

两个新的红细胞分化相关因子的 cDNA 克隆 及功能探讨

王 鑫 陈 兴 王敦成 胡美茹 王建安 黎 燕 沈倍奋*

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 曾报道在终末分化阶段的红细胞中可表达一些与珠蛋白基因增强子 HS2 序列特异结合的蛋白因子, 并利用杂交瘤技术制备了两株针对上述蛋白的单克隆抗体. 为获得编码这些因子的基因, 实验利用这两株单抗筛选构建于 λ gt11 的人胚肝 cDNA 表达文库, 并获得阳性克隆. 经分析, 其中一株 cDNA 克隆具有全长编码序列(EDRF1), 另一株为具有可读框的 cDNA 片段(EDRF2), 由它编码的氨基酸序列含有反式调节因子特有的亮氨酸拉链结构域. 与 GenBank 作同源比较后确定上述两株 cDNA 序列均未见报道. Northern 印迹结果表明, 它们编码的蛋白质为红细胞分化相关蛋白. RT-PCR 系统地观察了 EDRF1, EDRF2 在多种细胞株和组织中的表达, 提供了重要的功能线索. EDRF1 和 EDRF2 主要在造血系统和早期的胚胎多种组织表达, 说明它与血细胞成熟和早期的组织发育相关, 也可能是传递早期造血与胚胎发育的分子语言.

关键词 红细胞分化 反式调节因子 cDNA 克隆 λ gt11cDNA 文库 RT-PCR

红细胞生成是多功能造血干细胞或其祖细胞增生并沿一定方向分阶段分化的过程, 调控红细胞分化的因素有很多, 但细胞内某些特定基因的表达是决定红细胞分化的内在因素. 珠蛋白是终末分化红细胞的特征蛋白, 在中幼和晚幼红细胞期, 珠蛋白基因开启表达, 随之细胞核停止分裂, 红细胞即转入终末分化阶段, 提示珠蛋白基因表达与红细胞终末分化具有一定的内在联系, 调控珠蛋白基因表达的因素必然参与了红细胞的分化过程, 因此, 通过对珠蛋白基因表达调控的研究, 可为红细胞分化机制的阐明提供重要线索.

目前已知 β 珠蛋白基因簇上游存在一个基因簇控制区(locus control region, LCR), 在该区域内含有 4 个对 DNase I 高度敏感的增强子序列(DNase I hypersensitive site1~4, HS1~4). 研究表明, 这 4 个增强子序列, 特别是 HS2, 是调控珠蛋白基因高水平表达的重要因素^[1], 它可与诸多反式调节因子结合形成多元的蛋白质-HS2 复合物, 并通过上述蛋白间的协同作用, 使该区域染色体呈现开放的空间构象, 从而调控珠蛋白基因在终末分化的红细胞中活跃表达^[2].

人们观察到,在上述反式调节因子中,至少有两种 HS2 结合蛋白 GATA1 和 NF-E2 既参与珠蛋白基因的表达调控又参与红细胞的终末分化^[3, 4],说明此类反式调节因子是偶联红细胞分化和珠蛋白基因表达的重要因素,对它们的研究可有利于红细胞分化机理的阐明。

最近发现,在正常分化的人胚肝中、晚幼红细胞和氯高铁血红素(hemin)诱导分化的人红白血病 K562 细胞中表达一些新的分化相关的 HS2 结合蛋白^[5],并用杂交瘤技术制备了相应的 HS2 结合蛋白的单克隆抗体^[6]。本实验应用上述单抗筛选构建于 λ gt11 的人胚肝 cDNA 表达文库,以期获得单抗对应蛋白的 cDNA 克隆,为上述 HS2 结合蛋白生物学功能的鉴定及其作用机理的阐明奠定基础。

1 材料与方法

1.1 K562 细胞培养及诱导分化

K562 细胞由中国医学科学院基础医学研究所细胞生物室提供。按常规将 K562 细胞悬浮于含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 中,并在 37℃, 5%CO₂ 的条件下培养。K562 细胞的诱导分化是在上述培养液中加入 40 μ mol/L 氯高铁血红素(Sigma),持续培养 4 d^[7]。

1.2 人胚肝中、晚幼红细胞的分离

取 3 月龄人胚肝,通过不锈钢网研磨制成细胞悬液,按文献[8]以 40%, 70% Percoll(Pharmacia)不连续密度梯度离心法收集 70% Percoll 界面上的中、晚幼红细胞。

1.3 cDNA 文库的筛选

遵照 CLONTECH 试剂盒操作手册进行。先将滴度为 1×10^4 pfu 的噬菌体文库与宿主菌共同铺于 90 mm 平板,待菌苔中长出噬斑后用 IPTG 浸过的硝酸纤维素(NC)膜覆盖其表面,37℃ 培养 4 h,经适当处理后,将 NC 膜依次置于单抗,生物素-兔抗鼠 IgG(DAKO),链亲和素(streptavidin)-HRP(DAKO)以及显色底物(1 mg DAB, 3 mgCoCl₂, 0.3% H₂O₂) 等溶液中,待信号完全显示后终止反应。将阳性信号对应的噬斑挑出并按常规进行后续几轮筛选。

1.4 DNA 序列分析

按 DNA 测序试剂盒(PE 公司)的操作程序,用四色荧光染料标记技术通过双脱氧终止法,在 PE 公司 ABI PRISM 310 型全自动测序仪上进行序列分析。

1.5 Northern 印迹分析

参照文献[9]的方法提取人胚肝中、晚幼红细胞和 K562 细胞的总 RNA,并用地高辛标记的 cDNA 克隆片段为探针与上述 RNA 进行 Northern 印迹分析,结果用地高辛 DNA 检测和标记试剂盒(Boehringer Mannheim Biochemica)所示程序进行检测。

1.6 RT-PCR

用 Trizol 试剂(GIBCO)提取细胞总 RNA,测定 A 值。取 1~2 μ g RNA 进行反转录。取 1~3 μ L cDNA 反转录产物进行 PCR。引物序列:EDRF1 PCR 上游引物:GCGAATTCAATGCCCGACA-GTGAT,下游引物:AACTGCAGATCTATGATGACTTGAG;EDRF2 PCR 上游引物:CGGGTG-TTCTCCATTCT,下游引物:CGCTAGTTGCCGGTTTA。为排除假阳性,设 4 组对照,标准对照:从 pGEM-T-easy-EDRF1,EDRF2 质粒上扩增目的片段,阳性对照为氯高铁血红素刺激 96 h 后的 K562 总 RNA 反转录得到的 cDNA 进行 PCR,阴性对照为无关的肠癌细胞,另有空白对照。

2 结果

2.1 人胚肝 cDNA 文库的筛选及 cDNA 克隆序列分析

我们曾报道, 在正常分化的人胚肝中、晚幼红细胞和氯高铁血红素诱导分化的 K562 细胞中表达一些可与珠蛋白基因表达增强子 HS2 序列特异结合的反式调节因子, 并应用杂交瘤技术制备了两株针对上述分化相关的 HS2 结合蛋白的单克隆抗体^[5, 6], 即用这两株单抗对构建于噬菌体 λ gt11 载体的人胚肝 cDNA 表达文库进行免疫学筛选, 经累计筛选滴度为 2×10^6 pfu 的重组体后, 从中获得两株免疫反应阳性克隆, 并将其编码蛋白命名为红细胞分化相关因子 1 和 2 (erythroid differentiation related factor, EDRF1 和 EDRF2). 用 *EcoR* I 将两株噬菌体克隆 DNA 酶切后可分别获得长度为 1.071 和 0.576 kb 的插入片段, 同时实验选择 cDNA 插入片段的上游载体序列: GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG 和下游载体序列: TTGACACCAGACCAAC-TGGTAATG 为测序引物对插入片段进行正反向测序(图 1 和 2).

```

ATG CCC GAC AGT GAT GAA AAT GGA TCC TAT AGC ACC AGC TCT GAT CCA TCA   51
M P D S D E N G S Y S T S S D P S
GAT GAT AGC AAA GCA GTA GCT ATA ATC AAG TCT GTT GGA GAA CTA TCA GTA   102
D D S K A V A I I K S V G E L S V
CCA GAA AAA TAC AAA TCT ATT CAT CAA ATC AGA CCC AGT TGT GCA TTT CCA   153
P E K Y K S I H Q I R P S C A F P
GTT TGC CAT GAC ACA GAA GAG CGC TGT AGA CTT GTG CTT AGC TAT GTT CTA   204
V C H D T E E R C R L V L S Y V L
GAG GGT TTA AAA TTT GTC GAT AGC AGC ATC AAA AAA GAA AGC GAC CTT CCA   255
E G L K F V D S S I K K E S D L P
GCA GCT GAC CCC AGC ACT CCA ATC CCG TTA AAA TAT GAA GAT GAA TCC TCA   306
A A D P S T P I P L K Y E D E S S
AGA GGG GGT CCC GAG GGG CTA GAG AAG CAG ATG GCC TTG TTT TTG GAC AAA   357
R G G P E G G L E K Q M A L F L D K
ATG GGC TCC CTT CAG AAG GGC AAT TAT TCC AGT CAA TCT GGA ATG ATC CCT   408
M G S L Q K G N Y S S Q S G M I P
GGC GCT TGG CAA CAT AAA ATG AAA CTT CAG CTG ATT CTC AAG TCA TCA   456
G S W Q H K M K L Q L I L K S S

```

图 1 EDRF1 的编码区 cDNA 序列及其对应的氨基酸序列

图 1 示 EDRF1 的 cDNA 序列, 该序列具有一个较长的可读框, 可推算 EDRF1 的分子量大小(约 22 ku)^[6]以及 Northern 印迹分析中 EDRF1 mRNA 的长度(见后面结果), 并判断该 cDNA 序列编码一个具有 152 个氨基酸的蛋白因子, 等电点为 5.7, 没有代表性的结构域. 使用 NCBI 的 Blast 程序在公共数据库 GenBank non-redundant 中检索基因相似性, 若所检索的 EST 在 100 bp 中有 90% 以上序列与已知基因匹配, 则认为是已知基因. 将 EDRF1 的 cDNA 序列与 GenBank 作同源性比较后未发现明显同源, 说明它是一个未见报道的蛋白因子, 将其登录于 GenBank, 登录号为 AF040247.

EDRF2 的部分 cDNA 序列如图 2 所示. 该序列具有一个 369 bp 的可读框, 编码 123 个氨基酸(图 2), 等电点为 5.2, 其中包含一个典型的亮氨酸拉链结构域: L-X6-L-X6-L-A, 推测是一类可与 HS2 序列相结合的反式调节因子. 将 EDRF2 的部分 cDNA 序列与 GenBank 作同源性比较后未发现明显同源, 说明它也是一个未见报道的蛋白因子, 其登录号为 AF040248. EDRF2 全序列 cDNA 克隆的筛选目前尚在进行中.

```

CTG GCG GCG CAA GAC GTG CTG GCA AAT GGC GGC GCG GGT GTT TCT CCA TTC   51
  L  A  A  Q  D  V  L  A  N  G  G  A  G  V  S  P  F
TGG CTG GTA GGC AGT ATC CTG ATG CTT ACG CTC GGC GAG CTG TGT CTG AGC   102
  W  L  V  G  S  I  L  M  L  T  L  G  E  L  C  L  S
CCA ATT GGT CTG GCG ACC ATG ACG CTG TTG GCA CCG GAA AGA ATG CGT GGA   153
  P  I  G  L  A  T  M  T  L  L  A  P  E  R  M  R  G
CAG ATG ATG GGT CTG TGG TTC TGC GCC AGT GCG CTG GGT AAC CTG GCC GCG   204
  Q  M  M  G  L  W  F  C  A  S  A  L  G  N  L  A  A
GGT CTG ATT GGT GGT CAT GTG AAG GCC GAC CAG CTT GAT ATG CTG CCA GAT   255
  G  L  I  G  G  H  V  K  A  D  Q  L  D  M  L  P  D
CTC TTC GCG CGC TGC TCG ATT GCG CTG CTT ATC TGC GCC GCG GTA CTG ATC   306
  L  F  A  R  C  S  I  A  L  L  I  C  A  A  V  L  I
GTT CTC ATT GTT CCG ATT CGT CGC ATG CTG GAG AAT ACA CAG ACT AAA CCG   357
  V  L  I  V  P  I  R  R  M  L  E  N  T  Q  T  K  P
GCAACT AGC GCC
  A  T  S  A
    
```

图 2 EDRF2 的编码区 cDNA 序列及其对应的氨基酸序列(划线处提示亮氨酸拉链结构域)

2.2 EDRF1 和 EDRF2 为红细胞分化相关因子

为进一步确证 EDRF1 和 EDRF2 为红细胞分化相关因子, 实验以地高辛标记的上述因子的 cDNA 片段为探针, 对氯高铁血红素诱导分化前后得人红白血病 K562 细胞和处于正常终

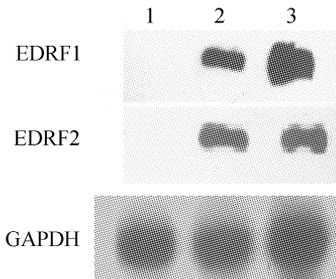


图 3 EDRF1, EDRF2 基因 Northern 印迹图谱

1 为 K562 细胞; 2 为氯高铁血红素诱导分化的 K562 细胞; 3 为人胚肝中、晚幼红细胞

末分化期的人胚肝中、晚幼红细胞的总 RNA 进行 Northern 印迹分析(图 3), 结果表明, 两种片段只与氯高铁血红素诱导分化的 K562 细胞和处于正常终末分化期的人胚肝中、晚幼红细胞的 RNA 产生阳性杂交带, 根据杂交带的位置推测, EDRF1 和 EDRF2 mRNA 大小分别约为 1 和 3 kb, 实验结果说明, EDRF1 和 EDRF2 只在分化的红细胞中特异表达, 是两种与红细胞分化相关的蛋白因子. 3 种细胞来源的总 RNA 与 EDRF1, EDRF2, GAPDH cDNA 探针杂交的 Northern 印迹图谱可见, 与该 cDNA 片段对应的 mRNA 只在分化的红细胞中特异表达.

2.3 不同细胞或组织中 EDRF1, EDRF2 的表达

RT-PCR 可以明确地反映 EDRF1, EDRF2 mRNA 的表达情况, 我们设置合理的几个对照组, 最大可能地排除假阳性, 使结果确切地反映在不同细胞系和组织中 EDRF1, EDRF2 的表达情况. 如表 1 所示, 在一些与造血无关的细胞中, 如骨骼肌细胞、造血基质细胞、肠癌细胞等,

表 1 EDRF1 和 EDRF2 在多种细胞系、组织中的表达

细胞系或组织	EDRF1	EDRF2	细胞系或组织	EDRF1	EDRF2
造血基质细胞	-	-	SKO-007	-	+
神经胶质细胞	-	-	Molt4	+	-
骨骼肌细胞	-	-	K562(氯高铁血红素诱导前)	-/+	-
骨髓细胞	+	+	K562(氯高铁血红素诱导后)	+	+
外周血细胞	-	-	HEL	+	+
HL60	-	+	睾丸组织	+	+
HCT8(肠癌)	-	-	胚肺组织	ND	+
HepG2	-	+	胚肾组织	+	+
HT29(肠癌)	-	-	胚肝组织	+	+
Raji	-	-			

EDRF1 和 EDRF2 未见表达, 而在与红系造血相关细胞系或造血细胞中, 如 K562, HEL, 骨髓细胞(图 4, 5), 以及发育中处于早期的组织或细胞中, 如胚肝组织、胚肾组织中都能检测到表达。

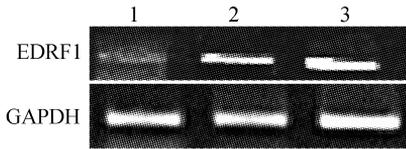


图 4 K562 和 HEL 细胞中 EDRF1 的表达
1 示 HEL; 2 示 K562; 3 示 K562 诱导分化后

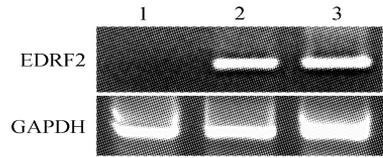


图 5 EDRF2 在 K562 细胞中诱导分化前后
和 Jurkat 中的表达
1 示 K562, 2 示诱导分化后的 K562; 3 示 Jurkat

3 讨论

哺乳类红细胞终末分化的主要特征是珠蛋白基因表达血红蛋白, 出现核固缩和去核等, 细胞癌变时上述分化特征消失, 核分裂失控而变为癌细胞(红白血病细胞), 这些特点涉及细胞分化和肿瘤形成两大研究领域, 因此, 对上述现象的深入研究有助于细胞分化和恶性化机理的阐明. 人们普遍认为, 红细胞分化过程的完成取决于两个相互联系的因素, 一是细胞外具有不同生物学功能的诸多细胞因子的作用, 二是反式调节因子的作用, 即细胞核内诸多反式调节因子通过与基因的顺式调控序列结合, 调控细胞分化特异性基因的顺序表达, 从而使红细胞分化并产生其特有的分化表型特征. 但随着对诸如红细胞生成素(EPO)等细胞因子的深入研究发现, 细胞因子的主要功能是调控红细胞不断增殖和阻遏其过早凋亡, 而与分化过程无明显关联^[10], 因此, 目前人们开始认为红细胞分化主要是细胞核内诸多反式调节因子协同作用的结果^[11], 即在细胞增殖到一定时期, 某些主要调节基因开启表达, 标志着细胞内固有基因表达程序的开启, 其基因表达产物包括细胞系特异因子和表达范围较广的所谓公共因子之间相互对话, 激活和/或关闭特定基因的表达, 使细胞出现特有的分化特征, 因此, 寻找和深入研究调控红细胞分化相关基因的活性因子以及它们之间的相互联系可为红细胞分化机制的阐明提供重要线索. 珠蛋白基因是红细胞分化相关基因, 目前发现调控珠蛋白基因表达的两种反式调节因子 GATA1 和 NF-E2 同时可影响红细胞的终末分化, 值得注意的是, GATA1 和 NF-E2 同时存在于正常红细胞和红系恶性细胞、小鼠红白血病(MEL)细胞以及人红白血病(K562)细胞中, 而且 GATA1 和 NF-E2 调控红细胞分化的功能可被其他相关因子诸如 GATA2 和 Nrf1 所替代^[12], 说明 GATA1 和 NF-E2 的存在不足以促使转化细胞完成终末分化过程, 要阐明红细胞分化和珠蛋白基因表达调控的机制, 尚须探索其他蛋白因子的协同作用.

红系终末分化过程中新出现的活性物质可与珠蛋白基因表达增强子 HS2 特异结合^[13-15], 为深入研究上述蛋白因子的生物学功能, 我们制备了相应的蛋白单抗, 并用它们筛选人胚肝 cDNA 文库, 初步实验结果证实, 获得的两株 cDNA 克隆迄今未见报道, 而且其编码蛋白 EDRF1 和 EDRF2 为红细胞分化相关蛋白. 鉴于它们可与珠蛋白基因表达 HS2 增强子特异结合^[5, 6], 而且仅在分化的红细胞中特异表达, 提示 EDRF1 和 EDRF2 可能为一类参与调控红细胞分化和珠蛋白基因表达的反式调节因子.

反转录 PCR 的结果提示, EDRF1, EDRF2 两个基因片段在早期的器官发育和组织分化中

可能起到重要作用,它在早期发育的器官中如胚肝、胚肾中表达,在成熟的组织细胞中如骨骼肌、神经胶质细胞中则未观察到表达,可能基因及其表达产物在完成早期功能后,处于静息状态.这种基因的定时活化或静息是器官发育和种系发生的精细调节,而且这两个基因片段在造血细胞中的表达也具偏嗜性,说明它在不同的造血细胞成熟过程中起到不同的调节作用.在向红系分化成熟的红白血病细胞中,两个基因片段均有表达,说明它们在红系生成中发挥作用.RT-PCR的结果表明EDRF1在未分化的K562细胞中表达,这也许是因为方法本身的灵敏,导致与Northern印迹的结果有所差异.EDRF2编码的蛋白可能作为一种反式作用因子,结合珠蛋白特异的顺式调节元件,共同建立红系发育程序,它也可能与其他的公共因子协调作用以调控珠蛋白基因的红系组织特异性与发育阶段特异性表达^[16, 17].EDRF2很可能作为一种转录因子,参与珠蛋白的表达调节及红细胞分化,多种蛋白共同协调控制红细胞的定向分化,符合造血一元论学说.

参 考 文 献

- 1 Morley B J, Abbott C A, Sharpe J A, et al. A single β -globin locus control region element (5'-hypersensitive site 2) is sufficient for developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(4): 2 057~2 066
- 2 Ellis J, Tan-Un K C, Harper A, et al. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus region. *EMBO J*, 1996, 15(3): 562~568
- 3 Penvy L, Simon M C, Robertson E, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, 1991, 349(6 306): 257~260
- 4 Peters L L, Andrews N C, Eicher E M, et al. Mouse microcytic anemia caused by a defect in the gene encoding the globin enhancer-binding protein NF-E2. *Nature*, 1993, 362(6 224): 768~770
- 5 王 鑫, 刘丕旭, 章静波, 等. 红细胞终末分化期出现与珠蛋白基因表达增强子 HS2 序列特异结合的蛋白质因子. *解剖学报*, 1994, 25(4): 379~384
- 6 王 鑫, 陈实平, 薛社普, 等. 红细胞分化相关蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. *解剖学报*, 1997, 28(2): 187~191
- 7 Moi P, Kan Y W. Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(22): 9 000~9 004
- 8 张庆一, 薛社普. 一种分离 Wistar 大鼠中幼、晚幼有核红细胞的有效方法. *解剖学报*, 1988, 19(4): 416~420
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 10 Wu H, Liu X, Jaenisch R, et al. Generation of committed erythroid BFU-E and CFR-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 1995, 83: 59~67
- 11 Migliaccio A R, Vannucchi A M, Migliaccio G. Molecular control of erythroid differentiation. *Int J Hematol*, 1996, 64(1): 1~29
- 12 Orkin S H. Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur J Biochem*, 1995, 231: 271~281
- 13 薛社普. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓癌细胞恶性调控的研究. *解剖学报*, 1991, 22(3): 225~234
- 14 刘友华, 薛社普. 胞质因子对人早幼白血病细胞恶性表型和基因表达的调控作用. *中国科学, B 辑*, 1987, (8): 853~864
- 15 刘丕旭, 王 鑫, 雷 薇, 等. EDDF 诱导产生与红细胞终末分化相关的 HS2 特异结合蛋白. *解剖学报*, 1995, 26(4): 371~374
- 16 王玉刚, 刘洪涛, 张颖妹, 等. 一个人类凋亡相关新基因 TFAR15' 的 cDNA 克隆与表达. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(3): 331~336
- 17 田宇清, 刘 钢, 聂丽平, 等. 圈卷产色链霉菌分化早期基因-samfR 的研究. *中国科学, C 辑*, 1999, 29(5): 461~467