



EMA Hideo(依马秀夫), 日本籍, 实验血液学国家重点实验室研究员, 博士生导师。主要从事干细胞生物学和再生医学研究工作, 研究方向是造血干细胞生物学功能调控。依马秀夫教授先后在美国NIH、普林斯顿大学、法国巴斯德研究所、日本筑波大学等研究机构从事多年干细胞尤其是造血干细胞相关的系列研究, 尤其擅长利用系列单细胞技术体系开展造血干细胞生物学研究, 在造血干细胞的单细胞移植、造血干细胞的不对称分裂及其造血干细胞的谱系分化等方面颇有建树。目前作为负责人承担国家重点基础研究发展计划项目、国家自然科学基金委面上项目, 已在*Nature Protocols*、*Cell*、*Immunity*、*Blood*等著名刊物上发表文章60多篇, 在造血干细胞领域具有广泛的学术影响。

基于单细胞转录组分析的造血微环境研究进展

李夏琳 董芳* 依马秀夫*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 成体造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是一类主要定居于骨髓, 具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞。HSC能够源源不断地产生各谱系成熟血细胞以维持造血系统的动态平衡。HSC功能特性的维持不仅依赖细胞本身的内在调控, 还受到其所处的造血微环境或造血龕(hematopoietic microenvironment or hematopoietic niche)中多种成分的影响, 因此研究造血微环境对揭示稳态造血调控、HSC体外扩增以及血液系统疾病的发生和发展等具有重要意义。以往研究利用体内成像技术和细胞特异的基因敲除技术, 发现了造血微环境中多种细胞、细胞因子以及细胞外基质等成分。但作为一个复杂的三维系统, 造血微环境的细胞组成、空间区域划分以及在正常造血维持及应激条件下的作用目前仍有争议。近年来, 单细胞组学技术的迅速发展为阐明造血微环境的细胞和分子的异质性提供了新方法, 为造血微环境的研究翻开了新的篇章。该文就单细胞转录组测序技术在骨髓微环境研究领域的最新进展进行综述。

关键词 造血干细胞; 造血微环境; 单细胞转录组测序

Advances on Hematopoietic Microenvironment Based on Single-Cell Transcriptomic Analysis

LI Xialin, DONG Fang*, EMA Hideo*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-12-06

国家重点研发计划“干细胞及转化研究”项目(批准号: 2019YFA0110203)和国家自然科学基金(批准号: 82070112、82170118)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909173, E-mail: dongfang@ihcams.ac.cn; hema@ihcams.ac.cn

Received: November 5, 2021 Accepted: December 6, 2021

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China Stem Cell and Translational Research (Grant No.2019YFA0110203) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82070112, 82170118)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909173, E-mail: dongfang@ihcams.ac.cn; hema@ihcams.ac.cn

Abstract Adult HSC (hematopoietic stem cell) mainly resides in bone marrow and has the potential of self-renewal and multi-lineage differentiation. HSC is responsible for lifelong production of all blood lineages in response to the rapidly changing demands of the organism. The maintenance of HSC is orchestrated not only by intrinsic programs but also extrinsic signals from the hematopoietic microenvironment or niche. Therefore, the study of niche is of great significance to reveal the regulatory mechanism of steady-state and abnormal hematopoiesis, as well as explore novel strategies for HSC *ex vivo* expansion. Multiple cellular and molecular components of the niche have been identified by previous studies using imaging and cell type-specific gene knockout techniques. However, as a complex three-dimensional system, there is an ongoing debate as to the specification and localization of the niche cells and the role of the niche during homeostasis and stress. Recently, much progress has been made in single-cell technology, which allows to clarify the cellular and molecular heterogeneity with unprecedented resolution and opens a new chapter for niche study. This review focuses on the major findings in analysis of bone marrow niche by single-cell RNA sequencing.

Keywords hematopoietic stem cells; hematopoietic microenvironment; single cell RNA sequencing

造血微环境也称作造血龛,这一概念最初由SCHOFIELD^[1]在1978年提出,此后,对造血龛的认识主要来自显微镜技术对骨髓超微结构进行的分析和体外长期支持造血的Dexter培养体系,但造血龛的细胞类型没有被完全确定。2003年,SCADDEN研究组^[2]和LI研究组^[3]分别利用特异性在成骨细胞上进行转基因和基因敲除小鼠构建的小鼠模型,提出成骨细胞是造血龛的关键组分。2005年,MORRISON等^[4]证明SLAM蛋白家族成员可以作为表面标记简单高效地识别造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC),并发现HSC与血窦(sinusoid)相邻,认为血窦内皮是支持造血的重要组分。至今,这两大类细胞仍是造血微环境研究的焦点。另外,研究人员利用细胞特异的基因敲除技术相继鉴定出多种潜在的龛细胞,包括Lepr⁺细胞^[5]、CAR细胞^[6]、NG2⁺细胞、Nestin-GFP^{dim+}细胞^[7]等。近年发现,Schwann细胞^[8]、巨核细胞^[9]、免疫细胞^[10-12]等均参与造血龛的组成,也认识到可能存在不同的龛调控不同的HSC亚群^[13]。

虽然我们在揭示骨髓微环境的组成和调控功能方面取得了长足的进步,但是用单一标志物定义某群细胞会忽略细胞的异质性。另外,用遗传学方法增加或减少某种细胞或因子表达量,可能会对其他重要类型的细胞造成影响,骨髓原有的结构也会发生相应改变。随着体内成像技术的发展和HSC纯化示踪技术的提升,对HSC的区域划分有了新的观点和认识。基于HSC特异性报告基因小鼠的研究发现,HSC在骨髓内是随机分布的,与血管和骨内膜并

没有特定的位置关系^[14]。目前关于造血龛的细胞组成和空间定位仍存在争议,尤其是成骨细胞和血管内皮细胞是否构成不同的龛,骨髓各细胞成分之间如何协调HSC的功能等问题尚未完全被阐明。

随着单个细胞核酸提取技术的优化、大规模测序技术的发展以及生物信息学分析算法的改进,单细胞转录组测序(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)以及空间转录组测序(spatial transcriptomics sequencing)技术日趋完善,为解析造血微环境的细胞和分子异质性及其空间分布提供了强有力的手段。最近XUE等^[15]结合scRNA-seq、空间转录组以及群体细胞转录组,对斑马鱼尾部造血组织的转录组特征进行了详细阐述,描绘了造血干祖细胞和微环境细胞的分子调控网络;ZHU等^[16]将scRNA-seq和单细胞ATAC-seq结合,识别出内皮细胞向生血内皮细胞(hemogenic endothelial cell, HEC)转化的“中间阶段”及该阶段相关的调控分子;YVERNOGÉAU等^[17]联合scRNA-seq和RNA断层扫描测序(RNA tomography sequencing, Tomo-seq)研究造血微环境调控HSC胚胎发生的分子机制。本文着重阐述单细胞测序技术在骨髓造血龛细胞类型的研究方面的应用,以及应激和白血病条件下骨髓微环境的改变。

1 骨髓微环境的细胞组成

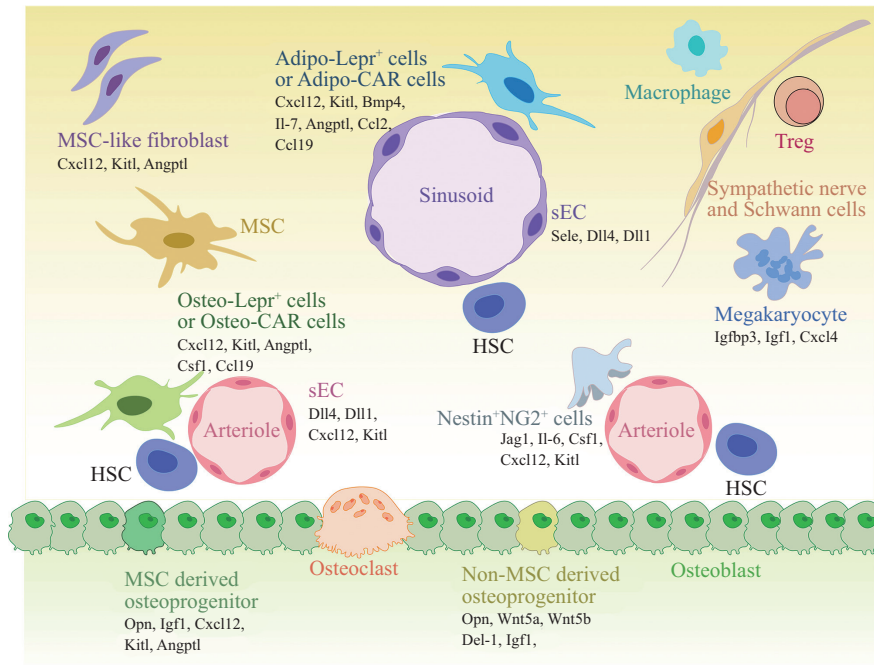
近年来,许多实验室利用scRNA-seq方法相继开展了小鼠骨髓基质细胞的研究工作,各个不同研究团队聚焦骨髓微环境研究的侧重点有所不同。WOLOCK等^[18]聚焦间充质谱系细胞,对骨髓中

非造血、非内皮细胞进行测序; TIKHONOVA等^[19]使用谱系特异的Cre重组酶重点关注三种不同造血龛: 即Lepr⁺间充质干细胞龛、Col2.3⁺成骨细胞龛和VE-Cad⁺血管细胞龛。BARYAWNO等^[20]对骨和骨髓的所有非造血细胞进行单细胞测序, 利用扩散映射(diffusion map)对数据非线性降维, 并通过基于分区的图抽象算法(partition-based graph abstraction, PAGA)在数据中注入拓扑结构且保留映射来推断细胞的分化轨迹。BACCIN等^[21]将空间转录组与单细胞测序结合, 通过激光捕获显微分割介导的转录组技术保留了细胞的空间信息, 估算了每种细胞在动脉区、血窦区、骨内膜区等显微区域的频率, 并用RNA Magnet分析确定了促进血因子的细胞来源。由于实验设计、样品制备、细胞来源等方面的差异, 各个研究团队发现的微环境细胞种类和频率有些许不同, 但结论大体一致, 即: 骨髓微环境的细胞组分主要包括血管周围基质细胞、血管内皮细胞、成骨谱系细胞(osteolineage cells, OLCs)和成纤维细胞(图1)。目前已知的骨髓龛细胞组分和单细胞转录组发

现的新认识见表1, 详细内容分述如下。

1.1 血管周围基质细胞

当证明SLAM蛋白家族能够标记相对纯化的HSC群体后, 利用成像技术发现骨髓中大多数CD150⁺CD48⁻CD244⁻HSC与血管相邻^[4], 提示血管内皮细胞和血管周围基质细胞对HSC调节的重要性。后续研究表明, 血管周围细胞不仅通过富集CXCL12、SCF等以维持HSC的经典造血因子^[6], 还具有间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)活性^[33], 在体外特定条件下可以分化为骨、软骨和脂肪, 移植后可在受体中形成具有一定组织结构的造血微环境, 并可在造血微环境中检测到供体来源的骨髓基质细胞和活跃造血^[34]。血管周围基质细胞常呈网状缠绕在小动脉周围, 与血窦结合较为松弛。这些血管周围基质细胞能够表达VCAM1等黏附分子和IL-7、Angpt1等信号分子, 通过与HSC表面的特异性受体结合将HSC锚定在骨髓中, 并调节HSC的自我更新、增殖和分化^[13]。然而越来越多的证据显示, 管周基质细胞是一个是异质性很高的群体, 各群细胞之间



单细胞转录组测序揭示了造血微环境细胞群体内部异质性, 尤其是血管周围基质细胞; 根据转录组特征, 血管周围基质细胞可分为三种: 成骨Lepr⁺细胞、成骨Lepr⁺细胞和Nestin⁺NG2⁺细胞。关于造血龛中是否存在更原始的MSC, 及其是否是血管周围基质细胞的分化源头等问题有待深入研究。

scRNA-seq reveals the heterogeneity within the niche cell populations, especially perivascular stromal cells, which can be divided into 3 categories: adipo-primed Lepr⁺ cells (or Adipo-CAR cells), osteo-primed Lepr⁺ cells (or Osteo-CAR cells) and Nestin⁺NG2⁺ cells. It remains to be settled as to whether there are more primitive MSCs in niche, also as the source of perivascular stromal cells.

图1 稳态下造血微环境的细胞和细胞因子组分

Fig.1 Hematopoietic niche cell populations and cytokines under homeostasis

表1 骨髓微环境细胞组分的类型、定位及其转录组特征

Table 1 Cell type, localization and transcriptional features of the hematopoietic niche

细胞亚群 Cell subtypes	定位 Localization	ScRNA-seq特征基因 ScRNA-seq signature genes	细胞因子 Cytokines	相互作用分子 Ligand/receptor pair	作用 Effects on HSC
Adipo-primed Lepr ⁺ cells (Adipo-CAR cells)	Perisinusoidal	<i>Cxcl12, Kitl, Vcam1, Nt5e, Eng, Adipoq, Lpl, Esm1, Mgp</i>	<i>Cxcl12, Scf, Angpt1, Angptl4, Il-7, Il-15, Il-34, Csf1, Bmp4, Bmp3, Cxcl14, Ccl19, Ccl2</i>	CXCL12/CXCR4 BMP4/BMPRI and BMPR2	Promote HSC retention ^[22] Regulate HSC self-renewal ^[23]
Osteo-primed Lepr ⁺ cells (Osteo-CAR cells)	Periarteriolar, nonvascular, trabecular region	<i>Cxcl12, Kitl, Wif1, Cd63, Sp7, Alpl, Spp1, Ibsp, Cd200, Tnc, Igfbp4, Postn</i>	<i>Cxcl12, Scf, Angpt1, Csf1, Ccl19</i>	SCF/c-Kit	Promote HSC maintenance ^[24-25]
Nestin ⁺ NG2 ⁺ cells	Periarteriolar	<i>Nes, Cspg4, Acta2, Myh11, Mcam, Spp1, Cdh2, Ngfr</i>	<i>Jag1, Il-6, Csf1, Cxcl12, Scf</i>	IL-6/IL-6R	Promote HSC self-renewal ^[26]
Arteriolar endothelial cells	Metaphysis, endosteum	<i>Pecam1, Cdh5, Tek, Ly6a, Cd34, Icam2, Podxl</i>	<i>Dll1, Dll4, Cxcl12, Scf</i>	DLL4/Notch receptor	Regulate HSC differentiation ^[19]
Sinusoidal endothelial cells	Throughout bone marrow	<i>Pecam1, Cdh5, Tek, Il-6st, Stab2, Emcn, Icam1, Flt4</i>	<i>Ang, Dll1, Dll4, Angptl4</i>	Angiogenin/unknown	Promote HSC maintenance and myelopoiesis ^[27]
MSC derived osteoprogenitors	Endosteum	<i>Runx2, Sp7, Grem1, CD200, Spp1, Lepr, Cxcl12, Kitl</i>	<i>Opn, Igf1, Cxcl12, Scf, Angpt1</i>	OPN/CD44 and integrins	Inhibit HSC function ^[28]
Non-MSC derived osteoprogenitors	Epiphysis	<i>Runx2, Sp7, Grem1, Spp1, Col12a1, Mmp13, Tnn, Ostn</i>	<i>Opn, Wnt5a, Wnt5b, Del-1, Igf1</i>	WNT5a/FZD	Promote HSC maintenance ^[29]
Mature osteoblasts	Endosteum	<i>Coll1a1, Bglap, Col11a2, Colla2, Sparc, Car3</i>			
MSC-like fibroblasts	Periarteriolar	<i>Fnl, Dcn, S100a4, Sema3c, Pdpn, Cd34, Ly6a, Pdgfra, Thy1, Cd44</i>	<i>Ccl7, Ccl11, Il-33, Cxcl1, Cxcl12, Scf, Angpt1</i>	ANGPT1/TEK	Indirectly regulate HSC by promoting vascular damage recovery ^[30-31]
Niche-associated megakaryocytes (embryonic)		<i>Coll1a1, Col3a1, Col6a2, Igfbp3, Ptn, Mfap4, Sparc, Anxa2</i>	<i>Igfbp3, Ptn, Angptl6,</i>	IGFBP3/IGF1R	Promote HSC proliferation ^[32]
Niche-associated megakaryocytes (adult)		<i>Mylk4, Wnt3a, Wnt4, Dkk1, Dkk2, Exoc8, Cplx2, Rab3c</i>	<i>Cxcl4, Igf1, Fgf10, Fgf9</i>	IGF1/IGF1R	Regulate HSC proliferation ^[32]

存在不同程度的重叠,且表型复杂,缺乏特异性表面标志将其区分。根据单细胞转录组测序结果,血管周围基质细胞可以划分为Lepr⁺细胞和Nestin⁺NG2⁺细胞两大类。

1.1.1 Lepr⁺细胞 瘦素受体(leptin receptor, Lepr)阳性细胞参与骨骼和脂肪生成的调控^[35],早期利用SCF-GFP、Lepr-Cre小鼠模型的研究显示血管周围

Lepr⁺细胞是骨髓中SCF和CXCL12的主要来源,从Lepr⁺细胞中剔除CXCL12或SCF能够大大降低骨髓中HSC的数量^[25,36],表明Lepr⁺细胞能够通过分泌细胞因子构建和维持造血龛。另外,利用CXCL12-GFP小鼠的研究揭示了血窦周围富含CXCL12的网状细胞,即CAR细胞的存在,其同样是CXCL12和SCF的重要来源^[6,37],并能够产生IL-7调节淋系祖细

胞和B细胞的分化和发育^[38]。大部分CAR细胞为瘦素受体阳性^[5]，借助单细胞转录组测序能够进一步阐释其分子特征和异质性。

根据转录组特征，Lepr⁺细胞可划分为成脂偏好和成骨偏好两类。成脂Lepr⁺细胞富集*Adipoq*和*Lpl*等，具有前体脂肪细胞特征；成骨Lepr⁺细胞则高表达*Sp7(Osterix)*、*Alpl*和*Runx2*等成骨特异基因。CAR细胞转录组特征与Lepr⁺细胞类似，也可分为成脂偏好(Adipo-CAR)和成骨偏好(Osteo-CAR)^[21]。其中Osteo-CAR细胞Lepr转录水平较低，因此Lepr-Cre转基因小鼠中Lepr-Cre只能标记部分CAR细胞^[5]。体外功能实验证实，成脂偏好Lepr⁺细胞在成纤维细胞集落形成单位(CFU-F)中显著富集，相较于其他血管外基质细胞有着更高的集落形成能力。影像学证据显示，成脂Lepr⁺细胞多围绕血窦分布，而成骨Lepr⁺细胞多定位于松质骨区域，与其成骨特征相一致。另一项研究将激光捕获显微分割技术与免疫荧光成像技术结合，进一步揭示了成骨Lepr⁺细胞在小动脉区域和非血管区域的分布^[21]。最近MORRISON研究组^[39]报道，Ostelectin特异性表达于小动脉周围的成骨Lepr⁺细胞上，Ostelectin⁺细胞能够通过感知机械力促进成体骨骼新生和维持淋巴造血。小动脉周围细胞数量随着衰老显著减少，而运动能够刺激体内Ostelectin⁺细胞的增殖，并有效提高骨强度和淋巴祖细胞数量。目前并不能明确成脂Lepr⁺细胞和成骨Lepr⁺细胞是否具有分化上的层级关系，也不能确定是否存在更原始的MSC作为二者共同的分化来源。因此，成脂Lepr⁺细胞和成骨Lepr⁺细胞的关系，以及MSC的鉴别和表征需要后续研究进一步探索。

1.1.2 Nestin⁺NG2⁺细胞 Nestin是一种细胞骨架蛋白，可通过带有*Nestin-GFP*的转基因报告小鼠模型观察其表达情况。MENDEZ-FERRER等^[7]利用*Nestin-GFP*小鼠的研究发现，Nestin-GFP⁺细胞在体外能够克隆样生长，并具有骨、脂肪和软骨分化潜能，在体内将Nestin-GFP⁺细胞剔除后HSC归巢能力下降，表明了Nestin⁺细胞在造血支持方面的作用。根据GFP表达能力的强弱，Nestin-GFP⁺细胞可分为两种：Nestin-GFP^{low}细胞数量较多，呈网状分布在血窦周围，约有80%与Lepr⁺细胞重叠；Nestin-GFP^{high}则相对较少，主要围绕小动脉分布，同时表达NG2(*Cspg4*)，其与小动脉周围的交感神经纤维和Schwann细胞组

成血管神经网络，共同调控HSC的静息^[40-41]。KHAN等^[42]研究表明，胎肝中Nestin⁺NG2⁺细胞与门静脉紧密相依，形成造血微环境促进HSC扩增；出生后门静脉表面Nestin⁺NG2⁺细胞丢失，肝脏中HSC数量大幅减少。然而，Nestin⁺NG2⁺细胞的研究离不开带有荧光标志的动物模型，这极大地限制了相关研究的开展。另外，同时表达Nestin和NG2的基质细胞十分稀少，它们定位往往也与Lepr-Cre细胞接近，至今仍缺乏特异性生物标志将其与Lepr-Cre细胞区分^[43]。

SCADDEN小组^[20]根据单细胞转录组测序结果，将同时表达Nestin、NG2，以及周细胞标志*Acta2*、*Myh11*、*Mcam*的细胞定义为Nestin⁺NG2⁺细胞。这群细胞并非同时高表达*Cxcl12*和*Kitl*，且Lepr转录水平相对较低，基于转录组特征可分为三簇：第一簇富集*Cdh2*、*Lepr*和*Ngfr*，*Kitl*表达量最高但*Cxcl12*表达量最低；第二簇细胞*Cxcl12*和*Kitl*表达水平均相对低下，分子特征类似小动脉周围细胞(NG2-CreER/Nestin-GFP^{high})^[41,44]；第三簇细胞*Cxcl12*转录水平最高但*Kitl*表达量最低，可能对应窦周细胞(Nestin-GFP^{low})^[7]。根据以上转录组特征可以将Nestin⁺NG2⁺细胞与Lepr⁺细胞区分，而Nestin⁺NG2⁺细胞不同的基因表达模式可能预示着三个亚群在HSC调控中的不同功能。

1.2 血管内皮细胞

内皮细胞在稳态下能够产生SCF、CXCL12、Notch配体、BMP2、Dhh、Wnt2等因子维持HSC静息和自我更新，在应激条件下能够产生IL-6、GM-CSF、G-CSF等促进HSC快速增殖和分化。另外HSPC与内皮的直接接触对其自我更新和增殖分化至关重要^[45]。骨是高度血管化的组织，长骨中沿骨干平行排列的中央动脉向骨内膜方向垂直发出放射状小动脉，在靠近骨内膜处反复分支形成毛细血管网，其中干骺端近生长板处的毛细血管呈拱形排列，被称为H型毛细血管^[46]；其周围聚集骨祖细胞、NG2⁺细胞和PDGFRβ⁺管周细胞^[47]，在血管形成和骨形成方面不可或缺。另外一种毛细血管对应骨髓中的血窦，遍布骨髓腔，与中心静脉相连，被称为L型毛细血管。血窦是薄壁膨胀的血管，与小动脉相比有着更高的通透性，周围活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平更高，促进HSPC分化和迁移；而小动脉通透性更低，周围ROS水平更低，常常维持HSC于静息状态^[48]。目前动脉和血窦如何协调调控HSC静止、增殖和动员等活动仍不明确。

骨髓血窦与动脉内皮细胞有许多共同表达的分子标志物, 如 *Cdh5(VE-Cad)*、*Pecam1(Cd31)*、*Tek(Tie2)*和 *Kdr(Flk1或Vegfr2)*等。根据差异表达基因, 内皮细胞可分为 *Sca1^{high}*小动脉内皮细胞 (arteriolar endothelial cells, AECs)和 *Stab2^{high}*血窦内皮细胞 (sinusoidal endothelial cells, SECs)。AECs富集 *Icam2*、*Ly6c1*、*Cd34*和 *Podxl*等; SECs高表达 *Icam1*、*Sele*、*Emcn*和 *Flt4(Vegfr3)*。Notch配体 *Dll4*在血窦和动脉内皮高度富集, 其能够抑制HSC中髓系分化程序的相关基因过早表达, 维持稳态下HSC各谱系细胞产出的平衡。此前有研究报道, 在衰老小鼠激活内皮Notch通路能够促进H型毛细血管和小动脉的增生, 增加小动脉周围PDGFR β ⁺和NG2⁺基质细胞数量, 从而提高SCF水平和骨髓中HSC比例^[47], 可见内皮来源Notch信号在HSC分化以及血管龕功能调节方面有着至关重要的作用。

近期一项利用人胎儿骨髓(fetal bone marrow, FBM)的研究揭示了FBM中血管内皮的转录组特征和空间分布特点^[49]。同小鼠骨髓内皮细胞类似, 人FBM的AECs表达高水平的 *Cd34*和 *Vim*, 以及新生内皮标志 *Unc5b*、*Dll4*和 *Pdgfb*; SECs特征性表达 *Ctsl*、*Stab2*和 *Sepp1*, 还显示出高水平的 *Thbs1*和 *Ccl14*的表达。 *Thbs1*能够促进HSPC在骨髓中的滞留^[50], *Ccl14*被报道与髓系祖细胞的增殖有关^[51]。免疫荧光成像显示, CD34^{high}VEGFR^{low}动脉内皮毗邻骺软骨; CD34^{low}VEGFR^{high}血窦内皮则在骨干区域卷曲交错形成复杂的网状结构; 而壁较厚的CD34^{high}血管来源于骨内膜及骨髓腔动脉, 常与CAR细胞共同定位于干骺端和骨干。这与小鼠骨髓中H型和L型血管的分布类似, 在造血支持方面发挥着不同的作用。

1.3 成骨谱系细胞

成骨细胞是最早被报道与HSC调控相关的细胞群体, 早期通过转基因技术在成骨细胞过表达甲状旁腺素, 观察到成骨细胞增多的同时伴有HSC数量的增多, 由此推测骨内膜的成骨细胞具有调控HSC的潜能^[2]。另外谱系示踪研究表明, 骨髓发育过程中 *Osterix(Sp7)*能够连续标记不同阶段的基质祖细胞, 围生期 *Osx⁺*细胞还具有MSPC的特性^[52]。然而利用 *Col2.3-Cre*、*Sp7-Cre*、*Bglap-Cre*等从成骨祖细胞及成熟成骨细胞中剔除CXCL12或SCF对HSC的影响甚微^[22,25,36]。随着对HSC表面标志的研究和成像技术的发展, 更多证据表明成熟成骨细胞更倾向于支

持淋巴系祖细胞, 而成骨谱系细胞更有可能是通过间接而非直接的方式影响HSC。骨内膜区域除了成骨细胞外, 还有众多其他细胞, 如间充质干细胞、破骨细胞、巨噬细胞等, 这些细胞不仅产生造血因子或细胞外基质, 还能通过多种信号分子相互作用, 共同协调调控HSC的功能^[13]。

最近一项研究表明, 青春期之前骨的形成由生长板内 *Acan⁺*软骨细胞主导, 青春期之后成骨细胞主要由 *Lepr⁺*细胞产生; 生长板软骨细胞调节骨的纵向延长, 而 *Lepr⁺*细胞调节横向成骨及骨组织重构^[53]。与此一致, 通过转录组测序也识别出 *Lepr⁺*细胞来源和非 *Lepr⁺*细胞来源的成骨细胞。其中, *Lepr⁺*源性成骨祖细胞特征性表达 *Runx2*、*Sp7*、*Grem1*等成骨分化早期标志^[54-55], 同时表达一定水平的 *Lepr*、*Cxcl12*、*Kitl*和 *Angpt1*, 推测其处于 *Lepr⁺*细胞向成骨细胞分化的过程中, 具有一定的造血支持作用; 非 *Lepr⁺*细胞来源的成骨祖细胞高表达 *Mmp13*, 与软骨内成骨联系紧密^[56], 而 *Cxcl12*、*Kitl*等表达水平极低。未来需要进一步阐明不同分化来源的OLCs在造血支持方面发挥作用的机制。成熟成骨细胞造血调控相关基因表达极低, 但近期研究表明成骨细胞对HSPC的调节可以通过细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)实现, 而不依赖传统配体-受体相互作用的细胞通讯方式^[57]。成骨细胞源性EVs中的tiRNA能够促进粒-单核系祖细胞(granulocyte-macrophage progenitors, GMPs)的蛋白质翻译和细胞增殖, 对应激过程中GMPs的活化、增殖和分化至关重要。

1.4 成纤维细胞

成纤维细胞是骨髓中普遍存在的间充质来源的细胞, 由表型和功能不同的亚群组成。由于缺乏独特的标记物和特异的形态, 成纤维细胞与血管周围基质细胞常被混淆^[58-59]。单细胞转录组测序结果显示, 成纤维细胞表达高水平的细胞外基质分子 *Fn1*和 *Dcn*, 以及低水平的软骨相关基因 *Sox9*、*Acan*和 *Col2a1*, 由此可与 *Lepr⁺*细胞和管周细胞区分开来。值得注意的是, 骨髓腔中有一群成纤维细胞高表达 *Cd34*、*Ly6a*、*Pdgfra*和 *Pdprn*, 主要分布在动脉周围^[60]; 其转录特征类似MSC, 并能表达造血调控相关基因, 可能与MORIKAWA等^[61]报道的PDGFR α ⁺*Sca-1⁺*CD45⁻TER119⁻(PaS)细胞存在重叠。免疫荧光成像显示, 成纤维细胞不仅分布在骨髓腔, 在骨骺及骨外膜区

域也有分布。与此一致的是,将骨消化后能够得到更多成纤维细胞^[20-21]。目前来自皮质骨、骨骺、骨外膜,以及骨髓腔等不同区域的成纤维细胞是否有相同的分化起源和功能特点尚不清楚,其与软骨、骨组织的发育和造血调控的关系也有待进一步阐明。

1.5 巨核细胞

既往研究对巨核细胞的认识常局限于生成止血凝血相关的血小板,近年来研究发现,巨核细胞还具有造血调控和免疫调节等多种功能^[62]。三维立体成像技术揭示了HSC常以非随机的方式分布于巨核细胞周围,后续研究表明巨核细胞在稳态下能够通过调控TGF β -1和CXCL4(PF4)维持HSC的静息和休眠;而在骨髓受到化疗损伤后,又可产生FGF-1促进HSC的扩增和骨髓造血的恢复^[9,63]。

利用单细胞测序对人卵黄囊和胎肝巨核细胞进行表征,发现了一群具有潜在造血支持功能的巨核细胞。这群细胞与细胞外基质合成相关,特征性高表达*Coll1a1*、*Col3a1*和*Col6a2*等,并富集TGF- β 应答相关基因集^[64]。差异基因分析显示,*Igfbp3*、*Ptn*和*Ccbe1*显著上调,此前有研究报道巨核细胞能够释放IGFBP3促进HSC增殖^[32];而*Ccbe1*正是胎肝中红细胞生成的关键调控因子^[65]。对巨核细胞分化轨迹的研究显示,造血调控相关巨核细胞的分化路径与免疫巨核细胞类似,而与经典的血小板生成、止血相关的巨核细胞不同。另外一项研究聚焦成年小鼠和人巨核细胞,通过scRNA-seq结合单个细胞的倍体信息,同样识别出一群与造血微环境有关的巨核细胞^[66],其高表达PF4(Cxcl4)和Igf1等造血因子,以及细胞黏附分子、Wnt信号分子等。这些研究证明,胚胎和成体骨髓中均存在部分巨核细胞参与调节HSC的活动,巨核细胞与HSC的相互作用在个体发育进程中如何变化有待深入探索。

2 骨髓微环境的造血因子

造血微环境对HSC的调控可通过黏附因子介导的细胞间直接接触和可溶性细胞因子介导的细胞信号转导等实现。识别促造血因子的细胞来源,以及基质细胞与HSC的相互作用分子有助于确定造血微环境的细胞成分及其调节HSC的分子机制。CXCL12和SCF是目前研究较为透彻的两种造血因子。CXCL12具有强趋化作用,能够结合HSC表面受体CXCR4,将HSC牢固地锚定在骨髓中;SCF是c-Kit

的配体,有助于维持HSC的静息状态,高浓度的SCF还可以促进HSC的自我更新。以CXCL12为例,几乎所有骨髓基质细胞都能产生CXCL12,但细胞特异性敲除实验表明,并非所有细胞产生的CXCL12都能影响HSC的活动:从Lepr-Cre中剔除CXCL12能够促进HSC的活化和动员;从Tie2-Cre靶向的内皮细胞中剔除CXCL12后HSC耗竭但并不动员^[36];从Sp7-Cre靶向的成骨祖细胞中删除CXCL12不影响HSC的数量和功能,但能减少pre-pro B细胞比例^[22]。可见不同细胞来源的CXCL12在造血调控中发挥着不同的功能;另外,不同细胞产生CXCL12的量可能不同,导致对HSC的作用不一致。除了CXCL12和SCF外,TPO也是调节HSC的重要造血因子。TPO与受体c-MPL结合能够促进血小板的生成^[67]和HSC的维持^[68]。证据显示,稳态和应激条件下调节HSC自我更新的TPO主要来自肝细胞,而骨髓中造血细胞、成骨细胞和基质细胞来源的TPO对HSC的自我更新能力影响甚微^[69-70]。造血因子的细胞来源及其对HSC的调控机制仍是造血微环境研究领域的一个重要课题。

BACCIN等^[21]通过空间转录组测序发现,骨髓内造血因子主要来自血窦和小动脉区域,同时利用RNA magnet算法分析了促造血因子的细胞来源,结果表明:Lepr⁺细胞(CAR细胞)是骨髓基质中产生细胞因子种类、数量最多的细胞,尤其是脂肪偏好的Lepr⁺细胞,除了生成*Cxcl12*、*Kitl*、*Angpt1*等关键造血因子外,还能合成大量*Il-7*、*Il-15*、*Il-34*、*Csfl*和*Bmp4*^[23,38,71]等调控因子,以及趋化因子*Ccl19*和*Ccl2*^[72]。另外,Lepr⁺细胞的转录活性大部分与造血因子合成有关,提示其可能作为骨髓内的“专职细胞因子合成者”发挥对HSC的调控作用。

除了Lepr⁺细胞外,骨髓龛中其他细胞也能产生多种因子共同调节HSC的活动,例如:血管内皮来源的*Angiogenin*、成骨祖细胞来源的*Wnt5a*,以及Nestin⁺NG2⁺细胞富集的*Jag1*等因子被报道有助于HSC静息状态的维持^[27,29];而血管内皮特异的Notch配体*Dll4*,以及成骨祖细胞来源的*Wnt5b*和*Del-1*能够参与髓系分化^[73-75]。其他细胞组分及其产生的促造血因子见表1。

3 应激条件下骨髓龛的细胞和分子组成变化

稳态下,血细胞和免疫细胞以相对稳定的方式

被替换,但在应激状态如化疗、感染、炎症或失血时,LT-HSC会迅速启动分裂,并且剧烈地向髓系细胞分化,为机体提供快速保护。但这一过程是短暂的,HSC最终会回到静息状态,以避免HSC的耗竭,并保证各谱系血细胞的产生^[76]。

化疗可以引起BM内广泛的细胞应激,杀伤快速分裂的造血祖细胞,驱动静止HSC增殖和分化。有研究表明,小鼠在接受致死剂量照射或化疗药物5-FU处理后,血管系统和血管周围细胞遭到破坏,而骨髓中脂肪细胞则快速扩增^[77]。与此一致的是,给予5-FU处理后脂肪偏好的Lepr⁺细胞上调成脂特异基因,而成骨偏好的Lepr⁺细胞下调成骨特异基因^[78]。此外,Notch、Wnt等关键通路的信号强度发生改变,成骨祖细胞的*Wnt5a*、内皮细胞的*Ang*以及Lepr⁺细胞的*Il7*和*Bmp4*等信号上调;相反,Lepr⁺细胞的*Wnt4*,血管内皮黏附分子*Sele*以及Notch配体*Dll4*和*Dll1*等显著下调^[19]。

机体发生感染或炎症时,血管内皮细胞在VEGF的作用下快速激活、增殖,管壁通透性增加;同时上调TLR4和MyD88的表达,并产生G-CSF,该因子不仅在髓系祖细胞向成熟粒细胞分化过程中起到关键作用,还能抑制Lepr⁺细胞产生CXCL12,从而减少HSC在骨髓的滞留,促进HSC向髓外迁移。单细胞测序结果表明,对小鼠注射LPS或pIpC诱导急性炎症反应后,Lepr⁺细胞和血管内皮显著上调趋化因子*Ccl5*、*Ccl6*、*Ccl19*,以及*Cxcr3*配体*Cxcl9*、*Cxcl10*和*Cxcl11*表达。另外,Lepr⁺细胞中*Il-6*表达增加,而*Il-7*、*Cxcl12*和*Kitl*表达明显下降。这一过程能够进一步促进髓系细胞扩增,抑制淋系造血,并促进HSC的活化和动员。

4 白血病条件下骨髓龕的细胞和分子组成变化

血液恶性疾病的发生发展伴随着骨髓微环境中因子和细胞成分的重塑。一方面,肿瘤细胞可以改变基质细胞的分化路径和造血因子的分泌,抑制正常造血,并将正常造血龕塑造成为有利于肿瘤进展的微环境。另一方面,骨髓龕基质细胞的异常改变也影响着白血病的发生发展。最近研究表明,内皮细胞分泌的细胞外小囊泡(small extracellular vesicles, SEVs)能够与白血病细胞的LILRB2受体结合,改变白血病细胞的功能并促进白血病的进展^[79]。因

此,研究肿瘤细胞-基质细胞相互作用机制能够为靶向基质细胞的抗肿瘤治疗提供思路。

比较正常小鼠和急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)小鼠基质细胞的转录图谱,可发现多种细胞成分改变。(1)成骨细胞分化受阻:成骨祖细胞比例上升,而成熟成骨细胞并没有明显增多。与此同时,各个阶段的OLCs呈现出不同程度的*Runx2*、*Sp7*和*Bglap*的下调,并显示出*Igfbp3*、*Mgp*、*Mmp2*和*Mmp11*等基因的表达,这些基因与抑制骨形成、抑制钙化,以及促进细胞外基质降解相关。(2)Lepr⁺细胞分化受阻:Lepr⁺细胞下调*PPAR*、*Adipoq*,以及*Grem1*、*BMP*等成脂和成骨分化相关基因表达;并上调低氧通路基因*Epas1*(*Hif-2a*)和维持Lepr⁺细胞于低分化状态的*Wisp2*。(3)血管内皮细胞减少而动脉内皮细胞增多:异常增生的血管网不仅能够为肿瘤细胞的生长和转移提供氧气和营养,还能通过黏附分子介导白血病细胞的附着和迁移。上述变化与此前报道一致,从转录水平反映了AML骨髓中成骨分化受限、骨形成和骨吸收异常、Lepr⁺细胞造血支持功能受损,以及血管重塑等特点^[80-81]。

除了细胞组成外,促造血因子的分泌也发生改变。在小鼠AML模型中,Lepr⁺细胞、早期成骨祖细胞、动脉内皮细胞产生的*Cxcl12*、*Kitl*、*Angpt1*、*Il7*、*Csfl*和*Vcam1*等减少,这不利于HSC在骨髓中的锚定和滞留,促进髓外造血的发生。相反,HSC池负向调控因子*Spp1*显著上调,使得HSPC的增殖受到抑制;该因子也被报道与AML患者的不良预后有关^[82]。最后,部分成纤维细胞中*Cxcl12*、*Kitl*和*Angpt1*的表达增加,这些成纤维细胞可能对应COSTA等^[83]报道的CAF(carcinoma-associated fibroblast),参与肿瘤的远处转移^[84]。

5 总结与展望

单细胞测序分析系统地绘制了骨髓微环境的转录景观,从分子层面解析了骨髓造血微环境在稳态、应激和疾病条件下细胞组成的变化以及细胞亚群的分布,并阐述了造血生长因子、趋化因子和膜结合配体的细胞来源,为揭示骨髓微环境与HSC相互作用的机制提供了线索。由转录组测序的结果可知:(1)Lepr⁺细胞可分为成脂偏好和成骨偏好两大类,这两大类细胞或许具有分化上的递进关系,

Lepr⁺细胞能够合成大部分造血调控因子,因此推测骨髓基质的不同区域有着不同的细胞因子浓度,这可能影响HSC的命运决定;(2) 动脉内皮细胞表达更高水平的造血调控因子,而静脉内皮细胞表达更多黏附分子,二者通过不同的方式介导HSC的静息维持、自我更新,以及分化、迁移等活动;(3) 成骨细胞来源于软骨细胞或Lepr⁺细胞,成熟成骨细胞虽然不表达造血调控因子,但是可以通过EVs等非细胞因子依赖的方式与HSC发生联系;(4) 部分成纤维细胞能分泌造血因子,其转录组特征类似于MSC,能够参与骨髓基质的构建与肿瘤转移。近年来,单细胞培养、单细胞移植以及谱系示踪等实验表明,HSC在自我更新能力、谱系分化偏向和细胞周期状态等方面呈现出异质性^[85];根据scRNA-seq数据显示,Lepr⁺细胞、成骨细胞、成纤维细胞等微环境细胞也存在不同程度的异质性。未来研究需要进一步明确微环境细胞不同亚群的生物学功能,以及其异质性对HSC异质性的影响。

尽管单细胞测序能够提供大量信息,但该技术 在造血微环境领域方面的应用仍存在问题。首先,单细胞在骨组织的捕获就存在一定难度,而保证单细胞的活性和完整性是单细胞测序成功的关键步骤之一^[86];同时,长骨、扁骨等不同骨组织在解剖学上的差异,以及消化等处理方式的不同也可能干扰细胞状态,使获得的细胞类型产生偏倚。其次,测序产生的高维度数据往往噪声大,需要先进的机器学习模型和优化的数学方法对所有数据进行整合、分析;再次,细胞的生长、分化是一个连续动态的过程,scRNA-seq识别的部分细胞处于“中间状态”,这些细胞类型之间的界限不甚清晰,也为细胞的分类和注释加大了难度。最后,单细胞转录组样本制备过程中不可避免地丢失了细胞的空间信息,而目前空间转录组的分辨率尚未达到单细胞水平,为HSC和基质细胞的精确定位带来了挑战。未来的研究需要突破这些技术上的限制,结合基因打靶、谱系示踪方法和成像技术探究微环境的细胞组成和空间分布,并整合蛋白质组学、表观遗传学等多组学数据进一步探究细胞和分子异质性及微环境在造血调控中的作用。

参考文献 (References)

[1] SCHOFIELD R. The relationship between the spleen colony-

- forming cell and the haemopoietic stem cell [J]. *Blood cells*, 1978, 4: 7-25.
- [2] CALVI L, ADAMS G, WEIBRECHT K, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche [J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 841-6.
- [3] ZHANG J, NIU C, YE L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size [J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 836-41.
- [4] KIEL M, YILMAZ O, IWASHITA T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells [J]. *Cell*, 2005, 121(7): 1109-21.
- [5] ZHOU B, YUE R, MURPHY M, et al. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow [J]. *Cell stem cell*, 2014, 15(2): 154-68.
- [6] SUGIYAMA T, KOHARA H, NODA M, et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches [J]. *Immunity*, 2006, 25(6): 977-88.
- [7] MENDEZ-FERRER S, MICHURINA T, FERRARO F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 829-34.
- [8] YAMAZAKI S, EMA H, KARLSSON G, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche [J]. *Cell*, 2011, 147(5): 1146-58.
- [9] BRUNS I, LUCAS D, PINHO S, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion [J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1315-20.
- [10] FUJISAKI J, WU J, CARLSON A, et al. *In vivo* imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche [J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 216-9.
- [11] WINKLER I, SIMS N, PETTIT A, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs [J]. *Blood*, 2010, 116(23): 4815-28.
- [12] HUR J, CHOI J, LEE H, et al. CD82/KAI1 Maintains the dormancy of long-term hematopoietic stem cells through interaction with DARC-expressing macrophages [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(4): 508-21.
- [13] MORRISON S, SCADDEN D. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 327-34.
- [14] KOKKALIARIS K, KUNZ L, CABEZAS-WALLSCHEID N, et al. Adult blood stem cell localization reflects the abundance of reported bone marrow niche cell types and their combinations [J]. *Blood*, 2020, doi: 10.1182/blood.2020006574.
- [15] XUE Y, LIU D, CUI G, et al. A 3D atlas of hematopoietic stem and progenitor cell expansion by multi-dimensional RNA-Seq analysis [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(5): 1567-78, e5.
- [16] ZHU Q, GAO P, TOBER J, et al. Developmental trajectory of prehematopoietic stem cell formation from endothelium [J]. *Blood*, 2020, 136(7): 845-56.
- [17] YVERNOGÉAU L, KLAUS A, MAAS J, et al. Multispecies RNA tomography reveals regulators of hematopoietic stem cell birth in the embryonic aorta [J]. *Blood*, 2020, 136(7): 831-44.
- [18] WOLOCK S L, KRISHNAN I, TENEN D E, et al. Mapping distinct bone marrow niche populations and their differentiation paths [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(2): 302-11, e5.

- [19] TIKHONOVA A, DOLGALEV I, HU H, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution [J]. *Nature*, 2019, 569(7755): 222-8.
- [20] BARYAWNO N, PRZYBYLSKI D, KOWALCZYK M, et al. A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia [J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1915-32, e16.
- [21] BACCIN C, AL-SABAH J, VELTEN L, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(1): 38-48.
- [22] GREENBAUM A, HSU Y, DAY R, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance [J]. *Nature*, 2013, 495(7440): 227-30.
- [23] WARSI S, BLANK U, DAHL M, et al. BMP signaling is required for postnatal murine hematopoietic stem cell self-renewal [J]. *Haematologica*, 2021, 106(8): 2203-14.
- [24] YOSHIHARA H, ARAI F, HOSOKAWA K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6): 685-97.
- [25] DING L, SAUNDERS T, ENIKOLOPOV G, et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 457-62.
- [26] BERNAD A, KOPF M, KULBACKI R, et al. Interleukin-6 is required *in vivo* for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system [J]. *Immunity*, 1994, 1(9): 725-31.
- [27] GONCALVES K, SILBERSTEIN L, LI S, et al. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells [J]. *Cell*, 2016, 166(4): 894-906.
- [28] NILSSON S K, JOHNSTON H M, WHITTY G A, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, 106(4): 1232-9.
- [29] MASTELARO DE REZENDE M, ZENKER JUSTO G, JULIAN PAREDES-GAMERO E, et al. Wnt-5A/B signaling in hematopoiesis throughout life [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1801.
- [30] TEE J K, SETYAWATI M I, PENG F, et al. Angiopoietin-1 accelerates restoration of endothelial cell barrier integrity from nanoparticle-induced leakiness [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(5): 682-700.
- [31] ARAI F, HIRAO A, OHMURA M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [J]. *Cell*, 2004, 118(2): 149-61.
- [32] HEAZLEWOOD S Y, NEAVES R J, WILLIAMS B, et al. Megakaryocytes co-localise with hemopoietic stem cells and release cytokines that up-regulate stem cell proliferation [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11(2): 782-92.
- [33] SACCHETTI B, FUNARI A, MICHIEZI S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment [J]. *Cell*, 2007, 131(2): 324-36.
- [34] FRENETTE P S, PINHO S, LUCAS D, et al. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 285-316.
- [35] YUE R, ZHOU B, SHIMADA I, et al. Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 782-96.
- [36] DING L, MORRISON S. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches [J]. *Nature*, 2013, 495(7440): 231-5.
- [37] OMATSU Y, SUGIYAMA T, KOHARA H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche [J]. *Immunity*, 2010, 33(3): 387-99.
- [38] CORDEIRO GOMES A, HARA T, LIM V, et al. Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation [J]. *Immunity*, 2016, 45(6): 1219-31.
- [39] SHEN B, TASDOGAN A, UBELLACKER J, et al. A mechano-sensitive peri-arteriolar niche for osteogenesis and lymphopoiesis [J]. *Nature*, 2021, 591(7850): 438-44.
- [40] PINHO S, FRENETTE P S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(5): 303-20.
- [41] KUNISAKI Y, BRUNS I, SCHEIERMANN C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence [J]. *Nature*, 2013, 502(7473): 637-43.
- [42] KHAN J A, MENDELSON A, KUNISAKI Y, et al. Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels [J]. *Science*, 2016, 351(6269): 176-80.
- [43] ARMULIK A, GENOV G, BETSHOLTZ C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(2): 193-215.
- [44] COUTU D L, KOKKALIARIS K D, KUNZ L, et al. Three-dimensional map of nonhematopoietic bone and bone-marrow cells and molecules [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(12): 1202-10.
- [45] RAFII S, BUTLER J M, DING B S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 316-25.
- [46] KUSUMBE A, RAMASAMY S, ADAMS R. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 323-8.
- [47] KUSUMBE A P, RAMASAMY S K, ITKIN T, et al. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 380-4.
- [48] ITKIN T, GUR-COHEN S, SPENCER J A, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis [J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 323-8.
- [49] JARDINE L, WEBB S, GOH I, et al. Blood and immune development in human fetal bone marrow and Down syndrome [J]. *Nature*, 2021, 598(7880): 327-31.
- [50] LONG M W, BRIDDELL R, WALTER A W, et al. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 251-5.
- [51] SCHULZ-KNAPPE P, MÄGERT H J, DEWALD B, et al. HCC-1, a novel chemokine from human plasma [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(1): 295-9.
- [52] MIZOGUCHI T, PINHO S, AHMED J, et al. Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development [J]. *Dev Cell*, 2014, 29(3): 340-9.
- [53] SHU H S, LIU Y L, TANG X T, et al. Tracing the skeletal pro-

- genitor transition during postnatal bone formation [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, doi: 10.1016/j.stem.2021.08.010.
- [54] HUANG W, YANG S, SHAO J, et al. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 3068-92.
- [55] WORTHLEY D, CHURCHILL M, COMPTON J, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential [J]. *Cell*, 2015, 160: 269-84.
- [56] NISHIMURA R, WAKABAYASHI M, HATA K, et al. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(40): 33179-90.
- [57] KFOURY Y S, JI F, MAZZOLA M, et al. tiRNA signaling via stress-regulated vesicle transfer in the hematopoietic niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, doi: 10.1016/j.stem.2021.08.014.
- [58] KALLURI R. The biology and function of fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 582-98.
- [59] UGURLU B, KARAOZ E. Comparison of similar cells: mesenchymal stromal cells and fibroblasts [J]. *Acta Histochem*, 2020, 122(8): 151634.
- [60] HELBLING P M, PIÑEIRO-YÁÑEZ E, GEROSA R, et al. Global transcriptomic profiling of the bone marrow stromal microenvironment during postnatal development, aging, and inflammation [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(10): 3313-30.e4.
- [61] MORIKAWA S, MABUCHI Y, KUBOTA Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2483-96.
- [62] LIU C, WU D, XIA M, et al. Characterization of cellular heterogeneity and an immune subpopulation of human megakaryocytes [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(15): e2100921.
- [63] ZHAO M, PERRY J M, MARSHALL H, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells [J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1321-6.
- [64] ABBONANTE V, DI BUDUO C, GRUPPI C, et al. Thrombopoietin/TGF- β 1 loop regulates megakaryocyte extracellular matrix component synthesis [J]. *Stem cells*, 2016, 34(4): 1123-33.
- [65] ZOU Z, ENIS D, BUI H, et al. The secreted lymphangiogenic factor CCBE1 is essential for fetal liver erythropoiesis [J]. *Blood*, 2013, 121(16): 3228-36.
- [66] SHU S, CHEN J, JIA S, et al. Single-cell analysis of ploidy and transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis [J]. *Blood*, 2021, 138(14): 1211-24.
- [67] KIMURA S, ROBERTS A W, METCALF D, et al. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(3): 1195-200.
- [68] QIAN H, BUZA-VIDAS N, HYLAND C D, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6): 671-84.
- [69] DECKER M, LESLIE J, LIU Q, et al. Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance [J]. *Science*, 2018, 360(6384): 106-10.
- [70] LONGFEI G, MATTHEW D, HAIDEE C, et al. Thrombopoietin from hepatocytes promotes hematopoietic stem cell regeneration after myeloablation [J]. *eLife*, 2021, 10: e69894.
- [71] MIAO R, LIM V Y, KOTHAPALLI N, et al. Hematopoietic Stem cell niches and signals controlling immune cell development and maintenance of immunological memory [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 600127.
- [72] SHI C, JIA T, MENDEZ-FERRER S, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands [J]. *Immunity*, 2011, 34(4): 590-601.
- [73] GILADI A, PAUL F, HERZOG Y, et al. Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 836-46.
- [74] DE REZENDE M M, NG-BLICHFELDT J P, JUSTO G Z, et al. Divergent effects of Wnt5b on IL-3- and GM-CSF-induced myeloid differentiation [J]. *Cell Signal*, 2020, 67: 109507.
- [75] MITROULIS I, CHEN L S, SINGH R P, et al. Secreted protein Del-1 regulates myelopoiesis in the hematopoietic stem cell niche [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3624-39.
- [76] PIETRAS E. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease [J]. *Blood*, 2017, 130(15): 1693-8.
- [77] ZHOU B, YU H, YUE R, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(8): 891-903.
- [78] TIKHONOVA A, LASRY A, AUSTIN R, et al. Cell-by-cell deconstruction of stem cell niches [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 27(1): 19-34.
- [79] HUANG D, SUN G, HAO X, et al. ANGPTL2-containing small extracellular vesicles from vascular endothelial cells accelerate leukemia progression [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1): e138986.
- [80] DUARTE D, HAWKINS E D, AKINDURO O, et al. Inhibition of Endosteal vascular niche remodeling rescues hematopoietic stem cell loss in AML [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(1): 64-77.e6.
- [81] KUMAR B, ORELLANA M, BROOKS J, et al. Exosomes-driven lipolysis and bone marrow niche remodeling supports leukemia expansion [J]. *Haematologica*, 2020, 106(5): 1484-8.
- [82] CHEN Y B, REN S M, LI S D, et al. Prognostic significance of osteopontin in acute myeloid leukemia: a meta-analysis [J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 7(2): 275-80.
- [83] COSTA A, KIEFFER Y, SCHOLER-DAHIREL A, et al. Fibroblast Heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3): 463-79.e10.
- [84] AHIRWAR D, NASSER M, OUSEPH M, et al. Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation [J]. *Oncogene*, 2018, 37(32): 4428-42.
- [85] HAAS S, TRUMPPA, MILSOM M D. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(5): 627-38.
- [86] MARX V. Method of the year: spatially resolved transcriptomics [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 9-14.