

造血干细胞衰老的研究进展

安 瑞* 易微微* 鞠振宇**

(杭州师范大学衰老研究所, 杭州 311121)

摘要 成体干细胞衰老是组织器官老化的重要原因之一。越来越多的证据显示, 免疫系统的衰老起始于造血干细胞(HSC)功能的下降, 即造血干细胞的衰老直接影响免疫系统功能。然而, 有关 HSC 衰老的机理和分子机制仍旧不清楚。在这篇综述中, 我们总结了造血干细胞衰老的表型, 同时从细胞内在及外在两个方面探讨了 HSC 衰老的分子机制。

关键词 造血干细胞衰老, DNA 损伤, 端粒功能障碍

学科分类号 Q255

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00008

衰老的生物学机制一直是国际生命科学领域研究的热点和前沿。成体干细胞对人体自我修复和组织再生至关重要, 越来越多的研究表明衰老与干细胞功能的下降密切相关, 成体组织干细胞的功能异常和数量下降可能是人类衰老的一个重要原因。骨髓造血干细胞(HSC)是一类研究比较深入的成体干细胞, 然而有关 HSC 衰老的机理和分子机制仍旧不清楚。HSC 具有自我更新能力并能分化为机体所需的各种血细胞的前体细胞, 并最终生成各种血细胞, 包括红细胞、白细胞和血小板。由于成熟血细胞的生存周期比较短, 血细胞的生成是一项持续不断的工程。研究显示, 一个成人每天能产生 10^{11} 个血细胞。尽管拥有如此强大的增殖及自我更新能力, 随着机体的衰老, 整个造血系统的造血能力也会下降。因此, 对维持造血干细胞稳态的体内调控机制的研究, 不仅可以揭示与衰老及组织再生相关的关键信号因子和调控网络, 而且可以从核心环节及分子机制入手, 通过调节干细胞和/或所处微环境的状态, 达到提高干细胞功能、促进组织再生以及减缓人类衰老等目的。

在人类和小鼠的衰老过程中, 免疫表型定义的造血干细胞数目有 2~10 倍的扩增^[1-5]。造血干细胞的数量增多可能在一定程度上有利于维持造血系统的功能。但是, 这些数目上增多的干细胞并不足以弥补衰老的造血干细胞在功能上的下降, 尤其在

应激压力下, 衰老的造血干细胞表现出明显的自我更新能力减弱和分化功能的异常。随着衰老的加速, 机体的免疫系统包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞功能显著下降, 表现出骨髓衰竭、贫血、免疫力低下、患白血病几率增加等等^[6]。造血干细胞分化能力的下降被认为是导致年老的人和小鼠免疫功能下降的主要原因^[7-10], 有研究结果显示, 在老年人的外周血中存在着大量的记忆型 B 细胞, 限制了 B 细胞产生抗体的多样性, 使老年人接种疫苗效果低下, 增加了患自身免疫性疾病的风险^[11-12]。机体衰老时胸腺萎缩, T 细胞发育、分化、成熟出现障碍, 机体中初始 T 细胞(Naïve T cell)的数目减少。另外, 在衰老的过程中, 机体的固有免疫系统也会受到影响。虽然在年老的骨髓中髓系细胞数目增多, 但是巨噬细胞与中性粒细胞吞噬病菌的能力明显减弱。同时, 细胞浆中各类炎症因子如 IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1 β 等的浓度升高, 促使一系列与衰老相关的疾病如骨质疏松症及神经退行性疾病的发生^[13]。除此之外, 年老的干细胞移植后归巢能力减弱, 当受到细胞因子刺激诱导后动员到

* 共同第一作者。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-28865691, Fax: 0571-28861695, E-mail: zhenyuju@163.com

收稿日期: 2014-01-07, 接受日期: 2014-03-06

外周血中的反应应答较年轻造血干细胞相比明显减弱^[14]。

目前, 国内外的研究学者认为, 引起造血干细胞衰老的原因和机制有很多种, 主要包含细胞的内源性机制和外源微环境的作用两个方面。本文将从这个角度讨论与造血干细胞衰老相关的一些研究进展, 主要包括 DNA 损伤、端粒缩短、活性氧水平升高、表观遗传修饰、细胞极性改变、代谢及造血微环境等方面。

1 DNA 损伤与造血干细胞衰老

DNA 损伤的累积是导致生物体衰老的一大诱因。大量研究报道, 人类早衰型疾病与 DNA 损伤修复及 DNA 损伤检验点相关的基因发生突变有关。通过对小鼠模型研究发现, DNA 修复功能缺陷的小鼠表现出造血干细胞自我更新能力下降, 而衰老的造血干细胞中 γ -H2AX 阳性细胞增多, 彗星实验提示 DNA 双链断裂的比例增加, 表明 DNA 损伤累积可能导致造血干细胞的衰老以及功能的下降^[15-16]。这一结果的产生可能与造血干细胞修复 DNA 损伤的方式有关。小鼠的造血干细胞大多数处于静止期, 以保护其免受内外环境的损伤, 处于静止期的造血干细胞利用非同源末端连接 (NHEJ) 的方式来修复 DNA 损失, 然而这种易发生错误的 DNA 修复方式, 会导致造血干细胞中发生基因突变的几率增加^[17]。在受到应激损伤后, 处在静止期的造血干细胞能够重新进入细胞周期, 激活 DNA 损伤检验点, 修复产生的 DNA 损伤。如果修复失败, 将会激活细胞衰老或细胞凋亡通路, 并最终清除那些 DNA 损伤严重而难以修复的干细胞。在衰老的造血干细胞中, DNA 损伤修复的机制可能受到不同程度的抑制, 从而导致 DNA 损伤的累积和自我更新能力的下降。有研究结果显示, 一部分与 DNA 损伤修复及应激反应相关的基因, 包括 *Xrcc1*、*Blm*、*Xab2* 等, 在年轻与年老的造血干细胞中表达有显著差异^[18]。

DNA 损伤通过激活 *p53*、*p16*、*Bcl-2* 等检验点基因, 调控细胞的增殖、凋亡和分化。有研究表明, *p53* 的过度激活导致造血干细胞的早衰, 而敲除 *p53* 促进造血干细胞的自我更新能力^[19]。然而, 在早衰的小鼠模型中, 敲除 *p53* 导致干细胞的 DNA 损伤进一步累积, 从而引起干细胞的基因组不稳定, 加重了小鼠的早衰表型^[20]。有关 *p16* 在造血干细胞衰老中的作用机制尚存在争议。有研究表

明 *p16* 在衰老的造血干细胞中累积, 敲除 *p16* 可以缓解造血干细胞的衰老表型^[21]。同时有报道称, 在 *BubR1* 突变的早衰小鼠中, 清除 *p16* 阳性的衰老细胞可以促进组织器官的稳态维持, 进而逆转了小鼠的早衰表型, 提示 *p16* 依赖的细胞衰老在个体衰老中的作用^[22]。然而, 也有研究认为, *p16* 在造血干细胞衰老中的作用并不明显^[23]。DNA 损伤检验点激酶 *ATM* 和 *ATR* 在 DNA 单链或双链断裂及启动 DNA 损伤修复反应中起重要作用。*ATM* 主要通过磷酸化 *p53* 等基因, 控制下游靶基因的表达, 诱发细胞周期阻滞、细胞衰老或凋亡等。*ATM* 基因缺失的临床表现为早衰、免疫缺陷、小脑退行性病变等^[24]。研究发现 *ATM* 基因缺失小鼠出现骨髓衰竭, 提示 *ATM* 与造血干细胞的自我更新能力有关。然而, 进一步研究发现 *ATM* 并不是通过 *p53* 来参与造血干细胞的调控。*ATM* 缺失的造血干细胞中氧化应激水平增加, 通过激活 *p38*, 上调 *p16-pRB* 信号通路, 导致造血干细胞耗竭。使用抗氧化药物和 *p38* 抑制剂可以显著改善 *ATM* 缺失的造血干细胞的自我更新能力^[25-26]。最新研究发现, 造血干细胞在 DNA 损伤应答过程中通过上调 *p21*, 抑制 *p53* 的激活促进造血干细胞的 DNA 损伤修复, 从而保护其自我更新能力。而造血祖细胞在 DNA 损伤应答过程中通过激活 *p53*, 上调 *p21* 的表达, 促进造血干细胞的衰老^[27]。由此表明, 造血干细胞对 DNA 损伤的应答反应与其子代细胞(造血祖细胞)存在较大的差异, 进一步了解造血干细胞的应激反应中的独特机制具有重要意义。

衰老的造血干细胞表现出向淋巴系统分化能力下降, 而向髓系造血分化能力相对增加的现象。这一现象是否与 DNA 损伤有关呢? 最新研究表明, *AP-1* 转录因子超家族成员 *Batf* 在介导造血干细胞 DNA 损伤应答和抑制干细胞的自我更新中起重要作用, DNA 损伤诱导 *Batf* 上调可以促使具有淋系分化倾向的造血干细胞耗竭^[28]。这项研究发现, 在衰老过程中造血干细胞中的 DNA 损伤不断累积, 促使其向淋系分化的相关基因表达上调, 更多的具有淋系分化倾向的干祖细胞过早地进行分化, 从而导致具有向淋系分化的造血干细胞减少, 具有髓系造血分化倾向的造血干细胞相对增多, 最终影响了造血干细胞库的平衡。

2 端粒功能障碍与造血干细胞衰老

端粒是真核生物线性染色体末端的一段重复的

TTAGGG 的 DNA 序列, 端粒酶通过延长端粒的长度来保护染色体的完整, 对维持基因组的完整和稳定起着重要作用. 对人类健康状态及端粒长度和端粒酶活性的研究显示, 端粒的长度与人类的健康状态成正相关. 在人类, CD34⁺ 的造血干细胞被发现具有一定的端粒酶活性, 但并不足以维持衰老过程中端粒的长度, 因此在衰老过程中造血干细胞也会出现端粒缩短的现象^[29]. 当端粒缩短到不足以保护染色体末端时, 就会激活 DNA 损伤反应, 导致造血干细胞的细胞周期停滞或走向凋亡. 先天性角化不全是一种由端粒酶突变引起的常染色体显性疾病, 很多患者表现出端粒过快缩短和骨髓衰竭. 同样, 再生障碍性贫血患者中也有端粒酶的突变和端粒过快缩短, 提示端粒的功能障碍与造血干细胞的再生能力下降和骨髓衰竭密切相关.

端粒酶基因(Terc^{-/-})敲除小鼠是研究端粒缩短导致的成体干细胞衰老的重要实验动物模型. 第一代端粒酶敲除小鼠(G1Terc^{-/-})虽然失去了端粒酶的活性, 但仍然保留了足够的端粒长度, 因此 G1Terc^{-/-} 小鼠在衰老的过程中表现基本正常. 在连续互交的过程中 Terc^{-/-} 小鼠端粒进一步缩短. 在 C57BL6 背景下, 第 3 代端粒酶敲除小鼠(G3Terc^{-/-})表现出端粒缩短相关的衰老特征, 主要包括小鼠整体寿命的缩短、多个组织器官稳态的失调和再生能力的下降. 最新研究发现, 端粒酶的重新激活能够延长 G3Terc^{-/-} 小鼠的端粒长度, 减弱 DNA 损伤应答, 从而在 4 周内逆转小鼠的衰老表型^[30], 提示端粒缩短与 G3 小鼠衰老的直接因果关系.

研究发现 G3Terc^{-/-} 小鼠的造血干细胞体外克隆形成能力和体内造血重建能力均显著下降, 提示端粒缩短影响造血干细胞的自我更新能力. 对端粒酶与 p21 双基因敲除小鼠的研究显示, 抑制 p21 的表达可以改善造血干细胞的自我更新能力^[31]. Puma 是受 p53 调节的另外一个效应分子, 主要介导了 p53 依赖的细胞凋亡作用. 对 Puma 和 Terc 双基因敲除小鼠的研究显示, Puma 基因缺失通过抑制造血干细胞的凋亡改善了 G3Terc^{-/-} 小鼠 HSC 的稳态维持^[32]. 这些研究提示, 端粒功能障碍对造血干细胞的影响主要是由于激活了 p53 介导的 DNA 损伤检验点, 从而诱导了造血干细胞的衰老或者凋亡. 然而, 最新研究发现, p53 非依赖的 DNA 损伤检验点基因 Batf, 介导了端粒功能障碍的造血干细胞的过早分化, 从而影响造血干细胞库的平衡^[28]. 这些研究提示, 端粒缩短到一定程度, 通过激活 p53

依赖和 p53 非依赖的 DNA 损伤检验点基因, 影响造血干细胞的稳态维持, 自我更新和多向分化能力. 虽然, 在端粒酶缺失的造血干细胞中高表达端粒酶可以逆转其早衰表型, 但是在正常造血干细胞中高表达端粒酶基因, 并不能进一步改善其连续移植的能力, 提示存在其他机制调控小鼠造血干细胞的自我更新能力.

3 活性氧与造血干细胞衰老

细胞正常新陈代谢产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 如超氧离子、过氧化氢等, 会诱导产生各种 DNA 损伤, 其中包括影响线粒体 DNA 复制并导致线粒体功能的减弱. 线粒体的损伤进一步增加 ROS 的产生, 加重包括端粒在内的 DNA 损伤. 端粒的损伤还可以通过 p53-PGC1 α 轴进一步影响线粒体的功能, 增加 ROS 的产生, 从而形成一个恶性循环. 在衰老的细胞中, 也发现了线粒体 DNA 突变的增加以及 ROS 产生的增多. 利用小鼠模型研究发现, 线粒体 DNA 聚合酶催化亚基 γ (POLG)突变可以导致贫血, 提示 DNA 突变和 ROS 产生增多影响造血干细胞的功能和稳态维持^[33]. 造血干细胞在连续移植的过程中, ROS 的水平会逐渐升高, 通过给受体小鼠喂 ROS 的抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)可以显著改善供体造血干细胞的自我更新能力, 提示 ROS 在造血干细胞中的持续升高抑制了造血干细胞的稳态维持^[25]. 造血干细胞中 ROS 的升高会激活 p38MAPK 和 mTOR, 这两种蛋白的高表达会导致连续移植过程中的造血干细胞过早耗竭^[34]. 另外, Bmi1 基因敲除也会影响线粒体的功能, 导致细胞中 ROS 的水平升高, DNA 损伤信号通路激活, 给小鼠喂 ROS 的抑制剂 NAC 或敲除 DNA 损伤检验点基因 Chk2 能够改善 Bmi1 基因敲除小鼠造血干细胞的功能^[35]. 这些研究说明造血干细胞对 ROS 的升高非常敏感.

研究发现, Foxo 转录因子家族在调控 ROS 产生、保护处于静止期的造血干细胞的过程中发挥了重要作用. Foxo3a 是一个与人类寿命密切相关的基因^[36], Foxo3a 基因敲除会导致 p38MAPK 磷酸化增加, 从而削弱造血干细胞的功能和稳态维持. 使用抗氧化剂能够显著降低 Foxo3a 基因缺失小鼠中 p38MAPK 表达升高, 从而改善造血干细胞的功能^[37]. 众所周知, p53 在维持造血干细胞的静止期及自我更新能力中起着重要的作用. 而 p53 对 ROS 的调节具有两面性: 一方面, 在强烈的氧化应激压力

下, 高水平的 ROS 会诱发 p53 下游的一系列促氧基因(PIG3、PIG6、FDXR、Bax 及 Puma 等)^[38]的上调, 从而介导细胞的凋亡或者衰老; 另一方面, p53 可以通过激活一系列抗氧基因(TIGAR、GLS2、GPX1 和 ALDH4)降低 ROS 水平^[39-41], 防止 DNA 损伤发生, 促进细胞存活。因此, p53 对造血干细胞衰老的影响不但体现在对不同 DNA 损伤应答的调节作用方面(见 DNA 损伤部分), 也体现在通过激活不同的下游基因来调节造血干细胞中 ROS 的水平方面。

4 表观遗传修饰与造血干细胞衰老

有许多研究发现, 随着造血干细胞的衰老以及功能下降, 其细胞内的基因表达水平也发生改变, 但引起这些改变的原因目前并不很清楚。最近的研究结果提示表观遗传学的改变可能与造血干细胞的衰老有密切的联系。染色体结构的表观遗传修饰被认为是调控细胞记忆的看门人, 对于细胞转录信息的建立和维持具有重要作用^[42-43]。在干细胞的自我更新和分化中, 染色体除 DNA 序列之外的其他信息也同样需要复制。如在非对称分裂后, 不同的子细胞中的染色体的修饰是不一样的。因此, 造血干细胞分裂后, 子代的干细胞可以通过继承母细胞的表观遗传信息来维持干细胞的干性。从单个细胞水平来看, 年轻的造血干细胞分裂以后能够维持淋系和髓系分化的平衡, 而衰老的造血干细胞分裂以后向淋系分化的能力下降。这可能是由于在衰老过程中造血干细胞维持表观遗传修饰准确传递的能力下降。另外, 随着复制次数的增加, 造血干细胞的干性逐渐下降, 也可能是由于表观遗传修饰对细胞分裂次数的记忆。越来越多的研究表明衰老是全基因组水平的表观遗传改变。

表观遗传修饰包括 CpG 岛中胞嘧啶的甲基化^[44]以及组蛋白的乙酰化、甲基化和泛素化^[44-46]。有研究针对年轻小鼠(2 个月)、成年小鼠(6~12 个月)以及年老小鼠(22~24 个月)的基因表达谱进行分析, 结果显示, 一些与转录沉默相关的基因在年老小鼠的造血干细胞中表达下降, 包括与组蛋白修饰相关的基因 SWI/SNF 复合物(Smarca4 和 Smacb1)、多梳抑制家族(Ring1)及 Trithorax 复合物(Mll3 和 Mllt10)、组蛋白去乙酰化酶(Sirt2、Sirt3、Sirt7、Hdac1、Hdac5 和 Hdac6), 以及乙酰转移酶(Myst2)等。最近研究发现, H4K16 的乙酰化修饰水平在造血干细胞衰老的过程中降低, 逆转这一

改变可以使衰老的造血干细胞年轻化。同时, 与 DNA 甲基化相关的基因如 DNA 甲基转移酶(Dnmt3b)、Mbd1 等也在年老的干细胞中表达下调^[48]。Dnmt3a 在维持 DNA 的甲基化中起重要作用, 该基因缺失的造血干细胞在不同的染色体区域表现出甲基化升高或者降低的现象, 这些改变通过上调干性基因和抑制分化基因限制了造血干细胞的分化潜能^[47]。最新研究表明, 随着衰老的发生, 5%左右的 DNA 去甲基化, 而在一些 CpG 岛中出现高甲基化的现象^[48]。这些研究表明 DNA 甲基化的改变也是造血干细胞衰老的潜在原因之一。

PcG(polycomb group)蛋白是进化过程中保守的染色质修饰基因, 是防止细胞身份发生改变的细胞记忆系统的重要组成部分。PcG 蛋白构成不同的 PRC(polycomb repressive complex)蛋白质复合物, 根据其功能不同分为 PRC1 和 PRC2。PRC2 是一个作用于组蛋白 H3 赖氨酸位点 K27 的高度保守的组蛋白甲基转移酶, 在体细胞衰老与肿瘤发生中都起着重要作用。最近有研究显示, 它的靶基因 Kiss1r、Nav2 和 Hsf4 等在年老的造血干细胞中甲基化水平升高, 而 Sdpr 基因被认为随着衰老的发生甲基化水平逐渐降低。果蝇 zeste 基因的人类同源基因 EZH2(enhancer of zeste homolog2)是组成 PRC2 蛋白复合物的一个催化亚基, 在其功能中起核心作用。PRC2 复合物通过对 H3K27 的甲基化修饰触发 PRC1 复合物在特定基因位点聚集, 从而导致下游靶基因沉默。在小鼠模型中, 敲除 PRC1 或者 PRC2 中的成员, 例如: BMI1、RING1、MEL18、EED 和 EZH2, 均可以造成血细胞产生的缺陷, 提示 PRCs 在造血系统的发育和维持过程中起重要作用^[49]。PRC1 复合物下游的一个重要位点是 Ink4a-Arf(Cdkn2a), 该位点编码 p16^{INK4a}。研究发现敲除 Ink4a-Arf 可以逆转 BMI1 缺失的造血干细胞的缺陷^[50]。除此之外, PRC1 还可以通过调控其他基因来影响造血干细胞的功能。

5 细胞极性丢失与造血干细胞衰老

造血干细胞在衰老过程中其细胞黏附作用发生改变, 这种改变提示可能与细胞极性相关, 并且研究者在果蝇模型中也证实了干细胞的衰老的确与细胞极性的改变相关。衰老干细胞的自我更新能力下降及干细胞分裂方式的改变可能是其中心体出现变异及干细胞极性改变的主要原因^[51]。

CDC42 参与调节蛋白质和细胞器三维结构的

形成, 能对各种刺激造血干细胞的因子做出应答, 通过对全基因组分析显示在单核细胞中 RHO GTPase 家族中的 CDC42 的高表达和人类的衰老和发病有关. 最新的研究结果显示, 年老的造血干细胞 CDC42 活性升高, 引起微管蛋白 (tubulin)、CDC42 和乙酰化 H4K16 (epigenetic polarity) 在细胞核内的随机分布, 使衰老的造血干细胞失去了细胞极性. 通过药物抑制 CDC42 的活性可以增加其细胞的极性, 使乙酰化 H4K16 的分布年轻化, 进而使年老的造血干细胞的功能年轻化^[48]. 造血干细胞的衰老与其失去了细胞极性有关, 这一观点也已经在其他的干细胞研究中得到了证实^[52-53]. 最新研究显示, 年老造血干细胞中 Wnt5a 表达升高, 引起 Wnt 信号通路由经典通路到非经典通路的转变, 从而导致造血干细胞的衰老. Wnt5a 处理可以激活 CDC42, 导致年轻造血干细胞发生类似年老细胞的极性改变, 进而造成这些细胞的再生能力下降和分化潜能的改变. 相反, 抑制 Wnt5a 可以改善造血干细胞的功能, 缓解造血干细胞的衰老^[54]. 这些研究表明, Wnt 非经典信号通路和细胞极性改变在造血干细胞衰老中的重要作用.

6 代谢与造血干细胞衰老

成年小鼠中大部分的造血干细胞处于静止状态, 主要以糖酵解的方式获得能量. 造血干细胞的能量代谢改变与干细胞功能的命运决定密切相关. Lkb1 激酶可以磷酸化调控腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 及其相关的酶. 当机体能量和营养水平较低时, Lkb1 可激活 AMPK, 抑制 mTOR 并减慢细胞增殖. 研究表明, Lkb1^{-/-} 会使处于静止期的干细胞进入细胞周期, 最终导致干细胞库衰竭, 干细胞功能下降. Lkb1 通过下调 PGC1 及其下游的转录因子, 共同作用影响线粒体生物合成及功能, 使脂质和核酸代谢发生改变, ATP 的合成减少, 进一步证实了, LKB1 在维持干细胞能量代谢平衡中的重要作用^[55-57]. 最新研究显示, 自噬在造血干细胞衰老中起重要作用. 在衰老的干细胞中, 当造血干细胞在处于饥饿状态时, Foxo3a 触发的转录程序能促使处于饥饿状态的干细胞启动自噬程序, 维持能量平衡. 提示自噬对于维持衰老干细胞的功能具有重要作用^[58].

近年来 mTOR 分子在细胞衰老的调控过程中所起的作用渐渐被人们所熟知, 雷帕霉素处理小鼠可以显著延长正常小鼠的寿命^[59]. 文献报道称,

p53 与 mTOR 之间的相互作用可能影响细胞的衰老. 细胞受到损伤后, 通过激活 p53, 上调 Sestrin 蛋白的表达, 激活蛋白激酶 AMPK, 进而激活 TSC1-TSC2 复合物, 最终抑制 mTORC1 的活性^[60]. 在造血系统中, 由 Pten 缺失所引起的 mTOR 活化能够增加 p21、p16 和 p53 蛋白在脾脏细胞中表达, 以及 p16 和 p53 蛋白在造血干细胞中的表达, 并且这些蛋白表达量的升高能被雷帕霉素所抑制^[61]. 同样, 敲除 mTOR 的重要抑制蛋白 TSC1 后, 造血干细胞出现了明显的衰老现象^[62]. 另外, 文献报道, 随着年龄的增加, 小鼠造血干细胞中 mTOR 的活性逐渐增强, 下游激酶 S6K1 的磷酸化程度也随之加强. 由此可见, mTOR 激活可能通过 p53-p21 调节造血干细胞的衰老, 而 p53-p21 信号通路的激活也可能通过 mTOR 调节造血干细胞的稳态维持.

7 造血微环境与干细胞衰老

绝大多数成年小鼠或人的造血干细胞驻留在骨髓龛中, 骨髓龛是其增殖、自我更新、分化的主要场所. 造血干细胞的细胞龛在调节干细胞自我更新, 维持干细胞处于静止期, 调控干细胞的动员及分化方面起着重要作用^[63-65]. 造血干细胞的微环境由基质细胞 (成纤维细胞、巨噬细胞、脂肪细胞、网状细胞和内皮细胞)、细胞外基质 (胶原、蛋白多糖和纤维连接蛋白、层粘连蛋白等) 及造血生长因子组成. 构成造血干细胞微环境的局部细胞因子主要包括 Notch 信号活化分子、WNT 配体、血管生成素、干细胞因子 (SCF) 以及促血小板生成素 (TPO) 等, 这些因子共同参与调节干细胞的命运^[66].

随着衰老的发生, 成骨形成减少, 骨密度疏松, 骨髓中脂肪增多等都会改变干细胞所处的骨髓龛外环境. 为了研究在衰老过程中骨髓龛分泌的因子以及细胞外基质细胞对造血干细胞的影响, 科学家们将年轻与年老的造血干细胞竞争性地移植到年轻和年老的受体小鼠中, 结果显示, 在年老的造血干细胞微环境中由于分泌更多的促炎性因子 (CCL5 即 RANTES), 促使年老的造血干细胞偏向髓系分化^[66]. 这个结果表明, 年老的造血干细胞龛不仅会影响到造血干细胞的自我更新能力, 同时也会影响到造血干细胞的分化潜能. 同时有证据称在年老的造血微环境中促白血病干细胞的数目增多, 诱发白血病的几率增加^[67-68]. 趋化因子 CXCL12 由骨髓龛中的成骨细胞分泌, 被认为在造血干细胞停滞及吸引

到它们的微环境的过程中起着重要作用. 研究发现, 在年老的小鼠骨髓龛中, 间充质干细胞数目减少且偏向脂肪细胞分化增多的现象与细胞质中 CXCL12 的含量减少相关^[69].

结合素蛋白 43(CXN43)是连接干细胞和基质细胞的通道, 可以维持干细胞中的低 ROS 水平, 这可能与维持干细胞的功能相关. 实验证实, 当细胞受到遗传毒性压力时, CXN43 能够清除干细胞中产生的大量 ROS, 避免了 p38MAPK 及下游 p16^{INK4A} 的激活, 从而保护处于 ROS 压力下的干细胞免于凋亡^[70-72]. 提高骨髓龛中 ROS 水平, 破坏造血干细胞正常生长的低氧环境并导致造血干细胞衰老, 这一发现进一步表明年老的造血微环境会影响造血干细胞功能的维持.

由于端粒功能障碍小鼠中细胞微环境的改变, 造血干细胞的分化也受到了影响. 有研究报道, 端粒功能障碍通过引起造血干细胞外环境的改变而间接地导致其功能衰竭, 进而限制了造血干细胞的重建能力^[73], 在端粒功能障碍导致细胞外源性衰老方面, 端粒功能障碍引起的体内大环境改变能够引起骨髓 B 淋巴细胞和胸腺 T 淋巴细胞分化成熟障碍^[74], 进一步发现端粒功能障碍通过调控细胞周期影响了造血干细胞的稳态维持^[75]. 利用蛋白组学分析方法发现端粒功能障碍引起一系列炎症因子的表达升高同样与人类的衰老相关^[76]. 骨髓移植实验的结果显示, 骨髓移植的供体及受体的年龄都会影响移植后干细胞的重建及治疗效果, 提示无论对于人类或者小鼠, 干细胞的内外环境^[15]改变都会导致干细胞衰老.

8 展 望

维持器官的稳态和再生能力可以作为确保机体正常衰老的一个有用途径. 在之前的研究中, 均认为造血干细胞的衰老是一个不可逆的过程. 然而最新的研究支持这样的假设, 通过药物干预的方式, 针对随年龄增长引起的造血干细胞内的信号通路改变及表观遗传修饰的改变, 可以逆转衰老的造血干细胞中功能减退的表型. 例如, 抑制 CDC42 或者 mTOR 的活性可以逆转造血干细胞的衰老表型. 表观遗传学是指在不发生 DNA 序列改变的情况下, 能够影响细胞表型以及生理状态的可遗传的改变. 概括地讲, 我们认为这是一种能够影响一系列基因表达水平的非永久性改变, 是一种可逆的改变. 因此, 存在于衰老过程中的表观遗传学的改变也可以

被逆转. 重要的是, 如果表观遗传学修饰在造血干细胞的衰老中起着关键的作用, 那么, 通过对表观遗传的调节来逆转衰老的干细胞的表观遗传特征, 必将成为未来研究的一个重要方向, 例如, 地西他滨(decitabine)和丙戊酸(valproic acid)等早已在临床中用以改变机体的表观遗传特征, 我们期待在未来的研究中, 能够发现更多针对衰老的造血干细胞的表观遗传修饰靶点, 并筛选和研发新型的药物.

除此之外, 造血干细胞的衰老是一个整体性的过程. 这就意味着单纯改善造血干细胞的内源性衰老因素是不够的, 还要改善造血干细胞衰老的外源性因素. 造血干细胞的微环境和系统环境都对造血干细胞的衰老起重要作用. 另外, 衰老的造血干细胞还可以反过来影响干细胞微环境的组成, 从而促进干细胞微环境的衰老. 因此, 造血干细胞衰老是由造血干细胞微环境、造血干细胞自身共同构成的一个综合性科学问题.

参 考 文 献

- [1] Rossi D J, Bryder D, Zahn J M, *et al.* Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(26): 9194-9199
- [2] de Haan G, Nijhof W, Van Zant G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood*, 1997, **89**(5): 1543-1550
- [3] Morrison S J, Wandycz A M, Akashi K, *et al.* The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 1996, **2**(9): 1011-1016
- [4] Chambers S M, Goodell M A. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. *Stem Cell Rev*, 2007, **3**(3): 201-211
- [5] Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, *et al.* Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(12): 5465-5470
- [6] Linton P J, Dorhkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*, 2004, **5**(2): 133-139
- [7] Sudo K, Eme H, Morita Y, *et al.* Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2000, **192** (9): 1273-1280
- [8] Warren L A, Rossi D J. Stem cells and aging in the hematopoietic system. *Mech Ageing Dev*, 2009, **130**(1-2): 46-53
- [9] Geiger H, Van Zant G. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 2002, **3**(4): 329-333
- [10] Geiger H, Rudolph K L. Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. *Trends Immunol*, 2009, **30**(7): 360-365
- [11] Weiskopf D, Weiberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int*, 2009, **22**(11): 1041-1050
- [12] Frasca D, Blomberg B B. Aging affects human B cell responses. *J Clin Immunol*, 2011, **31**(3): 430-435

- [13] Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, *et al.* Inflamm- aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, **908**(): 244–254
- [14] Geiger H, Koehler A, Gunzer M. Stem cells, aging, niche, adhesion and Cdc42: a model for changes in cell-cell interactions and hematopoietic stem cell aging. *Cell Cycle*, 2007, **6**(8): 884–887
- [15] Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, *et al.* DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*, 2007, **447**(7145): 686–690
- [16] Rossi D J, Bryder D, Seita J, *et al.* Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 2007, **447**(7145): 725–729
- [17] Mohrin M, Bourke E, Alexander D, *et al.* Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(2): 174–185
- [18] Chambers S M, Shaw C A, Gatz C, *et al.* Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, 2007, **5**(8): e201
- [19] Dumble M, Moore L, Chambers S M, *et al.* The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood*, 2007, **109**(4): 1736–1742
- [20] Begus-Nahrmann Y, Lecgel A, Obenaus A C, *et al.* p53 deletion impairs clearance of chromosomal-unstable stem cells in aging telomere-dysfunctional mice. *Nat Genet*, 2009, **41**(10): 1138–1143
- [21] Janzen V, Forkert R, Fleming H E, *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 2006, **443**(7110): 421–426
- [22] Baker D J, Wijshake T, Tchkonia T, *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 2011, **479**(7372): 232–236
- [23] Attema J L, Pronk C J, Norddahl G L, *et al.* Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16 INK4A- mediated senescence. *Oncogene*, 2009, **28**(22): 2238–2243
- [24] Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**(1): 71–77
- [25] Ito K, Hirao A, Arai F, *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2006, **12**(4): 446–451
- [26] Ito K, Hirao A, Arai F, *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2004, **431**(7011): 997–1002
- [27] Insinga A, Cicalese A, Faretta M, *et al.* DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(10): 3931–3936
- [28] Wang J, Sun Q, Morita Y, *et al.* A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell*, 2012, **148**(5): 1001–1014
- [29] Flores I, Canela A, Vera E, *et al.* The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev*, 2008, **22**(5): 654–667
- [30] Jaskeliuff M, Muller F L, Paik J H, *et al.* Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase- deficient mice. *Nature*, 2011, **469**(7328): 102–106
- [31] Choudhury A R, Ju Z, Djojotubroto M W, *et al.* Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*, 2007, **39**(1): 99–105
- [32] Sperka T, Song Z, Morita Y, *et al.* Puma and p21 represent cooperating checkpoints limiting self-renewal and chromosomal instability of somatic stem cells in response to telomere dysfunction. *Nat Cell Biol*, 2012, **14**(1): 73–79
- [33] Norddahl G L, Pronk C J, Wahlestedt M, *et al.* Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell*, 2011, **8**(5): 499–510
- [34] Jang Y Y, Sharkis S J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 2007, **110**(8): 3056–3063
- [35] Liu J, Cao L, Chen J, *et al.* Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*, 2009, **459**(7245): 387–392
- [36] Flachsart F, Caliebe A, Kleindorp R, *et al.* Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(8): 2700–2705
- [37] Miyamoto K, Araki K Y, Naka K, *et al.* Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(1): 101–112
- [38] Lyakhov I G, Krishnamachari A, Schneider T D. Discovery of novel tumor suppressor p53 response elements using information theory. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(11): 3828–3833
- [39] Hu W, Zhang C, Wu R, *et al.* Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(16): 7455–7460
- [40] Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky M V, *et al.* Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(16): 7461–7466
- [41] Wang L, Jiang Z, Lei X G. Knockout of SOD1 alters murine hepatic glycolysis, gluconeogenesis, and lipogenesis. *Free Radic Biol Med*, 2012, **53**(9): 1689–1696
- [42] Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 2007, **128**(4): 635–638
- [43] Sparmann A, Van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6**(11): 846–856
- [44] Goll M G, Bestor T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2005, **74**: 481–514
- [45] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, **33**(Suppl): 245–254
- [46] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007, **128**(4): 693–705
- [47] Challen G A, Sun D, Jeong M, *et al.* Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*, 2012, **44**(1): 23–31

- [48] Beerman I, Bock C, Garrison B S, *et al.* Proliferation- dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell*, 2013, **12**(4): 413–425
- [49] Klauke K, de Haan G. Polycomb group proteins in hematopoietic stem cell aging and malignancies. *Int J Hematol*, 2011, **94** (1): 11–23
- [50] Park I K, Qian D, Kiel M, *et al.* Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, **423**(6937): 302–305
- [51] Cheng J, Turkel N, Hemati N, *et al.* Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature*, 2008, **456**(7222): 599–604
- [52] Florian M C, Geiger H. Concise review: polarity in stem cells, disease, and aging. *Stem Cells*, 2010, **28**(9): 1623–1629
- [53] Macara I G, Mili S. Polarity and differential inheritance-- universal attributes of life?. *Cell*, 2008, **135**(5): 801–812
- [54] Florian M C, Nattamai K J, Dorr K, *et al.* A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature*, 2013,
- [55] Gan B, Hu J, Jiang S, *et al.* Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2010, **468**(7324): 701–704
- [56] Gurumurthy S, Xie S Z, Alagesan B, *et al.* The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*, 2010, **468**(7324): 659–663
- [57] Nakada D, Saunders T L, Morrison S J. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature*, 2010, **468**(7324): 653–658
- [58] Warr M R, Binnewies M, Flach J, *et al.* FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature*, 2013, **494**(7437): 323–327
- [59] Harrison D E, Strong R, Sharp Z D, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 2009, **460**(7253): 392–395
- [60] Budanov A V, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 2008, **134**(3): 451–460
- [61] Lee J Y, Nakada D, Yilmaz O H, *et al.* mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(5): 593–605
- [62] Chen C, Liu Y, Zheng P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Sci Signal*, 2009, **2**(98): ra75
- [63] Adams G B, Scadden D T. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol*, 2006, **7**(4): 333–337
- [64] Kiel M J, Morrison S J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 2008, **8**(4): 290–301
- [65] Lo Celso C, Scadden D T. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci*, 2011, **124**(Pt 21): 3529–3535
- [66] Ergen A V, Boles N C, Goodell M A. Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood*, 2012, **119**(11): 2500–2509
- [67] Vas V, Wandhoff C, Dorr K, *et al.* Contribution of an aged microenvironment to aging-associated myeloproliferative disease. *PLoS One*, 2012, **7**(2): e31523
- [68] Vas V, Senger K, Dorr K, *et al.* Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis. *PLoS One*, 2012, **7** (8): e42080
- [69] Tuljapurkar S R, Mcguire T R, Brusnahan S K, *et al.* Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels with aging. *J Anat*, 2011, **219**(5): 574–581
- [70] Gonzalez-Nieto D, Li L, Kohler A, *et al.* Connexin-43 in the osteogenic BM niche regulates its cellular composition and the bidirectional traffic of hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood*, 2012, **119**(22): 5144–5154
- [71] Cancelas J A, Koevoet W L, de Koning A E, *et al.* Connexin-43 gap junctions are involved in multic Connexin- expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. *Blood*, 2000, **96**(2): 498–505
- [72] Taniguchi Isgukawa E, Gonzalez-Nieto D, Ghiaur G, *et al.* Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(23): 9071–9076
- [73] Ju Z, Jiang H, Jaworski M, *et al.* Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat Med*, 2007, **13**(6): 742–747
- [74] Song Z, Wang J, Guachalla L M, *et al.* Alterations of the systemic environment are the primary cause of impaired B and T lymphopoiesis in telomere-dysfunctional mice. *Blood*, 2010, **115**(8): 1481–1489
- [75] Song Z, Zhang J, Ju Z, *et al.* Telomere dysfunctional environment induces loss of quiescence and inherent impairments of hematopoietic stem cell function. *Aging Cell*, 2012, **11** (3): 449–455
- [76] Jiang H, Schiffer E, Song Z, *et al.* Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105** (32): 11299–11304

Progress in Hematopoietic Stem Cell Ageing Research

AN Rui*, YI Wei-Wei*, JU Zhen-Yu**

(*Institute of Aging Research, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China*)

Abstract Stem cell ageing has been considered as one of the major causes of the declined regenerative capacity of tissues and organs with age, especially those with high proliferate cellular turnover. Growing evidences show that the ageing of the immune system is initiated at the very top of the hematopoietic hierarchy and the ageing of hematopoietic stem cell (HSC) directly affect the function of the immune system. However, molecule mechanisms underlies HSC ageing is still unclear. In this review, we summarize the phenotypes of ageing HSCs and discuss how the cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms of HSCs ageing.

Key words hematopoietic stem cell ageing, DNA damage, telomere dysfunction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00008

*These authors contributed equally to this work.

**Corresponding author.

Tel: 86-571-28865691, Fax: 86-571-28861695, E-mail: zhenyuju@163.com

Received: January 7, 2014 Accepted: March 6, 2014