

造血干细胞与造血相关调控信号通路

冯志伟¹综述,李长燕²审校(1. 解放军第五一七医院检验科,山西岢岚 036301;2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850)

【关键词】 造血干细胞; 信号传导; 细胞增殖; 细胞分化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.17.041 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)17-2122-03

人体内所有的血细胞都来自造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)的定向分化。HSC 又称多能干细胞,是存在于造血组织中的一群原始造血细胞,有两个重要特性:(1)高度的自我更新或自我复制能力;(2)可定向分化、增殖为不同的血细胞系,并进一步生成血细胞。在胚胎和迅速再生的骨髓中, HSC 多处于增殖周期之中;而在正常骨髓中,则多数处于静止期,当机体需要时,其中一部分分化为成熟血细胞,另一部分进行分裂增殖,以维持 HSC 的数量相对稳定。人类 HSC 首先出现于胚龄第 2~3 周的卵黄囊,在胚胎早期(第 2~3 个月)迁至肝、脾,第 5 个月又从肝、脾迁至骨髓。从胚胎末期一直到出生后,骨髓成为 HSC 的主要来源。

1 HSC 的表面标志和定向分化过程

HSC 是第一种被认识的组织特异性干细胞,最初是由 Till 和 McCulloch 于 1961 年通过少数脾集落形成实验发现并证实。目前主要是通过表面标志来分离纯化 HSC,其中有一种方法是用抗体来检测干细胞相关的表面分子 c-kit, Sca-1, Thy1.1 和造血谱系标志如 B220, CD3 和 Mac-1。通过这种方法得到的 HSC 只占有骨髓细胞中很小的一部分,其特征是低表达或不表达造血谱系标志 lin 和 Thy1.1,高表达 c-kit 和 Sca-1,即($\text{lin}^{\text{lo}}/\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{Thy1.1}^{\text{lo}}$)^[1]。这部分 HSC 可进一步细分为两类:一类是可以长期保持很强的自我更新能力的 HST(long-term hematopoietic stem cells, LT-HSC),表面标志为 $\text{Thy1.1}^{\text{lo}} \text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$,或用其他方法得到的 $\text{CD34}^- \text{Flt3}^- \text{LSK}$ 和 $\text{CD150}^+ \text{CD224}^- \text{CD48}^-$,这部分细胞约占骨髓细胞总数的 1/10 000。另一类为只有短期自我更新能力的 HST(short-term hematopoietic stem cells, ST-HSC),这部分干细胞的表面标志为 $\text{Thy1.1}^{\text{lo}} \text{lin}^{\text{lo}} \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$,或用其他方法得到的 $\text{CD34}^+ \text{Flt3}^- \text{LSK}$,约占骨髓细胞总数的 1/2 000。LT-HSC 能在体外维持重建造血超过 10 周,而 ST-HSC 在体外造血只能保持大约 6 周左右^[2],然后分化为多能造血祖细胞(multipotent progenitors, MPPs),按其表面标志定义为 $\text{Thy-1.1}^- \text{Flt3}^+ \text{LSK}$ 或者 $\text{CD34}^+ \text{Flt3}^+ \text{LSK}$ 细胞, MPPs 已经丧失了自我更新的能力,但仍保持多向分化能力,可以分化为任何一种终末血细胞。由于 MPPs 丧失了自我更新的能力,因此从 ST-HSC 到 MPP 的分化也被认为是造血系谱限制(lineage restriction)的开始^[3]。

MPPs 进一步可分化为淋巴系祖细胞(common lymphoid progenitor)和髓系祖细胞(common myeloid progenitor);其中淋巴系祖细胞可分别经过早 B 淋巴细胞(Pro-B cell)、早 T 淋巴细胞(Pro-T cell)和未成熟自然杀伤细胞(Pro-NK cell)最终分化为成熟的 B 淋巴细胞(B cell)、T 淋巴细胞(T cell)和自然杀伤细胞(NK cell);而髓系祖细胞可分化为粒系/单核系祖细胞(granulocyte monocyte progenitor, GMP)和巨核系/红系祖

细胞(megakaryocyte erythrocyte progenitor, MEP)。粒系/单核系祖细胞可进一步分化为单核巨噬细胞(monocyte macrophage)和粒细胞(granulocyte),后者又分为嗜酸性粒细胞(eosinophil, E)、嗜碱性粒细胞(basophil)和中性粒细胞(neutrophilic granulocyte)。巨核系/红系祖细胞可继续分化为红系祖细胞和巨核系祖细胞,前者经过有核红细胞、网织红细胞等阶段最终分化为成熟红细胞(erythrocyte),后者分化为成熟巨核细胞(megakaryocyte),并可以持续生成血小板(platelets)。此外,树突状细胞(dendritic cells)可由粒系/单核系祖细胞分化而来,也可由淋巴系祖细胞直接分化生成。

2 信号通路与 HSC 自我更新和定向分化的调节

HSC 是一类能够自我更新、自我分化的细胞群体。在发育过程中,机体对这两个过程之间的平衡进行精密调节,一些信号通路在这一调节过程中发挥非常重要的作用。

2.1 Wnt 信号通路 Wnt 家族蛋白是一类在多个组织中都有表达的信号分子,可以影响机体发育的多个进程,第一个被发现的成员 Wnt1 是在小鼠乳腺癌中克隆出来的,被证实是一种原癌基因, Wnt 基因的突变能导致机体、体节与轴的形成缺陷,脑、肾及生殖道的发育异常。

在经典的 Wnt 通路中, Wnt 配体可与细胞表面两种受体结合,引起 β -catenin 在胞质内的积累。一种是 Frizzled 家族成员,是一类七次跨膜蛋白;还有一类是低密度脂蛋白受体相关的单次跨膜蛋白(LRP)。当 Wnt 信号缺失时, β -catenin 与一个由 Axin 和 GSK-3 β 组成的多蛋白复合物结合后被磷酸化,进而泛素化降解。而当 Wnt 与其受体 Frizzled 或 LRP 结合后可阻断 GSK-3 β 介导的 β -catenin 磷酸化,使 β -catenin 在细胞内稳定和聚集,后者随后进入细胞核与 LEF/TCF 转录因子家族的成员结合, LEF/TCF 蛋白通常与 Groucho 抑制子结合,当与 β -catenin 结合后,抑制减弱,允许 LEF/TCF 诱导相应靶基因的转录^[4]。

Wnt 信号在许多类型的干细胞中对细胞增殖起了关键作用,近来的研究证实 Wnt 还影响干细胞分化,并且参与了对 HSC 的自我更新调控。在胚胎期, Wnt 蛋白(主要是 Wnt5A 和 Wnt10B)在胎肝和卵黄囊中都有表达^[5],而造血祖细胞表达 Wnt10B 说明 Wnt 蛋白通过自分泌的形式发挥作用。在含有 Wnt1、Wnt5A 或 Wnt10B 与干细胞生长因子 steel 的培养基中,胎肝来源的造血祖细胞可以被激活 11 倍之多。体外集落形成试验证实,细胞在有 Wnt 蛋白存在时可以保留未成熟特性。此外,纯化的 Wnt 蛋白和有活性的 β -catenin 能增强鼠类 HSC 在体外的自我更新和在体内的造血重建能力^[6]。然而,最新的研究表明 Wnt3a 缺陷小鼠体内 HSC 数量明显减少,这些干细胞谱系分化能力未受影响,但自我更新和复制能力严重丧失^[7]。这也说明 Wnt 家族蛋白调控信号通路的复杂性。

此外,有研究表明,折叠分子 Axin 的表达可以降低 HSC 在体内的造血重建能力,并可抑制其体外增殖能力^[8]。而抗原提呈细胞(APC)的缺失或 GSK-3 β 的药物抑制均能活化 Wnt 通路,抑制干细胞的分化,从而维持其自我更新及多向分化潜能^[9]。

2.2 Notch 信号通路 Notch 基因在很多物种中都有表达,最早是在果蝇中发现并被克隆,哺乳动物中发现有 4 个 Notch 同源体。Notch 蛋白是一个结构高度保守的表面受体,主要包括胞外区、跨膜区和胞内区。目前发现有 5 种不同的配体可以与 Notch 受体结合,分别是 Jagged1-2 和 Delta-like 1-3-4。

当 Notch 受体的胞外区与其配体相互作用后,受体裂解释放出其活化形式的胞内区 NICD,后者进入细胞核与 CSL DNA 结合蛋白结合,活化各种转录因子,进而启动靶基因如 HES、HRT/HERP 的表达^[10]。Notch 信号通路在 HSC 中高度活化,而在外周淋巴器官和成熟的血细胞中几乎不活化,在骨髓和外周血中也观察到 Notch 活性在造血分化时下调。另外 Notch 信号通路下游主要靶基因 HES1 在 HSC 高水平表达,而在更成熟的祖系细胞中表达水平显著降低。此外,Notch 信号的阻断导致体外 HSC 分化加速和体内干细胞数量的减少^[11]。上述研究显示 Notch 通路对干细胞为分化状态的维持十分重要。

为了明确一个完整的 Notch 信号是否为维持 HSC 未分化状态所必需,有实验检测了 Notch 信号被阻断的 HSC 重建造血系统的能力,结果提示 Notch 信号的阻断导致了更高的分化率,从而阻断了 HSC 未分化状态的维持,所以认为活化的 Notch 信号能抑制 HSC 分化,维持其多潜能性,并可进一步促进其增殖^[12]。此外 Notch1 缺陷的干细胞在存在无活性 Jagged1 竞争的条件下也可以在小鼠骨髓基质中重建造血,这些结果表明至少 Jagged1 介导的 Notch 信号通路在造血过程中并不是必需的^[13]。

2.3 转化生长因子 β (TGF- β)信号通路 TGF- β 基因超家族由一类结构、功能相关的可以调节细胞生长和分化的多肽生长因子亚家族组成,这一家族除 TGF- β 外,还有活化素(activins)、抑制素(inhibins)和骨形成蛋白(bone morpho-genetic proteins,BMPs)等。TGF- β 家族成员广泛存在于从果蝇到人多种生物的各种组织中,其中 TGF- β 在人体内有 TGF- β_1 、 β_2 、 β_3 三种异构体,基因分别定位于染色体 19q3.1q41 和 14q24,可能来自一个共同的祖先基因^[14]。由于 TGF- β 作用的多功能性和广泛性,从 1981 年 Robert 等^[15]发现 TGF- β 以来,对其信号传导的通路一直不清楚。直到后来发现了另一个蛋白家族 Smad 家族后,才较深入地阐明了 TGF- β 信号从膜到核转运的分子机制。

Smad 蛋白家族是近年来发现的新的细胞内信号转导蛋白,目前已经在脊椎动物中至少已克隆出 9 种 Smad 基因^[16]。根据结构和功能上的特点,Smad 蛋白被分为 3 类:第 1 类为受体激活型 R-Smads(receptor-activated Smads),包括 Smad1、2、3、5、8,可直接被 T β R I 磷酸化激活,再与第 2 类通用型 Co-Smads(common-mediator smads),主要是 Smad4 结合,形成异源二聚体,进入细胞核,发挥针对靶基因的转录调控作用;第 3 类为抑制型 I-Smads(inhibitory Smads),包括 Smad6、7,可阻断 R-Smads 和 Co-Smads 的相互作用,并参与 TGF- β 信号的负反馈调节。TGF- β 超家族的二聚配体与细胞膜表面的 I 和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合形成异四聚复合体。活化后的受体募集和磷酸化胞内的 R-Smad,后者与 Co-Smad 形成异聚复合体进入细胞核,与其他转录因子共同调节靶基因的转录,

这就是 Smad 依赖的 TGF- β 信号通路^[17]。此外,TGF- β 还可以通过 Smad 非依赖途径激活信号转导通路,比如 MAPK 通路可以与经典的 TGF- β 信号通路互相作用,协同、促进或者甚至是对抗经典的 TGF- β -Smad 信号通路,其中一个例子是 MAPK 通路激活 AP1,后者可调节 Smad 蛋白介导的转录活性^[18]。

研究表明,最早在小鼠胚胎期第 7.5 天的胚外卵黄囊的血岛就可以检测到 TGF- β_1 的表达,而在胚胎发育的后期,胎肝的血细胞和早期内皮细胞也都有 TGF- β_1 的表达,这提示 TGF- β_1 在造血发育和血管生成中可能发挥调控功能^[19]。TGF- β 对人或鼠造血祖细胞的直接抑制作用已通过体外培养实验证实,外源性的 TGF- β 可以可逆地抑制细胞分裂^[20],阻断内源的 TGF- β 信号也已在体外实验中试验过,用 TGF- β 的抗体处理或用其基因的反义寡核苷酸进行干扰可以使人造血细胞从静止状态释放,增加其集落生成的频率^[21]。这些体外研究表明 TGF- β 是一种关键的调节物,对造血对干/祖细胞的增殖有抑制作用。而体内实验由于不同的 TGF- β 异构体与其受体的基因敲除小鼠的过早死亡而无法深入研究。为了直接评估 TGF- β 信号对体内造血或 HSC 功能的影响,Larsson 等^[22]建造了一种有条件的敲除 TGF- β 异构体与其受体基因的成年小鼠模型,该模型中可以诱导中断 TGF- β_1 受体,从这种模型中得到的 HSC 在体外以单个形式在低刺激条件下培养时表现出聚集和增殖能力增加,证实了 TGF- β 对 HSC 增殖有抑制作用。然而,TGF- β 受体完全缺陷的小鼠体内造血细胞数目和分化能力都正常,表现出完全正常的造血功能;更进一步发现这些模型中的 HSC 表现出正常的细胞周期分配,而且不会因为随后的骨髓移植发生改变。这些发现对认为在体内生理环境下 TGF- β 是一种重要的对 HSC 负调节物质的传统观点提出了挑战。不过由于体外实验的条件与体内微环境差别很大,这种体内外实验得到的相反结果也反映了 TGF- β 对造血系统的作用微环境显著依赖性^[23]。

3 结 语

HSC 增殖分化是最基本的生命活动之一,其调控的分子机制一直是学术界的研究热点,近年来多种信号通路的发现都为研究 HSC 增殖分化的调节机制研究提供了一定的线索,除了本文上面介绍的 Wnt、Notch 和 TGF- β 信号通路之外,还有 JNK、RAR、RXR、MBP、MEK、ErK 等多条信号通路都发现对 HSC 的特性调控有一定的影响。然而目前还没有一条信号通路对 HSC 的影响完全研究透彻,实验方法或设计的不同也导致得到不同的甚至是相反的结果。此外许多与 HSC 特性调控相关的基因可以通过参与多条不同的信号通路从而发挥不同的作用,不同信号通路之间普遍存在的交联协同或对抗作用也反映了 HSC 特性调控机制的复杂性。因此对 HSC 特性调控的研究应该是整体性、动态性的。近年来酵母、线虫和果蝇等模式生物体大规模蛋白质相互作用网络连锁图相继构建成功,基于这些相互作用网络的深入研究揭示了许多新的复杂生物现象的规律,为研究人类等高等生物的蛋白质相互作用连锁图提供了宝贵经验,因此构建 HSC 特性调控蛋白相互作用网络并深入研究,有望更全面地认识 HSC 分子调控机制,为发现大量蛋白质之间互相联系的内在规律提供重要的信息和线索。

参考文献

- [1] Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells:evidence that Thy-1.1lo Lin-Sca-1 cells are the only

stem cells in C57BL/Ka-Thy-1. 1 bone marrow[J]. Exp Med,1992,175(1):175-184.

[2] Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation; a simple method to isolate long-term stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98(2):14541-14546.

[3] Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. [J] Development, 1997,124(10):1929-1939.

[4] Eastman Q, Grosschedl R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999,11(2):233-240.

[5] Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, et al. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis; expansion of multilineage progenitor cells[J]. Blood, 1997,89(10):3624-3635.

[6] Reya T, Dubcan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2003,423(6938):409-414.

[7] Tiago CL, Floor W, Brigitta A, et al. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation [J]. Blood, 2009,113(3):546-554.

[8] Staal FJ, Clevers HC. WNT signaling and haematopoiesis; a WNT-WNT situation[J]. Nat Rev Immunol, 2005,5(1):21-30.

[9] Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function [J]. Curr Opin in Cell Biol, 2004,16(6):681-687.

[10] Nam Y, Sliz P, Song L, et al. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes[J]. Cell, 2006,124(5):973-983.

[11] Duncan AW, Rattis FM, Dimascio LN, et al. Intention of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance[J]. Nat Immunol, 2005,6(3):314-322.

[12] Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, et al. Roles for c-Myc in Self-renewal of Hematopoietic Stem Cells[J]. J Biol Chem, 2004,279(24):24986-24993.

[13] Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, et al. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation[J] Blood, 2005,105(6):2340-2342.

[14] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003,113:685-700.

[15] Robert AB, Anzano MA, Lamb LC, et al. Sequence-specific 1H-NMR assignments and identification of two small antiparallel beta-sheets in the solution structure of recombinant human transforming growth factor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981,78(9):5339-5343.

[16] Zhang Y, Derynck R. Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk[J]. Trends Cell Biol, 1999,9(7):274-279.

[17] Nagaraj NS, Datta PK. Targeting the transforming growth factor- β signaling pathway in human cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010,19(1):77-91.

[18] Javelaud D, Mauviel A. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta; implications for carcinogenesis[J]. Oncogene, 2005,24(37):5742-5750.

[19] Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, et al. TGF-beta in murine morphogenetic processes; the early embryo and cardiogenesis[J]. Development, 1990,108(41):645-656.

[20] Batard P, Monier MN, Fortunel N, et al. TGF- β 1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation[J]. Cell Sci, 2000,113(pt3):383-390.

[21] Fortunel N, Batard P, Hatzfeld A, et al. High proliferative potential-quiescent cells; a working model to study primitive quiescent hematopoietic cells[J]. Cell Sci, 1998,111(pt 13):1867-1875.

[22] Larsson J, Blank U, Helgadottir H, et al. TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro [J] Blood, 2003,102(9):3129-3135.

[23] Henckaerts E, Langer JC, Orenstein J, et al. The positive regulatory effect of TGF-beta2 on primitive murine hemopoietic stem and progenitor cells is dependent on age, genetic background, and serum factors [J]. Immunology, 2004,173(4):2486-2493.

(收稿日期:2011-03-09)

国内病案复印工作现状

刘鲁萍 综述, 王晓龙 审校(广西壮族自治区柳州市人民医院病案室 545006)

【关键词】 病案; 复印; 表格和记录管理
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.17.042 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2011)17-2124-03

病案是患者病情资料的汇总,是由医务人员书写整理而成的医疗文献,客观真实地记录了患者疾病的发生、发展、诊断、治疗及住院期间医疗活动的全过程,是所有医护人员逐时、逐日连续和及时分别记录的既统一又不绝对一致的患者疾病发生、发展、诊疗、护理、转归等情况客观和系统的记录所形成的

一种特殊文档,在医院的医疗、教学、科研和管理中发挥着重要作用,同时还是具有法律依据的文献。它不仅是患者及家属向单位、保险部门等寻求医疗保障和经济利益的依据,更是处理医疗事故和医疗纠纷、进行医疗技术和司法鉴定的重要依据。随着医疗制度的改革,尤其是医疗纠纷“举证责任倒置”的实