

DOI: 10.12037/YXQY.2024.09-03

造血干细胞标志分子 CD34 的结构与功能新认识

罗军涛, 卢莹 (上海交通大学医学院皮肤病研究所, 上海 200092)

【摘要】 CD34 是造血干/祖细胞最主要的膜表面标志物, 是临床上造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 中评估和选择供体移植物的核心指标。然而, 令人惊讶的是, CD34 的生物学功能至今仍然知之甚少。尽管已有研究揭示了 CD34 在介导黏附中发挥重要作用, 但其发挥促进还是抑制功能尚无定论。CD34 作为一种高度糖基化的 I 型跨膜蛋白, 糖基化、磷酸化等翻译后修饰可能对于其构象及功能具有重要调控作用。本实验室前期工作发现了 CD34 共价活性位点、磷酸化修饰位点及其潜在功能。本综述结合基础研究实验结果, 对 CD34 分子研究进展作一简要介绍和展望。

【关键词】 造血干细胞; 膜蛋白; 翻译后修饰

Novel insights on the structure and function of hematopoietic stem cell marker CD34

Luo Juntao, Lu Ying (Institute of Dermatology Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)
Corresponding author: Lu Ying, E-mail: stove@shsmu.edu.cn

【Abstract】 CD34 is the major membrane surface marker of hematopoietic stem/progenitor cells, and the core index for evaluating and selecting donor grafts in clinical hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). However, the biological function of CD34 remains poorly understood. Functional studies of CD34 have revealed its important role in mediating adhesion, whether it functions as a facilitator or an inhibitor has not yet been determined. As a highly glycosylated type I transmembrane protein, the post-translational modifications such as glycosylation and phosphorylation may play an important role in the regulation of CD34 conformation and function. Our previous research has identified the covalent active sites and phosphorylation sites of CD34 and their potential functions. In this review, a brief introduction and prospect on the molecular research progress of CD34 through combining basic research results was presented.

【Keywords】 Hematopoietic stem cells; Membrane protein; Post-translational modification

Fund Program: General Program of National Natural Science Foundation of China (82170179)

造血干细胞动员是自体造血干细胞移植 (auto-hematopoietic stem cell transplantation, auto-HSCT) 的关键过程, 其动员效率和采集量对于植入成功率以及移植后转归均有重大影响。临床上造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 中评估和选择供体移植物的核心指标是 CD34⁺ 细胞计数。对于 CD34 分子功能的认识将了解造血干细胞发育分化以及临床 HSCT 具有重要理论和实践意义。

CD34 是一种高度糖基化的单次跨膜蛋白, N 端结构域位于细胞膜外, C 端结构域位于细胞膜内, 属 I 型跨膜分子。1984 年, Civin 等^[1] 利用未分化的人急性髓细胞白血病细胞株 KG-1 作为免疫原以产生单克隆抗体, 发现 anti-my-10 抗体能够

特异性识别 KG-1 α 细胞表面 115 kDa 的分子, 用于特异性的标记造血干/祖细胞 (hematopoietic stem/progenitor cell, HSC/HPC), 这是最早关于 CD34 分子报道。在第三届国际人类分化研讨会上, 该分子首次被定义为“CD34”, 在第五届研讨会上被最终确认^[2]。迄今为止, 由于表达和纯化困难, 尚无 CD34 分子全长晶体结构被完全解析, 这阻碍了对该分子功能的深入认识。

1 CD34 分子结构特点

CD34 家族蛋白成员包括 CD34、足萼糖蛋白 (podocalyxin) 和内聚糖 (endoglycan), 均为单次跨膜蛋白。该家族成员以胞外段富含丝氨酸残基、苏氨酸残基和脯氨酸残基, 以及丰富的糖基化修饰为特征, 具有独特的表达模式^[3]。CD34 全身敲

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82170179)

通信作者: 卢莹 E-mail: stove@shsmu.edu.cn

除小鼠并未发生致死性造血障碍,因此推测该家族成员之间存在功能冗余/互补。在造血系统中,CD34是HSC/HPC最主要的膜表面标志物,往往随着细胞成熟分化而降低表达^[4]。除此之外,研究发现上皮细胞、血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞和肠道内皮细胞等均有CD34的表达^[5]。尽管CD34在早期祖细胞上的表达被发现超过20年,并且在临床上用于造血干细胞移植超过15年,但我们对其实确切功能知之甚少^[6]。

人类CD34基因位于1号染色体,编码的CD34蛋白包含三个主要结构域:N端胞外区、跨膜区和C端胞内区。已知的CD34转录本有全长型和截短型两种mRNA剪接体,主要区别在于胞内段。全长CD34有385个氨基酸,截短型CD34则缺乏了C端57个氨基酸。即除了胞内结构域不同(全长型有73个氨基酸残基,截短型为16个),其余氨基酸序列完全相同^[7]。截短型CD34比全长型CD34表达量低^[8]。

CD34分子N端胞外结构域的145个氨基酸中丝氨酸或苏氨酸残基占35%,该结构域含有大量O-糖链连接位点和9个潜在N-糖链连接位点^[9]。上述糖基化修饰均可显著影响CD34分子在SDS聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率^[10]。

CD34分子跨膜区包含半胱氨酸富集的球状结构域和近膜结构域及含1个单跨膜螺旋。CD34家族成员中,足萼糖蛋白和CD34的球状区域含有6个配对的半胱氨酸残基,而内聚糖有一个未配对的半胱氨酸^[3]。Xia等^[11]使用AlphaFold蛋白结构数据库预测了CD34(aa169-285)的3D结构,并进行了分子对接。接近CD34跨膜区的6个半胱氨酸(C)可以分别形成3个化学键(C177-C199、C215-C229和C190-C242)。其中C215-C229和C190-C242都无法接近,而CD34表面围绕C177-C199键的空间很容易与化合物形成共价键。将体外纯化的CD34蛋白片段与共价化合物奥希替尼(osimertinib)和伊布替尼(ibrutinib)进行结合测试,结果显示,奥希替尼可以对接到该分子结合表面,通过迈克尔加成反应,与其在C199和C177附近的 α , β 不饱和羰基形成共价键。相反,由于 β -碳和2种半胱氨酸之间的距离,

伊布替尼与C199或C177之间无法形成有利的相互作用。上述数据为奥希替尼对CD34分子的选择性结合提供了分子基础。更重要的是,上述结果提示CD34蛋白可以作为共价化合物作用的潜在的药物靶点。

CD34分子的C端结构域缺乏酶结合基序,因此推测CD34通过结合接头蛋白(如CRKL)等促进信号转导,从而发挥调节细胞黏附等在内的生物过程。已知C端结构域中有2个已知的蛋白激酶C磷酸化(protein kinase C, PKC)位点和1个潜在的酪氨酸激酶磷酸化位点,分别位于Thr356、Ser362和Tyr318^[7]。上述PKC识别位点在该蛋白的截短型中缺失^[12]。CD34胞内段有1个src同源2(SH2)和两个src同源3(SH3)结构域,被接头蛋白(adaptor)CRKL(Crk-like)识别^[13]。某些情况下,CRKL通过结合其SH2结构域与其他胞内酪氨酸磷酸化蛋白如Cas、Cbl、paxillin等结合^[14],并进一步通过激活JNK等调控细胞迁移和黏附功能^[15]。

2 CD34分子新翻译后修饰位点的发现及功能

CD34已知的翻译后修饰形式包括糖基化、磷酸化、乙酰化、泛素化等修饰。如前所述,CD34胞外段富含糖基化修饰位点,糖基化修饰可能显著影响CD34分子在SDS聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率。诸多实验室发现,尽管CD34全长仅有385个氨基酸,但其在SDS聚丙烯酰胺凝胶中的迁移出现在110 kDa的位置,预期理论分子量相差巨大,推测主要原因是N端高度糖基化(图1A)。目前对于CD34分子糖基化修饰的位点、糖链类型、调控因素以及糖基化对于CD34功能的影响仍然了解有限。本课题组前期实验发现,接近跨膜区的半胱氨酸富集区对于CD34在SDS聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率有显著影响(图1A, B)。将共价活性位点C199突变后,CD34蛋白的迁移位置从110 kDa变为70 kDa,提示半胱氨酸富集区对于CD34糖基化及其构象具有重要影响。

磷酸化在CD34功能调控中也有重要作用。1992年Fackler等^[16]报道,PKC处理CD34⁺骨髓祖细胞或KG-1细胞后,细胞表面CD34表达呈剂

量依赖性上调,推测与 CD34 分子被 PKC 磷酸化相关。最近,CD34 的新型磷酸化修饰调节机制被揭示^[11]。研究发现,膜表面的 CD34 作为信号分子通过与 STAT3 相互作用调控造血细胞生长,并且该相互作用受 CD34 磷酸化修饰的调节。具体包

括 CD34^{Y329} 位点可以被 SRC 激酶直接磷酸化,并且该磷酸化促进了 CD34 与 STAT3 相互作用。表达 Y329 突变的 CD34 在调控造血细胞生长方面的功能被极大削弱,提示 SRC-CD34-STAT3 轴参与了细胞生长调控^[11]。

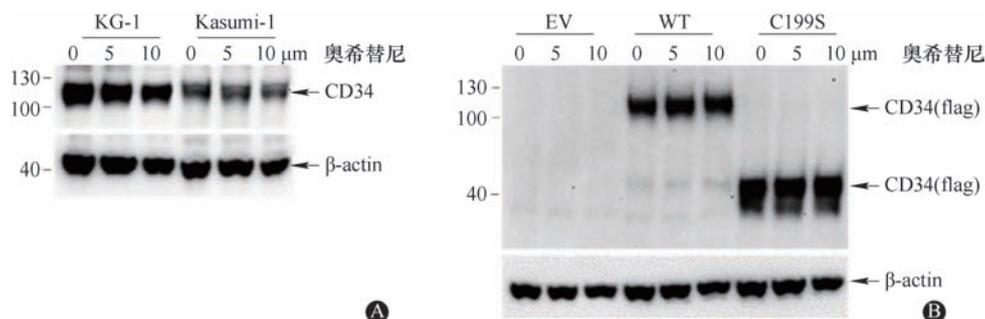


图 1 CD34 蛋白的表达检测

注:图 A, KG-1 和 Kasumi-1 细胞用奥希替尼处理 72 h 后用蛋白免疫印迹法检测 CD34 蛋白的表达;图 B, Kasumi-1 细胞过表达带 Flag 标记的 WT 或 C199S 突变体 CD34。用奥希替尼处理细胞 72 h,用蛋白免疫印迹法检测 CD34 的表达^[11]。WT, 野生型;EV, 空载对照。

CD34 的翻译后修饰在 HSCT 过程中的调变及功能影响是领域内关注的重要问题。然而,包括糖基化、磷酸化、乙酰化、泛素化等在内的各种修饰形式是否在骨髓动员、化疗等治疗过程中发生调变仍无文献报道。

3 高表达的 CD34 是急性髓细胞白血病预后不良的标志物

诸多研究针对 CD34 分子的表达量在急性髓细胞白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 中的意义进行了探索,但获得了相互矛盾的结论^[17-18]。因此,迄今对 CD34 表达与 AML 疾病预后的关系,尚无定论。为了明确 CD34 表达在 AML 中的预后意义,我们分析了 BeatAML (200 例) 和 TCGA (173 例) 队列的公开数据中患者的 CD34 表达水平。首先,根据 BeatAML 的 2017-欧洲白血病网分类,CD34 高表达与难治性患者呈显著相关性。其次,单因素 Cox 回归分析显示,在 BeatAML 和 TCGA 队列中,CD34 基因的高表达与总生存 (overall survival, OS) 率差相关。值得注意的是,当对 CD34 联合 *FLT3-ITD*、*NPM1*、*CEBPA* 突变和 *CBF* 融合基因进行生存分析时,CD34 过表达仍然与较差的 OS 显著相关。基于上述分析,我们认为高表达的 CD34 可作为 AML 的

不良预后标志物^[11]。

在此基础上,我们利用定量蛋白质组学比较了健康人群与 AML 患者中 CD34 的表达量的差异。结果显示,AML 患者中 CD34 蛋白丰度显著高于健康人群。进一步,对 CD34 蛋白 Y329 磷酸化水平的定量分析显示,AML 患者中 CD34 分子 Y329 磷酸化水平显著高于健康人群。鉴于 Y329 磷酸化水平在 SRC-CD34-STAT3 轴调控细胞生长中的重要作用,我们推测该位点磷酸化在 AML 的发生发展中十分关键^[11]。

外周血 CD34⁺ 细胞计数低或 CD34⁺ 细胞采集量不足是临床 auto-HSCT 失败的主要原因之一。认识 CD34 分子的结构、功能将对了解造血干细胞发育分化和临床造血干细胞移植具有重要理论和实践意义。未来针对 CD34 分子的生物化学和结构生物学研究的突破,将为认识 CD34 在造血细胞发育中的功能以及开发潜在的增加 CD34⁺ 细胞比例的策略用于临床造血干细胞移植带来希望。

参考文献

- [1] CIVIN CI, STRAUSS LC, BROVALL C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody

- raised against KG-1a cells [J]. *J Immunol*, 1984, 133 (1): 157-165.
- [2] KRAUSE DS, FACKLER MJ, CIVIN CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility [J]. *Blood*, 1996, 87 (1): 1-13.
- [3] NIELSEN JS, MCNAGNY KM. Novel functions of the CD34 family [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 22): 3683-3692.
- [4] KATZ FE, TINDLE R, SUTHERLAND DR, et al. Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells [J]. *Leuk Res*, 1985, 9 (2): 191-198.
- [5] BROWN J, GREAVES MF, MOLGAARD HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts [J]. *Int Immunol*, 1991, 3 (2): 175-184.
- [6] FURNESS SG, MCNAGNY K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis [J]. *Immunol Res*, 2006, 34 (1): 13-32.
- [7] LANZA F, HEALY L, SUTHERLAND DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2001, 15 (1): 1-13.
- [8] FELSCHOW DM, MCVEIGH ML, HOEHN GT, et al. The adapter protein CrkL associates with CD34 [J]. *Blood*, 2001, 97 (12): 3768-3775.
- [9] SIMMONS DL, SATTERTHWAITTE AB, TENEN DG, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells [J]. *J Immunol*, 1992, 148 (1): 267-271.
- [10] IYER RN, CARLSON DM. Alkaline borohydride degradation of blood group H substance [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 142 (1): 101-105.
- [11] XIA L, LIU JY, YANG MY, et al. Osimertinib Covalently Binds to CD34 and Eliminates Myeloid Leukemia Stem/Progenitor Cells [J]. *Cancer Res*, 2024, 84 (3): 479-492.
- [12] ZHOU Q, SMITH JB, GROSSMAN MH. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen [J]. *Biochem J*, 1995, 307 (Pt 2): 411-417.
- [13] 张炜沂, 陈虎. CD34 分子介导黏附作用的研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2008, 25 (5): 533-535.
- [14] UEMURA N, GRIFFIN JD. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (53): 37525-37532.
- [15] DOLFI F, GARCIA-GUZMAN M, OJANIEMI M, et al. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95 (26): 15394-15399.
- [16] FACKLER MJ, CIVIN CI, MAY WS. Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34 [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267 (25): 17540-17546.
- [17] ZEIJLEMAKER W, KELDER A, WOUTERS R, et al. Absence of leukaemic CD34 (+) cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: a longstanding controversy deciphered [J]. *Br J Haematol*, 2015, 171 (2): 227-238.
- [18] ZHU HH, LIU YR, JIANG H, et al. CD34 expression on bone marrow blasts is a novel predictor of poor prognosis independent of FLT3-ITD in acute myeloid leukemia with the NPM1-mutation [J]. *Leuk Res*, 2013, 37 (6): 624-630.

收稿日期: 2024-07-07

修回日期: 2027-07-18

本文编辑: 高超 潘麒羽

• 百家讲坛 •



自体造血干细胞移植的基本知识

闫金松

(大连医科大学附属第二医院 血液科)