



张春霞, 2010—2017 年就读于中国科学院动物研究所, 在血液与心血管发育研究组攻读博士学位, 目前在美国哈佛医学院/波士顿儿童医院做博士后。博士期间, 主要研究斑马鱼造血干细胞发育的调控机制, 阐明了 BMP 与 ERK 信号通路在造血干细胞产生过程中的相互关联(*Nat Commun*, 2014 年), 发现了炎症信号通路可以通过 Notch 信号来调控造血干细胞的产生(*Blood*, 2015 年), 首次揭示了 m⁶A 修饰在胚胎造血干细胞命运决定中的关键作用(*Nature*, 2017 年)。这些工作不仅增加了人们对造血干细胞产生机制的认识, 而且对体外诱导扩增造血干细胞提供了理论指导。博士论文《BMP-ERK 信号通路以及炎症信号调控斑马鱼造血干细胞产生的分子机制》获得 2020 年中国科学院优秀博士生论文。

造血干细胞发育过程中的信号通路调控

张春霞^{1,2}, 刘峰¹

1. 中国科学院动物研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101
2. 波士顿儿童医院, 波士顿 02115

摘要: 血液系统是维持机体生命活动最重要的系统之一, 为机体提供所需的氧气和营养物质, 通过物质交换维持内环境的稳态, 同时为机体提供免疫防御与保护。血细胞是血液的重要组成部分, 机体中成熟血细胞类型起源于具有自我更新及分化潜能的多能成体干细胞—造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)。造血干细胞及各类血细胞产生、发育及成熟的过程称为造血过程, 该过程开始于胚胎发育早期并贯穿整个生命过程, 任一阶段出现异常都可能导致血液疾病的发生。因此, 深入探究造血发育过程及其调控机制对于认识并治疗血液疾病至关重要。近年来, 以小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)作为动物模型来研究造血发育取得了一系列的进展。其中, BMP、Notch 和 Wnt 等信号通路对造血干细胞的命运决定和产生发挥了重要作用。本文对这些信号通路在小鼠和斑马鱼造血过程中的调控作用进行系统总结, 以期能够完善造血发育过程的调控网络并为临床应用提供指导。

关键词: 造血干细胞; 信号通路; BMP; Notch; Wnt

收稿日期: 2021-01-20; 修回日期: 2021-03-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(编号: 2018YFA0800200, 2018YFA080100), 中国科学院战略性科技先导专项(编号: XDA16010207)和国家自然科学基金重点项目(编号: 32030032, 31830061)资助[Supported by the National Key Research and Development Program of China (Nos.2018YFA0800200, 2018YFA080100), the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences, China (No. XDA16010207), and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 32030032, 31830061)]

作者简介: 张春霞, 博士, 研究方向: 造血干细胞发育。E-mail: zhangchxa@163.com

通讯作者: 刘峰, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 造血干细胞发育。E-mail: liuf@ioz.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.21-026

网络出版时间: 2021/3/16 11:16:44

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210315.0942.003.html>

Regulatory signaling pathways in hematopoietic stem cell development

Chunxia Zhang^{1,2}, Feng Liu¹

1. State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. Program in Cellular and Molecular Medicine, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA

Abstract: The blood system provides the body with oxygen and nutrients, maintains the homeostasis of the internal environment through material exchange, and keeps the body with immune defense and protection. Hematopoietic stem cells (HSCs), which are pluripotent adult stem cells with self-renewal and differentiation potential, are the origin of mature blood cells in the body. The production, development and maturation processes of HSCs and their derivatives are the so-called 'hematopoiesis', which begins in the early embryonic development and throughout the life course; any abnormality during these processes can cause the occurrence of hematological diseases. Therefore, a deeper understanding of hematopoietic development and its regulation is important to the diagnosis and treatment of blood diseases. In recent years, a series of advances have been made in studying hematopoietic development using mice and zebrafish as animal models. It has been shown that BMP, Notch and Wnt signaling pathways play an important role in the fate determination and generation of HSCs. In this review, we systematically summarize the regulatory roles of these signaling pathways in the hematopoietic process of mice and zebrafish embryos, to improve our understanding on the underlying regulatory network of hematopoietic development and provide guidance for clinical application.

Keywords: hematopoietic stem cell; signaling pathways; BMP; Notch; Wnt

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是一群具有自我更新及分化潜能的多能干细胞,可以产生所有类型的血细胞^[1]。血细胞可以分为髓系和淋系两大类,其中髓系细胞包括红系细胞、粒系细胞、巨核系细胞和单核系细胞,淋系细胞主要包括T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤性细胞(NK细胞)。造血干细胞及各类血细胞产生、发育和成熟的过程称为造血过程。脊椎动物的造血过程起始于胚胎期,可以分为初级造血和次级造血两个阶段。造血干细胞以内皮-造血转化的形式产生于次级造血阶段。造血干细胞发育在脊椎动物中是高度保守的过程,该过程受到多种信号通路和调控因子的精密调控。一些信号通路,如 ERK、Notch 以及 β -Catenin 介导的 Wnt 信号通路,在造血干细胞产生过程中的作用是动态变化的,也是浓度和时间依赖的。深入了解这些信号通路在造血干细胞发育过程中的调控网络和作用机制,不仅能够帮助理解体内造血干细胞的产生过程,也能为体外造血提供理论依据。小鼠(*Mus musculus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)是目前最常

用的研究造血发育的动物模型。从胚胎发育早期到成体,尽管发生部位有所不同,造血发育的阶段性过程在两种动物模型中是相似的。本文以 BMP、Notch 和 Wnt 信号通路为例,详细介绍信号通路在造血发育过程中的调控作用。

1 脊椎动物造血发育过程

1.1 小鼠造血发育

哺乳动物的造血发生起源于胚胎的腹侧中胚层,其中部分细胞特化为成血成血管细胞(hemangioblast),这类细胞同时具有向血细胞和血管细胞分化的能力^[2]。在小鼠中,成血成血管细胞最早出现在卵黄囊的血岛区(blood island in the yolk sac),胚胎期 7.5 天(E7.5)左右此处可检测到血细胞的产生,这一过程称为初级造血(primitive hematopoiesis),主要产生初级红系(primitive erythroid)和初级髓系(primitive myeloid)血细胞,为胚胎早期发育供氧气和免疫防

御^[3]。E9.5 卵黄囊区能够产生一群具有分化成红细胞、巨核细胞和巨噬细胞等多项潜能的红系-髓系前体细胞(erythro-myeloid progenitors, EMPs)^[4,5]。近期研究发现特定组织定居的巨噬细胞,如肝脏的Kupffer细胞、脑部的小胶质细胞、上皮的郎格罕氏细胞及肺部的肺泡巨噬细胞等,都来源于卵黄囊的红系-髓系前体细胞,并不依赖于造血干细胞^[6,7]。除红系和髓系细胞之外,在造血干细胞产生之前,卵黄囊还能产生一群具有淋系(lymphoid)分化潜能的前体细胞,可以分化为B淋巴细胞和T淋巴细胞,为机体供免疫防御^[8]。

初级造血是一个短暂的阶段,其产生的血细胞类型和数目不足以维持胚胎发育和成体需要,因此很快就被次级造血(definitive hematopoiesis)代替^[4]。造血干细胞产生于次级造血阶段,主要在E10.5小鼠胚胎的动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM)产生^[9],在小鼠的胎盘^[10]等区域也能检测到造血干细胞。随着研究的深入,造血干细胞的产生过程已经逐渐明晰。在主动脉腹侧壁的一群内皮细胞可以特化成具有造血潜能的生血内皮(hemogenic endothelium, HE),随后细胞形态发生变化,形成造血簇(hematopoietic clusters),逐渐脱离动脉内皮形成造血干细胞进入主动脉,这一过程称为内皮-造血转化(endothelial-to-hematopoietic transition, EHT)^[11]。新产生的造血干细胞在E12左右进入胎肝(fetal liver, FL)并进行大量扩增并逐渐成熟,其中一部分造血干细胞随后进入胸腺,分化为T淋巴细胞。最终,造血干细胞定位到终生造血器官骨髓(bone marrow, BM)。正常状态下骨髓中的造血干细胞处于静息状态,一旦机体需要,造血干细胞将会迅速动员起来并分化成各种血细胞以补充机体需要^[1]。

1.2 斑马鱼造血发育

在过去的20年里,斑马鱼凭借其独特的优势,已经成为研究发育的经典动物模型。首先,斑马鱼是体外受精,从受精卵到发育至成体的整个过程都可以在体外直接观察,而且便于进行操控;其次,斑马鱼胚胎是透明的,利用各种转基因或活体标记技术,能够对各组织器官的发育进行实时观察和追踪;再次,斑马鱼产卵的周期比较短,并且较易获得大量胚胎,这样有利于进行高通量筛选实验;最重要的是斑马鱼的基因组与哺乳动物高度保守,斑

马鱼中的很多成果可以为哺乳动物的相关研究提供参考^[12]。

斑马鱼的造血发育过程与哺乳动物相似,均起源于胚胎的腹侧中胚层。在发育过程中,后部的侧板中胚层(posterior lateral mesoderm, PLM)逐渐向中间迁移形成中间细胞团(intermediate cell mass, ICM),并在此处产生初级红系细胞。同时前部侧板中胚层(anterior lateral mesoderm, ALM)能够产生初级髓系细胞^[12,13]。斑马鱼的红系-髓系前体细胞出现在受精后36小时(36 hours post fertilization, 36 hpf)左右的尾部造血组织(caudal hematopoietic tissue, CHT),并且能够在此处进行分化^[14]。斑马鱼的造血干细胞也是在AGM区域经过内皮-造血转化过程产生。利用转基因荧光标记的方法对斑马鱼造血干细胞的产生过程进行实时追踪观察发现,主动脉腹侧壁的部分内皮细胞可以特化成为生血内皮,其形态也由扁平逐渐变成圆形,最后以出芽的形式脱离主动脉^[14,15]。与小鼠不同的是,斑马鱼的造血干细胞不形成血细胞簇,而是以单个细胞的形式产生,并在产生后直接进入动静脉之间的间充质,随后进入静脉。斑马鱼的内皮-造血转化过程起始于32 hpf,在60 hpf之前结束。新产生的造血干细胞随后会迁移到CHT区域进行扩增和分化,部分细胞会迁移到胸腺分化成T淋巴细胞。造血干细胞最终会进入斑马鱼的终生造血器官—肾脏(Kidney Marrow),为胚胎和成体提供各类血细胞。

2 造血干细胞产生过程的关键转录因子

造血干细胞的发育调控机制精密且有序。在此过程中,任何环节的失调都可能引起血液系统发育缺陷或功能紊乱,最终导致血液疾病的发生。因此,系统了解并深入探究造血干细胞发育的调控机制具有重大意义。

在造血发育过程中,转录因子Scl(stem cell leukemia, 也称作T-cell acute lymphocytic leukemia 1, TAL1)是成血成血管细胞的标记基因之一,对主动脉和造血干细胞的发育都有重要的调控作用^[16,17]。斑马鱼的scl基因有两个转录本—scla和sclβ,虽然这两个转录本都能够参与调控造血干细胞的产生,但是它们分别调控内皮-造血转化过程的不同阶段。通过构建荧光标记的scla和sclβ转基因斑马鱼并进行

实时观察发现, *sclβ* 在生血内皮细胞中特异表达, 对生血内皮的命运决定至关重要, 而 *sclα* 则在新产生的造血干细胞中特异表达, 对造血干细胞在 AGM 区的维持发挥作用^[18]。

作为常用的造血干细胞标记基因之一, 转录因子 Runx1 (RUNX family transcription factor 1, 也称为 acute myelogenous leukemia 1, AML1) 可以标记所有的胚胎造血干细胞^[19]。在小鼠胚胎中进行的功能实验发现, 缺失 *runx1* 后次级造血过程被阻断^[20]。进一步的条件性敲除实验发现, 内皮细胞中的 Runx1 对于造血干细胞的产生必不可少, 而造血干细胞产生之后, Runx1 对造血维持并不重要^[21]。近年来, 对于 Runx1 在造血干细胞产生过程中的作用有了进一步认识。通过观察斑马鱼内皮-造血转化过程发现, 缺失 *runx1* 后, 部分内皮细胞可以发生形变并开始出芽, 但在形成造血干细胞过程中这群细胞会发生破裂, 导致造血干细胞无法产生^[15]。随后的研究发现, Runx1 可以保证造血特性的获得, 而其下游靶基因 Gfi1/Gfi1b (growth factor independent 1A transcription repressor 1) 能够在生血内皮细胞中抑制内皮基因的表达, 并促进细胞发生形变, 进而保证造血干细胞的正常产生^[22]。

除此之外, Gata2 (GATA binding protein 2) 也是造血干细胞产生的关键调控因子。在小鼠的造血发育过程中, Gata2 在主动脉及造血干细胞簇中特异表达^[23]。在内皮细胞中特异性敲除 Gata2 发现, 生血内皮可以正常产生, 但是内皮-造血转化过程不能发生^[24], 与 Runx1 不同的是, 在造血干细胞产生之后, 血细胞中的 Gata2 对于造血干细胞的生存和维持也非常重要^[24,25]。斑马鱼的 *gata2* 有两个同源基因—, *gata2a* 和 *gata2b*。其中, *gata2a* 在受精后 11 小时就开始表达于成血成血管细胞中^[26], 而 *gata2b* 特异性表达在生血内皮中^[27]。在功能上, Gata2a 和 Gata2b 都能通过调控 *runx1* 的表达来促进生血内皮的特化, 同时 *gata2b* 又受到 Gata2a 的调控^[27,28]。

3 调控造血干细胞发育的信号通路

3.1 BMP 信号通路

骨形态发生蛋白(bone morphogenesis proteins,

BMPs)是转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β)超家族的一员^[29]。作为一种形态发生素, BMP 信号在胚胎发生、发育以及成体组织稳态的维持中都发挥着重要作用^[30]。经典的 BMP 信号通路是 Smads 依赖性的。BMP 配体先与 I 型受体(BMPRI)结合, 形成复合体后再与 II 型受体(BMPRII)结合。II 型受体是持续激活型的, 能够磷酸化 I 型受体。激活的 I 型受体随后磷酸化下游的 Smad 蛋白。作为细胞内的信号分子, 脊椎动物中的 8 种 Smad 蛋白可以分为 3 类: 受体调节型 Smads (receptor-regulated Smads, R-Smads)、共配体型 Smads (common-mediator Smads, Co-Smads) 以及抑制型 Smads (inhibitory Smads, I-Smads)。Co-Smads (Smad4) 和 I-Smads (Smad6 和 Smad7) 在 TGF- β 超家族中是通用的, 而 R-Smads 中能够参与 BMP 信号传导的主要包括 Smad1、Smad5 和 Smad8^[31]。

经受体激活后的 R-Smads 从细胞膜上脱离, 在胞内与 Smad4 结合并进入细胞核。在细胞核内, Smads 可以结合 DNA, 同时可以招募共同作用因子调控基因表达, 如 Smad1/5-Smad4 与 OAZ (Olf-1/EBF-associated zinc finger) 形成复合体后能够招募共激活因子 p300/CBP 等促进基因表达^[32]; Smad1-Smad4 与 Nkx3.2 形成复合体后能够招募共抑制因子 mSin3/HDAC1 等抑制基因表达^[33]。作为抑制型 Smads, Smad6 能够抑制 Smad4 与磷酸化 Smad1 的结合从而阻断 BMP 信号的传递^[34]; Smad7 能够竞争性地结合 TGF- β 或 BMP 受体, 并能够与 Smurf1/2 共同作用通过泛素化途径降解受体进而阻断信号的传递^[35,36]。

3.1.1 经典的 BMP-Smad1/5 在 HSC 发育过程的调控作用

脊椎动物的造血发育起源于腹侧中胚层, BMP 蛋白(尤其是 BMP4)能够诱导腹侧中胚层的形成^[37,38]。为了进一步研究 BMP 信号通路在造血发育中的作用, 研究人员用转基因的方法在时间和空间上来控制 BMP 信号的活性。首先, 为避免 BMP 信号缺失对早期中胚层发育的影响, 研究人员利用造血、血管及前肾前体细胞特异性的 *lmo2* 启动子在斑马鱼胚胎侧板中胚层中过表达功能缺失的 BMP 受体, 发现 BMP 信号在这些前体细胞中的缺失能够促

进血管和造血的发育但抑制前肾发育,说明 BMP 信号在细胞命运决定中起到重要的调控作用^[39]。随后,为避免对动脉发育的影响,研究人员利用热激蛋白(heat shock protein 70, hsp70)启动子特异性地在斑马鱼动脉发育完成之后过表达功能缺失的 BMP 受体来抑制 BMP 信号通路,结果发现造血干细胞的产生和维持不能正常进行^[40],说明 BMP 信号在造血发育中具有不可缺少的作用。虽然 BMP4 在 24hpf 的斑马鱼胚胎中表达于腹侧间充质(ventral mesenchyme)中,但是 BMP 受体 Bmpr2a 在主动脉内皮中可以检测到^[41],暗示着 BMP 受体可以将 BMP 信号传递到主动脉中,进而调控造血干细胞的产生。在小鼠胚胎中,BMP4 在腹侧间充质中表达,BMP 受体 Alk3、Alk6 和 BmprII,以及 BMP 下游效应因子 Smad1、4、5 在 AGM 区动脉和血细胞中表达用小分子药物抑制 BMP 信号后,小鼠造血活性明显降低^[42]。以上这些研究说明 BMP 信号对造血干细胞的产生和维持都发挥重要作用。

对于 BMP 信号通路调控造血发育过程的分子机制,近年来也有深入研究。作为 BMP 信号通路下游的关键信号分子,Smad1 和 Smad5 对于斑马鱼的初级造血过程发挥着不同的作用。Smad1 缺失能够增加初级红细胞的数目,而成熟巨噬细胞的产生受到抑制;Smad5 缺失导致初级红细胞的缺陷,巨噬细胞不受影响;但是 Smad1 或 Smad5 的缺失都会导致次级造血前体细胞的减少^[43,44]。在小鼠成血成血管前体细胞中,缺失 Smad1 可以促进后续造血基因的表达,同时能够使胞核内的磷酸化 Smad2(pSmad2)信号增强,这也暗示着 BMP 和 TGF- β 信号通路在造血发育调控中存在互作^[45]。另外,作为 TGF- β 超家族共用的 Co-Smad,Smad4 在小鼠内皮细胞而不是血细胞中的缺失能够增加造血动脉内造血簇的产生,也能够促进体外造血前体细胞的产生^[46],意味着内皮细胞的 Smad4 在小鼠造血发育过程中发挥着抑制作用。但是 Smad5 敲除的小鼠,造血干细胞的产生明显减少,内皮细胞的特性有所增强^[44]。体外实验发现 Smad1 直接结合到 *runx1* 启动子区域,促进其表达;同时,Smad6 可以在 Smurf1 的协助下抑制 Runx1 的活性^[47],暗示着 BMP 信号通路可能通过 Smad1 直接调控造血基因的表达;但在体内造血过程中是否存在直接调控还有待进一步验证。

3.1.2 造血干细胞发育过程中 BMP 信号通路与 FGF 信号通路的相互作用

在脊椎动物早期胚胎发育,包括神经特化、初级造血和胚胎干细胞命运维持等过程中,BMP 信号通路和 ERK 介导的 FGF 信号通路都发挥作用^[48-50],共同对细胞命运的选择进行调控。通过 *hsp70* 启动子驱动的遗传学控制以及特异性的化学抑制剂处理,研究人员发现在造血干细胞的产生过程中 BMP 信号通路持续发挥作用,而 ERK 信号通路的作用是动态变化的。在血管发生过程中,ERK 信号通路是动脉分化所必须的,一旦动静脉分化完成,ERK 信号就需要下调至阈值范围内以保证造血干细胞的产生。BMP 信号通路在 Smad1/5 介导下调 ERK 信号。Smad1/5 招募共抑制因子 HDAC1 到 *erk2* 启动子区,使其乙酰化水平下降,从而在转录水平上抑制 *erk2* 的表达。进一步研究发现,在斑马鱼造血发育过程中,过度激活的 ERK 信号能够增强动脉内皮细胞的特性以及内皮细胞间的紧密连接,最终导致生血内皮的产生及内皮-造血转化过程受到抑制,进而影响造血干细胞的产生^[44]。在小鼠造血发育过程中,研究人员在内皮细胞内特异性敲除 Smad4,发现动脉内皮中的 BMP4 表达增加,而增加的 BMP4 能够通过非 Smad 依赖的方式激活 ERK 通路,从而增加造血细胞簇的产生^[46]。这两项研究说明 BMP 信号通路可以在蛋白水平和转录水平上通过调控 ERK 信号的活性来影响造血干细胞的产生,而 ERK 信号对造血干细胞的调控是动态变化的(图 1)。

3.2 Notch 信号通路

Notch 蛋白是一个在进化上非常保守的跨膜受体蛋白,能够介导细胞-细胞间的信号传导,对于细胞命运决定非常重要^[51]。在哺乳动物和斑马鱼中,Notch 信号是由多个蛋白之间的相互关联进行信号传递的,包括信号接收细胞表面的 Notch 信号的跨膜受体(小鼠 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4,斑马鱼 Notch1a、Notch1b、Notch2 和 Notch3)与信号释放细胞所释放的 Notch 配体(Jagged 和 Delta)结合^[52,53]。随后,在 ADAM TACE 金属蛋白酶(ADAM metalloprotease)的作用下,Notch 受体 S2 位点被切割,在 γ -分泌酶(γ -Secretase)的作用下 S3 位点被切

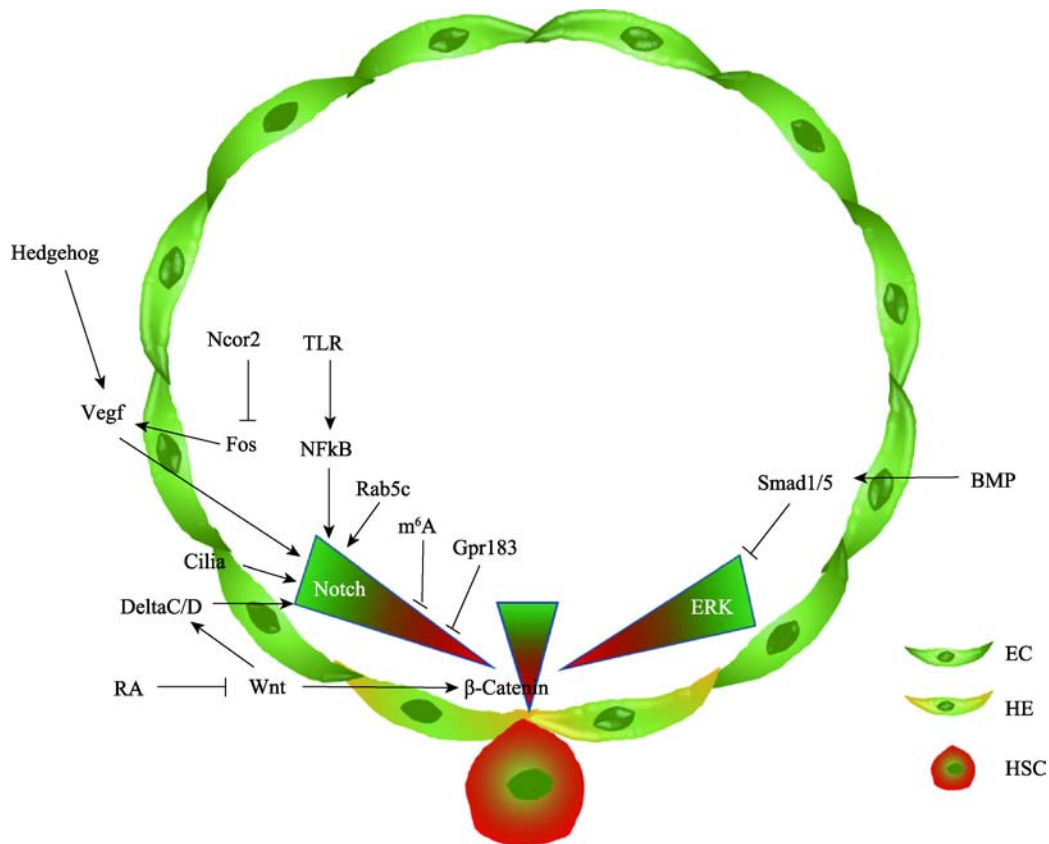


图 1 斑马鱼造血干细胞发育过程中的信号通路调控示意图

Fig. 1 Regulatory signaling pathways during zebrafish hematopoietic stem cell development

割, 释放出 Notch 细胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)。而在无 Notch 信号激活的情况下, 细胞核内的 RBPj 能够招募转录共抑制复合物(nuclear corepressor, NCoR)以及组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)抑制 Notch 信号靶基因的转录。Notch 信号激活后, NICD 可以入核, 替换 RBPj 并且招募转录共激活复合物从而激活 Notch 信号靶基因的转录^[54]。

3.2.1 Notch 信号通路在 HSC 发育过程的调控作用

Notch 信号是造血干细胞发育过程中非常重要, 也是研究较多的信号通路。Notch 信号缺失的突变体中动脉血管不能正常分化^[55], 作为造血干细胞的来源, 动脉血管的缺陷会导致造血干细胞异常产生, 这一功能是由 Notch1 介导的^[56]。动脉特异性标记基因 *ephrinB2* 作为靶基因, 可以直接受 Notch1 调控^[57]。进一步研究发现, Notch 信号通路对造血干细胞命运

决定及其产生过程也发挥着细胞自主性调控作用。利用 *hsp70:gal4;uas:NICD* 转基因斑马鱼品系, 在不同时期进行热激处理来控制动脉标记基因的表达, 发现 Notch 通过 *Runx1* 调控造血干细胞的产生与动脉发育是两个独立的过程^[58]。小鼠中的实验也证明, *Jagged1* 介导的 Notch1 信号的激活可以通过调节 *Gata2* 和 *Cdca7* 调控 *runx1* 基因的表达, 进而调控造血干细胞的产生, 这也不依赖于动脉发育^[27,59~61]。整体来讲, 不同的 Notch 配体可以介导不同强度的 Notch 信号, *Jagged1* 能够介导生血内皮细胞中低强度的 Notch 信号来维持造血干细胞的产生, 而 *Dll4* 维持内皮细胞中高强度的 Notch 信号来保证动脉的分化^[62]。

近年来, 随着研究的深入, 越来越多的结果证明 Notch 信号通路在造血发育过程中的作用是动态变化的, 而且也是剂量依赖性的。在斑马鱼中, 利用 Notch 信号的报告基因 *tp1* 转基因和造血干细胞标记基因 *cmyb* 以及 *runx1* 转基因鱼系, 追踪斑马鱼造

血过程,发现 $tp1^{+}cmyb^{+}$ 或 $tp1^{+}runx1^{+}$ 细胞不会发生内皮-造血转化,是因为这些细胞首先要失去 Notch 活性转变成 $tp1^{-}$ 细胞后才能产生造血特性,最终转变成造血干细胞。另外,应用转基因鱼系 Tg (hsp70:dn-MAML) 和 Tg (hsp70:GAL4/UAS:NICD) 胚胎,通过在不同时期热激处理控制 Notch 信号强度,研究者发现在动静脉分化之前,激活 Notch 信号能够促进造血干细胞的产生。在动静脉发育完成后,动脉内皮细胞中的 Notch 信号的持续激活则会抑制造血干细胞的产生,而降低 Notch 信号强度,能够促进造血干细胞的产生^[63]。在鸡胚造血干细胞产生过程中,随着 *runx1* 表达的增加,Notch 信号会逐渐降低,而抑制 Notch 信号后会在一定程度上促进造血干细胞的产生^[64]。

3.2.2 Notch 信号通路上游调控因子

随着对造血干细胞产生中 Notch 信号动态调控机制的认识越来越清楚,越来越多的研究阐释了 Notch 信号通路的上游调控机制(图 1)。首先,为保证动脉内皮的分化及造血干细胞的产生,Notch 信号需要正确的激活。在动静脉分化阶段,脊索分泌的 Hedgehog 信号能够促进体节中血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, Vegf) 的表达, Vegf 可以与具有动脉特性的成血管细胞表面的 Vegf 受体结合,进而激活动脉内皮中的 Notch 信号,促进动脉的分化^[65]。炎症信号也可以激活 Notch 信号并且特异性地调控造血干细胞的产生,而对动脉发育没有影响。初级中性粒细胞分泌的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 和粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 可以与内皮细胞表面的受体 TNFR2, Toll 样受体 (Toll-like receptor 4, TLR4) 结合,通过经典的炎症信号通路使得内皮细胞内的 NF κ B 进入细胞核,进而调控 Notch 受体 Jagged1 的表达^[66,67]。除此之外,内皮细胞内的初级纤毛发生也能够促进 Notch 信号在动脉内皮的激活,从而促进生血内皮细胞的特化,保障造血干细胞的正常产生^[68]。

另一方面,动脉内皮分化完成后,生血内皮细胞内 Notch 信号的下降也受到严密的调控。在转录水平上, NcoR2 作为一个转录共抑制因子,特异表达在斑马鱼 AGM 区,通过调控 *fos* 启动子的乙酰化

水平抑制其转录,进而抑制 Vegf 及其下游的 Notch 信号,以保证内皮-造血转化过程中内皮特性的降低及造血特性的获得^[69]。在转录后调控水平上,内皮细胞表达的 N6-methyladenosine (m^6A) 甲基转移酶 Mett13 能够在 *notch1a* mRNA 的 3'UTR 区域进行 m^6A 修饰,从而使得 *notch1a* mRNA 能被 Ythdf2 识别并降解。Mett13 或 Ythdf2 的缺失都会导致 *notch1a* mRNA 水平的升高,最终导致内皮细胞特性的增强而阻止造血干细胞的产生^[70]。在蛋白水平上,生血内皮细胞中的 G 蛋白偶联受体 183 (G protein-coupled receptor 183, Gpr183) 在内皮-造血转化开始之前能够通过招募 β -Arrestin1 和 E3 连接酶 Nedd4 来降解 Notch1 蛋白从而降低 Notch 信号的活性,以保证造血干细胞的正常产生^[63]。此外,在生血内皮特化过程中, Rab5c 通过精密调控 Notch 信号通路配体和受体的内吞运输,最终促进了造血干细胞的发育^[71]。

3.3 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路可以分为 β -Catenin 依赖的经典 Wnt 信号通路 (canonical pathway), 非典型平面细胞极性途径 (planar cell polarity pathway) 以及非经典 Wnt 信号/钙通路 (Wnt/ Ca^{2+} pathway)。这 3 种信号通路都依赖于 Wnt 配体与细胞膜表面受体 Frizzled (Fzd) 的结合以及细胞内 Dishevelled 的招募。Wnt 信号通路的激活对于胚胎早期形态发生, 体轴发育以及干细胞自我更新都至关重要^[72]。

在 β -Catenin 依赖的经典 Wnt 信号通路中, 无 Wnt 配体的情况下, 细胞内的 β -Catenin 被降解复合物 (destruction complex, Dishevelled-Axin-GSK3) 结合并磷酸化, 磷酸化的 β -Catenin 被 β -TrCP 识别并泛素化, 从而被进一步降解。在 Wnt 配体与细胞膜上的受体 Frizzled (通常为 Fzd1 或 Fzd4) 以及共受体 LRP5 或 LRP6 结合后使得 LRP 蛋白发生磷酸化, 磷酸化的 LRP 能够结合降解复合物, 阻止 β -TrCP 对 β -Catenin 的泛素化及降解, 最终细胞浆内的 β -Catenin 得以稳定存在。部分 β -Catenin 进入细胞核与 TCF/LEF 转录因子家族共同调控下游基因的表达, 进而调控胚胎体轴建立、组织发生、干细胞的自我更新、增殖和分化, 以及成体组织稳态等过程^[73]。

在非典型平面细胞极性途径 (Wnt/PCP pathway)

中, Wnt 配体(如 Wnt5a、Wnt7、Wnt11 等)与受体 Frizzled (通常为 Fzd3、Fzd6 和 Fzd7)及共受体(如 PTK7、ROR2 和 RYK)或细胞表面蛋白(CD146、VANGL2、Syndecan 和 Glypican)结合后, 进一步招募 Dishevelled 与受体复合物结合, 激活下游的 Rho 家族的小 G 蛋白(如 Cdc42、Rac1 和 RhoA)来调控细胞骨架的形成, 并通过 JNK 通路调控下游基因的转录, 进而调控细胞极性及细胞迁移^[74]。在非经典 Wnt 信号/钙通路(Wnt/Ca²⁺ pathway)中, Wnt 配体(如 Wnt5a)与受体 Frizzled 结合后能够通过 G 蛋白将信号传递给 PLC β 从而促进 Ca²⁺的释放。Ca²⁺的增加一方面能通过 CaMKII 激酶来调控下游信号, 另一方面能够通过 NFAT 来调控下游基因的表达^[75]。Wnt 信号/钙通路对于胚胎背腹分化和体轴形成以及细胞分化都有重要作用^[76]。

3.3.1 Wnt 信号通路在 HSC 发育过程的调控作用

在斑马鱼中, 过表达 Wnt 信号通路下游的抑制因子 *dkk* 和 *axin* 能够抑制造血干细胞的产生, 而前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)可以调控 Wnt 信号通路中 β -Catenin 的磷酸化进而调控造血发育^[77]。斑马鱼体节中 Wnt9a 的缺失虽然对造血干细胞的命运决定没有影响, 但却导致造血干细胞整体数目减少。进一步的实验说明体节中的 Wnt9a 能够为造血干细胞的增殖提供有利微环境, 从而保证造血干细胞的正常作用。Wnt 信号通路可以和 BMP 信号通路共同激活 Cdx-Hox, 进而调控造血过程^[78]。在小鼠中, 利用 GSK3 的抑制剂来增强 Wnt 信号能够增加造血干细胞的数目; 相反, β -Catenin 的小分子拮抗剂处理能够减少造血干细胞的数目。另外, 在小鼠的胚胎造血过程中发现, Wnt 对造血干细胞产生的作用也是动态变化的^[79]。在内皮-造血转化发生之前, β -Catenin 在内皮细胞中的激活可以促进造血干细胞的产生, 一旦造血的命运决定完成之后, β -Catenin 的活性就会下调^[79]。近期对于视黄酸(retinoic acid, RA)信号通路的研究发现, 它能够下调内皮细胞或造血前体细胞中的 Wnt 信号通路, 以促进造血干细胞的产生^[80]。

除经典的 Wnt/ β -Catenin 信号通路之外, β -Catenin 非依赖性的 Wnt 信号通路也能够调控造血发育过程(图 1)。在受精后 14~17 小时左右斑马鱼胚胎中, 体

节中的 Wnt16 可以促进 Notch 配体 DeltaC 和 DeltaD 的表达, 体节中的 Notch3 能够接受 DeltaC 和 DeltaD 传递的信号, 进而促进生骨节(sclerotome)和造血干细胞的特化, 以细胞非自主性的方式调控造血干细胞的产生^[81,82]。鉴于斑马鱼胚胎发育中 Wnt16 与 FGF 的活性有时间和空间上的相似性, 研究人员对两个信号通路进行检测后发现, Wnt16 对 DeltaC 的调控作用是由 FGF 信号通路介导的^[83]。另外, Rspodin1 作为 Wnt 信号的激活因子, 可以通过调控 Wnt16 的表达来调控造血干细胞的产生^[84]。但是目前对于体节如何调控造血干细胞命运决定的分子机制还有待进一步研究。

4 结语与展望

造血干细胞能够自我更新并分化产生各种类型的血细胞, 其重建造血的能力是临床上利用骨髓移植治疗血液疾病的基础。因此全面系统地研究造血发育过程的分子机制和复杂的信号调控网络, 有助于突破临床上造血干细胞匮乏的瓶颈, 对血液疾病的治疗和新药的研发都有非常重要的意义。目前, 对于造血干细胞的产生过程已经有清晰的认识, 但是该过程的调控机制还有待进一步完善。

近年来, 随着对造血干细胞产生过程中各个信号通路调控机制的研究越来越多, 人们也越来越意识到在内皮-造血转化过程中, 调控因子的动态平衡非常重要。例如: ERK 和 Notch 信号的激活在这个过程中的作用都是动态变化的。在内皮细胞中 ERK 和 Notch 的激活都是动脉分化所必需的, 但是随着内皮-造血转化的开始, 内皮细胞若要获得造血特性, 细胞内调控内皮特性的 ERK 和 Notch 信号活性需要下调, 以保证造血特性的获得及维持。一旦这些信号没有及时下调, 那么内皮-造血转化过程就不能完成, 也不能产生造血干细胞。在体外造血过程中, 能否通过调控这些信号通路的活性来促进造血干细胞的产生和维持还需要进一步研究。

致谢

感谢中国科学院动物研究所马东媛博士和中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)王璐博士对

本文的仔细阅读和修改。

参考文献(References):

- [1] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008, 132(4): 631–644. [DOI]
- [2] Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998, 125(4): 725–732. [DOI]
- [3] Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 1999, 126(22): 5073–5084. [DOI]
- [4] Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T, Vink CS, Bhandoola A, Dzierzak E, Speck NA. Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 541–552. [DOI]
- [5] McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, Bowen JR, Conway SJ, Catherman SC, Kingsley PD, Koniski AD, Palis J. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep*, 2015, 11(12): 1892–1904. [DOI]
- [6] Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu BS, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 2012, 336(6077): 86–90. [DOI]
- [7] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 2015, 518(7540): 547–551. [DOI]
- [8] Böiers C, Carrelha J, Lutteropp M, Luc S, Green JCA, Azzoni E, Woll PS, Mead AJ, Hultquist A, Swiers G, Perdiguero EG, Macaulay IC, Melchiori L, Luis TC, Kharazi S, Bouriez-Jones T, Deng QL, Ponten A, Atkinson D, Jensen CT, Sitnicka E, Geissmann F, Godin I, Sandberg R, de Bruijn MFTR, Jacobsen SEW. Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(5): 535–548. [DOI]
- [9] Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, 1994, 1(4): 291–301. [DOI]
- [10] Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH, Mikkola HKA. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2005, 8(3): 365–375. [DOI]
- [11] Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 2010, 464(7285): 116–120. [DOI]
- [12] Chen AT, Zon LI. Zebrafish blood stem cells. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 35–42. [DOI]
- [13] Detrich HW, Kieran MW, Chan FY, Barone LM, Yee K, Rundstadler JA, Pratt S, Ransom D, Zon LI. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(23): 10713–10717. [DOI]
- [14] Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development*, 2007, 134(23): 4147–4156. [DOI]
- [15] Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010, 464(7285): 112–115. [DOI]
- [16] Patterson LJ, Gering M, Patient R. Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood*, 2005, 105(9): 3502–3511. [DOI]
- [17] Ren X, Gomez GA, Zhang B, Lin S. Scl isoforms act downstream of etsrp to specify angioblasts and definitive hematopoietic stem cells. *Blood*, 2010, 115(26): 5338–5346. [DOI]
- [18] Zhen FH, Lan YH, Yan B, Zhang WQ, Wen ZL. Hemogenic endothelium specification and hematopoietic stem cell maintenance employ distinct Scl isoforms. *Development*, 2013, 140(19): 3977–3985. [DOI]
- [19] North TE, Goessling W, Walkley CR, Lengerke C, Kopani KR, Lord AM, Weber GJ, Bowman TV, Jang IH, Grosser T, Fitzgerald GA, Daley GQ, Orkin SH, Zon LI. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature*, 2007, 447(7147): 1007–1011. [DOI]
- [20] Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3444–3449. [DOI]
- [21] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to hematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*, 2009, 457(7231): 887–891. [DOI]
- [22] Lancrin C, Mazan M, Stefanska M, Patel R, Lichtinger M, Costa G, Vargel O, Wilson NK, Möröy T, Bonifer C,

- Göttgens B, Kouskoff V, Lacaud G. GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood*, 2012, 120(2): 314–322. [DOI]
- [23] Eich C, Arlt J, Vink CS, Solaimani Kartalaei P, Kaimakis P, Mariani SA, van der Linden R, van Cappellen WA, Dzierzak E. In vivo single cell analysis reveals Gata2 dynamics in cells transitioning to hematopoietic fate. *J Exp Med*, 2018, 215(1): 233–248. [DOI]
- [24] de Pater E, Kaimakis P, Vink CS, Yokomizo T, Yamada-Inagawa T, van der Linden R, Kartalaei PS, Camper SA, Speck N, Dzierzak E. Gata2 is required for HSC generation and survival. *J Exp Med*, 2013, 210(13): 2843–2850. [DOI]
- [25] Gao X, Johnson KD, Chang YI, Boyer ME, Dewey CN, Zhang J, Bresnick EH. Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med*, 2013, 210(13): 2833–2842. [DOI]
- [26] Patterson LJ, Gering M, Eckfeldt CE, Green AR, Verfaillie CM, Ekker SC, Patient R. The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood*, 2006, 109(6): 2389–2398. [DOI]
- [27] Butko E, Distel M, Pouget C, Weijs B, Kobayashi I, Ng K, Mosimann C, Poulain FE, McPherson A, Ni CW, Stachura DL, Del Cid N, Espín-Palazón R, Lawson ND, Dorsky R, Clements WK, Traver D. Gata2b is a restricted early regulator of hemogenic endothelium in the zebrafish embryo. *Development*, 2015, 142(6): 1050–1061. [DOI]
- [28] Dobrzycki T, Mahony CB, Krecsmarik M, Koyunlar C, Rispoli R, Peulen-Zink J, Gussinklo K, Fedlaoui B, de Pater E, Patient R, Monteiro R. Deletion of a conserved Gata2 enhancer impairs haemogenic endothelium programming and adult Zebrafish haematopoiesis. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 71. [DOI]
- [29] Massagué J. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67(1): 753–791. [DOI]
- [30] Wang RN, Green J, Wang ZL, Deng YL, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye JX, Yan ZJ, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*, 2014, 1(1): 87–105. [DOI]
- [31] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2783–2810. [DOI]
- [32] Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell*, 2000, 100(2): 229–240. [DOI]
- [33] Kim DW, Lassar AB. Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(23): 8704–8717. [DOI]
- [34] Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*, 1998, 12(2): 186–197. [DOI]
- [35] Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*, 1997, 389(6651): 631–635. [DOI]
- [36] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell*, 2000, 6(6): 1365–1375. [DOI]
- [37] Sadlon TJ, Lewis ID, D'Andrea RJ. BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 457–474. [DOI]
- [38] Pyati UJ, Webb AE, Kimelman D. Transgenic zebrafish reveal stage-specific roles for Bmp signaling in ventral and posterior mesoderm development. *Development*, 2005, 132(10): 2333–2343. [DOI]
- [39] Gupta S, Zhu H, Zon LI, Evans T. BMP signaling restricts hemato-vascular development from lateral mesoderm during somitogenesis. *Development*, 2006, 133(11): 2177–2187. [DOI]
- [40] Wilkinson RN, Pouget C, Gering M, Russell AJ, Davies SG, Kimelman D, Patient R. Hedgehog and Bmp polarize hematopoietic stem cell emergence in the zebrafish dorsal aorta. *Dev Cell*, 2009, 16(6): 909–916. [DOI]
- [41] Monteiro R, van Dinther M, Bakkens J, Wilkinson R, Patient R, ten Dijke P, Mummery C. Two novel type II receptors mediate BMP signalling and are required to establish left-right asymmetry in zebrafish. *Dev Biol*, 2008, 315(1): 55–71. [DOI]
- [42] Durand C, Robin C, Bollerot K, Baron MH, Ottersbach K, Dzierzak E. Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(52): 20838–20843. [DOI]
- [43] McReynolds LJ, Gupta S, Figueroa ME, Mullins MC, Evans T. Smad1 and Smad5 differentially regulate em-

- bryonic hematopoiesis. *Blood*, 2007, 110(12): 3881–3890. [DOI]
- [44] Zhang CX, Lv JH, He QP, Wang SF, Gao Y, Meng AM, Yang X, Liu F. Inhibition of endothelial ERK signalling by Smad1/5 is essential for haematopoietic stem cell emergence. *Nat Commun*, 2014, 5: 3431. [DOI]
- [45] Cook BD, Liu S, Evans T. Smad1 signaling restricts hematopoietic potential after promoting hemangioblast commitment. *Blood*, 2011, 117(24): 6489–6497. [DOI]
- [46] Lan Y, He WY, Li Z, Wang Y, Wang J, Gao J, Wang WL, Cheng T, Liu B, Yang X. Endothelial Smad4 restrains the transition to hematopoietic progenitors via suppression of ERK activation. *Blood*, 2014, 123(14): 2161–2171. [DOI]
- [47] Pimanda JE, Donaldson IJ, de Bruijn MFTR, Kinston S, Knezevic K, Huckle L, Piltz S, Landry JR, Green AR, Tannahill D, Göttgens B. The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3): 840–845. [DOI]
- [48] Xu RH, Ault KT, Kim J, Park MJ, Hwang YS, Peng Y, Sredni D, Kung HF. Opposite effects of FGF and BMP-4 on embryonic blood formation: roles of PV.1 and GATA-2. *Dev Biol*, 1999, 208(2): 352–361. [DOI]
- [49] Pera EM, Ikeda A, Eivers E, De Robertis EM. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3023–3028. [DOI]
- [50] Yu PZ, Pan G, Yu J, Thomson JA. FGF2 sustains NANOG and switches the outcome of BMP4-induced human embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 326–334. [DOI]
- [51] Kopan R, Ilagan MXG. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 2009, 137(2): 216–233. [DOI]
- [52] Shawber CJ, Kitajewski J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays*, 2004, 26(3): 225–234. [DOI]
- [53] Lomeli H, Castillo-Castellanos F. Notch signaling and the emergence of hematopoietic stem cells. *Dev Dyn*, 2020, 249(11): 1302–1317. [DOI]
- [54] Butko E, Pouget C, Traver D. Complex regulation of HSC emergence by the Notch signaling pathway. *Dev Biol*, 2016, 409(1): 129–138. [DOI]
- [55] Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 2001, 128(19): 3675–3683. [DOI]
- [56] Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y, Hirai H. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity*, 2003, 18(5): 699–711. [DOI]
- [57] Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolós V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen HY, Shou WN, Ballestar E, Esteller M, Rojas A, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell*, 2007, 12(3): 415–429. [DOI]
- [58] Burns CE, Traver D, Mayhall E, Shepard JL, Zon LI. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway. *Genes Dev*, 2005, 19(19): 2331–2342. [DOI]
- [59] Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, López ME, Inglés-Esteve J, Riera L, Tipping A, Enver T, Dzierzak E, Gridley T, Espinosa L, Bigas A. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *EMBO J*, 2008, 27(13): 1886–1895. [DOI]
- [60] Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL, Bigas A. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*, 2005, 132(5): 1117–1126. [DOI]
- [61] Guiu J, Bergen DJM, De Pater E, Islam ABMMK, Ayllón V, Gama-Norton L, Ruiz-Herguido C, González J, López-Bigas N, Menendez P, Dzierzak E, Espinosa L, Bigas A. Identification of Cdc7 as a novel Notch transcriptional target involved in hematopoietic stem cell emergence. *J Exp Med*, 2014, 211(12): 2411–2423. [DOI]
- [62] Gama-Norton L, Ferrando E, Ruiz-Herguido C, Liu ZY, Guiu J, Islam ABMMK, Lee SU, Yan MH, Guidos CJ, López-Bigas N, Maeda T, Espinosa L, Kopan R, Bigas A. Notch signal strength controls cell fate in the haemogenic endothelium. *Nat Commun*, 2015, 6: 8510. [DOI]
- [63] Zhang PP, He QP, Chen DB, Liu WX, Wang L, Zhang CX, Ma DY, Li W, Liu B, Liu F. G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via Notch1 inhibition. *Cell Res*, 2015, 25(10): 1093–1107. [DOI]
- [64] Richard C, Drevon C, Canto PY, Villain G, Bollérot K, Lempereur A, Teillet MA, Vincent C, Rosselló Castillo C, Torres M, Piwarzyk E, Speck NA, Souyri M, Jaffredo T. Endothelio-mesenchymal interaction controls runx1 expression and modulates the notch pathway to initiate

- aortic hematopoiesis. *Dev Cell*, 2013, 24(6): 600–611. [DOI]
- [65] Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circ Res*, 2009, 104(5): 576–588. [DOI]
- [66] He QP, Zhang CX, Wang L, Zhang PP, Ma DY, Lv JH, Liu F. Inflammatory signaling regulates hematopoietic stem and progenitor cell emergence in vertebrates. *Blood*, 2015, 125(7): 1098–1106. [DOI]
- [67] Espín-Palazón R, Stachura DL, Campbell CA, García-Moreno D, Del Cid N, Kim AD, Candel S, Meseguer J, Mulero V, Traver D. Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell*, 2014, 159(5): 1070–1085. [DOI]
- [68] Liu ZB, Tu HQ, Kang YS, Xue YY, Ma DY, Zhao CT, Li HY, Wang L, Liu F. Primary cilia regulate hematopoietic stem and progenitor cell specification through Notch signaling in zebrafish. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1839. [DOI]
- [69] Wei YL, Ma DY, Gao Y, Zhang CX, Wang L, Liu F. Ncor2 is required for hematopoietic stem cell emergence by inhibiting Fos signaling in zebrafish. *Blood*, 2014, 124(10): 1578–1585. [DOI]
- [70] Zhang CX, Chen YS, Sun BF, Wang L, Yang Y, Ma DY, Lv JH, Heng J, Ding YY, Xue YY, Lu XY, Xiao W, Yang YG, Liu F. m(6)A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature*, 2017, 549(7671): 273–276. [DOI]
- [71] Heng J, Lv P, Zhang YF, Cheng XJ, Wang L, Ma DY, Liu F. Rab5c-mediated endocytic trafficking regulates hematopoietic stem and progenitor cell development via Notch and AKT signaling. *PLoS Biol*, 2020, 18(4): e3000696. [DOI]
- [72] Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development*, 2018, 145(11). [DOI]
- [73] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 2012, 149(6): 1192–1205. [DOI]
- [74] Daulat AM, Borg JP. Wnt/Planar cell polarity signaling: new opportunities for cancer treatment. *Trends Cancer*, 2017, 3(2): 113–125. [DOI]
- [75] De A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(10): 745–756. [DOI]
- [76] Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 2005, 38(3–4): 439–446. [DOI]
- [77] Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT, Zon LI. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell*, 2009, 136(6): 1136–1147. [DOI]
- [78] Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, Davidson AJ, Hammerschmidt M, Rentzsch F, Green JBA, Zon LI, Daley GQ. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 72–82. [DOI]
- [79] Ruiz-Herguido C, Guiu J, D'Altri T, Inglés-Esteve J, Dzierzak E, Espinosa L, Bigas A. Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/ β -catenin activity. *J Exp Med*, 2012, 209(8): 1457–1468. [DOI]
- [80] Chanda B, Ditadi A, Iscove NN, Keller G. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell*, 2013, 155(1): 215–227. [DOI]
- [81] Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature*, 2011, 474(7350): 220–224. [DOI]
- [82] Kim AD, Melick CH, Clements WK, Stachura DL, Distel M, Panáková D, MacRae C, Mork LA, Crump JG, Traver D. Discrete Notch signaling requirements in the specification of hematopoietic stem cells. *EMBO J*, 2014, 33(20): 2363–2373. [DOI]
- [83] Lee Y, Manegold JE, Kim AD, Pouget C, Stachura DL, Clements WK, Traver D. FGF signalling specifies haematopoietic stem cells through its regulation of somitic Notch signalling. *Nat Commun*, 2014, 5: 5583. [DOI]
- [84] Genthe JR, Clements WK. R-spondin 1 is required for specification of hematopoietic stem cells through Wnt16 and Vegfa signaling pathways. *Development*, 2017, 144(4): 590–600. [DOI]

中国科学院动物研究所血液与心血管发育研究组简介

中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室血液和心血管发育研究组于 2009 年组建, 课题组长为刘峰研究员。课题组围绕“造血组织及血细胞发育调控”, 以斑马鱼和小鼠为主要研究模型, 从内源因子、微环境和表观修饰等多角度入手, 系统解析造血干细胞命运决定及血细胞发育的调控机制。在造血干细胞产生、维持及分化等方向取得了一系列研究成果, 在国际知名学术期刊 *Nature*、*Dev Cell*、*EMBO J*、*PNAS*、*J Exp Med*、*Blood*、*Nat Commun* 和 *Cell Res* 等发表论文 60 余篇。与此同时, 课题组承担了科技部、国家自然科学基金委以及中国科学院等一系列重大课题。课题组网站: <https://liulab.com.cn/>。

