

骨髓造血岛 EMP 研究进展

梁康礼 凡慧 范萍 胡小倩 程喜平

【摘要】 巨噬细胞红细胞连接蛋白 (EMP) 是一个分子量为 33 ~ 36kD 的跨膜蛋白, 由有核红细胞和巨噬细胞分泌, 有 2 个亚型, 分别被命名为 EMP-33 和 EMP-36。EMP 主要功能是介导有核红细胞与巨噬细胞黏附, 在造血组织内形成造血岛, 促进有核红细胞脱核成熟; 同时 EMP 影响巨噬细胞成熟和分化, 缺乏 EMP 可导致机体出现贫血, 有核红细胞凋亡增加, 最近研究显示下调巨噬细胞内 EMP 表达, 可使巨噬细胞活动受抑制, 这表明 EMP 与巨噬细胞异常活动及伪足形成相关, 涉及肿瘤和免疫等多项细胞重要功能。有研究显示 SLE 鼠 EMP 异常, 提示 EMP 可能参与 SLE 抗核抗体产生机制。该文就 EMP 发展现状作一综述。

【关键词】 巨噬细胞红细胞连接蛋白; 造血岛; 红细胞脱核; 细胞移动

Research progress of erythroblast-macrophage protein in bone marrow erythroblastic islands Liang Kangli, Fan Hui, Fan Ping, Hu Xiaoqian, Cheng Xiping. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author, Cheng xiping, E-mail: cxpgz@126.com

【Abstract】 Erythroblast-macrophage protein (EMP) is a transmembrane protein with a molecular weight of 33-36 kD, which is secreted by the erythroblasts and macrophages. EMP-33 and EMP-36 are two subtypes of EMP. The mainly functions of EMP are to mediate the adhesion of erythroblasts and macrophages to form erythroblastic islands within the hemopoietic tissues and accelerate the denucleation and maturation of erythroblasts. Moreover, EMP can affect the maturation and differentiation of macrophages. Lack of EMP can lead to the incidence of anemia and aggravate the apoptosis of erythroblasts. Recent investigations have demonstrated that down-regulating the expression level of EMP in macrophages can inhibit the macrophage activity, suggesting that EMP is correlated with the abnormal macrophage activity and the formation of pseudopod, which is involved with tumor, immunity and multiple vital cellular functions. Previous studies have revealed that the mouse models with SLE abnormally express the EMP, prompting that EMP probably participates in the production of antinuclear antibody of SLE. This article reviews the current situation and recent progress of EMP.

【Key words】 Erythroblast-macrophage protein; Erythroblastic islands;
Erythroid denucleation; Cell migration

巨噬细胞红细胞连接蛋白 (EMP) 是一个分子量为 33 ~ 36kD 的跨膜蛋白, 是由有核红细胞和巨噬细胞分泌, 有 EMP-33 和 EMP-36 2 个亚型^[1]。EMP 主要功能是介导有核红细胞与巨噬细胞黏附, 在造血组织内形成造血岛, 促进有核红细胞脱核成熟; 影响巨噬细胞的成熟和分化。下调巨噬细胞内 EMP 表达可导致巨噬细胞活动受抑制。另外,

EMP 可能参与了肿瘤和免疫的相关调节。

一、EMP 对红细胞的影响

1. EMP 是造血岛形成的关键蛋白

造血岛存在于哺乳动物的胎肝和骨髓组织, 其以巨噬细胞为中心, 周围围绕有核红细胞, 是有核红细胞脱核成熟的基本结构。在造血岛中, 存在大量的黏附分子连接细胞与细胞, 包括有核红细胞和

巨噬细胞间的连接以及有核红细胞间的连接^[2]。在巨噬细胞和有核红细胞上表达的细胞黏附分子众多,目前只有小部分被确认。最早被发现并确认的黏附分子是巨噬细胞表达的血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1) 和有核红细胞表达的 $\alpha 4 \beta 1$ 整合蛋白^[3]。后来又陆续发现红细胞表达的细胞间黏附分子 4 (ICAM-4) 及巨噬细胞的 av 整合蛋白;后续研究显示 EMP 是造血岛中重要的细胞黏附分子,其胞浆区包含数个 SH2 结构域结合位点和可能的磷酸络氨酸结构域结合位点而具有识别位点功能^[4-5]。有学者将骨髓干细胞敲除 EMP 基因并植入鼠胚胎内,用以观察 EMP 对胚胎生长发育的影响,结果显示 EMP 基因失活的胚胎在宫腔内死亡,胎肝组织中未发现红细胞造血岛,说明在敲除 EMP 的情况下,造血组织内未能形成造血岛,而红细胞分化成熟脱核也被抑制,导致胚胎死亡^[6]。EMP 在有核红细胞与巨噬细胞中均有表达,除了介导造血岛巨噬细胞和有核红细胞相互黏附外,还介导邻近有核红细胞的相互作用。在体外共培养实验中,相比于正常小鼠胎肝组织,敲除 EMP 鼠的胎肝组织红细胞造血岛的数量大量减少;重组造血岛实验显示正常巨噬细胞可以与正常或敲除 EMP 有核红细胞结合,但敲除 EMP 的巨噬细胞则无法与正常或敲除 EMP 有核红细胞连接^[7]。上述结果提示红细胞造血岛形成的关键是巨噬细胞表达的 EMP,而不是有核红细胞表达的 EMP。巨噬细胞上表达的 EMP 能识别有核红细胞,并黏附有核红细胞形成造血岛,有核红细胞虽然也表达 EMP,但不能主动识别巨噬细胞并形成造血岛。

造血岛分布于骨髓中,用定量荧光电子显微镜检测兔骨髓组织可发现邻近血窦造血岛和非邻近血窦造血岛在结构上存在差异;非邻近血窦造血岛包含更多原红细胞,而邻近血窦造血岛则含有大量的晚幼红细胞。随着造血岛逐渐向血窦迁移,不仅红细胞数量增加和成熟,而且造血岛中巨噬细胞 EMP 在细胞内的分布也逐渐从细胞核迁移到细胞膜^[8]。这说明 EMP 不仅可以形成造血岛,还可以引导造血岛移动靠近血窦,促进红细胞脱核释放。

2. EMP 与肌动蛋白的连接可能是 EMP 介导有核红细胞脱核的机制

作为一个跨膜蛋白,EMP 与有核红细胞胞核脱落的机制相关。Bala 等^[9]发现,通过转染 EMP 基因进入 HEK 细胞,EMP 存在于有核红细胞的细胞分裂收缩环,并在细胞内和肌动蛋白组成复合

体。免疫荧光结果显示:在正常有核红细胞中,肌动蛋白与 EMP 着色位点相一致,其位点在整个细胞质和细胞膜;但在敲除 EMP 有核红细胞中,肌动蛋白着色位点靠近细胞膜,几乎没有肌动蛋白在细胞质上,说明在有核红细胞中,在没有 EMP 的情况下肌动蛋白分布位点出现异常。EMP 与 F-肌动蛋白在有核红细胞中共存,显示了 EMP 在有核红细胞脱核过程中的重要作用。研究还显示,EMP 参与调节肌动蛋白细胞骨架,可能在巨噬细胞的成熟中起重要作用,敲除 EMP 的巨噬细胞表现为细胞缩小、缺少规则的肌动蛋白丝,亦不能有效地增加细胞质,这表明 EMP 参与调节肌动蛋白细胞骨架,不仅可以影响肌动蛋白在有核红细胞内的活动,影响有核红细胞内细胞分裂和脱核,还能阻止巨噬细胞的成熟^[1]。

3. EMP 缺乏导致贫血和髓外造血功能亢进

有核细胞脱核是红细胞成熟的最终环节,也是关键环节^[10]。研究显示,敲除 EMP 的小鼠胎儿患有严重贫血,并在胚胎生长发育过程中发生宫内死亡,有力地证明了 EMP 在决定红细胞生成和成熟中的重要作用^[6]。EMP 的缺乏可导致造血岛数量的减少,有核细胞成熟受限,引发贫血^[11]。Soni 等^[6]把敲除 EMP 细胞移植到小鼠,分别在不同时间点检测小鼠的外周血、骨髓和脾,结果显示在饲养到 10 周后,实验小鼠的红细胞计数、血细胞压积和血红蛋白明显较正常小鼠少,同时其外周血涂片存在大量的网织红细胞、核碎片和有核红细胞。深入研究显示,移植敲除 EMP 胎肝细胞的小鼠的骨髓造血功能明显受抑制,脾和肝的髓外无效造血功能增加,脾组织中血铁黄素的沉积增多。运用末端标志法可见移植敲除 EMP 胎肝细胞的小鼠脾组织凋亡细胞明显增多,定量分析则显示移植了敲除 EMP 胎肝细胞的小鼠脾组织里的凋亡细胞是移植正常胎肝细胞小鼠脾组织的 2.5 倍;苏木素-伊红染色可见胎肝血窦内不成熟红细胞前体,这进一步说明了 EMP 基因失活后髓外造血功能增加。

4. EMP 缺乏导致有核红细胞凋亡的增加

在缺乏 EMP 的情况下,红系细胞可以成熟到晚幼红细胞阶段,但不能脱核成熟,并且最终就会凋亡^[2]。为了证明 EMP 缺乏是否导致此种凋亡,有学者在有和无巨噬细胞的情况下分别培育有核红细胞,在培养 3 周后发现含有巨噬细胞的有核红细胞经历脱核成熟,而无巨噬细胞的有核红细胞死亡。进一步研究显示,有核红细胞在培养 12 d 后,

在无巨噬细胞的情况下 66% 凋亡, 而含有巨噬细胞的情况下则仅 10% 凋亡^[12-13]。为了研究巨噬细胞是否通过 EMP 调节有核红细胞凋亡, 有学者在培养有核红细胞第 4 日后加入抗 EMP 抗体, 培养到 12 d 后, 相比正常培养的有核红细胞, 加入抗 EMP 抗体的培养基中, 59%~60% 的有核红细胞发生凋亡, 而红细胞系增殖、成熟和脱核者显著减少^[12-13]。上述结果表明 EMP 参与的生物过程和细胞连接可以抑制有核红细胞的凋亡, 促进红细胞的正常脱核成熟, EMP 功能失调可引起细胞的非正常凋亡。

二、EMP 对巨噬细胞的影响

1. EMP 在巨噬细胞内的分布位点

EMP 存在于巨噬细胞内, 有学者发现兔多克隆 EMP 抗体免疫荧光标记小鼠胎肝巨噬细胞后, EMP 在巨噬细胞的定位随着细胞的发育而发生规律变化, 在巨噬细胞的各个成熟阶段均能发现 EMP。在未成熟细胞中, 大部分 EMP 在细胞内靠近胞核处, 较少出现在细胞膜, 但随着细胞的成熟, 巨噬细胞开始变大、出现膜褶皱和许多丝足突起, EMP 则主要存在于细胞膜, 并且主要存在于巨噬细胞细胞膜突触和皱褶中, 有利于和有核红细胞连接并形成造血岛^[1]。Soni 等^[14]运用免疫荧光标记分别检测培养第 4 日(未成熟)及第 8 日(成熟)的巨噬细胞, 结果显示 EMP 在未成熟巨噬细胞中只有 1/4 存在于细胞膜, 而在成熟巨噬细胞中则接近 3/4 存在于细胞膜。

2. EMP 影响巨噬细胞分化成熟及其功能

研究显示, EMP 不仅可调控造血岛的形成, 还对巨噬细胞的成熟分化有重大影响, 有学者发现敲除 EMP 胎肝细胞, 巨噬细胞表现出定量与定性的缺陷, 骨髓和胎肝造血岛中心的巨噬细胞可以特异表现为 F4/80 抗体阳性, 免疫荧光检测发现敲除 EMP 胎肝巨噬细胞 F4/80 抗体阳性细胞数量比正常鼠少 25%~30%, 且表现为细胞缩小、变圆和缺少细胞质的不成熟的细胞形态, 这种细胞形态不具备识别有核红细胞的功能^[6]。ER-MP12 蛋白是由未成熟巨噬细胞表达的蛋白, 通过免疫荧光检测发现其在未成熟巨噬细胞表达正常, EMP 缺乏可影响巨噬细胞终末成熟^[6,15]。相比正常细胞, 在体外培养的有核红细胞重构试验中, 无论使用敲除 EMP 的有核红细胞或敲除 EMP 的巨噬细胞均不能重构造血岛, 表明 EMP 功能是由红细胞和巨噬细胞自主控制的^[7,16]。巨噬细胞是人体内重要的免疫细

胞, 参与抗原提呈。研究显示, 在 SLE 患者中, 巨噬细胞出现吞噬能力降低的情况, 这种情况导致抗原物质增加, 有可能是自身抗体产生的来源之一^[17]。EMP 可调节巨噬细胞的分化成熟与功能, 这可能与 SLE 患者巨噬细胞吞噬功能降低有关, 这值得进一步探讨。

3. EMP 促进巨噬细胞活动

细胞移动是一个动态的、有良好协调性的过程, 包括黏附点的精确安排、肌动蛋白细胞骨架的重新排列、衔接蛋白和各种各样的信号通路的相互作用。利用短链发夹 RNA 慢病毒系统下调巨噬细胞 EMP 表达可使巨噬细胞的移动明显受到抑制。下调 EMP 表达时, mRNA 编码的 56 个细胞移动基因被下调, 其中包括细胞黏附和细胞极性基因如肌动蛋白基因以及细胞突起相关的基因如 Cdc42, 这些可能是 EMP 下调时导致细胞移动受抑制的原因。同时与细胞趋化、极化和蛋白水解相关的基因出现上调, 但与细胞黏附和突起相关基因表达下降, 进一步说明 EMP 调节具有广泛的生物效应, 且众多参与细胞骨架变化和伪足形成的基因调控细胞与巨噬细胞免疫功能密切相关^[1]。我们的研究也显示血清中抗 ds-DNA 抗体浓度变化规律与骨髓组织中的 EMP 变化规律相关, 提示 EMP 可能参与免疫功能调节以及 SLE 的发病, 值得我们进一步深入研究^[18]。

另有研究显示, 当 EMP 下调时, 促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1) 和胸腺瘤病毒原癌基因 1 (Akt1) 的表达明显增加, MAPK1 和 Akt1 上调表明 EMP 可能是 MAPK 通路相关分子如 ERK1/ERK2 或者 PI3K/AKT 信号通路的一部分^[1,19]。等同或替代的调节涉及 EMP 调节细胞活动通路, MAPK1 上调已经被证实与多种类型的癌症相关, 如粒细胞性白血病, 表明 EMP 可能与肿瘤和免疫等异常细胞活动有关^[20]。

三、展 望

抗核抗体对包括 SLE 在内的自身免疫性疾病具有重要意义, 但其在 SLE 病情活动中的意义不明确^[21-22]。值得注意的是, 抗核抗体的本质是针对细胞核的抗体, 按照抗原诱发抗体的免疫学基本原理, 游离细胞孤核的存在及与免疫系统密切接触, 对诱发抗核抗体具有重要价值。造血岛有核红细胞脱核成熟过程, 是机体游离细胞孤核产生的唯一机制, 同时游离细胞孤核被造血岛中心具有免疫活性的巨噬细胞吞噬, 因此理论上, 骨髓造血岛生

理结构具备诱发抗核抗体产生的条件,而 EMP 是有核红细胞脱核成熟及孤核出现的关键蛋白。研究显示 SLE 损害累及骨髓,我们的研究也显示 SLE 小鼠骨髓造血岛 EMP 存在异常,提示 EMP 可能参与 SLE 抗核抗体形成,值得进一步深入研究^[23]。

参 考 文 献

- [1] Javan GT, Can I, Yeboah F, Lee Y, Soni S. Novel interactions between erythroblast macrophage protein and cell migration. *Blood Cells Mol Dis*, 2016, 60: 24-27.
- [2] Chasis JA. Erythroblastic islands: Specialized environmental niches for erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13 (3): 137-141.
- [3] Lacal PM, Petrillo MG, Ruffini F, Muzi A, Bianchini R, Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C, Graziani G, Nocentini G. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related ligand triggering upregulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 and promotes leukocyte adhesion. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 347 (1): 164-172.
- [4] Wang Z, Vogel O, Kuhn G, Gassmann M, Vogel J. Decreased stability of erythroblastic islands in integrin $\beta 3$ -deficient mice. *Physiol Rep*, 2013, 1 (2): e00018.
- [5] Mao X, Shi X, Liu F, Li G, Hu L. Evaluation of erythroblast macrophage protein related to erythroblastic islands in patients with hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Med Res*, 2013, 18 (1): 1-7.
- [6] Soni S, Bala S, Gwynn B, Sahr KE, Peters LL, Hanspal M. Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem*, 2006, 281 (29): 20181-20189.
- [7] Soni S, Bala S, Hanspal M. Requirement for erythroblast-macrophage protein (Emp) in definitive erythropoiesis. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 41 (2): 141-147.
- [8] Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Vet Med Sci*, 2003, 65 (4): 449-452.
- [9] Bala S, Kumar A, Soni S, Sinha S, Hanspal M. Emp is a component of the nuclear matrix of mammalian cells and undergoes dynamic rearrangements during cell division. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342 (4): 1040-1048.
- [10] Bell AJ, Satchwell TJ, Heesom KJ, Hawley BR, Kupzig S, Hazell M, Mushens R, Herman A, Teye AM. Protein distribution during human erythroblast enucleation in vitro. *Plos One*, 2013, 8 (4): e60300.
- [11] Korolnek T, Hamza I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood*, 2015, 125 (19): 2893-2897.
- [12] Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*, 1998, 92 (8): 2940-2950.
- [13] Sui Z, Nowak RB, Bacconi A, Kim NE, Liu H, Li J, Wickrema A, An XL, Fowler VM. Tropomodulin3-null mice are embryonic lethal with anemia due to impaired erythroid terminal differentiation in the fetal liver. *Blood*, 2014, 123 (5): 758-767.
- [14] Soni S, Bala S, Kumar A, Hanspal M. Changing pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38 (1): 25-31.
- [15] Manwani D, Bieker JJ. The erythroblastic island. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 82: 23-53.
- [16] Dorn DC, Dorn A. Stem cell autotomy and niche interaction in different systems. *World J Stem Cells*, 2015, 7 (6): 922-944.
- [17] Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010, 58 (5): 355-364.
- [18] 程喜平, 赖梅生, 范萍, 梁康礼, 胡小倩, 凡慧, 陈金中. 滋阴清热药对狼疮鼠骨髓 EMP 及血清抗 ds-DNA 抗体的影响. *转化医学电子杂志*, 2016, 3 (2): 8-10.
- [19] Digiacoimo G, Ziche M, Dello Sbarba P, Donnini S, Rovida E. Prostaglandin E2 transactivates the colony-stimulating factor-1 receptor and synergizes with colony-stimulating factor-1 in the induction of macrophage migration via the mitogen-activated protein kinase ERK1/2. *FASEB J*, 2015, 29 (6): 2545-2554.
- [20] Ma D, Fang Q, Wang P, Gao R, Wu W, Lu T, Cao L, Hu X, Wang J. Induction of heme oxygenase-1 by $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger 1 protein plays a crucial role in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*, 2015, 290 (20): 12558-12571.
- [21] Yang Z, Ren Y, Liu D, Lin F, Liang Y. Prevalence of systemic autoimmune rheumatic diseases and clinical significance of ANA profile: data from a tertiary hospital in Shanghai, China. *Apmis*, 2016, 124 (9): 805-811.
- [22] Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies-quintessential biomarkers of SLE. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12 (2): 102-110.
- [23] 周晓洁, 周蕾, 巩路. 系统性红斑狼疮患者血液系统损害研究进展. *新医学*, 2010, 41 (9): 628-630.

(收稿日期: 2016-11-26)

(本文编辑: 洪悦民)