

PDK1 在内皮细胞向造血细胞转换中的作用研究

孙晓璐 王乐 袁卫平 王伟丽

【摘要】目的 研究磷酸肌醇依赖性激酶 1(PDK1)在内皮细胞向造血细胞转化阶段对造血干细胞(HSC)发生的影响。**方法** 应用 Vec-Cre 在内皮细胞中特异性敲除 PDK1 基因,取对照组 PDK1^{fl/fl}、PDK1^{fl/+}小鼠及敲除组 Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}小鼠胚胎的主动脉-性腺-中肾区(AGM 区)细胞进行集落形成实验,检测 PDK1 基因对造血祖细胞功能的影响;取对照组和敲除组 AGM 区细胞行移植实验,检测 PDK1 对 HSC 功能的影响;取对照组和敲除组 AGM 区细胞,通过流式细胞术检测 PDK1 对能够向造血转化的 CD31⁺c-Kit^{high}细胞群比例、细胞周期及细胞凋亡的影响;分选对照组和敲除组 AGM 区 CD31⁺c-Kit^{high}细胞群,通过 Real-time PCR 检测 PDK1 对内皮向造血转换相关的转录因子(RUNX1、P2-RUNX1、GATA2)的影响。**结果** PDK1 敲除后,造血祖细胞形成的克隆形态变小,数目减少[敲除组 CFU-GM 为(24±5)个/ee,对照组为(62±1)个/ee, $P=0.001$];破坏了造血干细胞重建造血及多向分化的能力(敲除组移植 5 只,0 只重建,对照组移植 7 只,5 只重建, $P=0.001$);AGM 区 CD31⁺c-Kit^{high}比例降低[敲除组 CD31⁺c-Kit^{high}比例为(0.145±0.017)%,对照组比例为(0.385±0.04)%, $P=0.001$];并且 AGM 区由内皮细胞向造血细胞转换的关键转录因子表达下降,但对 CD31⁺c-Kit^{high}细胞的增殖和凋亡无明显影响。**结论** 在内皮细胞中特异敲除 PDK1 基因,导致具有向造血转化的内皮细胞群比例降低,影响了 HSC 的发生,破坏了 HSC 重建造血的能力。

【关键词】 PDK1; 早期造血; AGM 区; 造血干细胞

基金项目:国家自然科学基金(81600082、81770105);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-12M-017、2017-12M-3-015);北京协和医学院“协和青年基金”(3332016093)

The role of PDK1 in the transition of endothelial to hematopoietic cells Sun Xiaolu^{*}, Wang Le, Yuan Weiping, Wang Weili^{*}. *Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Tianjin 300020, China*

Sun Xiaolu and Wang Le are the first authors who contributed equally to the article

Corresponding author: Wang Weili, Email: wangweili@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To explore the role of PDK1 in the transition of endothelial to hematopoietic cells and its effect on the generation and normal function of HSC. **Methods** PDK1 was deleted specifically in endothelial cells expressing VEC (Vascular Endothelial Cadherin). CFU-C was performed to detect the effect of PDK1 on the function of hematopoietic progenitor cells using the cells from PDK1^{fl/fl}, PDK1^{fl/+} and Vec-Cre; PDK1^{fl/fl} AGM region. Hematopoietic stem cell transplantation assay was conducted to determine the effect of PDK1 on hematopoietic stem cells. Flow cytometry was performed to analyze the influence of PDK1 on percentage, cell cycle and apoptosis of CD31⁺c-Kit^{high} cell population. Real-time PCR was conducted to measure the expression of transcription factors involved in process of transition from endothelial to hematopoietic cells. **Results** In contrast to the wild type group, the CFU from PDK1-deficient hematopoietic progenitor cells showed smaller in morphology and fewer in quantity. CFU-GM was (24±5)/ee in knockout group, and the control group was (62±1)/ee ($P=0.001$). PDK1 deletion severely impaired the ability to repopulate hematopoietic cells and differentiate into

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.09.002

作者单位:300020 天津,实验血液学国家重点实验室,中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所)(孙晓璐、袁卫平、王伟丽);天津市第一中心医院、卫生部危重病急救医学重点实验室(王乐)

孙晓璐和王乐对本文有同等贡献,均为第一作者

通信作者:王伟丽,Email:wangweili@ihcams.ac.cn

committed cells. hematopoietic progenitor cells from knockout group was transplanted into 5 recipients without any recipients reconstructed. However, 5 of 7 recipients were reconstructed in control group ($P=0.001$). The proportion of intra-vascular clusters in the AGM was decreased (the frequency of $CD31^+c\text{-Kit}^{\text{high}}$ in the knockout group was $(0.145\pm 0.017)\%$, and the control group ratio was $(0.385\pm 0.040)\%$ ($P=0.001$), but not due to the inhibition of cell proliferation and/or increase of apoptosis. Further study found that the absence of endothelial PDK1 causes a decreased expression of RUNX1, P2-RUNX1, GATA2 and other important hematopoietic-related transcription factors in hemogenic cluster. **Conclusion** PDK1 deletion impairs the transition of endothelial cells to hematopoietic cells as well as the generation and function of HSC.

【Key words】 PDK1; Embryonic hematopoiesis; Aorta-gonad-mesonephros; Hematopoietic stem cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81600082, 81770105); Medical and Health Science Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (2016-12M-017, 2017-I2M-3-015); Youth Foundation of Peking Union Medical College (3332016093)

永久的成体造血系统起始于造血干细胞(HSC)的形成^[1]。HSC为整个生命体提供不同阶段、全部类型的血细胞,了解HSC发生阶段的调控基因具有重要意义。在小鼠胚胎中,次级造血可以被分为两波:起始于胚胎期的第8或8.5天最初一代的多能造血祖细胞,及从胚胎第10.5天开始的具有成体重建造血功能的HSC^[2-4]。来自多个研究策略的证据表明次级造血祖细胞和HSC是直接由生血内皮形成的,这种生血内皮是一种特殊类型的具有瞬时造血潜能的结构内皮。该过程被认为是内皮细胞生成的转变,表现为胚胎内的主动脉、卵黄动脉和脐动脉中出现血管造血簇^[5-9]。

磷酸肌醇依赖性激酶1(PDK1)首先在成纤维细胞和表皮细胞中由胰岛素和/或其他生长因子刺激的PI3K-PKB信号通路中被发现^[10],为蛋白激酶AGC家族的主要调控者。PDK1作为AGC家族成员上游的蛋白激酶,通过磷酸化AGC激酶成员的一个保守的T-loop残基(处于这些激酶催化区域的中心位置),进而激活这些激酶来发挥功能^[11-12],发挥其对细胞生长、增殖、存活及代谢的调控作用^[13]。

PDK1对小鼠胚胎的正常发育具有重要作用,并可以调控细胞的大小。Lawlor等^[14]通过构建PDK1基因完全缺失的小鼠模型发现,完全缺失PDK1基因的小鼠胚胎在第9.5天死亡,并伴有多个异常表型,包括体节数目减少、由前脑和神经脊发育来的组织缺失。此外,PDK1对HSC、T细胞、B细胞、血小板的发育及功能均有调控作用^[15-20]。然而,目前还未清楚PDK1是否是内皮细胞向造血细胞转换及正常主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM区)HSC形成所必须的。因此,本课题组通过构建Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}小鼠,在表达VEC的内皮细胞中特异性敲除PDK1基因来研究

PDK1在内皮细胞向造血细胞转换中的作用。

材料与方法

1. 主要材料、试剂和仪器:Vec-Cre (Vascular endothelial cadherin-Cre)小鼠^[8]购自美国Jackson实验室,PDK1^{fl/fl}C57BL/6J小鼠(白细胞抗原表型为CD45.2)^[10]由Dario R. Alessi教授惠赠,B6.SJL小鼠(白细胞抗原表型为CD45.1)为我院实验动物中心保存。所有小鼠均饲养于SPF级动物房。所有涉及小鼠的实验均获得我院动物伦理委员会的批准。

MethoCult M3434 (CFC培养基)为美国Stem cell公司产品。流式相关抗体[CD31 (MEC13.3) PE、c-Kit (2B8) APC、CD45.1 (A20) APC、CD45.2 (104) PE、CD3 (145-2C11) PE-Cy7、B220 (RA3-6B2) FITC、Mac-1 (M1/70) APC-Cy7]购自美国e-Bioscience或BD公司。周期及凋亡相关试剂:Hoechst33342购自美国Sigma-Aldrich公司;Anti-mouse Ki-67 kit APC、Annexin V-7AAD apoptosis Kit FITC、FACS Lysing Solution、IntraSure kit均为美国BD公司产品。逆转录试剂盒购自美国Transgene公司。Fast Start Universal SYBR Green Master购自瑞士Roche公司。配置凝胶用琼脂糖购自西班牙Biowest Agarose公司。

超净台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;常温台式离心机及CO₂细胞培养箱为德国Thermo公司产品;普通倒置显微镜及荧光倒置显微镜TE2000-S为日本Nikon公司产品;Micro one小型离心机为日本Tomy公司产品;VORTEX涡旋振荡器为美国Scientific Industries公司产品;小摇床为深圳市培英电子有限公司产品;超纯水系统为德国Millipore公司产品;普通PCR仪为美国Bio-Rad/ABI公司产品;LSR II / LSR Fortessa / Canto II / Aria

III 流式细胞仪为美国BD公司产品。

2. PDK1 基因敲除小鼠模型的构建及鉴定: 利用 Vec-Cre; Loxp 系统在小鼠内皮细胞中特异性敲除 PDK1 基因。首先将 Vec-Cre 雄鼠与 PDK1^{fl/fl} 雌鼠进行杂交, 得到 Vec-Cre; PDK1^{fl/+} 小鼠; 再将 Vec-Cre; PDK1^{fl/+} 雄鼠与 PDK1^{fl/fl} 雌鼠杂交, 得到 Vec-Cre; PDK1^{fl/fl} 目的基因型小鼠胚胎(图 1A)。采用 PCR 鉴定小鼠基因型: PCR 条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 退火 5 min。将 PCR 产物用 20 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳, 成像。具体引物序列见表 1。经验证, 成功构建 Vec-Cre; PDK1^{fl/fl} 小鼠模型(图 1B)。

3. 集落形成实验: 取 1 个胚胎当量(embryo equivalent, ee)第 11.5 天 AGM 区细胞, 用 0.1% 胶原酶 37 °C 消化 30 min, 1 ml 含 10% FBS 的 PBS 终止消化, 240×g 离心 5 min 后弃上清, 100 μl PBS 重悬细胞, 加入到 1 ml M3434 中, 充分振荡混匀, 用克隆针种于 3.5 cm 培养皿中, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温细胞培养箱中, 培养 7 d, 于显微镜下观察计数, 统计 CFU-GEMM、CFU-GM 及 BFU-E 集落数目。

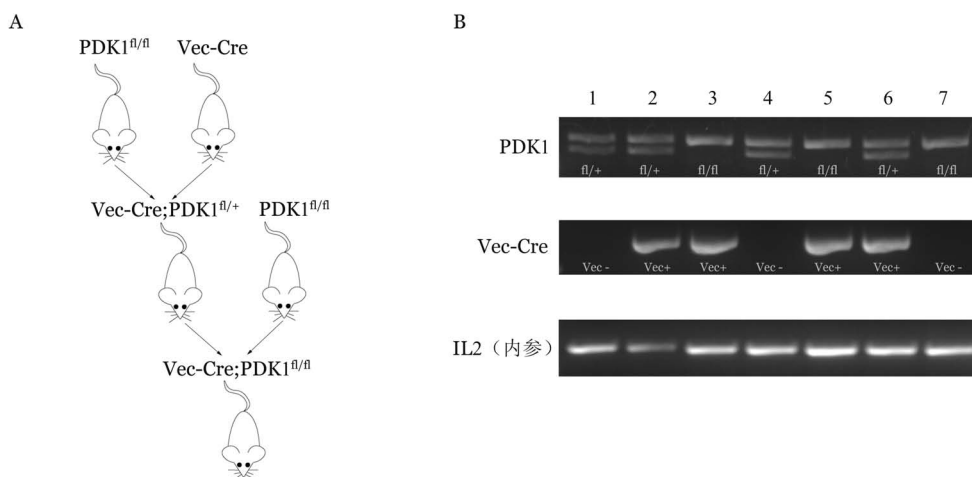
4. AGM 区造血细胞比例检测: 取 1 ee AGM 用 0.1% 胶原酶 37 °C 消化 30 min, 1 ml PBE 洗 1 遍,

50 μl PBE 重悬细胞, 标记抗体 CD31、c-Kit(4 °C、30 min)。每管加入 1 ml PBE 洗 1 遍, 4 °C、240×g 离心 5 min, 弃上清, 每管加入 300 μl PBE 重悬细胞, 过 300 目尼龙膜, 上流式细胞仪进行检测。

5. AGM 区细胞凋亡检测: 将裂解好的 AGM 区细胞中加入表面标记抗体, 冰上孵育 30 min; 每管加入 1 ml Binding 缓冲液洗 1 遍, 240×g、4 °C 离心 5 min; 弃上清, 留约 50 μl 液体, 每管样品管中加入 5 μl FITC Annexin V 和 5 μl 7-AAD, 混匀后室温避光孵育 15 min; 每管加入 300 μl Binding 缓冲液重悬, 过 300 目尼龙膜, 1 h 内上机检测。

6. AGM 区细胞周期(Ki-67)检测(使用 IntraSure kit 检测): 将裂解好的 AGM 区细胞样品管加入表面标记抗体, 冰上孵育 30 min; 每管加入 100 μl Reagent A 混匀, 室温避光放置 5 min; 每管加入 1 ml FACS lysing 缓冲液, 室温避光孵育 10 min, 240×g、4 °C 离心 5 min 弃上清, 留约 50 μl 液体; 每管加入 50 μl Reagent B, 样品管中加入 APC-Ki67 5 μl, 室温避光孵育 30 min; 每管加入 1 ml PBE 洗 1 遍, 240×g、4 °C 离心 5 min, 弃上清。300 μl 重悬, 过 300 目尼龙膜至流式管中。上机前加 Hoechst 33342 终浓度至 10~20 μg/ml。

7. AGM 造血干细胞移植实验: 将裂解好的来



A: Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} 小鼠繁殖路线; B: 小鼠基因型鉴定代表图; 1、4: PDK1^{fl/+} 小鼠; 2、6: Vec-Cre;PDK1^{fl/+} 小鼠; 3、5: Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} 小鼠; 7: PDK1^{fl/fl} 小鼠

图1 构建在VEC阳性内皮细胞中特异敲除PDK1基因的小鼠模型

表1 PCR引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Vec-Cre	CCAGGCTGACCAAGCTGAG	CCTGGCGATCCCTGAACA
Vec-Cre 内参(IL2)	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
PDK1	TGTGCTTGGTGGATATTGAT	AAGGAGGAGAGGAGGAATGT

自供体小鼠对照组 PDK1^{fl/fl}或 PDK1^{+/+}及实验组 Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}(白细胞抗原表型为 CD45.2)的 AGM 区细胞通过尾静脉注射到受致死剂量(9.5 Gy)照射(照射分两次,间隔时间大于 2 h,照射后 4 h 内进行移植)的 B6.SJL 小鼠(白细胞抗原表型为 CD45.1)。每只受体小鼠注射 1 ee AGM 区细胞及 2×10⁴保护细胞(保护细胞为 B6.SJL 骨髓细胞),细胞重悬于含 1%FBS 的 PBS 中,总体积为 400 μl。移植后一周内饮用水中加恩诺沙星。在移植后第 4、8、12、16 周通过尾静脉取受体小鼠外周血检测 HSC 重建及各系分化情况。外周血供体嵌合率大于 10% 定义为获得造血重建。

8. Real-time PCR 检测相关基因的表达:流式分选 AGM 区 CD31⁺c-Kit^{hi}细胞群,将分选得到的细胞用 Qiagen RNeasy Mini Kit 进行 RNA 提取和纯化,按照手册进行操作。取 1 μg RNA,按照逆转录试剂盒操作手册进行逆转录。获得 cDNA 后,采用 SYBR 染料法,参考 Fast Start Universal SYBR Green Master 说明书在 QuantStudio5 (0.1 ml) 仪器上进行 Real-time PCR。引物序列见表 2。反应条件:95 ℃, 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃, 1 min, 重复 40 个循环;收集信号。反应体系为 20 μl,每个反应设置 3 个复孔,以 GAPDH 为内参,按照 2^{-ΔΔCt} 计算基因的相对表达量。

9. 统计学处理:数据分析使用 *t* 检验(移植嵌合率数据除外),使用软件版本为 GraphPad Prism 7.0, 数据变量使用均值±标准误进行表述,移植嵌合率数据使用重复测量方差分析及多变量方差分析,使用软件版本为 IBM SPSS Statistics22。

结 果

1. 敲除小鼠内皮细胞 PDK1 基因对造血干/祖细胞(HSPC)功能的影响:为了研究敲除 PDK1 基因对 HSPC 功能的影响,本课题组取对照组和敲除组小鼠胚胎的 AGM 区细胞进行集落形成实验分析。结果显示敲除组 Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}小鼠相对于对照

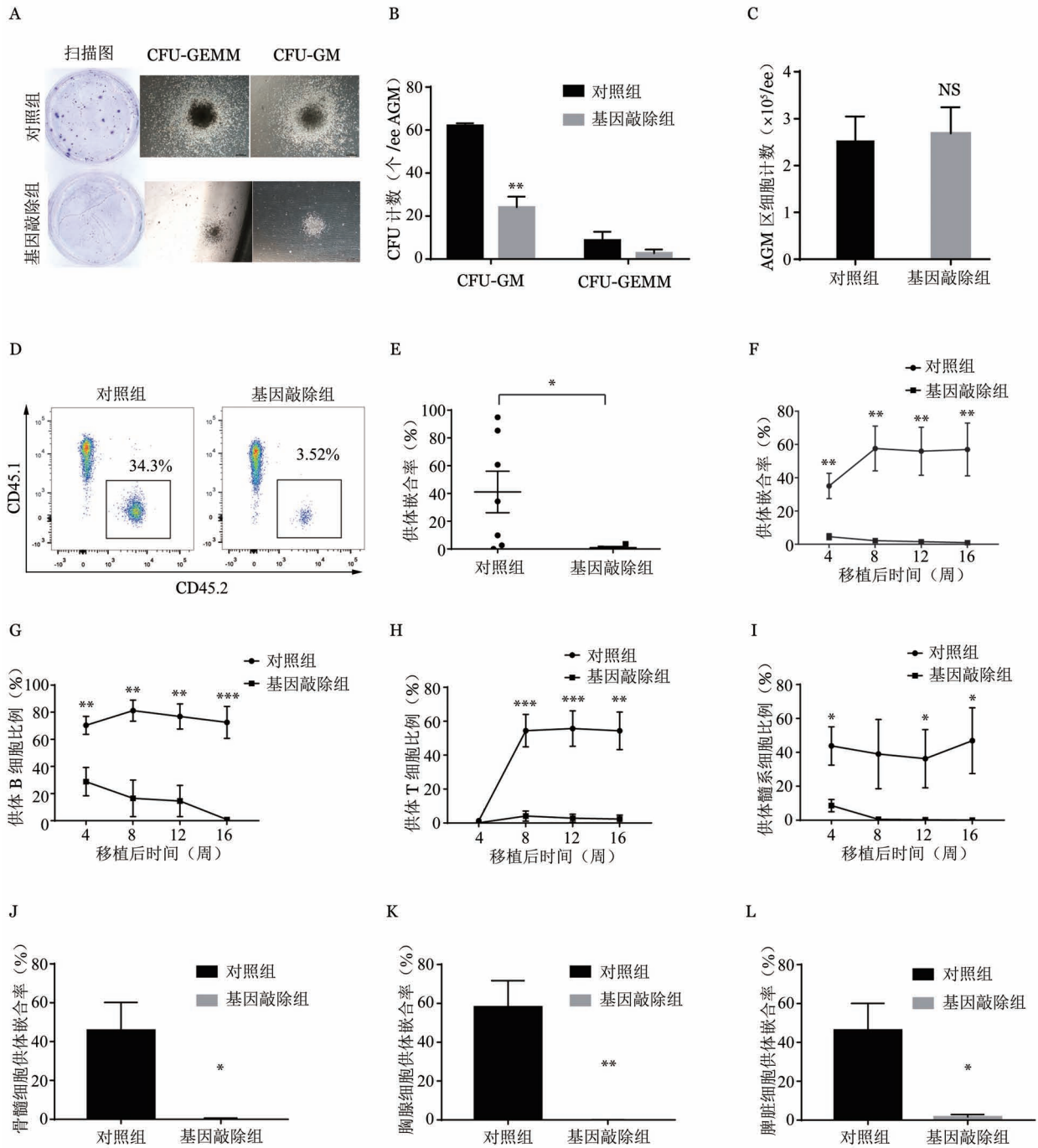
组 PDK1^{fl/fl}、PDK1^{+/+}小鼠所形成的集落形态小、数目少,其中敲除组 CFU-GM 的数目[(24±5)个 CFU-GM/ee]相对于对照组[(62±1)个 CFU-GM/ee]减少了约 50%(图 2A、B)。同时,为了排除敲除组克隆数目减少是由于 AGM 整体细胞数减少的可能性,我们进行 AGM 区细胞计数,结果显示对照组 AGM 区细胞平均计数为(2.534±0.510)×10⁵/ee,敲除组 AGM 区细胞平均计数为(2.685±0.560)×10⁵/ee,两组差异无统计学意义(*P* = 0.849)(图 2C)。为了检测敲除 PDK1 基因是否影响 HSC 的发生,本课题组进行了造血干细胞移植实验,取第 11.5 天 AGM 区细胞移植到受致死剂量照射的 B6.SJL 小鼠(白细胞抗原为 CD45.1)体内,并在移植后第 4、8、12、16 周取外周血检测 HSC 重建情况。同对照组 PDK1^{fl/fl}、PDK1^{+/+}相比,Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} AGM 细胞来源的受鼠无法重建造血及向各系分化(图 2D~I)。在移植第 16 周将对照组及敲除组的受鼠处死,取受鼠骨髓、脾脏和胸腺,计算供体嵌合率。流式结果显示,在 Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} AGM 区细胞来源的受鼠中几乎没有检测到来自供体的细胞(图 2J~L)。以上结果表明,内皮细胞中 PDK1 蛋白的缺失阻碍 HSPC 的发生且损害其正常功能。

3. PDK1 在内皮细胞中敲除后 AGM 的内皮生血簇比例降低:为了研究 PDK1 基因敲除后是否影响内皮向生血内皮的转换,我们通过流式细胞术检测了敲除组和对照组 AGM 区生血簇(CD31⁺c-Kit^{hi}细胞)比例。结果显示,敲除组和对照组相比,AGM 区生血簇比例降低[敲除组为(0.145±0.017)%,对照组为(0.385±0.04)%,*P* = 0.001](图 3A、B)。以上结果表明,PDK1 基因敲除后,导致了具有向造血转化的 AGM 区内皮簇 CD31⁺c-Kit^{hi}细胞比例减少,阻碍了内皮向生血内皮的转换。

4. Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} AGM 区生血簇的减少不是由于异常的细胞周期和凋亡造成:本课题组进一步研究 PDK1 基因在 VEC 阳性的内皮细胞敲除后,其 AGM 区生血簇比例降低是否是由于 CD31⁺c-Kit⁺细

表 2 Real-time PCR 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
PDK1	CTGGCCCGAGAAGCTG	GTCGTCCTGAAATGTAAAA
GATA2	GCGAAAACCAAAGTGCATAAGC	CTGTCTCCCAGAAACCAAGAGC
RUNX1	ACTCACTGGCGCTGCAACAA	AAGCTCTTGCTCTACCGCT
P2-RUNX1	AAGATCCGAGCCCTGTG	TCACAACAAGCCGATTGAGT



对照组: PDK1^{fl/fl}或PDK1^{+/+}; 基因敲除组: Vec-Cre; PDK1^{fl/fl}; A: 克隆结晶紫染色扫描图及克隆在显微镜下形态图; B: 克隆数目统计结果($n=3$, 实验重复2次); C: AGM区计数($n=4$, 实验重复3次); D: 移植的受体小鼠检测外周血嵌合率流式代表图; E: AGM区移植到受体小鼠, 16周后供体嵌合率(对照组共移植7只, 5只重建; 基因敲除组共移植5只, 0只重建); F~I: 对照组和基因敲除组AGM区移植到受体小鼠, 分别于第4、8、12、16周取受体小鼠外周血检测供体嵌合率及各系分化; J~L: 移植后16周, 取受体小鼠骨髓、胸腺、脾脏细胞, 流式细胞术检测骨髓、胸腺、脾脏细胞的供体嵌合率

图2 PDK1在内皮细胞中敲除后破坏造血细胞的功能(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

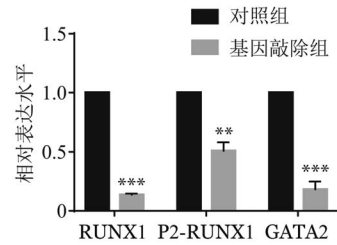
胞群的增殖减少和(或)凋亡增多所导致。为了检测这一可能性, 本课题组用Ki-67标记第11.5天AGM区细胞, 通过流式细胞术检测了CD31⁺c-Kit⁺细胞群的细胞周期状态。结果发现, 在VEC阳性的

内皮细胞特异性敲除PDK1基因后, 和对照组PDK1^{fl/fl}、PDK1^{+/+}相比并不阻碍CD31⁺c-Kit⁺细胞群的细胞增殖(图4A、B), 且并不促进CD31⁺c-Kit⁺细胞群细胞凋亡(图4C、D)。结果表明, 敲除组AGM

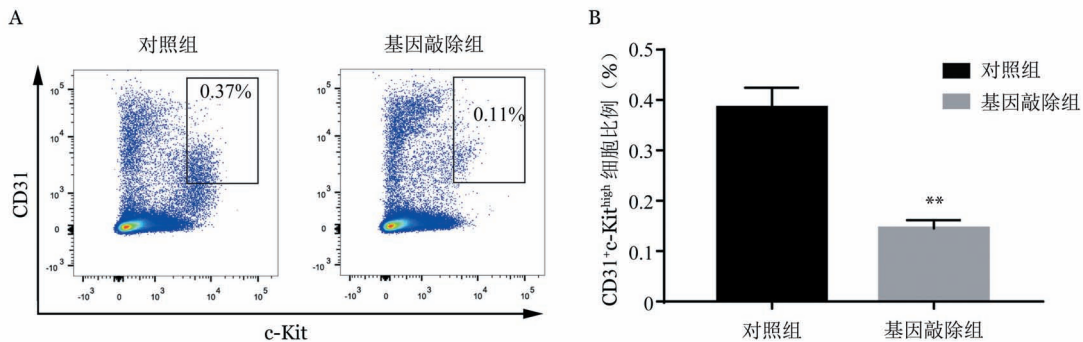
区生血簇的减少不是由异常的细胞周期和凋亡造成。

5. 在内皮细胞中敲除 PDK1 基因后, RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 的表达水平降低: 本课题组将第 11.5 天 AGM 区裂解成单个细胞, 流式分选 CD31⁺c-Kit⁺ 细胞群, 提取 RNA 后反转录为 cDNA, 通过实时定量 PCR 检测 RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 的表达。结果显示, 同对照组相比, 敲除 PDK1 基因后, AGM 区的 RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 表达均下降, 其中 RUNX1 表达下降约 86%, P2-RUNX1 表达下降约 49%, GATA2 表达下降约 82% (图 5)。这提示在 VEC 阳性的内皮细胞特异敲除 PDK1 基因后,

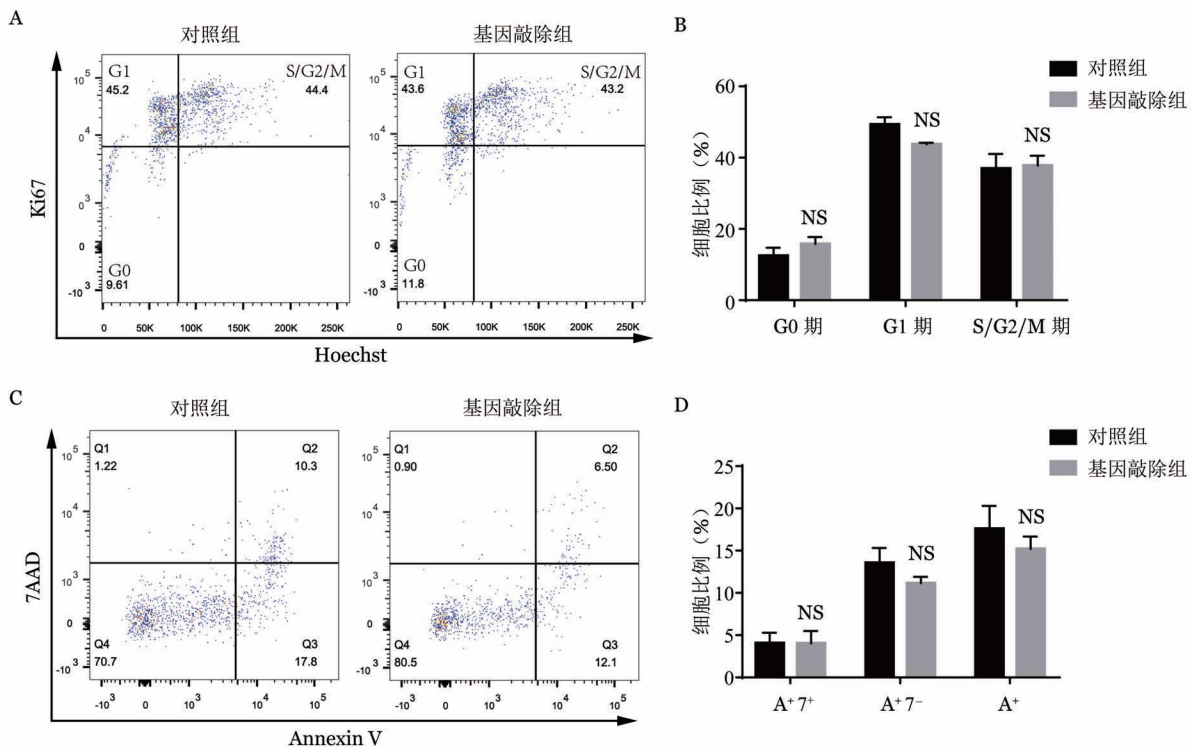
通过降低转录因子 RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 的表达, 从而可能阻碍了内皮向造血细胞的转换。



对照组: PDK1^{fl/fl} 或 PDK1^{+/+}; 基因敲除组: Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}
 图 5 PDK1 在内皮细胞中敲除后 RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 的表达水平降低 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



对照组: PDK1^{fl/fl} 或 PDK1^{+/+}; 基因敲除组: Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}; A: CD31⁺c-Kit^{high} 细胞群代表图; B: CD31⁺c-Kit^{high} 细胞群比例 ($n = 3$, 实验重复 3 次)
 图 3 PDK1 在内皮细胞中敲除后阻碍了内皮向造血细胞的转换 (** $P < 0.01$)



对照组: PDK1^{fl/fl} 或 PDK1^{+/+}; 基因敲除组: Vec-Cre;PDK1^{fl/fl}; A、C: CD31⁺c-Kit^{high} 细胞群周期及凋亡代表图; B、D: CD31⁺c-Kit^{high} 细胞群周期 ($n = 4$, 实验重复 2 次) 及凋亡 (对照组 $n = 8$, 基因敲除组 $n = 7$, 实验重复 2 次)

图 4 Vec-Cre;PDK1^{fl/fl} AGM 区生血簇的减少并不是由于异常的细胞周期和凋亡

讨 论

HSC 是一类能够自我更新并分化成所有血液细胞的造血始祖细胞。破译在胚胎发育时期血管内皮细胞向造血细胞发育调控的分子机制,对更好地理解造血细胞是如何发生及再生医学均具有重要的意义。在本研究中,本课题组发现 PDK1 在内皮细胞向造血细胞转换阶段及 HSC 发生和功能中均发挥着重要作用。为了检测 PDK1 在 AGM 区的内皮生血及 HSC 发生的作用,本课题组构建了在 VEC 阳性的内皮细胞中特异性敲除 PDK1 基因的小鼠,通过流式细胞术及集落形成实验发现敲除 PDK1 基因后小鼠内皮生血簇比例降低,形成的集落体积减小且数目减少;通过移植 AGM 区细胞至受致死剂量照射的受体小鼠体内,发现 *Vec-Cre; PDK1^{fl/fl}* AGM 区的 HSC 无法重建造血及多向分化。已有文献报道 RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2 等转录因子在内皮向造血转换过程中发挥着重要作用,在内皮细胞中特异性敲除 RUNX1 或 GATA2 均会影响内皮向造血的转换^[8,21]。进一步,本课题组通过 RT-PCR 检测 AGM 区 CD31⁺c-Kit^{high} 细胞群一些内皮向造血转换重要的转录因子 (RUNX1、P2-RUNX1 及 GATA2) 的表达,研究发现同对照组相比,这些转录因子在敲除组表达大幅度降低。而这些转录因子均可以促进内皮细胞向造血细胞转换。

本课题组之前发现通过 *Vav-Cre* 特异性敲除小鼠血细胞 PDK1 基因,可降低 HSC 的活性氧 (ROS) 水平,使得静息状态的 HSC 数目减少,进而 HSC 失去重建造血及多向分化的能力^[15]。这表明 PDK1 在小鼠不同的发育阶段,调控造血的机制是不同的,这也反映了造血调控的复杂性及精确性。值得注意的是,RICTOR 作为 AKT 另外一个磷酸化位点,和 PDK1 (可以磷酸化 AKT Thr308 位点) 类似,可以通过磷酸化 AKT 丝氨酸 473 位点进而使其活化。已有研究表明,通过 *Tie2-Cre* 在内皮中特异性敲除 RICTOR 基因,AGM 区重建造血能力显著降低 (对照组 19 只受体鼠重建 13 只,敲除组 15 只受体鼠重建 1 只),而通过 *Vav-Cre* 在造血细胞中特异敲除 RICTOR 基因,敲除组的 AGM 区可重建造血及多向分化 (嵌合率约为对照组嵌合率的 50%),这说明 RICTOR 在生血内皮中 HSC 的发生是不可或缺的,但对之后的 HSC 发育的必要性降低^[22]。而 PDK1 蛋白对 HSC 及造血祖细胞的发生及功能均是不可或

缺。此外,PDK1 对造血系统的其他种类血细胞作用及机制也有相关。PDK1 对 T 细胞的活化和功能的发挥具有重要作用。在适应性免疫应答中,T 细胞受体 (TCR) 识别抗原后激活转录因子 NF- κ B 对 T 细胞的活化与增殖具有重要作用^[23]。PDK1 对整合 TCR 和 CD28 信号来说是必不可少的^[16]。同时,PDK1 对 T 细胞的发育及增殖也具有重要作用。当在双阴性 (DN) 的胸腺细胞中条件性敲除 PDK1,则会破坏 pre-TCR 诱导的增殖,使 T 细胞发育阻滞在 DN4 期。降低 PDK1 的表达量时,虽然不会阻滞 T 细胞的分化,但会阻碍 T 细胞的扩增^[17]。B 细胞在适应性免疫应答和免疫记忆的形成均具有重要作用。Baracho 等^[19]通过条件性敲除 PDK1 基因,研究发现 B 细胞受体和其他细胞因子的受体需要 PDK1,以促进骨髓中产生 B 细胞及成熟 B 细胞存活和活化。Venigalla 等^[18]通过 *Vav-Cre* 转基因小鼠在造血系统中特异的敲除 PDK1 基因,观察到敲除 PDK1 基因后会阻碍骨髓中 B 细胞从 pro-B 向 pre-B 发育的进程。刘俊岭课题组利用在血小板中特异性敲除 PDK1 基因的 Cre 小鼠研究发现,缺乏 PDK1 会引起轻微的血小板减少症。同时,体内实验研究结果显示 PDK1 在动脉的血栓形成中发挥重要的调控功能^[20]。

已有研究发现一些重要的蛋白如 FLI1^[24]、NOTCH1^[25]、LTK^[26]、GATA2^[27-28]、RUNX1^[8,21,29]、C-MYB 等^[30]均可以调控 AGM 区的造血,科学家试图寻找出一个可以调控造血的主导性基因,然而越来越多的实验结果表明造血发生是由多种细胞因子共同调控完成的。HSC 能够自我更新及多向分化,来源相对广泛,易于取材和处理,具有广阔和重要的临床应用价值。了解 AGM 区内皮向生血细胞转换对研究 HSC 的自然发生和发展及内皮细胞体外重编程均具有重要意义。然而,造血细胞的发生和发展是一个复杂而精细的过程,还存在许多未知的因素,需要继续探索。我们的研究显示,PDK1 对造血的发生和功能均有重要作用,敲除 PDK1 基因内皮细胞向生血细胞转换受阻,并使产生的 HSC 失去重建正常造血的能力,这将对体外培养及调控 HSC 具有重要的提示意义。我们今后的研究将着重于 PDK1 调控内皮向生血细胞转换的具体信号网络的解析。

参 考 文 献

- [1] Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: the development

- of mammalian hematopoietic stem cells[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(2):129-136. DOI: 10.1038/ni1560.
- [2] Frame JM, McGrath KE, Palis J. Erythro-myeloid progenitors: "definitive" hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 51(4):220-225. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.09.006.
- [3] Kaimakis P, Crisan M, Dzierzak E. The biochemistry of hematopoietic stem cell development[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(2):2395-2403. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.10.004.
- [4] Swiers G, Rode C, Azzoni E, et al. A short history of hemogenic endothelium [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 51(4):206-212. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.09.005.
- [5] Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium [J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 116-120. DOI: 10.1038/nature08764.
- [6] Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, et al. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos[J]. *Immunity*, 1998, 8(6):761-769.
- [7] Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6):625-636. DOI: 10.1016/j.stem.2008.09.018.
- [8] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 887-891. DOI: 10.1038/nature07619.
- [9] Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 892-895. DOI: 10.1038/nature07679.
- [10] Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha[J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4):261-269.
- [11] Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture [J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2):1-14.
- [12] Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1 [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 185-188.
- [13] Mora A, Komander D, van Aalten DM, et al. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15(2): 161-170.
- [14] Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice [J]. *EMBO J*, 2002, 21(14):3728-3738. DOI: 10.1093/emboj/cdf387.
- [15] Hu T, Li C, Wang L, et al. PDK1 plays a vital role on hematopoietic stem cell function [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):4943. DOI: 10.1038/s41598-017-05213-3.
- [16] Park SG, Schulze-Luehrman J, Hayden MS, et al. The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(2): 158-66. DOI: 10.1038/ni.1687.
- [17] Hinton HJ, Alessi DR, Cantrell DA. The serine kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) regulates T cell development [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(5):539-545. DOI: 10.1038/ni1062.
- [18] Venigalla RK, McGuire VA, Clarke R, et al. PDK1 regulates VDJ recombination, cell-cycle exit and survival during B-cell development [J]. *EMBO J*, 2013, 32(7): 1008-1022. DOI: 10.1038/emboj.2013.40.
- [19] Baracho GV, Cato MH, Zhu Z, et al. PDK1 regulates B cell differentiation and homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(26):9573-9578. DOI: 10.1073/pnas.1314562111.
- [20] Chen X, Zhang Y, Wang Y, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis [J]. *Blood*, 2013, 121(18): 3718-3726. DOI: 10.1182/blood-2012-10-461897.
- [21] Sroczynska P, Lancrin C, Kouskoff V, et al. The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis [J]. *Blood*, 2009, 114(26):5279-5289. DOI: 10.1182/blood-2009-05-222307.
- [22] Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 487-492. DOI: 10.1038/nature17997.
- [23] Lee KY, D'Acquisto F, Hayden MS, et al. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation [J]. *Science*, 2005, 308(5718): 114-118.
- [24] Kawada H, Ito T, Pharr PN, et al. Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice [J]. *Int J Hematol*, 2001, 73(4):463-468. DOI: 10.1007/BF02994008.
- [25] Kumano K, Chiba S, Kunisato A, et al. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells [J]. *Immunity*, 2003, 18(5):699-711.
- [26] Nobuhisa I, Takizawa M, Takaki S, et al. Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(23): 8486-8494.
- [27] Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, et al. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos [J]. *Blood*, 2003, 102(3):896-905. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3809.
- [28] de Pater E, Kaimakis P, Vink CS, et al. Gata2 is required for HSC generation and survival [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(13): 2843-2850. DOI: 10.1084/jem.20130751.
- [29] Bee T, Swiers G, Muroi S, et al. Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis [J]. *Blood*, 2010, 115(15): 3042-3050. DOI: 10.1182/blood-2009-08-238626.
- [30] Ys M, Chiba N, Mucenski ML, 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.

(收稿日期:2018-04-08)

(本文编辑:刘爽)