合珠	Invitrogen 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Pierce 公司
RPMI 1640 培养基	Gbico 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
rhSCF 及 rhTPO	Stem cell 公司
抗人 CD34-FITC 单抗	BD 公司
微珠标记抗人 CD34 单抗、FcR	美天旎公司
阻断剂及 MS 分选柱	

实验方法:

hFL^{ext}的克隆和pET32a-hFL^{ext}表达载体的构建: 以人淋巴细胞cDNA文库为模板, PCR扩增获得全长人Flt3配体片段(全长hFL引物: F 5'-ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC T-3'; R 5'-TCA GTG CTC CAC AAG CAG CAG GTC C-3)。回收克隆片段, 连接pMD18-T载体。测序正确后再以pMD18-T-hFL cDNA为模板, PCR扩增获得hFL^{ext}片段(hFL^{ext}引物为: F 5'-CTC GAG GGC TGT CGG GGC TGT-3', R

5'-GAA TTC ACC CAG GAC TGC TCC TTC C-3')。回收克隆片段, 再次连接pMD18-T载体。测序正确后, 采用EcoR I 和Xho I 限制性酶, 双酶切pMD18-T-hFL^{ext}和pET32a (+), 回收获得hFL^{ext}片段, 亚克隆入pET32a(+)载体, 构建pET32a(+)-hFL^{ext}表达载体。

Trx-hFL^{ext}融合蛋白的诱导表达及纯化: 将表达质粒pET32a(+)-hFL^{ext}转化E.coli BL21, 选择阳性克隆接种于5 mL含100 mg/L氨苄青霉素的LB培养基, 37 °C摇菌过夜, 次日转接50 μL菌液至5 mL新鲜LB培养基, 37 °C摇菌3 h至A₆₀₀达到0.8。接着在菌液中加入终浓度为1 mmol/L IPTG, 30 °C诱导12 h。收集菌液, 4 °C 12 000 r/min离心10 min, 1 mL PBS重悬沉淀, 超声裂菌, 离心, 分别收集上清及沉淀, SDS-PAGE检测Trx-hFL^{ext}融合蛋白表达。将包涵体蛋白经8 mol/L尿素变性, 逐步透析复性, 即透析缓冲液A(2 mol/L urea, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, 2 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L GSSG, pH 8.0), B(0.5 mol/L urea, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, 2 mmol/L GSH, 0.1 mmol/L GSSG, pH 8.0)分别透析12 h, 接着透析缓冲液C(5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, pH 8.0)4 h 1次, 共4次。复性后的Trx-hFL^{ext}融合蛋白的纯化按照Invitrogen ProBondTM纯化手册进行, 其中结合液含20 mmol/L咪唑, 洗涤液含40 mmol/L咪唑, 洗脱液含250 mmol/L咪唑。纯化获得的Trx-hFL^{ext}融合蛋白经PBS透析, PEG-8000浓缩后, BCA 法蛋白定量, -70 °C分装冻存。

表达产物的Western blot分析: 将纯化获得的蛋白溶液进行SDS-PAGE, 电转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 1:1 000稀释的抗His单抗4 °C孵育过夜, PBST洗膜, 1:2 000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG 抗体37 °C孵育1 h, PBST洗膜, 显影, 压片。

脐血单个核细胞的分离制备: 无菌获取正常分娩产妇的抗凝脐带血, 将脐血与PBS 1:2体积稀释混匀, 缓慢加入人淋巴细胞分离液的上层, 稀释血与淋巴细胞分离液体积比为2:1。2 000 r/min 离心20 min, 吸取中间单个核细胞层, 加入5倍体积的PBS洗涤2次。

脐血单个核细胞增殖实验: 将2×10⁵脐血单个核细胞接种于24孔板, 在含20 % FCS的RPMI 1640培养基中, 加入Trx-hFL^{ext}融合蛋白或Trx对照蛋白, 使其终浓度分别为0, 0.1, 1, 10, 100和1 000 μg/L。体积分数5% CO₂, 37 °C培养1周, 细胞计数。

解放军第四军医大学唐都医院,¹血液内科,²中医科暨中西医结合肿瘤科, 陕西省西安市 710038;
³解放军第四军医大学医学遗传与发育生物学教研室, 陕西省西安市 710032

刘强★, 男, 1972年生, 辽宁省丹东市人, 汉族, 2003年解放军第四军医大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事造血干细胞研究。
liuqiang@fmmu.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)19-03476-05

收稿日期: 2010-11-10
修回日期: 2010-12-13
(20100901015/W·W)

脐血CD34⁺细胞的分选: 按照美天旎公司分选程序进行, 将每1×10⁸个脐血单个核细胞重悬于300 μL分选缓冲液中, 加入100 μL FcR阻断剂, 100 μL微珠标记抗CD34抗体, 4 °C孵育30 min, 10~20倍体积缓冲液洗涤, 500 μL缓冲液重悬细胞, MS柱阳性分选CD34⁺细胞, 流式检测CD34⁺细胞比例。

脐血CD34⁺细胞的体外扩增培养: 将5×10⁴磁珠分选获得的脐血CD34⁺细胞接种于24孔板, 分为4组, 分别为Trx(1 mg/L)对照组、Trx-hFL^{ext}(1 mg/L)组、Trx(1 mg/L)+干细胞因子(50 μg/L)+血小板生成素(20 μg/L)组、Trx-hFL^{ext}(1 mg/L)+干细胞因子(50 μg/L)+血小板生成素(20 μg/L)组。体积分数5% CO₂, 37 °C培养1周, 细胞计数, 流式检测CD34⁺细胞比例。

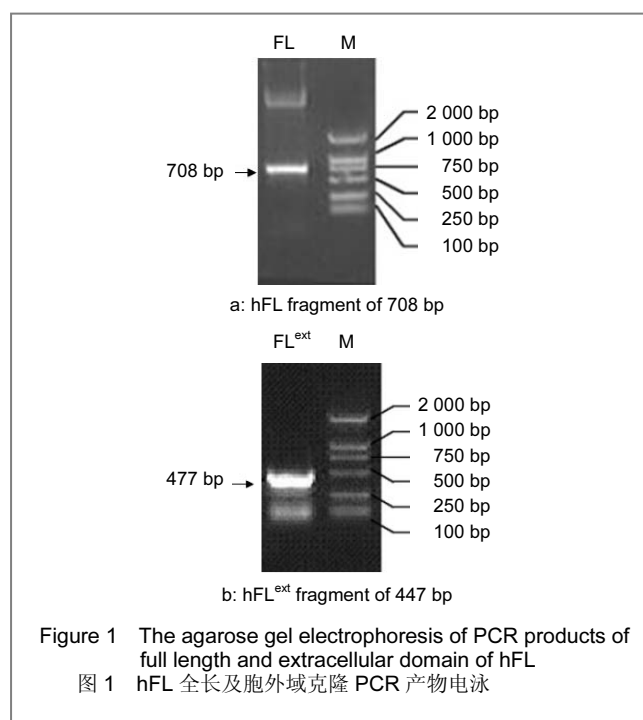
流式分析: 取适量的磁珠分选后细胞及扩增培养1周后的细胞, 含2% FCS的PBS洗涤液洗涤, 50 μL重悬细胞, 加入0.5 μL抗人CD34-FITC单抗或同型IgG-FITC对照抗体, 4 °C孵育30 min, 洗涤2次, 300 μL重悬细胞, BD FACS CaliburTM流式检测, Cellquest软件分析结果, PI染色去除死细胞。

主要观察指标: ①pET32a(+)-hFL^{ext}表达载体的构建。②Trx-hFL^{ext}融合蛋白的诱导表达、纯化及鉴定。③Trx-hFL^{ext}融合蛋白促进脐血单个核细胞增殖。④Trx-hFL^{ext}融合蛋白促进脐血CD34⁺细胞扩增。

统计学分析: 由第一作者应用SPSS10软件处理, 计算平均值及标准差, student's *t* 检验统计数据。

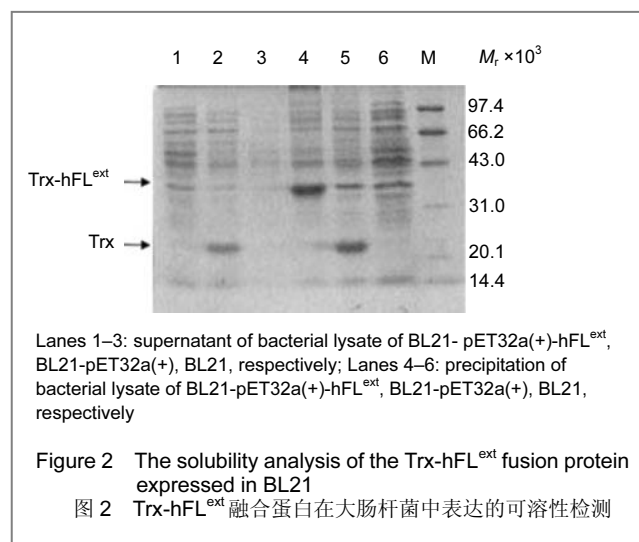
2 结果

2.1 pET32a(+)-hFL^{ext}表达载体的构建 见图1。

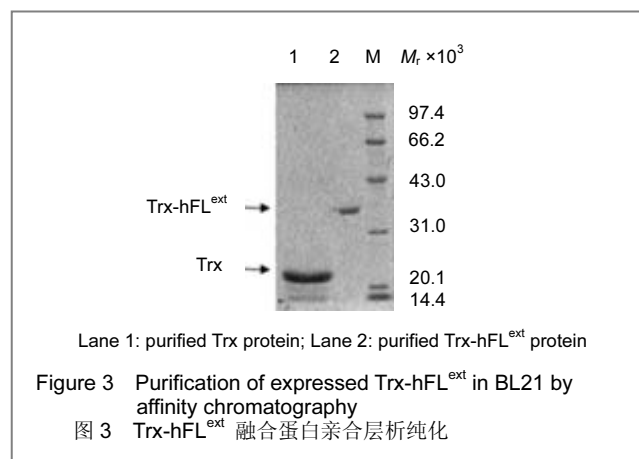


以人淋巴细胞cDNA文库为模板, PCR成功扩增获得708 bp的全长hFL片段(见图1a), 回收克隆片段, 连接pMD18-T载体。测序结果与GenBank公布的hFL基因序列完全一致。再以pMD18-T-hFL cDNA为模板, 成功扩增获得477 bp的hFL^{ext}片段(见图1b), 回收克隆片段, 再次连接pMD18-T载体。测序正确后酶切回收hFL^{ext}片段, 亚克隆入pET32a(+)-原核表达载体, 成功构建了pET32a(+)-hFL^{ext}表达载体, 测序证实序列正确。

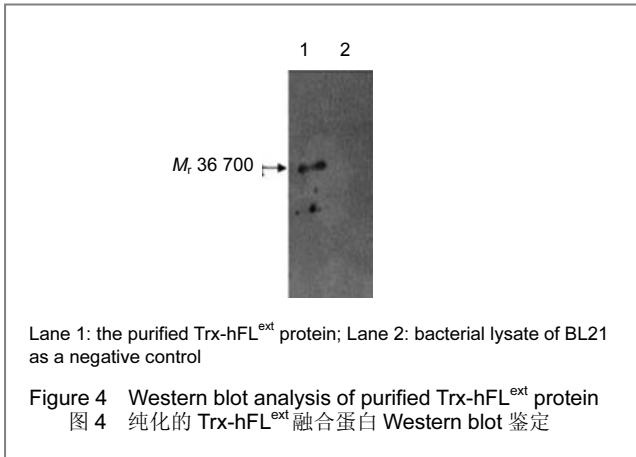
2.2 Trx-hFL^{ext}融合蛋白的诱导表达、纯化及鉴定 将表达质粒pET32a(+)-hFL^{ext}转化*E. coli* BL21, 1 mmol/L IPTG诱导蛋白表达。SDS-PAGE证实成功诱导表达出相对分子质量约36 700的Trx-hFL^{ext}融合蛋白, 主要以包涵体形式表达, 见图2。



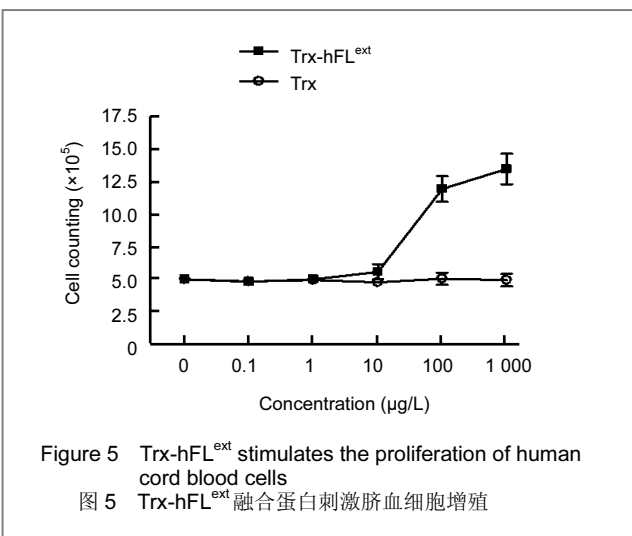
接下来采用8 mol/L尿素变性, 逐步透析复性, 镍珠亲和层析纯化蛋白。纯化的蛋白经SDS-PAGE证实, 仅有一条相对分子质量约36 700的Trx-hFL^{ext}融合蛋白带, 见图3。



用抗His标签单抗Western blot分析进一步证实, 仅有一条相对分子质量约36 700的Trx-hFL^{ext}融合蛋白带, 见图4。



2.3 Trx-hFL^{ext}融合蛋白促进脐血单个核细胞增殖 分离获得的脐血单个核细胞加入不同浓度的Trx-hFL^{ext}融合蛋白或Trx对照蛋白, 培养1周后进行细胞计数。结果显示, 10 μg/L以下浓度Trx-hFL^{ext}融合蛋白对脐血细胞增殖无明显作用, 100 μg/L Trx-hFL^{ext}明显促进脐血细胞增殖, 1 000 μg/L更高浓度的Trx-hFL^{ext}进一步促进脐血细胞增殖, 没有细胞毒性, 见图5。



2.4 Trx-hFL^{ext}融合蛋白促进脐血CD34⁺细胞扩增 为了解重组表达的Trx-hFL^{ext}融合蛋白能否促进脐血单个核细胞中的CD34⁺细胞的扩增。采用磁珠分选法获得脐血CD34⁺细胞, 加入1 mg/L的Trx-hFL^{ext}融合蛋白或Trx对照蛋白, 培养1周后进行细胞计数及CD34⁺细胞比例检测, 计算出CD34⁺细胞绝对数值。结果显示, 单独应用Trx对照蛋白不能够维持脐血CD34⁺细胞的数量, 培养1周后的CD34⁺细胞明显减少。而单独应用Trx-hFL^{ext}融合蛋白不仅能够维持脐血CD34⁺细胞的数量, 并且具有轻度扩增作用, 培养1周后的CD34⁺细胞数量是培养前的1.1倍。并且当与干细胞因子及血小板生成素联合应用时, Trx-hFL^{ext}融合蛋白具有协同促进CD34⁺细胞扩增作用, 见表1。

表 1 Trx-hFL^{ext}融合蛋白对脐血 CD34⁺细胞体外扩增的作用
Table 1 The effect of Trx-hFL^{ext} on expansion of human cord blood CD34⁺ cells ex vivo (x±s)

Group	0 d		7 d	
	CD34 ⁺ (%)	CD34 ⁺ (×10 ⁴)	CD34 ⁺ (%)	CD34 ⁺ (×10 ⁴)
Trx	78.3±6.7	3.9±0.3	7.2±2.1	1.2±0.2
Trx-hFL ^{ext}	78.3±6.7	3.9±0.3	12.1±3.4	4.3±0.7
SCF+TPO+Trx	78.3±6.7	3.9±0.3	19.3±4.3	10.7±3.2
SCF+TPO+Trx-hFL ^{ext}	78.3±6.7	3.9±0.3	22.5±4.9	18.9±4.9

3 讨论

脐血造血干细胞移植目前已广泛应用于治疗白血病、免疫缺陷等疾病, 但往往由于数量不足, 使很多移植受限。脐血造血干/祖细胞体外扩增是解决这个问题的可能途径, 目前国内有多个研究室进行此项研究^[22-24]。

Flt3配体是一种与早期造血调控密切相关的生长因子, 对鼠和人的早期造血干/祖细胞的增殖、生存和分化具有重要调控作用, 尤其是当与白细胞介素3, 6, 11, 12, c-kit配体和GM-CSF等许多其他造血生长因子联合应用时, 具有协同作用^[7-12]。然而Buza-Vidas等^[25]报道Flt3受体及其配体对造血干细胞的稳态维持及移植后扩增并不是至关重要的, 因此有必要重新检测Flt3配体对造血干/祖细胞扩增的作用。之前有研究显示hFL^{ext}足以发挥其生物学功能^[21], 因此, 作者决定表达hFL^{ext}进行造血干/祖细胞扩增研究。之前, 许多实验室都相继展开了对重组人Flt3配体的研究工作, 并通过不同的宿主细胞获得了人Flt3配体基因的高效表达^[26-29]。作者曾尝试在毕赤酵母菌进行表达, 但表达水平非常低。这可能由于毕赤酵母菌对密码子使用有偏好所致。Xu等^[30]曾在毕赤酵母菌获得人Flt3配体表达, 他们表达FL所用的cDNA根据毕赤酵母菌的密码子偏好已进行改造。在本实验中, 采用pET32a(+)作为原核表达载体, 建立了BL21原核表达系统, 将hFL^{ext}与携带His标签的Trx融合表达, 便于下一步的蛋白纯化工作。在诱导表达过程中, 尽管将诱导温度降到了25℃, Trx-hFL^{ext}仍主要以包涵体的形式表达, 而不是可溶形式。采用8 mol/L尿素变性包涵体蛋白, 再逐步透析复性, 并采用镍珠亲和层析纯化, 经SDS-PAGE及Western blot鉴定, 成功获得高纯度的Trx-hFL^{ext}融合蛋白。细胞增殖实验显示重组表达的Trx-hFL^{ext}融合蛋白具有生物学活性, 100 μg/L能明显刺激脐血细胞增殖, 1 000 μg/L更高浓度的Trx-hFL^{ext}进一步促进脐血细胞增殖, 没有细胞毒性。此外, 重组表达的hFL^{ext} Trx-hFL^{ext}融合蛋白不仅具有维持及轻度刺激CD34⁺细胞体外扩增的作用, 并且与干细胞因子及血小板生成素具有协同作用。

总之, 实验建立了hFL^{ext}的原核表达纯化系统, 并成功地获得具有生物学活性的Trx-hFL^{ext}融合蛋白, 证实其不仅具有维持及轻度刺激CD34⁺细胞体外扩增的作用, 并且与干细胞因子及血小板生成素具有协同作用, 为接下来的造血干/祖细胞体外扩增研究奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Drexler HG, Quentmeier H FLT3: receptor and ligand. Growth Factors. 2004; 22(2):71-73.
- [2] Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, et al. Human flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. J Immunol. 2008; 180(11):7358-7367.
- [3] Sitnicka E, Buza-Vidas N, Larsson S, et al. Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. Blood. 2003; 102:881-886.
- [4] Ebihara Y, Wada M, Ueda T, et al. Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34+CD38- cells expressing Flk2/Flt3. Br J Haematol. 2002; 119:525-534.
- [5] de Kruif EJ, Hagoort H, Velders GA, et al. Hematopoietic stem and progenitor cells are differentially mobilized depending on the duration of Flt3-ligand administration. Haematologica. 2010; 95(7): 1061-1067.
- [6] Bertho JM, Prat M, Stefani J, et al. Correlation between plasma Flt3-ligand concentration and hematopoiesis during G-CSF-induced CD34+ cell mobilization. Stem Cells Dev. 2008; 17(6):1221-1225.
- [7] Zhang Y, Guo C, Zhang H, et al. Synergistic protecting effect of cord blood CD34+ cells over-expressing both interleukin-3 and Flt3 ligand on lethally irradiated mice Int J Hematol. 2009; 90(1): 64-73.
- [8] Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, et al. Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. Exp Hematol. 1995; 23(10):1121-1129.
- [9] Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, et al. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. Blood. 1996; 87(4):1317-1325.
- [10] Shurin MR, Esche C, Lotze MT FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application. Cytokine Growth Factor Rev. 1998; 9(1):37-48.
- [11] Rossi B, Zanolin E, Vincenzi C, et al. Effect of addition of FLT-3 ligand and megakaryocyte growth and development factor on hemopoietic cells in serum-free conditions. Stem Cells Dev. 2004; 13(4):362-371.
- [12] Zhang Y, Zhang LS, Guo CH, et al. Zhongqing Yixue. 2007; 36(23): 2404-2405.
张勇, 张林生, 郭朝华, 等. 质粒载体pIRES2-FL-IL-3转染对脐血 CD34⁺ 细胞增殖影响的实验研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(23): 2404-2405.
- [13] Advani AS FLT3 and acute myelogenous leukemia: biology, clinical significance and therapeutic applications. Curr Pharm Des. 2005; 11(26):3449-3457.
- [14] Neal ZC, Sondel PM, Bates MK, et al. Flt3-L gene therapy enhances immunocytokine-mediated antitumor effects and induces long-term memory. Cancer Immunol Immunother. 2007; 56(11):1765-1774.
- [15] Carreras E, Turner S, Paharkova-Vatchkova V, et al. Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation. Immunol. 2008; 180(2):727-738.
- [16] Matsumura N, Mandai M, Hamanishi J, et al. Immunostimulatory effect of Fms-like tyrosine kinase 3 ligand on peripheral monocyte-derived dendritic cells and natural killer cells: utilization for ovarian cancer treatment. Oncol Rep. 2008; 19(2):505-515.
- [17] Buza-Vidas N, Cheng M, Duarte S, et al. Crucial role of FLT3 ligand in immune reconstitution after bone marrow transplantation and high-dose chemotherapy. Blood. 2007; 110(1):424-432.
- [18] Davis ID, Chen Q, Morris L, et al. Blood dendritic cells generated with FLT3 ligand and CD40 ligand prime CD8⁺ T cells efficiently in cancer patients. J Immunother. 2006; 29(5):499-511.

- [19] Lyman SD, James L, Vanden Bos T, et al. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell. 1993; 75(6): 1157-1167.
- [20] Lyman SD, James L, Escobar S, et al. Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs. Oncogene. 1995; 10(1):149-157.
- [21] Hannum C, Culpepper J, Campbell D, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. Nature. 1994; 368(6472): 643-648.
- [22] Meng QB, Wei YM, Zhang YZ, et al. Zhongguo Shuxue Zazhi. 2009; 22(6):443-446.
孟庆宝, 魏亚明, 张印则, 等. 不同细胞因子组合对脐血造血干细胞体外扩增效果分析[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(6): 443-446.
- [23] Qu XJ, Li HX, Feng MF, et al. Jichu Yixue yu Linchuang. 2007; 27(9): 1048-1052.
曲鑫建, 李惠侠, 丰美福, 等. 人脐血造血干细胞体外扩增方法初探[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(9): 1048-1052.
- [24] Pan WL, Li SP, Tang EJ, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008, 12(12):2216-2220.
潘万龙, 李淑萍, 唐恩洁, 等. 猪苓多糖对脐血造血干细胞体外扩增及干细胞移植后免疫重建的调节效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(12):2216-2220.
- [25] Buza-Vidas N, Cheng M, Duarte S, et al. FLT3 receptor and ligand are dispensable for maintenance and posttransplantation expansion of mouse hematopoietic stem cells. Blood. 2009; 113(15): 3453-3460.
- [26] Jia J, Wang LL, Gao L, et al. Sepu. 2010; 28(6):535-540.
贾佳, 王丽丽, 高林, 等. 高效疏水相互作用色谱法复性与同时纯化重组人Flt3配体的包涵体蛋白质 [J]. 色谱, 2010, 28(6):535-540.
- [27] Lu HS, Xu LH, Shi HJ, et al. Jinan Daxue Xuebao: Ziran Kexue yu Yixueban. 2008; 29(4):331-335.
卢宏松, 徐丽慧, 施焕敬, 等. 构建的Flt3L胞外域原核表达载体在大肠杆菌中的表达[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2008, 29(4): 331-335.
- [28] Liu XL, Duan XM, Fang YQ, et al. Jilin Daxue Xuebao: Yixueban. 2007; 33(2):381-384.
刘小林, 段秀梅, 方艳秋, 等. Flt3配体基因原核表达载体的构建、表达、纯化及生物学活性鉴定[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2007, 33(2):381-384.
- [29] Liang WY, Jiang YH, Cao KY, et al. Redai Yixue Zazhi. 2008; 8(1): 31-35.
梁蔚阳, 蒋玉辉, 曹开源, 等. 人Flt3配体基因的克隆及其在CHO细胞中的表达[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(1):31-35.
- [30] Xu ZX, Zhu JK, Zhang ZH, et al. Expression of human Flt3 ligand in Pichia pastoris and its biological characteristics. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao. 2000; 32(3):217-222.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家高技术研究发展计划 (863 计划)(2006AA02A111)。

作者贡献: 实验设计为第六、七、八作者, 实施为第一至五作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

创新性说明: 与国内外同类研究比较, 实验应用 BL21 大肠杆菌原核表达系统, 包涵体蛋白透析复性技术, 镍珠亲和层析纯化方法, 成功获得高纯度的 Trx-hFL^{ext} 融合蛋白。Trx-hFL^{ext} 融合蛋白不仅具有维持及轻度刺激 CD34⁺ 细胞体外扩增的作用, 并且与干细胞因子及血小板生成素具有协同作用, 为造血干/祖细胞体外扩增研究奠定了基础, 具有技术及应用创新性。