

文章编号: 1004-0374(2010)04-0377-05

TGF- β /Smad 通路对造血干细胞的调控作用

张 恒, 王月英, 孟爱民*

(中国医学科学院北京协和医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 造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是典型的成体干细胞,造血系统的稳定依靠造血干细胞正确的自我更新、增殖和分化。TGF- β 超家族包括TGF- β 、骨生成蛋白(BMP)和激活素,可通过Smad 蛋白对造血干细胞进行调节。TGF- β /Smad 通路可通过降低CDK4 的表达、增加p21 蛋白表达和改变p27 分布,将造血干细胞阻断于G₁ 期;通过上调CD34 表达,抑制造血干细胞的分化。但也有不同的观点,认为TGF- β 对HSCs 的调节与Smads 无关,TGF- β 并非通过调控p21 和p27 抑制HSCs 的增殖,TGF- β /Smad 通路对维持HSCs 静止状态无关。

关键词: 造血干细胞; 转化生长因子- β ; Smads

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

TGF- β /Smad signaling pathway regulates hematopoietic stem cells

ZHANG Heng, WANG Yue-ying, MENG Ai-min*

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

Abstract: Hematopoietic stem cells (HSCs) are historically the most thoroughly characterized type of adult stem cells, and homeostasis of the hematopoietic system is maintained by their accurate self renewal, proliferation and differentiation. The TGF- β family of ligands, including TGF- β , bone morphogenetic protein (BMP) and activin, signal through Smad pathways to regulate the fate of hematopoietic stem cells. TGF- β /Smad pathway may cause transcriptional activation of CD34 and preserve haematopoietic stem/progenitor cells activity. Also, the pathway may be involved in HSCs' G₁ arrest by down-regulating CDK4, up-regulating p21 and redistributing p27. However, there are some conflicting opinions as whether TGF- β regulates HSCs through Smads, whether TGF- β inhibits proliferation of HSCs by p21/p27, and whether the pathway is a control device of HSCs' fate, et al.

Key words: haematopoietic stem cells; transforming growth factor- β ; Smads

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)主要分布于成年脊椎动物骨髓中,数量少,具有多能造血功能^[1]。HSCs具有自我更新(self-renewal)和分化(differentiation)能力,通过自我更新作用可以维持HSCs自身数量和遗传性状的稳定,通过分化作用可以生成造血祖细胞并最终生成各种血液细胞^[2]。处于生态位(niche)中的HSCs受到多种内外部因素的精确调控,其命运主要包括增殖、分化、凋亡、休眠、恶化等,掌控HSCs命运的相关信号传导通路受到广泛的关注。

转化生长因子TGF- β 超家族包括TGF- β s、Activins和骨生成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs),对HSCs具有广泛的调节作用,包括细胞凋亡、增殖、分化等^[3]。TGF- β 家族成员能够结合细胞膜表面的丝氨酸/苏氨酸激酶受体TBR-II并

收稿日期: 2009-09-17; 修回日期: 2009-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30828011; 30770645);
中国医学科学院放射医学研究所发展基金(SF0825)s

*通讯作者: Email: ai_min_meng@126.com Tel: 022-85682353

将其激活,活化的T β R-II激活细胞膜内受体T β R-I,细胞内的Smad蛋白家族与活化的T β R-I结合后激活。Smad蛋白家族可以分为3群:受体激活型Smads(R-Smads)、通用配体型Smads(Co-Smads)和抑制型Smads(I-Smads)。通常TGF- β 先活化R-Smad2和(或)R-Smad3;R-Smads磷酸化后与Co-Smads(Smads4)接合,生成信号传导复合体后入核调控靶基因。I-Smads中的Smad7是Smads家族中主要的抑制因素,其作用机理是与T β R-I结合阻止R-Smads的活化,同时TGF- β 对Smad7起正向调控作用,形成反馈回路对细胞功能进行调控(图1)^[4]。

造血组织中,TGF- β /Smad通路被认为对维持HSCs的相对静止性起到重要作用^[5],在造血系统受到损伤时,TGF- β /Smad通路的过度活化可以抑制HSCs的活性,从而抑制HSCs的增殖,影响其分化^[6]。研究TGF- β /Smad通路对造血干细胞的调控作用,可以明确以上作用的机理,为在应激条件下预防和治疗造血系统损伤和防止血液病的发生提供新的靶点。

1 TGF- β /Smad通路对HSCs调控作用的机制

1.1 影响HSCs的增殖能力

在胚胎形成、血管生成和肌形成中,TGF- β 都

起到抑制细胞增殖的作用^[3]。通常认为HSCs的一个显著特征就是其相对的休止性,大量的体外细胞培养实验证明体内TGF- β 是使HSCs处于休止期的重要因子^[5]。体外对鼠和人细胞研究表明,TGF- β 可以直接抑制HSCs的增殖和分化,抑制作用随TGF- β 聚集度增高而强化^[7]。为了证明这一观点,有学者在体外实验中将TGF- β 失活,发现HSCs和造血祖细胞可以脱离休止期^[6]。很多分子机制被认为与该抑制作用有关,其中包括细胞因子受体的改变,细胞周期依赖激酶抑制因子表达的上调^[5]和骨髓细胞表面细胞因子的持续下调等因素。在应激条件下,高表达的TGF- β 可以降低CDK4的表达,以及降低D-Cdk4和cyclin E-Cdk2复合体的活性,将细胞周期阻断于G₁/S检查点^[3],使细胞无法从G₁期进入S期而无法增殖,并最终停滞于G₀期。Taiju等^[8]认为TGF- β 是通过诱导HSCs凋亡而产生抑制作用的。

1.2 对p21/p27的影响

p21可以与cyclin D、CDK4和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)组成四聚体,是p53介导的细胞周期抑制因子,在HSCs中对细胞周期起抑制作用。Ducos等^[9]将TGF- β 阻断抗体应用到HSCs,发现随着TGF- β 的阻断,p21的mRNA水平显著降低,细胞的增殖能力大幅度提

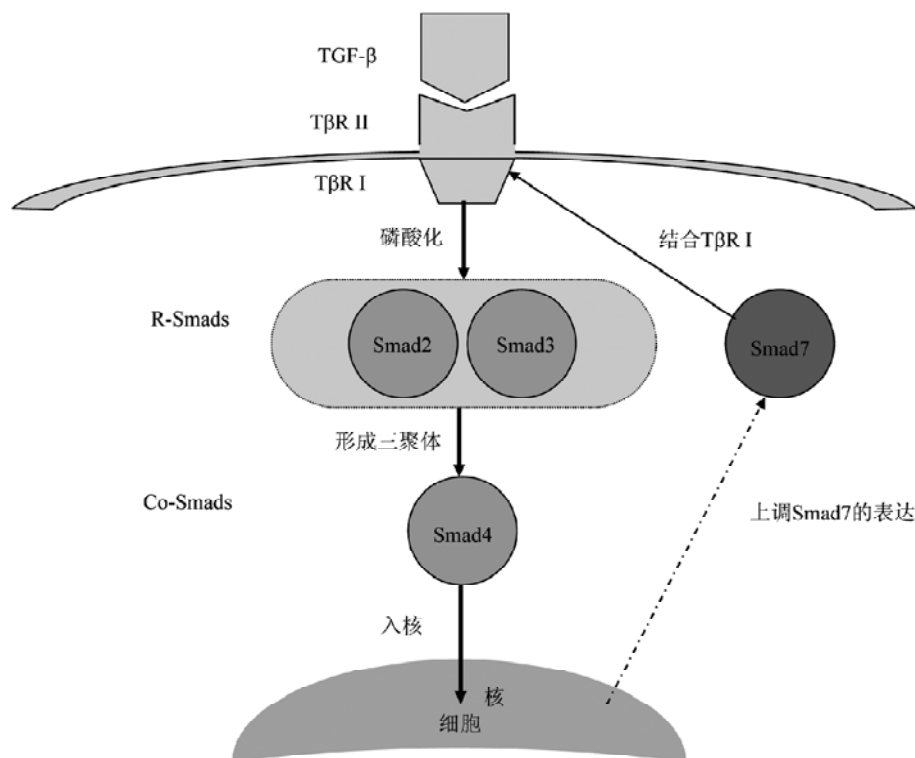


图1 TGF- β /Smad信号通路示意图

高;当使用外源 TGF- β 干预 HSCs 后 p21 的 mRNA 水平提高,细胞的增殖能力下降。过表达 Smad3 和 Smad4^[10],可以增强 TGF- β 对 p21 的诱导作用,而通过基因突变失活 Smad3/4 的作用可以阻断 TGF- β 对 p21 的诱导;用 Smad7 过表达阻断 TGF- β /Smads 通路,p21 的表达水平降低且与 Smad4 蛋白入核水平下降相关。以上研究表明,TGF- β /Smad 通路的活化可以通过上调 p21 的表达抑制 HSCs 的增殖,同时明确了 TGF- β 是通过 Smads 蛋白的活化影响 p21 表达水平的。

p27 的羧基端与 p21 不同,它与 cyclin-CDK 具有广泛交互作用,不受 p53 的调节,是分布最为广泛的 cdk 抑制因子,在增殖和分化的细胞中有广泛表达。过表达 p27 可以终止细胞周期^[11],p27 能够插入 cdk2 催化位点形成 cyclin-cdk2-p27 复合物,从而阻断 ATP 的结合,而 TGF- β 可以通过降低 cdk2 的表达而减少 cdk2-p27 复合物的形成并减少 cdk2 和 cyclin E 的结合。TGF- β 对 cyclin E 的表达没有直接影响^[12],但能够促进 cyclin E 与 P27 的结合,过多的 cyclin E-P27 复合物可以影响 cyclin E-cdk2 复合物的稳定性。通过以上机制,TGF- β 可以通过改变 p27 的分布对细胞增殖进行调控。

1.3 对 CD34 蛋白的调控

CD34 蛋白表达于人类骨髓或脐带 HSCs 的细胞膜,是 HSCs 的重要标志,随着造血干细胞的成熟其表达逐渐消失,其确切功能还未完全得知,仅有少量研究认为 CD34 高表达可以阻止 HSCs 的分化。Pierelli 等^[13]对 CD34⁺Lin⁻细胞进行了半定量研究,在 mRNA 水平和蛋白水平,TGF- β 均可以促进 CD34 蛋白的表达且与细胞生长无关,TGF- β 还能通过上调 CD34 表达维持 CD34⁺Lin⁻细胞的未分化状态,这一效应与 TGF- β 对细胞周期的影响无关。研究还表明,以上作用伴随着 Smad-2/3 蛋白的活化及 P38 磷酸化作用的阻断,利用 SB202190 阻断 P38 磷酸化后发现 CD34 的 mRNA 水平增高,但 CD34 蛋白的表达量未增加。可见 TGF- β /Smads 通路是上调 CD34 表达核心因素,这一作用与 HSCs 保持未分化状态相关,TGF- β /Smads 通路功能的异常可以影响 HSCs 的正常分化。为验证该结论,该实验室还用 TF-1 和 DG1a 细胞系进一步研究^[14],得出了完全相同的结论,同时发现在比 CD34⁺Lin⁻成熟的 CD34⁻细胞系 HL-60 和 K-562 中,TGF- β 不能上调 CD34 蛋白的表达。

2 对 HSCs 中 TGF- β /Smad 通路的深入研究

2.1 TGF- β

多数研究认为 TGF- β /Smads 通路对 HSCs 的影响是呈剂量效应的^[7],但也有不同的研究结论。Fuchs^[15]的研究表明,随 TGF- β 聚集度不同以及 HSCs 所处微环境不同,TGF- β 可以促进或抑制 HSCs 的增殖、分化、凋亡。Kale 和 Vaidya^[16]利用由 ATCC (american type culture collection) 提供的与 HSCs 高度相似的 KG1a 细胞系,对 TGF- β /Smads 通路及其相关的 MAPK 相关通路进行了系统研究。结果表明,TGF- β 高聚集度时可以促使 Smad3 蛋白磷酸化,通过 Smad3-TAB2-TAK1 通路激活 P38 通路,最终激活与细胞抑制相关的 ATF-2 (activation transcription factor 2) 和 c-Jun;在 TGF- β 低聚集度时,其作用则与 Smad3 无关,是通过直接激活 p44/42 MAPK 通路而上调 STAT (signal transducers and activators of transcription) 蛋白-3/5/6 表达,最终达到增殖效应。

通常认为 TGF- β 通过影响 p21、p27 能够抑制 HSCs 的增殖;但 Cheng 等^[17]对 32D (Cell-cycle-synchronized) 细胞株进行研究后发现 TGF- β 对细胞起到抗增殖作用时,p21 和 p27 的 mRNA 水平和 p21 的蛋白水平没有改变。他们构建了 p21 缺陷小鼠和 p27 缺陷小鼠,将缺陷小鼠 (p21p27^{-/-}) 和野生小鼠 (p21p27^{+/+}) 进行同窝对照研究。CAFC 实验结果为 10 ng/ml 的 TGF- β 1 在两种基因型的 HSCs 均可以抑制细胞增殖,结果没有显著差异,证实了 TGF- β 1 对 HSCs 的抗增殖作用不是通过调控 p21 和 p27。还有研究认为 TGF- β 对 HSCs 的影响与细胞周期没有直接关系,是通过调控抗凋亡基因 Bcl-2 实现或调控分化转录因子 GATA-1 和 PU1 实现的^[18]。

2.2 T β RI

为了在体内实验中阻断 TGF- β /Smads 通路用来研究其功能,Larsson 等^[19]对传统基因敲除技术进行了改进,成功构建了条件 T β RI 缺陷小鼠。研究表明,阻断 TGF- β /Smads 通路后并未对 HSCs 细胞的增殖能力产生影响;将 T β RI 缺陷小鼠的 HSCs 移植到其他小鼠后,实验结果与上相同。Larsson 等^[20]还对 T β RI 缺如小鼠使用细胞周期特异的细胞毒性药物 5-Fu 干预并进行系列骨髓移植实验,发现 T β RI 缺如小鼠和对照组对 5-Fu 的敏感性相同,且发现 T β RI 缺如的小鼠在应激状态下对维持干细胞库无作用,表明体内环境中 TGF- β /Smads 通路对维持

HSCs 静止状态无关, 与体外实验结果相反。

2.3 Smad4

一般认为, Smads 是 TGF- β 最重要的下行传导通路, 但有研究指出, Smad 通路远较原先研究的复杂^[21]。为了在 Smad4 环节阻断 TGF- β /Smads 信号传导通路, 有学者构建了 Smad4 基因敲除小鼠模型, 并将 Smad4 基因缺陷 HSCs 进行异体移植, 原代和次代受体内的 Smad4 缺陷 HSCs 在体内的增殖能力均显著降低, 充分证明 Smad4 对体内 HSCs 的自我更新能力起重要作用^[22]。因为过表达 Smad7 和敲除 Smad4 对 HSCs 应该起到相同的作用, 所以上述实验可以认为 Smad4 对 HSCs 的增殖起正向调控作用, 这一研究结果与原先认定的 TGF- β /Smads 信号传导通路的功能相矛盾。Smad4 对 HSCs 的调控作用似乎独立于 TGF- β /Smads 通路发生的, 其确切的分子机理还不得而知, 也许是 Smad4 与其他的信号传导通路发生了交互作用, 比如 Wnt 和 Notch。

2.4 Smad7

Smad7 是 TGF- β /Smad 信号传导通路的主要抑制因素, 通常其表达上调可以通过阻断 TGF- β /Smad 通路促进 HSC 的自我更新, 可以通过对 R-Smad 和 MAPK 的作用影响红系和巨系细胞的分化。Blank 等^[23]利用逆转录病毒基因转染技术使体外培养的小鼠 HSCs 中的 Smad7 过表达, Smad 通路被完全阻断后, HSCs 的自我更新能力大幅度提高并与 Smad4 的作用相关, 通过对骨髓中淋巴系和骨髓系细胞进一步研究发现 Smad 通路对 HSCs 的分化作用无关。与此结论相反, Chadwick 等^[24]利用逆转录病毒基因转染技术将 Smad7 基因导入人脐带血细胞获高表达, 植入联合免疫缺陷病 (severe combined immunodeficient disease, SCID) 模型小鼠骨髓中, 发现再植入的细胞过表达 Smad7 后造血系统由 B 淋巴细胞主导变为髓样细胞主导, 也就是说 TGF- β /Smads 通路对 HSCs 的分化起到了重要作用。

3 总结

综上所述, TGF- β /Smad 通路对 HSCs 调控的研究逐渐成为热点, 体外实验的技术手段已经比较成熟, 对 HSCs 具有周期阻断和抑制增殖的作用, 但体内实验中一些结论与体外实验存在较大差异, 原因主要在于: (1) TGF- β /Smad 通路与其他信号传导通路存在广泛的交互作用, 包括 MAPKs 相关通路、Wnt、Notch、p53 等, TGF- β 超家族的各成员间也存在交互作用, 目前的研究难以考虑所有的

交互因素; (2) HSCs 在体内所处的环境较为复杂, TGF- β 能够调控基质细胞分泌的细胞因子 IL-1 β 1、肿瘤坏死因子 TNF- α 和 SCF, 而这些因子也能对 HSCs 进行间接的调控, 这使体外实验很难模拟体内环境; (3) 体外实验中, HSCs 的筛选、长期培养和指标检测是公认的难题, 因其研究周期长、成本高很难在普通研究机构有效开展。

在今后的研究中, 需要进一步改进体内和体外实验的方法, 进一步阐明在各种应激条件下 TGF- β /Smad 通路对 HSCs 的调控作用, 阐明其调节作用的关键环节和主要交互影响因素。该领域的深入研究, 预期将为临床上预防和治疗 HSCs 功能异常的疾病提供新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Gekas C, Rhodes EK, Mikkola KA. Isolation and analysis of hematopoietic stem cells from the placenta. *J Vis Exp*, 2008, (16): 3791-6
- [2] Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 759-806
- [3] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113 (6): 685-700
- [4] Benchabane H, Wrana JL. GATA- and Smad1- dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (18): 6646-61
- [5] Scandura JM, Boccuni P, Massagué J, et al. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (42): 15231-6
- [6] Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, et al. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor- β . *Oncol Res*, 2003, 13 (6-10): 445-53
- [7] Ruscetti FW, Akel S, Bartelmez SH. Autocrine transforming growth factor- β regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*, 2005, 24 (37): 5751-63
- [8] Taiju U, Jennifer LM, Marie A, et al. A road map toward defining the role of smad signaling in hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24 (4): 1128-36
- [9] Ducos K, Panterne B, Fortunel N, et al. p21 (cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor- β 1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Cell Physiol*, 2000, 184 (1): 80-5
- [10] Kim YK. TGF- β 1 induction of p21WAF1/cip1 requires smad-independent protein kinase C signaling pathway. *Arch Pharm Res*, 2007, 30 (6): 739-42
- [11] Lecanda J, Ganapathy V, D' Aquino-Ardalan C, et al. TGF- β prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. *Cell Cycle*, 2009, 8 (5): 742-56
- [12] Zhang F, Mönkkönen M, Roth S, et al. TGF- β induced G₁

- cell cycle arrest requires the activity of the proteasome pathway. *Exp Cell Res*, 2002, 281 (2): 190-6
- [13] Pierelli L, Marone M, Bonanno G, et al. Transforming growth factor- β 1 causes transcriptional activation of CD34 and preserves haematopoietic stem/progenitor cell activity. *Br J Haematol*, 2002, 118 (2): 627-37
- [14] Marone M, Scambia G, Bonanno G, et al. Transforming growth factor- β 1 transcriptionally activates CD34 and prevents induced differentiation of TF-1 cells in the absence of any cell-cycle effects. *Leukemia*, 2002, 16 (1): 94-105
- [15] Fuchs O. Role of cytokine signaling pathways of the transforming growth factor- β (TGF- β) family in the regulation of hematopoiesis. *Cas Lek Cesk*, 2002, (141): 18-22
- [16] Kale VP, Vaidya AA. Molecular mechanisms behind the dose-dependent differential activation of MAPK pathways induced by transforming growth factor- β 1 in hematopoietic cells. *Stem Cells Dev*, 2004, 13 (5): 536-47
- [17] Cheng T, Shen H, Rodrigues N, et al. Transforming growth factor β 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21 (Cip1/Waf1) or p27 (Kip1). *Blood*, 2001, 98 (13): 3643-9
- [18] Pierelli L, Marone M, Bonanno G, et al. Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF β 1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood*, 2000, 95 (10): 3001-9
- [19] Larsson J, Blank U, Helgadottir H, et al. TGF- β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability *in vivo* despite increased proliferative capacity *in vitro*. *Blood*, 2003, 102 (9): 3129-35
- [20] Larsson J, Blank U, Klintman J, et al. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cell pool is not dependent on TGF- β signaling *in vivo*. *Exp Hematol*, 2005, 33 (5): 592-6
- [21] Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci*, 2005, 118 (Pt 16): 3573-84
- [22] Karlsson G, Blank U, Moody JL, et al. Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2007, 204 (3): 467-74
- [23] Blank U, Karlsson G, Moody JL, et al. Smad7 promotes self-renewal of hematopoietic stem cells. *Blood*, 2006, 108 (13): 4246-54
- [24] Chadwick K, Shojaei F, Gallacher L, et al. Smad7 alters cell fate decisions of human hematopoietic repopulating cells. *Blood*, 2005, 105 (5): 1905-15

《生命科学》编委

名誉主编: 池志强

主编: 林其谁

常务副主编: 王恩多

副主编: (以姓氏拼音序) 陈晓亚 杜生明 刘峰松 张知彬

编委: (以姓氏拼音序) 曹雪涛 陈雁 崔治中 段恩奎 方福德 方精云 冯雪莲
 高福 谷瑞升 顾红雅 桂建芳 郭爱克 郝小江 胡国渊 华子春 黄大卫
 季维智 金由辛 康乐 李林 罗晶 裴端卿 裴钢 申倚敏 沈允钢
 宋建国 苏荣辉 汤雪明 王澍 闻玉梅 吴常信 吴家睿 武维华 伍宗韶
 相建海 徐汝梅 杨晓 杨正宗 尹伟伦 尹文英 张启发 张旭 赵南明
 赵寿元 周俊 周琪

本期责任编辑: 管兴华