

## 红细胞分化去核因子:哺乳类红细胞终末分化/肿瘤抑制的调节因子家族及其相关基因的克隆<sup>△</sup>

薛社普<sup>#</sup> 刘友华 张世巍 马文丽 王鑫 费仁仁 杜权  
章正琰 章静波 陈克铨 周建平 马静 韩代书

(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学室,北京 100005)

**摘要** 本文报道哺乳类红细胞终末分化去核因子(EDDF)调控恶性骨髓瘤细胞的分化以及与EDDF相关的基因克隆的系列研究结果。以不同分化期哺乳类红细胞为研究对象,观察红细胞自然排核前后的细胞形态变化和与之互为对应的物质代谢的改变,分析EDDF与终末分化、核浓缩及自然排核的可能关系;用自建的红细胞胞质体杂交模型,分别对红白血病和非红系的骨髓瘤细胞进行同种和异种的细胞杂交实验以验证EDDF的作用规律。结果表明,哺乳类红细胞在终末分化不同阶段存在时相相关的分化去核因子家族。这些因子可调控不同分化阶段相关基因的活动,且呈时序性出现,与血红蛋白表达、细胞核停止分裂转向分化、核偏位、核浓(固)和自然去核等终末分化特征呈现明显的因果关系。EDDF活性蛋白可逆转体外培养的肿瘤细胞系(MEL, K562)的恶性生长及诱导终末分化。在上述基础上分别采用不同的分离、提纯及基因克隆路线,从人和小鼠红细胞中连续克隆到5种分化相关基因家族(MEDDF, HEDDF-1, HEDRF-1, HEDRF-2, HCNBP-1)及其全长序列,并经GenBank证实,它们均为无同源的新基因序列。

**关键词** 终末分化 红细胞分化去核因子 恶性调控 基因克隆

**中图分类号** R329.2<sup>+</sup>4

## Erythroid Differentiation Denucleation Factor: a Family of Erythroid Regulators for Mammalian Erythroid Terminal Differentiation/Tumor Suppression and the Cloning of Their Related Genes<sup>△</sup>

Xue Shepu<sup>#</sup> Liu Youhua Zhang Shifu Ma Wenli Wang Xin Fei Renren Du Quan  
Zhang Zhengyan Zhang Jingbo Chen Kequan Zhou Jianping Ma Jing Han Daishu

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

The role of regulation of erythroid differentiation denucleation factor (EDDF) on mammalian erythroid differentiation and myeloma cell malignancy as well as cloning of their stage related genes were serially studied. Through a series of cybrid and hybridization experiments between mammalian erythroid cells and erythroleukemia or non-erythroid myeloma cells, we have demonstrated a novel family of erythroid regulators (EDDFs) in the mammalian differentiating erythroblasts which with an active peak occurred concomitantly with marked decreases in DNA, RNA and the nuclear anchoring vimentin-IF, but increased in hemoglobin synthesis in cytoplasm prior to the denucleation process during terminal differentiation. The results of cell fusion experiments verified that the supplement of regulators (EDDFs) was critical to the recovery of the originally lost features of terminal differentiation and the reversion of malignant phenotype of

tumor cells. Here we showed that the erythroid regulator family EDDFs were essential regulators for the sequential expression of stage related genes of erythroid terminal differentiation, and for the redifferentiation of tumor cells to express the originally inactive globe genes, repressed the oncogenes, and vimentin-IF system, thus initiated nuclear condensation and denaturation. The EDDF gene family consisted of MEDDF, HEDDF-1, HEDRF-1, HEDRF-2 and HCNBP-1 were cloned. All were novel cDNA sequences that have been searched and registered in GenBank. They expressed varying in a stage specific manner, and acted on corresponding genes of terminal differentiation.

**Key words** terminal differentiation; erythroid differentiation denaturation factor; malignancy regulation; gene cloning

*Acta Acad Med Sin*, 2000, 22(4): 371~375

哺乳类红细胞终末分化的主要特征是表达血红蛋白, 停止细胞分裂, 出现为哺乳类红细胞所独特的核固缩和自然去核活动(哺乳类以下动物红细胞无此现象)。癌变时这些特征消失, 出现核分裂失控, 分化被抑制, 转变成红白血病肿瘤。何种细胞因子终止细胞分裂周期, 调控终末分化相关基因? 癌变时发生何种变化, 从而导致细胞核分裂失控? 这是涉及细胞分化及癌变机制两大领域基而未决的重大生命科学问题, 哺乳类红细胞及其瘤系的上述特点正是藉以研究其分子机制及其调控的理想模型。红细胞分化决定于细胞内、外因素和不同发育阶段细胞内诸多调节因子的协同作用。已知一系列红细胞造血因子如 EPO, SCF, BSF-E, CSF-E, IL-3, IL-6 和一些癌基因蛋白等, 分别作用于造血干细胞、原红细胞和早幼红细胞等不同阶段, 介导该细胞特异基因的表达与分化<sup>[1-3]</sup>。其中 EPO 是早幼期红细胞的最终依赖因子, 但自该期以后的终末分化相关因子尚无确切的报道。Eto<sup>[3]</sup>(1987)曾继笔者<sup>[4]</sup>之后, 报道从人红白血病细胞培养液中提纯到一种可诱导 MEL (murine erythroid-leukemia cell) 细胞表达血红蛋白的 EDF 因子。但该因子与文献报导的激活素 (activin) A 为同源物。其基因来源及序列结构与本组克隆得到的 EDDF 有基本区别。EDDF 的来源可能是红细胞在长期种系发生过程中由非去核进化至去核所形成的细胞内进化产物。癌变后这一调控终末分化的物质消失, 导致作为终末分化特征的血红蛋白、核固缩、和自然去核等表征受抑制。理论上, 如予以补充所缺失的 EDDF, 应能逆转癌变和恢复分化, 从而有可能为肿瘤的治疗提供一个的途径。这是本研究的最終目标之一。

**哺乳类红细胞发育过程中自然排核的物质基础及排核机制假说** 为验证哺乳类红细胞终末分化期自然去核的独特规律, 本研究自 80 年代初期便在

排核问题上先后报道了小鼠和兔红细胞排核过程的电镜观察<sup>[7]</sup>以及红系祖细胞 BFU-E 和 CFU-E 体系在体外培养条件下自然排核过程<sup>[8]</sup>, 提出排核是哺乳类红细胞终末分化的一种自主性活动。排核前出现核骨架-中间纤维体系(NM-IF)的超微结构改变, 与非排核的鸟类(鸡)红细胞表现出截然不同的形态特征<sup>[8]</sup>。为生物进化由非排核演变至排核提供了证据。

哺乳类红细胞在排核前还出现一系列与形态改变相应的可检测的物质代谢变化。用细胞化学、免疫荧光、电泳及分离、提纯等方法进行分析发现, 排核期核酸(DNA 及 RNA)、LDH 同工酶<sup>[10]</sup>、波形纤维蛋白含量及活性等均在排核前急剧下降, 而酸性磷酸酶、血红蛋白、膜收缩蛋白(spectrin  $\alpha$  及  $\beta$ )、微管、微丝蛋白活性或含量则呈不同程度上升, 尤其胞质中 EDDF 蛋白的活性迅速上升至高峰<sup>[11-14]</sup>。这些变化均以晚幼红细胞期为转折点, 而且 EDDF 活性高峰出现在排核过程之前, 与排核呈因果关系, 提示哺乳类红细胞在终末分化期出现分化去核物质, 并导致排核期间物质代谢的剧烈改变。以不影响红细胞生长分化的 Friend 贫血病毒(FVA)感染小鼠, 取其脾原红细胞进行离体培养 12、24、36、48、60 及 72 h 后, 分别取不同发育期细胞分离, 提纯 EDDF 蛋白质, 并以其对小鼠 MEL 红白血病细胞的生长抑制率和诱导表达血红蛋白的阳性细胞率作为生物活性指标进行动态分析发现, 该活性蛋白在早幼成红细胞期已经出现, 在中幼成红细胞期活性强度达高峰。用间接免疫荧光法和激光共聚焦显微镜观察发现: 作为锚定细胞核位置的波形纤维蛋白荧光强度在晚幼成红细胞早期突然下降(提示蛋白降解), 从而导致细胞核偏位, 微管和微丝蛋白纤维则随细胞核的排出而上升, 并且密集于缢痕区直到最后将被排出。以上结果为排核机制假说中的排核模式提供了证据<sup>[14]</sup>。

**红细胞胞质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分化作用** 为了验证上述假说,本研究选用自然去核并富含珠蛋白 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,与缺失该酶的小鼠及

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(小鼠-小鼠)和异种(小鼠-兔、小鼠-人)细胞胞质杂交模型。另用大鼠有核红细胞与小鼠浆细胞瘤杂交建成杂交细胞<sup>[6,15~19]</sup>。

本室建立的红系细胞-肿瘤细胞的同种和异种杂交细胞系及其表现特征:

红系细胞	恶性细胞系(骨髓瘤)	胞质/杂交细胞 (cybrid/hybrid)	表现特征
(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 <sup>[4]</sup>
(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 <sup>[4]</sup>
(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 <sup>[4]</sup>
(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 <sup>[14]</sup>
(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 <sup>[20]</sup>
(6)兔网织红细胞(RR)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤细胞(BW)	BW-RR	恶性逆转*,表达小鼠和兔型血红蛋白 <sup>[14]</sup>
(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 <sup>[14]</sup>
(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 <sup>[14]</sup>
(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*,该型蛋白基因表达受抑,表达人型血红蛋白 <sup>[14]</sup>
(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 <sup>[6,10,12,15,16,20]</sup>

\* 表现特征中恶性逆转包括生长曲线、分裂指数、<sup>3</sup>H-TdR 掺入率下降,以及在软琼脂中失去集落形成,在裸鼠体内丧失致瘤能力(包括癌基因 C-myc 被抑制等)

其中第 4 种杂交细胞系(HL-R),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 HGPRT 的突变株(HL-60-AR),然后与网织红细胞杂交;再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 2 种突变细胞在诱导分化药物维甲酸(RA)和二甲基亚砜(DMSO)等作用下,与胞质体杂交的结果均可向正常方向分化;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,并且分化的特征具有遗传稳定性<sup>[17]</sup>。

值得注意的是,宿主瘤细胞中原来不活动的珠蛋白基因,在杂交后被外源红细胞胞质中的 EDDF 因子所激活,呈现反式调节效应。1986 年,Baron<sup>[18]</sup>亦曾报道经 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 细胞杂交后的杂种细胞中,出现人型  $\alpha$  及  $\beta$  珠蛋白基因产物血红蛋白,该报道和本研究的结果不谋而合。表明已分化和癌变的细胞珠蛋白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<sup>[21]</sup>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%,本实验中的胞质体杂交细胞

c-myc 基因的表达也明显受抑。上述结果为红细胞分化去核因子可逆转肿瘤的恶性提供了基因水平的证据。此外,本实验还发现,EDDF 还能特异性地抑制起锚定细胞核位置作用的波形蛋白基因的活动。这一过程准确地模拟了哺乳类红细胞终末分化期的停止细胞分裂,转向细胞去核化的自然现象,并重排细胞分化基因表达的开关调节。上述结果为长期未解决的细胞分化机制问题提供了线索。

#### EDDF 的分离、提纯、活性分析及其基因克隆

在证明了哺乳类红细胞中存在终末分化去核调节因子的基础上,笔者又从红细胞中分离纯化出 EDDF,并对 EDDF 基因进行克隆。

EDDF 活性蛋白质的提纯分析:从盐酸苯胍诱发贫血的新西兰兔网织红细胞中提纯得到电泳纯、相对分子质量为 15 000 的活性蛋白质,又从 FVA 小鼠的不同发育期脾红细胞中分离纯化得到相对分子质量为 8 000 的 EDDF。纯化的 EDDF 对 MEL 及 K562 细胞均有明显的抑制细胞分裂作用,并具有与  $\beta$ -珠蛋白基因上游区的 HS-2 增强子标记探针特异结合的作用。氨基酸序列分析显示,二者 N 端 15 个氨基酸 (Leu-Arg-Ile-Arg-Gln-Thr-Ile-Lys-Val-Trp-X-Asp-Gln-Lys-Gln) 的前 7 个序列<sup>[1]</sup>完全相同,表明从不同物种中提纯的 EDDF 具有一定的同源性。

EDDF 基因的克隆:(1)根据 EDDF 氨基酸序列设计引物,采用人胚肝细胞 mRNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,对获得的片段进行 EDDF 基因的克隆,结果得到一全长为 759 bp 的 cDNA 序列,该序列编码 74 个氨基酸。经查询 GenBank 证实,未见同源序列,该序列编号为 AA514190 (Quan Du and S. P. Xue 1997)。Northern 印迹分析表明,该基因只在终末分化期出现核浓缩的红细胞中有特异表达。属 EDDF 基因家族中作用于核浓缩相关基因的成员之一,定名为 HEDDF-1。(2)用免疫法克隆人胚肝红细胞 EDDF 相关基因:以人胚肝红细胞的 HS-2 增强子结合蛋白为抗原,采用杂交瘤单克隆抗体和同源源的免疫筛选法进行克隆,结果获得 2 个并无同源的全长序列的红细胞终末分化相关基因:EDRF1(长 1.2 kb,阅读框编码 147 个氨基酸)和 EDRF2(长 500 bp,阅读框编码 107 个氨基酸,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 只在终末分化期人红细胞中出现。在 GenBank 中的编号分别为 AF040247 (Wand X, Shen BF, and Xue SP, 1997) 和 AF040248 (Wand X, Shen BF, and Xue SP, 1997),它们属于 EDDF 基

因家族中作用于珠蛋白基因的成员,分别定名为 HEDRF-1 及 HEDRF-2。用另一抗体从人骨髓  $\lambda$ gt11 cDNA 文库中克隆到一长度为 1.1 kb 的人核糖结合蛋白的 cDNA 片段。其对应的 mRNA 在小鼠原幼红细胞期表达量最高,以后从胞浆移入晚幼红细胞核内,属于 EDDF 家族中作用于核浓缩的成员之一。(3)用减除杂交-PCR 法克隆小鼠红细胞 EDDF 终末分化相关基因:采用直接提取核酸和减除杂交结合 PCR 的方法,从 FVA 诱发的脾脏原红细胞发育不同期的细胞中,克隆获得一小鼠中、晚幼红细胞终末分化相关的 EDDF cDNA。该基因全长 505 个核苷酸,编码 102 个氨基酸。经 GenBank 查新表明,此乃未见报道的新基因,编号为 BankIt180846 AF060220 (Zhang ZY, Liu SG and Xue SP, 1997)。Northern 印迹分析表明,该基因仅在造血相关组织的骨髓和脾脏中表达<sup>[19]</sup>。属于 EDDF 基因家族中作用于晚幼红细胞核浓缩相关基因的成员,定名为 MEDDF。

上述 EDDF 相关基因组成了作用于红细胞不同终末分化阶段的基因家族。以上基因克隆的成功为进一步对该家族的功能分析与验证奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- Dexter TM, Heyworth CM, Whetton AD, et al. The role of growth factors in haematopoiesis. *Bio Essays*, 1986, 2(4):154-158
- Cowling GJ, Dexter TM. Erythropoietin and myeloid colony stimulating factors. *TIBTECH*, 1992, 10: 349-357
- Koury MJ, Boudruant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*, 1992, 371:1-15
- Chang JC, Liu D, Kan YW. A 36-base-pair core sequence of locus control region enhances retrovirally transferred human B-globin gene expression. *Proc Natl Acad USA*, 1992, 89:3107-3110
- Eto Y, Tsuji T, Takezawa M, et al. Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 14(3):1035-1103
- 李宝莲,梁德才,刘裕,等.胞质因子对肿瘤细胞恶性的调控研究-小鼠骨髓瘤细胞与网织红细胞胞质的胞质杂交实验. *解剖学报*, 1984, 15:49
- 刘友华,薛社晋.哺乳类红细胞成熟过程中自然排核现象的电镜观察-电子显微镜学, 1989, 8:14
- 张庆一,田毅,薛社晋.小鼠骨髓红系祖细胞体外培养细胞分化的形态学观察. *中国医学科学院学报*, 1989, 11:210
- 董茂友,陈联松,张宇生,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
- 刘友华,薛社晋.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. *中国科学 B 辑*, 1987, 8:853



## 番荔枝科植物化学成分及其抗肿瘤活性<sup>△</sup>

杨世林 余竟光<sup>#</sup> 徐丽珍

(中国医学科学院 中国协和医科大学 药用植物研究所植物化学研究室, 北京 100084)

**摘要** 本文简要总结本室近15年来对番荔枝科植物的化学成分及其抗肿瘤活性研究的结果。该科植物所含的番荔枝素、多氧环己烯和苯乙烯内酯是主要的抗肿瘤活性成分,可望开发成为抗肿瘤新药。

**关键词** 番荔枝科 番荔枝素 多氧环己烯 苯乙烯内酯 抗肿瘤活性

**中图分类号** Q949.747.3 R 931.6

### Chemical Constituents of Annonaceae Plants and Their Antitumor Activities<sup>△</sup>

Yang Shilin Yu Jingguang<sup>#</sup> Xu Lizhen

(Department of Phytochemistry, Institute of Medicinal Plant Development, CAMS and PUMC, Beijing 100094, China)

This report is the summary of our research on the chemical constituents and their antitumor activities of Annonaceae plants. Annonaceous acetogenins, polyoxy-cyclohexenoids, and styryl-lactones from Annonaceae are the main constituents of antitumor activities. They are expected to develop a kind of new antitumor medicines.

**Key words** Annonaceae; acetogenins; polyoxy-cyclohexenoids; styryl-lactones; antitumor activities

*Acta Acad Med Sin*, 2000, 22(4): 376-382

番荔枝科(Annonaceae)是热带和亚热带地区一大植物种群<sup>[1]</sup>,该科含生物碱、萜类、黄酮、番荔枝素、多氧环己烯和苯乙烯内酯等成分。其中后3类化合物具有抗肿瘤活性,并已引起各国学者广泛兴趣,成为当今国内外继红豆杉后又一研究热点。本室从1985年开始,在广筛该科植物抗肿瘤活性的基础上,对其中15种植物进行化学成分的研究。本文简要总结研究的结果。

**番荔枝化合物的研究结果** 番荔枝素是1982年发现的一类有很强抗肿瘤活性的长碳链脂肪酸内酯,称为annonaceous acetogenins或polyketides,其译名有番荔枝(枝)素、番荔枝内酯、番荔枝皂素、番荔枝乙酰元和番荔枝乙酰精宁等,主要分布于该科的*Uvaria*(紫玉盘)、*Annona*(番荔枝)、*Asimina*、*Goniothalamus*(哥纳香)和*Rollinia*等12属中,至今

已发现350多种同系物。笔者从5种植物分离获得8种类型、45种番荔枝素(表1~8),新化合物16种,其抗肿瘤活性见表9,10。

番荔枝素分子中存在多个手性碳原子,立体结构比较复杂,多为蜡状物。笔者曾报道gigantecin(38)的单晶X-射线衍射测定绝对构型<sup>[12,16,17]</sup>。表3中2,4-*cis/trans*-isoannonacin(22/23)、2,4-*cis/trans*-isoannonacin-10-one(26/27)是以混合物形式存在的异系番荔枝素的第1、2种成员<sup>[5]</sup>,二者化学性质近似,分离困难,文献报道的常为顺式和反式体的混合物。笔者采用薄层色谱法将二者分开,从而得到单一的2,4-*cis*-squamone(24)、2,4-*trans*-squamone(25)、2,4-*cis*-annonareticin(35)和2,4-*trans*-annonareticin(36)<sup>[9,11]</sup>。