中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)常务所院长, 实验血液学国家重点实验室主任, 北京协和医学院干细胞与再生医学系主任。担任国际实验血液学会理事、中国生理学会血液生理专业委员会主任委员、中国病理生理学会实验血液学专业委员会副主任委员和中国细胞生物学会干细胞生物学分会副会长, 曾经或长期担任*Blood*、*Leukemia*和*Experimental Hematology*等国际杂志编委或副主编。程涛教授是我国造血干细胞生物学的领军学者。针对造血再生这一难题, 围绕造血干细胞数量、质量以及微环境调控进行了长期而系统的研究, 在*Science*、*Nature*及其子刊以及其他专业权威杂志等发表论文200余篇, SCI文章平均影响因子8.5, 学术查引8 800余次, 获授权专利11项, 得到国内外学界高度认可, 同时也推动了我国基础血液学和干细胞生物学的学科发展。

造血干细胞生物学及临床应用研究概况

郝莎* 董芳 胡林萍 程涛*

(实验血液学国家重点实验室, 中国医学科学院血液病医院(血液学研究所), 中国医学科学院干细胞医学中心, 北京协和医学院, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是一类具有自我更新(self-renewal)和多向分化潜能(multi-lineage differentiation)的造血组织干细胞, 通过定向分化产生各系造血祖细胞(如淋系祖细胞和髓系祖细胞等), 再大量增殖分化为各种成熟的功能性血细胞, 从而维持整个机体的稳态造血。HSC是发现最早、研究历史最长、临床应用最为有效且广泛的一类重要的成体组织干细胞。造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)可以治愈某些血液系统及非血液系统疾病, 至今已经历了60余年的发展, 是最经典和成熟的干细胞临床应用方案。因此, HSC的研究和应用奠定了干细胞生物学和再生医学的发展。近些年, 随着相关基础科学和新技术的发展, 一方面为HSC成为基因工程和组织工程的种子细胞提供了更为丰富的理论依据和技术支持, 进而进一步拓展其临床应用; 另一方面, 对HSC生理功能调控及机制的研究也将继续为其他干细胞研究领域提供一个良好的范式。该文就HSC的生物学特性、HSCT的发展、临床应用现状、存在问题及发展前景作一综述。

关键词 造血干细胞; 自我更新; 多向分化; 造血干细胞移植

Biology and Clinical Application Research of Hematopoietic Stem Cells

Hao Sha*, Dong Fang, Hu Linping, Cheng Tao*

(*State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Department of Stem Cell & Regenerative Medicine, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China*)

国家重点研发计划(批准号: 2016YFA010000、2017YFA0103400、2018YFA017801、2015CB64400)、国家自然科学基金创新群体项目(批准号: 81421002)、国家自然科学面上项目(批准号: 81670106)和中国医学科学院创新工程基金(批准号: 2017-I2M-1-015、2016-I2M-1-017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909032, E-mail: haosha@ihcams.ac.cn; chengtao@ihcams.ac.cn

This work was supported by the Grants from the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2016YFA0100600, 2017YFA0103400, 2018YFA17801, 2015CB964400), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81421002, 81670106) and Chinese Academy of Medical Sciences Initiative for Innovative Medicine (Grant No.2017-I2M-1-015, 2016-I2M-1-017)

*Corresponding authors. Tel: +86-22-23909032, E-mail: haosha@ihcams.ac.cn; chengtao@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2019-01-21 10:11:10 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190121.1011.006.html

中国细胞生物学学报

Abstract Hematopoietic stem cell (HSC) have the potential of self-renewal and multi-lineage differentiation into all blood cells, thus maintaining the hematopoiesis homeostasis of the whole body. HSC is one of the most important adult tissue stem cell with the earliest discovery, the longest research history and the most effective clinical applications, which is used to cure many hematological malignancies and nonmalignant disorders. It has been developed for more than 60 years. Therefore, the researches and applications of HSC have laid a foundation for stem cell biology and regenerative medicine. Over the last decade, biotechnological and scientific breakthroughs have revolutionized the field of genetic engineering and tissue engineering, and further expands HSC clinical applications. In the meantime, the study of HSC physiological function and regulation mechanisms will continue to provide a good paradigm for other stem cell research fields. This article reviews the biological characteristics of HSC, the brief history of HSCT, the current situation of HSC clinical applications and the development prospects of HSC.

Keywords hematopoietic stem cell; self-renewal; multi-lineage differentiation; hematopoietic stem cell transplantation

1 造血干细胞及其生物学特性

1.1 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的发现

HSC的发现很大程度上得益于放射生物学的研究手段。20世纪50年代, Jocobson等[1]和Ford等[2]分别在小鼠放射保护的实验中证明了外源输注的骨髓细胞存在髓系和淋系共同祖细胞。到了60年代, 加拿大科学家Till和McCulloch[3]利用经典的脾脏克隆形成单位(CFU-S)实验最早揭示了HSC的自我更新和多向分化潜能。我国学者吴祖泽院士等[4]从70年代开始了放射损伤对造血恢复的研究, 于80年代建立了小鼠造血重建的模型并系统研究了CFU-S对于放射损伤的敏感性及动力学变化。20世纪80年代后期, 借助流式细胞分析、分选技术和单克隆抗体的发展, Weissman实验室等[5]系统报道了小鼠骨髓HSC的免疫表型。随后, 大量工作相继报道了HSC及下游各类祖细胞的表面标志[6-8]。小鼠在造血系统研究中积累的丰富的HSC分化发育的相关数据, 也为研究人类HSC提供了可靠指标。90年代起, Dick实验室较早利用和优化严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠, 系统研究了人HSC的免疫表型和功能[9-10]。这些研究一方面丰富了HSC生物学理论, 另一方面也促进了HSC临床应用, 引领了整个干细胞生物学的发展。

1.2 HSC的生物学特性

HSC最初是一个功能学概念, 主要包括自我更新(self-renewal)和多向分化(multi-lineage differentiation)。稳态下大部分HSC保持静息状态(resting state), 在受到损伤等应急或病理情况下可发生凋亡(apoptosis)。此外, HSC还具有较强的运动迁移(trafficking)功能。为了便于记忆, 我们将上述HSC五个方面的生物学特性归纳为“SMART”特征(图1)。这些特性不仅是HSC在生理情况下必不可少的, 也是临床治疗性HSC乃至多种其他成体干细胞在功能上必须遵循的“金标准”[11]。

1.2.1 *自我更新* HSC自我更新的维持依赖于细胞内源性调控及其所处的造血微环境(niche)中多种成分的外源性调控。经典的Notch、Wnt、TGF、Hedgehog和FGF等信号通路对HSC的发育、分化及自我更新的维持起着重要调节作用。细胞周期调控分子在HSC自我更新中也起着重要介导作用, 如INK4家族成员p18的缺失可显著增强HSC体内自我更新能力, 克服HSC在连续移植中的“耗竭”[12]。此外, 一系列转录因子(如Scl、Gata2、Gfi-1等)可通过不同机制抑制细胞周期以维持HSC的自我更新潜能[13-14]。作为PI3K/AKT通路的效应分子, Foxo家族成员, 尤其是Foxo3a, 主要是通过提高HSC对氧化应激的耐受并启动保护性的自噬, 从而维持HSC静息状态和自我更新[15]。最新的研究表明, Hox家族的HoxB5特异性地表达在纯化的长周期HSC(long term HSC, LT-HSC)上, HoxB5高表达的LT-HSC在体内移植后表现出更强的造血重建和自我更新能力[16]。

HSC的外源性调控主要涉及造血微环境。研究发现, 高表达CD31和血管内皮黏蛋白的H型内皮细胞以及血小板源性生长因子受体b阳性(PDGFRb$^+$)的血管周基质细胞可维持LT-HSC的静息状态, 从机

中国细胞生物学学报

制上讲主要与该类内皮细胞中Notch信号通路的激活相关[17]。同时, 处于骨髓微环境中的巨噬细胞通过表达DARC与LT-HSC表面的CD82结合, 激活下游TGFβ-Smad3信号通路从而抑制LT-HSC的细胞周期进程, 使其维持在静息状态[18]。一方面, 转录因子ATF4可通过上调骨髓微环境中基质细胞和内皮细胞中Angptl3的分泌而维持胚胎期HSC的急剧扩增; 另一方面, ATF4缺失的HSC本身也存在造血重建和自我更新能力的缺陷[19], 这些结果不仅证实了微环境中的细胞成分通过分泌关键细胞因子促进HSC自我更新, 同时也证明了内源性细胞因素与外源性环境因素在调控HSC功能方面的双重交叉作用。此外, 移植前预处理(照射或化疗)也会损伤受体的骨髓微环境, 对移植入的供体HSC产生“旁观者效应(Bystander effect)”, 导致供体HSC植入不良和自我更新能力下降, 其原因主要与微环境中活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的急剧升高有关, 利用药物或者小分子化合物清除过量的ROS可以有效促进外源HSC的植入[20-22]。

1.2.2 多向分化 在经典的HSC分化模型中, HSC的分化是逐级发生的一个过程。LT-HSC处于造血级联的顶端, 能够维持长期(大于6个月)的多谱系造血重建和自我更新。随着自我更新能力的逐渐下降, LT-HSC产生短周期HSC(short term HSC, ST-HSC), 进而再向下分化为不具有长期自我更新能力的多能祖细胞(multi-potent progenitor, MPP)及下游共同髓系祖细胞(common myeloid progenitor, CMP)[6]和共同淋系祖细胞(common lymphoid progenitor, CLP)[7]。这种定向分化的祖细胞可进一步分化产生成熟的功能性血细胞, 包括巨核细胞/血小板、红细胞、单核细胞、粒细胞和淋巴细胞等而维持机体稳态造血。这一“金字塔”式的庞大分化模式受到多种转录因子和细胞因子的调控, 并随机体的机能状态而处于不断的动态变化之中。这一经典的分化模型建立了我们对HSC及造血系统调控的初步认识。

借鉴小鼠HSC造血分化模型的基本认识并得益于免疫缺陷小鼠的不断发展, 人HSC多向分化的“金字塔”体系也已经勾勒的比较清楚。经典的人造血分化模型同样认为, HSC处于造血级联的最顶端, 其下游为具有多谱系分化潜能的MPP[23]。MPP下游具有淋系(包括T、B、NK、DC及部分单核细胞)分化潜能的多潜能淋系祖细胞(MLP)则是人造血分化级联中不同于小鼠的细胞群体。同样, MPP也可以向髓系(CMP和GMP)和巨核红系(megakaryocytic and erythroid progenitor, MEP)分化, 进而产生成熟的粒细胞、红细胞和血小板。在对人胎肝期造血细胞的研究中发现, 从HSC及顺序向下游分化而来的MPP和寡能祖细胞(oligopotent)阶段均具有向多个谱系分化的潜能, 尤其是各阶段的干祖细胞均可向巨核细胞和红细胞分化[10,24]。而成体骨髓阶段, 只有HSC和MPP是具有多谱系分化潜能的, 其下游直接分化为仅具有特定谱系分化能力的单一潜能祖细胞(unipotent)而丧失了寡能祖细胞这一重要阶段。

近年来, 随着实验技术的不断改进, 利用单细胞移植结合细胞表面标记和单细胞测序技术, 传统的“金字塔”等级分化模型不断受到挑战。Muller Sieburg等[25]报道, HSC在移植后其分化谱系有所偏向, 可以根据其分化潜能的倾向性分为偏向髓系的HSC(myeloid-biased HSC)、偏向淋系的HSC(lymphoid-biased HSC)和平衡型的HSC(balance HSC)。Jacobsen等[26]的研究在ST-HSC的下游鉴定出一类偏向淋系分化的多潜能祖细胞(lymphoid-primed multipotent progenitor, LMPP), 该类细胞不能向巨核系和红系细胞分化, 但是可以向CLP和GMP细胞分化, 这也间接地反应出LT-HSC也许可以直接向MEP细胞分化。Nakauchi实验室[27]在2013年发现并报道, LT-HSC可以不经过ST-HSC以及MPP阶段, 直接分化成下游的髓系祖细胞(myeloid-restrcted repopulating progenitor, MyRP)。2016年, Dick实验室[24]通过分离人不同阶段的血细胞, 也提出了新的造血发育模式: 即红系−巨核细胞可不经历中间MPP的发育阶段, 直接来源于HSC。2018年, Nerlov和Jacobsen实验室[28]利用独特的小鼠移植模型, 用荧光素分别标记了红系(Gata1-GFP)和巨核系(Vwf-tdTomato)细胞, 结合单细胞移植, 第一次同时研究HSC在体内向五个谱系发育分化的命运。由此可见, 多个实验室利用各自的实验体系都揭示了HSC的异质性并提出了新的分化模式[29]。

总体来看, HSC的多向分化是其发挥造血重建作用的主要体现, HSCT后增殖和分化的动力学变化及相关调控对最终的移植重建效果具有决定性影响; 另外, HSC分化的偏向性也可用于特殊造血需求下的应急供应, 以应对机体在不同状态下的造血维持。

1.2.3 凋亡和基因组稳定性 由于HSC大部分处于静息状态, DNA受到损伤时无法有效进行DNA同源重组(homologous recombination repair, HR)而采用更加倾向于容易发生错配的非同源末端连接(non-homolgous end jointing, NHEJ)的方式进行DNA修复, 因此, 老化的HSC容易积聚较多突变以致基因组不稳定, 这也是老年血液肿瘤发生率增加的一个重要原因。

p53信号通路下游通过p21和puma两个分子对细胞周期和DNA损伤反应的双向调控, 在HSC应对DNA损伤修复维持功能稳定方面发挥关键作用。p21主要减缓细胞周期进程使发生DNA损伤的细胞进行充分修复, 而puma主要介导无法修复的细胞发生凋亡。puma缺失的小鼠可以抵御致死剂量放射线, 但并不增加肿瘤发生率, 这一点与*p53*基因缺失小鼠模型肿瘤发生显著增加不同, 相关机制的深入研究将为如何在细胞应激损伤条件下维持基因组稳定性带来新的策略[30]。*p53*下游另一靶基因*Gadd45a*(growth arrest and DNA damage 45a)也可通过激活p38MAPK通路诱导并加速LT-HSC终末分化为成熟细胞, 并尽快清除这些细胞从而避免基因组不稳定的LT-HSC恶性转化, Gadd45a缺失对年轻和年老小鼠HSC的影响不尽相同, 反映了Gadd45a在发育不同时期不同环境条件下对HSC生存和稳定性维持作用的复杂性[31]。这不仅利于深入认识在应激状态下HSC凋亡与功能维持的调控网络, 更为临床上衰老相关恶性疾病的救治提供可供选择的策略和靶点。

1.2.4 静息状态 大部分LT-HSC处于细胞周期的G_0期, 即维持在一种静息状态。在感受到各种刺激信号或者应激情况下LT-HSC可迅速进入细胞周期发生细胞分裂以满足机体实际需求。静息状态的维持对HSC的功能调控是必需且关键的, 过度的增殖会引起LT-HSC的耗竭; 同时, 静息状态的维持可减少因细胞频繁分裂而导致的DNA突变和氧化代谢物的积聚对HSC所致的负面效应。

细胞周期蛋白激酶抑制剂家族(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)分子可通过调控HSC和造血祖细胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)的周期而影响其功能[12]。p21是最早被报道在HSC静息维持其作用的CKI分子中, p21缺失的HSC由于过度增殖, 其自我更新和多向分化能力在连续移植后均出现衰竭[32], 这与p57缺失的HSC功能变化类似, 但后来的研究表明, p57可能在HSC静息中起着更加显著的作用; p27虽然对HSC的细胞周期影响不太明显, 但p27缺失的HPC则增殖能力显著增强[33]。由此可见, 不同CKI家族分子对HSC及其下游细胞作用不尽相同。

TGFβ信号通路也参与调节HSC的静息和自我更新[34]。体外培养中给予TGFβ1抑制HSC的生长。成体骨髓中不同的HSC亚群由于TGFβ受体表达水平不同, 因而对TGFβ1的反应性也不同。有研究认为, TGFβ1可以促进偏髓系分化的HSC增殖, 同时抑制偏淋系分化HSC增殖[35]。我们最新的研究利用单细胞体外培养体系发现, 极低浓度的TGFβ1能显著阻断LT-HSC的细胞分裂, 并抑制体内造血重建和自我更新潜能[36]。有趣的是, TGFβ也介导了微环境细胞与HSC之间的相互作用从而维持HSC的静息。研究发现巨核细胞分泌的TGFβ通过TGFβ-Smad信号通路维持稳态下HSC的静息, 但是当遇到化疗损伤等应激状态时, 巨核细胞则会暂时性地增强成纤维细胞生长因子的分泌, 抑制TGFβ信号通路, 从而促进HSC进入细胞周期而达到扩增HSC的目的。综上可知, HSC的静息调控受到微环境细胞和细胞因子等的综合调控以维持生理调控和应激状态下功能的“及时切换”。

1.2.5 运动迁移(trafficking) HSC的运动迁移包括归巢(homing)和动员(mobilization)两个相反的过程。归巢是指外源性HSC进入机体后通过血液循环到达相对固定的造血微环境的过程; 而动员则是指处于造血微环境中的HSC在受到动员剂的作用后从特定的骨髓微环境中运动迁移到外周循环的过程。

Ostendorp等[37]发现, 回输2 h后只有约3%的干细胞还存留于外周血中, 而35%则分布于骨髓、肝、脾中(三者相近); 随后外周血、肝、脾中的干细胞逐渐减少, 骨髓中的逐渐增加。移植22 h后, 外周血、肝、脾中的细胞约半数发生第1次有丝分裂, 骨髓中90%以上还未分裂, 提示骨髓造血组织是主要的归巢部位, 只有归巢至骨髓的造血细胞才能进一步增殖分化, 重建宿主造血和免疫功能。因此, 如何促进移植后HSC的归巢成为决定临床移植效果的关键因素之一。

与HSC归巢相类似, HSC动员也是一个复杂的多因素多步骤过程, 分为4个阶段: (1)动员剂和细胞

因子直接或间接地激活整个体系; (2)激活信号作用于HSPC, 使其发生表型的改变并进行增殖; (3)造血原始细胞与骨髓基质细胞相互黏附作用减弱以及在化学诱导改变的作用下穿越血管内皮细胞层, 进入外周血; (4)动员后细胞表面物质的表达发生改变, 更好地适应新的生存环境, 凋亡和归巢的趋向性都大大减弱。利用HSC动员现象从外周血采集供者HSC已成为目前移植收集HSC的主要方法。如何安全快速地动员出足够数量的功能良好的HSC用于临床移植是决定治疗效果的关键。

综上, HSC的功能以自我更新和多向分化为核心, 以静息状态的维持为基础, 以有效的应激反应与凋亡控制为必备, 加之归巢与动员两个主要的迁移模式共同构成了HSC的“SMART”五大生物学特性。这些特性相互影响, 互相制约, 构成HSC功能的动态生理调控机制(图1)。作为在临床中应用最为有效的成体干细胞, 深入探究并揭示HSC的功能特性及相关调控机制将为其更加广泛地应用于临床提供干预靶点和策略。

2 造血干细胞移植发展简史

对HSC生理功能的调控及机制的深入研究和认识, 为HSC更好地应用于临床疾病的治疗提供了丰富的理论基础, 为整个干细胞研究领域提供了一个良好的范式。造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是指通过应用健康的自体或异体HSC替代患者的HSC, 重建患者的造血功能和免疫功能从而达到治疗疾病的目的, 是目前最为有效、又是唯一可以治愈某些血液疾病以及一些自身免疫性疾病或实体瘤的最佳治疗方法[38]。在过去的60年里, HSCT的发展经历了多个阶段(图2), 至今已超过100万患者接受和得益于HSCT, 这是第一个进入临床实践的再生方法并对医学界产生了深远影响[39]。

HSCT起初是在为挽救意外大剂量照射后导致的骨髓衰竭而发展起来的。1945年, 第二次世界大战原子弹爆炸后, 大量遭受核辐射患者的造血系统和免疫系统被摧毁, 科学家们迫切需要找到治疗核辐射损伤的方法。1949年, Jacobson等[1]实验表明, 经过致死剂量照射的小鼠进行带有染色体标记的骨髓输注, 小鼠可以存活并且恢复的骨髓细胞完全来自供体。Ford等[2]进一步证实, 骨髓移植的放射保护作用主要来源于植入和存活的供体造血细胞。1956年, Barnes和Loutit等[40]对白血病小鼠进行了放射清髓预处理和骨髓移植治疗。随后, Thomas开始思考造血细胞移植的可行性, 并且十分确信人类骨髓移植的临床潜力。1957年, Thomas等[41]首次尝试了在放疗和化疗后输注正常供者骨髓来治疗白血病, 结果6例患者中只有1例出现了一过性植入, 因为许多研究者未能成功重复出这种治疗方法, 骨髓输注治疗白血病被认为前景黯淡而弃用。但Thomas始终相信它的潜力并开始用远系杂交犬模型进行实验, 认为选择合适的供者是问题的关键[42]。与此同时, 人类白细胞抗原分型的首个方法也被建立起来, 1958年, Dausset团队[43]发现了第一个人类白细胞抗原(HLAs)抗原, 随后相继描述了HLA及其遗传规律, 并认识到这些抗原是动物实验和临床上选择供者的重要遗传因素。

动物模型的研究院结果、对HLA配型重要性的认识、输血及抗感染治疗等支持手段的进步, 促使研究者有信心再次尝试异基因造血细胞移植。在1968至1969年期间, 3例联合免疫缺陷的幼儿在接受同胞相合骨髓移植后重建了造血和免疫系统[44]。1969年, 西雅图Thomas移植团队[45]开始在匹配的同胞间进行同种异体骨髓移植的临床实验, 并在19世纪70年代发表了他们在白血病患者中所取得的成果, 完成了第1例白血病患者与匹配的非亲缘供者的移植手术, 帮助促成了全国骨髓捐赠计划。另外, 在1972年报道了第1例再生障碍性贫血患者成功接受同种异体骨髓移植[45]。1977年, 西雅图Thomas团队[46]首次报道了白血病患者的长期无病生存情况, 这些是化疗失败甚至在多次复发状态时接受骨髓移植的患者, 一些高危患者得到治愈, 移植得到快速推广应用并取得了许多重要进展。

随后, 通过多年的不断探索, 对移植时机的选择、预处理方案的优化、移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的预防、治疗非恶性血液病的应用、对HSC来源途径的选择(动员的外周血干细胞以及脐带血干细胞等)、单倍体移植模式的探索及应用推广等, 意味着如今大多数患者都可以找到合适的供者。而且, 临床研究已经提示, 随着根除癌症、移植和预防GVHD的预处理方案的不断完善, 移植风险已经大大降低, 并改进了机会感染致死的治疗措施, 极大地促进了HSCT在多种疾病治疗中的应用。

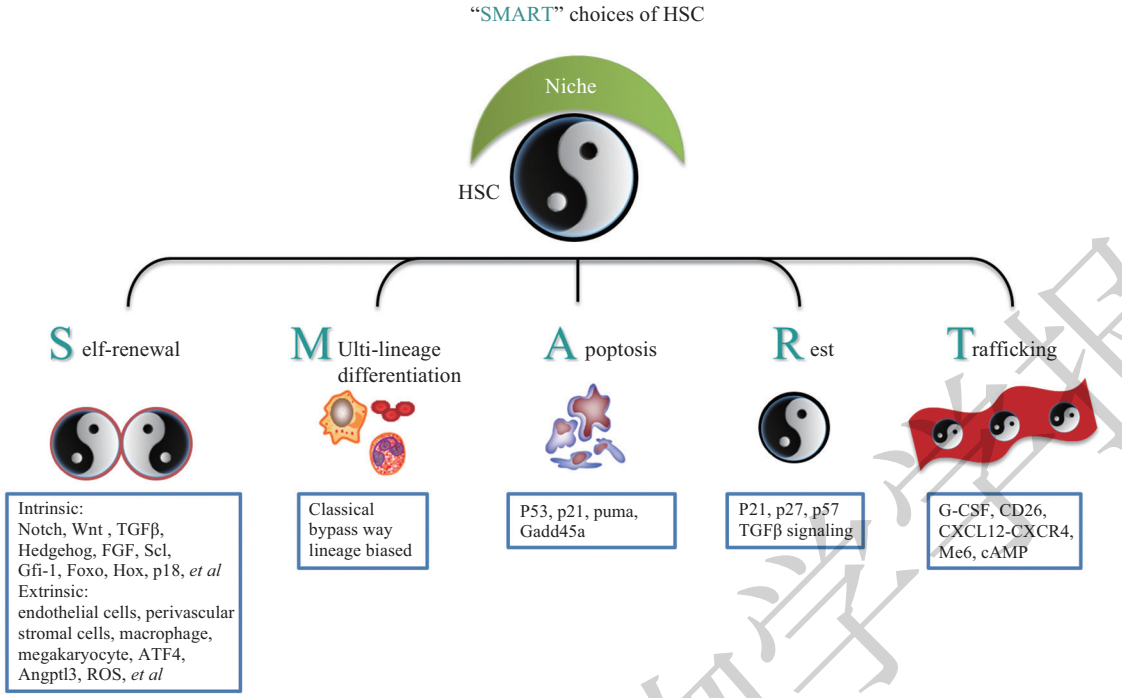

图1 HSC的"SMART"生物学特性

Fig.1 "SMART" choices of HSC

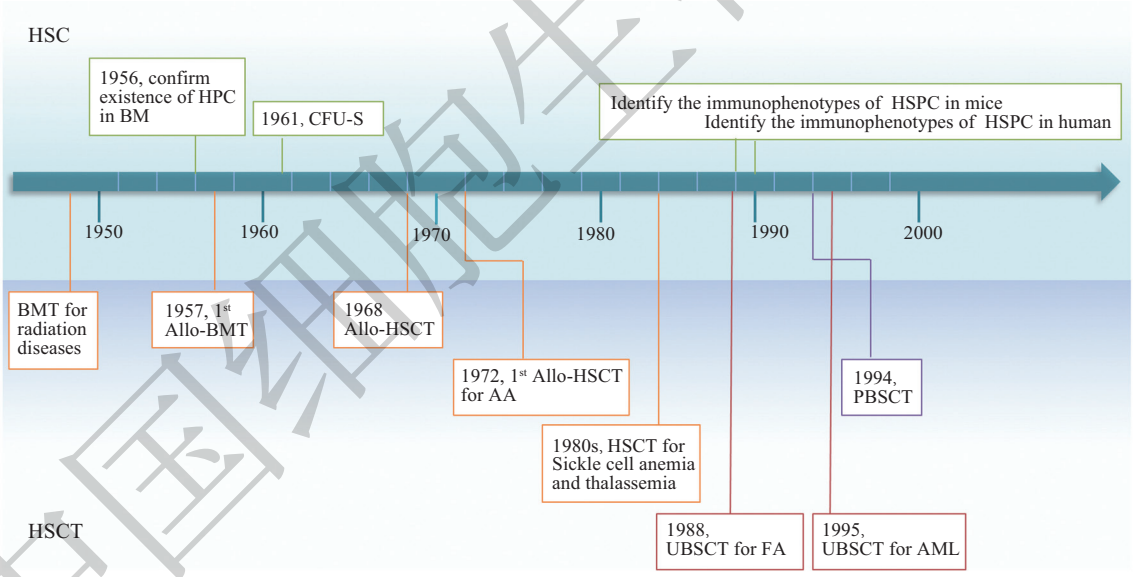

图2 HSC及HSCT发展简史

Fig.2 A brief history of HSC and HSCT

3 造血干细胞移植临床应用现状

HSCT有多种分类方法。根据移植的干细胞来源及供受者关系分为自体HSCT(autologous HSCT, Auto-HSCT)和异体HSCT(allogeneic HSCT, Allo-HSCT, 又称异基因HSCT)。Allo-HSCT又可分为HLA配型相合的同胞供者HSCT(HLA-matched sibling donor HSCT, MSD-HSCT)、亲缘单倍体相合HSCT(haploidentical donor HSCT, HID-HSCT)、非亲缘关系供者HSCT(unrelated donor HSCT, URD-HSCT)和脐带血干细移植(cord blood stem cell transplantation, CBSCT)。按移植物种类分为骨髓移植、外周血HSC移植和脐带血HSC移植。移植发展到今

中国细胞生物学学报

天, MSD-HSCT仍然是Allo-HSCT的首选供者, 非血缘移植、单倍体移植和脐带血移植并存。

Auto-HSCT时HSC来源于自身, 所以不会发生移植物排斥和GVHD, 移植并发症少且无供者来源限制, 移植相关死亡率低, 移植后生活质量好, 但Auto-HSCT治疗恶性血液病时, 因为缺乏移植物抗肿瘤作用以及移植物中可能混有残留的肿瘤细胞, 故复发率高。Allo-HSCT时HSC来源于正常供者, 无肿瘤细胞污染, 且移植物有免疫抗肿瘤效应, 故复发率低, 长期无病生存率高, 适应证广泛, 甚至是某些疾患唯一的治愈方法, 但供者来源受限, 易发生GVHD, 移植并发症多, 导致移植相关的死亡率高, 患者需长期使用免疫抑制剂, 部分长期生存者生活质量可能较差。

因此, 如何选择不同来源的HSC和不同的移植方式也成为了大家关注的重点, 各移植中心应为患者制定个体化治疗方案以达到最佳治疗效果。下面, 我们将根据目前临床上HSC的主要来源: 骨髓、动员的外周血和脐带血在临床移植中的应用作一介绍。

3.1 骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)

骨髓移植是指将正常的骨髓或者患者自身已缓解的骨髓移植给患者, 使患者重建造血和免疫功能的过程。移植前一般要经过大剂量的化疗和放疗, 大量破坏自身的异常细胞(如白血病恶性克隆细胞)后进行骨髓移植。在该过程中, 植入的骨髓HSC能持久地在患者骨髓腔中分化增殖, 从而恢复其正常造血和免疫功能。纯化的骨髓HSC移植到体内后增生速度很慢, 造血恢复是一个较长的过程, 而目前临床上大部分骨髓移植治疗都是将全骨髓细胞进行移植, 里面含有不同阶段的造血干、祖细胞和支持造血的各种基质细胞, 因此, 严格来讲, BMT并不完全等同于HSCT。

根据所移植的骨髓来源将BMT分为以下三种。(1)同基因骨髓移植(syngeneic BMT, Syn-BMT), 在人类仅有同卵孪生子女之间的骨髓移植。(2)异基因骨髓移植(Allo-BMT), 是将HLA相容的他人骨髓移植到患者体内, 目前多为同胞供者, 少数为非血缘关系供者。(3)自体骨髓移植(Auto-BMT), 是先采集自体骨髓, 进行必要的体外净化处理, 在患者进行根治性化疗或放疗之后再回输到自己体内。具有不受供者限制, 移植后恢复较快, 合并症相对少而轻, 几乎不受年龄(55岁以下均可)限制等优点。

3.2 外周血动员干细胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT)

从骨髓中获取HSC需要通过骨髓穿刺技术, 对供者伤害较大、骨髓移植费用高、来源缺乏等诸多因素限制, 所以现在临床上的使用越来越少。随着人们对HSC研究的深入, 发现正常生理状态下外周血中也含有一定比例的HSC。1988年, Socinski等[47]发现, 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)能动员造血干祖细胞从骨髓中大量转移到外周血。因此, 动员后的外周血就成为HSC新的供源。1994年Bensinger等[48]成功实施了G-CSF动员后PBSCT。外周血HSC经过G-CSF动员后, HSC比例增加, 变得更易采集, 成为现在临床上HSCT最重要的来源, 大有取代BMT的趋势, 完全相合的同胞PBSCT是目前治疗许多相关疾病的较佳选择[49]。

与BMT相比, PBSCT有以下一些特征: 移植后植入效率高; 重建造血和免疫功能快; 对放射线敏感性低。异体移植时, PBSCT后中性粒细胞恢复比BMT时间短(前者一般为11~15天, 后者为15~21天), 血小板重建的时间要短4~7天。$CD34^+$细胞数量越多, 造血重建的速度越快。血小板重建对$CD34^+$细胞数量的敏感性要强于中性粒细胞。通过体外富集$CD34^+$的细胞以增加移植PBSC的细胞数目会导致GVHD的增加, 这可能是改变了移植细胞分泌的细胞因子或淋巴细胞亚类的缘故。其他可以缩短细胞重建的策略包括外周血和骨髓HSC联合移植以及用基因重组人G-CSF转染的骨髓HSC进行移植。后者发生GVHD的比率与传统的骨髓移植相当, 而且中性粒细胞重建的速度与PBSC移植相当。

3.3 脐血造血干细胞移植

CBSCT与骨髓移植、外周血移植一样, 是HSC移植技术中的一个类型。上世纪70年代和80年代, Koike和Besalduch-Vidal[50]证明了脐血中含有足够数目的HSC可用于移植。1988年, Broxmeyer首先以实验证明脐血中富含HSC。1988年10月, 法国人Gluckman等[51]在巴黎为1例患有先天性再生不良性贫血(Fanconi)的5岁儿童实施了世界上首例HLA相合的同胞CBSCT, 并取得成功。从此, 人们对于一直被当成废弃物丢掉的胎盘和脐带血有了全新的评价和认识, 并拉开了临床CBSCT的序幕。随后, 全世界各国政府或科研机构出资兴建脐血库。1995年9月,

世界第1例CBSCT治疗成人白血病患者在法国圣安东尼奥医院获得成功。脐血干细胞的发现以及其临床应用, 为HSC移植提供了一个新的细胞来源。目前全球已有40 000例以上的患者(儿童和成人)接受了血缘或非血缘CBSCT, 治疗的疾病已达80余种, 包括恶性疾病和非恶性疾病。

脐血中$CD34^+$细胞约占有核细胞的比例与骨髓相似, 高于外周血。脐血有以下特点: (1)含有丰富的HSC和HPC, 数量可供40 kg以下儿童应用; 若进一步增加采集量, 改善处理方法, 其造血细胞的数量可大大增加, 满足成人的脐血HSC移植; (2)脐血中淋巴细胞大部分为幼弱型T细胞, 功能不成熟, 免疫反应较弱, HLA不合移植后, 发生GVHD较同类骨髓移植少而轻; (3)脐血HSC进入周期的细胞多, 有利于基因导入, 有可能成为基因治疗的理想靶细胞之一; (4)脐血HSC能够长期低温保存, 可作为自体移植储备之用; (5)脐血的采集不对供者造成任何痛苦和不利影响。由此可见脐血有诸多优点, 临床应用有广阔的前景[52-53]。

目前, 脐血移植存在的主要问题首先是单份脐血所含造血干/祖细胞数量少, 且脐血中淋巴细胞不成熟导致移植后造血重建延迟及移植失败, 移植相关死亡率较高; 其次是存在传播遗传性疾病的可能。虽然, 造血重建迟缓和排斥率高导致移植相关死亡率高, 但是, 随着脐血干细胞生物学特性研究的深入和干细胞组织工程技术的发展, 定将解决这些问题, 并为临床广泛应用铺平道路。

4 HSC临床应用挑战与发展前景

在过去的60年里, 已经超过100万患者接受了HSCT, 临床研究日新月异[39]。但是, HSCT仍然是一个面临双重挑战的复杂的治疗过程: 既要治疗原发疾病防止复发, 又必须要控制可能出现的严重并发症。欧洲血液和骨髓移植协会等欧洲大陆注册机构发表的报告显示, 全球上百个中心正在进行的研究中, 包括数千例移植, 使得HSCT成为大规模细胞移植的成功范例[39]。然而, 虽然HSCT已有60多年的临床实践, 但该疗法的临床应用普及拓展仍然受到很大限制。

4.1 移植并发症与复发

虽然HSCT是根治一些血液系统恶性肿瘤的唯一方法, 但并非所有疾病均可根治, 部分患者移植后会出现原发病复发。此外, HSCT过程中或移植后期经常会出现一些并发症, 如感染, 出血, 消化系统、心脏、呼吸系统及神经系统并发症等, 每种并发症均有一定概率发生。其中, 最为困扰临床医生的是GVHD[38]。

Auto-HSCT和Syn-HSCT不会发生GVHD, 但Allo-HSCT发生GVHD的概率很高。其中急性GVHD(aGVHD)发生概率为20%~60%, 慢性GVHD(cGVHD)发生率为50%左右, 致死性GVHD发生率为5%~20%。GVHD的发生率及死亡率取决于多种因素, 如原发病类型、移植前原发病状态、供受者HLA配型、年龄、预处理方案、预防方案等。轻度GVHD由于可伴随移植物抗白血病(GVL)效应, 因此对控制原发病、预防复发有一定益处, 但重症GVHD则可能危及生命, 一旦出现, 则需要尽快治疗。

延迟免疫重建(IR)是Allo-HSCT后的另一个主要困扰, 尤其是在CBSCT受者、单倍体HSCT和体外去除T细胞的移植患者中。除了移植来源和预处理方案, 很多受者参数与延迟免疫重建有关, 包括高龄、潜在的疾病特质和既往治疗类型、CMV供者及受者状态。GVHD对IR有较大的损伤和长期影响, 在降低GVHD风险的同时应提高IR。

Auto-HSCT虽然不存在排斥反应及GVHD的相关临床风险, 但会降低GVL, 同时由于恶性肿瘤患者的骨髓或外周血中残存的癌细胞可能会污染获取的自体HSC, 导致恶性疾病的复发[38,54]。但是到目前为止, 使用通过各种手段体外净化的干细胞并没有显著地改善复发率和生存率, 这表明患者体内预处理后残存的恶性细胞仍是复发的主要来源[55]。但随着诱导剂或挽救性治疗方法诱导分子应答机制的深入研究, 或者更有效的纯化技术进入市场, 这一观点可能会被重新审视。

4.2 造血干细胞来源匮乏及数量不足

供体匮乏以及HSC数量稀少这两大因素是HSC临床应用的主要瓶颈, 尤其对于脐带血HSC移植来说, 通常一个脐带收获的HSC数量不足以用于治疗成人个体。因此, HSC体外扩增是个迫切需要解决的问题, 是科学家们多年来一直不断努力的方向。

目前已经有一系列以无血清培养基为基础加上各种添加剂的体外扩增体系被广泛应用于小鼠及人HSC的实验研究中, 比如基础培养基联合应用重

组人血清白蛋白或者商品化的无血清培养基加多种补充成分, 但这些含有多种细胞因子的“鸡尾酒”样的组合却因为成分复杂、机制不明等各种原因很难广泛应用于临床。此外, HoxB4等经典转录因子的过表达可用于促进HSC的扩增, 但是潜在的致瘤风险使这一干预方式的应用受到很大阻碍[56]。

小分子化合物由于其结构简单、效果特异、副作用少、易操作等诸多优势而成为维持并扩增HSC的良好途径。研究发现, SR1和UM171这两个小分子化合物可用于人脐血来源的HSC的扩增[57-58], 两者联合应用可达到将近30倍的功能性HSC的扩增效果, 但是这两个小分子化合物依然需要在各种细胞因子的体系中方能发挥作用, 而且经过处理后的HSC移植到体内是否可用促进粒细胞、血小板和免疫细胞的植入及重建有待进一步确认[58]。除此之外, 利用计算机虚拟筛选技术, 以细胞周期蛋白激酶抑制剂p18为靶点筛选出特异的小分子抑制剂用于HSC的体外扩增, 经过该抑制剂处理的HSC体内自我更新能力显著增强, 从而实现了小鼠HSC在体外短期培养的扩增[59]。进一步的研究发现, 另一个靶向p18的小分子抑制剂对脐血来源的$CD34^+$ HSC细胞也具有显著的扩增能力[60]。这些研究为下一步研发能够扩增足够数量的、可移植的HSC的分子组合打下了重要基础。

在针对HSC的体外微环境维持和重塑方面, 目前还没有完全能够模拟HSC特殊的造血微环境的体外体系的建立。如何以临床应用为导向, 利用不同特性的生物物理材料构建适合HSC增殖和功能以维持的体外微环境将是未来HSC体外扩增领域新的突破口。此外, 利用胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)或重编程技术获得的诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)产生造血干祖细胞, 进而获得足够的可用于临床移植的HSC也是现阶段及今后需要攻克的一个难题。

4.3 早期植入不良

HSCT后早期植入对移植后造血和免疫长期重建至关重要。移植前的预处理损伤受体骨髓微环境对移植入的供体HSC产生“旁观者效应”, 导致供体HSC的植入不良和自我更新能力的下降[20]。目前, 促进造血移植后重建的策略主要包括: (1)提高移植物中具有重建能力的HSC的质量和数量; (2)提升移植的HSC归巢效率; (3)采集、分离骨髓时采用低氧环境或加入抗氧应激的环胞多肽A(cyclosporin A, CSA), 减少HSC暴露到空气后产生的生理性的氧应激; 或者照射移植之前采用抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)清除骨髓中的活性氧(ROS), 提高HSC的采集数量和HSC的移植率; (4)在保证干细胞池稳定的情况下, 加速植入的HSC增殖并向成熟细胞分化。

然而, 到目前为止, 在移植前通过体外处理来增加HSC的数量、改善HSC质量, 是十分困难的。人们已经进行了多种尝试, 但这些方法的有效性仍需要临床前试验或临床试验证实, 以期最终可应用于接受移植的患者。

5 发展前景

生物技术和科学取得的突破使细胞治疗领域发生了重大变革并应用于多个医学学科, 包括癌症的免疫治疗。取得这些进展主要源于过去长达半个多世纪在HSCT临床应用中的经验和体会。现代细胞疗法不仅在一定程度上得益于HSCT的发展, 而且在提高其适用性、安全性和疗效方面也有很大的前景, 甚至能够替代它, 在原有领域之外找到新的适用领域。

5.1 HSCT与基因治疗

自从基因治疗的概念提出以来, 造血干细胞一直被认为是最理想、最有发展前景的靶细胞。对一些单基因遗传病, 在HSC中表达一个正常基因的副本为永久治愈疾病提供了机会。20世纪90年代早期, 基因治疗开始以T淋巴细胞基因工程和HSC为先导, 治疗遗传性ADA缺乏联合重症免疫缺陷综合征[61-62]。后来, 基因治疗在免疫缺陷疾病及先天疾病(包括代谢性神经根型疾病和血红蛋白病)中也取得了进展。基因转导载体安全性的提高促进了造血干细胞基因治疗向临床应用的转化。虽然, 目前约65%的基因治疗实验使用病毒载体, 但花费更低的非病毒基因转导载体也在进行临床评估。近年, CRISPR-Cas9基因编辑技术的发展、基因敲除和基因精准校正的实现能够进一步加快造血干细胞基因治疗的适用性。随着载体技术的不断发展, 基于自失活病毒载体的造血干细胞基因治疗方案在地中海贫血、镰刀细胞贫血、肾上腺脑白质营养不良等的临床试验中已经展示了显著的初期治疗效果。在监管机构认证批准后, 有望扩大临床试验规模或直接进入临床治疗。但这些治疗方案的10~20年后的长期安全性依

中国细胞生物学学报

然不可预测, 因此基因治疗学家一直没有停止对更加安全的基因治疗策略的探索[39]。

5.2 HSCT与CAR-T技术

嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)疗法是一种通过T细胞基因改造实现肿瘤靶向杀伤的免疫治疗技术。由于CAR-T细胞完全由自体T细胞制备, 与传统移植技术相比, 不存在供源问题, 且无GVHD风险, 极具应用前景。多项临床试验证实, 其对复发/难治性血液肿瘤患者具有很好的疗效, 在儿童和成人中的多种B细胞恶性肿瘤患者中进行的靶向CD19的CART临床研究取得了令人瞩目的成功。然而, CAR-T疗法仍有需要克服的难题, 就目前所开展的临床试验来看, CAR-T细胞在体内的存续时间不如移植中完全嵌合的供者细胞持久, 一旦失去CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用, 原发病就有可能卷土重来[63]。

综合HSCT与CAR-T治疗各自的优缺点, 将二者进行联合或可扬长避短。实验数据显示, 将CAR-T治疗作为Allo-HSCT前调节治疗的一部分, 可以减少高剂量化疗的毒性, 并对生命质量产生积极影响[64]。对于复发/难治性患者来说, 通过前期的CAR-T治疗达到完全缓解, 则可以最佳状态顺利桥接至移植, 取得最好疗效。HSCT联合CAR-T治疗则可提高抗肿瘤靶向性, 降低复发率和不良反应及GVHD发生率。移植后复发患者选择CAR-T治疗具有良好的有效性及安全性。因此, 在移植各阶段中联合应用CAR-T治疗, 可实现互补或协同, 优化治疗效果, 扩大适用者范围, 有望成为一种新的值得推广的治疗策略。但目前更多的都是假设和小规模单中心研究, 特别是涉及CAR-T治疗本身的法规及质控方面仍存在一定问题, 还需进一步改进。因此, 我们需要更多的规范化的多中心临床研究来证实CAR-T治疗与移植组合起来的安全性及有效性。

5.3 HSCT与实体器官移植

对自体和异体HSCT临床疗效生物学机制的理解也启发了这些可应用于除了肿瘤学和遗传疾病更广泛的领域, 其中一个范例是联合HSCT诱导实体器官移植的耐受性。早期肝移植研究表明, 造血微嵌合体存在与移植物的免疫耐受有关, 支持同一供者的HSCT能够促进供体特异耐受的假设。这一方法在活体内肾移植中得到了成功验证。近来一些国家多中心研究表明, 进行Auto-HSCT前的大剂量细胞毒性方案能够调节免疫细胞对自体组织的反应性, 改善严重多发性硬化及其他自身免疫性或慢性炎症疾病患者群体的临床状态, 因此, 将Auto-HSCT应用在实体器官移植中也是值得探索的领域和方向[39]。

细胞疗法是过去十年医学领域最令人兴奋的创新之一, 它有潜力为预后较差疾病的各年龄的患者提供治疗方案。通过结合生物技术的进步和深入了解细胞疗法有效性安全性的生物机制, 克服原理上、经济上和监管方面带来的挑战, 将是未来几年内现代医学领域中的重大突破。HSC基础与临床研究的进展与突破, 使HSCT有可能在不远的将来实现质的跨越, 其应用将会更广泛, 疗效将会更好, 乃至发展为细胞治疗等全新的模式。

参考文献 (References)

1 Jacobson LO, Marks EK. The role of the spleen in radiation injury. Proc Soc Exp Biol Med 1949; 70: 740-2.

2 Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. Nature 1956; 177(4506): 452-4.

3 Till JE, McCulloch CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 1961; 14(2): 213-22.

4 魏启胜, 吴祖泽. 脾结节生成细胞(CFC-s)特性的研究(Wei Qisheng, Wu Zuze. Acta Physiologica Sinica) 1988; 40(5): 510-7.

5 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science 1988; 241(4861): 58-62.

6 Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature 2000; 404(6774): 193-7.

7 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 1997; 91(5): 661-72.

8 Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. Blood 1992; 80(12): 3044-50.

9 Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, *et al*. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. Nat Med 1996; 2(12): 1329-37.

10 Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med 1998; 4(9): 1038-45.

11 程涛, 董郝程. 造血干细胞生理调控及其分子基础研究进展. 生理学报(Cheng Tao, Dong Haocheng. Physiological regulation of hematopoietic stem cell and its molecular basis. Acta Physiologica Sinica) 2016; 68(4): 423-34.

12 Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. *In vivo* self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. Nat Cell Biol 2004; 6(5): 436-42.

13 Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, Haman A, Barakat S, Iscove NN, *et al*. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. Blood 2010; 115(4): 792-803.
14 Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, *et al*. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature 2004; 431(7011): 1002-7.
15 Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, *et al*. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell 2007; 128(2): 325-39.
16 Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, Yamazaki S, Sinha R, Kao KS, *et al*. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. Nature 2016; 530(7589): 223-7.
17 Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mae MA, Langen UH, Betsholtz C, *et al*. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. Nature 2016; 532(7599): 380-4.
18 Hur J, Choi JI, Lee H, Nham P, Kim TW, Chae CW, *et al*. CD82/KAI1 maintains the dormancy of long-term hematopoietic stem cells through interaction with DARC-expressing macrophages. Cell Stem Cell 2016; 18(4): 508-21.
19 Zhao Y, Zhou J, Liu D, Dong F, Cheng H, Wang W, *et al*. ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver. Blood 2015; 126(21): 2383-91.
20 Shen H, Yu H, Liang PH, Cheng H, XuFeng R, Yuan Y, *et al*. An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. Blood 2012; 119(15): 3629-37.
21 Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, Huang X, Cooper S, Hangoc G, *et al*. Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock. Cell 2015; 161(7): 1553-65.
22 Hu L, Cheng H, Gao Y, Shi M, Liu Y, Hu Z, *et al*. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. Blood 2014; 124(20): e45-8.
23 Anjos-Afonso F, Currie E, Palmer HG, Foster KE, Taussig DC, Bonnet D. CD34$^-$ cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. Cell Stem Cell 2013; 13(2): 161-74.
24 Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, *et al*. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. Science 2016; 351(6269): aab2116.
25 Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L, Huang JF, Sieburg HB. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood 2004; 103(11): 4111-8.
26 Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, *et al*. Identification of Flt3$^+$ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell 2005; 121(2): 295-306.
27 Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, *et al*. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. Cell 2013; 154(5): 1112-26.
28 Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, *et al*. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. Nature 2018; 554(7690): 106-11.
29 Yamamoto R, Wilkinson AC, Nakauchi H. Changing concepts in hematopoietic stem cells. Science 2018; 362(6417): 895-6.
30 Yu H, Shen H, Yuan Y, XuFeng R, Hu X, Garrison SP, *et al*. Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation. Blood 2010; 115(17): 3472-80.
31 Chen Y, Ma X, Zhang M, Wang X, Wang C, Wang H, *et al*. Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress responses in mice. Blood 2014; 123(6): 851-62.
32 Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, *et al*. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science 2000; 287(5459): 1804-8.
33 Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). Nat Med 2000; 6(11): 1235-40.
34 Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT. Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1). Blood 2001; 98(7): 3643-9.
35 Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. Cell Stem Cell 2010; 6(3): 265-78.
36 Wang X, Dong F, Zhang S, Yang W, Yu W, Wang Z, *et al*. TGF-beta1 negatively regulates the number and function of hematopoietic stem cells. Stem Cell Rep 2018; 11(1): 274-87.
37 Oostendorp RA, Ghaffari S, Eaves CJ. Kinetics of *in vivo* homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44-independent. Bone Marrow Transplant 2000; 26(5): 559-66.
38 Thomas ED, Sr. Stem cell transplantation: past, present and future. Stem Cells 1994; 12(5): 539-44.
39 Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, Dazzi F, Pedrazzoli P, Toubert A, *et al*. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. Sci Transl Med 2018; doi: 10.1126/scitranslmed.aap9630.
40 Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. Br Med J 1956; 2(4993): 626-7.
41 Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 1957; 257(11): 491-6.
42 Uphoff DE. Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. J Natl Cancer Inst 1957; 19(15): 123-30.
43 Colombani J, Colombani M, Dausset J. Leukocyte antigens and skin homograft in man. Demonstration of humoral antibodies after homografting by the antiglobulin consumption test. Ann N Y Acad Sci 1964; 120: 307-21.
44 Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet 1968; 2(7593): 1366-9.

中国细胞生物学学报

45 Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, *et al*. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. Lancet 1972; 1: 284-9.

46 Thomas ED. A review of the results of human marrow transplantation in Seattle. Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi 1977; 40: 863-72.

47 Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet 1988; 1(8596): 1194-8.

48 Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F, Rowley S, Weaver C, Lilleby K, *et al*. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. Br J Haematol 1994; 87(4): 825-31.

49 王承燕, 丁明孝. 骨髓移植与造血干细胞研究. 生物学通报 (Wang Chengyan, Ding Mingxiao. Bulletin of Biology) 2009; 44(1): 7-8.

50 Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, *et al*. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86(10): 3828-32.

51 Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, *et al*. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989; 321(17): 1174-8.

52 Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, *et al*. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood 2001; 97(2): 2962-71.

53 孙自敏. 脐血造血干细胞移植现状及展望. 国际输血及血液学杂志(Sun Zimin. Int J Blood Transfus Hermatol) 2011; 34: 97-9.

54 Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro J Jr, Anderson WF, *et al*. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. Lancet 1993; 341(8837): 85-6.

55 Muller AM, Kohrt HE, Cha S, Laport G, Klein J, Guardino AE, *et al*. Long-term outcome of patients with metastatic breast cancer treated with high-dose chemotherapy and transplantation of purified autologous hematopoietic stem cells. Biol Blood Marrow Transplant 2012; 18(1): 125-33.

56 Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. Cell 2002; 109(1): 39-45.

57 Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, *et al*. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. Science 2010; 329(5997): 1345-8.

58 Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, *et al*. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. Science 2014; 345(6203): 1509-12.

59 Gao Y, Yang P, Shen H, Yu H, Song X, Zhang L, *et al*. Small-molecule inhibitors targeting INK4 protein p18(INK4C) enhance *ex vivo* expansion of haematopoietic stem cells. Nat Commu 2015; 6: 6328.

60 Xie XQ, Yang P, Zhang Y, Zhang P, Wang L, Ding Y, *et al*. Discovery of novel INK4C small-molecule inhibitors to promote human and murine hematopoietic stem cell *ex vivo* expansion. Sci Rep 2015; 5: 18115.

61 Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, *et al*. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. Science 1995; 270(5235): 475-80.

62 Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, *et al*. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. Science 1995; 270(5235): 470-5.

63 Rosenbaum L. Tragedy, perseverance, and chance—The story of CAR-T therapy. New Engl J Med 2017; 377(14): 1313-5.

64 CAR-T cells and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. Immunotherapy. 2017; 9(13): 1115-25.

中国细胞生物学学报