

HIF-2 α 对高原红细胞增多症模型大鼠骨髓CD71⁺细胞GATA-1表达的影响

刘芳 魏巍 丁谨 陈英 冯婷婷 冀林华 施继禹

【摘要】 目的 探讨低氧诱导因子-2 α (HIF-2 α)对高原红细胞增多症(HAPC)模型大鼠骨髓CD71⁺细胞红系特异性转录因子GATA-1表达的影响。方法 选用雄性SD大鼠48只,随机分为低海拔对照组(海拔2 250 m饲养)和HAPC模型组(海拔4 300 m饲养)。在海拔4 300 m自然环境下复制HAPC大鼠模型并采用骨髓细胞分类计数、血液学参数和血清红细胞生成素(EPO)检测进行验证。应用密度梯度离心和免疫磁珠分选相结合的方法分选大鼠骨髓CD71⁺细胞, Q-PCR和Western blot法检测其HIF-2 α 、GATA-1 mRNA和蛋白的表达。低氧培养CD71⁺细胞,以最佳干扰序列HIF-2 α shRNAi3转染96 h, Q-PCR和Western blot检测HIF-2 α 、GATA-1 mRNA和蛋白的表达水平。结果 骨髓细胞分类计数、血液学参数和血清EPO含量测定结果提示HAPC大鼠模型复制成功。HAPC模型组骨髓CD71⁺细胞HIF-2 α 、GATA-1 mRNA和蛋白的表达高于低海拔对照组,且HIF-2 α 与GATA-1在mRNA和蛋白表达均呈正相关($r=0.923, P<0.01; r=0.838, P<0.01$)。HIF-2 α shRNAi3干扰HAPC模型组骨髓CD71⁺细胞96 h后, HIF-2 α 、GATA-1 mRNA和蛋白的表达均低于空白对照组和阴性对照组。结论 HIF-2 α 对GATA-1表达的影响可能与HAPC的发生发展相关。

【关键词】 高原红细胞增多症; 低氧诱导因子-2 alpha; GATA-1; 小干扰RNA

基金项目:国家自然科学基金(81441116);青海省科技厅(应用)基础研究计划(2012-Z-729)

Influence of HIF-2 α on the expression of GATA-1 in bone marrow CD71⁺ cell of high altitude polycythemia rat model Liu Fang*, Wei Wei, Ding Jin, Chen Ying, Feng Tingting, Ji Linhua, Shi Jiyu. *Department of Biochemistry, Medical College, Qinghai University, Xi'ning 810000, China
Corresponding author: Liu Fang, Email: qhxnlf2006@163.com

【Abstract】 Objective To explore the influence of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 α) on the expression of erythroid-specific transcription factor GATA-1 in bone marrow CD71⁺ cells of rat model with high altitude polycythemia (HAPC). **Methods** A total of 48 male SD rats were selected and randomly divided into normal control group and HAPC group. HAPC model was established at an altitude of 4 300 meters in the natural environment and verified by bone marrow cell classification and counting, hematologic parameters and serum EPO detection. Bone marrow CD71⁺ cells were separated by a combination of methods with density gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting. The changes of expression level of HIF-2 α , GATA-1 mRNA and proteins were detected by Q-PCR and Western blot. CD71⁺ cells were cultured under hypoxia condition and transfected with selected optimal HIF-2 α shRNAi3 for 96 h. And the expression level of HIF-2 α and GATA-1 mRNA and proteins were detected by Q-PCR and Western blot. **Results** The results of bone marrow cell counts, the hematologic parameters and the serum EPO content showed that the HAPC rat model was successfully established. The expression of HIF-2 α and GATA-1 mRNA and protein in bone marrow CD71⁺ cells of HAPC group was higher than that in control group ($P<0.05$). And HIF-2 α and GATA-1 of HAPC group were positively correlated at the expression levels of mRNA and protein, respectively ($r=0.923, P<0.01; r=0.838, P<0.01$). However, the expression of HIF-2 α and GATA-1 mRNA and protein in HAPC group was significantly lower than that in control groups after interfered by HIF-2 α shRNAi3 for 96 h ($P<0.05$). **Conclusion** The effect of HIF-2 α on GATA-1 expression may be correlated with the pathogenesis of HAPC.

【Key words】 High altitude polycythemia; Hypoxia-inducible factor-2 alpha; GATA-1; Small

interfering RNA

Found Program: National Natural Science Foundation of China(81441116); Applied Basic Research Programs of Science and Technology Department of Qinghai Provincial(2012-Z-729)

成熟红细胞执行氧气运输功能。缺氧发生时,为改善低氧血症,红细胞产生代偿性增加。高原低氧环境下,个体若出现红细胞过度积累、严重低氧血症的病理变化,最终会发展为高原红细胞增多症(high altitude polycythemia, HAPC)。HAPC多发生于海拔3 000 m以上地区移居男性人群,易并发心脑血管意外、肺栓塞、缺氧性肾病及胃肠病等多种致死率较高的严重疾病^[1],对高原地区居民的身心健康构成严重危害。缺氧诱导因子-2 α (hypoxia-inducible factor-2, HIF-2 α)是通过调控多种下游基因的表达来应答慢性低氧的主要转录因子之一。HIF-2由氧调节亚基 α 和构建亚基 β 组成具有转录活性的异源二聚体,能激活骨髓造血、铁代谢和能量代谢等相关基因的转录,在红细胞生成中起重要作用^[2-4]。红细胞生成是一系列特定谱系转录因子精密调控的有序增殖分化过程。GATA家族是参与其中的重要转录因子,具有保守锌指结构域,能够特异地结合基因启动子区(A/T)GATA(A/G)序列,调控下游基因的转录活性,参与造血等不同系统的发育。GATA-1是调控红系终末分化不可或缺的转录因子,在红系细胞中高表达^[5]。近期研究表明,低氧条件下HIF-2 α 作用于GATA-1促进肺泡II型细胞中血红蛋白的表达^[6],提示HIF-2 α 影响GATA-1的表达并可能参与HAPC成熟红细胞的过度积累过程。在本研究中,我们建立HAPC大鼠模型并分析HIF-2 α 对骨髓CD71⁺细胞GATA-1表达的影响,试图阐释HAPC中红细胞过度增殖分化的发生机制。

材料与方 法

1. 实验动物:健康SPF级雄性SD大鼠48只,体重(200 \pm 20)g,由西安交通大学医学部实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(陕)2012-003,合格证号:61001700000509。

2. 主要试剂:大鼠骨髓单个核细胞分离试剂盒购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。大鼠EPO ELISA试剂盒购自中国USCN公司。Anti-PE MicroBeads购自美国Miltenyi公司。流式单克隆抗体PE-CD71、PE-IgG2a购自美国BD公司。HIF-2 α shRNA靶点设计、慢病毒载体构建及包装由上海吉凯基因技术公司完成。StemSpanTM SFEM II购自美国STEMCELL公司。小鼠抗大鼠HIF-2 α 单克隆抗体购自美国Abcam公司,小鼠抗大鼠GATA-1、 β -actin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,HRP标记的二抗IgG购自北京中杉金桥生物有限公司。TRIzol总RNA提取试剂购自美国Invitrogen公司。ReveQAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit购自美国Fermentas公司。SYBR Green PCR Master Mix购自美国Bio-Rad公司。所用引物(表1)由上海生工生物工程股份有限公司合成。

3. 实验动物分组及HAPC模型的建立:将SD大鼠随机分为低海拔对照组和HAPC模型组,每组24只。参照文献^[7]方法,HAPC组大鼠自西安交通大学医学部运至海拔4 300 m青海省玉树州珍琴乡饲养40 d。低海拔对照组大鼠在海拔2 250 m西宁市同期饲养。尾静脉采血,测定红细胞数(RBC)、血红蛋白含量(HGB)、红细胞比容(HCT),并取1.5 ml全血分离血清用于ELISA法测定红细胞生成素(EPO)。颈动脉插管取血检测动脉血氧饱和度(SaO₂)。骨髓涂片行细胞分类计数。综合上述检测指标,根据2004年第六届国际高原医学和低氧生理学术大会制订的慢性高原病青海诊断标准(HGB>210 g/L, HCT>65%)^[8]判断动物是否患有HAPC。

4. CD71⁺细胞的分选和流式细胞术检测:CD71是表达于红系祖细胞至网织红细胞各分化阶段的

表1 引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')		扩增片段(bp)
	上游引物	下游引物	
HIF-2 α	TTCCAGCCACCATCTACCAG	GCCACTCCTGACCCCTTTTG	123
GATA-1	GCTCAGCAGCCTATTCTTCC	CGTTGCTCCACAGTTCACAC	89
β -actin	GATACTGCCCTGGCTCCTA	TCATCGTACTCCTGCTTGCT	144

红系特异性标志物之一^[9]。分离大鼠骨髓单个核细胞(MNC),等分为4组。两组分别与PE-CD71抗体和同型对照抗体4℃避光反应10 min后,加入Anti-PE MicroBeads 4℃避光孵育15 min,上样分选柱分选CD71⁺细胞,检测细胞CD71抗体的平均荧光强度值(MFI);另外两组分别加入PE-CD71抗体和同型对照抗体4℃孵育30 min,检测细胞CD71抗体的MFI,计算CD71⁺细胞占MNC的百分比。细胞计数10 000个以上。

5. 实时荧光定量PCR(Q-PCR)检测HIF-2 α 、GATA-1 mRNA表达:提取CD71⁺细胞总RNA,逆转录成cDNA后,以 β -actin为内参,采用2- $\Delta\Delta$ Ct法检测HIF-2 α 、GATA-1 mRNA表达。Q-PCR参数:95℃15 min,95℃10 s,60℃32 s,40个循环。每个样本重复3次。

6. Western blot法检测HIF-2 α 、GATA-1蛋白表达:用RIPA裂解液提取CD71⁺细胞总蛋白,BCA法定量后进行120 g/L SDS-PAGE电泳,蛋白电转至PVDF膜上,50 g/L脱脂牛奶室温封闭2 h,一抗HIF-2 α (1:250)、GATA-1(1:600)4℃过夜,二抗(1:80 000)室温下孵育1 h,ECL发光压片显色。以 β -actin为内参照。目的蛋白相对表达量=目的条带吸光度值/ β -actin条带吸光度值。

7. CD71⁺细胞的低氧培养:HAPC模型组大鼠骨髓CD71⁺细胞重悬于StemSpanTM SFEM II中,接种于6孔板(1.5 \times 10⁶个细胞/孔),置于37℃、3% O₂、92% N₂、5% CO₂、饱和湿度低氧培养箱中培养12 h,进行后续RNA干扰实验。

8. 细胞转染:低氧培养的CD71⁺细胞分为空白对照组(未转染任何干扰序列)、阴性对照组(转染阴性对照干扰序列)和HIF-2 α shRNAi 1、2、3组(分别转染HIF-2 α shRNAi 1、2、3干扰序列)。每组设5个复孔。干扰序列:HIF-2 α shRNAi 1:5'-GCAAC-TACCTGTTACCAA-3'; HIF-2 α shRNAi 2:5'-GCAGCCCTGAGGATTACTA-3'; HIF-2 α shRNAi 3:5'-GCATGGCTCCTGATGAATT-3'。阴性对照序列:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。加入HIF-2 α shRNA慢病毒液[感染指数(MOI)=2],96 h后荧光显微镜下观察绿色荧光情况,用Q-PCR、Western blot法分别检测转染后HIF-2 α mRNA及蛋白表达,筛选出最佳干扰序列。转染最佳干扰序列96 h后,观察绿色荧光情况,Q-PCR和Western blot检测HIF-2 α 、GATA-1 mRNA及蛋白表达。

9. 统计学处理:应用SPSS13.0软件进行数据分

析,实验数据进行Shapiro-Wilk检验,符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验;不符合正态分布的实验数据以中位数表示,差异显著性采用秩和检验;相关性分析采用Pearson相关检验,检验水准为0.05。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HAPC模型的鉴定:与低海拔对照组的骨髓粒、红细胞系分类计数结果比较,HAPC模型组大鼠骨髓的中、晚幼红细胞数较海拔对照组增加($P<0.05$),粒细胞系统差异无统计学意义($P>0.05$),粒/红比值减低($P<0.05$)(表2、3),RBC、HGB和HCT升高($P<0.01$),SaO₂降低($P<0.01$)(表4)。HAPC模型组大鼠血清EPO水平高于低海拔对照组[(24.3 \pm 1.57) ng/ml对(12.7 \pm 0.81) ng/ml, $P<0.05$]。上述结果提示HAPC模型组大鼠红系细胞数量增多但携氧能力下降,表明HAPC模型建立成功。

表2 两组SD大鼠骨髓粒、红细胞系分类计数比较

组别	鼠数	粒细胞系统 [% ,M(范围)]	红细胞系统 [% ,M(范围)]	粒/红比值 ($\bar{x}\pm s$)
低海拔对照组	24	0.50(0~8.45)	3.20(1.00~10.20)	2.90 \pm 0.38
HAPC模型组	24	0.00(0~5.50)	9.50(0.65~20.50)	1.30 \pm 0.65
z/t 值		0.470	-2.000	-3.000
P 值		0.450	0.040	0.010

注:HAPC:高原红细胞增多症

2. 大鼠骨髓CD71⁺细胞的纯度和占MNC的比例:以MFI为监测指标,分选后低海拔对照组、HAPC模型组CD71⁺细胞的纯度差异无统计学意义[(92.9 \pm 1.81)%对(92.1 \pm 2.13)% , $P>0.05$];HAPC模型组CD71⁺细胞占MNC的比例高于低海拔对照组[(53.48 \pm 3.81)%对(25.05 \pm 3.32)% , $P<0.05$]。

3. 大鼠骨髓CD71⁺细胞HIF-2 α 、GATA-1 mRNA及蛋白的表达:HAPC模型组骨髓CD71⁺细胞HIF-2 α 、GATA-1 mRNA相对表达量分别为低海拔对照组的2.77、3.73倍(P 值均 <0.05),HIF-2 α 和GATA-1的蛋白表达量均高于低海拔对照组(1.19 \pm 0.09对0.93 \pm 0.08, $P<0.01$; 1.63 \pm 0.10对0.97 \pm 0.08, $P<0.01$)(图1)。

4. 大鼠骨髓CD71⁺细胞HIF-2 α 、GATA-1 mRNA和蛋白表达的相关性分析:低海拔对照组大鼠骨髓CD71⁺细胞HIF-2 α 、GATA-1 mRNA表达与

表3 两组SD大鼠骨髓红细胞系统分类计数比较(%)

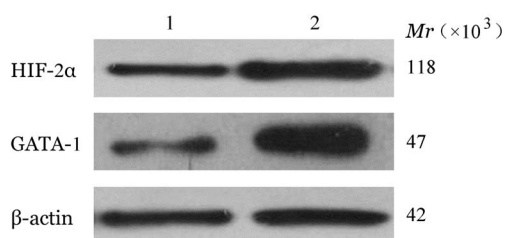
组别	鼠数	原始红细胞[M(范围)]	早幼红细胞($\bar{x}\pm s$)	中幼红细胞($\bar{x}\pm s$)	晚幼红细胞($\bar{x}\pm s$)
低海拔对照组	24	0.00(0~0.50)	1.50±0.55	9.50±2.25	9.40±3.50
HAPC模型组	24	0.25(0~1.00)	3.50±2.60	18.14±7.35	19.04±8.12
P值		0.227	0.100	0.010	0.006

注:HAPC:高原红细胞增多症

表4 两组SD大鼠血液学参数检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT(%)	SaO ₂ (%)
低海拔对照组	24	8.10±0.14	181.37±7.23	55.42±2.72	96.47±1.05
HAPC模型组	24	11.24±0.28	250.18±13.02	75.50±2.81	76.38±2.86
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:HAPC:高原红细胞增多症

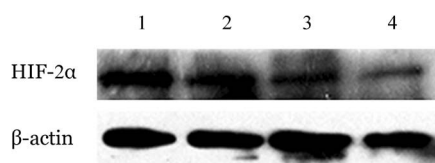


1:低海拔对照组;2:HAPC模型组

图1 高原红细胞增多症(HAPC)模型大鼠骨髓CD71⁺细胞HIF-2α和GATA-1蛋白的表达

蛋白表达呈正相关($r = 0.890, P < 0.05; r = 0.924, P < 0.01$);HAPC模型组大鼠HIF-2α、GATA-1 mRNA和蛋白表达也呈正相关($r = 0.923, P < 0.01; r = 0.838, P < 0.01$)。

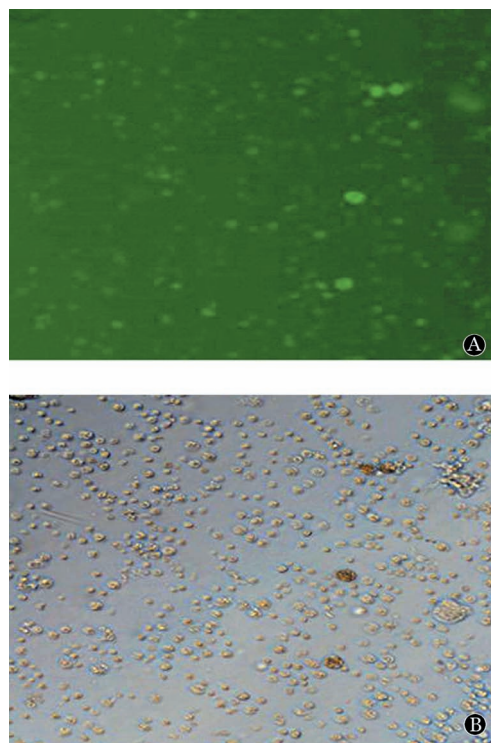
5. HIF-2α shRNAi 干扰效率验证:阴性对照组HIF-2α mRNA相对表达量为空白对照组的1.07倍($P > 0.05$); shRNAi 1、shRNAi 2、shRNAi 3组HIF-2α mRNA相对表达量分别为空白对照组的0.37、0.36、0.18倍(P 值均 < 0.01)。shRNAi 1、shRNAi 2、shRNAi 3组HIF-2α蛋白相对表达量分别为 0.77 ± 0.01 、 0.70 ± 0.02 、 0.36 ± 0.01 ,均低于阴性对照组(0.89 ± 0.05)($P < 0.05$)(图2)。HIF-2α shRNAi 3的干扰效果最好,后续实验选择HIF-2α shRNAi 3序列进行转染。



1:阴性对照组;2、3、4分别为shRNAi 1、shRNAi 2、shRNAi 3组

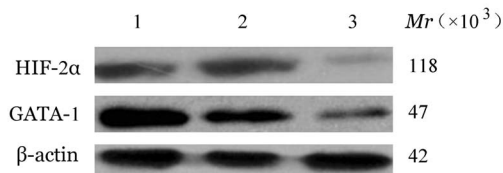
图2 Western blot法检测HIF-2α shRNA干扰序列蛋白表达

6. HIF-2α shRNAi 3对GATA-1基因表达的影响:荧光倒置显微镜下,HIF-2α shRNAi 3组绿色荧光分布于细胞内,与光学显微镜下同一视野对比,70%以上细胞显示绿色荧光(图3)。阴性对照组HIF-2α、GATA-1 mRNA的相对表达量为空白对照组的0.98、0.94倍(P 值均 > 0.05),shRNAi 3组HIF-2α、GATA-1 mRNA的相对表达量分别为空白对照组的0.17、0.38倍(P 值均 < 0.05)。shRNAi 3组HIF-2α、GATA-1蛋白表达量(0.21 ± 0.04 、 0.45 ± 0.02)均低于空白对照组(0.93 ± 0.09 、 1.83 ± 0.15)和阴性对照组(1.01 ± 0.07 、 0.92 ± 0.01)($P < 0.05$)(图4)。



A:荧光显微镜;B:光学显微镜

图3 HIF-2α shRNA3转染96 h后的荧光表达($\times 200$)



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:HIF-2α shRNAi 3 干扰组

图 4 HIF-2α shRNAi 3 干扰序列对大鼠骨髓 CD71⁺细胞 HIF-2α 和 GATA-1 蛋白表达的影响

讨 论

HIF-2α 在调控缺氧应激过程中发挥着重要的作用,其靶基因涉及骨髓造血、血管生长、血管收缩、能量代谢、儿茶酚胺合成和铁代谢等方面。一系列研究表明,HIF-2α 在红细胞生成过程中发挥着重要作用:①HIF-2α 在 EPO 生成,特别在应激性 EPO 生成的调控中起主要作用^[2];②HIF-2α 参与小肠铁吸收相关基因的表达和铁摄取,对肠铁吸收具有精细的调节作用^[3];③HIF-2α 激活血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 基因的转录,调节红细胞生成所需的造血微环境,促进幼稚红细胞成熟^[4]。现已明确,HIF-2α 在慢性低氧条件下呈稳定高表达^[10],提示其通过调节造血微环境和血红蛋白生成、加强红系细胞增殖分化信号而诱发红细胞大量生成。

GATA-1 在造血干细胞的谱系分化中起关键调控作用,在转录水平上调控激活珠蛋白、EPO 及其受体等红细胞特异基因的表达^[11-12],抑制与细胞周期相关的 Cdk6 及细胞增殖相关的 GATA-2、Myc 等不利于红细胞分化的基因表达^[13-14],承担抗凋亡和促进发育成熟等功能^[15-17],最终表现为促进红细胞分化。

EPO 是重要的红系干细胞造血因子,通过激活多条信号通路参与红系分化成熟的调控。EPO 受 HIF-2、GATA-1 等转录因子调节,在缺氧条件下大量生成。有研究表明,缺失 EPO 的小鼠胎肝细胞内,其红细胞集落形成单位(CFU-E)和爆式红系集落形成单位(BFU-E)不能进一步分化为含有血红蛋白的成熟红细胞^[18],可见 EPO 在红系终末分化期起促进红细胞分化和成熟的作用。因此,依据文献^[7,19]报道,本研究中我们应用骨髓细胞分类计数、血液学参数和血清 EPO 水平测定对 HAPC 大鼠模型进行鉴定。结果显示,与低海拔对照组比较,HAPC 模型组 SD 大鼠骨髓中、晚幼红细胞明显增加,粒细胞系统与有核红细胞的比值显著下降,

HGB、HCT 含量高于慢性高原病青海诊断标准,SaO₂ 显著降低,血清 EPO 含量明显升高,表明 HAPC 大鼠模型复制成功。

本研究首先采用流式细胞术对 CD71⁺细胞的纯度和占 MNC 的比例进行检测。结果表明,HAPC 模型组的 CD71 抗体 MFI 明显高于低海拔对照组,两组 CD71⁺细胞的纯度均达到 90% 以上,提示 HAPC 模型组骨髓髓系造血干/祖细胞向红系细胞分化明显增加,而且细胞免疫磁珠分选法可以获得高纯度的 CD71⁺细胞。这为 CD71⁺细胞 HIF-2α 和 GATA-1 表达的检测工作奠定了基础。

其次,Q-PCR 和 Western blot 检测结果显示,HAPC 模型组 CD71⁺细胞 HIF-2α、GATA-1 mRNA 及蛋白表达明显升高,提示高原低氧诱发 SD 大鼠 HIF-2α、GATA-1 表达上调,加强了对众多下游靶基因的调节,抑制红系细胞凋亡,促进血红蛋白的 mRNA 合成,推进 CFU-E 向成熟红细胞大量增殖分化,致使成熟红细胞过度积聚。

新近研究表明,低氧条件下 HIF-1α 作用于 GATA-1 基因的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE),诱导 GATA-1 高表达,促进 K562 细胞和 CD34⁺造血干/祖细胞的分化^[20],提示 HIF-1α 诱导 GATA-1 高表达可能参与低氧诱发红细胞加速分化的过程。Forsythe 等^[21]发现,HIF-1α、HIF-2α 的氨基酸序列有 48% 的同源性,在 N-端均含有碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域,介导与靶基因增强子或启动子上的 HRE 结合,因两者 bHLH 的同源性达到 99%,表明他们的 DNA 结合位点可能一致,提示 HIF-2α 也可能作用于 GATA-1 的 HRE 基序,调节 GATA-1 表达,影响红系细胞增殖分化。本研究结果表明 HAPC 模型组 HIF-2α、GATA-1 的 mRNA 与蛋白表达均呈正相关。采用 RNAi 技术抑制 HIF-2α 后,GATA-1 mRNA 和蛋白的表达下调,提示 HAPC 模型组 CD71⁺细胞 HIF-2α 可能作用于 GATA-1 调节其表达,参与高原低氧诱发红细胞过度增殖的过程。但在高原低氧条件下,HIF-2α 通过何种方式和途径调节 GATA-1 的表达尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Simonson TS, McClain DA, Jorde LB, et al. Genetic determinants of Tibetan high-altitude adaptation[J]. Hum Genet, 2012, 131(4):527-533. doi: 10.1007/s00439-011-1109-3.
 [2] Rankin EB, Biju MP, Liu Q, et al. Hypoxia-inducible factor-2

- (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4):1068-1077. doi: 10.1172/JCI30117.
- [3] Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, et al. HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(5):1159-1166. doi: 10.1172/JCI38499.
- [4] Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, et al. The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2 α through VCAM-1 in endothelial cells [J]. *Blood*, 2008, 112(4):1482-1492. doi: 10.1182/blood-2007-11-122648.
- [5] Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M. GATA factor switching during erythroid differentiation [J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(3):163-168. doi: 10.1097/MOH.0b013e32833800b8.
- [6] Grek CL, Newton DA, Spyropoulos DD, et al. Hypoxia up-regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(4):439-447. doi: 10.1165/rcmb.2009-0307OC.
- [7] 靳国恩, 韵海霞, 马兰, 等. 高原红细胞增多症动物模型的建立及其生理功能反应 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 24(13): 4713-4716. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2009.24.023.
- [8] 中华医学会高原医学分会. 关于统一使用慢性高原(山)病“青海标准”的决定 [J]. *高原医学杂志*, 2007, 17(1): 1-2. doi: 10.3969/j.issn.1007-3809.2007.01.001.
- [9] Marsee DK, Pinkus GS, Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens [J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 134(3):429-435. doi: 10.1309/AJCPCK3MOAOJ6AT.
- [10] Mazzeo RS, Reeves JT. Adrenergic contribution during acclimatization to high altitude: perspectives from Pikes Peak [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2003, 31(1):13-18.
- [11] Woon Kim Y, Kim S, Geun Kim C, et al. The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal γ -globin genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(16):6944-6955. doi: 10.1093/nar/gkr253.
- [12] Imagawa S, Suzuki N, Ohmine K, et al. GATA suppresses erythropoietin gene expression through GATA site in mouse erythropoietin gene promoter [J]. *Int J Hematol*, 2002, 75(4): 376-381.
- [13] Hong W, Nakazawa M, Chen YY, et al. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1 [J]. *EMBO J*, 2005, 24(13):2367-2378. doi: 10.1038/sj.emboj.7600703.
- [14] Rylski M, Welch JJ, Chen YY, et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation [J]. *Mol Mol Cell Biol*, 2003, 23(14):5031-5042. doi: 10.1128/MCB.23.14.5031-5042.2003
- [15] Trainor CD, Mas C, Archambault P, et al. GATA-1 associates with and inhibits p53 [J]. *Blood*, 2009, 114(1):165-173. doi: 10.1182/blood-2008-10-180489.
- [16] Zheng J, Kitajima K, Sakai E, et al. Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells [J]. *Blood*, 2006, 107(2):520-527. doi: 10.1182/blood-2005-04-1385.
- [17] Papetti M, Wontakal SN, Stopka T, et al. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(10):1972-1980. doi: 10.4161/cc.9.10.11602.
- [18] Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2 [J]. *Nature*, 1994, 371(6494):221-226. doi:10.1038/371221a0.
- [19] 鲁梦倩, 于天源, 尼玛次仁, 等. 藏医佐木阿汤与放血疗法对高原红细胞增多症模型大鼠的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(8): 2461-2463.
- [20] Zhang FL, Shen GM, Liu XL, et al. Hypoxia-inducible factor 1-mediated human GATA1 induction promotes erythroid differentiation under hypoxic conditions [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8):1889-1899. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01484.x.
- [21] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(9):4604-4613.

(收稿日期:2016-01-22)

(本文编辑:徐茂强)