

dentification and characterization of lactic acid bacteria[J]. J Dig Dis, 2008, 9(4): 190-198.

[10] 张志明, 孙海英, 李建平. 16S rRNA 在医学微生物鉴定中的应用[J]. 中国医学检验杂志, 2008, 22(6): 170-171.

[11] Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, et al. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(1): 94-105.

[12] Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(5): 892-916.

[13] Hoffmann M, Brown EW, Feng PC, et al. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among Vibrio species[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 90.

[14] 金中淦, 葛平, 徐蓉, 等. 16S rRNA、16S-23S rRNA 基因测序分析检测主要血流感染病原菌比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(3): 181-185.

[15] Zhu H, Zhou WY, Xu M, et al. Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(2): 174-178.

[16] Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region[J]. Microbiology, 1996, 142(Pt 1): 3-16.

[17] Gonzalez N, Romero J, Espejo RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region[J]. J Microbiol Methods, 2003, 55(1): 91-97.

[18] 刘春江, 府伟灵, 夏涵, 等. 16S-23S rRNA 基因间区在快速鉴定病原菌中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 685-687.

[19] 张守印, 郭学青, 李振军, 等. 16S rRNA 基因克隆文库用于菌群分析的效能研究和评价[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1549-1552.

[20] Liguori AP, Warrington SD, Ginther JL, et al. Diversity of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29323.

[21] Huber H, Hohn MJ, Stetter KO, et al. The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life[J]. Microbiol Res, 2003, 154(3): 165-171.

[22] Wang Y, Zhang Z, Ramanan N. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes[J]. J Bacteriol, 1997, 179(10): 3270-3276.

[23] Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 99-110.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 综 述 •

成骨细胞在造血微环境中的作用

郝润英¹, 张书霞^{1△}, 贺冠强², 王菊美²

(河北省邯郸市中心医院: 1. 检验科; 2. 血液科, 河北邯郸 056001)

关键词: 造血干细胞; 造血微环境; 成骨细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 08. 039 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)08-0996-03

造血干细胞(HSC)具有自我更新能力并且能够发育成各系血细胞。这一过程只有在特定的骨髓微环境中才能完成,早在 1978 年 Sehofield^[1]就提出龛的概念来定义骨髓中适宜 HSC 生存的特定微环境结构。该假说认为 HSC 定位于骨髓特定的三维环境内,以维持其自我更新的特点,而一旦离开龛, HSC 在基质细胞和各种细胞因子作用下进入增殖和分化状态,分化发育为各种成熟血细胞。随着研究的深入,发现这个龛可以进一步分为“骨龛”和“血管龛”^[2-8],两者在调节 HSC 方面是有区别的,本文着重讨论作为“骨龛”中重要成分的成骨细胞在造血调控中的重要作用。

研究表明成骨细胞是造血龛中的主体基质细胞,之所以是造血微环境中的重要细胞成分,是因为其能分泌多种造血生长因子,成骨细胞可以分泌 IL-1、IL-6、GM-CSF、G-CSF、M-CSF 等支持造血的因子,同时成骨细胞也分泌抑制造血细胞增殖的因子,如巨噬细胞抑制蛋白 1(MIP-1a),MIP-1a 可以抑制造血干、祖细胞的分化以保证有充足的造血干、祖细胞储备^[8]。成骨细胞对造血干、祖细胞调控的前提条件是成骨细胞必须与造血细胞直接接触,当成骨细胞和 HSC 共培养后,后者也同樣能调控成骨细胞,使之分泌许多因子。成骨细胞和 HSC 之间存在着密切的关系,两者之间可以相互影响。

在 HSC 龛里面,一方面成骨细胞通过一些黏附因子将

HSC 锚定在龛里面,另一方面成骨细胞通过分泌一些细胞因子和基质成分来调控 HSC。目前已知许多分子通路都参与了龛的调节,对成骨细胞调控造血发挥很重要的作用。如 Notch/Jagged, Ang-1/Tie2, Wnt/ β -catenin, Ca^{2+} /钙离子敏感受体(CaR),骨形成蛋白(BMPs),骨桥蛋白(OPN)/ $\beta 1$ 整合素以及 SDF-1/CXCR4 等。下面对这些调节通路分述如下。

1 Notch/Jagged 通路

Notch 基因在无脊椎动物和脊椎动物的多个物种中均有表达,最早在果蝇中发现并被克隆,其编码一相对分子质量约 300×10^3 的单链跨膜蛋白。Notch 蛋白是一个结构高度保守的细胞表面受体,又是基因转录的调节因子。Notch 蛋白主要包括胞外区、跨膜区和胞内区,它的胞外区由多个表皮生长因子(EGF)样重复序列和 3 个富含半胱氨酸 Notch/Lin-12 重复序列组成。它的胞内部分相对较短,包括结合区(RAM),6 个 CDC10/ankyrin 锚蛋白(ANK)重复序列,2 个核定位信号(NLS),1 个转录激活区(TAD)和 1 个 PEST 序列。Notch 配体在果蝇中称 Delta 和 Serrate,在线虫中称 Lag-2,而在脊椎动物中 Serrate 的同源分子称 Jagged1、Jagged2。Notch 配体都是长度很短的跨膜蛋白,胞膜外区含数量不等的 EGF 样重复序列。N 端含有一个富含半胱氨酸的 DSL 基序,在与 Notch 的相互作用中起关键作用。Coffman 等^[9]发现 HSC 表面表达

Notch,小鼠的成骨细胞和骨髓的基质细胞表达 Notch 的配体 Jagged1。Calvi 等^[5]研究发现激活甲状旁腺受体可以增加成骨细胞的数量,进而增强了 Notch/Jagged1 的活性,最终导致 HSC 数量上的增加。Varnum-Finney 等^[10]研究证实成骨细胞通过 Jagged1 和表达在 HSC 表面的 Notch1 结合后能够促进造血干细胞(HSC)的自我更新和数量增加。Kunisato 等^[11]研究指出 Notch/Jagged 通路对造血干细胞的调控作用可能与一系列的干细胞自我更新的基因(Hes1)被激活有关。

2 Ang-1/Tie2 通路

Tie2 是酪氨酸激酶的受体, Tie2 包括 2 个免疫球蛋白样区、3 个表皮生长因子(EGF)样区、3 个纤连蛋白样区、1 个跨膜区、1 个激酶区。Tie2 的配体是血管生成素(Ang)家族,有 Ang1、Ang2、Ang3、Ang4 共 4 个成员, Ang 的基本结构为 N-C-F 结构三个部分, N 端最开始有 50 个左右的残基为 N 末端区, 此区域一般编码血管生成素 Ang 的前体蛋白信号肽;接着是 215 个左右残基的螺旋卷曲区;接下来为 C 末端的纤连蛋白样区(Fbg)。研究发现 HSC 细胞表达 Tie2。Arai 等^[12]研究表明成骨细胞与 HSC 间 Ang-1/Tie2 信号通路是关键因素, Ang-1/Tie2 相互作用能抑制 HSC 的细胞分裂,维持 HSC 处于细胞周期 G0 期。Ang-1/Tie2 在 HSC 龛中的调节作用机制可能为:(1)通过激活 HSC 表面 $\beta 1$ 整合素和 N-钙粘连素的表达,促进 HSC 黏附到龛的细胞外基质成分;(2)抑制 HSC 的分化,维持干细胞的自我更新;(3)维持 HSC 的静息状态;(4)促进 HSC 滞留在 HSC 龛里面。Wilson 等^[13]研究还表明在 Ang-1/Tie2 信号传导中, HSC 表面分子 c-Myc 蛋白是一负性调节因素。增强 c-Myc 蛋白表达则抑制 N-钙粘蛋白等许多黏附分子受体的表达,促使 HSC 脱离成骨细胞,丧失自我更新能力,促进 HSC 分化。

3 Wnt/ β -catenin 通路

Wnt 一词产生于 70 年代,它是由非洲果蝇的分节的极性基因 wingless 和小鼠的一个原癌基因 int-1 两个词合成派生而来。Wnt 蛋白家族是一个富含半胱氨酸残基的分泌信号糖蛋白大家族, Wnt 在体内广泛表达, HSC 和其他非造血的基质细胞均有 wnt 蛋白表达。Fleming 等^[14]最近研究认为在造血龛中, Wnt 通路可控制 HSC 的增殖,维持其自我更新状态。 β -catenin 基因是果蝇 arm adillo 基因在哺乳动物的同源类似物,编码的 β -catenin 蛋白共有 781 个氨基酸,其氨基端(NH₂)富含丝/苏氨酸残基,是 Wnt 信号通路的下游分子。作为 Wnt 途径中重要的“调节子”, β -catenin 在 HSC 的自我更新中也具有重要作用。Reya 等^[15]用 β -catenin 转染小鼠的 HSC 与对照组相比,扩增能力明显增强,进入细胞周期的 HSC 细胞显著增多,在无 SLF(steel factor)的情况下培养 1~4 周仍然存活(对照组只能存活 48 h),在这一增殖过程中并不伴随相应的分化,细胞仍然能够保持 HSC 的特征,形态极为原始,在受致死剂量照射小鼠体内可以重建 T、B 细胞和髓系造血。Muguruma 等^[16]研究发现 β -catenin 在随机分布的,它总是分布在贴近骨内膜的成骨细胞表面。这一研究结果提示 β -catenin 有可能参与了 HSC 锚定在壁龛和其非对称性的分裂过程。

4 Ca^{2+} /CaR 通路

Adams 等^[17]发现 HSC 表面表达一种具有 7 次跨膜结构的蛋白质-钙离子敏感受体(CaR)。由于骨内膜表面富含 Ca^{2+} ,因此 CaR 能够促进 HSC 停留在骨内膜的成骨细胞表面。CaR 基因敲除小鼠的 HSC 可以正常地归巢到骨髓,但是归巢后的 HSC 却不能定植在骨龛里。成骨细胞对 HSC 的定位、停留及生存有着重要的调节作用,其机制之一可能是通过

胶原蛋白 I 由 Ca^{2+} 介导将 HSC 和成骨细胞连接在一起^[18]。

5 BMP 通路

骨形成蛋白(BMPs)属于转化生长因子 TGF β 超家族,其参与调节了细胞生长、分化和凋亡等重要的生理过程。在造血系统发育的早期即胚胎期, BMPs 被证明具有诱导造血系统生成的作用。Bhatia 等^[19]体外的实验研究表明 BMP4 具有维持 HSC 造血重建的能力。Zhang 等^[4]用动物实验证明,选择性地阻断 BMPs 的受体 BMPRI 可以使 N-钙粘连素+CD45⁻的成骨细胞数目增多。而 HSC 的数量和 N-钙粘连素+CD45⁻成骨细胞数目成正相关。由此可见, BMPs 能通过其受体 BMPRI 控制造血干细胞龛的大小,进而控制 HSC 的数量。

6 OPN/ $\beta 1$ 整合素通路

骨桥蛋白(OPN)是一种多聚的磷酸盐糖蛋白,主要由成骨细胞分泌。OPN 在细胞黏附、炎症反应、血管新生及肿瘤转移中发挥着重要的作用。最近的研究发现, OPN 在调节 HSC 黏附和增殖的过程中亦发挥着重要的作用。在骨髓里, OPN 主要表达在贴近骨内膜的成骨细胞表面。Haylock 等^[20]研究发现 OPN 可以与表达在 HSC 表面的 $\beta 1$ 整合素结合,从而介导 HSC 穿透基底膜,并将 HSC 锚定在造血龛里面,在骨龛和 HSC 之间发挥桥梁作用。体外的实验研究发现:加入外源性的 OPN 能显著抑制 HSC 的增殖。Stier 等^[21]用动物实验研究发现敲除 OPN 基因的小鼠外周血中 HSC 的数量明显高于野生型的小鼠。这些研究充分证明, OPN 不仅能够调控 HSC 的黏附,而且能够负性调控 HSC 的数量。

7 SDF-1/CXCR4 系统

基质细胞衍生因子(SDF-1)属于细胞趋化因子 CXC 亚家族,在骨髓内主要由临近骨内膜的成骨细胞分泌和释放。CXCR4 是 SDF-1 的唯一受体,是一个有 7 个跨膜结构域的 G 蛋白偶联受体,可在正常造血干/祖细胞以及包括血液肿瘤在内的多种肿瘤细胞上表达。SDF-1 与其受体 CXCR4 特异性结合,在造血调控中有重要的作用。de Barros 等^[22]研究证实, SDF-1/CXCR4 系统不仅在 HSC 归巢骨髓的过程中起重要作用,而且参与了维持正常造血细胞的存活和增殖。

总之, HSC 龛主要由基质细胞以及它们分泌的细胞外基质构成,它能够给 HSC 提供一个适宜的生长环境。成骨细胞是骨龛的一个重要组成成分,成骨细胞和 HSC 之间存在着精细的调节,这种调节可维持干细胞的静息、自我更新和分化之间的平衡。

8 小结与展望

本文从 HSC 龛的来历、成骨细胞在构建造血干细胞龛中所起到的作用等方面探讨了成骨细胞在造血微环境中的作用。阐述了成骨细胞在构建 HSC 龛中发挥了至关重要的作用:成骨细胞不仅通过黏附因子将 HSC 锚定在龛里面,并且通过分泌一些细胞因子和基质成分来调控 HSC,维持着 HSC 的静息、正常的自我更新和分化的平衡。然而,骨髓微环境是一个复杂的网络系统,造血龛内部调控干细胞的通路更是精细而微妙。此外, HSC 龛是一个三维立体、动态的结构,目前的研究仅仅限于体外的间接研究和动物实验,并不能真实地反映 HSC 和骨髓微环境的关系。而且,目前有关成骨细胞在造血系统疾病发生和发展中的作用的研究较少,深入研究成骨细胞及骨髓微环境之间的内在关系,必将会使研究者对造血认识有进一步的深入,并且能够为血液疾病的治疗提供新策略。

参考文献

[1] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming

cell and the haemopoietic stem cell[J]. Blood Cells,1978,4(1/2): 7-25.

[2] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche [J]. Cell,2004,116(6):769-778.

[3] Giordano G, La Monaca G, Annibali S, et al. Stem cells from oral niches: a review[J]. Ann Stomatol (Roma),2011,2(1/2):3-8.

[4] Zhang JW, Chao N, Ling Y, et al. Identification of the haemato- poietic stem cell niche and control of the niche size[J]. Nature, 2003,425(6960):836-841.

[5] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche[J]. Nature,2003,425 (6960):841-846.

[6] 陈文明,陈子兴,岑建农,等,人成骨细胞系 hFOB1. 19 生物学特 性的研究[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(2):339-344.

[7] Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, et al. Increased mobilization of c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (KSL) cells and colony-forming units in spleen (CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification [J]. J Cell Physiol,2006,208(1):188-194.

[8] Russell S. Taichman Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche[J]. Blood, 2005,105(7):2631-2639.

[9] Coffman C, Harris W, Kintner C. Xotch, the xenopus homolog of drosophila notch[J]. Science,1990,249(4975):1438-1441.

[10] Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, et al. Pluripotent, cy- tokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling[J]. Nat Med, 2000, 6 (11): 1278- 1281.

[11] Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, et al. HES-1 pre- serves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo[J]. Blood,2003,101(5):1777-1783.

[12] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche[J]. Cell,2004,118(2):149-161.

[13] Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differ- entiation[J]. Genes Dev,2004,18(22):2747-2763.

[14] Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo[J]. Cell Stem Cell,2008,2(3): 274-283.

[15] Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2003, 423 (6938):409-414.

[16] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow com- partment[J]. Blood,2006,107(5):1878-1887.

[17] Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor [J]. Nature,2006,439(7076):599-603.

[18] Theman TA, Collins MT. The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2009,10(3):289-301.

[19] Bhatia M, Bonnet D, Wu D, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells[J]. J Exp Med,1999,189(7):1139-1148.

[20] Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood[J]. Br J Haematol,2006,134(5):467-474.

[21] Stier S, Ko Y, Forkert R, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size[J]. J Exp Med,2005,201(11):1781-1791.

[22] de Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR, et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model[J]. PLoS One,2010,5(2):e9093.

(收稿日期:2012-11-13)

• 综 述 •

小儿泌尿系结石诊断及治疗进展

曹 建 综述,魏光辉[△]审校

(重庆医科大学附属儿童医院泌尿科,重庆 400014)

关键词:泌尿系结石; 诊断; 综述

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 08. 040 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)08-0998-03

小儿泌尿系结石是一种发病率和复发率均较高的疾病,其形成受多种因素的影响。因其成分、形态、位置的多样性,使得小儿泌尿系结石治疗较为困难。虽然目前冲击波碎石、微创内镜碎石等新技术已较为成熟地运用于成人结石的治疗,但小儿治疗技术仍相对落后。因此归纳总结其流行病学特征、病因、临床表现、辅助检查、治疗进展,有助于小儿泌尿系结石的早期防范和有效治疗,从而降低其发生率,减轻患儿痛楚。

1 流行病学特征

泌尿系结石患者以中青年为主^[1],男性居多,男女比例接近 3:2^[2]。小儿患者数量明显低于成人,且两者比例随地域和环境的改变而有所差异。据报道其比例在欧洲国家低于

3%^[3],而在一些亚洲国家可高达 30%^[4]。其 1 年和 5 年复发率分别为 10%、35%^[1],亦较高。

2 病 因

泌尿系结石的病因较复杂,包括自身因素和社会环境因素。自身因素包括代谢紊乱、局部解剖改变、遗传、感染以及慢性消耗性疾病(如甲亢、肿瘤)等^[5-8]。代谢紊乱是其主要原因,约占泌尿系结石患儿 30%以上,甚至有报道称这一比例可高达 80%^[9-10]。其中以高钙尿症为首,约 40%,而低枸橼酸尿症次之,约 26%^[5]。另有大量研究表明代谢紊乱与自身基因异常有关。现已有多个结石致病基因被发现,但完整的基因图谱尚未明确^[11]。另外感染、局部解剖改变、慢性消耗性疾病亦是

作者简介:曹建,男,在读研究生,主要从事结石相关研究。 [△] 通讯作者,E-mail:Ghwei@cqmu. edu. cn。