

特约综述



本实验室主要利用“基因敲除”小鼠为模式生物, 研究调节造血干细胞“自我更新”与分化的表观遗传调控机制。目前, 主要的研究方向集中在: 组蛋白甲基转移酶在造血免疫细胞发生发育与功能行使过程中的作用机制; 多潜能干细胞向造血干细胞的体外分化, 以及造血干细胞的体外扩增。

http://www.shanghaipasteur.cas.cn/kxyj/yjdy/zxgxb/200907/t20090702_1909356.html

胚胎干细胞向造血细胞分化的研究进展

王 振^{1,2} 丁晓丹² 张 岩^{2*} 袁金铎¹

(¹山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ²中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200025)

摘要 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)依靠其多能性(pluripotency)成为研究造血发生(hematopoiesis)的良好材料。随着近年来ESCs向造血细胞体外分化系统的建立, 为研究血液中不同类型细胞的发生发育提供了有用的研究模型。借助这些模型, 使得我们对造血发生的研究逐步深入, 我们对于造血系统的谱系分化有了更深刻的认识。该文对近年来ESCs向多种成熟血细胞的分化体系进行总结与展望。

关键词 造血细胞; 胚胎干细胞; 体外分化

Hematopoietic Differentiation of Embryonic Stem Cells

Wang Zhen^{1,2}, Ding Xiaodan², Zhang Yan^{2*}, Yuan Jinduo¹

(¹College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 200014, China; ²Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract The embryonic stem cells (ESC) have been successfully used to study the development of the hematopoietic cell lineages. During the past decades, an increasing number of studies have demonstrated the *in vitro* hematopoietic differentiation systems of both mouse and human ESC cells, which provide useful tools for elucidating the regulation of hematopoietic development. In this review, we summarize the recent progress in the hematopoietic differentiation from pluripotent embryonic stem cells.

Key words embryonic stem cells; *in vitro* differentiation; hematopoiesis

国家自然科学基金(批注号: 30971672)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 021-54653078, Email: yan_zhang@sibs.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30971672)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-54653078, Email: yan_zhang@sibs.ac.cn

1 前言

1981年, Evans和Kaufman Martin成功地将胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)细胞从小鼠囊胚分离获得^[1], 人类的ESC也于1998年由Thomson等^[2]分离建系。此后, ESC作为研究细胞分化机制的良

好模型被广泛应于向各种成熟体细胞的分化研究中。例如, 2001年Carpenter等^[3]和Schuldiner等^[4]分别报道了ESC分化成神经元细胞, Kehat等^[5]报道的ESC分化为成心肌细胞, Assady等^[6]报道了ES细胞分化为胰腺细胞, Sottile等^[7]报道的ESC分化为成骨细胞以及Kaufman等^[1]报道的ES细胞分化为造血系统的细胞。另一方面, 近年来的研究显示, 体细胞在四个转录因子Oct-4、Klf-4、Sox-2和c-Myc的作用下可以重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)^[8]。由于人iPSC可以较容易地由个体自身的体细胞经诱导获得, 同时避免伦理方面的问题, 因此, iPSC被认为是替代ESC的良好材料。

哺乳动物的血液系统包含有多种类型的成熟血细胞, 都是由造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)分化而来, 由造血干细胞分化为成熟血细胞的过程, 称为造血过程(Hematopoiesis)。随着近年来人们对多种“转基因”与“基因敲除”小鼠模型的研究, 越来越多的参与造血发生的转录调控因子以及信号通路被发现, 对造血干细胞的分化过程有了越来越深刻的了解, 造血细胞的分化谱系也已经初步确立, 造血细胞的体外定向分化也可以初步实现。但是如何更加有效的实现造血细胞的定向分化以及自我更新和分化的调节机制, 以及造血细胞与微环境(Niche)的相互作用仍然是这个领域中的重要研究方向。

2 造血细胞的分化谱系

哺乳动物造血发生部位随着胚胎发育而逐步改变, 大致依次经历卵黄囊-主动脉-性腺-中肾区(aorta-goand mesonephros, AGM)-胚肝, 最终定居在骨髓的过程。此外, 在AGM到胚肝的过程中, 胎盘中也有大量的造血干细胞参与了造血过程。随着造血过程发生部位的改变, 造血干细胞的微环境(Niche)也随之改变。在不同的微环境中, 具有造血能力不同干细胞的造血能力也有不同。例如, 卵黄囊区的造血祖代细胞(hemangioblast)直接分化发育出大量的红细胞, 以支持胚胎发育过程的氧气运输, 很少分化出其他类型的血液细胞; AGM区的造血干细胞则可以在“自我更新”的同时分化出少量的前体细胞; 在胚肝中, 造血干细胞分化出更多的各种类型的前体细胞; 最终在骨髓中, 造血干细胞稳定的分化为各个谱系成熟的具有功能的细胞。此外, 在胚肝

中造血干细胞大部分处于细胞周期中, 而骨髓中的造血干细胞大部分则处于静止状态。这些变化反映了造血干细胞逐步成熟的过程, 以及支持造血干细胞发育的微环境的改变。

1988年, Weissman实验室首先从小鼠骨髓中分离出了造血干细胞, 发现HSC存在于Lin⁻、Thy-1^{low}、Sca-1⁺细胞中^[9]; 在1990年他们又通过限制稀释和单细胞实验证明了在上述细胞群中, 大约每39个细胞中就有一个LT-HSC, 能够分化成各个谱系的克隆^[10]。1988年, Spangrude将分离得到的HSC分为三类: 长效造血干细胞(long-term HSC, LT-HSC)、短效造血干细胞(short-term HSC, ST-HSC)和多潜能干细胞(multipotent progenitor, MPP)^[11]。1996年, Osawa等^[12]利用单细胞移植造血重建实验, 证明了单个Lin⁻、Sca-1⁺、c-Kit⁺、CD34^{low}细胞就能够重建小鼠的造血系统。目前, 在骨髓中比较公认的HSC分化谱系如图1所示: 首先, 在骨髓中存在着比较原始的、具有自我更新能力的造血干细胞(HSC)。HSC又可以进一步分为长效造血干细胞(LT-HSC)和短效造血干细胞(ST-HSC)。其中, LT-HSC终生具有“自我更新”的能力, 而ST-HSC只保有有限的“自我更新”的功能。多潜能干细胞(MPP)可以分化为共同淋巴系前体细胞(common lymphoid progenitors, CLP)和共同髓系前体细胞(common myeloid progenitors, CMP)它们都是已经决定的祖细胞, 已经失去“自我更新”的能力, 但是可以分化为整个淋巴系或者髓系之中的任意类型的细胞。CLP继续分化可以形成T细胞前体细胞(Pro-T)、B细胞前体细胞(Pro-B)以及NK细胞前体细胞(Pro-NK), 最终发育为成熟的T细胞、B细胞和NK细胞。另一个分支中, CMP可以继续分化产生“粒细胞/单核细胞前体细胞”(granulocytic/monocytic-restricted progenitors, GMP)和“巨核细胞/红细胞前体细胞”(megakaryocytic/erythroid progenitors, MEP)。GMP继续分化成粒细胞(granulocytes)和巨噬细胞(macrophages); 其中, 粒细胞又分为嗜酸性粒细胞(eosinophils)、嗜中性粒细胞(neutrophils)和嗜碱性粒细胞(basophils); MEP则分化为巨核细胞(megakaryocyte)红细胞(erythrocyte)和血小板(platelet)。而树突细胞(dendritic cells)则可以由CLP和MEP两种来源的细胞分化而来。

目前, 研究ESC向造血系统分化的系统主要有两种, 一种是Keller等^[13]首先应用到分化成红细胞的

拟胚体(embryonic body, EB)系统; 另一种是Nakano等^[14]于1994年建立的ESC与OP9细胞共培养的系统。OP9细胞是由(C57BL/6XC3H)F2-op/op小鼠建系得来, 这类细胞由于编码M-SCF的基因发生突变而不能产生M-SCF。当M-SCF存在时会促使ESC向单核细胞与巨噬细胞方向分化, 从而使其它谱系的细胞分化受到抑制。由ESC和OP9细胞共培养体系可以实现向其它造血细胞的选择性分化(表1)。这两种实验方法均为研究ESC的分化提供了良好的模型, 使得细胞处在较为同步的分化水平。在此基础上对ESC进行基因水平的改造, 使得人们可以研究ESC向造血细胞分化过程中分子机制。

3 ES细胞向造血系统各类型细胞的分化

3.1 红细胞(erythroid)

红细胞是血液中数量最多的血细胞, 人体内每秒可以产生约 2.4×10^6 红细胞。MEP在生长因子的刺激下形成集落红系祖细胞(burst forming unit-

erythroid, BFU-E), BFU-E继续分化形成红系祖细胞(colony forming unit, CFU-E), CFU-E分化成红细胞前体细胞(Pro-EB), Pro-EB在经过晚幼红细胞(orthochromatic normoblasts, ON)和网织状红细胞(reticulocytes)去核之后形成成熟的红细胞。1993年, Wiles实验室通过EB分化试验得到了成熟的小鼠红细胞^[15]。在ESC分化培养后的8天得到的EB加入细胞因子促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)和KL(Kit-Ligand)继续培养10到14天得到了大部分红细胞的克隆。1997-1999年, Wessely陆续报道了人工合成的类糖皮质激素地塞米松(dexamethasone)在红细胞前体细胞的自我更新过程中发挥重要作用^[16-18]。2004年, Beug实验室通过三步法将EB分化得到的红细胞前体细胞扩增到 10^7 倍^[19]。在人中, 2006年 Chang等^[20]通过EB分化将人的ES细胞系(H1)分化成红细胞, 当对这类细胞血红蛋白进行分析时, 发现它们表达胎儿期的 ϵ 型和胎儿期的 γ 型珠蛋白, 几乎不表达成人的 β 型珠蛋白。随后Lu等^[21]更进一步得到了表达成

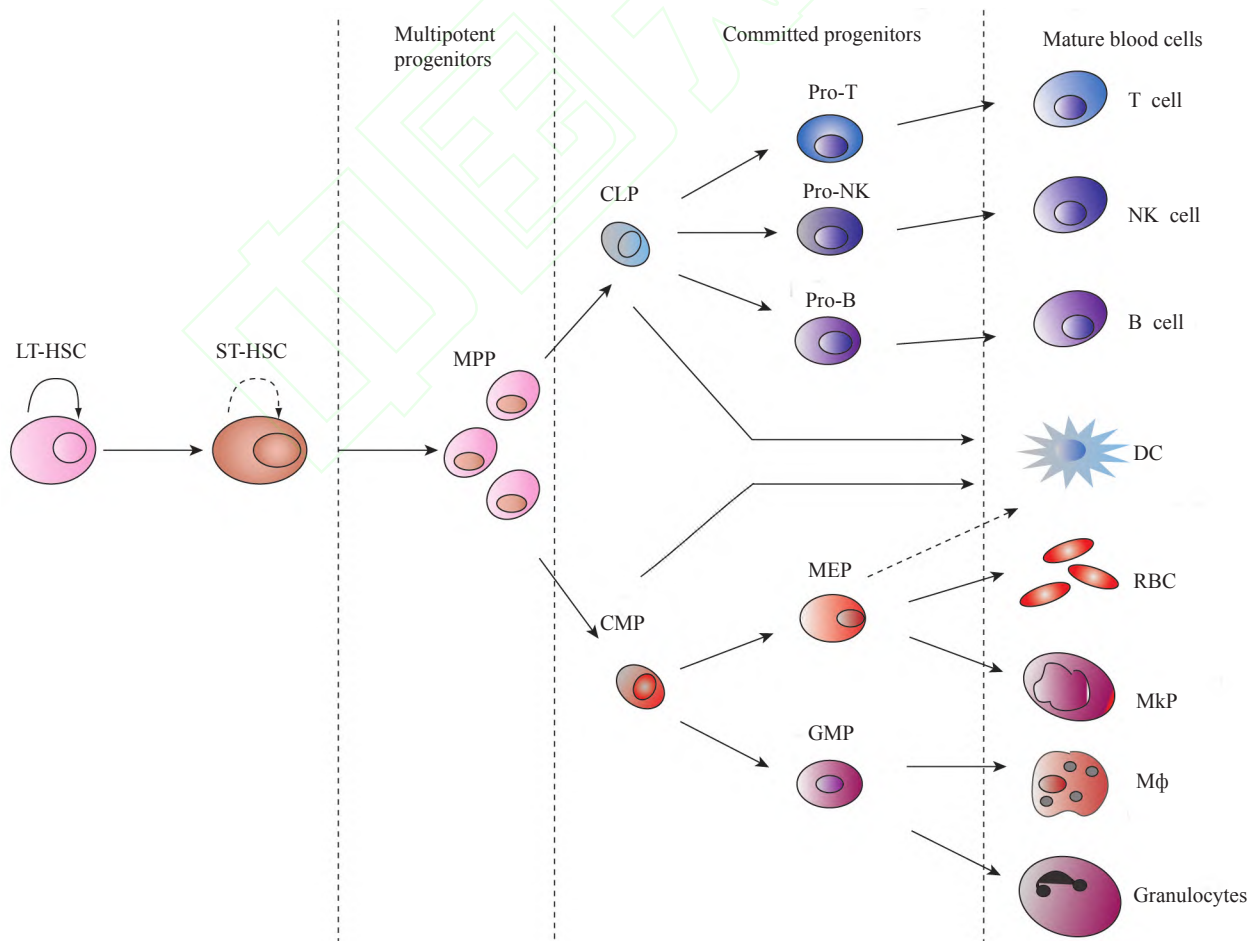


图1 小鼠造血免疫系统发育谱系

Fig.1 The development of hematopoietic lineages in mice

表1 胚胎干细胞向造血细胞体外分化系统

Table 1 *In vitro* culture systems of differentiation embryonic stem cells into hematopoietic

细胞类型 Cell type	来源 Resources	培养方法 Method of culture	细胞因子 Cytokines	参考文献 References	备注 Remarks
Erythroid	Mice ES, Human ES	EB, OP9	EPO, BMP4, VEGF, KL	15-21	Dexamethasone promotes the expansion erythroid progenitors
Megakaryocytes and platelets	Mice ES, Human ES, EB, OP9 Human iPS		TPO, VEGF, IL-6, SCF	29-32	The sac environment provided by C3H10T1/2 stroma cells ES enhance the efficiency of differentiation
Mast cells	Mice ES	EB	IL-3, IL-1, SCF, KL	12,15,33	Mice ES derived mast cells were comparative in IgE dependent immune response with normal mast cells <i>in vivo</i>
Macrophages	Mice ES, Human ES, EB Human iPS		IL-3, M-SCF	12,34-36	ES or iPS cell derived Macrophages were not equally with their comparative <i>in vivo</i>
B cell	Mice ES, Human ES, OP9 Human iPS		BMP4, IL-7, Flt3L	13,37,38	LPS stimulation promotes B cell differentiation
T cell	Mice ES, Human ES	OP9/OP9-DL1	BMP4, SCF, Flt3L	39-42	ES derived T cell relays on the expression of DL1 and the microenvironment of thymus
NK cell	Mice ES, Human ES	OP9	IL-6, IL-7, SCF, Flt3L IL15, IL18, IL12	43-46	NK cells devired from ES were Ly49 negative
Eosinophils	Mice ES, Human ES, OP9 Human iPS		GM-SCF, IL-3, IL-5	36,47	Eosinophils devired from ES or iPS both have the same expression pattern equally
Neutrophils	Mice ES, Human ES, OP9 Human iPS		G-SCF, GM-SCF, IL-6	36,48	Neutrophils devired from ES or iPS function properly
Dendritic cells	Mice ES, Human ES, EB, OP9 Human iPS		GM-SCF, IL-3, IL-4, TNF- α	49-56	DC devired from ES and iPS functional as APC
Osteoclasts	Mice ES, Human ES, OP9, ST2 Human iPS		G-SCF, RANKL	36,57-59	ST2 stroma cells and RANKL were added and TRAP activity were detected in differentiated osteoclasts

人型的 β 珠蛋白的红细胞, 这类红细胞具有携氧能力, 可以达到 10^{10} - 10^{11} /6孔板, 从而初步实现了将人的ESC较大规模的分化为成熟具有功能的红细胞。此外, 2011年, Giarratana等^[22]在体外由CD34⁺HSC得到分化的红细胞注射入NOD-SCID小鼠体内, 完成了到成熟红细胞的转变。此外, 许多关键的转录因子在红细胞形成过程中发挥着重要作用, 例如GATA-1在红细胞巨核细胞, 肥大细胞中均有表达, 在红细胞形成过程中一直伴随着GATA-1的表达, GATA-1基因敲除小鼠因为严重贫血在胚胎10.5至11.5天时死亡^[23]。GATA-1可以通过上调抗凋亡基因*Bcl-x_L*来促进红细胞的成熟^[24], 同时GATA-1还可以与其他转录因子如FOG-1、EKLF、TAL-1/SCL、PU.1和共转录因子CBP/p300、Brg1、MeCP1/NuRD等共同作用, 参与调节红细胞形成。此外, GATA-1还促进了CMP向MEP的分化过程^[25]。

3.2 巨核细胞(megakaryocytes)和血小板(platelets)

由于红细胞和巨核细胞都是由相同的前体细胞(megakaryocytic/erythroid progenitors, MEP)分化而来, 因此ESC向巨核细胞的分化与向红细胞的分化

紧密相关。在红细胞分化过程中起到关键作用的转录因子GATA-1在巨核细胞形成血小板(platelets)过程也起重要作用^[26-28]; 另外, 转录因子FOG(friend of Gata-1)也同时在红细胞和巨核细胞中表达。在整个分化过程中, FOG抑制红细胞的产生, 而在巨核细胞中FOG早期会抑制巨核细胞的形成, 在分化后期则会促进巨核细胞的形成^[29]。2003年, Fujimura等^[30]报道了通过小鼠ESC与OP9细胞共培养使得ESC分化为巨核细胞, 并得到了成熟的血小板。他们将在 α -MEM培养5天的ESC转移到OP9细胞上继续共培养, 在细胞因子(thrombopoietin, TPO)的存在下, 观察到在第8-9天和第13-16天有两批血小板的产生, 这与原始造血(primitive hematopoiesis)和永久造血(definitive hematopoiesis)相对应一致。另外, 2006年, Gaur等^[31]首次实现了用人的hES细胞通过OP9共培养得到巨核细胞, 这些细胞表达巨核细胞的特异性标志物如: CD41a、CD42b等, 因此这个系统为研究巨核细胞形成以及整合素 α IIb β 3信号通路提供了理想的模型, 但是并没有检测到血小板的释放。2008年, Takayama等^[32]改进了实验设计, 他们利用人的

ESC在C3H10T1/2基质细胞上面培养,同时加上内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)使得分化细胞外围形成一个囊状结构,利用这个囊状结构提供的微环境在IL-6、IL-11,以及干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)和TPO细胞因子作用下得到了巨核细胞,并且有表达CD41a和CD61特异性标志物的血小板释放,这些血小板亦可以被ADP和凝血酶激活,略有遗憾的是这种方法得到的巨核细胞释放的血小板的量比较少。此外,2010年Takayama等^[33]将人的真皮细胞重编程得到iPS细胞,在与之前相同的实验条件下得到了之前2-3倍数量巨核细胞和血小板,将得到的血小板移植入NOD-SCID-IL2 γ ^{-/-}小鼠体内后,在循环血液中检测到了血小板。同时通过活体成像显示了这些血小板参与了血瘤形成,从而证明了分化得到的血小板在体内具有功能,从而为临床治疗提供了直接的实验证据。

3.3 肥大细胞(mast cell)

肥大细胞是先天免疫和获得性免疫中IgE相关过敏反应的重要效应细胞。1991年,Wiles等^[13]和Keller等^[15]两人首先提出了两步法将分化15天的EB转移到含有IL-3的IMDM培养基中,但是该分化体系中含有巨噬细胞。随后,Keller做出改进,加入细胞因子KL、SCF、IL-3以及IL-1,得到的细胞含有50%~60%的肥大细胞前体细胞,并通过May-Griinwald-Giemsa和甲苯胺蓝染色确定肥大细胞的形成。Tsai等^[34]将ESC加入含有IL-11和SCF的甲基纤维素培养基中形成EB,之后在把EB转移到含有SCF和IL-3的培养基中,分化六周可以由2 000个ESC得到大约10⁸的肥大细胞。通过对这些ES来源的肥大细胞和骨髓来源的肥大细胞比较,发现ES来源的肥大细胞无论生存能力还是在IgE依赖性的免疫反应中所发挥作用,都与骨髓来源的肥大细胞相同。

3.4 巨噬细胞(macrophages M Φ)

巨噬细胞是先天性免疫中的重要效应细胞。Moore等^[35]将传代2-3次的ESC加入含有CSF-1和IL-3的IMDM甲基纤维素培养基中,10-12天形成EB,再转移到含有SCF和IL-3的培养基中培养,4-5天后可以看到附着在壁上的巨噬细胞。此外,Wiles等^[13]将分化了15天的EB转移到甲基纤维素膜IMDM培养基中,在IL-3和M-CSF两种细胞因子存在下,得到巨噬细胞,并且通过形态学、May-Griinwald-Giemsa染色以及F4/80抗体鉴定。此外,IL-1的存在也可以将

EB分化为巨噬细胞的概率由5-10%提高到30%。后来,Lindmark等^[36]通过ES分化得到巨噬细胞,与小鼠腹腔来源的巨噬细胞以及巨噬细胞系的基因表达谱做对比,发现ES来源的巨噬细胞更接近于腹腔的巨噬细胞。2009年,Choi等^[37]分化得到了人的巨噬细胞,他们将人的ESC和iPS与OP9共培养后,分选出髓系单核细胞,扩增后加入M-SCF和IL-1 β 继续培养5-7天,所得到的巨噬细胞无论是形态,表面分子标记物还是功能上均与组织来源的巨噬细胞相似。

3.5 B淋巴细胞

B淋巴细胞的发生是在从原始造血的卵黄囊转移到胚肝中才开始的。Nakano等^[14]早在提出OP9培养系统时已经把ESC分化到了前体B细胞,但是只有一小部分能分化成IgM阳性的B细胞。随后,Sarah等^[38]做出改进,在将ESC与OP9共培养后,在细胞因子IL-7和Flt-3L(Flt-3 ligand)存在下分化成B淋巴细胞,并且证明了由ES分化得到的B淋巴细胞与胚肝或骨髓来源的B淋巴细胞非常相似,都可以与Flt-3L反应,都可以被阿贝尔森小鼠白血病病毒所感染,在脂多糖刺激时均可以分泌抗体。2011年,Carpenter等^[39]首次报道了利用人的iPS细胞在OP9或MS-5基质细胞共培养得到了表达CD45⁺、CD19⁺、CD10⁺的B细胞前体细胞,尽管他们不表达IgM和CD5分子,但的确发生了D-J(H)区的基因重排。

3.6 T淋巴细胞

与B细胞不同,T淋巴细胞是在胸腺中发育成熟的,而且T淋巴细胞的成熟与胸腺的环境紧密相关,因此体外分化T淋巴细胞相对比较困难。Zuniga-Pfluck等^[40]发现,小鼠的ESC分化得到的Flk1⁺、CD45⁺的前体细胞与胸腺器官培养得到T淋巴细胞;此外,他们还发现,Notch信号通路在体外诱导HSC向T淋巴细胞分化过程中有着重要作用^[41],所以采用了表达Notch信号通路的配体Delta-Like1(DL1)的基质细胞(OP9-DL1)与ESC共培养,14天后可以看到表达T淋巴细胞谱系特异性标志物CD25和CD44的细胞,而且体外培养的T淋巴细胞也经历了与体内相同的从CD4⁻、CD8⁻双阴T淋巴细胞(double negative)向CD4⁺、CD8⁺双阳T淋巴细胞(double positive)发育的过程^[42]。2006年,Galic等^[43]报道了用人的ES细胞系H1与小鼠的基质细胞共培养,然后分选出CD34⁺和CD133⁺细胞移植到免疫缺陷性的人源化小鼠体内,检测到了分化出的T淋巴细胞。当用抗CD3和抗

CD28抗体激活后, 这些细胞可以表达T细胞激活后的特异性标记分子, 显示这些由ES分化得到的T细胞是有功能的。

3.7 NK细胞

NK细胞是同时在天然免疫与适应性免疫中具有重要功能的一类免疫细胞。在小鼠中NK细胞的表面标志物为CD3⁻、NK1.1⁺和CD122⁺, 此外Ly49和CD94/NKG2的表达对于NK细胞识别靶细胞以及调节NK细胞成熟扩增发挥重要作用^[44]。Lian等^[45]运用小鼠ES细胞系R1在含有SCF, VEGF的培养基中培养后, 分选出CD34⁺细胞再与OP9基质细胞共培养, 加入细胞因子IL-6、IL-7以及SCF、Flt-3L三天后更换细胞因子为IL-15、IL-18和IL-12, 最后与OP9共培养2天, 撤掉OP9细胞后可以得到扩增的NK细胞, 这类ES分化得到的NK细胞表达CD94/NKG2, 但不表达Ly49分子。2009年, Woll等^[46]报道了利用人的ES细胞系H9分化得到了NK细胞, 他们将H9细胞与小鼠骨髓基质细胞M210-B4共培养后分选出CD34⁺CD45⁺的细胞, 再转移到小鼠胚肝基质细胞AFT024上共培养, 在IL-7、IL15等细胞因子存在下得到了均质性比较高的NK细胞, 并且在体内和体外验证了都有比脐带血来源的NK细胞有更强杀伤肿瘤细胞能力。此外, Nakayama等^[47]报道了ESC来源的CD34⁺细胞可以产生NK细胞, 他们的培养方法与Lian报导的大体一致, 只是在细胞加入细胞因子略有不同。而且后者同时得到了表达CD19的B细胞前体细胞。

3.8 嗜酸性粒细胞(eosinophils)

嗜酸性粒细胞在血液系统中所占比例较小, 大约占外周血的1%~3%。Hamaguchi-Tsuru实验室通过OP9分化系统得到了小鼠的嗜酸性粒细胞^[48], 他们在EB形成后加入了细胞因子GM-SCF和IL-3或者IL-5后培养20天可以得到50%的嗜酸性粒细胞克隆。随后, Choi等^[37]将人的ES细胞和iPS细胞分化得到髓系单核细胞, 其中也有嗜酸性粒细胞的形成, 这些分化得来的嗜酸性粒细胞与体内的嗜酸性粒细胞功能相似。

3.9 嗜中性粒细胞(neutrophils)

正常人一天产生的白细胞细胞的数目可以达到10¹¹, 其中嗜中性粒细胞约占50%~70%。当遇到炎症反应时候, 嗜中性粒细胞可以快速增加5~10倍, 这对于分化过程控制有着很高的要求。2004年, Lieber等^[49]将小鼠ESC通过形成EB, 再与OP9的共同培养的分化策略得到了高纯度的中性粒细

胞。在ESC分化后8天的EB转移到第二种分化培养基中, 与OP9共培养三天之后加入细胞因子G-CSF、GM-CSF以及IL-6, 继续培养4至20天收获细胞, 其中75%~80%是成熟的中性粒细胞。通过形态学分析, 特异性的标志物如Gr-1的染色以及趋化性分析, 验证了体外分化得来的中性粒细胞与体内血液来源的中性粒细胞相似。人的嗜中性粒细胞分化也由Choi分化得到, 他们将人的ES和iPS细胞分化后筛选出表达的Lin⁻、CD34⁺、CD43⁺、CD45⁺髓系细胞在加入细胞因子G-CSF后培养8天得到与体内功能类似的嗜中性粒细胞^[37]。

3.10 树突细胞(dendritic cells)

树突细胞作为抗原递呈细胞, 在激活T淋巴细胞和维持免疫耐受过程中都有重要作用。Fairchild等^[50]运用了从CBA/Ca小鼠中得到的新的ES细胞系ESF116悬浮培养14天得到EB, 再加上细胞因子GM-CSF和IL-3的诱导, 最终得到了成熟的树突细胞, 并且检测到了树突细胞特异性标志物如CD11c、MHC-II、CD40、CD54、CD80、CD86的表达, 同时验证了诱导分化得到的树突细胞(ES-DC)具有正常的激活T淋巴细胞的能力。随后, Senju等^[51]运用OP9共培养的体系也得到了成熟的树突细胞, 他们采用了ES细胞系TT2, 再加入GM-CSF也得到了表达树突细胞特异性标志物CD11c的前体细胞, 在用IL-4和肿瘤坏死因子TNF- α 和anti-CD40抗体作用下, 得到成熟的树突细胞, 并且验证了无论是形态, 表面特异性标记物的表达还是激活T细胞的能力等方面, ES分化得到的树突细胞与骨髓来源的树突细胞都极为相似。对于人的ESC来说, 诱导分化的过程又有不同之处。2004年, Zhan等^[52]首先报道了用人的ESC分化得到成熟的树突细胞。他们将高密度的人的ESC铺到人工基底膜上面, 在含有成纤维细胞生长因子(bFGF)的血清中培养10-20天得到EB后, 再将悬浮的EB转移到组织培养皿中, 加入SCF、Flt3-L和促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)促进EB向造血系统方向分化, 最后在IL-3、GM-SCF和IL-4的刺激下, 诱导成熟树突细胞的产生。之后, 又有Su等^[53]和Tseng等^[54]也运用类似的方法得到由人的ES分化得到的成熟树突细胞。Senju等^[55]采用OP9共培养的方法, 也获得了人的树突细胞。他们首先在PEF滋养层上面培养的KhES-1细胞系, 然后通过分离液CTK将细胞铺到OP9上; 15-18天后转到新的OP9细胞上面,

在此期间加入GM-SCF和M-SCF; 7-10天后在GM-SCF和IL-4的作用下可以观察形状到不规则的细胞, 最后加入TNF- α 、LPS、CD40-ligand和IL-4诱导树突细胞成熟。这种方法得到的ES-DC显示出了更强的刺激T细胞增殖的能力。之后, Slukvin等^[56]报道了用OP9共培养的方法得到成熟的树突细胞, 他们的方法类似, 只是稍作改变。此外, Senju等^[57]将iPS细胞成功地诱导为成熟的树突细胞。iPS与ES相比, 其不同之处在于加入GM-SCF和IL-4等细胞因子后, 其培养时间要久一点, 但得到的成熟的树突细胞数量要多一些。尽管如此, 无论是对T细胞刺激还是对抗原的加工和呈递, iPS分化得到的树突细胞与ES细胞分化得到的树突细胞都相一致。目前, iPS诱导得到iPS-DC的问题在于目前的分化培养基仍然是以小鼠的为基础, 因此建立适应于人的ES细胞和iPS细胞的分化培养基, 以及iPS细胞库的建立对于实现iPS诱导的iPS-DC应用于临床具有重要的意义。

3.11 破骨细胞(osteoclasts)

破骨细胞具有骨吸收的功能, 其特异性标志物为抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP), G-SCF和RANKL(NF- κ B配体激活物)是与破骨细胞的形成相关的重要细胞因子。Hayashi等^[58]首先建立了小鼠ES细胞向破骨细胞分化的系统, ES细胞首先与ST2基质细胞共培养, 在1,25羟化维生素D₃(1,25-(OH)₂D₃)和地塞米松存在时, 诱导ST2基质细胞表达RANKL以及ST2自身表达的G-SCF, 11天后观察到多核破骨细胞产生, 8天之后可以检测到TRAP阳性的破骨细胞。随后他们验证了ES来源的破骨细胞在发育的第一阶段更加依赖于VEGFR-1^[59]。此外, 抗坏血酸也可以促进破骨细胞的产生^[60], c-fms信号通路参与了ES向破骨细胞分化的调控^[61]。另外, Choi等^[37]选用细胞因子GM-SCF、维生素D3和RANKL, 可以将人的ES和iPS分化成为破骨细胞, RT-PCR和流式分析验证了分化得来的破骨细胞都表达玻连蛋白(VNTR)、组织蛋白酶K(CTSK), 降血钙素受体分子(CALCR)以及RANK, 并且能够吸收矿化基质。

4 总结与展望

体外ESC在向造血细胞分化的技术体系在过去的研究中有很大的进展, 然而其分化的效率依然有待提高, 而且对体外分化得到的造血细胞还需要做

更为全面的功能验证。此外, 从临床应用角度而言, 无论是培养体系中的动物血清还是动物基质细胞都要有合适的替代品才能应用于人的疾病治疗, 而且成熟造血细胞存活时间相对较为有限, 只有造血干细胞能够在体内长期存活, 但目前依然缺乏成熟的由ES细胞向造血干细胞的体外分化体系。此外, 由ES细胞分化得到的造血细胞的安全性, 也是未来研究中需要考虑的一个重要因素。

参考文献 (References)

- 1 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 2 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swierciel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 3 Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2001; 172(2): 383-97.
- 4 Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, *et al.* Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001; 913(2): 201-5.
- 5 Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: A novel *in vitro* model for the study of conduction. *Circ Res* 2002; 91(8): 659-61.
- 6 Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50(8): 1691-7.
- 7 Sottile V, Thomson A, McWhir J. *In vitro* osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells* 2003; 5(2): 149-55.
- 8 Takahashi K, and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 9 Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell* 1986; 44(4): 653-62.
- 10 Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(7): 2788-92.
- 11 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241(4861): 58-62.
- 12 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242-5.
- 13 Wiles MV, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991; 111(2): 259-67.
- 14 Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science*

- 1994; 265(5175): 1098-101.
- 15 Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 1993; 13(1): 473-86.
 - 16 von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, *et al.* The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors *in vitro*. *Blood* 1999; 94(2): 550-9.
 - 17 Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J* 1997; 16(2): 267-80.
 - 18 Wessely O, Bauer A, Quang CT, Deiner EM, von Lindern M, Mellitzer G, *et al.* A novel way to induce erythroid progenitor self renewal: Cooperation of c-Kit with the erythropoietin receptor. *Biol Chem* 1999; 380(2): 187-202.
 - 19 Carotta S, Pilat S, Mairhofer A, Schmidt U, Dolznig H, Steinlein P, *et al.* Directed differentiation and mass cultivation of pure erythroid progenitors from mouse embryonic stem cells. *Blood* 2004; 104(6): 1873-80.
 - 20 Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, *et al.* Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006; 108(5): 1515-23.
 - 21 Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 112(12): 4475-84.
 - 22 Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, *et al.* Proof of principle for transfusion of *in vitro*-generated red blood cells. *Blood* 2011; 118(19): 5071-9.
 - 23 Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(22): 12355-8.
 - 24 Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999; 94(1): 87-96.
 - 25 Liew CW, Rand KD, Simpson RJ, Yung WW, Mansfield RE, Crossley M, *et al.* Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1. *J Biol Chem* 2006; 281(38): 28296-306.
 - 26 Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, *et al.* Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 1990; 344(6265): 447-9.
 - 27 Martin F, Prandini MH, Thevenon D, Marguerie G, Uzan G. The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem* 1993; 268(29): 21606-12.
 - 28 Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, *et al.* Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; 349(6306): 257-60.
 - 29 Tanaka M, Zheng J, Kitajima K, Kita K, Yoshikawa H, Nakano T. Differentiation status dependent function of FOG-1. *Genes Cells* 2004; 9(12): 1213-26.
 - 30 Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells *in vitro*. *Blood* 2003; 102(12): 4044-51.
 - 31 Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: A genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 436-42.
 - 32 Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008; 111(11): 5298-306.
 - 33 Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, *et al.* Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010; 207(13): 2817-30.
 - 34 Tsai M, Tam SY, Wedemeyer J, Galli SJ. Mast cells derived from embryonic stem cells: A model system for studying the effects of genetic manipulations on mast cell development, phenotype, and function *in vitro* and *in vivo*. *Int J Hematol* 2002; 75(4): 345-9.
 - 35 Moore KJ, Fabunmi RP, Andersson LP, Freeman MW. *In vitro*-differentiated embryonic stem cell macrophages: A model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(10): 1647-54.
 - 36 Lindmark H, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bruder CE. Gene expression profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells is an improved *in vitro* model for studies of vascular disease. *Exp Cell Res*, 2004; 300(2): 335-44.
 - 37 Choi KD, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2818-29.
 - 38 Cho SK, Webber TD, Carlyle JR, Nakano T, Lewis SM, Zuniga-Pflucker JC. Functional characterization of B lymphocytes generated *in vitro* from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(17): 9797-802.
 - 39 Carpenter L, Malladi R, Yang CT, French A, Pilkington KJ, Forsey RW, *et al.* Human induced pluripotent stem cells are capable of B-cell lymphopoiesis. *Blood* 2011; 117(15): 4008-11.
 - 40 de Pooter RF, Cho SK, Carlyle JR, Zuniga-Pflucker JC. *In vitro* generation of T lymphocytes from embryonic stem cell-derived prehematopoietic progenitors. *Blood* 2003; 102(5): 1649-53.
 - 41 Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity* 2002; 17(6): 749-56.
 - 42 Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Nat Immunol* 2004; 5(4): 410-7.
 - 43 Galic Z, Kitchen SG, Kacena A, Subramanian A, Burke B, Cortado R, *et al.* T lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(31): 11742-7.
 - 44 Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, *et al.* *In vivo* developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 2002; 3(6): 523-8.

- 45 Lian RH, Maeda M, Lohwasser S, Delcommenne M, Nakano T, Vance RE. Orderly and nonstochastic acquisition of CD94/NKG2 receptors by developing NK cells derived from embryonic stem cells *in vitro*. *J Immunol* 2002; 168(10): 4980-7.
- 46 Woll PS, Grzywacz B, Tian X, Marcus RK, Knorr DA, Vernieris MR, *et al*. Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent *in vivo* antitumor activity. *Blood* 2009; 113(24): 6094-101.
- 47 Nakayama N, Fang I, Elliott G. Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presence of vascular endothelial growth factor. *Blood* 1998; 91(7): 2283-95.
- 48 Hamaguchi-Tsuru E, Nobumoto A, Hirose N, Kataoka S, Fujikawa-Adachi K, Furuya M, *et al*. Development and functional analysis of eosinophils from murine embryonic stem cells. *Br J Haematol* 2004; 124(6): 819-27.
- 49 Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM. The *in vitro* production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood* 2004; 103(3): 852-9.
- 50 Fairchild PJ, Brook FA, Gardner RL, Graca L, Strong V, Tone Y, *et al*. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol* 2000; 10(23): 1515-8.
- 51 Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, Masuda M, Uemura Y, Araki K, *et al*. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 2003; 101(9): 3501-8.
- 52 Zhan X, Dravid G, Ye Z, Hammond H, Shablott M, Gearhart J, *et al*. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells *in vitro*. *Lancet* 2004; 364(9429): 163-71.
- 53 Su Z, Frye C, Bae KM, Kelley V, Vieweg J. Differentiation of human embryonic stem cells into immunostimulatory dendritic cells under feeder-free culture conditions. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 6207-17.
- 54 Tseng SY, Nishimoto KP, Silk KM, Majumdar AS, Dawes GN, Waldmann H, *et al*. Generation of immunogenic dendritic cells from human embryonic stem cells without serum and feeder cells. *Regen Med* 2009; 4(4): 513-26.
- 55 Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, *et al*. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol* 2010; 91(3): 392-400.
- 56 Slukvin II, Vodyanik MA, Thomson JA, Gumenyuk ME, Choi KD. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* 2006; 176(5): 2924-32.
- 57 Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, *et al*. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1021-31.
- 58 Yamane T, Hayashi S, Kunisada T. Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. *Methods Mol Biol* 2002; 185: 261-8.
- 59 Okuyama H, Tsuneto M, Yamane T, Yamazaki H, Hayashi S. Discrete types of osteoclast precursors can be generated from embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21(6): 670-80.
- 60 Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi S. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335(4): 1239-46.
- 61 Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Era T, Nakano T, Hayashi SI. Development of osteoclasts from embryonic stem cells through a pathway that is c-fms but not c-kit dependent. *Blood* 1997; 90(9): 3516-23.