

胚胎干细胞向造血干/祖细胞定向诱导分化的研究进展*

杨超 习佳飞 岳文 裴雪涛**

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是指由胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞经体外抑制培养而筛选得到的细胞, 具有无限增殖潜能, 在体外可以向造血细胞分化, 有可能为造血干细胞移植和血细胞输注开辟新的来源。此外, ES 细胞向造血干/祖细胞的定向诱导分化也为阐明哺乳动物造血发育的细胞和分子机制提供了良好的体外模型。对 ES 细胞向造血干/祖细胞定向分化的研究进展进行了综述。

关键词 胚胎干细胞, 造血干/祖细胞, 诱导, 体外分化

学科分类号 Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00755

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是从囊胚期的内细胞团(inner cell mass, ICM)和早期胚胎的原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)中分离得到的一种在体外具有高度增殖能力和多向分化潜能的细胞。1998 年, Thomson 等^[1]分离人的内细胞团并建立了人胚胎干细胞系。从此, 人 ES 细胞引起了国际学术界的广泛关注。随着干细胞及其相关技术的发展, 人 ES 细胞定向诱导分化为造血细胞有可能成为临床输血和造血干细胞移植的新来源及恶性血液疾病治疗的新途径, 同时, 也为研究造血及其分化调控机制提供了很好的模型, 引起越来越多研究者的关注^[2-3]。下面就相关的研究进展作一综述。

1 ES 细胞的特性

ES 细胞在有饲养层细胞或分化抑制因子存在的条件下, 能够保持其未分化状态, 具有以下优势: a. 高度的自我复制能力, 可以传代建系; b. 发育的全能型, ES 细胞能够分化为完整个体的所有组织细胞, 将其接种于免疫缺陷的小鼠体内, 可以形成含内、中、外三个胚层的畸胎瘤; c. 遗传的可操作性, 将 ES 细胞中编码组织相容性的基因进行遗传操作后, 适当地定向诱导其分化为所需类型的细胞, 植入遗传背景不同的受体体内, 可以用于治疗性克隆, 从而解除免疫排斥反应带来的长期

困扰。这些特性使 ES 细胞为细胞治疗带来新的希望^[4]。

ES 细胞在体外可诱导分化为神经细胞、心肌细胞、肝脏细胞、胰岛 β 细胞、造血细胞等多种类型的细胞。但目前尚不能控制 ES 细胞在特定的部位分化成相应的细胞, 直接应用 ES 细胞的做法极易导致畸胎瘤的发生。因此 ES 细胞在应用于临床治疗前, ES 细胞来源的细胞是否具有功能是关键问题。目前, 在 ES 细胞定向诱导分化的研究中以向造血细胞分化的研究居多。

2 ES 细胞向造血干/祖细胞的定向分化

2.1 ES 细胞向造血干/祖细胞定向分化的诱导方法

目前, 将 ES 细胞在体外诱导分化成造血细胞的方法主要有两种。最常用的是通过形成拟胚体(embryoid body, EB)而产生造血细胞。撤去分化抑制因子或使 ES 细胞脱离饲养层细胞进行悬浮培养、使用悬滴法或半固体培养基培养, ES 细胞可

* 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA02A107), 北京市科委重大项目培育专项(Z0005190043331)和北京市科委科技计划研发攻关类(D07050701350702)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2008-11-03, 接受日期: 2009-03-03

分化成 EB. 这个分化过程是完全自发的, 最初形成的 EB 是球状、外层包被有内胚层样细胞的实体结构, 继续发育 EB 内部会出现囊腔, 这一时期的 EB 称为囊状拟胚体(cylist embryoid body), 这些 EB 能够进一步诱导产生造血细胞. 此时期的 EB 提供了胚胎发育过程中各类型细胞相互作用的微环境, 与胚胎发育过程中卵黄囊相似, 其内含有造血前体细胞^[9]. 因此, 这是一种模拟体内胚胎发育过程的方法, 已被广泛应用于 ES 细胞向造血干/祖细胞分化的研究^[6].

另一种方法是去除饲养层细胞或分化抑制因子后, 将 ES 细胞与不同的基质细胞共培养, 直接定向诱导分化为造血细胞. 造血的发生、迁移及在骨髓内的维持都离不开造血微环境的调控, 目前被广泛应用的基质细胞主要有小鼠骨髓基质细胞系 OP9、S17、MS5 等^[7,8], 来源于小鼠胎肝的 AFT024^[9]及来源于小鼠胚胎 AGM 区的 AGM-S3^[10]等.

此外, 将 ES 细胞进行无血清无支持细胞的贴壁诱导, 在包被 IV 型胶原酶的组织培养瓶中培养, ES 细胞可分化为 Flk1⁺ 细胞, 该群细胞在造血生长因子的作用下可进一步分化为造血前体细胞^[11]. 通过造血调控的重要基因的过表达也成为促进 ES 细胞向造血细胞分化的重要手段^[12~14].

2.2 ES 细胞来源的造血干/祖细胞

自从 1981 年 Evens 和 Kaufman^[15]首次分离得到 ES 细胞, 建立了小鼠 ES 细胞系, 人们就开始了 ES 细胞向造血干/祖细胞诱导分化的研究. 1985 年, Doetschman 等^[16]首次报道了小鼠 ES 细胞在体外能够产生造血细胞, 研究发现, ES 细胞体外培养 8~10 天的 EB, 30% 能够形成血岛. Wiles 等^[17]的研究结果显示, 将小鼠 ES 细胞接种于含集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)的培养基中, 可以形成造血样集落, 集落表面表达造血细胞特异的抗原标志分子, 且具有明显的造血潜能. 又有研究者利用骨髓基质细胞系 RP010 与小鼠 ES 细胞共培养, 添加细胞因子 SCF、IL-3 和 IL-6 及胎肝基质细胞系 FLS4.1 的条件培养基, ES 细胞可分化为 PgP-1⁺Lin⁻ 的早期造血细胞^[18]. Kennedy 等^[19]将小鼠 ES 细胞自发分化成的 3~3.5 天的拟胚体接种于含 SCF、EPO 和 VEGF 的甲基纤维素培养基中培养, 可形成爆发式形成细胞(blast colony-forming cells, BL-CFCs). 单个 BL-CFCs 离散后培养可产生红系集落, 及由红

系和髓系细胞组成的混合集落. 从体外培养的小鼠 ES 细胞可得到 BL-CFCs 造血细胞及内皮细胞共同的前体细胞, 研究发现 bFGF 可诱导 ES 细胞向造血干细胞分化^[20].

Perlingeiro 等^[21]发现, 小鼠 ES 细胞通过过表达 BCR/ABL 可分化为造血细胞, 在体内外能进一步形成髓系和淋巴系细胞. 将 HOXB4 基因导入到小鼠胚胎干细胞内, 在体外分析 HOXB4 过表达可以促进小鼠 ES 细胞向造血细胞分化的潜能, 发现 HOXB4 基因的高表达可促进造胚胎干细胞向造血干细胞分化, 并促进造血干细胞向红系、粒系和巨核系细胞分化^[22]. BMP4、activin A、bFGF 和 VEGF 四种因子可有效地分阶段促进小鼠 ES 细胞向造血细胞分化, 即 BMP4 促进中胚层的分化, activin A、bFGF 诱导中胚层的前体细胞分化为血液血管干细胞, VEGF 促进血液血管干细胞分化为造血前体细胞^[23]. 该方法可高效获得血液血管干细胞, 为研究造血祖细胞的分子机制提供了一个理想的模型. Hiroyama 等^[23]诱导小鼠 ES 细胞向红系细胞分化, 将得到的细胞移植到急性贫血小鼠的体内, 可以短暂扩增, 进而分化成为有功能的红细胞, 显著改善小鼠的贫血症状.

同时, 小鼠 ES 细胞向造血干/祖细胞定向诱导分化的研究成果也为人 ES 细胞的研究提供了很大的帮助. Thomson 实验室首次研究发现人 ES 细胞具有向造血各系细胞分化的潜能^[24]. 该研究利用小鼠骨髓基质细胞系 S17 和小鼠卵黄囊内皮细胞系 C166 与人 ES 细胞共培养, 在诱导分化体系中仅添加了胎牛血清, 未添加任何外源细胞因子或生长因子, 诱导分化 17 天后, 获得了 1%~2% 的 CD34⁺CD38⁻ 细胞, 该细胞群表达 TAL-1、LMO-2、GATA-2 等造血前体细胞的转录因子. 在集落形成试验中, 把这些细胞接种在甲基纤维素半固体培养基中, 这些细胞会继续分化为髓系、红系、粒系和巨核系细胞集落. 这些细胞集落也表达各自的特征性抗原, 红系细胞表达血红蛋白 A, 髓系细胞表达 CD15, 巨核细胞表达 CD41. 这些结果表明造血基质细胞可诱导人 ES 细胞向造血细胞的分化. 随后, 大量的研究证明, BMP4, VEGF, TPO 等对于人胚胎干细胞向造血细胞分化具有促进作用, 诱导形成的造血祖细胞可产生红系和髓系细胞^[25, 26]. 血管内皮生长因子 A(VEGF-A)与 BMP4 协同作用, 可以进一步加强人 ES 细胞向造血细胞分化^[27]. 有研究比较了小鼠 OP9、S17、MS5 三种基质细胞

对人 ES 细胞的造血诱导作用, 结果发现 OP9 的诱导效率远远高于其他两种饲养层. 将未分化的人胚胎干细胞接种到 OP9 上与之共培养, 第 4 天出现中胚层细胞, 第 4~5 天首次出现红细胞集落 (erythroid, CFU-E)、粒细胞-红细胞-巨噬细胞集落 (CFU-GEMM)、粒细胞-巨噬细胞集落 (CFU-GM)、巨噬细胞集落 (CFU-M) 等. 在共培养 8~9 天后, CD34⁺细胞的比例可达到 20%, 分离所得的 CD34⁺细胞富含造血集落形成细胞, 这些细胞表达 GATA-1、GATA-2、SCL/TAL1 和 Flk1 等造血相关基因^[28]. Tian 等^[29]证明, 向无血清培养基中添加 SCF, TPO(thrombopoietin) 和 Flt3L 可使人 ES 细胞分化为造血细胞, 但这三种细胞因子不能诱导无血清培养体系中的 EBs 向造血细胞分化, 只有在添加 BMP4 和 VEGF 的情况下才能促进其向造血细胞分化.

此外, 最近有研究表明人造血微环境的基质细胞对人 ES 细胞造血分化具有一定的促进作用. Qiu 等^[30]利用人胎肝细胞系 FH-B-hTER 与人 ES 细胞共培养, 成功诱导产生了造血细胞, 结果证明该细胞系的诱导分化效率高于小鼠骨髓基质细胞系 S17, 并分析了单个红细胞集落形成单位和红细胞集落的 β - 球蛋白的表达, 结果发现共培养 8~21 天的人 ES 细胞可分化成为表达 ϵ 和 γ 球蛋白的红细胞. 此后, 又有研究者用人胎儿骨髓间质细胞联合低剂量的细胞因子促进了人 ES 细胞向造血细胞的分化. 将人 ES 细胞与小鼠骨髓基质细胞系 OP9 共培养, 能同时产生 CD34⁺造血细胞和 CD73⁺间充质干细胞(MSC). 分离的 CD34⁺细胞能形成造血细胞集落, 纯化的 CD73⁺间充质干细胞具有典型的骨髓来源 MSC 的形态学特征和细胞表型, 能向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化^[31]. 研究发现用脂质体转染法将转录因子 HOXB4 基因导入到人 ES 细胞, 可显著促进其向造血细胞分化, 且无需加入其他细胞因子^[32, 33]. Kennedy 等^[34]通过诱导人 ES 细胞向造血细胞分化, 首次证明了人血液血管干细胞的存在, 有两种不同类型的血液血管干细胞, 一种分化为原始红细胞、巨噬细胞和内皮细胞, 另一种只分化为造血细胞和内皮细胞. 这对早期造血发育的研究具有重要意义. 同年, Lu 等^[35]通过人 ES 细胞体外诱导分化的研究, 有效地获得了大规模的具有双向分化潜能的血液血管干细胞, 能分化为造血细胞和内皮细胞, 将这些细胞移植入糖尿病大鼠或视网膜缺血再灌注损伤的小鼠体内, 能参与修复损

伤部位的脉管细胞. 移植的细胞还可以降低心肌梗死小鼠的死亡率, 修复小鼠后肢的局部缺血. 这些结果证明了人 ES 细胞来源的血液血管干细胞对内皮修复具有重要作用.

3 关于 ES 细胞来源的造血干/祖细胞

3.1 ES 细胞来源的造血干/祖细胞的表面标志

小鼠的造血干细胞可以通过结合多个表面标志 Lin-Sca-1⁺c-kit⁺Thy1.1^{low} 而纯化, 纯化后的细胞移植后能够重建受致死性剂量放射线照射小鼠的造血系统. 而人的造血干细胞还没有找到很好的特异性标志. 目前认为 CD34 是造血干/祖细胞的主要标志物, 它会随着细胞的分化逐渐减少直至消失, 尽管 CD34 的功能未知, 但现在认为它参与早期造血过程. Try-1(CD90)是造血干细胞的又一抗原标志, 它比 CD34 分子出现得更早, 表达在早期造血细胞表面. 干细胞因子受体(c-kit, CD117)广泛分布于造血细胞群中, 约 60%~75%人类 CD34⁺造血细胞同时表达 c-kit. 但 CD34 是造血干细胞标志物的理论也受到挑战. Osawa 等^[36]首先证明拥有完全重建功能的小鼠造血干细胞可以是 CD34⁻细胞. 人的 CD34⁻细胞也有低水平的造血能力. 且有证据表明 CD34⁻细胞可能是比 CD34⁺细胞更原始的造血细胞. Flk-1/KDR 是在原始中胚层最早出现的内皮性受体, 有人认为它是血液血管干细胞的表面标志. Miraglia 等^[37]发现了一种新的造血干/祖细胞的标志物即 AC133. 有研究认为 AC133⁺细胞中含有更多的早期造血祖细胞, 其选择优于 CD34⁺^[38]. 有研究指出将人 ES 细胞与 OP9 细胞共培养, 发现诱导产生的早期造血前体细胞在表达 CD45 之前表达 CD43^[39]. 2007 年, 又有研究提出血管紧张素转换酶(CD143)是鉴定人 ES 细胞来源的血液血管干细胞的新标志, 并证明, CD143⁺CD45⁻CD34⁺的血液血管干细胞不仅可以分化为内皮细胞, 还可以分化为原始和定向淋巴造血细胞, CD143 和肾素-血管紧张素系统(RAS)通过血管紧张素 II 受体 AGTR1 和 AGTR2 直接调节血液血管干细胞的增殖和分化^[40]. 将人 ES 细胞与小鼠胎肝基质细胞共培养, 可有效诱导人 ES 细胞向造血祖细胞分化, 得到的单个红系克隆的珠蛋白的表达随着培养时间的延长, ζ 珠蛋白的表达降低, 而 β 珠蛋白的表达增加, 最终获得了脱核红细胞, 通过与人脐带血来源的 CD34⁺细胞相比较, 发现人 ES 细胞来源的红系祖细胞具有与其相似的分化途径^[41]. Lu 等^[42]证明了

人 ES 细胞可诱导产生大量有功能的红系细胞的可行性, 第一次证实了人 ES 细胞来源的红系细胞与正常红细胞的氧离曲线相似, 对 pH 值和 2, 3-DPG 的改变有一定反应.

3.2 ES 细胞来源的造血干/祖细胞功能分析

尽管造血干细胞的分离依赖于其特定的表面标志, 但其有效定义应当是其功能方面, 即长期的造血重建功能. 早期的研究认为 ES 来源的造血细胞的重建功能局限于淋巴细胞系. 进一步研究显示 ES 细胞来源的造血干细胞具有长期的多谱系造血功能. 将小鼠 ES 细胞置于含 IL-3, IL-6 的培养液和饲养层细胞上培养时, 在胎肝成纤维细胞培养上清条件培养液的诱导下, 可分化为 PgP-1⁺Lin⁻的早期造血细胞, 这种细胞输入亚致死剂量放射线照射的严重复合免疫缺陷 (severe combined immunodeficient, SCID) 小鼠体内, 可重建淋巴细胞、髓系细胞和红系细胞的造血功能. 再将这种小鼠的 PgP-1⁺Lin⁻细胞植入第二代 SCID 小鼠, 16~20 周后又可重建造血功能. 这说明 ES 细胞来源的造血干细胞具有自我更新能力和长期的多系造血功能^[17]. Wang 等^[26]首次报道了人 ES 细胞来源的 CD45-PFV(CD45-PECAM-1⁺Flk1⁺VE-cadherin⁺) 细胞具有体内重建造血的功能. 该群细胞具有向造血细胞和内皮细胞分化的双向潜能, 移植到半致死剂量放射线照射的 NOD/SCID 小鼠 8 周后, 能够重建小鼠的骨髓造血功能. Bowles 等^[32]证明人 ES 细胞来源的造血细胞具有很低的移植能力, 但并不能促进终生造血干细胞的产生. 同时, Kaufman 等^[24]也报道了人 ES 细胞经过共培养也可以产生具有移植能力的造血干细胞, 但移植效率也仅在 1% 左右. HOXB4 过表达促使 CDX4 上调, 能显著增强受致死剂量放射线照射的成体小鼠移植后的骨髓造血重建功能^[43]. 最近研究表明, 人 ES 细胞与 S17 基质细胞共培养产生的造血细胞, 能够重建 NOD/SCID 小鼠的造血功能^[7]. 目前, 对于 ES 来源的造血细胞体内重建造血功能的检测一般都选用小鼠为动物模型, 但移植效率有限. 研究指出其原因可能在于人 ES 细胞来源的造血细胞暴露于小鼠血清时会出现聚集现象^[7].

4 ES 细胞来源的造血干/祖细胞的应用前景和存在的问题

血细胞输注和造血干细胞移植是细胞治疗的常用手段, 可以用来治疗恶性血液疾病、感染性疾

病、遗传性疾病和重症免疫缺陷等多种疾病. 然而, 移植物来源短缺一直是临床面临的主要问题之一. 近年来, 以人 ES 细胞作为启动细胞的组织工程给许多临床疾病的治疗提供新的措施和希望, 也为解决临床造血干细胞移植及输血不足提供了新的解决方法. 但由于移植引起的免疫排斥问题限制了人 ES 细胞在治疗中的应用. 为了解决这一难题, 科学家们提出了应用人 ES 细胞的治疗性克隆方法, 即将病人细胞核移植到去核的卵细胞中建立 ES 细胞系, 再通过定向诱导分化获得大量病人来源的细胞, 从而避免异源细胞移植引起的免疫排斥反应. 但核移植需要大量供体的卵母细胞, 而卵母细胞的来源和卵细胞本身涉及到的伦理学问题都严重制约了通过核移植建立人 ES 细胞系的发展和今后的临床应用.

尽管 ES 细胞向造血干/祖细胞分化的研究已经取得了很大进展, 且其研究和利用前景非常广阔, 但仍然存在着一一些问题限制了其在临床的应用: 首先, 研究成本昂贵, 且诱导分化效率有限, 在研究应用中不能大量推广. 其次, 在目前的诱导分化体系中鼠源饲养层是最常用诱导方法, 这导致了鼠源基因污染细胞的可能, 因此需要进一步尝试建立高效可靠的人源饲养层. 诱导得到的细胞难于纯化, 来源于 ES 细胞的造血干细胞存在着许多亚群, 因此如何把不同类型的细胞分开以及在移植过程中具体应用哪个时期的造血干细胞还是一个问题. ES 细胞诱导获得的细胞在体内有无成瘤性尚无定论. 此外, 造血干细胞的标志还有争议. 由 ES 细胞分化来的造血干/祖细胞能否在体内重建造血, 并分化为具有造血重建功能的成熟血细胞尚需进一步论证. 本实验室曾开展了造血干/祖细胞增殖分化机制的研究^[44, 45], 并构建了慢病毒 RNA 干扰载体 pSicoR-SOCS-3, 用它成功地转染了 K562 细胞, 对比了正常 K562 细胞和 SOCS-3 基因沉默的 K562 细胞向红系发育的比率, 结果发现在相同的诱导条件下, SOCS-3 基因沉默有利于 K562 细胞向红系分化^[46]. 此外, 联合使用 15 周胎龄人胎肝基质细胞和人胎肝组织提取物模拟胎肝造血微环境, 诱导人 ES 细胞向造血细胞分化, 并比较了该方法与人胎肝基质细胞诱导法及人胎肝基质细胞/细胞因子诱导法之间的差别, 结果表明, 联合使用人胎肝基质细胞和人胎肝组织提取物可高效诱导人 ES 细胞向造血细胞分化, 且避免了鼠源饲养层所带来的异源性污染, 降低了实验成本^[47]. 这为深

入研究造血发育调控机制及以胚胎干细胞为启动细胞大规模的诱导产生红细胞奠定了基础。

综上所述, ES 细胞定向诱导分化为造血干/祖细胞的研究不仅为研究造血发育及分化调控机制提供了很好的模型, 而且为未来输血和造血干细胞移植带来了巨大的希望, 但还有许多问题需要解决, 仍需要进一步地研究和探索。

参 考 文 献

- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, **282**(5391): 1145~1147
- Giarratana M C, Kobari L, Lapillonne H, *et al.* *Ex vivo* generation of fully mature human red cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(1): 69~74
- Olsen A L, Stachura D L, Weiss M J. Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood*, 2006, **107**(4): 1265~1275
- Daley G Q, Scadden D T. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell*, 2008, **132**(4): 544~548
- Weiss M J. Embryonic stem cells and hematopoietic stem cell biology. *Aplastic Anemia and Stem Cell Biology*, 1997, **11**(6): 1185~1198
- Wang C, Faloan P W, Tan Z, *et al.* Mouse lysocardiolipin acyltransferase controls the development of hematopoietic and endothelial lineages during *in vitro* embryonic stem-cell differentiation. *Blood*, 2007, **110**(10): 3601~3609
- Tian X, Woll P S, Morris J K, *et al.* Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells*, 2006, **24**(5): 1370~1380
- Wang Y, Yates F, Naveiras O, *et al.* Embryonic stem cell-derived hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(52): 19081~19086
- Moore K A, Ema H, Lemischka I R. *In vitro* maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood*, 1997, **89**(12): 4337~4347
- Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, *et al.* Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood*, 2001, **98**(1): 6~12
- Nishikawa S I, Nishikawa S, Hirashima M, *et al.* Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 1998, **125**(9): 1747~1757
- Heigason C D, Sauvageau G, Lawrence H J, *et al.* Overexpression of HOXB4 enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Blood*, 1996, **87**(7): 2740~2749
- Schuringa J J, Wu K, Morrone G, *et al.* Enforced activation of STAT5A facilitates the generation of embryonic stem-derived hematopoietic stem cells that contribute to hematopoiesis *in vivo*. *Stem Cells*, 2004, **22**(7): 1191~1204
- Kurita R, Sasaki E, Yokoo T, *et al.* Tal1/Scl gene transduction using a lentiviral vector stimulates highly efficient hematopoietic cell differentiation from common marmoset (*Callithrix jacchus*) embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(9): 2014~2022
- Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5189): 154~156
- Doetschman T C, Eistetter H, Katz M, *et al.* The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood island myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 1985, **87**: 27~45
- Wiles M V, Keller G. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, 1991, **111**(2): 259~267
- Palacios R, Golunski E, Samaridis J. *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(16): 7530~7534
- Kennedy M, Firpo M, Choi K, *et al.* A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive hematopoiesis. *Nature*, 1997, **386**(6624): 488~493
- Faloan P, Arentson E, Kazarov A, *et al.* Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development*, 2000, **127**(9): 1931~1941
- Perlingeiro R C, Kyba M, Daley G Q. Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development*, 2001, **128**(22): 4597~4604
- Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, *et al.* The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*, 2008, **135**(8): 1525~1535
- Hiroshima T, Mihaara K, Sudo K, *et al.* Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS ONE*, 2008, **3**(2): e1544
- Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L, *et al.* Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(19): 10716~10721
- Chadwick K, Wang L, Li L, *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 2003, **102**(3): 906~915
- Wang L, Menendez P, Shojaei F, *et al.* Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med*, 2005, **201**(10): 1603~1614
- Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*, 2004, **103**(7): 2504~2512
- Vodyanik M A, Bork J A, Thomson J A, *et al.* Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lympho-hematopoietic potential. *Blood*, 2005, **105**(2): 617~626
- Tian X, Morris J K, Linehan J L, *et al.* Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*, 2004, **32**(10): 1000~1009
- Qiu C, Hanson E, Olivier E, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp Hematol*, 2005, **33**(12): 1450~1458

- 31 Trivedi P, Hematti P. Simultaneous generation of CD34⁺ primitive hematopoietic cells and CD73⁺ mesenchymal stem cells from human embryonic stem cell cocultured with murine OP9 stromal cells. *Exp Hematol*, 2007, **35**(1): 146~154
- 32 Bowles K M, Vallier L, Smith J R, *et al.* HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(5): 1359~1369
- 33 Chan K M, Bonde S, Klump H, *et al.* Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 2008, **111**(6): 2953~2961
- 34 Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-kattman M, *et al.* Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood*, 2007, **109**(7): 2679~2687
- 35 Lu S J, Feng Q, Caballero S, *et al.* Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nature Method*, 2007, **4**(6): 501~509
- 36 Osawa M, Hanada K, Hanada H, *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 1996, **273**(5272): 242~245
- 37 Miraglia S, Godfrey W, Yin A H, *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 1997, **90** (12): 5013~5021
- 38 Pasino M, Lanza T, Marotta F, *et al.* Flow cytometric and functional characterization of AC133⁺ cells from human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000, **108**(4): 793~800
- 39 Vodyanik M A, Thomson J A, Slukvin I I. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 2006, **108**(6): 2095~2105
- 40 Jokubaitis V J, Sinka L, Driessen R, *et al.* Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood*, 2008, **111** (8): 4055~4063
- 41 Ma F, Ebihara Y, Umeda K, *et al.* Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(35): 13087~13092
- 42 Lu S J, Feng Q, Park J S, *et al.* Biological properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cell. *Blood*, 2008, **112**(12): 4475~4484
- 43 Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, *et al.* Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (21): 11307~11312
- 44 谢小燕, 谢超, 李锦, 等. 凝集素 FRIL 体外维持造血干 / 细胞长期存活的机制初探. *中华血液学杂志*, 2004, **25**(8): 501~504
- 45 Xie X Y, Xie C, Li J, *et al.* *Chin J Hematol*, 2004, **25**(8): 501~504
- 45 师伟, 韩姝, 李艳华, 等. Wnt3 转基因基质细胞的建立及其对脐血 CD34⁺造血干 / 祖细胞扩增作用的研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(9): 835~841
- Shi W, Han L, Li Y H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(9): 835~841
- 46 刘雨潇, 吉蕾, 袁红丰, 等. SiRNA 沉默 socs3 对红系发育的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(7): 82~90
- Liu Y X, Ji L, Yuan H F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(7): 82~90
- 47 Liu Y X, Ji L, Yue W, *et al.* Cells extract from fetal liver promotes the hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*. 2009, **11**(1): 51~60

Differentiation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells From Embryonic Stem Cells*

YANG Chao, XI Jia-Fei, YUE Wen, PEI Xue-Tao**

(Stem Cells and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Embryonic stem cells(ESCs) are pluripotent cells derived from the inner cell mass of blastocyst-stage embryos, possessing permanent self-renewal and indefinite proliferative capacity *in vitro*. And ESCs could differentiate into the hematopoietic cell fate. Therefore ESCs may provide an alternative for hematopoietic stem cell transplantation and blood cells transfusion. Furthermore, ESCs differentiation could also provide a powerful model system to better understand the hematopoietic development and the mechanism involved. The current status for efforts to differentiate ESCs into hematopoietic lineages were reviewed.

Key words embryonic stem cells, hematopoietic stem/progenitor cells, differentiation, *in vitro*

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00755

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), The Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission(Z0005190043331, D07050701350702).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: November 3, 2008 Accepted: March 3, 2009