

## 综述

# 造血干细胞生理调控及其分子基础研究进展

董芳<sup>1</sup>, 郝莎<sup>1</sup>, 程辉<sup>1</sup>, 程涛<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院北京协和医学院, 血液病医院血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; <sup>2</sup>中国医学科学院干细胞医学中心, 天津 300020; <sup>3</sup>北京协和医学院干细胞与再生医学系, 天津 300020; <sup>4</sup>肿瘤医学协同创新中心, 天津 300020

**摘要:** 造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是发现最早、研究较多、在临床中广泛应用并一直起着范式作用的一类重要的成体组织干细胞。HSC研究被认为是整个干细胞生物学和再生医学的主要奠基学科之一。HSC具有自我更新、多向分化、静息维持、凋亡控制和运动迁移这五大特性。这些特性既相互影响, 又互相制约, 共同组成HSC功能的生理调控网络。本文将围绕构成HSC生物学的这五个主要方面在生理条件下的相关研究机制进行综述, 旨在通过对HSC功能调控的认识为其它类型的成体干细胞研究及应用提供引领和示范作用, 从而为整个干细胞与再生医学的发展奠定坚实的基础。

**关键词:** 造血干细胞; 自我更新; 分化; 静息; 凋亡; 迁移

**中图分类号:** R331; Q46

## Physiological regulation of hematopoietic stem cell and its molecular basis

DONG Fang<sup>1</sup>, HAO Sha<sup>1</sup>, CHENG Hui<sup>1</sup>, CHENG Tao<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; <sup>2</sup>Center for Stem Cell Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China; <sup>3</sup>Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; <sup>4</sup>Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Tianjin 300020, China

**Abstract:** As a classical type of tissue stem cells, hematopoietic stem cell (HSC) is the earliest discovered and has been widely applied in the clinic as a great successful example for stem cell therapy. Thus, HSC research represents a leading field in stem cell biology and regenerative medicine. Self-renewal, differentiation, quiescence, apoptosis and trafficking constitute major characteristics of functional HSCs. These characteristics also signify different dynamic states of HSC through physiological interactions with the microenvironment cues *in vivo*. This review covers our current knowledge on the physiological regulation of HSC and its underlying molecular mechanisms. It is our hope that this review will not only help our colleagues to understand how HSC is physiologically regulated but also serve as a good reference for the studies on stem cell and regenerative medicine in general.

**Key words:** hematopoietic stem cell; self-renewal; differentiation; quiescence; apoptosis; trafficking

造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 是目前发现最早、研究历史最长、临床应用最为广泛同时临床价值最为确切的成体干细胞类型之一。20世纪60年代, Till 和 McCulloch 两位科学家利用经典

的脾脏克隆形成单位 (colony formation units of spleen, CFU-S) 实验揭示了 HSC 的自我更新和多向分化潜能<sup>[1]</sup>。自此, 针对 HSC 主导的造血级联形成 (hierarchy) 以及 HSC 自我更新和多向分化功能及相关调

Received 2016-03-25 Accepted 2016-06-02

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the Major Research Plan from the Ministry of Science and Technology of China (No. 2016YFA0100600, 2015CB964400, 2011CB964800, 2013CB966902) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81421002, 81430004, 81330015, 91519315).

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23909396; E-mail: chengtao@ihcams.ac.cn

控机制的研究层出不穷<sup>[2-6]</sup>。这些研究一方面丰富了人们对于 HSC 生物学的理论认识, 促进了 HSC 在临床疾病中的广泛应用, 更为重要的是也为其它成体干细胞的研究提供了良好的示例和典范, 为干细胞与再生医学的发展奠定了坚实的基础。

HSC 的定义是一个功能学的概念, 主要包括多向分化 (differentiation 或 maturation) 和自我更新 (self-renewal) 两个方面, 前者主要是指 HSC 位于造血级联的最上游, 能够逐渐向下分化为造血祖细胞 (hematopoietic progenitor cell, HPC), 并最终分化成熟为不同谱系的各类功能血细胞; 后者是指 HSC 在维持向下游分化从而源源不断地产生成熟细胞的同时, 还能维持自身状态和功能的稳定, 以备应对多种应激状态下的造血调控。除此以外, HSC 的稳态维持 (resting 或 quiescence)、运动迁移 (trafficking) 以及凋亡控制 (apoptosis) 等特性也与其生物学功能的维持密切相关。由上述的五大特性组成的“SMART”特征不仅是 HSC 自身功能维持的关键调控因素, 同时也是临床治疗性 HSC 的功能“金标准”<sup>[7]</sup>。本文在综合当前文献并结合作者自己研究结果和体会的基础上就 HSC 这五大特性的生理性调控的研究进展逐一进行综述。

## 1 自我更新

HSC 自我更新功能的维持依赖于细胞本身的调控 (内源性调控) 及其所处的造血微环境中多种成分的调节 (外源性调控)。在单细胞水平, HSC 自我更新具有对称和不对称分裂两种模式。HSC 的内源性调控机制主要涉及一系列转录因子及相关信号通路分子的调节, 并且与 HSC 静息状态的维持密切相关<sup>[8]</sup>; 而作为外源性调控的造血微环境的功能单元称之为 niche, 各种 niche 成分通过细胞间接触和信号分子的相互作用维持和调节 HSC 的功能<sup>[9]</sup>。很大程度上来讲, 目前 HSC 体外扩增没有很大突破的一个重要原因就是我们还无法在体外完全模拟 HSC 所处的体内的造血微环境。

### 1.1 内源性调控机制

在成体 HSC 自我更新的内源性调控中, 除了经典的 Notch 信号通路和 Wnt 信号通路外<sup>[10, 11]</sup>, 一系列转录因子也参与其中。Scl、Gfi-1、Egr1、Egr3 等转录因子多是通过不同的机制抑制 HSC 的增殖并维持 HSC 处于 G0 期, 从而维持 HSC 的自我更新潜能<sup>[12-15]</sup>。而作为 PI3K/AKT 通路的效应分子,

FoxO 家族成员尤其是 FoxO3a 则主要是通过提高 HSC 对氧化应激的耐受并启动保护性的自噬从而维持 HSC 静息状态和自我更新能力<sup>[16, 17]</sup>。除此之外, Hox 家族中的 HoxB4 被认为是 HSC 自我更新的正向调控因子, 体外过表达 HoxB4 可快速显著促进 HSC 的扩增, 甚至达到 1 000 倍之多, 而且扩增后的 HSC 在体内仍保持了完整的 HSC 造血重建和多向分化潜能<sup>[18, 19]</sup>, 这一研究结论的获得为 HSC 的体外扩增带来了希望。可是后续研究中却发现 HoxB4 过表达的细胞在大动物体内长期移植后有诱发白血病的风险, 这一结果提示细胞内源性获得的生长优势也有潜在的致病风险, 同时也限制了该方法的广泛应用<sup>[20]</sup>。而最新的研究中利用不同造血细胞群的基因芯片数据进行多层筛选和比较, 筛选出 Hox 家族另一个分子 HoxB5 特异性地表达在纯化的长周期 HSC (LT-HSC) 上, 随后通过特异示踪 HoxB5 表达的转基因小鼠发现 HoxB5 高表达的 LT-HSC 在体内移植后表现出更强的造血重建和自我更新能力, 并对其所处的特异的造血微环境也进行了检测, 确定了 VE-cadherin<sup>+</sup> 的血管周细胞是其主要的定居位点<sup>[21]</sup>。由于 HSC 自我更新的维持机制与 HSC 的扩增和应用直接相关, 能否利用 HoxB5 这一特性用于 HSC 的扩增仍有待进一步研究。

HSC 自我更新的维持与其细胞周期状态密切相关, 那么细胞周期相关调节分子是否会影响 HSC 的自我更新呢? 我们的研究表明 p18 (CDKN2c) 作为 INK4 家族的细胞周期抑制蛋白, 具有抑制小鼠 HSC 自我更新的作用<sup>[22]</sup>。利用 p18 敲除的小鼠模型研究发现 HSC 的自我更新能力增强, 但是其细胞增殖、周期、凋亡及归巢能力并无明显变化, 这提示 p18 还具有非细胞周期依赖的作用。进一步的机制研究提示 p18 可能是通过促进 HSC 的自我更新性细胞分裂从而实现小鼠 HSC 的扩增, 这也为靶向 p18 的小分子化合物作为扩增 HSC 的靶点提供了研究基础。

基于上述的研究结果, 如何通过干预关键的转录因子及相关调控分子实现 HSC 的体外扩增是科学家们不断尝试的方向。虽然已经有一系列以无血清培养基为基础加之各种细胞因子组合的体外扩增体系被广泛应用于小鼠及人源 HSC 的实验研究中, 比如 SCF, TPO, Flt3-L, 胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor-binding protein-2, IGFBP2) 及血管生成素 (angiopoietin) 家族分子等<sup>[23-25]</sup>,

但是这些含有多种细胞因子的“鸡尾酒”样的组合却因为各种原因很难广泛应用于临床。小分子化合物由于其结构简单、效果特异、副作用少、易操作等诸多优势而成为扩增 HSC 的良好途径。已经有研究发现 SR1<sup>[26]</sup> 和 UM171<sup>[27]</sup> 这两个小分子化合物可用于人脐血来源的 ST-HSC 和 LT-HSC 的扩增, 但是其作用机制并不明确, 而且目前也还没有关于这两个小分子化合物的临床报道。在这一研究领域, 我们合作研究团队利用计算机虚拟筛选技术, 以 p18 为靶点筛选出特异的小分子抑制剂用于 HSC 的体外扩增, 结果表明该类抑制剂可以相对特异性地阻断 p18 与 CDK4/6 及 cyclin D 的结合, 经过该抑制剂处理的 HSC 体内自我更新能力显著增强, 从而实现了小鼠 HSC 在体外短期培养的扩增<sup>[28]</sup>。进一步的研究发现另一个靶向 p18 的小分子抑制剂对脐血来源的 CD34<sup>+</sup>HSC 也具有显著的扩增能力<sup>[29]</sup>。该研究的发现为临床体外扩增足够数量的、可供移植的 HSC 提供了独特的小分子化合物, 为进一步研制具有扩增 HSC 作用的药物奠定了基础。

除此以外, 表观调控分子通过对 DNA 或者组蛋白的表观遗传修饰对 HSC 的自我更新发挥调控作用。DNA 甲基化转移酶 (DNMT) 家族主要包括 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B, 其中前者主要维持 DNA 的甲基化, 而后两者则对 DNA 发挥从头 (*de novo*) 甲基化作用。利用逆转录病毒介导的 Cre 表达特异敲除 *Dnmt3a* 和 / 或 *Dnmt3b* 的研究发现, 相比于 *Dnmt3a* 或者 *Dnmt3b* 单独缺失, *Dnmt3a* 和 *Dnmt3b* 双敲除的 HSC 长期自我更新能力丧失<sup>[30]</sup>。后续研究利用条件性基因敲除小鼠发现 *Dnmt3a* 缺失的 HSC 自我更新能力增强, 但是 HSC 的多向分化出现了阻滞, 这主要与 *Dnmt3a* 缺失引起分化相关的基因的转录抑制有关<sup>[31]</sup>。深入研究也揭示了 *Dnmt3a* 和 *Dnmt3b* 对 HSC 起了既交叉重叠又相对特异的作用<sup>[32]</sup>。Sirtuin 6 (Sirt6) 作为 Sirtuin 家族的组蛋白去乙酰化酶, 通过与染色体结合特异性地对 H3K9 和 H3K56 发挥去乙酰化作用, 从而抑制 NF- $\kappa$ B、C-Jun、MYC 和 Hif-1 等信号通路的转录活性<sup>[33-35]</sup>。最新的研究表明, Sirt6 缺失的 HSC 不能维持在静息状态反而更加快速地进入细胞周期, HSC 的数量虽然增加但是其长期造血重建和自我更新能力下降。从机制上讲, Sirt6 缺失导致 H3K56 的乙酰化程度增高, 进一步激活 Wnt 信号通路的关键转录因子 TCF/LEF1 的转录, 从而导致 HSC 过度增殖, 继

而引起其衰竭<sup>[36]</sup>。

## 1.2 外源性调控机制

造血微环境是由一系列细胞、细胞因子以及细胞外基质等多种组分构成的复杂结构。经典的成骨细胞龛和血管内皮细胞龛对 HSC 静息状态和自我更新功能的维持早有报道<sup>[9, 37]</sup>。最新研究发现在内皮细胞龛中, 高表达 CD31 和血管内皮粘蛋白 (endomucin) 的 H 型内皮细胞以及血小板源性生长因子受体 b 阳性 (PDGFRb<sup>+</sup>) 的血管周基质细胞通过促进动脉血管的形成和干细胞因子的分泌, 维持 LT-HSC 的静息状态, 从机制上讲主要与该类内皮细胞中 Notch 信号通路的激活相关。利用这一特性激活年老小鼠血管内皮细胞中的 Notch 信号可以部分缓解年老小鼠 LT-HSC 的功能缺陷<sup>[38]</sup>。同时, 处于骨髓微环境中的巨噬细胞通过表达 DARC/CD234 与 LT-HSC 表面的 CD82 结合, 促进下游 TGF $\beta$ -Smad3 信号通路的激活, 从而抑制 LT-HSC 的细胞周期进程, 使其维持在静息状态<sup>[39]</sup>。

除了微环境中的细胞成分外, 微环境中的细胞因子也对 HSC 的增殖、存活及自我更新发挥关键调控作用。我们近期工作利用基因缺失的小鼠模型研究发现, 转录因子 ATF4 一方面可通过上调骨髓微环境中基质细胞和内皮细胞中 Angptl3 的分泌而维持胎肝 HSC 的急剧扩增<sup>[40]</sup>, 另一方面, ATF4 缺失的 HSC 本身也存在造血重建和自我更新能力的缺陷, 这些结果不仅证实了微环境中的细胞成分通过分泌关键细胞因子促进 HSC 自我更新, 同时也证明了内源性细胞因素与外源性环境因素在调控 HSC 功能方面的双重交叉作用<sup>[41]</sup>。这些研究结果从微环境角度为寻找扩增 HSC 的靶向干预措施和策略提供了指引和帮助。

除了细胞及细胞因子外, 骨髓微环境中的活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 一方面对移植供体 HSC 起了直接的调控作用; 另一方面, ROS 对移植受体微环境的影响间接地对供体 HSC 的造血重建和自我更新能力发挥调控作用。研究表明, 相比于常氧环境 (21% 氧含量), 在低氧环境下 (3% 氧含量) 收集的小鼠骨髓或者人脐带血 HSC 的体内长期造血重建能力显著增强。这主要是由于常氧环境导致的非生理性的氧化应激引起线粒体通透性增加, 继而胞内 ROS 含量急剧升高从而损伤了 HSC 的长期自我更新<sup>[42, 43]</sup>。利用药物或者小分子化合物进行干预将会显著改善 HSC 的移植效率。我们知道,

移植前的预处理措施(包括照射或者化疗药物处理)会损伤受体的骨髓微环境。我们的工作证实放射损伤的受体骨髓微环境对移植进来的供体 HSC 产生“旁观者效应”(bystander effect), 导致供体 HSC 的植入不良和自我更新能力的下降, 其原因主要与微环境中一系列 ROS 的升高有关, 而降低 ROS 的产生可以有效促进外源 HSC 的植入<sup>[44]</sup>。造血微环境中持续高水平的 ROS 会损害 HSC 的功能并最终耗竭 HSC, 而超氧化物歧化酶(Mn-SOD)和过氧化氢酶(catalase)作为体内清除 ROS 的特异酶可以降低 ROS 水平从而成为提高 HSC 长期植入并维持自我更新的潜在靶点。我们进一步的研究表明, 外源性过表达这两个酶 Mn-SOD 和 catalase 可通过降低 ROS 水平、促进 DNA 修复并减少细胞凋亡, 不仅提高对亚致死剂量照射动物的放射保护, 还可显著促进移植 HSC 的长期植入<sup>[45]</sup>。同样的策略也可应用于人源 HSC 上。采用抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸(NAC)对 NOD/SCID 小鼠进行预处理也可促进人源 LT-HSC 的植入, 同时 NAC 的应用并不影响人 HSC 各系的分化<sup>[46]</sup>。这些研究结果为今后优化 HSC 移植的方法、促进 HSC 长期植入并维持自我更新提供了新的策略。

总之, 微环境调控作为维持和改变 HSC 功能的重要的外源性调控方式在生理状态下通过多种途径(细胞因子及细胞代谢调控)对 HSC 的自我更新功能发挥至关重要的作用。如何从全局角度利用有效手段促使微环境组成成分维持和促进 HSC 的自我更新是未来 HSC 广泛应用及整个干细胞与再生医学研究中应该考虑的重要科学问题。

## 2 谱系分化模式

HSC 的分化谱系研究是伴随着 HSC 的表型研究而逐渐形成的, 而鉴定 HSC 功能的“金标准”还是通过体内动物移植模型而实现的。从上世纪八十年代开始, Weissman I.L 和 Toshio Suda 教授就陆续发表了利用细胞表面标志  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$  (LKS<sup>+</sup>) 来纯化小鼠 HSC<sup>[47-49]</sup>。进一步的研究将 CD34 和 Flk2/Flt3 这两个表面标记用于区分 LT-HSC 和短周期 HSC (ST-HSC)<sup>[50]</sup>。之后 Weissman 教授分别在 1997 年和 2000 年报道了 HSC 分化为祖细胞后的共同淋系祖细胞(common lymphoid progenitors, CLP)和共同髓系祖细胞(common myeloid progenitors, CMP)及其下游粒系-单核系祖细胞(granulocyte-macro-

phage progenitors, GMP) 和巨核系-红系祖细胞(megakaryocyte-erythroid progenitors, MEP) 的表面标志<sup>[3,4]</sup>。至此, HSC 的分化谱系级联初步形成。

经典的 HSC 分化模型认为, LT-HSC 处于造血级联的顶端, 能够维持长期的(大于 6 个月)多谱系造血重建和自我更新能力, 其下游的 ST-HSC 则在造血谱系重建和自我更新能力的维持方面都有所限制, 再向下游的多能祖细胞(MPP)则不具有长期的自我更新能力。MPP 下游主要分化为淋系和髓系两支即 CLP 和 CMP, 前者主要向 B 系祖细胞、T 系祖细胞和部分 NK 祖细胞和树突状细胞分化并最终形成各系成熟的终末分化细胞, 而后者先分化为 GMP 和 MEP, 并进一步向下游的单核祖细胞、巨噬前体细胞、巨核祖细胞和红系祖细胞分化, 进而成熟为各系功能细胞。这一“金字塔”式的庞大的分化模式接受多种转录因子和细胞因子形成的复杂网络的调控, 并随着机体的机能状态而处于不断地动态变化之中。这一经典的分化模型建立了我们对于 HSC 及造血系统调控的初步认识。

随着研究的进展, 一些新的以谱系偏向为主导的 HSC (lineage-biased HSC) 的分化模型也逐渐被发现和认可。例如, Muller-Sieburg 等的研究通过动物移植模型发现 HSC 在移植后其分化谱系有所偏向, 即部分 HSC 偏向于向髓系分化, 而另外的 HSC 则偏向于向淋系分化, 也有一些 HSC 平均向这两个谱系分化, 因此可以根据其分化潜能的倾向性分为偏向髓系的 HSC (myeloid-biased HSC)、偏向淋系的 HSC (lymphoid-biased HSC) 和平衡型的 HSC (balance HSC)<sup>[6]</sup>; Eaves 等的研究也根据 HSC 的分化谱系将其分为主要向髓系分化的  $\alpha$ -HSC, 向髓系和淋系分化的  $\beta$  型 HSC, 主要向淋系分化的  $\gamma$  和  $\delta$  型 HSC<sup>[51]</sup>。这些分类虽然命名不同, 但是其所指内容互相交叉和联系。随后, Jacobsen 等的研究在 ST-HSC 的下游鉴定出一类偏向淋系分化的多潜能祖细胞(LMPP), 该类细胞虽然不能向巨核系和红系细胞分化, 但是可以向 CLP 和 GMP 细胞分化, 这也间接地反映出 LT-HSC 也许可以直接向 MEP 细胞分化<sup>[52]</sup>。同时, 体外研究提示, 在给予特定谱系细胞因子比如巨核细胞集落刺激因子 M-CSF 的体系中培养 HSC, 利用报告基因系统可以很直观地发现 HSC 中与巨核系分化高度相关的转录因子 PU.1 表达的迅速升高, 导致 HSC 在发生首次细胞分裂之前就具有了向巨核细胞分化的倾

向<sup>[53]</sup>。这提示细胞所处的微环境中多种外源性信号刺激均可对 HSC 的谱系分化产生影响。除此以外,关于 MEP 的分化来源也颇具争议, Yamamoto 等的研究表明在机体遇到出血、血小板急剧减少等应激情况下 MEP 无需经过层层级联分化而是可以通过“旁路途径”(bypass way)直接从 HSC 分化而来,以满足快速获得所需的成熟细胞的强烈需求<sup>[2]</sup>。这些研究结果也在人源性的巨核和红系祖细胞的分化模式中得到了验证<sup>[54]</sup>。这些结果的获得进一步丰富了关于 HSC 分化途径的认识,尤其在 HSC 的谱系偏向方面多种“旁路途径”的存在使 HSC 在应对机体各种复杂状态的情况下可以更加“得心应手”。

### 3 静息状态的维持

前面已经提到, HSC 的自我更新能力与其静息状态的维持密切相关。HSC 区别于祖细胞及成熟细胞的一个重要标志是大部分的 LT-HSC 均处于细胞周期的 G<sub>0</sub> 期,即维持在一种静息的状态。在感受到各种刺激信号或者应激情况下 LT-HSC 可以迅速地进入细胞周期发生细胞分裂以满足机体的实际需求。细胞静息状态的维持对于 HSC 的功能调控是必需而关键的,由于各种因素导致过多的 LT-HSC 进入周期会引起过度的细胞增殖进而引起 LT-HSC 的衰竭。

#### 3.1 HSC 静息状态的维持与细胞周期调控因子密切相关

已有的研究表明细胞周期蛋白激酶抑制剂家族(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)分子通过调控 HSC 和 HPC 的周期而影响其功能。例如,早先报道 p21 缺失的 HSC 由于过度增殖,其自我更新和多向分化能力在连续移植后均出现衰竭<sup>[55]</sup>,这一点与 p57 缺失的 HSC 的功能变化类似,且 p57 可能在 HSC 静息中起着更加显著的主导作用<sup>[56]</sup>;而同属于该家族的另一个分子 p27 虽然对 HSC 的细胞周期影响不太明显,但是 p27 缺失的 HPC 则表现出显著的增殖能力增强<sup>[57]</sup>。由此可见,不同 CKI 家族分子针对不同的造血细胞发挥协调平衡作用。

#### 3.2 细胞因子 TGFβ 对 HSC 的细胞周期发挥关键调控作用

在造血系统中 TGFβ 信号通路参与一系列广泛的生理过程,包括维持免疫系统稳态和调节 HSC 的静息和自我更新。在体外培养中给予 TGFβ1 可以强力抑制 HSC 的生长,中和 TGFβ1 可以释放处

于休眠状态的早期造血前体细胞。从机制上讲, TGFβ1 可以通过上调 CD34 LSK 细胞中 p57 的表达促进 HSC 的静息<sup>[58]</sup>,而非通过 p21 或 p27 发挥作用<sup>[59]</sup>。最近的研究表明,成体骨髓中存在不同的 HSC 亚群,它们在自我更新及分化方面有不同的潜能<sup>[60]</sup>,而不同的亚群由于 TGFβ 受体的表达水平不同,因此对 TGFβ1 的反应性也不同<sup>[61]</sup>。有研究认为 TGFβ1 可以促进髓系分化的 HSC 增殖,同时抑制淋系分化的 HSC 增殖。虽然既往的研究中发现条件性敲除小鼠 TGFβR-1 后 HSC 自我更新能力及在造血压力情况下归巢能力并未见受损<sup>[62]</sup>,而 TGFβR-2 条件性敲除的小鼠由于过多的 HSC 进入周期,反而导致移植后重建能力下降<sup>[63]</sup>。但是这些 TGFβR 条件性敲除的小鼠模型均存在严重的炎症反应,难以排除这些炎症反应对 HSC 功能的影响。TGF 信号通路下游关键的信号分子是 Smad4。条件性敲除 Smad4 后 HSC 的分化能力不受影响,但是自我更新能力显著降低,这也再一次证明 TGFβ 信号通路在维持 HSC 自我更新方面的关键作用<sup>[64]</sup>。是否可以运用 TGFβ 对 HSC 细胞周期的调控和静息状态的维持来达到扩增 HSC 的目的还需要进一步的深入研究。

除此以外, TGFβ 也介导了微环境细胞与 HSC 之间的相互作用从而维持 HSC 的静息。研究发现作为 HSC 分化的下游细胞——巨核细胞可以作为骨髓微环境的细胞成分之一维持 HSC 处于静息状态<sup>[65]</sup>。在相关机制方面则发现巨核细胞分泌的 TGFβ 通过 TGFβ-Smad 信号通路维持稳态下的 HSC 静息。但是当遇到化疗损伤等应激状态时,巨核细胞则会暂时性地增强成纤维细胞生长因子(FGF)的分泌,抑制 TGFβ 信号通路,从而促进 HSC 进入细胞周期而达到扩增 HSC 的目的。

由上可知, HSC 的静息调控受到 niche 细胞和细胞因子等微环境成分的组合调控以维持生理调控和应激状态下的“及时切换”。

### 4 基因组稳定性和凋亡

作为整个造血系统的始祖, HSC 不仅维持整个造血级联的稳定,同时在多种应激刺激下也可能参与多种恶性转化的发生<sup>[66]</sup>。HSC 独特的细胞周期状态(即静息状态)虽然为避免应激条件导致的 DNA 损伤和错误修复的发生提供了一定的保障,但是研究 HSC 在调控凋亡反应和维持基因组稳定

性方面的作用及相关机制将为防止多种恶性转化的发生提供研究基础和可能的靶点。

众所周知, 细胞受到 DNA 损伤会激活 DNA 损伤的监测点, 而 G1 损伤检验点 (DNA damage checkpoint) 的核心是 p53。p53 信号通路下游通过 p21 和 Puma 两个分子对细胞周期和 DNA 损伤反应的双向调控, 在 HSC 应对 DNA 损伤修复维持功能稳定方面发挥关键作用<sup>[67, 68]</sup>, 同时 Gadd45a (growth arrest and DNA damage 45a) 也通过多种机制维持 HSC 的基因组稳定性。因此, 进一步解析 DNA 损伤反应在 HSC 细胞周期和命运决定中的作用, 是揭示 HSC 自我更新和造血系统稳态维持机制的重要一环。

Puma 是 p53 通路激活后介导细胞凋亡的分子。我们的工作显示 Puma 缺失的小鼠在接受放射线照射后, 细胞凋亡减少, 同时启动高效的 DNA 修复从而提高对放射损伤的耐受, 促进动物的长期存活, 但是并不会提高肿瘤发生的危险, 这一点与 p53 基因缺失小鼠模型的表型截然相反<sup>[69]</sup>。我们进一步的工作发现在细胞重编程技术中已经利用 Puma 缺失会促进 DNA 修复和维持基因组稳定性这一作用从而促进 iPS 细胞的生成, 从而证明了 Puma 介导 p53 对 iPS 细胞生成的抑制作用<sup>[70]</sup>。为何 Puma 缺失后高效的 DNA 修复并未增加恶性转化的发生是 Puma 在维持基因组稳定性方面的独特之处, 相关机制的深入研究将为如何在细胞应激损伤条件下维持基因组稳定性带来广阔的应用空间, 同时也为以 Puma 为干预靶点促进放射保护方面的潜在应用提供了研究基础。

与 Puma 作用机制不同, p53 下游另一靶基因 Gadd45a 主要通过诱导细胞分化、调控细胞周期、促进 DNA 损伤修复等作用维持基因组的稳定性。在 HSC 中外源性过表达 Gadd45a 并不会诱导细胞周期的停滞和细胞死亡, 反而是放射线照射等 DNA 损伤反应会诱导 LT-HSC 中内源性 Gadd45a 的表达, 后者通过激活 p38 MAPK 通路诱导并加速 LT-HSC 终末分化为成熟细胞并尽快清除这些细胞从而避免了基因组不稳定的 LT-HSC 的恶性转化, 这可以认为是 Gadd45a 维持基因组稳定性的机制之一<sup>[71]</sup>。鞠振宇等的工作利用基因缺失的小鼠模型的研究结果也表明, 生理状态下 Gadd45a 的缺失对 HSC 的表型改变并不明显; 在年轻小鼠给予 5-FU 等应激处理时, Gadd45a 基因缺失的 HSC 迅速进入

细胞周期, 增殖加速, 同时增强其自我更新和多向分化的潜能而避免了 HSC 的耗竭, 这反映出 Gadd45a 在诱导 HSC 细胞周期停滞同时维持 HSC 功能方面的特异性作用<sup>[72]</sup>; 研究也发现在年老的小鼠给予低剂量照射诱导 DNA 损伤后, Gadd45a 缺失的 HSC 凋亡减少, DNA 修复延迟, 而这些未及时修复的 DNA 损伤的累积反过来又抑制了 HSC 的功能并可能促进恶性转化的发生<sup>[73]</sup>。这些结果反映了 Gadd45a 在发育不同时期不同环境条件下对 HSC 命运决定的细胞特异性作用。这不仅利于深入认识在应激状态下 HSC 凋亡与功能维持的调控网络, 更为临床上衰老相关的恶性疾病的救治提供了可供选择的策略和靶点。

## 5 运动迁移

HSC 的运动形式主要包括两个方面即归巢 (homing) 和动员 (mobilization)。归巢是指外源性 HSC 进入机体后通过血液循环到达相对固定的造血微环境的过程; 而动员则是指处于造血微环境中的 HSC 在受到动员剂的作用后从特定的骨髓微环境中运动迁移到外周循环的过程。除此之外, 在某些病理情况下, HSC 自身出于防御性的保护也会从原来的造血微环境中运动迁移到适合其自身存活的特殊的微环境中发挥功能<sup>[74]</sup>。归巢及在骨髓微环境的定居作为移植后 HSC 长期植入的关键步骤, 涉及 HSC 与微环境之间的多种相互作用, 这些相互作用反过来又会影响 HSC 的静息与分化。由此可见, 归巢和动员是与 HSC 的其它特性相互联系和影响的过程。

研究表明, 生理条件下骨髓 HSC 的运动和迁移也会随着昼夜变化出现节律性的波动。动物在接受亮光照 5 h 时 HSC 的迁移可达到顶峰, 而处于黑暗环境中 5 h 时则降至低谷。这一现象的出现主要受到中枢神经系统分泌的肾上腺素的调控。骨髓中的神经末梢释放肾上腺素, 后者与骨髓基质细胞膜上的  $\beta_3$  肾上腺素受体 ( $\beta_3$ -AR) 结合, 引起转录因子 Sp1 的下调和 CXCL12 的快速下降, 从而利于 HSC 的迁移和运动<sup>[75]</sup>。

HSC 的归巢能力是其在骨髓微环境中定居和长期植入的前提。检测 HSC 归巢能力目前常用的方法是将带有特殊标记的包含 HSC 的群体细胞移植给照射或者非照射的受体动物, 在 HSC 发生初次分裂之前 (15~17 h) 检测其在受体骨髓不同微环境

部位(成骨 niche 和血管 niche 等)中的归巢能力<sup>[76]</sup>。借助于这些方法, HSC 归巢的调控方面已经取得了很多进展。研究表明参与 HSC 归巢并稳定处于特定的造血微环境的关键信号通路是 CXCL12/CXCR4 和 VCAM1/VLA-4 (integrin $\alpha$ 4 $\beta$ 1)<sup>[77]</sup>, 降低 CXCR4 信号通路敏感性可以促进造血干祖细胞(HSPC)动员<sup>[78]</sup>。CD26 作为一种丝氨酸蛋白酶可以水解 CXCL12 N-端的氨基酸从而阻断其趋化因子样作用<sup>[79]</sup>, 故 CD26 的抑制剂可用于促进移植后 HSPC 的归巢<sup>[80]</sup>。最新的研究发现组织因子途径抑制剂(TFPI)作为 CD26 的抑制因子也可以促进小鼠及人源的 HSPC 对 CXCL12 的反应, 从而促进移植后向骨髓的归巢和植入。从机制上讲, 这主要是由细胞外基质 Glypican3 所介导的<sup>[81]</sup>。除此之外, 细胞外基质的众多成分也会影响 HSC 在特异的骨髓 niche 中的归巢, 例如, 内皮细胞上透明质酸(hyaluronic acid)的表达可与 HSC 表面的 CD44 相互作用从而调节 HSC 的归巢<sup>[82]</sup>; 成骨细胞上骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达主要与 HSC 表面 Integrin 家族分子结合从而对骨髓腔中心而非骨内膜的 HSC 的归巢和

维持进行调控<sup>[83]</sup>。但是由于归巢检测方法学本身的限制, 如何联合影像学方法和手段在原位检测单个 HSC 移植后不同时间点的归巢能力还亟需进一步的探索。

HSC 运动另一主要方面是 HSC 的动员。如何安全快速地动员出足够数量的功能良好的 HSC 用于移植是决定治疗效果的关键。目前被广泛应用的 HSC 动员剂有细胞因子 G-CSF<sup>[84]</sup> 和 CXCR4 的小分子化合物拮抗剂<sup>[85]</sup> 等。裴雪涛研究组利用干细胞技术平台对小分子化合物库进行筛选, 发现了一种新型的 HSPC 的动员剂——Me6TREN (简称 Me6)<sup>[86]</sup>。通过单次皮下注射 Me6 即可将小鼠骨髓中的 HSPC 快速有效地动员到外周血中, 且动员的 HSPC 具有长期造血重建功能。而且, Me6 与 G-CSF 在动员 HSPC 方面具有协同作用, 为动员剂的联合应用提供了研究的基础。进一步的机制研究发现 Me6 主要是通过激活 MMP-9 的表达同时抑制 SDF-1 诱导的迁移和 VLA-4 介导的粘附而实现对 HSPC 的动员。该项工作首次证明了 Me6 强大的动员效果, 因而具有潜在的临床应用价值。

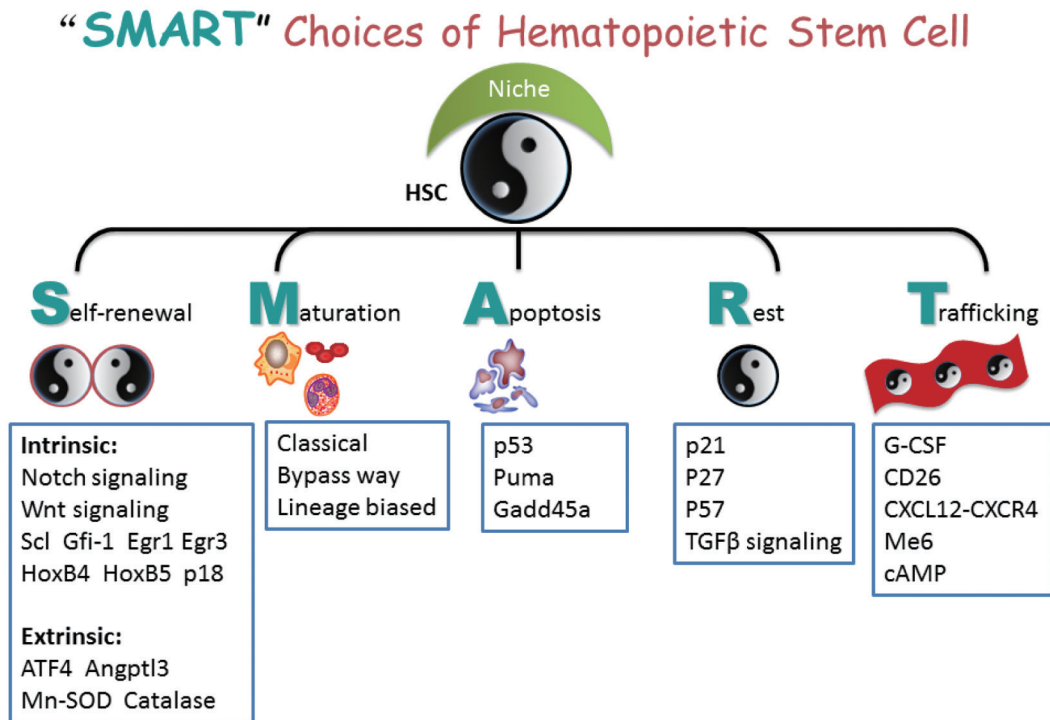


图 1. 生理状态下造血干细胞的“SMART”特性及相关调控分子

Fig. 1. “SMART” choices and physiological regulators of hematopoietic stem cell. HSC possesses self-renewal (S), maturation (M), apoptosis (A), rest (R) and trafficking (T) characteristics, namely “SMART” choices. Several molecules and regulators for each choice are listed, which comprise a complex network for the maintenance of HSC under physiological condition.

但是 HSC 的归巢和动员这两个看似方向相反的活动也并非是完全反向耦联在一起的。Adams 等的研究发现属于 G 蛋白耦联受体的 Ga 亚单位有激活型 (as) 和抑制型 (ai) 两种状态。一方面, 当微环境中的 CXCL12 与 HSC 表面的 CXCR4 结合后, 通过释放 G 蛋白的 ai 亚单位, 使 ATP 不能催化为 cAMP, 抑制了 HSC 的迁移, 从而维持其在微环境中的归巢; 另一方面, 当肾上腺素 (adrenalin) 及前列腺素 E (prostaglandin E, PGE) 等与其相应的 G 蛋白耦联受体结合后, 通过释放 G 蛋白的 as 亚单位, 使 ATP 催化为 cAMP, 促进 HSC 的运动和迁移, 从而有利于 HSC 的动员<sup>[87]</sup>。由此可见同属于 HSC 运动迁移范围的归巢和动员两个过程其中心的调控因素是 cAMP 的含量, 而其上游的受体及下游的信号转导通路的发现和挖掘将进一步丰富关于 HSC 运动的调控机制<sup>[88]</sup>。但是 CXCR4 是否也可以促进 as 亚单位的释放目前还不清楚。该研究为进一步寻找可以调控 HSC 运动的众多 G 蛋白耦联受体及相关调控通路带来了希望。

## 6 总结与展望

综上所述, HSC 的功能以自我更新和多向分化为核心, 以静息状态的维持为基础、有效的应激反应与凋亡控制为必备, 加之归巢与动员两个主要的运动模式共同构成了“SMART”干细胞功能五大特性。这些特性相互影响, 互相制约, 构成 HSC 功能的动态生理调控机制 (图 1)。作为在临床中应用最为广泛的成体干细胞之一, 深入探究并揭示 HSC 的功能特性及相关调控机制将为其更加广泛的临床应用提供可行的干预靶点和策略。更为重要的是, 作为干细胞研究中具有引领作用的学科之一, HSC 生理功能的调控及机制研究将为整个干细胞研究领域提供一个良好的范式, 从而推进干细胞与再生医学的整体发展。

### 参考文献

- 1 Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213–222.
- 2 Yamamoto R, Morita Y, Oechara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, Ema H, Nakauchi H. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 2013; 154(5): 1112–1126.
- 3 Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404(6774): 193–197.
- 4 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91(5): 661–672.
- 5 Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Bouriez Jones T, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JC, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark SA, Nerlov C, Jacobsen SE. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 2013; 502(7470): 232–236.
- 6 Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L, Huang JF, Sieburg HB. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 2004; 103(11): 4111–4118.
- 7 Cheng T. Toward ‘SMART’ stem cells. *Gene Ther* 2008; 15(2): 67–73.
- 8 Wang Z, Ema H. Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 2016; 103(5): 498–509.
- 9 Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505(7483): 327–334.
- 10 Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal *in vivo* and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 2002; 99(7): 2369–2378.
- 11 Huang J, Nguyen-McCarty M, Hexner EO, Danet-Desnoyers G, Klein PS. Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nat Med* 2012; 18(12): 1778–1785.
- 12 Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, Haman A, Barakat S, Iscove NN, Sauvageau G, Hoang T. Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 2010; 115(4): 792–803.
- 13 Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431(7011): 1002–1007.
- 14 Min IM, Pietramaggiore G, Kim FS, Passegue E, Stevenson KE, Wagers AJ. The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 380–391.
- 15 Cheng H, Hao S, Liu Y, Pang Y, Ma S, Dong F, Xu J, Zheng G, Li S, Yuan W, Cheng T. Leukemic marrow infiltration reveals a novel role for Egr3 as a potent inhibitor of normal

- hematopoietic stem cell proliferation. *Blood* 2015; 126(11): 1302–1313.
- 16 Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegue E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128(2): 325–339.
- 17 Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, Debnath J, Passegue E. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 2013; 494(7437): 323–327.
- 18 Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* 2002; 109(1): 39–45.
- 19 Abramovich C, Pineault N, Ohta H, Humphries RK. Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1044: 109–116.
- 20 Zhang XB, Beard BC, Trobridge GD, Wood BL, Sale GE, Sud R, Humphries RK, Kiem HP. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector. *J Clin Invest* 2008; 118(4): 1502–1510.
- 21 Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, Yamazaki S, Sinha R, Kao KS, Seita J, Sahoo D, Nakauchi H, Weissman IL. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* 2016; 530(7589): 223–227.
- 22 Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. *In vivo* self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* 2004; 6(5): 436–442.
- 23 Heckl D, Wicke DC, Brugman MH, Meyer J, Schambach A, Büsche G, Ballmaier M, Baum C, Modlich U. Lentiviral gene transfer regenerates hematopoietic stem cells in a mouse model for Mpl-deficient aplastic anemia. *Blood* 2011; 117(14): 3737–3747.
- 24 Khoury M, Drake A, Chen Q, Dong D, Leskov I, Fragoso MF, Li Y, Iliopoulou BP, Hwang W, Lodish HF. Mesenchymal stem cells secreting angiopoietin-like-5 support efficient expansion of human hematopoietic stem cells without compromising their repopulating potential. *Stem Cell Dev* 2010; 20(8): 1371–1381.
- 25 Zhang CC, Lodish HF. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(4): 307.
- 26 Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, Walker JR, Flaveny CA, Perdew GH, Denison MS, Schultz PG, Cooke MP. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010; 329(5997): 1345–1348.
- 27 Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, Csaszar E, Knapp DJ, Miller P, Ngom M, Imren S, Roy DC, Watts KL, Kiem HP, Herrington R, Iscove NN, Humphries RK, Eaves CJ, Cohen S, Marinier A, Zandstra PW, Sauvageau G. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 2014; 345(6203): 1509–1512.
- 28 Gao Y, Yang P, Shen H, Yu H, Song X, Zhang L, Zhang P, Cheng H, Xie Z, Hao S, Dong F, Ma S, Ji Q, Bartlow P, Ding Y, Wang L, Liu H, Li Y, Miao W, Yuan W, Yuan Y, Cheng T, Xie XQ. Small-molecule inhibitors targeting INK4 protein p18(INK4C) enhance *ex vivo* expansion of haematopoietic stem cells. *Nat Commun* 2015; 6: 6328.
- 29 Xie XQ, Yang P, Zhang Y, Zhang P, Wang L, Ding Y, Yang M, Tong Q, Cheng H, Ji Q, McGuire T, Yuan W, Cheng T, Gao Y. Discovery of novel INK4C small-molecule inhibitors to promote human and murine hematopoietic stem cell *ex vivo* expansion. *Sci Rep* 2015; 5: 18115.
- 30 Tadokoro Y, Ema H, Okano M, Li E, Nakauchi H. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2007; 204(4): 715–722.
- 31 Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, Bock C, Vasanthakumar A, Gu H, Xi Y, Liang S, Lu Y, Darlington GJ, Meissner A, Issa JP, Godley LA, Li W, Goodell MA. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* 2012; 44(1): 23–31.
- 32 Challen GA, Sun D, Mayle A, Jeong M, Luo M, Rodriguez B, Mallaney C, Celik H, Yang L, Xia Z, Cullen S, Berg J, Zheng Y, Darlington GJ, Li W, Goodell MA. Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(3): 350–364.
- 33 Sundaresan NR, Vasudevan P, Zhong L, Kim G, Samant S, Parekh V, Pillai VB, Ravindra PV, Gupta M, Jeevanandam V, Cunningham JM, Deng CX, Lombard DB, Mostoslavsky R, Gupta MP. The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat Med* 2012; 18(11): 1643–1650.
- 34 Sebastian C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenon JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* 2012; 151(6): 1185–1199.
- 35 Zhong L, D’Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD,

- Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihi OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* 2010; 140(2): 280–293.
- 36 Wang H, Diao D, Shi Z, Zhu X, Gao Y, Gao S, Liu X, Wu Y, Rudolph KL, Liu G, Li T, Ju Z. SIRT6 controls hematopoietic stem cell homeostasis through epigenetic regulation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell* 2016; 18(4): 495–507.
- 37 Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT. The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured? *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192(1): 12–18.
- 38 Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mae MA, Langen UH, Betsholtz C, Lapidot T, Adams RH. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature* 2016; 532(7599): 380–384.
- 39 Hur J, Choi JI, Lee H, Nham P, Kim TW, Chae CW, Yun JY, Kang JA, Kang J, Lee SE, Yoon CH, Boo K, Ham S, Roh TY, Jun JK, Baek SH, Kim HS. CD82/KAI1 maintains the dormancy of long-term hematopoietic stem cells through interaction with darc-expressing macrophages. *Cell Stem Cell* 2016; 18(4): 508–521.
- 40 Zhao Y, Zhou J, Liu D, Dong F, Cheng H, Wang W, Pang Y, Wang Y, Mu X, Ni Y, Li Z, Xu H, Hao S, Wang X, Ma S, Wang QF, Xiao G, Yuan W, Liu B, Cheng T. ATF4 plays a pivotal role in the development of functional hematopoietic stem cells in mouse fetal liver. *Blood* 2015; 126(21): 2383–2391.
- 41 Rieger MA. ATF4, a new player in fetal HSC expansion. *Blood* 2015; 126(21): 2351–2352.
- 42 Broxmeyer HE, O’Leary HA, Huang X, Mantel C. The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells *ex vivo*. *Curr Opin Hematol* 2015; 22(4): 273–278.
- 43 Mantel CR, O’Leary HA, Chitteti BR, Huang X, Cooper S, Hangoc G, Brustovetsky N, Srour EF, Lee MR, Messina-Graham S, Haas DM, Falah N, Kapur R, Pelus LM, Bardeesy N, Fitamant J, Ivan M, Kim KS, Broxmeyer HE. Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock. *Cell* 2015; 161(7): 1553–1565.
- 44 Shen H, Yu H, Liang PH, Cheng H, XuFeng R, Yuan Y, Zhang P, Smith CA, Cheng T. An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. *Blood* 2012; 119(15): 3629–3637.
- 45 Miao W, Xufeng R, Park MR, Gu H, Hu L, Kang JW, Ma S, Liang PH, Li Y, Cheng H, Yu H, Epperly M, Greenberger J, Cheng T. Hematopoietic stem cell regeneration enhanced by ectopic expression of ROS-detoxifying enzymes in transplant mice. *Mol Ther* 2013; 21(2): 423–432.
- 46 Hu L, Cheng H, Gao Y, Shi M, Liu Y, Hu Z, Xu J, Qiu L, Yuan W, Leung AY, Yang YG, Cheng T. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood* 2014; 124(20): e45–e48.
- 47 Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(4): 1502–1506.
- 48 Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 1992; 80(12): 3044–3050.
- 49 Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988; 241(4861): 58–62.
- 50 Osawa M, Hanada K-i, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242–245.
- 51 Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, Lee SJ, Brinkman R, Eaves C. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2007; 1(2): 218–229.
- 52 Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; 121(2): 295–306.
- 53 Mossadegh-Keller N, Sarrazin S, Kandalla PK, Espinosa L, Stanley ER, Nutt SL, Moore J, Sieweke MH. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* 2013; 497(7448): 239–243.
- 54 Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, Kaufmann KB, McLeod J, Laurenti E, Dunant CF, McPherson JD, Stein LD, Dror Y, Dick JE. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 2016; 351(6269): aab2116.
- 55 Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000; 287(5459): 1804–1808.
- 56 Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, Susaki E, Onoyama I, Tateishi Y, Nakayama K, Nakayama KI. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(3): 262–271.

- 57 Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nat Med* 2000; 6(11): 1235–1240.
- 58 Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 2009; 113(6): 1250–1256.
- 59 Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stier S, Scadden DT. Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1). *Blood* 2001; 98(13): 3643–3649.
- 60 Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 690–697.
- 61 Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 2010; 6(3): 265–278.
- 62 Larsson J, Blank U, Klintman J, Magnusson M, Karlsson S. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cell pool is not dependent on TGF-beta signaling *in vivo*. *Exp Hematol* 2005; 33(5): 592–596.
- 63 Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 2011; 147(5): 1146–1158.
- 64 Karlsson G, Blank U, Moody JL, Ehinger M, Singbrant S, Deng CX, Karlsson S. Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2007; 204(3): 467–474.
- 65 Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2014; 20(11): 1321–1326.
- 66 Krivtsov AV, Figueroa ME, Sinha AU, Stubbs MC, Feng Z, Valk PJ, Delwel R, Dohner K, Bullinger L, Kung AL, Melnick AM, Armstrong SA. Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML. *Leukemia* 2013; 27(4): 852–860.
- 67 Sperka T, Song Z, Morita Y, Nalapareddy K, Guachalla LM, Lechel A, Begus-Nahrman Y, Burkhalter MD, Mach M, Schlaudraff F, Liss B, Ju Z, Speicher MR, Rudolph KL. 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.
- 68 Bell JF, Sharpless NE. Telomeres, p21 and the cancer-aging hypothesis. *Nat Genet* 2007; 39(1): 11–12.
- 69 Yu H, Shen H, Yuan Y, XuFeng R, Hu X, Garrison SP, Zhang L, Yu J, Zambetti GP, Cheng T. Deletion of Puma protects hematopoietic stem cells and confers long-term survival in response to high-dose gamma-irradiation. *Blood* 2010; 115(17): 3472–3480.
- 70 Li Y, Feng H, Gu H, Lewis DW, Yuan Y, Zhang L, Yu H, Zhang P, Cheng H, Miao W, Yuan W, Cheng SY, Gollin SM, Cheng T. The p53-PUMA axis suppresses iPSC generation. *Nat Commun* 2013; 4: 2174.
- 71 Wingert S, Thalheimer FB, Haetscher N, Rehage M, Schroeder T, Rieger MA. DNA-damage response gene GADD45A induces differentiation in hematopoietic stem cells without inhibiting cell cycle or survival. *Stem Cells* 2016; 34(3): 699–710.
- 72 Chen Y, Ma X, Zhang M, Wang X, Wang C, Wang H, Guo P, Yuan W, Rudolph KL, Zhan Q, Ju Z. Gadd45a regulates hematopoietic stem cell stress responses in mice. *Blood* 2014; 123(6): 851–862.
- 73 Chen Y, Yang R, Guo P, Ju Z. Gadd45a deletion aggravates hematopoietic stem cell dysfunction in ATM-deficient mice. *Protein Cell* 2014; 5(1): 80–89.
- 74 Ma S, Shi Y, Pang Y, Dong F, Cheng H, Hao S, Xu J, Zhu X, Yuan W, Cheng T, Zheng G. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *J Hematol Oncol* 2014; 7: 71.
- 75 Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Hematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008; 452(7186): 442–447.
- 76 Grassinger J, Nilsson SK. Methods to analyze the homing efficiency and spatial distribution of hematopoietic stem and progenitor cells and their relationship to the bone marrow endosteum and vascular endothelium. *Methods Mol Biol* 2011; 750: 197–214.
- 77 Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* 2002; 195(9): 1145–1154.
- 78 Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT. CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 2001; 166(8): 5027–5033.
- 79 Shioda T, Kato H, Ohnishi Y, Tashiro K, Ikegawa M, Nakayama EE, Hu H, Kato A, Sakai Y, Liu H, Honjo T, Nomoto A, Iwamoto A, Morimoto C, Nagai Y. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) and SDF-1beta are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11): 6331–6336.
- 80 Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer

- HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 2004; 305(5686): 1000–1003.
- 81 Khurana S, Margamuljana L, Joseph C, Schoutedden S, Buckley SM, Verfaillie CM. Glypican-3-mediated inhibition of CD26 by TFPI: a novel mechanism in hematopoietic stem cell homing and maintenance. *Blood* 2013; 121(14): 2587–2595.
- 82 Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, Bertonecello I, Nilsson SK. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 2011; 118(6): 1516–1524.
- 83 Grassinger J, Haylock DN, Storan MJ, Haines GO, Williams B, Whitty GA, Vinson AR, Be CL, Li S, Sorensen ES, Tam PP, Denhardt DT, Sheppard D, Choong PF, Nilsson SK. Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins. *Blood* 2009; 114(1): 49–59.
- 84 Christopher MJ, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link DC. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 2009; 114(7): 1331–1339.
- 85 Tchernychev B, Ren Y, Sachdev P, Janz JM, Haggis L, O'Shea A, McBride E, Looby R, Deng Q, McMurry T, Kazmi MA, Sakmar TP, Hunt S 3rd, Carlson KE. Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(51): 22255–22259.
- 86 Zhang J, Ren X, Shi W, Wang S, Chen H, Zhang B, Wang Z, Zhou Y, Chen L, Zhang R, Lv Y, Zhou J, Nan X, He L, Yue W, Li Y, Pei X. Small molecule Me6TREN mobilizes hematopoietic stem/progenitor cells by activating MMP-9 expression and disrupting SDF-1/CXCR4 axis. *Blood* 2014; 123(3): 428–441.
- 87 Adams GB, Alley IR, Chung UI, Chabner KT, Jeanson NT, Lo Celso C, Marsters ES, Chen M, Weinstein LS, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT. Haematopoietic stem cells depend on Galpha(s)-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* 2009; 459(7243): 103–107.
- 88 Mendez-Ferrer S, Frenette PS. Galpha(s) uncouples hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 379–380.