

· 学科进展 ·

# 白血病状态下正常造血干/祖细胞的生物学行为及其调控机制:国家自然科学基金重大项目结题综述

孙瑞娟<sup>1\*</sup> 江虎军<sup>1</sup> 程涛<sup>2</sup> 诸江<sup>3</sup>  
王健民<sup>4</sup> 周剑锋<sup>5</sup> 董尔丹<sup>1</sup>

(1. 国家自然科学基金委员会医学科学部,北京 100085; 2. 中国医学科学院血液病医院(血液学研究所),天津 300020; 3. 上海交通大学医学院瑞金医院上海血液学研究所,上海 200025; 4. 第二军医大学附属长海医院血液科,上海 200433; 5. 华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科,武汉 430030)

**[摘要]** 国家自然科学基金“十二五”重大项目“白血病状态下正常造血干/祖细胞的生物学行为及其调控机制”集中围绕正常造血干/祖细胞在白血病状态下的受抑规律及其内外调控机制这一热点科学问题进行了多团队联合攻关。经过2011—2014年的4年研究,从分子、细胞、整体和临床等多个层面系统阐释了白血病状态下白血病细胞和正常造血干/祖细胞竞争的规律,揭示了白血病恶性克隆生长和正常造血干/祖细胞受抑的分子机制,提出了抑制白血病细胞特别是白血病干细胞生长及促进正常造血干/祖细胞扩增的治疗新策略,取得了一系列突破性和原创性的研究成果,为进一步提高白血病临床治疗效果奠定了重要基础。

**[关键词]** 重大项目;白血病;造血干细胞;白血病干细胞;造血微环境

DOI:10.16262/j.cnki.1000-8217.2015.04.003

白血病是一类公认的克隆性(单细胞来源)干细胞恶性增殖性疾病,其发病率呈逐年增长趋势,严重威胁人民生命健康。以往的研究主要集中在白血病细胞本身如何过度增殖和积聚,而对白血病细胞如何竞争性抑制正常造血并未给予足够的关注,对这方面的认识极大地限制了对患者的救治。正常造血干细胞(Hematopoietic Stem Cell, HSC)是各种血细胞及免疫细胞产生的源泉,白血病宿主体内异常的造血微环境及白血病细胞通过各种途径影响HSC的数目和功能,是患者造血受抑的主要原因。因此,促进白血病患者体内正常HSC数量增加并增强其功能将为强化HSC相对于白血病干细胞(Leukemia Stem Cell, LSC)的竞争优势,为提高白血病治疗缓解率和治愈率提供新的思路,并为白血病病程发展及治疗过程中出现的顽固性骨髓抑制提供长期而根本的解决办法。由于对白血病宿主体内正常HSC数量和功能变化规律的研究重视不够,对病态造血微环境下HSC的调控机制不甚了解,目前尚无

通过改善白血病患者造血微环境、提高HSC功能的治疗手段,相关研究也仅仅处于起步阶段。本项目以白血病宿主体内的病态造血微环境、HSC及LSC作为研究对象,深入系统研究白血病状态下HSC的数目、功能及生物学行为等,对进一步阐明白白血病状态下HSC功能由盛到衰的转变机制及关键分子基础均具有重大的理论及实践意义。

## 1 立项背景

白血病是一大类严重威胁人民生命健康的恶性肿瘤。2008年卫生部调查表明,白血病已名列我国肿瘤死亡率第6位,发病率为3.82/10万,占35岁以下青少年和儿童恶性肿瘤死亡的首位。近20年来,白血病的治疗虽取得长足的进展,但治疗效果仍不尽人意。成人急性髓系白血病化疗缓解率约为50%—70%,3年无病存活率仅为20—30%,即使是造血干细胞移植(Hematopoietic Stem Cells Transplantation, HSCT)也只能取得50—70%的长

收稿日期:2015-03-24; 修回日期:2015-04-09

\* 通信作者, Email: sunrj@nsfc.gov.cn

期生存。对某些白血病亚型如混合系白血病(Mixed Lineage Leukemia, MLL)常规化疗的疗效不佳,三年生存率不到10%。这类白血病的发病机制迄今不明,目前尚无有效的治疗手段。

造血微环境对造血干/祖细胞(Hematopoietic Stem/Progenitor Cells, HSC/HPC)干性的维持、增殖和分化具有不可或缺的支持和调节作用<sup>[1]</sup>。目前,关于造血微环境等因素在白血病发生、发展中的作用认识还相对欠缺<sup>[2]</sup>。白血病造血微环境的表型、白血病造血微环境对HSC及LSC的调控机制也知之甚少。在恶性造血和正常造血共存的微生态系统中,研究二者如何竞争性地利用造血微环境提供的“支持性资源”,特别是恶性造血如何“由弱而盛”是一重要和有趣的基础生物学课题。多年的研究基础及临床治疗经验表明,单纯从内在因素来遏制白血病乃至其它癌症,效果往往不尽人意,难以达到治愈的目的。阐明白血病宿主体内病态造血微环境对正常HSC/HPC及LSC生长的影响及其分子机制将为从根本上清除白血病细胞赖以生存和增殖的土壤,改善病程发展及治疗过程中出现的顽固性骨髓抑制提供长期而根本的解决方案,从而提高白血病治愈率、降低病人死亡率,提高患者的生存质量。

白血病发生发展的过程就是疾病细胞逐渐占据优势,正常HSC逐步受到抑制的过程<sup>[3,4]</sup>。对于大多数白血病类型来说,白血病细胞的增殖影响HSC的增殖、分化和功能是疾病发展和恶化的重要环节,进而HSC生物学特性发生改变,由此导致的HSC和LSC之间的消长与白血病病程的演变密切相关。白血病动物模型是深入研究白血病微环境下HSC的数目、功能、生物学行为,特别是HSC与LSC之间的消长关系的理想手段,有可能总结并归纳出能反应白血病HSC和LSC生长动力学变化规律的模型及关键生物参数。一方面可以作为预测病程进展指导临床预后的重要指标,另一方面可以明确影响HSC和LSC消长的关键信号途径和分子靶点,从而找到既能杀灭白血病细胞,又能选择性增强体内正常HSC功能和数量的有效干预手段,进而阐明白血病临床治疗中对于正常HSC功能影响的关键环节,并有可能通过增强和保持HSC的功能提高白血病治疗效果,减少治疗相关并发症的发生。

研究白血病状态下(包括治疗后)微环境对HSC的调控机制及HSC与LSC间消长的规律,最终目标是“扶正(HSC)驱邪(LSC)”,通过纠正LSC

和HSC间的失衡,促进正常造血功能恢复,为白血病的治疗带来新的希望;通过建立从药物筛选、效应验证到分子机制研究的优化的研究平台,为新的信号传导通路及分子靶点的发现及其它肿瘤的研究提供可以借鉴的方法和思路。

重大项目“白血病状态下正常造血干/祖细胞的生物学行为及其调控机制”以白血病为研究模型,采用多学科交叉的手段,围绕如下关键科学问题展开系统性研究:

(1) 明确不同类型的白血病、不同发病阶段,正常HSC/HPC在白血病中的受抑规律,及其自我更新和定向分化等生物学特性和调控机制。

(2) 明确白血病发生发展对正常造血微环境的影响及其机制;正常造血微环境和白血病微环境对正常HSC和LSC的异同作用及其机制。

(3) 目前的主要治疗手段(化疗、造血干细胞移植)对正常HSC/HPC,以及移植后供体来源正常HSC/HPC在白血病体内的生物学行为及调控机制的影响。

(4) 以关键调控通路为切入点,发现影响白血病微环境下正常HSC/HPC及LSC功能改变的特异性因子,找到可进行有效干预的新靶点,探索有效的干预措施。

## 2 取得的主要研究成果

国家自然科学基金重大项目“白血病状态下正常造血干/祖细胞的生物学行为及其调控机制”执行时期是2011年1月至2014年12月,经过项目团队4年的联合攻关,取得了如下系列原创性的研究成果:

### 2.1 成功建立多种白血病模型,揭示了正常造血受抑的规律及其分子机制

目前建立白血病模型必须先对小鼠进行放射处理后再植入白血病细胞,这样做会引发很多问题。因为放射本身就会极大地损伤小鼠骨髓微环境及小鼠的免疫系统,因此放射后的模型对于研究白血病下的正常细胞变化有一定的影响。项目实施期间,利用不同方法,不经放射处理构建并优化了多种小鼠白血病模型,为深入开展正常造血受抑分子机制的研究奠定了重要的基础。

(1) 利用逆转录病毒的方法构建并优化了非照射的急性髓系白血病(MLL-AF9, AML)、急性T淋巴细胞白血病(Notch诱导的T-ALL)和急性早幼粒白血病(APL)小鼠模型<sup>[5]</sup>。

(2) 利用“染色体工程技术”成功获得了具有 MLL 融合基因的生殖系嵌合基因敲入小鼠 (MLL-AF-9, MLL-ENL)<sup>[6]</sup>。

(3) 利用重编程技术建立嵌合体小鼠白血病模型<sup>[7]</sup>。

(4) 成功建立“急性移植物抗宿主病小鼠模型”(aGVHD)<sup>[8]</sup>。

(5) 以非照射的 AML 小鼠白血病模型系统地研究了白血病宿主体内正常 HSC/HPC 的动力学变化、生物学特性(细胞周期、凋亡)和生物学功能(自我更新和分化)等,并总结归纳了白血病状态下正常 HSC/HPC 生长的关键生物动力学参数,建立了可协助临床判断病程和预后的数学模型。

(6) 在全基因组范围内阐明了白血病微环境抑制 HSC/HPC 功能的分子机制,阐述了干细胞功能受损的关键信号传导通路和靶基因:根据基因芯片结果,利用斑马鱼模型和小鼠模型验证了候选基因 (*Egr3*、*Maff*、*Hey1* 和 *Hes1*) 对正常 HSC 向巨核红系祖细胞 (Megakaryocyte Erythroid Progenitor Cells, MEP) 分化受抑及抑制其细胞周期的作用<sup>[5]</sup>。

(7) 通过临床病例及动物模型,明确了化疗、造血干细胞移植等临床干预过程中,白血病宿主的正常 HSC/HPC 的动力学演变关系以及对治疗效果的影响,并指导临床治疗。

## 2.2 阐释了白血病微环境的主要特征及对正常 HSC/HPC 和白血病细胞的调控规律

(1) 利用急性早幼粒白血病 (APL) 小鼠模型研究了白血病干细胞/起始细胞在体内外增殖变化的规律,揭示了白血病环境下炎性因子(如 RIG-1) 对发病过程的重要调控作用。研究发现 RIG-1 可通过非凋亡通路引起细胞分化和细胞周期阻滞以及细胞自噬活化性死亡,提出促炎能力是白血病细胞疾病生物特性之一,对“白血病起始细胞修饰微环境以利于自身生长”这一假设提供新的证据<sup>[9]</sup>。

(2) 利用 AML 小鼠模型研究了骨髓微环境中 PDGFR $\alpha^+$ 、SCA-1 $^+$ 、CD45 $^-$ 、TER119 $^-$  的骨髓间充质干细胞 (P $\alpha$ S MSC) 在白血病发病中的作用。结果表明,在 AML 发生过程中,MSC 的比例和绝对数量显著下降;体外培养后其成脂分化能力明显高于对照组且具有衰老倾向。由此可见,白血病微环境下间充质干细胞 (MSC) 的功能发生了改变,降低了对正常 HSC/HPC 的造血支持作用,还利于白血病细胞的恶性增殖。

(3) 阐述了白血病状态下器官微环境尤其是脾

脏微环境对小鼠 T-ALL 发生和发展的作用。利用 Notch1 诱导的小鼠 T-ALL 为模型,发现在发病早期,T-ALL 白血病细胞最先在脾脏内建立自己的“根据地”,通过分泌高水平的 MIP-3 $\beta$  有效地募集 T-ALL 细胞,进而促进白血病细胞的增殖、迁移等恶性表型;切除脾脏可以延长小鼠生存时间。首次证实了器官特异性脾脏微环境对 T-ALL 发展的作用机制<sup>[10]</sup>。

(4) 揭示了白血病相关巨噬细胞、中性粒细胞的特性改变及其对正常造血和白血病细胞的不同调控作用。研究发现,白血病发病过程中存在白血病相关巨噬细胞的数量随病程发展而变化,且可以促进白血病细胞的增殖。在炎症情况下,小鼠骨髓内的髓系细胞能产生大量活性氧分子;引起造血祖细胞增殖信号的加强,促进急性粒系造血的发生,这对今后深入开展相关临床研究(如骨髓移植)具有一定的理论和实践指导意义<sup>[11]</sup>。

(5) 通过构建多种半相合急性移植物抗宿主病 (aGVHD) 小鼠模型,在 aGVHD 发生的多时间点分析供体 HSC/HPC、MSC、血管内皮细胞及 Nestin 阳性细胞等骨髓微环境基质细胞的生物学改变,阐明了其相互关系并探讨了相应的干预手段<sup>[8,12,13]</sup>。通过构建连续骨髓移植模型和竞争性骨髓移植模型,发现 aGVHD 导致的造血功能障碍不是由于骨髓 HSC 功能缺陷,而是由于造血微环境功能缺陷所导致。

## 2.3 揭示了调控白血病恶性克隆生长的重要信号通路、关键分子靶点及表观遗传学的调控机制

研究表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在调控 LSC 和 HSC 间的消长平衡中起决定性作用,因此,在本项目中探讨了该信号通路在调控正常 HSC/HPC 及白血病恶性克隆生长中的机制。

(1) 以 Rictor 分子为研究靶点,分别采用斑马鱼模型、Rictor 敲除及多种条件敲除小鼠模型,揭示了 Rictor 在造血系统发育及白血病发生中的作用,系统评估了 Rictor 作为一种白血病细胞特异性分子靶点的可能性;研究表明,Rictor 缺失影响胚胎早期 EHT 的转化以及 HSC 扩增;Rictor 可以通过下游的 FoxO1 调控 B 细胞的早期发育,主要是非成熟 B 细胞向成熟 B 细胞的分化受到阻碍,敲低 FoxO1 可以部分恢复 B 系细胞减少的表型<sup>[14]</sup>。此外,还发现 Rictor 敲除可明显抑制白血病细胞的生长,延长小鼠的寿命。这些研究结果对临床上白血病患者切脾治疗的进一步改善具有重要的指导意义<sup>[15]</sup>。

(2) 研究发现抑制 Rictor 的表达可以阻遏 MLL 白血病细胞株的增殖及 MLL 白血病逆转录病毒小鼠模型的发病;进一步设计并构建了 MLL-AF6 条件性基因敲除小鼠,探讨了 Rictor 对 MLL 白血病干细胞生长动力学的影响,评价了对阻止 MLL 白血病、恢复正常造血的作用,为 Rictor 干预 MLL 白血病的机制研究提供了良好的体内实验平台。

(3) 利用独特的临床病例发现了白血病中 HSC 恶性克隆演变的分子遗传学基础及新的致病基因,并进行了功能研究;发现了新的白血病融合基因 *MLL-NRIP3*,并发现组蛋白甲基化酶 *SETD2* 是潜在的肿瘤抑制基因,提出了新的表观遗传学调控机制<sup>[16]</sup>。

**2.4 针对特异性的信号通路和关键分子靶点,设计、合成了多种小分子化合物,并阐明其作用机制。**

(1) 建立了 HSC 单细胞技术平台,针对靶向 HSC 扩增及抑制 LSC 的小分子化合物进行了模拟、设计、合成、筛选及活性测定,同时对靶向白血病干细胞的小分子药物已经开始进行临床前的研究<sup>[17]</sup>。

(2) 针对 LSC 的特异性分子靶点进行了一系列愈创木内酯倍半萜 (GSLs) 及其衍生物的筛选及活性测定,发现该类化合物在体外实验中能够选择性地杀伤急性髓系白血病 (AML) 干/祖细胞,天然的 GSL 化合物 Arglabin 和最新的化合物 Micheliolide (MCL) 都能够降低 AML 中 CD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup> 的含量。在 NOD/SCID 小鼠模型中, MCL 处理细胞后进行移植能显著地降低人白血病细胞的移植率。这些结果表明 GSL 是靶向 AML 干/祖细胞的一类值得重视的化合物资源,并且 GSL 可作为小分子探针应用于肿瘤干细胞的基础研究<sup>[18]</sup>。近期的研究结果还发现抗氧化剂 NAC 能够促进人 HSC 在 NOD/SCID 小鼠的植入,对提高造血干细胞植入具有临床指导价值<sup>[19,20]</sup>。

(3) 研究发现敲除 MBD2 后对正常造血影响较小,但对 T 细胞发育有一定影响;研究还发现敲除 MBD2 可以延缓 T-ALL 及 MLL 两类白血病小鼠模型的发病,提示 MBD2 可作为干预急性 T 淋巴细胞白血病细胞进程的重要潜在靶点(待发表)。

(4) 探讨了高度侵袭性 NK 细胞白血病 (ANKL) 病理生理机制模式和靶向策略。研究发现 ANKL 人群普遍存在对 EBV 易感的生殖细胞突变,这为解决国内高发的 EBV 相关性疾病提供了关键的线索;找到了 ANKL 的共同通路的融合点,第

一次较完整地阐述了该类型疾病的病理生理全貌,为探索新的治疗策略提供了非常良好的机遇(待发表)。

### 3 结语

项目执行期间,共计发表标注项目批准号的相关 SCI 论文 71 篇(含 4 篇已接收),其中包括在 *Nature Genetics*、*Molecular cell*、*Immunity*、*JCI*、*Nature Communication*、*Blood*、*Leukemia* 及 *Autophagy* 等著名杂志上发表的高水平论文,另外还有许多研究工作有待发表;共培养硕士/博士研究生 84 名(包括未毕业学生),博士后 3 名;成功举办或协办国际会议 6 次、国内会议 6 次;课题组成员参加国际学术会议近百人次;申请专利 5 项,其中一项已经获得授权。该重大项目的圆满完成,在国内外同行中产生了重要的科学影响,发挥了学科引领作用,对我国血液学基础与临床研究具有重要的推动作用。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, 425 (6960): 836—841.
- [2] Zhang B, Ho Y W, Huang Q, et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 2012, 21 (4): 577—592.
- [3] Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Hodby KA, et al. Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (33): 13576—1381.
- [4] Hu X, Shen H, Tian C, et al. Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model. *Blood*, 2009, 114 (18): 3783—3792.
- [5] Tian C, Zheng G, Cao Z, et al. Hes1 mediates the different responses of hematopoietic stem and progenitor cells to T cell leukemic environment. *Cell Cycle*, 2013, 12 (2): 322—331.
- [6] Zhou P, Wang Z, Yuan X, et al. Mixed lineage leukemia 5 (MLL5) protein regulates cell cycle progression and E2F1-responsive gene expression via association with host cell factor-1 (HCF-1). *J Biol Chem*, 2013, 288 (24): 17532—17543.
- [7] Liu Y, Cheng H, Gao S, et al. Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells. *Leukemia*, 2014, 28(5): 1071—1080.
- [8] Lin Y, Hu X, Cheng H, et al. Graft-versus-host disease causes broad suppression of hematopoietic primitive cells and blocks megakaryocyte differentiation in a murine model. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20 (9): 1290—1300.
- [9] Li XY, Jiang LJ, Chen L, et al. RIG-I modulates Src-mediated AKT activation to restrain leukemic stemness. *Mol Cell*, 2014, 53 (3): 407—419.

- [10] Ma S, Shi Y, Pang Y, et al. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *J Hematol Oncol*, 2014, 7 (1): 71.
- [11] Kwak HJ, Liu P, Bajrami B, et al. Myeloid cell-derived reactive oxygen species externally regulate the proliferation of myeloid progenitors in emergency granulopoiesis. *Immunity*, 2015, 42 (1): 159—171.
- [12] Yao Y, Song X, Cheng H, et al. Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e104607.
- [13] Wu T, Young JS, Johnston H, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, 2013, 191 (1): 488—499.
- [14] Zhang Y, Hu T, Hua C et al. Rictor is required for early B cell development in bone marrow. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e103970.
- [15] Hua C, Guo H, Bu J, et al. Rictor/mammalian target of rapamycin 2 regulates the development of Notch1 induced murine T-cell acute lymphoblastic leukemia via forkhead box O3. *Exp Hematol*, 2014, 42 (12): 1031—1040 e1-4.
- [16] Zhu X, He F, Zeng H, et al. Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet*, 2014, 46 (3): 287—293.
- [17] Yang P, Myint KZ, Tong Q, et al. Lead discovery, chemistry optimization, and biological evaluation studies of novel biamide derivatives as CB2 receptor inverse agonists and osteoclast inhibitors. *J Med Chem*, 2012, 55 (22): 9973—9987.
- [18] Zhang Q, Lu Y, Ding Y, et al. Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *J Med Chem*, 2012, 55 (20): 8757—8769.
- [19] Miao W, Xufeng R, Park MR, et al. Hematopoietic stem cell regeneration enhanced by ectopic expression of ROS-detoxifying enzymes in transplant mice. *Mol Ther*, 2013, 21 (2): 423—432.
- [20] Hu L, Cheng H, Gao Y, et al. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood*, 2014, 124 (20): e45—48.

**Final report on the major program of NSFC—  
“Biological Behaviors and Regulatory Mechanisms of Normal Hematopoietic  
Stem/Progenitor Cells during the Development of Leukemia”**

Sun Ruijuan<sup>1</sup> Jiang Hujun<sup>1</sup> Cheng Tao<sup>2</sup> Zhu Jiang<sup>3</sup>  
Wang Jianmin<sup>4</sup> Zhou Jianfeng<sup>5</sup> Dong Erdan<sup>1</sup>

(1. Department of Health Science, National Natural Science Foundation of China, Beijing 100085; 2. State Key Laboratory of Experimental Hematology; Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Tianjin 300020; 3. State Key Laboratory for Medical Genomics and Shanghai Institute of Hematology, Rui-Jin Hospital, Shanghai Jiao-Tong University School of Medicine, Shanghai 200025; 4. Department of Hematology, Institute of Hematology, Changhai Hospital, Shanghai 200433; 5. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan 430030.)

**Abstract** The major program of “Biological Behaviors and Regulatory Mechanisms of Normal Hematopoietic Stem/Progenitor Cells during the Development of Leukemia” mainly focuses on the mechanisms underlying the competition between normal hematopoietic stem/progenitor cell (HSC/HPC) and leukemic cells. Upon a 4-year study by the four collaborative groups, significant progress has been made in the following areas: (1) optimized and established several unique leukemia models; (2) systemically studied the kinetics of normal HSC/HPC and altered micro-environmental elements during leukemia development; (3) defined several novel genetic and epigenetic regulators that govern the competition between HSC/HPCs and LSCs during leukemia development; (4) discovered several novel small molecules that can promote normal HSC/HPC expansion or inhibit leukemia cell proliferation. These results would help better understand the pathogenesis or current therapies of leukemia and provide novel therapeutic strategies to combat the disease.

**Key words** major program; leukemia; hematopoietic stem cell; leukemia stem cell; bone marrow microenvironment