

HCAR2 介导低氧促 K562 细胞向红系分化作用

陈迎^{1,2}, 李建³, 曹炎², 何云凌², 吴丽颖², 周钢桥^{1,2}

摘要 目的 研究低氧下羟基羧酸受体 2(HCAR2)对人慢性髓系白血病细胞 K562 向红系细胞分化的影响。方法 在含氯化血红素(hemin)的培养基中培养细胞,比较常氧/低氧条件下 K562 细胞向红系分化的能力,以及在此过程中 HCAR2 的表达情况。进而利用遗传学手段干预 HCAR2 表达,分别使其在 K562 细胞中敲低或过表达,通过联苯胺染色、RT-qPCR、Western blot 及流式细胞术检测 HCAR2 在低氧促 K562 细胞向红系分化中的作用。结果 K562 细胞向红系分化 1、2、3 d 后,HCAR2 的表达水平和 K562 细胞向红系分化的能力均随时间逐渐升高,并在低氧条件下得到增强;在 K562 细胞中敲低 HCAR2,诱导分化后红细胞生成减少,且红系分化标记分子 CD235a、 γ -珠蛋白(γ -globin)的 mRNA 和蛋白表达均降低,红系细胞膜表面分子 CD71 和 CD235a 双阳性细胞比例下降;相反,在 K562 细胞中过表达 HCAR2,与对照组相比,诱导分化后红细胞生成增加,且 CD235a、 γ -globin 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高,CD71/CD235a 双阳性细胞比例也有所增加。结论 HCAR2 介导了低氧促进 K562 细胞向红系分化。

关键词 红系分化;低氧;HCAR2;K562 细胞

中图分类号 Q 254

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1249-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.001

羟基羧酸受体 2(hydroxy-carboxylic acid receptor 2, HCAR2)是一种 II 型羟基羧酸受体,多在脂肪细胞中表达,并发挥抗脂解的作用^[1]。低氧会上调人原代单核细胞和巨噬细胞中 HCAR2 的表达^[2]。但是,低氧是否影响 K562 细胞中 HCAR2 的表达,

以及 HCAR2 在 K562 细胞中发挥的作用目前尚不清楚。

人慢性髓系白血病 K562 细胞是一种红细胞和巨核细胞谱系高度未分化的祖细胞^[3],具有分化为红系细胞和巨核细胞的潜力^[4],有报道指出,低氧能够加速 K562 向红系分化的进程^[5]。由于在 hemin 刺激下^[6] K562 细胞会产生胚胎型和胎儿型血红蛋白,这一特性为人类红系分化相关研究提供了一种理想的细胞模型。因此,该研究以 K562 细胞作为红系分化研究的体外模型,探究 HCAR2 对 K562 细胞向红系分化的影响,为揭示红系发育相关疾病的致病机制及研发相关诊疗药物提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和载体 人慢性髓系白血病细胞 K562 受赠于军事医学研究院王华副研究员,HEK293T 细胞保存于辐射医学研究所遗传学与整合组学实验室细胞库;pCDH-control-puro、pCDH-HCAR2-puro、pLVX-control-Puro、pLVX-HCAR2-puro 均购于长沙优宝生物科技有限公司;包装质粒 ps-PAX2 和 pMD2.G 储存于辐射医学研究所遗传学与整合组学实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基、FITC-CD71 抗体购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;全细胞裂解液 RIPA、山羊抗小鼠/兔二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司;脱脂奶粉、APC-CD235a 抗体购自美国 BD Biosciences 公司;逆转录试剂盒购自武汉莫纳生物科技有限公司;HM74 抗体购自美国 Bioword Technology Inc 公司; β -actin 抗体、CD235a 抗体购自武汉 Abclonal 公司; γ -globin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;hemin 购自美国 Sigma Aldrich 公司;蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司;一抗稀释液、ZLip2000 转染试剂购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;SYBR Green 荧光定量试剂盒购自美国 Kapa Biosystems 公司;二氧化碳培养箱

2023-06-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81730055)

作者单位:¹安徽医科大学生命科学学院,合肥 230032

²军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所,蛋白质组学国家重点实验室,国家蛋白质科学中心,北京 100850

³军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所,北京 100850

作者简介:陈迎,女,硕士研究生;

吴丽颖,女,博士,副研究员,责任作者,E-mail: liyingwu_china@163.com;

周钢桥,男,博士,研究员,责任作者,E-mail: zhougq114@126.com

(型号: Forma™) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;显微镜(型号: ECLIPSE Ti2) 购自日本 Nikon 公司;流式细胞仪(型号: FACSAria™ III) 购自美国 BD 公司;荧光定量 PCR 仪(型号: QuantStudio™ 3) 购自美国 Applied Biosystems 公司;SDS-PAGE 电泳仪、电转仪购自美国 Bio-Rad 公司;全自动化学发光图像分析系统(型号: 5200) 购自上海天能公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及向红系诱导分化 将 K562 细胞置于补充有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基中,并在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。将 K562 细胞按照 3 × 10⁵/ml 的密度铺于 60 mm 培养皿中,根据课题组前期筛选的最适药物终浓度(30 μmol/L),加入 hemin 诱导向红系分化。

1.2.2 低氧处理条件 将 K562 细胞(3 × 10⁵/ml) 平均分为两组分别置于低氧(3% O₂) 和常氧(20% O₂) 培养箱中培养 1、2、3 d;敲低和过表达的细胞株以相同密度铺板,分组标记,分别在常氧和低氧培养箱中培养 2 d。

1.2.3 慢病毒包装 利用 HIV 病毒将自身基因组插入到宿主基因组的特性,向 HEK293T 细胞转入 psPAX2、pMD2.G 和目的质粒。HEK293T 接种于 100 mm 培养皿,待细胞密度达到 70% ~ 80%,按 ZLip2000 转染试剂说明书进行转染,目的质粒、ps-PAX2、pMD2.G 以 3 : 2 : 1 的比例添加。于转染后 48 h 回收含有病毒的培养基,用病毒浓缩液浓缩离心后分装, - 80 °C 保存备用。

1.2.4 HCAR2 敲低、过表达稳转株的构建 用浓缩后的病毒液感染 K562 细胞,同时加入 10 μg/ml 的聚凝胺(Polybrene) 以促进病毒进入细胞。感染 48 h 后,利用嘌呤霉素抗性进行药物筛选,之后通过检测 HCAR2 的 mRNA 和蛋白表达水平来鉴定敲低、过表达稳转株是否构建成功。shRNA 序列见表 1。

表 1 shRNA 靶向序列

编号	序列(5' - 3')
sh-control	ATCGACTAGCCACTTAGAC
sh-HCAR2-1#	GTGGCTGACTTTCTACTGA
sh-HCAR2-2#	CCTTCCTGATGGACAACCTA
sh-HCAR2-3#	GGTGCAAATTTGTGCAGCA

1.2.5 联苯胺染色观察红细胞生成比例 收取分化后的 K562 细胞,用 PBS 重悬细胞,将细胞密度调整为 1 × 10⁵ 个/ml,取 100 μl 细胞悬液与 5 μl 联苯

胺工作液(配方:25 μl 联苯胺染液 + 25 μl H₂O + 1 μl H₂O₂) 混匀,加入 96 孔板,室温避光反应 5 min。最后在光学显微镜下进行观察拍照,每组至少随机选取 5 个视野,用以计算联苯胺阳性细胞比例。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平 收取细胞,离心后加入全细胞裂解液 RIPA 吹打均匀,4 °C 裂解 30 min,12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液,加 4 × 上样缓冲液煮沸 10 min, - 20 °C 冻存备用。根据目的蛋白分子量选用合适浓度的丙烯酰胺凝胶,上样、电泳、转膜,经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h、一抗 4 °C 孵育过夜、二抗室温孵育 1 h,最后在凝胶成像仪中显影。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测 mRNA 水平 收集细胞,提取细胞总 RNA,测定 RNA 样品浓度并进行逆转录。RT-qPCR 反应体系在 96 孔板中充分混匀,置于 RT-qPCR 仪上进行反应,每组设 3 个复孔,以 β-actin 为内参进行定量分析。RT-qPCR 引物序列见表 2。

表 2 RT-qPCR 的引物序列

基因名称	引物序列(5' - 3')
HCAR2	F:ACAACCTGGCCATCATTTCTCTG
	R:TCAGTCGGCGAATACCGTAAG
CD235a	F:ACTCGCTTCTGGAACGCTCTG
	R:CCTCTGGGTCCATGGGTAGA
γ-globin	F:GGATTCCTATGTGGGCGACGA
	R:GCCTACAGGGATAGCACAGC
ACTB	F:GGATTCCTATGTGGGCGACGA
	R:GCCTACAGGGATAGCACAGC

1.2.8 流式细胞术 收取经处理后的各组细胞,每组细胞量不少于 1 × 10⁵ 个,用 100 μl PBS 溶液重悬细胞,加入 CD235a 抗体和 CD71 抗体,室温下避光孵育 15 min,之后 PBS 洗 3 次,重悬于 300 μl PBS 中,混合均匀后用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均重复至少 3 次。组间比较采用方差分析,相关性分析采用 pearson 法,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧对 K562 细胞向红系分化的影响 联苯胺染色结果显示,无论在常氧还是低氧条件下,联苯胺阳性细胞比例均随分化时间逐渐升高;且与常氧组相比,低氧组联苯胺染色阳性细胞比例更高(F = 175.9, P < 0.05)(图 1A、B)。RT-qPCR 和 Western

blot 实验分别检测了红系细胞特异性分子 CD235a 和 γ -globin 的蛋白及 mRNA 表达水平,相较于常氧组,低氧组 CD235a 和 γ -globin 的表达增加 ($F_{CD235a} = 127.0, F_{\gamma\text{-globin}} = 158.1, P < 0.05$) (图 1C ~ E)。流式细胞术检测 CD71 和 CD235a 的表达情况,结果显示在分化的不同时间点,低氧组 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞的百分比均高于常氧组 ($F = 85.8, P < 0.01$)

(图 1F、G)。

2.2 HCAR2 与红系分化的相关性 根据 Western blot 和 RT-qPCR 实验结果,低氧组 HCAR2 蛋白和 mRNA 的表达均高于常氧组 ($F = 110.0, P < 0.05$) (图 2A、B);与此同时,CD235a 和 γ -globin 在低氧下的蛋白表达上调,变化趋势与 HCAR2 相似 (图 2A)。因此,采用pearson法进一步分析,发现 K562

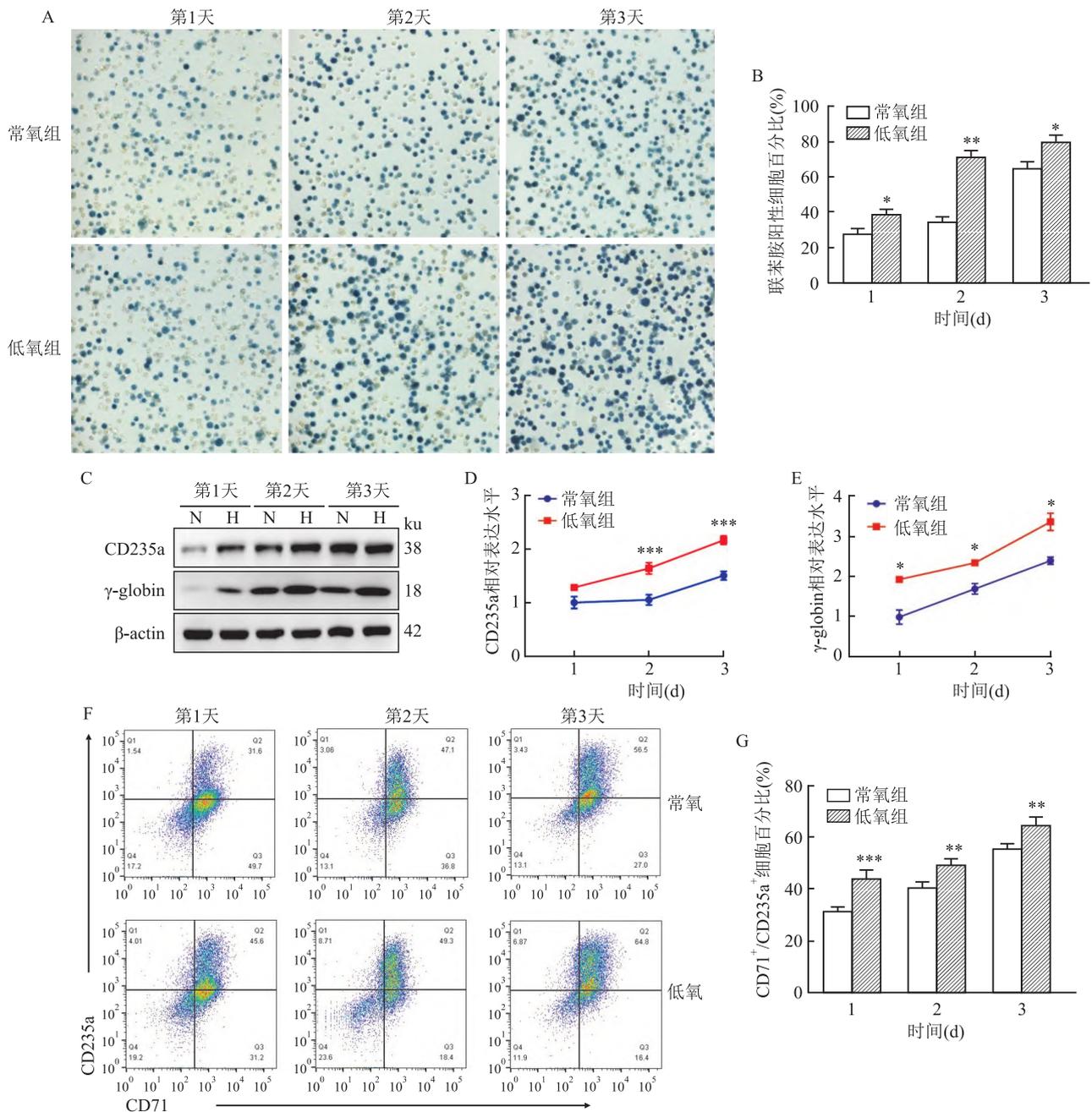


图1 低氧对 K562 细胞向红系分化的影响

A、B: 联苯胺染色观察 K562 细胞红系分化情况及其统计直方图 $\times 200$; C: Western blot 实验检测 CD235a 及 γ -globin 的蛋白表达变化; N: 常氧组; H: 低氧组; D、E: RT-qPCR 检测 CD235a 及 γ -globin 的 mRNA 水平; F、G: 流式细胞术检测 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞百分比及其统计直方图; 与常氧组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

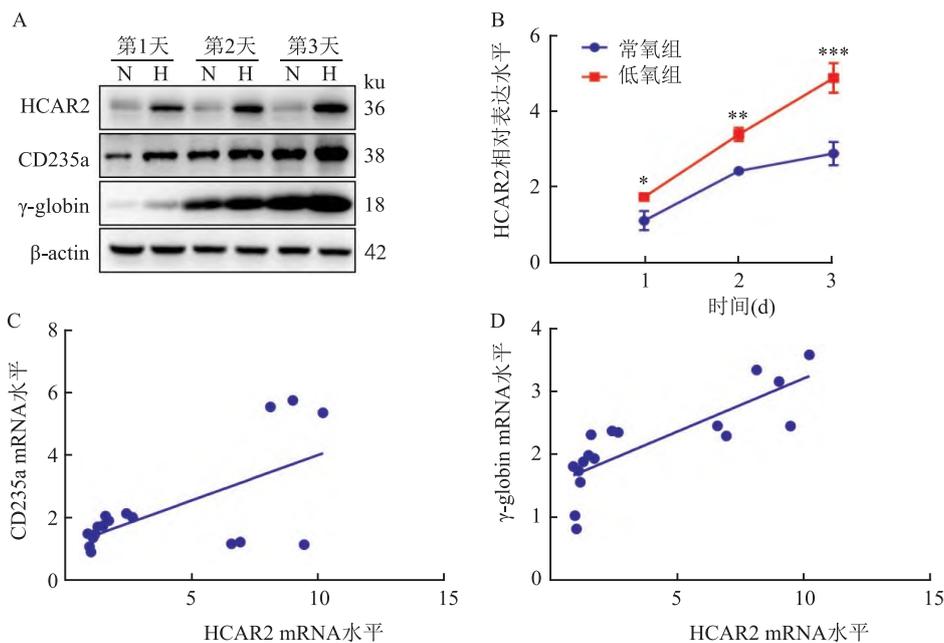


图2 HCAR2 与红系分化的相关性

A: Western blot 实验检测 HCAR2、CD235a 及 γ -globin 的蛋白表达变化; N: 常氧组; H: 低氧组; B: RT-qPCR 检测 HCAR2 的 mRNA 水平; C: HCAR2 与 CD235a 表达的相关性散点图; D: HCAR2 与 γ -globin 表达的相关性散点图; 与常氧组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

细胞向红系分化过程中 HCAR2 分别与 CD235a ($r = 0.6311, P = 0.0066$) 和 γ -globin ($r = 0.8141, P < 0.0001$) 的 mRNA 水平呈正相关(图 2C、D)。

2.3 敲低 HCAR2 对低氧促红系分化的影响 为了进一步探讨 HCAR2 对红系分化的影响,通过慢病毒感染构建了稳定敲低 HCAR2 的 K562 细胞株,用来研究 HCAR2 低表达对 K562 细胞向红系分化的影响。Western blot 和 RT-qPCR 实验分别检测了敲低 HCAR2 后, K562 细胞向红系分化时 CD235a 和 γ -globin 蛋白和 mRNA 的表达变化。结果显示,敲低 HCAR2 后,无论常氧组还是低氧组 CD235a 和 γ -globin 蛋白的表达均下调(图 3A), CD235a 和 γ -globin 的 mRNA 水平均降低 ($F_{CD235a} = 129.4, F_{\gamma\text{-globin}} = 30.02, P < 0.05$) (图 3B、C)。随后通过联苯胺染色观察显示,在常氧和低氧下敲低 HCAR2 均会使得联苯胺阳性细胞比例降低 ($F = 31.86, P < 0.05$) (图 3D、E)。流式细胞术检测结果显示敲低 HCAR2 后常氧组和低氧组中 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞百分比均有所减小 ($F = 118.2, P < 0.001$) (图 3F、G)。

2.4 HCAR2 过表达对低氧促红系分化的影响 Western blot 实验结果显示常氧和低氧条件下过表达 HCAR2 后 CD235a 和 γ -globin 的蛋白表达上调(图 4A), RT-qPCR 实验结果显示 HCAR2 高表达时, CD235a 和 γ -globin 的 mRNA 水平升高 ($F_{CD235a} =$

$67.04, F_{\gamma\text{-globin}} = 81.74, P < 0.05$) (图 4B、C)。联苯胺染色观察到过表达 HCAR2 后,常氧组和低氧组 K562 细胞中联苯胺阳性细胞比例均升高 ($F = 52.99, P < 0.01$) (图 4D、E)。流式细胞术检测结果显示,过表达 HCAR2 后 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞的百分比增加 ($F = 53.37, P < 0.05$) (图 4F、G)。

3 讨论

研究表明低氧可促进红系分化, Cao et al^[7] 发现 K562 细胞中缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 与 TET3 蛋白结合的位点缺失会抑制低氧条件下的红系分化,并使得细胞活力显著下降,这表明 HIF-1 可能介导了低氧促红系分化作用。之前的研究^[8]进一步证实了 HIF-1 通过上调其靶基因 REDD1 来抑制 mTORC1 信号通路并增强自噬水平,从而促进了低氧下的红系分化进程。而本研究通过在常氧和低氧条件下分别诱导 K562 细胞向红系分化,观察到低氧具有促进 K562 细胞向红系分化的作用;在 K562 细胞向红系分化过程中 HCAR2 表达升高并受低氧调控。因此,推测 HCAR2 可能作为一个新的低氧靶分子参与调控红系分化过程。

本研究通过构建稳定敲低 HCAR2 的 K562 细胞株发现 HCAR2 的低表达能抑制 K562 细胞向红系分化,减弱低氧促红系分化的作用;同时,通过过

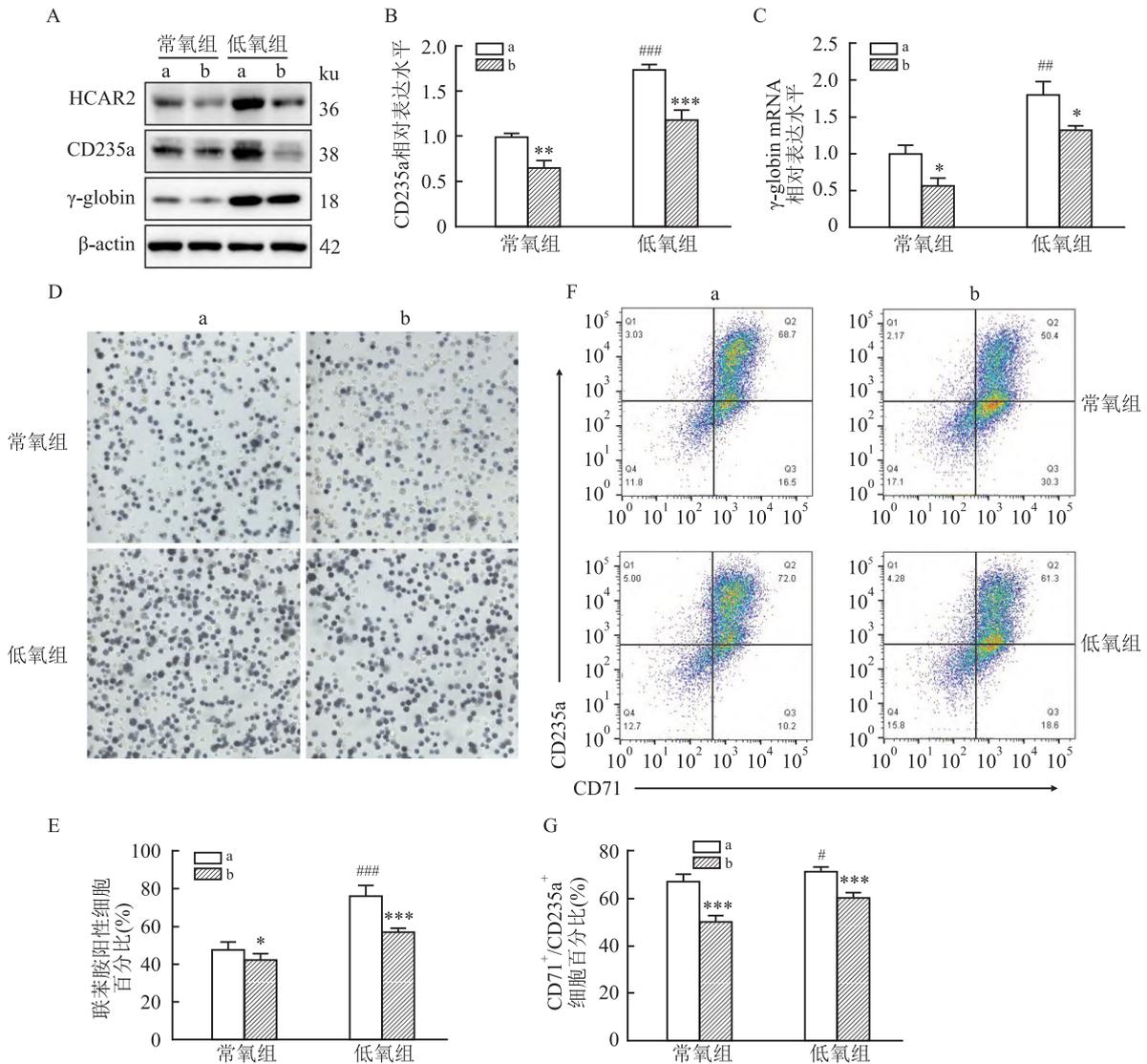


图3 敲低 HCAR2 对低氧促红系分化的影响

A: Western blot 实验检测 HCAR2、CD235a 及 γ -globin 的蛋白表达变化; B、C: RT-qPCR 检测 CD235a 和 γ -globin 的 mRNA 水平; D、E: 联苯胺染色观察 K562 细胞红系分化情况及其统计直方图 $\times 200$; F、G: 流式细胞术检测 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞百分比及其统计直方图; a: shCtrl 组; b: shHCAR2 组; 与 shCtrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与常氧组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

表达 HCAR2 细胞株的构建,进一步证明了 HCAR2 的高表达更有利于红系分化,并且能够增强低氧对红系分化的促进作用。这些结果提示 HCAR2 参与介导了低氧对红系分化的促进作用。HCAR2 是一种 G 蛋白偶联受体,与抑制型 G 蛋白(Gi)相连^[9],可通过抑制腺苷酸环化酶的活性,降低细胞中环磷酸腺苷的水平^[10]。有学者发现在红系分化过程中细胞内环磷酸腺苷水平呈持续性下降^[11],因此,HCAR2 可能是通过抑制腺苷酸环化酶活性降低细胞内环磷酸腺苷水平,从而介导低氧促 K562 细胞向红系分化的作用,但其中涉及的具体分子机制还

有待研究。

本研究阐述了 HCAR2 自身表达水平的变化对红系分化的影响,然而 HCAR2 作为一种细胞膜受体,其功能的发挥也可以通过结合不同配体实现。例如,在肠上皮细胞中,通过识别 β -羟基丁酸(BHB)诱导转录因子 HOPX 的表达,进而抑制细胞增殖,减慢肠道肿瘤的生长速度^[12];而在动脉粥样硬化小鼠模型中,口服 3-羟基丁酸可通过激活 HCAR2 促进巨噬细胞中的胆固醇外流,显著改善动脉粥样硬化^[13]。但 HCAR2 对红系分化的调控中是否有某种配体的参与尚不清楚。

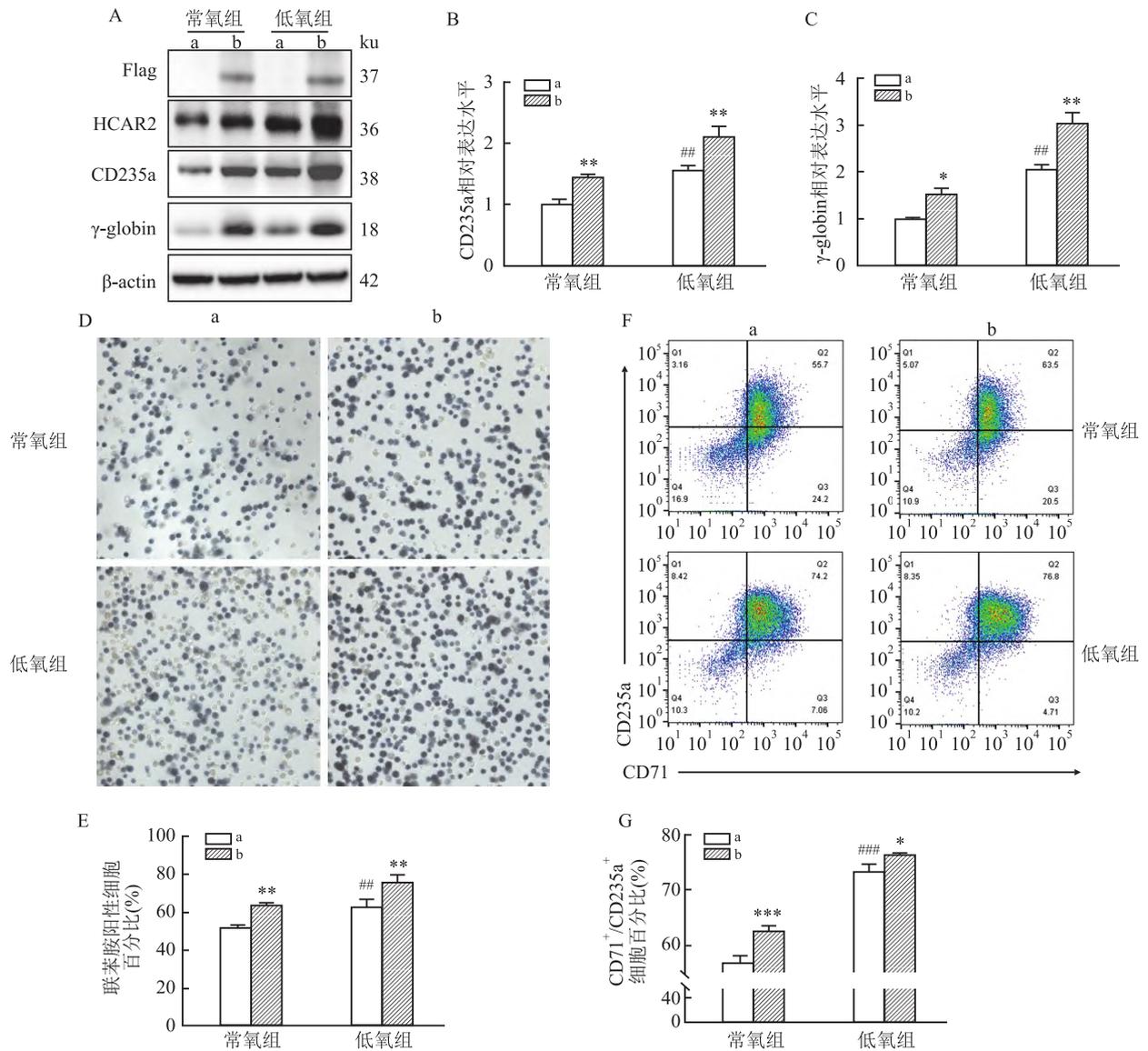


图4 HCAR2 过表达对低氧促红系分化的影响

A: Western blot 实验检测 HCAR2、CD235a 及 γ -globin 的蛋白表达变化; B、C: RT-qPCR 检测 CD235a 和 γ -globin 的 mRNA 水平; D、E: 联苯胺染色观察 K562 细胞红系分化情况及其统计直方图 $\times 200$; F、G: 流式细胞术检测 CD71⁺/CD235a⁺ 细胞百分比及其统计直方图; a: Vector 组; b: HCAR2 组; 与 Vector 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与常氧组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

综上所述,该研究表明 HCAR2 在低氧刺激下表达升高,并可以促进 K562 细胞向红系分化,这为认识和探索 HCAR2 的新功能提供了参考。然而,低氧促 HCAR2 高表达的过程是否有 HIF-1 的参与,以及 HCAR2 配体刺激能否促进 K562 细胞向红系分化,还需要进一步实验验证。

参考文献

[1] Zhang Y, Schmidt R J, Foxworthy P, et al. Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(2):

729 - 32.

[2] Knowles H J, te Poele R H, Workman P, et al. Niacin induces PPARgamma expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(5): 646 - 56.

[3] Zikmund T, Paszekova H, Kokavec J, et al. Loss of ISWI ATPase SMARCA5 (SNF2H) in acute myeloid leukemia cells inhibits proliferation and chromatid cohesion[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6):2073.

[4] Tan L, Xu H, Chen G, et al. Silencing of HMG2A2 reverses retardance of cell differentiation in human myeloid leukaemia[J]. *Br J*

- Cancer, 2018, 118(3): 405–15.
- [5] Hu C, Yan Y, Fu C, et al. Effects of miR-210-3p on the erythroid differentiation of K562 cells under hypoxia [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2):563.
- [6] Sobh A, Loguinov A, Zhou J, et al. Genetic screens reveal CCDC115 as a modulator of erythroid iron and heme trafficking [J]. Am J Hematol, 2020, 95(9): 1085–98.
- [7] Cao J Z, Liu H, Wickrema A, et al. HIF-1 directly induces TET3 expression to enhance 5-hmC density and induce erythroid gene expression in hypoxia [J]. Blood Adv, 2020, 4(13): 3053–62.
- [8] Li J, Quan C, He Y L, et al. Autophagy regulated by the HIF/REDD1/mTORC1 signaling is progressively increased during erythroid differentiation under hypoxia [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10:896893.
- [9] Engelstoft M S, Park W M, Sakata I, et al. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells [J]. Mol Metab, 2013, 2(4): 376–92.
- [10] Chen Y, Ouyang X, Hoque R, et al. β -Hydroxybutyrate protects from alcohol-induced liver injury via a Hcar2-cAMP dependent pathway [J]. J Hepatol, 2018, 69(3): 687–96.
- [11] Cokic V P, Andric S A, Stojilkovic S S, et al. Hydroxyurea nitrates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells [J]. Blood, 2008, 111(3): 1117–23.
- [12] Dmitrieva-Posocco O, Wong A C, Lundgren P, et al. β -Hydroxybutyrate suppresses colorectal cancer [J]. Nature, 2022, 605(7908): 160–5.
- [13] Zhang S J, Li Z H, Zhang Y D, et al. Ketone body 3-Hydroxybutyrate ameliorates atherosclerosis via receptor Gpr109a-mediated calcium influx [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(9): 2003410.

HCAR2 mediates hypoxia-promoted erythroid differentiation of K562 cells

Chen Ying^{1,2}, Li Jian³, Cao Yan², He Yunling², Wu Liying², Zhou Gangqiao^{1,2}

(¹School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²National Center for Protein Sciences, State Key Lab of Proteomics, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850; ³Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

Abstract Objective To explore the effect of hydroxy-carboxylic acid receptor 2 (HCAR2) on erythroid differentiation of human chronic myeloid leukemia K562 cells under hypoxia. **Methods** The cells were cultured in medium containing hemin to compare the ability of K562 cells to differentiate into erythroid cells under normoxia/hypoxia conditions. Then the expression of HCAR2 was interfered with genetic methods to knockdown or overexpress it in K562 cells, respectively. Benzidine staining, RT-qPCR, Western blot and flow cytometry were used to detect the role of HCAR2 in the erythroid differentiation of K562 promoted by hypoxia. **Results** On day 1, 2, 3 after differentiation, the expression level of HCAR2 and the erythroid differentiation ability of K562 cells increased gradually with time, and hypoxia enhanced the above phenotypes compared with normoxia. In HCAR2-silenced K562 cells, erythroid cells was reduced and the expression of erythroid differentiation markers CD235a and γ -globin decreased. Simultaneously, the proportion of double-positive cells expressing erythroid cell surface molecules CD71 and CD235a was lower than that of the control group. On the contrary, the overexpression of HCAR2 in K562 cells increased erythroid cells generation as well as elevated the expression levels of CD235a and γ -globin. In addition, the proportion of CD71/CD235a double-positive cells also increased in HCAR2-overexpressed K562 cells. **Conclusion** HCAR2 mediates hypoxia in promoting the erythroid differentiation of K562 cells.

Key words erythroid differentiation; hypoxia; HCAR2; K562 cell