

综述与专论

造血干细胞自我更新调控及
wnt 信号在其中的作用*

张好建 苗振川 汪 蕴 丰美福**

(中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 干细胞生物学最为重要的问题之一就是干细胞自我更新的调控机制。造血干细胞具有自我更新和分化为各血细胞世系的能力, 但目前对其自我更新的调控机制尚未明确。大量的研究表明, 造血干细胞的自我更新受到来自其所处微环境和自身内在基因的共同调控。经典的发育调控通路——wnt 信号通路在造血干细胞自我更新调控中起着至关重要的作用。就造血干细胞自我更新及其调控, 特别是 wnt 信号通路在其中的作用作一综述, 并对其应用前景和今后的研究方向作了展望。

关键词 造血干细胞, 自我更新, 调控, wnt 信号通路

学科分类号 Q28

造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 的概念早在 200 年前就已提出, 来自骨髓的 HSCs 在整个生命过程中能够源源不断地产生血细胞, 它们具有干细胞所共有的特性即自我更新和多向分化潜能。HSCs 也可以被描述为造血重建细胞。HSCs 的这种特性构成了骨髓移植的理论基础, 使得骨髓移植成为半个世纪以来最为有效的临床治疗方法之一。近年的研究表明, 组织特异的干细胞也能向其他组织的细胞类型分化。经细胞移植后, 在特定环境下 HSCs 能向骨骼肌细胞、心肌细胞、内皮细胞以及肝细胞分化, 这就极大地推动了 HSCs 在临床上的应用^[1]。

虽然对 HSCs 表型特征和功能有了较为深入的了解, 但一个基本问题——HSCs 自我更新调控机制却不清楚。在大多数情况下, 通过各种生长因子、细胞因子等联合作用能促进 HSCs 大量扩增, 但这也加快了其分化进程^[2]。干细胞自我更新的调控机制, 已经成为干细胞领域的研究热点之一。笔者结合自己的工作, 就近来 HSCs 自我更新调控机制的研究进展作一综述。

1 造血干细胞自我更新调控

从某种角度来说, 干细胞体现了一种细胞的发育和功能状态。一般认为干细胞的发育, 包括自我更新、扩增、分化等, 是一个动态的复杂过程。在造血系统, 由于自我更新能力的差异导致了 HSCs

的异质性。多潜能祖细胞约占骨髓细胞的 0.05%, 可被分成三个不同类群: 长期造血干细胞 (LT-HSCs)、短期造血干细胞 (ST-HSCs) 和无自我更新能力的多能祖细胞 (MPPs)。LT-HSCs 的自我更新能力可保持于整个生命过程, 而 ST-HSCs 只能维持约 8 周的时间, 进而产生无自我更新能力的多能祖细胞。随着 HSCs 的发育, 其自我更新能力也在不断丢失。在成体, HSCs 维持在一个相对恒定的水平, 通常认为 HSCs 群体处于静止状态。近来的研究表明, 在成体小鼠每天仅有 8% ~ 10% 的 LT-HSCs 进入细胞周期, 而所有 HSCs 在 1 ~ 3 个月内完成一次细胞周期。但对于人类 HSCs 进入细胞周期的比率却不清楚。

在体内, LT-HSCs 受到各种因素的作用进入细胞周期, 通过自我更新得到扩增, 而后进入血液循环。现在已知一些生长因子在体外能诱导 HSCs 增殖。干细胞因子 (SCF) 是造血干细胞的维持因子 (survival factor), 近来认为 SCF 和 TPO 共同作用能促进造血干细胞的不对称分裂, 并始终保持一个具有自我更新能力的 HSC^[3]。Flt-3 是 III 型酪氨酸激酶受体, 主要表达在原始造血祖细胞表面。Shah 等^[4]认为 Flt-3 配体 (FL) 和 Flt-3 之间的作用有

* 北京市自然科学基金资助项目 (7022023)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62571017, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2004-01-12, 接受日期: 2004-03-31

助于造血干细胞的体外扩增与干细胞特性的维持。越来越多的试验证实，各种生长因子如血管内皮生长因子 (VEGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、基质细胞衍生因子 (SDF-1) 等对于造血干细胞具有重要的调控作用^[5-7]。这些因子在促进 HSCs 增殖的同时却不能抑制其分化。但可喜的是，Punzel 等^[8]证实，造血支持细胞能招募 HSCs 进入细胞周期并促进 HSCs 的不对称分裂，促进细胞增殖，并能保持其干细胞潜能。从而证实 HSCs 与基质细胞之间的直接接触对于维持造血干细胞自我更新潜能是必需的。Ueno 等^[9]发现 mKirre 是基质细胞膜蛋白，可能在基质细胞与 HSCs 之间传导信号，从而促进 HSCs 自我更新，并抑制其分化。我们也从人胎肝和脐血中分离鉴定了具有间充质干细胞特性的细胞，它们具有造血支持功能，并在一定程度上维持造血干细胞未分化状态，而且也表达 mKirre 同源基因。

持续分裂和自我增殖细胞的一个很重要的特征，就是能通过端粒酶的活性来维持细胞端粒长度。在小鼠，LT-HSCs 具有和癌细胞类似的端粒酶活性，而 ST-HSCs 和 MPPs 的端粒酶活性大大降低^[10]。Allsopp 等^[11]研究表明，小鼠 LT-HSCs 在连续移植过程中随着不断的分离其端粒长度在逐步缩短。越来越多的研究表明，端粒缩短限制了 HSCs 的再生能力。所以，研究人员试图通过维持端粒酶活性获得永生化的 HSCs。

HSCs 同其他类型的细胞一样，也受到程序性细胞死亡或者细胞凋亡的调控。Domen 等^[12]通过在小鼠内过表达凋亡抑制基因 bcl-2，能引起 LT-HSCs 的不断增加。不同品系的小鼠在 HSCs 数量和细胞周期上表现出极大的不同，这也可能是由它们在细胞凋亡程度上的不同引起的。研究表明，几个染色体区域可能控制着这种多态性，但目前尚不知其中的调控子。

虽然对 HSCs 自我更新调控的分子机制目前还不是很清楚，但也发现一些信号通路参与了 HSCs 自我更新的调控，如 Hox、Notch、Sonic hedgehog (Shh) 和 wnt 信号通路。一些 Hox 基因如 HoxB4 和 HoxA9 的过表达能导致 HSCs 群体在体内和体外的选择性扩增，从而说明他们与 HSCs 的自我更新紧密相关^[13]。Varnum-Finney 等^[14]通过 jagged-1 激活 Notch 信号，在体外引起原始祖细胞的增加，并在移植后具有造血重建作用，从而证实 Notch 信号通路的激活能促进 HSCs 自我更新。同样，富含

HSCs 的人造血细胞群体受到 Shh 刺激也表现出增长自我更新能力，表明 Shh 通路在 HSCs 的自我更新调控中同样起着重要的作用^[15]。我们对 HSCs 自我更新调控总结如图 1。

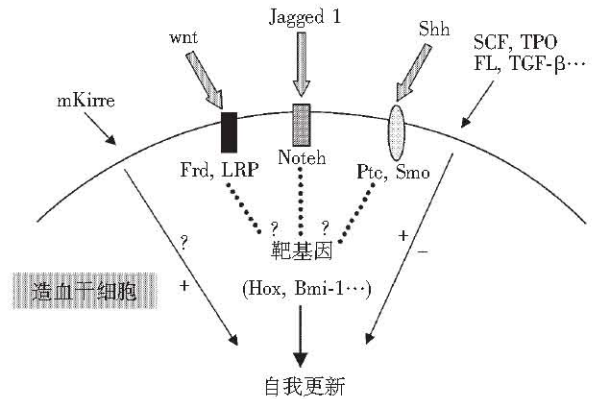


Fig. 1 The regulation of hematopoietic stem cells self-renewal

图 1 造血干细胞自我更新调控的示意图

2 wnt 信号通路对造血干细胞自我更新的作用

2.1 wnt 信号通路

wnt 蛋白家族作为一种分泌型信号分子，表达于无脊椎动物和脊椎动物的各种组织，并在它们的发育中起着重要作用。Nusse 等^[16]首先发现了 wnt 家族的第一个成员 wnt1 (也称为 Int-1)。Siegfried 等^[17]证实 wnt 能调控果蝇体节极性的发育。wnt 蛋白广泛表达于小鼠的各个器官组织，wnt 基因的突变将会引起小鼠四肢、大脑和肾脏等多种器官的发育缺陷。wnt 信号通路除了调控正常发育外，它们的失调也会引起细胞的癌化^[18]。

近来，已经将 wnt 通路的各种成员阐明。wnt 蛋白在细胞表面有两种类型的受体：七次跨膜的 Frizzled 蛋白家族和一次跨膜低密度脂蛋白相关的蛋白质家族 (LRP)。wnt 蛋白通常与跨膜受体 Frizzled 和 LRP-5/6 结合，激活 dishevelled (Dsh) 基因产物，激活的 Dsh 招募糖原合成酶 3 (GSK3) 和 axin，从而降低了 β -catenin 的磷酸化，阻止其被泛素介导的降解过程。稳定的 β -catenin 转移到核内，与转录因子 LEF/TCF 形成复合物激活下游靶基因，促进细胞的增殖与分化。Dickkopf-1 (DKK-1) 能结合 LRP-5/6，使其从 Frizzled 分离下来，阻断 wnt 受体复合物的形成，抑制了 wnt 信

号, 转而影响细胞的生长, 细胞分化, 还可能促进细胞凋亡^[19].

2.2 wnt 信号通路对造血干细胞的作用

wnt 信号通路在发育过程中的重要作用为研究其对干细胞自我更新的调控提供了可能. Ross 等^[20]证实 wnt10B 能维持前脂细胞的未分化状态; Reya 等^[21]的研究表明 wnt3A 在依赖 LEF-1 的情况下可诱导 B 细胞祖细胞的增殖; Chenn 和 Walsh 等^[22]证实 wnt 信号通路中其他成员如 β -catenin 的激活能促进干细胞进入细胞周期, 促进细胞增殖. 然而, 也有研究发现 wnt 信号参与干细胞不同世系的定向分化过程, 特别是在皮肤干细胞^[23]. 这就说明, wnt 信号通路对干细胞自我更新的影响可能与其特定的微环境有关, 并不排除其在干细胞分化上的作用.

近来研究表明, wnt 信号在造血系统中起着重要作用, 是造血干/祖细胞的重要调控子. 在胚胎造血发生中, wnt 蛋白, 特别是 wnt5A、wnt10B, 表达于胚胎造血器官卵黄囊和胎肝. 骨髓中一定数量 wnt 蛋白的表达以及 Frizzled 在骨髓来源的 HSCs 和造血祖细胞上的表达也支持了这一说法^[21]. 我们的试验也发现, 在人胎肝以及脐血来源的基质细胞有 wnt 蛋白表达, 这在一定程度上为此提供了证据. 通过基因转染或基因敲除小鼠模型等各种方法, 进一步加深了 wnt 蛋白对 HSCs 调控的研究. Austin 等^[24]将 wnt 1、wnt5A/wnt10B 与 SLF 共同作用能促进胎肝来源干细胞扩增可达 11 倍之多. 通过集落形成实验证实, 这些细胞仍然保留其未分化状态. Van Den Berg 等^[25]证实 wnt5A 蛋白能在基质细胞存在的情况下促进人 CD34⁺ Lin⁻ 造血干细胞的扩增. Willert 等^[26]将纯化的 wnt3A 蛋白作用于 LT-HSCs, 能导致其扩增达 300 倍, 并保持其 LT-HSCs 特征. 但是 wnt 信号通路对 HSCs 作用的直接证据却是近来才发现的. Reya 等^[27]采用具有富含半胱氨酸结构域的可溶性 Frizzled 与 wnt 结合, 从而抑制了 wnt 与其膜受体 Frizzled 的结合, 发现 HSCs 增殖仅为对照的 20%. 另外用 Axin 促进 β -catenin 的降解来阻断 wnt 信号通路, HSCs 增殖能力下降并且影响其造血重建功能.

近来对 wnt 通路中其他成员在造血系统, 特别是 HSCs 自我更新的作用也进行了研究. Reya 等^[27]将 wnt 通路中的成员 β -catenin 在骨髓 HSCs 中过表达, 发现 HSCs 能在长达 8 周的时间内群体倍增 100 多倍, 并且大约有 30% 细胞保持其干细胞特征, 表

明 β -catenin 具有维持 HSCs 干细胞特性并在体外扩增 HSCs 的能力, 这反应了上游 wnt 信号的作用. 进一步实验证实, 在体内正常微环境下 HSCs 在自我更新或者进入细胞周期时受到 wnt 信号的作用.

wnt 蛋白在功能上具有很大差异, 这也预示着 wnt 信号在造血系统作用的多样性. Murdoch 等^[28]研究表明, wnt5A 在体外对于造血干/祖细胞增殖与分化影响不大. 甚至一些研究组认为可溶性 wnt 蛋白具有抑制造血祖细胞自我更新的作用. Yamane^[29]证实 wnt3A 和基质细胞共同作用能抑制造血发生, 特别是 B 细胞世系和髓系细胞. 同时 wnt 信号可能在干细胞的分化中起着一定的作用. Brandon 等^[30]利用 QCE6 细胞作为模型, 发现抑制 wnt11 表达将会阻断 QCE6 细胞向红细胞世系分化, 而在培养体系中添加 wnt11 或 wnt5A 则会促进造血祖细胞向红细胞和单核细胞分化.

2.3 wnt 信号通路对造血干细胞的作用机理

由于 wnt 信号具有种属特异性或者组织特异性, wnt 蛋白对于自分泌或旁分泌方式的选择以及其受体表达模式不同, 这些都将决定 wnt 信号通路在细胞中的作用. 多数的研究表明 wnt 蛋白表达于 HSCs 所处的微环境细胞, 这说明它们多以旁分泌方式起作用. 但也可能以自分泌方式对 HSCs 的自我更新进行调控. 有研究发现造血祖细胞也表达 wnt10B, 这表明 wnt 可能通过自分泌方式调控干细胞. 另外, β -catenin 信号通路是受到造血生长因子的刺激而被激活的, 这也暗示了 wnt 诱导的自分泌机制. 至于 wnt 信号通路对 HSCs 自我更新调控的分子机制目前还很不清楚.

wnt 信号可能与其他的信号通路共同作用. 虽然以前研究表明 HoxB4 可直接作用于 HSCs^[13], 而 Notch1 的作用则需要其配体的存在, 但值得注意的是, wnt 引起 HSCs 自我更新时, Notch 1 和 HoxB4 的表达随之上调^[27], 这就为 HoxB4 和 Notch1 介导 wnt 信号提供了可能.

3 展 望

造血干细胞自我更新机制的研究才刚刚开始, 有许多问题尚待解决. a. 材料来源的种属差异、造血细胞群体多样性等等, 都给造血干细胞自我更新机制的研究带来很大困难. 所以在未来研究中, 获得纯化的确定的干细胞是至关重要的. Uchida 等^[31]在这方面的进展可能给我们带来新的曙光; b. 由于在体外无法区分未分化干细胞与定向祖细

胞, 所以, 建立一种良好的, 通过体内、体外手段均可进行分析的 HSC 增殖与分化调控模型, 可能成为未来研究的重点. 在这个模型中, HSC 能获得向血细胞各个世系分化的能力, 同时也能抑制分化开始事件的激活; c. wnt 信号通路与其他通路之间以及与转录因子之间 (如 HOXB4) 是否相互作用, 又是如何相互作用来共同调控 HSCs 发育, 将是未来研究的另一个重点. 它们可能调控共同的靶基因, 或者以一种梯度的方式进行作用, 来调节 HSCs 的自我更新; d. wnt 蛋白常常与细胞外基质结合在一起, 所以很难分离到有活性的蛋白. 采用新的方法分离具有生物活性的 wnt 蛋白并激活其下游的信号, 将会应用于未来的 HSCs 基因调控以及移植.

4 结 语

目前, 自我更新调控机制的研究已经成为干细胞领域的研究热点之一. 研究人员已经开始系统地分析胚胎干细胞、神经干细胞特别是造血干细胞及构成其微环境的基质细胞如 AFT024 等的基因指纹, 并获得了大量信息, 正逐渐从分子水平理解干细胞的增殖、分化和成熟的过程^[32, 33].

对于造血干细胞自我更新机制的研究, 将为其体外大量扩增提供理论基础. 同时, 由于癌症可被看作是干细胞自我更新调控的失控, 所以干细胞自我更新调控机制的研究, 也有利于对肿瘤的研究, 为肿瘤的临床治疗奠定基础. 总之, 人们对造血干细胞自我更新的调控机理认识已经有了一定的基础, 希望通过对造血干细胞自我更新机制的研究, 能够给细胞替代治疗和组织工程带来新的希望.

参 考 文 献

- Krause D S, Theise N D, Collector M I, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 1982, **105** (3): 369 ~ 377
- Domen J, Weissman I L. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today*, 1999, **5** (5): 201 ~ 208
- Luens K M, Travis M A, Chen B P, *et al.* Thrombopoietin, kit ligand, and flk2/flt3 ligand together induce increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34 + Thy-1 + Lin-cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. *Blood*, 1998, **91** (4): 1206 ~ 1215
- Shah A J, Smogorzewska E M, Hannum C, *et al.* Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34 +. *Blood*, 1996, **87** (9): 3563 ~ 3570
- Gerber H P, Malik A K, Solar G P, *et al.* VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 2002, **417** (6892): 954 ~ 958
- Larsson J, Blank U, Helgadóttir H, *et al.* TGF- β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability *in vivo* despite increased proliferative capacity *in vitro*. *Blood*, 2003, **102** (9): 3129 ~ 3135
- Hattori K, Heissig B, Rafii S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leuk Lymphoma*, 2003, **44** (4): 575 ~ 582
- Punzel M, Liu D, Zhang T, *et al.* The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. *Exp Hematol*, 2003, **31** (4): 339 ~ 347
- Ueno H, Sakita-Ishikawa M, Morikawa Y, *et al.* A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 2003, **4** (5): 457 ~ 463
- Morrison S J, Prowse K R, Ho P, *et al.* Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity*, 1996, **5** (3): 207 ~ 216
- Allsopp R C, Cheshier S, Weissman I L. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2001, **193** (8): 917 ~ 924
- Domen J, Cheshier S H, Weissman I L. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med*, 2000, **191** (2): 253 ~ 264
- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries R K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell*, 2002, **109** (1): 39 ~ 45
- Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, 2000, **6** (11): 1278 ~ 1281
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, *et al.* Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells *via* BMP regulation. *Nat Immunol*, 2001, **2** (2): 172 ~ 180
- Nusse R, Varmus H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982, **31** (1): 99 ~ 109
- Siegfried E, Perrimon N. Drosophila wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *Bioessays*, 1994, **16** (6): 395 ~ 404
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000, **14** (15): 1837 ~ 1851
- Gregory C A, Singh H, Perry A S, *et al.* The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem*, 2003, **278** (30): 28067 ~ 28078
- Ross S E, Hemati N, Longo K A, *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 2000, **289** (5481): 950 ~ 953
- Reya T, O'Riordan M, Okamura R, *et al.* Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 2000, **13** (1): 15 ~ 24
- Chenn A, Walsh C A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, 2002, **297** (5580): 365 ~ 369
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, *et al.* beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 2001, **105** (4): 533 ~ 545
- Austin T W, Solar G P, Ziegler F C, *et al.* A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, 1997, **89** (10): 3624 ~ 3635
- Van Den Berg D J, Sharma A K, Bruno E, *et al.* Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*, 1998, **92**

- (9): 3189 ~ 3202
- 26 Willert K, Brown J D, Danenberg E, *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003, **423** (6938): 448 ~ 452
- 27 Reya T, Duncan A W, Ailles L, *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, **423** (6938): 409 ~ 414
- 28 Murdoch B, Chadwick K, Martin M, *et al.* Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (6): 3422 ~ 3427
- 29 Yamane T, Kunisada T, Tsukamoto H, *et al.* Wnt signaling regulates hemopoiesis through stromal cells. *J Immunol*, 2001, **167** (2): 765 ~ 772
- 30 Brandon C, Eisenberg L M, Eisenberg C A. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood*, 2000, **96** (13): 4132 ~ 4141
- 31 Uchida N, Tsukamoto A, He D, *et al.* High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest*, 1998, **101** (5): 961 ~ 966
- 32 Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, *et al.* "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*, 2002, **298** (5593): 597 ~ 600
- 33 Hackney J A, Charbord P, Brunk B P, *et al.* A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (20): 13061 ~ 13066

Regulation of Haematopoietic Stem Cells Self-renewal and The Role of wnt Signaling in The Process *

ZHANG Hao-Jian, MIAO Zhen-Chuan, WANG Yun, FENG Mei-Fu **

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The mechanisms of regulating stem cells self-renewal is one of the most important issues in stem cell biology. Haematopoietic stem cells (HSCs) have the ability to renew themselves and to differentiate into all lineages of the blood but, the mechanism that control HSCs self-renewal remain unclear. Most researches showed it was controlled by the signal and growth factors from the microenvironment and the cell-autonomous components. The wnt signaling pathway plays an important role in this process. The HSCs self-renewal, the mechanism, the role of wnt signaling pathway and the perspectives of application and research in this field are discussed.

Key words HSCs, self-renewal, regulation, wnt signaling pathway

* This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of Beijing (7022023).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62571017, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn

Received: January 12, 2004 Accepted: March 31, 2004