

## 领域前沿 · 中国



刘峰, 中国科学院动物研究所研究员, 1999年毕业于中国科学院遗传研究所, 获理学博士学位。2000年至2008年分别在新加坡国立大学、美国范德堡大学医学院和英国牛津大学分子医学研究所, 利用斑马鱼和非洲爪蟾等模式动物进行血液和血管发育的基础研究。2009年入选中国科学院“百人计划”并加入中国科学院动物研究所, 任研究员。刘峰研究员主要从事血液系统发育研究, 尤其关注血液与心血管干细胞/前体细胞的形成、造血干细胞命运决定、维持及分化等。刘峰研究组首次阐释RNA甲基化修饰调控胚胎期造血干细胞发育的分子机制; 证实了Notch信号动态变化的必要性, 鉴定了多个在造血干细胞命运决定、产生和分化过程中的关键因子, 揭示了微环境的重要作用。现已在Nature、Dev Cell、EMBO J、PNAS、J Exp Med、Blood、Nat Commun、Cell Res和Development等刊物发表论文40余篇。其研究成果多次受到国际著名科学家的高度评价并被F1000重点评述和推荐。刘峰研究员还担任国际斑马鱼学会执行委员、中国动物学会斑马鱼分会主任委员、发育生物学专业委员会副主任委员兼任秘书长等社会职务。

## 胚胎期造血干细胞发育的分子调控

马东媛 王璐 薛媛媛 刘峰\*

(中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 造血干细胞是生物体所有血细胞的原始祖细胞, 在维持血液系统长期稳定的同时, 也是骨髓移植治疗恶性血液疾病的核心所在。因此, 造血干细胞的体内发育和体外诱导扩增一直是倍受科学界关注的热点课题。该研究组以小鼠和斑马鱼为模型, 从遗传调控和表观遗传修饰等角度阐释造血干细胞产生、维持和定向分化的分子调控机制; 同时, 揭示微环境在血液发生不同阶段的特异性调控作用。

**关键词** 造血干细胞发育; 信号通路; 微环境; 表观遗传

## Molecular Regulation of Hematopoietic Stem Cell during Embryogenesis

Ma Dongyuan, Wang Lu, Xue Yuanyuan, Liu Feng\*

(State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

国家自然科学基金(批准号: 31425016、81530004、31370030、31401242、31271570、30971678、31000647)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2016YFA0100500、2010CB945300、2011CB943900)和中国科学院干细胞与再生医学战略性先导科技专项(批准号: XDA0101011)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-64807307, E-mail: liuf@ioz.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31425016, 81530004, 31370030, 31401242, 31271570, 30971678, 31000647), the National Basic Research Program of China (Grant No.2016YFA0100500, 2010CB945300, 2011CB943900) and the Strategic Priority Research Program of the CAS (Grant No.XDA0101011)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64807307, E-mail: liuf@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2017-12-04 12:16:06 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171204.1215.020.html>

**Abstract** Hematopoietic stem cells (HSCs) are capable of both self-renewal and differentiation into all types of blood lineages to sustain hematopoiesis during adulthood. Although HSC transplantation is widely used to treat severe hematological diseases in clinic, there are still some limits regarding the source of HSCs and related issues. Therefore, a better understanding of HSC development and its regulation will certainly contribute to improve the efficacy of HSC transplantation to treat patients. Using zebrafish and mouse as models, our group has been long investigating the regulatory mechanisms underlying HSC emergence, maintenance and lineage differentiation, which will provide some useful insights to *in vitro* generation and expansion of HSCs for clinical use in the near future.

**Keywords** hematopoietic stem cell; signaling; microenvironment; epigenetics

## 1 造血干细胞研究背景

对于血细胞起源的探究始于二十世纪初期,然而直到2010年,来自荷兰、美国和法国的三个研究组分别以小鼠和斑马鱼为模型,才证实造血干细胞是通过内皮-造血转化过程产生的<sup>[1-3]</sup>。随后,调控该过程的一系列关键转录因子和信号通路陆续被发现<sup>[4-5]</sup>。在人、小鼠和斑马鱼等脊椎动物中,血液发生是一个保守的生物学过程。胚胎期造血干细胞产生于主动脉-性腺-中肾区,随后迁移到胎肝(小鼠和人)或尾部造血组织(斑马鱼)进行扩增,进而迁移至胸腺向淋系细胞分化,最后迁移至骨髓(小鼠和人)或骨髓(斑马鱼)以维持终生造血<sup>[6]</sup>。从分子水平来看,血液发生是由遗传因素和表观遗传因子协同介导的一个多步骤、多部位的动态发育过程,其关键调控要素既包括转录因子、表观修饰蛋白以及miRNA,也涉及血液流动、炎症信号和内皮细胞等微环境因素。在临床恶性血液疾病治疗时,造血干细胞是骨髓移植术的核心组分,然而,其来源匮乏一直是制约血液疾病治疗的瓶颈。因此,探索造血干细胞的体内发育机制以及建立体外诱导扩增方案便成为当今科学界的研究热点。

## 2 胚胎期造血干细胞发育的关键因子

真核生物mRNA的修饰及其功能受到广泛关注,其中,N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>6</sup>-methyl-ade-nosine, m<sup>6</sup>A)依赖的RNA甲基化是最常见、最丰富的修饰形式之一。近年来,m<sup>6</sup>A在斑马鱼早期发育、果蝇性别决定以及T细胞稳态等发育过程中的作用逐渐被揭示,但其在血液发生中的作用却甚少被报道。我们通过m<sup>6</sup>A测序技术、RNA-Seq以及基因敲降或敲除的表型分析发现,m<sup>6</sup>A修饰水平下降后,造血干细胞不能正常产生,血管的内皮特性却明显增强;与此同时,一系列动脉内皮发育相关的基因表达发生变化,尤

其是*notch1a*显著升高。单碱基分辨率m<sup>6</sup>A-miCLIP-Seq以及YTHDF2-RIP-Seq综合分析发现,m<sup>6</sup>A通过YTHDF2介导了*notch1a*的稳定性以维持内皮细胞和造血细胞基因表达的平衡,进而调控造血干细胞的命运决定<sup>[7]</sup>。特别需要强调的是,Notch信号在血管和血液发生中是动态变化的;我们首次通过实验证实,造血干细胞发育过程中并不是一直需要Notch信号,尤其是在内皮-造血转化过程中,Notch信号需要下调<sup>[8]</sup>。除了Gpr183-Arrb1-Nedd4对Notch1的负向调节,我们还发现,BLOS2与Notch1结合并介导其进入内体-溶酶体降解途径,而转录共抑制子Ncor2通过Fos-Vegfd调控Notch信号活性,进而调控造血干细胞产生或维持<sup>[9-11]</sup>。

在胚胎期造血干细胞发育过程中,ERK信号也是剂量依赖的,并被多因素动态协同调控。内皮细胞中Smad1/5通过招募HDAC1对ERK的抑制作用有利于造血干细胞产生,过量的ERK1/2会使得动脉内皮特性以及内皮细胞间的紧密连接增强,导致内皮-造血细胞的转化过程受到抑制<sup>[12]</sup>。我们还通过ChIP-PCR、萤光素酶报告系统以及基因敲除后的表型分析等实验证实,ETS家族转录因子Fev(又称为Pet1)可以直接结合*erk*启动子区并调控其表达,以便维持ERK的水平,进而促进造血干细胞产生<sup>[13]</sup>。此外,Fev还通过*tph2*控制5-羟色胺(5-HT)合成,进而影响5-HT神经元的分化及维持。在此基础上,我们发现,Fev/Pet1、Tph2和AAAD等参与5-HT合成的重要转录因子和合成酶在AGM区内皮细胞和间充质细胞中均有表达。在内皮细胞特异性缺失*tph2*(*vec-cre;tph2<sup>fl/fl</sup>*)的小鼠胚胎中,AGM区内皮细胞中的5-HT水平下降,造血簇大小和数目显著降低,造血干细胞发育异常。我们还意外地发现,在*tph2<sup>-/-</sup>*和*pet1-cre;tph2<sup>fl/fl</sup>*胚胎中,AGM区造血簇数量是正常的。这是因为,Shh-Nkx2.2-Lmx1b-Pet1通路因负反馈调控而上调,ERK信号被

激活, 造血干细胞增殖加快, 进而使得完全缺失 $tph2$ 的胚胎中造血发育缺陷得到恢复<sup>[14]</sup>。

在造血干细胞分化阶段, 我们发现, 转录因子Irf4对淋系细胞的命运决定至关重要。Irf4直接调控趋化因子受体Ccr9a, 促进淋系细胞归巢; 同时, Irf4也可以直接抑制 $pu.1$ 表达, 阻止前体细胞向髓系分化<sup>[15]</sup>。转录因子Foxn1通过调节胸腺上皮细胞发育而为T淋巴细胞分化和成熟提供所需的微环境<sup>[16]</sup>。在红细胞成熟阶段, 我们证实, KLF家族的转录因子 $klf3$ 和 $klf6$ 是关键性的调控基因<sup>[17]</sup>。

### 3 胚胎期造血干细胞发育的微环境

造血干细胞的发育不仅需要内源转录因子和关键蛋白的精密调控, 同时也受周围环境的影响。随着发育的进程, 造血干细胞由其产生部位主动脉-性腺-中肾区域迁移至胎肝或尾部造血组织, 最后到达骨髓或肾髓, 每个阶段所处的不同微环境都有其特定的作用。对于造血干细胞而言, 微环境既包括干细胞周围的其他细胞群体(例如: 内皮细胞、间充质细胞、成骨及破骨细胞等), 也包含血液流动剪切力、氧气浓度和温度等一系列生物物理性因素。

研究表明, 血液流动的机械力可以通过一氧化氮(NO)信号通路促进生血内皮产生造血干细胞<sup>[18]</sup>。我们的研究工作进一步揭示, 内皮细胞中存在一个重要的响应血液流动剪切力的转录因子Klf2a, Klf2a直接调控一氧化氮合成酶基因的表达, 进而调控NO在体内的含量。这一发现深入阐释了血液流动调控造血干细胞产生的新机制<sup>[19]</sup>。众所周知, 炎症信号参与机体病理和应激反应; 而在生理状态下, 我们发现, 炎症信号TLR4-Myd88-NF $\kappa$ B通路对胚胎期造血干细胞的产生也有重要作用, TLR4缺失导致的造血缺陷表型是由Notch信号介导的<sup>[20]</sup>。血管内皮不仅是造血干细胞的来源, 同时也为造血干细胞的迅速扩增和分化提供了必要条件。我们利用斑马鱼体外发育和早期胚胎透明的优势, 实时观察造血干细胞与血管内皮细胞的相互作用。通过功能实验揭示, 斑马鱼尾部血管内皮细胞是造血干细胞必要的微环境, 并且通过Klf6a-Ccl21通路有效促进造血干细胞的扩增<sup>[21]</sup>。

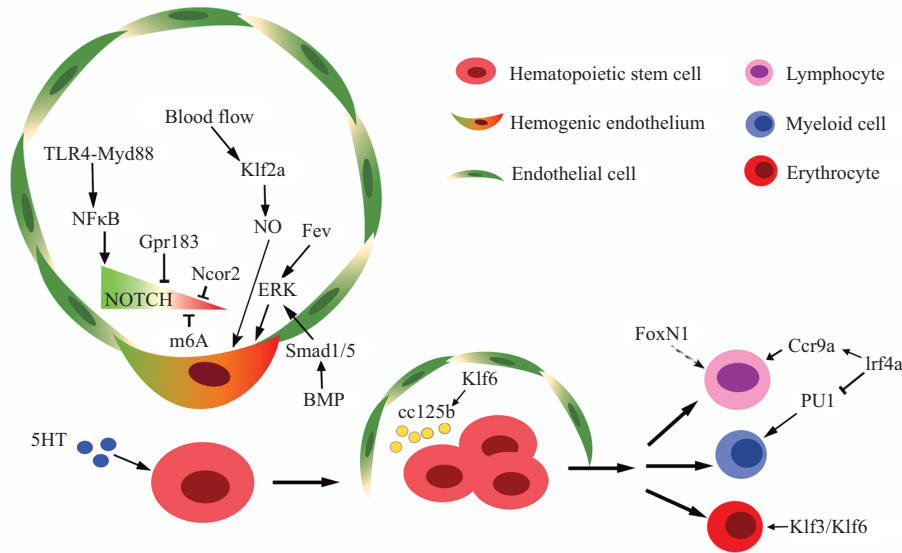
### 4 造血干细胞研究展望

综上所述, 基于小鼠和斑马鱼等模式动物的研

究基本阐释了脊椎动物血液发生的过程, 并从分子水平初步揭示了其调控机制, 包括: 重要的转录因子、表观修饰蛋白、信号通路以及微环境等(图1)。此后, 随着单细胞测序、高灵敏性染色质免疫共沉淀(STAR ChIP-seq)、核染色质转座酶可接近性高通量测序分析(ATAC-seq)、高分辨率全基因组DNaseI超敏位点测序(liDNase-seq)和全基因组甲基化测序(WGBS)等高灵敏和高通量测序方法的开发以及基于CRISPR/Cas或多色荧光的活体示踪技术的应用, 将会帮助科研工作者从更新、更深、更广的角度认识并研究血液发生过程, 更为精确地阐释该过程的动态调控及各系细胞的命运决定和谱系分化, 揭示不同微环境对血液发生各阶段的精密、协同调控。与此同时, 鉴于造血干细胞在临床血液疾病治疗中的重要地位与广阔应用前景, 造血干细胞的体外诱导和扩增仍将是研究热点。更为清晰和准确地认识内源性和外源性因素的协同调控, 也将有助于促进体外造血的早日实现。

### 参考文献 (References)

- Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* 2010; 464(7285): 108-11.
- Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. *In vivo* imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 2010; 464(7285): 116-20.
- Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010; 464(7285): 112-5.
- Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development* 2013; 140(12): 2463-7.
- Clements WK, Traver D. Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(5): 336-48.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008; 132(4): 631-44.
- Zhang C, Chen Y, Sun B, Wang L, Yang Y, Ma D, *et al.* m6A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature* 2017; 549(7671): 273-6.
- Zhang P, He Q, Chen D, Liu W, Wang L, Zhang C, *et al.* G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via Notch1 inhibition. *Cell Res* 2015; 25(10): 1093-107.
- Wei Y, Ma D, Gao Y, Zhang C, Wang L, Liu F. Ncor2 is required for hematopoietic stem cell emergence by inhibiting Fos signaling in zebrafish. *Blood* 2014; 124(10): 1578-85.
- Zhou W, He Q, Zhang C, He X, Cui Z, Liu F, *et al.* BLOS2 negatively regulates Notch signaling during neural and hematopoietic stem



在胚胎期造血干细胞产生过程中, TLR4-Myd88-NFκB通路、RNA甲基化、Gpr183以及Ncor2通过影响Notch信号进行调控, 同时Fev和BMP信号通过ERK信号通路调控; 在造血干细胞维持阶段, 血液流动通过调控Klf2a-NO通路、5-HT及Klf6/ccl25b都参与调控造血干细胞维持及扩增; 在血细胞分化阶段, FoxN1及Irf4a参与造血干细胞向淋系分化, 而Klf3/Klf6影响其向红系分化。

TLR4-Myd88-NFκB, RNA methylation, Gpr183 and Ncor2 are involved in HSC specification via Notch signaling, while Fev and BMP regulate ERK signaling in this process. Blood flow regulates HSC maintenance through the Klf2a-NO cascade, whereas 5-HT and Klf6/ccl25b regulate HSC maintenance as well as expansion. Once HSCs are formed, FoxN1 and Irf4a thereby drive them towards lymphoid differentiation, while Klf3/Klf6 regulates erythroid differentiation.

图1 造血干细胞发育的调控网络

Fig.1 The regulatory network of hematopoietic stem cell (HSC) development during embryogenesis

- and progenitor cell development. *Elife* 2016; 5: doi: 10.7554/eLife.18108.
- 11 He Q, Gao S, Lv J, Li W, Liu F. BLOS2 maintains hematopoietic stem cells in the fetal liver via repressing Notch signaling. *Exp Hematol* 2017; 51: 1-6.e2.
  - 12 Zhang C, Lv J, He Q, Wang S, Gao Y, Meng A, *et al.* Inhibition of endothelial ERK signalling by Smad1/5 is essential for haematopoietic stem cell emergence. *Nat Commun* 2014; 5: 3431.
  - 13 Wang L, Liu T, Xu L, Gao Y, Wei Y, Duan C, *et al.* Fev regulates hematopoietic stem cell development via ERK signaling. *Blood* 2013; 122(3): 367-75.
  - 14 Lv J, Wang L, Gao Y, Ding YQ, Liu F. 5-hydroxytryptamine synthesized in the aorta-gonad-mesonephros regulates hematopoietic stem and progenitor cell survival. *J Exp Med* 2017; 214(2): 529-45.
  - 15 Wang S, He Q, Ma D, Xue Y, Liu F. Irf4 regulates the choice between T lymphoid-primed progenitor and myeloid lineage fates during embryogenesis. *Dev Cell* 2015; 34(6): 621-31.
  - 16 Ma D, Wang L, Wang S, Gao Y, Wei Y, Liu F. Foxn1 maintains thymic epithelial cells to support T-cell development via mcm2 in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(51): 21040-5.
  - 17 Xue Y, Gao S, Liu F. Genome-wide analysis of the zebrafish Klf family identifies two genes important for erythroid maturation. *Dev Biol* 2015; 403(2): 115-27.
  - 18 North TE, Goessling W, Peeters M, Li P, Ceol C, Lord AM, *et al.* Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell* 2009; 137(4): 736-48.
  - 19 Wang L, Zhang P, Wei Y, Gao Y, Patient R, Liu F. A blood flow-dependent klf2a-NO signaling cascade is required for stabilization of hematopoietic stem cell programming in zebrafish embryos. *Blood* 2011; 118(15): 4102-10.
  - 20 He Q, Zhang C, Wang L, Zhang P, Ma D, Lv J, *et al.* Inflammatory signaling regulates hematopoietic stem and progenitor cell emergence in vertebrates. *Blood* 2015; 125(7): 1098-106.
  - 21 Xue Y, Lv J, Zhang C, Wang L, Ma D, Liu F. The vascular Niche regulates hematopoietic stem and progenitor cell lodgment and expansion via klf6a-ccl25b. *Dev Cell* 2017; 42(4): 349-62.e4.