

文章编号: 1004-0374(2009)05-0669-06

## 胚胎干细胞向血液干细胞定向分化的研究进展

张晓丽, 晁瑞华, 朱小舟, 王媛\*

(华东师范大学生命医学研究所, 上海200241)

**摘要:** 骨髓移植是目前治疗恶性白血病以及遗传性血液病最有效的方法之一。但是HLA相匹配的骨髓捐献者严重短缺,骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)体外培养困难,在体外修复患者骨髓造血干细胞技术不成熟,这些都大大限制了骨髓移植在临床上的应用。多能性胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有自我更新能力,在合适的培养条件下分化形成各种血系细胞,是造血干细胞的另一来源。在过去的二十多年里,血发生的研究是干细胞生物学中最为活跃的领域之一。小鼠及人的胚胎干细胞方面的研究最近取得了重大进展。这篇综述总结了近年来从胚胎干细胞获得造血干细胞的成就,以及在安全和技术上的障碍。胚胎干细胞诱导生成可移植性造血干细胞的研究能够更好地了解正常和异常造血发生的机制,同时也为造血干细胞的临床应用提供理论和实验依据。

**关键词:** 干细胞; 胚胎干细胞; 血液干细胞; 分化

**中图分类号:** Q813; Q343 **文献标识码:** A

## Derivation of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells

ZHANG Xiao-li, CHAO Rui-hua, ZHU Xiao-zhou, WANG Yuan\*

(Institute of Biomedical Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** Bone marrow (BM) transplantation is currently the standard treatment for high-risk leukemia and a range of genetic blood disorders. However, a shortage of HLA-matched BM donors and the inability to culture and genetically repair BM-derived hematopoietic stem cells (HSCs) *in vitro* have limited their more widespread therapeutic applications. Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells that can self-renew and differentiate into hematopoietic lineages under appropriate conditions, which provide an alternative source for HSC transplantations. Over the last two decades, hematopoietic development from embryonic stem cells has been one of the most active areas of stem cell biology. Recent studies have progressed from work with mouse to human embryonic stem cells. This review outlines the current progress, safety and technical obstacles in derivation of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. Strategies to produce transplantable hematopoietic populations can be used to better understand normal and abnormal hematopoiesis, but also facilitate the future application of hematopoietic cell from "bench to bedside".

**Key words:** stem cell; embryonic stem cells; hematopoietic stem cells; differentiation

目前临床上最常用的细胞替代治疗手段是造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)在血液遗传性疾病(如再生障碍性贫血)及恶性白血病中的应用。骨髓、被激活的外周血(mobilized peripheral blood)及脐带血为主要HSCs的来源。但这些来源的HSCs数量少,体外扩增能力有限,且异体移植配型困难,而基因修复技术的不成熟则限制了自体HSCs

移植在临床中的应用<sup>[1]</sup>。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)来源于胚胎发育早期囊胚的内细

收稿日期: 2009-08-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)(2010CB945403); 华东师范大学"985工程"科技创新平台; 上海市科委细胞信号传导平台

\*通讯作者: E-mail: wangy32@hotmail.com

胞团(inner cell mass),具有自我更新和多向分化的特性<sup>[2-4]</sup>,可在体外无限增殖,传代建系,便于进行基因修复,且能在体外聚合形成胚体(embryoid body, EB),在适当条件下进一步分化形成血细胞,因而有望作为HSCs的另一重要来源。本文就近年来ESCs向HSCs诱导方面的研究进展及尚存在的问题等综述如下。

## 1 造血干细胞的来源及特征

胚胎血发生可分为两个时期。原始胚胎血发生(primitive hematopoiesis)始于胚胎外卵黄囊(yolk sac)。此期造血主要生成表达胚胎珠蛋白的原始有核红细胞,但缺乏淋系前体细胞,且不能移植成年小鼠。随之而来的永久造血(definitive hematopoiesis)形成的血干细胞具有多向分化潜能,可移植并替代经放射处理的成年小鼠的造血系统。在胚胎出生之前,肝脏为主要的永久造血器官<sup>[5]</sup>。最初人们认为胚肝中的HSCs来自于胚胎体外的卵黄囊,但事实上,早在1899年, van der Stricht已提出蝙蝠胚体内造血区的存在,这一结果在后来的兔、鼠、鸡,以及人的研究中亦观察到<sup>[5]</sup>。但最有说服力的证据来自于鹌鹑早期胚胎/鸡卵黄囊之间的异体移植实验,鹌鹑胚胎可移植于鸡胚,但鹌鹑胚胎中却检测不到鸡卵黄囊血细胞<sup>[6]</sup>,从而证明了早于胚肝的胚体内造血区的存在。目前研究表明这一区域位于胚胎的主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM),来自于主动脉旁胚脏壁(para-aortic splanchnopleural)<sup>[7,8]</sup>。另外,一系列的研究表明胎盘亦可能参与胚胎造血<sup>[9-13]</sup>。

胚胎出生后的主要造血器官是骨髓。小鼠骨髓HSCs的筛选手段主要是通过特异性标志的阴性筛选及阳性富集相结合的方法,分选c-kit<sup>+</sup>/Scal<sup>+</sup>/thy1-low/lineage<sup>-</sup>的细胞(即不表达Mac1、Gr1、CD3、CD4、CD8、B220、Ter119等末端分化的血细胞的表面抗原)<sup>[14]</sup>。也可以用Rhodamine123和Hoechst33342染料染色等手段来分离骨髓HSCs<sup>[14]</sup>。而胚胎时期的HSCs表面抗原的表达非常短暂,且缺乏特异性,其表型随发育的阶段、细胞周期及所在的位置而改变。例如,c-kit不仅仅表达在血细胞表面,亦可在肝的前体细胞检测到<sup>[15]</sup>。在胚胎发育早期,CD41在造血前体细胞中表达,而在永久造血细胞中,CD41表达于巨核细胞<sup>[16]</sup>。静默状态的长期HSCs(long-term HSCs)不表达CD34,而处于活跃细胞周期的短期HSCs(short-term HSCs)则高度表达

CD34<sup>[17,18]</sup>。

与之相比,ESC-HSC的特异性表面抗原更为复杂,不能用成体血干细胞的富集方法,且其表型受EB发育阶段及培养条件的影响而改变。最早的研究表明,来源于PgP-1阳性,B-220/Mac-1/JOR0 75/TER 119阴性的EB细胞可在移植小鼠体内生成多种血细胞<sup>[19]</sup>。但此研究并未证明PgP-1阴性的细胞群不能移植小鼠,因此PgP-1是否确为血干细胞的特异性抗原有待探讨。之后的一系列研究曾采用了f1kl<sup>+</sup><sup>[20]</sup>、CD45<sup>+</sup>/AA4.1<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup><sup>[21]</sup>或CD45<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup><sup>[22]</sup>富集造血前体细胞,但这些研究同样缺乏阴性群体的对照实验,而且移植细胞在受体造血系统的嵌合率较低(移植8周后嵌合率<20%),因而难以确定这些标志物是否为ESC-HSC的特异性表面抗原。最近的报道表明ESC-HSC为CD41<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>/CD150<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>,在表型上更接近于胚胎时期的造血前体细胞<sup>[23]</sup>。但此群体细胞的表型并不完全一致,仅部分表达CD45及CD48,因此,ESC-HSC特异性表面抗原的确定仍需进一步的研究。

人成体造血干细胞为CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup><sup>[24]</sup>。由于人类胚胎研究的局限性,胚胎时期HSCs的表型尚不清楚。目前,人类ESCs来源的HSCs多采用CD34<sup>+</sup>的富集方法<sup>[25,26]</sup>,但移植效率极低,且在受体体内仅能短期存在,故CD34<sup>+</sup>细胞分选的方法是否可行有待探讨。

## 2 胚胎干细胞血分化的方法及所存在的问题

### 2.1 小鼠胚胎干细胞向造血干细胞分化

Doetschman等<sup>[27]</sup>最初发现ESCs在体外可形成血细胞。在此研究中,ESCs体外分化形成含血红蛋白血岛的EB,在细胞因子的进一步诱导下形成多种造血前体细胞集落,其形成的类型及过程与体内卵黄囊的原始造血相似,且不能形成淋系细胞,或移植成年小鼠,因此认为ESCs血分化形成的血细胞为原始造血细胞<sup>[28-30]</sup>。

ESC-HSC的移植实验在后来十多年的研究中被证明是一个很有挑战性的课题,人们尝试了多种方法促进ESCs的永久造血,或采用细胞表面抗原筛选的方法富集少量可移植性ESC-HSC,均不甚成功<sup>[19-22,31]</sup>。Eichmann<sup>[19,21]</sup>及Palacios<sup>[31]</sup>实验室尝试改变CO<sub>2</sub>及O<sub>2</sub>的浓度(7.5%CO<sub>2</sub>/5%O<sub>2</sub>)以模仿胚胎在母体内的状态,并采用了细胞因子,如IL-3、IL-6和IL-7等诱导ESCs的血分化。另外,基质细胞也被多个实验室用来模拟体内造血系统发育的微环境。Palacios等<sup>[19]</sup>认为FLS4.1胚肝基质细胞可分泌f1t3配体及SCF

(stem cell factor, 或steel factor), 与ESCs共培养, 可促进其永久造血。Nakano等<sup>[32]</sup>的研究表明FLS4.1、ST2、PA6等已建立使用的基质细胞分泌大量的M-CSF, 导致共培养的ESC-HSC分化形成巨噬细胞, 因而从M-CSF失活的新生小鼠头颅骨中分离建立了OP9基质细胞系, 他们的研究表明OP9细胞可促进ESCs体外分化形成淋巴及粒系细胞。Daley及Zandstra的实验室通过对比ESCs血分化的多种培养诱导体系(悬液培养、半固体甲基纤维素集落培养、贴壁培养及悬滴培养), 发现贴壁培养虽对EB形成数量的影响不大, 但却大幅度地降低了造血前体细胞的形成。相比而言, 单个EB形成的造血前体细胞集落数以悬滴培养为最高<sup>[33]</sup>。

尽管前期的ESCs血分化及移植研究没有取得突破性的进展, 但这些工作给我们提供了许多可借鉴的方法及应改善的方面。大家普遍认为ESC-HSC类似原始造血细胞, 缺乏永久造血所必需的转录因子及归巢因子(homing factors)。Perlingeiro等<sup>[34]</sup>在2001年利用致癌基因*Bcr/Abi*的过度表达诱导ESCs形成包括粒系、淋系及红细胞等多种血细胞。受此启发, Kyba等<sup>[35]</sup>总结了多年来各实验室ESC-HSC的研究经验, 在早期分化的ESCs中高度表达HoxB4, 首次成功地诱导ESCs大量生成造血前体细胞, 长期(>6个月)及二级移植后可重建受体的血液系统, 而不形成白血病。利用同一方法, Rideout等<sup>[36]</sup>证明了*Rag2*基因缺失的ESCs可通过同源重组得以修复, 再通过HoxB4的过量表达形成可移植性造血前体细胞, 治疗小鼠由于*Rag2*缺失而导致的免疫性缺陷。然而, 由于HoxB4不能有效地诱导ESCs生成永久造血细胞, 且其过量表达导致HSC分化偏斜, 形成过多粒系gr1<sup>+</sup>细胞(>80%, 而正常小鼠粒系为20%左右)。同一实验室的Wang等<sup>[37]</sup>在EB发育过程中条件诱导*Cdx4*基因表达, 结合HoxB4, 形成的ESC-HSC在移植后有较为平衡的血液系统系谱分布, 并通过克隆实验, 首次证明了可移植性ESC-HSC的存在。如果从ESCs算起, 按这种方法, 在分化的第6天, 每1万个ESCs可以形成约250万个第6天的EB细胞, 再经过OP9共培养10-14d, 最终可获得5亿个血细胞, 足够250只小鼠的移植实验。

当然目前这种方法仍存在需改善之处。首先, *Cdx4*及HoxB4的过量表达是通过基因水平上的直接改变, 在未来的基因治疗中存在潜在的危险, 将来

应探索小分子诱导或蛋白转移等非基因修饰的方法; 其次, 这种方法得到的ESC-HSC移植小鼠, 其造血系统系谱分布与骨髓移植对照仍有一定的差距, 尚需改进; 另外, 移植实验需100万-200万细胞方能得到较好的效果, 证明移植细胞群中HSCs比例仍偏低, 特异性表面抗原的确定将有助于ESC-HSC的富集, 且减少未完全分化细胞移植后形成畸胎瘤的危险性。

**2.2 人胚胎干细胞向造血干细胞分化** 与小鼠ESCs血分化系统相比, 人类ESC-HSC的研究远远落后。Kaufman等<sup>[38]</sup>在2001年报告人类ESC(hESC)与小鼠骨髓基质细胞S17或卵黄囊内皮细胞C166共培养17d, 不需任何生长因子, 可自发分化形成CD34<sup>+</sup>造血前体细胞, 诱导效率1%-2%。在此之后的多个研究亦使用了不同的基质细胞来促进hESC的血分化, 包括OP9、M210-B4、FH-B-hTERT、AM20.1B4人及鼠骨髓基质细胞等<sup>[25, 39-42]</sup>。研究表明, 这些基质细胞分泌血分化所需的细胞因子。Lako实验室报道AM20.1B4分泌TGF- $\beta$ , 与hESC的共培养可提高造血细胞的生成<sup>[39]</sup>。最近亦有报道Wnt在hESC血分化中亦起重要作用<sup>[43]</sup>。直接从分化的EB分离HSC的方法亦被尝试。尽管hESC的EB分化与小鼠有差别, 来自Elefanty及Zandstra实验室的研究强调通过EB分化的血发生条件较稳定, 重复性较高<sup>[44-47]</sup>。有多个实验室采用HoxB4过表达的方法来促进hESC从原始造血细胞成为可移植性血细胞, 但收效甚微, 证明了我们对于Hox家族的功能仍未完全了解, hESC的血发生机制与小鼠不同<sup>[26, 48, 49]</sup>。

hESC血分化在早期的研究多局限于体外实验, 在2005年才有第一例hESC-HSC移植裸鼠成功的报道<sup>[26]</sup>。在此研究中, 从分化10d的EB中分离出来的CD45<sup>-</sup>/PFV细胞(CD45<sup>-</sup>/PECAM-1<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup>/Vcadherin<sup>+</sup>)为血液及内皮细胞的祖细胞, 经成血细胞因子(SCF、G-CSF、Flt3-配体、IL-3、IL-6等)诱导后, 直接通过髓腔注射移植入经放射处理的NOD/SCID小鼠体内, 受体小鼠的注射髓腔中在移植8周后仍可检测到包括红系、粒系及淋系等血细胞, 但嵌合率<1%(而人脐带血移植小鼠可达到10%), 且在其他未注射细胞的骨髓腔无人血细胞的存在, 证明这些hESC来源的血细胞不能正常地通过血循环迁移。研究还发现, 通过静脉注射移植的血细胞易凝集, 造成肺栓塞。

最近的两个研究均采用hESC与基质细胞共培

养的方法<sup>[25, 39]</sup>，这种方法得到的造血前体细胞可通过静脉注射移植小鼠而未有肺栓塞的发生。而且，当通过髓腔注射时，造血系统的重建不仅局限于接受注射的髓腔，对侧骨腔也可检测到人源血细胞，嵌合率也较前有所提高(2%)，最为重要的是移植后3—6月仍可检测到人源血细胞。Tian等<sup>[41]</sup>认为，与脐带血中CD34<sup>+</sup>细胞相比，hESC来源的CD34<sup>+</sup>细胞的MHC-I的表达较低。而确有报道表明这些小鼠体内尚存在少量NK细胞。使用asialo GM1 (ASGM1)的抗血清可以完全消除NK细胞的存在，提高hESC来源的血细胞在受体内存活率。Ledran等<sup>[39]</sup>从小鼠AGM和胎肝中分离得到的原代基质细胞与hESC共培养，以促进hESC的血分化，CD34<sup>+</sup>细胞在hESC分化的18—21 d达到高峰，诱导率比以往报道的方法提高了至少31%。但是同样是这个区域来源的基质细胞系就不能达到这样高的诱导率，说明原代的基质细胞具有更强的诱导作用。研究人员亦改变了移植系统，将未分选的细胞移植到NOD/SCID/IL2Rag2r c<sup>-/-</sup>小鼠体内，移植率比以前大有提高，可以在末梢血检测到16%的嵌合率。

目前，hESC-HSC的研究还存在许多需要解决的问题。人们主要应用CD34来富集hESC-HSC，但所得移植效果不甚理想。Ledran等<sup>[39]</sup>的研究在CD34表达最高峰的分化时期收集移植未经分选的细胞，取得了高移植效率，CD34是否确为hESC-HSC最理想的表面富集抗原值得进一步探讨。其次，尽管hESC-HSC的研究已取得了突破性进展，但其移植效率仍不理想。移植最长时间仅为3—6个月，且嵌合率低，多局限于骨髓，二级移植后嵌合率进一步下降，如Ledran等<sup>[39]</sup>的研究表明，外周血的嵌合率从一级受体的16%降至2.7%，部分原因可能是由于hESC-HSC的实验模型为免疫缺陷小鼠的异种移植，给研究增加了难度。目前亦有一些实验室尝试其他动物模型，如胚胎羊及鸡卵<sup>[50, 51]</sup>，但尚无突破性进展。另外，hESC-HSC在骨髓的嵌合率大多<1%，可能与这些hESC-HSC的原始特性有关，目前的培养条件还不能使它们完全分化成熟为可移植性血干细胞，因而优化诱导条件，使用小分子或基因改变等方法将有助于永久造血细胞的形成。

### 3 展望

ESCs的全能性以及无限增殖的能力使它们成为细胞替代治疗很有前途的资源，可以解决器官捐献短缺等问题。ESCs定向分化为HSCs可以替代骨

髓、脐带血等传统的HSCs，为基因治疗开辟了新的领域，而且扩大了HSCs移植的应用范围。但是这种方法仍然存在免疫排斥的问题。未分化的ESCs不表达MHC-2，表达少量的MHC-1，但是随着在体外或体内的分化，MHC-1的表达会上调，所以仅是未分化的ESCs和它早期的分化细胞才具有免疫豁免的特性，所以形成的HSCs还是会引起受体的免疫排斥。利用体细胞核转移入卵细胞的方法建立患者特异性的ESCs系可解决这一问题，但这种方法尚存在伦理方面的争论，而且没有足够的人卵细胞做核转移受体。最近研究发现，体细胞可直接诱导成为多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)，形成患者特异的自体干细胞，避免免疫排斥的问题。目前iPS细胞在小鼠的疾病模型中已被证明可分化形成血细胞，治疗血液系统疾病<sup>[52]</sup>。尽管iPS研究中的技术细节有待于进一步的探讨，毋庸置疑，iPS的建立将为HSCs在血液系统疾病的治疗研究开拓更为广阔的前景。

### [参 考 文 献]

- [1] Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology*, 2003: 398-418
- [2] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6
- [3] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7634-8
- [4] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145-7
- [5] Lensch MW, Daley GQ. Origins of mammalian hematopoiesis: *in vivo* paradigms and *in vitro* models. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 127-96
- [6] Dieterlen-Lievre F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 33: 607-19
- [7] Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, et al. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature*, 1993, 364: 64-7
- [8] Muller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, et al. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, 1994, 1: 291-301
- [9] Barcena A, Muench MO, Kapidzic M, et al. A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. *Reprod Sci*, 2009, 16: 178-87
- [10] Barcena A, Kapidzic M, Muench MO, et al. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. *Dev Biol*, 2009, 327: 24-33

- [11] Mikkola HK, Gekas C, Orkin SH, et al. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol*, 2005, 33: 1048-54
- [12] Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J, et al. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*, 2003, 130: 5437-44
- [13] Dancis J, Jansen V, Gorstein F, et al. Hematopoietic cells in mouse placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 1968, 100: 1110-21
- [14] Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1994, 1: 661-73
- [15] Ren X, Hu B, Colletti L. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy. *Surgery*, 2008, 143: 790-802
- [16] Mikkola HK, Fujiwara Y, Schlaeger TM, et al. Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood*, 2003, 101: 508-16
- [17] Ito T, Tajima F, Ogawa M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 2000, 28: 1269-73
- [18] Ogawa M, Tajima F, Ito T, et al. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations. *Ann NY Acad Sci*, 2001, 938: 139-45
- [19] Palacios R, Golunski E, Samaridis J. *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7530-4
- [20] Miyagi T, Takeno M, Nagafuchi H, et al. Flk1<sup>+</sup> cells derived from mouse embryonic stem cells reconstitute hematopoiesis *in vivo* in SCID mice. *Exp Hematol*, 2002, 30: 1444-53
- [21] Potocnik AJ, Kohler H, Eichmann K. Hemato-lymphoid *in vivo* reconstitution potential of subpopulations derived from *in vitro* differentiated embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10295-300
- [22] Burt RK, Verda L, Kim DA, et al. Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 2004, 199: 895-904
- [23] McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, et al. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood*, 2009, 114: 268-78
- [24] Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 2804-8
- [25] Tian X, Woll PS, Morris JK, et al. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells*, 2006, 24: 1370-80
- [26] Wang L, Menendez P, Shojaei F, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med*, 2005, 201: 1603-14
- [27] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, 87: 27-45
- [28] Burkert U, von Ruden T, Wagner EF. Early fetal hematopoietic development from *in vitro* differentiated embryonic stem cells. *New Biol*, 1991, 3: 698-708
- [29] Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, et al. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 473-86
- [30] Palis J, Robertson S, Kennedy M, et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 1999, 126: 5073-84
- [31] Gutierrez-Ramos JC, Palacios R. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9171-5
- [32] Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*, 1994, 265: 1098-101
- [33] Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, et al. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78: 442-53
- [34] Perlingeiro RC, Kyba M, Daley GQ. Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development*, 2001, 128: 4597-604
- [35] Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 2002, 109: 29-37
- [36] Rideout WM 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109: 17-27
- [37] Wang Y, Yates F, Naveiras O, et al. Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 19081-6
- [38] Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10716-21
- [39] Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 85-98
- [40] Qiu C, Hanson E, Olivier E, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp Hematol*, 2005, 33: 1450-8
- [41] Tian X, Morris JK, Linehan JL, et al. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*, 2004, 32: 1000-9
- [42] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34<sup>+</sup> cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 2005, 105: 617-26
- [43] Woll PS, Morris JK, Painschab MS, et al. Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood*, 2008, 111: 122-31

- [44] Bauwens CL, Peerani R, Niebruegge S, et al. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells*, 2008, 26: 2300–10
- [45] Karlsson KR, Cowley S, Martinez FO, et al. Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp Hematol*, 2008, 36: 1167–75
- [46] Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, et al. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, 2007, 109: 2679–87
- [47] Ng ES, Davis RP, Azzola L, et al. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*, 2005, 106: 1601–3
- [48] Bowles KM, Vallier L, Smith JR, et al. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24: 1359–69
- [49] Unger C, Karner E, Treschow A, et al. Lentiviral-mediated HoxB4 expression in human embryonic stem cells initiates early hematopoiesis in a dose-dependent manner but does not promote myeloid differentiation. *Stem Cells*, 2008, 26: 2455–66
- [50] Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood*, 2006, 107: 2180–3
- [51] Park TS, Zambidis ET, Lucitti JL, et al. Human embryonic stem cell-derived hematoendothelial progenitors engraft chicken embryos. *Exp Hematol*, 2009, 37: 31–41
- [52] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318: 1920–3