

Smad3 基因剔除对小鼠造血功能的影响

张 玲¹ 孙 昭¹ 沈爱玲¹ 马 丽¹ 姜学英¹ 马冠杰¹ 杨 晓^{2*} 赵春华^{1*}

¹(中国医学科学院中国协和医科大学 血液学研究所 实验血液学国家重点实验室,天津 300020)

²(军事医学科学院生物工程研究所 发育和疾病遗传学研究室,北京 100071)

摘 要 研究 *Smad3* 基因剔除对小鼠造血功能的影响。实验小鼠分为 5 组,每组有 *Smad3* 基因剔除小鼠 (*Smad3*^{-/-}) 和其同窝孪生的野生型小鼠 (*Smad3*^{+/+}) 各 1 只。小鼠的造血功能用 14 天形成的脾结节 (CFU-S₁₄)、多系祖细胞 (CFU-GEMM)、粒-单系祖细胞 (CFU-GM)、红系祖细胞 (BFU-E) 测定及外周血象、骨髓象等实验血液学指标来确定。每组小鼠取尾血作白细胞、红细胞和血小板计数,涂片作白细胞分类计数。将一侧股骨的骨髓冲出,制成单细胞悬液,计数其中有核细胞数,测定 CFU-GM、BFU-E、CFU-GEMM 值。将每只小鼠的 4×10^4 个骨髓有核细胞经尾静脉注入 3 只 8~10 周经致死量射线照射的同系雌性小鼠体内,测定 14 天的 CFU-S。取一部分胸骨、肝脏、脾脏固定做病理切片,其余胸骨冲出骨髓,涂片作分类计数。结果 *Smad3*^{-/-} 小鼠外周血白细胞和血小板计数明显高于 *Smad3*^{+/+} 小鼠,红细胞数无显著差异。外周血白细胞分类结果也表明粒细胞显著增高,骨髓有核细胞数无显著差异,CFU-GM 显著增高,BFU-E 无显著差异,CFU-GEMM 明显减少,CFU-S 显著减少。病理形态学观察发现骨髓增生极度活跃,以粒系为主,肝脾无显著差别。骨髓涂片分类表明粒系增多,粒系:红系比例增高。因此得出结论 *Smad3* 基因剔除使小鼠造血干祖细胞数目减少,而且干祖细胞分化异常,向粒系分化增多。*Smad3* 基因对造血系统的作用与 TGF- β 的作用有相关性。

关键词 *Smad3*, 基因剔除, 造血功能

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0428-05

SMAD3 是细胞质内介导转化生长因子- β (TGF- β) 信号转导的分子之一^[1]。TGF- β 是一个多效的细胞因子,因细胞类型、分化阶段和局部微环境的不同而发挥不同的作用。对于造血干细胞,TGF- β 的主要作用是维持其静息状态,使干细胞处于 G₀ 期,保持干细胞群体的相对稳定;对于造血多系祖细胞,TGF- β 的主要作用是抑制其受其它细胞因子刺激而增殖,对于定向祖细胞则作用不一^[2]。目前应用基因打靶的方法已经建立了 *Smad3* 基因剔除小鼠 (*Smad3*^{-/-})^[3]。杨晓等发现 *Smad3*^{-/-} 小鼠易发生渐进性白细胞增多症,及免疫功能缺陷^[4];35 日龄和 70 日龄的 *Smad3*^{-/-} 小鼠外周血白细胞计数明显高于野生型小鼠^[5]。为了进一步研究其造血功能,

我们采用实验血液学的方法对其血象、骨髓象和造血干、祖细胞功能进行了观察,初步揭示了 *Smad3* 基因剔除对小鼠造血功能的影响,以及 *Smad3* 与 TGF- β 作用的相关性。

1 材料和方法

1.1 动物

实验组小鼠分 5 组,每组由 1 只 6~8 周野生型和 1 只与其同窝孪生的基因剔除小鼠 (129SVEV \times Black Swiss) 组成。测定脾结节 (CFU-S) 所用的受体小鼠 30 只,为 8~10 周雌性小鼠 (129SVEV \times Black Swiss) 均由军事医学科学院医学生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室提供。

收稿日期 2003-01-22,修回日期 2003-04-15。

基金项目: 国家科技部 863 计划 (No. 2002AA205061); CMB 基金 (Grant # 01-748); 国家基础研究重大专项 (973) 基金 (No. 001CB5099); 北京科技基金 (No. 2002-489)

* 通讯作者: 1 Tel: 86-22-27210717; Fax: 86-22-27210717; E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn;

2 Tel: 86-10-66948882; E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

(注 沈爱玲现工作于青岛市人民医院)

1.2 试剂

IMDM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),小鼠造血混合集落(CFU-GEMM)培养基(Methocult M3434 , StemCell Technologies Inc. ; Vancouver , Canada),小鼠 GM-CSF(Peprotech. 公司)。

1.3 方法

1.3.1 取尾血 ,进行白细胞、红细胞和血小板计数 ;尾血涂片 ,用瑞氏染液染色 ,对白细胞进行分类。

1.3.2 骨髓有核细胞涂片、分类 :取出胸骨 ,用少量 D-Hank 's 液冲出骨髓并用一滴牛血清或马血清混匀 ,涂片 ,在空气中晾干后作瑞氏染色 ,观察细胞形态 ,进行分类计数。

1.3.3 对骨髓、肝脏、脾脏等脏器进行病理形态学观察。

1.3.4 CFU-GM 的测定 :无菌操作取出小鼠双下肢骨 ,冲出骨髓 ,制成单细胞悬液。在含 30% 胎牛血清 40ng/mL GM-CSF 和 0.3% 琼脂的 IMDM 培养基的 35mm 培养皿中接种 1×10^5 个骨髓有核细胞 ,培养皿置于 37°C 5% CO_2 的饱和湿度孵箱中培养 7d ,在倒置光学显微镜下计数。CFU-GM 为“粒-巨噬细胞集落形成单位”的缩写 ,每一个集落代表一个粒-单系祖细胞。

1.3.5 CFU-GEMM ,BFU-E 的测定 :取 *Smad3*^{-/-} 小鼠和与其同窝的野生型小鼠各 5 只 ,颈椎脱位处死。在无菌条件下取双下肢骨 ,用 D-Hank 's 液将骨髓冲出 ,计数有核细胞数。用 2% FBS IMDM 培养液调整细胞浓度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$,取出 0.3mL 加入 3.0mL CFU-GEMM 完全培养基中。振荡混匀后静置 5 ~ 10min ,使气泡散尽 ,用 1mL 注射器(BD 公司)将混合物吸出 ,每 35mm 培养皿加入 1mL ,轻轻摇动使其均匀分布 ,把培养皿置于 37°C 5% CO_2 的饱和湿度孵箱中培养 10d 和 14d ,在倒置光学显微镜下分别计数 BFU-E 和 CFU-GEMM。BFU-E 和 CFU-GEMM 分别称为红系瀑式集落形成单位和粒-红-单-巨混合集落形成单位 ,分别代表红系祖细胞和多系祖细胞。

1.3.6 CFU-S 的测定 :采用外源性脾结节形成技术 [按文献 [5] 的方法用上述骨髓细胞配制成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液 ,选择 8 ~ 10 周龄同系雌性小鼠作为受体 ,在接受了 8.5Gy¹³⁷Cs 射线照射的 4h 之内 ,从尾静脉注入 0.2mL 上述细胞悬液 ,即每只小鼠注入骨髓有核细胞 4×10^4 ,用加有复合维生素 B 的水喂养 14d 后 ,处死 ,取出脾脏 ,用 Bouin 液固定 24h 后 ,计数脾脏表面生成的结节数 ,每一个造血干细胞增殖分化成一个集落 ,植入的干细胞数与生成

的脾结节数线性相关。

1.3.7 统计学处理 :所有数据均以均值 \pm 标准差来描述 ,差异显著性检验用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 外周血白细胞、红细胞、血小板计数及外周血白细胞分类

从表 1 的结果可以看出 *Smad3*^{-/-} 小鼠的白细胞和血小板数量显著增高 ,红细胞数量无明显差异。白细胞数量比野生型小鼠增加了 47.5% ,血小板增加了 26.0%。表 2 的外周血白细胞分类结果也证实了 *Smad3*^{-/-} 小鼠粒细胞比例增高 ,比野生型小鼠增加了 147.9% ,而淋巴细胞相应减少。

表 1 外周血白细胞、红细胞、血小板计数结果(*n* = 5)

	<i>Smad3</i> ^{+/+}	<i>Smad3</i> ^{-/-}
WBC($\times 10^9/\text{L}$)	17.32 \pm 6.185	25.54 \pm 7.15*
RBC($\times 10^{12}/\text{L}$)	6.078 \pm 0.380	5.900 \pm 0.331
PLT($\times 10^9/\text{L}$)	631.2 \pm 34.1	795.2 \pm 21.6**

* *P* < 0.05 , ** *P* < 0.01

表 2 外周血白细胞分类(*n* = 4)

	<i>Smad3</i> ^{+/+}	<i>Smad3</i> ^{-/-}
Granulocyte(%)	24.0 \pm 12.2	59.5 \pm 4.43**
Lymphocyte(%)	76.0 \pm 12.2	40.5 \pm 4.43**

** *P* < 0.01

2.2 骨髓有核细胞计数及分类

骨髓有核细胞数无显著差异 ,计数结果为($\times 10^7$ 个/股骨): *Smad3*^{+/+}(1.41 \pm 0.26) ; *Smad3*^{-/-}(1.27 \pm 0.25)。

从骨髓涂片中随机选择几个视野进行分类计数 ,共计数 200 个细胞。各种细胞在骨髓有核细胞中的含量见表 3。两种小鼠骨髓淋巴细胞含量无显著差异 ; *Smad3*^{-/-} 小鼠骨髓中粒细胞含量显著增高 ,比野生型小鼠增高了 29.1% ,与外周血中的情况相符 ,红细胞明显降低 ,降低了 27.9% ;粒红比例(正常值为 1.2 ~ 1.4 : 1 ,表示骨髓造血功能的平衡状况)明显增高 ,增高了 77.9% ,说明骨髓造血功能的异常调节反应 ,粒系增生占优势。

表 3 骨髓有核细胞分类 (n = 5)

Table 3 Classification of bone marrow nucleated cells (n = 5)

	<i>Smad3</i> ^{+/+}	<i>Smad3</i> ^{-/-}
Lymphocyte (%)	39.8 ± 3.03	36.2 ± 3.19
Granulocyte (%)	35.8 ± 2.77	46.2 ± 4.09**
Erythrocyte (%)	24.4 ± 3.51	17.6 ± 2.41**
Granulocyte/erythrocyte ratio	(1.49 ± 0.22):1	(2.65 ± 0.32):1**

** P < 0.01

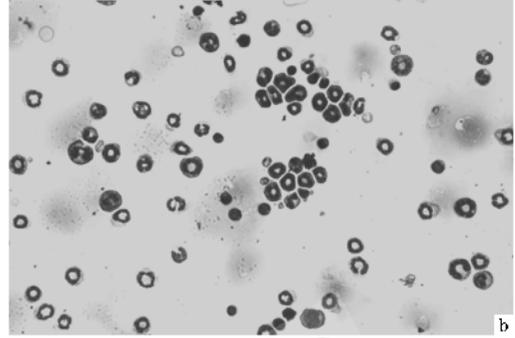
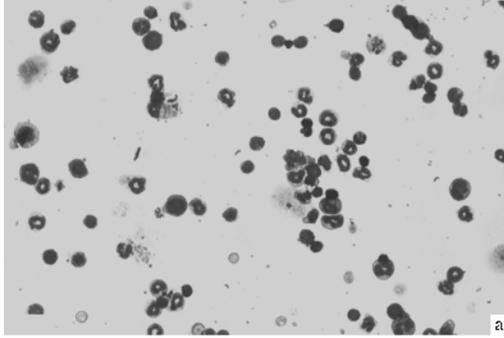


图 1 骨髓病理形态观察

Fig. 1 Pathomorphism of the bone marrows of *Smad3*^{+/+} and *Smad3*^{-/-} mouse

a. *Smad3*^{+/+} (×200); b. *Smad3*^{-/-} (×200)

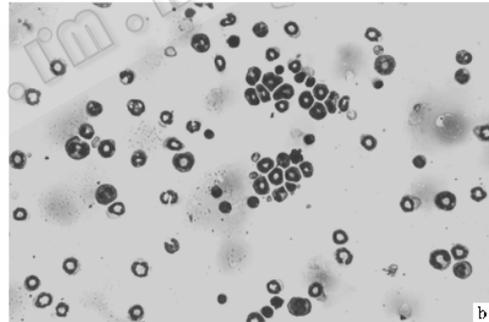
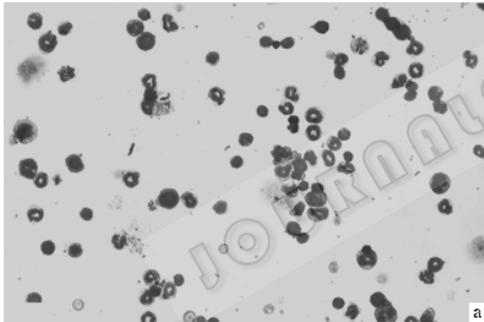


图 2 骨髓涂片瑞氏染色

Fig. 2 Bone marrow smears stained by Wright's stain

Bone marrows are actively proliferative with much more granulocytes in the *Smad3*^{-/-} mouse.

a. *Smad3*^{+/+} (×200); b. *Smad3*^{-/-} (×200)

2.4 各类造血祖细胞的测定结果

Smad3^{-/-} 小鼠 CFU-GM 增多,比野生型小鼠增多 46.8% 与外周血和骨髓分类计数的结果是一致的。BFU-E 无显著差异。CFU-GEMM 减少 62.3%,说明 *Smad3*^{-/-} 小鼠多能祖细胞减少,但它向粒-单系祖细胞的分化功能增强,产生的 CFU-GM 增多,而分化为红系祖细胞的功能无显著差异。结果见表 4。

2.5 CFU-S₁₄的测定结果

Smad3^{-/-} 小鼠 14 天的脾结节 (CFU-S₁₄) 数目明显少于野生型小鼠 (P < 0.01),比野生型小鼠减少了 50.9%,说明其造血干细胞减少,结果见表 5。

2.3 骨髓、肝脏、脾脏的病理形态学观察

野生型小鼠(图 1 a)骨髓增生活跃(++) , *Smad3*^{-/-} 小鼠(图 1 b)增生极度活跃(+++) ,并且以粒系为主(图 2)。肝脏、脾脏等器官未见异常(资料未提供)。

表 4 骨髓 CFU-GM ,BFU-E ,CFU-GEMM 的测定结果

(个/1 × 10⁵ BMNCs , n = 5)

Table 4 The CFU-GM ,BFU-E and CFU-GEMM yields of bone marrows (/1 × 10⁵ BMNCs , n = 5)

	<i>Smad3</i> ^{+/+}	<i>Smad3</i> ^{-/-}
CFU-GM	49.9 ± 14.4	63.0 ± 9.6*
BFU-E	7.1 ± 4.5	3.6 ± 1.9
CFU-GEMM	13.8 ± 2.5	5.2 ± 3.1*

* P < 0.05

表 5 14 天形成的脾结节的数量(个/1 × 10⁵ BMNCs) (n = 5)

Table 5 CFU-S₁₄ (/1 × 10⁵ BMNCs) (n = 5)

	<i>Smad3</i> ^{+/+}	<i>Smad3</i> ^{-/-}
CFU-S ₁₄	28.5 ± 9.0	14.0 ± 8.0**

** P < 0.01

3 讨 论

SMAD3 是 SMAD 蛋白家族的成员之一, SMAD 蛋白家族的功能是将 TGF- β 与其受体结合后产生的信号从细胞质转导到细胞核内^[1]。目前已发现的哺乳动物 SMAD 蛋白至少有 8 种, 根据其结构和功能特性分为三类: 第一类 R-SMADs (Receptor-activated SMADs), 是 TGF- β 家族受体激酶的直接底物, 包括 SMAD1, 2, 3, 5 以及可能的 SMAD8。SMAD1, 5 和 SMAD8 主要介导 BMP 信号。SMAD2 和 SMAD3 转导 TGF- β 和活化素 (Activin) 的信号。第二类 Co-SMADs (Common-mediator SMADs) 通过同 R-SMAD 结合, 参与信号转导, 此类 SMAD 只有 SMAD4, 在 BMP 和 TGF- β /Activin 信号通路中共享, 它是 TGF- β 诱导的信号传递通路中必不可少的成员及调控转录的关键转录因子。第三类 I-SMADs, 包括 SMAD6 和 SMAD7, 通过与被配体激活的 I 型受体发生牢固结合, 阻止受体对 R-SMAD 的磷酸化, 从而阻断受体激活 R-SMAD, 阻断信号转导。目前认为, SMAD6 主要阻断 BMP 信号传导, SMAD7 主要阻断 TGF- β /activin 信号转导^[3]。TGF- β 与 II 型受体结合后, 使 I 型受体聚集, I 型受体被磷酸化而激活, 再通过特定的方式使 SMAD2 或 SMAD3 磷酸化, SMAD2 或 SMAD3 与 SMAD4 形成复合物后, 进入细胞核, 调节特定靶基因的转录。

为研究 *Smads* 基因在哺乳动物体内的功能, 采用基因剔除技术已建立了各种 *Smad* 基因剔除小鼠。近几年来 *Smad3* 基因被三个研究小组独立地剔除^[4, 7, 8]。所有这些突变小鼠均在胚胎期发育正常并可存活至成年。离乳后, *Smad3*^{-/-} 小鼠发生渐进性的白细胞增多症、牙周炎、胃炎、肠炎以及粘膜附近脓肿形成的慢性感染。对有症状的 *Smad3*^{-/-} 小鼠淋巴结的组织学及免疫表型分析显示 T 细胞有增强的增殖能力及活化的表型。*Smad3*^{-/-} B 淋巴细胞对 TGF- β 的抑制作用依然敏感, 而胸腺细胞和外周 T 细胞却彻底失去了对 TGF- β 信号的应答, 中性粒细胞也失去了对 TGF- β 正常的趋化应答^[4]。

造血功能的调节是个非常复杂的过程, 是造血干细胞在特定微环境中不断生成各种成熟血细胞和自我复制的过程。造血功能是靠正常的造血干细胞和正常的造血微环境以及神经体液系统的调节来维持的。国内外就 *Smad3* 基因剔除对小鼠造血功能的研究还未见报道。而关于 TGF- β 对人和小鼠造血

系统的影响已有较多的研究^[2]。TGF- β 可以维持造血干细胞的静息状态, 抑制干细胞和多能祖细胞增殖, 抑制红系和巨核系祖细胞, 刺激小鼠粒-单系祖细胞增殖。TGF- β 的这些作用通过下调 IL-1, IL-3, M-CSF 受体和上调 GM-CSF 受体的表达来实现^[2]。本研究发现, *Smad3*^{-/-} 小鼠造血干祖细胞明显减少。因为基因剔除小鼠所表现出来的是在胚胎发育过程中早期的缺陷积累所导致的病变, 所以, *Smad3* 基因剔除小鼠表现的造血干、祖细胞 (CFU-S, CFU-GEMM) 减少可能是因为在胚胎发育早期造血干细胞因 TGF- β 信号阻断而使 TGF- β 不能完全控制其静息状态, 导致干细胞在发育早期就不断增殖分化为祖细胞和成熟细胞, 在个体发育完成后干细胞相对于野生型小鼠减少, 祖细胞的数量也就相应减少。各系祖细胞的测定结果显示粒-单系祖细胞 (CFU-GM) 数量增高, 骨髓病理形态学观察结果表明骨髓增生极度活跃, 涂片分类结果显示粒细胞比例增高, 粒、红比例增加, 说明骨髓增生以粒系增生为主, 外周血涂片分类结果也证明粒细胞增多, 这几项结果说明造血干祖细胞分化功能异常, 向粒系分化的功能亢进。本研究的结果表明 *Smad3* 基因剔除小鼠与存活下来的 TGF- β 1 基因剔除小鼠的表型相似, 只是 *Smad3*^{-/-} 小鼠程度要轻, TGF- β 1 基因剔除小鼠中静息的 Ho/Rho^{Low} c-Kit⁺ 造血干细胞减少 90% 以上, 而且髓系增生, 红系细胞数量降低^[9]。因此 SMAD3 对造血系统的作用与 TGF- β 对造血系统的作用有一定的相关性, 但 TGF- β 并不完全依赖于这一信号分子, 还有其它途径在发挥作用, 如刘兵等报道 *Smad5* 在胚胎造血调控过程中起重要作用^[10]。此外, *Smad3*^{-/-} 小鼠的血小板显著增高, 这一结果与其它研究小组的结果一致^[5], 其机制需要进一步的研究。在本实验中, 我们还发现外源的 TGF- β 1 不仅刺激了野生型 CFU-GM 集落的体积增大, 纯合型小鼠的 CFU-GM 体积也增大, 说明 TGF- β 1 对 CFU-GM 的刺激作用不完全依赖于 SMAD3。这些现象的机制还需要进一步的实验来阐明。本研究的结果表明 *Smad3* 基因剔除使小鼠造血干祖细胞数量和功能异常, 导致造血功能的异常调节反应, 为进一步探讨 SMAD3 介导的 TGF- β 信号对造血系统的调控作用提供了一定的实验基础。

致 谢: 感谢中国医学科学院血液学研究所病理学研究室赵均铭副研究员、徐世才技师和军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室吕亚

歆技师的大力支持。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Heldin C H, Miyazono K, Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, **390**: 465 - 471
- [2] Nicolas O Fortunel, Antoinette Hatzfeld, Jacques A Hatzfeld. Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*, 2000, **96**(6): 2022 - 2036
- [3] Yang X(杨晓), Huang P T(黄培堂), Huang C F(黄翠芬). Progress in the Function of Smad Genes. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2000, **16**(2): 145 - 150
- [4] Yang X, Letterio J J, Chen L *et al.* Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J*, 1999, **18**: 1280 - 1291
- [5] Zhan D W(战大伟), Wang D P(王冬平), Luan R H(栾蓉晖) *et al.* Determination of hematological and biochemical parameters of

mice lacking *Smad3*. *Laboratory Animal Science And Administration* (实验动物科学与管理), 2002, **19**(1): 7 - 11

- [6] Xue Q S, editor in chief(薛庆善主编). Principles and techniques of in vitro culture(体外培养的原理与技术). Beijing: Science Press, 2001. 2.
- [7] Zhu Y, Richardson J A, Parada L F *et al.* *Smad3* mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*, 1998, **94**: 703 - 714
- [8] Datto M B, Frederick J P, Pan L *et al.* Targeted disruption of SMAD3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 2495 - 2504
- [9] Dickson M C, Martin J S, Cousins F M *et al.* Defective hematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knockout mice. *Development*, 1995, **121**: 1845 - 1854
- [10] Liu B, Sun Y X, Jiang F Z *et al.* Disruption of *Smad5* gene leads to enhanced proliferation of high-proliferative potential precursors during embryonic hematopoiesis. *Blood*, 2003, **101**: 124 - 133

The Effects of the *Smad3*-knockout on the Hematopoiesis of Mouse

ZHANG Ling¹ SUN Zhao¹ SHEN Ai-Ling¹ MA Li¹ JIANG Xue-Ying¹ MA Guan-Jie¹
YANG Xiao^{2*} ZHAO Chun-Hua^{1*}

¹(State Key Lab of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS and PUMC, Tianjin 300020, China)

²(Genetic Catoratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract The effects of the *Smad3*-knockout on the hematopoiesis of mouse were investigated in this work. Five pairs of wild type and *Smad3*-null mice were studied. White blood cell(WBC), red blood cell(RBC) and platelet(PLT) counting of peripheral blood cells were performed with blood obtained from tails. And white blood cells were classified by their morphology. Bone marrow nucleated cells(BMNCs) were counted and classified. The CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM yields were measured in each pair of mice. CFU-S yield of each mouse was measured by injecting bone marrow cells into lethally irradiated 8-10 weeks old wild type female mice. And the pathomorphism of their bone marrows, spleens and livers were observed. As a result, WBC and PLT of *Smad3*-null mice were significantly higher than those in wild type mice. *Smad3*-null mice had much more proportion of granulocytes in classification. There wasn't any difference in RBC counting and BFU-E measurement. The yield of CFU-GM increased, while the yields of CFU-GEMM and CFU-S markedly reduced. Bone marrows are actively proliferative, with granulocytosis. The granulocyte/erythrocyte ratio increased. There were no obviously alterative in spleen and liver. Thus *Smad3*-knockout results in a decreased number of stem and progenitor cells. Moreover hematopoietic differentiation is abnormal with a tendency to forming more granulocytes and platelets. The effect of *Smad3* on hematopoiesis is correlative to that of TGF- β .

Key words *Smad3*, knockout, hematopoiesis

Received: 01-22-2003

This work was supported by grants from the " 863 Projects " of Ministry of Science and Technology of P. R. China(No 2002AA205061); from China Medical Board of NewYork, Inc: (Grant # 01-748); from National Key Project for Basic Research of China(No 001CB5099); from Beijing Ministry of Science and Technology (No 2002-489); RCH Zhao is a Cheung Kong Scholar in P. R. China.

* Corresponding author. 1. Tel: 86-22-27210717; E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn 2. Tel: 86-10-66948882; E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>