

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00469

K562 细胞红系分化过程中 miR-451 表达的变化

薛向阳¹, 张青锋¹, 黄玉富², 潘卫庆^{1,2*}

1. 同济大学传染病与疫苗研究所, 同济大学医学院, 上海 200092
2. 第二军医大学基础部病原生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 观察 K562 细胞红系分化过程中 miR-451 表达的变化, 探讨 miR-451 在红细胞(RBC)形成过程中的作用。 **方法:** 应用 Northern 印迹法分析小鼠不同组织细胞(肝、骨髓、红细胞、白细胞)及人 RBC、鸡 RBC 中 miR-451 的表达情况。采用氯高铁血红素(hemin, 50 $\mu\text{mol/L}$)诱导 K562 细胞红系分化, 诱导 36 h 后应用联苯胺染色及血红蛋白 mRNA RT-PCR 鉴定 K562 细胞红系分化结果, 采用 Northern 印迹法及茎环 RT-PCR 分析 K562 细胞经 hemin 诱导不同时间点(24、48、72、96 h) miR-451 表达的变化。 **结果:** 除红细胞外, 小鼠白细胞、肝脏及骨髓 Northern 印迹均未检测到 miR-451 表达; 人 RBC 及具有细胞核的鸡 RBC 亦检测到 miR-451 表达。小鼠及人 RBC 检测到 2 种 miR-451, 发现了 1 条较 Sanger 中心报道的序列 3' 端多 1 个尿嘧啶的 miR-451 序列。50 $\mu\text{mol/L}$ hemin 诱导后 K562 细胞出现红系分化, 与诱导前相比, 诱导 36 h 后联苯胺染色阳性细胞增多($P < 0.05$), γ 、 δ 及 ϵ 血红蛋白表达增加($P < 0.05$)。Northern 印迹未能检测到 K562 细胞诱导前后 miR-451 表达变化, 但更敏感的茎环 RT-PCR 分析显示, 诱导前 K562 细胞本身低丰度表达 miR-451, hemin 诱导 24 h 后, miR-451 表达丰度开始增加, 随着血红蛋白(δ -globin)表达增加, miR-451 表达进一步增加, 72 h 达高峰。 **结论:** miR-451 是红系分化终末特异高表达的 miRNA, 在人及小鼠 RBC 中均存在相差 1 个碱基的 2 种序列, 其在 K562 细胞红系分化过程中表达升高。

[关键词] K562 细胞; miR-451; 红细胞; 细胞分化

[中图分类号] Q 254 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0469-05

Changes of miR-451 expression during erythroid differentiation of K562 cells

XUE Xiang-yang¹, ZHANG Qing-feng¹, HUANG Yu-fu², PAN Wei-qing^{1,2*}

1. Institute for Infectious Diseases and Vaccine Development, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China
2. Department of Microbiology and Parasitology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the expression of miR-451 during erythroid differentiation of K562 cells and investigate the role of miR-451 in erythroid differentiation. **Methods:** MiR-451 expression was analyzed in different tissues (the liver, bone marrow, erythrocytes, and white blood cells) of mice, human erythrocytes, and chicken red blood cells by Northern blotting. Erythroid differentiation of K562 cells was assessed by DAB staining and RT-PCR of hemoglobin mRNA before and 36 h after hemin induction (50 $\mu\text{mol/L}$). The expression of miR-451 in K562 cells was further explored by Northern blotting and stem-loop RT-PCR before and 24, 48, 72, and 96 h after hemin induction (50 $\mu\text{mol/L}$). **Results:** Expression of miR-451 was only identified in the erythrocytes, not in white blood cells, hepatic cells or bone marrow of mice. MiR-451 expression was also detected in human erythrocytes and chicken erythrocytes with nuclei. Two bands were detected in the human and mouse erythrocytes by Northern blotting, indicating that, in addition to the one reported by Sanger's miRBase, there was another miR-451 sequence which had additional uracil residue in 3' terminal. Hemin induced differentiation of K562 cells and DAB staining showed more positive cells after induction ($P < 0.05$); the expression of γ , δ and ϵ -globin mRNA was also increased after treatment with hemin ($P < 0.05$). Although Northern blotting revealed no changes in miR-451 expression in K562 cells after hemin induction, more sensitive stem-loop RT-PCR showed that miR-451 expression, which maintained at lower level in un-induced K562 cells, was increased during erythroid differentiation 24 h after hemin induction. With the upregulation of δ -globin protein, the expression of miR-451 reached its peak 72 h later. **Conclusion:** miR-451 is specifically and highly expressed in erythroid terminal

[收稿日期] 2007-12-14 **[接受日期]** 2008-02-25

[作者简介] 薛向阳, 博士生. E-mail: wzxxy@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-65985903, E-mail: wqpan0912@yahoo.com.cn

differentiation. Two different sequences of miR-415 (one with and additional uracil residue) are present in the human and mouse erythrocytes, and their expression is elevated during the erythroid differentiation of K562 cells.

[KEY WORDS] K562 cells; miR-415; erythrocytes; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 469-473]

造血干细胞接受骨髓微环境刺激信号后,在维持自我更新的同时会产生不同谱系的血细胞,血细胞谱系的形成是生物体发育和生命维持的重要环节之一。这些过程涉及多个基因的有序开启和关闭,需复杂且精密的调控。大规模基因表达谱分析已筛选出一些决定谱系形成和分化的转录因子及细胞因子受体,如参与红系形成的GATA-1^[1]和FOG-1^[2]。MicroRNA(miRNA)是一类真核生物高度保守的内源性小调节RNA,长度约18~25个核苷酸,通过与靶mRNA特异性碱基配对引起靶mRNA降解或翻译抑制,调控基因转录后表达,参与机体生长发育、细胞增殖、胰岛素分泌和脂肪代谢等多种生理过程^[3-6]。近年来的研究^[7-12]显示,microRNA不但在正常造血过程中发挥着重要作用,而且与血液系统肿瘤发生发展密切相关。我们前期对人红细胞(RBC)小RNA文库进行分析,结果发现miR-415在人RBC中特异性高表达^[13]。因此,本研究进一步分析miR-415在RBC形成过程中的表达情况,探讨其与RBC分化间的相关性,为深入探讨红系分化调控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞及动物 急性红白血病K562细胞株购自美国ATCC公司;健康成年男性RBC来自第二军医大学长海医院中心血站,Hank液洗涤2次,4℃保存;鸡RBC采自3月龄雄性健康家鸡(体质量约2kg),Hank液洗涤2次,4℃保存;8周龄雄性昆明小鼠(体质量约25g)购自第二军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 TRIzol试剂购自Invitrogen公司;红细胞裂解液购自天根生化科技(北京)有限公司;M-MLV逆转录酶、Oligo(dT)₁₅、Taq酶购自宝生物工程(大连)有限公司;RNase抑制剂购自Toyobo公司;Nylon(+)膜购自Pall公司;RPMI 1640培养液购自美国GibcoBRL公司;小牛血清购自Hyclone公司;高效杂交液购自北京博大泰恒生物技术有限公司;Northern生物素-亲和素化学发光试剂购自Pierce公司;氯高铁血红素(hemin)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.3 人RBC、鸡RBC以及小鼠血、肝、骨髓细胞的miR-415表达

1.3.1 小鼠血、肝、骨髓细胞的获取及样品RNA抽提 小鼠眼球取血致死,血液肝素抗凝,Hank液洗

涤2次,按红细胞压积10倍体积加TRIzol试剂;小鼠肝脏以200目钢丝网研磨,收集肝细胞,以红细胞裂解液裂解RBC后,Hank液洗涤2次,计数,每 5×10^6 细胞加1ml TRIzol试剂;小鼠骨髓细胞裂解RBC后,处理同肝细胞。按TRIzol试剂盒说明书分别抽提上述小鼠组织细胞、人RBC及鸡RBC的总RNA,焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水溶解,分光光度计测定260nm及280nm光密度(D)值,确定RNA溶液浓度和纯度。

1.3.2 Northern印迹分析各组织miR-415的表达 标本总RNA经15%尿素变性PAGE胶电泳后,以1mA/cm²电流半干转膜,将RNA转移到尼龙膜,紫外交联,用高效杂交液42℃预杂交1h后,加入生物素标记探针42℃杂交过夜。miR-415生物素标记探针序列为5'-b-AAA CTC AGT AAT GGT AAC GGT TT-3',b代表生物素标记。尼龙膜以含0.5%SDS的2×SSC洗膜2次,再以0.5%SDS、0.5×SSC、50℃洗膜2次后,按Pierce化学发光法说明书检测。

1.4 K562细胞诱导分化过程miR-415的表达

1.4.1 K562细胞培养及诱导分化 K562细胞株培养于含10%小牛血清的RPMI 1640培养液中,以 1×10^5 /ml细胞密度接种于37℃、5%CO₂培养箱中培养。正常情况下每2d换液,4d传代1次。诱导K562细胞时,在细胞传代并换液同时加入终浓度为50μmol/L(用过滤的DMSO溶解)hemin,诱导36h,其后以联苯胺染色法检测血红蛋白表达^[14]及血红蛋白mRNA分析共同鉴定hemin的诱导分化结果。

1.4.2 血红蛋白mRNA RT-PCR分析 诱导前后的K562细胞总RNA定量后,以Oligo(dT)₁₅为RT引物,将mRNA逆转录为cDNA,根据GenBank报道的血红蛋白基因序列(表1),用Primer 5.0软件设计引物,由上海英骏生物技术有限公司合成。以GAPDH作为内参,PCR扩增血红蛋白基因。PCR条件为:94℃ 5min;94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 30s,25个循环;最后72℃ 5min。

1.4.3 茎环RT-PCR分析诱导分化过程miR-415的表达 以终浓度为50μmol/L的hemin持续诱导K562细胞96h,分别于诱导24、48、72及96h收集细胞并抽提细胞总RNA。以GAPDH作为内参,参

考 Chen 等^[15]的方法进行茎环 RT-PCR 检测 miR-451 表达。miR-451 的 RT 引物: 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG AAA CTC AG-3'; PCR 前向引物: 5'-ACA CTC CAG CTG GGA AAC CGT TAC CAT TAC T-3';

PCR 反向引物: 5'-CTG GTG TCG TGG AGT CGG CAA-3'。RT 条件为: 16°C 30 min, 42°C 30 min, 70°C 15 min; PCR 条件为: 95°C 10 min, 随后 95°C 15 s, 60°C 30 s, 68°C 30 s, 26 个循环。再以 8% 中性 PAGE 分析。

表 1 血红蛋白 RT-PCR 分析引物序列

Tab 1 Primers for haemoglobin RT-PCR analysis

Gene name		Primer sequence(5'-3')	Product length (bp)
Globin- α	Forward	TGG CGA GTA TGG TGC GGA G	246
	Reverse	TGG CTT AGG AGC TTG AAG TTG A	
Globin- β	Forward	GCA AAG AAT TCA CCC CAC CAG T	171
	Reverse	GCC CTT CAT AAT ATC CCC CAG T	
Globin- γ	Forward	TGA ATG TGG AAG ATG CTG GA	136
	Reverse	TGT GCC TTG ACT TTG GGG TT	
Globin- δ	Forward	AGG ACA GGA CCA GCA TAA AA	262
	Reverse	ATA ACA GCA TCA GGA GAG GA	
Globin- ϵ	Forward	CCA GAC AGA GAG GCA GCA GC	190
	Reverse	TCC AGG GGT AAA CAA CGA GG	
GAPDH	Forward	CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG TAA	101
	Reverse	GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TGT	

2 结果

2.1 miR-451 在人 RBC、鸡 RBC 及小鼠血、肝、骨髓细胞中的表达差异 结果显示: 小鼠血液、骨髓及肝脏等造血组织来源细胞中, miR-451 在 RBC 中高表达, 而在小鼠白细胞、肝细胞和骨髓细胞中均未检测到 miR-451 表达(图 1A), 证实 miR-451 在小鼠红系终末分化阶段才出现高丰度表达。miR-451 在人 RBC 中特异性高表达(图 1B)。非哺乳动物鸡 RBC 亦检测到 miR-451 表达(图 1B), 说明 miR-451 在产生红细胞的不同动物间具保守性。此外, 人及小鼠 RBC 泳道显示 2 个条带, 除外降解可能, 提示 miR-451 应存在个别碱基差别的 2 种分子形式(图 1)。Sanger 中心 miRNA 数据库中 miR-451 序列为 5'-AAA CCG UUA CCA UUA CUG AGU U-3', 本研究在小鼠及人 RBC 中除克隆到这条序列外, 还克隆到 3' 端多 1 个 U 的序列, 即 5'-AAA CCG UUA CCA UUA CUG AGU UU-3', 暂命名前者为 miR-451a, 后者为 miR-451b; 而鸡 RBC 未能检测到 miR-451b 表达。

2.2 K562 细胞红系分化过程 miR-451 表达的变化

2.2.1 K562 细胞诱导红系分化的鉴定 联苯胺染色法结果: 经 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 hemin 诱导 36 h 后, 联苯胺染色阳性细胞从诱导前的 (2.3 \pm 1.3) % 升高至 (27.6 \pm 5.6) % ($P < 0.05$); 血红蛋白 mRNA 分析结果: 与诱导前相比, hemin 诱导 36 h 后血红蛋白

γ 、 δ 、 ϵ mRNA 相对表达量(相应 globin/GAPDH)明显增加 ($P < 0.05$), 而血红蛋白 α 、 β mRNA 相对表达量未见明显变化(图 2)。

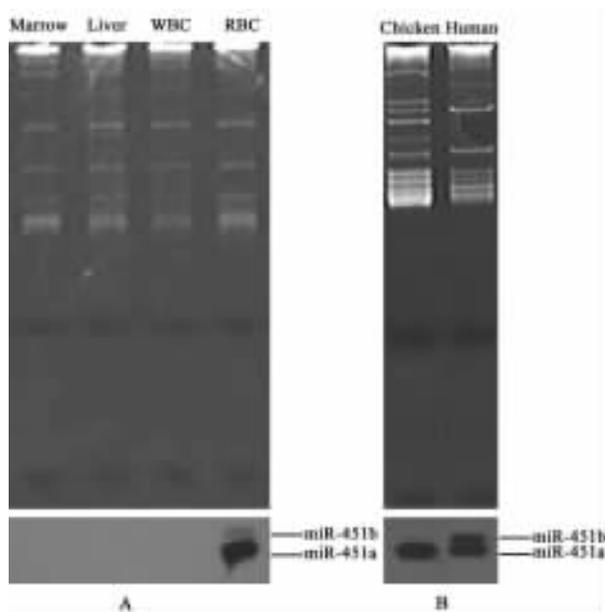


图 1 miR-451 在小鼠不同组织细胞及鸡、人 RBC 中的表达
Fig 1 Analysis of miR-451 expression in different tissues of mouse and erythrocytes of human and chicken

Above panels: Ethidium bromide staining of polyacrylamide gel before Northern blot analysis; Bottom panels: Northern blot analysis with miR-451 specific probe. A: Different hemopoietic tissues of mouse, 5 μg of total RNAs were analyzed; B: Chicken RBC and human RBCs, 10 μg of total RNAs were analyzed

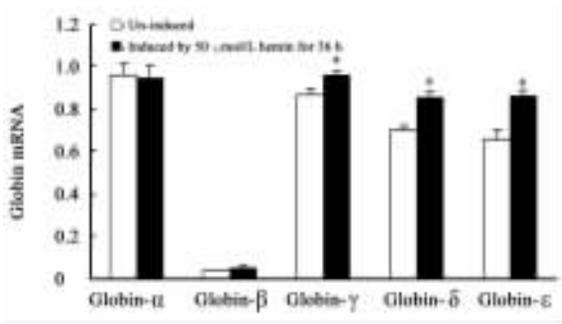


图2 K562细胞诱导后血红蛋白各成分 mRNA 表达的变化

Fig 2 RT-PCR results of haemoglobin expression in K562 cells before and after hemin induction

* $P < 0.05$ vs un-induced K562 cells; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2.2 诱导分化过程 miR-451 表达的变化 由于 Northern 印迹敏感度较差,未能检测到 K562 细胞诱导前后 miR-451 表达变化(图 3A),为此,本研究采用更敏感的茎环 RT-PCR 方法分析 miR-451 表达情况。结果(图 3B)表明:诱导前 K562 细胞本身低丰度表达 miR-451, hemin 诱导 24 h 后, miR-451 表达丰度开始增加,随着血红蛋白表达增加(δ -globin), miR-451 表达丰度进一步增加, 72 h 达高峰。

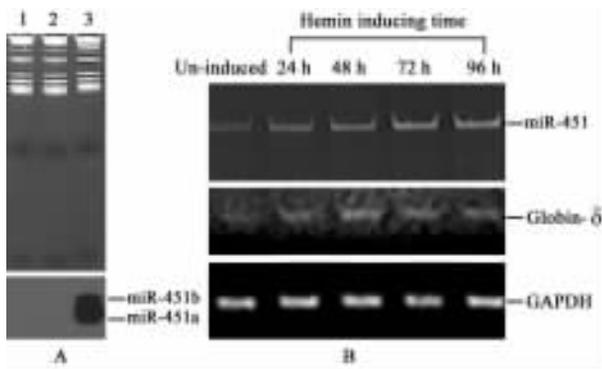


图3 K562细胞诱导过程 miR-451 表达的变化

Fig 3 Analysis of miR-451 expression in K562 cells before and after hemin induction

A: Northern analysis of miR-451 expression with 10 μg total RNAs. 1: Un-induced K562 cells; 2: K562 cells induced by hemin for 36 h; 3: Human RBCs. Above panel: Ethidium bromide staining of polyacrylamide gel before Northern blot analysis; Bottom panel: Northern blot analysis with miR-451 specific probe. B: Stem-loop RT-PCR analysis of miR-451 expression in K562 cells before and after hemin induction for different incubation periods

3 讨论

miRNA 是血细胞早期分化和谱系形成过程中

的重要调节者。过表达 miR-181 能促进小鼠 B 细胞形成, miR-142s 和 miR-223 则能促进 T 细胞形成^[7]; 在人巨核细胞形成过程中, miR-130a 靶向参与糖蛋白 II b 启动子激活的 MAFB 转录因子, miR-10a 靶向 HOXA1 参与血小板形成^[16]; 靶向癌基因 c-Kit 的 miR-221 和 miR-222 调节红系分化^[9]。在血细胞分化不同阶段, miRNA 表达也是一个动态过程。在巨核细胞分化早期, miR-223 和 miR-15a-miR-16-1 表达下调, 体外培养 14 d 后, 这些 miRNAs 又恢复到最初干细胞水平; 而 miR-181b、miR-155、miR-106a、miR-17 及 miR-20 则一直表达下调^[16]。我们前期对人 RBC 小 RNA 文库的分析结果^[13]发现 miR-451 在人 RBC 高丰度表达, 与 Rathjen 等^[17]的结果类似; 芯片分析结果^[18]也表明 miR-451 在红系发育中特异高表达。为进一步探讨 miR-451 与 RBC 发育的关系, 本研究动态观察 RBC 分化形成过程中 miR-451 的表达。

哺乳动物最早的造血部位在卵黄囊, 随后转移到胎肝, 最后骨髓维持永久造血。本研究的 Northern 印迹分析结果表明, 小鼠肝脏、骨髓及白细胞未检测到 miR-451 表达, 说明 miR-451 是 RBC 终末分化阶段才特异高表达的 miRNA。此外, 本研究除确定了 Sanger 中心报道的 miR-451 序列外, 还验证了 3' 端多 1 个尿嘧啶的序列。哺乳动物细胞同时表达 2 种类型 miR-451 (miR-451a、miR-451b), 而有核的鸡 RBC 仅表达 miR-451a, 这种差异有待进一步研究。

K562 细胞在 hemin 作用下会出现联苯胺染色阳性细胞和胎儿血红蛋白(HbF)合成增加等红系分化特征^[14], 为此, 本研究选择 K562 细胞进一步分析红系分化进程 miR-451 表达的变化。结果发现 K562 细胞本身就低水平表达 miR-451, 伴随着以 γ 、 δ 、 ϵ 血红蛋白表达增加为特征的 K562 红系分化过程, miR-451 表达也随之升高。因为 K562 细胞是 β 珠蛋白相对缺陷的细胞, 诱导后也未见其表达明显增加。本研究结果提示 miR-451 可能不参与血红蛋白类型转换。Zhan 等^[18]的芯片分析结果亦表明 miR-451 参与 RBC 形成的调节。本研究再次证明了 miR-451 在 K562 细胞红系分化中的调节作用, 并发现了 2 种类型的 miR-451, 但二者功能是否存在差别、miR-451 作用的靶基因有哪些等问题仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Fujiwara Y, Browne C P, Cunniff K, Goff S C, Orkin S H. Ar-

- rested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 12355-12358.
- [2] Tsang A P, Visvader J E, Turner C A, Fujiwara Y, Yu C, Weiss M J, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation [J]. Cell, 1997, 90: 109-119.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431: 350-355.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [5] Plasterk R H. Micro RNAs in animal development [J]. Cell, 2006, 124: 877-881.
- [6] Poy M N, Spranger M, Stoffel M. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. Diabetes Obes Metab, 2007, 9 (Suppl 2): 67-73.
- [7] Chen C Z, Li L, Lodish H F, Bartel D P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. Science, 2004, 303: 83-86.
- [8] Chen C Z, Lodish H F. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis [J]. Semin Immunol, 2005, 17: 155-165.
- [9] Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth *via* kit receptor down-modulation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 18081-18086.
- [10] Kluiver J, Kroesen B J, Poppema S, van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies [J]. Leukemia, 2006, 20: 1931-1936.
- [11] Lawrie C H. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function [J]. Br J Haematol, 2007, 137: 503-512.
- [12] Liao R, Sun J, Zhang L, Lou G, Chen M, Zhou D, et al. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells [J]. J Cell Biochem, 2008 Jan 11 [Epub ahead of print]
- [13] Xue X, Zhang Q, Huang Y, Feng L, Pan W. No miRNA were found in Plasmodium and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection [J]. Malar J, 2008, 7: 47.
- [14] Huo X F, Yu J, Peng H, Du Z W, Liu X L, Ma Y N, et al. Differential expression changes in K562 cells during the hemin-induced erythroid differentiation and the phorbol myristate acetate (PMA)-induced megakaryocytic differentiation [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 292(1-2): 155-167.
- [15] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, Zhou Z, Lee D H, Nguyen J T, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: e179.
- [16] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 5078-5083.
- [17] Rathjen T, Nicol C, McConkey G, Dalmay T. Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host [J]. FEBS Lett, 2006, 580: 5185-5188.
- [18] Zhan M, Miller C P, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Song C Z. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation [J]. Exp Hematol, 2007, 35: 1015-1025.

[本文编辑] 尹 茶

• 书 讯 •

《中药不良反应与临床》已出版

本书由沈丕安编著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0709-4,452页,16开,定价75.00元。

本书由上海市名中医、从事中医临床工作四十余年的沈丕安主任精心编撰,以临床常用中药为主,对常用中药的毒性和不良反应作了精辟的论述。本书起点高,不仅包括中医中药传统理论知识及药理毒理知识,而且包含了编者的宝贵临证体会,适合中医药临床医师、教师、学生、中西医结合专业、中医药工作人员阅读、参考。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大新华书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>