



吴宇轩, 华东师范大学生命科学学院, 生命医学研究所研究员、博士生导师。2012年于武汉大学获得博士学位, 随后加入中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 历任博士后和副研究员。2015年至2018年于哈佛大学医学院从事博士后研究工作。实验室主要研究单倍体胚胎干细胞的应用、结合造血干细胞和CRISPR基因编辑技术治疗以地中海贫血为主的遗传疾病; 另外, 通过CRISPR文库介导的高通量筛选, 鉴定新的血液细胞分化调控基因、功能性非编码区以及肿瘤免疫新靶点, 并研究其作用机理及信号网络。相关研究成果发表在*Nature Medicine*、*Cell Stem Cell*、*Nature Biotechnology*、*Nature Genetics*、*Cell Research*和*Blood*等学术期刊上。  
<https://faculty.ecnu.edu.cn/s/4006/main.jspy>

## 造血干细胞及其应用研究进展

田晓玲 杨菲 吴宇轩\*

(华东师范大学生命科学学院, 生命医学研究所, 上海市调控生物学重点实验室, 上海 200241)

**摘要** 造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是一类多能干细胞, 位于特殊的造血微环境, 主要存在于骨髓中。其能自我更新和多向分化为各种功能的血细胞, 维持血液系统的建立和动态平衡。造血干细胞的这些重要特性以及造血干细胞移植在临床上的广泛应用, 结合基因治疗和基因编辑技术的进步, 使得基于造血干细胞治疗多种血液疾病和免疫疾病的基因治疗研究在近年来取得了很大的进展。该文将从造血干细胞生物学特征、来源、造血干细胞微环境的基础研究, 以及造血干细胞基因治疗、自体造血干细胞移植治疗 $\beta$ -地中海贫血等方面的临床研究和应用进展进行综述。

**关键词** 造血干细胞; 自我更新; 分化; 基因编辑; 基因治疗; 地中海贫血

## Advances in Research and Application of Hematopoietic Stem Cells

Tian Xiaoling, Yang Fei, Wu Yuxuan\*

(Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

**Abstract** Multipotent hematopoietic stem cells (HSCs) reside in specialized niche mainly in adult bone marrow with extensive self-renewal and differentiation capacity, can replenish all myeloid and lymphoid blood cell lineages and maintain blood system establishment and dynamic balance. Due to these important characteristics of HSCs and extensive clinical application of HSC transplantation, combined with advances in gene therapy and gene editing, the research of HSCs based gene therapy for many blood diseases and immune diseases has made great progress in recent years. In this review, we focus on self-renewal and differentiation of HSCs, sources and microenvironment of HSCs, gene editing based clinical research with HSCs especially for beta-Thalassemia.

**Keywords** hematopoietic stem cells; self-renewal; differentiation; gene editing; gene therapy; Thalassemia

\*通讯作者。Tel: 021-24206745, E-mail: yxwu@bio.ecnu.edu.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-24206745, E-mail: yxwu@bio.ecnu.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:30:50

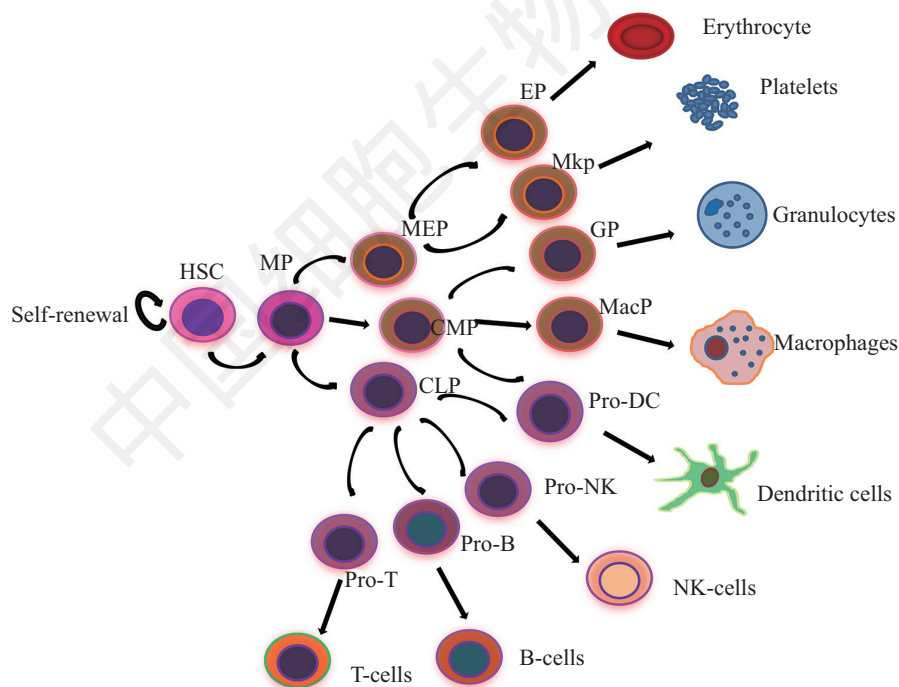
URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1630.024.html>

造血干细胞移植被广泛用于治疗多种血液系统疾病,如白血病、淋巴瘤和镰刀状贫血等,是许多血液学恶性肿瘤的唯一治愈手段,经异体造血干细胞移植后,造血干细胞可重建病人的整个造血系统。但目前仍然缺少足够数量的可供移植的供体和脐血HSCs,这限制了HSCs用于骨髓移植治疗的应用,且低效的造血系统重建仍然是引起移植后发病和致死的重要原因<sup>[1-2]</sup>。更深入地研究造血干细胞的自我更新、分化以及其内源性和外源性调控网络,可以推动造血干细胞体外扩增以及移植策略的开发,使得其更好地服务于临床治疗。另外,发展基于病毒导入和基因编辑的新一代基于自体造血干细胞的治疗策略也是重要的研究方向。本文将从造血干细胞生物学特征及来源、造血干细胞微环境的基础研究、造血干细胞基因治疗、自体造血干细胞移植治疗 $\beta$ -血红蛋白病等方面的临床研究和应用进展进行综述。

## 1 造血干细胞生物学特征、来源

造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSCs)作为成体干细胞,位于造血系统级联的顶端,存在于脐带血、外周血和成年人骨髓中,数量少,是一群具有自我更新能力和全能性的细胞,能分化为各种类型的造血祖细胞(图1),进而分化产生不同谱系的骨髓和淋巴样血细胞。在分化过程中,HSCs首先丢失了自我更新能力,然后逐步失去多能性,最终变为特定的有功能的成熟细胞类型,如红细胞、血小板、粒细胞、DC细胞、B细胞、T细胞、NK细胞等<sup>[3]</sup>。造血重建反应了HSCs两个重要特征:自我更新能力和分化潜能之间的平衡。

造血干细胞功能的维持以及自我更新受到严格的调控。HSCs的命运决定,如细胞死亡和存活、细胞分裂或静息、细胞分化或自我更新、极性和迁移或定居都处于一个动态的网络调控之中,可避免HSCs衰竭引起的造血重建失败,或者



造血干细胞是一群具有自我更新能力和多向分化潜能的多能干细胞,不仅能维持自身状态和功能的稳定,而且也能分化为不同类型的造血祖细胞,进一步分化为各种谱系的功能血细胞类型。MP: 多能祖细胞; MEP: 红/巨核细胞祖细胞; CMP: 共同髓系祖细胞; CLP: 共同淋巴样祖细胞; MacP: 巨噬细胞祖细胞; GP: 粒细胞祖细胞; Mkp: 巨核细胞祖细胞; DC: 树突状细胞; EP: 红细胞祖细胞; GMP: 粒细胞/巨噬细胞祖细胞。

The HSCs has the self-renewal capacity and the multipotency. Throughout differentiation, an HSCs first loses self-renewal capacity, then become a mature functional cell of a certain lineage. MP: multipotent progenitor; MEP: megakaryocyte/erythrocyte progenitors; CMP: common myeloid progenitor; CLP: common lymphoid progenitor; MacP: macrophage progenitor; GP: granulocyte progenitor; Mkp: megakaryocyte progenitor; DC: dendritic cell; EP: erythrocyte progenitor; GMP: granulocyte/macrophage progenitor.

图1 造血干细胞分化

Fig.1 Model of the hematopoietic differentiation

HSCs过度增殖引起的增殖失控。这些命运决定不仅在干细胞水平非常重要,在整个HSCs往下分化过程中的每一个祖细胞阶段也都很重要。大量新的血细胞生成不是在干细胞阶段大量增殖而来的,而是祖细胞在多个短暂分化阶段通过指数级扩增而来的。正常情况下,HSCs几乎不分裂,主要处于静息和休眠状态,只有一小部分HSCs参与特定阶段的活跃的造血生成<sup>[4]</sup>。而在骨髓移植后,只有真正的长周期造血干细胞(long-term hematopoietic stem cells, LT-HSCs)的成功归巢才能保证血液系统的终生重建<sup>[5]</sup>。人的HSCs表达表面分子CD34,有许多报道描述了人HSCs是CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞,异种移植方法鉴定发现,这一群异质性HSPC细胞只包含<1%的功能性HSCs。近年来利用谱系标志(CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>),提高了人HSCs的富集方法,但是纯度仍然只能达到15%<sup>[5]</sup>。

HSCs来源于胚胎中胚层的主动脉-性腺-中肾区的生血内皮(hemogenic endothelium),HSCs经血液循环迁移到胎肝,成人阶段则定植到骨髓。在压力环境下HSCs也可以迁移到骨髓外进行造血作用。因成熟的血细胞寿命短,HSCs可为血液系统终身

补充血细胞<sup>[6]</sup>。

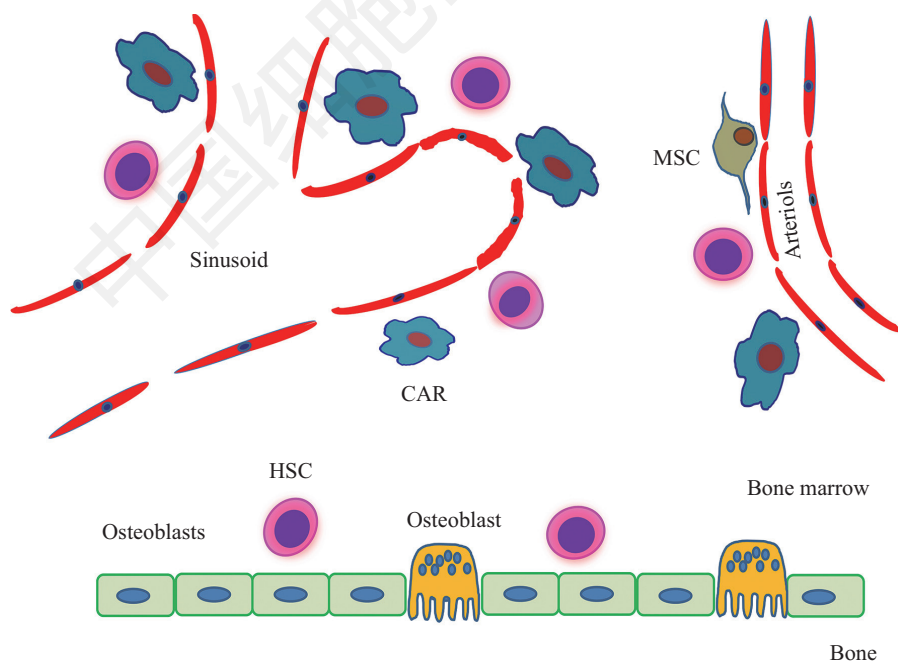
## 2 造血干细胞微环境(hematopoietic stem cell niche)

骨髓里存在着一个受到严格调控的局部微环境(niche),由不同细胞、细胞因子和细胞外基质等构成,调控HSCs自我更新、静息状态、增殖和分化作用<sup>[7]</sup>。干细胞‘niche’的概念由Schofield<sup>[8]</sup>于1978年首次提出。niche的调控信号源自周围细胞或其分泌的细胞因子,以及来自物理因素,如氧张力(shear stress)、收缩力(contractile forces)和温度。在体内动态平衡过程中,大部分HSCs处于静息状态,但遇到化疗损伤、感染等刺激时,HSCs会被活化,开始大量增殖和分化,以应对干扰素介导的信号传递等感染性应激反应<sup>[9]</sup>。

### 2.1 三种类型的HSCs niche

骨髓HSCs位于特殊的造血微环境niche中,包括骨内膜niche、网状niche和血管周niche(图2)。

骨髓中的第一种HSCs niche是骨内膜niche,骨内膜niche中最基本的细胞类型是成骨细胞、破骨细胞、OMs(osteomac)和瘦素受体CXC-驱化因子配



骨髓HSCs定位于三种类型的HSCs niche,分别是骨内膜niche、网状niche和血管周niche。MSC: 骨髓巢蛋白阳性间充质干细胞; CAR: CXCL12丰富的网状细胞。

HSCs in bone marrow are considered to reside in one of three types of HSC niches: endosteal, reticular or perivascular niches. MSC: bone marrow nestin-positive mesenchymal stem cell; CAR: CXCL12-abundant reticular cell.

图2 骨髓HSCs niche

Fig.2 HSCs niche in adult bone marrow

基-12(CXC-chemokine ligand 12, CXCL12)丰富的网状细胞(CXCL12-abundant reticular cell, CAR)。这些细胞类型促进了HSCs与骨内膜niche的黏附。骨内膜niche中影响HSCs的作用因子有: N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-CAD)、基质衍生因子-1 $\alpha$ (stromal derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ )/CXCR4(C-X-C receptor type 4)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)/CD44/ $\beta$ 1整合素、血管生成素-1(angiotensin-1, ANG-1)/酪氨酸激酶受体2(tyrosine kinase receptor 2, TIE2)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)/干细胞因子受体(stem cell factor receptor, c-KIT)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell-adhesion molecule-1, VCAM-1)/极迟抗原-4(very late antigen-4, VLA-4)和促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)/TPO受体MPL。第二种是网状niche, 其中血窦周围CXCL12丰富的网状细胞能产生大量的SDF-1 $\alpha$ 和SCF, 从而维持HSCs的表型。第三种是血管周niche。HSCs通过SDF-1 $\alpha$ /CXCR4、SCF/c-KIT和VCAM-1/VLA-4轴在血管周niche中维持和影响HSCs功能。研究表明, 维持HSC造血重建和分化潜能的细胞因子也可以由巢蛋白阳性的间充质干细胞产生<sup>[10]</sup>。

## 2.2 影响HSC再生的血管微环境

处于静息状态的HSCs主要定位于骨内膜区的微动脉, 这些微动脉被NG2<sup>+</sup>巢蛋白高表达的周细胞鞘包裹, 并与交感神经一起作用, 促进HSCs在骨髓中的维持和保留。巢蛋白高表达的细胞本身处于静息状态, 从静息状态激活后, HSCs会离开NG2<sup>+</sup>微动脉周niche, 转移到表达Lepr<sup>+</sup>的血窦周niche。窦内皮细胞释放VEGF, 促进辐照后HSCs的存活, 还表达肌糖蛋白C(tenascin C), 分泌血管生成因子(angiocrine factors), 促进HSCs增殖。因为巢蛋白低表达的细胞在化疗后大部分都被破坏, HSCs再生可能从小动脉处开始, 导致随后的niche的转换, 产生持续的增殖、重组和造血再生。移植的HSCs偏向于优先归巢到骨内膜区, 部分原因是受到窦内皮细胞产生和表达的透明质酸(hyaluronin)和E-选择素(E-selectin)的调控, 以及HSCs表达的钙感受受体(calcium-sensing receptor, CaR)和Robo4的介导<sup>[9]</sup>。

## 2.3 调控HSCs维持的主要细胞类型

调控HSCs功能维持的主要细胞类型有血管周内皮细胞、巨噬细胞、CAR细胞、交感神经元和无髓鞘 Schwann细胞(nonmyelinating Schwann cells)。

已知的HSCs维持因子有CXCL12和SCF, 其他的调节因子包括多效生长因子(pleiotrophin)、血管生成素1(angiotensin 1, ANGPT1)、TGF- $\beta$ 以及信号通路包括Notch和Wnt。研究表明, 成骨细胞对HSCs的维持是非必需的, 但可能在调控淋巴祖细胞发面发挥作用<sup>[9]</sup>。某些类型的细胞已被证明对HSCs的维持有负调节作用, 包括脂肪细胞等, 这些细胞在化疗和放疗后数量越来越多。对静息和活化后的HSCs进行区域性定位研究, 发现静息的HSCs定位于NG2<sup>+</sup>周细胞鞘围绕的小动脉附近, 但在激活后转移到表达Lepr的窦周区附近<sup>[9]</sup>。

造血干细胞的干性维持依赖于骨髓niche的特定微环境, niche对静息状态维持、自我更新、增殖和分化都发挥着调控作用<sup>[11-12]</sup>。Niche中的细胞通过分泌SCF、CXCL12来调控HSCs干性维持和分化<sup>[12-14]</sup>。骨髓和脾脏的血管周、内皮细胞和间质细胞分泌细胞因子促进HSCs的维持, 其他一些细胞类型也直接或间接调控HSCs niche。一类分裂和非分裂的HSCs定居在血管周niche, 这些niche主要和骨髓和脾脏的血窦相联系。还有一类HSCs主要和小动脉有关, 动脉周和窦周微环境因HSCs进入血液循环的能力和暴露到血浆成分的程度而不同。内皮细胞和CXCL12丰富的网状血管周基质细胞是干细胞因子SCF的主要来源和HSCs维持所需的CXCL12的主要来源。其他的血管周细胞, 如Ng2-CreER<sup>+</sup>小动脉周细胞[表达神经-神经胶质抗原-2(neural-glial antigen-2)], 也可能合成HSCs维持所需的CXCL12。脾脏中髓外造血作用依赖于血管周niche, 主要和红髓有关, 其中, 内皮细胞和转录因子21表达的基质细胞(transcription factor 21-expressing stromal cells)是SCF和CXCL12的主要来源。血管和基质成分在衰老过程中发生了改变<sup>[11]</sup>。静息和自我更新的HSCs依靠糖酵解而不是线粒体氧化磷酸化来产生能量。HSCs对糖酵解的依赖被认为是对骨髓缺氧环境的一种适应, 并反应了HSCs的低能量需求。然而, 最近的证据显示, 线粒体代谢和活动的改变并不仅仅是被动的结果, 而是HSCs命运决定的积极驱动因素<sup>[15]</sup>。因此, 线粒体活性和代谢的调节对于维持HSCs的自我更新潜力至关重要, 并且可能有利于移植性HSCs的体外增殖<sup>[15]</sup>。

## 2.4 HSCs与衰老及损伤

造血干细胞的衰老会引起自我更新能力下降、

归巢能力降低以及向血液细胞的分化能力下降,包括免疫系统功能下降、贫血、患白血病几率增加等。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是生物有氧代谢过程中的一种副产品,包括氧离子、过氧化物和含氧自由基等,会诱导DNA损伤和影响线粒体功能。在衰老的造血干细胞中,ROS产生增多影响造血干细胞的稳态和功能维持。HSCs中ROS含量的升高也会激活p38MAPK和mTOR,从而导致移植过程中HSCs的过早衰竭<sup>[15]</sup>。

研究表明,HSCs衰老是由DNA损伤、ROS增多、表观遗传变化、极性丧失以及细胞外源性因子包括源于HSCs niche的细胞因子和趋化因子所引起的。衰老HSCs能通过营养减少、清除ROS、极性改变、表观遗传修饰、衰老细胞清除来恢复活力<sup>[16-17]</sup>。衰老的造血干细胞niche影响造血干细胞的自我更新能力和分化潜能<sup>[18]</sup>。HSCs衰老对骨髓的潜在影响包括各种异常,血管改变、脂肪发生皱缩、成骨减少、niche细胞分泌的因子改变(CCL5分泌增加和OPN水平降低),以及减少HSCs与基质细胞间的黏附<sup>[6]</sup>。化疗诱导大部分急性髓细胞样白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞凋亡,然而在通过SDF-1 $\alpha$ /CXCR4和VCAM-1/VLA-4轴占据了HSC niche的窦周室并转化为白血病干细胞(leukemic stem cell, LSC)之后,一部分AML细胞具有了抗性。LSCs能同窦内皮细胞融合,并融合在内皮中,从而使LSCs得以存活,防止化疗和压力,导致疾病复发<sup>[10]</sup>。

## 2.5 调控造血干细胞的信号通路

HSCs的自我更新、分化和静息状态的维持涉及到多种信号通路,如SCF/c-kit信号通路、Notch信号通路、Wnt信号通路和PI3K/AKT信号通路等<sup>[19]</sup>。小鼠*Lnk*基因敲除纯合子模型(*Lnk*<sup>-/-</sup>)中不仅存在HSCs数量的增加而且HSCs再生潜力也随之增长,说明TPO正调控HSCs自我更新过程,*Lnk*负调控HSCs自我更新过程。TGF- $\beta$ /Smad是调节HSCs静息状态和自我更新过程的重要通路之一,体外培养实验证明,TGF- $\beta$ 抑制HSCs的增殖而非诱导凋亡,中和TGF- $\beta$ 可从静息态细胞中诱导释放早期造血祖细胞。条件性敲除TGF- $\beta$  I型受体,小鼠HSCs表现正常自我更新和造血重建,但大部分TGF- $\beta$ 和Smad基因敲除的小鼠模型出现早期胚胎致死,加之Smad通路或TGF- $\beta$ 家族其他受体和配体的作用,使得TGF/Smad信号通路在HSCs功能中的作用机制很难得到证明。过

表达Wnt信号通路的关键分子 $\beta$ -catenin发现,HSCs多向分化功能受损且出现暂时性的数量增加,接着造血干细胞池的衰竭。但在HSCs中条件性敲除 $\beta$ -catenin和 $\gamma$ -catenin,HSCs仍具有正常造血功能。作为PI3K/AKT通路的效应分子,FoxO3a通过提高HSCs对氧化应激的耐受并启动自噬而维持静息状态。Ang-1/Tie2通路也可以调控HSCs的静息态。在成体骨髓中,酪氨酸激酶Tie2对HSCs的维持是必不可少的。生理条件下,表达Tie2的HSCs处于静息态。Ang-1体外处理HSCs可以抑制其增殖并维持其长期体内重建能力<sup>[3]</sup>。

## 3 造血干细胞的应用

### 3.1 造血干细胞和基因治疗

造血系统是基因治疗的理想靶标,HSCs可经离体基因操作、基因修饰后重新通过静脉输注到病人体内。HSCs可以在麻醉后通过骨髓穿刺获得。近年来,则通常使用血细胞单采术收集经细胞因子(如G-CSF)动员的外周血造血干细胞来进行常规异体和自体移植。而用HSCs做基因治疗也有几个挑战,HSCs数量稀少、归巢及分化功能容易在培养中受损。若根据细胞表面抗体定义HSCs(如CD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45RA<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD49f<sup>+</sup>)<sup>[20]</sup>,并纯化到较高纯度后用作临床,则会丢失大量细胞,使得干细胞数量减少。当前的临床所用HSCs主要来源于骨髓或动员的外周血干细胞,通常通过免疫磁珠分离和富集CD34<sup>+</sup>细胞群(占成年人骨髓细胞的~1%),其中包括极少比例的长周期多能HSCs和更多数量的短周期祖细胞。这种CD34<sup>+</sup>细胞的分离方法能够获得30~50倍富集的HSCs,去除了大部分原本含量较多的成熟血细胞。富集后的HSCs在体外短暂培养后便可做离体基因修饰。保证HSCs在基因修饰的过程中没有削弱造血干细胞的归巢和自我更新能力或引起其他不良作用以及HSCs数量是否足够,是基因导入或基因编辑成功的前提<sup>[21-24]</sup>。目前已经有多个结合病毒载体导入和造血干细胞的基因治疗临床实验,这些疾病包括X-连锁严重联合免疫缺陷病(X-SCID)、腺苷脱氨酶缺乏性重度联合免疫缺陷症(ADA-SCID)、戈谢病(Gaucher disease)、范可尼贫血(Fanconi anemia)、慢性肉芽肿(chronic granulomatous disease, CGD)和获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)等。

### 3.2 造血干细胞治疗 $\beta$ -血红蛋白病

$\beta$ -血红蛋白病是世界上分布最广的遗传性血液病,包括 $\beta$ -地中海贫血(地贫)和镰刀状贫血(镰贫),寻找新的针对 $\beta$ -血红蛋白病的治疗方法,对于提高病人生存率至关重要。目前,全球约有2.7亿人携带地贫基因,全球每年约有20万地贫重症患儿出生。所以,寻找新的治疗 $\beta$ -血红蛋白病方法治疗 $\beta$ -地贫对提高病人生存率至关重要。目前,中型和重型地贫患者治疗常规治疗是需要长期通过除铁和输血来维持生命,或者通过合适配型的异体造血干细胞移植彻底根治地贫疾病,但主要实施障碍是我国血液资源的紧缺及异体造血干细胞配型困难。因此,新型的基于患者自体造血干细胞移植的治疗方案不但可以起到对疾病终身治愈的目的,还可以大大缓解血库压力、节约血液资源。蓝鸟公司(bluebird bio)开发的LentiGlobin疗法通过慢病毒载体感染病人自体造血干细胞,然后再将整合有外源 $\beta$ -珠蛋白的造血干细胞移植回病人体内,从而重建具有正常 $\beta$ -珠蛋白的血液系统,起到治疗 $\beta$ -地贫的目的。此疗法已经进入临床实验阶段,并获得了不错的早期疗效,提示基于造血干细胞的基因治疗将是一个非常有力度的临床策略。但是,已有研究报道,慢病毒在造血干细胞中的随机整合具有致癌风险,同时慢病毒中的表达原件在造血干细胞长期归巢和自我更新的过程中会被逐渐沉默,使得疗效下降,有可能无法达到终身治愈的目的,因此这些疗效的评估需要长达数年甚至十年以上的长期临床观测。另外,临床所需的高浓度、高质量的慢病毒对设备和技术的要求极高,成本很难降低,导致此项疗法的收费将会极其昂贵。由此可见,并行的、更加安全的、成本更低的临床方案是非常有必要的<sup>[25-26]</sup>。

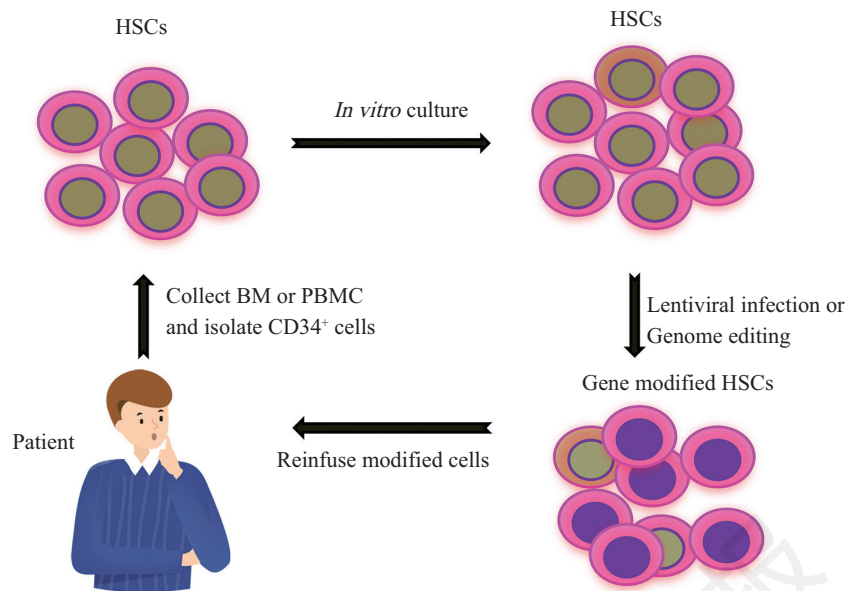
通过基因插入、缺失或替换手段,基因编辑技术已能用突变基因代替正常基因,也能够以正常基因代替突变基因,进行基因功能研究和疾病基因的治疗。DNA编辑的核酸酶有三类:锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)以及最新发现的规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced shortpalindromic repeats, CRISPR/Cas9)系统。其中,CRISPR/Cas9基因编辑系统一经发现,便由于其高效性和易使用性成为了风靡全球的基因编辑工具,无论在科研还是

临床上都展现出了无限的潜力。CRISPR/Cas9系统是细菌和古细菌为了防御入侵质粒或噬菌体的DNA而形成的。在该系统中,细菌和古细菌能把入侵生物的20 bp的短序列(protospacers)引入到自身的基因组,产生CRISPR。这些CRISPR结构域被翻译加工,从而产生CRISPR RNA(crRNA)和trans-activating crRNA(tracrRNA)。crRNA和tracrRNA复合体与Cas9蛋白结合形成一个活化的DNA内切酶,能够切开DNA靶位点。crRNA和tracrRNA在经过人们改造后又形成了单链引导RNA(single-chain guide RNA, sgRNA)。只需要设计sgRNA,配合单一的核酸内切酶,就可以对靶标DNA实现基因编辑<sup>[21]</sup>。

随着第一个自体造血干细胞的基因编辑利用ZFNs靶向CCR5被FDA批准用于治疗HIV感染的临床实验<sup>[27]</sup>,基于基因编辑的基因治疗拉开了序幕。当下,科学家们可以对特定基因区域进行多种多样的编辑:(1)利用DNA被切割后的NHEJ修复敲除基因或者编辑特定基因的表达调控区域;(2)同时导入Cas9和外源DNA供体,实现HDR介导的DNA修复,将特定DNA区域修复成目标序列,例如对特定点突变的DNA修复(图3)。

目前已有报道利用基于HDR的基因编辑策略来治疗镰刀状贫血,即对病人来源的造血干细胞进行编辑,之后进行自体干细胞移植,从而治疗疾病<sup>[28]</sup>。该项研究以CRISPR/Cas9为基因编辑工具,通过导入Cas9核糖核蛋白(RNP)和rAAV6供体,对HSCs的HBB基因完成了同源重组修复,有效地修正了病人HSPCs中SCD引起的E6V突变,之后将HSPCs分化为红细胞,成功表达成人 $\beta$ -珠蛋白( $\beta$ -globin) mRNA。证实了这种CRISPR为基础的以HDR方式靶向HSCs的HBB位点的编辑方法具有作为下一代治疗SCD疾病临床方案的潜力。但是如上所述,HDR介导的基因编辑效率仍然太低,而临床治疗所需的经过编辑的CD34<sup>+</sup>细胞最好能做到无需分选或者筛选,能直接回输治疗。此外,人体内真正能够长期归巢并自我更新的LT-HSCs是一群处于G<sub>0</sub>期的细胞,而研究表明,G<sub>0</sub>期细胞中的DNA修复很少以HDR的方式进行,主要通过NHEJ方式进行修复。因此,利用细胞内更加高效的NHEJ修复策略来进行疾病治疗将是一个可行性更高的策略。

BCL11A是HbF表达的抑制基因<sup>[30-31]</sup>,移植BCL11A基因被敲除或敲低后的HSCs进行自体造血干细胞移



收集病人骨髓或动员的外周血细胞, 分离CD34<sup>+</sup>造血干细胞进行体外慢病毒导入或基因编辑, 随后回输给病人进行造血重建, 从而纠正基因突变以及治疗疾病。

Bone marrow (BM) or mobilized peripheral blood (mPB) cells collected from the patient are reinfused after *ex vivo* gene editing for gene therapy.

图3 基因编辑结合自体造血干细胞移植治疗血液疾病

Fig.3 Autologous hematopoietic stem cell transplantation combined with gene editing

植来治疗 $\beta$ -血红蛋白病是极具潜力的治疗策略<sup>[32-33]</sup>。通过编辑*BCL11A*基因的增强子区域, 可以在红细胞前体细胞以及红细胞中特异性下调*BCL11A*表达, 而且不会影响其在HSCs、B细胞以及其他血液细胞中的功能。这使得编辑后的HSCs在移植到体内后可以正常归巢, 重建整个血液系统, 同时产生具有高HbF表达的红细胞, 最终达到有效治疗包括 $\beta$ -地贫在内的 $\beta$ -血红蛋白病的目的<sup>[34-38]</sup>。本课题组<sup>[39]</sup>也已证明利用改进过后的Cas9 RNP可以在造血干细胞中达到90%以上的基因编辑效率。CRISPR/Cas9技术高效编辑 $\beta$ -地贫病人的CD34<sup>+</sup>造血干/祖细胞中的*BCL11A*增强子序列, 使得CD34<sup>+</sup>细胞移植回体内后产生HbF表达被重新激活的红细胞, 从而治愈 $\beta$ -地贫疾病。

#### 4 总结和展望

HSCs存在于特殊的微环境 niche 中, niche 对 HSCs 维持自我更新能力和分化潜力的必不可少。近年来, 在不同间质和内皮骨髓细胞群定义方面的进展以及造血干细胞和祖细胞研究方面的进展, 大大地增加了对 HSCs 生长微环境和调控 HSCs 功能的分子机制的理解。除了维持 HSCs 动态平衡, niche 也涉及到包括血液恶性肿瘤在内的血液病的发病

机制。理解外在的调控因素、细胞微环境 niche 同 HSCs 的相互作用, 对寻找新的血液病治疗性策略以及增强血液再生和造血重建至关重要。更好地理解 niche 在血液病发展中发挥的作用, 了解在不同的血液病状态下, niche 受到哪种方式的修饰, 如何被修饰, 从而通过保护和改变特定 niche 的靶向治疗, 为血液病相关紊乱的治疗提供新的策略。虽然目前的结果表明, 间充质细胞对 HSCs 维持是必要的, 但是没有一类 niche 细胞类型足以单独维持 HSCs 的功能。另外, 细胞的表现遗传调控研究也使得人们对 HSCs 的形成和自我更新有了更深入的认识<sup>[40]</sup>。研究 niche 细胞如何通过塑造 HSCs 的表现遗传特性来影响其自我更新和分化将进一步加深人们对 HSCs 的认识。

近年来, 基于慢病毒载体和基因编辑结合自体造血干细胞移植的治疗策略得到了长足的发展, 同时在临床应用方面也展现出了极大的潜力。蓝鸟公司治疗地贫和镰贫的 LentiGlobin 的 2/3 期临床取得了很好的疗效。同时, 基于基因编辑的治疗策略, 例如针对 *HBB* 位点进行同源重组修复治疗镰刀状贫血疾病以及编辑 *BCL11A* 增强子<sup>[41]</sup> 或者 *HBB* 启动子位点<sup>[42]</sup> 重新激活胎儿血红蛋白来治疗地贫<sup>[43]</sup> 和镰贫<sup>[44]</sup> 的研究都取得了很好的临床前结果, 相关的临

床疗法CTX001也已经由福泰制药(Vertex)/CRISPR Therapeutics公司在欧洲和美国展开。相信随着造血干细胞基础研究的不断深入、各种基因导入和基因编辑技术的进步,以造血干细胞为载体的针对更多血液疾病或者免疫系统疾病的临床应用还会更加广泛,造福更多患者。同时,造血干细胞的基础研究和临床转化过程也给人们提供了大量可借鉴的知识和经验,将会大大推动整个干细胞领域的发展。

### 参考文献 (References)

- Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 2010; 115(19): 3861-8.
- Pineault N, Boyer L. Cellular-based therapies to prevent or reduce thrombocytopenia. *Transfusion* 2011; 51 Suppl 4: 72s-81s.
- Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010; 2(6): 640-53.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 2008; 135(6): 1118-29.
- Lunger I, Fawaz M, Rieger MA. Single-cell analyses to reveal hematopoietic stem cell fate decisions. *FEBS Lett* 2017; 591(15): 2195-212.
- Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development* 2018; 145(2): pii: dev139691.
- Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505(7483): 327-34.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4(1/2): 7-25.
- Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Med* 2014; 20(8): 833-46.
- Hira VVV, Van Noorden CJF, Carraway HE, Maciejewski JP, Molenaar RJ. Novel therapeutic strategies to target leukemic cells that hijack compartmentalized continuous hematopoietic stem cell niches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017; 1868(1): 183-98.
- Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Rev Immunol* 2017; 17(9): 573-90.
- Wei Q, Frenette PS. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity* 2018; 48(4): 632-48.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25(6): 977-88.
- Kimura Y, Ding B, Imai N, Nolan DJ, Butler JM, Rafii S. c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis. *PLoS One* 2011; 6(10): e26918.
- Papa L, Djedaini M, Hoffman R. Mitochondrial role in stemness and differentiation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells Int* 2019; 2019: 4067162.
- Lee J, Yoon SR, Choi I, Jung H. Causes and mechanisms of hematopoietic stem cell aging. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6): pii: E1272.
- de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood* 2018; 131(5): 479-87.
- 安瑞, 易微微, 鞠振宇. 造血干细胞衰老的研究进展. *生物化学与生物物理进展*(An Rui, Yi Weiwei, Ju Zhenyu. Progress in hematopoietic stem cell ageing research. *Prog Biochem Biophys*) 2014; 41(3): 238-46.
- 董芳, 郝莎, 程辉, 程涛. 造血干细胞生理调控及其分子基础研究进展. *生理学报*(Dong Fang, Hao Sha, Cheng Tao. Physiological regulation of hematopoietic stem cell and its molecular basis. *Acta Physiologica Sinica*) 2016; 68(04): 423-34.
- Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science (New York, NY)* 2011; 333(6039): 218-21.
- Yu KR, Natanson H, Dunbar CE. Gene editing of human hematopoietic stem and progenitor cells: Promise and potential hurdles. *Hum Gene Ther* 2016; 27(10): 729-40.
- Chaudhury S, Ayas M, Rosen C, Ma M, Viqaruddin M, *et al.* A multicenter retrospective analysis stressing the importance of long-term follow-up after hematopoietic cell transplantation for beta-thalassemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; 23(10): 1695-700.
- Morgan RA, Gray D, Lomova A, Kohn DB. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress and lessons Learned. *Cell Stem Cell* 2017; 21(5): 574-90.
- Hsieh MM, Wu CJ, Tisdale JF. In mixed hematopoietic chimerism, the donor red cells win. *Haematologica* 2011; 96(1): 13-5.
- Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005; 16(11): 1241-6.
- Persons DA. Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol Ther* 2010; 18(5): 861-2.
- DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, Li L, Rao A, Wang J, *et al.* Preclinical development and qualification of ZFN-mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016; 3: 16067.
- Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, *et al.* CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human hematopoietic stem cells. *Nature* 2016; 539(7629): 384-9.
- Ottaviani D, LeCain M, Sheer D. The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet* 2014; 30(3): 85-94.
- Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, Wu Y, Zeng J, Bauer DE, *et al.* An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat Biotechnol* 2018; 36(10): 977-82.
- Canver MC, Lessard S, Pinello L, Wu Y, Ilboudo Y, Stern EN, *et al.* Variant-aware saturating mutagenesis using multiple Cas9 nucleases identifies regulatory elements at trait-associated loci. *Nat Genet* 2017; 49(4): 625-34.
- Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene therapy for beta-hemoglobinopathies. *Mol Ther* 2017; 25(5): 1142-54.



- 33 Ghiaccio V, Chappell M, Rivella S, Breda L. Gene therapy for Beta-hemoglobinopathies: milestones, new therapies and challenges. *Mol Diagn Ther* 2019; 23(2): 173-86.
- 34 Xu J, Sankaran VG, Ni M, Menne TF, Puram RV, Kim W, *et al.* Transcriptional silencing of  $\gamma$ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev* 2010; 24(8): 783-98.
- 35 Brendel C, Guda S, Renella R, Bauer DE, Canver MC, Kim YJ, *et al.* Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *J Clin Invest* 2016; 126(10): 3868-78.
- 36 Tsang JC, Yu Y, Burke S, Buettner F, Wang C, Kolodziejczyk AA, *et al.* Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells. *Genome Biol* 2015; 16: 178.
- 37 Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutierrez L, Grech G, Fanis P, *et al.* Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet* 2010; 42(9): 801-5.
- 38 Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani-refah A, Pourfarzad F, van Ijcken W, *et al.* HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest* 2014; 124(4): 1699-710.
- 39 Zhou W, Zhao Q, Sutton R, Cumming H, Wang X, Cerruti L, *et al.* The role of p22 NF-E4 in human globin gene switching. *J Biol Chem* 2004; 279(25): 26227-32.
- 40 Yu VWC, Yusuf RZ, Oki T, Wu J, Saez B, Wang X, *et al.* Epigenetic memory underlies cell-autonomous heterogeneous behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 2017; 168(5): 944-5.
- 41 Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, *et al.* BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* 2015; 527(7577): 192-7.
- 42 Traxler EA, Yao Y, Wang YD, Woodard KJ, Kurita R, Nakamura Y, *et al.* A genome-editing strategy to treat beta-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med* 2016; 22(9): 987-90.
- 43 Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, Liu P, Yao Q, Lazzarotto CR, *et al.* Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2019; 25(5): 776-83.
- 44 Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, *et al.* CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* 2016; 539(7629): 384-9.