

文章编号: 1004-0374(2009)05-0675-04

造血干细胞研究进展

刘廷析^{1, 2*}

(1 中国科学院上海生命科学研究院 / 上海交通大学医学院健康科学研究所干细胞生物学重点实验室和发育与疾病实验室, 上海 200025; 2 上海交通大学医学院瑞金医院, 上海血液学研究所医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025)

摘要 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是成体干细胞研究领域的范式。对造血干细胞自我更新和不对称分裂分子遗传学机制的诠释, 将不仅帮助理解成体干细胞“干性”维持的发育遗传学机制, 也将对白血病干细胞和其他类型肿瘤干细胞的发育起源及开发针对肿瘤干细胞的靶向治疗模式产生深远的影响。

关键词: 造血干细胞; 白血病干细胞; 自我更新; 模式生物

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Research progress of hematopoietic stem cells

LIU Ting-xi^{1, 2*}

(1 Key Laboratory of Stem Cell Biology and Laboratory of Development and Diseases, Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences and Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2 State Key Laboratory for Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract: Hematopoietic stem cell (HSC) is a paradigm of adult stem cells. Understanding the genetic basis of self-renewal and asymmetric division intrinsic to the HSC, will not only help to elucidate the developmental mechanism of “stemness” maintenance in various adult stem cells, but also generate far-reaching impacts on our understanding of developmental origin of leukemia stem cell and other cancer stem cell that can ultimately be targeted in the clinical practice.

Key words: hematopoietic stem cells; leukemia stem cell; self-renewal; model organisms

人体血液含有6种主要血细胞群体: 红细胞、淋巴细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和血小板, 其主要功能包括运输氧气、执行免疫防御功能和止血功能等重要生命活动。这些血细胞寿命短暂, 如红细胞在血液循环中存活大约120 d, 而粒细胞、单核细胞、巨噬细胞大约是12 d。估计在成人体内每秒需要产生150万个血细胞, 才能补充被消耗的血细胞^[1]。目前已知, 造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是维持体内血细胞数量稳定最重要的细胞群体, 因而它自身必然受到细胞内外环境因素的严密调控。在异常情况下, 造血干细胞的耗竭或异常增殖, 导致全血细胞减少或

白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs) / 白血病激发细胞(leukemia-initiating cells, LICs)的增加。不同于功能成熟的血细胞, 造血干细胞具有两个重要特征: 自我更新(self-renewal)和多潜能性(pluripotency)。自我更新通过细胞周期分裂而完成, 是造血干细胞

收稿日期: 2009-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30525019; 30830047); 科技部重大研究计划项目(2007CB947003); 中科院知识创新工程重要方向项目(KSCX1-YW-R-03); 上海高校模式生物E-研究院(E03003); 上海市优秀学科带头人计划(09XD1404700)

*通讯作者 E-mail: txliu@sibs.ac.cn

有丝分裂的一种特殊方式。分裂产生的两个子代细胞中，一个仍然保留造血干细胞的特征；另一个子代细胞相对成熟，进入细胞周期活跃状态，通过系定向(lineage commitment)产生各种类型的成熟血细胞群体，这一过程即多潜能性。由于产生两个功能不同，命运不同的子代细胞，造血干细胞分裂因而也可被视作不对称分裂(asymmetric division)^[2]。

造血干细胞研究历史可追溯至20世纪60年代，Till和McCulloch在1961年发现并鉴定脾克隆形成单位(colony-forming unit-spleen, CFU-S)作为最早的造血干细胞。此后，由于巨大的基础意义和临床应用前景，造血干细胞一直是生命科学研究领域中的重点和热点，并随后成为成体干细胞研究领域的重要范式。目前，除造血干细胞外，神经干细胞、肠道干细胞、皮肤干细胞和心肌干细胞等相继被分离和初步鉴定。由于造血干细胞移植技术在临床上的潜在价值，从腹侧中胚层前体细胞及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)向造血干细胞定向发育的机制、造血干细胞在活体内定向迁移和归巢(homing)的机制，以及造血干细胞在体外扩增并定向诱导分化为单种成熟血液细胞的现实可能性等均是目前研究的重点和热点。由于流式细胞仪、荧光蛋白示踪技术、显微镜技术和模式动物研究的进展，正常造血干细胞和白血病干细胞或白血病激发细胞相继被分离和确定^[3]。同时，由于目前的肿瘤化学治疗和放射治疗主要杀伤细胞周期活跃、处于增殖期的肿瘤细胞，因而虽然能够减轻肿瘤细胞负荷，但由于不能根除微环境中细胞周期相对不活跃的白血病干细胞，导致肿瘤复发和治疗失败^[3]。考虑到无论是正常造血干细胞还是白血病干细胞都需要和它们所处的细胞微环境“龕”(microenvironmental niche)密切相互作用，并进而控制上述造血干细胞独特的生物学特性，因而研究微环境“龕”和干细胞在生理和病理情况下的相互作用，成为干细胞研究的新一轮热点^[4]。以下对造血干细胞研究的主要进展和存在的问题作一简述。

1 造血干细胞的发育起源和迁移

经过一个多世纪在体外和模式动物体内的研究，目前关于造血干细胞的发育起源仍然存在争议。所有脊椎动物(如斑马鱼、鼠和人)造血都可被分成两个连续的阶段：原始造血和定向造血。原始造血呈一过性，主要产生红细胞和一定数量的巨噬细胞，在哺乳动物位于胚外卵黄囊血岛，在斑马鱼

则位于胚内后部双侧侧板中胚层(posterior bilateral plate mesoderm, P-BLPM) (早期)和中间细胞群(intermediate cell mass, ICM) (晚期)。定向造血位于主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区，在脊椎动物进化中高度保守，被认为是第一个定向造血干细胞发生的位点^[4]。目前，争论的焦点是AGM区的定向造血干细胞是独立起源还是由卵黄囊血岛原始造血前体细胞发育而来，在小鼠造血干细胞系示踪实验表明，原始造血前体细胞参与定向造血干细胞的形成^[5]，但相反的实验结果也有报道^[6]。Mikkola¹研究组^[7,8]报道在胎盘微环境中的血管内皮细胞发现造血干细胞，使造血干细胞的发育起源问题进一步复杂化。这些位于不同解剖位点的造血干细胞也许仅仅反映了它们在发育过程中的迁移路径，而不是代表独立的发育起源。但为什么造血干细胞要经历这样一个复杂的迁移路径，出现在解剖上高度隔离的位点，其原因还不清楚。对这一问题的机制性研究可能会帮助我们理解造血干细胞归巢的分子机制和改进临床上骨髓造血干细胞移植效率，并对识别白血病干细胞转移的信号路径产生重要影响。

2 造血干细胞的体外诱导、扩增和定向分化

*HoxB4*是第一个被证明可在体外促进造血干细胞数量扩增，同时又保持其多向分化潜能的基因^[9]。在体内，*Bmi-1*基因被认为与造血干细胞自我更新和数量的维持有密切相关^[10,11]。造血干细胞向粒细胞和血小板分化已有报道。最近，诱导多潜能干细胞技术可使高度分化成熟的细胞在表达4个Yamanaka因子后，通过基因组重编程成为具有发育全能性的胚胎干细胞^[12]，并能通过4个细胞囊胚期注射发育成为成体小鼠^[13]。这些研究进一步扩大了胚胎干细胞和它们的衍生定向造血干细胞的应用前景。胚胎干细胞、iPS细胞和与造血干细胞为代表的成体干细胞的联合研究将为再生医学提供广阔的空间。

3 造血干细胞微环境“龕”及其对干细胞的影响

造血干细胞自我更新分裂是造血干细胞的重要特征，在补充大量消耗的成熟血细胞的同时，又保持体内造血干细胞的数量相对恒定。日益增多的证据表明，造血干细胞这一独特的生物学特性依赖与造血微环境“龕”的相互作用。造血微环境“龕”中的细胞成份还不十分清楚。2004年，两个研究小组发现骨髓微环境“龕”中的细胞，包括破骨

细胞和血管内皮细胞作为支持造血干细胞发育和自我更新的细胞群体^[14]。一些证据表明,交感神经元的轴突末端也可能是微环境“龕”的一部分,调节造血干细胞功能^[15]。微环境“龕”细胞可能通过提供多种分泌因子和WNT、SHH和TGF- β 等多种信号路径来维持造血干细胞的“干性”(stemness)。考虑到造血干细胞在微环境中的空间位置及发生细胞周期分裂时中心粒和纺锤体的空间定位,可以假设在造血干细胞分裂产生的两个子代细胞中,贴近微环境“龕”细胞的那一个子代细胞由于优先受到“龕”细胞分泌的WNT等“干性”维持信号的影响,因而仍然保留了造血干细胞的特征;另一个子代细胞由于“远离”微环境“龕”细胞,因而相对成熟并进入增殖周期分化成为成熟血细胞群体。从后果上看,由于造血干细胞这种独特的自我更新分裂产生了两个功能和命运各不相同的子代细胞,因此可被认为是不对称分裂。造血干细胞不对称分裂的分子机制目前还不清楚。在更低等的模式生物,如果蝇和线虫,控制不对称分裂的遗传学机制高度保守。与不对称分裂有关的基因或信号路径(如*Par-3*、*Par-6*、*Lgl*、*Numb*、*APKC*等)均存在于哺乳动物造血干细胞^[2]。最近,Reya研究组^[16]在造血干细胞分裂时观察到Numb蛋白的不对称分布,提示哺乳动物造血干细胞可能使用类似的不对称分裂遗传学机制来控制造血干细胞的自我更新。

4 白血病肿瘤干细胞概念的意义及其对临床的影响

一般认为,白血病是造血干细胞克隆性疾病。白血病干细胞(leukemia stem cells)表达细胞膜表面抗原(CD34⁺CD38⁻CD133⁺lineage⁻),与正常造血干细胞膜表面抗原(CD34⁺CD38⁻CD90⁺lineage⁻)非常近似,因而推测白血病干细胞可能起源于正常造血干细胞的恶性转化,但白血病干细胞也可能起源于相对分化成熟的造血祖细胞甚至是成熟血细胞。由于自我更新信号转导路径对于白血病干细胞和白血病的自我维持密切相关,而该路径在正常造血干细胞中已经存在,故相对于分化较成熟的祖细胞而言,正常造血干细胞直接转化为白血病干细胞只需要累积更少的突变^[3]。由于白血病干细胞在细胞起源上尚存争论,目前倾向于使用白血病激发细胞(leukemia-initiating cells)代替白血病干细胞这一术语,以强调该群细胞的肿瘤激发潜力。由于白血病干细胞(或白血病激发细胞)只在白血病细胞群体中占很少比例,

目前的肿瘤治疗方法(化疗和放疗)对细胞周期活跃的肿瘤细胞有较强的杀伤作用(因而能够降低肿瘤负荷),但不能根除细胞周期沉默的白血病干细胞而导致肿瘤复发,这是治疗失败的主要原因^[3]。理论上,开发针对白血病干细胞或白血病激发细胞的靶向治疗应该能够根除白血病,但由于白血病干细胞和正常干细胞之间可能使用共同的自我更新信号转导路径,故寻找正常和恶性干细胞之间的遗传学差异成为目前的研究前沿。研究发现,肿瘤抑制基因*Pten*缺失的小鼠引起造血干细胞恶性转化,且正常和白血病干细胞对*Pten*功能的依赖性不同,为进一步开发特异性针对白血病干细胞(但不影响正常造血干细胞)的治疗方法奠定了基础^[17,18]。另一项研究发现相对于正常造血干细胞而言,白血病干细胞表达更高水平的膜表面抗原CD47,并可介导巨噬细胞对白血病干细胞的特异性杀伤,为未来白血病干细胞靶向治疗提供了理论和实验基础^[19,20]。目前研究的焦点主要集中在理解肿瘤干细胞和正常干细胞在遗传学、表观遗传学及非编码RNA信号路径上的异同,并从中找出可能的诊断和治疗靶点。由于历史和样本取材方便等原因,造血干细胞一直被认为是成体干细胞研究领域的经典范式。预期对于白血病干细胞的分子遗传学和发育生物学研究也将对肿瘤生物学和肿瘤干细胞领域产生不可估量的重要影响。

5 正常和白血病干细胞发育和自我更新的信号转导路径

如前所述,无论是正常造血干细胞还是白血病干细胞,其最重要的细胞生物学特性是自我更新(self-renewal)。自我更新机制至少包括了“干性”(stemness)维持或多潜能维持的机制和分化抑制的机制,在四维时空框架内通过不对称分裂的方式来完成。目前已知参与造血干细胞自我更新的分子和信号路径包括*Hoxb4*、*Pten*、*Bmi-1*、WNT、TGF- β 和SHH信号路径等,但基因组中有多少这样的基因参与造血干细胞自我更新?要回答这个问题,目前的逆向遗传学策略(reverse genetics),如基因敲除小鼠,并不能有效识别所有控制造血干细胞自我更新的基因,而经典的正向遗传学策略(forward genetics),即表型驱动,基因组饱和的遗传学筛选结合染色体步移和定位克隆可有效在全基因组规模上筛选和确定造血干细胞自我更新所必需的相关基因和路径。在人类,正向遗传学策略主要用于疾病基因的定位克隆,但遗传家系的数量、大小和遗传背景复杂是

其主要的制约因素。在小鼠，通过 ENU 化学随机诱变技术制造遗传疾病家系，筛选并定位克隆相应的基因，已证明是候选基因识别的有效手段。但由于需要海量的人力、物力和财力，基因组饱和筛选目前仍难以进行。如 Vogel 博士所说：“作同样的遗传学筛选，小鼠需要一个工厂，斑马鱼只需要一间实验室。”^[21]

斑马鱼是近年在国际上新兴的人类发育和疾病脊椎动物模式生物，兼具“小”模式生物体(酵母、线虫和果蝇)和“大”模式生物体(鼠)的综合优势。作为连接非脊椎动物和哺乳动物的“桥梁”，其独特的生物学、基因组学、遗传学优势及其高度保守的发育和疾病信号传导路径，使其成为以表型驱动的正向遗传学筛选策略，在基因组规模上识别人类发育和疾病未知基因或信号转导路径的最佳模式生物体之一^[22]。斑马鱼 ENU 化学随机诱变饱和筛选在德国和美国已获得成功。1996 年，国际著名学术刊物 *Development* 第 123 整期对 Nusslein-Volhard (1995 年诺贝尔奖获得者)所领导的这一工作予详细报道。然而，这些筛选有两个明显的不足：(1) 形态学筛选，主要通过肉眼观察来确定突变表型(如贫血)；(2) 没有针对特定的干细胞群体进行筛选。2006 年 5 月，我们实验室应用 ENU 化学诱变技术获得 1000 个隐性遗传突变家系，在第三代进行遗传学筛选，目前已获得数十个影响造血干细胞发育和自我更新的突变株。毫无疑问，对这些突变家系进行定位克隆，将对我们理解脊椎动物和哺乳动物造血干细胞发育和自我更新打下坚实的物质基础。一旦这些基因被克隆，我们将评估它们在白血病干细胞恶性转化中的地位和作用。由于白血病干细胞可能使用与正常造血干细胞不同或类似的自我更新机制来维持肿瘤细胞的恶性增殖，因而识别两者在自我更新机制上的细微不同，可能最终导致白血病干细胞诊断和治疗靶点的确定并最终应用于临床。

[参 考 文 献]

- [1] Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, 2006, 169(2): 338-46
- [2] Faubert A, Lessard J, Sauvageau G. Are genetic determinants of asymmetric stem cell division active in hematopoietic stem cells? *Oncogene*, 2004, 23(43): 7247-55
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-11
- [4] Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*, 2001, 414(6859): 98-104
- [5] Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature*, 2007, 446(7139): 1056-61
- [6] Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 2005, 90(1): 100-8
- [7] Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, et al. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2005, 8(3): 365-75
- [8] Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 252-63
- [9] Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell*, 2002, 109(1): 39-45
- [10] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003, 423(6937): 255-60
- [11] Molofsky AV, Pardoll R, Iwashita T, et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, 2003, 425(6961): 962-7
- [12] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [13] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90
- [14] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, 425(6960): 836-41
- [15] Katayama Y, Battista M, Kao WM, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 2006, 124(2): 407-21
- [16] Wu M, Kwon HY, Rattis F, et al. Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 541-54
- [17] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes hematopoietic stem cells from leukemia-initiating cells. *Nature*, 2006, 441(7092): 475-82
- [18] Zhang J, Grindley JC, Yin T, et al. PTEN maintains hematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukemia prevention. *Nature*, 2006, 441(7092): 518-22
- [19] Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 2009, 138(2): 271-85
- [20] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009, 138(2): 286-99
- [21] Vogel G. Zebrafish earns its stripes in genetics screens. *Science*, 2000, 288(5469): 1160-1
- [22] Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(9): 717-24