

第十四章

细胞增殖与分化 的分子机制

- 多细胞生物的体细胞命运有三种：经历细胞周期增殖；分化成具有特定功能的细胞；死亡并且从生物体中消失。
- 细胞的上述生物学过程受到严密调控，任何一方失控都能导致机体功能障碍和疾病。
- 本章介绍细胞增殖与分化的分子机制。

主要内容

1

细胞增殖的分子机制

2

细胞分化的分子机制

3

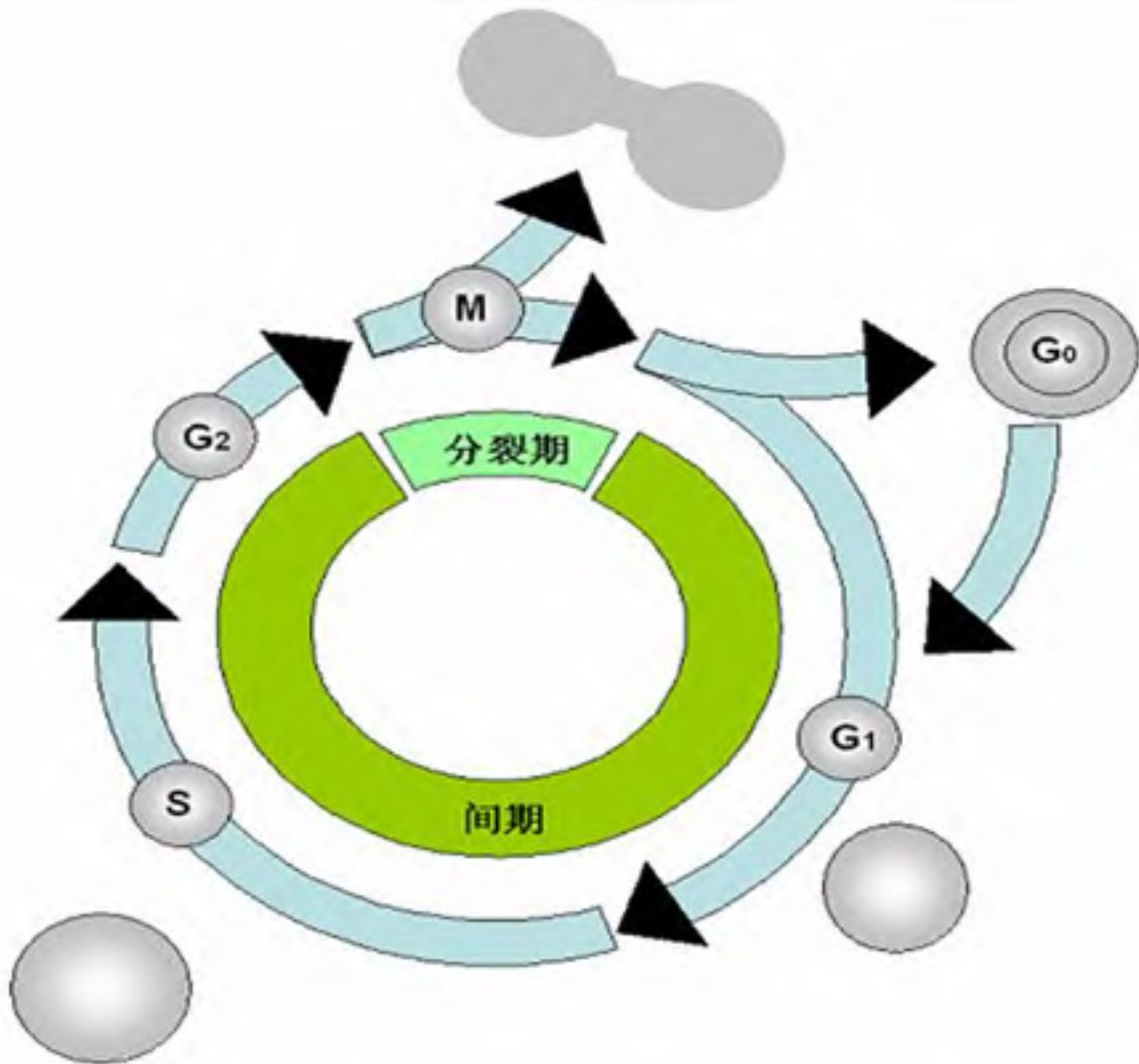
干细胞分化的分子机制

细胞增殖的分子机制

一、细胞周期及其调控概述

一) 细胞周期

指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的连续动态过程，可分为四个时期： G_1 、 S 、 G_2 、 M 期。



细胞周期中各期的生化特点

G1期： 从有丝分裂完成到**DNA**复制之前这一阶段，又称为复制前期。该期细胞内各种**RNA**、蛋白质合成增多。

S期： 又称为**DNA**合成期或复制期。该期细胞内遗传物质从二倍体到四倍体。组蛋白的合成也同时进行。

G2期：指**DNA**合成完成到有丝分裂开始这段时间，又称复制后期。该期**DNA**合成已终止，但仍然进行着**RNA**和蛋白合成。同时线粒体**DNA**在此期复制。

M期：又称为有丝分裂期。此期细胞呈球形，染色体在此期凝聚后分开，移向细胞两端，解聚并再形成两个完整的核，最后通过细胞质分裂，结束**M**期。该期蛋白质合成也显著减少，细胞质内的多核蛋白体大部分解体。

二) 细胞周期中的转折点或关卡

指对细胞周期转折处染色体物理完整性的监控以及对与某些细胞周期事件起始相关的生化途径的监控。

细胞在长期的进化过程中发展出了一套保证细胞周期中DNA复制和染色体分配质量的检查机制，通常被称为细胞周期转折点(check point)，是一类负反馈调节机制。当细胞周期进程中出现异常事件，如DNA损伤或DNA复制受阻，这类调节机制就被激活，及时中断细胞周期的运行，待细胞修复或排除故障后，细胞周期才能恢复运转，保证了在细胞周期中上一期事件完成以后才开始下一期的事件。

在一个细胞周期内至少存在四个关卡：



- **G1晚期的关卡：** 监控G1期细胞大小及环境中是否有生长因子。当细胞生长足够大，并且成功完成DNA复制准备工作，不再依赖生长因子，可通过关卡。
- **G1-S期关卡：** 监控DNA是否损伤。
- **G2-M期关卡：** 监控DNA是否损伤及DNA是否正确完全复制。
- **有丝分裂中期关卡：** 监控姐妹染色体是否稳定地附着在纺锤体上。

二、细胞周期调控机制

- ❖ 2001年10月8日美国人Leland Hartwell、英国人Paul Nurse、Timothy Hunt因发现“细胞周期的关键调节分子”而荣获诺贝尔生理学医学奖



Leland H. Hartwell



Tim Hunt



Sir Paul M. Nurse

一) 参与细胞周期调控的主要蛋白质

- 1、细胞周期蛋白 (Cyclin)
- 2、细胞周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin Dependent Kinase, CDK)
- 3、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI)
- 4、Rb蛋白及转录因子E2F
- 5、调节CDK磷酸化和去磷酸化的蛋白激酶和磷酸酶
- 6、泛素和使蛋白质泛素化的酶

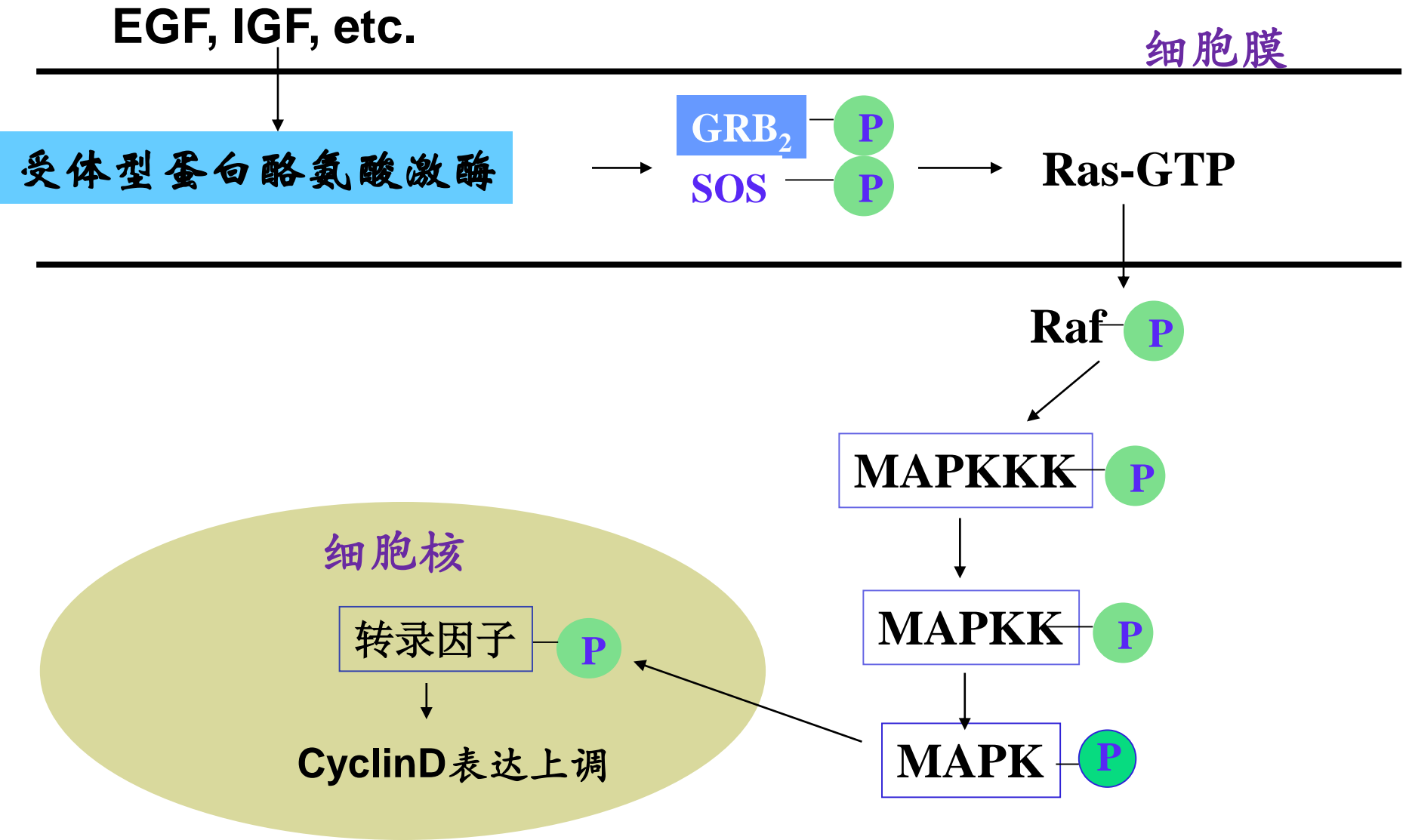
1、细胞周期蛋白（Cyclin）

- 细胞周期蛋白可分为A、B、D、E等类型。
- G1期细胞周期蛋白：CyclinD, CyclinC
- G1/S期细胞周期蛋白：CyclinE
- S期细胞周期蛋白：CyclinA
- M期细胞周期蛋白：CyclinB

❖ 细胞周期蛋白在细胞的不同时期内含量是可升或降的。它们在细胞核内的含量主要受以下几个因素调控：

- 1、生长因子诱导的基因表达；
- 2、泛素介导的蛋白质降解；
- 3、蛋白质在核与胞质间的运输。

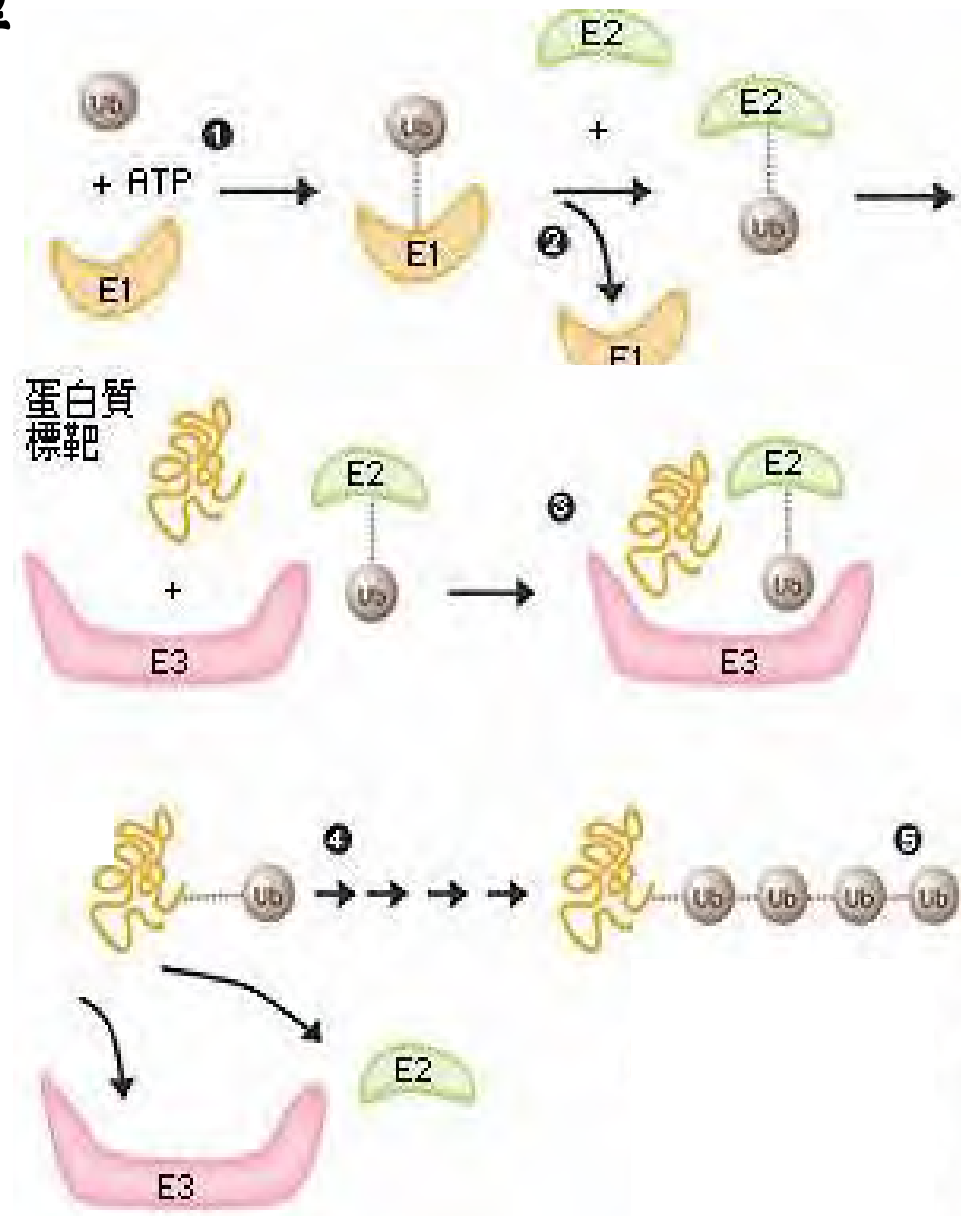
1. 生长因子诱导的基因表达



2、泛素介导的蛋白质降解

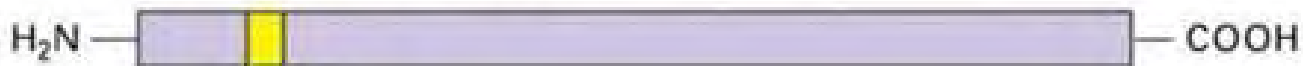
❖ 泛素化步骤

- 泛素激活酶E1利用ATP与泛素结合→泛素活化
- 泛素从E1转换到泛素结合酶E2
- E3识别Cyclin, E2将泛素转给Cyclin使之泛素化
- 被泛素化的蛋白质在26S的蛋白酶体中降解



泛素 (Ubiquitin) 介导的周期蛋白A和B的降解

(a) Mitotic cyclin destruction box 有丝分裂周期蛋白破坏框

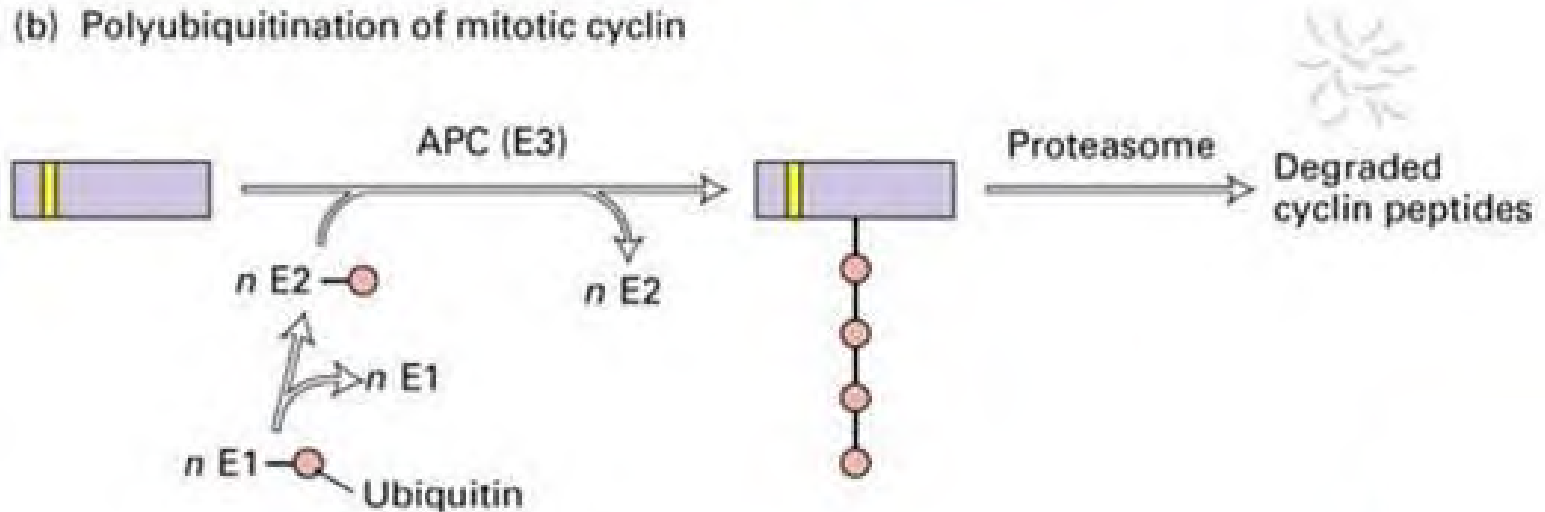


Cyclin A **Arg-Thr-Val-Leu-Gly-Val-Ile-Gly-Asp**

Cyclin B1 **Arg-Thr-Ala-Leu-Gly-Asp-Ile-Gly-Asn**

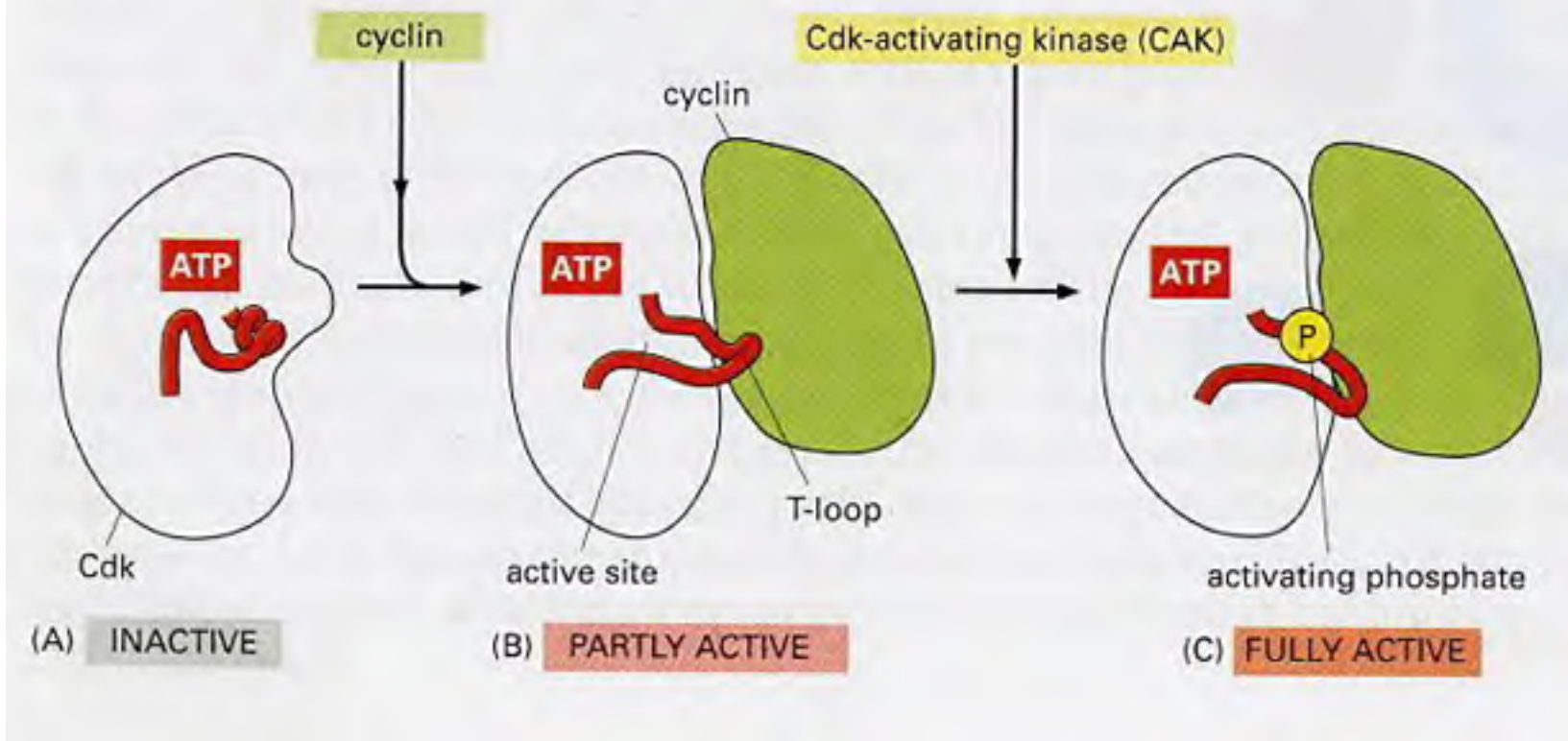
Cyclin B2 **Arg-Ala-Ala-Leu-Gly-Glu-Ile-Gly-Asn**

(b) Polyubiquitination of mitotic cyclin



2、细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK）

- CDK是细胞内组成型表达的核内丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。
- 单独存在无活性，与相应的细胞周期蛋白结合形成复合物才能具有活性。
- 在细胞周期蛋白结构中都有保守的100多个氨基酸残基的周期蛋白盒，该部位是与CDK结合部位。



• 可以认为:

- Cyclin + CDK = 有酶活性的蛋白复合体
- Cyclin为复合体的调节亚单位 (浓度随细胞周期变化)
- CDK为复合体的催化亚单位

- ❖ 底物：Rb蛋白、转录因子、组蛋白、细胞结构蛋白等，通过它们的活性调控细胞周期进程。
- ❖ CDK本身还受蛋白激酶和磷酸酶的催化。
- ❖ 细胞周期蛋白与CDK形成的复合物还受CDK抑制物（CKI）的抑制。

主要的细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶

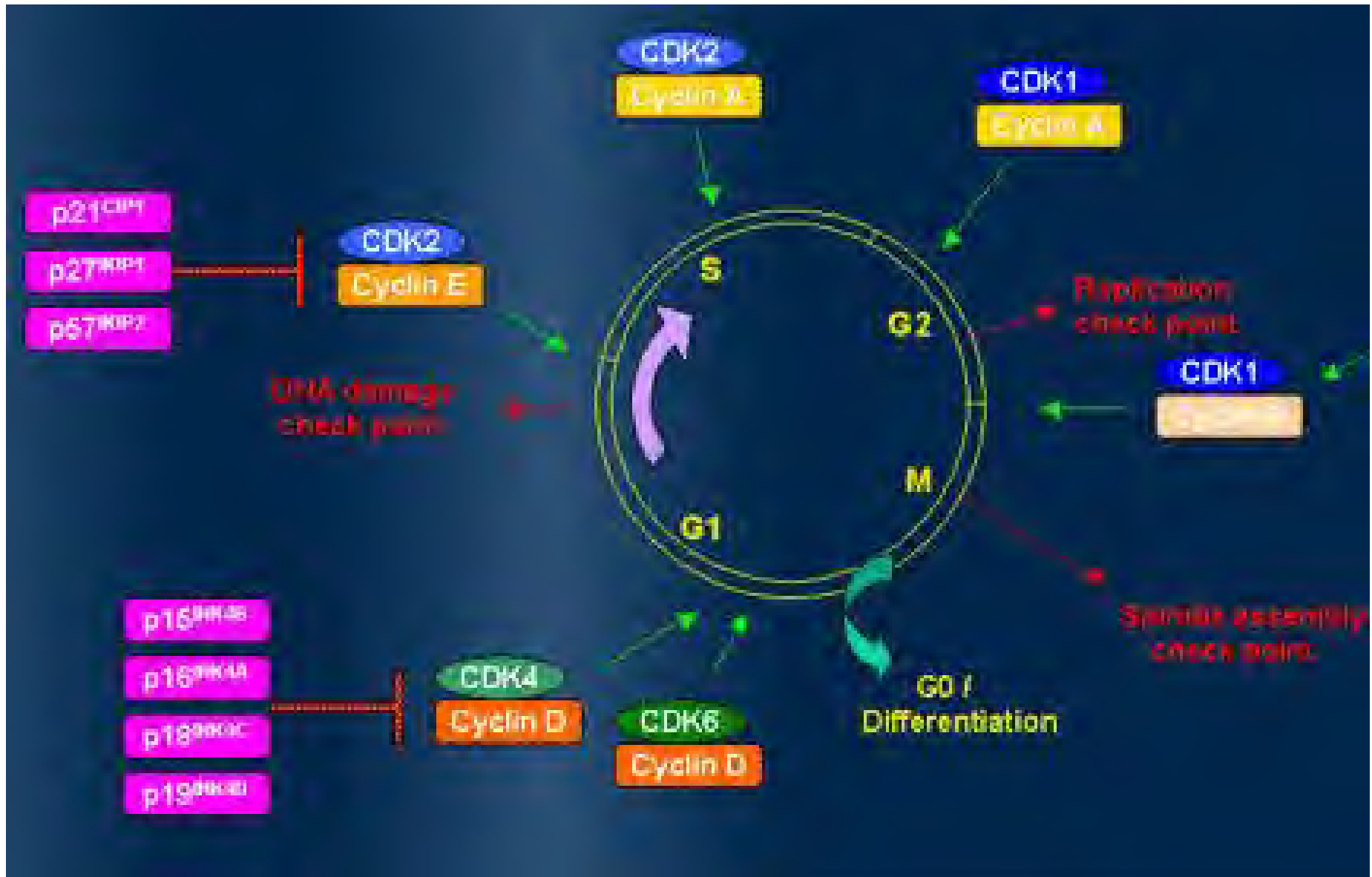
细胞周期蛋白	激酶	功能
Cyclin D	CDK2、CDK4、CDK6	G1期进入S期
Cyclin E	CDK2、CDK3	G1期进入S期
Cyclin A	CDK2	早S期DNA合成的起始
Cyclin A1	CDK2	早S期DNA合成的起始
Cyclin B	CDK1	G2期进入M期

3、CDK抑制物(CKI)

- 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（CKI）通过与Cyclin对CDK的竞争性结合，拮抗Cyclin的作用，从而调节细胞周期的进程。
- CKI可以单独与CDK结合，或与CDK-Cyclin复合物结合

CKI家族	功能	家族成员
<p>CDK4和CDK6 抑制因子 (INK4)家族</p>	<p>抑制CDK4和 CDK6的活性</p>	<p>p15 (INK4 b) p16 (INK4 a) p18 (INK4 c) p19 (INK4 d)</p>
<p>细胞因子诱导的 蛋白/激酶相互 作用蛋白 (Cip/Kip) 家族</p>	<p>抑制G1期的Cyclin - CDK复合物及CyclinB- CDK1复合物的活性</p>	<p>p21 (Cip1/Waf1) p27 (Kip1) p57 (Kip2)</p>

Cyclin、CDK与CKI的相互作用

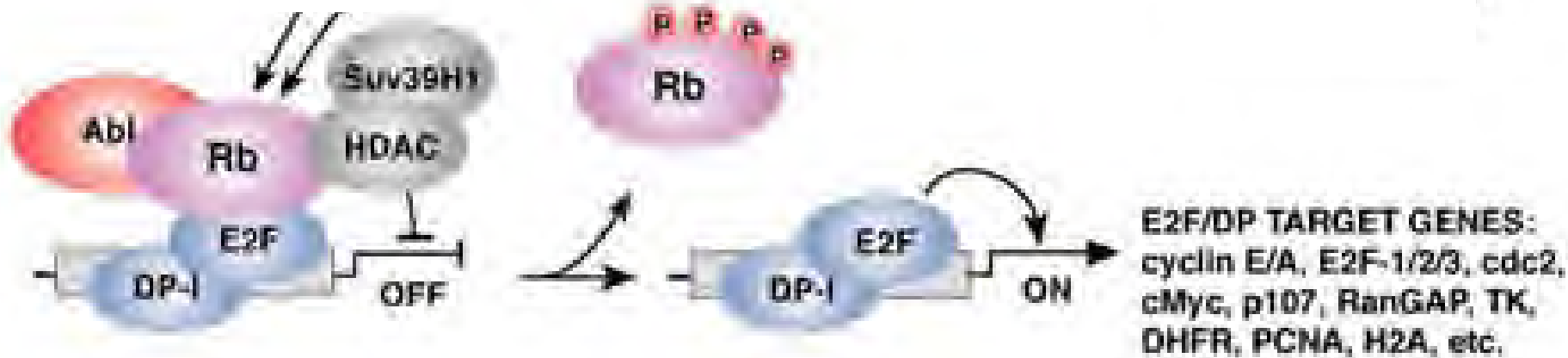


4、Rb蛋白及转录因子E2F

- 在许多DNA合成基因和细胞生长调控基因(如CyclinE、CyclinA和CDK1的基因)的启动子中均含有转录因子E2F的结合位点，E2F可以直接活化这些基因，启动DNA合成使细胞进入S期。
- E2F可与Rb结合，Rb遮盖E2F功能区，抑制其转录激活功能，抑制DNA合成。
- Rb家族有一口袋结构，故称口袋蛋白。目前发现三个成员：
Rb(P105), P107, P130

Rb蛋白与E2F的相互作用

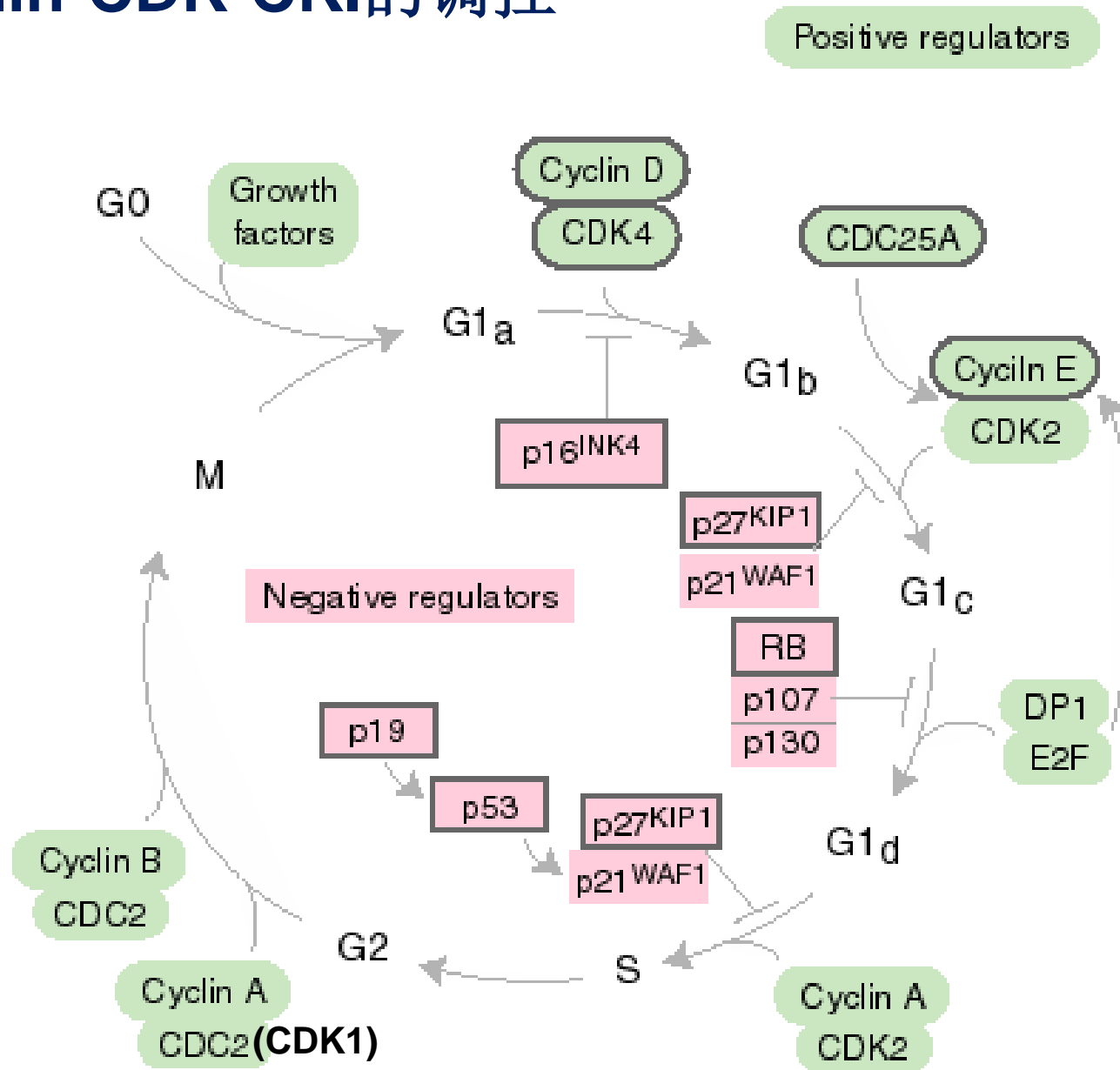
- **去磷酸化的Rb蛋白**与促进细胞分裂的某些转录因子 (E2F, CAB-1 蛋白等) 结合, 转录因子活性被抑制, 细胞周期停滞于G1期。
- CyclinD/CDK 4等激酶复合体使**Rb磷酸化**失活, 失活的Rb释放E2F等转录因子, 促使细胞进入S期。



二) 调控蛋白协同作用调控细胞周期

- 细胞周期的调控可分为外源和内源性调控, 外源性调控主要是细胞因子以及其它外界刺激引起; 内源性调控主要是通过Cyclin-CDK-CKI的网络调控来实现。
- G1早期, cyclinD表达并与CDK4/6结合, 成为始动细胞周期的启动子。
- G1晚期cyclinE表达, 并与CDK2结合, 推动细胞进入S期。
- 进入S期后, cyclin A表达, cyclinD、cyclin E降解。
- S晚期、G2早期, cyclin A、cyclin B表达, 并与CDK1结合, 促进细胞进入M期。

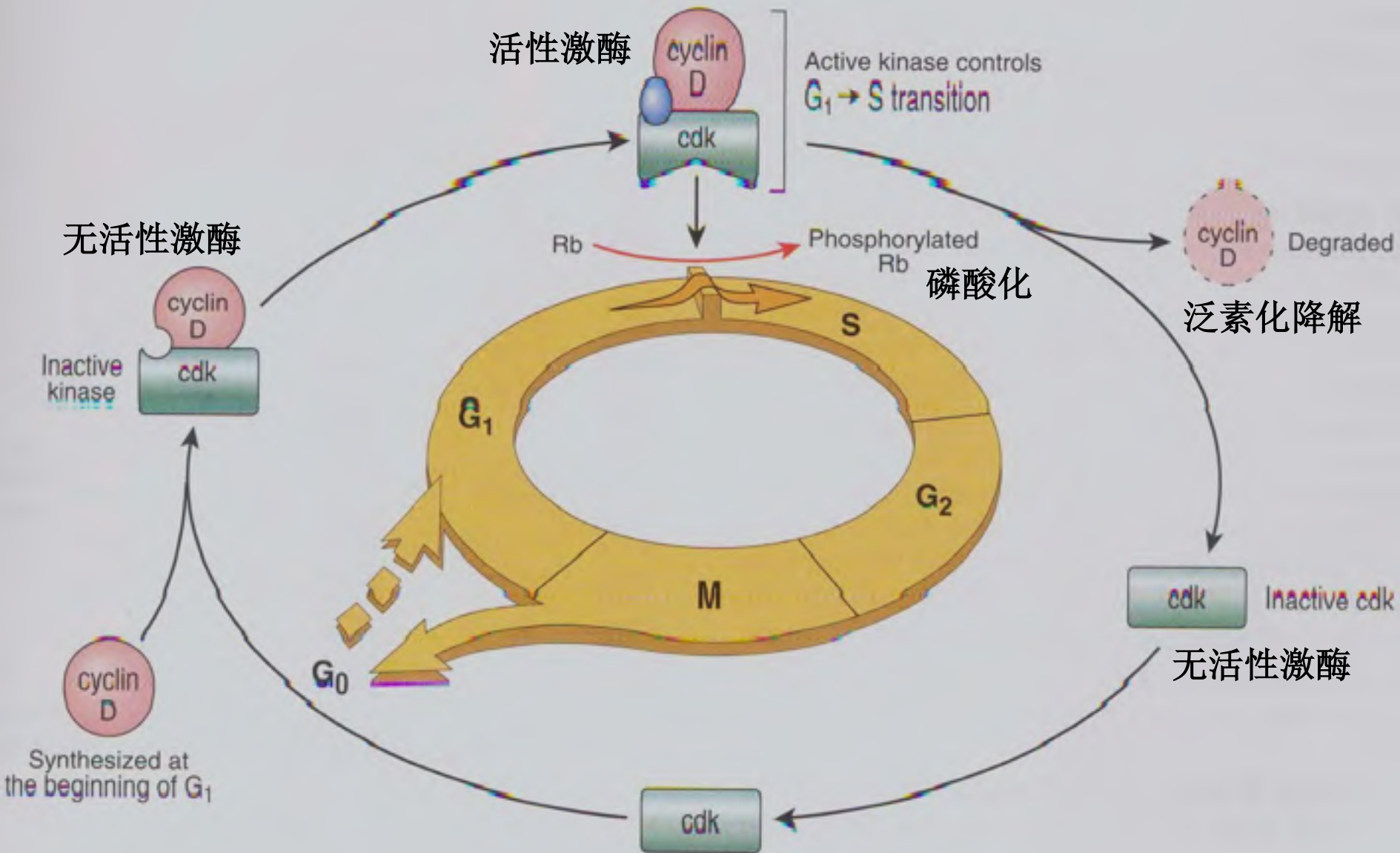
Cyclin-CDK-CKI的调控



1、 G1-S关卡调控的关键因素是CDK4/6和CDK2的活化

细胞在生长因子的刺激下，G1期CyclinD表达，并与CDK4、CDK6结合，使下游的蛋白质如Rb磷酸化，磷酸化的Rb释放出转录因子E2F，促进许多基因的转录，包括编码CyclinE、A的基因。

CDK4/6的活化

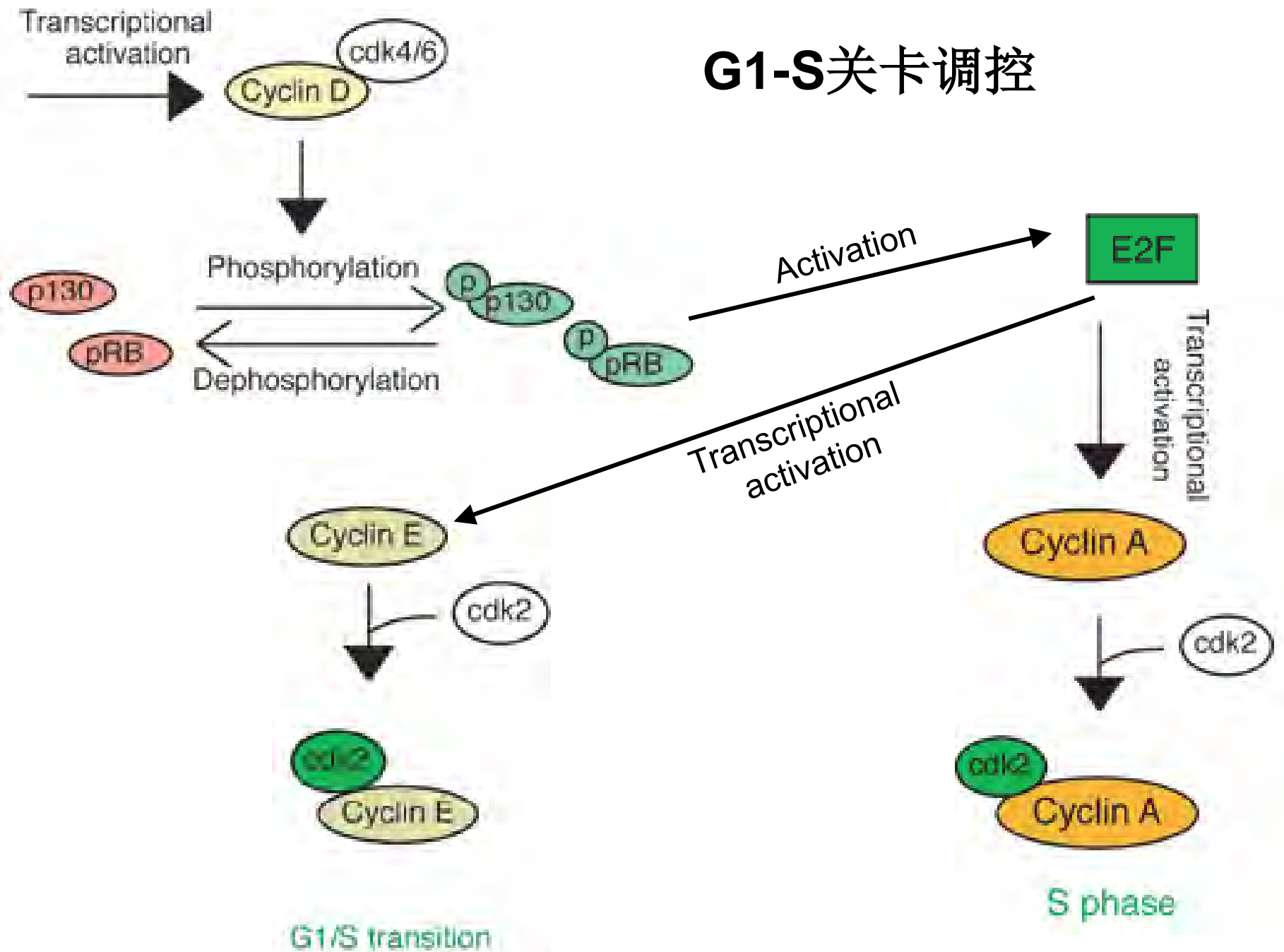


CDK2的活化

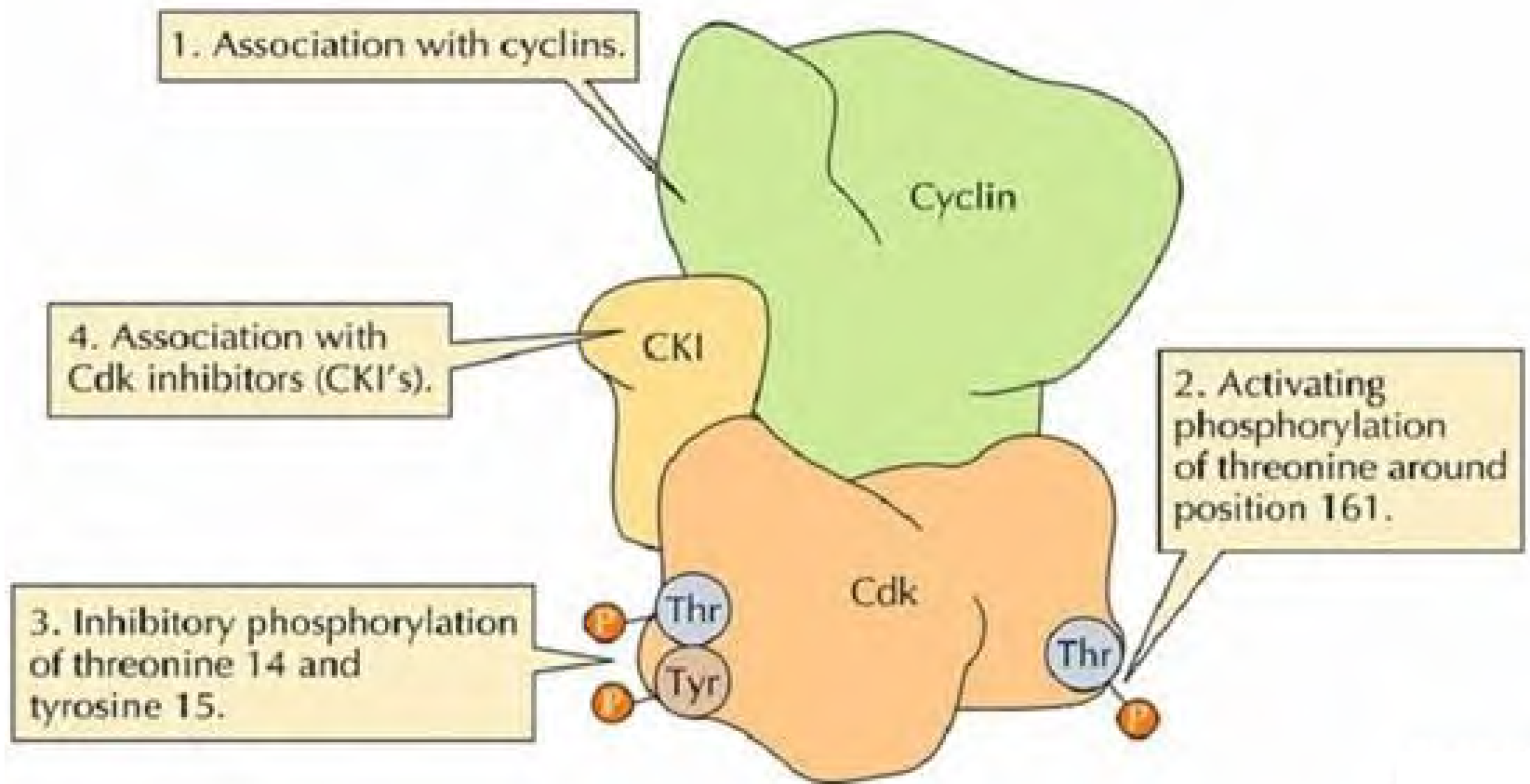
CyclinE的表达晚于**Cyclin D**，在**G1**晚期达到高峰。**CyclinE**与**CDK2**、**CDK3**结合，通过磷酸化使它们活化。

CDK2是调节**DNA**复制开始的关键酶，也能与**S**期合成的**CyclinA**及**A1**结合并使其激活，共同在**G1**到**S**期的转折中发挥作用。

G1-S关卡调控



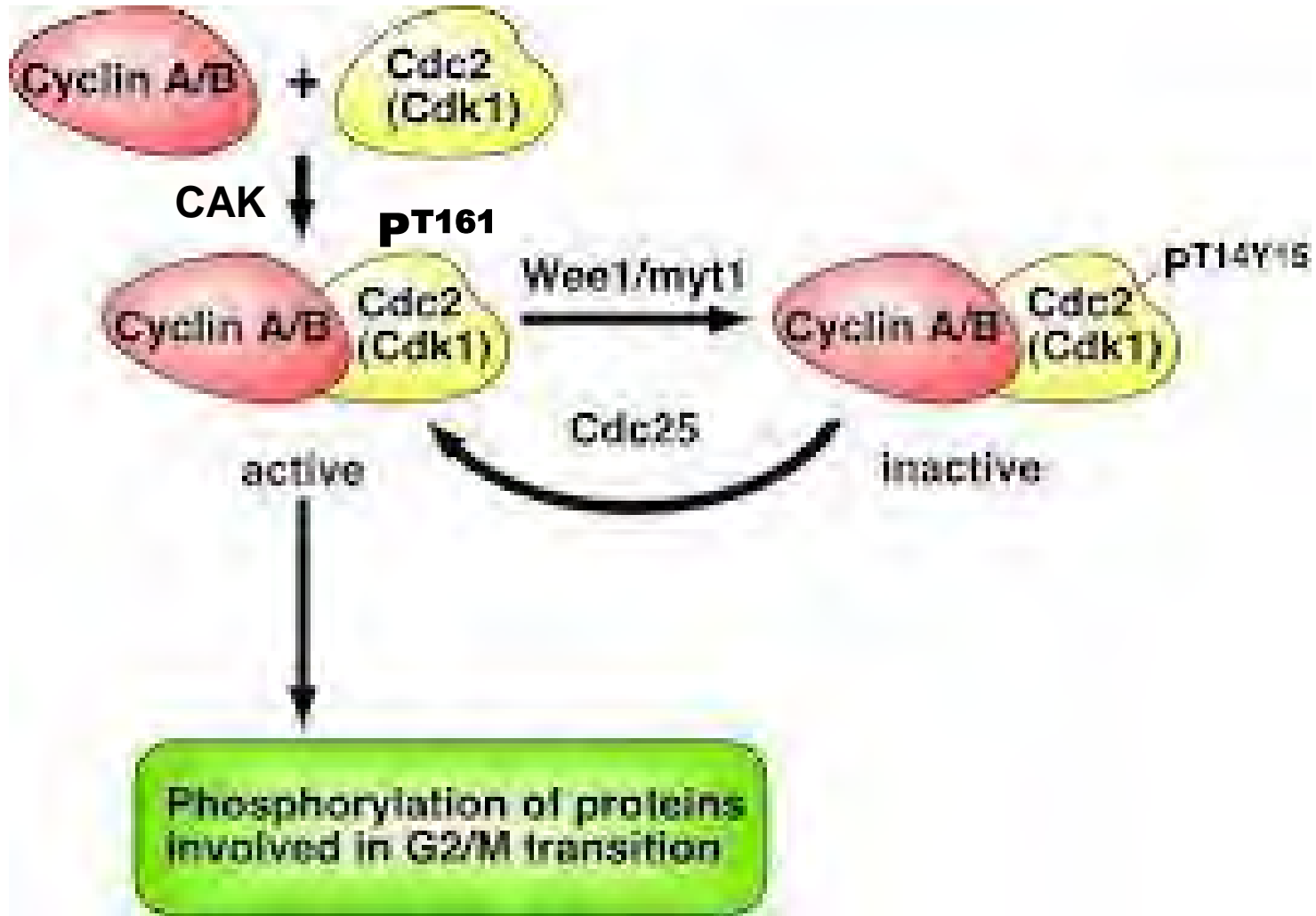
2、G2-M关卡调控的关键因素是CDK1(Cdc2)活化



CDK1的激活需要Thr14和Tyr15去磷酸化和Thr161的磷酸化

- ❖ CyclinB在G1后期合成，进入核内与CDK1结合成复合物，但CDK1此时被强磷酸化(T14, Y15, T161)，无活性。
- ❖ 在G2-M关卡，Cdc25磷酸酶被活化，使CDK1去磷酸化形成有活性的CyclinB-CDK1- $T_{161}Pi$ 复合物，从而磷酸化底物蛋白，如组蛋白1、核纤层蛋白、肌球蛋白等，为染色体分离做好准备，细胞通过关卡。

G2-M关卡的调控

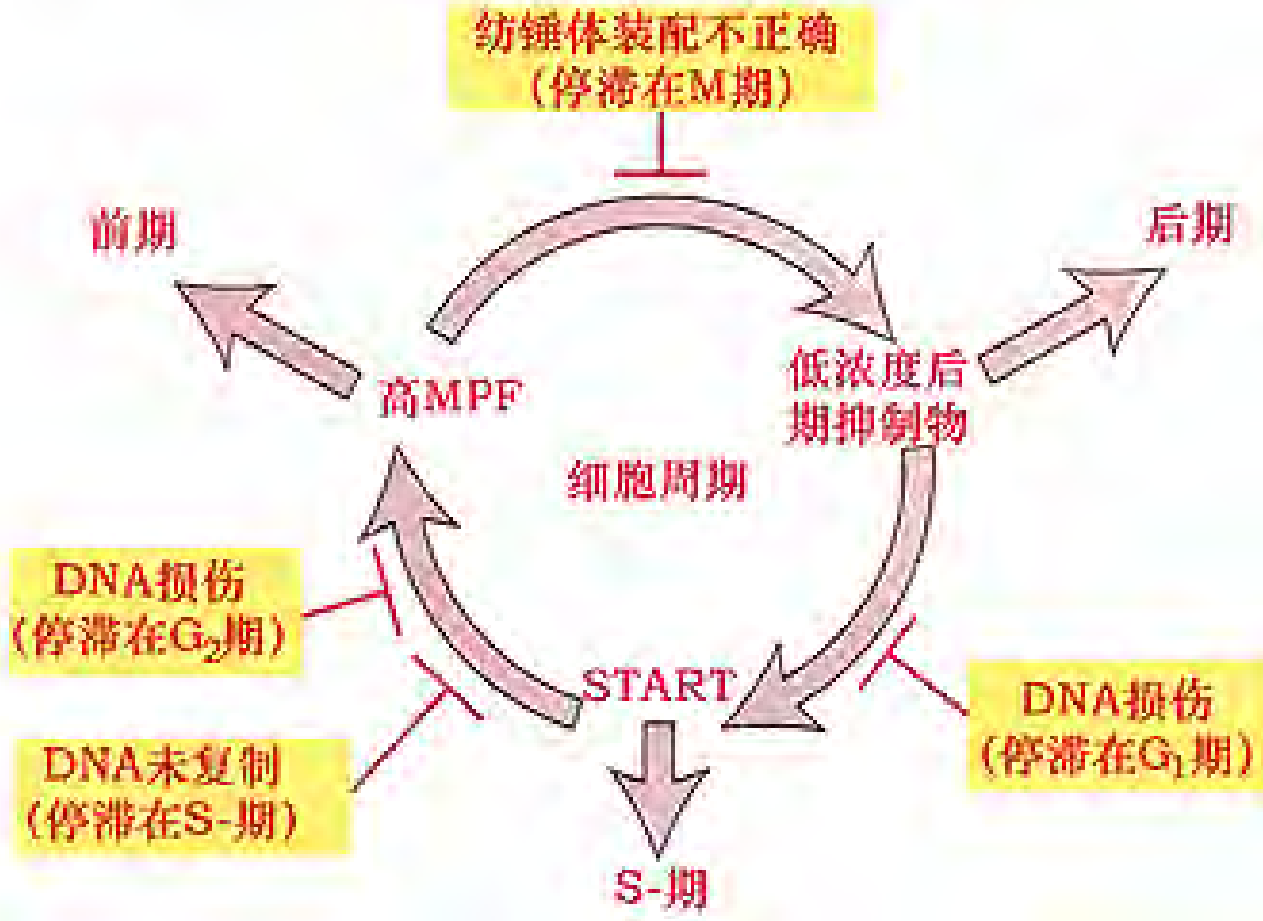


CDK激活激酶 (CDK-activating kinase, CAK)

3、细胞离开M期进入 G1期的关键因素是 APC介导的多泛素化蛋白降解

- M期的CyclinA/B-CDK1作用的底物之一是APC蛋白。
- APC（anaphase promoting complex，**细胞分裂后期促进复合体**）蛋白磷酸化后才有活性，负责将泛素连接到M期周期蛋白上。
- 在有丝分裂中期染色体分离组装完成后，结合在纺锤体处的APC蛋白被CyclinA/B-CDK1磷酸化而活化，最终导致连接姐妹染色体的蛋白质降解，细胞通过**有丝分裂中期关卡**，可进入G1。

4、DNA损伤关卡与G₁、G₂期停滞相关

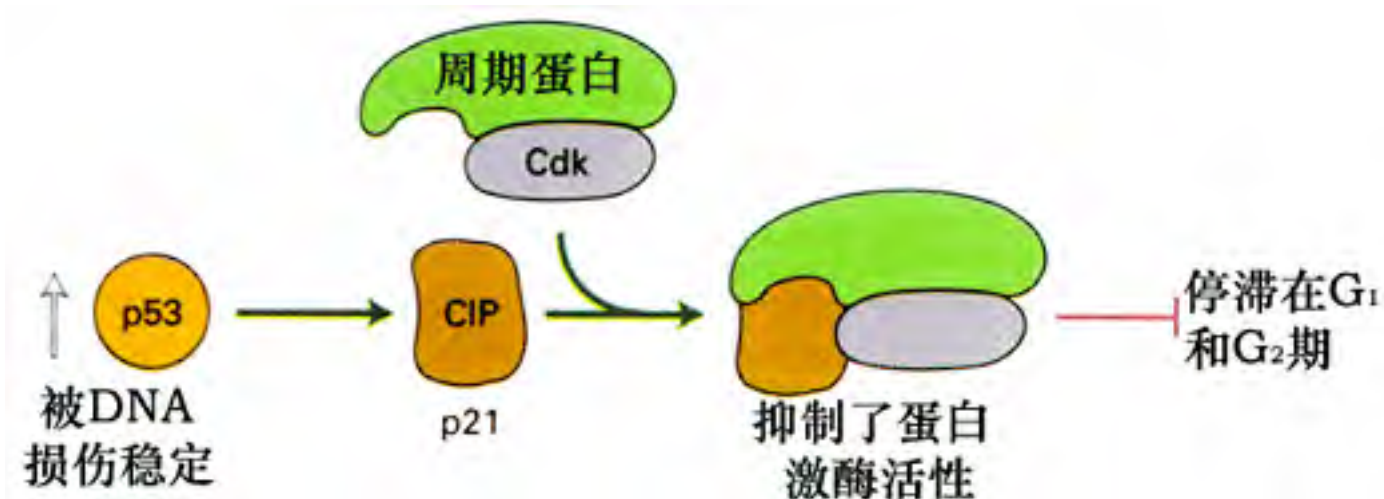


由于射线或化学因素引起的DNA损伤，可阻止G₁期的细胞进入S期、G₂期的细胞进入有丝分裂，直到受损伤的DNA被修复。

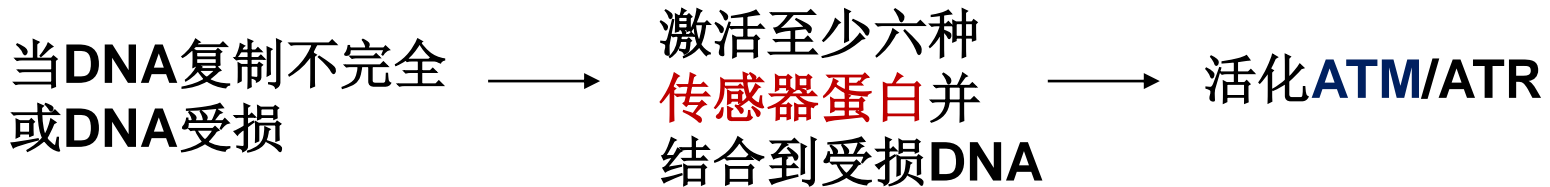
MPF为M期促进因子（M phrase-promoting factor）

肿瘤抑制基因p53的作用机制

- p53蛋白是一种转录因子, 正常条件下很不稳定, 因此不会积累到足够高的浓度。DNA损伤活化的CDK2可使p53磷酸化, 稳定性增加, 提高了它在细胞中的浓度。p53作为转录激活因子诱导p21^{CIP}的基因转录, 该蛋白是一种细胞周期蛋白激酶抑制因子(CKI), 能够与所有哺乳动物的CDK-周期蛋白复合物结合并抑制其活性。因此细胞被阻止在G₁期(或G₂期), 直到受损伤的DNA被修复。



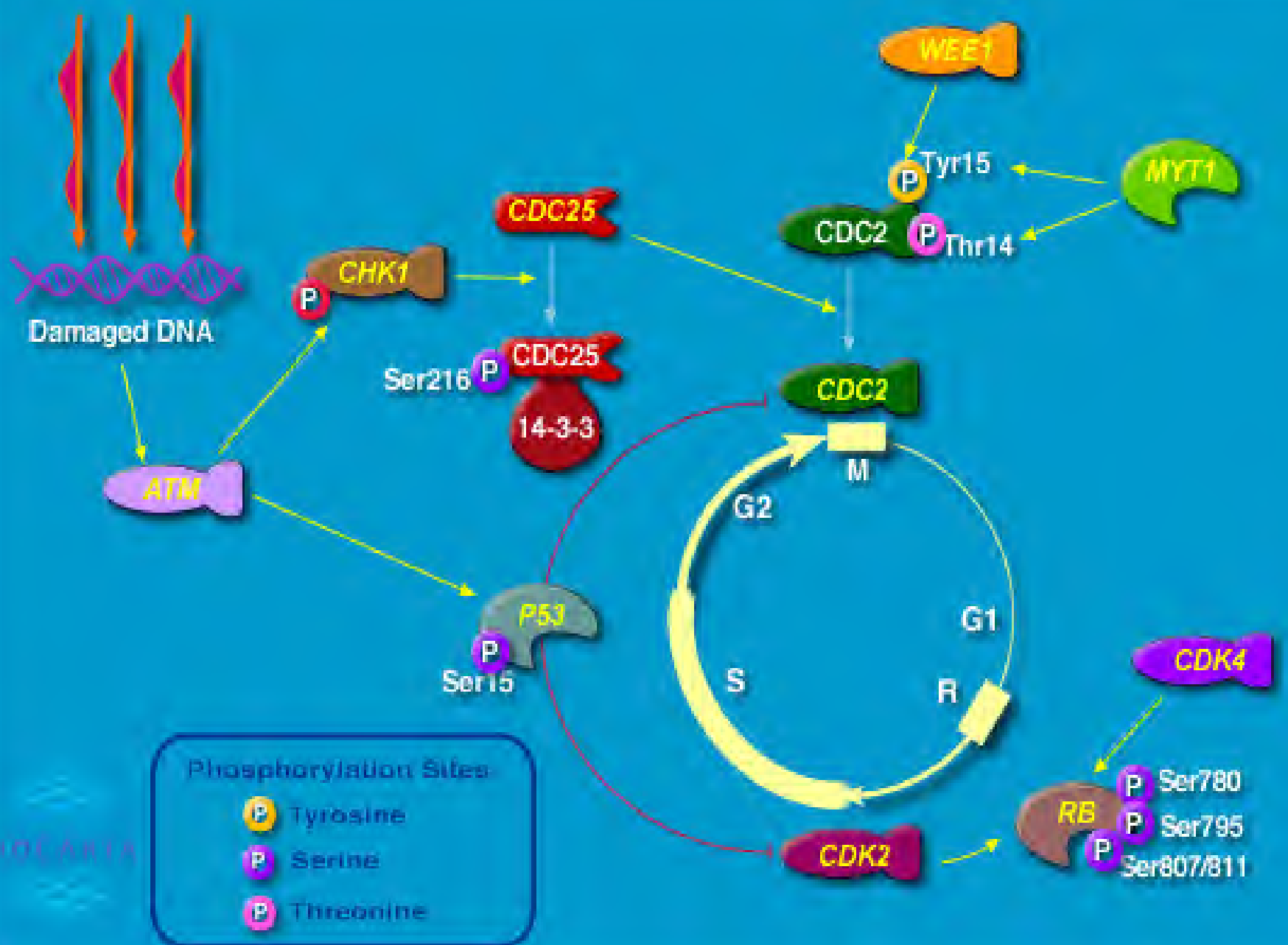
ATM活化导致细胞周期阻滞



ATM是与DNA损伤检验有关的一个重要基因，它编码一个蛋白激酶，结合在损伤的DNA上，能将某些蛋白磷酸化，中断细胞周期。

其信号通路有两条：

- ❖ 激活关卡激酶(checkpoint kinase) Chk1，抑制M期CDK的活性
- ❖ 激活Chk2，抑制G1-S期CDK的活性



Phosphorylation Sites:

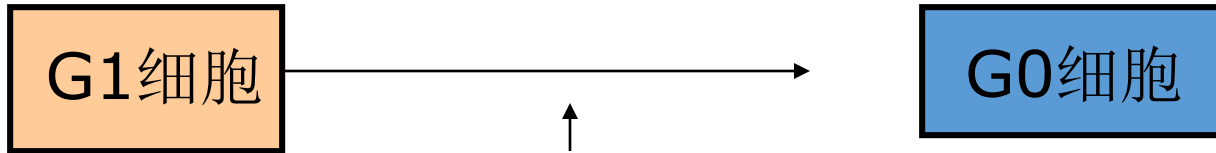
- P Tyrosine
- P Serine
- P Threonine

bioRxiv

三) 生长因子对细胞周期的调控

细胞周期调控受细胞外的生长因子等外在因素的作用，如：细胞生长环境中营养物质和氧气供应量、各种生长因子及细胞因子等。这些外在因素通过细胞膜上的信号转导对细胞周期调控蛋白的基因表达或生物活性进行调控，从而间接调控细胞周期。

1、多种生长因子的协同作用使细胞从G0进入细胞周期



- ① 环境中信号分子作用
- ② 环境中启动细胞分裂的生长因子不足
- ③ 体外培养的原代细胞分裂一定次数后开始衰老

除终末分化细胞和衰老细胞外，其它**G0**期细胞可经过三个阶段重返**G1**期：

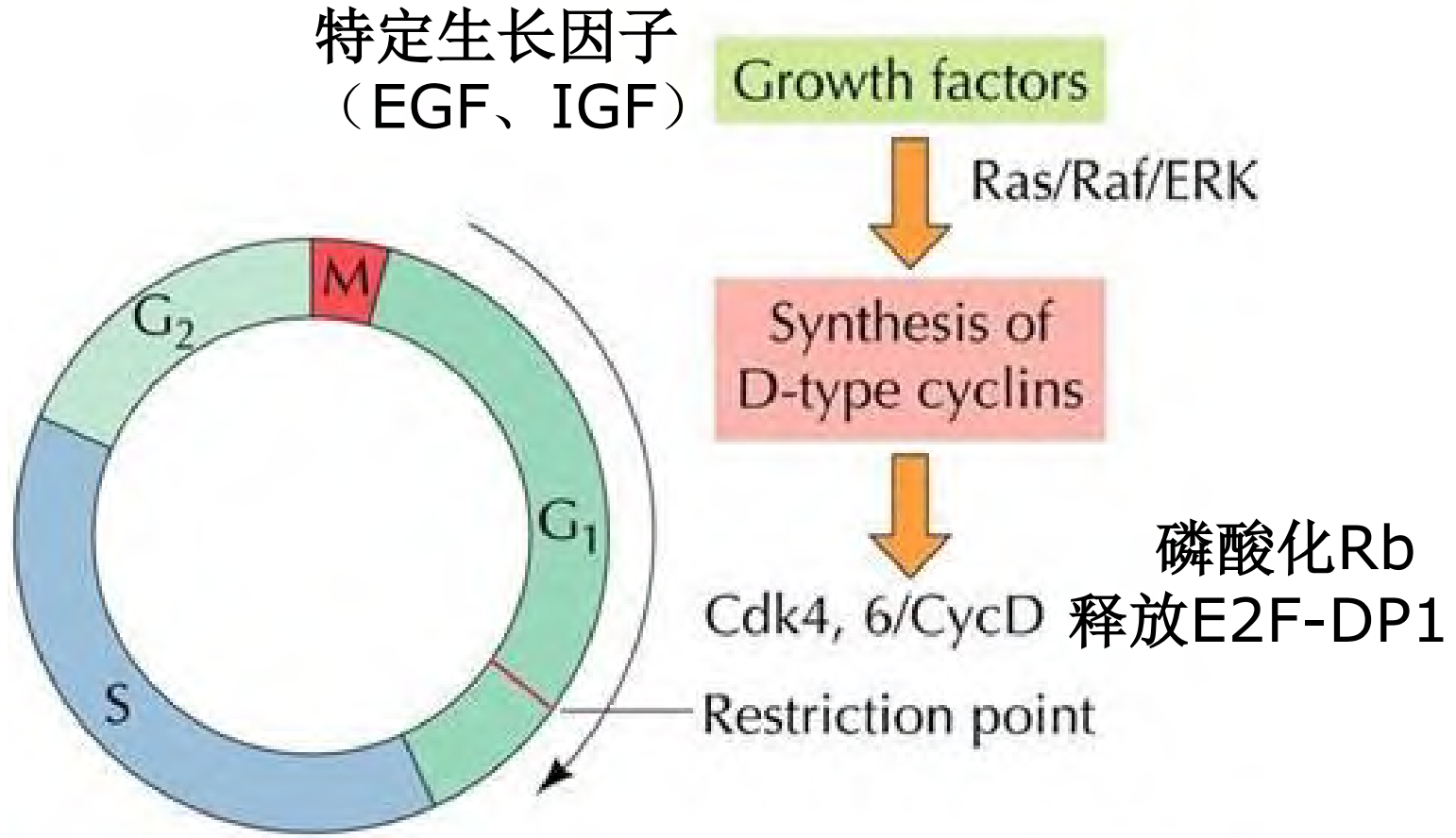
第一阶段：获得资格 需要血小板源生长因子

第二阶段：进入 需要血小板源生长因子、表皮生长因子、和胰岛素

第三阶段：进展 胰岛素样生长因子1

在多种生长因子协同作用下，通过各种信号转导途径最终活化细胞周期蛋白-**CDK**，从而使细胞进入**G1**期。

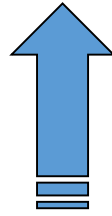
2、生长因子促进G1期的细胞周期进程



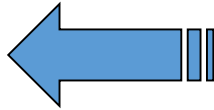
最终使细胞通过**G1**期限制点

细胞分化的分子机制

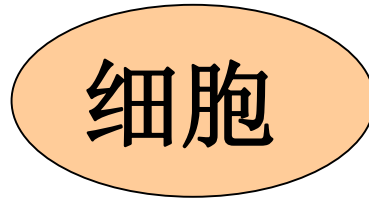
生长/分裂



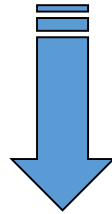
休眠



细胞



分化



死亡

细胞分化 (cell differentiation) 是指同一起来源的细胞发生一系列的内外变化，在形态、结构和生理功能上发生稳定性差异的过程。

细胞分化的实质是在细胞外界信号和细胞内调控因子的影响下，基因选择性表达的结果。

- **细胞分化**

- 渐进过程
- 贯穿生命的全过程

- **细胞定向或细胞决定**

- 细胞发育在某些关键时刻被定向
- 被定向的细胞最终发育为成熟细胞
- 不能从一种细胞轨道跳跃到另一细胞轨道

一、细胞分化过程中特异性基因的差异表达

特异性基因表达的调控机制：

- **差异基因转录：** 调节哪些核基因转录成RNA
- **核RNA的选择性加工：** 不同的拼接将导致同一条核RNA产生不同的转录子
- **mRNA的选择性翻译：** 调节哪些mRNA翻译成蛋白质
- **差别蛋白质加工：** 选择哪些蛋白质加工成为功能性蛋白质

一) 母体RNA的作用

- **动物卵细胞中贮存有大量mRNA，呈非均匀分布**
 - 用转录抑制剂放线菌素D处理海胆受精卵，胚胎发育仍能进行至囊胚期
 - 用蛋白质翻译抑制剂嘌呤霉素处理受精卵，受精卵停止发育
- **卵裂后细胞质的特性决定了子细胞核的分化命运**
 - 昆虫以表面卵裂的方式形成胚层细胞。迁入卵的后端极质部的细胞发育为原始生殖细胞，用紫外线照射这一区域，破坏极质，卵将发育为无生殖细胞的不育个体。

- 无论是母体mRNA的作用还是细胞间相互作用，其结果是启动特定基因的表达。
- 对果蝇、家蚕等实验动物的研究表明：
 - 卵受精后，首先表达的是母体基因；母体基因的产物是转录因子，沿胚的前后轴形成一个浓度梯度，决定了胚的前后位置和头尾区域；控制其它基因的表达。
 - 母体基因 → 间隙基因 → 成对基因 → 体节极性基因 → 同源异形基因（homeotic gene, Hox）

二) 奢侈基因中某些特定基因选择性表达

生物体细胞中含有决定生长分裂和分化的全部基因信息，按其
与细胞分化的关系，可将这些基因分为两大类：**奢侈基因**和**管家基
因**。

管家基因(house keeping gene)，这类基因的表达产物为细胞生命活
动持续需要和必不可少，但与细胞分化的关系不大，在细胞分化
中只起协助作用。

奢侈基因(luxury gene)，编码细胞特异性蛋白，与各种分化细胞的
特定性状直接相关，这类基因对细胞自身生存无直接影响。

- 从分子层次看，细胞分化主要是奢侈基因中某种（或某些）特定基因选择性表达的结果。某些基因的选择性表达合成了执行特定功能的蛋白质，从而产生特定的分化细胞类型。

在胚胎发育过程中，细胞基因组严格按时空顺序相继活化这一现象称为基因的**差异表达**（**differential expression**）或**顺序表达**（**sequential expression**）。

从一个受精卵开始，在个体发育的过程中逐步分化产生各种细胞类型和组织，这种分化就是不同特异性基因相继表达的结果。

珠蛋白基因的差异表达

- 红细胞中的血红蛋白，在发育中不同基因顺序地“开”“闭”，使珠蛋白四聚体的构成随时间发展相应发生变化。
- 哺乳动物早期胚胎中四聚体的组成为 $\alpha_2 \epsilon_2$ ，然后随着胚胎发育改变为 $\alpha_2 \gamma_2$ ，出生后主要为 $\alpha_2 \beta_2$ 。正常成人的血液中还含有少量珠蛋白 $\alpha_2 \delta_2$ 。 $\beta, \gamma, \epsilon, \delta$ 均由 β 样珠蛋白基因编码。 β 样珠蛋白基因具有严格的红系组织特异性和发育阶段专一性特点。

β 样珠蛋白基因表达的调节

β 样珠蛋白基因簇的结构



1. 顺式作用元件

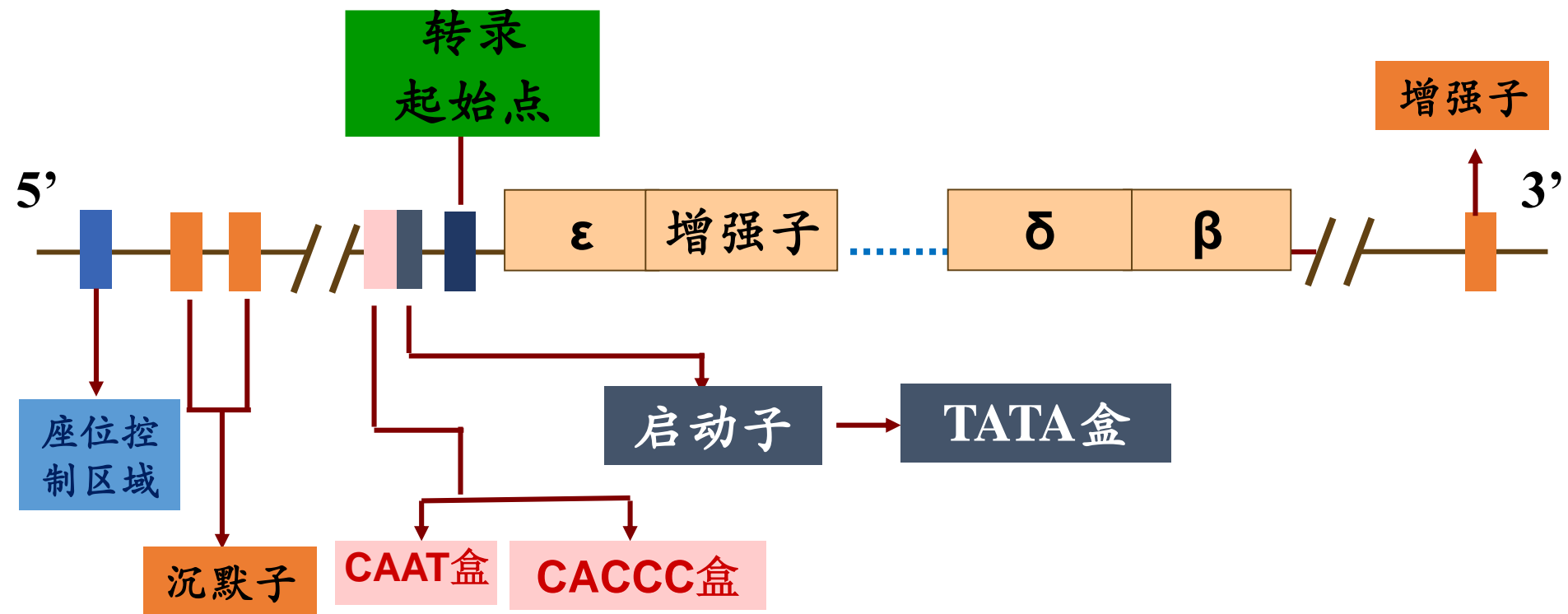
(1) 启动子：转录起始点(+1) 5'端上游含TATA盒、CAAT盒和CACCC盒。

- 若-30bpTATA盒点突变，将导致转录显著降低，引起β地中海贫血。
- 若-90bp处CACCC盒发生突变，将破坏红系特异调控因子的结合，也引起β地中海贫血。

(2) 增强子：2个增强子，分别位于人β珠蛋白基因内及3'端+2400bp处。

(3) 沉默子：人 β 珠蛋白基因5'旁侧-610bp到-490bp及-338bp到-233bp处各有一个沉默子，与相应的反式阻抑因子直接或间接作用。

(4) 座位控制区域（LCR）：位于人 ϵ 珠蛋白基因5'上游远侧端6~21kb间的一段DNA序列，含4个DNaseI超敏位点。LCR为红系组织专一的、层次更高的顺式作用元件。LCR的突变或缺失会导致各种贫血症。

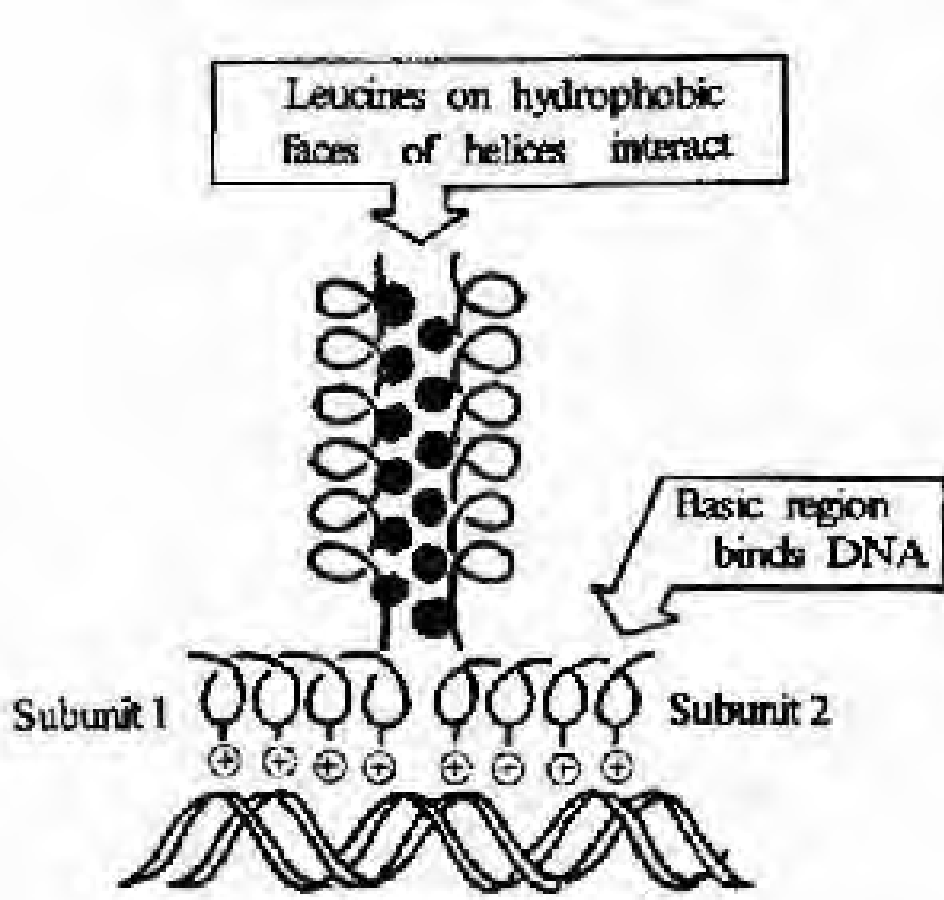


2. 反式作用因子

与人 β 样珠蛋白基因转录有关的反式调控因子分为基本转录因子（如**CPI**, **SP1**）和红细胞组织特异转录因子（如**GATA-1**, **NF-E2**等）两类。

CPI识别序列：**CCAAT**

SP1识别序列：**CACCC**



NF-E2蛋白：一种重要的转录反式作用因子，是由分子量分别为45kD (p45) 和18kD (p18) 的两类亚基构成的异二聚体，都是属于AP-1基因超家族的含碱性亮氨酸拉链的蛋白。

- **GATA-1**和**EKLF**也是重要的红系反式作用因子，在红系细胞的分化和基因表达过程中起关键作用，**GATA**位点突变会使红系分化终止。(Erythroid kruppel like factor)
- **GATA-1**和**EKLF**都可以通过**锌指结构**与其它蛋白因子相互作用形成核酸-蛋白复合物。**GATA-1**尚须辅助蛋白**FOG**存在。

3. 活性染色质结构与 β 珠蛋白基因的表达

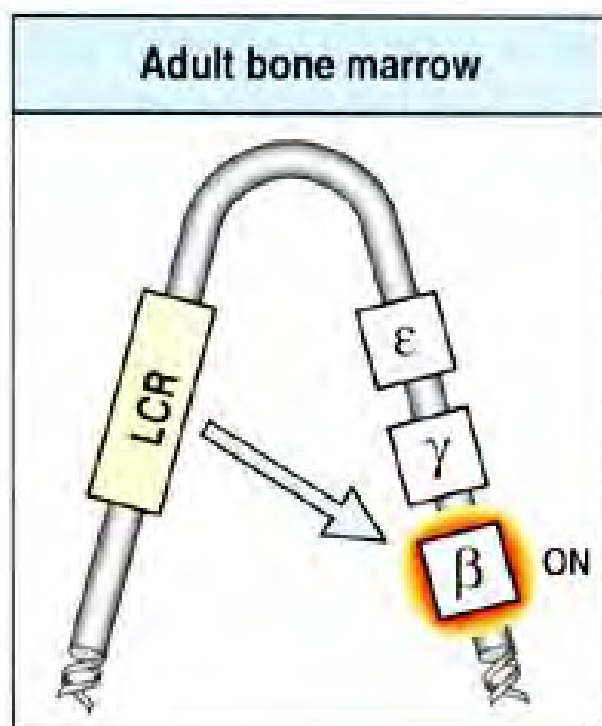
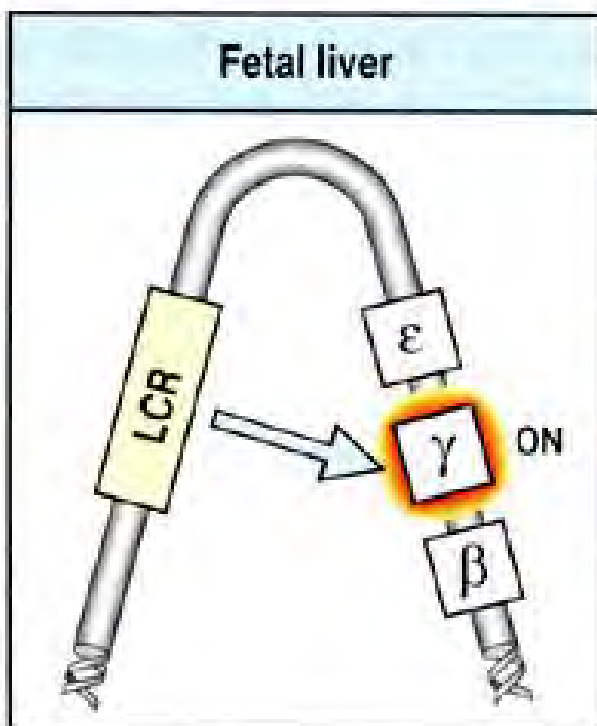
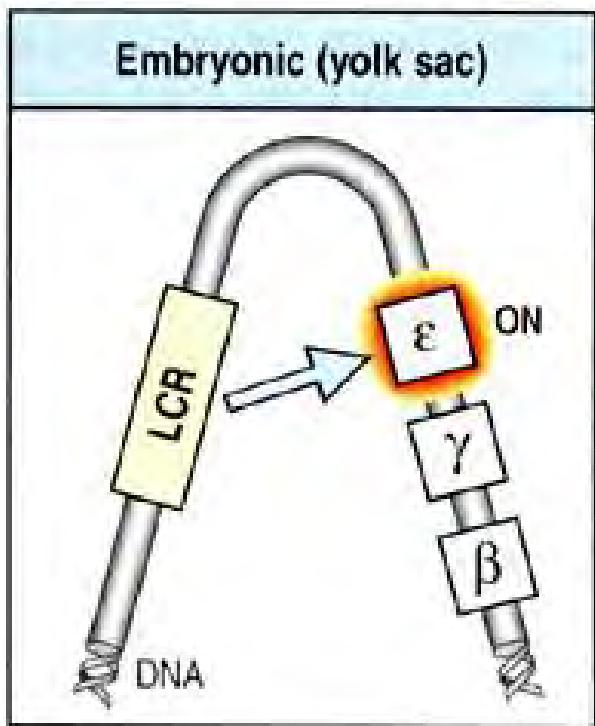
- 染色质解旋结构变化依赖于5'上游远侧端的LCR。一些地中海贫血症病人珠蛋白基因所在的染色质部分或完全缺乏LCR，即使 β 珠蛋白基因及其近侧端调控区结构完整，也不能表达 β 珠蛋白。
- 红细胞在发育过程中失去染色质解螺旋能力，仍保持对DNaseI的抗性，因而 β 珠蛋白结构基因处于非活性状态。

4. LCR与 β 样珠蛋白基因发育中的顺序表达

不同珠蛋白基因在染色体上的排列位置，对保持发育阶段的顺序性表达至关重要。

珠蛋白基因的位置与LCR相对距离的差异，可能影响各珠蛋白基因同LCR相互作用的频率，使近距离的珠蛋白基因优先表达，远距离的则在较后阶段被激活。

何时表达何种 β 样珠蛋白，决定于结合在特定珠蛋白基因启动子上的转录因子与结合在LCR上的因子之间的亲和力。



组合调控对特异性蛋白基因表达的调节

组合调控（combinational control）是指一组基因调节蛋白共同协调地决定对某一基因表达的调节方式。

组合调控可使细胞分化成特定的细胞类型

若将**MyoD**基因引入，取自鸡胚皮肤的体外培养的成纤维细胞出现成肌细胞的特征，并融合成多核肌肉样细胞，表达肌动蛋白、肌球蛋白并组成收缩装置，质膜产生受体蛋白及离子通道蛋白，接受来自神经的刺激。

但若将**MyoD**基因引入非成纤维细胞，细胞不转变为肌肉样细胞，说明成纤维细胞中已积累了其他必需的基因调节蛋白，在加入**MyoD**蛋白后，能完成特异的基因调节蛋白的组合，从而启动肌肉细胞的分化。

二、细胞分化的信号途径

- 细胞分化是一个非常复杂的过程, 有多种细胞信号分子参与
 - 细胞外信号网络
 - 细胞所处微环境的细胞生长因子
 - 邻近细胞表面分子
 - 细胞内信号网络
 - 细胞接受细胞外信号的受体及信号转导分子

Wnt信号通路

- Wnt信号通路广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中，是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路。Wnt信号在动物胚胎的早期发育、器官形成、组织再生和其它生理过程中，具有至关重要的作用。
- Wnt是一类分泌型糖蛋白，通过自分泌或旁分泌发挥作用。

- Wnt信号通路是一个复杂的调控网络，目前认为包括三个分支：
 - 1.经典Wnt信号通路，通过 β -连环素（ β -Catenin）激活基因转录；
 - 2.Wnt/PCP通路(planner cell polarity pathway),通过小G蛋白激活JNK（c-Jun N-terminal kinase）来调控细胞骨架重排；
 - 3.Wnt/ Ca^{2+} 通路，通过释放胞内 Ca^{2+} 来影响细胞粘附和相关基因表达。

经典Wnt信号途径

分泌型的配体蛋白Wnt与膜表面受体蛋白Frizzled结合

↓
激活胞内蛋白Dvl

↓
GSK3 β 等蛋白形成的 β -连环素的降解复合体解散

↓
 β -连环素积累，进入细胞核

↓
 β -连环素结合LEF/TCF转录因子家族

↓
启动下游靶基因（如*c-myc*、*Cyclin D1*等）的转录

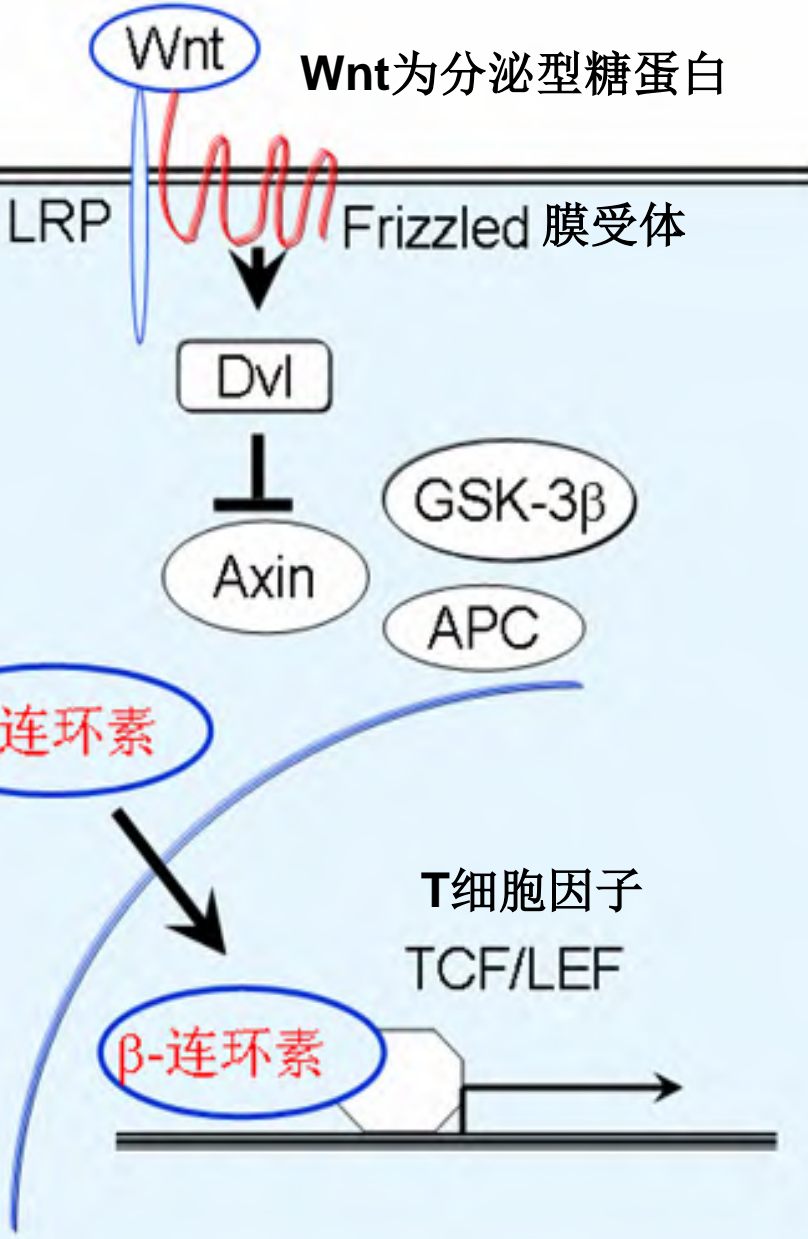
低密度脂蛋白相关受体



糖原合酶激酶3β



Wnt为分泌型糖蛋白

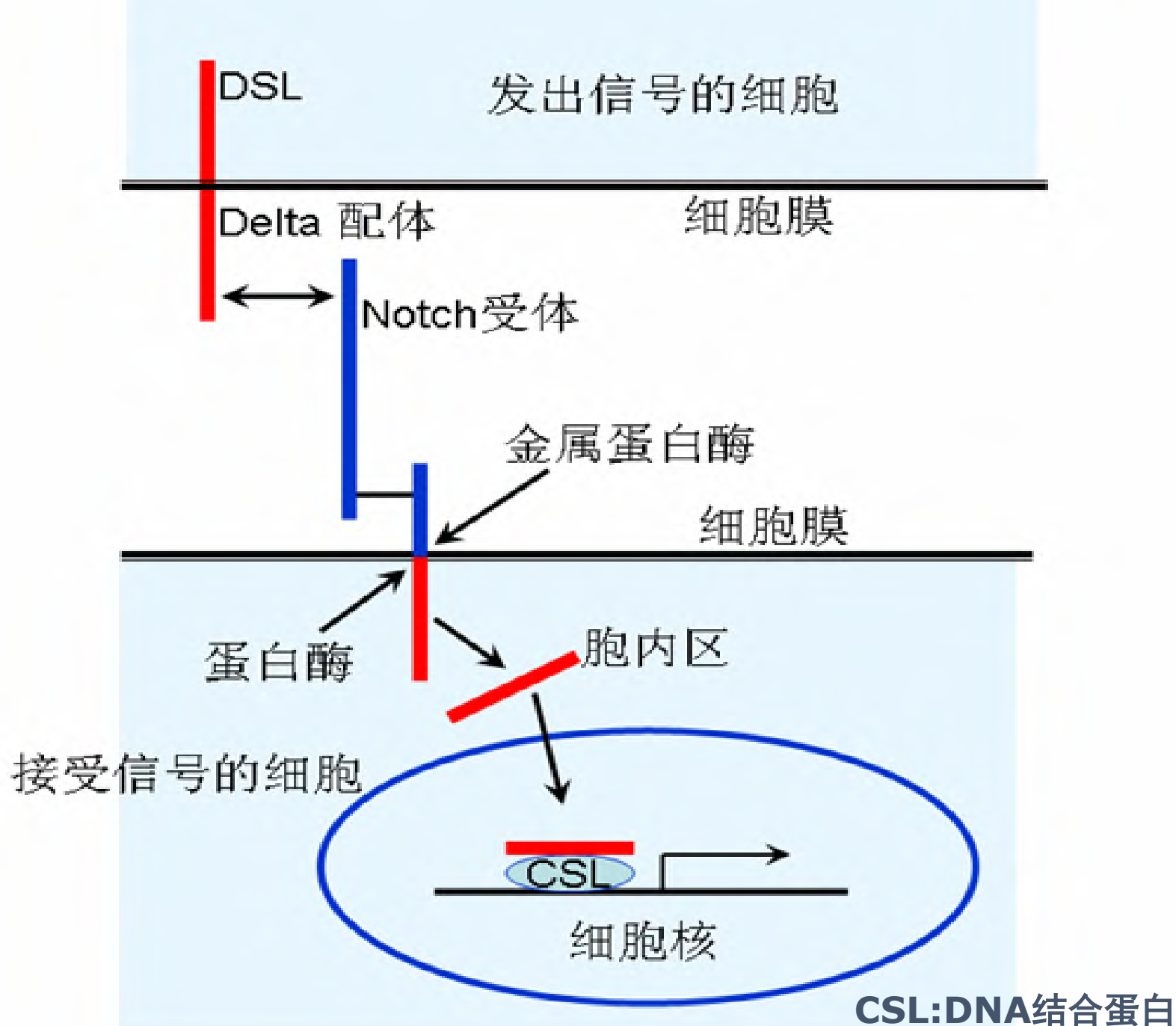


Notch信号通路

- **Notch**信号途径由**Notch**、**Notch**配体（**DSL**蛋白）和**CSL**（一类**DNA**结合蛋白）等组成。
- **Notch**及其配体均为单次跨膜蛋白，当配体（如**Delta**）和相邻细胞的**Notch**结合后，**Notch**被蛋白酶切割，释放出具有核定位信号的胞内区**ICN**（intracellular domain of Notch），进入细胞核与**CSL**结合，调节基因表达。

Notch信号通路

- **CSL**为转录因子，能识别并结合特定的**DNA**序列（**GTGGGAA**），这个序列位于**Notch**诱导基因的启动子上。胞内区**ICN**不存在时，**CSL**为转录抑制因子。当结合**ICN**时，**CSL**能诱导相关基因的表达。
- 通路可概括为：**Delta**→**Notch**→酶切→**ICN**→进入细胞核→**CLS-ICN**复合体→基因转录。



Notch信号通路的旁抑制效应

- 当一群具有相同命运的细胞中有一个细胞发生了分化并表达一个特定的分化信号时，其细胞表面的Notch配体Delta与相邻细胞膜上的Notch结合，启动信号途径，防止其它细胞发生同样的分化，这种现象叫作旁抑制效应（lateral inhibition）。

Hedgehog信号通路

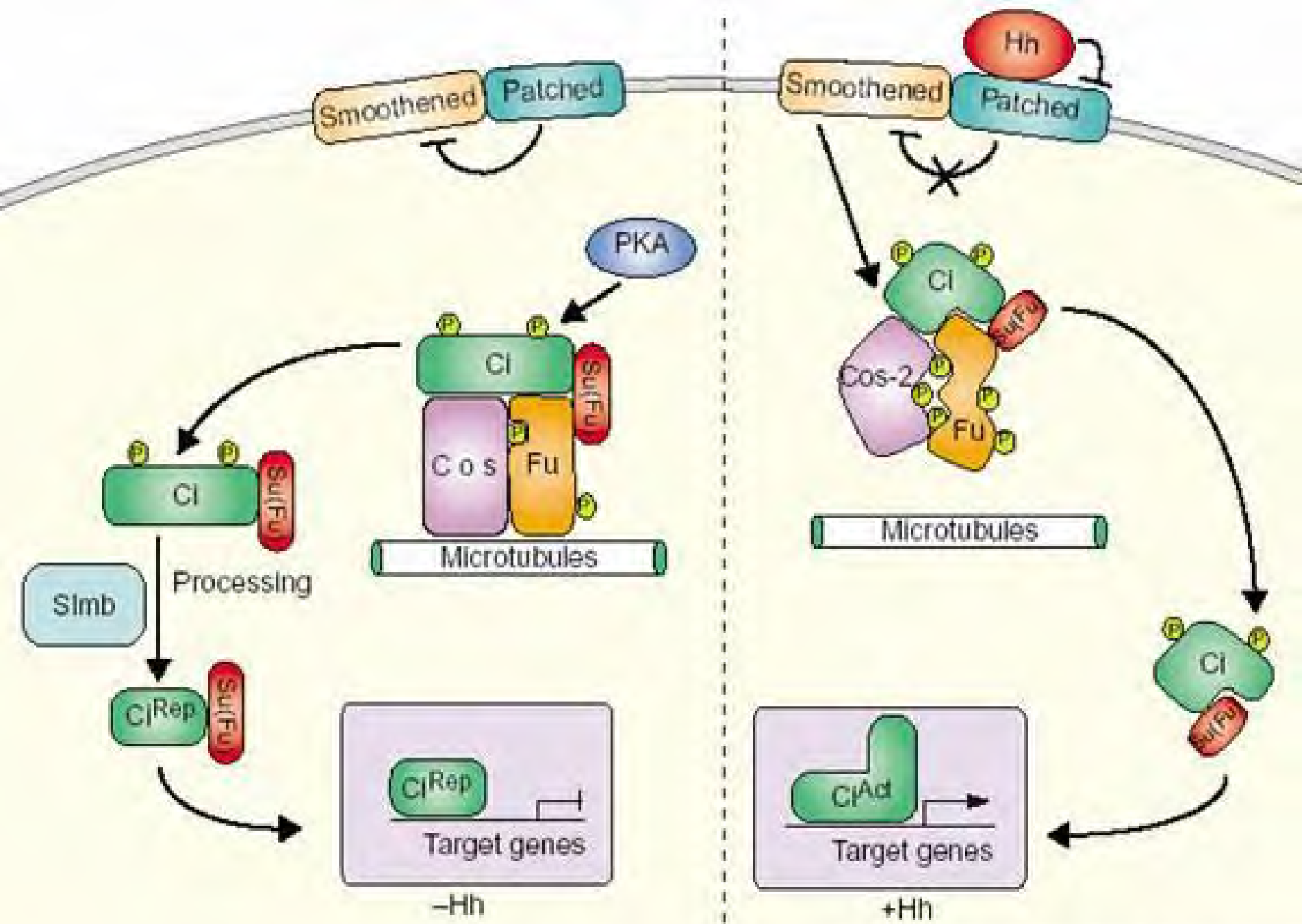
- Hedgehog是一种共价结合胆固醇的分泌性蛋白，在动物发育中起重要作用。
- 哺乳动物Hedgehog基因主要有3个成员：Shh（Sonic hedgehog）、Ihh（Indian hedgehog）和Dhh（desert hedgehog）。

Hedgehog信号通路

- 两个跨膜蛋白Patched（Ptc）和Smoothened（Smo）介导Hedgehog信号向胞内传递。
- Ptc是12次跨膜蛋白，能与Hedgehog结合。
- Smo为7次跨膜蛋白，与G蛋白偶联型受体同源。
- 在无Hedgehog的情况下，Ptc抑制Smo。
- 当Hedgehog与Ptc结合时，则解除了Ptc对Smo的抑制作用，引发下游事件。

Hedgehog信号通路

- Hedgehog信号途径的转录因子是Ci（Cubitus interruptus，在脊椎动物中为Gli），具有锌指结构，分子量155KD。
- 在胞质中Ci与其它蛋白形成复合体，这些蛋白包括：
 - Fu（Fused，一种丝氨酸/苏氨酸激酶）
 - Cos（Costal，一种能将复合体锚定在微管上的蛋白）
 - Su（suppressor of Fused，适配蛋白）。



- 在没有Hedgehog信号时，Ci被水解为75KD的片段，进入细胞核，抑制Hedgehog信号响应基因。
- 当Hedgehog与Ptc结合时，Ci的降解被抑制，从复合体中释放出来，全长的Ci进入细胞核中，启动相关基因表达，这些基因包括Wnt和Ptc。Ptc的表达，又会抑制Smo，从而抑制Hedgehog信号，是一种反馈调节。

干细胞分化的分子机制

一、干细胞的分类

根据干细胞的发育潜能分为三类：

- ◆全能干细胞 (**totipotent stem cell**)
- ◆多能干细胞 (**pluripotent stem cell**)
- ◆专能干细胞 (**unipotent stem cell**) 。

- **全能干细胞**能够发育成为具有各种组织器官的完整个体潜能的细胞，如胚胎干细胞。
- **多能干细胞**具有分化出多种细胞组织的潜能，但失去了发育成完整个体的能力，发育潜能受到一定的限制。骨髓多能造血干细胞是典型的例子，它可分化出至少十二种血细胞，但不能分化出造血系统以外的其它细胞。
- **专能干细胞**只能向一种类型或密切相关的两种类型的细胞分化，如上皮组织基底层干细胞、肌肉中的成肌细胞。专能干细胞是发育等级最低的干细胞。

根据干细胞所处的发育阶段分为两类：

◆ 胚胎干细胞(**embryonic stem cell, ES**)

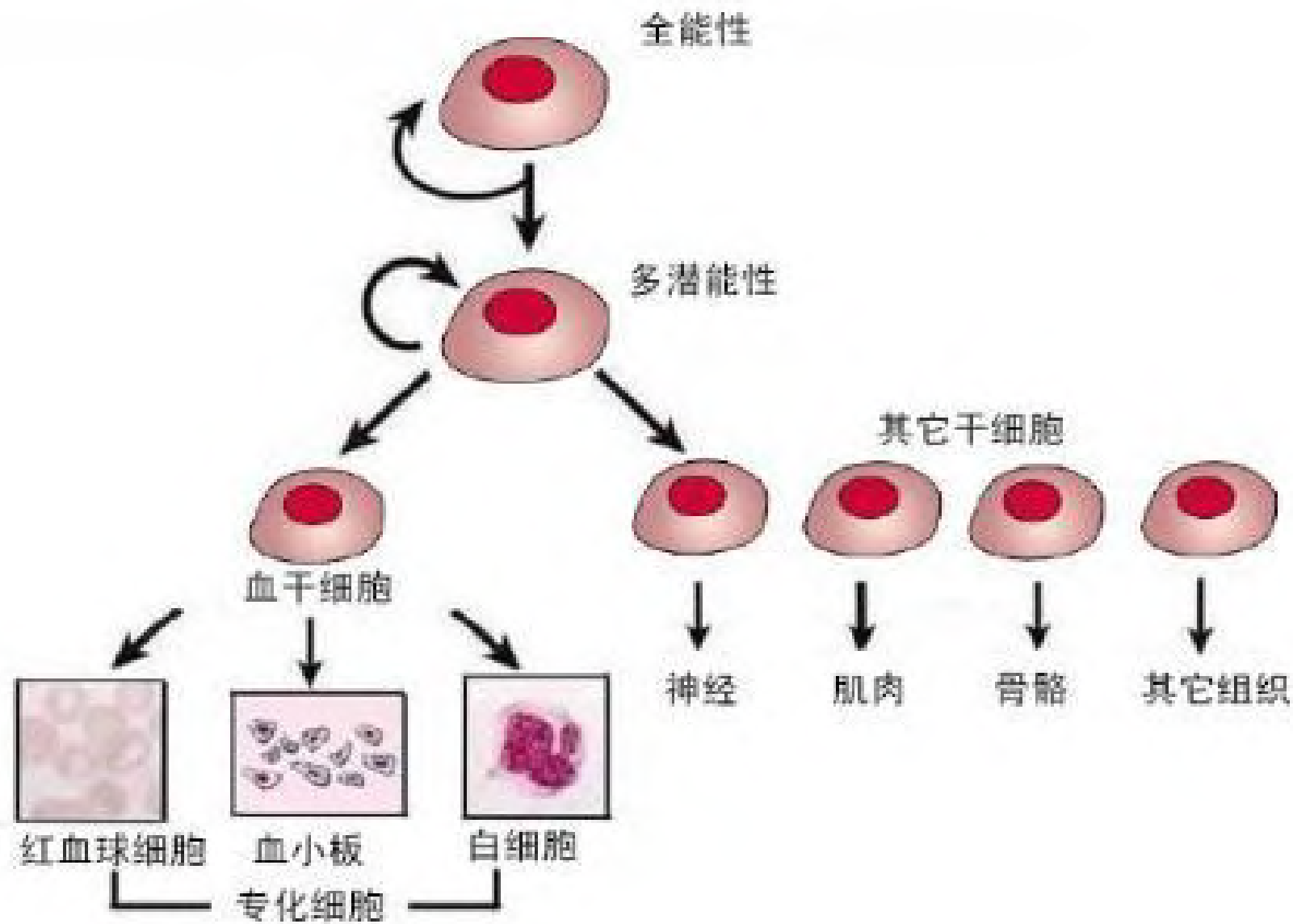
◆ 成体干细胞(**somatic stem cell**)

➤ 胚胎干细胞是从早期胚胎内细胞团或原始胚胎生殖细胞经体外分化抑制培养分离克隆的。胚胎干细胞的发育等级较高，是全能干细胞。

- 成体干细胞是一类成熟较慢但能自我维持增殖的未分化的细胞，这种细胞存在于各种组织的特定位置上，一旦需要，这些细胞便可按发育途径，先进行细胞分裂，然后经过分化产生出另外一群具有有限分裂能力的细胞群。
- 成体干细胞的发育等级较低，是多能或专能干细胞。造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)和骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是熟知的成体干细胞。

干细胞的主要特征

1. 干细胞本身不是终末分化细胞(即干细胞不是处于分化途径的终端); 干细胞能无限地分裂。
2. 干细胞有两种分裂方式, 一是 通过对称分裂形成两个相同的干细胞; 二是进行不对称分裂, 产生的子细胞一个保持原有干细胞特性, 一个则进入终末分化。
3. 干细胞分裂产生的子细胞只能在两种途径中选择其一: 或保持亲代特征仍作为干细胞; 或不可逆地向终末分化。
4. 干细胞分化具有方向性



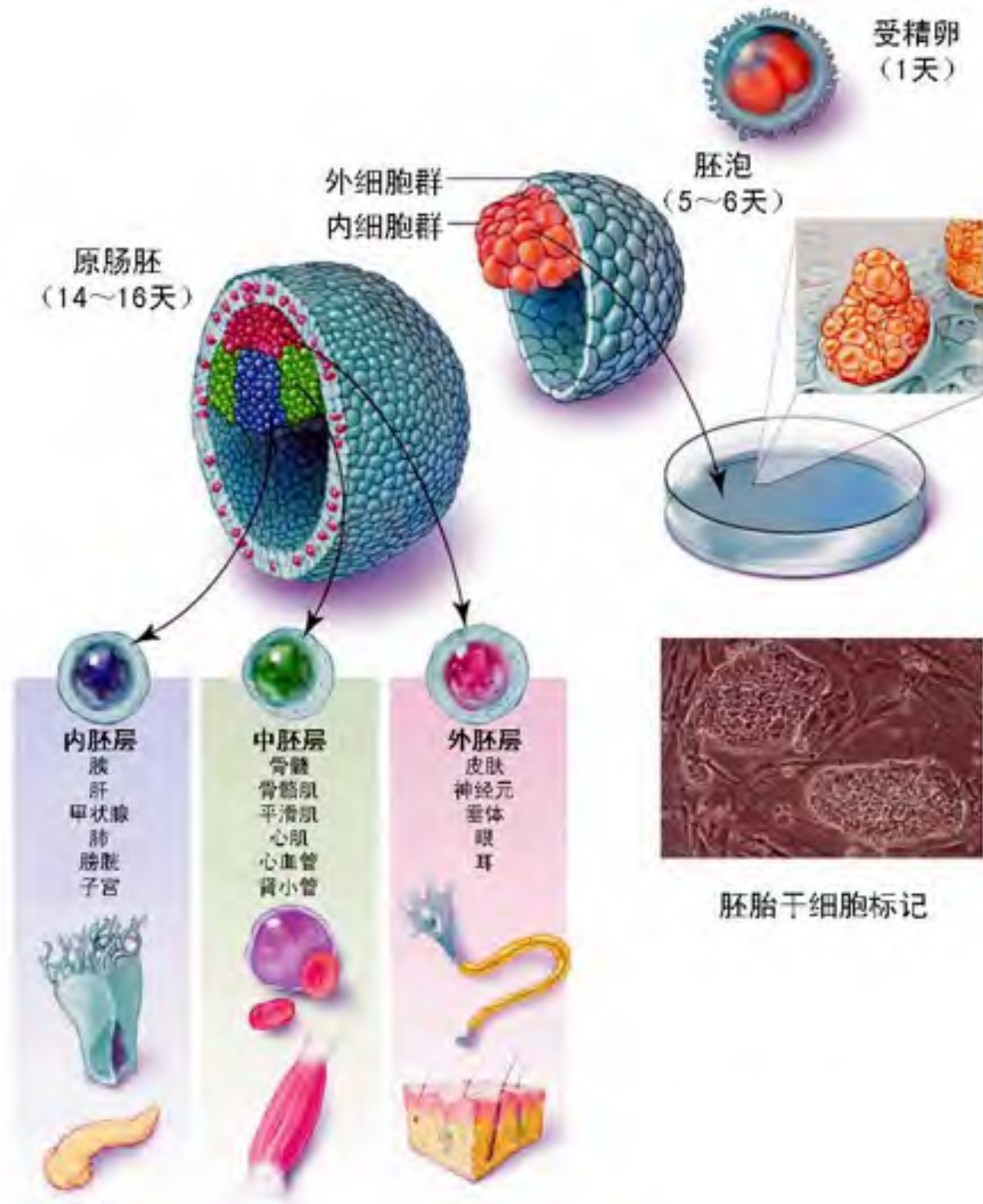
干细胞系统

二、干细胞分化的机制

干细胞命运各不相同，但分化机制相似：调控基因指导特异性基因的转录及特定蛋白质的合成，从而细胞逐步发展为具有专门功能的特定细胞类型。

同样，干细胞也对邻近细胞的生长信号发生反应，导致特定基因活化及相应蛋白质合成，参与细胞分化、运动，或其它细胞作用以形成组织。

(一) 胚胎干细胞的分化



维持胚胎干细胞全能性的机制

- **oct-4**基因是胚胎干细胞(ES)的一个特异标志分子。无论是在体内还是体外，**oct-4**基因只在全能或多能性细胞如ES细胞和胚胎生殖细胞中表达。
- **oct-4**是一种调节性基因，职责是控制其他基因的表达。

维持胚胎干细胞全能性的机制

- 研究发现，**oct-4**不同的表达水平指导ES细胞的3种不同命运：
 - oct-4**表达上调2倍使ES细胞分化为原始内胚层细胞，
 - oct-4**表达下调使ES细胞分化为滋养层细胞，
 - oct-4**表达水平不变才能使ES细胞维持不分化状态。
- 因此，**oct-4**被视为多能细胞发动、维持及分化的主要候选调控因子。

- **nanog**基因仅在ES细胞中特异表达，在分化的ES细胞和体细胞中不表达。**nanog**基因只在ES细胞中发挥作用，在其他干细胞中则处于休眠状态。
- **nanog**基因维持ES细胞的不分化状态，**nanog**是**oct-4**基因启动后维持内细胞团全能性所必需的，但作用机制目前尚不清楚。

体外培养胚胎干细胞的定向诱导分化

- ❖ 当受精卵分裂发育成囊胚时，将内细胞团分离并进行培养，在一定条件下，这些细胞既可在体外”无限期”地增殖传代，同时还保持其全能性。
- 饲养层细胞或白血病抑制因子是胚胎干细胞体外培养过程中保持未分化状态的必要条件。
- 在缺乏来自饲养层细胞和白血病抑制因子的自我更新信号时，通过聚集培养胚胎干细胞，可以诱导其分化为类胚体(embryoid bodies, EBs)。

定向诱导胚胎干细胞分化的方法

- 外源性生长因子诱导
- 体外培养下，ES细胞对细胞因子具有依赖性。培养过程中添加或撤除某一种或某些细胞因子可指导ES细胞的增殖或分化。主要的诱导因子主要有:维甲酸(retinoic acid, RA)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)等。
- 利用细胞因子诱导ES细胞朝一定方向分化时，一般采用分阶段的办法，即先得到类胚体，再在类胚体的基础上进一步诱导使其分化为目的细胞。在各阶段添加的细胞因子不同，具体表现为细胞因子种类、浓度或组合的不同。

- **转基因诱导**

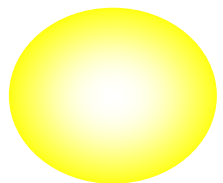
主要是利用基因转染技术将某些信号转导成分的基因转入胚胎干细胞中，使某个促分化基因在胚胎干细胞中过表达，从而有效地诱导胚胎干细胞发生特异性分化。

- **与其他细胞共培养**

将胚胎干细胞与一种诱导细胞共同培养，通过诱导细胞的作用使胚胎干细胞向特定方向分化。

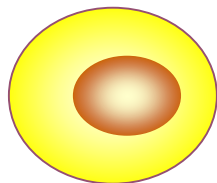
干细胞工程

去核胚胎干细胞

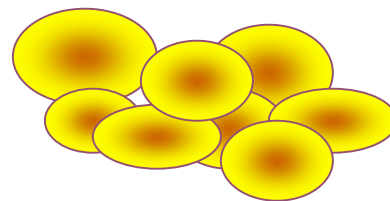


核移植

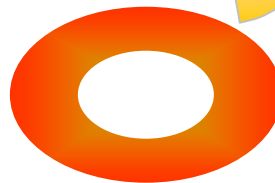
组装胚胎干细胞



组织干细胞



体外诱导培养



各种组织器官

（二）成体干细胞的分化

• 转分化/横向分化（ **transdifferentiation** ）

- 指一种已经分化的细胞类型不可逆地转化为另外一种正常分化的细胞类型。转分化前后的细胞在形态上和分子水平上都有明确的特征以示区别。
- 一种组织的成体干细胞倾向于分化成该组织的各种细胞，但特定条件下，可分化成其它组织的功能细胞。
- 转分化伴有不同基因的关闭或启动,也就是基因组活动的重新编程 (reprogramming).

胚胎干细胞

- ① 来自胚泡的内细胞群
- ② 发育全能性，可诱导分化为机体
- ③ 无限的自我更新能力
- ④ 增殖能力强，便于应用
- ⑤ 细胞可不断增殖，“永生化”，移植后有形成肿瘤的可能性
- ⑥ 不能自体移植
- ⑦ 有伦理问题

成体干细胞

来源于骨髓、外周血、角膜、视网膜、脑、骨骼肌、齿髓、肝、皮肤、胃肠道粘膜层和胰腺等

分化较局限，部分成体干细胞（造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞）有一定跨系、跨胚层的“可塑性”

病理条件下才显出一定的自我更新潜能

增殖能力较弱，故不能完全取代胚胎干细胞

成瘤的可能性很小

自体移植可避免免疫排斥

分离和使用不存在伦理问题

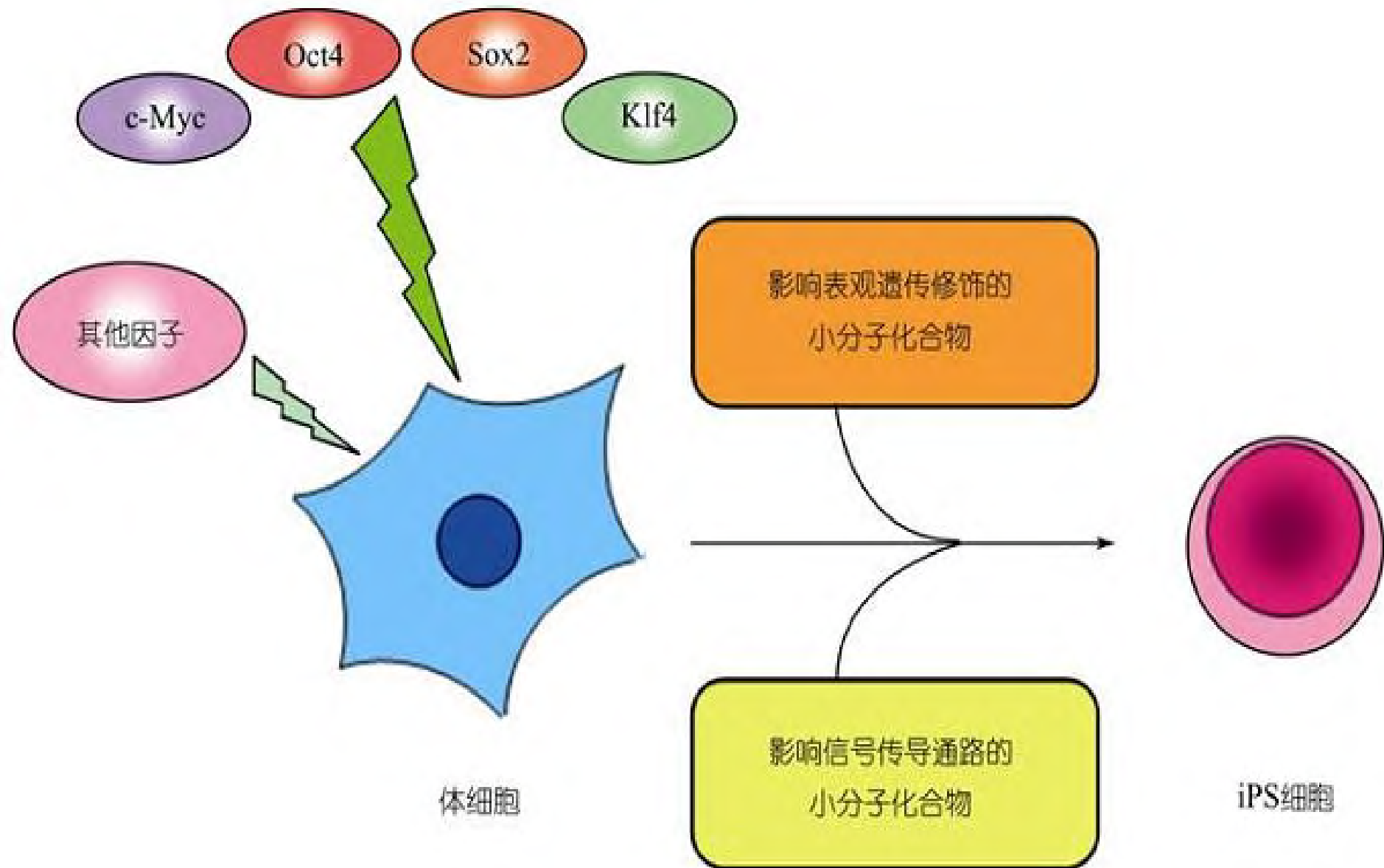
(二) 诱导性多能干细胞的形成

• 诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPS)

- 通过表达某些转录因子(如Oct3/4, Sox2, c-myc, klf4)将已分化的成体细胞(如小鼠的成纤维细胞)逆转到细胞分化前的状态,从而获得功能上与胚胎干细胞类似的诱导性多能干细胞。
- 通过将完全分化的体细胞重编程,不经胚胎阶段而直接逆转至多能干细胞状态的iPS 细胞一度被视为最有希望运用到再生医学及新药开发的重要资源,为人类各种遗传性及功能性疾病的研究和治疗带来了新希望。但是iPS 细胞存在着重编程错误及基因组不稳定性缺陷,这些缺陷将有可能导致iPS 细胞的临床治疗潜能受到限制。

逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、
质粒转染、转座子、
附着体载体或蛋白质直接介导

制备iPS细胞的方法



三、干细胞的应用

- 干细胞具有的能够稳定生存增殖并保持多向分化潜能的特性使其在遗传性疾病和组织器官移植领域有巨大的应用前景。

胚胎干细胞的应用

- 揭示哺乳动物的发育机制及影响因素

胚胎干细胞在不同发育阶段携带着丰富的发育信息，为研究胚胎干细胞的发育规律提供重要线索。

- 疾病治疗

胚胎干细胞最诱人的前景和用途是生产组织和细胞，用于“细胞疗法”，为细胞移植提供无免疫原性的材料。目前，胚胎干细胞已可被定向诱导分化成神经细胞、造血细胞、心肌细胞、内皮细胞、视网膜细胞等，并已应用于临床。

- 药学研究

胚胎干细胞系发展为胚体后的生物系统，可模拟体内细胞与组织间复杂的相互作用，并可进行药物筛选。

需要解决的问题

- 胚胎干细胞定向诱导分化的调控机制还需要进一步深入探索。
- 将胚胎干细胞最终分化成一个复杂的组织器官尚存在技术上的困难。
- 如何控制胚胎干细胞分裂增殖中的突变，产生正常的分化细胞仍需大量的实验研究。
- 利用人胚胎干细胞进行克隆治疗可能形成畸胎瘤
- 胚胎来源困难、体外培养条件复杂、免疫排斥反应以及伦理学问题等

iPS的应用

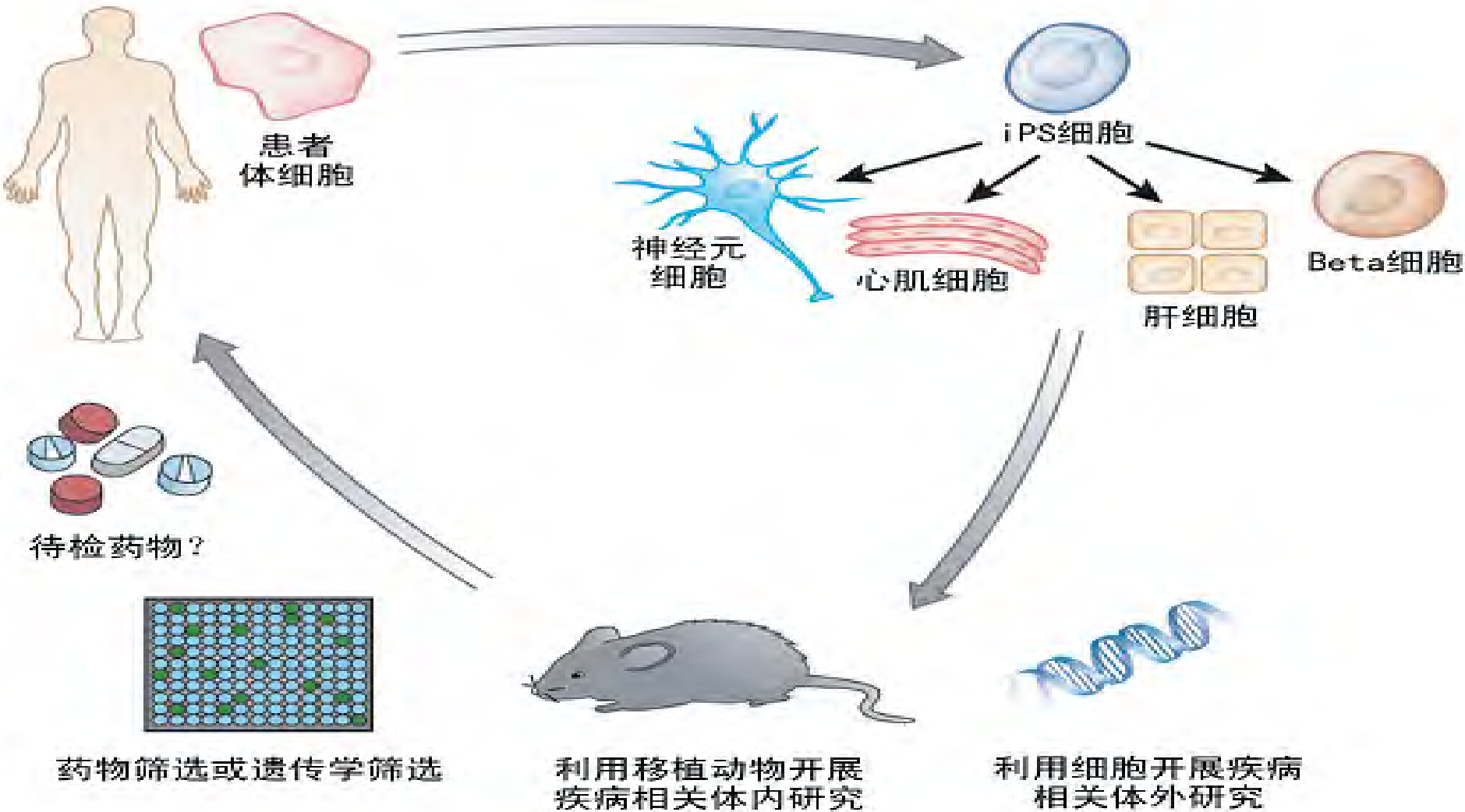


图1 iPS细胞在人类疾病研究工作中的用途。
图片由《自然-医学》(Nature Medicine) 杂志提供。

成体干细胞的应用

- 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)
- 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)
- 脐带血间充质干细胞
- 神经干细胞

Key Point

- 细胞周期转折点(**check point**)
- 细胞周期蛋白（**Cyclin**）和细胞周期蛋白依赖性激酶（**Cyclin Dependent Kinase, CDK**）
- 细胞分化 (**cell differentiation**)
- 干细胞的分类与主要特征
- 诱导性多能干细胞 (**iPS**)