

# 蛋白酶3对造血干/祖细胞增殖和分化的影响

孙露<sup>1,2</sup> 刘欢<sup>1,2</sup> 谢雪梅<sup>1,2</sup> 王丽莎<sup>1,2</sup> 张诗悦<sup>1,2</sup> 赵梓含<sup>1,2</sup> 成天然<sup>1,2</sup> 姜珊<sup>1,2</sup>  
王小菡<sup>3</sup> 王彤<sup>1,2</sup> 许元富<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 北京协和医学院, 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020; <sup>2</sup>天津医学健康研究院, 天津 301600; <sup>3</sup>第二临床医学院, 广东医科大学, 东莞 523808)

**摘要** 蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3)是一种中性丝氨酸蛋白酶, 与病原体清除、组织损伤和细胞凋亡有关。近期研究发现, *Prtn3*在造血干/祖细胞中高表达, 但其生物学功能及意义仍不清楚。围绕上述问题, 该文采用单细胞转录组测序方法分析*Prtn3*基因在野生型小鼠(WT)血细胞中的表达情况; 构建*Prtn3*基因敲除小鼠(*Prtn3*<sup>-/-</sup>), 并采用流式细胞术和血常规分别分析*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠骨髓中的LT-HSC、ST-HSC、MPP、CMP、GMP、MEP及分化成熟细胞的数目和比例; 体外干/祖细胞单细胞和集落培养法分析LSK细胞的增殖和分化潜能; 竞争移植实验分析*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠LSK细胞的竞争能力以及外周血、脾脏和骨髓中各种血细胞的数目和比例; 免疫荧光法分析*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠脾脏和骨髓中的供体血细胞分布。结果显示, *Prtn3*在小鼠造血干/祖细胞, 尤其是在髓系祖细胞(CMP和GMP)中持续高表达; *Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠骨髓中LSK和LK细胞所占比例显著高于WT小鼠骨髓中LSK和LK细胞的比例且表现为LT-HSC、ST-HSC、MPP、CMP及GMP在骨髓细胞中的比例均显著增加( $P<0.05$ ); 单个LSK细胞克隆形成能力分析结果表明*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的LSK细胞分裂产生的细胞数目特别是小克隆形成的数量显著高于对照组( $P<0.05$ ); 体外多细胞集落形成实验结果显示*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠LSK细胞的G、M、GM集落形成数量与对照组相比显著增加( $P<0.05$ ); 竞争移植实验表明*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的LSK细胞增殖分化产生的细胞所占比例显著降低( $P<0.05$ ), *Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的LSK细胞(CD45.2<sup>+</sup>)分化产生的中性粒细胞和单核细胞占CD45.2<sup>+</sup>细胞的比例显著增加( $P<0.05$ ), 而淋巴细胞所占比例显著减少( $P<0.05$ )。总之, *Prtn3*基因参与调控造血干/祖细胞增殖、分化。该研究将为造血干/祖细胞增殖和分化的调控以及造血稳态维持的研究提供一定的理论和实验基础。

**关键词** 蛋白酶3; 造血干/祖细胞; 增殖和分化; 髓系造血

## Effect of Proteinase 3 on the Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells

SUN Lu<sup>1,2</sup>, LIU Huan<sup>1,2</sup>, XIE Xuemei<sup>1,2</sup>, WANG Lisha<sup>1,2</sup>, ZHANG Shiyue<sup>1,2</sup>, ZHAO Zihan<sup>1,2</sup>, CHENG Tianran<sup>1,2</sup>,  
JIANG Shan<sup>1,2</sup>, WANG Xiaohan<sup>3</sup>, WANG Tong<sup>1,2</sup>, XU Yuanfu<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; <sup>2</sup>Tianjin Institutes of Health Science, Tianjin 301600, China; <sup>3</sup>the Second School of Clinical Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

收稿日期: 2023-03-15 接受日期: 2023-04-20

中国医学科学院医学科学创新基金(批准号: 2021-12M-1-017)和国家自然科学基金(批准号: 81970107)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

Received: March 15, 2023 Accepted: April 20, 2023

This work was supported by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2021-12M-1-017), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970107)

\*Corresponding author. Tel: +86-13820755331, E-mail: xuyf@ihcams.ac.cn

**Abstract** PRTN3 (proteinase 3) is a neutral serine protease, which is associated with pathogen elimination, tissue damage, and apoptosis. Recent studies have reported that *Prtn3* is highly expressed in hematopoietic stem/progenitor cells, but the biological functions and annotations remain largely unknown. Here, this article aimed to investigate *Prtn3* expression in the hematopoietic compartment of wild-type mice (WT) by single-cell transcriptomics and construct a *Prtn3* knockout mouse model (*Prtn3*<sup>-/-</sup>) to analyze the number and percentage of LT-HSC, ST-HSC, MPP, CMP, GMP, and MEP as well as the mature blood cells by flow cytometry and blood routine analysis. *In vitro* single-cell colony assay and CFC assay was used to investigate the proliferation and differentiation potential of LSKs. Competitive transplantation of isolated mouse bone marrow LSK cells was used to analyze the number and percentage of different lineages of in PB, SP, and BM, and compare the distribution of donor-derived cells in SP and BM. The results showed that *Prtn3* was consistently high expression in mouse hematopoietic stem/progenitor cells, especially in myeloid progenitor cells (CMP and GMP). The proportion of LSK and LK cells in the bone marrow of *Prtn3*<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that of WT mice, and the number and proportion of LT-HSC, ST-HSC, MPP, CMP and GMP in bone marrow cells significantly increase ( $P < 0.05$ ). Single-cell colony assays showed that the number of cells produced by *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSK cell division, especially the number of small clones, was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). *In vitro* colony, formation assays showed that the number of G, M and GM colony formation of *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSK cells increased significantly compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Competitive transplantation assays showed that the progeny cells produced by *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSKs dropped significantly ( $P < 0.05$ ), and the proportion of neutrophils and monocytes produced by *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSKs increased ( $P < 0.05$ ), while the proportion of lymphocytes decreased ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the *Prtn3* gene is involved in the regulation of hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and differentiation. This study provides a certain theoretical and experimental basis for the study of the regulation of proliferation and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells for the maintenance of hematopoietic homeostasis.

**Keywords** proteinase 3; hematopoietic stem/progenitor cells; proliferation and differentiation; myeloid hematopoiesis

造血干/祖细胞(hematopoietic stem progenitor cells, HSPCs)是目前研究最多的成体干细胞,是机体整个生命周期中所有血细胞的来源。而骨髓微环境是造血干/祖细胞赖以生存的体内造血微环境,调节着HSPCs的静息、增殖和分化。通常,在生理状态下,骨髓中大多数的HSPCs处于静息期,少数HSPCs通过增殖和分化生成各种类型的血细胞,并维持和形成一种各类血细胞占比相对稳定的造血平衡;机体衰老会引起上述稳态造血平衡发生改变,以适应机体的变化<sup>[1-2]</sup>。一般来说,衰老引起的造血稳态变化与感染和炎症引起的变化是不一样的,是不可恢复的,表现为HSPCs的干性和多向分化潜能降低,进而出现HSPCs偏向于髓系分化、粒系造血增强和粒细胞占血细胞的比例增加的骨髓和血象变化<sup>[3-5]</sup>。目前,已知有多种转录因子主要包括PU.1、GATA-1、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\epsilon$ 、RAR和Gfi-1等参与了粒系造血,但这些仍然不能完全阐明衰老引起的造

血干/祖细胞偏向髓系分化的分子机制。

蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3)是在中性粒细胞中发现的继人中性粒细胞弹性蛋白酶(human neutrophil elastase, HNE)和组织蛋白酶G(cathepsin G, CG)之后的第三种丝氨酸蛋白酶<sup>[6-7]</sup>。PRTN3不仅参与与消灭感染性炎症中的病毒体,还与细胞凋亡以及多种组织损伤相关的慢性炎症疾病如血管炎性肉芽肿病(granulomatosis with polyangiitis, GPA)、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)、肺囊肿性纤维症(pulmonary fibrosis, PF)等有关<sup>[8]</sup>。PRTN3主要存在于中性粒细胞的嗜天青颗粒中以及单核细胞含有过氧化物酶的溶酶体中。此外, PRTN3也可表达在嗜碱性粒细胞、肥大细胞、内皮细胞<sup>[9]</sup>和人肺泡壁细胞<sup>[10]</sup>等中。近期,我们通过检索分析Haemosphere数据库(<https://www.haemosphere.org>)和Bloodspot数据库(<http://servers.binf.ku.dk/bloodspot>),并比对我们单细胞转录组测序中

*Prtn3*基因在造血分化谱系中的表达,明确了造血干/祖细胞中*Prtn3*基因高表达,但其生物学功能不十分清楚。基于以上研究背景,我们开展了*Prtn3*对造血干/祖细胞增殖和分化以及髓系造血影响的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

*Prtn3*基因缺失小鼠由江苏集萃药康生物科技股份有限公司构建;野生型对照小鼠采用其同窝野生型小鼠;竞争性骨髓移植受体小鼠为C57BL6-Ly5.2/CD45.1亚型小鼠;竞争性供者细胞取自C57BL6-Ly5.2/CD45.2亚型小鼠。实验动物均在中国医学科学院血液学研究所无特定病原体(specific pathogen free, SPF)动物房饲养,标准动物饲料喂养,自由进食饮水。所有涉及小鼠的实验均得到中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所动物管理中心及伦理委员会的批准(批准号:IHCAMS-DWLL-CIFMS2021004-1)。

### 1.2 血常规分析

每只小鼠尾部采血10  $\mu$ L,用血象稀释液稀释25倍后,再用全自动血液细胞分析仪(迈瑞医疗器械有限公司,BC-30)检测各类血细胞数量和占比。

### 1.3 流式细胞术分析小鼠骨髓中造血干/祖细胞的组成和占比

将周龄为8~12周的小鼠处死后,去除其皮毛,完整地将其胫骨、股骨、髌骨剥离,再将剥离下的胫骨、股骨、髌骨浸在PBE(PBS+EDTA)溶液中备用。向15 mL离心管里加入5 mL PBE溶液,用1 mL注射器从骨头的一端插入骨髓腔,在溶液中不断冲洗,使骨髓中的细胞充分冲洗出来。得到的细胞悬液经75  $\mu$ m滤膜过滤,1 500 r/min离心5 min,再用1 mL PBE溶液重悬,裂解红细胞后进行细胞计数。之后取适量细胞进行流式抗体[*Lin*-APC(Biolegend, 348703)、*Sca1*-PE/Cy7(Biolegend, 108114)、*c-Kit*-APC/Cy7(Biolegend, 105826)、*CD34*-FITC(eBioscience, 11-0341-85)、*CD135*-PE(Biolegend, 135306)、*CD16/32*-APC/Cyanine7(Biolegend, 101327)]标记,每个样本细胞浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,并用分析型流式细胞仪-CantoII进行分析。

### 1.4 造血干/祖细胞竞争性移植实验及分析

制备实验小鼠(供体,CD45.2)全骨髓单细胞

悬液,进行*c-Kit*磁珠阳性富集后,分选造血干细胞(*Lin*<sup>-</sup>、*c-Kit*<sup>+</sup>、*Sca1*<sup>+</sup>、LSK)细胞。制备CD45.1小鼠全骨髓单细胞悬液;CD45.1小鼠(受体)进行致死剂量(9.5 Gy)的X-射线辐照骨髓。将 $1 \times 10^3$ 个供体小鼠的LSK细胞和 $5 \times 10^5$ 个CD45.1小鼠的全骨髓细胞混合后,通过尾静脉注射移植于骨髓后的受体小鼠内。移植后小鼠口服恩诺沙星4周。移植4个月后取出小鼠股骨、胫骨、髌骨,研磨脾脏,用1 mL注射器冲出骨髓细胞,过滤并重悬。用红细胞裂解液裂解骨髓的红细胞,进行流式抗体[*CD11b*-APC(Biolegend, 101211)、*CD45R/B220*-PE/Cy7(Biolegend, 103221)、*Ly6C*-APC/Cy7(Biolegend, 128025)、*CD3*-FITC(Biolegend, 100203)、*Ly6G*-PE(Biolegend, 127607)、*CD45.1*-PerCP(Biolegend, 110725)]标记,最后通过分析型流式细胞仪-CantoII进行分析。

### 1.5 骨髓及脾脏冰冻切片免疫荧光染色分析CD45.1<sup>+</sup>细胞与CD45.2<sup>+</sup>细胞的分布

制备7  $\mu$ m厚度的脾脏及骨髓冰冻切片,在4%多聚甲醛中固定过夜,PBS洗5 min,用含0.2% Triton-100的PBS通透30 min,加入PBS洗5 min(该步骤重复3次),吸去PBS,常温用5%山羊血清封闭30 min。按照1:200比例加入抗CD45.1(Biolegend, 110714)或者抗CD45.2(Biolegend, 109806)直标抗体4  $^{\circ}$ C孵育过夜,加入PBS洗5 min,DAPI(Biolegend, 422801)染核5 min,加入PBS洗5 min,用封片剂(ThermoFisher Scientific, p36931)固定于载玻片上,置于转盘式共聚焦显微镜(UltraVIEW VOX)分析CD45.1<sup>+</sup>细胞与CD45.2<sup>+</sup>细胞的比例。

### 1.6 造血干/祖细胞增殖和单细胞克隆形成能力的检测

常规制备骨髓细胞并进行LSK细胞表面荧光标记,使用流式细胞分选仪分选单个LSK细胞到无血清条件培养基[含rHSA、50 ng/mL的重组小鼠干细胞因子(mouse stem cell factor, mSCF, Peprotech)和50 ng/mL的重组小鼠血小板生成素(mouse thrombopoietin, mTPO, Peprotech)],于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养体系中培养7天,每天在倒置显微镜下观察计数每孔细胞数并记录,7天后统计形成的克隆的大小和数目。

### 1.7 集落形成实验

集落形成细胞(colony-forming cell, CFC)培养用于检测某一细胞群体多潜能祖细胞和定向祖细胞。

使用流式细胞分选仪分选LSK细胞加入到Methocult GF M3434培养基(stem cell technologies)内,同时加入11  $\mu$ L青霉素-链霉素的混合溶液(100 $\times$ )。轻轻地吹吸均匀以减少气泡的生成,再将其接种于24孔板内。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱内培养3~10天。以培养基说明书描述为标准在显微镜下观察克隆,计数克隆的种类和数目。

### 1.8 RT-PCR检测

使用Picopure RNA分离试剂盒(ThermoFisher Scientific, KIT0204)从小鼠骨髓LSK细胞和中性粒细胞中分离RNA。采用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad, 1708891)合成cDNA,采用SYBR Green定量RT-PCR试剂盒(Bio-Rad, 1708880)进行RT-PCR。RT-PCR检测*Prtn3*的表达水平,*Prtn3*的上游引物为5'-CCC TGA TCC ACC CGA GAT TC-3';*Prtn3*的下游引物为5'-GGT TCT CCT CGG GGT TGT AA-3'。*Gapdh*的上游引物为5'-AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT-3';*Gapdh*的下游引物为5'-CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA-3'。

### 1.9 Western blot检测

分选*Prtn3*基因敲除鼠及同窝对照小鼠LSK细胞。加入100  $\mu$ L含磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的Cocktail裂解液重悬细胞( $2 \times 10^5$ 个),再加入等体积的SDS样本缓冲液(ThermoFisher Scientific, NP0007),并充分混匀振荡,置于95  $^{\circ}$ C金属浴煮沸5 min至蛋白变性,然后将其转移到冰上冷却3 min,超声后冻存或直接上样。经80 V恒压电泳、300 mA恒流转膜2 h、5%牛奶室温封闭1 h后,4  $^{\circ}$ C孵育1:1 000比例稀释的一抗[抗PRTN3抗体(ab103632)]过夜,4  $^{\circ}$ C孵育1:5 000比例稀释的二抗(Bio-Rad, 1706516)1.5 h,加入化学发光剂(ECL Western blot kit, Millipore),使用Bio-Rad Chemi Doc化学发光成像系统曝光采集图像。

### 1.10 单细胞转录组测序

采用Cell Ranger Version 3.1.0流程进行原始数据的质量控制和小鼠参考基因组mm10之间的比对。我们使用“ScaleData”函数消除由处理和线粒体基因表达差异导致的批次效应。数据降维分析包括以下三个过程:寻找可变基因(variable gene)、主成分分析(principal component analysis, PCA)以及非线性降维方法分析(uniform manifold approximation and projection, UMAP)。我们使用Louvain算法,应用在

“RunUMAP”时所用的相同的主成分,执行“FindClusters”函数对细胞进行聚类。FeaturePlot函数用于展示基因*Prtn3*的表达。

### 1.11 统计学方法

数据采用GraphPad Prism 8进行统计学分析,采用未配对Student *t*检验进行统计学差异分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

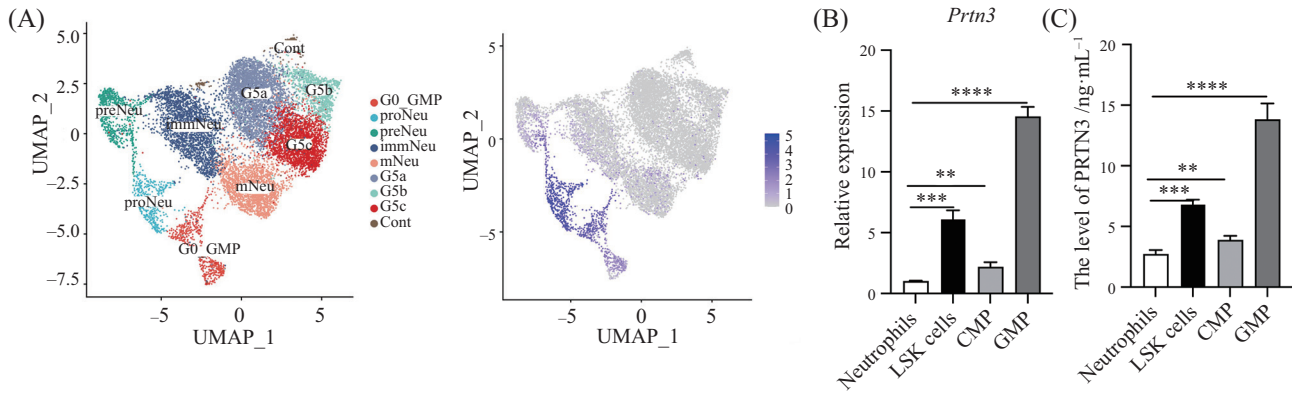
## 2 结果

### 2.1 *Prtn3*在造血干/祖细胞中高表达

为了研究*Prtn3*在小鼠造血干/祖细胞中的作用,我们采用单细胞转录组测序方法分析了C57BL/6小鼠中的c-Kit阳性和Gr1阳性的骨髓细胞的基因表达谱<sup>[1]</sup>。我们分析后发现*Prtn3*在小鼠造血干/祖细胞中有较高水平的表达(图1A)。我们进一步采用RT-PCR验证分离的小鼠LSK细胞、髓系共同祖细胞(common myeloid progenitor, CMP)、粒细胞-单核细胞祖细胞(granulocyte-monocyte progenitor, GMP)和中性粒细胞中*Prtn3*的表达情况,发现*Prtn3*在造血干/祖细胞中高表达,并显著高于中性粒细胞中的表达水平(图1B)。同时,我们采用ELISA分析小鼠造血干/祖细胞(LSK细胞、CMP、GMP)和中性粒细胞中PRTN3的表达情况,结果显示PRTN3可在造血干/祖细胞中表达(图1C)。以上结果提示,*Prtn3*在调控造血干/祖细胞的增殖和髓系分化调控方面可能起着重要作用。

### 2.2 *Prtn3*敲除小鼠的构建、鉴定及分析

为了研究*Prtn3*缺失对小鼠造血干/祖细胞增殖和分化等特性的影响,我们设计并成功获得了*Prtn3*基因敲除小鼠(*Prtn3*<sup>-/-</sup>)(图2A)。聚合酶链式反应(PCR)检测显示*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的*Prtn3*基因被敲除(图2B)。为了进一步明确*Prtn3*在小鼠的造血干/祖细胞中的敲除情况,利用流式分选技术分选出小鼠的LSK细胞,提取其蛋白和总RNA,通过RT-PCR分析*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的干/祖细胞中*Prtn3*的基因表达水平以及Western blot分析其蛋白水平的表达。结果显示*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的造血干/祖细胞中*Prtn3*基因成功被敲除(图2C和图2D)。同时,外周血常规检测结果显示,*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的粒细胞和单核细胞的数量及比例显著增加;淋巴细胞的数量和比例显著降低( $P < 0.05$ )(图2E和图2F)。这些结果提示,*Prtn3*基因缺失促进了造血干/祖细胞向髓系分化。

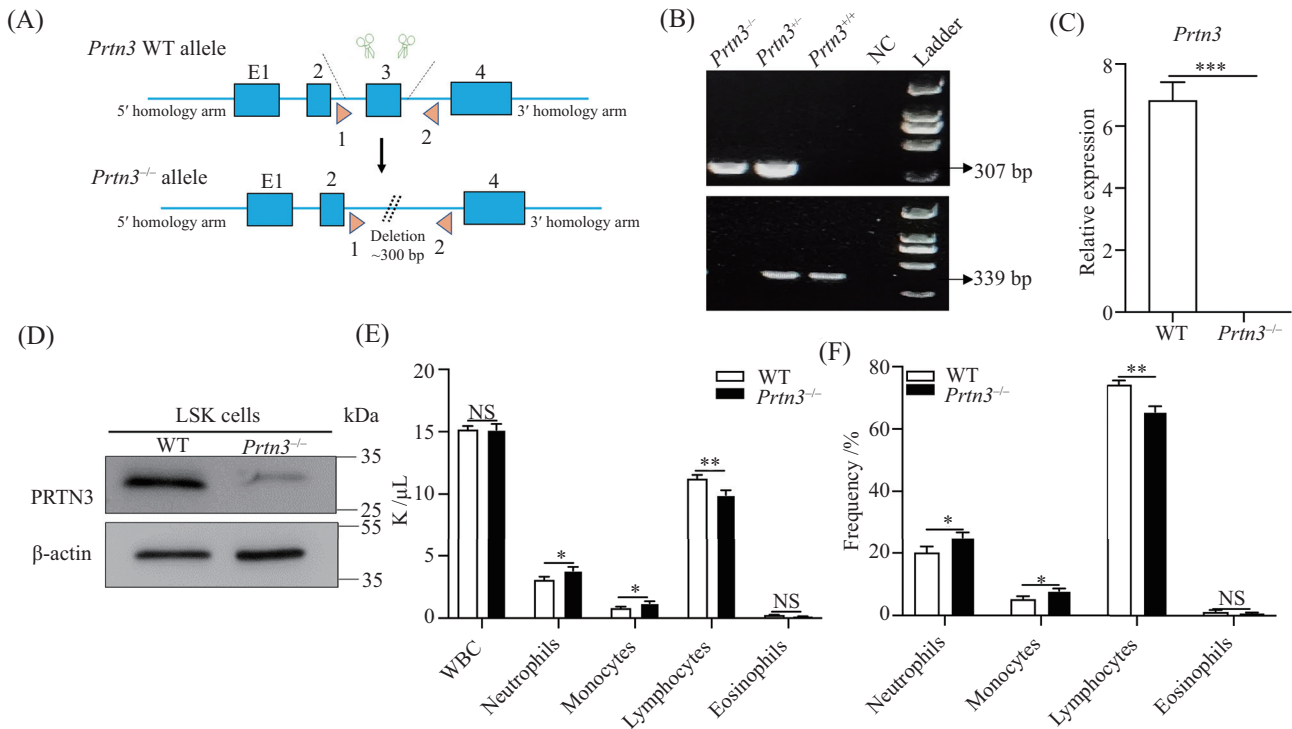


A: UMAP图显示骨髓、外周血和脾脏共12 285个细胞, 颜色分别代表不同的细胞类型及细胞亚群(左图)。Prtn3在小鼠造血干/祖细胞及粒细胞分群的表达(右图)。B: 转录水平检测WT小鼠中性粒细胞、LSK细胞、CMP、GMP中Prtn3表达情况。C: ELISA检测WT小鼠中性粒细胞、LSK细胞、CMP、GMP中PRTN3表达情况。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001。

A: UMAP diagram shows a total of 12 285 cells in bone marrow, peripheral blood, and spleen, and the colors represent different cell types and cell subsets (left). Expression of *Prtn3* in mouse hematopoietic stem/progenitor cells and granulocyte groups (right). B: transcriptional level identification of *Prtn3* expression in neutrophils, LSK cells, CMP, GMP in WT mice. C: ELISA identification of PRTN3 expression in neutrophils, LSK cells, CMP, GMP in WT mice. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001.

图1 Prtn3在造血干/祖细胞中的表达

Fig.1 Expression of *Prtn3* in hematopoietic stem progenitor cells



A: *Prtn3*基因敲除小鼠模型的构建图。B: 基因水平检测Prtn3<sup>-/-</sup>小鼠LSK细胞中Prtn3表达情况。C: 转录水平检测Prtn3<sup>-/-</sup>小鼠LSK细胞中Prtn3表达情况。D: 蛋白水平检测Prtn3<sup>-/-</sup>小鼠LSK细胞中PRTN3表达情况。E: 小鼠外周血常规细胞数量检测。F: 小鼠外周血常规细胞比例检测。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

A: construction diagram of a mouse model of *Prtn3* knockout. B: gene level identification of *Prtn3* mouse expression in *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSK cells. C: transcriptional level identification of *Prtn3* mouse expression in *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSK cells. D: protein level identification of the expression of PRTN3 in *Prtn3*<sup>-/-</sup> mouse LSK cells. E: results of routine cell count test results in peripheral blood of mice. F: measurement results of routine cell ratio test results in peripheral blood of mice. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

图2 Prtn3基因敲除鼠的构建以及鉴定

Fig.2 Construction and identification of *Prtn3* knockout mice

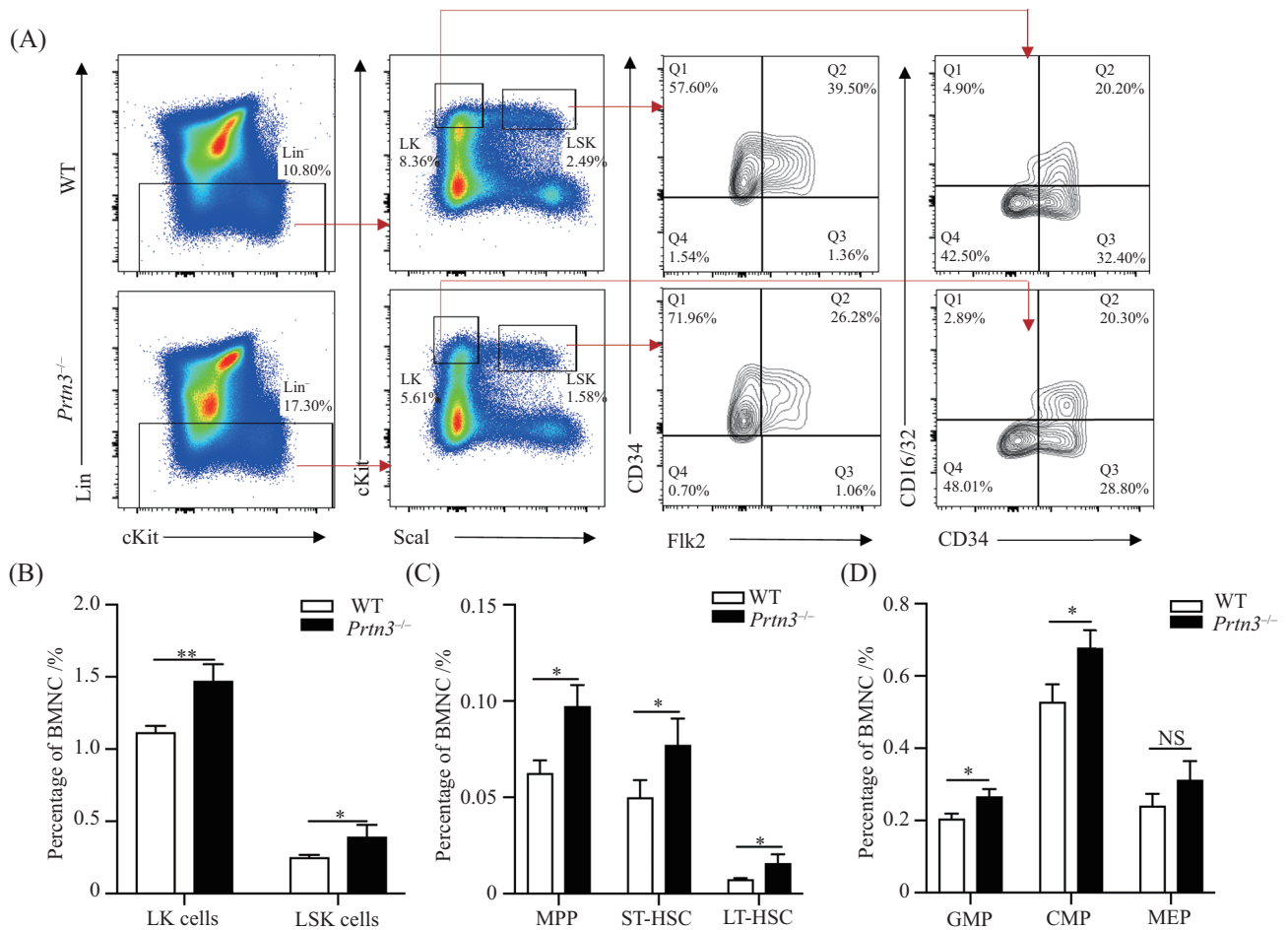
### 2.3 Prtn3敲除对小鼠造血干/祖细胞数量及比例的影响

为了研究 *Prtn3* 基因敲除对小鼠骨髓造血干/祖细胞的影响, 我们通过流式细胞术分析其数量及比例。研究结果显示: 与 WT 小鼠相比, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 小鼠骨髓中 LSK 细胞、LK(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>) 细胞的比例和数目均显著增高 ( $P < 0.05$ ) (图 3A 和图 3B)。进一步分析发现 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 小鼠骨髓中 LT-HSC(Flk2<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>LSK) 细胞、ST-HSC(Flk2<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>LSK) 细胞、MPP(Flk2<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>LSK) 细胞、CMP(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>) 细胞和 GMP(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>) 细胞的比例和数量均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 但 MEP(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD16/32<sup>-</sup>) 细胞的比例和数量无显著变化(图 3A、图 3C 和图 3D)。

以上结果说明, *Prtn3* 缺失导致小鼠骨髓造血干/祖细胞的比例及数量显著增加(MEP 除外)。

### 2.4 Prtn3 基因敲除促进造血干/祖细胞的增殖及集落形成

由于 *Prtn3* 基因缺失能显著提高小鼠骨髓中造血干/祖细胞的比例及数量, 我们推测 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 小鼠的造血干/祖细胞能较快地由静息状态进入增殖状态。为此, 我们采用体外单细胞体外培养和克隆形成实验来分析 *Prtn3* 基因缺失对小鼠造血干/祖细胞增殖的影响。实验中我们采用流式细胞分选仪将单个的 LSK 分选到 U 型底且预加入条件培养基的 96 孔板中, 每天观察细胞的增殖分裂状态并记录数目, 在培养 7 天后, 统计形成的克隆的数目和大小。研究结果显示: 相较于野生型 LSK 细胞, 在培养前期(第 2~5 天),



A: 流式细胞术检测 LSK、LT-HSC、ST-HSC、MPP、LK、GMP、CMP 和 MEP 的比例。B: LK 细胞和 LSK 细胞比例分析。C: GMP、CMP、MEP 比例分析。D: MPP、ST-HSC、LT-HSC 比例分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , NS:  $P > 0.05$ 。

A: the flow cytometry measures the proportions of LSK, LT-HSC, ST-HSC, MPP, LK, GMP, CMP, and MEP. B: LK cell and LSK cell ratio analysis. C: GMP, CMP, MEP ratio analysis. D: MPP, ST-HSC, LT-HSC ratio analysis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , NS:  $P > 0.05$ .

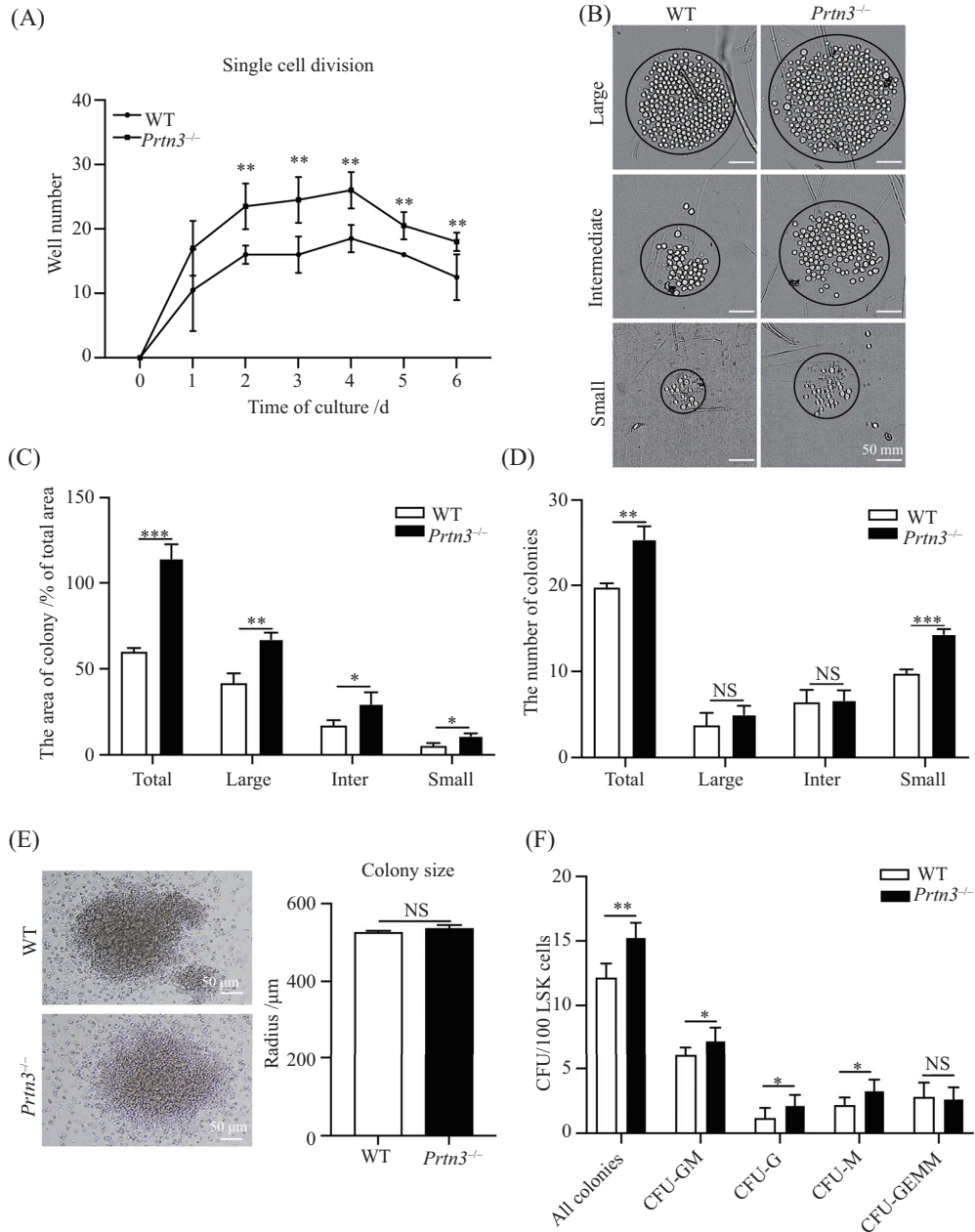
图 3 *Prtn3* 基因敲除对小鼠造血干/祖细胞数量及比例的影响

Fig.3 Effects of *Prtn3* knockout on the number and proportion of mouse hematopoietic stem and progenitor cells

*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠 LSK 细胞进入增殖状态的数目显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 4A)。此外, *Prtn3*<sup>-/-</sup> LSK 细胞体外培养后增殖生成的细胞总数以及形成的细胞克隆面积均显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 4B 和图 4C); 其总的克隆形成数量, 特别是小克隆形成的数量明显增加, 但

是该表型对中等大小及大克隆的形成数量无显著影响 (图 4D)。以上结果表明, *Prtn3* 基因敲除能够显著促进 LSK 较早进入增殖状态, 但这也会导致部分 LSK 细胞分裂能力呈下降趋势。

随后, 我们又通过多细胞集落形成实验来进一步



A: 单细胞克隆检测造血干/祖细胞的增殖, 统计7天每孔中的细胞增殖速率。B: 每个孔中的大、中、小克隆的面积。C: 每个克隆大小的百分比。D: 大、中、小克隆的数目和统计。E: 将WT和*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的100个LSK细胞在M3434培养基中培养7天, 统计克隆大小。F: 统计CFU-all colonies、GM、G、M、GEMM数目。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , NS:  $P > 0.05$ 。

A: the proliferation of hematopoietic stem progenitor cells was detected by single-cell cloning experiments, counting the cell proliferation rate in each well for 7 days. B: the size of large, medium, and small clones in each well. C: the percentage of each clone size. D: number and statistics of large, medium, and small clones. E: culture 100 LSK cells of WT and *Prtn3*<sup>-/-</sup> mice in M3434 medium for 7 days to observe the statistical clone size. F: the number of CFU-all colonies, GM, G, M, GEMM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , NS:  $P > 0.05$ .

图4 *Prtn3*基因敲除对造血干/祖细胞增殖及集落形成能力的影响

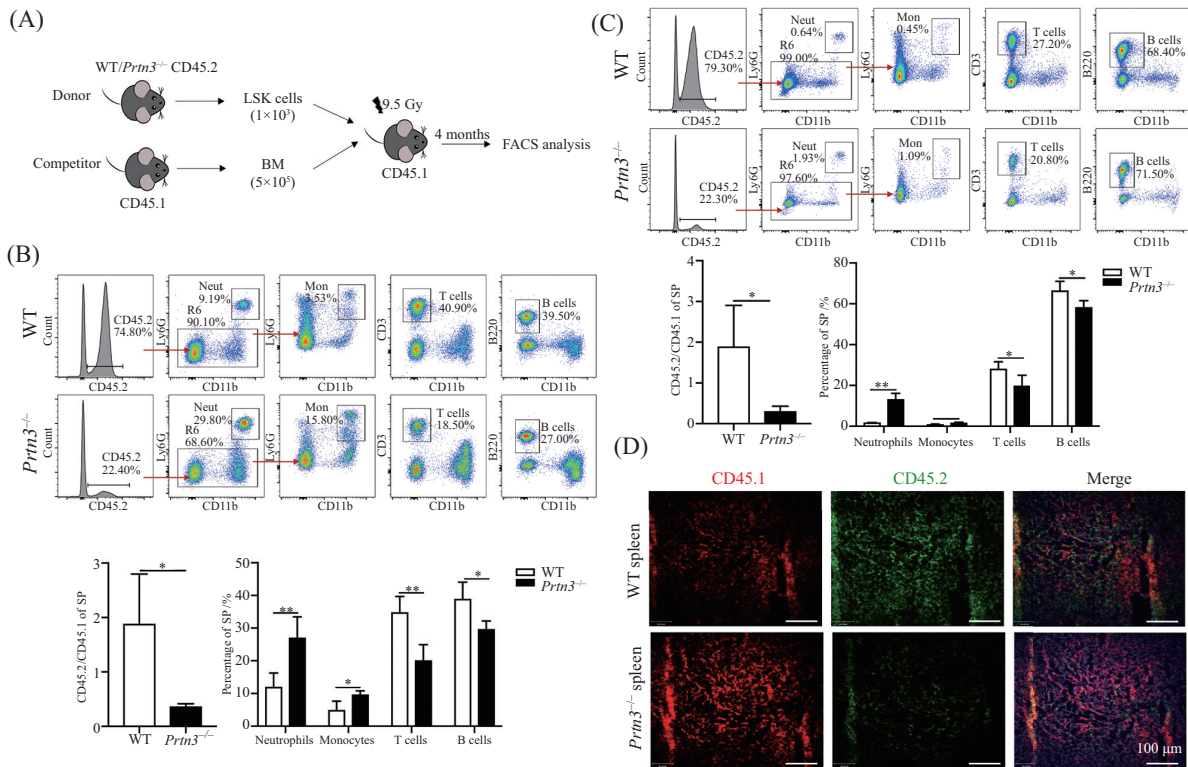
Fig.4 Effects of deficiency *Prtn3* on the proliferation and colony formation of hematopoietic stem progenitor cells

步分析 *Prtn3* 基因敲除对造血干/祖细胞向髓系分化的影响。同样, 我们首先采用流式细胞分选仪分选 LSK 细胞, 并将 100 个 LSK 细胞接种到含有 Methocult GF M3434 培养基 (stem cell technologies) 的 24 孔板中, 经过 7 天培养后, 统计其集落的类型和数目。WT 和 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 小鼠骨髓细胞形成集落的大小相似 (图 4E)。相较于 WT 的 LSK 细胞, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 的 LSK 细胞集落形成能力增强, 其总集落形成数量, 特别是 G、M、GM 集落形成数量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 但对 GEMM 集落数量的形成无显著影响 (图 4F)。这些结果显示 *Prtn3* 敲除促进了 LSK 细胞形成髓系集落的能力。

### 2.5 *Prtn3* 基因敲除对造血干/祖细胞造血重建能力的影响

体内研究发现 *Prtn3* 基因缺失能显著提高小鼠骨髓中造血干/祖细胞的比例及数量, 而体外研究又

表明 *Prtn3* 基因敲除能够显著促进 LSK 细胞较早进入增殖状态。为此, 我们开展了 WT 和 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 骨髓中的 LSK 细胞的竞争性移植实验。即将来自 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 及 WT 小鼠骨髓中的  $1 \times 10^3$  个 LSK 细胞 (供体 CD45.2 小鼠) 和  $5 \times 10^5$  个骨髓细胞 (CD45.1 小鼠) 混合移植到经过致死剂量 (9.5 Gy) 放射线辐照过的受体 (CD45.1 小鼠) 内 (图 5A)。通过流式细胞术分析移植 4 个月后受体小鼠外周血中供体细胞的嵌合率。结果显示: 与对照组相比, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 来源的外周血 CD45.2 与 CD45.1 的比例降低, 但 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 来源小鼠的粒细胞的数量和比例显著增加 (占 CD45.2<sup>+</sup> 细胞的比例), T 细胞和 B 细胞数量和比例显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 5B)。同时, 进一步分析脾脏中来源于供鼠的体细胞的嵌合率, 与外周血的比例一致, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 来源小鼠脾脏 CD45.2 与 CD45.1 的比例降低, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 来源小鼠的粒细胞的数量和比例显著增加 (占 CD45.2<sup>+</sup> 细胞的比例); 脾脏中供鼠来源的 LSK



A: WT和*Prtn3*<sup>-/-</sup>小鼠的LSK细胞的竞争性移植技术路线示意图。B: 移植4个月后外周血中的来源于CD45.2的细胞比例及供体来源细胞比例流式图, 统计中性粒细胞、单核细胞、T细胞及B细胞的百分比。C: 移植4个月后脾脏中的CD45.2比例及供体来源细胞百分比分析和中性粒细胞, 单核细胞, T细胞及B细胞流式图。D: 免疫荧光染色显示移植4个月后脾脏及骨髓中CD45.1及CD45.2比例及分布。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: four months after transplantation, schematic of competitive transplantation of LSK cells from WT and *Prtn3*<sup>-/-</sup> mice. B: proportion of CD45.2 in peripheral blood and flow cytometry of donor-derived cells, percentage analysis, and neutrophils, monocytes, T cells, and B cells. C: four months after transplantation, analysis of CD45.2 ratio and percentage of donor-derived cells in the spleen and flow cytometry of neutrophils, monocytes, T cells, and B cells. D: immunofluorescence staining showed the proportion and distribution of CD45.1 and CD45.2 in the spleen and bone marrow 4 months after transplantation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图5 *Prtn3* 基因敲除对造血干/祖细胞造血重建能力的影响

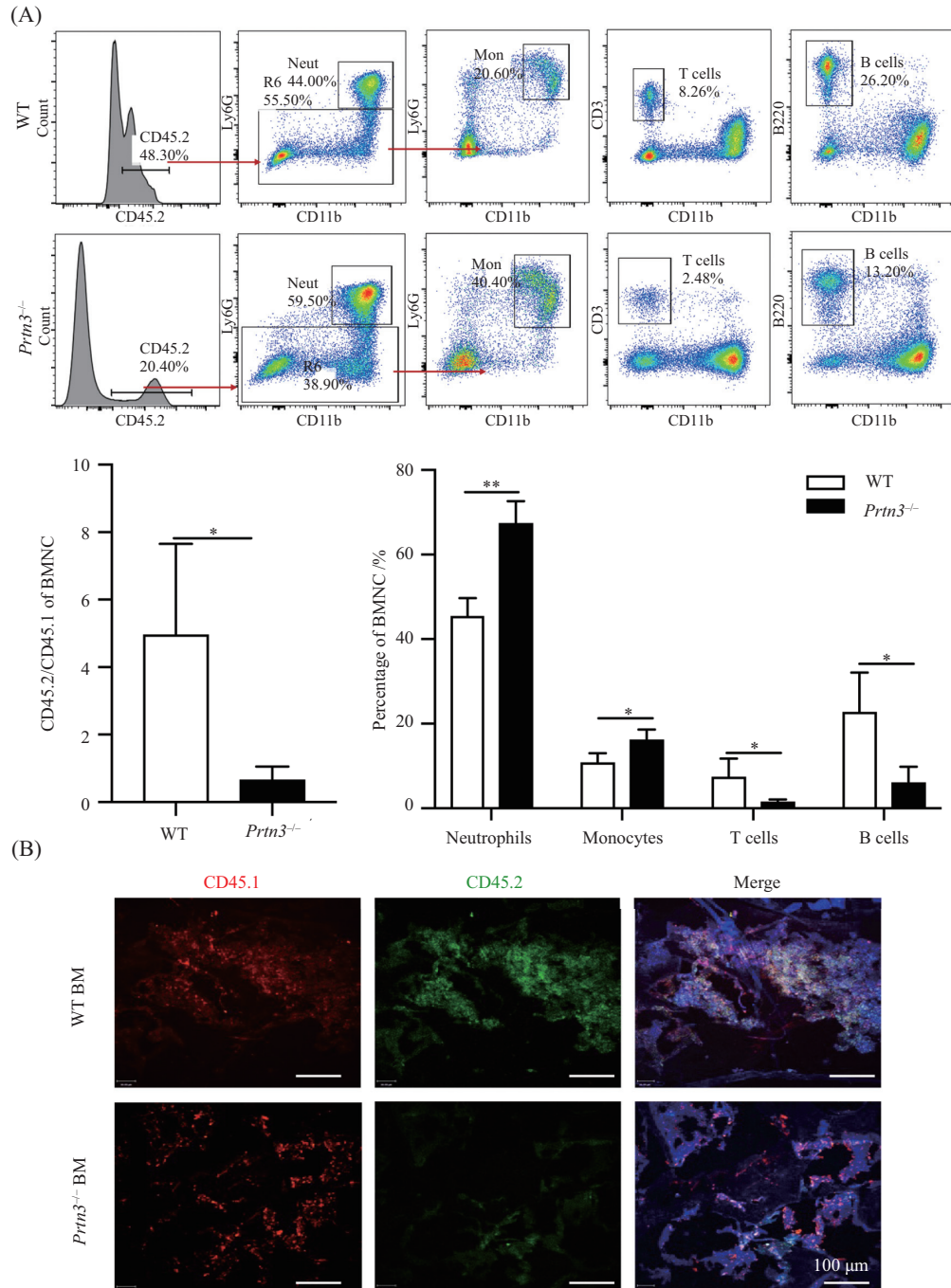
Fig.5 Effect of *Prtn3* knockout on hematopoietic reconstitution ability of hematopoietic stem progenitor cells



偏向髓系分化, B细胞比例显著降低(图5C)。免疫荧光染色结果也显示 *Prtn3*<sup>-/-</sup> 供鼠 CD45.2/CD45.1 在脾脏中的比例显著低于对照组(图5D)。

进一步分析受鼠骨髓中来源于供鼠的造血干/祖细胞髓系和淋系细胞分化情况以及 CD45.2 与 CD45.1

的比例, 结果显示: 相较于 WT 来源的 LSK 细胞, *Prtn3*<sup>-/-</sup> 来源的 LSK 细胞移植后表现出髓系细胞比例显著增加, 淋系细胞比例减少, CD45.2 与 CD45.1 的比例显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 6A 和图 6B)。这些结果表明 *Prtn3* 基因敲除加速了 LSK 细胞的增殖和衰老 (倾



A: 移植4个月后骨髓中的CD45.2比例及供体来源细胞流式图, 统计中性粒细胞、单核细胞、T细胞及B细胞比例。B: 免疫荧光染色显示移植4个月后骨髓中CD45.1及CD45.2比例及分布。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: four months after transplantation, the proportion of CD45.2 in the bone marrow and the flow cytogram of donor-derived cells, the proportion of neutrophils, monocytes, T cells, and B cells were counted. B: four months after transplantation, immunofluorescence staining showed the proportion and distribution of CD45.1 and CD45.2 in the bone marrow. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图6 *Prtn3*基因敲除对造血干/祖细胞造血重建能力的影响

Fig.6 Effect of *Prtn3* knockout on hematopoietic reconstitution ability of hematopoietic stem progenitor cells

向于髓系分化), 并降低了小鼠造血干/祖细胞长期造血重建能力。

### 3 讨论

造血干/祖细胞是机体整个生命周期中所有血细胞的来源。通常, 在生理状态下, 骨髓中大多数的造血干/祖细胞处于静息期, 少数造血干/祖细胞通过增殖和分化生成各种类型的血细胞, 并维持和形成各类血细胞占比相对稳定的造血平衡。机体衰老一方面会导致造血干/祖细胞群体逐渐扩大, 但重建造血能力下降; 另一方面会导致粒系造血占据主导地位, 粒细胞占比升高和稳态造血失衡<sup>[12-13]</sup>。已有研究表明, 参与调控多种细胞增殖信号通路的分子能够影响造血干/祖细胞的细胞周期、增殖分化及造血重建<sup>[14-15]</sup>, 但其中明确与衰老的造血干/祖细胞相关的调控分子[如周期依赖激酶抑制剂p16INK4a(Cdkn2a)]<sup>[16]</sup>较少, 而与造血干/祖细胞偏向髓系分化的分子机制了解的更少。

PRTN3是中性粒细胞分泌的主要丝氨酸蛋白酶之一, 具有十分广泛的生物学功能, 不仅具有抗菌、降解多种组织蛋白的功能, 还能通过加工细胞因子、受体、核转录因子、周期蛋白依赖性激酶抑制剂P21和裂解活化Caspase-3等调控炎症反应<sup>[6-7, 17-19]</sup>。已有研究表明, *Prtn3*在造血干/祖细胞中显著高表达<sup>[18]</sup>。本课题组开展的单细胞转录组测序结果明确了*Prtn3*基因在小鼠造血干/祖细胞中有较高水平的表达; 同时, 我们在查询Haemosphere数据库(<https://www.haemosphere.org>)时也发现*Prtn3*基因在造血干/祖细胞LSK(包括LT-HSC、ST-HSC和MPP)中表达相对较高, 在CMP和GMP中表达水平最高, 在成熟的髓系细胞粒细胞和单核细胞中表达水平也较高。以上结果提示*Prtn3*可能参与维持造血干/祖细胞的特性和功能。在随后的*Prtn3*基因敲除小鼠骨髓细胞研究中, 我们发现*Prtn3*基因缺失增加了小鼠骨髓中造血干/祖细胞的比例及数量, 尤其是增加了髓系祖细胞CMP和GMP的数量。上述结果表明: *Prtn3*可能与造血干/祖细胞的增殖和定向分化有关。造血干/祖细胞衰老的特征主要是指自我更新和重建造血能力减弱, 以及倾向于髓系分化, 从而导致造血稳态发生变化<sup>[1]</sup>。我们的研究发现, *Prtn3*基因敲除后髓系祖细胞和成熟的髓系细胞均显著增多, 提示造血干/祖细胞倾向髓系分化。因此, 我们认为造血干/祖细胞中

*Prtn3*高表达可以延缓这些细胞的衰老。为此, 我们开展了体外单细胞培养和集落形成实验, 结果发现*Prtn3*基因敲除小鼠LSK细胞进入增殖状态的数目显著高于同窝对照组的数目, 并且前者总的克隆形成数量, 特别是小克隆形成的数量明显增加, 这表明*Prtn3*基因敲除能够显著促进LSK较早进入增殖状态, 但LSK整体分裂能力呈下降趋势。上述研究结果提示, *Prtn3*基因可以调控造血干/祖细胞进入细胞周期, 从而影响机体造血和造血干/祖细胞定向分化。我们推测, *Prtn3*基因可能与延缓或阻止造血干/祖细胞进入增殖周期和定向分化有关, 该基因的表达水平升高可能与造血干/祖细胞分化受阻的血液疾病的发生和发展有关。

骨髓移植和竞争性移植通常是评价造血干/祖细胞重建造血能力的关键实验。目前, 一些文献已经报道了一些基因(如: *PU.1*<sup>[20]</sup>、*GATA-1*<sup>[21]</sup>、*C/EBP $\alpha$* <sup>[22]</sup>、*IGF2BP2*<sup>[23]</sup>、*SZT2*<sup>[24]</sup>等)在造血重建和稳态维持中起到重要作用。我们前面的研究已经揭示了*Prtn3*在造血干/祖细胞的增殖和分化的抉择中具有重要作用, 因此, 我们认为, *Prtn3*能够影响造血干/祖细胞重建造血的能力。接下来的竞争性骨髓移植实验结果也证实了我们的推测, 即*Prtn3*基因敲除小鼠骨髓中的造血干/祖细胞细胞总体竞争能力显著降低, 维持正常造血稳态的能力下降, 且较早出现倾向髓系细胞分化的特点, 导致造血稳态和血象发生改变。我们知道衰老的造血干/祖细胞往往表现出向髓系分化增强、淋系分化减弱的特性, 而本研究结果揭示了*Prtn3*基因缺失小鼠造血干/祖细胞移植后表现出髓系细胞比例增加和淋系细胞比例减少的现象。因此, 探索*Prtn3*在造血干/祖细胞衰老过程中的作用机制及其对造血稳态的影响值得进一步深入。

总之, 本研究通过将小鼠*Prtn3*基因特异敲除探究*Prtn3*基因在造血干/祖细胞增殖、分化及造血重建中的作用。研究结果揭示了*Prtn3*基因缺失显著上调了LSK和LK的细胞比例, 并导致造血干/祖细胞竞争能力减弱, 且致使细胞较早出现髓系分化的现象; 同时, *Prtn3*基因缺失能够显著促进LSK进入分裂周期及增强体外集落形成的能力。该研究将为今后深入研究与造血干/祖细胞衰老、增殖和定向分化相关的疾病提供潜在的治疗新靶点。

## 参考文献 (References)

- [1] DE HAAN G, LAZARE S S. Aging of hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2018, 131(5): 479-87.
- [2] ZHANG L, MACK R, BRESLIN P, et al. Molecular and cellular mechanisms of aging in hematopoietic stem cells and their niches [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 157.
- [3] YANG D, DE HAAN G. Inflammation and aging of hematopoietic stem cells in their niche [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1849.
- [4] ADELMAN E R, HUANG H T, ROISMAN A, et al. Aging human hematopoietic stem cells manifest profound epigenetic reprogramming of enhancers that may predispose to leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1080-101.
- [5] UDROIU I, SGURA A. Growing and aging of hematopoietic stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(6): 594-604.
- [6] KARATEPE K, ZHU H, ZHANG X, et al. Proteinase 3 limits the number of hematopoietic stem and progenitor cells in murine bone marrow [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(5): 1092-105.
- [7] LOISON F, XU Y, LUO H R. Proteinase 3 and Serpin B1: a novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation [J]. *Inflamm Cell Signal*, 2014, 1(6) : e462.
- [8] WITKO-SARSAT V, THIEBLEMONT N. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener granulomatosis): a proteinase-3 driven disease [J]? *Joint Bone Spine*, 2018, 85(2): 185-9.
- [9] KUCKLEBURG C J, NEWMAN P J. Neutrophil proteinase 3 acts on protease-activated receptor-2 to enhance vascular endothelial cell barrier function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2): 275-84.
- [10] TRIVIOLI G, MARQUEZ A, MARTORANA D, et al. Genetics of ANCA-associated vasculitis: role in pathogenesis, classification and management [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(10): 559-74.
- [11] XIE X, SHI Q, WU P, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity in homeostasis and infection [J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9): 1119-33.
- [12] SAKAMAKI T, KAO K S, NISHI K, et al. Hoxb5 defines the heterogeneity of self-renewal capacity in the hematopoietic stem cell compartment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 539: 34-41.
- [13] GONG X, ZHU L, LIU Y, et al. Elevated arterial-central venous carbon dioxide partial pressure difference indicates poor prognosis in the early period of open heart surgery in infants with congenital heart disease [J]. *Pediatr Cardiol*, 2021, 42(7): 1601-6.
- [14] HERAULT L, POPLINEAU M, MAZUEL A, et al. Single-cell RNA-seq reveals a concomitant delay in differentiation and cell cycle of aged hematopoietic stem cells [J]. *BMC Biol*, 2021, 19(1): 19.
- [15] ABDELFATTAH A, HUGHES-DAVIES A, CLAYFIELD L, et al. Gata2 haploinsufficiency promotes proliferation and functional decline of hematopoietic stem cells with myeloid bias during aging [J]. *Blood Adv*, 2021, 5(20): 4285-90.
- [16] DANG Y, AN Y, HE J, et al. Berberine ameliorates cellular senescence and extends the lifespan of mice via regulating p16 and cyclin protein expression [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1): e13060.
- [17] ZHOU Q, WANG W, WU J, et al. Ubiquitin-specific protease 3 attenuates interleukin-1beta-mediated chondrocyte senescence by deacetylating forkhead box O-3 via sirtuin-3 [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2017-27.
- [18] YOSHIDA A, MATSUOKA K, UENO F, et al. Serum PR3-ANCA is a predictor of primary nonresponse to anti-TNF-alpha agents in patients with ulcerative colitis [J]. *Inflamm Intest Dis*, 2021, 6(2): 117-22.
- [19] MUSTAFA Z, ZHANAPIYA A, KALBACHER H, et al. Neutrophil elastase and proteinase 3 cleavage sites are adjacent to the polybasic sequence within the proteolytic sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 spike protein [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(10): 7181-5.
- [20] SCHLEICHER W E, PIETRAS E M. Reduced PU.1 expression collaborates with Tet2 loss to trigger myeloid leukemogenesis [J]. *Blood Cancer Discov*, 2022, 3(5): 378-81.
- [21] GONCALVES M F F, LACERDA S, LARA N, et al. GATA-1 mutation alters the spermatogonial phase and steroidogenesis in adult mouse testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2022, 542: 111519.
- [22] CHEN Y, GAO L, LIN T, et al. C/EBPZ modulates the differentiation and proliferation of preadipocytes [J]. *Int J Obes*, 2022, 46(3): 523-34.
- [23] ZHOU Z, CHEN S, WU T, et al. IGF2BP2, an RNA-binding protein regulates cell proliferation and osteogenic differentiation by stabilizing SRF mRNA [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(1): 195-209.
- [24] PIZZINO A, WHITEHEAD M, SABET RASEKH P, et al. Mutations in SZT2 result in early-onset epileptic encephalopathy and leukoencephalopathy [J]. *Am J Med Genet A*, 2018, 176(6): 1443-8.