

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

王 鑫 刘丕旭 章静波 薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所细胞生物室, 北京 100005)

摘要 利用 Southwestern 印迹和电泳迁移率改变分析法, 研究了处于终末分化阶段的人胚肝中、晚幼红细胞和经 hemin 诱导分化前后的 K562 细胞核抽提物中与地高辛标记的 HS2 探针特异结合的蛋白质。发现经 hemin 诱导后的 K562 细胞样品中出现一些为诱导前缺如的, 分子量为 12, 14, 18, 45 和 50 kD 的 HS2 结合蛋白。这些结合蛋白在印迹图谱中的位置(分子量大小)与存在于正常终末分化期红细胞中 HS2 结合蛋白的相近。同样, 诱导后 K562 细胞核蛋白质与 HS2 形成复合物的电泳迁移图谱与正常分化的人胚肝红细胞核蛋白质-HS2 复合物的相似, 而与未经诱导的 K562 细胞核蛋白质-HS2 复合物的迁移图谱存在差异。提示诱导分化和正常分化的红细胞表达一些新的 HS2 结合蛋白, 这些仅在终末分化期红细胞中出现的 HS2 结合蛋白, 可能是参与红细胞分化和珠蛋白基因表达调控的重要因素。

关键词 红细胞分化 珠蛋白基因表达调控 增强子(HS2)序列 人胚肝红细胞 人红白血病(K562)细胞

红细胞终末分化是细胞因子(cytokines)与细胞内基因协调作用下按一定程序表达的结果。反式调节因子在这种联系中起着重要的媒介作用, 例如一些反式调节因子一方面可以激活红细胞生成素受体(EPOR)基因的表达, 使红细胞对 EPO 产生反应并沿着红系的方向分化^[1], 一方面又可与多种基因的表达调控序列(增强子或启动子)结合以激活诸多红系表型基因(诸如珠蛋白基因)的表达^[2], 从而使红细胞完成分化过程, 并产生其特有的分化特征。因此, 反式调节因子是决定红细胞分化和红系表型基因表达的内在因素。

目前已知珠蛋白基因表达增强子序列 HS2(DNase I hypersensitive site 2)可与诸多蛋白质因子结合形成多元的蛋白质-HS2 复合物(multiproteins-HS2 complex), 以调控珠蛋白基因在红细胞分化过程中高水平表达^[3-6]。但对构成该复合物的蛋白质因子, 特别是它们在红细胞分化过程中的作用所知甚少。因此, 研究这类在红细胞分化过程中特异表达的反式调节因子对阐明红细胞分化的分子机制具有重大意义。本实验以人胚肝中、晚幼红细胞分化过程中产生的可与 HS2 序列相结合的反式调节因子为研究对象, 并与常用的对应于人胚胎发育期的红系转化细胞——人红白血病 K562 细胞在诱导分化前后出现的 HS2 结合蛋白互为印证, 对其在红细胞分化和珠蛋白基因表达调控中所起的作用进行探讨。

材 料 和 方 法

1. K562 细胞

• 国家自然科学基金重点基金资助项目

K562 是本室引进的传代细胞系。按常规将 K562 细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 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 μmol/L hemin(Sigma), 持续培养 4 d^[1]。

2. 人胚肝中、晚幼红细胞的分离

取 3 月龄人胚肝置于冷 PBS 中, 洗去血污后在 100 目不锈钢网上研磨过滤制成细胞悬液, 并按本室张庆一^[2]的方法分离中、晚幼红细胞; 在 50 ml 玻璃离心管中经 40%、70% Percoll(Pharmacia)不连续密度梯度离心(3 000 g, 4℃, 90 min), 取 70% Percoll 界面上的细胞, 以 20 倍体积 PBS 洗 3 次备用。

3. 细胞核蛋白质的制备^[3]

将 K562 细胞和中、晚幼红细胞分别依次悬浮于缓冲液 A、B、C、D 和 E 中进行匀浆和抽提。细胞先悬于缓冲液 A(15 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes, pH7.6, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1% NP40, 0.5 mmol/L PMSF)中, 4℃离心收集细胞, 沉淀再悬于 10 倍沉淀体积的缓冲液 B(A+1 mmol/L DTT)中匀浆, 随后补加 1/5 体积的缓冲液 C(2 mmol/L KCl, 100 mmol/L Hepes, pH7.6, 60 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT), 继续匀浆, 显微镜下观察细胞裂解情况, 4℃下 1 000 r/min, 离心 25 min, 沉淀悬浮于缓冲液 D(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 100 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 10%甘油), 3 000 r/min, 离心 10 min。随后再悬浮于缓冲液 E(0.4 mmol/L NaCl+D)中, 最后于缓冲液[10%甘油, 25 mmol/L Hepes, pH7.6, 40 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氯(Sigma)]中 4℃透析 6 h, 确定其蛋白质浓度后, -70℃贮存备用。

4. HS2 序列的制备

扩增构建有 HS2 序列的 PUC₁₉ 质粒(刘德培教授惠赠), CsCl 超离心法纯化该质粒后用 EcoRI 和 BamHI(本所内切酶组产品)双酶切出, 并以电泳透析法回收。该序列全长 732 bp。

5. HS2 序列的地高辛(DIG)标记(参见 DIG Labeling and Detection Kit, Boehringer Mannheim Biochemica)

取 3 μg HS2 DNA, 100℃变性, 迅速置于冰浴中, 依次加入标记引物, DIG-dUTP 和其他 4 种 dUTP 以及 Klenow 酶, 37℃温育 4 h, 终止反应后用 LiCl 和无水乙醇沉淀标记的探针, 70%乙醇洗涤, 吹干, 溶于 50 μl TE(pH8.0)溶液中备用。

6. Southwestern 印迹分析^[10]

一定量核蛋白质抽提物经 SDS/15%-PAGE 电泳分离后经电转移至 NC 膜上, 转移后将膜封于预杂交液(0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 6%脱脂牛奶, 300 μg/ml 鲑鱼精 DNA, 0.1%叠氮钠)中 37℃保温 1 h。随后改加 1 ml 杂交液(预杂交液+10 μl DIG 标记 DNA)继续于 37℃保温 1 h。杂交完后用洗液(0.4 mol/L NaCl, 0.04 mol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)于室温下清洗 1 h, 中间换液 2 次。

7. HS2 DNA 序列与核蛋白复合物电泳迁移率改变的检测

7.1 核蛋白质与 HS2 序列的结合反应^[11]: DNA 与核蛋白结合反应液最终体积为 20 μl。反应液中含有 20 mmol/L Hepes, pH7.8, 60 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 2 μg BSA, 4 μg 鲑鱼精 DNA, 10%甘油和不同浓度的核蛋白质。反应在 25℃进行 10 min 后加入 1 μl(50 ng)HS2 片段, 继续在 25℃下保温 20 min 后加入 1 μl 电泳指示液(50%甘油: 0.1%溴酚蓝=2:1)。

7.2 HS2 迁移率改变的检测(参见 DIG Labeling and Detection Kit): HS2-蛋白质复合物在 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液中经 1% 琼脂糖凝胶电泳 3~4 h 后转移到 NC 膜, 用 $6 \times \text{SSC}$ 清洗 5 min, 80°C 烘烤 2 h, 然后置于 10 ml 预杂交液 ($5 \times \text{SSC}$, 1% 脱脂牛奶, 0.1% 十二烷基肌苷酸钠, 0.02% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ 变性鲑鱼精 DNA, 68°C 保温 1 h, 改加 1 ml 杂交液(预杂交液+10 μl DIG 标记 HS2 探针)于 68°C 保温 6 h 以上, 随后用 $2 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS 于室温洗涤 2 次(5 min/次), $0.1 \times \text{SSC}$ -0.1% SDS 于 68°C 清洗 2 次(15 min/次), 杂交结果按 DIG 试剂盒所述方法检测。其步骤大致为: 杂交后膜用 2% 脱脂牛奶封闭 30 min, 加入按一定比例稀释的偶联碱性磷酸酶的抗 DIG 抗体(Anti-DIG-AP)保温 30 min, 经洗涤后加显色底物至信号完全出现。

结 果

1. 终末分化期人胚肝中、晚幼红细胞和 hemin 诱导分化前后 K562 细胞核中 HS2 结合蛋白的检测

人胚肝红系细胞及 hemin 诱导前后的 K562 细胞核蛋白质 20 μg 和 40 μg 经 SDS/15%-PAGE 电泳分离后进行 Southwestern 印迹图谱分析(图 1)。可见在中、晚幼红细胞核抽提物中出现与 DIG 标记的 HS2 探针特异结合的蛋白质, 分子量分别为 50 kD, 45 kD, 15 kD, 14 kD 和 12 kD。值得注意的是, K562 细胞经 hemin 诱导后的核抽提液中亦出现类似的 HS2 结合蛋白, 其分子量分别为 50 kD, 45 kD, 18 kD, 15 kD, 14 kD 和 12 kD, 而未经诱导的 K562 细胞核抽提物中则缺乏此类蛋白质或含量甚微。换言之, 诱导分化的 K562 细胞产生了与处于终末分化期的中、晚幼红细胞中 HS2 结合蛋白基本相同的蛋白质, 表明这些与分化相关的 HS2 结合蛋白可能在 K562 细胞和正常红细胞的分化过程中参与了珠蛋白基因的表达调控和红细胞分化。

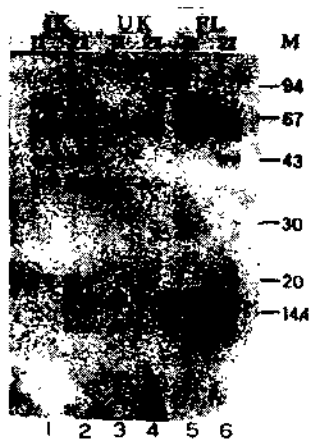


图 1 DIG 标记的 HS2 探针与细胞核蛋白质结合的 Southwestern 印迹图谱, 图中可见不同红系细胞来源的核蛋白质与 DIG 标记的 HS2 结合蛋白组分之间存在差异。注意 1、2 与 5、6 行出现的 HS2 结合蛋白条带相似而与 3、4 行出现的 HS2 结合蛋白条带存在差异。1, 2 行: hemin 诱导 K562 细胞核抽提物; 3, 4 行: 未经诱导 K562 细胞核抽提物; 5, 6 行: 正常人胚肝中、晚幼红细胞核抽提物 M. 标准分子量蛋白 $1 \times 20 \mu\text{g}$ 蛋白质



图 2 不同来源和不同浓度的红系细胞核蛋白质与 HS2 序列结合所形成不同复合物的电泳迁移率改变图谱。核蛋白质分别来自未诱导的 K562 细胞(1, 2), hemin 诱导的 K562 细胞(3, 4, 5)和人胚肝中、晚幼红细胞(6, 7)。a, b, c 和 d 为 HS2-蛋白复合物, $1 \times$ 核蛋白质量 = $2 \mu\text{g}$

2. Hemin 诱导 K562 细胞分化前、后核蛋白质与 HS2 序列形成复合物的电泳迁移率改变分析

为了验证上述终末分化期或经 hemin 诱导分化后出现的 HS2 结合蛋白与未经诱导者是否不同,取不同来源的红系细胞核蛋白质分别与 HS2 DNA 进行电泳迁移率改变分析,结果如图 2 所示。可见人胚肝中、晚幼红系细胞核蛋白质与 HS2 序列结合后形成的复合物在电泳中除可见 2 条与 K562 细胞核蛋白质迁移率近似的条带(b, c)外,还出现带 a 和 1 条迁移率明显变慢的条带 d,而且其速率减慢的程度与蛋白质浓度成正相关(图 2 中的 6, 7)。在经 hemin 诱导后的 K562 细胞核蛋白质较高浓度组分中亦出现类似的迁移图谱(图 2 的 4, 5),而未经诱导的 K562 细胞核蛋白质组分中则缺少带 a,并显示迁移速率较快的条带 d(图 2 中 1, 2)。提示诱导分化后, K562 细胞出现新的 HS2 结合蛋白以参与条带 a 和条带 d 的形成。值得注意的是 a 条带在低浓度的 K562 诱导产物中不明显,可能是含量太低不足以形成滞留带(图 2 的 3),说明诱导产生的分化相关蛋白质的量甚微。由于这些 HS2 结合蛋白伴随分化过程产生,并存在于正常终末分化的中、晚幼红细胞中,因而可以认为,它们是与珠蛋白基因表达调控和红细胞分化相关的红细胞分化特异性蛋白质因子。

讨 论

细胞分化的机制及其调控是生物学界的重要研究课题。哺乳类红细胞的发生是多能干细胞或其祖细胞增殖和沿着一定方向进行分化的过程,伴随着红细胞的终末分化,细胞按其固有的基因表达程序,顺序地表达诸多可检测的细胞蛋白质产物并出现表型特征,红细胞如何按发育阶段启动不同珠蛋白基因表达和出现自然排核现象,一直吸引着人们用作研究细胞分化和基因表达调控的理想模型^[12]。红细胞终末分化开始于珠蛋白基因表达。位于 β 珠蛋白基因簇上游的增强子 HS2 序列是目前公认的调控珠蛋白基因表达的增强子序列,它与各类珠蛋白基因在红细胞中呈发育阶段性高水平表达有关^[7]。现已发现至少有两种反式调节因子 GATA1 和 NF-E2 通过与增强子(HS2)或启动子序列结合来参与珠蛋白基因的表达调控^[2],如果这两种蛋白质及其 HS2 结合序列出现缺失或发生突变则不但影响了珠蛋白基因的表达,同时也影响了红细胞的终末分化^[13,14],表明反式调节因子 GATA1 和 NF-E2 是偶联红细胞分化和珠蛋白基因表达调控的重要因素。目前的研究结果表明,实现珠蛋白基因在终末分化的红细胞中高水平表达还须依赖诸多其他未知蛋白质因子参与形成多元的 HS2 蛋白质复合物^[2,3],由它们介导使相距较远的增强子和启动子序列在空间形成紧密的联系以形成活性转录起始复合物。因此,阐明红细胞终末分化和珠蛋白基因表达调控的机理还须对这类蛋白质进行深入的研究。

本实验选用 HS2 序列中 732bp 的功能区作为靶区域,以诱导 K562 细胞分化作为红细胞分化的模型,并对照正在进行终末分化的人胚肝中、晚幼红细胞,比较分化和未分化的红细胞核中 HS2 结合蛋白之间的差异。从 Southwestern 印迹图谱的结果可以看出,经 hemin 诱导后, K562 细胞中出现分子量为 50 kD, 45 kD, 18 kD, 15 kD, 14 kD 和 12 kD 的新的 HS2 结合蛋白,它们与终末分化期人胚肝红细胞核蛋白质中存在的 HS2 结合蛋白(50 kD, 45 kD, 15 kD, 14 kD 和 12 kD)可互为匹比。这些仅在终末分化期出现的 HS2 结合蛋白很可能就是调控珠蛋白基因表达并与红细胞终末分化相关的蛋白质因子。电泳迁移率改变图谱显示 hemin 诱导的 K562 细胞核蛋白质-HS2 复合物的迁移率与人胚肝中、晚幼红细胞核蛋白质-HS2 复合物的迁移率相似,但与诱导前核蛋白质-HS2 复合物的不同,进一步说明 K562 细胞诱导后表达

一些新的与存在于正常分化期红细胞中相似的 HS2 结合蛋白, 由于这些新产生复合物的迁移速率随蛋白质浓度的增加而变慢, 提示随蛋白质浓度增高, 不断有蛋白质因子直接或间接(由其他蛋白质介导)与 HS2 结合形成 HS2-蛋白质复合物。因此, 参与红细胞分化和珠蛋白基因表达的反式调节因子, 可能包括这些分化相关基因表达的 HS2 直接或间接结合蛋白, 通过这些蛋白质可使增强子和启动子产生联系并构成活性转录起始复合物, 使珠蛋白在终末分化的红细胞中高水平表达。对这类蛋白的检测和 cDNA 克隆的研究将另文报道。

收稿 1994-05 修回 1994-06

参 考 文 献

- [1] Chiba T, Ikawa Y, Todokoro K. GATA1 transactivates erythropoietin receptor gene and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA1 gene expression. *Nucleic Acids Res*, 1991,19(14): 3843
- [2] Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, 1992,80(3): 575
- [3] Ellis J, Talbot D, Dillon N, et al. Synthetic human β -globin 5' HS2 constructs function as locus control region only in multi-copy transgene concatamers. *EMBO J*, 1993,12(1): 127
- [4] Mei P, Kan YW. Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990,87: 9 000
- [5] Ney PA, Sorrentino P, McDonagh KT, et al. Tandem AP-1 binding sites within the human β -globin dominant control region function as an inducible enhancer in erythroid cells. *Gene Dev*, 1990,4: 993
- [6] Talbot D, Grosfeld F. The 5' HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J*, 1991,10(6): 1 391
- [7] Curtin DT, Liu DP, Chang JC, et al. Human β -globin gene expression in transgenic mice is enhanced by a distant DNaseI hypersensitive site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989,86: 7082
- [8] 张庆一, 薛社普. 一种分离 Wistar 大鼠中、晚幼有核红细胞的有效方法. *解剖学报*, 1988,19(4): 416
- [9] 王 智. Southwestern 印迹图谱分析. *基础医学与临床*, 1990,10(1): 245
- [10] Law ML, Gao JZ, Puck TT. A nuclear protein associated with human cancer cells binds preferentially to a human repetitive DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989,86: 8472
- [11] Gumucio DL, Rood KL, Gray TA, et al. Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter: Alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol*, 1988,8(12): 5310
- [12] 薛社普. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓瘤细胞恶性调控的研究. *解剖学报*, 1991,22(3): 225
- [13] Peters LL, Andrews NC, Eicher EM, et al. Mouse microcytic anemia caused by a defect in the gene encoding the globin enhancer-binding protein NF-E2. *Nature*, 1993,362(22): 768
- [14] Penry L, Simon MC, Klein WH, et al. Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA1. *Nature*, 1991,349(17): 257

APPEARANCE OF SOME NOVEL PROTEINS BINDING ENHANCER ELEMENT OF GLOBIN GENE (HS2) DURING ERYTHROID TERMINAL DIFFERENTIATION

Wang Xin, Liu Pixu, Zhang Jingbo, Xue Shepu

(Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Using digoxigenin labeled HS2 as a probe, we have performed Southwestern blot and gel retardation analysis for determination of HS2 binding proteins in the nuclear extracts which isolated from the intermediate and late erythroblasts of human fetal liver, and from the human erythroleukemia (K562) cells before and after hemin induction. The results indicated that HS2-binding proteins with molecular weights of 12, 14, 18, 45, and 50 kD were detectable in the induced differentiating cell nuclear extract. These proteins were also appeared in intermediate and late erythroblasts at terminal differentiation stage, but were not observed in uninduced nuclear

extract. Gel retardation analysis demonstrated that the pattern of bands generated by induced and uninduced nuclear extract was distinctively different from each other, but was identical to those from the intermediate and late erythroblasts of human fetal liver. These results indicated that some nuclear proteins which were only expressed during terminal differentiation of erythroid cells might interact with HS2 sequence directly or indirectly to form the HS2-protein multimeric complexes and thus play an important role in the globin gene regulation and erythroid differentiation.

KEY WORDS Erythroid differentiation; Globin gene regulation; DNase I hypersensitive site 2 (HS2); Erythroblast of human fetal liver; Human erythroleukemia cell (K562)

• 研究通讯 •

脑损伤和胚胎脑细胞移植后生长相关蛋白(GAP-43)阳性细胞的改变

(第三军医大学组织学胚胎学教研室, 重庆 630038 王传松 蔡文琴)

用 40 只正常成年 *Wistar* 大鼠, (1)10 只做正常对照; (2)5 只用去掉尖部的腰椎穿刺针损伤左侧纹状皮质及海马, 另 5 只用同样方法损伤小脑蚓部; (3)5 只损伤左侧纹状皮质和海马, 伤后立即移植装有 16 d 胚鼠大脑细胞悬液的微孔滤膜圆筒(微孔直径 $0.8 \mu\text{m}$, 筒高 5 mm, 直径 2 mm); 5 只损伤小脑的鼠用同样方法移植 16 d 胚鼠的小脑细胞悬液。微孔滤膜可把胚胎脑细胞与宿主脑组织分隔, 但不影响营养成分及大分子物质的通过。(4)5 只损伤纹状皮质、海马和 5 只损伤小脑蚓部的大鼠, 伤后只移植微孔滤膜做对照。所有大鼠于术后 2 个月取脑, 用 Boehringer 公司的 GAP-43 生长相关蛋白(growth associated protein)抗体和 Vector 公司的 ABC 试剂盒做免疫组织化学染色。

正常大鼠纹状皮质、海马和小脑蚓部有 GAP-43 阳性神经元, 但未见阳性胶质细胞。单纯损伤和伤后只移植微孔滤膜的大鼠, 损伤灶边缘出现阳性胶质细胞。损伤纹状皮质、海马后移植和不移植胚胎大脑细胞悬液 GAP-43 免疫染色无明显改变。损伤小脑蚓部后移植胚胎小脑细胞悬液的动物, 损伤灶边缘阳性胶质细胞层增厚, 周围的阳性浦肯野细胞增多。本文的结果显示, GAP-43 阳性胶质细胞的出现与脑损伤密切相关。移植的胚胎小脑细胞与宿主脑细胞被微孔滤膜分隔, 使宿主阳性胶质细胞和浦肯野细胞增多, 可能是移植的小脑细胞释放某些物质透过微孔滤膜的孔而起作用的。

收稿 1994-04