

综 述

Wnt信号通路在造血干细胞自我更新和扩增中的作用

胡成龙 孙洁文 侯 烨 李 静 章 骏*

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要 Wnt信号分子是一类在无脊椎与脊椎动物的多种组织中广泛表达且进化上高度保守的信号刺激因子, 由于它们在生长、发育、代谢和干细胞调节等多种生物学过程中的重要生物学功能而被广泛重视。根据其激活的信号通路不同, Wnt分子可分为经典和非经典两类。经典类和非经典类Wnt分子分别通过激活 β -catenin、 Ca^{2+} 及JNK信号通路而发挥作用。近年来的研究显示, 经典和非经典Wnt信号通路均在造血干细胞的自我更新和功能维持的调控中发挥关键作用。该文通过对经典和非经典Wnt信号通路的分子调控机理的探讨, 对近年来有关Wnt信号通路在HSC自我更新调控中的研究进展进行了综述, 对Wnt信号通路与造血微环境中其他信号通路在造血发生、维持和重建中的关系进行了讨论。

关键词 Wnt信号; 造血干细胞; 自我更新; 造血微环境

Wnt Signaling Pathway in Self-renewal and Expansion of Hematopoietic Stem Cell

Hu Chenglong, Sun Jiewen, Hou Ye, Li Jing, Zhang Jun*

(College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract Wnt signaling molecules are highly conserved stimulating factors in evolution, which are widely expressed in various tissues of invertebrate and vertebrate. They are highly valued for their important biological functions in a variety of biological processes including growth, development, metabolism and regulation of stem cells. Based on the activation pathways, Wnt molecules can be divided into canonical and non-canonical types, acting on Wnt/ β -catenin signal pathway, Wnt/JNK signaling pathway and Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway, respectively. Recent studies have shown that the Wnt signaling pathways play important roles in self-renewal of hematopoietic stem cell. This article mainly discussed the molecular mechanisms of canonical and non-canonical Wnt signaling pathways, the research progress of Wnt signaling pathway in self-renewal of hematopoietic stem cell in recent years and the interaction between Wnt and other signaling pathways in hematopoiesis, hematopoietic maintenance and reconstitution.

Key words Wnt signaling; hematopoietic stem cell; self-renewal; hematopoietic microenvironment

收稿日期: 2014-03-28 接受日期: 2014-06-17

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2013CB966803)、国家自然科学基金(批准号: 31201104)、上海市科委基础研究领域项目(批准号: 13JC1406403)和上海市教委科研创新项目(批准号: 13YZ051)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-64322762, E-mail: zhj@shnu.edu.cn

Received: March 28, 2014 Accepted: June 17, 2014

This work was supported by the State Key Development Program for Basic Research of China(973 Program) (Grant No.2013CB966803), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201104), the Program for Basic Research of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (Grant No.13JC1406403) and the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (Grant No.13YZ051)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64322762, E-mail: zhj@shnu.edu.cn

网络出版时间: 2014-10-30 13:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0100.html>

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是各种血细胞的始祖细胞,担负着维持和重建造血的重要生理功能,HSC的功能异常是许多血液系统疾病的根源。HSC移植方法作为临床治疗血液系统难治性疾病和其他恶性肿瘤性疾病的重要手段已被广泛应用。因此,HSC的生物学特性和功能调节的分子机制的研究,不但具有重要的理论意义,同时具有重要的生物医学应用价值。

不同于功能成熟的血细胞,HSC具有两个重要特征:自我更新和多潜能性分化^[1]。正是由于它的这两个重要特性使得其在造血系统中如此独特和重要:其多潜能性分化特性确保它生成所有血液细胞的能力,而其自我更新特性(生成自我)确保其在生成其他血液细胞的同时,也产生新的HSC,从而确保了造血的长久不衰。所以,对调控HSC自我更新的分子机制的研究始终是干细胞领域的研究热点。在过去二十多年中,通过构建与分析转基因小鼠与基因敲除小鼠模型,人们已陆续找到了一些潜在的参与调节HSC自我更新的信号分子,但决定HSC发生发育的关键因子及关键信号通路还未完全甄别。

Wnt信号分子是一类在多种无脊椎与脊椎动物的组织中广泛表达并在进化上高度保守的活性因子。它们在细胞内至少可激活三种不同的信号通路:经典的Wnt/ β -catenin信号通路、非经典的Wnt/JNK信号通路和Wnt/ Ca^{2+} 信号通路。研究表明,经典和非经典的Wnt信号均参与了包括调控造血在内的许多重要生物学功能^[2-4],揭示Wnt信号通路调控HSC自我更新的分子机制,将给HSC体外扩增和血液系统疾病的发病机制的研究提供新的思路,为血液系统疾病的治疗提供新的分子靶点。本文综述了近

年来经典和非经典的Wnt信号通路在HSC自我更新调控中的研究进展,并探讨Wnt信号通路在造血微环境中其他信号通路在造血发生、维持和重建中的作用。

1 Wnt分子和其信号通路

1.1 Wnt分子及其受体

Wnt分子是一类分泌型糖蛋白。目前,在哺乳动物中发现的Wnt分子有19种。通常根据其激活的信号不同将Wnt分子分为经典型和非经典型。经典型Wnt分子主要通过激活 β -catenin发挥作用,而非经典型Wnt分子通过激活JNK和 Ca^{2+} 信号而发挥作用。此外,部分Wnt分子可以同时激活经典和非经典信号通路(表1)。Wnt多为350~400个氨基酸大小蛋白分子,其N-端为一段富含半胱氨酸的信号肽^[5-6]。通过信号肽和受体的特异性结合,Wnt激活下游信号而发挥生物学功能。研究表明,分子Wnt3a、Wnt5a和Wnt10b等在造血调控中发挥着重要作用^[7]。

Wnt受体主要为一类名为卷曲蛋白(Frizzled, Fz)的7次跨膜蛋白受体^[8]。Fz有10种亚型,其胞外N-端有一段富含半胱氨酸的结构域,介导与胞外Wnt分子的结合。根据其结合的Wnt分子及其所激活的下游信号的不同,Fz也可分为经典和非经典两类。经典的Fz主要包括Fz1、Fz2、Fz4、Fz9和Fz10;非经典的Fz主要包括Fz3、Fz5、Fz6、Fz7和Fz8。经典和非经典的Wnt分子分别通过结合相应的Fz受体,然后通过被称Dishevelled(Dsh)的多结构元件蛋白调节下游信号的活化。此外,经典和非经典Wnt信号的激活还分别依赖于LRP和Ryk/Ror受体酪氨酸激酶。LRP是一种跨膜蛋白受体,有LRP5和LRP6两种亚型。Ryk受体酪氨酸激酶的胞外结构主要包

表1 Wnt分子、受体和抑制剂
Table 1 Wnt molecules, receptors and inhibitors

项目 Item	经典 Canonical	非经典 Noncanonical	参考文献 References
Wnt molecules	Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt16	Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11, Wnt16	[2,5-7,15-21]
Fz receptors	Fz1, Fz2, Fz4, Fz9, Fz10	Fz3, Fz5, Fz6, Fz7, Fz8	[5,13,20]
Other receptors	LRP5, LRP6, Ryk, Ror	Ryk, Ror	[5,9-12,21]
Wnt inhibitors	Sfrp1, Sfrp2, Sfrp3, Dkk1, Dkk3, Wifl	Sfrp1, Sfrp2, Sfrp3, Wifl	[5,22-23]

括WD信号域^[8], Ryk受体被证实是促进轴索生长的Wnt复合受体结构,与Wnt分子结合参与Wnt信号通路的传递^[9]。Ror是一类在细胞质膜中单次跨膜的受体酪氨酸激酶,在经典和非经典Wnt信号通路中发挥了重要的作用,尤其在非经典Wnt信号通路中,对JNK和PCP都有一定的调节作用^[10-12]。

最近还发现了另一种协同受体——视紫红质家族成员LGR5(leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)。质谱分析表明,LGR5与Wnt受体Fz/LRP结合紧密^[13]。LGR5是G蛋白耦联受体家族成员之一,具有18个富含亮氨酸的重复单位和7个跨膜区域。在小肠干细胞的增殖中,LGR5通过标记隐窝柱状细胞(crypt base columnar cells, CBC)来维持上皮细胞自我更新的特性^[14]。

目前,已发现Wnt信号的抑制分子包括分泌型卷曲相关蛋白Sfrps(secreted frizzled related proteins)、DKKs和Wif1^[24]。Sfrp1、Sfrp2和Sfrp3通过与Wnt分子结合而阻止Wnt与Fz受体的结合从而抑制经典与非经典Wnt通路^[25]。DKKs是一种分泌型糖蛋白,为Wnt辅助受体LRP5/6的拮抗剂。其中,DKK1具有抑制Wnt信号转导通路引起轴心复制的能力^[26]; DKK3具有诱导 β -catenin的定位改变及增加细胞间黏附功能^[27]。Wif1为保守分泌型蛋白,其N末端含50个氨基酸信号序列。Wif1通过与Wnt分子结合进而阻止Wnt与受体的结合,从而抑制Wnt活性^[28]。

1.2 经典的Wnt/ β -catenin信号通路

β -catenin是Wnt/ β -catenin信号通路的关键分子,由781个氨基酸组成,其氨基端具有蛋白激酶的磷酸化位点调节其蛋白的稳定性,其羧基端具有转录活性结构域;而其中段为arm repeats结构域,介导与其他蛋白的相互作用^[29]。 β -catenin的主要活性是在核内通过调节靶基因的表达而完成的。由于缺乏DNA结合元件, β -catenin在核内需要通过与转录因子TCF或LEF1结合而发挥作用。在无 β -catenin结合的情况下,TCF/LEF1结合在靶基因的调控元件上,同时募集转录抑制因子Grouche、CtBP和HDAC等,抑制靶基因的表达。当 β -catenin与TCF/LEF1结合后,上述转录抑制因子将被具有转录辅助激活因子LgS、Pygopus、CBP/p300和Brahma等替代,从而诱导靶基因的表达^[30]。

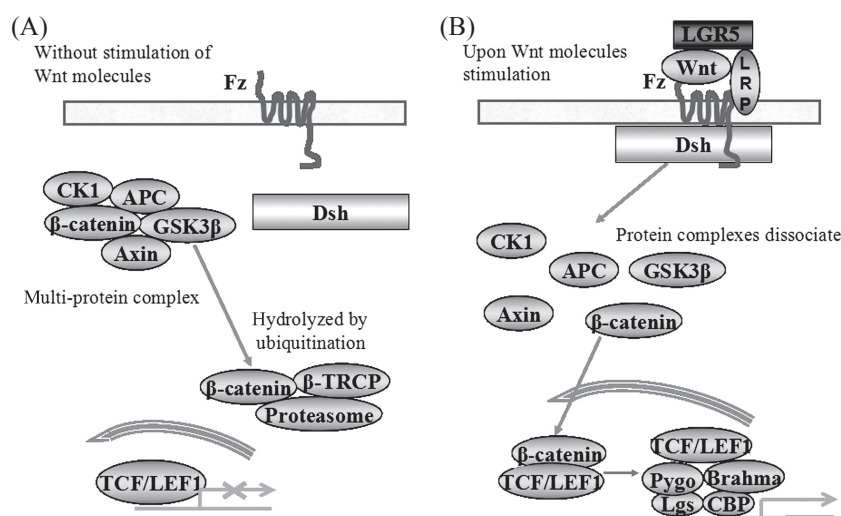
β -catenin的活性受Wnt分子的诱导调控。当无Wnt分子刺激时,胞质中的 β -catenin被羁留在Axin、

APC、CK1和GSK3 β 组成的多蛋白复合物中^[30],其中,CK1磷酸化 β -catenin第45位的丝氨酸,GSK3 β 磷酸化 β -catenin的N末端第33和37位点的丝氨酸残基以及第41位点的苏氨酸,磷酸化的 β -catenin被泛素连接酶 β -TRCP识别,引起泛素化共价修饰,从而被蛋白酶体降解^[29-31](图1A)。当细胞膜受体Fz和LRP与Wnt分子结合而被激活时,Axin、APC、CK1和GSK3 β 组成的多蛋白复合物将被募集到活化的受体分子表面而解离,使得 β -catenin游离于细胞浆中而不能被GSK3 β 磷酸化降解。这种胞浆中游离的 β -catenin可被转移到细胞核中,与转录因子TCF/LEF1结合,从而激活靶基因的转录^[32-34](图1B)。目前已发现,抑制剂ICAT可以抑制 β -catenin和TCF/LEF1的相互作用从而抑制转录复合体的活性^[35]。值得一提的是,如果将 β -catenin基因的突变造成其N末端缺失或GSK3 β 磷酸化位点被其他氨基酸替代,从而使其不能被GSK3 β 磷酸化,这种突变型的 β -catenin将具有明显活性且不受细胞内在的调控机制所调节。利用这种突变型 β -catenin所构建的载体转染细胞将会造成被感染细胞中 β -catenin信号的持续活化^[36]。

1.3 非经典的Wnt/JNK信号通路和Wnt/ Ca^{2+} 信号通路

Wnt/JNK通路(图2A)由于参与调控细胞的极性化又被称为平面细胞极化(planar cell polarity, PCP)信号通路,主要由Wnt5a和Wnt11等非经典Wnt分子通过Fz和Dsh激活DAAM1、RhoA和Rac1/2等小分子GTP酶而发挥作用。这些小分子GTP酶可通过Profilin、Rock诱导actin的多聚化调节细胞骨架结构的重排和极性化的建立,从而调节细胞的形态、不对称结构和分裂^[2]。同时,它们还通过激活JNK-Jun信号而调节细胞的生长和生存等细胞生物学活性^[15]。

Wnt/ Ca^{2+} 通路(图2B)主要通过Dsh和G蛋白酶激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC),激活的PLC通过酶切作用将PIP₂分子切成IP₃和DAG两种重要的信号分子。DAG通过激活蛋白激酶C(PKC)-Cdc42通路而调节细胞的极性化、细胞结构和细胞运动等。IP₃主要通过其在内质网表面的受体结合,激活内质网中 Ca^{2+} 释放,从而引起细胞内 Ca^{2+} 浓度增加和 Ca^{2+} 敏感信号成分的激活。 Ca^{2+} 通过激活钙调蛋白依赖性激酶II(CamKII)-NFAT通路,调节细胞运动、细胞黏附和生存。同时, Ca^{2+} 通过激活TAK1-NLK通路抑制经典Wnt/ β -catenin信号活性^[37]。

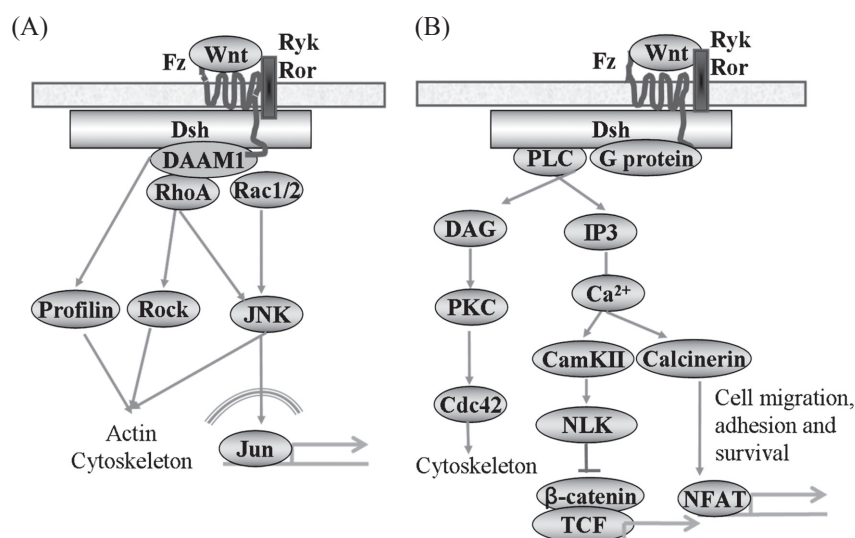


A: 无Wnt分子刺激时Wnt/β-catenin信号通路; B: Wnt分子刺激时Wnt/β-catenin信号通路。Dsh: 散乱蛋白; Fz: 卷曲蛋白; LRP: 低密度脂蛋白受体相关蛋白; LGR5: 视紫红质蛋白; GSK3β: 糖原合成酶激酶; CK1: 酪蛋白激酶; APC: 大肠腺瘤息肉病蛋白; Axin: 支架蛋白; TCF/LEF1: T细胞因子/淋巴样增强因子; Lgs、Pygopus、CBP和Brahma均为转录辅助因子。

A: without Wnt molecules stimulation of Wnt/β-catenin signaling pathway; B: upon Wnt molecules stimulation of Wnt/β-catenin signaling pathway. Dsh: dishevelled protein; Fz: frizzled protein; LRP: low density lipoprotein receptor related protein; LGR5: leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5; GSK3β: glycogen synthase kinase-3β; CK1: casein kinase 1; APC: adenomatous polyposis coli; Axin: scaffold protein; TCF/LEF1: T cell factor/lymphoid enhancement factor 1; Lgs, Pygopus, CBP and Brahma are transcription cofactors.

图1 Wnt/β-catenin信号通路

Fig.1 Wnt/β-catenin signaling pathway



A: Wnt/JNK信号通路; B: Wnt/Ca²⁺信号通路。Ryk/Rho: 小G蛋白超家族的亚家族成员; DAAM1: 胚胎形态发生散乱蛋白相关激动蛋白1; Rac1/2: Rho-GTP酶家族蛋白; JNK: c-Jun氨基末端激酶; Rock: Rho相关激酶; Jun: 核转录因子; PKC: 蛋白激酶C; CamKII: 钙调蛋白依赖蛋白激酶II; IP3: 三磷酸肌醇; DAG: 肌萎缩相关蛋白; NFAT: 活化T细胞核因子; Cdc42: 细胞分裂周期蛋白42; NLK: Nemo样激酶。

A: Wnt/JNK signaling pathway; B: Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. Ryk/Rho: members of the family of small G protein superfamily; DAAM1: dishevelled associated activator of morphogenesis 1; Rac1/2: Rho-GTP enzyme family protein; JNK: c-Jun amino terminal kinase; Rock: Rho-associated kinase; Jun: nuclear transcription factor; PKC: protein kinase C; CamKII: calmodulin dependent protein kinase II; IP3: inositol triphosphate; DAG: amyotrophy related proteins; NFAT: activation of T cell nucleus factor; Cdc42: cell division cycle protein 42; NLK: Nemo-like kinase.

图2 Wnt/JNK信号通路和Wnt/Ca²⁺信号通路

Fig.2 Wnt/JNK signaling pathway and Wnt/Ca²⁺ signaling pathway

2 Wnt信号通路在造血发生和胚胎发育造血形成中的作用

在正常的造血发生过程中,大多数HSC存在于骨髓微环境中,具有长期造血重建能力,被称为长效HSC(long-term hematopoietic stem cell, LT-HSC)。LT-HSC在骨髓中可以分化成短效HSC(short-term hematopoietic stem cell, ST-HSC), ST-HSC只具备有限的自我更新能力,可以继续分化为多潜能前体细胞(multipotent progenitors, MPP), MPP可以进一步分化为共同淋巴系前体细胞(common lymphoid progenitor, CLP)或共同髓系前体细胞(common myeloid progenitor, CMP)。其中, CLP可以进一步分化成各种淋巴系的前体细胞,最终分化成T细胞、B细胞以及自然杀伤细胞(natural killer, NK);而CMP则进一步分化成粒细胞/单核细胞系前体细胞(granulocyte/monocyte precursors, GMP)和巨核细胞/红细胞系前体细胞(megakaryocytic/erythroid progenitors, MEP)。GMP和MEP再分别进一步分化为各种粒细胞、巨噬细胞和巨核细胞、红细胞^[38]。

在胚胎发育早期, HSC是由位于中胚层主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM)具有造血能力的血管内皮细胞所产生。这种内皮细胞位于背侧动脉的腹面,接受来自周围临近的内皮细胞和间充质细胞提供的信号刺激。其中, Wnt、Hedgehog、VEGF、Notch和BMP等多个发育相关的信号分子对造血的发生必不可少。它们通过相应的时间和空间调控,分别在特定的时空中被激活,诱导中胚层腹侧化、造血/血管双向祖细胞(hemangioblast)形成及造血细胞定向分化等一系列的生物学变化,从而启动造血的发生。HSC在AGM区形成不久,即随着血液循环迁移到富含毛细血管的胎盘Labyrinth、胚胎肝脏和脾脏中扩增。在出生前后, HSC最终迁移到达骨髓并选择骨髓组织作为其永久性的家^[39]。

Wnt信号通路在胚胎早期的造血形成中起着关键作用。在小鼠的卵黄囊、AGM区和胎肝中均可测到Wnt配体和Fz受体的表达^[40]。Wnt信号在胚胎早期红细胞生成中处于活化状态^[41-42],经典Wnt通路的激活能上调原始红细胞生成的关键转录因子和造血细胞表面必需的特异性标志物,也能增加造血多潜能祖细胞(MPP)的形成^[43]。斑马鱼胚胎早期表达Wnt16配体, Wnt16在调控中胚层和背主动脉的造血发生起关键作用^[19]。Tarafdar等^[43]发现,

在早期胚胎分化和造血形成中, Wnt通路的相关分子 β -catenin/TCF/LEF和胚胎多潜能分子Brachyury/Nanog之间的相互调控能诱导早期中胚层细胞形成并维持着一定程度上的干细胞潜能。基因敲除小鼠模型研究证实, Wnt/ β -catenin信号通路在早期胚胎造血发生中起至关重要的作用。在小鼠的生殖系细胞中敲除Wnt3a会使得胎肝中造血干祖细胞急剧减少,最终导致小鼠在胚胎期(12.5天)死亡,这表明Wnt3a在胎肝造血发生中的重要性^[44]。分化阶段特异性 β -catenin剔除小鼠研究表明, Wnt/ β -catenin信号可能只对早期HSC形成中的血管内皮细胞向HSC转化过程必不可少,而对HSC形成后的增殖和分化可有可无^[45]。

3 经典的Wnt信号通路对HSC自我更新及扩增的调控作用

目前对经典的Wnt/ β -catenin是否为HSC自我更新扩增所必需尚存在争议。早期的研究发现,许多Wnt分子如Wnt10b和Wnt2b等均在小鼠的胚胎期AGM区和肝脏以及出生后骨髓造血细胞和基质细胞中表达^[46-47]。表达这些Wnt分子的细胞所产生的条件培养基具有促进HSC扩增的能力^[16]。同时发现, Wnt分子与SCF等造血因子对HSC数量扩增具有协同作用^[48]。采用基因过表达和敲除的策略发现,经典的Wnt/ β -catenin信号在HSC自我更新和扩增中必不可少,其活化具有促进HSC扩增的作用。活化型 β -catenin的过表达可促进HSC的体外扩增。小鼠造血系统中特异性敲除 β -catenin可导致HSC自我更新的受损^[49]。在骨髓基质细胞或/和成骨细胞中过表达Wnt分子的抑制因子如Axin、DKK1和Wif1等可打破HSC的静息状态,造成HSC自我更新受损及降低体内的造血重建能力^[22-23,47]。基于这些研究,临床工作者研究发现,采用GSK3 β 抑制剂激活 β -catenin信号不但能够提高HSC在体外培养体系中的扩增,同时可以促进HSC在体内的造血重建能力^[50-52]。但有研究发现, Wnt/ β -catenin信号通路对HSC的自我更新和扩增并非必不可少。Cobas等^[53-54]和Jeannet等^[55]分别通过可诱导的Cre-loxp-调节的靶基因敲除技术发现,敲除 β -catenin或同时敲除 β -catenin和 γ -catenin均对HSC的自我更新和造血重建能力无影响。这些研究结果不一致的原因有待进一步研究。

采用逆转录病毒感染的策略或转基因技术直

接在HSC中过表达活化型 β -catenin发现,只有在生存信号的保护下,如过表达Bcl2或激活Akt(通过*Pten*敲除或insulin growth factor刺激),活化型 β -catenin感染的HSC可在体外持续长期生长,细胞数量可扩增为原来的100倍以上。而活化型 β -catenin单独过表达多引起HSC分化的阻止、自我更新能力的丧失和凋亡^[56-57]。最近的研究发现,Wnt信号通路对HSC自我更新具有强度差异效应^[58]。Luis等^[59]用携带*Apc*基因的特定等位突变基因的小鼠模型的方法,发现2倍于正常水平的Wnt/ β -catenin的信号活性可明显促进HSC的自我更新和造血重建,大于4倍正常水平的Wnt/ β -catenin的信号活性将促进HSC向粒细胞祖细胞分化,而进一步增加Wnt/ β -catenin的信号活性将促进HSC向T淋巴祖细胞的分化,更高活性的Wnt/ β -catenin的信号将诱导细胞死亡^[58]。所以,Wnt/ β -catenin信号的过度活化将严重损伤HSC的自我更新。其可能机制为:(1)通过提高Cyclins E1和E2的表达和降低CDK抑制激酶p21^{kip/waf}的表达而诱导HSC进入细胞周期,使得长效HSC由于过度增殖而耗尽^[57];(2)诱导Caspase 3和Caspase 9介导的内源性凋亡通路的激活^[60]。

值得注意的是,HSC的自我更新是一种受多种信号共同调节的综合结果。其中部分信号可能通过持续活化而维持HSC的数量;但另一部分信号可能只有在HSC扩增时才活化,这种瞬间活化的信号促进HSC增殖,可能在造血重建中起关键作用。但这种信号的持续和过度活化不但不利于HSC的自我更新,反而会由于过度增殖而引起HSC耗竭。Wnt/ β -catenin信号有可能就是这种需要瞬间活化信号的代表。我们推测,Wnt/ β -catenin信号活化的时间和强度差异在调节HSC的自我更新中起了至关重要的作用,周期性和节律性的恰当强度的Wnt/ β -catenin信号可能是促进HSC扩增的关键。而这种信号的瞬间效应在以往的研究中被忽视。

4 Wnt信号通路与造血微环境中其他信号通路

HSC通常被认为处在一个由特殊的细胞(Niche细胞)或基质成分组成的特区——造血微环境(Niche)中^[61]。在这种特区中,Niche细胞通过黏附分子和膜表面信号分子与HSC直接接触或通过分泌细胞因子等刺激HSC中信号的活化,从而调节HSC的

自我更新、增殖、分化和生存等细胞生物学行为。Niche中大量的信号通路如Notch、PGE2、BMP、Pten/PI3K/Akt等与Wnt信号通路一起共同维持着造血平衡^[62]。

4.1 Notch与Wnt信号

Notch和Wnt信号相互作用共同参与调节HSC的产生和维持^[61]。Notch是一个高度保守的信号通路,在多种系统中参与维持细胞的多样性与分化。在造血系统中,Notch信号通过抑制粒/单核细胞的分化和促进T-细胞和红细胞的分化,从而调节造血细胞的多样性。Notch信号的完全抑制将引起HSC向粒细胞分化的增加而导致粒细胞增生性疾患的发生。Notch信号的过度活化将导致T-细胞分化的增加和T-细胞白血病的发生。由于目前所用的体外HSC培养体系多为粒细胞祖细胞的扩增体系,通常不支持T-细胞的扩增,所以在这种培养体系中,活化的Notch信号多可支持粒细胞祖细胞甚至HSC的大量扩增^[63-64]。

研究表明,Wnt和Notch信号在造血调控中相互作用和相互调节。斑马鱼中的造血研究显示,Wnt信号位于Notch信号的上游,两个信号均为AGM造血形成所必需。研究表明,Wnt16信号分子激活Notch配体delta-C和delta-D的表达,从而激活Notch信号通路^[19]。这种Wnt调节Notch的上下游关系在小鼠骨髓HSC中也得到了证实^[65]。这一研究结果很好地说明了在不同的时间段,依次出现的不同信号通路Wnt和Notch联合起来最终影响了HSC的特异性^[66]。

4.2 PGE2与Wnt信号

前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)是一种不饱和脂肪酸,由环氧合酶(cyclooxygenase, COX)在炎症刺激下合成,具有多种生理活性。PGE2能抑制髓系祖细胞分化,促进红系祖细胞增生,对造血系统有着重要的调节作用^[67]。最近的研究表明,PGE2对HSC也具有重要的影响,包括可提高HSC在移植过程中的归巢、存活和增殖能力以及提高HSC的长期再植能力和竞争再植频率,从而提高HSC移植的成功率等^[68-69]。与Notch通路相似的是,斑马鱼的研究同样揭示了PGE2和Wnt信号通路在造血发生中的关联^[70]。研究表明,PGE2调节脊椎动物HSC的发生和扩增^[71]。Goessling等^[70]用斑马鱼模型研究发现,对PGE2合成的抑制会造成Wnt信号通路的阻断,并且发现PGE2通过cAMP/PKA机制磷酸化 β -catenin,从

而激活Wnt信号通路。不仅如此,他们在小鼠的HSC以及其他类型的组织干细胞中也发现PGE2和Wnt有同样的关联。

4.3 BMP与Wnt信号

BMP信号是调控胚胎造血发育的重要信号通路之一。研究表明,在胚胎干细胞造血分化过程中,BMP信号首先诱导中胚层的发生,然后通过激活Wnt信号和Cdx-Hox通路促进造血发生^[72]。Wang等^[73]利用KDR(Flk1)和PDGFR α 这两个造血分化过程的标记物发现,BMP抑制剂可消除Wnt3a对胚胎干细胞产生血管生成细胞的刺激,且Wnt抑制剂同样对BMP4诱导形成血管生成细胞具有抑制作用。最近,Nostro等^[74]和Singbrant等^[75]发现,BMP信号通过转录因子SMAD调控转录并与Wnt信号通路共同作用于生物体的发育过程。研究显示,造血系统急性损伤后的再生依赖于BMP和Wnt信号通路的激活,这两条信号通路的下游转录因子SMAD1和TCF共同结合并调节造血发生相关基因及红系分化基因的表达,因此BMP和Wnt信号在造血发生和分化过程中共同发挥作用^[76]。

4.4 Pten/PI3K/Akt与Wnt信号

Pten/PI3K/Akt是维持正常的造血发生的关键信号通路之一。在造血组织中条件性剔除Pten引起PI3K/Akt信号异常活化,从而导致HSC活化、增殖和外周动员,最终耗尽HSC^[77]。Perry等^[78]利用一种细胞特异性条件诱导的方法,在小鼠造血干/祖细胞同时剔除Pten并激活 β -catenin基因,结果发现,这种双突变小鼠的长效HSC明显扩增,其机制是诱导长效HSC增殖、抑制凋亡和阻断分化,表明Pten/PI3K/Akt和Wnt/ β -catenin这两条信号通路对HSC的自我更新和扩增具有联合作用。此外,骨髓微环境极低的营养供应对维持HSC的静息状态和自我更新是十分重要的^[79]。因此,一些对营养敏感的信号通路如Lkb1和mTOR等在HSC的造血发生过程中是十分重要的^[80-81]。Huang等^[52]通过抑制mTOR信号通路同时激活Wnt/ β -catenin信号,在体外无血清培养条件下可以维持小鼠和人的长效HSC,并在小鼠体内增加长效HSC的数量。

造血微环境是一个调控HSC自我更新和扩增等功能的巨大复杂的调控枢纽,Wnt信号通路与其中的多种信号通路、调节分子在造血平衡中具有相互协同作用,这或许能为研究造血因子对于HSC的自

我更新提供新的参考。

5 非经典Wnt信号通路和HSC

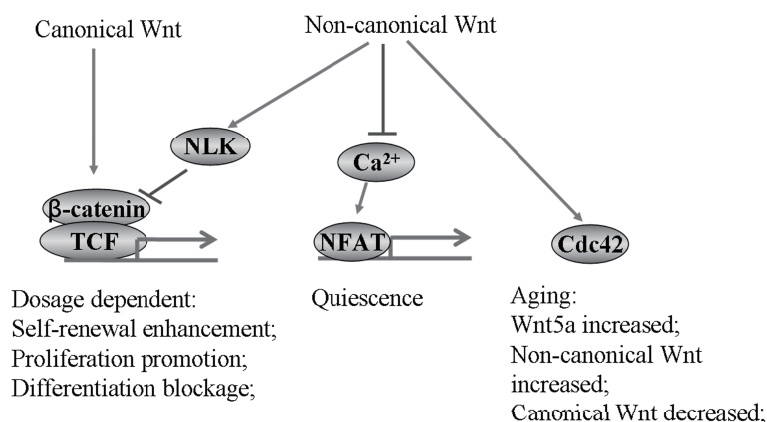
非经典Wnt信号通路在维持造血干细胞的静息和造血重建等方面同样发挥着不可替代的作用。最近,Sugimura等^[20]研究发现,在成骨Niche细胞(N-cadherin⁺的梭型成骨细胞)中表达和分泌包括Wnt5a和Wnt5b在内的多个非经典Wnt分子,而在静止的HSC中表达较高水平的非经典Wnt受体Fz8。非经典的Wnt分子通过Fz8受体抑制经典的Wnt/ β -catenin和Ca²⁺-NFAT-IFN γ /Cox2信号,在维持HSC的静息状态和功能的动态平衡中起着重要的作用。非经典Wnt信号可能通过抑制Cdc42-Pak1-CK1信号通路而阻断NFAT进入细胞核抑制其转录活性。另一个7次穿膜蛋白受体分子Flamingo(Fmi)定位于静止的HSC和Niche细胞的黏附界面之间,通过调节Fz8在HSC和N-cadherin⁺成骨细胞中的亚细胞定位,使HSC中的Fz8靠近Niche细胞,然后被Niche细胞分泌的非典型Wnt分子激活。所以,敲除Fmi或Fz8均可促进静止型HSC进入细胞周期,损伤HSC的造血重建功能。

Povinelli等^[21]发现,Wnt5a通过Ryk受体调节HSC静息和造血重建。Ryk通过结合Wnt通路Wnt5a配体而调节Wnt5a与HSC之间的应答,而抑制Ryk的活性则能阻断Wnt5a诱导HSC静息和提高短效HSC和长效HSC的造血重建能力。此外,Wnt5a抑制活性氧的产生也受Ryk的调控,提示Wnt5a-Ryk信号可能是通过抑制活性氧而发挥其对HSC的调控作用。

6 经典和非经典Wnt信号通路在HSC中的相互作用

经典Wnt信号和非经典Wnt信号在HSC调控中通过相互拮抗而调节造血的动态平衡。通常认为,经典的Wnt/ β -catenin通过调节增殖和自我更新基因的表达而发挥作用,表现为提高细胞自我更新能力、促进细胞增殖和阻隔分化作用;而非经典的Wnt信号通过NLK与TCF/ β -catenin复合物的相互作用来参与经典Wnt信号的调节。NLK的磷酸化激活对TCF/LEF1的转录活性具有明显的抑制作用^[82]。此外,非经典通路的Ca²⁺能通过NFAT调节HSC静息状态^[37](图3)。

最新的研究显示,经典Wnt信号和非经典Wnt信号的活性在HSC衰老过程中发生了转换^[83]。Baumann^[84]和Florian等^[85]发现,衰老小鼠HSC细胞中由



TCF: T细胞因子; NLK: Nemo样激酶; Ca^{2+} : 钙离子; NFAT: 活化T细胞核因子; Cdc42: 细胞分裂周期蛋白。

TCF: T cell factor; NLK: Nemo like kinase; Ca^{2+} : calcium ion; NFAT: nuclear factor of activated T cells; Cdc42: cell division cycle 42.

图3 经典和非经典Wnt信号对HSC的作用和联系

Fig.3 Effect and interaction of canonical and non-canonical Wnt signaling pathways on HSC

于Wnt5a的mRNA表达和蛋白含量显著升高,从而导致非经典Wnt信号通路激活,而经典Wnt信号通路活性明显下降。这种由经典Wnt信号向非经典Wnt信号活性的转化调节了HSC的衰老过程。用Wnt5a处理年轻HSC后发现,Wnt5a能抑制 β -catenin的表达,且通过激活非经典Wnt通路中小分子Rho GTP酶Cdc42诱发HSC衰老,减弱HSC的再生能力并引发类似于髓系分化增加而淋巴系细胞分化减少的衰老现象。因此,Wnt5a-Cdc42信号在HSC衰老中具有诱导作用。Wnt5a^{+/+}(杂合子敲除)小鼠中,由于非经典Wnt信号的降低,HSC的衰老减缓,且B细胞数量增多;在衰老的HSC中抑制Wnt5a表达后可使衰老HSC重新恢复活力,B细胞分化增加而髓细胞分化明显减少^[83]。

对经典与非经典Wnt信号通路在HSC中的转化机制研究,不仅为Wnt信号通路在HSC功能的研究上提供了新的视野,而且也为HSC的衰老研究提供了新的参考^[86]。同时,由于在HSC衰老中的作用,我们或许可以进一步推测,经典与非经典Wnt信号通路在HSC中的转化可以为HSC的自我更新、扩增和白血病的治疗提供新的研究方向。

7 展望

综上所述,Wnt信号通路在胚胎早期的造血形成过程中起着至关重要的作用,在成年造血中,Wnt信号通路可以促进HSC增殖并维持HSC功能,且这种作用具有明显的强度差异效应。Wnt信号通路在骨髓Niche中与其他信号通路共同调控造血发生和发育,表明Wnt信号通路是细胞内一个复杂的、多

作用位点的调控网络。其中,Notch和Wnt信号在体外HSC扩增中的作用值得进一步研究。已知,多种体外因子及体内固有的转录因子通过不同信号调控包括增殖、分化和生存在内的多种HSC的细胞生物学行为,而HSC自我更新能力是各种细胞生物学行为的综合结果。作为其中的关键信号通路,Wnt信号通路的研究将有助于我们深入了解HSC自我更新及扩增的分子调控机制,为临床解决HSC来源短缺的难题提供新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: Clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Ann Rev Med* 2005; 56: 509-38.
- 2 Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(5): 547-53.
- 3 Kokolus K, Nemeth MJ. Non-canonical Wnt signaling pathways in hematopoiesis. *Immunol Res* 2010; 46(1/2/3): 155-64.
- 4 Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(8): 581-93.
- 5 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17(1): 9-26.
- 6 Seke Etet PF, Vecchio L, Bogne Kanga P, Nchiwan Nukenine E, Krampera M, Nwabo Kamdje AH. Normal hematopoiesis and hematologic malignancies: Role of canonical Wnt signaling pathway and stromal microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1835(1): 1-10.
- 7 Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 27-36.
- 8 Pathy L. The WIF module. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(1): 12-

- 3.
- 9 Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 2004; 119(1): 97-108.
- 10 Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A, Arenas E. Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 4): 586-95.
- 11 Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, *et al.* Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 2011; 20(2): 163-76.
- 12 Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 2006; 4(4): e115.
- 13 de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, *et al.* Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 2011; 476(7360): 293-7.
- 14 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449(7165): 1003-7.
- 15 Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, Harland RM. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 2000; 405(6782): 81-5.
- 16 van Den Berg DJ, Sharma AK, Bruno E, Hoffman R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood* 1998; 92(9): 3189-202.
- 17 Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, *et al.* Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003; 4(5): 349-60.
- 18 Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, *et al.* Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 2000; 13(1): 15-24.
- 19 Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature* 2011; 474(7350): 220-4.
- 20 Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, *et al.* Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* 2012; 150(2): 351-65.
- 21 Povinelli BJ, Nemeth MJ. Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells* 2014; 32(1): 105-15.
- 22 Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, *et al.* Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3): 274-83.
- 23 Schaniel C, Sirabella D, Qiu J, Niu X, Lemischka IR, Moore KA. Wnt-inhibitory factor 1 dysregulation of the bone marrow niche exhausts hematopoietic stem cells. *Blood* 2011; 118(9): 2420-9.
- 24 Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 13): 2627-34.
- 25 Schreck C, Bock F, Grziwotk S, Oostendorp RA, Istvanffy R. Regulation of hematopoiesis by activators and inhibitors of Wnt signaling from the niche. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1310(1): 32-43.
- 26 Krause U, Ryan DM, Clough BH, Gregory CA. An unexpected role for a Wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1093.
- 27 Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling. *Gene* 2003; 302(1/2): 179-83.
- 28 Ng RC, Matsumaru D, Ho AS, Garcia-Barcelo MM, Yuan ZW, Smith D, *et al.* Dysregulation of Wnt inhibitory factor 1 (Wif1) expression resulted in aberrant Wnt-beta-catenin signaling and cell death of the cloaca endoderm, and anorectal malformations. *Cell Death Differ* 2014; 21(6): 978-89.
- 29 Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16(13): 3797-804.
- 30 Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(1): a007898.
- 31 Macdonald BT, Semenov MV, He X. SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell* 2007; 131(6): 1204.
- 32 Yasuda J, Yokoo H, Yamada T, Kitabayashi I, Sekiya T, Ichikawa H. Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kappaB. *Cancer Sci* 2004; 95(1): 52-7.
- 33 Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 14): 3117-29.
- 34 Li J, Sutter C, Parker DS, Blauwkamp T, Fang M, Cadigan KM. CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *EMBO J* 2007; 26(9): 2284-94.
- 35 Daniels DL, Weis WI. ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell* 2002; 10(3): 573-84.
- 36 Baba Y, Yokota T, Spits H, Garrett KP, Hayashi SI, Kincade PW. Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J Immunol* 2006; 177(4): 2294-303.
- 37 Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet*: TIG 2000; 16(7): 279-83.
- 38 Lento W, Congdon K, Voermans C, Kritzik M, Reya T. Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(2).
- 39 Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: Advances and questions. *Development* 2011; 138(6): 1017-31.
- 40 Corrigan PM, Dobbin E, Freeburn RW, Wheadon H. Patterns of Wnt/Fzd/LRP gene expression during embryonic hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 2009; 18(5): 759-72.
- 41 Cheng X, Huber TL, Chen VC, Gadue P, Keller GM. Numb mediates the interaction between Wnt and Notch to modulate primitive erythropoietic specification from the hemangioblast. *Development* 2008; 135(20): 3447-58.
- 42 Tran HT, Sekkali B, van Imschoot G, Janssens S, Vleminckx K. Wnt/beta-catenin signaling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(37): 16160-5.
- 43 Tarafdar A, Dobbin E, Corrigan P, Freeburn R, Wheadon H. Canonical Wnt signaling promotes early hematopoietic progenitor formation and erythroid specification during embryonic stem cell

- differentiation. PLoS One 2013; 8(11): e81030.
- 44 Luis TC, Weerkamp F, Naber BA, Baert MR, de Haas EF, Nikolic T, *et al.* Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. Blood 2009; 113(3): 546-54.
 - 45 Ruiz-Herguido C, Guiu J, D'Altri T, Ingles-Esteve J, Dzierzak E, Espinosa L, *et al.* Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/beta-catenin activity. J Exp Med 2012; 209(8): 1457-68.
 - 46 Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: Expansion of multilineage progenitor cells. Blood 1997; 89(10): 3624-35.
 - 47 Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature 2003; 423(6938): 409-14.
 - 48 Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature 2003; 423(6938): 448-52.
 - 49 Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, *et al.* Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells *in vivo*. Cancer Cell 2007; 12(6): 528-41.
 - 50 Trowbridge JJ, Xenocostas A, Moon RT, Bhatia M. Glycogen synthase kinase-3 is an *in vivo* regulator of hematopoietic stem cell repopulation. Nat Med 2006; 12(1): 89-98.
 - 51 Ko KH, Holmes T, Palladinetti P, Song E, Nordon R, O'Brien TA, *et al.* GSK-3beta inhibition promotes engraftment of *ex vivo*-expanded hematopoietic stem cells and modulates gene expression. Stem Cells 2011; 29(1): 108-18.
 - 52 Huang J, Nguyen-McCarty M, Hexner EO, Danet-Desnoyers G, Klein PS. Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. Nat Med 2012; 18(12): 1778-85.
 - 53 Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJ, MacDonald HR, Kemler R, *et al.* Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. J Exp Med 2004; 199(2): 221-9.
 - 54 Koch U, Wilson A, Cobas M, Kemler R, Macdonald HR, Radtke F. Simultaneous loss of beta- and gamma-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. Blood 2008; 111(1): 160-4.
 - 55 Jeannot G, Scheller M, Scarpellino L, Duboux S, Gardiol N, Back J, *et al.* Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. Blood 2008; 111(1): 142-9.
 - 56 Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. Nat Immunol 2006; 7(10): 1048-56.
 - 57 Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, *et al.* Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. Nat Immunol 2006; 7(10): 1037-47.
 - 58 Luis TC, Naber BA, Roozen PP, Brugman MH, de Haas EF, Ghazvini M, *et al.* Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. Cell Stem Cell 2011; 9(4): 345-56.
 - 59 Robanus-Maandag EC, Koelink PJ, Breukel C, Salvatori DC, Jagmohan-Changur SC, Bosch CA, *et al.* A new conditional Apc-mutant mouse model for colorectal cancer. Carcinogenesis 2010; 31(5): 946-52.
 - 60 Ming M, Wang S, Wu W, Senyuk V, Le Beau MM, Nucifora G, *et al.* Activation of Wnt/beta-catenin protein signaling induces mitochondria-mediated apoptosis in hematopoietic progenitor cells. J Biol Chem 2012; 287(27): 22683-90.
 - 61 Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, *et al.* Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann N Y Acad Sci 2007; 1106: 64-75.
 - 62 Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. Blood 2008; 111(2): 492-503.
 - 63 Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. Nat Med 2000; 6(11): 1278-81.
 - 64 Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. Blood 2002; 99(7): 2369-78.
 - 65 Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, *et al.* Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. Nat Immunol 2005; 6(3): 314-22.
 - 66 Loeffler D, Kokkaliaris KD, Schroeder T. Wnt to notch relay signaling induces definitive hematopoiesis. Cell Stem Cell 2011; 9(1): 2-4.
 - 67 Pelus LM. Association between colony forming units-granulocyte macrophage expression of Ia-like (HLA-DR) antigen and control of granulocyte and macrophage production. A new role for prostaglandin E. J Clin Invest 1982; 70(3): 568-78.
 - 68 Pelus LM, Hoggatt J, Singh P. Pulse exposure of haematopoietic grafts to prostaglandin E2 *in vitro* facilitates engraftment and recovery. Cell Prolif 2011; 44 Suppl 1: 22-9.
 - 69 Pelus LM, Hoggatt J. Pleiotropic effects of prostaglandin E2 in hematopoiesis; prostaglandin E2 and other eicosanoids regulate hematopoietic stem and progenitor cell function. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2011; 96(1/2/3/4): 3-9.
 - 70 Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, *et al.* Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. Cell 2009; 136(6): 1136-47.
 - 71 North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, *et al.* Prostaglandin E2 regulates vertebrate hematopoietic stem cell homeostasis. Nature 2007; 447(7147): 1007-11.
 - 72 Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, *et al.* BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. Cell Stem Cell 2008; 2(1): 72-82.
 - 73 Wang Y, Umeda K, Nakayama N. Collaboration between WNT and BMP signaling promotes hemoangiogenic cell development from human fibroblast-derived iPS cells. Stem Cell Res 2010; 4(3): 223-31.
 - 74 Nostro MC, Cheng X, Keller GM, Gadue P. Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. Cell Stem Cell 2008; 2(1): 60-71.
 - 75 Singbrant S, Karlsson G, Ehinger M, Olsson K, Jaako P, Mi-harada K, *et al.* Canonical BMP signaling is dispensable for hematopoietic stem cell function in both adult and fetal liver

- hematopoiesis, but essential to preserve colon architecture. *Blood* 2010; 115(23): 4689-98.
- 76 Trompouki E, Bowman TV, Lawton LN, Fan ZP, Wu DC, DiBiase A, *et al.* Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration. *Cell* 2011; 147(3): 577-89.
 - 77 Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, *et al.* PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 2006; 441(7092): 518-22.
 - 78 Perry JM, He XC, Sugimura R, Grindley JC, Haug JS, Ding S, *et al.* Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev* 2011; 25(18): 1928-42.
 - 79 Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, *et al.* The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 380-90.
 - 80 Gurumurthy S, Xie SZ, Alagesan B, Kim J, Yusuf RZ, Saez B, *et al.* The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 2010; 468(7324): 659-63.
 - 81 Gan B, Hu J, Jiang S, Liu Y, Sahin E, Zhuang L, *et al.* Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* 2010; 468(7324): 701-4.
 - 82 Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23(4): 1379-89.
 - 83 Florian MC, Nattamai KJ, Dorr K, Marka G, Uberle B, Vas V, *et al.* A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature* 2013; 503(7476): 392-6.
 - 84 Baumann K. Stem cells: A WNT switch to ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(12): 752.
 - 85 Florian MC, Dorr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, *et al.* Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5): 520-30.
 - 86 Verovskaya E, de Haan G. Noncanonical Wnt comes of age in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 642-3.