

· 药理与临床 ·

苦参碱诱导 K562 细胞分化的差异表达基因的研究

何於娟¹, 蒋纪恺¹, 张彦¹, 刘小珊², 马凌娣¹, 欧一衡³, 涂植光¹

(1. 重庆医科大学 临床生化教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院 血液科, 重庆 400016; 3. 重庆市永川市人民医院, 重庆 402160)

摘要:目的 研究苦参碱诱导人红白血病 K562 细胞分化的分子机制。方法 应用改良的 mRNA 差异显示逆转录技术 (DDRT-PCR) 筛选苦参碱诱导 K562 细胞分化相关的差异表达基因; 对差异 cDNA 片段纯化、克隆、测序及 Blast 分析, 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法验证。进一步对其中的未知差异 cDNA 片段采用 Northern 杂交确定其转录本的大小及组织分布特性, 进而充分利用多种生物信息学资源对差异片段进行结构和功能的预测。结果 苦参碱诱导 K562 细胞前后存在明显的基因表达差异, 筛选获得了 17 条差异条带。其中 4 个差异显著片段经 RT-PCR 验证后, 在 Genbank 中分析, 有 3 个为已知基因, 1 个可能为未知基因, 暂命名为 KH 基因。Northern 杂交证实 KH 基因转录本的大小为 1.35 kb, 分布于正常人体脑组织中。结论 苦参碱具有诱导 K562 细胞基因表达谱发生变化的作用, 由苦参碱诱导的 K562 细胞分化是一个多基因参与的过程; KH 基因可能是苦参碱作用 K562 细胞后表达量发生改变的未知基因, 可能与细胞癌变有关。

关键词: 苦参碱; K562 细胞; 诱导分化; 差异表达基因

中图分类号: R979.1; R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0224-05

Differentially expressed genes in K562 cell differentiation induced by matrine

HE Yu-juan¹, JIANG Ji-kai¹, ZHANG Yan¹, LIU Xiao-shan²,MA Ling-di¹, OU Yi-heng³, TU Zhi-guang¹

(1. Department of Clinical Biochemistry, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China;

2. Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Science Chongqing 400016, China; 3. The People's Hospital of Yongchuan City, Chongqing 402160, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of differentiation of human erythro-leukemia K562 cells induced by matrine. **Methods** The improved mRNA differential display reverse technique-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) was used to screen the differentially expressed genes related to K562 cells between before and after being treated with matrine. The differentially expressed cDNA fragments were purified, cloned, sequenced, and Blast analyzed. RT-PCR was used to examine the expression levels of the differentially expressed cDNA. Northern blot was adopted to confirm the transcript length and distribution of the cDNA fragments with unknown differentiation, then their structures and functions were analyzed by comparing their base sequences with multiple public bioinformatic resources. **Results** Significant difference in gene expression was observed in K562 cells before and after being treated with matrine. Seventeen bands of differential genes were isolated, cloned, and sequenced. Four of them were analyzed in Genbank and confirmed by RT-PCR. The Blast result showed that three of them were the known genes, while one of them may be an unknown gene named as KH gene temporarily. The Northern blot result showed that KH gene distributed in normal human brain tissue, whose transcript size was 1.35 kb. **Conclusion** Matrine plays an important role in regulating the differentiation-related gene expression. And K562 cell differentiation induced by matrine is a complex process in which many genes are involved. The KH gene may be a differentiation-related unknown candidate gene with changes of expression amount in K562 cells being treated with matrine that probably relates to cell canceration.

Key words: matrine; K562 cells; induced differentiation; differentially expressed genes

收稿日期: 2004-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670881; 30171150)

作者简介: 何於娟 (1972—), 女, 四川南充人, 副教授, 医学科学博士, 主要研究方向为中药抗肿瘤的分子机制研究。

Tel: (023) 68485006 68485216 Fax: (023) 68485005 E-mail: hjy2753@hotmail.com

苦参是我国传统的常用中药,具有抗炎、抗肿瘤等作用,苦参碱是其主要的生物碱。K562细胞是一株分化极差、具有多向分化潜能的人红白血病细胞,是体外诱导分化实验的常用模型。前期研究表明,0.2 mg/mL 苦参碱可诱导 K562 细胞向成熟方向分化,并且显著影响 K562 细胞的细胞周期、端粒酶活性、细胞骨架以及 c-myc 和 N-ras 等原癌基因的表达等^[1~5]。细胞分化受阻的根本原因是基因表达的异常,细胞表型的改变是基因表达改变的结果。因此,克隆分化相关的差异表达基因是研究苦参碱诱导分化机制的关键。mRNA 差异显示技术是梁鹏等^[6]1992 年建立的一种以 PCR 为基础的,从总 RNA 入手,能有效鉴别并克隆一对组织或细胞差别表达基因的方法。本研究运用改良的 DDRT-PCR 技术筛选苦参碱诱导 K562 细胞分化的差异表达基因,探讨苦参碱诱导 K562 细胞分化的分子机制,为进一步开发苦参碱的药效,实现对白血病的非杀伤性治疗的目标奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞:对照组 K562 细胞由本校病理生理教研室惠赠,0.2 mg/mL 苦参碱处理组 K562 细胞由本室自建。苦参碱(相对分子质量 248.36,纯度 99.9%),由日本大正制药公司惠赠。Trizol 试剂购自 Gibco BRL 公司;DDRT-PCR 全套引物均购自中国科学院上海细胞生物研究所;pGEM-T easy vector system 试剂盒购自 Promega 公司;小量 PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;Alk Phos 标记试剂盒购自 Amershan Life Science 公司;Multiple Tissue Northern (MTN[®]) Blot 试剂盒购自 Clontech 公司。

1.2 细胞培养:取对数生长期的 K562 细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 (Gibco, 美国) 培养液调节细胞浓度为 1×10^5 /mL, 实验组加入苦参碱至终质量浓度为 0.2 mg/mL, 对照组加入等量细胞培养液,37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养 3 h。

1.3 总 RNA 的提取:按说明书采用 Trizol 试剂提取对照组与苦参碱处理组 K562 细胞的总 RNA。然后用 RNase-free DNase I 去除样品中 DNA 的污染,再经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,回收总 RNA。测定总 RNA 吸光度 (A) 值并经电泳检测其纯度。

1.4 引物设计:上游引物为随机引物 (D₁、D₂、D₃、D₄、D₅ 5 种),各含 10 个碱基。下游引物为锚定引物,共 4 组,序列为 dT₁₂MA (T₁₂AA、T₁₂CA、T₁₂GA),dT₁₂MG (T₁₂AG、T₁₂CG、T₁₂GG),dT₁₂MC

(T₁₂AC、T₁₂CC、T₁₂GC),dT₁₂MT (T₁₂AT、T₁₂CT、T₁₂GT)。

1.5 差异显示逆转录 PCR (DDRT-PCR):分别以 4 组锚定引物为引物,合成以苦参碱诱导前后 K562 细胞总 RNA 为模板的 cDNA 第 1 链。将 2 μg 纯化总 RNA 70 °C 水浴变性 5 min 后立即转入冰浴,在 20 μL 逆转录反应体系中,含 2 μg 纯化总 RNA,20 μmol/L 锚定引物 1.5 μL,40 U/μL RNase 抑制剂 1 μL,5×逆转录酶缓冲液 4 μL,40 mmol/L dNTP 4 μL,200 U/μL M-MLV 逆转录酶 1 μL,0.1% DEPC 水补足 20 μL,混匀后 37 °C 水浴 1 h,反应完毕后 95 °C,5 min 灭活逆转录酶终止反应,-20 °C 保存备用。

以一组锚定引物对一种随机引物作不同组合,分别用对照组与处理组的以该锚定引物逆转录的逆转录产物 cDNA 做模板,进行 PCR 扩增。在 20 μL PCR 反应体系中,含 cDNA 3 μL,40 mmol/L dNTP 1.6 μL,20 μmol/L 锚定引物 0.5 μL,20 μmol/L 随机引物 0.5 μL,2 U/μL Taq DNA 聚合酶 1 μL,10×PCR 缓冲液 2 μL,消毒双蒸水补足 20 μL。反应条件为:94 °C、5 min,94 °C、1 min,40 °C、4 min,72 °C、1 min;94 °C、30 s,50 °C、2 min,72 °C、1 min,共 40 个循环;72 °C、7 min。PCR 产物与上样缓冲液混匀后,在 6% 非变性聚丙烯酰胺 mini 凝胶上 150 V 稳压,电泳 2~3 h,电泳完毕,将聚丙烯酰胺凝胶取出,置于含 EB 的电泳缓冲液中染色 30 min,紫外灯下观察电泳结果,找出有差异的 cDNA 条带。

1.6 差异 cDNA 的回收、扩增、克隆及筛选:切割含差异显示 cDNA 片段的胶条于 EP 管内,加 100 μL TE 溶液室温孵育 10 min 后沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 10 μL 进行 2 次 PCR 扩增,反应条件不变,电泳检查后,选择只有一条电泳条带的扩增产物经小量 PCR 产物纯化试剂盒纯化,然后克隆至 pGEM-T easy vector,转化至感受态 JM109 菌中,并利用 pGEM-T easy vector 带有氨苄西林 (Ampicillin) 耐受基因及 LacZ 基因的诱导表达等特点,进行阳性克隆的筛选,再提取质粒,用 EcoR I 酶切鉴定重组子。

1.7 克隆片段的序列分析及同源性比较^[7,8]:将含有插入片段的阳性克隆菌寄至上海申友生物技术有限公司,用 T7 引物或 SP6 引物测序。根据测序结果,去掉载体上的核酸序列,利用 GenBank 等网上公共生物资源对插入片段的碱基序列进行无限制方

式 (no restriction mode, NR) 的同源性比较,进一步对未知 cDNA 片段进行表达序列标签 (expressed sequence tags, EST)、蛋白质、mRNA 等的同源性比较、基因区域预测以及开放阅读框架 (open reading frame, ORF) 与模体 (motif) 的分析、染色体的定位等多种生物信息资源数据库的比较与分析。

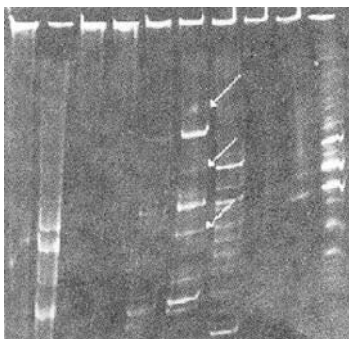
1.8 差异显示 cDNA 片段的半定量 RT-PCR 验证:分别以调整至同一浓度的对照组与苦参碱处理组 K562 细胞的总 RNA 为模板,用 Oligo (dT)₁₈ 逆转录合成全部 cDNA 第 1 链,用根据各差异显示 cDNA 片段的测序结果设计各片段内部的一对特异性引物,以 β -actin (F5'-ACACTGTGCCCATCT-ACGAGG-3', R5'-AGGGGCCGGACTCGTCAT-ACT-3', 扩增产物 621 bp) 为内参照进行 RT-PCR 检测。PCR 产物用含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪分析结果,检测其吸光度 (A) 值,与内参照比较计算相对含量。

1.9 未知 cDNA 片段的 Northern 杂交分析:采用 Alk Phos 试剂盒对未知 cDNA 片段进行碱性磷酸酶标记后作为探针,用 Multiple Tissue Northern (MTN[®]) Blot 试剂盒进行 Northern 印迹杂交分析。

2 结果与分析

2.1 苦参碱处理前后 K562 细胞 mRNA 的差异显示结果:采用改良的 DDRT-PCR 技术,以苦参碱处理前后 K562 细胞为差异显示样品进行差异显示分析,获得 17 条差异条带,部分结果见图 1。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



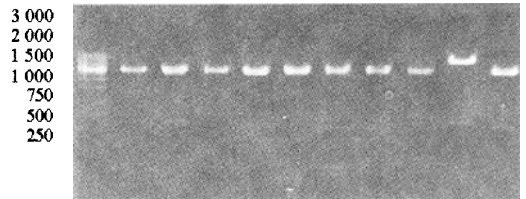
1,3,5,7,9-对照组 K562 细胞
2,4,6,8,10-苦参碱处理组 K562 细胞
箭头所指为差异基因显示条带
1,3,5,7,9-K562 cells of control group
2,4,6,8,10-K562 cells of matriline group
arrowheads direct bands of differential genes

图 1 DDRT-PCR 产物的 PAGE 鉴定

Fig. 1 Identification of DDRT-PCR products by PAGE

2.2 差异 cDNA 重组子的酶切鉴定结果:有差异的片段回收后 2 次 PCR 再扩增,扩增产物纯化后克隆至 pGEM-T easy vector,根据蓝白筛选结果,挑取白色菌落,经小量质粒提取后,用限制性内切酶 *EcoRI* 消化,琼脂糖凝胶电泳可见插入片段者为重组质粒,部分结果见图 2。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M-DNA 标准品 (250,500,750,1 000,1 500,2 000,3 000 bp)
1,3,5-阴性质粒 2,4,6,7,8,9,10-重组质粒
M-DNA marker (250, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000, 3 000 bp)
1,3,5-negative vector 2,4,6,7,8,9,10-recombinant vector

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Enzyme restriction identification of recombinant vector

2.3 序列分析及同源性比较结果:选择 4 个差异显著 cDNA 片段的重组质粒测序分析,标记为 1[#]~4[#] 克隆,4 个克隆均来自苦参碱处理 K562 细胞后表达受抑的区带。将所获得的 4 个序列以无限制方式通过资料最为丰富的核酸-核酸序列数据库,在 GenBank 中进行核酸序列的同源性比较,同源性比较结果见表 1。结果表明 1[#]~3[#] 克隆与已知蛋白质或蛋白酶的碱基序列高度同源,1[#] 克隆与 NADH-泛醌还原酶 100% 同源,2[#] 克隆与单链 DNA 结合蛋白 (SSBP) 100% 同源,3[#] 克隆与人类核糖体蛋白 S11 (RPS11) 100% 同源。4[#] 克隆定位于 16 号染色体上,与已知序列无高度同源性,为一未知的 cDNA 片段。对未找到同源性的 4[#] 克隆,进一步从蛋白质数据库、mRNA 库及 EST 库 (含 dbEST, 人 EST) 进行同源性比较,结果均未发现有显著同源性的基因登录,提示该 4[#] 克隆可能为一种未知基因的 EST,称之为 EST00111,经 GenBank 登录注册后,获得注册号为 BMO77298,dbEST ID 10245338,暂命名为 KH 基因。该差异显示 cDNA 片段再与高通量基因组序列 (high throughput genomic sequences, HTG) 库和人基因组库比较,发现该片段与人类 16 号染色体 contig 的 NT 010498.8 的序列有高达 97% 的同源性。进一步通过 GenBank 的人类 Genome View,发现该差异显示片段定位于 16 号染色体的长臂 12 区 2 带

(16q12.2);ORF 分析找到了一个 204 bp (68 个氨基酸)的完整 ORF;4[#]克隆的 motif 分析则发现其富含 bra 与 reti 可能为一功能片段。以上分析表明 4[#]克隆可能是一个已被人类基因组计划测序且定位在 16 号染色体的长臂 12 区,但尚未被分离克隆的未知基因。

2.4 差异 cDNA 片段的 RT-PCR 验证结果:4 个

表 1 4 个差异 cDNA 片段在不限制数据库的同源性比较结果

Table 1 Homogenous comparison of four differential cDNA fragments in unrestricted database

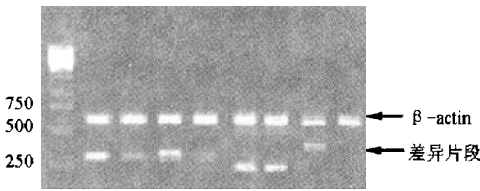
克隆	同源基因	得分	E 值
1 [#]	人 NADH-脱氢酶(泛醌)Fe-S 蛋白 5 (15kD) (NADH-辅酶 Q 还原剂),克隆 MGC:1 496,mRNA	513	e-143
	人 NADH-泛醌氧化还原酶 15 kDa IP 亚单位 mRNA,核基因编码蛋白	513	e-143
2 [#]	人单链 DNA 结合蛋白 (SSBP1),mRNA	618	e-175
	人单链 DNA 结合蛋白,克隆 MGC:5 185		
3 [#]	人单链 DNA 结合蛋白 mRNA,完整 cds	787	0.0
	人核糖体蛋白 S11 (RPS11),mRNA		
	人克隆 IMAGE:3343838, mRNA		
4 [#]	人核糖体蛋白 S11,克隆 MGC:19681 IMAGE:3357773, mRNA,完整 cds	1023	0.0
	人 16 号染色体克隆 RP11-463J22		

表 2 4 个差异 cDNA 片段的 RT-PCR 结果 (A 值)

Table 2 RT-PCR results of four differential cDNA fragments (A value)

组别	1 [#]			2 [#]			3 [#]			4 [#]		
	目的基因	β-actin	相对比值	目的基因	β-actin	相对比值	目的基因	β-actin	相对比值	目的基因	β-actin	相对比值
对照	119.80	135.20	0.89	116.07	148.47	0.78	144.00	147.53	0.98	66.07	141.33	0.47
苦参碱	50.40	144.77	0.35	40.53	147.63	0.27	119.47	150.10	0.80	0.00	145.53	0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



M-DNA 标准品 1、3、5、7-1[#]、2[#]、3[#]、4[#]克隆对照组 2、4、6、8-1[#]、2[#]、3[#]、4[#]克隆苦参碱组

M-DNA standard 1, 3, 5, 7-1[#], 2[#], 3[#], 4[#] clone of control group 2, 4, 6, 8-1[#], 2[#], 3[#], 4[#] clone of matrine group

图 3 差异 cDNA 片段的 RT-PCR 结果

Fig. 3 RT-PCR results of differential cDNA fragments

常规的 Northern 杂交是以标记的差异 cDNA 片段为探针,对苦参碱诱导前后的 K562 细胞的 RNA 进行杂交分析。本实验在序列分析、同源性比较及 RT-PCR 检测的基础上,直接借助克隆技术多种组织的 Northern blot 试剂盒杂交分析,可见探针与正常人体脑组织的 mRNA 获得了明显的杂交信号,杂交带位于 1.35 kb 处,结果见图 4。

3 讨论

机体正常发育过程或病理变化过程中,无论是多基因的综合作用还是单基因的突变,本质上都是基因表达改变所致。各型白血病的发病均受到基因

差异 cDNA 片段的 RT-PCR 扫描结果见表 2。可见 1[#]~4[#]克隆的相对比值均为苦参碱处理组表达受抑,与 DDRT-PCR 检测结果一致,尤其是 4[#]克隆——未知基因 KH,发现其分布于对照组 K562 细胞中,在苦参碱处理组 K562 细胞中无表达,电泳结果见图 3。

2.5 未知差异 cDNA 片段的 Northern 杂交结果:

9.5 kb
7.5 kb
4.4 kb
2.4 kb
1.35 kb
0.24 kb

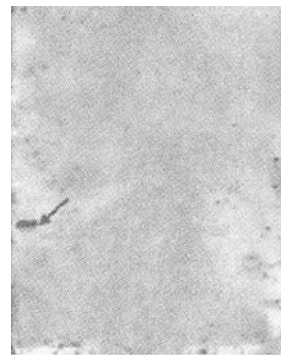


图 4 差异 cDNA 的 Northern blot 结果

Fig. 4 Northern blot result of differential display cDNA

表达调控异常的影响,均是基因表达异常导致造血干/祖细胞分化受阻于不同阶段所致。因此,寻找差异表达基因将有助于揭示造血细胞分化受阻的机制,也将为苦参碱用于白血病的治疗提供新的基因治疗靶点。

1-脑 2-心 3-骨骼肌 4-结肠(无黏膜) 5-胸腺 6-脾
7-肾 8-肝 9-小肠 10-胎盘 11-肺 12-外周血白细胞
1-brain 2-heart 3-skeletal muscle 4-colon (no mucosa)
5-thymus 6-spleen 7-kidney 8-liver 9-small intestine
10-placenta 11-lung 12-peripheral blood leukocyte

结合本实验室的特点,笔者在经典 DDRT-PCR 方法的基础上做了一些改变:①采用胞浆 RNA 代替稳定性较差的 mRNA;②采用非变性的凝胶电泳^[9],降低差异显示条带的复杂性及后期工作的复杂性;③采用 mini PAGE 代替测序胶 PAGE,EB 染色代替放射自显影,使操作更为简便、安全。

K562 细胞是分化极差的白血病细胞,具有多向分化潜能。本实验选取 0.2 mg/mL 苦参碱作用 K562 细胞 3 h 为分离差异表达基因的时间点,试图得到诱导早期 K562 细胞行为改变时的相关基因,为在分子水平揭示苦参碱诱导细胞分化调控的启动机制奠定基础。结果发现:苦参碱处理 K562 细胞 3 h 后,即有明显的 cDNA 差异显示,其中既有诱导表达的区带,也有下调的区带。提示苦参碱作用的靶点可能是在基因水平上,涉及多个基因的激活与失活。本实验获得的 4 个克隆均来自苦参碱处理 K562 细胞后表达受抑的区带。首先以无限制方式通过资料最为丰富的核酸-核酸序列数据库,在 GenBank 中进行核酸序列的同源性比较。结果表明除 4[#]克隆外,其余 3 个克隆均与已知的蛋白或蛋白酶完全相符或高度同源,提示获得的 3 个克隆为已知蛋白(酶)或其家族成员,1[#]克隆的同源蛋白主要是与细胞的 ATP 生成直接相关的 NADH-泛醌还原酶,这提示苦参碱可能通过作用于细胞氧化呼吸链来引起细胞的增殖抑制,尚需进一步证实。2[#]克隆的同源蛋白是 SSBP,SSBP 是 DNA 复制所必需的蛋白质,它的功能在于稳定 DNA 解开的单链,阻止复性和保护单链部分不被核酸酶降解,保证 DNA 复制的正常进行。由于它来自于苦参碱处理后表达受抑的区带,所以推测苦参碱作用 K562 细胞使其增殖受抑与 DNA 的复制受抑有关。3[#]克隆与人类核糖体蛋白有高度同源性,核糖体是翻译合

成蛋白质的场所,这提示苦参碱的诱导分化作用还涉及到了蛋白质翻译过程。这些推测都有待进一步证实。而 4[#]克隆在 GenBank 中未发现同源性的基因登录,但是已被人类基因组计划测序和染色体定位,目前尚未被克隆和功能研究的未知基因的 EST,Northern 杂交确定了其转录本的大小和在正常人体组织中的分布特性,为下一步的全长克隆与功能研究提供了线索。本课题组正在对这个与细胞癌变相关的未知基因进行全长克隆和功能研究,这将为在分子水平阐明苦参碱对 K562 细胞的诱导分化机制提供有价值的信息。

References:

[1] Zhang Y, Jiang J K, Liu X S, *et al.* Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by matrine [J]. *Nat Med*, 1998, 52(4): 295-299.
 [2] He Y J, Jiang J K, Zhang Y, *et al.* The changes of SmCD of K562 cells induced by matrine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(8): 730-731.
 [3] Zhang L P, Jiang J K, Tam J W, *et al.* Effects of matrine on proliferation and differentiation in K562 cells [J]. *Leuk Res*, 2001, 25(9): 793-800.
 [4] Zhang Y, Liu X S, Xu X R, *et al.* Investigations of cytoskeleton of K562 cells induced by matrine [J]. *J Chongqing Med Univ* (重庆医科大学学报), 2002, 27(4): 386-387.
 [5] He Y J, Jiang J K, Ou Y H, *et al.* Matrine affects early expression of proto-oncogenes in K562 cells [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2002, 21(4): 369-372.
 [6] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257(5072): 967-971.
 [7] Hou L. *Decode Life—Human Genome Project and Post-Genome Project* (解码生命——人类基因组计划和后基因组计划) [M]. Beijing: Science Press, 2000.
 [8] Bailey L C, Searls D B, Overton G C. Analysis of EST-driven gene annotation in human genomic sequence [J]. *Genome Res*, 1998, 8(4): 362-376.
 [9] Bauer D, Muller H, Reich J, *et al.* Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(18): 4272-4280.

美国 ALPHA 实验室认可
美国际合作中国企业

葡萄籽提取物

(原花青素 ≥ 95%)

专业生产厂家

电话: 0086-022-25293102; 25295475

传真: 0086-022-25293103

网址: <http://www.jf-natural.com>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司

天津经济技术开发区第十二大街