维普资讯 http://www.cqvip.com

血小板生成素、分子结构、基因结构

第23卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.2
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

196—199

血小板生成素的研究进展

R573.201

34

病理生理教学研究室 蓝 轲* 综述 范维珂 审校

中图分类号 R331.143

血小板的发生需经历多能干细胞 (multipotential stem cell)、定血干细胞(committed stem cell)、原巨核细胞 (megakaryoblast)、幼巨核细胞 (promegakarycyte) 及成熟巨核细胞 (megakaryocyte)几个阶段，最终由成熟巨核细胞发生胞质的脱落而形成血小板。在这一复杂过程中，一种新近获得的细胞因子——血小板生成素 (thrombopoietin，TPO)起着主要的调控作用。本文将综述近年来有关血小板生成素的发现，分子生物学，来源及生物学功能等方面的研究概况。

1 血小板生成素的发现

血小板生成素是1958年Kelemen提出的一个概念[1]。早在60、70年代，研究者就发现血小板减少症患者骨髓内巨核细胞的数量、大小及成熟率等均发生明显的增加，而血小板增多症患者则出现相反的现象[2,3]。用血小板减少动物的血清注射正常动物，可致受者血小板生成增加，说明血小板减少动物的血清中含有某种或某些物质可以促进血小板的生成[4,5]。但由于方法学等原因，一直未能纯化到足量的该物质供测序及克隆，因此对其研究也未有突破。直至1986年，Wendling等观察到给受体小鼠转入一种髓样增生性白血病病毒(myeloproliferative leukemia virus)基因可引起小鼠骨髓的增生反应[6]。1990年Souyri等分离鉴定了这种基因，即v－mpl，一种病毒原癌基因[7]。相应的c－mpl于1992年被Vigon所克隆[8]。Methia等发现，Mpl选择性地表达在巨核系细胞膜上，且c－mpl反义寡核苷酸可特异性地阻止巨核细胞集落的形成[9]。经DNA序列分析发现，c－mpl属于造血因子受体超家族的一员。因此人们推测c－mpl的配体可能与巨核细胞的增殖分化有关。通过Mpl亲和层析等方法，终于纯化了各种种属Mpl的配体(ligand)并对其进行了广泛的研究。诸多研究表明，Mpl的配体是一种新的细胞因子，具有促进巨核细胞增殖，成熟产生血小板的作用，且这种作用具有细胞系特异性。这就是寻找多年的细胞因子血小板生成素(TPO)，也称为巨核细胞生长发育因子(megakaryocyte growth and development factor，MGDF)，或c－Mpl配体(ML)[10-14]。

2 血小板生成素的分子结构

血小板生成素是一种糖蛋白，具有两个结构区域，即N端区和C端区。通过人，鼠，猪和狗等种属TPO的cDNA推导出的氨基酸序列，其分子量均在35KD以上，糖基化后则可达60KD以上。人、狗、小鼠及猪的成熟TPO分别含332、331、335及332个氨基酸残基。各种属TPO在153和154位有一个保守的精氨酸—精氨酸(Arg－Arg)切割点，将TPO分为N端区和C端区。氨基酸序列分析发现，各种属TPON区具有高度的同源性，但C区同源性则较低[11,12]。Austin等比较了人，小鼠及猪的TPO氨基酸序列，发现具有68－73％的一致性。N端区则具有81－85％的一致性[15]。TPO N区与红细胞生成素(erythropoietin，Epo)相比较则有25％的一致性。因此TPO N区又被称为Epo样结构[16]。TPO N区和Epo均具有四个半胱氨酸残基，其中三个是保守的，定点诱变试验表明，1，4半胱氨酸形成的二硫建对Epo的功能非常重要，因此推

* 男，1971－12出生，研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

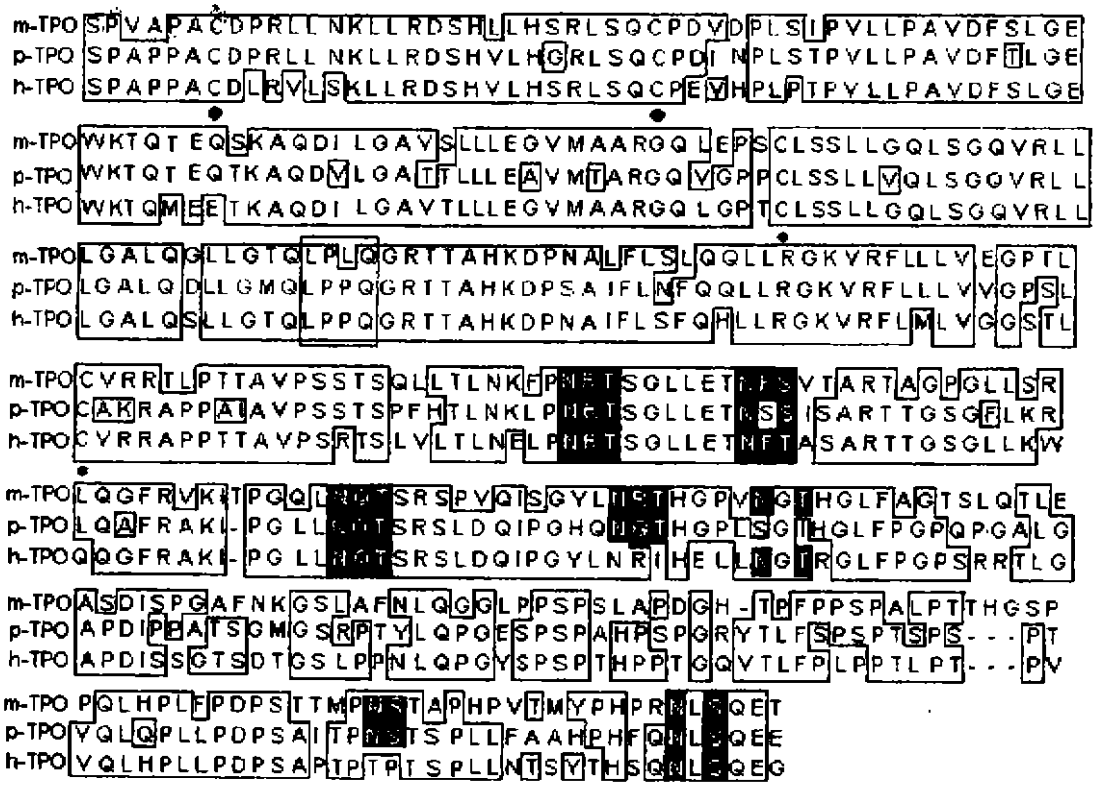


图1 小鼠.猪及人TPO(m－TPO.p－TPO,h－TPO)的氨基酸序列比较.线框内各种属相同的氨基酸序列。"."为半胱氨酸残基;阴影为N－糖基化位点;112－115氨基酸切除后可产TPO变异体。

测TPO的1,4半胱氨酸可能也形成这种关键性的二硫键[11]。人,鼠及猪等种属TPO C区分别具有6,7,6个N－糖基化位点,其中四个位点是保守的。C区富含苏氨酸,丝氨酸及脯氨酸残基,与已知的氨基酸序列无同源性[11]。有资料表明,TPO N区与全长TPO 具有同等的生物学功能。因此推测TPO经蛋白质水解过程得到的N区才是最终成熟的蛋白质。C区的存在有助于提高TPO在血中的半衰期[16]。但C区的功能还值得进一步研究。此外,还发现了一些TPO的变异体,即发生在N区保守位置的数个氨基酸的切除与插入,变异体可能与TPO的表达调控有关。也有报导表明变异体与表达调控无关[16,17]。

3 血小板生成素的基因结构入表达的调控

Southern印迹试验表明,TPO基因在基因组中是一个单拷贝基因。原位杂交分析发现人TPO基因定位于染色体(3q$^{26-27}$,也有报道位于3q$^{27-28}$。)人TPO基因全长约7kb,包含6个外显子和5个内含子。外显子1和外显子2包含5′非翻译序列及编码TPO信号肽起始4个氨基酸的序列。剩余的信号肽序列及成熟TPO的起始26个氨基酸的编码序列位于第3外显子内。第4、5外显子也参与N区编码。完整的C区及3′非翻译序列以及大约剩余的N区50个氨基酸由外显子6编码。从获得的各种属TPO基因序列分析发现,各种属间TPO基因具有较高的同源性。此外,有资料表明,人TPO基因编码区外显子和内含子与Epo的排列完全一致,且TPO N区与Epo具有25%的一致性,说明二者有可能来自同一先祖基因。但是Epo只有一个结构区域,且其基因位于第7号染色体上,因此二者的关系还有待进一步探讨[15,16]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

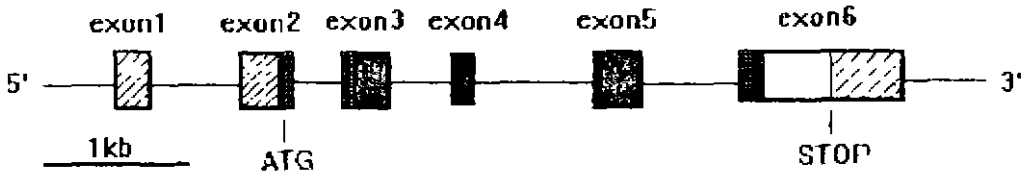


图2 人TPO基因结构

TPO表达的调节是近年来研究的热点。研究者发现TPO在血中的水平与血小板的数量呈负相关。在细胞因子家族中，与TPO最具同源性的Epo的表达是通过转录水平调节的，因此推测TPO的表达也是通过类似机制调节。即当血小板数量减少时，通过TPO mRNA转录水平的提高，使TPO表达增多，从而促进巨核细胞增殖成熟产生血小板使其恢复正常。也有研究者提出了相反看法。Stoffel等观察到，在血小板减少的动物，基血清TPO水平虽然增高，但TPO mRNA在肝脏及肾脏中(肝肾为主要产生TPO的器官)并不增加，同时观察到血小板可通过其膜上Mpl受体摄取TPO，通过代谢机制，使TPO活性消除。因此提出血小板直接参与TPO表达的调节。Karine等也观察到无论在血小板生成减少还是增多的动物，其TPO mRAN均无变化[18]。由于TPO变异体的存在，且变异体在种属间为保守性的，故有人推测TPO变异体mRNA可能参与TPO 表达的调节。但Stoffel和Karine等均发现变异体mRNA水平在血小板减少或增多的动物均无变化。此外，有报道血小板通过表达高亲和力的Mpl受体以结合内化TPO从而降低TPO的水平。Karine等也提出巨核细胞可通过其表达的Mpl受体使TPO清除。有人观察到TPO可被可溶性的Mpl受体胞外区捕获，参与TPO表达的调节。综上所述，TPO表达的调节可能不是通过转录水平调节，而是翻译水平或转录后水平的调节[17,18]。随着资料的积累，TPO表达的调节机制会进一步明确。

4 血小板生成素的来源

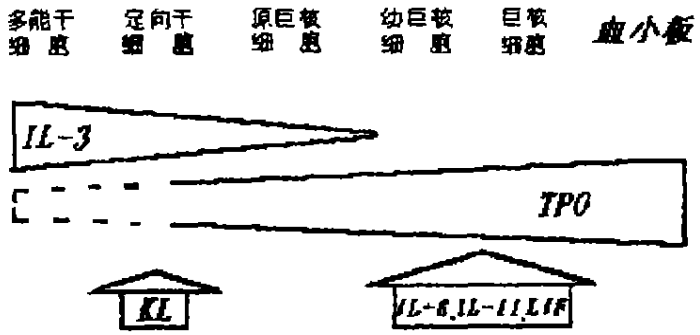
运用全长cDNA探针作多组织的Northern印迹试验发现，血小板生成素mRNA存在于胎肝，成人肝脏及肾脏中，而胰腺，肌肉，脑组织，心脏，肺及胎盘等未发现TPO mRNA[11,12]。新近有报导骨髓基质细胞也能表达血小板生成素[19]。所以就目前而言，TPO主要来源于胎肝，成人肝脏，肾脏及骨髓基质细胞。

5 血小板生成素的生物学功能

Bartley等用再生障碍狗的血浆(APK9)培育CD_{34}^{+}细胞增殖分化为巨核细胞，这种效应可被Mpl受体胞外区(Mpl－X)阻断。此实验无法被IL－3，IL－6，GM－CSF，LIF，SCF及Epo重复。然而通过Mpl亲和层析获得的TPO及重组TPO则可重复这个试验。说明TPO具有促进细胞分化生成巨核细胞的作用[10]。de Sauvage等用再生障碍猪的血浆(APP)同样可刺激巨核细胞的生成，这种效应也可被Mpl－IgG所取消；经Mpl亲和层析得到的TPO可使鼠的Ba/F3细胞(一种表达了c－mpl的因子依赖细胞)增殖[11]。Kaushansky等用BHK细胞表达的TPO注射小鼠，发现其血小板上升4倍以上；组织检查骨髓和脾脏发现巨核细胞增多，而且发现巨核系先祖细胞CFU－MK在骨髓和脾脏中升高约20倍以上。此外Kaushansky还观察到，用鼠TPO可诱导具有Mpl受体的人细胞系MOe和KU 812表达血小板膜分化抗原GPI-[12]。de Sauvage等也观察到全长TPO或N区均可刺激外周血祖细胞形成GPⅡb/GPⅢa。上述试验说明TPO具有促进细胞分化的能力，且无严格的种属特异性。

Angelika等报道了TPO对其他细胞系的作用。在骨髓抑制的小鼠，TPO可以加速除血小板外的红细胞及中性粒细胞的恢复。但在正常小鼠中，TPO仅仅增加血小板的数量而对红细胞及粒细胞无影响[20]。Kaushansky等也报道了TPO与IL－3，c－kit配体及Epo协同使红系，粒系及巨核系祖先

维普资讯 http://www.cqvip.com



图三 血小板生成的调节(仿Kaushansky,1995)

细胞数量增多的效应[21]，当然也有可能是TPO通过使巨核细胞增多，再由巨核细胞分泌诸如IL－3，GM－CSF，IL－6和IL－1等给胞因子，影响红系及粒系的变化[20]。

众所周知，血细胞的分化成熟是一个多细胞水平的调节过程。Kaushansky等观察到，在血小板形成的极早期阶段，特别是多能干细胞向定向干细胞分化阶段，IL－3可能起着更大的作用。另外在血小板形成的后期阶段，其他细胞因子也参与了调节。但在血小板形成的过程中，如果缺乏TPO的参与，其他已知的细胞因子无法完成这一过程，其他因子只是起辅助的，协同的作用。另外在正常动物，TPO对其他细胞系作用甚小。因此，TPO具有促进巨核细胞增殖，成熟产生血小板的功能，这种功能具有相对的细胞系特异性，它是血小板生成的主要调节因子[21]。此外，血小板生成素的其他功能及作用机制，也值得进一步探讨。

6 结束语

综上所述，血小板生成素是一种由肝，肾及骨髓基质细胞分泌的一种新近才肯定的细胞因子，是一种糖蛋白，分子量在70KD左右[21]。其基因定位于$3q^{26-27}$，也有报道为$3q^{26-27}$。目前研究表明TPO具有促进巨核细胞增殖，成熟产生血小板的功能，它是血小板生成的主要调节因子。在TPO的其他生物学功能方面，其基因的调控，TPO与Mpl相互作用及信息传导，TPO的临床应用方面尚需作出进一步的探索。

参 考 文 献

1.Kelemen E. et al.Acta Haematol 1958;20:350
2.Ebbe S.et al.Blood 1968;32:34
3.Odell.et al.Acta haematol 1967;38:34
4.de Gabriele G.et al.Br J Haematol 1967;13:210
5.Corash L.et al.Blood 1987;70:117
6.Wendling.et al.Virology 1986;149:242
7.Souyri.et al.Cell 1990;63:1137
8.Vigon.et al.Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5640
9.Methia.et al.Blood 1993;82:1395
10.Bartley.et al.Nature 1994;77:1117
11.de Sauvage.et al.Nature 1994;369:533
12.Si Lok.et al.Nature 1994;369:565
13.Kaushansky.et al.Nature 1994;369:568
14.Wendling.et al.Nature 1994;369:571
15.Austin.et al.Blood 1995;85(4):981
16.Foster.et al.Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:13023
18.Karine.et al.Blood 1996;87(7)2578
19.Nagahisa.et al.Bloob 1996;87(4):;1309
20.Angelika.et al.Exp hematol 1996;24:1238
21.Kaushansky.et al.Blood 1995;86(2):419

(收稿日期 1997－04－28)