

红细胞胞质因子对 K_{562} 细胞分化及其核基质-中间纤维体系影响的研究*

马文丽 薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 利用转基因与细胞融合相结合的方法, 使无核的兔网织红细胞转入可供筛选的标记基因, 并使之与红白血病细胞 K_{562} 融合, 成功地筛选出胞质杂交体 $K-RR_{neo}$ 细胞; 以 $K-RR_{neo}$ 细胞为研究对象, 采用分子杂交、RT-PCR、DNA 测序及免疫印迹技术, 系统地研究了细胞杂交前后的生长、分化特征及其中间纤维体系的变化规律。结果表明, 网织红细胞胞质中确实存在红细胞胞质因子, 通过对相关基因表达的调控, 可抑制红系肿瘤细胞的生长, 并促进其分化, 同时引起中间纤维主要成分波形纤维蛋白的改变, 出现排核前征兆。

关键词 转基因 细胞融合 K_{562} 细胞 生长分化 核基质-中间纤维体系

终末分化期出现自然排核独特特征的哺乳类红细胞在其生长、分化、排核过程中的形态、生化组分及功能活动的典型变化, 是研究造血系统肿瘤细胞恶性调控的理想模型。近年来, 薛社普等^[1]利用这一模型, 采用网织红细胞与骨髓瘤细胞进行同种或异种间杂交, 并对杂交前后骨髓瘤细胞的恶性表型等一系列指标进行了比较研究, 结果发现, 骨髓瘤细胞的恶性逆转与网织红细胞胞质中存在的一种与自然排核、终末分化密切相关的胞质因子(又称为红细胞去核分化因子, Erythroid Denudeation Differentiation Factor, EDDF)有关。为进一步研究 EDDF 对红系肿瘤细胞的恶性调控作用及其与基因表达、细胞分化密切相关的核基质-中间纤维体系在这一过程中所起的作用, 利用人红系来源的红白血病细胞 K_{562} 与兔网织红细胞融合, 比较研究 K_{562} 细胞杂交前后生长分化特性的改变。前文已报道杂交后核基质-中间纤维体系的超微结构改变^[2], 本文着重报道分子生物学方面的结果, 包括基因表达调控、细胞骨架体系中的中间纤维及其主要组分波形纤维蛋白(vimentin)在细胞杂交前后的变化规律, 为揭示哺乳类红细胞自然排核机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞的准备 K_{562} 细胞培养于含胎牛血清及小牛血清各 5% 的 RPMI-1640 培养基

1993-10-19 收稿, 1994-05-04 收修改稿

* 国家自然科学基金重点资助项目

中,兔网织红细胞的制备采用皮下注射盐酸苯胍的方法^[2].

1.1.2 基因及探针的制备 neo 基因来自质粒 pSV_{neo}^[3], Vimentin cDNA 探针购自 ATCC (Cat No 59757) 公司, β -珠蛋白及 c-myc 基因控针分别来自质粒 pBR: β S^[4] 及 phc-myc^[5].

质粒纯化按常规超速离心法^[6], 经紫外分光光度仪定量, -20°C 保存, 备用.

探针标记采用非同位素标记试剂盒 (BioNick labelling kit, GIBCO-BRL), 取待标记 DNA $1\mu\text{g}$, 按试剂盒要求, 加 Biotin¹⁴-dATP 于 14°C 反应 1 h 后, 以 Sephadex G50 离心柱纯化生物素化探针, 并用 DNA detection kit (GIBCO-BRL) 检测标记效率.

1.2 方法

1.2.1 转基因过程 取纯化的 pSV_{neo} 质粒 $40\mu\text{g}$, 常规乙醇沉淀后, 于 70% 乙醇 4°C 浸洗过夜, 离心收集沉淀, 超净台内干燥, 加入无菌注射用水 $100\mu\text{L}$ 使质粒溶解.

导入基因采用脂质素转基因系统 (Lipofectin, GIBCO-BRL). 取 $50\mu\text{L}$ Lipofectin 试剂加入 $50\mu\text{L}$ 注射用水, 混匀, 然后与等量的 pSV_{neo} 质粒溶液轻轻混合, 静置 20 min 后, 缓缓加至已备好的兔网织红细胞中 (计数为 1.2×10^6), 于 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 5~24 h, 即可通过脂质体介导作用而将 neo 基因导入兔网织红细胞中. 导入 neo 基因的兔网织红细胞称为 RR_{neo}, 用于与 K₅₆₂ 细胞融合.

1.2.2 细胞融合及杂交细胞的筛选 K₅₆₂ 细胞与 RR_{neo} 细胞的比例为 1:5~10, 促融合剂 PEG 分子量为 1450 (Sigma), 按常规 PEG 促融法使两者融合, 24 h 后接种于含 G₄₁₈ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 于 37°C , 5% CO_2 孵箱内培养 14~20 d, 常规方法制作融合前后细胞的生长曲线.

1.2.3 Northern 印迹方法 参阅文献[6], 按常规步骤进行.

1.2.4 RT-PCR 及 DNA 测序 分别提取兔网织红细胞、K₅₆₂ 细胞及 K-RR_{neo} 细胞的 RNA, 于 90°C 变性 5 min 后迅速浸于冰浴; 在 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 处理过的 Eppendorf 管中, 加入 RNA 样品 $1\sim 5\mu\text{L}$, dNTP 各 $1\text{mmol}/\text{L}$, RNasin 1 单位/ μL , 六碱基随机引物 10pmol , 逆转录酶 200 单位, $1\times\text{PCR}$ 缓冲液 (参阅 BRL 的逆转录 Kit 说明书), 总反应体积为 $20\mu\text{L}$, 依次于 23°C , 10 min; 42°C , 60 min; 95°C , 5~10 min, 迅速浸于冰浴. 加入 $80\mu\text{L}$ $1\times\text{PCR}$ 缓冲液, 含 50pmol 的 P_1 , P_2 引物及 1~2 单位的 Taq DNA 聚合酶, 然后进入 PCR 扩增 (参阅 Promega 的 PCR 扩增 Kit 说明书), 扩增条件为 95°C , 30 s; 55°C , 90 s; 72°C , 60 s, 循环 25~30 次, 特异扩增 β -珠蛋白 cDNA 的一对引物序列为 P_1 : 5' GGA TCT GTC CAC TCC TGA TG 3'; P_2 : 5' TCC ACG TGC AGC TTG TCA CA 3', 扩增结果以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

以 DEAE-Cellulose 滤纸回收扩增出的 PCR 产物, 并利用 SureClone ligation kit (Pharmacia) 使之克隆于 pUC 18 Sam I/BAP 载体中, 常规方法测定扩增的 DNA 序列.

1.2.5 SDS-PAGE 用 Western 印迹法 参阅文献[7, 8] 的方法, 经选择性多步抽提纯化核基质-中间纤维组分, 进行常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), Western 印迹法采用 1:1000 稀释的 Vimentin 单克隆抗体 (Sigma) 进行检测.

2 结果

导入 neo 基因后的兔网织红细胞 (RR_{neo}) 孵育 24 h, 彻底清洗后, 与适当比例的 K₅₆₂ 细胞

融合, 24 h 换以含有 G_{418} 500 $\mu\text{g/mL}$ 的选择性培养基培养, 结果可见未经融合的 K_{562} 细胞第 3 d 起出现颗粒样变性, 第 8 d 前全部死亡; 而与 RR_{neo} 融合后的胞质杂交细胞则在第 12 ~ 14 d 于较多死亡细胞的背景中存活 (图 1(a)). 20 d 后挑出呈克隆性生长趋势的细胞 (图 1(b)), 接种于 500 $\mu\text{g/mL}$ G_{418} 的选择性培养基中继续培养, 可见该杂交细胞为较规则球形, 体积较 K_{562} 稍大, 定名为 $K-RR_{neo}$.

亲代 K_{562} 细胞与胞质杂交体 $K-RR_{neo}$ 细胞生长曲线比较, 可见在不含 G_{418} 的正常培养基中, K_{562} 细胞旺盛生长, 而 $K-RR_{neo}$ 细胞生长明显缓慢; 在含 G_{418} 500 $\mu\text{g/mL}$ 的选择性培养基中, $K-RR_{neo}$ 细胞的生长率与其在正常培养基中基本相同, 而未经融合的 K_{562} 细胞却不能生长, 并逐渐死亡 (图 2).

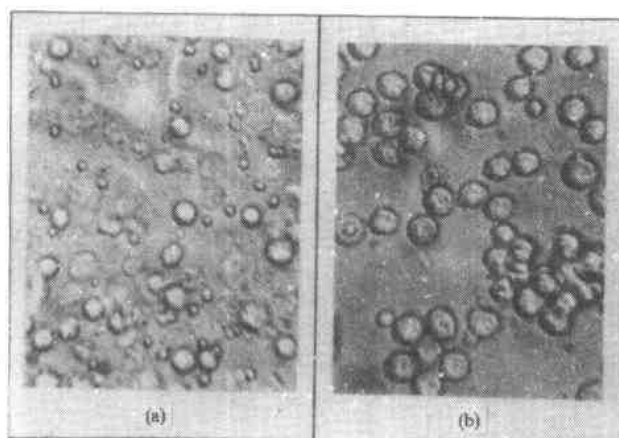


图1 转染 neo 基因的兔网织红细胞与 K_{562} 细胞融合形成的胞质杂交体细胞

(a) 融合后第 14 d, 可见杂交细胞在较多死亡细胞的背景下存活,
(b) 融合后第 20 d, 可见杂交细胞呈克隆性生长趋势

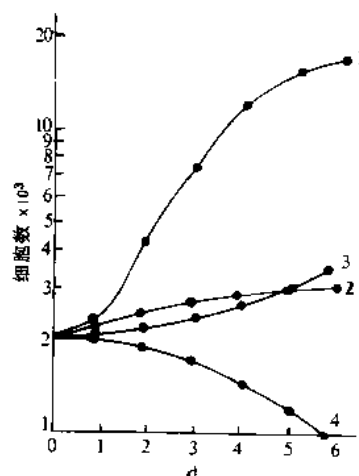


图2 K_{562} 细胞与 $K-RR_{neo}$ 细胞的生长曲线
1— K_{562} 细胞在正常培养基中, 2— $K-RR_{neo}$ 细胞在正常培养基中, 3— $K-RR_{neo}$ 细胞在 G_{418} 选择性培养基中, 4— K_{562} 细胞在 G_{418} 选择性培养基中

采用 c-myc 探针对 K_{562} 细胞、 $K-RR_{neo}$ 细胞的 RNA 进行了 Northern 印迹法检测, 结果显示, K_{562} 细胞 c-myc 基因表达呈强阳性, $K-RR_{neo}$ 细胞 c-myc 表达明显降低 (图 3(b)); 用激光光密度扫描仪 (UHro-Scan XL, Pharmacia) 定量处理, 两者的黑度峰值面积分别为 17.853 (K_{562}) 及 10.425 ($K-RR_{neo}$). 相同样品进行 β -Hb 探针杂交, 结果可见 $K-RR_{neo}$ 细胞出现较弱的阳性杂交带, 而 K_{562} 细胞则呈阴性 (图 3(c)), 提出红系细胞分化的标志基因 β -Hb 在 $K-RR_{neo}$ 细胞中可能被激活表达.

为防止 α -Hb 或 γ -Hb 等非特异性杂交结果的出现, 进一步选用了一对 β -Hb 特异的引物, 进行了 RT-PCR 扩增. 结果可见 K_{562} 细胞的 RT-PCR 表现为阴性, 而 $K-RR_{neo}$ 则在 158 bp 处出现明确的阳性带 (图 4), 表明 $K-RR_{neo}$ 细胞中已开始有 β -Hb 的表达.

为避免由于引物等原因可能出现的假阳性结果, 将 RT-PCR 阳性产物克隆于 pUC18 载体中, 进行了 DNA 序列分析, 从部分序列的放射自显影结果 (图 5), 经 GeneBank 基因数据库计算机分析, 表明 RT-PCR 扩增的 cDNA 确实来自 β -Hb mRNA, 进一步证实了融合后的胞

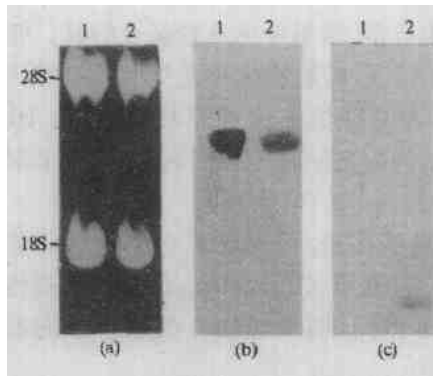


图 3 RNA 电泳及 Northern 印迹检测

(a) RNA 电泳图谱, 样品分别取自: 1——K₅₆₂ 细胞, 2——K-RR_{neo} 细胞; (b) Northern 印迹检测, 探针为 c-myc DNA, 样品 1, 2 同上; (c) Northern 印迹检测, 探针为 β -Hb DNA, 样品 1, 2 同上

Northern 印迹检测, 探针为 β -Hb DNA, 样品 1, 2 同上

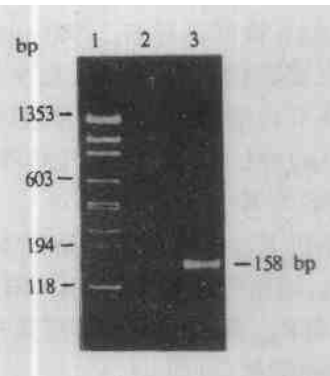


图 4 RT-PCR 扩增产物电泳图

1——DNA Size Marker Φ 174/Hae III, 2——K₅₆₂ 细胞, 3——K-RR_{neo} 细胞

质杂交体 K-RR_{neo} 细胞已进入了分化状态。

K₅₆₂ 细胞属于中胚层来源的细胞, 胞质的中间纤维蛋白应为波形蛋白。经选择性多步抽提后, 得到的核基质-中间纤维组分进行 SDS-PAGE, 然后以 Vimentin 单克隆抗体进行 Western 印迹检测, 可见 K₅₆₂ 细胞在 55 ku 处出现明显的阳性杂交带, 但 K-RR_{neo} 细胞则只有较弱的阳性杂交带 (图 6)。

进一步提取两种细胞的 RNA, 以 Vimentin cDNA 探针进行 Northern 印迹检测, 结果可

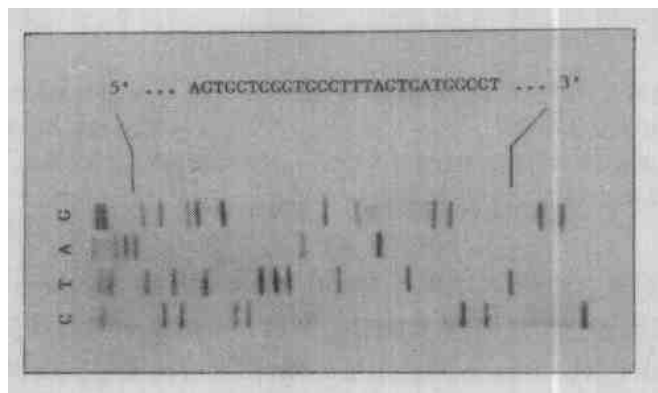


图 5 RT-PCR 阳性产物 DNA 序列分析

示 27 bp 的 cDNA 序列, 相当于 β -珠蛋白基因第二个外显子的一部分

见 K₅₆₂ 细胞中 Vimentin mRNA 呈高表达, 而 K-RR_{neo} 细胞则基本检测不到阳性杂交信号 (图 7), 表明 K-RR_{neo} 细胞中 Vimentin 蛋白的减少, 可能是由于 Vimentin 基因被关闭的缘故。

3 讨论

本实验室既往制作胞质体杂交细胞所采用的实验模型是: 先将骨髓瘤细胞通过诱导突变、抗性筛选, 使其成为 HGPRT⁻ 缺陷株, 进而与富含 HGPRT 酶的网织红细胞融合, 利用 HAT 选择性培养基筛选出杂交细胞株^[9], 此方面需时较长 (至少 3~6 个月), 工作量较大,

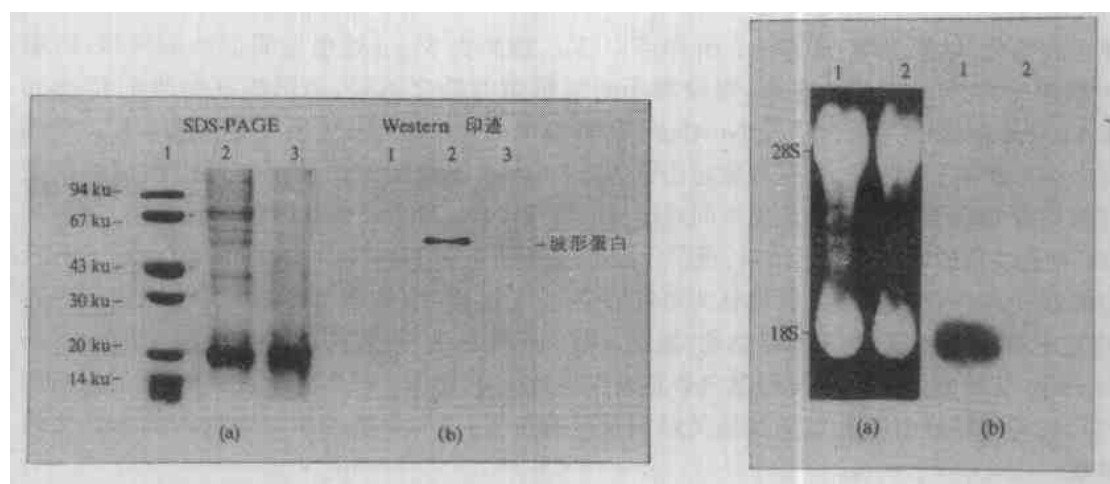


图6 K_{562} 细胞及 $K-RR_{neo}$ 细胞核基质-中间纤维组分 SDS-PAGE 及 Western 印迹检测结果

(a) SDS-PAGE 1——标准蛋白分子量, 2—— K_{562} 细胞, 3—— $K-RR_{neo}$ 细胞; (b) Western 印迹检测结果, 1, 2, 3 同上

图7 K_{562} 细胞、 $K-RR_{neo}$ 细胞 RNA 电泳及 Vimentin cDNA 探针的 Northern 印迹检测结果

(a) RNA 电泳, 1—— K_{562} 细胞, 2—— $K-RR_{neo}$ 细胞; (b) Northern 印迹, 1, 2 同上

且由于致突变剂 MNNG 的强烈致畸致癌作用, 给实验操作带来不便或影响亲代细胞的其它生物学特性, 同时还由于网织红细胞中已基本没有核基因组的存在, 其 HGPRT 阳性仅是由于胞质中存有 HGPRT 酶及相应的 mRNA 之故, 但后两者均具有一定的半衰期, 融合后的细胞并不能从遗传基因水平使获得的 HGPRT 表型得以维持, 因此, 难以稳定地筛选融合细胞。近年来, 利用表达性外源基因导入细胞的方法可替代诱导突变得得到同样效果, 即将可供筛选的标记基因导入细胞, 使之成为新的遗传标志, 再用特定的选择性培养基进行筛选^[7]。然而, 迄今为止, 外源基因导入的靶细胞均为有核细胞。本文采用脂质素转基因方法将外源基因 neo 导入无核的网织红细胞中, 使之成为标记基因的携带者, 进而与人红白血病 K_{562} 细胞融合, 利用 neo 基因对 G_{418} 的抗性, 成功地筛选出胞质杂交体 $K-RR_{neo}$ 细胞, 此方法大大方便了融合、筛选过程, 为研究胞质因子对肿瘤细胞恶性表型的调控提供了良好的实验模型。

利用上述模型, 本文比较研究了人红系来源的红白血病细胞 K_{562} 杂交前后的生长率、原癌基因 c-myc 的表达以及标志红系细胞分化的 β -Hb 基因表达情况, 结果发现融合后的胞质杂交体 $K-RR_{neo}$ 细胞生长明显缓慢, c-myc 表达降低, 原亲代 K_{562} 细胞不表达的 β -Hb 基因得以激活表达。上述结果又一次证实了网织红细胞中确实存在一种抑制 K_{562} 细胞生长, 并促进其分化的胞质因子, 为进一步探讨胞质因子对红系肿瘤细胞恶性表型的调控奠定了基础。

核基质-中间纤维体系是近年来新发现的一种细胞内重要结构。越来越多的研究者们注意到该体系与细胞分化、基因表达调控密切相关^[10], 大量的研究表明, 核基质不仅是维持核形态, 提供 DNA/RNA 空间支架的重要结构, 而且也参与了 DNA, RNA 的复制、转录、修饰等基本生命过程^[11]; 波形纤维还可能具有维持基因表达活性的功能, 并可能通过核纤层直接或间接地与核基质相互协调, 共同调节基因表达^[12], 为此, 研究核基质-中间纤维体系在红系肿瘤细胞逆分化过程中的特征改变, 有可能为 EDDF 的作用机制提供重要的新线索。

我们采用免疫印迹、分子杂交及整装电泳技术, 研究了 K_{562} 细胞杂交前后的核基质-中间

纤维体系的变化,结果发现,在 Western 印迹中, K_{562} 细胞在 55 ku 处出现明显的阳性带,而融合后的胞质杂合体 $K-RR_{neo}$ 细胞,则检测不到或极微的杂交条带,与网织红细胞的状态相同。用 Vimentin cDNA 探针进行 Northern 印迹检测,检测不到阳性杂交带,亦与 K_{562} 细胞之呈高表达形成明显对照。表明可能是由于 Vimentin 基因关闭的结果。与前边报道的整装电子显微镜观察到 $K-RR_{neo}$ 细胞的中间纤维构型与亲代 K_{562} 细胞放射状构型明显不同,而呈现与网织红细胞类似的网格状构形结果一致^[2]。提示,细胞生长与分化特征的改变,可能与胞质中间纤维构型的改变有一定的关系。我们认为可能存在以下机制:细胞融合后,网织红细胞质中存在的 EDDF 作用于核基质-DNA 结构,激活 β -Hb 基因表达,同时关闭 c-myc 及 Vimentin 基因;Vimentin 基因的关闭导致波形蛋白表达减少甚至消失,胞质中波形纤维重新排列,并逐渐解聚、断裂,后者间接或直接影响核基质的结构及核的位置,进而促使红系细胞进入终末分化而发生排核。

综上所述,本文采用基因工程与细胞工程相结合的手段,建立了一个制备胞质杂交体的新方法,并利用该方法所建立的实验模型,系统地研究了兔网织红细胞胞质因子对人红系来源的红白血病细胞 K_{562} 生长与分化特性的影响,又一次证实了 EDDF 的存在,且发现 EDDF 对红系来源的肿瘤细胞恶性表型同样具有调控作用。为最终阐明红系细胞分化、排核的分子细胞生物学机制提供了理论依据。

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 马文丽, 薛社普. 兔网织红细胞与 K_{562} 细胞胞质杂合体($K-RR_{neo}$)核基质-中间纤维体系的研究. 实验生物学报, 1993, 26(4): 377 ~ 387
- 3 Southern P J, Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J Mol Genet, 1982, 1(2): 327 ~ 331
- 4 Liu D, Chang J C, Moi P *et al.* Dissection of the enhancer activity of B-globin 5' DNase I hypersensitive site 2 in transgenic mice. Proc Acad Sci USA, 1992, 89: 3 899 ~ 3 903
- 5 Yaswen P. Expression of c-ki-ras, c-Ha-ras and c-myc in special cell types during hepatocarcinogenesis. M₁ Cell Biol, 1985, 5: 780
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1 121.
- 7 Burnette W N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Annal Biochem, 1981, 112(1): 195 ~ 201
- 8 马文丽, 薛社普. K_{562} 细胞核基质-中间纤维整装电镜观察. 解剖学报, 1993, 24(2): 168 ~ 171
- 9 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. 中国科学, B 辑, 1987, (8): 853 ~ 859
- 10 Hentzen P C, Rho J H, Bekhor I. Nuclear matrix DNA from chicken erythrocyte contains B-globin gene sequences. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 304 ~ 307
- 11 陈 枫, 翟中和. 细胞核骨架. 细胞生物学杂志, 1989, 11(2): 49 ~ 51
- 12 Kooijman M, Bloemendaal M, Traub P. Fluorescence study of the nucleic acid binding site of vimentin. FEBS Lett, 1992, 302(2): 177 ~ 180