

DOI: 10.13376/j.cbls/2020042

文章编号: 1004-0374(2020)04-0325-10

## 造血微环境细胞组成及功能的研究进展

迟亚男<sup>1</sup>, 范书玥<sup>1,2,3</sup>, 马 姬<sup>1</sup>, 薛 燕<sup>1,2,3</sup>, 曾凡一<sup>1,2,3\*</sup>

(1 上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025; 2 上海市儿童医院上海医学遗传研究所, 上海 200040; 3 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 国家卫生和计划生育委员会医学胚胎分子生物学重点实验室, 上海 200040)

**摘 要:** 造血微环境是造血干细胞 (HSCs) 居住的场所, 对于维持 HSCs 自我更新、分化与稳态有着重要的调控作用。伴随着胚胎发育, 造血主要分为卵黄囊造血、主动脉-性腺-中肾造血、胎肝造血及骨髓造血 4 个时期, 因而研究造血发育时期的微环境对体外 HSCs 的扩增及诱导分化有着重要的指导意义。现对 4 个造血时期的造血微环境细胞组成及功能进行综述, 阐明不同时期造血微环境调控作用的异同, 为实现 HSCs 在体外的扩增与分化打下基础。

**关键词:** 造血干细胞; 造血发育; 微环境; 基质细胞; 单细胞

**中图分类号:** R331 **文献标志码:** A

## Advances in research on cell composition and function of hematopoietic microenvironment

CHI Ya-Nan<sup>1</sup>, FAN Shu-Yue<sup>1,2,3</sup>, MA Ji<sup>1</sup>, XUE Yan<sup>1,2,3</sup>, ZENG Fan-Yi<sup>1,2,3\*</sup>

(1 Department of Histoembryology, Genetics & Development, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2 Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China; 3 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** The hematopoietic microenvironment hosts the hematopoietic stem cells (HSCs). It also plays an essential role in regulating the self-renewal, differentiation, and homeostasis of HSCs. During embryonic development, hematopoiesis can be divided into four stages: yolk sac hematopoiesis, aortic-gonadal-medullary hematopoiesis, fetal liver hematopoiesis, and bone marrow hematopoiesis. Therefore, hematopoietic microenvironment has a profound impact on the expansion and differentiation of HSCs *in vitro* or *in vivo*. In this paper, the composition and function of hematopoietic microenvironment cells during the four stages were reviewed, and the differences in regulating hematopoiesis were described, which may help lay a solid foundation for the expansion and differentiation of HSCs *in vitro*.

**Key words:** hematopoietic stem cells; hematopoietic development; microenvironment; stromal cells; single cell

造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 是一类能分化成各类血细胞并可以长期自我更新的成体干细胞, 可用于治疗恶性血液病、再生障碍性血液病、自身免疫病等多种血液性疾病<sup>[1-4]</sup>。用于临

床治疗的 HSCs 主要来源于骨髓、动员外周血和脐带血, 但所得细胞配型严格、数目有限, 为了能有效地控制 HSCs 在体外的增殖及分化, 其赖以生存的造血微环境 (hematopoietic microenvironment) 已

收稿日期: 2019-11-20; 修回日期: 2020-02-17

基金项目: 国家重大科学研究计划项目(2014CB964701, 2014CB964703); 国家自然科学基金项目(31871484); 上海市重中之重点学科项目(2017ZZ02019); 上海市自然科学基金项目(16ZR1428600)

\*通信作者: E-mail: fzeng@vip.163.com; Tel: 021-62472308

经成为研究重点。造血微环境由基质细胞及其分泌的生物大分子组成,主要通过物理接触固定 HSCs 和造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs),然后借助分泌的细胞因子、外泌体等物质调控它们的增殖、分化及发育。当造血微环境中的基质细胞发生病变或异常时,会诱导 HSCs 与 HPCs 发生改变,造成骨髓增生、白血病等血液病的发生与发展<sup>[5]</sup>。因此,无论是对于血液病的治疗还是 HSCs 的体外扩增,研究造血微环境都具有重要意义。本文对造血微环境的细胞组成及功能进行综述。

## 1 造血发育历程

回溯 HSCs 的发育历程,哺乳动物的造血发育起始于胚胎早期胚外的卵黄囊血岛部位,成熟的成血管细胞(造血与内皮细胞的共同祖细胞)分化成血管内皮,并产生原始的有核红细胞、巨核细胞和巨噬细胞,但此时的造血只是暂时的,并不能长久维持下去<sup>[6]</sup>。随着发育的进行,在主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区的主动脉内,生血内皮细胞开始向造血分化,此过程被称为内皮向造血转化(endothelial-to-hematopoietic transition, EHT),产生造血干细胞的前体细胞(precursor cells of HSCs, pre-HSCs),并以出芽的方式形成能永久造血的造血干细胞(definitive-HSCs, d-HSCs)<sup>[7]</sup>,然而此时的 HSCs 数目屈指可数。随后成熟的 HSCs 随血液循环转移至胎肝,并在胎肝中进行快速增

殖<sup>[8-9]</sup>,产生大量的 HSCs,随后受趋化因子的作用迁移至骨髓,产生各类 HPCs 并不断向下游分化,最终以静息状态定居于骨髓内(图1),待机体发生损伤或血细胞缺乏时将再被激活,重新增殖<sup>[10]</sup>。

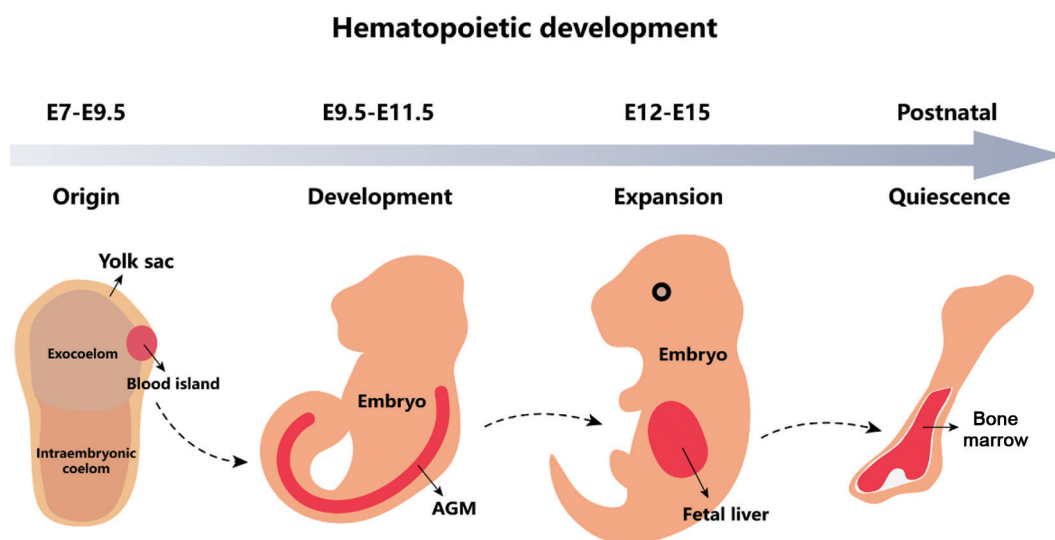
在 AGM 与胎肝造血期之间,胎盘的迷路区血管中也发现了与 AGM 区类似的 HSCs 簇并且具有分化为其他血细胞的潜能<sup>[11-12]</sup>,但由于胎盘是胎儿与母体进行血液及营养交换的器官,因而胎盘的 HSCs 到底是造血发育而来,还是随血液流动至此,目前尚无证据证实。

由此可见, HSCs 在发育的不同时期处于不同的状态,因而造血微环境的调控作用也大相径庭,所以应分别探究不同时期造血微环境的细胞组成及功能,对应体外需求选择合适的条件,逐步攻克 HSCs 体外诱导分化及扩增的难题。

## 2 不同时期造血微环境的细胞组成及功能

### 2.1 卵黄囊初始时期

由于卵黄囊时期还未形成成熟的 HSCs,目前研究重点主要集中在造血起源上,对其造血微环境调控作用的机制研究较少。早期的研究发现,卵黄囊基质细胞呈现内胚层样和中胚层样的两大细胞类群,能够在体外促进骨髓来源造血干细胞(bone marrow derived HSCs, BM-HSCs)向巨噬细胞分化<sup>[13]</sup>,其中梭形的贴壁细胞表达间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)标记 CD44、CD105,可被诱导分



小鼠造血发育过程从胚胎第7天(E7)胚外卵黄囊(yolk sac)的血岛(blood island)开始发生(origin),随后在AGM区形成成熟的 HSCs,新生的 HSCs 接着在胎肝(fetal liver)进行快速增殖(expansion),最终以静息状态(quiescence)定居于骨髓(bone marrow)。Exocoelom: 胚外体腔; Intraembryonic coelom: 胚内体腔; Embryo: 胚胎。

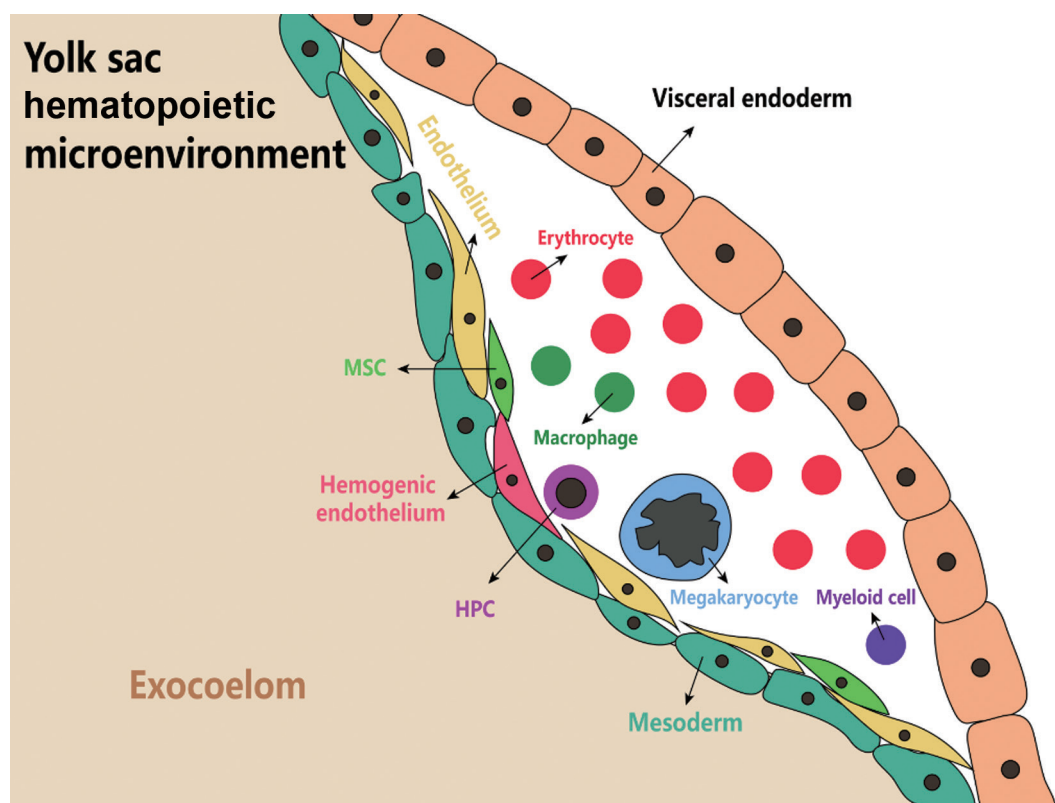
图1 造血发育历程

化成内皮细胞<sup>[14]</sup>; 卵圆形的内皮细胞表达 TGF- $\beta$ 2、INF- $\gamma$ 、BMP-4、IL-6 等细胞因子<sup>[15]</sup>。随着技术的不断突破及发展, 借助单细胞测序技术, 对胚胎第 6.5 天到第 8.5 天小鼠的卵黄囊进行单细胞水平的分析后发现, 卵黄囊主要由中胚层细胞、内皮细胞、生血内皮细胞、红细胞、髓细胞、巨核细胞及血液祖细胞七大细胞类群组成<sup>[16]</sup>(图 2); 细胞间的发育分化轨迹揭示, 随时间推移, 早期的中胚层细胞逐步分化成内皮细胞、生血内皮细胞、血液祖细胞, 最终形成原始红细胞, 其中内皮细胞高表达标志物 Cdh5 和 Pecam1, 生血内皮细胞则高表达血系相关分子 Kdr, Spl1 和 Itga2b, 也证实了之前关于血液来自内皮的假说<sup>[16]</sup>。因此, 卵黄囊内的中胚层、内皮、生血内皮细胞会通过分泌细胞因子, 促进表达 IL-3、IL-5、GM-CSF 等多种细胞因子受体的 HPCs 向原始红细胞、巨核及巨噬细胞分化, 逐步形成原始血液, 为胚胎发育提供所需的养分及防御系统。

## 2.2 AGM成熟时期

当人们明确第一个成熟的 d-HSCs 出现于 AGM

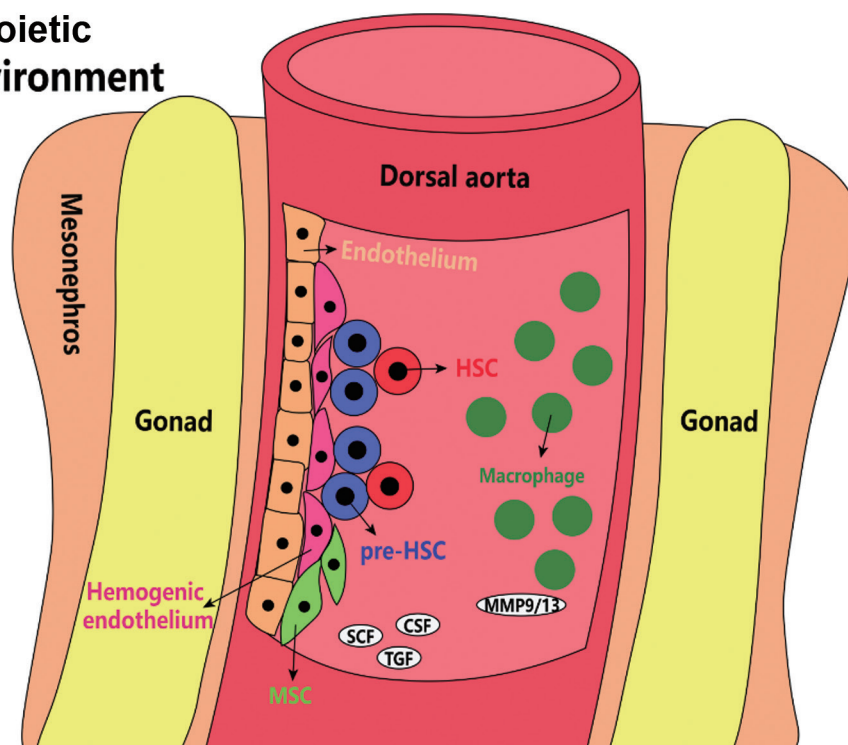
区后, 便希望借助体外基质细胞 -HSCs、基质细胞 -全能性干细胞共培养系统, 实现 HSCs 的体外增殖及诱导分化, 但是研究者们建立的 100 多个 AGM 基质细胞系中只有不到 40% 的细胞系可以支持造血<sup>[17]</sup>, 其中来源于背主动脉、泌尿生殖脊的基质细胞对于维持 HSCs 的增殖最为有效<sup>[17-18]</sup>, 因而不同 AGM 亚区对 HSCs 的调控作用不同, 主动脉可能才是 AGM 区取材的最佳区域。除此之外, 这些细胞系还可以支持胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 或诱导多能性干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 向 HSCs 分化<sup>[19-20]</sup>, 但是分化形成的多为 pre-HSCs, 因而骨髓移植后的植入率并不高<sup>[21-22]</sup>, pre-HSCs 仍需进一步分化成熟。相似的是, 能有效支持造血的 AGM 基质细胞, 都高表达 SCF、M-CSF、SDF-1、TGF- $\beta$ 1/2/3 等因子<sup>[19, 23-24]</sup>, 调控 HSCs 的增殖与分化。虽然目前 AGM 造血微环境的细胞组成尚不明确, 但已有的研究显示其含有 MSCs<sup>[25]</sup>、巨噬细胞<sup>[26]</sup>、内皮细胞和生血内皮细胞<sup>[27-30]</sup>(图 3)。相比于其他细胞, 巨噬细胞的占比最大, 其中 CD206<sup>+</sup>



在卵黄囊时期的脏壁内胚层(visceral endoderm)与中胚层(mesoderm)之间, 生血内皮细胞(hemogenic endothelium)产生少量 HPCs、髓细胞(myeloid cell)、巨核细胞(megakaryocyte)、巨噬细胞(macrophage)及红细胞(erythrocyte), 它们与内皮细胞(endothelium)、MSCs一同构成此时的造血微环境。Exocoelom: 胚外体腔。

图2 卵黄囊时期的造血微环境

## AGM hematopoietic microenvironment



在AGM区的被主动脉(dorsal aorta)中, 生血内皮细胞(hemogenic endothelium)形成pre-HSCs后进一步成熟为HSCs, 此时MSCs、巨噬细胞(macrophage)、内皮细胞(endothelium)等造血微环境细胞通过分泌SCF、CSF、TGF、MMP9/13等因子促进造血生成。Gonad: 性腺; Mesonephros: 中肾。

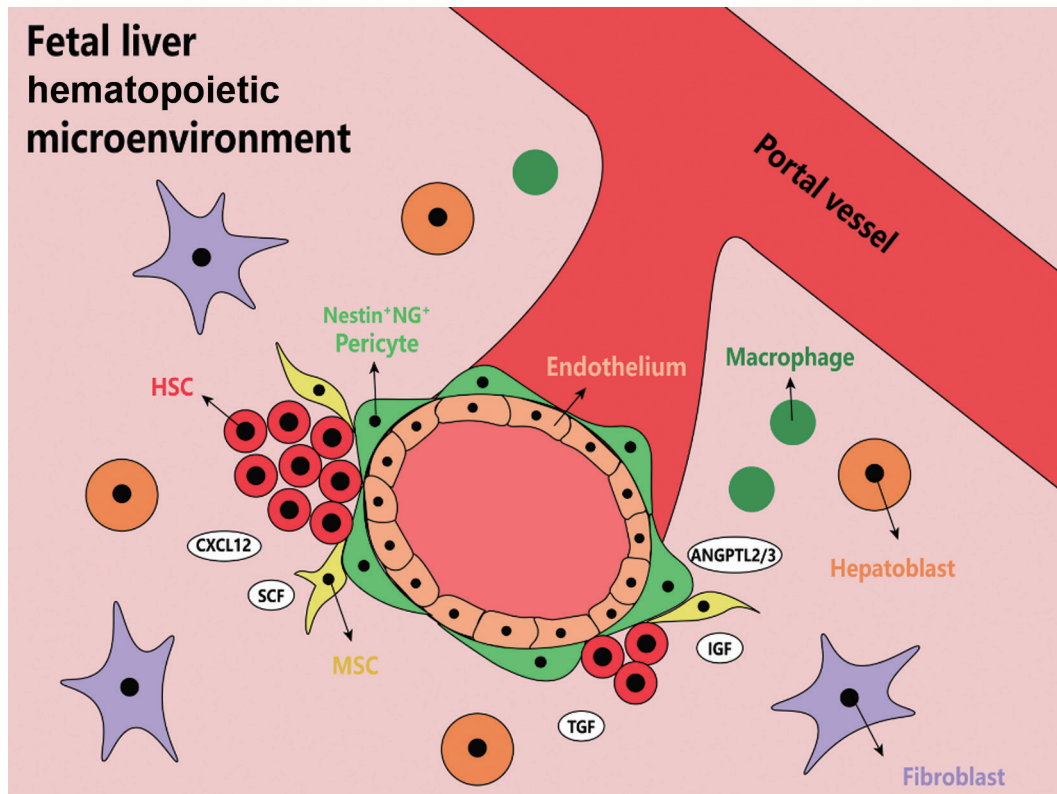
图3 AGM部位的造血微环境

巨噬细胞可通过分泌PF4、CCL2/7、MMP9/13等促炎因子促进内皮细胞向HSCs的转变<sup>[26]</sup>, 这一现象也在斑马鱼的相关研究中得到证实<sup>[31]</sup>。内皮细胞是组成主动脉血管的主要细胞, 当*Runx1*表达升高时, 形成了生血内皮细胞<sup>[32]</sup>, 随后又高表达*Gata2*、*Fli1*、*Gpr56*, 于是开始向pre-HSCs及d-HSCs分化<sup>[29, 33]</sup>。而MSCs则是一类广泛分布于各类组织器官的中胚层细胞, 具有向多种细胞分化的潜能, 并且能够分泌细胞因子参与免疫调节, 在临床上被广泛应用于疾病治疗, 在胎肝与骨髓的造血微环境中也都有报道。综上所述, AGM的造血微环境主要为EHT过程及HSCs的产生提供有利条件, 但MSCs等微环境细胞对此的作用机制还不明确, 若开展进一步研究, 明晰其作用机制, 将对体外HSCs的诱导分化具有重要指导意义。

### 2.3 胎肝增殖时期

从内胚层发育而来的胎肝含有多种内胚层、中胚层细胞, 成分复杂, 而对于HSCs增殖却具有得天独厚的优势。不仅如此, 胎肝造血微环境对于红

系祖细胞<sup>[34]</sup>、巨噬细胞<sup>[35]</sup>、髓系及淋巴系血细胞<sup>[36]</sup>的增殖也都有促进作用, 同时也可以诱导ESCs、iPSCs定向造血分化<sup>[37]</sup>, 隐藏着巨大的潜力, 因而一直备受国内外学者关注。研究者们一直致力于探究其中的细胞组成及作用机制, 以求在体外实现同样高效的造血增殖。多年的研究表明, 胎肝造血微环境主要由肝祖细胞、内皮细胞、血管周细胞、MSCs、成纤维细胞等细胞类群组成<sup>[38]</sup>(图4), 并且通过单细胞分析, 在人的胎肝中也发现了大量巨噬细胞的存在, 能够促进红细胞形成<sup>[39]</sup>。其中Nestin<sup>+</sup>NG2<sup>+</sup>的血管周细胞与门脉细胞构成门脉血管生态位, 通过高表达SCF、CXCL12、SPP1、VCAM1、ANGPTL2、IGF2等因子, 将HSCs锚定在血管周围并促进其不断增殖<sup>[40]</sup>; 胎肝中的MSCs有着与肝星状细胞相似的蛋白质表达<sup>[41]</sup>, 研究也证实了胎肝中存在上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)<sup>[42]</sup>, 能够促进HSCs增殖<sup>[43]</sup>; 内皮细胞可以支持红系与髓系造血, 当其缺失Tie2等重要基因后, 就会导致胚胎严重贫血甚至死亡<sup>[44]</sup>, 并



在CXCL12等趋化因子的作用下, HSCs被招募到胎肝的门脉(portal vessel)周围, 受MSCs、血管周细胞(pericyte)、内皮细胞(endothelium)、巨噬细胞(macrophage)、成纤维细胞(fibroblast)、肝祖细胞(hepatoblast)等造血微环境细胞调控, 快速、大量增殖。

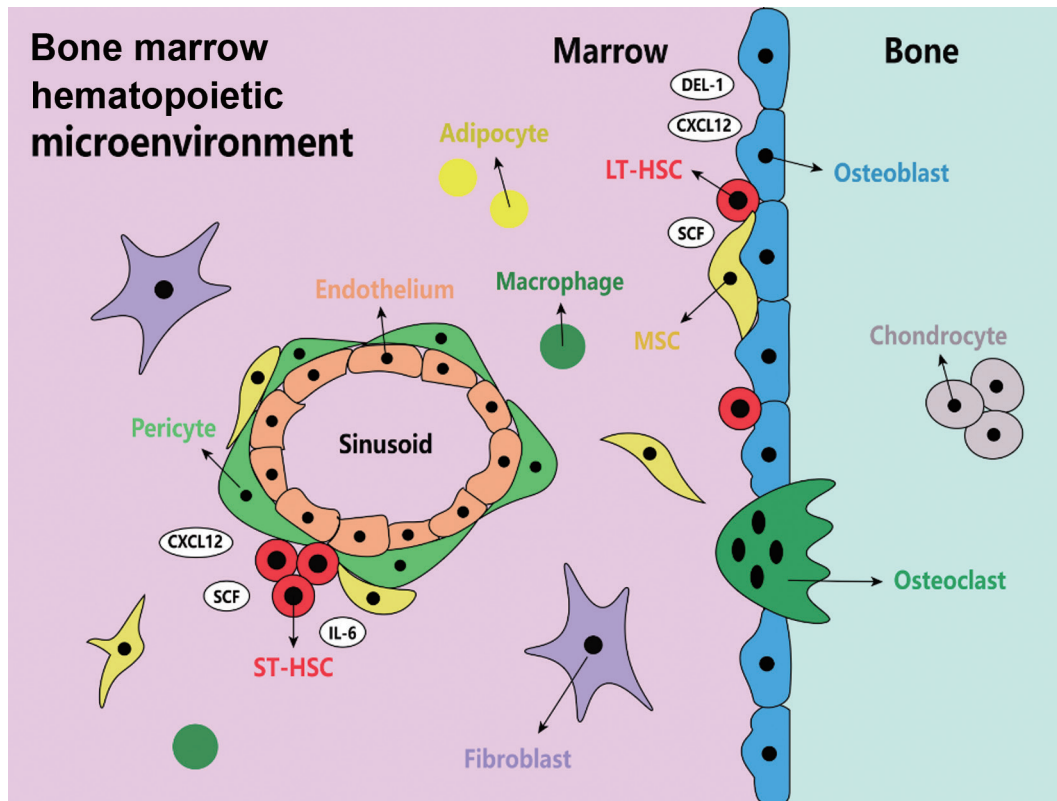
图4 胎肝部位的造血微环境

且 SCL-PLAP<sup>+</sup> Ve-cadherin<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> 内皮细胞具有长久的血管重建能力<sup>[45]</sup>, 可能对于血管生态位的形成具有重要作用; 此外, 肝祖细胞可以分化成肝细胞与胆管细胞, 其中 Dlk-1<sup>+</sup> 的肝祖细胞会通过分泌 EPO、TPO、SCF 促进红细胞生成<sup>[46]</sup>。借助共培养系统, 体外建立的胎肝基质细胞系能够有效地扩增 HSCs, 参与调节免疫反应<sup>[47]</sup>, 进而提高骨髓移植的植入率<sup>[48]</sup>; 其中 CD3<sup>+</sup> 的胎肝基质细胞能够分泌 ANGPTL2/3、IGF2, 将 BM-HSCs 扩增 2 倍; 进一步用 SCF<sup>+</sup> DLK<sup>+</sup> 筛选, 可得到更加纯化的基质细胞<sup>[49]</sup>; 若外源添加 ANGPTL2/3, 可使扩增倍数升至近 30 倍<sup>[50]</sup>; 这些支持造血的基质细胞分泌 IGF、FGF、TGF, 通过配体-受体反应促进 HSCs 增殖<sup>[51]</sup>。综上所述, 胎肝造血微环境有利于 HSCs 的快速增殖, 并产生足够的 HPCs 和各类血细胞, 为胚胎期与成体后的造血系统打下坚实的基础。由于存在一定的伦理问题, 对于胎肝的研究一直饱受争议, 但明晰胎肝造血微环境的成分及机制将有助于维持 HSCs 体外增殖能力<sup>[47-48, 52]</sup>。

#### 2.4 骨髓静息时期

骨髓是公认的、研究最为广泛的造血龕, 成熟

的 HSCs 及 HPCs 一直定居于此并行行使造血功能, 通过层层分化, 每秒钟可产生千万个血细胞来维持机体的功能。早在 20 世纪 70 年代, 人们就开始通过体外培养骨髓基质细胞来探索骨髓造血微环境的功能<sup>[53]</sup>, 发现多种骨髓基质细胞系均可促进 HSCs 增殖以及下游的血系分化<sup>[54]</sup>, 同时也能够诱导 ESCs、iPSCs 定向造血分化<sup>[55]</sup>, 其中 OP9 细胞系明显优于其他基质细胞系<sup>[56]</sup>, 是目前使用最多的体外共培养系统。研究显示, 骨髓微环境中非血系的基质细胞主要由 MSCs、成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、内皮细胞和血管周细胞这 6 大细胞类群组成<sup>[57]</sup>, 构成骨内膜生态位、血管周生态位两大造血龕<sup>[58]</sup> (图 5)。其中骨内膜生态位定位于骨与骨髓的交界处, 由 MSCs、成骨细胞、破骨细胞以及软骨细胞组成<sup>[59]</sup>, 它们高表达 SCF、CXCL12、G-CSF 等因子, 将具有长久造血能力的 HSCs (long term-HSCs, LT-HSCs) 锚定, 促进其归巢<sup>[60]</sup>, 并通过配体受体信号转导维持 LT-HSCs 的静息状态<sup>[61-62]</sup>; 而血管周生态位则由窦管内皮细胞及血管周围细胞组成, 通过表达 IL-6、SCF、CXCL12 等因子调控



骨内膜造血龛由MSC、成骨细胞(osteoblast)、破骨细胞(osteoclast)、软骨细胞(chondrocyte)组成,维持具有长久造血能力的LT-HSCs以静息状态长期存活;血管周造血龛由窦血管(sinusoid)内皮细胞(endothelium)、血管周细胞(pericyte)、MSCs、成纤维细胞(fibroblast)组成,促进具有短期造血能力的ST-HSCs自我更新及血系分化;巨噬细胞(macrophage)促进HSCs植入;脂肪细胞(adipocyte)则加速HSCs的衰老。

图5 骨髓内的造血微环境

具有短期造血能力的HSCs (short term-HSCs, ST-HSCs)、HPC 的自我更新与分化<sup>[63-68]</sup>;但是也有研究表明,骨内膜生态位也存在一些小血管,其中的内皮细胞和成骨细胞一起分泌 DEL-1 促进 LT-HSCs 增殖及髓系分化<sup>[69]</sup>。骨髓中的巨噬细胞通过促进微环境细胞分泌 CXCL12,维持 HSCs 在微环境中的定居,当缺少巨噬细胞的作用时,则更多的 HSCs 被动员至血液中<sup>[70-71]</sup>。而脂肪细胞对于造血过程却起着负调控作用,它们的增多或异常会造成造血功能障碍及老化<sup>[72-73]</sup>。因此,维持造血微环境的平衡及稳态,才能达到长久稳定的造血。对于白血病与再生障碍性血液病来说,骨髓移植是最佳的治疗手段,但放疗或化疗之后骨髓微环境的基质细胞也同样遭到破坏,影响了移植的 HSCs 的增殖及分化,由于 MSCs 可分化为成骨细胞和软骨细胞,因而在治疗时可以补充 MSCs 等基质细胞来恢复造血微环境<sup>[74]</sup>。另外,在一些白血病患者体内,研究者发现 MSCs 的成骨分化被抑制、成脂分化被增强,异常的骨髓微环境

为肿瘤细胞提供了有利条件,参与了血液病的发生与发展<sup>[75]</sup>;同时,证据表明异常的骨髓基质细胞也会诱发白血病发生<sup>[76-77]</sup>,因而针对骨髓造血微环境的治疗可成为白血病等恶性血液病治疗的一个新方向。

### 3 总结与展望

通过对比不同时期造血微环境的细胞组成及功能,可以发现,随着胚胎发育,造血微环境的细胞种类越来越多,造血龛的结构也越来越复杂;从早期的内皮细胞到胎肝时期的肝细胞与血管周细胞,再到成体骨髓的 MSCs 与成骨细胞,微环境对 HSCs 的调控作用也越来越复杂;从 AGM 区分泌的 M-CSF、SDF-1、TGF- $\beta$ 1/2/3 等因子,到胎肝分泌的 EPO、TPO、SCF、ANGPTL2、IGF2 等因子,再到骨髓分泌的 SCF、CXCL12、IL-6 等因子,逐步促进 HSCs 的成熟、增殖及血系分化(表 1)。然而相似的是,这些因子都通过配体-受体作用激活

表1 造血微环境细胞组成及功能

细胞类型	卵黄囊	AGM	胎肝	骨髓	分泌因子	造血调控作用
中胚层细胞	✓				未知	未知
MSCs	✓	✓	✓	✓	SCF、CXCL12、M-CSF、SDF-1、TGF-β1/2/3等	促进HSCs增殖及分化
内皮细胞	✓	✓	✓	✓	FGF、TGF-β2、INF-γ、BMP-4、IL-6、DEL-1等	促进EHT
生血内皮细胞	✓	✓			未知	促进EHT
巨噬细胞	✓	✓	✓	✓	PF4、CCL2/7、MMP9/13等	促进HSCs植入
血管周细胞			✓	✓	IL-6、SCF、CXCL12等	促进HSCs增殖
成纤维细胞			✓	✓	SCF、M-CSF、SDF-1、TGF-β1/2/3等	促进HSCs增殖及分化
肝祖细胞			✓		EPO、TPO等	促进红细胞生成
成骨细胞				✓	SCF、CXCL12、G-CSF、DEL-1等	促进HSCs植入及增殖
软骨细胞				✓	未知	未知
脂肪细胞				✓	Lipocalin 2、neuropillin-1等	抑制HSCs增殖
红细胞等血细胞	✓	✓	✓	✓	未知	未知

HSCs/HPCs 的 NOTCH、EGF、WNT、BMP/TGF-β、TNF/IFN/NF-κB 等信号通路参与造血调控<sup>[78]</sup>, 其中 SCL/TAL1、LYL1、LMO2、GATA2、RUNX1、MEIS1、PU.1、ERG、FLI-1、GFI1B 这 10 大转录因子决定着 HSCs 的命运<sup>[79]</sup>。此外, 相对于研究较为明确的内皮细胞和 MSCs, 近年来研究发现, 巨噬细胞存在于各个造血时期的微环境内, 它的存在促进了 EHT 过程, 但对于 HSCs 增殖及分化方面的功能还需要进一步的研究。无论是血系细胞还是非血系细胞, 对于 HSCs 都存在着或多或少的调控作用, 而这些微环境细胞中哪些关键组分发挥主导作用; 多组分之间如何协同作用; 每一类微环境细胞是否存在特异的亚群介导 HSCs 干性维持; 如何分离鉴定关键组分用于 HSCs 的体外扩增等问题仍需要进行深入研究。

由于胚胎期细胞数量有限, 对于各时期的微环境组分及 HSCs 的体外扩增机制有待进一步研究。在未来, 希望借助微量技术或通过体外扩增细胞技术等来推动胚胎发育领域进行更加细致深入的研究。近年来迅速兴起的单细胞测序技术可以从单细胞水平揭示细胞间的异质性、分析微环境细胞的组成及功能差异、探索细胞间的分化轨迹, 已被用于肿瘤、免疫及其微环境、组织器官发育等研究领域<sup>[80]</sup>, 是目前发育生物学研究中最佳的研究手段, 已成功揭示了原肠前<sup>[81]</sup>、原肠胚<sup>[82]</sup>等早期胚胎发育过程中的细胞图谱。对于造血微环境来说, 该技术已被应用于卵黄囊、胎肝及骨髓的研究中, 而 AGM 区的全部细胞组成以及已知的微环境细胞促进造血的作用机制还需研究人员进一步探索研究。此外, 其他任何模拟造血微环境的方式都有可能起

到促进造血的作用。Wilkinson 等<sup>[83]</sup> 研究显示, 用聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA) 替代血清白蛋白的培养基可以使 HSCs 在体外扩增 236~899 倍, 大大提高了 HSCs 体外增殖的效率, 同时也为 HSCs 体外扩增开辟了新思路。

综上所述, 全面阐明造血微环境的作用机理, 可以揭示 HSCs 增殖及分化的依赖条件, 为 HSCs 的体外扩增及诱导分化提供指导, 并且通过模拟体内的微环境, 将大大推动恶性血液病及再生障碍性血液病的临床治疗研究。

### [参 考 文 献]

- [1] Hu Q, Sun W, Wang J, et al. Conjugation of haematopoietic stem cells and platelets decorated with anti-PD-1 antibodies augments anti-leukaemia efficacy. *Nat Biomed Eng*, 2018, 2: 831-40
- [2] Koschmieder S, Vetrie D. Epigenetic dysregulation in chronic myeloid leukaemia: a myriad of mechanisms and therapeutic options. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 180-97
- [3] Zeng F, Chen MJ, Huang WY, et al. In utero transplantation of human hematopoietic stem cells into fetal goats under B-type ultrasonographic scan: an experimental model for the study of potential prenatal therapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005, 118: 170-3
- [4] Zhang J, Yan J, Zeng F. Recent progress on genetic diagnosis and therapy for β-thalassemia in China and around the world. *Hum Gene Ther*, 2018, 29: 197-203
- [5] Sarkaria SM, Decker M, Ding L. Bone marrow micro-environment in normal and deranged hematopoiesis: opportunities for regenerative medicine and therapies. *Bioessays*, 2018, 40: 1-11
- [6] Yamane T. Mouse yolk sac hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 80
- [7] Dzierzak E, Bigas A. Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell Stem Cell*,

- 2018, 22: 639-51
- [8] Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*, 2000, 95: 2284-8
- [9] Rybtsov S, Ivanovs A, Zhao S, et al. Concealed expansion of immature precursors underpins acute burst of adult HSC activity in foetal liver. *Development*, 2016, 143: 1284-9
- [10] Tzeng YS, Li H, Kang YL, et al. Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 2011, 117: 429-39
- [11] Jordan HE. Aortic cell clusters in vertebrate embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1917, 3: 149-56
- [12] Pereira CF, Chang B, Gomes A, et al. Hematopoietic reprogramming *in vitro* informs *in vivo* identification of hemogenic precursors to definitive hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2016, 36: 525-39
- [13] Yoder MC, Papaioannou VE, Breitfeld PP, et al. Murine yolk sac endoderm- and mesoderm-derived cell lines support *in vitro* growth and differentiation of hematopoietic cells. *Blood*, 1994, 83: 2436-43
- [14] 韩小强, 瓦龙美. 小鼠卵黄囊间充质干细胞培养及诱导成血管内皮细胞. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11: 6600-5
- [15] Na XD, Wang QR. The effects and the mechanism of YSEC-CM on the growth of yolk sac hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Res*, 2004, 28: 1189-95
- [16] Pijuan-Sala B, Griffiths JA, Guibentif C, et al. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. *Nature*, 2019, 566: 490-5
- [17] Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N, et al. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*, 2002, 99: 1183-9
- [18] Harvey K, Dzierzak E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem Cells*, 2004, 22: 253-8
- [19] 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
- [20] 张绪超, 陈惠芹, 黄绍良, 等. 含人AGM区基质细胞培养体系定向诱导胚胎干细胞为造血干细胞的实验研究. *中国病理生理杂志*, 2007, 23: 1747-51
- [21] 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
- [22] Sanjuan-Pla A, Romero-Moya D, Prieto C, et al. Intra-bone marrow transplantation confers superior multilineage engraftment of murine aorta-gonad mesonephros cells over intravenous transplantation. *Stem Cells Dev*, 2016, 25: 259-65
- [23] Weisel KC, Moore MA. Genetic and functional characterization of isolated stromal cell lines from the aorta-gonado-mesonephros region. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1044: 51-9
- [24] Nishikawa M, Tahara T, Hinohara A, et al. Role of the microenvironment of the embryonic aorta-gonad-mesonephros region in hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938: 109-16
- [25] Durand C, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal lineage potentials of aorta-gonad-mesonephros stromal clones. *Haematologica*, 2006, 91: 1172-9
- [26] Mariani SA, Li Z, Rice S, et al. Pro-inflammatory aorta-associated macrophages are involved in embryonic development of hematopoietic stem cells. *Immunity*, 2019, 50: 1439-52
- [27] Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 1046-56
- [28] Hadland BK, Varnum-Finney B, Nourigat-Mckay C, et al. Clonal analysis of embryonic hematopoietic stem cell precursors using single cell index sorting combined with endothelial cell niche co-culture. *J Vis Exp*, 2018, 135: 1-9
- [29] Baron CS, Kester L, Klaus A, et al. Single-cell transcriptomics reveal the dynamic of haematopoietic stem cell production in the aorta. *Nat Commun*, 2018, 9: 2517
- [30] Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature*, 2016, 533: 487-92
- [31] Travnickova J, Tran Chau V, Julien E, et al. Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. *Nat Commun*, 2015, 6: 6227
- [32] Swiers G, Baumann C, O'Rourke J, et al. Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nat Commun*, 2013, 4: 2924
- [33] Solaimani Kartalaei P, Yamada-Inagawa T, Vink CS, et al. Whole-transcriptome analysis of endothelial to hematopoietic stem cell transition reveals a requirement for Gpr56 in HSC generation. *J Exp Med*, 2015, 212: 93-106
- [34] Porayette P, Paulson RF. BMP4/Smad5 dependent stress erythropoiesis is required for the expansion of erythroid progenitors during fetal development. *Dev Biol*, 2008, 317: 24-35
- [35] Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb<sup>+</sup> erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity*, 2015, 42: 665-78
- [36] Tang Y, Peitzsch C, Charoudeh HN, et al. Emergence of NK-cell progenitors and functionally competent NK-cell lineage subsets in the early mouse embryo. *Blood*, 2012, 120: 63-75
- [37] Ma F, Ebihara Y, Umeda K, et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13087-92
- [38] Su X, Shi Y, Zou X, et al. Single-cell RNA-Seq analysis reveals dynamic trajectories during mouse liver development. *BMC Genomics*, 2017, 18: 946
- [39] Popescu DM, Botting RA, Stephenson E, et al. Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature*, 2019, 574: 365-



- 71
- [40] Khan JA, Mendelson A, Kunisaki Y, et al. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science*, 2016, 351: 176-80
- [41] Kordes C, Sawitzka I, Gotze S, et al. Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31: 290-304
- [42] Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*, 2003, 101: 2973-82
- [43] Zhang H, Miao Z, He Z, et al. The existence of epithelial-to-mesenchymal cells with the ability to support hematopoiesis in human fetal liver. *Cell Biol Int*, 2005, 29: 213-9
- [44] Neo WH, Booth CAG, Azzoni E, et al. Cell-extrinsic hematopoietic impact of Ezh2 inactivation in fetal liver endothelial cells. *Blood*, 2018, 131: 2223-34
- [45] Canete A, Comaills V, Prados I, et al. Characterization of a fetal liver cell population endowed with long-term multiorgan endothelial reconstitution potential. *Stem Cells*, 2017, 35: 507-21
- [46] Sugiyama D, Kulkeaw K, Mizuuchi C, et al. Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410: 301-6
- [47] 王汉汉, 迟亚男, 杨冠恒, 等. 2类小鼠胎肝基质细胞的生物学特征及表达谱分析. *上海交通大学学报(医学版)*, 2019, 39: 1226-32
- [48] Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, et al. Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*, 2002, 99: 1190-6
- [49] Chou S, Lodish HF. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 7799-804
- [50] Farahbakhshian E, Verstegen MM, Visser TP, et al. Angiopoietin-like protein 3 promotes preservation of stemness during *ex vivo* expansion of murine hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 2014, 9: e105642
- [51] Charbord P, Moore K. Gene expression in stem cell-supporting stromal cell lines. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1044: 159-67
- [52] 蔡耘, 张绪超, 陈惠芹, 等. 含人AGM区、胎肝及骨髓基质细胞培养体系程序化诱导小鼠胚胎干细胞向造血干细胞的分化. *中国组织工程研究*, 2011, 15: 4969-74
- [53] Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol*, 1977, 91: 335-44
- [54] Wineman J, Moore K, Lemischka I, et al. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood*, 1996, 87: 4082-90
- [55] Tian X, Kaufman DS. Hematopoietic development of human embryonic stem cells in culture. *Methods Mol Med*, 2005, 105: 425-36
- [56] 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
- [57] Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, et al. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell*, 2019, 177: 1913-32
- [58] Ho MS, Medcalf RL, Livesey SA, et al. The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment. *Br J Haematol*, 2015, 170: 472-86
- [59] Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 2010, 116: 4815-28
- [60] Balduino A, Mello-Coelho V, Wang Z, et al. Molecular signature and *in vivo* behavior of bone marrow endosteal and subendosteal stromal cell populations and their relevance to hematopoiesis. *Exp Cell Res*, 2012, 318: 2427-37
- [61] Thoren LA, Liuba K, Bryder D, et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*, 2008, 180: 2045-53
- [62] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003, 425: 841-6
- [63] Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 2012, 481: 457-62
- [64] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, et al. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 380-4
- [65] Smith-Berdan S, Nguyen A, Hong MA, et al. ROBO4-mediated vascular integrity regulates the directionality of hematopoietic stem cell trafficking. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 255-68
- [66] Himburg HA, Harris JR, Ito T, et al. Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche. *Cell Rep*, 2012, 2: 964-75
- [67] Kwak H, Salvucci O, Weigert R, et al. Sinusoidal ephrin receptor EPHB4 controls hematopoietic progenitor cell mobilization from bone marrow. *J Clin Invest*, 2016, 126: 4554-68
- [68] Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*, 2016, 532: 323-8
- [69] Mitroulis I, Chen LS, Singh RP, et al. Secreted protein Del-1 regulates myelopoiesis in the hematopoietic stem cell niche. *J Clin Invest*, 2017, 127: 3624-39
- [70] Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 2010, 116: 4815-28
- [71] Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169<sup>+</sup> macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*, 2011, 208: 261-71

- [72] Zhou BO, Yu H, Yue R, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat Cell Biol*, 2017, 19: 891-903
- [73] Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Cell Stem Cell*, 2017, 20: 771-84.e
- [74] Abbuehl JP, Tatarova Z, Held W, et al. Long-term engraftment of primary bone marrow stromal cells repairs niche damage and improves hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 241-55.e
- [75] Le Y, Fraineau S, Chandran P, et al. Adipogenic mesenchymal stromal cells from bone marrow and their hematopoietic supportive role: towards understanding the permissive marrow microenvironment in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Rev*, 2016, 12: 235-44
- [76] Zambetti NA, Ping Z, Chen S, et al. Mesenchymal inflammation drives genotoxic stress in hematopoietic stem cells and predicts disease evolution in human pre-leukemia. *Cell Stem Cell*, 2016, 19: 613-27
- [77] Dong L, Yu WM, Zheng H, et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature*, 2016, 539: 304-8
- [78] Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4: a005975
- [79] Wilson NK, Foster SD, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 532-44
- [80] Potter SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14: 479-92
- [81] Xiang L, Yin Y, Zheng Y, et al. A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. *Nature*, 2020, 577: 537-42
- [82] Argelaguet R, Clark SJ, Mohammed H, et al. Multi-omics profiling of mouse gastrulation at single-cell resolution. *Nature*, 2019, 576: 487-91
- [83] Wilkinson AC, Ishida R, Kikuchi M, et al. Long-term *ex vivo* haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. *Nature*, 2019, 571: 117-21