综述

文章编号:1000-5404(2005)09-0930-03

转录因子 c-Myb 与胚胎干细胞造血调控

Hematopoietic regulation of transcription factor c-Myb in embryonic stem cells

陈洁平 综述,黄其林 审校 (第三军医大学西南医院血液内科,重庆 400038)

造血系统生长和分化是某些特殊基因不同表达的正性和负性信号之间复杂的平衡。其中转录因子在这一特殊的生物调节过程中起着十分重要的作用。c-Myb 作为一种重要的转录调控因子参与了造血系统发育和分化过程[1~4]。研究显示失活 c-myb 基因的纯合鼠有正常的卵黄囊造血,但却不能发育成胎儿肝脏的成年造血而导致胚胎在妊娠 15 d 死亡[5]。这是 c-Myb 参与造血的最有力证据,表明 c-Myb 表达水平与造血分化密切相关。然而,在纷繁复杂的造血系统分化过程中,c-Myb 怎样参与? c-Myb 对造血发育、造血分化、造血定型以及造血相关基因的表达等有何影响? 是目前国内外普遍关注的难点和热点问题。上述问题的阐明将有助于了解 c-Myb 在造血分化中的作用。

1 c-Myb 与造血发育

转录调节蛋白 c-Myb 是重要的转录调控因子。Myb 家族的 3 个成员 a-Myb、b-Myb 和 c-Myb 在脊椎动物中表达,并且与增生、凋亡及分化密切相关[6]。业已证明 c-Myb 蛋白在早期造血发育中是一个十分重要的转录调控因子[7~9]。c-Myb 在不成熟造血祖细胞中呈高表达[10],对于造血定型及造血各系的发育具有至关重要的作用[11]。c-Myb 调节造血系统中髓系细胞的生长和分化[1],对粒系的定型及早期粒系的形成、调节粒系定型相关基因的表达具有明显影响,关系到从多能造血干细胞到祖细胞,到前体细胞,到成熟粒系的整个成熟过程[12]。c-myb 作为定向造血的必须基因,在最终红系祖细胞早期发育前及发育中,在卵黄囊中呈低水平表达[13]。c-Myb 在造血多个阶段中均担负了重要角色,并且在 T 细胞发育的早期阶段也是必须的[14]。有研究表明在卵黄囊内皮细胞及原始造血 CD34 细胞中表达 c-Myb 不是必须的,但对造血定型 c-Myb 却是必须的[15]。c-Myb 在红细胞的发育过程中担负着重要的作用,表现为当红细胞的祖细胞分化为成熟红细胞时 c-Myb 表达下降[16]。有研究表明虽然胚胎肝脏造血是有缺陷的,但在 c-myb-/- 鼠,前体细胞分化进入巨噬细胞的能力是存在的[17]。发育过程及成年的不同组织中均有 c-Myb 的表达[18,19]。在转基因鼠 T 细胞的发育过程中显示了一种优势的 Myb 蛋白,其表达因增加了 T 细胞的凋亡而阻断了 T 细胞的分化[20]。在不成熟的造血祖细胞中,c-Myb 高表达,并且在主动脉旁胚脏层及在开始定向造血活性的卵黄囊中也有表达[13,21]。而 c-myb 基因纯合鼠虽有卵黄囊造血却无胎肝成年造血,提示 c-Myb 对造血调控起着关键性作用,据此也可以假设 c-Myb 缺乏并不影响胚胎早期造血,而在造血分化的成熟阶段,其作用却举足轻重,可能决定着造血系统的定性分化。然而事实是否如此,详细的分子机制如何,迄今尚不清楚,成为研究 c-Myb 参与造血调控的关键性问题。

2 c-myb 打靶胚胎干细胞及诱导分化模型的研究

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)细胞作为研究造血分化的理想模型为探讨单个转录因子在造血中的作用提供了理想的平台,而不同 c-Myb 表达水平 ES 细胞模型无疑对于阐明 c-Myb 参与造血调节的机制非常有效,基因打靶技术又为研究特定转录因子对造血定性的影响提供了一种十分有效的方法。有人通过体外分化纯合突变转录因子 ES 细胞成功地研究了敲除某些转录因子功能对造血的影响,即采用基因敲除的方法研究某个转录因子对胚胎干细胞造血分化的影响,探索其在造血定型中的作用及其机制。通过建立 c-myb 等位基因敲除 ES 细胞模型 c-myb-/-与 c-myb 野生型 ES 细胞进行体外诱导分化及分化相关基因转录水平变化的比较研究[2,4,17,22,23],对于阐明 c-Myb 在造血分化中的角色,乃至揭示整个造血系统中生长和分化的相关机制均具有十分重要的意义。

c-Myb 在各种不成熟造血细胞中高表达,并且在造血系统的发育中担负了重要的角色。通过对小鼠胚胎干细胞的 c-myb 基因打靶,证实 c-Myb 对于造血系统中多数髓系发育如 T 淋巴和 B 淋巴系的发育是必需的。c-myb 基因敲除,为研究 B 淋巴细胞中 c-myb 靶基因的鉴定和特征提供了有用的模型体系[2]。进一步研究体外分化 c-myb-/- ES 细胞,通过联合克隆形成分析和基因表达分析对定型和祖细胞形成的动力学进行研究,结果显示 CD34 阳性的成年多系祖细胞被阻断在早期阶段并且不能增生及形成克隆。相反地,胚胎造血的非系前体细胞定型和分化被抑制在巨噬细胞和红系之间。早期巨噬细胞分化和巨噬前体细胞的克隆形成能力在缺乏 c-Myb 的情况下并不发生改变[17]。Sumner 等[22]通过对小鼠胚胎的 c-myb 基因打靶,分析 c-myb-/-嵌合体显示在成年造血组织中,没有发现成熟的淋巴及髓系细胞。在 c-myb-/-胚胎肝脏中不能形成巨核细胞克隆形成单位(colony-forming unit, CFUs),表明 c-Myb 缺乏将影响巨核细胞的形成。Lin 等[23]分析了 c-myb 对不同干细胞基因打靶的研究,对 c-Myb 功能进行了较为全面的分析,确定了 c-Myb 在造血形成中的重要作用。为了探索 c-Myb 对胚胎造血发育过程的作用和影响环节,建立理想的研究模型十分重要。目前有几种

作者简介:陈洁平(1962-),女,贵州省贵阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤基因治疗及干细胞诱导分化方面的研究,发表论文 40 篇。电话:(023)68765196

收稿日期:2005-01-11;修回日期:2005-04-22

诱导 ES 细胞的造血分化策略，其中，使用最广泛的是去除白血病抑制因子(LIF)的半固体介质胚胎体(embryoid bodies, EBs)形成实验[22,25,26]。利用这一系统可以较全面地研究转录因子 c-Myb 在造血定型及分化中的详细作用。有学者使用该体系建立的鼠 ES 细胞体外诱导分化系统分析巨噬细胞的分化，结果显示在去除 LIF 并保持 ES 细胞的非分化状态，同时加入特殊的造血生长因子，来自 EBs 的 ES 成功产生出含有成熟造血细胞的血岛。比较 c-myb-/-和 c-myb+/+ ES 细胞分化能力，证实在 EBs 中血岛形成的频率没有改变，成熟的吞噬细胞形成由于表达表面抗原 CD11 或 F4/80 而不能与野生型的巨噬细胞区别[17]。利用野生型或 c-myb 敲除鼠 ES 细胞体外分化系统可以方便地分析 c-Myb 在调节 ES 细胞分化中的作用与时间进程，并进一步阐明 c-Myb 的翻译效果[17]。可见，利用这一分化体系对于阐明 c-Myb 的作用机制十分有帮助。

3　c-Myb 与胚胎干细胞造血定型和分化

通过基因打靶技术，对 ES 细胞纯合 c-myb-/-及野生 c-myb +/+ 的研究显示，卵黄囊造血显然不受 c-Myb 缺乏的影响，因为原始的有核红细胞依旧存在，而且在体外分化 c-myb-/- ES 细胞中也能产生。除原始红细胞外，在 c-myb-/-胚胎肝脏中出现仅有的成熟细胞是巨核细胞和巨噬细胞[22]。有证据说明造血失败与 c-myb-/-胚胎在大动脉-性腺-中肾(AGM)区域干细胞特征缺乏有关[24]。然而 c-myb-/-胚胎的肝脏检查及 c-myb-/-ES 细胞体外分化的研究显示，在 c-Myb 缺乏情况下可以产生具祖细胞基因型的细胞。在来自 c-myb-/-胎肝和 c-myb-/-ES 起源的细胞中发现，其共表达祖细胞抗原 CD34 和总的造血标志物 CD45。体外克隆形成试验显示这些细胞不具备祖细胞的功能活性[22]。Sumner 等[22]的研究显示尽管 c-myb-/-产生的造血细胞是非常有限的，但 c-myb-/-ES 细胞产生的野生型胚囊最终成为广义的非造血组织嵌合动物的一部分。自此以后的研究没有表明 c-myb-/-对成年造血的作用，但是通过检查妊娠 11～12 d 嵌合体的胎肝显示存在 c-myb-/-祖细胞样细胞，这些细胞不能扩增或失去终末分化。一项嵌合体动物的相关研究结果也支持在成年鼠的造血系统中发现了一些 c-myb-/-的造血祖细胞。Allen 等[14]在 c-myb-/-ES 细胞和 rag-/-宿主胚泡之间的嵌合体成年胸腺中鉴定出少量非常不成熟的 c-myb-/-胸腺细胞。在一种高度选择性的环境获得的结果有可能解释 c-myb-/-在造血细胞中的作用。这些研究显示成年淋巴及髓系的造血定型受到不同程度的影响[14,22]。Sumner 等[22]在这方面的研究结果提示它们对定向造血有作用，尽管这些细胞是起源于 AGM(aorta-gonad-mesonephros，胚胎-性腺-中肾)的造血干细胞的子孙或来自于以后的造血相关遗传因子内皮尚不清楚。Karafiat 等[4]研究发现 Myb 的亮氨酸拉链区域是一个具有功能的分子开关，它可以影响系特异转录因子的表达，直接影响造血祖细胞向髓系和红系的发育。

4　c-myb 与造血相关基因

较早研究 c-myb 在造血定型和分化中的作用是采用 c-myb 及突变的 c-myb 分别转染 ES 细胞，然后在分化过程中分析多个造血系的分子标志物的表达及克隆形成。表明 c-myb 通过激活某些基因如 c-kit 和 flt-3 而调节造血定型及祖细胞的增生和分化[27]。有研究表明在 c-myb 缺失的纯合小鼠，肝脏红系相关 GATA-1，NF-E2，SCL 和 EpoR 的表达明显少于正常小鼠，而 Kit 配体的表达则高于正常小鼠。说明 c-myb 直接或间接地参与了这些基因的调 11 节[23]。Mukouyama 等[24]研究了 c-myb+/+ 和 c-myb-/-小鼠胚囊中 P-Sp(splanchnopleural 胚囊壁)及 AGM 区域分离细胞，发现 c-myb-/-组造血祖细胞标志 c-Kit 不表达，而表达髓系相关标志 Mac-1，Gr-1，淋巴系相关标志 CD19，B220，Thy-1.2 及红系相关标志 Ter119。表明 c-myb 在 P-Sp 和 AGM 区域造血细胞生成中发挥了作用。原始的红系细胞能表达胚胎的 Zeta-globin 和成年的 β-globin 球蛋白[28]。而有研究则显示红系相关标志 β-globin 和 Zeta-globin 的表达在 c-myb-/-及 c-myb +/+ 组之间无明显差别[17]。在 c-myb-/- 胚胎体中相应的 CD34，c-Mpl 和 c-Kit 表达是通过转录因子 SCL，Lmo2 和 GATA-2 的水平来反映的，并且与造血祖细胞的基因型相联系[29～32]。

综上所述，目前的研究阐明了 c-Myb 在造血发育、造血分化及定型中的部分作用，以及对造血相关基因的调控等方面的一些问题。但对 c-Myb 在造血系统定型及分化过程中，其表达以及不同表达水平对造血各系的影响，以及 c-Myb 对那些造血相关基因进行调控和调控环节等，尚有待进一步的研究。

关键词：c-Myb；胚胎干细胞；造血调控；转录因子

中图法分类号：R394.2　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells[J]. Int Rev Immunol, 2001, 20(1): 83－105.

[2] Lieu Y K, Kumar A, Pajerowski A G, *et al*. Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(41): 14853－1488.

[3] Bjerrgaard M D, Jurlander J, Klausen P, *et al*. The *in vivo* profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow[J]. Blood, 2003, 101(11): 4322－4332.

[4] Karafiat V, Dvorakova M, Pajer P, *et al*. The leucine zipper region of Myb oncoprotein regulates the commitment of hematopoietic progenitors[J]. Blood, 2001, 98(13): 3668－3676.

[5] Mucenski M L, McLain K, Kier A B, *et al*. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis[J]. Cell, 1991, 65(4): 677－689.

[6] Ness S A. The Myb oncoprotein: regulating a regulator[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1288(3): F123－F139.

[7] Ezoe S, Matsumura I, Satoh Y, *et al*. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Cell Cycle, 2004, 3(3): 314－318.

[8] White J R, Weston K. Myb is required for self-renewal in a model system of early hematopoiesis[J]. Oncogene, 2000, 19(9): 1196－1205.

[9] Kumar A, Lee C M, Reddy E P. c-Myc is essential but not sufficient for c-Myb-mediated block of granulocytic differentiation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11480－11488.

[10] Kastan M B, Strauss L C, Civin C I. The role of hematopoietic growth factors and oncogenes in leukemogenesis[J]. Am J Pediatr Hematol On-

col, 1989, 11(3): 249 - 267.

[11] Smith E, Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(6): 973 - 981.

[12] Ward A C, Loeb D M, SoedeBobok A A, *et al*. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals[J]. Leukemia, 2000, 14(6): 973 - 990.

[13] Palis J, Robertson S, Kennedy M, *et al*. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse[J]. Development, 1999, 126(22): 5073 - 5084.

[14] Allen R D 3rd, Bender T P, Siu G. c-Myb is essential for early T cell development[J]. Genes Dev, 1999, 13(9): 1073 - 1078.

[15] Krause D S, Mucenski M L, Lawler A M, *et al*. CD34 expression by embryonic hematopoietic and endothelial cells does not require c-Myb[J]. Exp Hematol, 1998, 26(11): 1086 - 1092.

[16] Bartunek P, Kralova J, Blendinger G, *et al*. GATA-1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myb promoter[J]. Oncogene, 2003, 22(13): 1927 - 1935.

[17] 陈洁平, Clarke D, Bonifer C. c-myb对胚胎干细胞的体外造血分化及定型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 485 - 489.

[18] Sitzmann J, NobenTrauth K, Klempnauer K H. Expression of mouse c-myb during embryonic development[J]. Oncogene, 1995, 11(11), 2273 - 2279.

[19] Ess K C, Witte D P, Bascomb C P, *et al*. Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation[J]. Oncogene, 1999, 18(4), 1103-1111.

[20] Badiani P, Corbella P, Kioussis D, *et al*. Dominant interfering alleles define a role for c-myb in T-cell development[J]. Genes Dev, 1994, 8(7): 770 - 782.

[21] Labastie M C, Cortes F, Romeo P H, *et al*. Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo[J]. Blood, 1998, 92(10): 3624 - 3635.

[22] Sumner R, Crawford A, Mucensk M, *et al*. Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor[J]. Oncogene, 2000, 19(30): 3335 - 3342.

[23] Lin H H, Sternfeld D C, Shinpock S G, *et al*. Functional analysis of the c-myb proto-oncogene[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1996, 211: 79 - 87.

[24] Mukouyama Y, Chiba N, Mucenski M L, *et al*. Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb[J]. Curr Biol, 1999, 9(15): 833 - 836.

[25] Wiles M V, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture[J]. Development, 1991, 111(2): 259 - 267.

[26] Faust N, Bonifer C, Wiles M V, *et al*. An *in vitro* differentiation system for the examination of transgene activation in mouse macrophages[J]. DNA Cell Biol, 1994, 13(9): 901 - 907.

[27] Melotti P, Calabretta B. Induction of hematopoietic commitment and erythromyeloid differentiation in embryonal stem cells constitutively expressing c-myb[J]. Blood, 1996, 87(6): 2221 - 2234.

[28] Trimborn T, Gribnau J, Grosveld F, *et al*. Mechanisms of developmental control of transcription in the murine alpha- and beta-globin loci[J]. Genes Dev, 1999, 13(1): 112 - 124.

[29] Shivdasani R A, Mayer E L, Orkin S H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL[J]. Nature, 1995, 373(6513): 432 - 434.

[30] Elefanty A G, Robb L, Birner R, *et al*. Hematopoietic-specific genes are not induced during *in vitro* differentiation of scl-null embryonic stem cells[J]. Blood, 1997, 90(4): 1435 - 1447.

[31] Yamada Y, Warren A J, Dobson C, *et al*. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3890 - 3895.

[32] Tsai F Y, Orkin S H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation[J]. Blood, 1997, 89(10): 3636 - 3643.

(编辑 薛国文)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文"υ"，不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r"，不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"－"或"＋"表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等，不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角，例如：$^{99}Tc^m$、$^{113}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{113m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

本刊编辑部