2000, 25(4)
337-339

维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2000)04-0337-03

苦参碱诱导K562细胞分化相关cDNA的克隆

张 彦，蒋纪恺，刘小珊，刘北忠，许相儒，何渝军
（重庆医科大学临床生化教研室 重庆 400016）

R733.7

摘 要：目的 克隆苦参碱诱导人白血病K562细胞分化的相关基因，以求了解白血病细胞分化及苦参碱的作用机制。**方法** 以人白血病细胞K562为研究对象，在苦参碱诱导其分化的基础上，利用mRNA差异显示技术对K562细胞在苦参碱诱导前及诱导后48小时的基因表达情况进行分析。**结果** 在苦参碱诱导前后的K562细胞之间存在明显的基因表达差异，一些基因在诱导后表达增强，而一些基因经苦参碱作用后表达减弱甚至完全抑制。经克隆和筛选获得部分表达差异的cDNA片段，为进一步研究苦参碱的诱导分化机制及肿瘤细胞发生和分化机制打下了基础。**结论** 苦参碱具有调控分化相关基因表达的作用，苦参碱诱导K562细胞分化是多基因共同参与的过程。

关键词： 差异显示PCR；苦参碱；K562细胞；cDNA 白血病 克隆 mRNA
中国图书分类法分类号： R917.3 **文献标识码：** A **收稿日期：** 2000-03-01

Cloning of differentiation-related cDNA induced by matrine from K562 cell line

ZHANG Yan, et al
（Department of Clinical Biochemistry, Chongqing Medical University, 400016）

Abstract: Objective To clone differentiation-related genes of human leukemia K562 cells, and to study the mechanism of differentiation of K562 cells induced by matrine. **Methods** Differentially expressed genes between K562 cells and their matrine-treatment cells have been investigated by mRNA differential display technique. **Results** There were obvious differences in gene expression of K562 cells before and after matrine treatment. The expression of some genes was decreased or inhibited while that of other genes was active. **Conclusion** Matrine plays an important role in regulating the differentiation-related gene expression. The differentiation induced by matrine is a complex process with multiple genes involved.

Key Words: DDRT-PCR; Matrine; K562 cells; cDNA

前期研究表明，一定浓度的苦参碱可诱导人白血病K562细胞株向成熟方向分化，并且显著影响K562细胞的细胞周期和端粒酶活性[1,2]。众所周知，细胞表型的改变是基因表达发生改变的结果。上述研究结果提示苦参碱对K562细胞的诱导分化中存在基因表达的改变，因此，克隆相关的基因是研究苦参碱诱导分化作用机制和研究肿瘤细胞发生与逆转机理的关键。本实验以K562细胞为研究对象，用苦参碱作用K562细胞，建立了mRNA差异显示逆转录PCR这一研究系统。

1 材料与方法

基金项目： 国家自然科学基金资助项目（39670881）；
重庆市科委中青年科技专家基金资助项目（99-33-48）

作者介绍： 张 彦（1968- ），女，讲师，博士

1.1 **细胞培养** 取对数生长期的人白血病细胞株K562，用含10%小牛血清的RPIM 1640（GIBCO, U.S.A）培养液调节细胞数为1×10^5个/ml，加入苦参碱使其终浓度为0.1mg/ml，对照组除未加苦参碱外其余与处理组相同。处理组与对照组细胞在37℃、5% CO_2条件下培养48 h。

1.2 **细胞总RNA的提取** 总RNA提取试剂盒购自湖南联盛高技术产业有限公司。实验所用器皿均经过焙烤、DEPC水处理以灭除RNase。按照试剂盒说明书分别提取苦参碱处理组及对照组K562细胞的总RNA。分别取50 μg总RNA，加入10 u RNase抑制剂，10u 无RNase的DNase I于50 μl反应体系中37℃孵育30 min，酚、氯仿提取后，乙醇法沉淀总RNA，取适量DEPC水溶解后测得A260 / A280 = 1.9～2.0，放-20℃冰箱备用。

1.3 **引物设计** DDRT-PCR全套引物购自中国科学院上海细胞生物学研究所。下游引物共4个，各由14个碱基组成，序列为T12MN（M=A, G, C; N=A, T, G, C），上游引物含10个碱基，共20种。

1.4 **mRNA的逆转录** 取1.0 μg不同处理的K562细胞的

维普资讯 http://www.cqvip.com

RNA，在20μl反应体系中加入终浓度为2.5μM的上游引物、10 u的RNase抑制剂（GIBCO BRL）、300 u的M-MLV逆转录酶（GIBCO BRL）、M-MLV逆转录酶反应缓冲液、10mM的DTT、20μM的dNTPs，混匀后37℃下孵育60 min，反应完毕后95℃水浴5min以终止反应，4℃放置。

1.5　cDNA扩增　以逆转录产物为模板进行PCR扩增，反应体系共20μl，含：2μl逆转录产物，1×PCR buffer，2.5μM下游引物，1μM上游引物，20μM dNTPs，5μCi[α-^{32}P]dCPT（购自北京市亚辉生物医学工程公司），1.5 u Taq polymerase。反应条件：变性94℃ 30 s；退火40℃ 2 min；延伸72℃ 30 s。反应40个循环后，72℃延伸7min。

1.6　cDNA扩增片段电泳　PCR产物与样品缓冲液混合后，在6%非变性聚丙烯酰胺凝胶上以60W恒功率电泳3 h，凝胶于80℃干燥30 min。-20℃曝光过夜，次日显影。

1.7　特异带的获得　在显影的X光胶片上寻找在苦参碱处理组与对照组之间有明显差异的条带。将X光片与凝胶对齐，用锋利的刀片切下与差异条带相对应的凝胶条放入一只离心管中，加入100μl二蒸水，室温孵育10 min，100℃煮沸15 min，取6μl为模板，除不加同位素外，按前述PCR条件再次扩增，电泳检查后进行亚克隆。

1.8　目的序列的亚克隆　按照试剂盒说明书将扩增的PCR产物与pGEM-T Easy Vector（Promega公司）连接，转化E. Coli JM109菌株。提取质粒，用EcoR I内切酶消化，鉴定重组子。

1.9　斑点杂交　用对照K562细胞及苦参碱作用48 h后的K562细胞的RNA进行逆转录，同时掺入放射性底物[α-^{32}P]-dCTP进行cDNA单链标记作为探针，筛选重组克隆。

2　结　果

2.1　苦参碱处理前后K562细胞mRNA的差异显示

利用苦参碱处理前后K562细胞的总RNA，去除残留的DNA之后，由下游引物逆转录成ss cDNA，再加上10个碱基的上游引物扩增后进行电泳，成功显示了苦参碱处理组与对照组之间的差异带（图1）。



图1　聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影图

1,3：苦参碱处理的K562细胞；

2,4：对照K562细胞

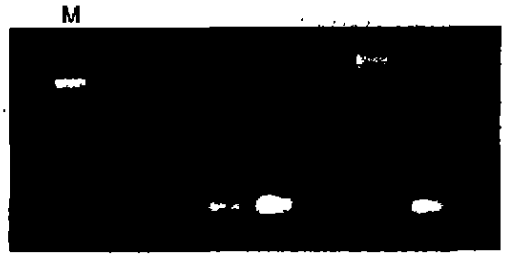


图2　差异cDNA的再次扩增

M:分子量标准

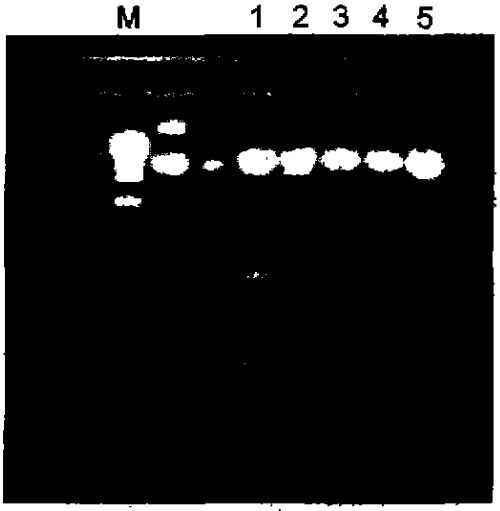


图3　差异cDNA重组子的酶切鉴定

M: 分子量标准；1: 阳性对照；2,3,4,5: cDNA插入片段

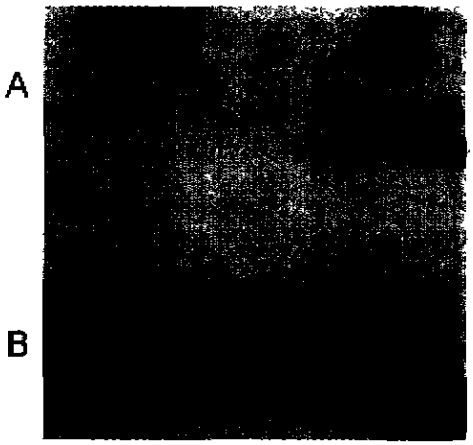


图4　mRNA差异克隆的差别杂交

A：对照K562细胞制备的探针

B：苦参碱处理K562细胞制备的探针

2.2　特异带的获得

从聚丙烯酰胺凝胶上共回收了数十条有明显差异的cDNA片段。

2.3　分化相关cDNA的再扩增

从聚丙烯酰胺凝胶上将特异带切下来，洗脱，并以此为模板再次进行PCR，均有特异扩增（图

维普资讯 http://www.cqvip.com

2）。

2.4 重组子的酶切鉴定

重组质粒经内切酶EcoR I 消化后，琼脂糖凝胶电泳可见插入片段（图3）。

2.5 重组子与K562细胞分化相关性的确认

对照及苦参碱处理的K562细胞的^{32}P标记的cDNA单链探针分别与含差异cDNA片段的重组子进行斑点杂交，可以观察到重组子与两种探针的杂交结果存在明显差异（图4）。

3 讨 论

在肿瘤发生发展过程中，肿瘤组织会出现与其相应正常组织不同基因表达水平的mRNA，因而寻找并发现这些差异有助于揭示肿瘤发生发展的本质，也为肿瘤的治疗提供新的基因治疗靶点。

mRNA差异显示逆转录PCR（mRNA differential display reverse transcription PCR，DDRT-PCR）技术是1992年由Liang 和Pardee等根据基因的选择性表达而建立的一种分子克隆策略[3]。它能直观地将在不同时期或不同器官中表达的基因展示出来，从而分离那些特异表达的基因。此法是证明和分离不同细胞或同种细胞在不同条件下差异表达的基因的方法，自1992年问世以来在国内外得以广泛应用并由此获得了多个人类新基因。同递减式杂交法等以前的旧方法比较而言，虽然在原理上有相似之处，但DDRT-PCR法耗时少且灵敏度提高了50倍。此项技术几经完善后[4,5]得到了广泛的应用，在肿瘤、心血管疾病、内分泌、神经生物学、白血病等研究方面取得了丰硕的成果，证明了它是分离和研究特异表达基因的有效、快捷、方便的手段[6~8]。

苦参碱(matrine)是从苦参(sophora flavescens)、山豆根等豆科槐属植物的干燥根中提取的一种生物碱活性成分。研究表明苦参碱有抗炎症、抗过敏、抗病毒、抗心率失常及抗肿瘤等多种药理作用[9]。

本实验结果发现苦参碱诱导K562细胞分化过程中有多基因的表达差异，这样的结果可能是苦参碱导致多基因的表达改变或者是多基因共同参与了苦参碱的诱导分化作用，也可能是二者兼有。

运用DDRT-PCR方法得到一批在白血病K562细胞与苦参碱处理的K562细胞中表达差异的cDNA克隆，其中一些在苦参碱作用后表达增强，一些在苦参碱作用后表达减少甚至表达受抑，我们采用逆转录法制备cDNA探针，一次性地检测所有的重组克隆，简化了筛选克隆的工作，节省了时间。

本实验获得了一部分表达差异的cDNA片段克隆，初步证实它们在苦参碱诱导分化前后在mRNA表达水平上存在差异，但它们的性质、功能、与诱导分化的关系、在肿瘤发生发展中所起的作用都有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Zhang Yan, Jiang Jikai, Liu Xiaoshan, et al. Differentiation and apoptosis in K562 erythroleukemia cells induced by Matrine [J]. Natural Medicine, 1998;52(4):295-299.

[2] 张丽萍，蒋纪恺，谭永安，等．苦参碱对K562细胞株端粒酶活性和细胞周期的影响[J]．中华肿瘤杂志，1998;20(5):328-329.

[3] 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.

[4] Liang P.,Averbourh L., Pardee A.B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization [J]. Nucleic Acid Res., 1993; 21(14):3269-3275.

[5]Bauer D.H., Muller J., Reich H., et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) [J]. Nucleic Acid Res., 1993;21(8):4272-4280.

[6] 周 煜．mRNA差示技术的原理及其应用[J]．生物技术通讯，1995;6(3):128-131.

[7]Nishio Y.L.P., Aiello G.L. Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cell identified by mRNA different display [J]. FASEB, 1994;8:103-106.

[8] Mao M., Yu M., Tong J.H., et al. RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell [J].Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,1996;93:5910-5914.

[9] 李先荣，方 增．苦参生物碱的药理研究及其临床应用[J]．山西中医，1985;1(3):49.