

# 氯化高铁血红素诱导 K562 细胞中 $\beta$ -珠蛋白基因表达的研究

贾春平, 陈美珏, 黄淑贞, 曾溢滔

(上海市儿童医院上海医学遗传研究所, 上海 200040)

**摘要:**以绿色荧光蛋白(EGFP)基因为报道基因, 构建了在  $\beta$ -珠蛋白启动子驱动及 HS2 元件调控下的重组表达载体 HG, 用脂质体转染法将其转染到 K562 细胞中, 并用 RT-PCR 方法及流式细胞仪检测氯化高铁血红素(Hm)对 K562 细胞中  $\beta$ -珠蛋白基因表达及重组载体 HG 在 K562 细胞中瞬时表达的影响。结果显示:用  $30\mu\text{mol/L}$  Hm 诱导 K562 细胞 24、48 及 72h 后, 不仅其  $\gamma$ -珠蛋白 mRNA 水平升高, 其  $\beta$ -珠蛋白 mRNA 水平也明显上升, 而且这种诱导作用在诱导 24、48h 后比较明显; Hm 还可增强重组表达载体 HG 在 K562 细胞中的瞬时表达。提示 Hm 诱导红系分化的机理可能与  $\gamma \rightarrow \beta$ -珠蛋白基因的转换机制相关。

**关键词:**氯化高铁血红素; K562 细胞;  $\gamma$ -珠蛋白基因;  $\beta$ -珠蛋白基因

中图分类号: Q756

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)04-0399-04

## A Study of Inductive Effect of Hemin on Expression of the $\beta$ -globin Genes in K562 Cells

JIA Chun-ping, CHEN Mei-jue, HUANG Shu-zhen, ZENG Yi-tao

(Shanghai Institute of Medical Genetics Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** The recombinant plasmid HG was constructed, in which the reporter gene encoding the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was driven by the  $\beta$ -globin promoter and regulated under the HS2 element. The inductive effect of hemin on the expression of the  $\beta$ -globin gene and transiently transfected  $\beta$ -globin genes in K562 cells was analysed by FACS as well as RT-PCR method. The results showed that the level of  $\gamma$  and  $\beta$ -globin gene mRNA in K562 cells increased significantly after 24, 48 and 72 hours induced with  $30\mu\text{mol/L}$  Hm. And this inductive effect was stronger after 24 and 48 hours. Furthermore, the transient expression of plasmid HG in K562 cells increased significantly with hemin induction. These results indicated that the mechanism of inductive erythroid differentiation with hemin may be correlated with mechanism of  $\gamma \rightarrow \beta$ -globin gene.

**Key words:** hemin; K562 cell line;  $\gamma$ -globin gene;  $\beta$ -globin gene

K562 是一种红白血病细胞系, 是人的造血干细胞在向红系分化过程中被 Friends 病毒感染, 停止分化而形成的, 主要表达胚胎及胎儿期的  $\epsilon$ 、 $\gamma$ -珠蛋白及部分  $\zeta$ 、 $\alpha$ -珠蛋白<sup>[1]</sup>。K562 细胞包含大部分珠蛋白基因表达调控所需的反式作用因子。在许多诱

导剂的作用下, 可使 K562 细胞重新启动或继续向正常方向分化。如, K562 细胞可在氯化高铁血红素(Hm)、羟基脲(HU)、丁酸或其他试剂的诱导下, 大量表达  $\gamma$ -珠蛋白<sup>[2~4]</sup>。关于胚胎/胎儿期 K562 细胞中, 是否有  $\beta$ -珠蛋白基因的转录或表达, Hm 诱导

收稿日期: 2002-02-27; 修回日期: 2002-05-13

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39893320)资助项目; 上海市卫生局青年基金(No. 131014Y16)资助项目

作者简介: 贾春平(1973-), 女, 山东聊城人, 博士研究生, 研究方向: 珠蛋白基因表达调控

通讯作者: 曾溢滔, 中国工程院院士。Tel. 021-62472308; Fax. 021-62475476; E-mail. ytzeng@stn.sh.cn

后,其转录或表达水平是否受影响,目前还未见报道。本研究通过 RT-PCR、流式细胞仪检测,分析 Hm 对 K562 细胞中  $\beta$ -珠蛋白基因及导入的外源性  $\beta$ -珠蛋白基因的转录或表达水平的影响,为研究  $\gamma \rightarrow \beta$  基因开关机制以及临床上治疗  $\beta$ -地中海贫血提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞系

一株 K562 细胞来自本室细胞库,另一株 K562 细胞购自中国科学院细胞生物学研究所,以上细胞均用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基(Gibco)在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

### 1.2 质粒及主要试剂

所用 pEGFP-N1 质粒为 Clontech 公司产品;pcDNA3.1/zero、pGEM-11Z、pSL301 质粒均为 Invitrogen 公司产品;限制性内切核酸酶 *Afl*III、*Not*I 等为 New England Biolabs 公司产品;DOTAP 脂质体为 Roche 公司产品;RT-PCR Kit 为 Gibco 公司产品。

### 1.3 真核基因表达载体 HG 的构建

构建重组质粒 HG 所应用的限制性内切酶反应、凝胶回收、连接及转化反应、质粒的大量提取等方法,均按本实验室常规操作。

### 1.4 Hm 诱导 K562 细胞

细胞在诱导前一天传代,以  $2 \times 10^5$  /ml 个细胞接种到培养瓶,培养 24h 后,换到含 30  $\mu$ mol/L Hm 的新鲜培养基中,分别在 24、48、72h 后收集细胞,未诱导的对照细胞也要同步收集。

### 1.5 K562 细胞转染及瞬时表达

细胞在转染前一天传代,以每毫升  $1 \sim 3 \times 10^5$  个细胞接种到培养瓶,培养 24h 后准备转染,转染前 2~3h 换液。转染步骤为:溶液 A,每样本 5  $\mu$ g 表达载体 HG 或对照空质粒(pcDNA3.1),用培养基 1640 稀释至 50  $\mu$ l;B 液,每样本 30  $\mu$ l(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)脂质体,用培养基 1640 稀释至 100  $\mu$ l;A 液与 B 液轻柔混合,室温放置 15min,再加入适量培养基 1640;将混合物加入用无血清培养基 1640 洗过两次的细胞中,在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下继续培养,8h 后换含 10% 小牛血清的新鲜培养基,诱导组的新鲜培养基

中含 30  $\mu$ mol/L 的 Hm,继续培养 48h。每一样本均转染三瓶细胞。48h 后,收集转染细胞。

### 1.6 流式细胞仪检测

收集转染细胞,用含 2% 小牛血清的 PBS 洗两次,向每一样本细胞加入 0.5ml 鞘液,用流式细胞仪(Becton Dickinson FACS Calibur)测定荧光表达情况。具体检测方法详见文献<sup>[5]</sup>。

### 1.7 RT-PCR 检测

将收集到的 K562 细胞,用 DEPC 水配制的 PBS 洗两次,提取总 RNA,反转录成 cDNA,分别扩增  $\beta$ 、 $\gamma$ -珠蛋白及  $\beta$ -肌动蛋白(actin)基因;对转染 HG 质粒的 K562 细胞 A,同时扩增绿色荧光蛋白(EGFP)及  $\beta$ -肌动蛋白基因,引物序列见表 1。PCR 扩增条件为:94°C 4min,1 个循环;94°C 45s,56°C 45s,72°C 1min,扩增  $\beta$ 、 $\gamma$ -珠蛋白及  $\beta$ -肌动蛋白基因的循环数分别为 32、18、18,同时扩增 EGFP 及  $\beta$ -肌动蛋白基因的循环数为 25。PCR 产物经凝胶电泳检测。

表 1 PCR 扩增所用引物序列  
Table 1 PCR primer sequences

PCR 扩增产物名称	引物序列
$\beta$ -珠蛋白	上游:5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3' 下游:5'-AGC CTG CAC TGG TGG GGT GAA-3'
$\gamma$ -珠蛋白	上游:5'-ACT CGC TTC TGG AAC GTC TGA-3' 下游:5'-GTA TCT GGA GGA CAG GGC ACT-3'
$\beta$ -肌动蛋白	上游:5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC-3' 下游:5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3'
EGFP	上游:5'-CACATGAAGCAGCAGCACTTCT-3' 下游:5'-AACTCCAGCAGGACCATGTGAT-3'

## 2 结 果

### 2.1 重组载体 HG 的构建

重组载体 HG 是将 3.2kbHS2(基因库号码为 U01317;5671-8946)、1.7kb 的  $\beta$ -珠蛋白启动子(基因库号码为 U01317;60467-62187)及 0.95kb 的 EGFP 编码序列分别在 *Eco*RI、*Nco*I 酶切位点处依次连接在 pcDNA3.1 上,EGFP 基因的 3' 端与包含  $\beta$ -珠蛋白基因内含子 2、外显子 3 及 3' 端 1.1kb 的非编码区序列的  $\beta$ E 片段在 *Not*I 酶切位点处连接,经酶切鉴定分析,构建完全正确(图 1)。

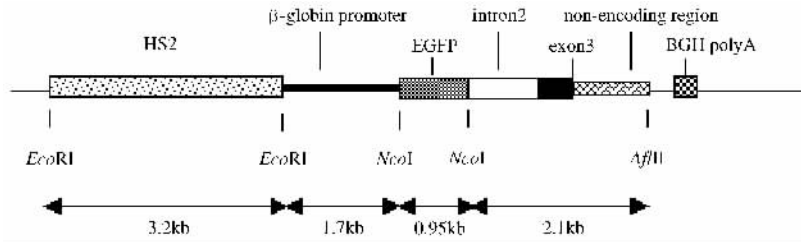


图 1 HG 重组载体示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid HG

## 2.2 Hm 可诱导 K562 细胞中 $\beta$ -珠蛋白 mRNA 水平的升高

通过 RT-PCR 分析, K562 细胞中, 确实存在  $\beta$ -珠蛋白 mRNA, 只是其 mRNA 水平远远低于  $\gamma$ -珠蛋白, 并且用  $30\mu\text{mol/L}$  Hm 诱导 24、48 及 72h 后, 不仅其  $\gamma$ -珠蛋白 mRNA 水平升高, 其  $\beta$ -珠蛋白 mRNA 水平也明显增加, 且这种作用在诱导 24、48h 后更明显, 而相应的  $\beta$ -肌动蛋白 mRNA 水平在诱导前后基本无变化(图 2)。

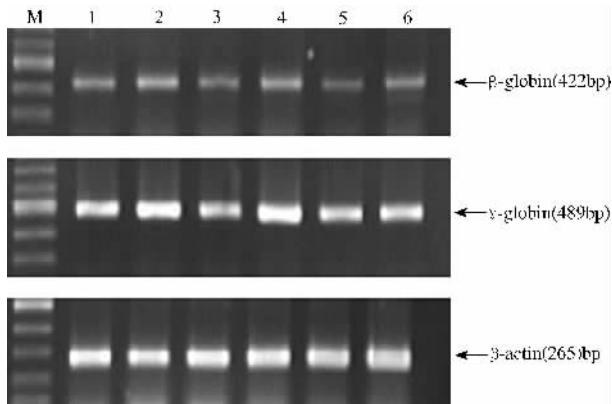


图 2 RT-PCR 扩增 K562 细胞中  $\beta$ 、 $\gamma$ -珠蛋白及  $\beta$ -肌动蛋白基因的凝胶电泳图

M: 100bp Marker; 2、4、6 分别为 Hm 诱导 24、48、72h; 1、3、5 为 24、48、72h 的未诱导对照。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of  $\beta$ 、 $\gamma$ -globin and  $\beta$ -actin genes of K562 cells

M: 100bp Marker; 2、4、6: K562 cells induced 24、48、72 hours with Hm; 1、3、5: K562 cells cultured 24、48、72 hours without Hm.

## 2.3 Hm 可诱导重组表达载体 HG 在 K562 细胞中的瞬时表达

经流式细胞仪分析, Hm 可诱导重组表达载体 HG 在 K562 细胞中的表达, 具体表现在: 表达载体

HG 经脂质体包埋转染 K562 细胞后, 无  $30\mu\text{mol/L}$  Hm 诱导的一组, 表达 EGFP 的 K562 细胞所占比例平均为 1.5%, 而用  $30\mu\text{mol/L}$  Hm 诱导 48h 的一组, 表达 EGFP 的 K562 细胞所占比例平均为 2.1%, 增加了 0.6%。RT-PCR 分析也表明, Hm 可提高重组表达载体 HG 在 K562 细胞中的表达水平(图 3)。

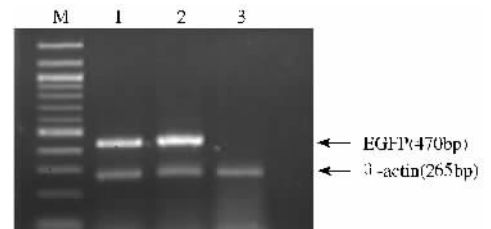


图 3 HG 重组表达载体转染 K562 细胞后, EGFP 及  $\beta$ -肌动蛋白基因的 RT-PCR 结果的凝胶电泳图

M: 100bp Marker; 1: 转染 HG 重组质粒, 未用 Hm 诱导; 2: 转染 HG 重组质粒, 并用 Hm 诱导 48h; 3: 转染对照空质粒, 并用 Hm 诱导 48h。

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of EGFP and  $\beta$ -actin gene in K562 cells transiently transfected with plasmid HG

M: 100bp Marker; 1: K562 cells transfected with plasmid HG; 2: K562 cells transfected with plasmid HG and induced 48 hours with Hm; 3: K562 cells transfected with control plasmid and induced 48 hours with Hm.

## 3 讨 论

Hm 是一种红系分化诱导剂, 可诱导红白血病细胞系 K562 中胚胎/胎儿型的  $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\xi$ 、及  $\alpha$ -珠蛋白基因转录水平升高, 并可用于地中海贫血病的治疗<sup>[2,3]</sup>。此外, 还有研究报道, Hm 可使正常及再障小鼠 CFU-E、BFU-E 数量有不同程度的增加<sup>[6]</sup>。为了探讨 Hm 是否对  $\beta$ -珠蛋白基因的转录有影响,

本研究利用 RT-PCR 及流式细胞仪分析技术,通过分析 Hm 诱导前后, K562 细胞中  $\beta$ -珠蛋白基因及导入外源  $\beta$ -珠蛋白基因的转录水平变化,发现 Hm 可诱导  $\beta$ -珠蛋白基因转录水平升高,且这种作用在诱导 24、48h 后比较明显。为了排除本实验室保存的 K562 细胞株已发生突变的可能性,特从中国科学院细胞生物研究所购买了一株细胞株,进行同样的实验,得到了同样的结果(图略)。

另外,本实验室曾经首次报道了另外一种红系分化诱导剂——羟基脲(HU),不仅可以增加  $\gamma$ -珠蛋白的合成,更重要的是 HU 也能增加  $\beta$ -珠蛋白基因的表达<sup>[7,8]</sup>。两例携带 IVS-2-654-C $\rightarrow$ T 突变基因的中间型  $\beta$  地中海贫血病人经 HU 治疗后,血红蛋白水平明显升高,且这种升高并不是  $\gamma$  基因的作用,因为病人血液中  $\gamma$ -珠蛋白链的含量并没有增加,而  $\beta$ -珠蛋白 mRNA 和  $\beta$ -珠蛋白肽链却显著增加,从而导致血液学的明显改善和临床症状的明显好转,因此推测,Hm 治疗一些  $\beta$  地中海贫血所取得的症状好转,可能也与  $\beta$ -珠蛋白 mRNA 水平的增加有关。本实验室高枫等<sup>[9]</sup>还报道了在一株 K562 变种细胞中,有大量  $\beta$ -珠蛋白基因表达,因此表明在 Hm 或其他因素的影响下,K562 细胞可进一步向红系分化。关于 Hm 诱导红系分化的机理,目前还不是很清楚,已有实验证明,Hm 诱导 K562 细胞后,一些红系转录因子的活性明显增加,如 GATA-1 在 Hm 诱导后,其磷酸化程度增加,GATA-1 结合活性明显增加,从而增加了 GATA-1 与相应 DNA 或其他转录因子的结合机会,增加一些珠蛋白基因的转录<sup>[10]</sup>,在  $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\beta$ -珠蛋白基因启动子上,确实都存在一些 GATA-1 结合位点。另外,还有实验证明,Hm 可增强带有红系转录因子 NF-E2 结合元件的增强子活性<sup>[11,12]</sup>。本研究所用的重组表达载体 HG,在  $\beta$ -珠蛋白基因启动子前加了 HS2 元件,HS2 是  $\beta$ -珠蛋白基因座控制区 LCR 中一个重要的组成部分,是典型的红系增强子,其 300bp 左右的核心序列上有 NF-E2 及 GATA-1 结合位点,因此推测,Hm 对表达载体 HG 的诱导,可能是通过作用于 HS2 元件,也可能作用于  $\beta$ -珠蛋白启动子。此外,HG 表达载体在另外一种小鼠成年型的红白血病细胞 MEL 及转基因小鼠中,都得到有效的特

异表达(另文发表),因此表明,HG 重组载体是研究  $\beta$ -珠蛋白基因表达调控的有效载体。总之,Hm 对 K562 细胞中  $\beta$ -珠蛋白基因及外源  $\beta$ -珠蛋白基因的诱导作用,为药物及基因治疗  $\beta$  地中海贫血的综合应用提供了一定的科学依据。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] Benz E J, Murnane M J, Tonkonow B L, *et al.* Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 3509~3513.
- [2] Dean A, Ley T J, Humphries R K, *et al.* Inducible transcription of five globin genes in (K)562 human leukemia cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 5515~5519.
- [3] Kollia P, Fibach E, Politou M, *et al.* Hydroxyurea and hemin affect both the transcriptional and post-transcriptional mechanisms of some globin genes in human adult erythroid cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 850: 449~451.
- [4] Atweh G F, Sutton M, Nassif I, *et al.* Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease [J]. Blood, 1999, 93: 1790~1797.
- [5] 黄淑帆, 曾凡一, 巩芷娟, 等. 人造干细胞在山羊体内的移植和扩增及分化研究[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(2): 86~89.
- [6] 王传清, 袁弥满. 氯化高铁血红素对正常及再生障碍性贫血小鼠红系祖细胞的体内诱导作用[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19(10): 507~513.
- [7] Zeng Y T, Huang S Z, Ren Z R, *et al.* Hydroxyurea therapy in  $\beta$ -thalassemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced  $\beta$ -globin synthesis[J]. Br J Haematol, 1995, 90: 557~560.
- [8] 黄淑帆, 顾小锋, Fibach E, 等. 羟基脲对  $\beta$ IVS-II-654 C $\rightarrow$ T 基因表达的影响[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(8): 395~398.
- [9] 高枫, 任兆瑞, 黄淑帆. 与抑制 K562 细胞向红系分化相关的 Attractin 基因的分离和初步鉴定[J]. 遗传, 2002, 24(1): 1~5.
- [10] Partington G A, Patient R K. Phosphorylation of GATA-1 increases its DNA-binding affinity and is correlated with induction of human K562 erythroleukaemia cells[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(4): 1168~1175.
- [11] Palma J F, Gao X, Lin C H, *et al.* Iron protoporphyrin IX (Hm) but not tin or zinc protoporphyrin IX can stimulate gene expression in K562 cells from enhancer elements containing binding sites for NF-E2[J]. Blood, 1994, 84(4): 1288~1297.
- [12] Kim Y C, Masutani H, Yamaguchi Y, *et al.* Hm-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2[J]. J Biol Chem, 2001, 276(21): 18399~18406.