

铁剥夺在 TPA 诱导 K562 细胞分化中对细胞生长分化及 EGR1mRNA 表达的影响^{*}

房定珠¹ 李晓斌¹ 廖清奎² 王大斌 马小玉 陈洪波
(湖北十堰 郧阳医学院附属太和医院儿科 442000)

摘要 目的: 通过 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中干预细胞铁代谢探讨白血病细胞铁与细胞分化的关系及对 EGR1mRNA 表达的影响。方法: 应用体外细胞培养技术通过细胞形态、细胞化学染色观察细胞生长分化情况; 用 FCM、RT-PCR 等技术检测细胞周期、细胞表面分化抗原 CD33、CD14 及 EGR1mRNA 的表达。结果: 在 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中铁剥夺可明显抑制 K562 细胞生长, 并可阻止 TPA 诱导 K562 细胞分化, 使 K562 细胞停止在 S 期。铁剥夺可降低 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中 EGR1mRNA 的表达。讨论: 铁剥夺明显抑制 K562 细胞生长、阻止 TPA 诱导 K562 细胞分化, 故铁剥夺剂(DFO)可能作为一种辅助抗癌药用于白血病的化疗, 但由于它能阻止白血病细胞的分化, 故不宜用于白血病的诱导分化治疗。铁剥夺使 K562 细胞分化过程中 EGR1mRNA 表达降低可能参与了阻止 TPA 诱导 K562 细胞的分化过程。

关键词: 铁剥夺; 细胞分化; EGR1mRNA; 细胞周期; 细胞表面分化抗原

中图分类号: R737-7 **文献标识码:** A

K562 Cell Growth and Differentiation and EGR1mRNA Expression were Affected by Iron Deprivation During TPA- Induced K562 Cell Differentiation

FANG Ding-zhu, LI Xiao-bing, LI Qing-kui^{*}, WANG Da-bin, MA Xiao-yu, CHEN Hong-bo

Department of pediatrics, Taihe Hospital of YunYang Medical College of Shiyan, HuBei 442000, China

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between iron and K562 cells differentiation and EGR1mRNA expression by TPA inducing K562 cells differentiation and interfering with iron metabolism. **Methods:** Morphology(Wright's staining, NSE staining, iron staining) and flow cytometry were applied to observe the differentiation characteristics of K562 cells, cell-cycle and the differentiation antigen expression of CD33, CD14 on the surface of cells. PT-PCR was applied to assay the EGR1mRNA expression. **Results:** The rate of K562 cell growth was 8.67%, 6.01% and 98.88% in k562 + TPA group, TPA+ Fe group and TPA- Fe group respectively. The rate of differentiation-inducing of K562 was 4.5% and 95%, 92.5%, 11% in the control group and other three experiment groups, respectively. K562 cells with NSE staining showed strong positive in groups of TPA or TPA+ Fe treatment K562 cell, but negative or weak positive in most cells both control group and TPA- Fe treatment K562 cell group. Inhibiting rate of NaF of K562 was 16.13%, 58.72%, 61.93% and 19.23% in every group respectively. Cell cycle remained at S phase in the control group and TPA- Fe group: the percent of S phase cells was 60.21% and 60.99% respectively, but in groups of TPA or TPA+ Fe treatment K562 cell, cell-cycle remained at G0+ G1 phase: the percent of their cells was 51.7% and 53.69% respectively. The expression of CD33 on the surface of cells was similarly 0.99, 0.93, 0.92 and 0.96 in every group respectively. The expression of CD33 on the surface of cell was different: in TPA group and TPA+ Fe group (0.31 and 0.44 respectively), in control group and TPA- Fe group(0.05 and 0.09 respectively). EGR1mRNA was expressed only in three experiment groups with TPA or TPA+ Fe group or TPA- Fe group: 1.0173 ± 0.0223 , 0.992 ± 0.039 and 0.4993 ± 0.028 respectively. Our experiment suggested that iron deprivation inhibited cell growth and blocked cell differentiation and decreased EGR1mRNA expression, and cell cycle remained at the S period during TPA-inducing K562 cell.

Conclusion: K562 cell growth were inhibited and their differentiation were blocked at cell cycle S period, so the agent of iron deprivation could be regarded as a supplementary anticancer drug in chemical therapy of leukemia. EGR1mRNA expression was reduced by iron deprivation during TPA-inducing K562 cell differentiation and could participate in blocking K562 cell differentiation course induced by TPA.

Key words: Cell differentiation; Cell differentiation antigen; Cell cycle; EGR1mRNA

铁是所有生物体所必需的元素, 它参与许多重要的生化过程如细胞生长、分化、氧运输等; 在能量代谢和 DNA 合成中, 催化关键反应的酶是含铁酶。许多转录因子与生长因子的活性表达依赖于铁^[1]; EGR1 基因是一种与细胞生长、分化、凋亡有关的转录因子, 它的活性表达在多种细胞的分化过程中均能检测到, 它不仅与正常组织细胞的生长、分化、凋亡有关, 而

且与肿瘤关系密切^[2]。在细胞分化过程中铁与 EGR1 的关系鲜有报道; 本研究通过 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中干预细胞铁代谢来观察对 EGR1mRNA 表达及对细胞分化的影响, 从分子水平探讨白血病细胞铁与细胞分化的关系及对 EGR1mRNA 表达的影响。

^{*} 基金项目: 本科题受湖北省教育厅基金资助(NO. 2004D012)

作者简介: 房定珠, (1965-), 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤治疗与肿瘤热疗。E-mail: fdzc@Sohu.com

(收稿日期: 2006-04-16 接受日期: 2006-05-07)

1 料和方法

1.1 试剂:

TPA 购于 ICN(U. S. A) 公司, 用无血清的 RPMI- 1640 培养基配制 16nmol/L 工作液, - 20℃ 冻存. RPMI- 1640, 特级新生小牛血清, 焦碳酸二乙酯(DEPC) 购于 GIBCO 公司, 细胞总 RNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司, DL- 2000Marker 购于 Takara 公司, 一步法 RT- PCR 试剂盒购于大连宝生物工程公司. 去铁胺(DFO) 购于 Giba 公司, 三氯化铁(FeCl₃) 购于 Baker 公司, 均用超纯水配制成 20μmol/L 的工作液, 4℃ 保存备用.

1.2 细胞培养:

K562 细胞株由本研究室提供. K562 细胞置与经 60℃ 灭活的 10% 的新鲜小牛血清的 RPMI- 1640 培养基中, 37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度的 CO₂ 培养箱中悬浮培养, 2- 3 天传代一次, 0.4% 的台盼蓝染色鉴定细胞活性在 90% 以上, 取第 3- 4 天处于指数生长期的细胞进行实验.

1.3 TPA、Fecl₃、DFO 的浓度及作用时间的选定:

参照文献^[1,3]及预试验结果, 确定 TPA, Fecl₃, DFO 的最适浓度和最佳作用时间, TPA 终浓度为 16nm/L, Fecl₃, DFO 均终浓度为 20μM/L.

1.4 实验分组

- 实验分四组:
- 1 组(空白对照组, K562) K562 细胞普通培养
 - 2 组(实验组, TPA+ K562) K562 细胞+ TPA 培养
 - 3 组(实验组, TPA+ Fe+ K562) K562 细胞+ TPA+ Fecl₃ 培养
 - 4 组(实验组, TPA- Fe+ K562) K562 细胞+ TPA+ DFO 培养

1.5 RT- PCR 检测 EGR1mRNA 基因表达

1.5.1 细胞总 RNA 提取和鉴定: 组织/ 细胞总 RNA 提取试剂盒说明书进行操作, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度及含量, 各样本 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.7- 2.0 之间, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 RNA 特征性三条带 28S, 18S, 5S.

1.5.2 引物合成: 根据参考文献^[4]提供的 EGR1, β- actin 的 cDNA 序列由北京赛百盛基因技术公司合成, 纯化, 用无 Rnase 的灭菌双蒸水溶解为 20μM/L, - 20℃ 保存备用. 引物序列如下:

EGR1 sense 5- TGC AGA TCT TGA CCC GTTC- 3
Antisense 5- GGA GAT GGT GCT GAG GACG- 3

产物: 489bp
β- actin sense 5- CCA AGG CCA ACC GCG AGA G- 3
Antisense 5- AGG GTA CAT GGT GGT GCC GC- 3
产物: 587bp

1.5.3 RT- PCR 反应: 取样本 RNA 各 2ug, 按一步法 RT- PCR 试剂盒推荐条件操作, 以 β- actin 为内参照, 反应条件为 94℃ 变性 1min, 57℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 2min, 共行 30 次循环.

1.5.4 电泳: 取 PCR 扩增产物 2ul, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以溴乙啶显色后在 GDS- 8000 凝胶成像系统上用 Grab- II 软件摄取电泳图象, 再用 Gelworks ID 分析软件进行分析, 以各目的片段与 β- actin 的像素值之比进行半定量分析.

1.6 细胞形态观察:

各待测培养细胞制成 1× 10⁴/ml 细胞悬液, PBS 洗涤两次, 离心涂片, 自然干燥后瑞氏染色, 油镜下观察细胞形态, 计数 200 个细胞, 计算诱导分化率. 诱导分化率% = (已分化细胞数/200) × 100%. 已分化细胞指早幼粒细胞以下的细胞.

1.7 非特异性酯酶(NSE)染色:

将实验组和空白对照组细胞计数后接种于 6 孔培养板进行培养, 细胞密度为 1× 10⁶ 个/ 孔. 于 4d 收集各组细胞制成 1× 10⁴/ml 细胞悬液, PBS 洗涤两次, 离心涂片, 10% 甲醛生理盐水固定, NSE 作用液 37℃ 处理 90min, 干后镜检. 同时每张涂片做氟化钠抑制实验, 计算氟化钠抑制率.

结果判断: 胞浆中有棕黑色颗粒的为阳性细胞, 每片计数 200 个细胞, 计算阳性率. 氟化钠抑制率% = [(氟化钠抑制前阳性细胞数- 氟化钠抑制后阳性细胞数)/ 氟化钠抑制前阳性细胞数] × 100%.

1.8 流式细胞仪检测细胞周期及细胞表面抗原 CD33、CD14:

各待测培养细胞制成 1- 2× 10⁶/ml 单细胞悬液, PBS 洗涤两次, 1500r× 5min, 收集细胞, 上流式细胞仪检测.

1.9 统计学分析:

率的比较用 X² 检验, 均数的比较用方差分析(组间两两比较用 SNK- q 检验).

2 结果

2.1 铁对细胞生长的影响:

TPA- Fe 组 K562 细胞生长明显受抑制, 在 DFO 作用 1d 细胞生长速度即开始减慢, 随作用时间延长生长抑制愈明显, 至 4d 后存活细胞很少, 大多数细胞凋亡, 其生长抑制率为 98.88%. 其他三组细胞增殖明显, TPA、TPA+ Fe 组 K562 细胞有明显的聚集现象. 各组之间两两比较见表 3- 1 所示.

表 3- 1 铁对各组细胞生长的影响
Table 3- 1 The influence of Fe on the cell growth in each group

组别	细胞数(× 10 ⁵ / ml)					生长抑制率(%)	X ²	P
	day0	day1	day2	day3	day4			
K562(对照组)	2.0	3.9	10.5	36.8	71.5			
K562+ TPA	2.0	3.3	8.9	31.2	65.3	8.67*	327.27	0.0000
K562+ TPA+ Fe	2.0	4.5	11.2	38.5	67.2	6.01		
K562+ TPA- Fe	2.0	1.8	1.5	1.2	0.8	98.88* △▲		

注: * P< 0.05(均与对照组比较), △P< 0.05(第三、四组 VS 第二组) ▲P< 0.05(第四组 VS 第三组)
* P< .05(all compared with control group). P< 0.05(group 3 and 4 vs group 2). ▲P< 0.05(group 4 vs group 3)

2.2 铁对细胞分化的影响

2.2.1 细胞形态: TPA 组、TPA+ Fe 组 K562 细胞趋向成熟分化, 第 4d 在光学显微镜下见多数细胞出现成熟细胞的特征,

如细胞胞体变大, 胞浆染色变淡, 可见空泡样改变, 核浆比率缩小, 可见内外胞浆, 核、核仁减少或消失, 核染色质由疏松趋向致密, 核形态扭曲折叠或肾形, 呈幼稚单核细胞样; 诱导分

化率为 95% 和 92. 5%。TPA- Fe 组多数细胞凋亡, 成活的细胞形态多与对照组 K562 细胞相似, 即胞体大, 圆形或椭圆形, 胞核大而圆, 有 2- 3 个核仁胞浆极少的原始细胞, 早幼阶段以下的细胞极少。各组之间两两比较见表 3- 2 所示。

表 3- 2 铁对 K562 细胞诱导分化的影响
Table 3- 2 The influence of Fe on the differentiation of TPA- induced K562 cells

组别	已分化细胞(个)	未分化细胞(个)	合计	诱导分化率(%)	X ²	P
K562(对照组)	9	191	200	4. 5		
K562+ TPA	190	10	200	95. 0 [*]		
K562+ TPA+ Fe	185	15	200	92. 5 [*]	593. 75	0. 0000
K562+ TPA- Fe	22	178	200	11. 0 ^{△▲}		

注: ^{*} P< 0. 05(均与对照组比较), [△]P< 0. 05(第三、四组 VS 第二组), [▲]P< 0. 05(第四组 VS 第三组)
^{*} P< . 05(all compared with control group). [△]P< 0. 05(group 3 and 4 vs group 2). [▲]P< 0. 05(group 4 vs group 3).

2. 2. 2 非特异性酯酶(NSE)染色: 单核细胞非特异性酯酶染色阳性, 可被氟化钠抑制, 抑制率> 50%, 粒系细胞呈阴性或弱阳性, 不被氟化钠抑制。本实验发现空白对照组及 TPA- Fe 组 K562 细胞 NSE 染色绝大多数呈阴性, 阳性率仅为 15. 5% 和 13%, 以弱阳性为主, 氟化钠抑制率分别为 16. 13% 和 19. 23%; TPA、TPA+ Fe 处理 4d 的 K562 细胞 NSE 染色呈阳性和强阳性, 阳性率分别为 86%、88%, 且这两组 K562 细胞 NSE 染色多数阳性细胞可被氟化钠抑制, 阳性率由氟化钠抑制前的 86%、88% 下降为 35. 5%、33. 5%, 氟化钠抑制率分别为 58. 72%、61. 93%。各组之间两两比较见表 3- 3。

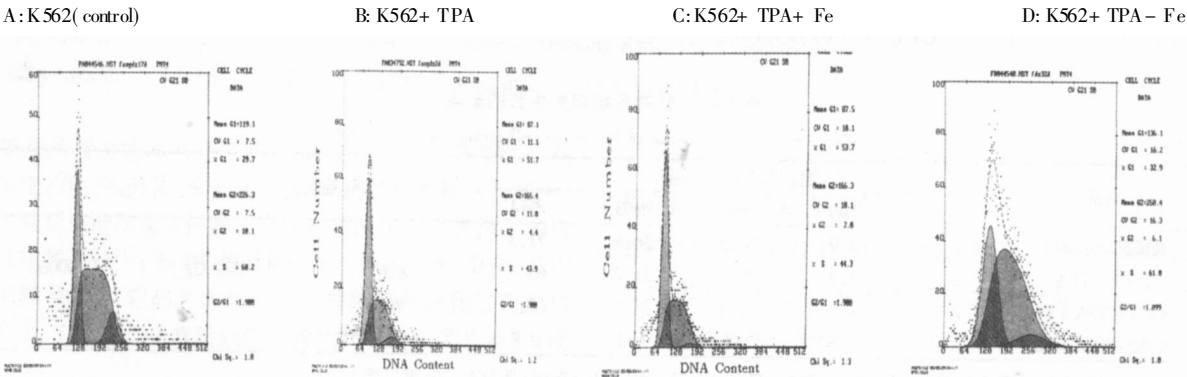
表 3- 3 各组 K562 细胞 NSE 染色及氟化钠抑制率的改变
Table 3- 3 NSE staining of K562 cells and NaF inhibition ratio in each group

组别	NSE 染色(细胞数)			X ²	P	抑制前 阳性	抑制后 阳性	抑制率%	X ²	P
	阳性	阴性	阳性率%							
K562	31	169	15. 50	31	26	16. 13				
K562+ TPA	172	28	86. 00 [*]	172	71	58. 72 [*]			36. 58	0. 0000
				423. 88	0. 0000					
K562+ TPA+ Fe	176	24	88. 00 [*]	176	67	61. 93 [*]				
K562+ TPA- Fe	26	174	13. 00 ^{△▲}	26	21	19. 23 ^{△▲}				

注: ^{*} P< 0. 05(均与对照组比较), [△]P< 0. 05(第三、四组 VS 第二组) [▲]P< 0. 05(第四组 VS 第三组)
^{*} P< 0. 05(all compared with control group). [△]P< 0. 05(group 3 and 4 vs group 2). [▲]P< 0. 05(group 4 vs group 3).

2. 2. 3 各组 K562 细胞周期及细胞表面分化抗原 CD33、CD14 的变化: 我们应用流式细胞仪检测了各组 K562 细胞 4d 时细胞周期的变化情况, 空白对照组及 TPA- Fe 组多数细胞处于 S 期, S 期细胞比率各为 60. 21% 和 60. 99%; TPA、TPA+ Fe 组多数细胞被阻滞在 G0+ G1 期, 该期细胞比率分别为 51. 7% 和 53. 69%, S 期细胞减少各为 43. 91% 和 44. 28%, 各组 G2+ M 期细胞数变化不大, 如图 3- 1; 同时检测了细胞表面分化抗原 CD33、CD14 的变化, 代表髓系祖细胞表面分化抗原 CD33, 在 TPA、TPA+ Fe 组随着时间延长其表达有所减少分别为 93% 和 92%, 但与对照组比较无显著性差异; 代表成熟单核细胞表面分化抗原 CD14 表达逐渐增多各为 31% 和 44%; 而空白对照组及 TPA- Fe 组仍以 CD33 表达为主, 各为 99% 和 96%。如图 3- 2; 各组之间两两比较结果见表 3- 4。

图 3- 1 各组 K562 细胞周期变化
Figure 3- 1 K562 cell cycle changes in each group

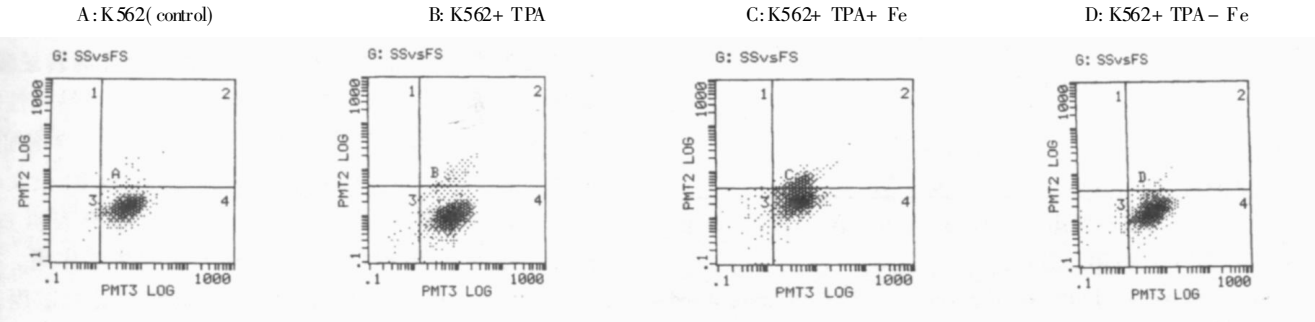


A 图, D 图为对照组和 TPA- Fe 处理 4d K562 细胞周期的变化, 均以 S 期细胞为主; B 图, C 图为 TPA, TPA+ Fe 各处理 4d K562 细胞周期的变化, 均以 G0+ G1 期细胞较多。

Diagram A and D are K562 cell cycle changes in control group and induced by TPA- Fe 4d, all taking the cells in S period as the dominant factors.
Diagram B and C are the changes of K562 cell cycle induced by TPA, TPA+ Fe respectively 4d, more cells present at Go+ G1 phase.

图 3- 2 各组 K562 细胞表面分化抗原 CD₃₃ CD₁₄的表达情况

Figure 3- 2 Expression of CD₃₃ and CD₁₄ on the surface of K562 cells in each group



该图第 1 象限为 CD14 的表达, 第 4 象限为 CD33 的表达, 第 2 象限为 CD33 和 CD14 的共同表达。
A 图,D 图为对照组和 TPA- F_n 处理 4d K562 细胞表面抗原 CD33、CD14 的表达, 以第 4 象限 CD33 的表达为主; B 图, C 图为 TPA, TPA+ F_n 各处理 4d K562 细胞表面抗原 CD33、CD14 的表达, 第 2 象限 CD33 和 CD14 共同表达均见增加。
In this diagram, Quadrant 1 is the expression of CD₁₄, Quadrant 4 is the expression of CD₃₃, Quadrant 2 is the common expression of CD₃₃ and CD₁₄.
Diagram A and D are the expressions of CD₃₃ and CD₁₄ on the surface of K562 cells in control group and induced by TPA- Fe 4d, taking the expression of CD₃₃ in Quadrant 4 as the dominant factor; Diagram B and C are the expressings of CD₃₃ and CD₁₄ on the surface of K562 cells induced respectively by TPA and TPA- Fe 4d, and increasing of the expressions of CD₃₃ and CD₁₄ in Quadrant 2.

表 3- 4 各组细胞周期比例及细胞表面分化抗原 CD₃₃ CD₁₄的变化

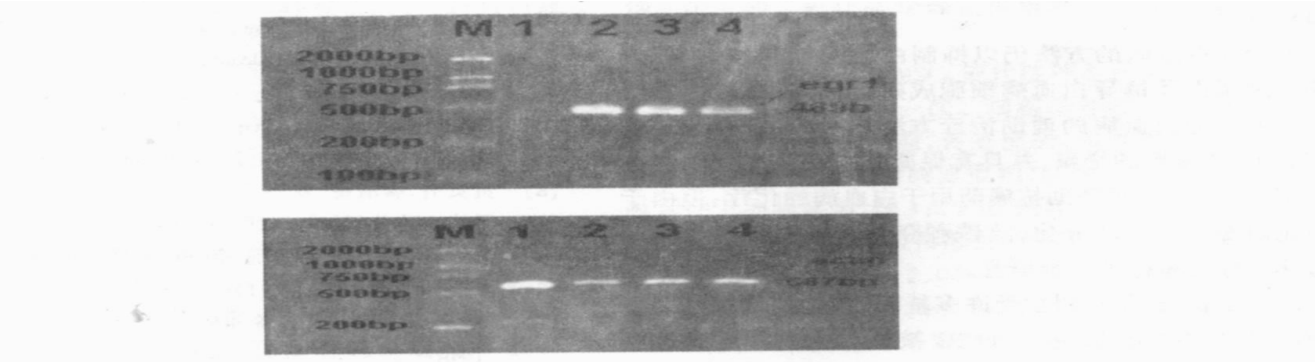
Table 3- 4 Cell cycle proportion and CD₃₃ and CD₁₄ changes in each group

项目	K562	K562+ TPA	K562+ TPA+ Fe	K562+ TPA- Fe	X ²	P
各细胞周期						
细胞比率(%)						
G ₀ + G ₁	29. 71	51. 70 [*]	53. 69 [*]	32. 90 ^{△▲}	808. 16	0. 0000
S	60. 21	43. 91 [*]	44. 28 [*]	60. 99 ^{△▲}	412. 75	0. 0000
G2+ M	10. 10	4. 40	2. 00	6. 10	6. 734	0. 0809
CD33	0. 99	0. 93	0. 92	0. 96	6. 316	0. 0972
CD14	0. 05	0. 31 [*]	0. 44 [*]	0. 09 ^{△▲}	59. 12	0. 0000

注: * P< 0. 05(均与对照组比较), △P< 0. 05(第三、四组 VS 第二组) ▲P< 0. 05(第四组 VS 第三组)
* P< 0. 05(all compared with control group) . △P< 0. 05(group 3 and 4 vs group 2) . ▲P< 0. 05(group 4 vs group 3) .
2. 3 各组细胞 EGR1mRNA 的表达: EGR1mRNA 表达, TPA 组和 TPA+ Fe 组 EGR1mRNA 表达水平相近, 而 TPA- Fe 组 EGR1mRNA 表达水平明显降低, 如图 3- 3 所示; 各组之间两两比较结果见表 3- 5。

图 3- 3 各组细胞 EGR1mRNA 基因的表达

Figure 3- 3 EGR1mRNA expression in each group



上图为处理 K562 细胞 12h 各组细胞 EGR1cDNA 电泳图
下图为处理 K562 细胞 12h 各组细胞β- actin cDNA 电泳图
The up diagram is EGR1cDNA electrophoretogram of induced K562 cells at 12h in each group; the down diagram is β- actincDNA electrophoretogram of induced K562 cells at 12h in each group.
Mark: 2000bp DNA Ladder Lane1: K562(control) Lane2: K562+ TPA Lane3: K562+ TPA+ F_n Lane4: K562+ TPA- F_n

表 3- 5 各组细胞 EGR1mRNA 基因表达的半定量分析
Table 3- 5 Semiquantitative analysis of the expression of EGR1mRNA in each group

组别	$\bar{X} \pm s$	F	P
K562(对照组)	0.0000 \pm 0.0001	992.04	0.0000
K562+ TPA	1.0173 \pm 0.0223 [*]		
K562 + TPA+ Fe	0.9920 \pm 0.0390 [*]		
K562 + TPA- Fe	0.4993 \pm 0.0280 ^{* Δ▲}		

注: * P< 0. 01(均与对照组比较), ΔP< 0. 01(第三、四组 VS 第二组) ▲P< 0.01(第四组 VS 第三组)
* P< 0. 01(all compared with control group) , ΔP< 0. 01(group 3 and 4 vs group 2) . ▲P< 0. 01(group 4 vs group 3) .

3 讨论

铁参与细胞的生长调节^[3]。铁在血细胞生长和分化过程中起着重要的作用。动物细胞由 G1 期进入 S 期(DNA 合成期) 特别需要铁^[4]。铁与肿瘤的发生、发展有密切关系, 现普遍认为铁是通过推动自由基转化、增殖而与肿瘤发生关系的。由于增殖的肿瘤细胞对铁的需求高, 因此肿瘤细胞表面有比正常细胞更多的与铁代谢相关的受体表达和对铁的摄取率^[5]。恶性肿瘤性疾病患者体内铁代谢紊乱已被证实。铁在癌组织中的含量与正常组织比较有差异, 对不同的癌组织来说, 铁含量的变化有不同表现, 还不能作出统一解释。铁与白血病的关系更为密切, 一定量铁可使白血病细胞生长, 铁剥夺可诱导白血病细胞凋亡。已有研究表明^[6] 白血病 HL- 60 细胞被诱导向单核/ 巨噬系分化的过程中依赖铁。本研究也发现铁剥夺可明显抑制 K562 细胞生长, 铁剥夺第 4d K562 细胞生长抑制率为 98. 88%, 其生长受抑制可能与铁剥夺后培养基中可利用铁减少而影响细胞的增殖和生长有关。另外还发现在 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中, 铁剥夺组 S 期细胞比率为 60. 99%, 较 TPA 组、TPA+ Fe 组升高, 这提示铁剥夺可使 K562 细胞停止在 S 期, 阻止 TPA 诱导 K562 细胞分化, 与国外文献报道^[7]一致。但有趣的是 TPA+ Fe 组并没有明显促进 K562 细胞的诱导分化, 这可能是细胞处于富铁环境时, 细胞能通过自身调节降低转铁蛋白受体(TfR) 表达, 影响铁的吸收来维持细胞自身铁的平衡^[8]。

目前治疗白血病的方法仍以抑制白血病细胞增殖、促进白血病细胞凋亡及诱导白血病细胞成熟分化为主, 有作者提出铁剥夺可作为白血病的辅助治疗方法之一^[9], 铁剥夺能有效的抑制 K562 细胞的增殖, 并具有促凋亡作用。因此铁剥夺剂(DFO) 可能作为一种辅助抗癌药用于白血病的化疗, 但由于它能阻止白血病细胞的分化, 故铁剥夺是否宜用于白血病的诱导分化治疗还有待进一步研究。

细胞的生长、分化和凋亡受许多基因的调控, 这些基因表达失衡即可导致肿瘤的产生。EGR1 被认为是一种肿瘤抑制基因, 在多种恶性肿瘤中表达消失。我们的研究也证实 K562 细胞株不表达 EGR1 基因, 但在 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中有 EGR1mRNA 的表达^[10]。在理论上, EGR1 可通过诱导细

胞因子而促进细胞生长, 但由于 EGR1 与编码生长因子基因调控区的结合及反式激活作用随细胞类型而不同, 其对细胞生长影响的直接作用尚不清楚。EGR1 活性表达在多种细胞的分化过程中均能检测到, EGR1 在人 HL- 60 细胞株中不表达, 当该细胞株被诱导经过 G0 期向巨噬系分化时转录激活, 在注定向巨噬系分化的 U937 和 M1 细胞, EGR1 呈结构性表达。基因转染使 HL- 60 细胞结构性表达 EGR1 并诱导该细胞向巨噬细胞分化, 在 HL- 60 细胞培养基中加入 EGR1 反义寡核苷酸可阻断该细胞株向巨噬细胞分化^[11], 这些都表明 EGR1 在调控造血细胞向单核巨噬细胞分化方面起重要作用。在血细胞生长、分化过程中许多调节细胞周期和分化的基因表达依赖于铁, 许多转录因子与生长因子的活性表达亦依赖于铁; 本研究发现铁剥夺可降低 TPA 诱导 K562 细胞分化过程中 E- GR1mRNA 的表达, 其结果与 Alcantara 报道一致; 这是否与铁剥夺阻止 K562 细胞分化有关? 根据我们的实验结果并结合大量的实验已证明 EGR1 与细胞分化有密切的关系, 因此我们认为 TPA- Fe 使 EGR1mRNA 表达的降低可能是铁剥夺阻止 TPA 诱导 K562 细胞分化的原因之一, 其确切机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Alcantara O, Kalidas M, Baltathakis I, et al. Expression of multiple genes regulating cell cycle and apoptosis in differentiating hematopoietic cells is dependent on iron[J] . Experimental Hematology, 2001, 29: 1060 - 1069
[2] 蒙国照, 吴名耀. 即刻早期基因 EGR- 1 与肿瘤研究[J] . 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(3) : 178- 180
[3] Cazzola M, Berganachi G, Arosio P. Manipulation of cellular iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects[J] . Blood, 1990, 75, 1093- 1019
[4] 钱忠明. 铁代谢—基础与临床[M] . 第一版. 北京, 科学出版社, 2000 年, 15- 16
[5] 贾国存, 廖清奎. 肿瘤细胞铁代谢的分子机制[J] . 国外医学输血及血液学分册, 2003, 26(4) : 342- 45
[6] Kramer JL, Baltathakis I, Alcantara OS, et al. Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21(WAF1/ CIP1) and requires iron[J] . Br J Haematol, 2002, 117(3) : 727- 34
[7] Gazitt Y, Reddy SV, Alcantara O, et al. A new molecular role for iron in regulation of cell cycling and differentiation of HL - 60 human leukemia cells: iron is required for transcription of p21(WAF1/ CIP1) in cells induced by phorbol[J] . Cell Physiol, 2001, 187(1) : 124- 35
[8] 黄贵清, 廖清奎, 罗春华. 急性白血病患儿外周血细胞转铁蛋白受体表达分析[J] . 华西医科大学学报, 1997, 28(1) : 55- 57
[9] 刘秀红, 龚书明. 铁代谢障碍对机体功能的影响[J] . 国外医学医学地理分册, 1995, 16(1) 14- 16
[10] 房定珠, 廖清奎, 高举. K562 细胞诱导分化过程中 EGR1mRNA 表达情况研究[J] . 中华儿科杂志, 2004, 42(7) : 495- 498
[11] Nguyen HQ, Hoffman- Liebermann B, Liebermann BA, et al. The zinc finger transcription factor Egr- 1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage[J] . Cell, 1993, 72(2) : 197- 209