

KLF1 和 *KLF9* 对 K562 细胞红系分化的协同调控作用

任岚^{1,2}, 肖茹丹^{1,2}, 张倩^{1,2}, 娄晓敏^{1,3}, 张昭军^{1,3,4}, 方向东^{1,2,3,4}

1. 中国科学院北京基因组研究所, 中国科学院基因组科学与信息重点实验室, 北京 100101
2. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049
3. 中国科学院大学中丹学院, 北京 101408
4. 中国科学院干细胞与再生创新研究院, 北京 100190

摘要: Krüppel 样因子(Krüppel-like factors, KLFs)是锌指蛋白超家族的一个亚家族, 参与细胞内的多种生理、病理过程, 该家族成员在红细胞分化发育过程中发挥非常重要的作用, 但是家族成员间对红系分化的协同调控作用还鲜有报道。本课题组前期研究发现, KLF 家族成员 *KLF1* 和 *KLF9* 在已分化的红系细胞中的表达水平显著高于造血干细胞。为进一步探讨二者在红系分化中是否存在协同作用, 本研究在 K562 细胞中分别过表达/敲低表达 *KLF1* 和 *KLF9*, 检测二者表达的相关性, 发现 *KLF1* 和 *KLF9* 的基因表达呈现正相关, 且二者共表达可以显著促进 K562 细胞红系分化, 特异地增强β-珠蛋白的表达。通过对 *KLF1*、*KLF9* 单独和共同过表达、敲低表达的 K562 细胞转录组数据的分析发现二者可能通过 PI3K-Akt 和 FoxO 通路协同调控红系分化, *FOS*、*TF*、*IL8* 是协同调控的候选靶基因。本研究结果为后续深入研究 *KLF1* 和 *KLF9* 协同调控红系分化的分子机制奠定了基础。

关键词: 红系分化; KLF; 转录组测序; 转录因子

Synergistic regulation of the erythroid differentiation of K562 cells by *KLF1* and *KLF9*

Lan Ren^{1,2}, Rudan Xiao^{1,2}, Qian Zhang^{1,2}, Xiaomin Lou^{1,3}, Zhaojun Zhang^{1,3,4},
Xiangdong Fang^{1,2,3,4}

1. CAS Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
2. Life Sciences College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
3. Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China
4. Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Krüppel-like factors (KLFs) regulate diverse physiological processes such as the differentiation and

收稿日期: 2018-06-29; 修回日期: 2018-09-30

基金项目: 中国科学院器官重建与制造战略性先导科技专项(编号: XDA16010200)和国家自然科学基金项目(编号: 81700097, 81700116, 81670109, 31471115, 31371300)资助[Supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. XDA16010200) and the National Natural Science Foundation of China (Nos.81700097, 81700116, 81670109, 31471115, 31371300)]

作者简介: 任岚, 硕士研究生, 专业方向: 疾病组学与转化医学研究。E-mail: eico.renlan@gmail.com

肖茹丹, 硕士研究生, 专业方向: 疾病组学与转化医学研究。E-mail: xiaorudan@big.ac.cn

任岚和肖茹丹并列第一作者。

通讯作者: 方向东, 博士, 研究员, 研究方向: 干细胞与复杂疾病临床组学与转化医学。E-mail: fangxd@big.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-174

网络出版时间: 2018/11/13 11:32:56

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20181113.1132.001.html>

development of red blood cells. However, it remains unclear whether KLFs exhibit synergistic regulatory effects. Transcriptomic data from our previous study showed that *KLF1* and *KLF9* expression was significantly higher in differentiated red blood cells than in hematopoietic stem cells. In the present study, we manipulated *KLF1* and *KLF9* gene expression by overexpressing or knocking down *KLF1* and *KLF9* in K562 cells and revealed a positive correlation between the expression of *KLF1* and *KLF9*; their co-expression can significantly promote erythroid differentiation and specifically enhance β -globin gene expression. Further, we analyzed the transcriptome data of K562 cells with altered *KLF1/KLF9* levels and found that *KLF1* and *KLF9* synergistically regulated erythroid differentiation through the PI3K–Akt and FoxO signaling pathways. *KLF1* and *KLF9* may exert this synergistic effect through *FOS*, *TF*, and *IL8* in K562 cells. We have provided evidence that *KLF1* and *KLF9* play a synergistic role in regulating erythroid differentiation.

Keywords: erythroid differentiation; KLF; transcriptome sequencing; transcription factors

Krüppel 样因子(Krüppel-like factors, KLFs)是锌指蛋白超家族的一个亚家族^[1], 参与细胞内的多种生理、病理过程^[2, 3], 与红系分化过程密切相关^[4]。*KLF1* 通过结合 β -珠蛋白启动子和位点控制区(locus control region, LCR), 促进成年期 β -珠蛋白的表达和胎儿期 γ -珠蛋白到 β -珠蛋白基因的转换^[5, 6]。*KLF2*、*KLF11*、*KLF13* 等主要是促进胚胎期 ϵ -珠蛋白与胎儿期 γ -珠蛋白基因的表达, 同时这些珠蛋白的表达还受 *KLF3*、*KLF8* 等因子的抑制^[7-10]。*KLF17* 参与调控早期红系分化过程^[11]。在小鼠中敲除 *KLF1*、*KLF2*、*KLF3*、*KLF6* 和 *KLF13* 等基因都可观察到造血缺陷或贫血等异常表型^[7, 12-14]。此外, 还发现多个 KLF 因子对红系分化具有协同作用, 但具体作用机制目前仍不清楚。如 *KLF1* 和 *KLF2* 通过控制以 *Myc* 为中心的作用网络调控胚胎早期珠蛋白基因表达和红细胞生成过程^[15]。在已分化的红系细胞中, *KLF3* 的表达依赖于 *KLF1*, 在 *KLF1*^{-/-} 小鼠胎肝红系细胞中 *KLF3* 表达水平明显降低^[16, 17]。在 *KLF1*^{-/-} 小鼠胎肝中, *KLF9* 的表达水平显著降低^[17], 但是 *KLF9* 调控红系分化的方式及功能目前尚未见报道。

本课题组前期进行了人脐带血造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)向红系分化过程中特定阶段细胞(HSC、P2、P3、P4、P5、RBC)的转录组研究^[18], 通过分析 KLF 家族成员在上述时期转录组数据中的表达丰度, 发现 *KLF1*、*KLF9*、*KLF15* 这 3 个因子在由 HSC 分化的红系细胞中的表达水平显著高于未分化的 HSC, 提示这 3 个因子可能发挥了协同调控细胞红系分化的作用。由于 *KLF15* 在这

些细胞中的表达水平极低, 并且该基因不仅仅在红系细胞中发挥作用, 其在人胚胎干细胞中的表达水平也高于已分化的红系细胞^[19], 因此并不支持其作为促进红系分化的调控因子。*KLF9* 由于在其非编码基因组区域存在红系特异增强子元件, 并且已被证明是潜在的红系分化的调控因子^[19]。因此, 本研究主要关注 *KLF1* 和 *KLF9* 对红系分化的协同调控作用。

本研究利用 K562 细胞模型, 首先确认了 *KLF1* 和 *KLF9* 基因表达的正相关性, 发现二者共表达显著促进红系分化和 β -珠蛋白的表达; 通过对 *KLF1* 和 *KLF9* 分别和共同过表达、敲低表达的 K562 细胞的转录组数据进行分析, 探讨了二者对红系分化协同调控的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 菌株、质粒载体 pCDH-CD713B、pRNAT-U6.1/Neo 由本实验室保存; K562 细胞来源于 ATCC 细胞库; Trizol 试剂盒、反转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒、限制性内切酶等试剂购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 过表达细胞株的构建

根据 NCBI 上提供的 *KLF1*、*KLF9* 共识编码序列(consensus coding sequence, CCDS), 设计二者全长表达的引物(*KLF1* 引物两端带有 *Xho* I 和 *Not* I 酶

切位点、*KLF9* 引物两端带有 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切位点)。提取 K562 细胞的 cDNA 作为模板, PCR 扩增分别得到全长的 *KLF1*、*KLF9* 片段, 并与 pCDH-CD713B 载体分别经过 *Xho* I 和 *Not* I 或 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 连接得到过表达质粒。随后, 利用电转染方法将过表达质粒分别转染 K562 细胞 24~48 h 后, 利用 G418 (800 μg/mL) 分别筛选出 *KLF1* 和 *KLF9* 稳定过表达的细胞, 将对照组、*KLF1* 过表达细胞株、*KLF9* 过表达细胞株和 *KLF1*、*KLF9* 共同过表达细胞株分别命名为 Ctrl-OE、*KLF1*-OE、*KLF9*-OE、*KLF*(1+9)-OE。

1.3 敲低表达细胞株的构建

设计并合成 *KLF1* 的 siRNA (吉玛基因, 苏州), 利用 Lipofectamine LTX 试剂盒转染 K562 细胞。根据 RNAi Designer 网站设计 *KLF9* 的 shRNA, 并将 shRNA 连接到 pRNAT-U6.1/Neo 载体后, 采用电转的方法将重组质粒转染 K562 细胞。转染后的 K562 细胞, 通过 G418 (800 μg/mL) 的筛选获得稳定敲低表达的细胞株, 将对照组、*KLF1* 敲低表达细胞株、*KLF9* 敲低表达细胞株和 *KLF1*、*KLF9* 共同敲低表达细胞株分别命名为 Ctrl-KD、*KLF1*-KD、*KLF9*-KD、*KLF*(1+9)-KD。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应

利用 Trizol 法提取 K562 细胞总 RNA, 采用 TaqMan 反转录试剂盒对 1 mg 总 RNA 进行反转录。引物序列见表 1。利用 CFX96™ Real-Time 系统检测上述基因 mRNA 表达丰度。扩增条件: 95 5 min; 95 30 s, 60 15 s, 72 10 s, 78 40 s, 40 个循环; 78 10 min。溶解曲线的程序为 95℃ 15 s; 60 15 s; 95 15 s。上述基因均被检测 3 次, 其表达水平以 *GAPDH* 的丰度作为内参, 用 CFXManager 软件分析基因表达结果, 并采用 *T*-test 方法分析差异显著性。

1.5 K562 细胞红系分化诱导方法

取 1×10⁶ 个 K562 细胞置于 6 cm 培养皿中, 添加 5 mL RPMI 1640 完全培养基和 25 μL 10 mmol/L 的 Hemin 试剂后, 摇动培养皿使之混匀; 置于

表 1 本研究所使用的引物序列信息

Table 1 Primers sequences used in this study

基因	引物序列(5'→3')
<i>KLF1</i>	F: TTGCGGCAAGAGCTACACC
	R: GTCAGAGCGCGAAAAAGCAC
<i>KLF9</i>	F: ACAGTGGCTGTGGGAAAGTC
	R: AACTGCTTTTCCCCAGTGTG
<i>HBB</i>	F: TTGAGTCCCTTTGGGGATCTG
	R: AGCTCACTCAGTGTGGCAAA
<i>HBG</i>	F: CCCAGAGGTTCTTTGACAGG
	R: TTCTCAGGATCCACATGCAG
<i>HBE</i>	F: TTTGGAACCTGTGCTCTCC
	R: GGCTTGAGGTTGCTCTCTCC
<i>GAPDH</i>	F: TGTTGCCATCAATGACCCCTT
	R: CTCCACGACGTACTCAGCG

37、5% CO₂ 的培养箱中培养, 加 Hemin 诱导 72 h 后进行后续实验。

1.6 流式细胞术(FACS)检测红细胞分化方法

将 Hemin 试剂诱导的 K562 细胞收集到新的 15 mL 离心管中, 300 g 离心 5 min, 弃上清, 用 1×PBS (含 2% FBS, 2 mmol/L EDTA) 重悬细胞, 300 g 离心 5 min, 弃上清后再用 PBS 洗一次, 用 500 μL 1×PBS 重悬, 将细胞转移到流式管中, 加入抗体 CD235a-PE 和 CD71-APC 染色, 每管各 0.5 μL, 混匀后放 4 黑暗静置 10 min; 300 g 离心 5 min, 弃上清后用 1×PBS 洗一次, 再重悬于 500 μL 1×PBS 中; 用流式细胞仪分析 CD235a 和 CD71 双阳细胞的比例。

1.7 转录组建库与测序方法

Ctrl-OE、*KLF1*-OE、*KLF9*-OE、*KLF*(1+9)-OE、Ctrl-KD、*KLF1*-KD、*KLF9*-KD 和 *KLF*(1+9)-KD 细胞分别经 Hemin 诱导 72 h 后, 分别收集细胞提取细胞的总 RNA, 由北京基因组研究所所级中心测序平台进行转录组建库, 通过 HiSeq2000 测序平台进行 RNA-seq 转录组测序。

1.8 转录组数据分析方法

1.8.1 RNA-Seq 组学数据在参考基因组上的比对

RNA-Seq 组学测序得到的序列首先用 FastQC

评估测序质量。使用 HISAT2 对原始数据进行基因组比对。参考基因组用 GRCh37。

1.8.2 转录本组装和定量分析

用 samtools 工具处理 HISAT2 输出的结果 sam 文件, 转换成可供基因组定量分析的 bam 文件。使用 StringTie 组装转录本、注释并估测转录本的丰度等。序列数目根据基因长度和总的比对上的序列数进行标准化, 以 FPKM 作为统一的度量标准^[20]。FPKM 置信区间估算是通过 Bayesian 推理方法来实现的^[21]。

1.8.3 差异表达基因的鉴定

用 Edge R 软件包进行基因差异表达分析。筛选标准为 fold-change 2.0, 且 $P < 0.05$ 。

1.8.4 基因的功能注释和网络分析

用 DAVID 平台分析差异表达基因的 Gene Ontology 和差异显著性通路。分子相互作用网络通过 STRING 公共知识数据库分析获得。

2 结果与分析

2.1 *KLF1* 和 *KLF9* 基因表达的相关性

如果 *KLF1* 与 *KLF9* 协同调控红系分化, 那么在红细胞中这两个基因的表达可能会存在相关性。本研究在 *KLF1*、*KLF9* 分别过表达和敲低表达的 K562 细胞中, 利用 qRT-PCR 技术检测这两个基因的表达情况。结果发现, 过表达一个 *KLF* 基因后, 另一个

基因的表达水平会显著升高; 反之亦然(图 1)。因此, *KLF1* 与 *KLF9* 基因表达呈正相关。

2.2 *KLF1* 和 *KLF9* 协同促进 K562 细胞红系分化

为研究 *KLF1* 和 *KLF9* 是否协同调控红系分化, 本研究分别利用 Hemin 对 *KLF1*、*KLF9* 及共同过表达、敲低表达的 K562 稳定细胞株进行体外红系诱导分化, 利用 FACS 技术分析红细胞表面红系特异标志物 CD235a 和 CD71 的表达变化。通过对 3 次实验结果的统计分析, 发现 *KLF1*、*KLF9* 分别高表达均可以显著增加 CD71⁺、CD 235a⁺ 双阳性 K562 细胞的比例, 反之亦然(图 2)。 *KLF1* 和 *KLF9* 共同高表达时 CD235a⁺ 和 CD71⁺ 双阳性细胞的比例更高(图 2A), 表明 *KLF1* 和 *KLF9* 对红系分化有协同促进作用。 *KLF1* 和 *KLF9* 共同敲低表达虽也能部分抑制红系分化, 但抑制作用并不如单一基因敲低表达的作用明显(图 2B), 可能是由于二者共同敲低表达使得细胞启动了其他基因参与红系分化。

2.3 *KLF1* 和 *KLF9* 协同促进 *HBB* 的表达

珠蛋白基因的表达变化也是评估红系分化的重要标志之一, 不同类型的珠蛋白基因(*HBE*、*HBG* 和 *HBB*) 在红系分化的不同阶段呈现特征性表达。在 K562 细胞的红系诱导分化模型中, 本研究分别检测了 *KLF1*、*KLF9* 及其共同过表达或敲低表达对 β 珠蛋白基因家族中 *HBE*、*HBG*、*HBB* 基因表达的影响。结果表明, *KLF1* 和 *KLF9* 两个基因单独和共同过表达均可促进 *HBB* 表达($P < 0.05$), 且共同过表达促进效果更显著($P < 0.01$), 进一步表明二者具有协同促进

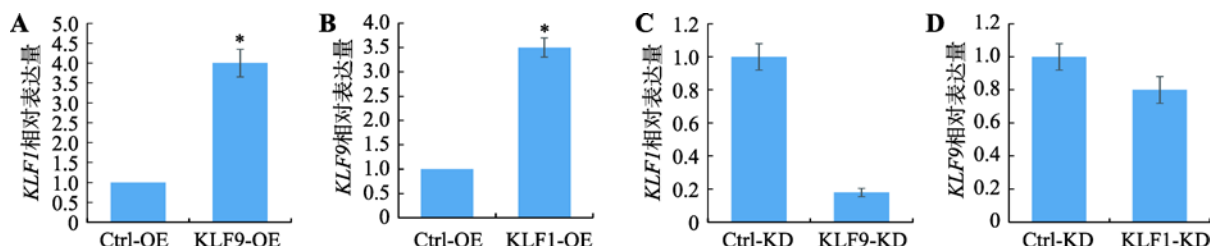


图 1 K562 细胞中 *KLF1* 和 *KLF9* 基因表达的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis of *KLF1* and *KLF9* gene expression in K562 cells

A: K562 细胞中 *KLF9* 过表达后 *KLF1* 的表达量; B: K562 细胞中 *KLF1* 过表达后 *KLF9* 的表达量; C: K562 细胞中 *KLF9* 敲低表达后 *KLF1* 的表达量; D: K562 细胞中 *KLF1* 过表达后 *KLF9* 的表达量。Ctrl-OE: 对照; KLF1-OE: *KLF1* 过表达细胞株; KLF9-OE: *KLF9* 过表达细胞株; KLF1-KD: *KLF1* 敲低表达细胞株; KLF9-KD: *KLF9* 敲低表达细胞株。*表示 $P < 0.05$, 差异显著。

红系分化的作用(图 3A)。除单独过表达 *KLF1* 可显著抑制 *HBB* 的表达外^[22], 其他过表达方式对 *HBE* 和 *HBG* 表达的影响不显著, 且敲低表达实验并不能显著下调 *HBB*、*HBE* 和 *HBG* 的表达(图 3B)。

2.4 *KLF1* 和 *KLF9* 协同调控红系分化的分子机制分析

为深入探究 *KLF1* 和 *KLF9* 协同调控红系分化的分子机制, 本研究对 *KLF1*、*KLF9* 及共同过表达或敲低表达细胞株进行转录组测序分析, 按照 fold-change 2.0 且 $P < 0.05$ 的筛选标准, 各组差异基因的上下调数目, 结果如表 2 所示。敲低表达组的差异基因数目多于过表达组, *KLF1* 和 *KLF9* 共同过表达或敲低表达组的红系分化相关的差异基因数目多于其单独敲低表达或过表达组。

利用 DAVID 数据库对差异基因进行 KEGG 分析, 结果表明差异基因所富集的通路, 有些在 *KLF1*、*KLF9* 单独和共同过表达、敲低表达中均受到了影响(图 4)。PI3K-Akt 通路和 FoxO 通路是 *KLF1* 过表达和二者共同过表达的共有通路, 且均与红系分化相关^[23]。受 *KLF9* 过表达影响的 TNF 通路与 PI3K-Akt 通路有直接关系, 暗示 *KLF1* 和 *KLF9* 可能通过这几个通路协同调控 K562 细胞的红系分化进程。此外, 在所有敲低表达组中共有的 NF-KappaB 通路也与 TNF 通路有着密切关系, 这些通路的相互关系如图 5 所示。

此外, 将差异表达基因提交至 STRING 分子网络分析平台, 构建 PPI 分子调控网络(图 6)。对比网络核心基因, 发现共有的潜在靶基因是 *FOS*、*TF*、*IL8*, 其中 *TF* 与 *KLF1* 有关, 而 *IL8*、*FOS* 被证实与

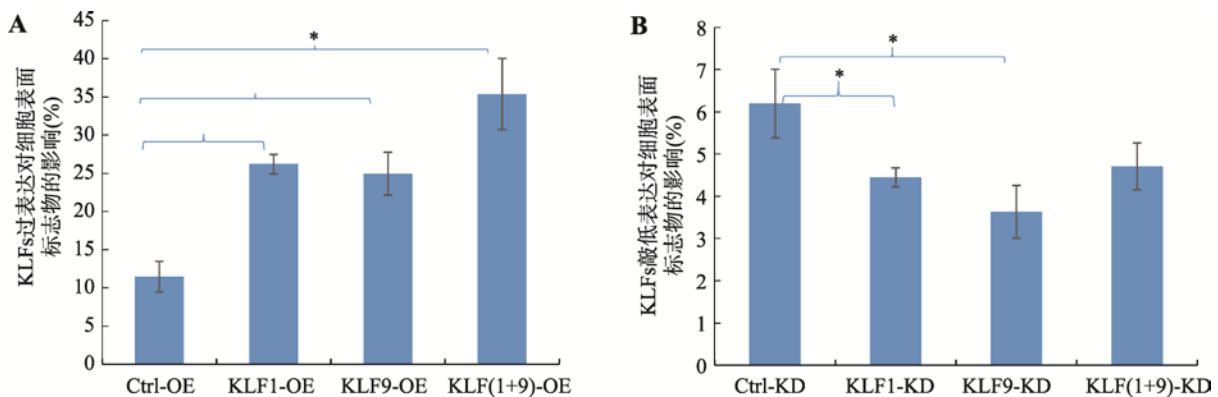


图 2 *KLF1* 和 *KLF9* 对 Hemin 诱导 K562 细胞红系分化的影响

Fig. 2 The effects of *KLF1* and *KLF9* on the erythroid differentiation of K562 cells induced by Hemin

A: FACS 分析 *KLF1*、*KLF9* 分别和共同过表达对 K562 细胞红系分化的影响; B: FACS 分析 *KLF1*、*KLF9* 分别和共同敲低表达对 K562 细胞红系分化的影响。KLF(1+9)-OE: *KLF1*、*KLF9* 共同过表达细胞株; KLF(1+9)-KD: *KLF1*、*KLF9* 共同敲低表达细胞株。*表示 $P < 0.05$, 差异显著; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

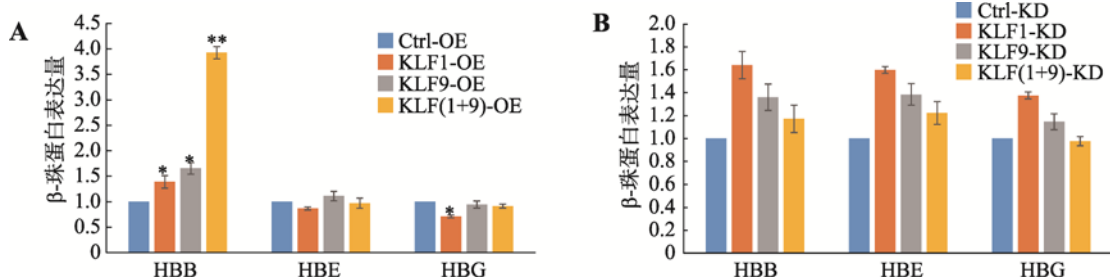


图 3 *KLF1* 和 *KLF9* 对不同亚型珠蛋白基因表达的影响

Fig. 3 The effects of *KLF1* and *KLF9* on the gene expression of different β -globins

A: 不同类型珠蛋白基因在 *KLF1*、*KLF9* 分别和共同过表达细胞中的表达丰度; B: 不同类型珠蛋白基因在 *KLF1*、*KLF9* 分别和共同敲低表达细胞中的表达丰度。*表示 $P < 0.05$, 差异显著; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。

表 2 不同处理组差异基因上调和下调数目

Table 2 Number of differential genes in different treatment groups

	KLF1-OE vs. Ctrl-OE	KLF9-OE vs. Ctrl-OE	KLF(1+9)-OE vs. Ctrl-OE	KLF1-KD vs. Ctrl-KD	KLF9-KD vs. Ctrl-KD	KLF(1+9)-KD vs. Ctrl-KD
差异基因数目 (上调/下调)	280/553	166/151	262/305	538/408	390/532	497/427
红系分化相关 差异基因数目	45	29	45	79	66	88

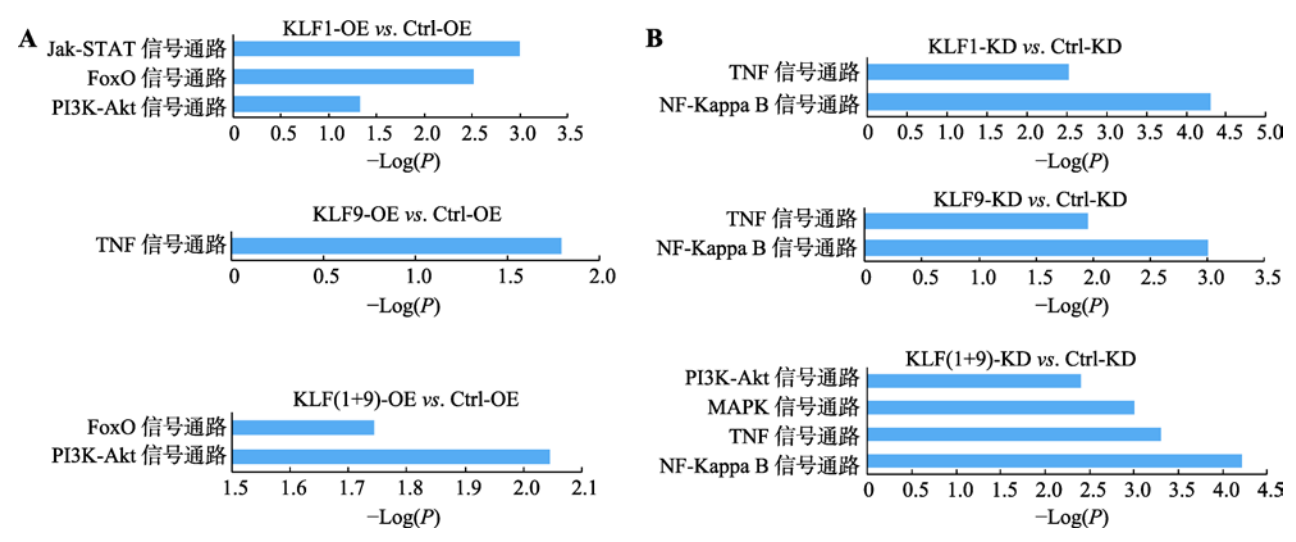


图 4 利用 DAVID 分析红系分化过程中受 *KLF1* 和 *KLF9* 过表达和敲低表达影响的主要信号通路

Fig. 4 The disturbed pathways were enhanced during K562 cells erythroid differentiation with *KLF1* and *KLF9* overexpression and knockdown

A: *KLF1* 和 *KLF9* 过表达影响的主要信号通路; B: *KLF1* 和 *KLF9* 敲低表达影响的主要信号通路。

KLF9 有关^[23], *TNF* 和相关凋亡诱导配体 TRAIL 作用可抑制正常红细胞生成^[24]。此外, 共同存在的一些血红蛋白 HBA1、HBD、HBE1、HBG2 和 HBZ 的差异也提示 *KLF1* 和 *KLF9* 在红系分化发育过程中发挥着重要作用。

3 讨 论

本研究利用 K562 细胞红系分化模型证明了两个 KLF 家族成员 *KLF1* 和 *KLF9* 对红系分化的协同促进作用, 发现了潜在受 *KLF1* 和 *KLF9* 协同调控的信号通路与候选靶基因。这些信息在很大程度上丰富了 KLF 家族因子调控红系分化的分子网络, 有助于拓展对 KLF 家族成员与红系造血相关疾病的病理机制之间可能联系的认识。K562 细胞是胎儿期红系细胞株, 尽管在体外红系诱导分化过程中不易评估

胎儿期向成人期转换过程而具有局限性, 但因其易于常规培养、便于基因遗传操作与表型评估等特征, 仍作为评估未知因子调控红系分化的较佳模型^[25, 26]。目前虽尚未有 *KLF9* 可调控成人期红系细胞分化的报道, 但在成人急性淋巴细胞白血病患者中 *KLF9* 显著上调^[27], 且有研究表明在成人红系祖细胞中降低 *KLF1* 水平可再次激活胎儿 β -珠蛋白基因表达^[28], 所以推测 *KLF1* 和 *KLF9* 可能在成人期红系细胞分化中也发挥一定的作用, 但还有待进一步探究。本研究发现 *KLF1* 和 *KLF9* 在 K562 细胞模型共同过表达可显著促进红系分化, 说明这两个基因在调控 K562 细胞红系分化进程中存在一定程度上互相促进或者相辅相成的关系。

共同过表达 *KLF1* 和 *KLF9* 对 *HBE* 和 *HBG* 的表达并没有影响, 表明 *KLF1* 和 *KLF9* 并不通过调控这两个珠蛋白基因促进红系分化。但是, 这两个 KLF

因子却可以特异性地协同促进 *HBB* 基因的表达水平, 异常表达可导致 β 地中海贫血^[29], 通过转录因子调控并促进 *HBB* 编码基因表达一直是探索 β -地贫临

床治疗策略之一,本研究为提高 *HBB* 基因的表达水平提供了新的思路。因此, *KLF1* 和 *KLF9* 协同促进 *HBB* 的表达依然具有重要理论意义。

通过对 *KLF1*、*KLF9* 表达水平改变所引起的差异表达基因的信号通路和蛋白质互作网络分析,鉴定了 *FOS*、*TF*、*JUN*、*FOXO3*、*TNF*、*IL8* 和 *RUNX2* 等几个可能发挥关键作用的重点基因。在后续研究中,我们会进一步利用染色质免疫共沉淀及荧光双报告基因等技术验证这些候选靶基因,结合原代造血干细胞、成人期 HUDEP-2 红系细胞模型和斑马鱼等模型,通过调节靶基因表达水平或改变通路等策略探索 *KLF1* 和 *KLF9* 调控 *HBB* 珠蛋白及红系分化的分子机制。

参考文献(References):

- [1] Conkright MD, Wani MA, Anderson KP, Lingrel JB. A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(5): 1263–1270. [DOI]
- [2] McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1337–1381. [DOI]
- [3] Xiong Q, Ruan XY, Fang XD. Progress on Sp1-like and Kruppel-like factors. *Hereditas (Beijing)*, 2010, 32(6): 531–538.
熊倩, 阮修艳, 方向东. Sp1/Kruppel 样因子的研究进展. *遗传*, 2010, 32(6): 531–538. [DOI]
- [4] Xiong Q, Zhang ZJ, Fang XD. Regulation of KLF on globin expression and erythroid differentiation. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2011, 27(8): 693–699.
熊倩, 张昭军, 方向东. KLFs 对珠蛋白基因表达和红系分化的调控作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(8): 693–699. [DOI]
- [5] Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 742–744. [DOI]
- [6] Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, Nourbakhsh E, Cloonan N, Grimmond SM, Bailey TL, Perkins AC. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res*, 2010, 20(8): 1052–1063. [DOI]
- [7] Basu P, Morris PE, Haar JL, Wani MA, Lingrel JB, Gaensler KM, Lloyd JA. KLF2 is essential for primitive erythropoiesis and regulates the human and murine embryonic beta-like globin genes *in vivo*. *Blood*, 2005, 106(7): 2566–2571. [DOI]
- [8] Asano H, Li X S, Stamatoyannopoulos G. FKLF, a novel kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal β -like globin genes. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(5): 3571. [DOI]
- [9] Hu JH, Navas P, Cao H, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Systematic RNAi studies on the role of Sp/KLF factors in globin gene expression and erythroid differentiation. *J Mol Biol*, 2007, 366(4): 1064–1073. [DOI]
- [10] Funnell AP W, Norton L J, Mak K S, Burdach J, Artuz C M, Twine N A, Wilkins M R, Power C A, Hung T T, Perdomo J. The CACCC-Binding protein KLF3/BKLF represses a subset of KLF1/EKLF target Ggenes and is required for proper erythroid maturation *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(16): 3281–3292. [DOI]
- [11] van Vliet J, Crofts LA, Quinlan KGR, Czolij R, Perkins AC, Crossley M. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics*, 2006, 87(4): 474–482. [DOI]
- [12] Funnell AP, Norton L J, Mak KS, Burdach J, Artuz CM, Twine NA, Wilkins MR, Power CA, Hung TT, Perdomo J, Koh P, Bell-Anderson KS, Orkin SH, Fraser ST, Perkins AC, Pearson RC, Crossley M. The CACCC-binding protein KLF3/BKLF represses a subset of KLF1/EKLF target genes and is required for proper erythroid maturation *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(16): 3281–3292. [DOI]
- [13] Gordon AR, Outram SV, Keramatipour M, Goddard CA, Colledge WH, Metcalfe JC, Hagertheodorides AL, Crompton T, Kemp PR. Splenomegaly and modified erythropoiesis in KLF13^{-/-} mice. *J Biol Chem*, 2008, 283(18): 11897–11904. [DOI]
- [14] Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL. Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood*, 2006, 107(4): 1357–1365. [DOI]
- [15] Pang CJ, Lemsaddek W, Alhashem YN, Bondzi C, Redmond LC, Ahson N, Dumur CI, Archer KJ, Haar JL, Lloyd JA, Trudel M. Kruppel-Like factor 1 (KLF1), KLF2, and Myc control a regulatory network essential for embryonic erythropoiesis. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(13): 2628–2644. [DOI]
- [16] Crossley M, Whitelaw E, Perkins A, Williams G, Fujiwara Y, Orkin SH. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4): 1695–1705. [DOI]

- [17] Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, Medowall A, Weiss M, Grimmond S, Perkins A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood*, 2006, 107(8): 3359–70. [DOI]
- [18] Nan D, Xi J, Li Y, Xie X, Jian S, Zhang Z, Li Y, Fang F, Wang S, Yue W, Pei X, Fang X. Global transcriptome analysis for identification of interactions between coding and noncoding RNAs during human erythroid differentiation. *Front Med*, 2016, 10(3): 297–310. [DOI]
- [19] Xiong Q, Zhang Z, Chang K H, Qu H, Wang H, Qi H, Li Y, Xiuyan R, Yang Y, Yang Y, Li Y, Sandstrom R, Sabo PJ, Li Q, Stamatoyannopoulos G, Stamatoyannopoulos JA, Fang X. Comprehensive characterization of erythroid-specific enhancers in the genomic regions of human Krüppel-like factors. *BMC Genomics*, 2013, 14: 587. [DOI]
- [20] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van MB, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 511–515. [DOI]
- [21] Jiang H, Wong WH. Statistical inferences for isoform expression in RNA-Seq. In: Oxford University Press, UK, 2009. [DOI]
- [22] Vinjamur DS, Alhashem YN, Mohamad SF, Amin P, Jr DCW, Lloyd JA. Krüppel-like transcription factor KLF1 is required for optimal γ - and β -globin expression in human fetal erythroblasts. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0146802. [DOI]
- [23] Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani-refah A, Pourfarzad F, Van IW, Lenhard B, Rooks H, Best S, Menzel S, Grosveld F, Thein SL, Soler E. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest*, 2014, 124(4): 1699–7110. [DOI]
- [24] Zama L, Secchiero P, Pierpaoli S, Bassini A, Papa S, Alnemri ES, Guidotti L, Vitale M, Zauli G. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*, 2000, 95(12): 3716–3724. [DOI]
- [25] Green AR, Rockman S, Deluca E, Begley CG. Induced myeloid differentiation of K562 cells with downregulation of erythroid and megakaryocytic transcription factors: a novel experimental model for hemopoietic lineage restriction. *Exp Hematol*, 1993, 21(4): 525–531. [DOI]
- [26] Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M, Gambari R. Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica*, 1997, 82(4): 395–401. [DOI]
- [27] Iacobucci I, Iraci N, Messina M, Lonetti A, Chiaretti S, Valli E, Ferrari A, Papayannidis C, Paoloni F, Vitale A, Storlazzi CT, Ottaviani E, Guadagnuolo V, Durante S, Vignetti M, Soverini S, Pane F, Foà R, Baccarani M, Müschen M, Perini G, Martinelli G. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40934. [DOI]
- [28] Zhou D, Liu K, Sun C W, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching. *Nat Genet*, 2010, 42(9): 742–744. [DOI]
- [29] Li YM, Xiong Q, Fang XD. Advances in research on transcriptional regulation and erythroid differentiation of globin genes. *J Dev Med*, 2013, (4): 223–229. 李艳明, 熊倩, 方向东. 珠蛋白基因的转录调控与红细胞分化发育研究进展. 发育医学电子杂志, 2013, (4): 223–229. [DOI]

(责任编辑: 杨昭庆)