

文章编号: 1004-0374(2009)02-0295-04

ROS 与造血干细胞损伤研究进展

张俊伶, 孟爱民*

(中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

摘要 辐射可以通过引起造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)内活性氧(reactive oxygen species, ROS)系统水平升高导致HSC损伤。HSC损伤患者出现难治性血液系统疾病,严重影响患者生存质量,甚至威胁患者生命。ROS可以通过多种机制引起组织、器官和细胞损伤。ROS的来源包括:线粒体、NOX(NADPH oxidases)、细胞色素P450酶、黄嘌呤氧化酶、非偶联NO合酶。已证实HSC内ROS来源于NOX。ROS升高后影响HSC在成骨细胞微环境定位,导致HSC与微环境相互作用减弱,从而影响HSC功能。此外,ROS升高后通过激活P38MAPK-P16Ink4途径,损伤HSC自我更新能力,并且使HSC定向分化产生更多的髓系克隆而不是红细胞系克隆;PI3K-Akt-mTOR途径可能也是ROS诱导HSC损伤途径。ROS对细胞周期影响为:促使HSC离开G₀期进入细胞周期,导致干细胞池的耗尽。基于NOX在氧化还原信号传递过程中的重要作用,证实辐射通过NOX产生的ROS以及鉴定产生ROS的NOX亚型,这一工作会为临床靶向治疗辐射诱发的血液系统疾病提供重要的价值。

关键词: 辐射;造血干细胞损伤;活性氧;NADPH氧化酶

中图分类号: Q813; R691 **文献标识码:** A

The role of ROS on hematopoietic stem cells damage

ZHANG Jun-ling, MENG Ai-min*

(The Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine in Tianjin, Institute of Radiation Medicine,
Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China)

Abstract: Ionizing radiation (IR) exposure may increase ROS level in HSC and lead to irreversible damage on HSC. ROS damages cells, tissues and organs through several pathways. Mitochondria, NADPH oxidases (NOX), cytochrome P450-based enzymes, xanthine oxidase and uncoupled NO synthases can induce cellular ROS production. It has been suggested that ROS produced partly by NOX in HSC and could affect HSC's localization in their niche and reduce the interaction between the HSC and microenvironment. P38MAPK-P16Ink4 signaling pathway is activated by elevation of ROS, which might destroy the long-term maintenance of self-renewal and induce myeloid differentiation skewing. ROS have also been known to activate PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. It can also inhibit maintenance of HSC quiescent state. It is significant to elucidate the mechanisms that ROS generated by NOX after HSC exposed to IR.

Key words: ionizing radiation; hematopoietic stem cells damage; reactive oxygen species (ROS); NADPH oxidases (NOX)

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)是造血组织中一类特殊细胞,具有自我更新或自我复制能力,并能够分化生成血液系统中各类成熟细胞的原始细胞,即HSC具有自我更新与定向分化的能力。HSC在分裂时,进行不对称性有丝分裂,每

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2008-11-11
基金项目: 国家自然科学基金(30828011, 30770645); 天津市自然科学基金(08JCYBJC07300); 教育部新教师基金课题(20070023102)

*通讯作者: ai-min-meng@126.com

次干细胞分裂,一个细胞立即分化为早期祖细胞,而另一个则维持不分化,HSC在不断生成祖细胞的同时,也使其本身的数量和质量保持终生不变。HSC绝大部分存在于骨髓组织,少量存在于外周血循环中。HSC损伤会导致造血功能持久性抑制,严重影响患者的生存质量,甚至危及生命。多种因素可导致HSC损伤,包括物理因素(如辐射)、化学因素(如肿瘤患者化疗、化学致癌物污染)和生物学因素(如细菌和病毒等微生物感染)。本文主要讨论物理因素辐射对HSC的损伤。

日常生活中人体不可避免地受到来自环境中的各种辐射,长期接受小剂量电离辐射可能增强人体免疫功能^[1],但是单次或多次接收较大剂量的辐射可以引起大量的组织和器官损伤,辐射对细胞损伤机制包括辐射导致DNA损伤、影响基因表达、激发细胞凋亡程序^[2]。骨髓是辐射敏感组织,电离辐射可以导致HSC损伤。近年的研究显示,辐射可以诱导HSC内活性氧(reactive oxygen species, ROS)持续升高。本文对辐射通过诱导骨髓ROS持续升高进而引起骨髓造血干细胞损伤机制最新研究进展作一简述。

1 ROS作用机制及来源

1.1 ROS作用机制 辐射可以诱导ROS产生^[3],辐射诱导产生的ROS可以与DNA反应,导致DNA被氧化、双链断裂和变异;也可以与细胞膜反应,引起膜脂质反应,导致细胞或细胞核损伤,从而引起细胞凋亡、坏死或有丝分裂细胞死亡^[4]。ROS具有高化学反应活性并且作为重要信息物质在许多病理生理过程中出现。ROS包括诸如超氧化物和羟基的自由基,还有非自由基,如H₂O₂。与ROS相关的生物学行为主要有三种:第一,在氧化还原反应不平衡(氧压力)的条件下,大量的自由基产生会导致氧化作用和大分子、细胞膜和DNA损伤,对细胞功能和活力是有害的;第二,ROS过氧化物与信号分子NO相互作用,导致NO生物利用度下降,并且产生本身就有生物学活性的另一种反应性物质——亚硝酸盐;第三,对ROS产生的精密调控能够调节细胞内分子的活性和信号转导通路,包括高特异性急慢性的细胞表型的改变^[5]。ROS可触发多种信号转导途径,如P21Ras、Smads/src激酶、P38MAPK、ERK-1/2MAPK,最终造成细胞增殖、分化或死亡等不同反应^[6]。

1.2 ROS来源 一般情况下,ROS由体内正常氧化代谢产物形成,并且在细胞信号转导过程发挥重要

作用。生理条件下,这些ROS主要在清除体内细菌和异物,导致老化等过程中发挥重要作用,过多的ROS可被体内一些抗氧化的酶和其他一些非酶途径小分子物质中和。然而,在外界环境压力下,ROS剧烈增加导致组织、器官和细胞的损伤。大多数细胞的ROS来源主要包括:线粒体、NADPH氧化酶(NOX)、细胞色素P450酶、黄嘌呤氧化酶、非偶联NO合酶。其中,NOX在氧化还原信号传递过程中发挥着非常重要的作用。根据预测的结构域可以将NOX家族分为三类:(1)NOX1—NOX4有60%的同源性并且被预测为含有6个跨膜的 α -螺旋和C-端的NADPH结合区域;(2)NOX5与以上4种有相同的基本结构,但是在N-端有一个钙调蛋白样的钙离子结合区域;(3)DUOX1和DUOX2域与NOX5结构基本相似,但是包含了N-端的过氧化物酶同源区域^[5]。HSC内ROS来源于HSC表面的NOX,并非HSC内线粒体^[7]。Piccoli等^[8]实验发现,CD34造血干细胞表达相同水平的NOX1、NOX2、NOX4转录产物和一定量的NOX2s,还有极少量的NOX5,然而并未发现NOX3、DUOX1和DUOX2。HSC表面的NOX产生释放ROS,通过相应的信号转导通路引起HSC损伤。

2 ROS对造血微环境中HSC影响

2.1 造血微环境 造血微环境是指在成体组织中HSC定居及进行自我更新并能产生大量祖细胞的特定场所,由一些维持HSC结构与功能的细胞及信号分子组成。现已证实骨内膜区域的成骨细胞环境和血管内皮细胞环境,即骨膜巢和管腔巢在造血微环境中发挥了重要作用^[9]。骨膜巢具有维持HSC自我更新和归巢作用,此外还与淋巴细胞发育分化密切相关^[10];管腔巢可能能够刺激HSC的增殖与分化,两者对于维持HSC自我更新与定向分化功能起到相辅相成的作用^[11]。正常情况下,造血干细胞和支持细胞主要定位于骨髓的低氧环境中,低氧环境限制了ROS的产生,这使得造血干细胞能够免受长期的氧化作用的损伤,维持造血微环境的稳定,保证正常的造血功能^[7,12]。

2.2 ROS对微环境中的HSC损伤 成骨细胞是造血微环境的重要组成部分,与HSC之间存在着精细的调节。HSC在成骨细胞定位时的特点包括:处于静止期,高表达钙离子感受器(calcium-sensing receptor, CaR)、N-钙黏蛋白(NCAD)、Notch1、腺苷三磷酸结合盒转运体Bcrp、端粒逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和P21。

CaR 在 HSC 在骨内膜表面定位过程中发挥了重要作用; NCAD 在 HSC 与环境形成黏附性连接时起作用; Notch1 通过与成骨细胞环境中的 Notch 配体相互作用维持 HSC 处于静止期; Bcrp 能够保护 HSC 免受内外源性的毒性损伤; TERT 的活性与 HSC 自我更新的潜能相关^[12]。P21 是细胞周期抑制剂, 能够抑制 HSC 进入细胞周期, 保护 HSC 免受细胞周期依赖的骨髓毒性物质的损伤^[13]。当 HSC 内 ROS 水平升高时, 这些表达在 HSC 表面且能够维持 HSC 正常功能的信号分子都有不同程度的表达下调, 导致 HSC 与造血微环境相互作用减弱从而影响 HSC 功能。

3 ROS 对造血干细胞自我更新与定向分化平衡的影响

3.1 ROS 升高对 HSC 自我更新与定向分化的影响 HSC 内的 ROS 水平、相关的信号转导通路以及 HSC 在成骨细胞内定位的特点对 HSC 长期的自我更新与定向分化共同发挥作用^[12]。连续的 HSC 移植是评价 HSC 维持长期自我更新能力的可靠的方法^[14]。将野生型小鼠 (CD45.2) 未成熟造血细胞 (c-Kit⁺Sca-1⁺Lineage⁻, KSL) 植入受到致死辐射剂量照射的小鼠 (CD45.1) 骨髓中, 在每次 HSC 移植后 ROS 水平都有逐渐的但是很明显的增高, 并且高于老龄化细胞内的 ROS 水平, 伴随着细胞内 ROS 水平升高, 出现了 KSL 细胞再生能力减弱, 可以证明细胞内 ROS 水平升高后 HSC 的自我更新能力减弱^[13]。ROS 低水平的 HSC 群体定向分化产生红细胞系克隆和粒细胞/红细胞/单核细胞/巨核细胞集落形成单位 (CFU-GEMM), 当 HSC 内 ROS 水平升高时, HSC 则定向分化产生更多的髓系克隆而不是红细胞系克隆^[12]。

3.2 ROS 升高影响 HSC 自我更新与定向分化的信号转导途径 在探寻 ROS 升高影响 HSC 自我更新与定向分化的信号转导途径之前, 应先采用一定的方法促使 HSC 内 ROS 水平升高。有几种方法可以人工诱导 HSC 内 ROS 水平升高, 包括应用 BSO (buthionine sulfoximine) 法^[15]、小鼠 Atm (ataxia telangiectasia mutated) 基因敲除法^[16], 以及小鼠 Foxo3a 敲除法^[17]。这几种方法均可以促使 HSC 内 ROS 升高, 为实验研究创造条件。

有报道显示, P38MAPK-P16^{Ink4} 信号转导途径在氧化压力诱导的 HSC 损伤中发挥重要作用^[13, 17, 18]。ROS 升高导致 P38MAPK 激活, 从而引起造血干细胞自我更新能力的下降。BSO 可以诱导的 HSC 内 ROS 升高, HSC 表达 P16^{Ink4a} 和 P19^{Arf} 上调。P16^{Ink4} 是通过 MAPK 途径被调控的, 包括 ERK 和 P38MAPK

的激活。其他的 Ink4 家族包括 P15^{Ink4b} 和 P18^{Ink4c} 也是以 P38MAPK 依赖的方式表达上调^[13]。Atm 缺失小鼠是分析在体内氧化压力下 HSC 功能的适宜模型。Atm 缺失导致 ROS 水平的增加, 从而导致 HSC 自我更新能力下降^[16]。在体外, P38 MAPK 的激活可以引起可见的 Atm 阴性的造血祖细胞再生障碍, 并且是再生障碍的主要原因。同时, 在 24 周 Atm^{-/-} 小鼠 KSL 细胞表面 Ink4 家族成员包括 P16^{Ink4a}、P19^{Arf}、P15^{Ink4b} 和 P18^{Ink4c} 均表达上调。p38 MAPK 被上游的 MAPK 酶 (MKK3 和 MKK6) 和 MAPK 酶激酶 [凋亡信号调控酶 1 (ASK1), 被 MAP3K5 编码] 激活^[19]。Foxo3a 敲除小鼠 HSC 内 ROS 水平升高后同样可以引起 P38MAPK 激活, HSC 自我更新能力下降^[17]。对于 HSC 进行连续的移植也可导致 ROS 水平的增加, 在连续的 HSC 移植后, ROS 诱导 ASK1 激活从而使 P38 MAPK 被活化^[12, 13]。此信号转导的通路可概括为: ROS 水平升高后诱导 ASK1 激活, 通过激活后者下游的 MAPK 酶引起 P38 MAPK 活化, P38 MAPK 活化后 HSC 表面 P16^{Ink4a} 表达上调, 其他的 Ink4 家族成员也有表达上调, 从而诱导 HSC 损伤。

此外, 有人应用抗氧化剂 N-acetyl-L-cysteine (NAC)、P38 抑制剂 SB203580 或是 mTOR 抑制剂 rapamycin 都能保存 ROS 高水平 HSC 细胞群体的细胞活性, 暗示 P38MAPK 和 mTOR 的激活都与 ROS 高水平细胞群体的干细胞功能衰退有关。已知 ROS 也能激活 PI3K-Akt-mTOR 通路, 并且该通路可以被 rapamycin 抑制^[12]。该通路激活后其下游因子 Foxo 失活, 可能会使 HSC 内 ROS 水平更高^[17]。

4 ROS 对造血干细胞细胞周期的影响

细胞周期通常被分为 S 期、G₁ 期、G₂ 期和 M 期。正常情况下 HSC 处于静止状态, 被称为 G₀ 期。相对的静止期是 HSC 重要特性, 对于保护骨髓免受骨髓毒性物质损伤和压力条件下保护干细胞池内的细胞数量都是至关重要的^[14]。ROS 水平升高后, 处于 G₀ 期 HSC 细胞比例下降, S 期、G₂ 期和 M 期细胞比例无变化这也支持了这种观点: ROS 水平较低时, HSC 多处于静止期, ROS 水平升高后, 更多的 HSC 被激活^[12, 13]。HSC 内的 ROS 水平升高能够特异性的激活 P38 MAPK-P16INK4a 途径从而使 HSC 离开 G₀ 期进入细胞周期, 导致 HSC 静止期缺陷, 使得 HSC 被消耗^[13, 16]。

5 总结

综上所述, ROS 可以通过多种途径对造血干细胞造成损伤, 导致骨髓不可逆性抑制, 严重威胁患

者生命。辐射可以引起骨髓环境中 ROS 水平升高, 证实辐射通过 NOX 产生的 ROS 引发 HSC 损伤, 鉴定产生 ROS 的 NOX 亚型, 这些可以作为今后工作研究的重点。

[参 考 文 献]

- [1] Fang SP, Tago F, Tanaka T, et al. Repeated irradiations with γ -rays at a dose of 0.5 Gy may exacerbate asthma. *J Radiat Res*, 2005, 46(2): 151-6
- [2] Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol*, 2002, 30(6): 513-28
- [3] Rugo RE, Secretan MB, Schiestl RH. X radiation causes a persistent induction of reactive oxygen species and a delayed reinduction of TP53 in normal human diploid fibroblasts. *Radiat Res*, 2002, 158(2): 210-9
- [4] Michael W, Epperly Ph D, Anatoli N, et al. Ascorbate as a "redox sensor" and protector against irradiation-induced oxidative stress in 32d CL 3 hematopoietic cells and subclones overexpressing human manganese superoxide dismutase. *Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(3): 851-61
- [5] Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, et al. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(pt5): 960-4
- [6] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(6): L1005-28
- [7] Piccoli C, Ria R, Scrima R, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. *Biol Chem*, 2005, 280(28): 26467-76
- [8] Piccoli C, D'Aprile A, Ripoli M, et al. Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(4): 965-72
- [9] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 2005, 121(7): 1109-21
- [10] Wu JY, Purton LE, Rodda SJ, et al. Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by $G_s\alpha$ -dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(44): 16976-81
- [11] Cancelas JA, Williams DA. Stem cell mobilization by $\beta 2$ -agonists. *Nat Med*, 2006, 12: 278-9
- [12] Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 2007, 110(8): 3056-63
- [13] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2006, 12(4): 446-51
- [14] Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1}/waf1. *Science*, 2000, 287(5459): 1804-8
- [15] Griffith OW. Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. *Methods Enzymol*, 1981, 77: 59-63
- [16] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature*, 2004, 431(7011): 997-1002
- [17] Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a Is Essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 101-12
- [18] Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(3): 578-83
- [19] Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2001, 2(3): 222-8