

小鼠红细胞分化相关因子 cDNA 片段的克隆与分析[△]

刘世广 章正琰 张世馥 马 静 唐 文

章静波 薛社普[#]

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

摘要 目的 克隆与小鼠红细胞终末分化相关因子的基因, 并对其表达特性进行分析。方法 用致贫血 Friend 病毒(FVA)诱导 BALB/c 小鼠脾脏产生大量 FVA 原红细胞, 后者经分离纯化并在促红细胞生成素作用下进行体外培养。采用减除杂交与 PCR 相结合的方法, 用未经培养的 FVA 诱导的原红细胞(0 h FVA 原红细胞)的 cDNA 对培养 36 h 的 FVA 诱导的成红细胞(36 h FVA 成红细胞)的 cDNA 进行多次减除杂交和 PCR 扩增, 构建上述 36 h cDNA 的质粒减除文库并进行差异筛选。对阳性克隆进行核苷酸序列测定及 Northern 印迹分析。结果 获得 1 个 472 bp 的 cDNA 片段, 其中含有 1 个 309 bp 的开放阅读框架, 编码 102 个氨基酸。经 GenBank 进行同源比较, 未发现同源序列, 已被 GenBank 接受, (编号 AA114369)。Northern 印迹分析表明, 该 cDNA 在培养 36 h 的 FVA 中、晚幼红细胞中呈差异表达, 其 mRNA 全长约为 500~600 bp 左右。将其暂命名为小鼠红细胞分化相关因子 (MEDRF) 基因。结论 MEDRF 基因在红细胞分化的中、晚幼阶段特异表达, 表明 MEDRF 是一个新的与红细胞终末分化相关的因子。

关键词 红系细胞 细胞分化 减除杂交 cDNA 克隆

中图分类号 R329. R⁺1 R331. 1⁺41

哺乳类红细胞的有序分化是多种因素协同作用的结果, 在红细胞的终末分化过程中存在明显的形态和生化方面的变化, 表现为珠蛋白基因表达血红蛋白, 细胞分裂停止, 细胞核固缩, 最后出现细胞去核, 形成网织红细胞。这些表型的变化反映了一系列内在基因的开启和关闭。确定并克隆这些分化相关基因, 对阐明红系细胞终末分化以及红系细胞恶变的机制具有重要意义。近年来本室针对哺乳类红细胞分化期核浓缩和排核等现象对红细胞的终末分化进行了大量的研究, 证明了在红系细胞包括网织红细胞中, 存在着可促进细胞分化的胞质因子^[1,2]。为克隆与红细胞分化相关的基因, 本研究以小鼠致贫血 Friend 病毒(anemia inducing Friend virus, FVA)诱导的脾红细胞为实验材料, 采用减除杂交与 PCR 相结合的方法, 对红细胞分化相关基因的 cDNA 进行克隆, 并对其结构和表达的阶段特异性进行了分析。

[△] 国家自然科学基金(39670364)资助项目; [#] 通讯作者

参 考 文 献

- 1 Guidetti B, Mercuri S, Vagnozzi R. Long term results of the surgical treatment of 129 intramedullary spinal cord gliomas. *J Neurosurg*, 1981, 54:323~330
- 2 Epstein FJ, Farmer JP, Freed D. Adult intramedullary spinal cord ependymomas; the result of surgery in 38 patients. *J Neurosurg*, 1993, 79:204~209
- 3 Samii M, Klekamp J. Surgical results of 100 intramedullary tumors in relation to accompanying syringomyelia. *Neurosurgery*, 1994, 35:865~873
- 4 Cristante L, Herrmann HD. Surgical management of intramedullary spinal cord tumors: function outcome and sources of morbidity. *Neurosurgery*, 1994, 35:69~76
- 5 徐启武, 鲍伟民, 毛仁玲. 显微手术治疗颈髓髓内肿瘤. *中华神经外科杂志*, 1996, 12:137~140
- 6 Anne G. Osborn. Tumors cysts and tumorlike lesions of the spine and spinal cord. In: Anne GO ed. *Diagnostic Neuroradiology*. St. Louis: Mosby, 1994, 909~918
- 7 Robert IG, David MY. Nongenerative diseases of the spine. In: Robert IG, David MY, eds. *Neuroradiology—The requisites*. St. Louis: Mosby, 1994, 485~491

Differential Diagnosis and Operative Timing of Intramedullary Spinal Cord Tumors

Wang Zhongcheng* Liu Ali

(Department of Neurosurgery, Institute of Neurosciences, CAMS and PUMC, Beijing 100050)

Objective To discuss the differential diagnosis of various kinds of intramedullary spinal cord tumors, and choose the right operative timing. **Methods** On grading the dysfunction of the movement, an analysis has been made statistically for 147 cases with 160 tumors resected by microneurosurgery and confirmed pathologically. Their neuroimage have been also compared. **Results** The clinical manifestations of main kinds of intramedullary spinal cord tumors are not significantly different, but there are certain characteristic features in their neuroimage. The tumors of grade 0 group (normal movement) are obviously smaller than those of other grades groups. The pre-and post-operative grades of motor disturbance show a better, positive linear correlation. **Conclusions** MRI, particularly its enhancement, can differentiate an ependymoma from astrocytoma and hemangioblastoma in most cases. A satisfactory result can be achieved to resect the tumor immediately by using the minimally invasive, microsurgical techniques.

Key words intramedullary spinal cord tumors; differential diagnosis; microsurgery

(1998-01-23 收稿)

* Corresponding author

1 材料和方法

质粒、菌株和病毒 pBluescript SK(+)质粒和 XL1-blue 菌株来源于 American Type Culture Collection。FVA 为美国 Vanderbilt 大学医学院医学系 Koury MJ 教授惠赠。BALB/c 小鼠由中国医学科学院实验动物研究所提供。

试剂 T4 DNA 连接酶和促红细胞生成素(EPO)为 Boehringer Mannheim 公司产品。IMDM 培养基、胎牛血清、链亲合素(streptavidin)、cDNA 合成试剂盒为 Gibco BRL 公司产品。mRNA 纯化试剂盒为 Pharmacia 公司产品。Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。光敏生物素、牛血清白蛋白(BSA)为 Sigma 公司产品。 α -[32 P]-dCTP 为北京亚辉公司产品。其它试剂均为北京或上海化学试剂厂生产的分析纯试剂。

脾脏原红细胞的分离和培养^[3] 8~12 周的雌性 BALB/c 小鼠 10 只,经尾静脉注射 1:50 稀释的 FVA 传代血清(0.2 ml/只)。注射后 13~15 d 放血处死小鼠。取出较正常增大 10 倍的脾脏,制成单细胞悬液;采用 1%~2% BSA 连续梯度分离原红细胞,然后加入 EPO 至 0.2 U/ml,在 5% CO₂、37℃ 中培养 36 h。

减除杂交 分别提取分离后未经培养的 FVA 原红细胞(0 h FVA 细胞)及培养 36 h 的 FVA 中、晚幼红细胞(36 h FVA 细胞)的 mRNA,以 oligo(dT)为引物,合成双链 cDNA。以超量的酶解和光敏生物素标记的 0 h cDNA(cDNA-0)片段对 36 h cDNA 进行多次减除杂交和 PCR 扩增,得到富含 36 h FVA 细胞所特有的 cDNA(sub cDNA-36)后,将其亚克隆至 pBluescript SK(+)载体中,构建成质粒减除文库(subtractive cDNA 文库)。

差异杂交筛选^[4] 随机挑取 800 个含有插入片段的克隆,一式两份转移到硝酸纤维素膜上进行培养,经原位裂解,分别用 32 P 标记的 cDNA-0 和 sub cDNA-36 为探针对减除文库进行差异杂交筛选;与 sub cDNA-36 探针杂交呈阳性、而与 cDNA-0 探针杂交呈阴性的克隆为阳性克隆,取部分阳性克隆进行 DNA 序列分析。

DNA 序列测定 采用美国 ABI 的 373A DNA 序列测定自动分析仪,用 Taq DNA 聚合酶荧光标记引物循环测序法进行测序反应。

Northern 印迹分析 为证实 MEDRF 在红系细胞分化过程中的差异表达,分别提取 0 h FVA 细胞及 36 h FVA 细胞总 RNA,经甲醛变性凝胶电泳及转膜,用 32 P 标记的 MEDRF 的 cDNA 探针进行杂交,然后进行放射自显影观察。

2 结果

减除杂交及减除文库构建结果 以 cDNA-0 作为驱除组(driver),cDNA-36 作为目的组(target),进行减除杂交,经过反复四轮杂交和两次 PCR 扩增,使 36 h FVA 细胞特有的 cDNA(sub cDNA-36)得以富集,并克隆至 pBluescript SK(+)载体的相应位点中,构建成 1 个含有 36 h FVA 细胞特异 cDNA 的质粒减除文库。该文库约含有 3 000 个带插入片段的克隆。

与红细胞终末分化相关因子基因的差异筛选结果 经过差异筛选,获得了 72 个阳性克隆。sub cDNA-36 h 中的阳性克隆数明显多于 cDNA-0 h(图 1)。

差异筛选阳性克隆的核苷酸序列分析 随机对 4 个阳性克隆进行核苷酸序列测定,其中

clone 3~40 阳性克隆的序列见图 2, 该序列全长共 472 bp。测序结果经 GenBank 进行同源性比较, 未发现与其同源的核苷酸序列和氨基酸序列, 已被 GenBank 接受(接受号 AA114369)。对其序列进行分析发现, 从第 51~359 位有 1 个 309 bp 的开放阅读框架, 第 357 位有一终止密码 TAA, 编码 102 个氨基酸, 经计算表明, 其编码蛋白质的相对分子质量约为 11 800, 第 460 位有一加尾信号 AATAAA。将其暂命名为小鼠红细胞分化相关因子(murine erythroid differentiation related factor, MEDRF)。

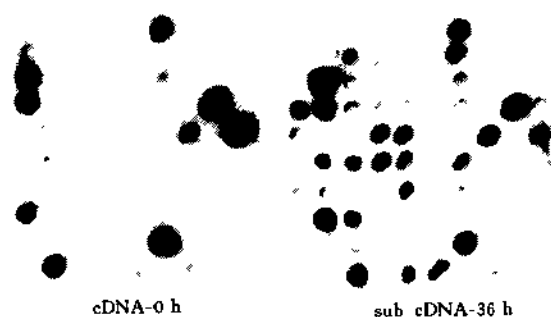


图 1 用 ^{32}P 标记的 cDNA-0 和 sub cDNA-36 作探针针对减除文库进行差异筛选

Fig 1 Differential screening of the ^{32}P -labeled cDNA-0 and sub cDNA-36 probes to subtractive library

1	AA ACC CCG AGG ATT GTG GAT GAG GCG GGC TCA GCA CCA TTA GAC TTG	47
48	AAG ATG GCC OCT TTT CAG AGC AAT AAG GAT CCG ATC TCC ACA GGG ATA	95
1	M A P F Q S N K D P I S T G I	15
96	AAG GAG TTT AAT GTT CTG CTG GAT CAG CAG GTC TTT GAT GAT CCT CTG	143
16	K E F N V L L D Q Q V F D D P L	31
144	ATC TCT GAA GAA GAC ATG GTG ATT GTG GTT CAT GAC TGG GTG AAC TTG	191
32	I S E E D M V I V V H D W V N L	47
192	TAC ACC AAC TAT TAC AAG AAG CTC GTG CAT GGG GAG CAG GAG GAG CAA	239
48	Y T N Y Y K K L V H G E Q E E Q	63
240	GAC AGG GCC ATG ACA GAA CTC CAG CAA GAG CTG AGT ACT CTG GGC AGC	287
64	D R A M T E L Q Q E L S T L G S	79
288	CAG TTT CTA GCC AAA TGC AGG ACC TTT CTG AAG TCC AAA GAG CCC CCA	335
80	Q F L A K C R T F L K S K E P P	95
336	AGC AAT ACA CTG CCC TCC TCA TAA CTT AAA GGG TCT GGG TAT CAT GTC	383
96	S N T L P S S *	102
384	TTA GAA CCC CAA ACA CTC GGC TCT GTG TTA TAT CTT CAG ACC GTT CTC	431
432	CCA AGA TGT TGC TGT ACT TTG ACT TGC CAA TAA AGA CCA AA	472

图 2 MEDRF cDNA 的核苷酸序列及其阅读框架

Fig 2 Nucleotide sequence and its reading frame of MEDRF cDNA

MEDRF 的 Northern 印迹分析 结果显示, MEDRF mRNA 在 0 h FVA 细胞(原红细胞)中不表达(图 3A)。经培养 36 h, FVA 细胞分化至中、晚幼阶段时, 即 36 h FVA 细胞, 该基

因则明显表达(图 3B)。根据 28 S、18 S 和 5 S rRNA 的位置估计,该基因 mRNA 的全长约为 500~600 bp(图 3)。

图 3 Northern 印迹分析 MEDRF mRNA 在
0 h FVA 细胞和 36 h FVA 细胞中的表达

Fig 3 Northern blot analysis of the expression
of MEDRF mRNA in FVA cells

A. 0 h FVA cells; B. 36 h FVA cells

3 讨论

红系细胞分化过程的和谐调控是多因素共同作用的结果。包括造血生长因子、转录因子和造血系统的微循环因素等。近年来的研究表明,造血生长因子的作用可能只是维持那些本身已经“决定”了的细胞的存活,并促使其增殖,而那些不具有红系内在因素的细胞则出现凋亡^[5,6]。因此,转录因子在红系的分化过程中似乎起着更为重要的作用^[7]。迄今为止,在红细胞终末分化阶段,尚未发现特异的转录因子。已证实 FVA 能诱导小鼠脾脏原红细胞大量增殖而不影响其正常发育,该种细胞被称为 FVA 细胞。采用 1%~2% BSA 连续梯度分离,可使未成熟的原红细胞纯度达 95%左右^[3]。体外培养时,原红细胞在 EPO 的作用下,相对同步地进行早幼成红细胞的分化。但是,在 36~48 h 的中、晚幼红细胞阶段,其相关分化因子尚未见报道。本研究从 36 h FVA 细胞中克隆出 MEDRF,表明该因子的基因在红系发育的中、晚幼阶段特异表达。因此,它可能在红细胞的终末分化过程中起着重要的作用。

MEDRF 核苷酸序列的一级结构分析显示,它有一个开放的阅读框,编码 102 个氨基酸,其核苷酸序列的第 51 位有一个翻译起始密码 AUG,在其旁侧序列中的-3 位为 A,+4 位为 G,这是真核细胞 mRNA 进行有效翻译所必需的结构^[8]。在第 460 位有一个典型的加尾信号 AATAAA,但其后只有 7 个核苷酸,没有 poly(A)尾,因此其 3'端非编码区可能不够完整,但根据 Northern 印迹的结果分析,该 cDNA 片段两端非编码区的缺失不会太多。

Northern 印迹证明,MEDRF 只在 36 h FVA 细胞中表达,而在 0 h FVA 细胞不表达。这种表达的阶段性说明其基因是一个与红系细胞终末分化因子相关的基因片段。由于缺乏同源比较的资料,因此,目前还很难对 MEDRF 的确切功能进行预测。但是,作为一个具有明显分化阶段性表达的因子基因,必然有其表达的必要性,也必然有其相应的功能。克隆其全长 cDNA 和进一步的功能研究正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 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): 225~234
- 2 刘友华, 薛社普. 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. 中国科学 B 辑, 1987, 8: 853~864

- 3 Koury MJ, Sawyer ST, Boudurant MC. Splenic erythroblasts in anemia-inducing Friend disease: A source of cells for studies of erythropoietin-mediated differentiation. *J Cell Physiol.* 1984, 121:526~532
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 516~517
- 5 Wu H, Liu X, Jaenisch R. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Blood* 1996, 83:59~67
- 6 D'Andrea AD. Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol.* 1994, 6:804~808
- 7 Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J Bio Chem.* 1995, 270:4955~4958
- 8 Kozak M. Analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15:8125~8148

Subtractive cDNA Cloning and Analysis of Murine Erythroid Terminal Differentiation Related Factor

Liu Shiguang Zhang Zhengyan Ma Jing Zhang Shifu Xue Shepu*, *et al*

(Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005)

Objective Cloning and identification of cDNA related to erythroid terminal differentiation factor(MEDRF). **Methods** cDNA related to erythroid terminal differentiation from the Friend virus anemia (FVA) infected splenic erythroblasts of BALB/c mice were performed by using subtractive hybridization combined with PCR technique. The splenic proerythroblasts isolated were cultured in the presence of erythropoietin for 36 hrs. Subtractive cDNA clones of differentially expressed in the 36 hrs erythroblasts (sub cDNA-36) but absent in the uncultured proerythroblasts were observed. The sub cDNA-36 was then used for construction of subtractive cDNA library using the Bluescript-SK(+) phage vector system, and differentially screened by ³²P-labelled PCR generated probes. The positive clones were analyzed by nucleotide sequencing. **Results** The results indicated that a 472 bp cDNA fragment which contained a 309 bp reading frame from 51 to 359 coding 102 amino acids was identified and it has been accepted by GenBank as a new cDNA sequence that without comparable homology of existing sequences (accession number;AA114369). Northern blot analysis demonstrated that it was differentially expressed in the 36 hrs cultured intermediate-late stages of erythroblasts. **Conclusions** The newly found cDNA, which expresses specifically in intermediate-late stages of erythroblasts, not in stages of proerythroblasts, may be a new gene related to murine erythroid terminal differentiation.

Key words erythroid cell; cell differentiation; subtractive hybridization; cDNA cloning

(1998-03-06 收稿)