

· 研究进展 ·

VCAM-1⁺巨噬细胞引导造血干祖细胞 向血管微环境归巢

李丹彤^{1,2} 薛文志¹ 李美^{1,2} 李林¹ 潘巍峻^{1,2*}

(1. 中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

[摘要] 造血干祖细胞可以通过增殖分化产生红细胞、白细胞、血小板等人体内所有类型的血液细胞,维持脊椎动物的终生造血。在发育过程中,造血干祖细胞诞生于动脉—性腺—中肾(AGM)区域后,后通过归巢锚定在特定的微环境中进行自我更新或向下游各血系分化。复杂的血管结构以及其他基质成份,如基质细胞等,构成了独特的造血微环境,调控造血过程的进行。然而,由于造血过程时空跨度非常大,观察手段十分有限,目前对造血微环境的精细结构以及调控造血干祖细胞归巢的分子细胞机制仍然知之甚少。为攻克这一难题,本团队在优化活体成像技术的基础上,进一步整合活体免疫荧光标记、遗传调控和图像重构计算等方法,对斑马鱼尾部造血组织(相当于哺乳动物胎肝)中的造血干祖细胞的归巢过程进行了解析,揭示了独特的微血管结构对造血干祖细胞停留的调控作用。在研究中,本团队还意外地发现了一种全新的微环境细胞,并将其命名为“先导细胞”。这类细胞是先前未被定义过的巨噬细胞新亚型,存在于归巢“热点区域”中,表现出“巡逻行为”,可以识别进入造血组织的造血干细胞并将其引入特定的血管结构中,从而实现造血干细胞的归巢。此项研究为造血干细胞移植相关的转化研究开辟了新的方向。

[关键词] 斑马鱼;活体成像;造血干祖细胞归巢;静脉微血管;VCAM-1⁺巨噬细胞

1 研究背景

正常成人体内每升血液中有 10^{12} 数量级的红细胞为人体运输营养物质和氧气, 10^9 白细胞发挥免疫功能, 10^9 血小板参与止血凝血。同时,人体内血液的新陈代谢相当旺盛,正常成熟的红细胞平均寿命为120天、白细胞约7—14天、血小板约7—9天。通过单细胞骨髓移植实验证实数量如此庞大的血细胞均来源于造血干祖细胞(Haematopoietic Stem and Progenitor Cell, HSPC)^[1]。哺乳动物发育过程中,HSPC产生于动脉—性腺—中肾区域(Aorta-Gonad-Mesonephros, AGM)的动脉血管,先后定植于胎肝(进行快速增殖)和骨髓(维持成体终生造血)^[2]。造血干祖细胞通过血液循环最终定植于造血微环境并发挥正常功能的过程被称为归巢。生命的维持高度依赖来源于HSPC的血细胞,而HSPC

正常发挥功能是以其成功归巢为前提的,因此,HSPC归巢的意义和重要性就不言而喻了。

造血干祖细胞存在于造血组织中,具有自我更新和向下游各系血细胞分化的潜能^[3]。早在20世纪50年代,科学家就开展了同种异体的造血干祖细胞移植。随着移植技术日趋成熟,造血干祖细胞现已被广泛地应用于血液、免疫、肿瘤等重大疾病的治疗^[4]。1971年,Trentin J. J. 研究并证明了造血干细胞所处的微环境对其细胞行为和命运决定具有重要影响^[5],只有归巢至适宜的造血微环境,造血干祖细胞才能进一步的增殖、分化,进而重建造血和免疫功能。简而言之,造血干祖细胞的归巢能力直接影响了移植效率^[6]。

由于造血干祖细胞归巢过程的时空跨度非常大,观察手段十分有限,尽管科研人员在过去几十年的研究中,对归巢过程的细胞和分子基础进行了一

收稿日期:2018-12-17;修回日期:2019-01-07

* 通信作者,Email: weijunpan@sibs.ac.cn

定的解析^[7-10],但对于在体内生理情况下归巢究竟如何发生、归巢的微环境究竟是何种结构、微环境细胞又是如何帮助造血干细胞归巢等一系列关键科学原理依然知之甚少,这种情况严重制约了临床造血干细胞移植等相关技术的发展,使得造血干祖细胞归巢机制的活体解析迫在眉睫。

2 研究进展及成果

为了活体解析造血干祖细胞的归巢机制,本研究团队首先建立了长时程特异性标记造血干祖细胞的活体成像系统(图 1)。目前科学界普遍认为斑马鱼中造血干祖细胞诞生于 AGM 区动脉腹侧壁^[11],于是我们对转基因鱼系 Tg(*kdr1*: Dendra2)胚胎的 AGM 区进行光转换,使该区域新生的造血干祖细胞被标记为红色。当红色的造血干祖细胞迁移到尾部造血组织中时,我们就可以轻松地在绿色荧光标记的血管丛中,实时追踪红色荧光标记的造血干祖细胞的迁移行为和停留时间。

与此同时,我们通过大规模前向遗传学筛选获得了存在归巢缺陷的 *itga4* 遗传突变体(图 2a)。通过比较野生型与 *itga4* 突变体,我们定义造血干祖细胞成功归巢需要在尾部造血组织停留超过 30 分钟(图 2b)。通过分析造血干祖细胞停留的空间分布,我们注意到斑马鱼胚胎中存在造血干祖细胞归巢停留的“热点”区域,该区域位于背侧、节间血管与尾部静脉丛交汇处附近(图 2c)。我们进一步对“热点”区域进行精细的活体成像,并对造血干祖细胞停留处的血管结构进行三维重构,发现尾部静脉丛背侧与节间血管交汇处,分支出一条独立的、较细的血管,紧紧包绕着造血干祖细胞,我们将其命名为“静脉微血管”(venous capillary)。静脉微血管内腔较小并与较粗主血管之间呈一定角度,在普通的显微成像中很容易被忽略,技术上的突破使我们得以首次

发现并报道造血干祖细胞停留在特殊的静脉微血管结构中(图 2d)。

ITGA4 的配体 VCAM-1 在哺乳动物的造血干祖细胞停留过程中至关重要^[12]。我们发现斑马鱼胚胎中的 *vcam-1* 特异性表达在尾部造血组织,同时,*vcam-1* 突变体胚胎具有与 *itga4* 突变体相似的造血缺陷表型,这说明 ITGA4-VCAM-1 信号通路在斑马鱼中功能保守。我们通过抗体染色发现 VCAM-1 蛋白弱表达在尾部造血组织部分静脉内皮细胞上,这与以往报道一致。出乎意料的是,内源的 VCAM-1 被发现强表达于某些紧邻着造血干祖细胞的细胞上(图 3a)而这些 VCAM-1⁺非内皮细胞正是巨噬细胞的一个新亚群(图 3b)。通过复杂的遗传操作,我们还构建了只有内皮细胞表达 VCAM-1 或只有巨噬细胞表达 VCAM-1 的两种情形(图 3c—f)。进一步的研究发现内皮细胞和巨噬细胞上的 VCAM-1 具有各自不同的功能:内皮细胞上表达的 VCAM-1 分子帮助造血干祖细胞在尾部静脉丛背侧的血管内皮床滚动,有效减慢细胞流动速度,但不足以使造血干祖细胞停留(图 3c, d);而巨噬细胞上表达的 VCAM-1 能帮助造血干祖细胞发生停留,且必不可少(图 3e, f)。两者相互配合,协同促进造血干祖细胞的停留过程。

为在活体上直接观察 VCAM-1⁺巨噬细胞帮助造血干祖细胞归巢的全过程,我们借助抗体和活体实时高分辨率成像技术,对 VCAM-1⁺巨噬细胞进行追踪并观察到 VCAM-1⁺巨噬细胞会在尾部静脉丛背侧血管内侧小范围内缓慢地移动,我们称之为“巡逻”(patrol)(图 4)。当造血干祖细胞从节间血管或尾部静脉丛进入尾部造血组织时,总是会经过节间血管与尾部静脉丛背侧血管交汇处,在这里有机会遇到“巡逻”的 VCAM-1⁺细胞并与其发生相互作用。

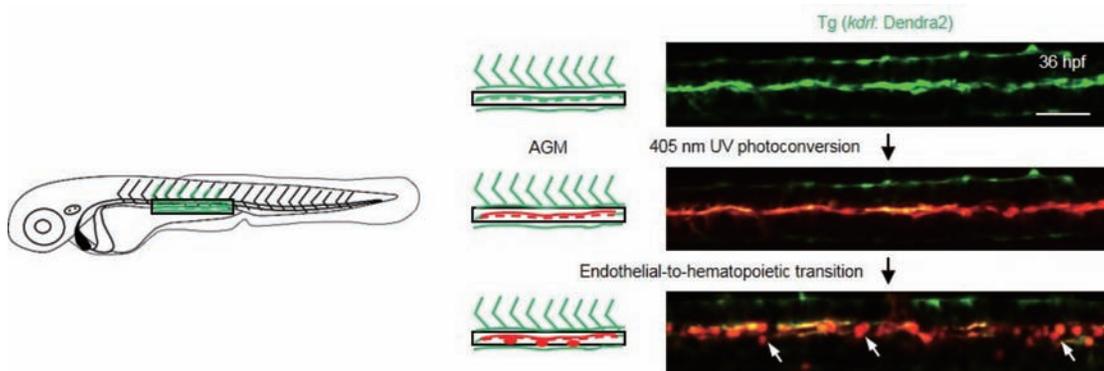


图 1 特异性标记造血干祖细胞的活体成像系统(比例尺:50 微米)

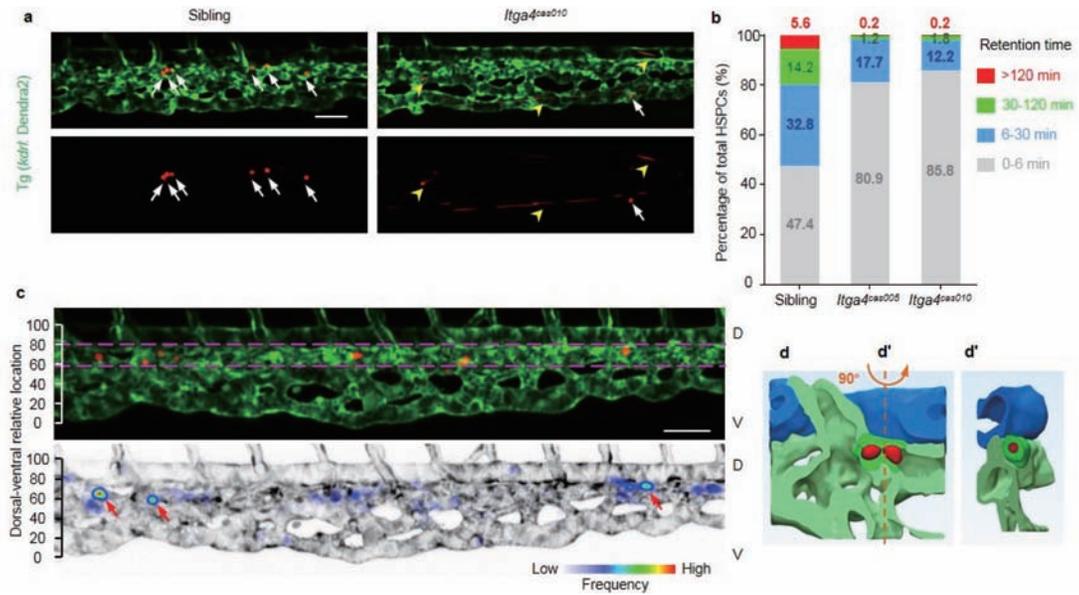


图2 造血干祖细胞归巢停留的时空规律

a. 野生型中造血干祖细胞能够成功定植在尾部造血组织(白色箭头所示),而 *itga4* 突变体中造血干祖细胞则是快速流动,成像呈红线(黄色箭头所示)。b. 将野生型和两种 *itga4* 突变体胚胎,3个一组,将造血干细胞逗留时间分成4类,统计每类逗留时间对应的造血干祖细胞数量相对总数所占百分比。c. 野生型转基因系 *Tg (kdr1; Dendra2)* 胚胎进行光转换后,对整个尾部造血组织进行成像,计算造血干祖细胞在每个点出现的频率,出现造血干祖细胞停留的热点区域。d. 对停留热点区域进行高分辨率成像并进行三维重构,观察围绕在造血干祖细胞周围的血管与造血干祖细胞之间的位置关系。(比例尺:50微米)

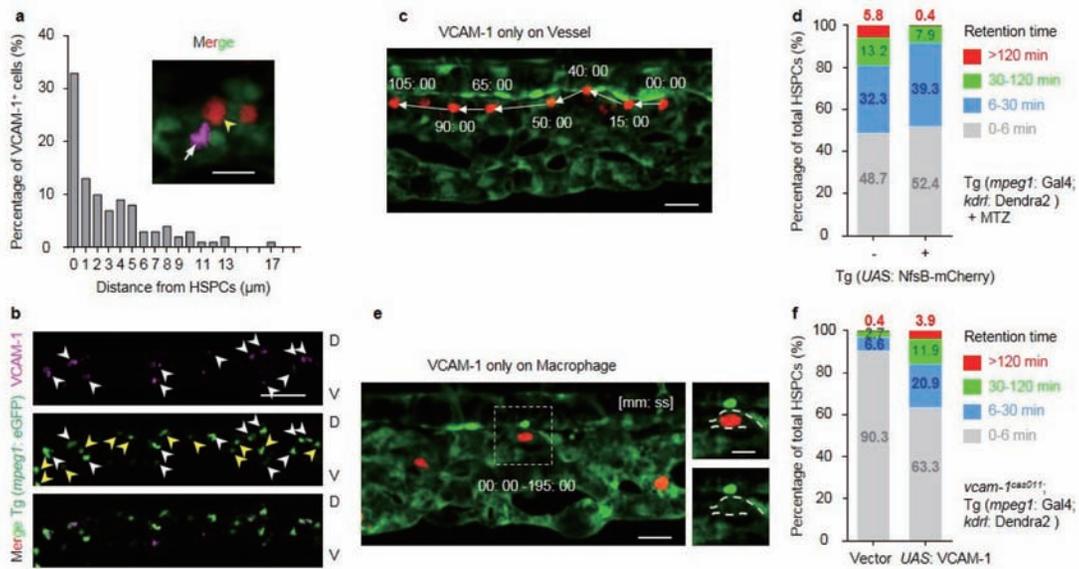


图3 巨噬细胞和内皮细胞表达的 VCAM-1 在造血干祖细胞停留过程中发挥不同的作用

a. 绝大多数(86%) VCAM-1⁺细胞与造血干祖细胞之间相隔小于7 μ m(造血干祖细胞平均直径大约6.9 μ m)。b. 尾部造血组织的 VCAM-1⁺细胞(品红色,白色箭头所指)也是 *mpeg1; eGFP* 阳性细胞(绿色,白色箭头指示双阳性细胞),即巨噬细胞。c. d. 只有内皮细胞表达 VCAM-1 时,造血干祖细胞在血管内皮床滚动,停留时间延长,但停留超过30分钟所占比例仍明显下降。e. f. 只有巨噬细胞表达 VCAM-1 时,造血干祖细胞在尾部造血组织可以发生停留。比例尺显示50 μ m(b),20 μ m(c, e)和10 μ m(a)

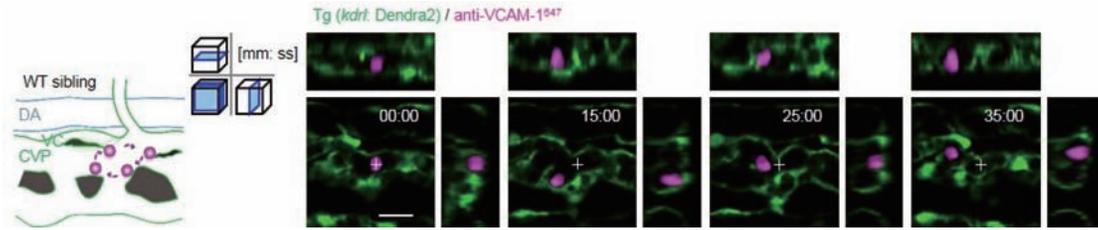


图 4 VCAM-1⁺巨噬细胞在尾部造血组织进行小范围巡逻
十字所在处为起始时间点 VCAM-1⁺巨噬细胞所在位置。(比例尺:20 μm)

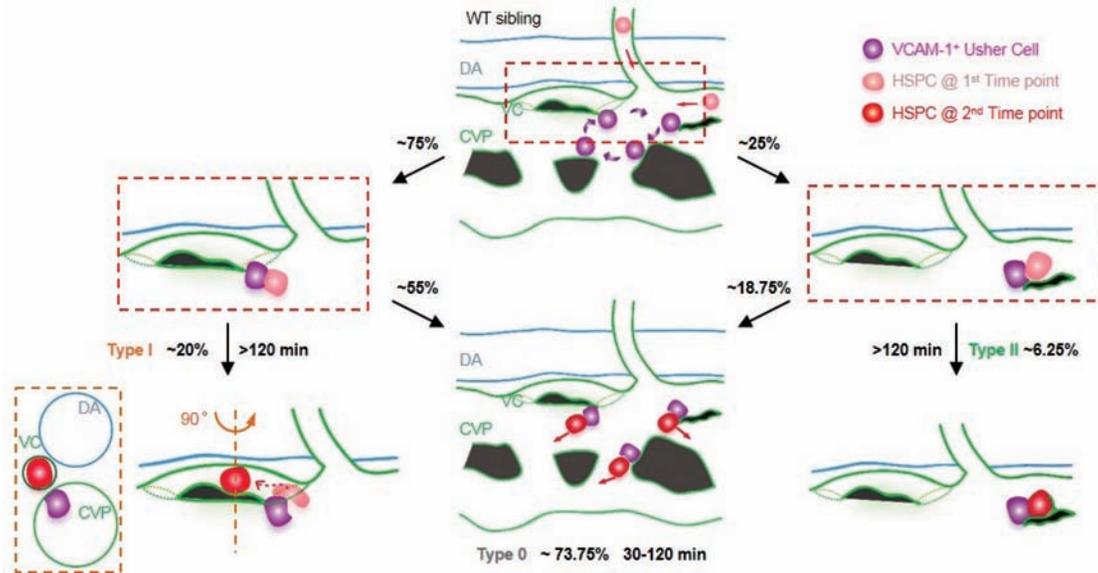


图 5 活体成像分析 VCAM-1⁺先导细胞引导造血干祖细胞停留的过程

我们还定量分析了超过 100 组 VCAM-1⁺巨噬细胞与造血干祖细胞相互作用及其后续事件,发现他们平均相互作用时间在 30 分钟左右。其中,大约 60%造血干祖细胞没有发生停留(逗留 6—30 分钟),而通过静脉丛离开尾部造血组织,其余约 40%造血干祖细胞发生停留,即在尾部造血组织停留超过 30 min。在发生停留的造血干祖细胞中(图 5),大约 75%的细胞会与 VCAM-1⁺巨噬细胞在静脉微血管的开口处相遇。在 VCAM-1⁺巨噬细胞的指引下,其中 20%的造血干祖细胞最终能够进入静脉微血管并且停留超过 120 min,这被称为“I 型停留”(Type I);其余约 25%发生停留的造血干祖细胞与 VCAM-1⁺巨噬细胞在尾部静脉丛中相遇,其中 6.25%的细胞会被内皮细胞形成的口袋结构包裹,发生“II 型停留”(Type II);其他停留方式统称为“0 型停留”(Type 0):即与 VCAM-1⁺巨噬细胞相互作用,逗留时间超过了 30 min,但是细胞间相互作用没有成功将造血干祖细胞引入到血管微环境中。一般来说,“0 型停留”不会持续超过 120 min。由于 itga4

突变体中缺少 ITGA4-VCAM1 相互识别与作用,因此造血干祖细胞呈现快速流动,一穿而过的表型。

本研究生动地展示了体内造血干细胞归巢停留的动态过程,极大地丰富了对造血干细胞归巢机制的科学认识。研究中发现的微环境结构及细胞亚群,对于细胞领域相关的基础研究和临床应用都具有重要的理论指导意义。

3 结论与展望

本研究展示了初生造血干细胞在体归巢的动态过程,不仅回答了“体内生理环境下的造血干细胞归巢如何发生”这一造血领域的重大科学问题,而且发现了对于造血干细胞归巢起关键引导作用的“先导细胞”。值得注意的是,该研究改变了以往对 ITGA-VCAM-1 作用机制的认识,发现 VCAM-1⁺巨噬细胞亚群对 HSPC 归巢停留至关重要。

《自然》高级编辑 Natalie Le Bot 认为,该研究在世界上首次解析了造血干细胞归巢的时空动态全过程,并初步解析了干细胞巢的分子细胞基础。华山

医院血液科陈彤教授表示期待该成果能尽快应用于临床,“先导细胞可以为造血干细胞归巢打开方便之门,这预示今后可能在临床上大大提高造血干细胞移植的成功率。”

参 考 文 献

- [1] Osawa M, Hanada K, Hamada H, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 1996, 273 (5272): 242—245.
- [2] Gao X, Xu CL, Asada N, et al. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development*, 145(2), doi: UNSP dev139691 10.1242/dev.139691 (2018).
- [3] Winkler I G, Sims N A, Pettit A R, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 2010, 116: 4815—4828.
- [4] Barriga F, Ramirez P, Wietstruck A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res*, 2012, 45: 307—316, doi:Doi 10.4067/S0716-97602012000300012.
- [5] Trentin JJ. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *American Journal of Pathology*, 1971, 65: 621—628.
- [6] Caocci G, Greco M, La Nasa G. Bone marrow homing and engraftment defects of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 2017, 9. doi:ARTN e201703210.4084/MJHID.2017.032.
- [7] Seitz G, Boehmler AM, Kanz L, et al. The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1044: 84—89.
- [8] Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, et al. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*, 2007, 109(2): 533—542.
- [9] Adamiak M, Borkowska S, Wysoczynski M, et al. Evidence for the involvement of sphingosine-1-phosphate in the homing and engraftment of hematopoietic stem cells to bone marrow. *Oncotarget*, 2015, 6(22): 18819—18828.
- [10] Christopherson KW, Hangoc G, Mantel CR, et al. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*, 2004, 305 (5686): 1000—1003.
- [11] Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010, 464(7285): 112—115.
- [12] Imai Y, Shimaoka M, Kurokawa M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *International journal of hematology*, 2010, 91(4): 569—575.

VCAM-1⁺ macrophages guide the homing of HSPCs to a vascular niche

Li Dantong^{1,2} Xue Wenzhi¹ Li Mei^{1,2} Li Lin¹ Pan Weijun^{1,2}

(1. Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031;

2. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025)

Abstract Haematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) give rise to all blood lineages that support the entire lifespan of vertebrates. After HSPCs emerge from endothelial cells within the developing dorsal aorta, homing allows the nascent cells to anchor in their niches for further expansion and differentiation. Unique niche microenvironments, composed of various blood vessels as units of microcirculation and other niche components such as stromal cells, regulate this process. However, the detailed architecture of the microenvironment and the mechanism for the regulation of HSPC homing remain unclear. Here, using advanced live imaging and cell-labeling system, we perform high-resolution analyses of the HSPC homing in caudal haematopoietic tissue of zebrafish (equivalent to the fetal liver in mammals), and reveal the role of the vascular architecture in the regulation of HSPC retention. We identify a VCAM-1⁺ macrophage-like niche cell population that patrols the inner surface of the venous plexus, interacts with HSPCs in an ITGA4-dependent manner, and directs HSPC retention. These cells, named ‘usher cells’, together with caudal venous capillaries and plexus, define retention hotspots within the homing microenvironment. Thus, the study provides insights into the mechanism of HSPC homing and reveals the essential role of a VCAM-1⁺ macrophage population with patrolling behavior in HSPC retention.

Key words Zebrafish; live-imaging; homing of hematopoietic stem/progenitor cells; venous capillary; VCAM-1⁺ macrophages