

· 专论与综述 ·

生物节律影响巨核细胞发育和血小板产生的研究进展*

赵 越 张建法[△]

(南京理工大学分子代谢中心 江苏 南京 210094)

摘要 自然界中生物体的生命活动、生活习性都存在着一定的周期性变化。生物昼夜节律的产生是以内源性的生物钟系统为基础的。生物钟不仅易受到外界环境的影响,而且可以通过调控一系列特定的下游基因的表达,影响生物体的生理生化过程。巨核细胞是生成血小板的前体细胞,经过分化、增殖、成熟和裂解,最终生成血小板。血小板是一种没有细胞核的特殊细胞,在生理性止血和器官修复上发挥着重要作用,同时参与血栓等多种疾病的发生。近几年借助现代分子生物学和细胞生物学手段,证实了哺乳动物的巨核细胞和血小板的生成呈现明显的周期性的变化,利用生物钟基因缺失模型进一步发现了生物钟基因对巨核细胞和血小板的影响。本文概述了生物节律对巨核细胞和血小板的影响,为进一步研究巨核细胞的发育和血小板生成机制提供了参考。

关键词 生物节律 巨核细胞 血小板;

中图分类号 R331.143 **文献标识号** A **文章编号** :1673-6273(2011)20-3958-03

Effects of Biological Rhythm on Megakaryocyte Development and Platelet Formation*

ZHAO Yue, ZHANG Jian-fa[△]

(Center for Molecular Metabolism, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing, 210094, China)

ABSTRACT: The activity and habit of organisms in nature exhibit circadian rhythms. The circadian rhythms in physiology and behavior are controlled by internal circadian clock. The circadian clock is composed of several genes by transcription/translation-based feedback loop. The circadian clock is not only affected by external environment, but also can regulate several downstream genes expression, thus affecting the organism's physiological and biochemical processes. Megakaryocytes are precursor cells of platelet, which generate platelets after differentiation, proliferation, maturation and fragmentation. Platelets are anucleate cells which play essential roles in hemostasis and organ repair, participate in thrombosis and various diseases. In recent years, megakaryocytes and platelet formation show significant circadian changes, and clock gene can affect megakaryocytes and platelet formation using gene knock-out animal models. This article reviews the recent progress in the influence of circadian clock on megakaryocytes and platelet, and provides evidences to further understand the megakaryocyte development and the mechanism of platelet formation.

Key words: Circadian clock; Megakaryocyte; Platelet

Chinese Library Classification: R331.143 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3958-03

前言

生物节律是指地球上的生物在漫长的进化过程中,在体内形成的一种近似于钟摆的机制,它能够随着时间的变化,调节自身的生理活动,控制各种生命活动在一定的时期开始、进行和结束。其中对哺乳动物影响最大的昼夜节律是目前开展研究最多的。自然界中,低等生物与高等生物的生物节律的产生机制类似,均为生物节律基因转录和翻译后调控所形成的分子振荡,通过不同的输入和输出途径所构成。目前的研究表明生物钟与巨核细胞、血小板有着密切的联系。不仅血小板数目和功能存在着昼夜差异,生物钟基因的缺失会导致巨核细胞发育异常和血小板数目的相应变化,改变机体的凝血能力。本文综述

了生物钟对巨核细胞和血小板的影响,为进一步研究巨核细胞的发育和血小板产生的机制提供了重要的线索。

1 巨核细胞的发育和血小板的产生

巨核细胞是血小板产生的前体细胞,经过一系列复杂的发育过程,最终产生血小板。血小板作为一种独立的血液成分,是一种没有细胞核的颗粒。它是由成熟的巨核细胞胞浆裂解脱落而形成的具有活性胞质小块,具有粘附、聚集和释放的功能,在许多重大疾病的发展变化中起重要的作用。

造血干细胞首先分化成早期巨核祖细胞,即 BFU-MK,进一步分化成为较晚期的巨核系祖细胞(CFU-MK),然后再分化成为形态上可以识别的巨核细胞。巨核细胞的成熟过程十分复

* 基金项目 国家自然科学基金重大项目 (30730030)

作者简介 赵越 (1984),男,博士研究生,主要研究方向 生物钟的调控与生物学功能。E-mail:zhaoyue611@gmail.com

[△]通讯作者 张建法,电话 025-84318533, E-mail: jfzhang@mail.njust.edu.cn

(收稿日期 2011-02-26 接受日期 2011-03-20)

杂,伴随着一系列的变化。其在成熟过程中,增殖能力逐渐丧失,有丝分裂活跃,出现了多倍体化现象,多倍体化使巨核细胞的体积不断增大。此外还可观察到着细胞膜折入细胞内、网状的边界膜系统形成并将胞质划分成不同的区域,大量颗粒出现。 $CD34^{+}$ 的表达逐渐减弱,而膜表面的 $CD41^{+}$ 、 $CD61^{+}$ 和 $CD42^{+}$ 表达增强。当巨核细胞成熟后,巨核细胞胞质的伪足延长拉伸,伸向窦腔内,产生血小板前体,血小板前体经过伸长、弯曲分支扩大、细胞器转运入血小板前体中,中心小体分解、微管移位到胞膜,血小板前体进入骨髓血管窦状隙,再分裂成为血小板^[1]。

巨核细胞发育成熟,进一步产生血小板时受到一系列基因的调控。目前的研究表明这个过程最主要受到血小板生成素TPO 以及其受体 C-mpl 的影响;内源性的 TPO 主要由肝脏和肾脏产生,少量可产生于脾脏和骨髓细胞^[2]。TPO 或 C-mpl 基因敲除小鼠外周血中血小板数目下降,骨髓巨核细胞明显减少。使用 TPO 后外周血中血小板数目的成倍增长,充分说明了 TPO 及其受体 C-mpl 在血小板生成中的起到的主导作用,体外实验也证明了 TPO / C-mpl 在巨核细胞发育和血小板前体形成中的重要作用。另外一个重要的转录因子 GATA-1 在巨核细胞发育中发挥着重要的作用,GATA-1 控制调节巨核细胞胞浆成熟、分化及血小板界膜生成的一些基因的表达。进一步研究表明 GATA-1 两个锌指蛋白有着各自的作用,C 端只具有与 DNA 的结合的能力,却没有调控下游基因的作用,推测可能有另外的因素在共同起着作用。一系列的实验证据表明 FOG 与 GATA-1 起着协同作用,锌指结构蛋白识别序列组成了 GATA-1、FOG 交互作用的结构基础,这是血小板生成的基础。利用基因敲除技术,发现 FOG 缺失小鼠巨核细胞发育缺陷,进一步印证了 FOG 在巨核系统中的重要作用。GATA-1 和 NF-E2 一起,组成了产生血小板的核心结合因子。NF-E2 被认为在巨核细胞向血小板分化过程中起主要作用。NF-E2 基因敲除小鼠呈现出完全的血小板缺失,巨核细胞数目增多体积增大,同时巨核细胞成熟缺陷^[8]。

血小板的产生与巨核细胞的凋亡有着密切的关系。血小板从巨核细胞产生显示了一些凋亡的特征,暗示着凋亡与血小板的产生有着密切的联系^[3]。巨核细胞的凋亡伴随着血小板的产生,这一过程需要巨核细胞内 Caspase 系统的激活^[4]。成熟巨核细胞中发现 Caspase-3 和 Caspase-9 被激活,抑制了这些 Caspase 的活性也就抑制了血小板前体的产生^[5]。肿瘤抑制蛋白 P53 与凋亡密切相关,在巨核系细胞中用 siRNA 减少 P53 的水平发现,干扰后巨核细胞的 DNA 含量增加,巨核细胞的凋亡减弱,血小板前体产生减少^[6]。另外,抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 表达的变化也会影响到巨核细胞的发育和血小板的生成,当过表达 Bcl-xL 基因后,小鼠的巨核细胞数目和 DNA 含量没有明显变化,但其分界膜系统发育异常,引起血小板前体产生减少^[7]。对过表达 Bcl-2 的转基因小鼠研究后发现,外周血中的血小板减少了一半^[8]。这一系列证据证明凋亡在巨核细胞发育和血小板的产生中起着重要作用,调控巨核细胞的凋亡能够影响巨核细胞的发育和外周血小板的数目。

2 昼夜节律对巨核细胞发育和血小板产生的影响

昼夜节律是生物体固有的内在的特性,体内的许多细胞都呈现出昼夜变化,预示着昼夜节律对巨核细胞存在着重要的作用。Behnke 等^[9]在研究巨核细胞的形成过程时,发现人体中巨核细胞的形成和血小板前体形成一般发生在黎明后几小时内,并且具有明显的昼夜节律变化,暗示着巨核细胞发育及血小板前体的形成受到昼夜节律性的调控。进一步的研究表明^[10],人体血液中的纤维蛋白原含量、白细胞介素-6 以及血小板数目有着明显的节律性变化,具体实验结果显示纤维蛋白原在血清中的最高值出现在上午 9 点,白细胞介素-6 的峰值出现在凌晨 2 点钟左右,而血小板的峰值出现在下午 5 点左右。前人对巨核细胞和血小板的节律性变化的原因有过很多的假设,白细胞介素-6 可以促进巨核细胞产生血小板,说明血小板的节律性变化与血液中白细胞介素的含量有着密切的关系。褪黑激素使一类由松果体产生的胺类激素可以促进巨核细胞产生血小板前体的生成和降低血小板的聚集,延长血小板的寿命,同时其分泌又具有很强的昼夜节律性,基于上述原因 Di Bella 等^[11]推测褪黑激素是血小板数目昼夜周期变化的因素之一。

随着生物钟基因的发现和对生物钟基因的进一步认识,人们逐渐认识到生物钟基因可能在巨核细胞发育和血小板的产生中起着重要的作用。Hartley 等^[12]首次证实了在巨核细胞中存在着生物钟节律基因的表达,其证实了在骨髓来源的巨核细胞中生物钟基因 Per2 和 Bmal1 mRNA 和蛋白的存在,并且在转录水平上有着明显的节律性。同时发现限制饮食可以改变巨核细胞中生物钟基因转录节律,Per2 基因的转录节律性发生了明显变化,表达的绝对量明显减少。Bmal1 的转录节律也发生了明显偏移,但是表达的绝对量没有明显变化。对巨核细胞 DNA 含量研究后发现,巨核细胞中的 DNA 含量具有明显的昼夜节律性。限制饮食对巨核细胞 DNA 含量的节律性有着明显影响,其节律曲线呈现双峰型,改变了节律的低点和高点出现的时间,增加了 DNA 含量的绝对量。不同 DNA 含量的巨核细胞的数目也存在着昼夜节律。限制饮食影响了巨核细胞的细胞周期,增加了细胞内的有丝分裂。上述结果说明在巨核细胞内存在着生物钟系统,同时说明饮食的改变可以改变巨核细胞中生物钟基因的转录、DNA 含量和细胞周期的节律和水平。Hartley 等^[13]对外周血研究发现,血小板的数目在小鼠体内也是呈现节律性变化的,限制小鼠的饮食对血小板的数目和节律影响不大。网织血小板的绝对值和相对值都呈现指出明显的节律性。血小板生成素 TPO 在血液中也呈现出明显的节律性变化。巨核细胞的体积也呈现出明显的节律性。他同时研究了在巨核细胞中发挥重要作用的基因的转录,发现限制饮食能够影响相关基因的转录节律。上述研究说明生物节律能够调控巨核细胞发育及血小板的生成,为人们进一步了解巨核细胞发育和血小板的产生提供了依据。

3 生物钟基因缺失影响巨核细胞发育和血小板的产生

为了进一步研究生物钟对巨核细胞和血小板的影响,生物钟基因敲除小鼠被引入研究当中。Ohkura 等^[14]首次利用 Clock 基因突变小鼠研究生物钟对血小板的影响,其发现 Clock 突变小鼠的尾部流血延长,血小板数目有着明显的减少。同时发现

在 Clock 基因突变小鼠中血小板功能的节律性发生了变化。首次证实生物钟基因可以影响血小板的产生。为了进一步阐明生物钟与巨核细胞、血小板的关系,赵越等^[13]利用 Per2 基因缺失小鼠研究其对巨核细胞发育和血小板产生的影响。与 Clock 基因突变小鼠的结果一致,Per2 基因缺失后,小鼠的尾部流血时间延长,同时血小板数目减少了。通过研究其巨核细胞发现,当 Per2 基因缺失后,巨核细胞的数目并没有明显变化,DNA 含量明显增加,分解膜系统发育异常,同时巨核细胞凋亡减弱。赵越等认为生物钟基因 Per2 缺失后引起血小板减少,并不是通过减少巨核细胞的数目,而是通过减弱 P53 的表达,增强了抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达,使巨核细胞的凋亡减弱,从而导致血小板减少。

4 结语与展望

随着现代生物技术的发展,人们对生物钟作用机制、巨核细胞发育和血小板产生机制已经取得了一定的认识,并对三者的关系做了初步的研究。生物钟基因的缺失引起机体一系列生理变化,包括巨核发育异常和血小板数目的变化。于此同时,生物钟基因对血小板生成的影响机制及其复杂,至今仍不太清楚。例如生物钟基因如何影响巨核细胞边界膜系统发育、如何影响巨核细胞中颗粒的合成等等。因此它们之间的关系还需要进一步的研究。本文初步概括了生物钟对巨核细胞发育和血小板产生的影响,为进一步认识巨核细胞的发育和血小板的产生机制提供了参考。

参考文献 (References)

- [1] Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets [J]. J Clin Invest, 2005, 115 (12): 3348-3354
- [2] Ishida A, Handa M. Thrombopoietin (TPO) [J]. Nippon Rinsho, 2005, 63(8):618-620
- [3] White MJ, Kile BT. Apoptotic processes in megakaryocytes and platelets [J]. Semin Hematol, 2010, 47(3):227-234
- [4] Clarke MC, Savill J, Jones DB, et al. Compartmentalized megakary-

ocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death [J]. J Cell Biol, 2003, 160:577-587

- [5] De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes [J]. Blood, 2002, 100: 1310-1313
- [6] Fuhrken PG, Apostolidis PA, Lindsey S, et al. Tumor suppressor protein P53 regulates megakaryocytic polyploidization and apoptosis [J]. J Biol Chem, 2008, 283:15589-15600
- [7] Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, et al. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation [J]. Blood, 2002, 100 (5):1670-1678
- [8] Ogilvy S, Metcalf D, Print CG, et al. Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival [J]. PNAS, 1999, 96:14943-149 48
- [9] Behnke O, Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream [J]. Eur J Haematol Suppl, 1998, 61:3-23
- [10] Kanabrocki EL, Sothorn RB, Messmore HL, et al. Circadian interrelationships among levels of plasma fibrinogen, blood platelets, and serum interleukin-6 [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 1999, 5(1):37-42
- [11] Di Bella L, Gualano L. Key aspects of melatonin physiology: thirty years of research [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27(4):425-432
- [12] Hartley PS, John Sheward W, French K, et al. Food-entrained rhythmic expression of PER2 and BMAL1 in murine megakaryocytes does not correlate with circadian rhythms in megakaryopoiesis [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(7):1144-1152
- [13] Hartley PS, Sheward J, Scholefield E, et al. Timed feeding of mice modulates light-entrained circadian rhythms of reticulated platelet abundance and plasma thrombopoietin and affects gene expression in megakaryocytes [J]. Br J Haematol, 2009, 146(2):185-192
- [14] Ohkura N, Oishi K, Sudo T, et al. CLOCK regulates circadian platelet activity [J]. Thromb Res, 123:523-527
- [15] Zhao Y, Zhang Y, Wang S, et al. The clock gene Per2 is required for normal platelet formation and function [J]. Thromb Res, 2011, 127 (2):122-130