

封面：

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

单核-巨噬细胞分化的组蛋白甲基化重建

郑启凡

工作完成日期 2016-12-01

报告提交日期 2017-03-27

厦门大学

2017年 03月

单核-巨噬细胞分化的组蛋白甲基化重建

Reprogramming of histone methylation modification during the
monocyte-macrophage differentiation

博 士 后 姓 名 郑启凡

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 生物化学与分子生物学

研究工作起始时间 2015 年 03 月

研究工作期满时间 2017 年 03 月

厦 门 大 学

2017 年 03 月

厦门大学博士后研究工作报告

著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（ ）， 2、不保密（）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

内 容 摘 要

单核-巨噬细胞分化过程受到多方面因素的影响，不同分化诱导物激活不同信号通路引起的不同转录因子的改变进而导致单核-巨噬细胞的分化是目前研究巨噬细胞分化机制的基本思路。巨噬细胞分化过程中如何受动态建立的表观遗传学修饰、调控转录因子的动态变化机制仍未明了。本研究使用 ChIP-on-chip 发现了正性组蛋白甲基化修饰 H3K4me3 以及负性修饰 H3K27me3 在巨噬-细胞分化相关的转录因子启动子上均有修饰，如 *HOXAs* 和 *FOXOs* 等。*HOXAs* 基因的表达被快速抑制与单核-巨噬细胞分化进程密切相关。本研究采用染色质免疫共沉淀技术证明了 H3K4me3 参与调控 *HOXAs* 基因在起始和终末分化期，而 H3K27me3 在维持巨噬细胞功能维持期 *HOXAs* 基因的持续低水平表达。此外，H3K27me3 的重编程在单核-巨噬细胞分化过程中 *FOXOs* 基因的表达上调中起主要作用。有趣的是 H3K4me3 和/或 H3K27me3 的小分子抑制剂 MI-3 与 GSK126 显著促进 THP-1 和 K562 细胞向巨噬细胞的分化程序。综上所述，这些结果共同阐明了表观遗传的动态建立是单核-巨噬细胞分化、维持的关键分子机制。

关键词： 单核细胞；巨噬细胞；分化；TrxG；PcG

Abstract

Subset heterogeneity of the mononuclear phagocyte system (MPS) is controlled by defined transcriptional networks and programs; however, the dynamic establishment of programs that control broad, orchestrated expression of transcription factors (TFs) during the progression of monocyte-into-phagocyte (MP) differentiation remains largely unexplored. By using chromatin immunoprecipitation assays, we show the extensive trimethylation of histone H3 lysine 4 (H3K4me3) as well as histone H3 lysine 27 (H3K27me3) occupancy with broad footprints at the promoters of MP differentiation-related TFs, such as *HOXA* and *FOXO* genes, *KLF4*, *IRF8* and others. The rapid repression of *HOXA* genes was closely associated with the MP differentiation program. H3K4me3 participates in regulating *HOXA* genes at mild and terminal differentiation periods, while H3K27me3 maintains low-level expression of *HOXA* genes at phagocytic maintenance periods. Furthermore, the reprogramming of H3K27me3 plays a major role in the up-regulation of *KLF4* and *FOXO* genes during MP differentiation. Importantly, the pharmacological inhibition of H3K4me3 and/or H3K27me3 strikingly promotes the differentiation programs of THP-1 and K562 cells. Together, these findings elucidate mechanisms crucial to the dynamic establishment of epigenetic memory, which is central to the maintenance of the MP differentiation blockade.

Keywords: Monocyte; Macrophage; Differentiation; TrxG; PcG

目 次

1. 文献综述	1
1.1 单核-巨噬细胞系统概述	1
1.1.1 单核-巨噬细胞的起源与分化	1
1.1.2 单核巨噬细胞系统的生物学功能	2
1.2 调控单核-巨噬细胞系统的关键细胞信号通路及转录因子	3
1.2.1 调控单核-巨噬细胞系统分化的关键细胞信号通路	3
1.2.2 调控单核-巨噬细胞系统分化的关键转录因子	8
1.3 PcG 与 TrxG 组蛋白甲基转移酶家族的生物学功能及表观遗传学特性	11
1.4 免疫细胞分化的表观遗传学调控现状	14
1.5 结束语	16
2. 前言	17
3. 材料与方法	18
3.1 实验材料	18
3.1.1 细胞株与动物	18
3.1.2 化学药品及主要试剂	18
3.1.3 实验器材及设备	19
3.2 实验方法	20
3.2.1 细胞培养	20
3.2.2 流式细胞术	20
3.2.3 染色质免疫共沉淀 (ChIP)	21
3.2.4 酶联免疫吸附测定 (ELISA)	22
3.2.5 细胞核蛋白提取	24
3.2.6 Western Blotting	25
3.2.7 免疫荧光	26
3.2.8 RNA 干扰	26
3.2.9 小鼠骨髓干细胞分离与巨噬细胞诱导	27
3.2.10 RNA 的提取和 RT-PCR	27
3.2.11 ChIP-on-chip 及数据分析	29
3.2.12 统计学分析	29
4. 结果	30
4.1 单核-巨噬细胞分化模型建立	30
4.1.1 单核-巨噬细胞系模型建立	30
4.1.2 原代巨噬细胞模型建立	32
4.2 单核-巨噬细胞分化组蛋白修饰改变规律	33
4.3 组蛋白甲基化动态修饰调控单核-巨噬细胞分化关键转录因子	36
4.4 靶向组蛋白甲基化修饰调控单核-巨噬细胞分化	41
4.4 靶向组蛋白甲基转移酶抑制剂调控单核-巨噬细胞功能	44
5. 讨论	46
6. 结论	50
参考文献	51
博士生期间发表的学术论文、专著	73
简历	76

厦门大学博硕士论文摘要库

说 明

博士后研究工作报告的排版以全国博士后管理委员会办公室制定的统一格式为准（参见以上排版范例），研究报告封面统一以彩色羊皮卡纸制作，颜色不限，内页用纸为普通 A4 打印纸，单面或双面打印不限，正文字体为宋体小四。

为更好地保护博士后研究报告的著作权，请各位博士后在博士后研究工作报告中文摘要前加做《厦门大学博士后研究报告著作权使用声明》（具体格式见附件 2），并在该声明中明确保密年限。

出站时，提交 1 份研究报告至厦门大学图书馆，2 份给厦门大学人事处博士后管理办公室（学校定期提交给国家图书馆）。

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1. 文献综述

1.1 单核-巨噬细胞系统概述

单核-巨噬细胞系统 (Mononuclear phagocyte system, MPS) 是机体重要的免疫细胞组成, 具有抗感染、抗肿瘤和免疫调节等重要作用。单核-巨噬细胞系统包括骨髓中的单核细胞前体细胞、外周血中的单核细胞 (Monocyte, Mo)、以及组织中由单核细胞分化而来的巨噬细胞 (Macrophage, M ϕ) 和树突状细胞 (Dendritic cell, DC) [1]。单核细胞是血液循环中的 MPS 细胞, 其主要功能是作为巨噬细胞和树突状细胞的储存库或前体循环于全身, 在适当时进入组织分化为巨噬细胞或树突状细胞 [2, 3]。MPS 的突出特点是其异质性: 无论从形态还是从功能角度看, 血液循环中、淋巴器官中以及外周组织中的 MPS 细胞都各具特征。关于其亚群组成、分化关系、细胞特征以及组织分布, 至今仍然是研究的热点。阐明单核-巨噬细胞系统的分化、激活、效应的细胞和分子机制, 对深刻认识机体自身稳态、免疫应答、以及相关疾病发生发展, 最终建立有效的干预手段, 具有重要的理论和实际意义。

1.1.1 单核-巨噬细胞的起源与分化

单核细胞来源于骨髓干细胞分化而来的髓系祖细胞, 经过原 (始) 粒细胞, 前单核细胞发育为单核细胞进入血液, 随之进入全身各组织 (图 1)。进入组织中的单核细胞分化为巨噬细胞, 进入肝脏的巨噬细胞称为枯否氏细胞 (Kupffer cells, KCs), 进入肺脏为尘细胞 (Dust cells), 结缔组织中的组织细胞 (Histocytes), 神经组织中的小胶质细胞 (Microglial cells), 脾和淋巴结中的固定和游走巨噬细胞等。

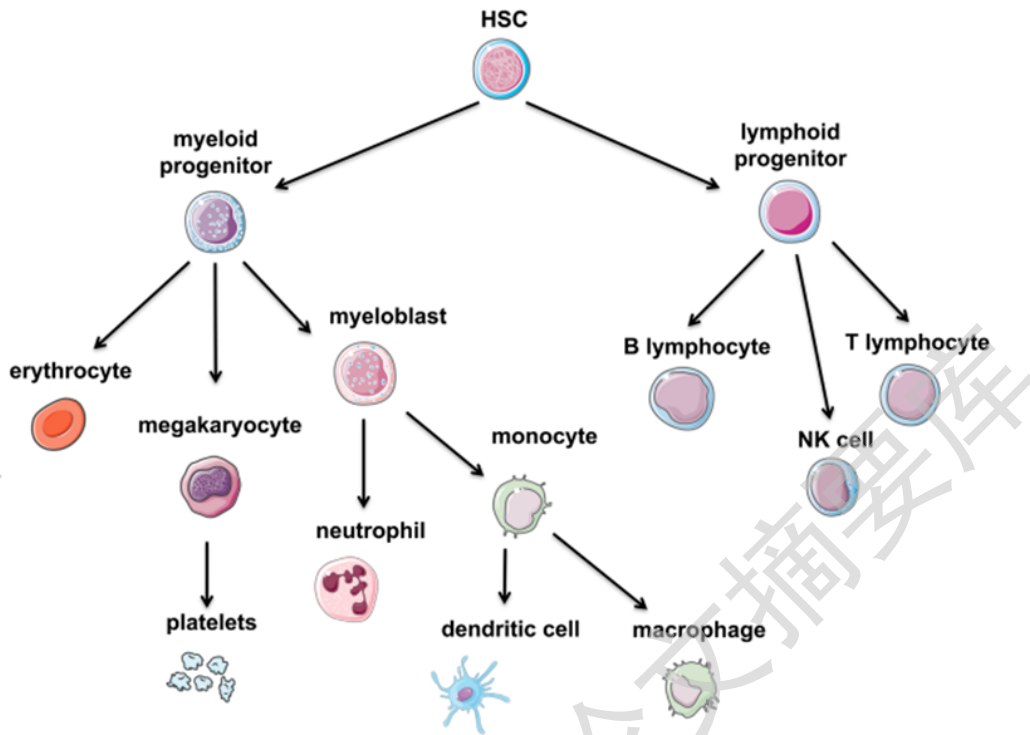


图 1 造血干细胞分化示意图 [4]

Figure 1. Hematopoietic stem cell differentiation diagram [4]

1.1.2 单核巨噬细胞系统的生物学功能

单核-巨噬细胞具有多种重要的生物学功能，包括（1）非特异免疫防御作用；（2）清除外来及衰老细胞；（3）通过抗原递呈连接固有免疫与特异性免疫；（4）非特异的免疫监视功能等，在机体免疫防御以及机体稳态的维持上起不可或缺的作用 [1, 5-8]。近年来，肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophage, TAMs）在各肿瘤的发生发展机制研究中备受关注。TAMs 可释放表皮生长因子（Epidermal Growth Factor, EGF），趋化因子，金属基质蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMPs）和血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor, VEGF）等，从而调控肿瘤生长，细胞外基质（Extracellular matrix, ECM）重塑，血管新生以及肿瘤侵袭与转移；还可抑制机体免疫系统的抗肿瘤免疫反应，其水平增高与患者预后不良有关 [9-11]。微环境的改变极大地促进了肿瘤的恶性进展，并在一定程度上参与了肿瘤的化疗抵抗。因此，亟需靶向肿瘤微环境中的巨噬细胞改变其分化方向从而改善肿瘤的预后。

1.2 调控单核-巨噬细胞系统的关键细胞信号通路和转录因子

单核细胞在不同的外界分化诱导物刺激下，如集落刺激因子（Colony-stimulating factors, CSF），类视黄醇（Deltanoids），IL-1 β 等细胞因子 [12-14]，通过激活不同的下游信号通路，诱导分化相关的重要转录因子的表达(图 2) [15]。

1.2.1 调控单核-巨噬细胞系统分化的关键细胞信号通路

1.2.1.1 PI3K/AKT 通路

PI3K/AKT 通路的激活依赖于细胞因子、生长因子等配体介导的受体活化 [16]，对造血细胞的存活有重要意义 [17]。PI3K 家族由三个亚家族（I-III 类）组成，其中 I 类已被证明参与血细胞分化的调节 [18]。I 类包括 G 蛋白偶联受体（G protein-coupled receptor, GPCR）和受体酪氨酸激酶激活的 IA 类 PI3K，此类 PI3K 包含一个调节亚基（p85 α ，p85 β ，p50 α ，p55 α 或 p55 γ ），一个催化亚基（p110 α ，p110 β 或 p110 δ ）的。以及选择性 GPCR 激活的 IB 类 PI3K（调节亚基：p101 α ，催化亚基：p110 γ ）。在激活和被招募到细胞膜后，I 类 PI3K 能够磷酸化膜结合的磷酸肌醇-4,5-二磷酸，导致磷酸肌醇-3,4,5-三磷酸（PIP3）的形成 [18]。PIP3 可作为蛋白激酶 B（PKB）（同种型： α ， β ， γ ）PH 结构域（pleckstrin homology domain）的锚定分子，将 PKB 募集到细胞膜。激活后的 PKB 能够转移到细胞浆并使其底物磷酸化。

已有报道，PI3K/PKB 分别在 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 诱导的 HL-60 细胞的单核细胞分化中、可溶性糖基化终产物受体（Soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE）诱导的单核-巨噬细胞分化中被活化 [19, 20]。PI3K 参与了单核细胞肌动蛋白重组和细胞粘附功能 [21, 22]。

糖原合酶激酶 3（Glycogen synthase kinase, GSK3），FOXO1/3/4 和 TSC1/2 等多种底物会受到 PKB 通路的负性调控 [18]。PI3K/PKB 通路参与骨髓单核祖细胞的增殖，存活和分化，已有研究证实 GSK3 通过负调节 C/EBP α 参与维持造血干细胞（Hematopoietic stem cell, HSC）和中性粒细胞的发育 [18]。此外，在 K562 慢性髓系白血病细胞中 GSK3 的失活可诱导 β -catenin 的表达 [23]。FOXO 蛋白负性调节 HSC 增殖/扩增和髓系细胞的定向分化 [18]。PKB 还通过抑制结节性硬化

蛋白 (Tuberous sclerosis protein, TSC1/2) 激活 Rheb (RAS homolog enriched in brain, mTOR 激活的 RAS 家族 GTP 酶的靶基因)。因此, PKB 可直接影响 mTOR 活性, 进而通过上调促增殖的 C/EBP α -p30 和 C/EBP β -LIP 而增强 HSC 和祖细胞的增殖[24-26]。还有研究显示, PIP3 参与了由 M-CSF 诱导和剪接体复合蛋白 THOC5 介导的 C/EBP α , C/EBP β 和 PU.1 的表达量增加[27], 表明 PI3K/PKB 信号转导通路在其中的重要作用。此外, PKB 还参与不同谱系的分化: 组成性活化的 PKB 可诱导中性粒细胞和单核细胞的形成[17]。

1.2.1.2 MAPK 通路

MAPK 信号调控细胞的基本生物学进程, 如细胞的增殖, 存活, 运动和迁移等关键信号通路, 并参与多种信号转导因子介导的信号通路, 如细胞因子, 生长因子等下游信号通路的转导[28, 29]。此外, MAPK 通路也参与 HSC 的分化和造血, 通常由细胞外信号调节激酶 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 和/或 c-Jun 的 N-末端激酶 (JNK) 来调节[30]。

哺乳动物 RAS 家族的小 GTP 酶包含多个成员 (H-, K-, N-, e-, R-, M-RAS, TC21, RalA/B, Rap1A/B, Rap2A/B/C, Rit1/2, Rheb/L1), 作为 RAF 家族激酶的活化剂[31]。RAS 依赖性信号通路的活化诱导转录因子 AP-1 (c-Jun, JunB 和 Fos 相关抗原 Fra-1/2) 的激活。一般来说, RAS 蛋白在调节细胞增殖、肿瘤发生及恶性进展中起重要作用, RAS 信号通路相关的抑制增殖能力是 RAS 促进单核细胞分化的重要特征[32]。RAS 通过诱导细胞周期抑制相关基因如 p15, p16, p19, p21 和 p53 的表达和/或活化从而负性调节多种细胞的细胞周期[33-35]。

在 U937 和 K562 细胞中转染组成性活化的 N-RAS 发现, 干扰素调节因子 (Interferon regulatory factor, IRF-1) 介导了 RAS 依赖的抑制增殖作用[36]。因此, RAS 介导的细胞增殖抑制可作为促进骨髓细胞的分化诱导剂[17]。RAS 的活化水平在 PMA (Phorbol-12-myristate 13-acetate) 诱导的 HL-60 细胞分化过程中显著增加[37]。在 RAS 活性受抑制的转基因小鼠中发现单核细胞终末分化的改变和血液中非典型单核细胞的积累[38]。在髓系祖细胞 (Common myeloid progenitor, CMP) 和粒细胞/单核细胞祖细胞 (Granulocyte/monocyte progenitor, GMP) 中, 组成性活化的 H-RAS 和 N-RAS 变异体有利于单核细胞谱系的形成[39]。用组成性活化的 H-RAS 转导人造血干细胞或鼠骨髓 FDC-P1 细胞可出现单

核细胞/巨噬细胞分化的增多，但在小鼠中也表现出血液肿瘤的发生[39, 40]。而在原代人造血干细胞中，组成性活化的 K-RAS 诱导了细胞短暂的增殖以及骨髓单核细胞的分化[41]。在 K-RAS 的下游，促增殖效应主要取决于 ERK 的活化，促进细胞分化主要通过 p38 来介导[41]。过表达 H-RAS 或 K-RAS 的 32D 细胞可被诱导出单核细胞分化表型，过表达 H-RAS 的原代小鼠骨髓细胞可出现巨噬细胞的分化表型[42, 43]。移植了过表达 H-RAS 的骨髓细胞的小鼠表现出（前）T 和 B 细胞淋巴瘤且单核细胞、巨噬细胞分化增加的特征[44, 45]。而 N-RAS 过表达的小鼠表现出髓系细胞的过度增殖[46]。此外，组成性活化的 H-RAS 通过 RAF 非依赖途径、蛋白激酶 C（Protein kinase C, PKC）依赖的方式增强了人类急性髓系白血病（Acute myeloid leukemia, AML）细胞 P39 对全反式维甲酸（All-trans retinoic acid ATRA）诱导的粒细胞和单核细胞分化的敏感性[47]。

RAS 激活的 RAF 家族激酶（RAF-A, RAF-B 和 c-RAF），尤其是 c-RAF，可进一步促进增殖和分化信号通路转导[30]。例如，c-RAF 参与了造血干细胞的增殖[48]，通过 IL-3 和 GM-CSF 诱导的早期造血干细胞集落形成[49]。在 PMA 诱导的 HL-60 细胞的单核细胞分化过程中 c-RAF 被激活[50]。在 PMA 不敏感的 HL60 细胞分化过程中使用冈田酸处理细胞可发现 c-RAF/MAPK 信号通路被激活，可能是由于丝氨酸-苏氨酸磷酸酶 1 和 2A 受到了抑制[50]。c-RAF 的过表达增强了 ATRA 依赖的粒细胞形成和在 HL-60 细胞中 1,25(OH)₂D₃ 依赖的单核细胞的形成[51]。此外，RAF 在 1,25(OH)₂D₃ 诱导的 HL-60 细胞的单核细胞分化过程后期通过 MEK/ERK 非依赖方式激活核糖体蛋白 S6 激酶起作用[52]。

RAF 激活主要靶向 MEK 家族激酶 MEK1/2 及其下游 ERK1/2[30]。在 32D 细胞中使用促增殖因子 IL-3，发现 MEK-ERK 仅被瞬时激活[53]。相反，在各种造血细胞或白血病细胞系中，MEK1/2 和 ERK1/2 在粒细胞和单核细胞分化过程中保持持续激活状态[53, 54]。例如在使用 PMA，1,25(OH)₂D₃，CDDO（2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid），sRAGE，UA（Ursolic acid）等诱导剂处理人类骨髓来源细胞 32D，M1，HL-60 和 U937 发生单核细胞分化过程中，若使用 MEK1/2 的抑制剂可显著抑制单核细胞的分化[20, 54-58]。在使用 PMA 治疗人髓系白血病 TF-1a 细胞，使之向巨噬细胞分化的过程中，MEK1/2 的抑制剂也可阻断巨噬细胞的分化[59]。ERK1 敲除的小鼠表现出 CMP 的轻微增加，GMP 显著减少，表明 ERK1 在 CMP-GMP 分化中起重要作用，而巨噬细胞的形

成和功能则没有受到 ERK1 的影响[60]。在 M-CSF 和 TNF 联合处理的 U937 细胞中，持续的 ERK 激活与分化诱导相关[61]。有趣的是，在 1,25(OH)₂D₃ 诱导的 HL-60 细胞分化过程中，ERK1/2 在单核细胞发育的第一阶段高度活化，其特征是初始分化标志物增高的同时仍保留有细胞增殖能力；在分化的第二阶段，ERK1/2 激活水平降低而 p27 水平增加，导致细胞周期的阻滞，进而促进终末分化[62]。在维生素 E-琥珀酸诱导的 HL-60 细胞单核细胞分化期间，p21 和成视网膜瘤蛋白（Retinoblastoma protein, Rb）低磷酸化相关的增殖抑制也依赖于 ERK 活性[63]。在用维生素 D3 衍生物处理的 HL-60 细胞中也观察到相同的结果[64]。RAS-RAF-MEK-ERK 级联反应主要通过活化和/或诱导 PU.1, STAT3, C/EBP β , C/EBP α , 和 c-Fos 等转录因子介导细胞分化[53, 65, 66]。

单核细胞形成受另一通路 MAPK，即 MAP3K-MKK-JNK 通路的影响[29]。JNK 主要由上游激酶 MKK4/7 激活[29]，MKK4/7 又可被多种 MAP3K 激活[67]。JNK 家族成员及其同种型（p46 同种型：JNK1 α 1/ β 1, JNK2 α 1/ β 1, JNK3 α 1; p54 同种型：JNK1 α 2/ β 2, JNK2 α 2/ β 2, JNK3 α 2）对骨髓单核细胞分化影响的机制仍未被完全阐明[17, 67]。研究显示，JNK 在 PMA 处理的 THP-1 和 U937 细胞、1,25(OH)₂D₃-/鼠尾草酸处理的 HL-60 细胞的单核细胞分化过程中被激活[68-70]。

JNK1 β 1, JNK2 α 1 和 JNK2 α 2 主要在 LPS 刺激的 THP-1 单核细胞/巨噬细胞中表达和磷酸化[68]。JNK 的抑制导致 1,25(OH)₂D₃ 处理的 HL-60 细胞的单核细胞分化减少，抑制在 Shp2 转导的小鼠造血干细胞中蛋白酪氨酸磷酸酶（PTP）Shp2 诱导的单核前体细胞形成，和在原代小鼠骨髓细胞中 M-CSF 诱导的巨噬细胞的形成[70-72]。HPK1（Hematopoietic progenitor kinase1）诱导的 JNK 的持续活化有助于 M-CSF 诱导的原代小鼠造血干细胞的存活与分化，甚至不需要 IL-3 的辅助[73]。最近，已经研究证实 JNK 激活参与 GM-CSF 诱导条件下的原代人血液单核细胞分化中的自噬，这是血液单核细胞分化成熟和存活所必需的过程[74]。JNK 的活化可能通过激活 AP-1 家族的转录因子来促进细胞的分化，尤其是通过 c-Jun, JunB 和 JunD[70, 75]。

1.2.1.3 PKC 通路

蛋白激酶 C（Protein kinase C, PKC）家族激酶分为三组：典型 PKC（PKC α , β I, β II, γ ），新型 PKC（PKC σ , δ , ϵ , η , θ ）和非典型 PKC（PKC ζ , ι , λ ），

非典型 PKC 表现出与另外两组 PKC 相反的特征[76]。PKC 家族成员直接或间接调控多种细胞的生物学表型，如细胞增殖，细胞周期和分化[76]，PKC 是参与骨髓和单核细胞分化的重要分子之一[17]。

PKC 依赖的信号级联反应通常由 GPCR，受体酪氨酸激酶（Receptor tyrosine kinase, RTK）或非受体酪氨酸激酶接受多种刺激（例如 CSF, PMA, 生长因子或细胞因子）触发，可导致磷脂酶 C 同种型的活化（例如 PLC β/γ ），二酰基甘油（DAG）和 Ca²⁺释放肌醇三磷酸盐的产生[76]。DAG 以 Ca²⁺依赖（常规 PKC）或非依赖（新型 PKC）方式激活典型和新型 PKC；而非典型 PKC 是不依赖于 Ca²⁺/DAG 激活的，但依赖于神经酰胺（PKC ζ ）或 Src 家族激酶（SFK）（PKC 1/ λ ）。PKC 能够影响下游信号传导介质，如 GSK3 β 或 RAF1。因此，几组 PKC 可参与影响细胞的关键特征，PKC α 和 β 是影响髓系细胞分化方向和成熟的最重要的 PKC 同种型[17, 76]。在 PMA 或 GM-CSF 处理 U937 细胞或原代人单核细胞后，PKC α/β 迅速从细胞浆转移到细胞膜，并且保持持续活化状态[77-79]。在 1,25(OH)₂D₃ 诱导的 HL60 细胞的单核细胞分化过程中，PKC α 和 PKC β 的表达和活化水平均增强[80, 81]。虽然 PKC 活性通常取决于其在细胞膜的定位，高 PKC 活化水平和核 PKC 定位，但有研究报道 GMP 的单核细胞/巨噬细胞成熟与之相关，而低水平的 PKC 和胞质 PKC 分布与粒细胞形成相关[82-85]。然而，已经在早期造血前体细胞中证实高 PKC 活性有利于嗜酸性粒细胞的形成，而低 PKC 活性可诱导骨髓单核细胞的分化[86]。此外，在 PMA 诱导 U937 细胞分化期间，PKC 通过 RAS 和 ERK 通路诱导整合素唾液酸化以促进细胞粘附功能的增强[87]。在转录后水平，PKC 依赖性效应可由 c-Jun 介导，c-Jun 在 PMA 依赖的 PKC 激活后被诱导转录，C/EBP 蛋白直接被 PKC 或分化相关 miRNA（如 miR22）磷酸化[88-90]。

PKC α 的选择性激活与人原代单核细胞向巨噬细胞的分化成熟相关[78]，而对 PKC α/β I 的选择性抑制导致人原代单核细胞对 PMA 诱导的巨噬细胞的分化减少[79]。PKC α 组成性活化的原代 GMP 甚至可在粒细胞诱导剂作用下仍向巨噬细胞分化；PKC α 过表达直接促进 32D 细胞分化为巨噬细胞[91, 92]。这些效应至少部分由 PKC α 诱导的 JNK2 的磷酸化和随后被激活的 Jun 蛋白介导[93]。在 PMA 诱导的 U937 细胞中，PKC 的激活与细胞增殖阻滞和单核细胞分化相关[88]。

在 PKC β 缺失的 U937 细胞以及 PMA 不敏感的 HL60 细胞显示出低 PKC β

水平,即使在 PMA 存在下,两种细胞均不能进行单核-巨噬细胞分化,而在过表达 PKC β 后则可正常进行单核-巨噬细胞分化,说明 PKC β 介导了单核-巨噬细胞的分化[94, 95]。用 PKC β 特异性抑制剂处理 HL60 细胞中可以观察到类似的作用[96]。此外,已有证据表明巨噬细胞的分化与 PKC β 依赖的细胞外基质蛋白的表达相关[97]。

1.2.2 调控单核-巨噬细胞系统分化的关键转录因子

1.2.2.1 STATs

在外界刺激下,IFN 家族成员,CSF, M-CSF, G-CSF, 白血病抑制因子(LIF), IL-6, OSM, IL-13 和 IL-3 等通过激活由 JAK1, JAK2, JAK3 和 Tyk2 组成的 Janus 激酶(JAK)家族,诱导受体寡聚化诱导骨髓单核细胞分化[98] [17, 99-103]。活化后的 JAK 能够通过酪氨酸磷酸化直接激活 STAT 家族的转录因子(STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B 和 6)。

PTPcC 可通过 JAK1 和 Tyk2 的去磷酸化抑制 IL-6 和 LIF 诱导的 M1 细胞单核细胞分化[104]。JAK2 可介导 IL-3 诱导的鼠多能造血细胞系 EML 的 GMP 形成[105]。JAK3 在 IL-6 诱导的 M1 细胞的单核细胞分化过程中被激活[106]。此外,在 JAK3 敲除的小鼠中发现未成熟的粒细胞和单核细胞祖细胞数量明显增加,说明细胞的终末成熟分化依赖于 JAK3; JAK3 的过表达可加速 GM-CSF 处理的原代骨髓细胞的巨噬细胞分化进程[106, 107]。

已有研究表明 STAT1 在自发性或粘附分子诱导的原代人单核细胞分化中,以及 IFN- γ 诱导的 U937 细胞的单核细胞分化过程中被激活[108]。有趣的是,在此过程中,激活的 STAT1 不依赖于 JAK 的丝氨酸磷酸化,因为酪氨酸和丝氨酸磷酸化的 STAT1 能够诱导人单核细胞的分化标志物的产生,而在 U937 来源的单核细胞中,由 Tyk2 过表达引起的 STAT1 的组成性活化不能增强 STAT1 靶基因的转录[109, 110]。然而,在 U937 细胞中组成性表达酪氨酸磷酸化缺陷的 STAT1,细胞的增殖和分化均被抑制,表明 STAT1 酪氨酸磷酸化在此过程中是重要的,其功能可能通过二聚化与核转位实现[111]。在单核-巨噬细胞分化期间,核穿梭蛋白核仁素特异性介导 STAT1 的核转位[112]。用分泌的肿瘤抑制蛋白 Dickkopf-3 刺激人单核细胞诱导 STAT1/3 激活可导致 DC 样表型的分化[113]。小鼠骨髓来源的细胞中 STAT1, 3 和 5 的激活通常伴随骨髓细胞的扩增和巨噬细胞分化标志物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库