



# 造血干细胞VII

Hematopoietic Stem Cells VII

主编 Lothar KANZ  
Katja C. WEISEL  
John E. DICK  
Willem E. FIBBE

主译 陈志红



人民卫生出版社

# 造血干细胞VII

## Hematopoietic Stem Cells VII

主 编 Lothar KANZ  
Katja C. WEISEL  
John E. DICK  
Willem E. FIBBE

主 译 陈志红

副主译 仲 任  
李 堂  
房 芳

译 者 (以姓氏笔画为序)  
卢 愿  
仲 任  
李 堂  
陈志红  
房 芳  
徐爱晶

Copyright and Photocopying. ©2009 The New York Academy of Sciences. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored or transmitted in any form or by any means without the prior permission on writing from the copyright holder. Authorization to photocopy items for internal and personal use is granted by the copyright holder for libraries and other users registered with their local Reproduction Rights Organization (RRO), e.g. Copyright Clearance Center (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA (www.copyright.com), provided the appropriate fee is paid directly to the RRO. This consent does not extend to other kinds of copying such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works or for resale. Special requests should be addressed or [PermissionsUK@wiley.com](mailto:PermissionsUK@wiley.com).

版权所有, 包括全部或部分资料的翻译、复印、图片再使用、引用、广播、微缩或其他途径复制、数据库储存等。违者必究。

出版者不能保证本书中关于剂量和应用的所有信息完全准确。在每一个个例中读者必须参考相关信息。

## 图书在版编目 (CIP) 数据

造血干细胞Ⅶ / (美)坎兹 (Kanz) 主编; 陈志红主译.

—北京: 人民卫生出版社, 2011. 6

ISBN 978-7-117-14330-1

I. ①造… II. ①坎… ②陈… III. ①造血干细胞—研究  
IV. ①R331.2

中国版本图书馆CIP数据核字 (2011) 第088486号

门户网: <a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a> 出版物查询、网上书店
卫人网: <a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a> 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

图字: 01-2011-0451

## 造血干细胞Ⅶ

主 译: 陈志红

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里19号

邮 编: 100021

E-mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 三河市富华印刷包装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 13

字 数: 316 千字

版 次: 2011年6月第1版 2011年6月第1版第1次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-14330-1/R·14331

定 价: 38.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

## 译者序

造血干细胞是存在于造血组织中的一群原始造血细胞，也可以说它是一切血细胞的原始细胞。造血干细胞具有自我更新及分化为各种血细胞和免疫活性细胞的能力，也可以分化成各种其他细胞。自从1955年Thomas首先开展骨髓造血干细胞移植以来，造血干细胞被广泛地应用于血液病的临床治疗实践中，已成为治疗和治愈恶性血液病、重型再生障碍性贫血、某些实体瘤等最有效的方法。近10年来，各地学者们对造血干细胞的基础理论和临床应用认识有了显著的提高，但仍有许多问题尚未解决。2008年9月18日至20日，在第七届造血干细胞国际研讨会上，来自世界各地包括德国、荷兰、瑞典、意大利、美国、加拿大、日本、新西兰的30名著名血液学专家商讨了造血干细胞及其临床应用的最新进展。本次会议的主题囊括了造血干细胞领域的诸多方面，包括干细胞分类、龕（微环境）及干细胞调节，另外还讨论了间充质干细胞、恶性造血与癌干细胞、端粒酶突变与衰老、调节因子、多能性、胚胎干细胞及转化型研究等方面的许多新发现，同时提出许多假说并予以研究验证。本书详尽地记录他们的研究发现和未发表的数据，包括研究方法和大量图文并茂的研究结果，为致力于造血干细胞研究的基础和临床工作者开拓研究视野和今后研究方向。

我们希望本书能为血液与肿瘤专业的基础研究者、临床医师、研究生以及致力于造血干细胞治疗其他疾病研究的专业人员提高基础理论、更新相关知识和开拓研究视野。

陈志红

# 目 录

造血干细胞国际研讨会 (VII) .....	1
------------------------	---

## 第一部分 干细胞分级与微环境

造血干细胞的淋巴系分化 .....	14
基因模型研究静态干细胞与微环境 .....	21
骨内膜的造血干细胞微环境调节: 促血小板生成素/Mpl 信号在维持静止期造血 干细胞中的作用 .....	30
骨髓血管龕的功能异质性 .....	40

## 第二部分 干细胞调节

TGF- $\beta$ 超家族信号介导的复合体和环境依赖性造血干细胞的调节 .....	46
WNT 蛋白: 龕中调节造血干细胞分化的环境因子 .....	59
摘除小鼠脾脏对改变小鼠骨髓微环境中细胞因子表达和增加骨形成的研究 .....	65
造血干/祖细胞经典运输途径的研究 .....	73
NAMPT/NAD <sup>+</sup> /SIRT1 补救先天性粒细胞缺乏患者骨髓特异性转录因子失调 .....	79

## 第三部分 间充质干细胞

间充质干细胞: 一种组织修复的新方法 .....	85
人类器官中血管周围多分化潜能祖细胞 .....	100
不同人骨髓间充质干细胞亚群的表型特征 .....	105
体外人骨髓间充质干细胞的肌源性分化可用于尿道括约肌修复 .....	116

## 第四部分 恶性造血与癌干细胞

定向祖细胞向白血病干细胞的转换.....	124
PLZF在人类骨髓发育中的作用.....	129
抗肿瘤免疫与癌干细胞.....	133
揭示干细胞调控机制的途径之一——自然遗传多样性.....	147

## 第五部分 衰 老

可遗传的端粒酶反转录酶基因突变引起的短端粒增加多种恶性肿瘤易感性.....	154
---------------------------------------	-----

## 第六部分 多能性干细胞

从多能性干细胞疾病模型探索疾病的发病机制.....	166
诱导多能性干细胞生成肿瘤及其预防措施.....	171
胎肝源性的非常小胚胎/外胚层样干细胞按照造血干细胞发展迁移途径.....	178
人诱导性多能性干细胞源性的造血系统发育.....	191
Retractions .....	199
Erratum for Ann. N. Y. Acad. Sci. 1170; 682-687 .....	200
Erratum for Ann. N. Y. Acad. Sci. 1171; 100-104 .....	201

# 造血干细胞国际研讨会 (VII)

德国 Tübingen 大学, 2008-09-18 ~ 2008-09-20

Katja C. Weisel<sup>a</sup>, John Dick<sup>b</sup>, Willem E. Fibbe<sup>c</sup>, Lothar Kanz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Hematology, Oncology and Immunology, University Medical Center II, Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Toronto General Research Institute, Princess Margaret Hospital, Toronto, Canada

<sup>c</sup> Department of Hematology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

## 引 言

2008年9月18日至20日,由Tübingen大学与Amgen大学联合主办的两年一度的第七届造血干细胞国际研讨会在德国梅尔斯堡举行,30名著名的血液学专家商讨了造血干细胞及其临床应用的最新进展。其主题囊括了造血干细胞领域的许多方面,包括干细胞分类、龕(微环境)及调节,另外还讨论了间充质干细胞、恶性造血、衰老、调节因子、多能性以及胚胎及转化型研究等内容。此次的会议摘要中,陈述了所有致力于血液学及干细胞生物学的基础研究者和临床医师均十分感兴趣、并且认为是非常重要的内容。

## 干细胞分类

Hideo Ema (日本东京大学)指出血液系统是由一系列分级排列的细胞组成,即从造血干细胞到一系列的成熟血细胞,整个造血系统由造血干细胞克隆形成和维持。成年小鼠骨髓造血干细胞,其CD34呈阴性或低表达,c-Kit阳性,Sca-1阳性,并且富含CD34<sup>+</sup>KSL细胞。单细胞分析显示单个CD34<sup>+</sup>KSL细胞具有增殖及自我更新潜能,在体外可以克隆增生,将其移植入经过致死性放射线处理的小鼠体内也可增殖<sup>[1]</sup>。竞争性增殖分析认为平均大约25%的CD34<sup>+</sup>KSL细胞是造血干细胞。为了研究异基因造血干

细胞可能的分类,并且达到造血干细胞更好的纯化,将CD34<sup>+</sup>KSL细胞进行细分并对其功能进行研究。经流式细胞仪分析,发现CD34<sup>+</sup>KSL细胞具有其他抗体。CD34<sup>+</sup>KSL细胞最好不超过100个抗体检测,然而,所有这些细胞具有20种或更多种抗体,其中10种抗体仅存在于部分细胞中。根据最后一组抗体,CD34<sup>+</sup>KSL细胞可分为阳性及阴性两类,每一类的10个细胞移植入已接受致死量辐照的小鼠体内,同时植入对照细胞,结果发现仅有4种抗体对造血干细胞富集有作用,其中抗CD150抗体最受关注。当CD150<sup>high</sup>、CD150<sup>med</sup>及CD150<sup>neg</sup>的CD34<sup>+</sup>KSL细胞分别进行移植,这三种细胞的增殖频率是相似的;但是CD150<sup>high</sup>、CD150<sup>med</sup>CD34<sup>+</sup>KSL细胞的平均嵌合百分点明显高于CD150<sup>neg</sup>CD34<sup>+</sup>KSL细胞。有趣的是,髓系主要由CD150<sup>high</sup>细胞组成,而淋巴系主要由CD150<sup>neg</sup>细胞构成。第二次移植显示CD150<sup>high</sup>细胞具有显著的自我更新潜能,而CD150<sup>neg</sup>细胞的此种潜能很小。此外,单细胞克隆分析显示,CD150<sup>high</sup>细胞具有高的中性粒细胞、巨噬细胞、红细胞及巨核细胞克隆形成活性,而CD150<sup>neg</sup>CD34<sup>+</sup>KSL细胞具有高的中性粒细胞及巨噬细胞克隆形成活性。这些数据证明CD150<sup>high</sup>细胞比CD150<sup>neg</sup>细胞更幼稚,并且去除CD34<sup>+</sup>KSL细胞中的CD150<sup>neg</sup>细胞,可以获得更高纯度的造血干细胞。这些数据也显示出造血干细胞具有高

的自我更新潜能、髓系重建及完全的髓系分化能力的特征。

Christopher Baum (德国汉诺威和美国俄亥俄州辛辛那提儿童医院) 研究显示, 分类结构不仅限制造血自我更新和分化, 也控制造血干细胞插入性转化。基因导入造血干细胞可用于治疗许多遗传性疾病和后天获得性疾病; 然而, 插入性突变导致的低效及剂量限制阻碍了这项技术的发展。Christopher Baum 及其团队已建立鼠模型以探讨靶细胞类型、细胞培养条件以及载体技术对诱导插入突变的影响<sup>[2]</sup>。最终应用细胞培养基础分析, 对载体修饰的造血干细胞在一系列移植病例中的效果进行长期追踪 (超过20个月), 并对结果进行比较。最糟糕的例子是, 强大的病毒增强启动子单一插入原癌基因中, 例如 *Evil* 或 *Prdm16* 基因, 完全可以诱导白血病的发生<sup>[3]</sup>。进一步研究证明, 有众多因子控制插入突变的发生。对分类造血干细胞的转染研究发现, 细胞固有的再生潜在在插入突变中起主导作用, 因此, 只有在具有固有造血干细胞潜能的多能细胞中, 才可观察到不受克隆控制的显性插入突变。然而, 多能干/祖细胞、更成熟的髓系细胞及T细胞, 很难通过插入突变基因诱导转化过程。在造血干细胞子代中插入具有上调功能的 *Evil* 能够限制T淋巴细胞的分化, 提示曾报道的骨髓偏移分化为所谓的正常造血干细胞可能反映 *Evil* 或之后相关功能基因的失调作用。作为诱导插入突变的第二个重要因素, 载体框架中存在的增强启动子已经被识别。

在此分类中第三个因素是反转录病毒载体的插入形式,  $\gamma$  反转录病毒插入形式在诱导插入突变方面比慢病毒形式具有更大的风险性。然而, 慢病毒载体在造血干细胞中可以募集到高活性的增强-启动序列, 仍有可能导致插入突变。这些研究为找到更合理的治疗性载体提供了理论基础; 同时, 复制缺陷载体所带来的插入突变, 可以作为识别调控克隆造血基因的工具, 这些是血液学、肿

瘤学及再生药理学研究的重点。

Koichi Akashi (美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院 Dana-Farber 癌症研究所) 多年来致力于造血系统发展树等级研究<sup>[4]</sup>, 并且现在正在研究造血的主要问题: 造血干细胞何时何处开始激活淋巴系发展。普通淋巴祖细胞 (CLP) 是最早期的先导, 并且表达 IL-7 受体; 然而最早期的淋巴细胞祖细胞 (ELP) 却表达 RAG, 而不是 IL-7 受体。一些学者报道, ELP 比 CLP 更早, 是 T 细胞的主要来源。通过利用 RAG 小鼠, 其具有 RAG ( $\text{Gre}^+$ ) 及加强黄色荧光蛋白 (EYFP) -ROSA 受体, 显示 CLP 可分为  $\text{YFP}^+$  和  $\text{YFP}^-$  两组, 并且只有没有激活 RAG 基因的  $\text{YFP}^-$  CLP 具有 CLP 活性 (包括 T 细胞潜能)。此外,  $\text{YFP}^-$  CLP 和 ELP 的竞争性重建显示 CLP 对于 T 细胞生成更有潜力;  $\text{YFP}^-$  CLP 在胸腺中改变其表型, 为最早期胸腺前体。这些数据显示 CLP 和 ELP 是相互独立的, 并且前者是胸腺 T 细胞的主要来源。

## 干 细 胞 龕

造血干细胞的特征在于其相对静止性, 尽管分化进程相关的功能活动还不是很清楚。Kateri Moore (美国纽约 Mount Sinai 医学院) 及其团队就上述问题以及在内环境稳态时造血干/祖细胞动力学的相关问题进行阐述<sup>[5,6]</sup>。他们创建了有静止标记的、可分离细胞的鼠模型。这是一个双基因转移模型, 是由来自人 CD34 调节元件 (hCD34tTA) 的 Tet-tTA、激活由 Tet 反应启动子 [TetO-H2B-绿色荧光蛋白 (GFP)] 控制的组织蛋白 H2B-GFP 融合蛋白。在缺乏 Tet-衍生多西环素 (Dox) 小鼠中, 持续出现 GFP 掺入核小体现象; 在  $\text{mCD34}^{-/\text{lo}}$  造血干细胞中, hCD34 调节元素是有活性的, 调节造血干细胞的功能活性; 给予小鼠 Dox 后, H2B 转基因关闭, 允许在分离的细胞中 GFP 标记的逐步稀释。给予 Dox 治疗后, 骨髓流式细胞仪



分析显示, GFP标记存在于大多数原始造血干细胞中, 细胞周期分析显示其处于G<sub>0</sub>期; LSK<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>及LSK<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>细胞的功能分析, 证明体外所有原始干/祖细胞都能分离到LSK<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>, 80%的小鼠骨髓再生至少需要5个LSK<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>细胞。二次再生仅仅达到原始LSK<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>小鼠的骨髓。这些研究数据显示分化史可以作为干细胞潜能的标志物, 并且在正常内环境中可以评估不同干祖细胞的动力学。另外, 此模型可以在内环境稳态以及内环境紊乱后, 原位呈现造血干细胞的位置。在生后特殊化的微环境时, 骨髓支持造血干细胞自我更新及分化双重作用。

目前的研究发现, 长期造血干细胞(LT-HSC)的微环境含有两部分: 骨内膜表面(成骨细胞龛)及窦状内皮(血管龛)。Fumio Arai(日本东京Keio大学)研究了成骨细胞龛的分化<sup>[7]</sup>, 发现骨内膜分离的细胞可再分为3种: 中胚层祖细胞(MPC)、未成熟的成骨细胞及成熟的成骨细胞。基因表达分析显示MPC倾向于高表达细胞因子, 会影响造血干细胞增殖和静止; 成熟的成骨细胞表达多种细胞黏附分子, 包括N-钙黏蛋白、OB-钙黏蛋白及ALCAM。这些数据表明, 多种间充质成骨成分形成一种“微环境综合体”, 用于支持成骨环境中的造血干细胞。此外, 成骨环境产生的细胞因子, 用于调节造血干细胞的静止状态, 已经证明血小板生成素(TPO)可以调节静止的造血干细胞。已有研究结果证明长期造血干细胞表达TPO受体; Mpl在成人骨髓中是静止的, 与产生TPO的骨衬细胞相互作用。在静止的长期造血干细胞中, TPO/Mpl途径的抑制和激活相互调节: 抗Mpl中和抗体——AMM2表达于静止的长期造血干细胞中, 并且可以在非照射状态下成功移植造血干细胞, 然而外源性TPO可短暂地增加静止造血干细胞的数目。这些结果提示TPO/Mpl信号途径是一种新的微环境组分, 在成骨细胞龛中对调节长期造血干细胞起重要作用。

## 干细胞调节

Stefan Karlsson(瑞典Lund大学医院)及其团队正在研究TGF-β生长因子超家族, 并且证实该超家族在体外可以调节和维持造血干细胞的增殖。对正常水平所有TGF-β超家族信号转导的研究发现, Smad4起关键的调节作用<sup>[8]</sup>。该研究团队通过Smad4敲除诱导模型(Mx-Cre)证实了Smad4在造血系统中的作用。有趣的是, 几种增殖方法证明Smad4在造血干细胞维持自我更新及重建过程中起重要作用, 这与前期干扰TGF-β转录途径的研究相反。前期研究表明Smad4对造血干细胞自我更新的正调节作用是其非典型功能。此外, 在观察到的含有下调作用的*notch1*及*c-myc Smad4<sup>-/-</sup>*原始细胞中, 植入Smad4使之进入基因网络中, 会干涉造血干细胞的去向选择(Karlsson et al, J Exp Med, 2007)。最近, 已证明TGF-β通过Smad4与融合蛋白直接作用而抑制骨髓细胞Nup98-HoxA9的转化, 是一种Smad4信号独立的活化方式(EMBO J, 2006)。因此, Karlsson及其团队决定进一步研究Nup98-HoxA9与Smad4之间的相互作用。在Smad4-null造血干细胞中, 利用反转录病毒载体增强Nup98-HoxA9的表达, 其转化功能大约增加4倍; 将这些转化的细胞移植入受体小鼠体内, 结果显示其在体内阻止TGF-β表达, 使得髓系增殖更快。分子水平研究证实, 转染Nup98-HoxA9的野生型造血干细胞产生的Smad4蛋白是未转化细胞的5倍, 推测具有致癌潜能的Nup98-HoxA9可影响胞质中Smad4的隔离和稳定。其次, 已研究出一种再激活TGF-β途径的方法。通过检测克隆重演, 共转染Smad4的一小部分, 编码一条含有20个氨基酸的肽链(竞争HoxA9结合), 可降低转染Nup98-HoxA9细胞至少10倍以上的扩展能力。此外, 已证实此种竞争性分子可引起内源性隔离的Smad4释放,

重新激活 TGF- $\beta$  途径; 然而, TGF- $\beta$  仍不适用于临床治疗, 因为它在体内不能产生继发性作用。这些研究结果可以通过异常 Hox 蛋白表达诱导来设计新的白血病治疗方案。

经典 Wnt 信号与造血的诸多方面有关, 在 T 细胞发生过程中, Wnt 信号为多数成熟胸腺细胞提供重要的增殖信号。Wnt 在造血干细胞中的作用存在争议, 在与有功能的 Wnt 信号相比较时, 许多可诱导失去功能的 Wnt 信号模型研究得出不同的结果。Frank Staal (荷兰鹿特丹大学) 及其团队研究缺乏 Wnt 基因的鼠模型, Wnt 基因似乎在造血中起不可替代的作用<sup>[9, 10]</sup>。缺乏 Wnt3a 的小鼠产前死亡时间大约在胚胎 12.5 天前后, 利用体外分析和移植入非照射的供者小鼠以研究胎儿造血, 证明 Wnt3a 缺陷导致了胎肝中造血干细胞及祖细胞数目的减少, 在第二次移植分析中极大地降低了其重建能力。这种缺陷是不可逆的, 并且在植入完整 Wnt3a 的小鼠体内不可恢复。这种 Wnt3a<sup>-/-</sup> 造血干细胞缺乏长期再生能力, 不能用改变了细胞周期或原始祖细胞的生存来解释。此外, Wnt3a 缺陷影响髓系, 还影响未成熟胸腺细胞的分化, 但在祖细胞水平并不影响 B 淋巴细胞的发生。这些结果表明 Wnt3a 信号不仅提供增殖刺激信号, 例如对未成熟的胸腺细胞, 在造血时还调节造血干细胞的去向选择。总之, 此种小鼠模型对于 Wnt 信号调节造血干细胞的自我更新提供了直观的基因学证据。

Anna-Rita Migliaccio (美国纽约 Mount Sinai 医学院) 报道了 Gata1 在阻滞突变的长期病理过程中所发挥的作用<sup>[11, 12]</sup>。Gata1 是红细胞及巨核细胞突变的必需基因, 携带有 X 连锁亚等位 Gata1<sup>low</sup> 突变的小鼠血小板减少, 并且先后死于贫血。然而, 具有 CD1 髓系的小鼠 1 个月后贫血消失, 并可出现造血。为了明确在 Gata1<sup>low</sup> 突变的小鼠体内造血是否为自身造血干细胞造血, Migliaccio 等分析了脾切除后半合子 Gata1<sup>low/0</sup> 雄性小鼠及杂合子 Gata1<sup>low/+</sup> 雌性小鼠。半合子雄性小鼠在

脾切除后 2 周死于贫血, 相反, 杂合子的雌性小鼠在脾切除后存活了 9 个月, 并且具有正常的红细胞及高于正常的血小板, 其骨髓干/祖细胞及巨核细胞主要是野生型。尽管在 Gata1<sup>+0</sup> 及 Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠的骨髓中 c-Kit<sup>pos</sup> 细胞的频次是相同的, 但是这些细胞在这两种动物的骨及脾脏内的分布是不同的。在 Gata1<sup>+0</sup> 小鼠体内, c-Kit<sup>pos</sup> 细胞与骨内膜无关, 多数位于髓质, 少数位于脾。相反, 多数 Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠骨髓中 c-Kit<sup>pos</sup> 细胞位于骨内膜, 少数位于髓质, 很多 c-Kit<sup>pos</sup> 细胞被脾吞噬。

为了明确 Gata1<sup>low/0</sup> 干/祖细胞是如何克服其基因缺陷并在脾中分化, 利用受控于 HS2 的报告基因的表达进行跟踪实验, 证实 Gata1<sup>low</sup> 突变提供 Gata1 加强子。与预期结果相同, 由 Gata1<sup>+0</sup> 小鼠骨髓和脾脏纯化的干/祖细胞中, 报告基因呈低水平表达, 并且在 Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠骨髓干祖细胞中表达量也极少。相反, Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠脾脏的干/祖细胞表达更高水平的 HS2 控制的报告基因。Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠脾脏而非骨髓中的祖细胞, 在体外可以克隆造血。上述结果提示 Gata1<sup>low/0</sup> 小鼠造血由合适的脾脏微环境优先启动, 这种合适的脾脏微环境允许那些具有 Gata1 位点结构交替能力的造血干细胞分化, Gata1 位点参与 HS2 增强子的激活。因此, 合适的脾脏微环境可以挽救 Gata1<sup>low</sup> 突变造成的造血缺陷, 此微环境能够支持具有激活 Gata1 基因选择的 HS2 加强子这一特殊能力的干/祖细胞成熟的功效。

Steffen Massberg (美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院) 研究循环中的造血干细胞, 并指出相当多数量的 HSPC 持续移出骨髓并且进入外周血中<sup>[13]</sup>。HSPC 个体在外周血中的存在时间近似于以分钟计, 提示 HSPC 进入及离开血流的更新速度很快。然而, 对于循环中的 HSPC 的最终去向及功能知之甚少。循环中起源于骨髓的、具有短期及长期多方向重构能力的 HSPC, 可以离开外周血并持

续移入多种非淋巴骨髓外组织。HSPC在进入淋巴管排泄前,在髓外组织中停留36小时后移入外周血,最终到达骨髓。HSPC从髓外组织进入淋巴结的出口依赖于S1P受体,主要是S1P<sub>1</sub>。在生理条件下迁徙的HSPC主要参与停留在外周组织中特殊造血细胞的持续存储。暴露于Toll样受体(TCR)类似物,迁移的HSPC定植在髓外组织中增殖,并产生天然免疫效应细胞。因此,HSPC可以监控外周器官并随时补充定植的造血细胞,在机体防御病原时可以作为成熟白细胞的来源。

## 间充质干细胞

Willem E. Fibbe (荷兰Leiden大学医学中心)的主要方向之一是研究间充质干细胞(MSC)的生物学特性。间充质干细胞是一种多能祖细胞,已成为有前景的临床治疗手段,因为该细胞在体外及体内可以调节炎症反应<sup>[14]</sup>。间充质干细胞在体外具有抑制T细胞、B细胞及NK细胞增殖的特性,在体内可以诱导调节T细胞,促进单核细胞和CD34<sup>+</sup>细胞分化为介导耐受性应答的未成熟树突状细胞的特性。尽管间充质干细胞体外确切的特点是否与体内相同仍不明确,但是其已开始应用于临床治疗。这些研究包括调节移植物抗宿主病,以及促进脐血移植和完全相同单倍体干细胞移植产生造血<sup>[15]</sup>。新的间充质干细胞治疗包括促进炎症患者的组织修复,如克罗恩病和其他自身免疫性疾病。间充质干细胞上述作用的机制尚不完全明确,未来第一步研究将追踪体内间充质干细胞轨迹研究其体内功能机制。这对于研究间充质干细胞发生/发展的分级和鉴定具有特定功能的间充质干细胞亚类具有重要意义。

Bruno Peault (美国宾夕法尼亚州Pittsburgh儿童医院)及其团队报道了人类婴儿和成人组织中血管细胞与多种中胚层细胞系之间的解剖、分子及发展关系<sup>[16,17]</sup>。首先,通

过免疫组化及流式细胞技术从人体骨骼肌中分离出联合表达肌源性及内生细胞标志(CD56、CD34、CD144)的细胞。这些肌源性内生细胞在联合免疫缺陷小鼠损伤的骨骼肌中,较在CD56<sup>+</sup>肌源性祖细胞中,以一种更有效的方式合成肌纤维。长期培养CD56<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>细胞增殖并保持正常的染色体组型,在氧化应激条件下较CD56<sup>+</sup>肌源性细胞更少发生肿瘤,并且能更好地存活。克隆衍生的CD56<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>细胞体外培养时可以分化为肌源性、骨源性及软骨细胞,并且体外可再生骨骼肌。这些新型人类肌源性内皮细胞的特性与小鼠肌肉分离的干细胞(MDSC)相似,并且可经得起生物学技术处理,包括流式细胞仪纯化和在体外长期扩增,预示该干细胞可以作为骨骼肌修复的治疗性细胞。

外膜细胞是血管固有的细胞,环绕在人体多种器官的小血管上,包括骨骼肌、心脏、胰腺、脂肪组织及胎盘。通过CD146、NG2和PDGF-R $\beta$ 的表达,以及缺少造血、内皮及肌源性细胞的标志物来鉴定这些细胞。已有的证据表明,无论是从骨骼肌还是非肌肉组织纯化得到的血管固有细胞,在体外和培养过程中均具有肌源性。不考虑其组织来源,长期培养的血管固有细胞保持肌源活性。它们具有多种分化潜能(骨、软骨及脂肪),表达已知的间充质干细胞标志,在一种培养模型中有趋化现象。奇怪的是,间充质干细胞标志在天然的未经培养的血管固有细胞表面也有表达。这些数据表明,已研究过的人类组织的毛细血管及微血管壁存在祖细胞,是难以捕获的间充质干细胞的一部分,只能在所有组织原代培养中进行回顾性鉴定。

Hans-Jörg Bühring (德国Tübingen大学医院)公布了关于间充质干细胞免疫表型特点的数据<sup>[18]</sup>。通过可塑黏附性分离的骨髓起源的间充质干细胞(BM-MSC)难以标准化,并且提供其起源的信息极少。按照惯例,未分流的BM-MSC不仅与造血细胞一同培养,

而且还与其他不相关的细胞共同培养。其结果是, 间充质干细胞的生长及分化不仅受到这些细胞分泌的可溶性因子的影响, 而且还受到细胞与细胞间相互接触的影响。因为间充质干细胞在骨髓中数量非常少, 因此这些无关细胞的影响就相当可观。另一个问题是, 共同培养几天后, 培养基中的非黏附细胞被移除。这种选择性过程导致在后来时点才出现黏附的、不能被清除的间充质干细胞亚群细胞的丢失。为了更明确地确定其起始发生及排除其他细胞对于间充质干细胞扩增的影响, 鉴定出一系列标志物, 包括CD105、CD73、CD271、STRO-1、GD2及SSEA-4, 这些标志物与原始间充质干细胞富集有关。然而, 许多标志物并非间充质干细胞所特有, 许多造血细胞亚群也有表达。

为了识别更特异性的标志物, Bühring等<sup>[19-21]</sup>发现了2种间充质干细胞特异性表位, 即W8B2和39D5。这些抗体仅与CD271<sup>bright</sup>CD45<sup>-</sup>细胞发生反应, 此细胞具有完全的促克隆形成(CFU-F)的潜能。多色细胞分选与集落分析显示, CD271<sup>bright</sup>W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>-</sup>细胞富含90倍CFU-F, CD271<sup>bright</sup>W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>+</sup>细胞富含180倍CFU-F。上述两部分细胞能够提高黏附细胞所具有的典型成纤维形态。然而, CD271<sup>bright</sup>W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>+</sup>与CD271<sup>bright</sup>W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>-</sup>细胞相比增殖得更快, 并且平均形成的集落更大。详细的表型分析显示, 这两部分片段对于建立间充质干细胞标志CD13(如CD73、CD90、CD105、CD140b)均有意义。相反, 间充质干细胞的其他标志(如CD10、CD26、CD106、CD146)的表达则仅限于39D5<sup>-</sup>亚群, 而CD166的表达仅限于39D5<sup>+</sup>细胞。另外, 吉姆萨染色显示39D5<sup>-</sup>中含有大而明亮的胞质区域, 伴有显著的空泡, 使人联想到间充质干细胞形态的描述, 而39D5<sup>+</sup>细胞的特点是具有碱性颗粒的少量胞质。这两种亚群扩增的间充质干细胞可诱导分化为成骨细胞、成肌细胞及神经

细胞。相反, 只有39D5<sup>+</sup>细胞分化为软骨细胞及胰岛, 同样, 只有39D5<sup>-</sup>而非39D5<sup>+</sup>细胞分化为脂肪细胞。

间充质干细胞的增殖与分化潜能也是在单细胞水平上进行分析。将单个细胞接种到96孔板, W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>+</sup>细胞(11/96)的形成克隆效率大约是W8B2<sup>+</sup>39D5<sup>-</sup>细胞(5/96)的2倍。单个细胞培养导致集落形态的可变性、严格的表型、不同的增殖和分化潜能, 表明了意想不到的异质性程度。因此, 单一39D5<sup>-</sup>克隆可形成脂肪细胞, 而不能形成成骨及神经细胞; 而39D5<sup>+</sup>克隆细胞可以分化为成骨细胞及神经细胞, 而非脂肪细胞。总之, 科学家们鉴定了两种经典的、具有严格表型及功能的间充质干细胞子集。独特的39D5<sup>+</sup>子集细胞可以代表一个令人振奋的新时代的开始, 即分化形成软骨细胞用于替代治疗椎间盘损伤。

## 恶性造血

白血病由一组等级细胞组成, 其中一部分细胞具有干细胞样潜能的自我更新能力。Scott Armstrong<sup>[22, 23]</sup>(美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院)报道了混合谱系白血病(MLL)融合蛋白是由MLL基因在染色体11q23易位, 在定向造血祖细胞上表达类似干细胞的特性。这为评价基因表达的改变和对细胞最小固有的自我更新能力的遗传学研究提供了条件。Scott Armstrong等用携有MLL-AF9融合蛋白的反转录病毒转染小鼠IL-7R<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>FcγR II / III<sup>hi</sup>粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)及Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>富含间充质干细胞的细胞(LSK), 结果导致急性粒细胞性白血病(AML)的发生。从白血病细胞中能分离出IL-7R<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>FcγR II / III<sup>+</sup>白血病干细胞(LSC), 只要注入第二受体4个这样的细胞, 即可发生白血病。基因表达图用来证明细胞起源的独立性, LSC具有的基因表达图

与髓系细胞分化的基因表达图最为一致,然而,已经鉴定的一种白血病自我更新信号与间充质干细胞中一组高表达基因明显重叠,但在间充质干细胞转变为定向祖细胞过程中表达减低。这种信号包括一系列对正常间充质干细胞及人类 MLL-重排 AML 很重要的基因,如 *HoxA5*、*HoxA7*、*HoxA9*、*HoxA10* 及 *Meis1*。其次,研究者对 *HoxA9* 及 *Meis1* 表达是否能转化间充质干细胞及 GMP 产生疑问,并且发现间充质干细胞转化效率高,而 GMP 转化效率低,显示其他途径对 MLL-AF9 介导祖细胞转化是必需的。最终,在最近的 MLL-AF4 白血病模型中,开发了一种由 MLL-融合蛋白控制的胚胎学项目,并且发现了与畸变基因表达相关的组蛋白 H3 赖氨酸 79 甲基化的广泛异常。这些数据表明 MLL 融合蛋白通过激活 *Hox* 基因及其他途径来转化间充质干细胞,或许是由于异常组蛋白甲基化引起的。

John Dick (加拿大安大略省多伦多大学)及其同事致力于研究造血是如何维持的,以及在应激情况下如何适时产生大量的成熟细胞<sup>[24]</sup>。他们发现早幼粒细胞白血病锌指结构 (PLZF) 作为关键的开关,可以控制这些生物学过程。因此进行了一系列人类干/祖细胞基因失活及激活的研究;体内外研究发现,PLZF 阻止干/祖细胞的增殖与分化,反之 PLZF 失活可迅速促进分化。细胞因子信号降低 PLZF 的功能,介导迅速向中性粒细胞分化。这些研究表明抗分化因子对细调发展很关键。

Markus H. Frank (美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院)报道了癌症干细胞 (CSC) 通过自我更新及分化,促使肿瘤的发生和发展,并与造血系统肿瘤和某些实体瘤有关。最近在人类恶性黑色素瘤中发现,致肿瘤生成最小的一群细胞与治疗抵抗和肿瘤进展存在特殊关系<sup>[25,26]</sup>。此外,原始概念验证显示,对 ABCB5<sup>+</sup> 黑色素瘤干细胞的细胞杀伤性化疗抵抗的特殊靶点是终止实验性肿瘤生

长。这些发现提示癌症干细胞靶向战略,包括癌症干细胞消融,调控癌症干细胞特异分子途径,或者抑制肿瘤发展中的癌症干细胞功能适用于改良传统治疗方法,最终清除能引起复发和转移的难治性肿瘤起动力因子。其他研究显示 ABCB5<sup>+</sup> 黑色素瘤干细胞,相对于黑色素瘤的大部分群体,具有一种特殊的免疫表型,与优先激活 Th2 淋巴细胞及更有效地抑制 T 细胞增殖有关。这些发现显示,ABCB5<sup>+</sup> 黑色素瘤干细胞可能不仅代表了以抵抗肿瘤化疗为特征的一种癌症亚群,还可能与抵抗免疫治疗的人类恶性黑色素瘤的亚类相一致。

Gary Van Zant (美国肯塔基州列克星敦市 Markey 癌症中心)最近鉴定出 Latexin 可作为小鼠间充质干细胞种群大小的一种负性调节因子<sup>[27,28]</sup>。Latexin 是通过影响干细胞自我更新和凋亡来调节干细胞种群的。因此,Latexin 对于重要种群的大小起到类似“刹车”的作用,这也提示在正常环境下 Latexin 下调可以抑制恶性细胞的生长。的确,在许多癌细胞系及恶性血液病患者体内根本不存在 Latexin 或含量极少。淋巴瘤细胞系通过表达载体异位表达 Latexin,结果在体外显著抑制细胞生长、在体内明显抑制肿瘤形成。这些结果表明 Latexin 可以作为治疗人类恶性疾病的一种新方法。

## 恶性及老化

Peter M. Lansdorp (加拿大温哥华英国哥伦比亚癌症研究所)研究证实,当间充质干细胞纯化成为一种细胞时,存在端粒重复缺失<sup>[29,30]</sup>。采用单-端粒长度分析 (STELA),在少于 100 个纯化间充质干细胞中检测 Xp/Yp 端粒长度。有趣的是,移植入免疫缺陷小鼠体内的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> 脐血细胞存在几千碱基的丢失,反映了造血重建需要干细胞的多细胞分化。Lansdorp 认为,间充质干细胞端粒丢失限制了干细胞的克隆增殖,同时具

有肿瘤抑制基因作用。因此, 干细胞克隆的端粒会随着时间推移正常缩短, 对伴随端粒重复不足、起源于染色体末端的DNA损伤信号不能产生正常的反应, 为不正常克隆提供了强有力的选择。此类细胞不能修复各种DNA损伤, 由此产生的突变表型可以使这些细胞迅速发生遗传进化。关于端粒缺失、老化及肿瘤发生之间关系的研究显示, 在恶性血液病患者体内经常发现存在端粒酶基因的先天性突变, 如AML和慢性淋巴细胞白血血病。

Andreas Trumpp (瑞士实验癌症研究所和德国海德堡德国癌症研究中心) 报道了成体干细胞, 主要维持高度再生的组织, 如皮肤、小肠内皮和造血系统。这些组织中大多数成熟细胞半衰期短, 因此必须不断地由有活性的、长期生存的干细胞产生。在生物体的一生中, 干细胞通过自我更新来维持, 同时通过分化产生所有特定组织的成熟细胞类型。小鼠间充质干细胞是迄今最有代表性的成体干细胞, 并且作为了解其他成人干细胞的一种模型。利用label-retaining分析, Trumpp分离出一种长期休眠的最原始的间充质干细胞 ( $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^- \text{CD34}^-$ )<sup>[31, 32]</sup>。这些休眠的干细胞似乎比有活性的自我更新的干细胞更具有增殖能力, 并且不涉及造血的维持。这些细胞对损伤信号有反应, 从而被激活并进入自我更新程序。造血重建之后, 增殖的间充质干细胞再次休眠, 表明间充质干细胞在不同的造血刺激条件下可以具有休眠和自我更新的两面性。免疫组化研究显示, 休眠的间充质干细胞作为单个细胞分布于骨髓中, 提示休眠的区域可能很小, 或许仅由一个干细胞组成。此外, 癌症干细胞逃避抗增殖化疗的原因之一是其相对静止性。Trumpp提供了证据, 利用IFN家族成员治疗小鼠, 在体内引起休眠干细胞活化和增殖。利用IFN的这种新作用, 可能除去整个干细胞池, 即通过IFN短期激活间充质干细胞, 再继续对其施以化疗。这些结

果可应用于以休眠CML干细胞为靶向的治疗, 而不仅仅以伊马替尼攻击靶向。

## 多 能 性

George Daley (美国马萨诸塞州波士顿市哈佛医学院和儿童医院) 研究显示了多能干细胞如何用于治疗人类血液疾病<sup>[33, 34]</sup>。利用人类红系干细胞(ESC), Daley应用短发卡RNA敲除骨髓衰竭综合征、Fanconi贫血及Shwachman-Diamond综合征相关的基因。基因失活诱导人类临床疾病的典型细胞表型, 如Fanconi贫血, 其表型对DNA损伤物质高度敏感; 而Shwachman-Diamond表型具有有丝分裂不稳定性。之后, Daley描述了体细胞是如何转导的, 通过转录因子Oct4、Sox2、Myc及Klf4可以直接将细胞转变为类ESC状态, 产生诱导型多能干细胞(iPS)。大量的疾病特异性iPS细胞可以从许多单基因血液病患者体内分离获得, 如Shwachman-Diamond及ADA免疫缺陷, 还有肌肉营养不良、帕金森病、亨廷顿病(Huntington's disease)、糖尿病及唐氏综合征等。目前实验研究的目的是比较Shwachman-Diamond综合征患者获得的特异性iPS细胞与shRNA敲除的人类ES细胞制造的模型的异同。

最近发现, 有两部分重叠的4种基因可诱导小鼠甚至人类细胞核重排, 可能开启新的细胞替代治疗方法。Harald Mikkers利用内源性基因和可诱导基因来诱导多能性<sup>[35, 36]</sup>。尽管基因联合诱导多能性程度不同, Oct4和Sox2似乎是必备基因。反转录病毒已经用于介导这4种基因, 由于其中的几种基因与癌症相关, 使得反转录病毒将来不可能用于临床治疗。为了制订一种更安全的重排计划, 这个团队进一步研究了表达一种最重要的内源性重组基因的细胞类型是否易于重排。结果表明, 原始的4种多能转录因子中的3种(Oct4、Klf4、Myc)介导了小鼠

神经干细胞 (NSC) 开发出内源性 SoxB1 蛋白水平的重排。在体内和体外重排 NSC 分化成每种起源层次细胞, 在小鼠体内也发生类似的现象。然而, 雌性嵌合体动物产下的后代, 1 个月内发生软组织肿瘤, 强调了如果完整的前病毒被激活或不完全沉默, iPS 细胞具有潜在致肿瘤的能力。从人类胚胎中分离的人类胚胎干细胞 (hESC), 以及更多的新近成人真皮成纤维细胞, 被重排诱导为多能干细胞 (hiPC), 表明两种有潜能的细胞可用于再生细胞替代疗法。然而, 控制多能干细胞向某一特定方向分化的细胞和分子生物学基础知识的匮乏, 仍是阻止这种疗法用于临床的最重要的障碍之一。间充质干细胞移植仍是迄今为止最普遍和成功的干细胞治疗方法。

Mick Bhatia (加拿大安大略省哈密尔顿 McMaster 大学) 及其团队已经明确了从 hESC 及 hiPSC 向造血细胞系进化时出现的信号和细胞表型。尽管有可以通过原始血细胞功能提高造血细胞质量的方法, 但是仍难以找到在体内产生具有类似成体间充质干细胞繁殖功能的造血细胞的方法。此团队最近完成了未分化 hESC 及 hiPSC 种系的详细的表型分析。与其他几篇报道类似, 几种细胞表达分化细胞类型标志, 同时也联合表达多能因子, 包括 Oct 及 Nanog。为了更好地了解这些细胞类型, 利用直接 FACS 分离和即刻旋转聚集胚胎体形成 (SA-EB) 分析, 证明 hESC 具有根据细胞表面标志分化为特定族系的潜质。组蛋白后生分析显示基因轨迹或阻遏或是激活, 提示各种小分支随时准备向特定族系发展。奇怪的是, 染色质沉淀分析也证明在 hESC 培养中, 并非所有细胞有二价体区域。此外, 经反转录病毒整合位点标记的单个克隆有自我更新和分化倾向, 进一步证实了这些发现。直接分离及反转录病毒整合位点标记分析均显示, hESC 培养中至少有 2 个亚群专一负责干细胞培养的维持和再生; 然而在体外祖细胞某一分支负责分

化, 通过多种途径保持各种 hESC 的培养。这些发现表明祖代细胞对种系发展起重要作用, 根据 hESC 的分化进程和新近产生的 hiPSC, Bhatia 提议重新评价并定义被诱导分化的靶向群体。以上实验结果提示, 通过人类多能细胞可以优化和控制造血细胞系的发展。

Ihor Lemischka (美国纽约 Mount Sinai 医学院) 公布了探讨小鼠胚胎干细胞 (mESC) 的多能性调节的两项研究结果<sup>[37, 38]</sup>。在第一项研究中, 一种快速短发夹结构 (sh) RNA 调节方法用于下调候选基因产物, 这些基因产物在 Nanog 调控下起到激活或失活的作用, Nanog 是一个造血结构域, 包含了维持多能性及自我更新状态的转录调节子。创建了一种多潜能报告 mESC 细胞系, 该细胞系中存在受顺式作用元件调控的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达, 而顺式作用元件正常情况下调控内源性 Nanog 的表达。在分化时, GFP 表达水平迅速下降。此外, Lemishka 等发现了一种有效方法, 将合成的 shRNA 分子迅速转染到这些细胞中。在 shRNA 库中共筛选到 300 多种基因产物。目的基因产物包括调节 mESC 死亡决定程序的分子, 这些分子包括遗传调节因子及转录调节子。筛查结果显示, Nanog 的表达和多能性存在正性和负性调节因子。这些被鉴定的、更有趣的分子是 Brg-1 SWI/SNF 染色质重装复合体的组成成分, 进一步研究显示 SWI/SNF 活性部分必须从转录调节因子网络系统中卸载, 才能维持 mESC 多能状态。另外, 在诱导分化过程中, SWI/SNF 扮演激活基因的角色。总之, 研究显示 SWI/SNF 在多能性和分化的相互转换中发挥重要作用。

另一项研究的重点是, 当下调 Nanog 表达时总体分子和生化的改变。先前建立了一种 mESC 细胞系, 其内源性 Nanog 被 Dox 调节形式替代, Dox 是一种小分子, 易被哺乳动物细胞吸收。当存在 Dox 时, 人工设计的 mESC 呈现多能性; 当缺乏 Dox 时, 人工设

计的mESC随时准备分化。在组蛋白修正、转录、稳定状态mRNA水平及核蛋白组学的4个时间点(下调Nanog后的0天、1天、3天、5天),检测基因组改变。所有检测结果中发现许多改变,表明细胞命运是如何演变的。几乎一半的核蛋白水平变化不与相应编码mRNAs的变化相伴随。Lemischka等回顾现在和以前的研究发现,在移除Nanog后多能转录网络和Nanog蛋白-蛋白相互作用组是如何改变的。这些结果为进一步探讨多能细胞命运调节动力提供了研究平台。

## 胚胎干细胞

Mariusz Ratajczak (美国肯塔基州路易斯维尔大学) 研究关于近来鉴定的非常小的胚胎样干细胞(VSEL)。几组数据支持在成人骨髓(BM)和脐带血(CB)中存在多能干细胞(PSC)的假说,骨髓及脐血来源的干细胞在蛋白和(或)mRNA水平表达多能干细胞标志物,包括ESC转录因子(例如Oct-4及Nanog)及阶段特异性胚胎抗原(SSEA),进一步支持这种假说。另外,Ratajczak等已经证明这些胚胎标志物表达于VSEL干细胞<sup>139,401</sup>,并且多潜能成人祖细胞(MAPC)、骨髓基质细胞及骨髓分离的成人多潜能可诱导细胞(MIAMI)也表达这些标志物。除骨髓和脐带血外,表皮、心脏、胰腺、睾丸和支气管上皮中存在Oct-4<sup>+</sup>细胞。由于SSEA、Oct-4和Nanog是ESC、外胚层干细胞(EPSC)和原始生殖细胞(PGC)的特征性标志物,成人组织中存在这些细胞支持以下观点:成人组织中存在一群多能干细胞,是在早期原肠胚胎形成期储备的。假说认为这些细胞可能是原始生殖细胞的后代,为了将基因传递给下一代,原始生殖细胞产生体细胞,成为所有成年体细胞系的“母系”。也有假说认为多能干细胞与原始生殖细胞一样,消除其体壁印记后储存于发育的组织中,保护发育机体避免生成畸胎瘤的

可能。然而,这也影响这些细胞“真正多潜能性”的某些方面(例如其发展为完全胚囊的可能)。在组织更新的稳态条件下,Oct-4<sup>+</sup>多能干细胞在重新作为长期造血再生细胞的起源中起重要作用。此外,器官损伤时(如心肌梗死或脑卒中时),这些细胞可以从骨髓和其他组织的特殊小巢动员到外周血中,随外周血液循环到达受损器官并发挥修复作用。另一方面,它们可能是恶性肿瘤的来源。总体来讲,这些细胞不能去除体壁印记,从正常迁移途径中迷路,获得危险的突变,或者在错误的时间动员到外周血中并且在慢性炎症区域沉积,这样可能会导致恶性肿瘤发生(如畸胎瘤、生殖细胞瘤、儿童肉瘤及其他相应的肿瘤)而不是再生。

Glaudia lengperke (德国Tübingen大学医院)探讨了尾部(Cdx)同位序列基因*Cdx1*和*Cdx4*,由BMP4和Wnt激活,上调其后的*Hox*基因,在小鼠ESC体外分化以及斑马鱼胚胎形成时促进造血<sup>1411</sup>。对其他中胚层衍生物的分析显示,尾部信号介导的造血是以牺牲形成于前中胚层的心脏组织为代价的。这些结果支持一种观点:体外分化的ESC可以作为研究早期哺乳动物发展的模型,为研究胚胎去向选择的模式及接受外界信号后的去向转换提供独特的平台,同时,过表达AP信号可用来调整由ES细胞的组织形成。

## 转化型研究

Rupert Handgrestinger (德国Tübingen大学儿童医院)及其团队的研究重点在于:自然杀伤细胞在同种异体细胞移植后防治恶性血液病复发时发挥重要作用<sup>1421</sup>。单倍体相合造血干细胞移植,其抗白血病作用可以增强抗移植后复发和改善疗效。Handgrestinger等利用纯化的CD34表达,成功地从父母供者体内筛选出外周血干细胞。与非同种异体反应性供者相比,从同种异体反应性NK供



者获得的CD34<sup>+</sup>干细胞,移植后复发风险明显降低。由此提示,急性淋巴细胞性白血病在儿童是一种易受NK细胞影响的疾病。它们也证明了NK细胞可以对健康个体自身造血细胞产生细胞毒性作用,并且在自体移植后NK同种异体反应状态仍然存在。为了在移植物中保存大部分供者NK细胞,在单倍体相合造血干细胞移植时,研究者们以动员移植物CD3<sup>+</sup>T细胞阴性消耗替代CD34<sup>+</sup>阳性选择。大量的CD56<sup>+</sup>NK细胞与移植物一起被移植,100多名患有各种恶性疾病的儿童接受这种治疗。除具有同种异体反应状态外,NK细胞的功能状态也很重要,移植后具有持续存在的高NK活性的患者较低活性患者的复发率低。因此,针对增加移植后NK活性的战略可以降低白血病的复发率。为了在单倍体相合移植后激活NK细胞,临床上正在探讨实施几种措施。

一种方法是在移植后采用额外的、反复制入供者分离的NK细胞,这些NK细胞在体外与IL-15过夜孵育,以此激活NK细胞。输入IL-15激活的NK细胞后,接着予以低剂量的IL-2治疗以诱导体内IL-15激活的NK细胞增殖并提高其细胞毒性。迄今,7位患者施以此种疗法,无明显严重副作用。因为NK细胞可以产生抗体依赖的细胞毒性作用(ADCC),该研究团队探讨额外增加直接针对白血病靶细胞的单克隆抗体是否可以增加移植后移植物抗白血病效应。另外,期望前瞻性临床研究探讨哪种措施或者与何种治疗方法联合应用,能最有效地提高移植物抗白血病效应。

Karl Welte(德国汉诺威医科大学直属医院)报道了严重先天性粒细胞缺乏,是以粒细胞生成和成熟障碍为特点的异种骨髓造血衰竭综合征,粒细胞停留在早幼粒或中幼粒水平,而外周血中无成熟的中性粒细胞。尽管G-CSF可以提高90%以上CN患者的中性粒细胞水平,但是依赖G-CSF的中性粒细胞分化仍严重影响这些患者。虽然CN患者

血清中生物激活的G-CSF水平以及骨髓细胞G-CSF受体的表达均有提高,但是中性粒细胞数目的增加仅出现于每日注射药理剂量的G-CSF之后(为生理水平的100~1000倍)。由遗传学判定CN存在两种主要的类型:60%的患者是常染色体显性遗传,存在ELA基因突变;大约20%的患者是常染色体隐性遗传,存在HAX1基因突变。这种遗传学异质性提示,由于共同髓系转录因子下调,几种病理机制可以导致相同的表型(如骨髓形态或对G-CSF的反应)。近来,淋巴增强子-1(LEF-1)是一种诱导粒细胞生成的决定性转录因子,其直接上调C/EBP $\alpha$ <sup>[43]</sup>。下调LEF-1及靶基因C/EBP $\alpha$ 是CN的常见病理机制,与突变状态无关。除C/EBP $\alpha$ 外,C/EBP $\beta$ 是另外一种粒细胞特异性转录因子;然而,这两种转录因子在粒细胞生成中起的作用不同:C/EBP $\alpha$ 对稳态下中性粒细胞的生成有作用,C/EBP $\beta$ 对细胞因子介导的紧急中性粒细胞生成至关重要<sup>[44]</sup>。在CN患者C/EBP $\alpha$ 表达水平是正常的,研究者检测G-CSF在C/EBP $\alpha$ 依赖的紧急中性粒细胞生成激活中的作用,并且发现C/EBP $\beta$ 由NAD<sup>+</sup>和SIRT1依赖途径所激活。稳态下由LEF-1调节中性粒细胞生成,缺乏LEF-1时C/EBP $\alpha$ 不起作用。

既往研究显示,CN患者血清G-CSF水平以及骨髓细胞G-CSF受体的表达均有提高,但是这种提高不足以达到使CN患者产生正常数量中性粒细胞的水平。这支持以下假说:药理剂量的G-CSF导致C/EBP $\beta$ 激活,通过NAD<sup>+</sup>及SIRT1激发紧急状态下中性粒细胞的生成,而不是依赖于LEF-1/C/EBP $\alpha$ 。CN被认为是一种前白血病综合征,超过25%的患者在20年后可能患白血病。因为对于应用G-CSF治疗C周期性或特发性粒细胞减少症患者并未发现AML/MDS,CN容易发生恶性转化的根本原因是G-CSF受体信号下游的潜在缺陷,而非G-CSF治疗本身。大约转化为AML的80%的CN患者存在获