

- [18] Lee, M. K. , et al. , 1993, *J. Cell Biol.* , **122**: 1337-1350.
- [19] Chin, S. S. M. , et al. , 1991, *J. Cell Sci.* , **99**: 335-350.
- [20] Gill, S. R. , et al. , 1990, *J. Cell Biol.* , **111**: 2005-2019.
- [21] Wong, P. C. and D. W. Cleveland. , 1990, *J. Cell Biol.* , **111**: 1987-2003.
- [22] Hisanaga, S. , et al. , 1990, *J. Mol. Biol.* , **211**: 857-869.
- [23] Ching, G. Y. and R. K. H. Liem. , 1993, *J. Cell Biol.* , **122**: 1323-1335.
- [24] Lendahl, U. , et al. , 1990, *Cell.* **60**: 585-595.
- [25] Shaw, G. and K. Weber. , 1982, *Nature* , **298**: 277-279.
- [26] Steinert, P. M. and R. K. H. Liem. , 1990, *Cell* , **60**: 521-523.
- [27] Hoffman, P. N. , et al. , 1985, *J. Neurosci.* , **5**: 2920-2929.
- [28] Hoffman, P. N. and D. W. Cleveland. , 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **85**: 4530-4533.
- [29] Hoffman, P. N. , et al. , 1984, *J. Cell Biol.* , **99**: 705-714.
- [30] Hoffman, P. N. , et al. , 1985, *J. Cell Biol.* , **101**: 1332-1340.
- [31] Monteiro, M. J. , et al. , 1990, *J. Cell Biol.* , **111**: 1543-1557.
- [32] Xu, Z. -S. , et al. , 1993, *Cell* , **73**: 23-33.
- [33] Lee, V. M. -Y. , et al. , 1988b, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **85**: 7384-7388.
- [34] Johnson, G. and R. Jope. , 1988, *Brain Res.* , **456**: 95-103.

与造血过程有关联的转录因子

桂长云 蒋 傲 钱若兰

(中国科学院上海细胞生物研究所 上海 200031)

多能干细胞分化过程中其子代细胞分化潜能逐渐减小,并使子代细胞获得成熟细胞的某些表型,最终达到终末分化和具有特定表型。研究这个过程的分子机理是发育生物学的一个重要课题。造血过程是从多能造血干细胞分化成各系造血祖细胞,再进一步分化成成熟血细胞(包括红细胞,白细胞和淋巴细胞)的过程^[1]。

造血过程是生长因子、转录因子相互作用

和调节的结果。一般认为生长因子促进造血干细胞的增殖,维持造血干细胞的数量和分化潜能。转录因子与细胞专一性基因激活有关联。它们作用于造血干细胞和造血祖细胞并使它们向各系成熟的血细胞分化。为了维持哺乳动物在整个生命过程中不断造血,造血干细胞必须具备以下三个特点^[2]: 1. 一部分造血干细胞处于不分裂的状态。2. 增殖以产生新的造血干细

表 1 与造血过程有关的细胞内核转录因子的特点

转录因子	分 类	结合位点	组织和细胞分布
GATA-1	GATA	(A/T)GATA(A/G)	prog. ,E,M,Meg. ,S
GATA-2	GATA	(A/T)GATA(A/G)	prog. ,E,M,Meg. ,End,NS.
GATA-3	GATA	(A/T)GATA(A/G)	T,NS
SCL/tal-1	bHLH	AACAGATGGT	prog. ,E,M,Meg. ,O.
Rbtn-2	LIM	?	广泛分布
EKLF	Kruppel	CCNCNCCCN	E,M,Meg.
p ⁴⁵ NF-E2	b-zip	(C/T)GCTGA(G/C)TCA(C/T)	prog. ,E,M,Meg,WBC.
Ikaros	C ₂ H ₂ 类锌指蛋白	GGGAAT	L,CS
C-myb	myb	(T/C)AAC(G/T)G	prog.
Oct-2	POU	Octamer	B,浆细胞
Pu. 1	Ets	GGAA	Mye,B,E,prog.
E2A	bHLH	CANNTG	广泛分布

注: prog(祖细胞), E(红细胞), M(肥大细胞), Meg(巨核细胞), S(Sertoli细胞), L(淋巴细胞), WBC(白细胞), B(B淋巴细胞), T(T淋巴细胞), Mye(髓细胞), CS(网状体), End(内皮细胞), NS(神经系统), O(其他)。

胞,达到更新造血干细胞的作用。3. 分化成各类造血细胞系的祖细胞,使其分化潜能减小。其实,在造血过程中,转录因子对维持造血干细胞的三个特点和造血干细胞向成熟血细胞分化均起重要作用。

一、造血过程中的转录因子

最近几年的研究发现多种转录因子与造血过程有关。它们可分为两大类:GATA 家族和非 GATA 家族。现将与造血有关的几种转录因子特点列于表 1 中。

(一) GATA 家族转录因子

1. GATA 家族成员的一般情况 GATA-1 是第一个被发现的 GATA 转录因子家族成员,同时也是红系细胞发育十分重要的转录因子。GATA-1 以前名称很多如 ery-1, NF-E1 等等。后来陆续发现了 GATA-2 和 GATA-3。GATA-2 对红系的发育和其他血细胞的发育不可缺少^[1]。GATA-3 主要作用于淋巴细胞系的发育。后来,还发现其他的 GATA 家族成员如 GATA-4,但是 GATA-4 不存在于造血细胞中。GATA 家族成员蛋白质的共同特点是它们可以与基因调控序列(如 β -珠蛋白家族基因的启动子,增强子,LCR,GATA-3 作用于免疫球蛋白基因上游的启动子等)上特定 GATA 元件结合。GATA 转录因子家族成员结合 GATA 元件的部位为蛋白的锌指结构。GATA-1 除锌指区与其他的 GATA 家族成员同源外,其他部位的氨基酸的一级结构相差很大。GATA-2 与 GATA-3 的同源性较高。GATA-1 在不同种系动物中相差很大,而 GATA-2 和 GATA-3 在不同种系动物中同源性很高。

2. GATA-1 GATA-1 mRNA 存在于红系、巨核系、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、IL-3 依赖的始祖细胞和小鼠睾丸的足细胞中。GATA-1 能识别靶基因调控序列内(启动子,增强子等)的 GATA 元件^[7]。GATA 类蛋白可能具有维持 LCR 区域形成开放的染色质结构,有利于基因的启动子,增强子与其它转录因子间相

互作用。而且 GATA-1 基因的启动子区域含有 GATA 元件,提示 GATA-1 基因的表达具有自身调控作用和可能受 GATA 家族的其他成员所调节。GATA-1 纯合子突变小鼠胚胎中髓系、淋巴系、巨核系发育不受影响^[8],红系细胞受阻于红母细胞阶段。GATA-1 纯合子突变导致胎儿期严重贫血和出生前死亡的原因是 GATA-1 的基因失活导致红系细胞不能分化的结果^[10-14]。

3. GATA-2 GATA-2 同 GATA-1 一样能识别靶基因的启动子,增强子和 LCR 区域中 GATA 元件。它除与 GATA-1 一样在红系、巨核系、肥大细胞系中存在外,还存在于内皮细胞、脑神经系统及胚胎干细胞中。在 GATA-1 纯合子突变小鼠胚胎中发现 GATA-2 表达增高 50 倍^[10]因此 GATA-1 在促进红系细胞分化过程中抑制 GATA-2 的表达。随着红系细胞分化,GATA-1 表达增加而 GATA-2 减少;反之,在 GATA-1^{-/-}纯合子突变小鼠胚胎中 GATA-2 可部分弥补 GATA-1 的功能,所以 GATA-1 的功能和 GATA-2 的功能有交叉^[18]。在 GATA-2^{-/-}纯合子突变小鼠胚胎中发现^[9]:小鼠胚胎造血细胞不分化而且造血细胞数量下降,这说明 GATA-2 在造血的早期即参与造血细胞的增殖及维持造血细胞的数量。此外 GATA-2 在胚胎的脑组织中表达,揭示了 GATA-2 可能在神经发育中具有潜在作用。

GATA-2 在造血细胞增殖中的作用可能是通过 SCF (Stem Cell Factor) 等外源性的生长因子作用于相应的受体如 (c-kit)^[12],然后通过细胞内的信号传递作用于 SCL (Stem Cell Leukemia) 和 Rbtn-2 等转录因子,使干细胞分化。

4. GATA-3 GATA-3 是 GATA 家族的另一个成员,它结合于靶基因的 GATA 元件上,但是,它不同于 GATA-1 和 GATA-2。在个体发育早期它是广泛存在的,但对成熟的血细胞来说:它只存在于 T 淋巴细胞中。GATA-3 还分布于发育的神经组织、肾脏、内皮细胞和 ES 细胞中。GATA-3 在 T 淋巴细胞的所有发

育阶段中均有高水平的表达。T-淋巴细胞受体 α -和 δ -链的启动子,增强子区域具有GATA元件,因此GATA-3可能是T淋巴细胞特异基因表达的重要转录激活因子。GATA-3^{-/-}纯合子突变的小鼠^[11]表现为不正常的造血包括致死性的胚胎期出血。GATA-3对造血过程的作用还不明了,它可能影响胎肝造血和通过作用于GATA-1影响巨核细胞系的分化。此外,GATA-3在胚胎脑组织中表达,推测它可能在神经发育中有潜在的功能。而且GATA-3和GATA-2在神经系统中的分布有所不同,因此GATA-2和GATA-3在神经系统的发育过程中可能行使不同的功能。

5. GATA元件在造血细胞中的分布

红细胞 各种珠蛋白基因的启动子,增强子和LCR;EPO受体基因启动子和增强子;红细胞谷胱甘肽过氧化物酶基因启动子;胆素原脱氨基酶基因启动子;丙酮酸激酶基因启动子;GATA-1基因启动子;SCL基因;EKLF基因;血型糖蛋白基因启动子;红细胞特异的组蛋白H5基因启动子。

肥大细胞 羧基肽酶A基因启动子;肥大细胞特异的IL-4基因增强子;小鼠肥大细胞蛋白酶(MMCP)基因启动子(包括MMCP-1, MMCP-2, MMCP-4, MMCP-5, MMCP-6, MMCP-L);大鼠肥大细胞蛋白酶I(RMCP-I)基因启动子和增强子,IgE受体 β 链基因启动子。

T淋巴细胞 T淋巴细胞受体 δ 基因增强子;T淋巴细胞受体 α 基因增强子;T淋巴细胞受体 β 基因增强子;CD8 α 基因启动子;CD3 δ 受体基因增强子。

巨核细胞 蛋白酶1b基因增强子和启动子;大鼠血小板因子4基因启动子;mpl受体基因;糖蛋白IX基因;糖蛋白IB α 基因; β -凝血球蛋白基因。

巨核/内皮细胞 P-Selectin基因启动子; α -Integrin基因启动子。

(二) 与造血有关的非GATA类转录因子

1. SCL(Stem Cell Leukemia) SCL^[12]

是bHLH(basic helix-loop-helix)家族中的一种转录因子,是在急性淋巴瘤细胞性白血病(TALL)中由于染色体易位而被发现的,它的分布与GATA-2相似。SCL存在于红系、肥大细胞系、巨核系及IL-3依赖的始祖细胞中。SCL是红细胞分化的正调控因子:1. 因为SCL启动子有GATA元件,证明GATA类转录因子通过结合于SCL的启动子部位促进SCL基因的转录。2. 诱导红系分化的化学物质DMSO等使细胞内SCL mRNA表达增高。3. 把SCL的cDNA转入红系细胞以后,这些细胞向成熟红细胞方向分化;反之,引入反义SCL使这些细胞停止分化。4. SCL mRNA存在于红系发育的所有阶段中,而且其分布与GATA-1相似。尽管SCL基因是在急性T淋巴瘤细胞白血病人中发现的,但是,在正常的T,B淋巴细胞中不存在SCL基因的表达。

SCL转录因子通过结合于特定基因上游的CANNTG(E box)序列来行使其转录激活功能。SCL纯合子突变的小鼠^[15]胚胎组织分析发现:这时的小鼠胚胎广泛缺乏红系、缺乏各层次的造血干细胞和胚胎死于早期妊娠。SCL^{-/-}纯合子突变后小鼠胚胎产生的现象类似于GATA-2^{-/-}和Rbtn-2^{-/-}纯合子突变后的小鼠胚胎。

2. Rbtn-2 Rbtn-2^[16]的发现同SCL一样是在TALL病人血细胞中发现的一类含LIM domain的转录因子。Rbtn-2 LIM domain氨基酸序列为(C-X₂-C-X₁₇±1-H-X₂-C)-X₂-(C-X₂-C-X₁₇±1-C-X₂-C/D/H)。Rbtn-2与Rbtn-1有50%的同源性,二者均为细胞原癌基因。基因寻靶(gene targeting)Rbtn-2基因后发现:它是红细胞发育成熟必须的转录因子。Rbtn-2^{-/-}纯合子突变抑制卵黄囊造血。由于Rbtn-2和SCL协同作用于造血干细胞的细胞增殖和它们的早期分化^[17],所以Rbtn-2纯合子突变引起胚胎早期死亡。Rbtn-2的LIM domain能与锌结合形成锌指蛋白结构可能作用于发育晚期的红细胞分化。Rbtn-2在细胞内分布与GATA-2及SCL相似,主要分布于红系、

巨核系和肥大细胞系中,因此 Rbtn-2 既是干细胞增殖的重要因子,又是红细胞成熟分化中不可或缺的转录因子。

3. EKLK (Erythroid Kruppel-Like Factor) EKLK 是红细胞特异的转录因子, EKLK 含有三个锌指结构,与 Kruppel 家族其它转录因子同源,它结合于 CCACACCCT (CAC box)。EKLK 基因启动子部位含有 GATA 元件,提示 GATA 家族成员参与 EKLK 基因表达的调控。EKLK 在细胞内的分布同 GATA-1^[4,6]。

EKLK^{-/-}纯合子突变显示^[6]:小鼠胚胎卵黄囊造血正常,但胎儿期出现严重的贫血和导致死胎。尽管 EKLK 在多能干细胞的增殖及分化成成熟的红细胞过程中不起作用,但是, EKLK 可作用于胎肝造血阶段。EKLK^{-/-}纯合子突变使红细胞变小,红细胞的形态不规则,血红蛋白含量减少。另外, EKLK 为 β -珠蛋白基因表达所必须的转录因子。

4. NF-E2^[19,21] NF-E2 是一类含亮氨酸拉锁的转录因子(b-zip),它含有两个亚单位,一个是造血组织专一的 p⁴⁵NF-E2,另一个是广泛存在的 b-zip 蛋白 p¹⁸NF-E2。p⁴⁵NF-E2 为转录催化亚单位, p¹⁸NF-E2 能特异地与基因上游的 AP-1 类似元件结合协同行使激活转录的功能。在小鼠红白血病细胞株(MEL)细胞研究中发现缺乏 p⁴⁵NF-E2 蛋白, β -珠蛋白基因不表达。引入外源的 p⁴⁵NF-E2 cDNA 后, β -珠蛋白基因表达明显增加。突变后的 p⁴⁵NF-E2 使 MEL 细胞既不表达 β 珠蛋白基因又不表达 α 珠蛋白基因,因此,从小鼠红白血病细胞系的研究中证明 MEL 细胞内珠蛋白基因表达高度依赖 p⁴⁵NF-E2。Gene targeting^[15]使 p⁴⁵NF-E2 失活后纯合子突变^[20]的小鼠除血小板严重减少外,成年 p⁴⁵NF-E2^{-/-}小鼠的红细胞基本正常。尽管出现红细胞异型、低色素、网织红细胞化和巨脾,但是,这种红细胞的异型可能是不断出血继发的结果。可以肯定 p⁴⁵NF-E2 在巨核细胞分化成血小板中起作用。尽管 p⁴⁵NF-E2 对红细胞的分化作用不明显,但是, p⁴⁵NF-E2 对红

细胞的正常表达 β 型珠蛋白还是十分重要的。

二、造血过程中的基因表达调控

很多机制控制着真核基因的表达。当某一基因转录时,此基因所在部位的染色质必须形成开放的染色质构型。基因表达是在多层次上进行调控的。转录过程中存在着二类转录因子:一类是通用的基础转录因子,这些因子协助真核生物细胞核内 RNA 多聚酶 II 结合于转录起始上游的 TATA box, CAAT box 和 GC box 区域。一旦基础转录因子结合于启动子区域,此基因就可以低水平的转录。另一类是转录调节因子,这些因子可以刺激和加强基础转录。在造血过程中存在着多种转录因子,它们既分工又协作,作用于一定的发育时期。有的因子可以作用于干细胞阶段(例如 GATA-2)^[3,9],有的作用于特定基因表达(例如 EKLK)^[4,6],还有的可以作用于几个不同的发育阶段(例如 SCL)^[5]。图 1 描述了造血过程中几种常见的转录因子参与造血细胞发育的过程。

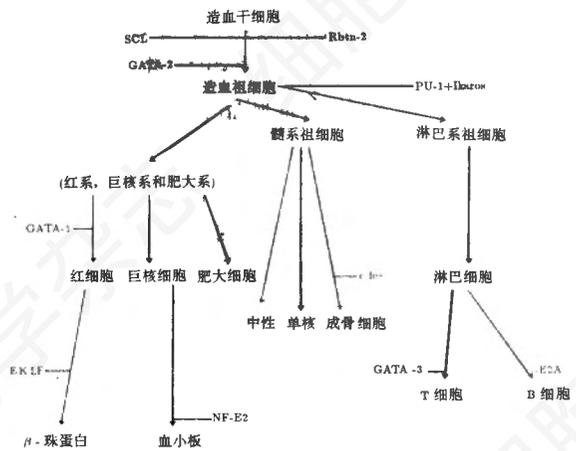


图 1 参与造血细胞发育的主要转录因子及其在造血细胞发育过程中的作用位点^[1,2,11]

近期通过基因打靶(gene targeting)建立特定基因缺失的动物模型来推断转录因子在动物体内的功能取得了丰硕成果。这个方法为了解转录因子在体内的功能提供了良好的模型,明确了造血过程中不同发育阶段中必需的转录

因子是什么。如利用 MEL 细胞株的研究中发现: p^{45} NF-E2 是红系发育过程中必需的转录因子,但利用基因打靶实验证明: p^{45} NF-E2 基因失活后的动物红细胞发育并不存在很大的障碍,相反,血小板的形成过程受阻。尽管基因打靶的方法对造血过程中转录因子的研究提供了充分的、可信的第一手资料,但是这个方法对转录因子间的相互协同和抑制作用还无法弄清,另外,造血过程中某一转录因子基因失活后,对于其发育、分化下游的作用就无法明了。

三、造血过程中转录因子间的相互调控

从上面几种转录因子失活后的研究和其它相关研究中发现: 转录因子并不是单独作用于发育的某一个阶段而不作用于其它阶段,而是相互调控、协同地作用于造血细胞的增殖和成熟分化。如 GATA-2 既作用于多能干细胞的增殖,同时还作用于其它转录因子的转录,例如: GATA-2 作用于 Rbtn-2 和 SCL 基因上游调控序列中的 GATA 元件,促进 Rbtn-2 转录,从而使干细胞增殖和维持造血器官中多能干细胞的数目。在造血干细胞阶段, SCL 与 Rbtn-2 协同作用维持造血干细胞的数量和质量。其中任何一个基因失活后的小鼠胚胎将死于早期妊娠。出现严重的造血细胞数量减少。

从对 p^{45} NF-E2 的研究中发现 p^{45} NF-E2 是红系分化中重要的转录因子。但是, p^{45} NF-E2 失活后只发现血小板成熟受阻,因此,很可能在 p^{45} NF-E2 失活后其它的转录因子或转录因子的亚单位弥补了 p^{45} NF-E2 的作用。

结 束 语

在造血过程中转录因子的作用各不相同。有的转录因子作用于单一的细胞系中某一基因表达如 EKLf 只作用于红细胞中 β -珠蛋白基因的表达。有的转录因子还存在相互抑制如红细胞发育过程中随 GATA-1 的增多,红细胞向

成熟分化,此时高浓度的 GATA-1 抑制 GATA-2 的表达。而且,在红细胞分化成熟过程中 GATA-1 还存在正调控机制。总之,造血细胞的生成过程是一个通过多种因子协同作用的复杂网络,其确切的调控机理和作用方式还有待进一步的研究来补充和论证。

参 考 文 献

- [1] Shivdasani R. A. et al., 1996, *Blood*, **87**: 4025-4039.
- [2] Orkin S. H., 1995, *J. Biol. Chem.*, **270**: 4955-4958.
- [3] Tsai F. Y. et al., 1995, *Nature*, **371**: 221-226.
- [4] Nuez B., et al., 1995, *Nature*, **375**: 316-318.
- [5] Shivdasani R. A., et al., 1995, *Nature*, **373**: 432-434.
- [6] Perkins A. C., et al., 1995, *Nature*, **375**: 318-322.
- [7] Weiss M. J., et al., 1995, *Exp. Hematol.*, **23**: 99-107.
- [8] Penvy L., et al., 1995, *Development*, **121**: 163-172.
- [9] Dorfman D. M., et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, **267**: 1279-1285.
- [10] Orkin S. H., 1992, *Blood*, **80**: 575-581.
- [11] Orkin S. H., 1995, *Eur. J. Biochem.*, **231**: 271-281.
- [12] Mc Guckin C. P., et al., 1995, *Exp. Hematol.*, **23**: 14-20.
- [13] Green R., et al., 1992, *Oncogene*, **7**: 653-660.
- [14] Weiss M. J., et al., 1994, *Genes & Dev.*, **8**: 1184-1197.
- [15] Bockamp E. O., et al., 1994, *Bio. Essay*, **16**: 481-488.
- [16] Rabbitts T. H., 1991, *Cell*, **67**: 641-644.
- [17] Warren A. J., et al., 1994, *Cell*, **78**: 45-57.
- [18] Blobel G. A., et al., 1995, *Mol. Cellul. Bio.*, **15**: 626-633.
- [19] Andrews N. C., et al., 1993, *Nature*, **362**: 722-728.
- [20] Shivdasani R. A., et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 8690-8694.
- [21] Lu S. J., et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 8398-8402.