

哺乳类红细胞分化去核因子对细胞 分化及骨髓瘤细胞恶性调控的研究 (综述)

薛社普

中国医学科学院基础医学研究所

摘 要 哺乳类红细胞在发生上与具有细胞核的低等脊椎动物红细胞的_{最大}差异是在造血的终末分化阶段出现核固缩和自然排核现象。癌变时,上述终末分化特征被抑制,细胞分裂失控而恶变为肿瘤。这是涉及细胞分化和癌变机制二大领域和与进化、遗传与发育密切相关的重大生物医学问题。本研究选择了具有这些独特特性的哺乳类红细胞作为研究细胞分化和癌变调控的对象。通过对排核前后的细胞形态变化和与之互为对应的物质代谢改变的分析。提出了哺乳类红细胞在种系发生的进化过程中出现红细胞分化去核因子(EDDF)的工作假说。用自建的红细胞胞质体与肿瘤细胞的杂交模型,对红系的红白血病及非红系的骨髓瘤细胞进行了同种和异种细胞杂交之后均出现了预期的恶性逆转和细胞分化特征,验证了哺乳类红细胞胞质中存在EDDF的假想。从家兔网织红细胞和小鼠终末分化期的成红细胞中分别分离到电泳纯、分子量为15KD及8KD,N端8及15个氨基酸序列互为一_致,并无同源的EDDF活性蛋白,对体外培养的L929及MEL细胞作用效应与上述胞质体杂交细胞分化特征类似。并已从人胚肝及小鼠分化期红细胞的提纯物质中进行基因克隆和序列分析,得到代表终末分化不同阶段的EDDF分化相关基因家族的四个全长序列克隆。进一步的工作正在进行之中。此项工程将有可能为红细胞造血及其相关肿瘤调控研究提供前景。

肿瘤发生是一个多因素、多阶段(诱癌和促癌)和多种基因(原癌基因、癌基因、抗癌基因及分化基因等)作用的过程。正常细胞可在致癌物、病毒和辐射等因素作用下,引起内在遗传物质结构或基因表达程式/功能上的改变,而发生细胞转化和癌变。因此肿瘤实质上是一种细胞增殖失控和分化异常(终末分化受抑)的疾病。大量涉及癌变的肿瘤细胞生物学资料表明,肿瘤细胞或表现为特定染色体的丢失^[1],特异部位的易位、重排、缺失和位点断裂等遗传物质的明显缺陷^[3-4],或表现为基因功能失常^[5,6],异常地表达非本身组织特异的癌胚抗原、胚胎性同工酶和异位激素等产物。无论是遗传物质缺失或基因表达异常,均可通过细胞工程技术、基因补偿或用多种诱导剂进行基因表达调控和促进终末分化等方法,以降减恶性增生、逆转恶性表型和使之进行正常分化(表达正常分化产物)。大部分造血系肿瘤细胞,如小鼠Friend红白血病细胞(MEL)、人红白血病K562细胞、人早幼粒白血病HL-60细胞及单核白血病U937细胞等,已证明可通过诱导剂促进其终末分化产物表达^[6,7]。小鼠畸胎瘤细胞在移植至胚胎系统的胚泡腔后,可被诱导恢复正常分化而衍生为正常组织,表明已失活的分化基因可通过诱导调节而恢复其活性,逆转其恶性表型^[8]。这方面已形成从基因水平进行肿

瘤恶性逆转调控的一个方兴未艾的研究领域。目前许多探索真核细胞分化、去分化、再分化的基因表达调控的细胞工程工作,运用细胞融合、胞质体杂交、DNA 重组及基因转移等技术,进行肿瘤细胞恶性调控的研究正在国际范围内展开。资料表明,利用诱导分化物质或细胞工程技术,可纠正遗传物质缺陷及基因表达异常状态,使失控的癌细胞增殖和基因异常活动向正常方向转化,这就为肿瘤防治提供了新的前景。近年来,我们实验室选择终末分化期出现自然去核独特特征的哺乳类红细胞,作为研究细胞分化及恶性调控的对象,用自建细胞杂交系统对造血系统肿瘤细胞进行恶性调控的研究(国家“七·五”及“八·五”重点科技攻关项目),本文介绍承担该课题的研究思路及进展情况。

一、哺乳类红细胞发育过程中自然排核的物质基础及排核机理的工作假说

红细胞在种系发生中有一个特点,即进化至哺乳类之后,在其发生的晚幼成红细胞期丧失细胞核分裂活动,继而核固缩和出现自然排核,形成网织红细胞进入血流成为成熟的红细胞。当癌变时(如小鼠红白血病 MEL 及人类红白血病 K562 等),这一终末分化过程特征(包括珠蛋白基因表达血红蛋白)受抑,细胞核增殖活动失控而演变为癌细胞,其机理未明。但这些特点涉及细胞分化和癌变机理二大领域,正是研究它们的规律及其机理的理想模型,具有重要理论和实践意义。有趣的是红细胞终末分化期排核过程只发生于哺乳类,在其以下的脊椎动物红细胞并无此现象。什么是自动排核的物质基础?进化上是否有某种遗传物质发生了改变,或在种系发生过程中出现排核的调控因子导致从非排核物种演变至哺乳类的红细胞排核?文献上已有报道在红系造血过程中出现与造血有关的因子如 EPO, SCF, CSF-E, BPF, IL-3, 6, 9 以及激活素 A/EDF 等,大多主要作用于造血干细胞、原红及早幼成红细胞阶段(已知早幼成红细胞是依赖 Epo 的最后阶段),而自该阶段以后的终末分化、排核和成熟由何种因子调控,尚无确切报道。为了阐明排核前后的细胞形态分化变化及其物质基础,我们进行了下列的实验观察:

1. **扫描及透射电镜观察**^[9] 以盐酸苯胍诱发小鼠(BALB/C)贫血,取股骨骨髓按常规制备电镜标本,分别进行扫描电镜(日立 S-450)及透射电镜(JEM-2600EX)下的观察。晚幼成红细胞出现核偏位或细胞核突向一方,线粒体等细胞器聚集于偏位核后方。核排出时并不完全裸露,排核后的胞质体(网织红细胞)迅速由不规则状变为圆盘状。

2. **红系祖细胞体外培养排核的观察**^[10] 取 BALB/C 小鼠股骨髓制备祖细胞悬液,分别以 IMDM-甲基纤维素进行 CFU-E 及 BFU-E 体系的培养。倒置相差显微镜下活细胞追踪观察和染色后观察。在培养 36~48h 左右可见明显的联苯胺阳性细胞集落;培养 48~60h 可见集落细胞中出现不少排核图像和散在的细胞核残物,提示排核是红细胞终末分化的一种自主活动。

3. **排核前后红细胞内核酸、酶、细胞骨架和血红蛋白以外的活性蛋白质动态变化的分析**
分别采用细胞组化、免疫荧光组化、电泳及分离提纯等方法对上述物质的动态变化进行了比较观察。发现排核期间上述物质均出现一系列与形态改变互为相应的可测变化(图 1):核酸(DNA、RNA)、LDH 同工酶^[12]、波形纤维蛋白(vimentin)等在排核前急剧降减;相反酸性磷酸酶、血红蛋白、膜收缩蛋白(spectrin) α 及 β 亚基、微管蛋白、微丝蛋白以及血红蛋白除去后的胞质活性蛋白等则迅速上升达高峰^[12,31,33]。这些变化均以晚幼红细胞期为转折点,而且似与细胞核的存活状态及排核过程密切相关,提示哺乳类红细胞在终末分化期出现去核物

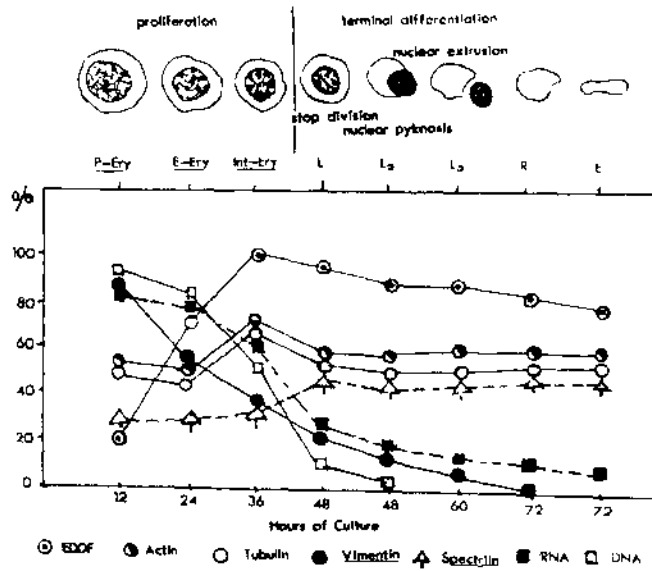


图1 红细胞发生过程中核酸(DNA、RNA)以及一些特异蛋白质(骨架蛋白、波形纤维蛋白、红细胞分化去核蛋白(EDDF)在定量上的改变与细胞增殖、分化及自然排核的关系示意图。

E. 成熟红血球, E-ery. 早幼成红细胞, Int-ery. 中幼成红细胞, L₁, L₂, L₃, 晚幼成红细胞分期, 分别示停止分裂、核固缩和排核阶段; P-ery 原红细胞, R. 网织红细胞

质, 并可能导致排核期间物质代谢上的剧烈改变。以 FVA 感染的小鼠离体培养 12~72 小时的脾红细胞为材料, 提纯活性蛋白质, 对 MEL 红白血病细胞生长抑制率进行生物学活性的动态分析, 发现该活性蛋白在早幼成红细胞期已经出现, 在中幼成红细胞期含量达高峰(图 3-3), 与排核及细胞骨架蛋白等物质代谢呈正相关^[31,33]。用间接免疫荧光法处理上述各期脾红细胞的微管、微丝、波形纤维蛋白等骨架系统在激光共聚焦显微镜下观察, 可见作为锚定细胞核位置的波形纤维蛋白(图 2)在晚幼成红细胞早期突然下降和降解(图 3-1), 导致细胞核偏位(图 3); 微管和微丝蛋白及其纤维则随细胞核外突排出过程而密集在缢痕区(图 3), 这为排核的二个阶段细胞骨架系的作用规律提供了证据。

基于哺乳类红细胞终末分化期细胞核停止分裂、呈现核固缩、自然排核和表达珠蛋白基因产物等特征, 以及根据我们上述实验所积累的资料, 尤其在排核前可观察到的特异活性蛋白质高峰和骨架蛋白等相关物质代谢的急剧变化, 我们提出了哺乳类红细胞在种系发生过程中可能出现“去(排)核调节因子(erythroid denucleation regulatory factor, EDRF)”, 或称“红细胞分化一去核因子(erythroid differentiation-denucleation factor, EDDF)”的工作假说。设想这一因子是导致自然去核和始动细胞由增殖期转向终末分化期的调节物质。为验证进化上在种系发生过程中是否出现 EDDF 物质, 我们采用了显示核骨架-核纤层-中间(波形)纤维的技术, 比较了小鼠(哺乳类)和鸡(鸟类)的细胞骨架系在进化上从非排核至排核之间的差异。图 4b 可见小鼠晚幼成红细胞排核前出现中间纤维主要成分波形纤维蛋白(vimentin) 降解、稀疏、断裂, 核纤层稀薄图像, 与鸟类相应结构之浓厚发达呈明显对比^[31]。这些差异为从进化上的非去核鸟类演变至去核的哺乳类红细胞初步提供了可能的证据, 间接表明在种系发生过程中产生去核物质 EDDF 是符合逻辑的设想。本研究的核心问题是验证这一因子是否

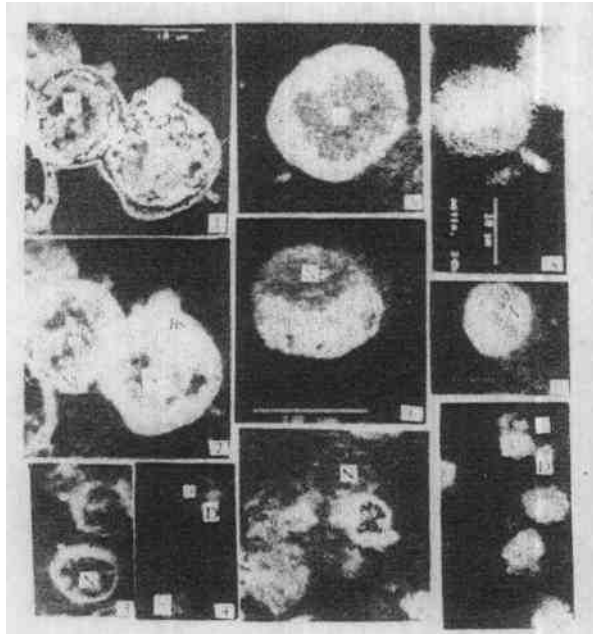


图2 激光共聚焦显微镜下小鼠脾红细胞培养不同时期(12、24、36、48小时)后三种骨架蛋白的免疫荧光分布动态变化图

1、2 培养12~24小时后的成红细胞示波形蛋白呈强荧光的核周层(PNL)和伸入核膜下与核纤层(NL)相连的结合位点(BS); 3 示核偏位(培养36小时)波形蛋白消减明显; 4 排核期(培养48小时)荧光消失; 5 示微管蛋白核周强荧光层(培养12小时); 6 核偏位(36小时), 微管荧光增强; 7 排核期(48小时), 微管蛋白集中在初网织红细胞区; 8 示微丝蛋白呈弥散状及块状束(24小时); 9 核偏位(36小时)及10 排核期(48小时), 微丝荧光增强和集中在初网织红细胞区。N, 细胞核; D, 去核中细胞; R, 初网织红细胞。

存在, 并拟利用这一因子来抑制肿瘤细胞核的恶性分裂活动, 调节分化基因表达, 促进细胞终末分化, 为防治肿瘤提供理论依据。

二、红细胞胞质体杂交模型的建立和对红白血病及非红系骨髓瘤细胞的诱导作用

为了验证上述假说, 我们选用自然去核而富含珠蛋白 mRNA 和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶(HGPRT)阳性的正常小鼠或兔的网织红细胞, 与小鼠和人类红白血病细胞(MEL 及 K562)和非红系的恶性骨髓瘤细胞进行杂交, 创建了同种和异种细胞胞质体杂交模型。选用网织红细胞作为“胞质体”, 除了因为它在自然去核后的胞质体中含有丰富的基因产物(珠蛋白基因 mRNA)可作为遗传标志外, 还因它本身是为 HGPRT 强阳性, 便于在与缺失此酶的骨髓瘤细胞融合后用 HAT 选择液来纯化杂种细胞。创建这种胞质体杂种细胞模型的主要目的, 是验证哺乳类红细胞胞质中是否存在对肿瘤细胞核活动起限制作用、抑制肿瘤细胞恶性分裂和重排基因表达活动的因子, 并企图利用这一因子诱导细胞终末分化。表 1 为我们近年来建立的同种(小鼠—小鼠)和异种(小鼠—兔, 小鼠—人)的胞质体杂种细胞(cybrid cells)和用大鼠有核红细胞与小鼠浆细胞瘤杂交建成的杂交细胞(hybrid cells)及其表型特

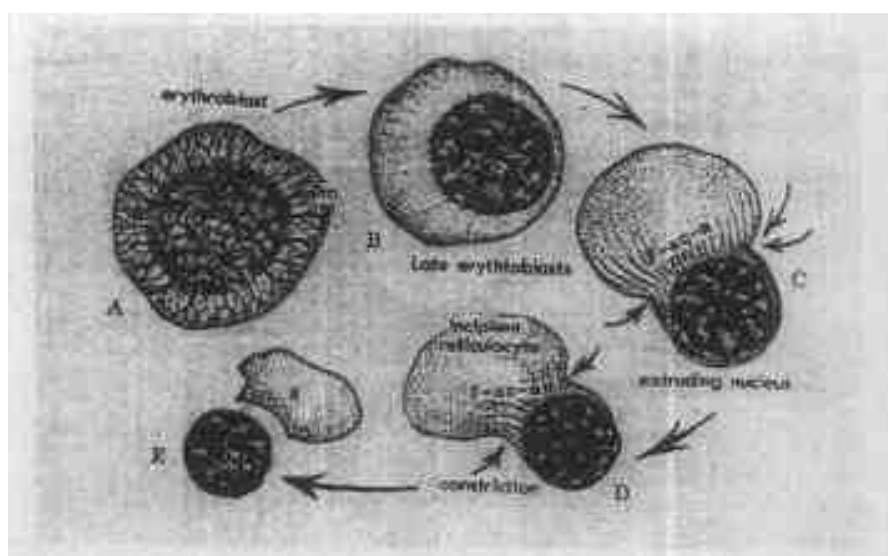


图3 哺乳类红细胞排核过程中细胞骨架系的作用规律示意图

A. 成红细胞 (erythroblast) 球形蛋白纤维与核纤层 (N.L.) 连结 (结合位点 BS) 后向外延伸与膜膜 (PM) 相连, 从而保持细胞膜位置稳定; B. 晚幼红细胞 (Late erythroblast) 球形蛋白纤维溶解, 导致核回缩和偏位的核膜初期期相; C. 排核一期期相, 示微丝 (F-actin)、微管 (m) 纤维组织围绕核外突出过程而密集在初期期相红细胞 (enucleating reticulocyte) 和收缩 (constrictum) 区; enucleating nucleus, 排核核; F-actin, 聚合微管束; R, 网织红细胞。

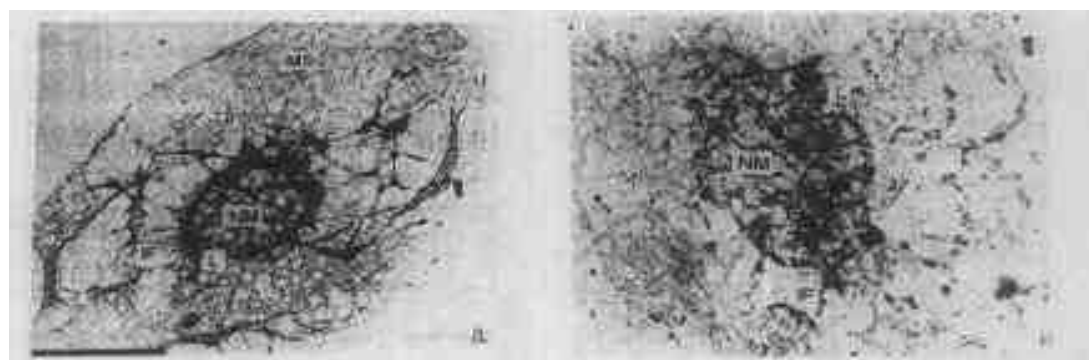


图40 成鸡晚幼成红细胞球形蛋白中间纤维-核纤层-核骨架体系整装电镜图。

中间纤维束由核纤层发出, 穿过核膜与膜膜相连。在核纤层膜层厚发达。

图45 14天小鼠巨肝晚幼成红细胞球形蛋白中间纤维-核纤层-核骨架体系整装电镜图。

示中间纤维束, 因染色较深, 核纤层稀疏。

IF 中间纤维束; L 核纤层; MS, 膜骨架; NM, 核纤层

征^[15-16]。表中1~8为非红系骨髓瘤, 9为红系肿瘤红白血病。

表1中1~3为小鼠网织红细胞(R)与小鼠骨髓瘤细胞(BW5147)骨髓瘤细胞(NS-1)及SP2/0浆细胞瘤)分别进行同种杂交所建成的3种胞质体杂种细胞(cybrid cells)。BW-R、

表 1 红系细胞×肿瘤细胞的同种和异种杂交细胞系的建立及其表型特征

红系细胞	恶性细胞系 (骨髓瘤)	胞质/杂交细胞 (cybrid/hybrid)	表型特征	作者 文献
1. 小鼠网织红细胞 (R)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤细胞 (BW)	BW-R	* 恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[13]
2. 小鼠网织红细胞 (R)	小鼠浆细胞瘤 NS-1 (NS)	NS-R	* 恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[13]
3. 小鼠网织红细胞 (R)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤 (SP)	SP-R	* 恶性逆转, 表达小鼠型血红蛋白	[15]
4. 小鼠网织红细胞 (R)	人 HL-60-AR 早幼粒白血病突变株细胞 (HL)	HL-R	* 恶性逆转, 表达人型及小鼠型血红蛋白	[14]
5. 小鼠网织红细胞 (R)	人 HMy-2 浆细胞瘤 (HMy)	HMy-R	* 恶性逆转, 表达人型及小鼠型血红蛋白	[32]
6. 兔网织红细胞 (RR)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤 (BW)	BW-RR	* 恶性逆转, 表达小鼠和兔型血红蛋白	[15]
7. 兔网织红细胞 (RR)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤 (SP)	SP-RR	* 恶性逆转, 表达小鼠和兔型血红蛋白	[15] [26]
8. 大鼠中、晚幼红细胞 (RNR)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤 (SP)	SP-RNR	* 恶性逆转, 表达大、小鼠型血红蛋白	[15]
9. neo 标记的兔网织红细胞 (RRneo)	人红白血病 K562 细胞 (K)	K-RRneo	* 恶性逆转, 波型蛋白基因表达受抑, 表达人型血红蛋白	[29] [30]
10. 非红系对照—小鼠 B 淋巴细胞	小鼠 SP2/0 或 NS-1, BW 等	淋巴杂交瘤	各型恶性淋巴瘤, 产生抗体	[13] [15] [16]

* 恶性逆转包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 掺入率下降, 在软琼脂中失去集落形成及在裸鼠体内丧失致瘤能力等, 部分标本测了癌基因探针的 Northern blot, 表明癌基因 C-myc 等被抑制。

NS-R 及 SP-R 均呈现恶性逆转的表型特征 (包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 并合率下降, 失去集落形成和在裸鼠体内的致瘤能力等) 和表达小鼠型的血红蛋白等分化特征。表 1 中 4, 5 为小鼠网织红细胞与人类早幼粒白血病突变株细胞 (HL-60-AR) 及人类浆细胞瘤细胞 (HMy-2) 分别进行异种杂交建成的 HL-R 及 HMy-R 胞质体杂种细胞系, 除呈现恶性表型逆转 (包括癌基因表达受抑) 外, 并表达了人型血红蛋白。表中 6, 7 为兔网织红细胞 (RR) 与小鼠 BW 及 SP2/0 二种骨髓瘤细胞分别异种杂交, 所建立的 BW-RR 及 SP-RR 两种胞质体杂种细胞。同样出现恶性表型逆转, 而且同时表达了小鼠和兔型血红蛋白。8 为用大鼠有核红细胞 (RNR) 与小鼠浆细胞瘤 (SP2/0) 杂交建成的 SP-RNR 杂交细胞 (hybrid cells), 在恶性逆转的同时, 表达了大、小鼠型血红蛋白。表中 9 为兔网织红细胞与人 K562 红白血病细胞异种杂交的胞质杂种细胞。呈现恶性表型逆转和表达人型血红蛋白。对照实验均以小鼠淋巴细胞与上述部分相应肿瘤细胞进行同条件下融合作为比较, 它们均形成众所周知的淋巴杂交瘤细胞, 并未逆转肿瘤恶性。

表中 4, 在杂交前先用 MNNG-8Ag 处理, 将人早幼粒白血病细胞 (HL-60) 变成缺失 HG-PRT 的突变株 (HL-60-AR), 然后与网织红细胞杂交; 另将此突变株异种移植至裸鼠皮下, 建成了在体内传代的裸鼠人白血病细胞系 (HL-60-AR/NU)。实验证明, 这二种突变细胞在诱导分化药物维甲酸 (RA) 和二甲基亚砷 (DMSO) 等作用下, 与胞质体杂交的结果一致, 可

以向正常方向分化。细胞形态、功能、膜受体、酶活性、增殖能力、致癌性以及 7 种癌基因表达 (C-myc, H-ras, fos, sis, abl, erb-B 及 V-Ki-ras) 等均发生了改变、分化性状具有遗传稳定性^[17]。

三、红细胞胞质“分化去核因子”对红白血病及骨髓瘤细胞恶性表型和基因表达的调控作用

对上述 9 种同种和异种胞质体杂种细胞, 进行多项有关生长和基因表达指标的观察, 证明它们均规律地呈现恶性生长明显降低, 丧失致癌性并表达红系细胞终末分化产物等特征^[13~16, 26, 29, 30, 32]。

1. 细胞形态改变 (表面膜突起及微绒毛减少, 核糖体、含铁蛋白团粒及异染色质比例增多) 及组化染色反应明显改变 (联苯胺阳性、cAMP 增高、磷酸二酯酶活性下降等)。

2. 分裂指数、³H-TdR 参入率及生长曲线 (增殖率) 明显下降。

3. 在软琼脂培养中失去形成集落能力。

4. 刀豆球蛋白 (Con A) 凝集反应阴性。

5. 抗原性改变: Thy-1 抗体的细胞毒试验及荧光抗体染色反应由亲本的阴性反应转变为中等阳性。

6. 异种移植至先天免疫缺陷的无胸腺裸鼠体内, 失去致瘤性。

7. 染色体数量在传代过程中呈现动态变化, 众数值下降, 呈现异源胞质体对宿主核物质及染色体构建具有明显作用的细胞遗传改变^[28]。

8. 用癌基因探针 (C-myc、H-ras 等) 进行 Northern 印迹分子杂交, 证明在各型杂交细胞中均未见相应癌基因转录条带, 表明转录活动受到明显抑制。

9. 传代过程中, 持续出现红细胞正常分化的珠蛋白基因产物血红蛋白的联苯胺阳性染色反应 (BW-R 直至第 42 代仍有生化可测含量 $1.56\mu\text{g}/10^6$ 细胞)。但一般上述杂交细胞只能 10 代以下。

10. 用小鼠和人的 β -珠蛋白基因探针, 进行对细胞全 RNA 的 Northern 印迹分子杂交, 证明在同种和异种杂交细胞中, 均有珠蛋白基因转录活动产物出现。即在原来为非红细胞类型的肿瘤细胞中, 表达与红细胞 9S-RNA 相对应条带, 证明红细胞胞质中存在反式调节因子 (trans-acting regulatory factor)。

11. 聚丙烯酰胺-尿素凝胶电泳图谱显示, 在传代的胞质体杂种细胞中, 可单独或同时出现同种和异种杂交动物种属的珠蛋白转译产物血红蛋白的条带。

12. 用测定同位素标记催化产物的方法, 在各型杂交细胞中均检测到 HGPRT 基因产物的持续表达^[26]。

上述同种和异种杂种细胞, 均如我们所预期的呈现了细胞分裂和生长受到限制、出现恶性逆转和正常分化等特征。表明网织红细胞胞质中, 存在着可传递的调节恶性分裂和促进细胞分化的红细胞分化去核因子 (EDDF), 验证了我们工作假说中的设想。值得注意的是, 血红蛋白原是红细胞的终末分化产物, 却在各型非红细胞类型的同种和异种骨髓瘤杂交细胞中出现, 表明宿主瘤细胞中原来不活动的珠蛋白基因, 在杂交后已为外源红细胞质中的 EDDF 因子组织特异地所激活。这种通过外来调节因子启动宿主珠蛋白基因表达的作用, 通称为反式调节效应 (transacting regulatory effect), 而细胞杂交则是目前用以鉴别反式调节因子的重要方法

之一。我们自 1984 年以来,连续报道小鼠和人类非红细胞类型骨髓瘤细胞与小鼠(或兔)网织红细胞杂交后,激活了宿主核中珠蛋白基因表达血红蛋白的实例^[13~16,29,30,32],确证哺乳类网织红细胞胞质中存在可传递的反式调节因子。在此之前,文献上有关杂交细胞中珠蛋白基因表达调控的报道零散而结果互不一致^[18,19,20]。1986 年,Baron^[18]报道,经 DMSO 诱导的小鼠红白血病细胞(MEL)或人类红白血病 K562 细胞,与人成纤维细胞或 HeLa 细胞杂交 24 小时后,在二核体的杂种细胞中,出现人型 α 及 β 珠蛋白基因产物血红蛋白,得出和我们上述不谋而合的结论,即红细胞胞质中存在反式调节因子。目前文献上所有的调控研究,均在二个有核细胞之间的杂交中进行,由于二核细胞之间融合带来的复杂性,所得结果不如我们直接用胞质体杂交法更有说服力。HGPRT 基因产物在胞质体杂种细胞中的表达也是如此,也和文献报道中的人成纤维细胞与 HGPRT 缺失的大鼠肝癌细胞杂交后,激活了大鼠型 HGPRT 基因表达^[27]的结果一致。这些结果表明,已分化和癌变的细胞,珠蛋白和 HGPRT 基因并不是不可逆地受抑(封闭)或丢失,在适当的相应因子作用下,仍可重新被激活。Westin 等^[22]指出,HL-60 细胞被诱导进行分化时,C-myc 癌基因的表达率下降 80%~90%,我们的胞质体杂交细胞中,C-myc 基因的表达活性也明显受抑,这为红细胞胞质因子(分化去核因子)调控肿瘤恶性提供了基因水平的证据。在我们的实验中,分化去核因子(EDDF)具有特异激活非红系细胞宿主核中珠蛋白基因表达和抑制(封闭)癌基因及起锚定细胞核位置作用的波形蛋白基因的活动,而呈一正一负互为因果的“偶联”关系,准确地模拟了哺乳类红细胞终末分化期的停止细胞分裂,转向细胞分化的自然现象,建立了细胞分化过程中一正一负的基因开关调节模型,有可能为国际上长期未解决的细胞分化机理的探索,提供了参考线索。

四、EDDF(红细胞分化—去核因子)的分离、提纯、活性分析及基因克隆

上述的细胞杂交实验进一步证明红细胞胞质中存在终末分化和去核的调节因子。在这一基础上我们进行了从红细胞中分离纯化活性因子,定性、定量和活性作用分析的工作,为下一步的基因克隆及基因工程奠定基础。首先制备兔网织红细胞裂解物上清液,用 Sephadex G-100 进行柱层分析后,按体积比例加到体外培养的转化小鼠成纤维细胞 L929 体系中。可见浓度达到占培养液终体积的 1.5%时,L929 细胞的分裂活动及集落形成能力即明显受抑,表明兔网织红细胞裂解上清中含有该活性物质^[22]。进一步从盐酸苯胍诱发贫血的新西兰兔网织红细胞中(表 2)提纯活性物质,发现微量浓度(0.1~0.09 μ g/ml)的提纯物即可达到完全抑制体外培养(L929 细胞及人鼻咽癌 KB 细胞株)的分裂及集落形成活动。提纯物在电泳上为单一条带,分子量约 15kD。理化性质分析表明为蛋白质(在蛋白酶 K 处理后失活,耐热力达 100 $^{\circ}$ C 10 分钟以上)^[23,24]。

表 2 红细胞分化(去核)调节因子的提纯及其生物学活性

提纯步骤	蛋白质含量	抑制浓度	纯化倍数	产率(%)
1. 兔网织红细胞裂解液	1000mg	3mg	1	100.00
2. 选择性变性	13mg	80~100 μ g	33	43.20
3. Sephadex G-100 洗脱液	53 μ g	0.5~1 μ g	4000	21.00
4. DEAE 纤维素洗脱液	5 μ g	0.1~0.2 μ g	20000	10.10
5. CM 纤维素柱洗脱液	3 μ g	0.05 μ g	31000	9.10

对体外培养细胞实验的活性分析表明：实验组（培养液中加入 0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 提纯物）的生长曲线、分裂指数、生长抑制率、 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率、群体倍增率及集落形成率等指标均明显低于对照组（表 3）^[25]。取得了与细胞杂交类似的抑制肿瘤或转化细胞恶性生长的效果。

表 3 红细胞分化（去核）调节因子对 L929 及 KB 细胞生长的生物学活性分析

组 别	生长抑制率 * (%)	群体倍增率 (%)	集落形成率 (%)	$^3\text{H-TdR}$ 掺入率 (CPM)
对照	0	8.67	13.125	1377.00 (1.5h) 47086.36 (4h)
L929 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	41.87 (1d) 64.42 (2d)	-0.15	0	589.00 (1.5h) 5360.00 (4h)
0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	74.00 (1d) 89.05 (2d)	-0.74	0	328.00 (1.5h) 4134.00 (4h)
对照	0	6.63	--	10631.00 (1 h) 13520.00 (2 h)
KB 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25.57 (1 d) 57.19 (5 d)	3.64	-	4080.00 (1 h) 6819.00 (2 h)
0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40.00 (1 d) 80.58 (5 d)	2.19	-	3546.00 (1 h) 3293.00 (2 h)

注：* . 生长抑制率>50%者有效

采用硫酸铵盐析的分离、等电聚焦，正相和反相高压液相色谱等纯化手段，取感染 FVA (Friend 贫血病毒) BALB/C 小鼠的脾红细胞经培养不同发育期 (12, 24, 36, 48, 60, 72 小时) 后，分别分离纯化取得 EDDF，比较各期 EDDF 对 MEL 红白血病细胞生长的抑制率^[34]。绘制分化各期细胞 EDDF 活性的动态曲线，证明该活性蛋白确有诱导 MEL 细胞分化的作用。经反复纯化后的 8KD EDDF，对 MEL 及 K562 细胞的有丝分裂抑制率更高。更有意义的是所有上述提纯的 EDDF 均能与 β -珠蛋白基因上游区的 HS₂ 增强子标记探针有特异结合活性。8KD EDDF 氨基酸序列分析，表明为碱性蛋白，N 端 15 个氨基酸的序列为^[34]：

N' Leu-Arg-Ile-Arg-Gln-Thr-Ile-Lys-Val-Trp-X-Asp-Gln-Lys-Gln
(X 为未确定的氨基酸)

查询蛋白质数据库，未发现同源序列。以上述氨基酸序列设计引物，用 PCR 法从人胚肝合成混合寡核苷酸，从 $\lambda\text{gt}11$ 人胚肝文库中筛选阳性片段，再扩增和亚克隆至 T 载体，经过数次文库的筛选克隆和 PCR 扩增，得到一个全长为 900b. p. 的 cDNA 序列。具有加尾信号和 225nts 的阅读框架，编码 73 氨基酸。查询 GenBank (编号为 Accession AA514190) 未见同源序列，只在终末分化期出现核浓缩的人红细胞和睾丸中特异表达。

以人胚肝终末分化期红细胞中 HS₂ (珠蛋白基因 5' 增强子) 结合蛋白为抗原免疫 BALB/C 小鼠，通过杂交瘤单克隆抗体技术，筛选抗红细胞分化相关单抗。采用表达文库的免疫筛选法，从 $\lambda\text{gt}11$ 人胚肝文库中筛选到二株部分序列的 cDNA，再以之为探针，进一步从人胚肝文库中筛选出二个全长序列的红细胞终末分化相关基因：EDRF1 (长 1.2kb, 阅读框编码 147 氨

氨酸)和EDRF2(长500bp.,阅读框编码107氨基酸,有一典型亮氨酸拉链结构域,为一反式调节因子)。二者的对应mRNA只在终末分化人红细胞中出现。在GenBank中的编号分别为AF040247和AF040248,均无同源序列的新基因。在GenBank的序列如下:

AF040247 (Wang, X., Shen, B, F, and Xue, S, P. 1997)

/product="erythroid differentiation-related factor 1"

/translation="DESYSEEEEEMPDSDENGSYSTSSDPSSDDSKA VAIKSVGELSVPE
KYKSIHQI

RPSCAFFVCHDTEERCRLVLSYVLEGLKF VDSSIRKEATFQQLDPSTPIPLKYEDD
LPE"

BASE COUNT 115a 69c 75g 80t

ORIGIN

1	gatgaaagt	atagtgaaga	ggagggaagax	atgcccgaca	gtgatgaaa	tggatectat
61	agcaaccaget	ctgateccate	agatgatagc	aaagcagtag	ctataatcaa	gtctgttggg
121	gaactatcag	taccagaaaa	atacaaatct	attcaccaaa	tcagaccag	ttgtgcattt
181	ccagtttgc	atgacacaga	agagcgctgt	agacttggtc	ttagctatgt	tctagagggt
241	ttaaaaattg	tcgatagcag	catcagaaaa	gaagcgacct	tcagcagct	ggaccaccagc
301	actccaatcc	cgtlaaata	tgaagatgat	cttcagag		

另一单抗免疫筛选从人骨髓文库中筛出#15 cDNA 片段,长2.0Kb,其对应单抗经共聚焦仪测定定位于终末分化期红细胞质中,其编码正在分析。

以上的研究主要是从红细胞中提取活性蛋白质,然后进行基因克隆的技术路线。另一实验组采用直接提取核酸进行克隆的不同技术路线,最近同样以FVA诱发的脾脏原红细胞为材料,采用减除杂交与PCR相结合的方法,克隆到一个小鼠中,晚幼红细胞终末分化相关的EDDF cDNA。首先建立培养0时和36小时二个不同发育阶段红细胞的cDNA文库(cDNA-0和NA-36),分别进行PCR扩增。将cDNA-0的扩增产物用Alu-1及Rsa-1酶切成小片段(100-200bp),以光敏生物素标记作为驱除组(driver cDNA)。与作为目的组的组(target)或tricer cDNA的cDNA-36进行减除杂交,使两组中相同的cDNA形成复合体(生物素一亲和素结合的复合体),经酚/氯仿抽提而被去除。如是反复4轮以上杂交后,得到差异表达的Sub-cDNA-36片段。予以富集和酶切后,亚克隆至pBluescript Sk载体中,经蓝斑筛选出阳性克隆,进一步通过差异筛选,从72个特异阳性克隆中选4个插入片段进行了测序,并以该cDNA片段为探针,对构建于λgt11重组噬菌体中的小鼠中、晚幼红细胞文库进行原位杂交筛选,经两轮杂交及PCR鉴定,获得一个阳性cDNA克隆。将其亚克隆至pBluescript-SK载体上测序,表明为小鼠终末分化相关基因的cDNA全序列,全长505个核苷酸,编码区309个核苷酸,编码102个氨基酸和一个终止密码。该cDNA的3'末端有一个146核苷酸的非编码区,其中包括第462位的加尾信号AATAAA和由26个腺苷酸组成的多聚A尾端。GenBank最新资料检索表明为未见报道的新基因,编号为AA114369。经Northern印迹分析表明,该cDNA仅在与造血相关组织如骨髓、脾脏中表达。

SEQUENCE REGION: 1~505

TRANSLATION REGION: 53~359

* * * DNA TRASLATION * * *

```

1   T   CAA ACC CCG AGG ATT GTG GAT GAG GCG GGC TCA GCA CCA TTA GAC   46

47  TTG AAG ATG GCC CCT TTT CAG AGC AAT AAG GAT CTG ATC TCC ACA GGG   94
   1           M   A   P   F   Q   S   N   K   D   L   I   S   T   G   14
95  ATA AAG GAG TTT AAT GTT CTG CTG GAT CAG CAG GTC TTT GAT GAT CCT   142
15  I   K   E   F   N   V   L   L   D   Q   Q   V   F   D   D   P   30
143 CTG ATC TCT GAA GAA CAC ATG GTG ATT GTG GTT CCT GAC TGG GTG AAC   190
31  L   I   S   E   E   D   M   V   I   V   V   P   D   W   V   N   46
191 TTG TAC ACC AAC TAT TAC AAG AAG CTC GTG CAT GGG GAG CAG CAG GAG   238
47  L   Y   T   N   Y   Y   K   K   L   V   H   G   E   Q   E   E   62
239 CAA GAC AGG GCC ATG ACA GAA TTC CAG CAA GAG CTG AGT ACT CTG GGC   286
63  Q   D   R   A   M   T   E   F   Q   Q   E   L   S   T   L   G   78
287 AGC CAG TTT CTA GCC AAA TAC AGG ACC TTT CTG AAG TCC AAA GAG CCC   334
79  S   Q   F   L   A   K   Y   R   T   F   L   K   S   K   E   P   94
335 CCA AGC AAT ACA CTG CCC TCC TCA TAA CTT AAA GGG TCT GGG CAT CAT   382
95  P   S   N   T   L   P   S   S   *   102
283 GTC TTA GAA CCC CAA ACA CTC GGC TCT GTG TTA TAT CTT CAG ACC GTT   430
431 CTC CCA AGA TGT TGC TGT ACT TTG ACA TGC CAA TAA AGA CCA AAT ACT   478

479 CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA   505

```

图5 MEDRF 核苷酸序列及氨基酸阅读框架
(章正琰等: 小鼠红细胞分化相关因子 cDNA 全序列的克隆和结构特征分析)
GenBank BankIt 180846, Accession Number AF060220 1998.

参 考 文 献

1. Levan A. Some current problems of cancer cytogenetics. *Hereditas*, 1967, 57 : 343.
2. Sandberg AA. In: Owens AH (ed). *Tumor Cell Heterogeneity Origins and Implications*. Vol. 4. New York. Academic Press, 1984, 367.
3. Klein G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature*, 1981, 294 : 313.
4. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, 1983, 221 : 227.
5. Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: The position in 1988. *Cancer Res*, 1988, 48 : 3302.
6. Sachs L. In: Wahren B, et al (eds). *Molecular Biology of Tumor Cells*. New York. Raven Press, 1983, 257.
7. Sager R. Genetic suppression of tumor formation: A new frontier in cancer research. *Cancer Res*, 1986, 46 : 1573.
8. Mintz B, Illmensee K. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73 : 549.
9. 刘友华, 等. 哺乳类红细胞成熟过程中自然排核现象的观察. *电子显微镜学报*, 1989, 8 : 14.
10. 张庆一, 等. 小鼠骨髓红系祖细胞体外培养细胞的形态学观察. *中国医学科学院学报*, 1989, 11 : 210.
11. 董茂庆, 等. 鸡和小鼠具核红细胞的中间纤维-核纤层-核骨架体系. *解剖学报*, 1990, 21 : 399.
12. 周国平. 胞质因子对人早幼粒白血病细胞恶性表型和基因表达的调控作用. 中国医学科学院基础医学研究所硕士研究生论文, 1987.