

含 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)^o- 缺失的染色体 11 中 $G\gamma$ 珠蛋白基因在 MEL 细胞中活跃表达*

张俊武 乔 军** 宋文凤*** 邱志明***

(中国医学科学院 基础医学研究所, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 用 EB 病毒转化技术获得了 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)^o- 地中海贫血杂合子的淋巴细胞系, 并用细胞融合法获得了其与鼠红白血病细胞 (MEL) 的杂合细胞, 进一步筛选到仅含正常或异常人染色体 11 的次级克隆杂合细胞, 并证明在只含正常人染色体 11 的次级克隆杂合细胞中 $G\gamma$, $A\gamma$ 珠蛋白基因不表达, β 珠蛋白基因表达, 但在仅含具有缺失的人染色体 11 的杂合细胞中 $G\gamma$ 基因高水平表达. 这些结果进一步确证在 β -珠蛋白基因簇内的 DNA 片段缺失是导致 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)^o- 地中海贫血中 $G\gamma$ 基因持续活跃表达的原因.

关键词 ($A\gamma\delta\beta$)^o- 地中海贫血 鼠红白血病细胞 细胞融合 胎儿珠蛋白基因 基因表达

人 β -珠蛋白基因簇位于第 11 号染色体短臂, 包含 5 个功能基因及一个假基因, 排列顺序为 5'- ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\psi\beta$ - δ - β -3'. ϵ -珠蛋白基因主要在胚胎期表达, $G\gamma$, $A\gamma$ -珠蛋白基因主要在胎儿期表达, 出生后基本关闭, 在成人中主要表达 δ -, β -珠蛋白. 然而, 在个别天然发生的 β -珠蛋白基因簇内的碱基突变或缺失突变, $G\gamma$ 及 $A\gamma$ 珠蛋白基因 (或两者之一) 在成人中仍然持续活跃表达, 此种情况见于胎儿血红蛋白持续症 (HPFH) 和 ($\delta\beta$)^o- 地中海贫血^[1]. 这些突变体提供了研究珠蛋白基因表达调控的天然模型. 近来, 我们在中国云南省发现了一种与 $G\gamma$ 珠蛋白基因持续表达相关的新型 ($A\gamma\delta\beta$)^o- 地中海贫血缺失^[2]. 除去了包括 $A\gamma$, $\psi\beta$, δ , β 基因在内共约 90 kb DNA. 为了进一步证明这一缺失是 $G\gamma$ 基因在成人中持续活跃表达的原因, 我们用细胞融合和次级克隆法实现了正常与异常人染色体 11 的分离, 并证明仅在具有缺失的人染色体 11 中的 $G\gamma$ 基因能高水平表达.

1 材料与方法

1.1 淋巴细胞系的建立

供血者为一个 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)^o- 地贫缺失杂合子, 男 23 岁, 无贫血症状, Hb15.3 g/dl,

1994-04-25 收稿, 1995-05-16 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目

** 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029

*** 昆明医学院, 昆明. 650031

MCH26pg, HbA₂ 为 1.5%, 胎儿血红蛋白 (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) 为 9.3% (低于已鉴别的家系中另几个杂合子的 HbF 量 (16% ~ 17%)), 胎儿珠蛋白链主要为 G γ 型^[2]. 用微量全血 EB 病毒 (Epstein-Barr Virus) 转化法建立 B 淋巴细胞系^[3].

1.2 细胞融合及含人染色体 11 的杂合细胞的选择

所用 MEL585 细胞系为腺嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型 (APRT⁻), 具有接近四倍体的染色体组成, 来源于 Deisseroth 博士, 维持在含 10% 胎儿小牛血清 (FCS) 的组织培养基中. 细胞融合实验主要参考 Papayannopoulou 的方法^[4], 略有改变. 把处于对数生长期的 50×10^6 淋巴细胞和 25×10^6 MEL 细胞混合, 离心, 用磷酸盐缓冲的生理盐水 (PBS) 冲洗, 细胞沉淀用 1mL 50% 聚乙二醇 (溶于 75mmol/L Hepes 中, 购自德国 Boehringer Mannheim 公司) 进行细胞融合, 然后悬浮在 30mL 不含 FCS 的 RPMI 中, 以每分钟 800 转离心 5min, 再把细胞沉淀悬浮在 50mL RPMI + 20%FCS 中. 培养 48 h 后, 把细胞转入含 20 μ mol/L alanosine, 50 μ mol/L 腺嘌呤及 0.25 μ g/mL 哇巴因的培养基中于 24 孔板中进行选择培养. 杂合克隆在选择培养 2 ~ 4 周后出现. 当克隆生长到约 1×10^5 个细胞时, 用单克隆抗体 53/6 检测包含人染色体 11 的杂合克隆^[5]. 用 53/6 及免疫粘合法 (panning)^[5] 从阳性克隆中富集包含人染色体 11 的杂合细胞, 并在含 1.5% 二甲亚砜 (DMSO) 培养基中培养 3 d 以诱导细胞分化, 然后用免疫荧光标记法和抗 β - 及抗 γ - 珠蛋白单克隆抗体测定 β 及 γ 珠蛋白链^[4]. 为获得仅含正常或异常人染色体 11 的杂合细胞, 用有限稀释法进行次级克隆, 并对由单一细胞衍生的细胞群进行 DNA 及 RNA 分析.

1.3 DNA 分析

从用 53/6 富集的含人染色体 11 的杂合细胞或单克隆杂合细胞中提取基因组 DNA, 经 NcoI 酶解后按以前的方法^[6] 进行电泳分离及 Southern 转移, 并用 α -³²P 标记的 p500H 探针杂交, 以确定正常或异常人染色体 11 的存在^[2].

1.4 RNA 分析

从 DMSO 诱导分化的细胞中制备总 RNA, 用 RNase 保护分析法测定人 β - 及 γ - 珠蛋白 mRNA^[7]. 两种包含 pT7 启动子及珠蛋白基因片段的质粒被用做体外转录 RNA 探针的模板: ① pT7A γ (170)^[7], 由插入 A γ 基因的 NcoI-PvuII 片段到 pBlue-script 载体质粒 pT7 启动子下游区而成, 用 BstEII 线性化, 转录后的 RNA 探针与 γ mRNA 杂交后产生一个由外显子 2 衍生出的 170nt 保护片段; ② pT7 β ^[8], 由插入人 β 珠蛋白基因的 BamHI-BalI 片段到 pGEM 载体质粒 pT7 启动子下游区而成, 用 BsaI 酶解线性化, 转录后的 RNA 探针与 β mRNA 杂交后产生一个外显子 2 衍生出的 205nt 保护片段. 3 μ g 总 RNA 和各 1×10^6 cpm 的 β - 和 γ - 探针在 47 $^{\circ}$ C 杂交过夜后, 加 300 μ L RNase 酶解液 (含 1 单位 RNaseA 及 60 单位 RNaseT1). 于 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 保护的片段在 5% 聚丙烯酰胺/8mol/L 尿素凝胶中电泳分离后放射自显影.

2 结果

2.1 含人染色体 11 的杂合细胞及单克隆的获得

两次成功的细胞融合实验共获得 98 株杂合细胞, 经单克隆抗体 53/6 检测后发现 2 株阳性克隆. 经用 53/6 及免疫粘合法富集人染色体 11 的杂合细胞, 随后用 DMSO 诱导细胞分化

后,用抗 γ - 及抗 β - 珠蛋白单克隆抗体检测,杂合细胞株 H1 中 70% 以上的细胞显示 β - 珠蛋白阳性,而 γ - 珠蛋白阳性细胞少于 5%。相反,杂合细胞株 H2 中 80% 以上的细胞为 γ - 珠蛋白阳性,而 β - 珠蛋白阳性细胞少于 10%(图 1)。

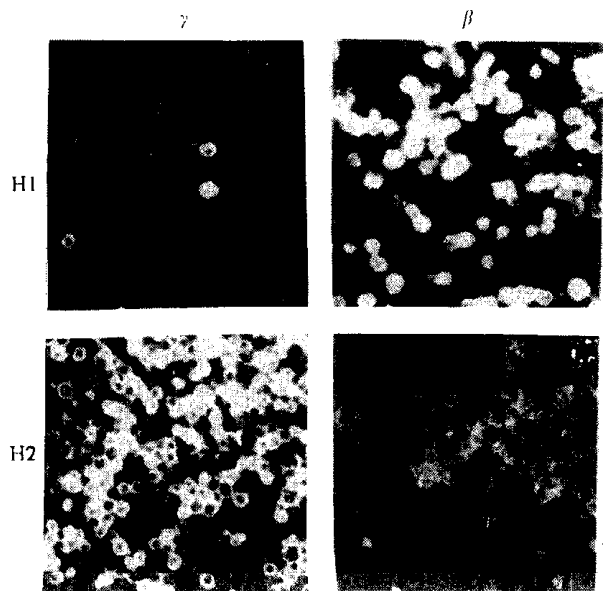


图 1 杂合细胞用抗 γ -及抗 β -珠蛋白单克隆抗体的检测

Southern 印迹杂交分析证明 H1 显示与正常人染色体 11 相应的杂交带,检测不出与异常人染色体 11 相应的杂交带,说明主要为包含正常人染色体 11 的杂合细胞。H2 显示与异常人染色体 11 相应的杂交带,检测不出与正常人染色体 11 相应的杂交带,说明主要为包含异常人染色体 11 的杂合细胞(图 2)。因为不能完全排除 H1 中可能仍有少量含异常人染色体 11 的杂合细胞,也不能排除 H2 中可能仍有少量含正常人染色体 11 的杂合细胞,故进一步用细胞培养基把两株杂合细胞进行有限稀释后分放于 96 孔板,使每孔最多只含一个细胞,单克隆在一周后出现。DNA 分析证明从 H1 分离到的 9 株单克隆杂合细胞中除一株已

C2 H1 S₁ H2 S₂ S₃ S₄ S₅ S₆ S₇ S₈ S₉ S₁₀ S₁₁ S₁₂ S₁₃ S₁₄ S₁₅ S₁₆ S₁₇ S₁₈ S₁₉ S₂₀ S₂₁ S₂₂ S₂₃ S₂₄ S₂₅ S₂₆ S₂₇ S₂₈ S₂₉ S₃₀ S₃₁ S₃₂ S₃₃ S₃₄ S₃₅ S₃₆ S₃₇ S₃₈ S₃₉ S₄₀ S₄₁ S₄₂ S₄₃ S₄₄ S₄₅ S₄₆ S₄₇ S₄₈ S₄₉ S₅₀ S₅₁ S₅₂ S₅₃ S₅₄ S₅₅ S₅₆ S₅₇ S₅₈ S₅₉ S₆₀ S₆₁ S₆₂ S₆₃ S₆₄ S₆₅ S₆₆ S₆₇ S₆₈ S₆₉ S₇₀ S₇₁ S₇₂ S₇₃ S₇₄ S₇₅ S₇₆ S₇₇ S₇₈ S₇₉ S₈₀ S₈₁ S₈₂ S₈₃ S₈₄ S₈₅ S₈₆ S₈₇ S₈₈ S₈₉ S₉₀ S₉₁ S₉₂ S₉₃ S₉₄ S₉₅ S₉₆ S₉₇ S₉₈ S₉₉ S₁₀₀

2.2 G γ 基因在正常及异常人染色体 11 中的不同表达状况

把两株杂合细胞及随机挑选的几株单克隆杂合细胞在含 1.5%DMSO 的培养基中诱导细胞分化,制备总 RNA,并用 γ - 和 β -RNA 探针及 RNase 保护法分析,在 H1 及其

图 2 杂合细胞 DNA 的 Southern 印迹杂交分析

7.3 kb 及 4.5 kb p500H 探针特异的 NcoI 片段分别代表了由正常及异常人染色体 11 产生的片段,一个具有 Yunnanese(A $\gamma\delta\beta$)^o- 地贫缺失的杂合子 DNA 用作对照(C2)

分离的单克隆杂合细胞中都仅检测到 β -珠蛋白 mRNA(图 3)。相反,在杂合细胞 H2 及由其分离的单克隆杂合细胞中能检测到高水平的 γ -珠蛋白 mRNA(图 3)。此结果说明在正常人染色体 11 上的 G γ -,A γ - 珠蛋白基因不表达,仅 β -珠蛋白基因表达,但在具有 DNA 片段缺失的 Yunnanese(A $\gamma\delta\beta$)^o- 地贫染色体 11 上的 G γ -珠蛋白在 MEL 细胞中高水平表达。为检查随细胞培养时间的延长,异常人染色体 11 上 G γ - 基因的表达状况是否发生变化,两株单克隆杂

合细胞被连续培养 4 个月并间断地用 53/6 选择富集含人染色体 11 的杂合细胞, $G\gamma$ -基因的高水平表达状况并无变化, 表明了异常人染色体 11 上 $G\gamma$ -基因在 MEL 细胞中表达的稳定性.

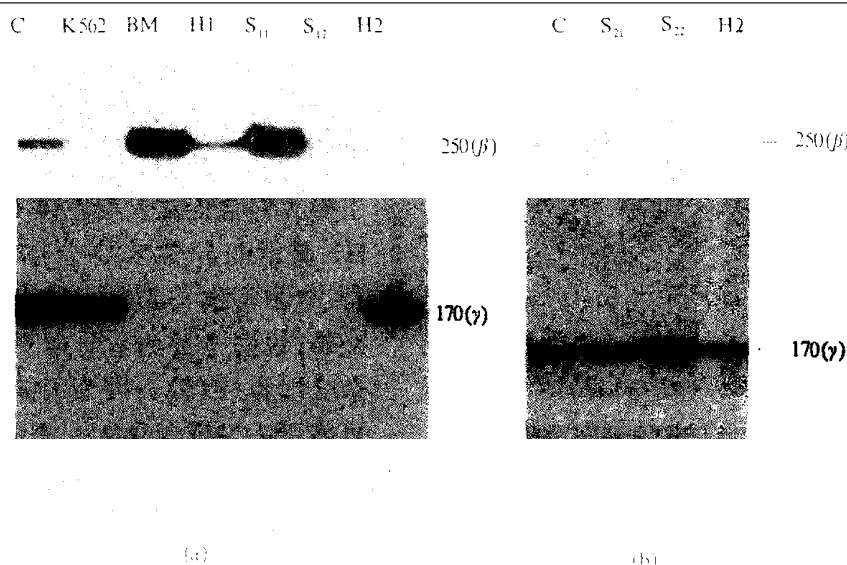


图 3 杂合细胞 RNA 的 RNase 保护分析

S_{11} 及 S_{12} 是由杂合细胞株 H1 分离的单克隆杂合细胞, S_{21} 及 S_{22} 是由杂合细胞株 H2 分离的单克隆杂合细胞. 仅表达 γ mRNA 的 K562 细胞及仅表达 β mRNA 的成人骨髓细胞 (BM) RNA 用作对照. 对照 C 为一个用克质粒构建子 μ CRA $\gamma\psi\beta\delta\beta$ 转染 MEL 细胞获得的稳定转化子, 已知它表达 $A\gamma$ 及 β mRNA

3 讨论

MEL 细胞系是鼠干细胞在向红细胞发育分化过程的早期被病毒感染导致发育分化停止而形成的, 但一些化学剂可诱导此细胞继续发育分化, 这在一定程度上可以模拟人红细胞的发育过程, 因此 MEL 已被广泛使用来研究人珠蛋白基因的表达调控. 虽然已证明 MEL 细胞能够提供人珠蛋白基因表达调控所需的反式作用环境, 但当把有限长度的 DNA 片段 [甚至把位于 ϵ 因上游区的 4 个 DNaseI 高敏位点组成的位点控制区 (LCR) 顺序^[9] 与具有天然染色体排列的从 $A\gamma$ - 到 β - 基因共 29kb DNA 片段连接] 转入 MEL 细胞后, 人 β - 及 γ - 珠蛋白基因均能同时在诱导分化的 MEL 细胞中高水平表达, 不表现发育阶段特异性 (张俊武等未发表资料). 这说明人为拼接的长度有限的克隆片段或者可能未包含人珠蛋白基因发育调节所必需的全部顺式调控顺序, 或者在 MEL 细胞中不能成就某些特定的修饰. 用细胞融合法则可实现完整的人染色体向 MEL 细胞的转移. 已经证明, 当把人胎肝成红细胞与 MEL 细胞融合后, 含人染色体 11 的杂合细胞开始时主要表达 γ - 珠蛋白, 不表达 β - 珠蛋白, 随着细胞培养时间的延长, 表达 γ - 珠蛋白逐渐减少, β - 珠蛋白逐渐增加, 直至仅表达 β - 珠蛋白, 表现出发育阶段特异的表达图案^[4]. 一些不表达珠蛋白的细胞 (如淋巴细胞及成纤维细胞) 与 MEL 细胞融合后则表达 β - 珠蛋白, 但不表达 $G\gamma$ -、 $A\gamma$ - 珠蛋白^[10], 表现出与成人红细胞同样的珠蛋白基因表达图案. 骨髓是成人中唯一表达珠蛋白的组织, 但其中的成红细胞仅约 1%, 不易从中分离足够数量的成红细胞以供研究, 目前也无建立成红细胞系的方法. 建立淋巴细胞系的方法已经成熟, 采用淋巴细胞与 MEL 细胞融合的方法研究一些天然突变子中珠蛋白基因表达是一个方便方法. Papayannopoulou 等把几种在美国及希腊发现的 HPFH 突变子的染色

体 11 转移到 MEL 细胞中后, 观察到人胎儿 $G\gamma$ - 和 $A\gamma$ - 珠蛋白基因的表达^[11]. 我们不久前在云南省发现了一种与胎儿 $G\gamma$ 珠蛋白基因持续表达相关的新型 ($A\gamma\delta\beta$)⁰- 地贫缺失, 近来建立了一个杂合子的淋巴细胞系, 并得到了其与 MEL 细胞的杂合细胞. 最初的杂合细胞应包含 MEL 及人细胞的全部染色体, 但随着不断的细胞分裂增殖, 人染色体随机丢失, 以致 98 个杂合细胞克隆扩增到足够分析的细胞数量时, 仅两个克隆可检测到人染色体 11, 并且每个克隆只占优势地含有体细胞中的两个染色体 11 之一. 单克隆抗体 53/6 可特异地识别人染色体 11 表达的某种细胞表面抗原, 因此可用其鉴别和富集含人染色体 11 的细胞以便分析. 在此基础上分离单克隆杂合细胞则可能使来源于杂合子细胞中的两条人染色体 11 得以分离, 以便比较它们的表达情况. 我们在仅含正常人染色体 11 的杂合细胞中观察到 β - 珠蛋白基因表达, 而 γ - 珠蛋白基因不表达, 再次证明来源于淋巴细胞的人染色体 11 的珠蛋白基因在 MEL 细胞中显示与成人红细胞同样的发育阶段特异的表达图案. 然而, 在仅含异常人染色体 11 的杂合细胞中, $G\gamma$ - 珠蛋白基因能稳定地高水平表达, 说明 β - 珠蛋白基因簇内的 DNA 片段缺失确是 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)⁰- 地贫中胎儿 $G\gamma$ - 珠蛋白基因持续活跃表达的原因.

关于此类缺失突变体中胎儿 γ - 珠蛋白基因在成人中持续活跃表达的机制, 已提出了若干假说. Huisman 等^[12] 假设在 $A\gamma$ - 与 δ - 基因之间可能存在抑制 γ - 基因表达的顺序, 此顺序在一些突变体中被除去便导致 γ - 基因的活化. Tuan 及 Forget 等^[13] 假设缺失导致原位于 β - 珠蛋白基因簇 3' 远端可能的加强子类顺序被带到接近 γ - 基因. 一个近来提出的模式认为 γ - 和 β - 基因发育阶段特异的表达是通过它们相互竞争与 LCR 的相互作用来实现的^[8,14], β - 基因在这些突变体中的缺失必然导致 γ - 基因的活跃表达. 这些假说虽然确能对一些突变体的表现型进行解释, 但也都存在许多矛盾, 并缺少直接的实验证据. 比较我们鉴别的 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)⁰ 缺失纯合子及 Chinese($A\gamma\delta\beta$)⁰ 缺失纯合子的表现型及缺失位置, 发现前者的贫血症状明显轻于后者, 二者的 5' 缺失端点相近, 而 3' 缺失端点相差约 13kb. 这暗示一个加强子类顺序可能存在于二者的 3' 缺失端点之间. 此顺序在后者被除去而在前者中仍然保留 (但 DNA 片段缺失使此顺序接近 $G\gamma$ 基因) 导致前者中 $G\gamma$ 基因具有更高水平的表达, 更好地代偿了 β 珠蛋白表达的不足. 为证实这一假设, 我们已经克隆分离了 Yunnanese($A\gamma\delta\beta$)⁰ 缺失的 3' 并入顺序, 并将对其进行功能测定以鉴别加强子类顺序是否存在.

致谢 美国华盛顿大学 G. Stamatoyannopoulos 教授、T. Papayannoulou 教授以及 G. Zitnik 博士对此工作给予许多帮助, 顺致谢意.

参 考 文 献

- 1 Stamatoyannopoulos G, Nienhuis A W. The Molecular Basis of Blood Diseases. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1987. 66~105
- 2 Zhang J W. Molecular characterization of a novel form of ($A\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia deletion in a Chinese family. Blood, 1993, 81(6): 1624~1629
- 3 乔 军. 微量全血 EB 病毒转化法建立淋巴细胞系的新技术. 中国实验临床免疫学杂志, 1990, 2(1): 2~4
- 4 Papayannoulou T. Analysis of human hemoglobin switching in MEL human fetal erythroid cell hybrids. Cell, 1986, 46(3): 469~476

- 5 Papayannopoulou T. Anti-HEL cell monoclonal antibodies recognize determinants that are also present in hemopoietic progenitors. *Blood*, 1984, 63(2): 326 ~ 334
- 6 王琳芳, 潘华珍. 分子生物学基本技术. 北京: 科学出版社, 1992. 48 ~ 68
- 7 Stamatoyannopoulos G. Developmental regulation of human γ -globin genes in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13(11): 7 636 ~ 7 644
- 8 Enver T. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching. *Nature*, 1990, 334(6264): 309 ~ 313
- 9 Orkin S H. Globin gene regulation and switching: circa 1990. *Cell*, 1990, 63(4): 665 ~ 672
- 10 Takegawa S. Only adult hemoglobin is produced in fetal nonerythroid MEL cell hybrids. *Blood*, 1986, 68 (6): 1 384 ~ 1 388
- 11 Papayannopoulou T. Activation of developmentally mutated human globin genes by cell fusion. *Science*, 1988, 252: 1 056 ~ 1 058
- 12 Huisman T H J. The present status of heterogeneity of fetal hemoglobin in β -thalassemia: an attempt to unify some observations in thalassemia and related conditions. *Ann N Y Acad Sci*, 1974, 232: 107 ~ 124
- 13 Tuan D. Different 3' endpoints of deletions causing ($\delta\beta$)^o-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: Implications for the control of γ -globin gene expression in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(22): 6 937 ~ 6 941
- 14 Behringer R R. Human γ -to β -globin gene switching in transgenic mice. *Genes & Dev*, 1990, 4(3): 380 ~ 389