PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2008, 35(7): 778~784
www.pibb.ac.cn

siRNA 沉默 socs3 对红系发育的影响 *

刘雨潇 吉 蕾 袁红丰 陈 琳 薛 郡 管兆轩
南 雪 白慈贤 王韫芳 岳 文 裴雪涛 **
(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室，北京 100850)

摘要 为了研究细胞因子信号转导分子 3(suppressor of cytokine signals-3，SOCS-3)对造血发育的影响，构建了 SOCS-3 慢病毒 siRNA 干涉载体，并转染人红白血病细胞株 K562．根据绿色荧光蛋白的表达进行流式分选后，获得了高表达慢病毒干涉载体的细胞．实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 检测了转染细胞中 SOCS-3 基因的干涉效率，结果显示，与对照组相比，siRNA 干涉后 K562 细胞 SOCS-3 基因的表达量仅为其相对表达量的 22.1%，干涉效率 77.9%；Western-blot 结果显示，SOCS-3 在蛋白质水平表达也明显受抑制．进一步对 SOCS-3 基因沉默后的 K562 细胞进行了诱导分化，并采用联苯胺染色法检测 K562 细胞向红系分化比例变化，免疫荧光染色检测细胞表面抗原的变化，RT-PCR 检测造血相关基因的变化．结果发现，SOCS-3 沉默后 K562 细胞向红系的发育能力显著提高．研究结果证明，SOCS-3 在造血发育中有重要调控作用，而对其表达进行干涉或沉默将在规模化的红细胞诱导研究中发挥重要作用．

关键词 siRNA，基因沉默，SOCS-3，慢病毒，K562 细胞
学科分类号 Q28，R34

红细胞输注是目前临床输血的常用手段，可预防发热性非溶血性输血反应，尤其适用于需反复输血的血液病患者，骨髓移植及既往曾有过输血反应的患者[1, 2]．然而目前红细胞来源紧张、数量及扩增能力有限及污染等问题给其临床使用的安全性和广泛性带来了极大挑战．因此人们期望更为安全、有效和经济的血细胞资源．随着干细胞研究及其相关领域的生物学技术的快速发展，以胚胎干细胞或造血干细胞为启动细胞的造血干细胞工程为临床输血和干细胞的移植带来了新希望．与此同时深入研究红细胞生成机制、建立高效的红系诱导分化体系便具有了非常重要的意义[3].

细胞因子信号转导抑制因子 -3 (suppressor of cytokine signals，SOCS-3)最早发现于 1997 年，它在染色体上的位置为 17q25.3，CDS 区由 675 个连续核苷酸组成，编码 225 个氨基酸．SOCS-3 和其家族其他成员具有相似的蛋白质结构，主要由链中部的 SH2 结构域、N 区和 C 区的 SOCS 盒组成[4, 5]．SOCS-3 的主要生理功能是抑制细胞因子的信号转导．细胞因子可诱导 SOCS-3 基因的表达，而 SOCS-3 基因的表达产物又可特异性地抑制细胞因子的信号传导．SOCS-3 的这种负反馈调节作用主要通过三种方式进行：利用和 STAT 相似的 SH2 结构域，竞争结合细胞因子受体胞质区的磷酸化位点，转录因子 STAT 的活化；利用 SH2 与 JAK 结合，竞争性地抑制 JAK 与底物的结合；或通过 C 端的 SOCS 盒与伸蛋白复合体结合，将 SOCS-3 结合的信号蛋白通过泛素途径降解，从而阻断细胞因子的信号传递．因此 SOCS-3 在胚胎发育、肿瘤生成等方面发挥着重要的调控作用．对小鼠胚胎发育的研究表明，过表达或敲除该基因的小鼠均在胚胎期发生死亡．75%的 *SOCS-3* 转基因小鼠的胚胎肝脏中完全无红细胞生成，而 SOCS-3$^{-/-}$小鼠则会出现红细胞增多症[6].

为此我们构建了慢病毒 RNA 干涉载体 pSicoR-SOCS-3，用它成功地转染了 K562 细胞，并对比了正常 K562 和 SOCS-3 基因沉默 K562 细

* 国家高技术研究发展计划(863)重大专项(2006AA02A107), 国家重点基础研究发展规划(973)(2005CB522702)和北京市科委重大项目培育专项(Z0005190043331)资助项目.
** 通讯联系人.
Tel: 010-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn
收稿日期：2007-11-26，接受日期：2007-12-28

胞向红系发育的比率，结果发现在相同的诱导环境中，SOCS-3 基因沉默后 K562 细胞向红系的分化能力大大提高了．这为进一步研究造血分化调控机制，建立高效的红系诱导分化效率奠定基础．

1 材料与方法

1.1 材料

人 K562 细胞系及 293FT 细胞系本室保存．携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein，GFP) 基因的慢病毒 RNA 干涉载体 pSico Reverse-GFP (pSicoR)为美国 Andrea Ventura 和 Alex Meissner 教授惠赠[7]，慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2、包膜质粒 pLP/VSVG、TRIzol 试剂、lipofectamine 2000 和 Opti-MEM® Ⅰ培养基均购自 Invitrogen 公司．DH5α 感受态菌购自天为时代公司．高糖 DMEM 和 1640 培养基购自 Sigma 公司；胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司；羊抗人 SOCS-3 抗体、羊抗人 β-actin 抗体和 Western-blot 化学发光检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司；反转录试剂与 T4 连接酶、rTaq 酶及各种限制性内切酶均购自大连宝生物公司；RealMasterMix(SYBR Green)购自北京天根生化科技有限公司；质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Qiagen 公司；辣根过氧化酶标记的鼠抗羊 IgG 抗体购自北京中杉金桥公司．

1.2 方法

1.2.1 K562 细胞的培养．K562 细胞培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中，每 2～3 天换液一次．慢病毒干涉载体的构建及检测．

1.2.2 SiRNA 序列的设计．GenBank 中查找人 SOCS-3 基因 mRNA 序列(NM_003955.3)，根据慢病毒 RNA 干涉载体 pSicoR 的要求，在冷泉港网站上获得以 SOCS-3 编码区为靶点的特异性 siRNA 寡核苷酸序列 2 对．利用 RNA Structure 软件分析其 mRNA 二级结构，并进行 BLAST 同源性分析．选取两对特异性寡核苷酸互补链，序列为：1．正义 5′ TGAACTTGTTTGCTCTTTGATTCAAGAGATC-AAAGAGCAAACAAGTTCTTTTTTC 3′，反义链 5′ TCGAGAAAAA AGAACTTGTTTGCTCTTTGA-TCTCTTGAATCAAAGAGCAAACAAGTTCA 3′；2．正义链 5′ T GCCACCT GGACTCCTATGATTC AAGAGATCATAGGAGTCCAGGTGGCTTTTTTC 3′，反义链 5′ TCGAGAAAAAAGCCACCTGGA-CTCCTATGATCTCTTGAATCATAG GAGTCCAG-GTGGCA 3′(北京奥科生物公司合成)．

1.2.3 慢病毒干涉载体 pSicoR-SOCS-3 构建及慢病毒包装．

正、反向 siRNA 寡核苷酸片段各 1 μl与 48 μl 的退火缓冲液混合，在适当的条件下对合，取 5 μl 对合产物进行磷酸化，同时用 *Hpa* Ⅰ和 *Xho*Ⅰ限制酶将慢病毒 RNA 干涉载体 pSicoR 线性化，与磷酸化后的 siRNA 寡核苷酸片段连接．重组质粒转化 DH5α 大肠杆菌，挑选阳性克隆，扩增并提取质粒，用 *Xho*Ⅰ和 *Xba*Ⅰ酶切鉴定，选择含插入片段的克隆进行基因测序．

将慢病毒载体质粒与包装质粒 pLP1、pLP2、包膜质粒 pLP/VSVG，与 42 μl lipofectamine 2000 混合于无血清 Opti-MEM® Ⅰ培养基中，室温孵育 20 min，形成 DNA-lipofectamine 2000 复合物．同时胰酶消化 293FT 细胞，收集约 6×10^6 个细胞重悬于 5 ml 的生长培养基中，与 DNA-lipofectamine 2000 复合物混匀，加入含 5 ml 生长培养基的 10 cm 细胞培养皿中，37℃ CO_2 孵箱中培养过夜，次日用含有 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基换液．转染 48～72 h 后收集上清，以 3 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片．此后用水平转头在 4℃ 条件下以 26 000 r/min 超速离心 90 min，收集沉淀用 K562 生长培养基重悬，冻存于–80℃．

1.2.4 细胞转染与流式细胞术分选．离心收集 K562 细胞，同时加入含有病毒颗粒和 Polybrene(终浓度为 6 mg/L)的 K562 生长培养基重悬细胞，并以 1×10^6/ml 密度将细胞接种于 6 孔板中，过夜．次日加入含 10%胎牛血清和抗生素的完全培养基，将细胞继续培养至 72 h．转染后 24～72 h 于荧光显微镜下观察细胞转染效率，收集转染后的细胞进行流式细胞术分选(fluorescence-activated cell sorting，FACS)，获得高表达 GFP 的 K562 细胞．

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测干涉效率．转染慢病毒干涉载体质粒 pSicoR-SOCS-3 和阴性对照质粒的 K562 细胞，置于培养 2 天后，收集各组细胞，提取细胞总 RNA，进行反转录，获得 cDNA 模板．取等量 cDNA 模板用人 SOCS-3 上游引物特异引物进行 PCR 扩增，同时以人肌动蛋白基因(β-actin)为内参照．所用引物序列：SOCS-3 上游引物，5′ atcctggtgacatgctcctc 3′，下游引物，5′ caaatgttgcttccccctta 3′，片段长度 205 bp；β-actin 上游引物，5′ gatccacatctgctggaagg 3′，下游引物，5′ aagtgtgacgttgacatccg 3′，片段长度 232 bp．反应条件均为：94℃ 5 min 预变性，94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃

40 s，扩增 30 个循环，72℃ 延伸 10 min．PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳并分析结果．

1.2.6　实时荧光定量 PCR 检测干涉效率．Trizol 法提取各组细胞总 RNA，反转录后的 cDNA 中取 1 个样品进行梯度稀释作为绘制标准曲线的样本，与其余样品同时进行 PCR 反应．用 20 μl 反应体系，包括 1× RealMasterMix，1× SYBR Green，SOCS-3 的上、下游引物各 1 μl(5 pmol)引物及 1 μl 模板，以 β-actin 基因作为内参照，每样品均做 3 个复孔，以不加模板为空白对照．反应条件为：94℃ 5 min 预变性，94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 40 s，72℃ 延伸 10 min．30 个循环扩增后获得各组 *C*t值，绘制标准曲线，用基于 ΔΔ*C*t 方法的进行相对定量分析，基因表达差异为 2ΔΔ*C*t，ΔΔ*C*t= Δ*C*t 样品−Δ*C*t 参考基因．

1.2.7　Western-blot 法检测干涉后 SOCS-3 蛋白的表达．取转染 pSicoR-SOCS-3 和对照组 K562 细胞，用预先配制好的蛋白裂解液液解 G2T 裂解细胞，用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度．25 μg 蛋白上样进行 15% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，半干式电转的方法转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后，TBST 洗膜，加入羊抗人 SOCS-3 单抗 4℃ 孵育过夜．次日 TBST 洗膜后再加 HRP 标记的鼠抗羊二抗室温孵育 1 h，TBST 洗膜．化学发光试剂于暗室自显影．以 β-actin 蛋白作为内参照．

1.2.8　体外诱导 K562 细胞向红系分化．取转染 pSicoR-SOCS-3 质粒的 K562 细胞、转染空载体的 K562 细胞和正常的 K562 细胞，以 5×10^4/ml 密度接种于 75 cm 培养瓶中，4 ml/ 瓶，进行红系的诱导分化，培养条件如下：10%胎牛血清，1640 培养基，其中加入 2 U/ml 促红细胞生成素(EPO，R&D Systems)，10 μg/L 白细胞介素 -3 (IL-3，R&D Systems)，10 μg/L 白细胞介素 -6(IL-6，R&D Systems)．

1.2.9　细胞形态学观察及联苯胺染色．从接种当日起每天观察细胞的形态变化并进行细胞联苯胺染色，计数 300 个细胞中联苯胺染色阳性细胞率，以确定 SOCS-3 沉默对 K562 向红系发育的影响．

1.2.10　细胞的免疫荧光染色．诱导 7 天后将细胞由培养基中吸出，PBS 清洗后离心，弃上清，加入少量 PBS 将细胞制成悬液，取适量滴片，待片子完全晾干后加入 4%多聚甲醛固定 10～15 min 后，收集细胞 PBS 清洗后加入人 CD71- PE 抗体，于室温孵育 40 min，再次用 PBS 清洗．在荧光显微镜下观察、拍照．

1.2.11　半定量 RT-PCR 检测红系特异基因的表达．收集不同诱导天数的细胞提取细胞总 RNA，进行反转录，获得 cDNA 模板．取等量 cDNA 模板用人 α-globin 进行 RT-PCR．所用引物如下：上游，5′ cgacaagaccaacgtcaagg 3′，下游，5′ agaagcc-aggaacttgtcca 3′．片段长度 492 bp．

2　结　　果

2.1　慢病毒干涉载体 pSicoR-SOCS-3 的成功构建

重组慢病毒干涉载体 pSicoR-SOCS-3 用 *Xho*Ⅰ和 *Xba*Ⅰ双酶切电泳后可见含插入片段阳性克隆(图 1)，经基因测序证实插入序列完全正确，与预期设计相符，重组质粒构建成功．

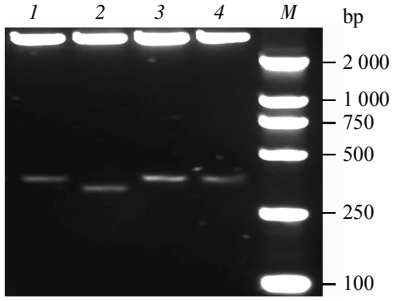

Fig. 1　Identification of recombinant by digestion of restrict endnuclease *Xho*Ⅰ and *Xba*Ⅰ

M: DL2000 marker; *1*: Recombinant pSicoR-SOCS-3 plasmid 1; *2*: Recombinant pSicoR-SOCS-3 plasmid 2; *3*: pSicoR lentiviral plasmid.

2.2　慢病毒的包装

293-FT 细胞包装慢病毒后，由于 VSVG 糖蛋白使 293FT 融合的作用，可在显微镜下观察到多核合胞体的形成(图 2a)．此外，在包装 48～72 h 后，可在荧光显微镜下观察到细胞中绿色荧光蛋白的表达，并且呈现绿色荧光的细胞超过 98%(图 2b)．包装 72 h 后，收集毒液过滤备用．

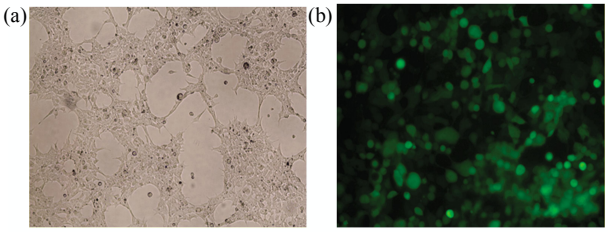

Fig. 2　Producing lentivirus in 293FT Cells by fluorescence microscope

(a) The appearance of multinucleated syncitia of 293FT cells. (b) The GFP expression of 293FT cells producing lentivirus for 48～72 h (100×).

2.3　慢病毒转染 K562 细胞及筛选阳性细胞

K562 细胞是悬浮生长细胞，用普通的毒液难以转染．因此本实验对慢病毒毒液进行了浓缩，通过超速离心分离出病毒颗粒，并将病毒颗粒重悬于 K562 生长培养基中转染 K562 细胞，48 h 后荧光显微镜下观察，发现表达绿色荧光蛋白的细胞很少，为获得高表达慢病毒干涉载体的细胞，对转染 72 h 的 K562 细胞根据 GFP 阳性表达进行流式分选，获得强表达 GFP 的细胞，分选后细胞荧光显微镜下观察，表达 GFP 的细胞基本达 100% (图 3a，b，c).

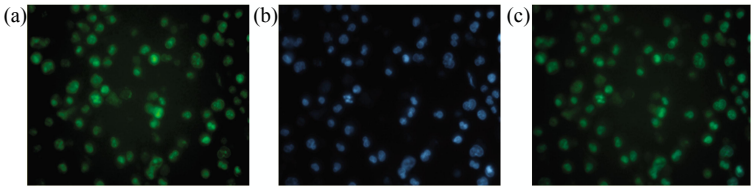

Fig. 3　GFP expression of transfected-K562 cells

(a) The appearance of multinucleated syncitia of 293FT cells. (b) The GFP expression of 293FT cells producing lentivirus for 48～72 h. (100×)

2.4　SOCS-3 基因表达降低

2.4.1　SOCS-3 mRNA 表达水平的降低．提取未转染组、阴性对照组和两对转染慢病毒干涉载体 pSicoR-SOCS-3 的 K562 细胞总 RNA，半定量 RT-PCR 法检测 SOCS-3 基因 mRNA 水平的表达．结果显示，未转染和转染了阴性对照载体的细胞均有 SOCS-3 的表达，相对表达量基本一致，转染了 pSicoR-SOCS-3-1 干涉载体的细胞 SOCS-3 表达量有了明显降低，但转染了 pSicoR-SOCS-3-2 干涉载体的细胞 SOCS-3 基因表达没有明显变化(图 4)．因此，我们进一步验证 pSicoR-SOCS-3-1 质粒的干涉效果，以上述获得的未转染、转染了 pSicoR-SOCS-3-1 干涉载体和阴性对照载体细胞的 cDNA 作为模板，进行了以 β-actin 为内参照的 SOCS-3 相对表达量的实时荧光定量 PCR 检测．结果显示与对照组相比，转染慢病毒干涉载体 1 的细胞 SOCS-3 基因的表达量仅为其相对表达量的 22.3%，即干涉效率为 77.8%，具有显著差异($P < 0.05$，图 5).

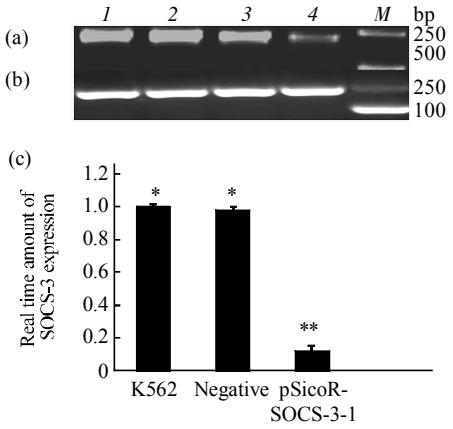

Fig. 4　Effect of RNA interference on SOCS-3 expression by PCR

(a)Expression of SOCS-3. (b)Expression of β-actin. (c)Relative amount of SOCS-3($^{*}P > 0.05$, $^{**}P < 0.05$). *M*: DL2000; *1*: Untransfected group; *2*: Negative control group; *3*: pSicoR-SOCS-3-2 transfection group; *4*: pSicoR-SOCS-3-1 transfection group.

2.4.2　SOCS-3 蛋白表达水平的降低．采用 Western-blot 法检测转染阴性对照载体和慢病毒 SOCS-3 干涉载体的 K562 细胞中 SOCS-3 蛋白水平的变化．结果发现，第一组转染干涉载体的细胞 SOCS-3 蛋白表达受到了有效抑制，基本未检测到．但第二组转染干涉载体的细胞 SOCS-3 蛋白表达未见明显变化(图 5)，结果与实时荧光定量 PCR 一致，因此后续实验选择 pSicoR-SOCS-3-1 质粒转染的 K562 做进一步研究.

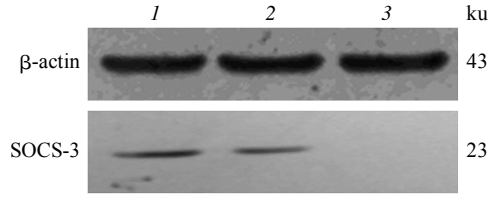

Fig. 5　Effect of RNA interference on SOCS-3 protein expression by Western-blot

1: K562 cells; *2*: Negative control group; *3*: pSicoR-SOCS-3-1 transfection group.

2.5　SOCS-3 沉默促进了 K562 细胞向红系的发育

2.5.1　形态学观察．未诱导的 K562 细胞呈圆形，细胞体积较大，折光性好，胞浆内未见颗粒，偶见空泡，胞核大，核仁清晰数目不等；转染了慢病毒干涉载体的 K562 细胞诱导 2 天后，细胞体积有所缩小，胞浆丰富，核浆比降低，核仁模糊，形态

逐渐类似于早幼红细胞．未转染细胞与转染了空载体的细胞诱导 4 天后才能观察到类似的变化．

2.5.2　联苯胺染色结果．经台盼蓝拒染细胞计数及联苯胺染色确定不同实验组向红系发育的情况，结果发现，转染了慢病毒干涉载体的细胞联苯胺染色阳性率在诱导第 4 天达到峰值，未转染与转染了空载体的则在第 6 天达到峰值．此外干涉载体组的联苯胺染色阳性率明显高于 2 个对照组，最高可达 47.3%(图 6).

2.5.3　免疫荧光法检测．诱导 7 天后分别用免疫荧光法检测了转染了阴性对照和 pSicoR-SOCS-3 的 K562 细胞红系相关标志 CD71 的表达情况，结果发现，转染了干涉载体的细胞呈现红色荧光的比率大大高于阴性对照组(图 7)．这更进一步证实了联苯胺染色的结果．

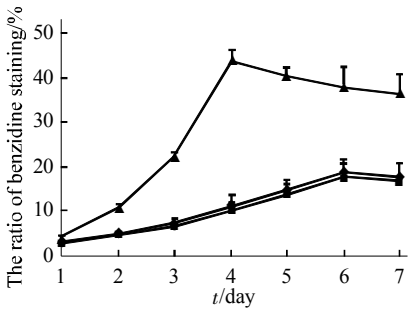

Fig. 6　Benzidine staining of K562 cells in different groups

◆—◆: K562 cells; ■—■: Negative control; ▲—▲: pSicoR-SOCS-3-1 group.

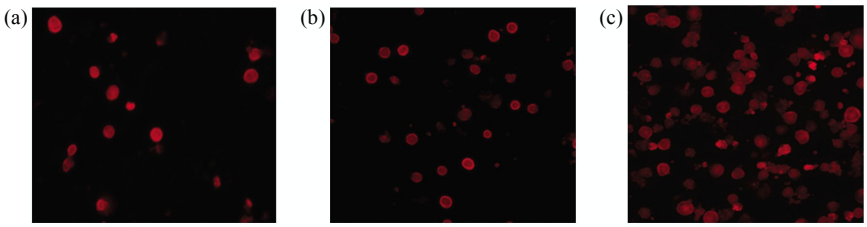

Fig. 7　Fluorescent immunocytochemistry analysis of CD71 expression on K562 cells

(a) K562 cells transfected with control plasmid. (b) Control group cells. (c) K562 cells transfected with pSicoR-SOCS-3 plasmid. (100×)

2.5.4　RT-PCR．为了检测不同组 K562 细胞向红系发育过程中特异基因表达情况的变化，本实验收集诱导 0 天、4 天、6 天的 K562 细胞对其红系特异基因 α-globin 的表达情况进行了半定量检测．结果显示，诱导前各组细胞均弱表达 α-globin，诱导 4 天各组细胞 α-globin 的表达较诱导前均有所增强，而且转染干涉载体的细胞的 α-globin 表达高于 2 个对照组，在诱导 6 天空载体与阴性对照组的 α-globin 较诱导第 4 天有了进一步增强，但转染干涉载体的细胞的 α-globin 表达无明显变化．

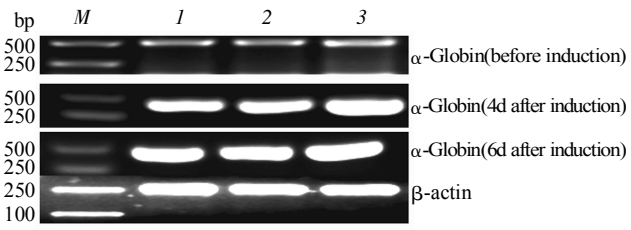

Fig. 8　RT-PCR analysis of α-globin gene expression in K562

M: DL2000; *1*: Untransfected group; *2*: Negative control group; *3*: pSicoR-SOCS-3-1 transfection group.

3　讨　　论

红细胞源于骨髓多能造血干细胞，在全血中容积百分比约为 50%，是血液中最主要的细胞成分，红细胞移植是目前治疗贫血的常用手段[8]．为了缓解其临床使用压力，近年来多个研究小组致力于体外诱导红细胞的研究，并建立了多种不同的诱导体系如细胞因子诱导体系、饲养层共培养体系等．然而大量使用因子的昂贵费用及异源饲养层的危险性极大地限制了上述方法的应用前景[9, 10].

红细胞的产生受到造血因子和造血干细胞自身内在基因的共同调控，其中促红细胞生成素(EPO)是其产生的最重要因子．EPO 是一种由肾近曲小管附近的细胞合成分泌的一种糖蛋白，它结合并激活位于造血干细胞上的特殊受体，使之定向发育成为成熟红细胞．EPO 缺乏时，红系前体细胞将被降解死亡[11, 12]．细胞因子信号转导抑制因子 -3 是广泛存在于人和哺乳动物细胞中的一种胞浆蛋白．有研究证明 EPOR 受体上有 SOCS-3 的高亲和结合位点，SOCS-3 对 EPO 具有负调控作用[13]．正常情况

下，细胞内 SOCS-3 低水平表达，但在 EPO 的刺激下，它的表达在 15～30 min 内可迅速升高，并产生能够能直接与 EPO 受体及 JAK2 结合的蛋白质，抑制 EPO 引起的 STAT5 活化及下游反应，从而对红细胞的生成产生强烈的负调控作用[14, 15]. 基于上述研究背景，我们希望通过一定的方法降低 SOCS-3 在造血祖细胞中的表达，从而抑制它对 EPO 的负调控作用，提高造血细胞对 EPO 的灵敏性，促进造血祖细胞向红细胞的发育，以建立一种高效率、低成本的红系诱导方法.

人红白细胞血病细胞(K562 细胞)具有造血多能干细胞的某些特性，既能在一般培养条件下迅速分裂增殖又能在不同培养条件下向红系、粒系、巨核细胞系分化成熟，因此可将它作为原始造血干细胞模型来应用[16]. 我们选择 K562 细胞作为研究模型，进行下游实验.

RNA 干涉是生物界普遍存在的一种防御反应，被细胞内出现的双链 RNA 激活，可高度特异地抑制同源基因的表达[17, 18]. 近年来随着相关研究的深入，该技术被广泛地应用于多个领域，发挥着重要的作用. siRNA 具有 RNA 双链结构和 3′端双核苷酸悬垂，较难被核酶降解，所以用它作为基因沉默工具具有更好的稳定性和更优越的抑制效果[19]. 慢病毒载体是一种新型病毒载体，具有获得病毒周期短，滴度高，可以感染分裂、非分裂细胞，能整合入宿主基因组从而稳定表达目的基因等特点. 本研究根据冷泉港实验室的报道，挑选了 2 对 SOCS-3-siRNA 寡核苷酸片段，通过分子克隆技术成功地构建了慢病毒干涉质粒 pSicoR- SOCS-3-1 和 pSicoR- SOCS-3-2，并包装产生了具有感染力的能够稳定干涉人 SOCS-3 的慢病毒毒液. K562 细胞是悬浮生长细胞，使用普通毒液难以达到理想的感染效果. 因此我们对所收集的病毒毒液进行了超速离心和浓缩，从而达到了有效感染悬浮细胞的目的. 此后，我们对 100%表达慢病毒干涉载体的 K562 细胞进行了实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹杂交鉴定结果显示，pSicoR-SOCS-3-1 慢病毒干涉载体，不论是 mRNA 水平还是蛋白质水平，均成功、稳定地干涉了 K562 细胞 SOCS-3 基因的表达(干涉效率约为 77%).

本研究中在确定了 SOCS-3 沉默效果之后，对转染了慢病毒干涉载体的 K562 细胞、转染了空载体的 K562 细胞及正常的 K562 细胞进行了红系诱导分化，并通过 Wright-Gimsa 染色、免疫荧光检测、联苯胺染色与半定量 PCR 等方法对各组细胞的分化快慢、分化效率及分化过程中基因表达的变化做了详细比较，结果表明，在相同的红系分化特异因子作用下，转染了慢病毒干涉载体的 K562 细胞诱导 2 天便可观察到的形态学变化，诱导 4 天联苯胺染色阳性率便可达 47.3%. 而未转染的 K562 细胞与转染了空载体的 K562 诱导 6 天联苯胺染色阳性率才可达 18%左右. 这表明与对照组相比，SOCS-3 表达被抑制时，K562 细胞会更迅速、更高效的向红系分化.

综上所述，我们通过构建慢病毒干涉载体的方法，稳定干涉了 K562 细胞中 SOCS-3 表达，同时我们又对转染细胞进行了红系诱导分化，结果证明 SOCS-3 基因沉默有利于造血祖细胞向红系的发育. 为深入研究造血细胞发育调控机制，以及以胚胎干细胞或造血干细胞为启动细胞大规模的诱导产生红细胞奠定了基础.

参 考 文 献

1 Johansson P I. The blood bank: from provider to partner in treatment of massively bleeding patients. Transfusion, 2007, **47** (2 Suppl): 176S～181S

2 Weiskopf R B, Webb M, Stangle D, *et al*. A procedure for rapid issue of red cells for emergency use. Arch Pathol Lab Med, 2005, **129**(4): 492～496

3 Abby L Olsen, David L Stachura, *et al*. Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. Blood, 2006, **107** : 1265～1275

4 Endo T A, Masuhara M, Yokouchi M, *et al*. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature, 1997, **387**(6636): 921～924

5 Hilton D J, Richardson R T, Alexander W S, *et al*. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(1): 114～119

6 Marine J C, Mckay C, Wang D, *et al*. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. Cell, 1999, **98**(5): 617～627

7 Andrea V, Alexander M, Christopher P D, *et al*. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. Proc Natl Acad Sci, 2004, **101**(28): 10380～10385

8 Yazdanbakhsh K. Development of complement therapeutics for inhibition of immune-mediated red cell destruction. Transfusion, 2005, **45**(2 Supp1): 122S～129S

9 Douay L, Andreu G. *Ex vivo* production of human red blood cells from hematopoietic stem cells: what is the future in transfusion?. Transfus Med Rev, 2007, **21**(2): 91～100

10 Giarratana M C, Kobari L, Lapillonne H, *et al*. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol, 2005, **23**(1): 69～74

11 Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. Regulation of the

erythropoietin gene evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science, 1988, **242**(488): 1412～1415

12 Sawyer S T, Krantz S B, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. Blood, 1989, **74**(1): 103～109

13 Hörtner M, Nielsch U, May L M, *et al*. Suppressor of cytokine signaling-3 is recruited to the activated granulocyte-colony stimulating factor receptor and modulates its signal transduction. J Immunol, 2002, **169**(3): 1219～1226

14 Sakaki A, Yasukawa H, Shouda T, *et al*. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. J Biol Chem, 2000, **275** (38): 29338～29347

15 Nicholson S E, de Souza D, Fabri L J, *et al*. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP -2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp 130. Proc Natl Acad Sci USA. 2000, **97**(12): 6493～6498

16 张祖旬, 李爱华, 曾小澜, 等. K562 细胞模拟骨髓造血多能干细胞的实验应用. 中国生化药物杂志, 2000, **21** (1): 52～53

17 Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, **431**(7006): 343～349

18 Hannon G J，Rossi J J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature, 2004, **431**(7006): 371～378

19 Bass B L. RNA interference. The short answer. Nature, 2001, **411** (6836): 428～429

Effect of Silencing SOCS-3 by siRNA on The Erythropoietic Development*

LIU Yu-Xiao, JI Lei, YUAN Hong-Feng, CHEN Lin, XUE Jun, GUAN Zhao-Xuan, NAN Xue, BAI Ci-Xian, WANG Yun-Fang, YUE Wen, PEI Xue-Tao**

(*Research Center of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing* 100850, China)

Abstract To study the regulation mechanism of SOCS-3 (Suppressor of cytokines signals-3) for erythropoietic development, small interference RNA expression vectors of SOCS-3 were constructed and transferred in to the K562 cell lines stably by lentiviral system. The efficiency of virus transfection was identified by expression of green fluorescence protein(GFP) analyzed by fluorescence microscope, then the high GFP expression K562 cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) according to strong GFP expression. The efficiency of RNA interferencing on SOCS-3 were detected by Real time-PCR and Western blot. The SOCS-3 gene expression at mRNA level of K562 cells transfected by lentivirus plasmids was 22.1% of the K562 cells transfected by the control lentivirus. The SOCS-3 protein expression of K562 cells transfected by lentivirus plasmids was also down regulated. Furthermore, K562 cells transfected by lentivirus plasmids were induced into the erythropoietic cells and the erythropoietic differentiation of K562 cells were examined by benzidine staining, immunocytochemistry and RT-PCR. Then it was found that the K562 cells could be induced into erythroid lineage cells more easily after silencing of SOCS-3. The experiment confirmed the important role of SOCS-3 in erythropoietic development and provided a useful new way for production of erythroid lineage cells.

Key words small interference RNA, gene silence, SOCS-3, lentivirus, erythropoietic development, K562

---

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), National Basic Research Program of China (2005CB522702) and The Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission(Z0005190043331).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: November 26, 2007 Accepted: December 28, 2007