

造血干细胞发育的分子机制

王璐[†], 张春霞[†], 刘峰^{*}

中国科学院动物研究所, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100101

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: liuf@ioz.ac.cn

收稿日期: 2015-07-23; 接受日期: 2015-08-20

国家自然科学基金(批准号: 31271570, 31425016)资助

摘要 造血干细胞是一群具有自我更新及分化能力的多能干细胞, 可以分化为所有类型的成熟血细胞. 造血干细胞的发育过程受到多种转录因子及信号通路的精密调控, 任何调控失衡都将导致严重的发育缺陷或者重大疾病. 本文系统总结了脊椎动物(小鼠及斑马鱼)造血干细胞发育过程中发挥关键作用的信号通路及转录因子, 不仅有助于理解造血干细胞发生的分子机制, 而且对完善调控网络以及促进基础向临床转化具有一定的理论指导意义.

关键词 造血干细胞, 生血内皮, 内皮造血转换, 转录因子, 信号通路

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是一群多能干细胞, 具有自我更新及分化为所有成熟血细胞类型的潜能, 是成体脊椎动物血细胞的原始祖细胞^[1]. 造血过程起始于胚胎发育早期, 贯穿生命体的终生. 这一过程中众多信号通路及调控因子之间存在相互协调或者拮抗作用, 对造血干细胞产生、维持、分化及自我更新过程进行复杂精密的调控. 系统全面地了解造血过程中的调控机制对于体外获得造血干细胞以及再生医学具有重要的指导意义. 本文将从脊椎动物造血过程的不同阶段介绍关键的调控因子及信号通路.

1 脊椎动物造血过程

脊椎动物的造血过程分为两个阶段: 初级/胚胎

造血(primitive or embryonic hematopoiesis)以及次级/成体造血(definitive or adult hematopoiesis)^[1]. 初级造血是脊椎动物造血的最初阶段. 初级造血发生于胚胎外卵黄囊(yolk sac)的血岛(blood island)位置. 初级造血产生的造血细胞包括原始红细胞(primitive erythrocytes)以及一些原始髓细胞(primitive myeloid cells). 原始红细胞能够为胚胎早期发育提供必要的氧气, 而髓细胞可以为机体提供免疫保护. 初级造血是一个瞬时的过程, 很快就被次级造血过程所代替. 次级造血过程分为两个时期, 前期可以产生红系-髓系前体细胞(erythromyeloid progenitor, EMP), 这一类细胞具有分化为红系, 巨核系及髓系细胞的潜能^[2-6]. 次级造血的第二个时期可以产生造血干细胞. 胚胎内的主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区域会产生造血干细胞^[1,7-9]. 另有研究证明,

引用格式: 王璐, 张春霞, 刘峰. 造血干细胞发育的分子机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 16-24

Wang L, Zhang C X, Liu F. Molecular regulation of hematopoietic stem cell development. *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 16-24, doi: 10.1360/N052015-00251

小鼠(*Mus musculus*)的胎盘^[10,11]、脐动脉^[9]以及头部的血管处^[12]也可以检测到造血干细胞. 造血干细胞通过血液循环迁移至胚胎的肝脏并进行扩增, 随后迁移至骨髓, 产生骨髓造血^[13]. 在次级造血过程中造血干细胞可以定向分化、增殖产生不同的血细胞前体, 并进一步生成各种类型的成熟血细胞(图 1)^[14].

斑马鱼(*Barchydanio rerio* var)作为一种理想的遗传学和发育生物学模式生物, 具有保守的造血发育系统, 因此被广泛地应用到造血干细胞的研究中^[1,15-17]. 斑马鱼初级/胚胎造血起源于两个区域^[18,19], 一个是脊索与躯干中胚层之间, 称为中间细胞群(intermediate cell mass, ICM), 主要产生红系细胞(erythroid); 另一个位于胚胎前部侧板中胚层, 只产生髓系细胞(myeloid). 在初级造血过程中, 斑马鱼中 ICM 区域相当于哺乳动物中的卵黄囊. 在其中发生的初级造血过程也与哺乳动物类似. 次级造血发生于 AGM 区域, 造血干细胞出现于主动脉腹侧区域(ventral wall of dorsal aorta). 这一区域与哺乳动物中的 AGM 同源, 在造血过程中的作用也类似. 造血干细胞产生之后, 进入血液循环并逐步迁移至尾部造血组织(caudal hematopoietic tissue, CHT), 这个区域相当于哺乳动物中的胎肝, 只作为一个暂时的次级造血器官. 经过短暂的扩增, 在受精后第 3~5 天, 一部分造血干细胞迁移至胸腺, 在这里造血干细胞分化产生 T 淋巴细胞^[20]. 其余的造血干细胞迁移至肾脏, 这是斑马鱼的终生造血器官, 相当于哺乳动物的骨髓. 造血干细胞在肾脏为胚胎乃至成鱼的发育提

供各类成熟血细胞(图 1)^[15,17,21].

2 成血成血管前体细胞的分化及主动脉形成的调控机制

脊椎动物的造血发生起源于腹侧中胚层, 其中部分细胞特化形成成血成血管前体细胞(hemangioblast)^[22], 这种细胞具有分化产生血液和血管前体细胞的能力. 转录因子 Etv2(Er71/Etsrp)是中胚层向成血成血管前体细胞特化过程中的主控基因, 同时调控血液及血管的发育. 血管前体细胞发育过程中, Etv2 受到 FLK1 的调控影响中胚层的发育^[23]; 而在随后的血管发育过程中, Etv2 则通过直接结合在 *flk1* 启动子区域调控其转录^[24]. 小鼠实验中证明 Etv2 位于 BMP, Notch 及 Wnt 信号下游调节血液血管祖细胞命运决定^[25].

在调控血管发育, 尤其是动脉发育信号通路中, 研究较多的就是 VEGF 信号通路. 与内皮细胞表达的受体 Kdr1 结合后, 体节中产生的 VEGFa 信号被传递到内皮细胞内, 从而通过下游 ERK 信号通路调控动脉分化^[26]. ERK 信号通路发挥作用是时间、浓度依赖性的. 血管形成之前缺失 ERK 信号导致动脉发育不完整, 最终导致造血干细胞不能产生^[27]; 而在血管形成之后过量的 ERK 信号则会促使动脉内皮特性持续维持, 同时还会通过上调内皮特异性黏附分子 ESAM 的表达, 使动脉内皮之间的紧密连接增强, 这也不利于造血干细胞的产生^[28]. 因此, 为了保证造血

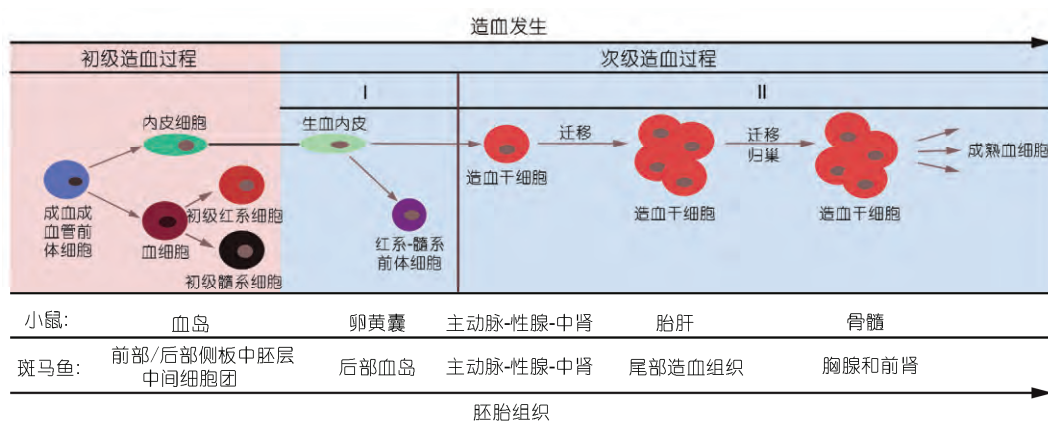


图 1 小鼠和斑马鱼造血过程及造血组织

造血过程分为初级造血及次级造血过程, 分别发生于不同的造血组织. 初级造血过程产生原始红细胞及原始髓细胞; 次级造血过程分为两个时期, 前期可以产生红系-髓系前体细胞, 第二个时期产生造血干细胞, 可以分化为所有类型的成熟血细胞

干细胞的顺利产生, ERK 信号通路需要受到严格控制. 最近的研究表明, ETS 转录因子 *Fev* 以及 BMP-Smad1/5 信号通路可以分别通过正向、负向来调节 *ERK* 基因的表达, 将 ERK 信号表达量维持在一个正常水平, 从而有利于造血干细胞产生^[27,28]. VEGFa-ERK 信号通过下游的 Notch 信号通路调控动脉发育. 在 *vegfa* 缺失的斑马鱼胚胎中, Notch 信号的激活可以恢复动脉发育的缺陷^[29]. Notch 配体 DeltaC 和 Delta Like 4, 受体 Notch1 和 Notch3 以及 Notch 信号靶基因 *Hey2* 等都在动脉内皮特异性表达, 而 Notch 信号的缺失会导致动脉标记基因下调, 同时静脉标记基因会在动脉异位表达, 这都暗示着 Notch 信号通路对动脉发育是必需的^[30,31]. 在 VEGF-Notch 上游的是 Hedgehog 信号通路, *shh* 或 *gli2* 突变体都会产生严重的动脉缺陷表型, 过表达 *vegfa* 能够恢复这一表型^[29,32]. 最近的研究表明, Hedgehog-Notch 是生血内皮的产生所必需的信号, 其后, 通过 *Scl* 的诱导作用产生造血干细胞^[33]. 除此之外, Hedgehog 信号通路还通过 *Crlra*(calcitonin receptor-like receptor)调控 Notch 信号通路, 进而调控动脉产生, 这一过程是 VEGF 非依赖性的^[34].

3 生血内皮的特化及造血干细胞发生的调控机制

近年来有研究证实, 在脊椎动物中 HSCs 产生于生血内皮(hemogenic endothelium, HE), 这是一类具有生成血细胞功能的内皮细胞. Eilken 等人^[35]首先在体外单细胞水平观察到中胚层细胞向血管内皮细胞分化, 进而分化为血细胞, 并形成血细胞群落的过程. Lancrin 等人^[36]在胚胎干细胞向血细胞分化的过程中鉴定到了生血内皮的存在. 斑马鱼和小鼠活体成像(live imaging)实验及遗传学分析证实生血内皮细胞通过内皮-造血转换过程(endothelial-hematopoietic transition, EHT)直接产生 HSCs^[37-41]. 在此过程中, 一部分腹侧动脉内皮细胞的内皮特性逐渐减弱, 并发生形态变化, 由扁平的内皮细胞形态逐渐收缩凸起, 同时内皮细胞之间的紧密连接逐渐松弛, 脱离动脉内皮后进入血液循环, 该过程中没有进行细胞分裂. 在小鼠胚胎中造血干细胞通过 AGM 区内皮-造血转换过程生成后, 在主动脉内部腹侧形成血细胞簇, 从而直接进入血液循环^[38]; 而在斑马鱼中, 造血

干细胞生成后通过动脉静脉之间的间充质进入静脉, 再进入血液循环^[37,39].

3.1 关键转录因子

有一系列基因及信号通路影响 EHT 过程, 其中有 3 个基因被证明直接参与这一过程(图 2). *scl* 基因是血液和血管前体细胞最早的标记基因之一^[42,43]. 在 *scl* 基因敲除小鼠和斑马鱼胚胎中, 初级造血及次级造血缺失. 对斑马鱼的研究工作发现, *Scl* 是生血内皮细胞命运决定不可或缺的因子^[43-45]. 后续研究发现两个 *scl* 转录本: *scl α* 及 *scl β* , 其中 *scl β* 表达于 EHT 过程之前, 随后 *scl α* 表达于新产生的造血干细胞中. 功能缺失实验证明, *scl β* 的缺失导致生血内皮不能经历内皮生血转换过程, 说明 *scl β* 可以调控造血干细胞的发生; 而 *scl α* 在新形成的造血干细胞维持中发挥作用^[44,45].

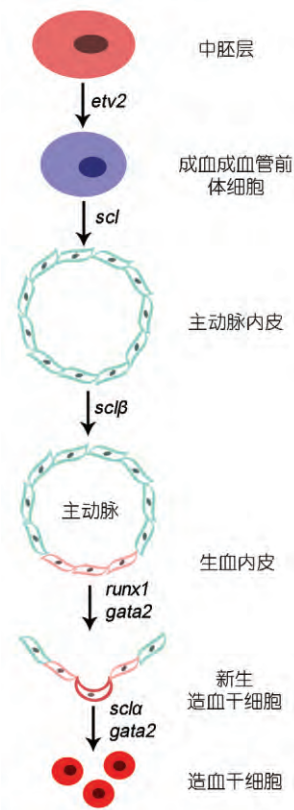


图 2 造血干细胞发生过程的关键调控因子

造血过程起源于腹侧中胚层, 其中部分细胞特化为成血成血管前体细胞, 进而分化产生内皮细胞. 内皮细胞迁移到中线形成主动脉, 其中主动脉腹侧的部分细胞特化为生血内皮, 通过内皮造血转换作用产生造血干细胞

runx1 是造血干细胞的关键标记基因, 对于生血内皮的定向造血发育起到重要作用, 小鼠及斑马鱼中的研究表明, EHT 过程依赖于 *runx1*. 小鼠中 *runx1* 可以促使动脉造血内皮细胞形成动脉内造血干细胞簇, 敲除 *runx1* 后造血细胞簇也会消失^[46]; 而且在内皮细胞或者血细胞分别缺失 *runx1* 证明该基因只在造血干细胞发生过程中发挥作用, 并不影响造血干细胞产生后的维持^[46,47]. 斑马鱼活体成像实验证实了这一结论. Kissa 和 Herbomel^[39]利用 *kdr1-GFP* 转基因鱼观察内皮 EHT 过程, 在 *runx1* 功能缺失的斑马鱼胚胎中, 生血内皮细胞可以发生形态变化, 经历 EHT 过程, 但随后这些细胞发生破碎. 这证明了 *runx1* 可以调控 EHT 过程, 影响造血干细胞的产生.

在造血干细胞形成阶段, *Gata2* 表达于小鼠胚胎的主动脉和脐动脉的内皮细胞以及动脉内血细胞簇中; 并且 *gata2* 缺失的小鼠胚胎在造血干细胞发生之前(E10)死亡, 暗示了 *gata2* 在造血干细胞发生过程中可能发挥作用. *Gata2* 在 AGM 区的表达依赖于顺式作用元件(+9.5), 这个增强子区域的敲除导致 AGM 区域造血关键基因(*runx1* 和 *scl*)表达水平的下降, 并且导致生血内皮无法通过 EHT 过程产生造血干细胞^[48]. 造血干细胞生成之前在内皮细胞中特异性地敲除 *gata2* 导致主动脉内血细胞簇无法产生, 但是主动脉的内皮发育正常, 并且生血内皮也可以特化, 说明 *gata2* 特异性地作用于 EHT 过程^[49,50]. 不同于 *Runx1* 只在 EHT 过程中发挥作用, *GATA2* 不仅影响 EHT 过程也会影响造血干细胞产生后的存亡^[50].

除此之外, 一些转录因子通过调控决定造血干细胞命运的关键基因, 如 *scl*, *runx1* 的表达, 影响次级造血过程. *Gata2* 与 ETS 转录因子 *Fli1* 及 *Elf1* 形成一个转录调控复合体, 调控 *scl* 基因的表达. Pimanda 等人^[51]发现 *Gata2*, *Fli1*, *Scl* 及它们的增强子组成一个复合体, 在 AGM 区相互调控起到影响造血干细胞命运决定的作用. 另外有研究证明, *Gata2*, *Scl* 及 ETS 转录因子 *Fli1*, *Elf1*, *Pu.1* 组成的转录复合体可以被 *runx1* 基因增强子招募从而影响造血干细胞的产生^[52]. 还有一些因子通过直接调控 EHT 过程中的关键事件来调控 HSC 的产生. *HoxA3* 作为 EHT 过程的负向调控因子, 通过下调造血相关基因的表达同时上调内皮相关基因的表达水平来维持动脉的内皮特性^[53]. 最近的研究表明, *gf1* 作为 *Runx1* 的靶基因, 对于 EHT 过程中动脉内皮特性的减弱和内皮细胞形变至

关重要^[54]; 而 *F2r-ZO1* 以及 *ESAM* 这类细胞间紧密连接分子在 EHT 过程中需要被下调才能使新产生的造血干细胞从动脉脱落^[28,55].

3.2 信号通路的调控

造血干细胞的产生受到一系列信号通路的严密调控, 这些信号通路可以直接调控生血内皮或造血干细胞的命运决定及 EHT 发生过程, 也可以通过影响微环境而调控造血干细胞产生(图 3). 最近的研究表明, 来自于体节的信号对于造血干细胞的产生也有重要的调控作用^[56,57].

(1) Notch 信号通路. Notch 信号通路对造血干细胞命运决定及其产生发挥着细胞自主性调控作用. 之前的研究利用 *hsp70:gal4;uas:NICD* 转基因系, 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* 的表达来调控造血干细胞发育, 这也不依赖于动脉发育^[59]. 另一方面, 在造血干细胞产生过程中, Notch 信号通路的持续激活也会产生不利影响. 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^[60]. 在斑马鱼胚胎中, 缺失 *Ncor2* 而导致的 Notch 信号通路的过度激活对造血干细胞的发生过程是不利的^[61]. 但是过量的 Notch 信号如何抑制造血干细胞产生并不是特别清楚, 有可能是由于过量的 Notch 会增强动脉内皮的特性, 进而抑制造血特性的获得, 但这还需要进一步验证.

(2) Wnt 信号通路. 经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对造血干细胞发育、自我更新的调控作用已有很多报道. 过表达 Wnt 信号通路中的抑制因子 *DKK* 和 *Axin* 会导致造血干细胞标记基因的表达下降, 同时, *PGE2* 可以通过调节 β -catenin 的磷酸化作用于 Wnt 信号通路, 这对于造血干细胞的产生非常重要^[62]. Wnt 信号通路还可以与 BMP 信号通路共同激活 *Cdx-Hox* 进而调控造血过程^[63]. 但是在小鼠胚胎造血过程中 Wnt 信号通路对造血干细胞的调控作用是随着时间动态变化的^[64]. β -catenin 仅在 EHT 发生之前的部分内皮细胞中表达并被激活, 在内皮细胞特异性敲除 β -catenin 会影响造血干细胞的产生, 而一

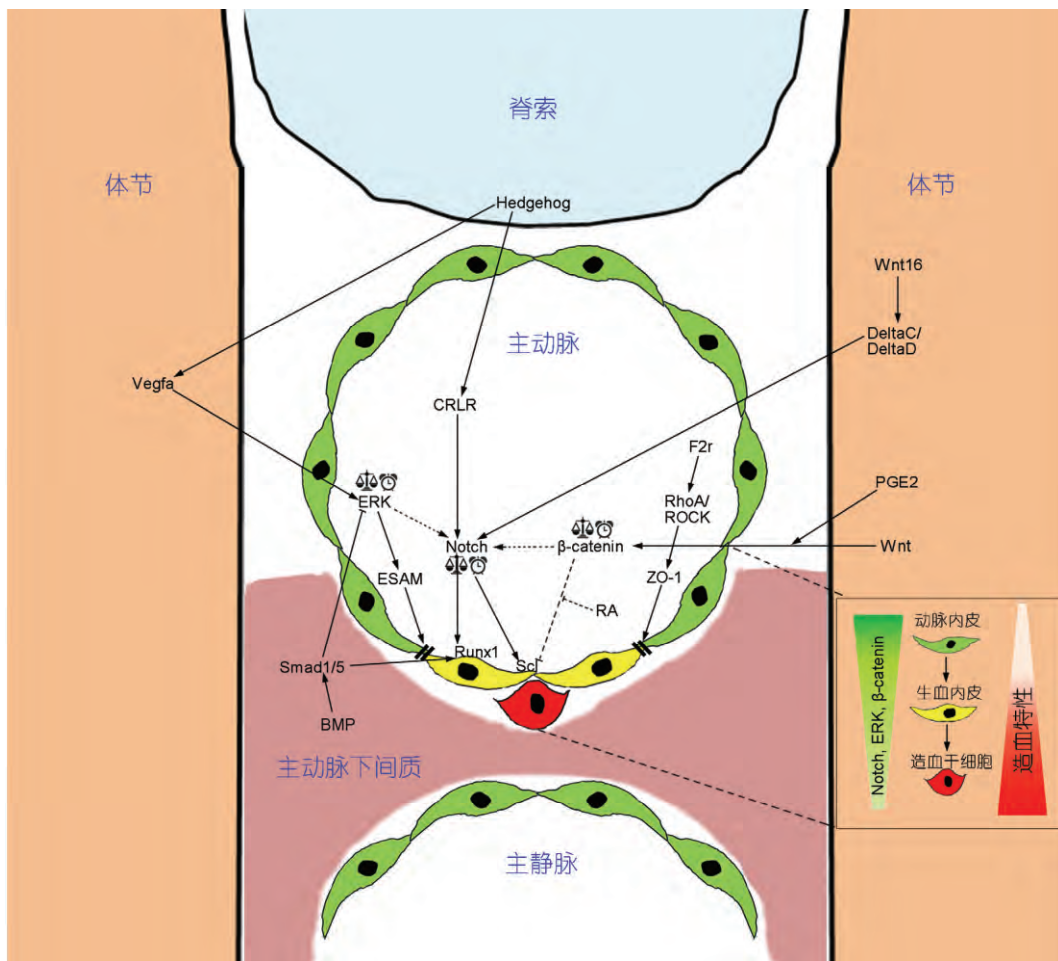


图3 造血干细胞发育过程中的信号通路调控网络

在血管发育过程中, Hedgehog-Vegf-Notch 信号通路调控动脉的分化. 在造血干细胞发育过程中, 生血内皮中的 Notch 信号、体节中的 Wnt/ β -catenin 信号, 以及动脉腹侧间充质细胞中的 BMP-Smad1/5 信号分别在造血干细胞产生的不同阶段进行调控. 其中, Notch, β -catenin 和 ERK 发挥作用是浓度和时间依赖性的, 在内皮造血转换的过程中需要维持在一定的水平才能保证造血干细胞的顺利产生

一旦生血内皮产生并发生 EHT 过程之后, Wnt/ β -catenin 信号便不再被需要^[64]. 但是 β -catenin 是通过影响生血内皮命运决定、EHT 过程, 还是影响造血干细胞产生的微环境来调控造血干细胞产生, 具体分子机制尚不清楚. 近期的研究表明, 视黄酸(RA)信号通路促进造血干细胞产生就是通过下调生血内皮/Pre-HSC 中的 Wnt 信号通路^[65].

非经典 Wnt 信号通路对造血干细胞发育也有重要的调控作用. 在斑马鱼胚胎造血发育过程中, *wnt16* 的敲低会导致造血干细胞不能正常产生, 而这一过程是由体节中的 Notch 配体 DeltaC 和 DeltaD 共同介导的, 过表达 *deltaC* 和 *deltaD* 能够恢复造血干细胞减少的表型^[66]. 但是 Wnt16 调控 Notch 配体的分

子机制尚未研究清楚.

(3) BMP 信号通路. 作为一种重要的形态发生素, BMP 信号, 尤其是 BMP4, 可以诱导腹侧中胚层和造血前体细胞的形成, 抑制 BMP4 信号将导致腹侧中胚层及血液和内皮细胞形成受损. 而且, 早期造血细胞标记分子 *scl* 和 *runx1* 的表达也都依赖于 BMP4^[67]. 近几年, 利用诱导性抑制或过激活 BMP 信号通路的方法, 发现在中胚层分化完成之后, BMP 信号通路对于造血过程依然有重要的调控作用. 位于动脉腹侧间充质的 BMP4 信号可以调控造血干细胞的产生而不影响动脉发育^[68,69]. 在斑马鱼和小鼠胚胎中, 缺失 BMP 下游因子 Smad1/5 或 Smad4 均可以导致造血干细胞产生受到抑制^[28,70,71]. 目前关于

BMP 信号通路对造血干细胞发生的调控机制, 可以从两个方面进行解释. 一种是直接调控, 动脉腹侧间充质中的 BMP 信号可能会直接传递到生血内皮或造血干细胞中进行调控; 体外实验发现 BMP 下游因子 Smad1 可以直接结合 *runx1* 启动子区从而调控其表达^[72], 但是这种猜测在体内并未得到证实. 另一种是间接调控, 动脉腹侧间充质作为造血干细胞重要的微环境, 对造血干细胞的产生必不可少^[60,73]; 而 BMP 信号不仅可以维持微环境的稳定, 还可以在 EHT 过程抑制动脉内皮特性和细胞之间的紧密连接, 从而保障造血干细胞的顺利产生^[34].

4 展望

造血过程是胚胎发育过程中一项重要的生命活动, 可以产生各种成熟血细胞, 受到多个因子调控并且涉及多个造血组织. 造血干细胞是所有血细胞的

原始祖细胞, 其正常发育分化是保证机体正常造血过程的重要条件. 造血干细胞发育期间存在着错综复杂的动态调控网络. 这种调控网络的任何一个环节发生变化, 造血过程会随之发生一系列的变化, 甚至导致严重的发育缺陷或者重大疾病. 而如何从体外获得可移植、有功能的造血干细胞一直是干细胞领域亟待解决的问题.

诱导多能干细胞技术(induced pluripotent stem cells, iPS cells)的兴起为体外获得造血干细胞提供了可能性^[74,75]. 然而目前为止利用这项技术尚不能得到具有长期自我更新及分化能力的造血干细胞^[76,77]. 因此, 全面系统地研究造血过程的分子调控机制并构建精确的信号调控网络成为造血干细胞研究的核心工作, 而这种信号调控网络的建立具有广泛的临床应用价值, 对一些重大血液疾病的治疗和新药开发具有重大意义.

参考文献

- 1 Orkin S H, Zon L I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008, 132: 631–644
- 2 Bertrand J Y, Giroux S, Golub R, et al. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 134–139
- 3 Yokota T, Huang J, Tavian M, et al. Tracing the first waves of lymphopoiesis in mice. *Development*, 2006, 133: 2041–2051
- 4 Bertrand J Y, Kim A D, Violette E P, et al. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Development*, 2007, 134: 4147–4156
- 5 Palis J, Robertson S, Kennedy M, et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 1999, 126: 5073–5084
- 6 Yoder M C, Hiatt K, Mukherjee P. *In vivo* repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6776–6780
- 7 Kumaravelu P, Hook L, Morrison A M, et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, 2002, 129: 4891–4899
- 8 Rhodes K E, Gekas C, Wang Y, et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 252–263
- 9 de Bruijn M F, Speck N A, Peeters M C, et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J*, 2000, 19: 2465–2474
- 10 Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin S H, et al. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 2005, 8: 365–375
- 11 Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell*, 2005, 8: 377–387
- 12 Li Z, Lan Y, He W, et al. Mouse embryonic head as a site for hematopoietic stem cell development. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 663–675
- 13 Galloway J L, Zon L I. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 53: 139–158
- 14 Kondo M, Wagers A J, Manz M G, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 759–806
- 15 de Jong J L, Zon L I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 481–501
- 16 Ellett F, Lieschke G J. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10: 563–570

- 17 Davidson A J, Zon L I. The “definitive” (and “primitive”) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*, 2004, 23: 7233–7246
- 18 Ciau-Uitz A, Liu F, Patient R. Genetic control of hematopoietic development in *Xenopus* and zebrafish. *Int J Dev Biol*, 2010, 54: 1139–1149
- 19 Paik E J, Zon L I. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*, 2010, 54: 1127–1137
- 20 Willett C E, Cortes A, Zuasti A, et al. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev Dyn*, 1999, 214: 323–336
- 21 Chen A T, Zon L I. Zebrafish blood stem cells. *J Cell Biochem*, 2009, 108: 35–42
- 22 Turpen J B, Kelley C M, Mead P E, et al. Bipotential primitive-definitive hematopoietic progenitors in the vertebrate embryo. *Immunity*, 1997, 7: 325–334
- 23 Kataoka H, Hayashi M, Nakagawa R, et al. Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFRalpha+ primitive mesoderm. *Blood*, 2011, 118: 6975–6986
- 24 Salanga M C, Meadows S M, Myers C T, et al. ETS family protein ETV2 is required for initiation of the endothelial lineage but not the hematopoietic lineage in the *Xenopus* embryo. *Dev Dyn*, 2010, 239: 1178–1187
- 25 Lee D, Park C, Lee H, et al. ER71 acts downstream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 497–507
- 26 Hong C C, Peterson Q P, Hong J Y, et al. Artery/vein specification is governed by opposing phosphatidylinositol-3 kinase and MAP kinase/ERK signaling. *Curr Biol*, 2006, 16: 1366–1372
- 27 Wang L, Liu T, Xu L, et al. Fev regulates hematopoietic stem cell development via ERK signaling. *Blood*, 2013, 122: 367–375
- 28 Zhang C, Lv J, He Q, et al. Inhibition of endothelial ERK signalling by Smad1/5 is essential for haematopoietic stem cell emergence. *Nat Commun*, 2014, 5: 3431
- 29 Lawson N D, Vogel A M, Weinstein B M. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*, 2002, 3: 127–136
- 30 Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 543–553
- 31 Lawson N D, Scheer N, Pham V N, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 2001, 128: 3675–3683
- 32 Pola R, Ling L E, Silver M, et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*, 2001, 7: 706–711
- 33 Kim P G, Albacker C E, Lu Y F, et al. Signaling axis involving Hedgehog, Notch, and Scl promotes the embryonic endothelial-to-hematopoietic transition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E141–E150
- 34 Wilkinson R N, Koudijs M J, Patient R K, et al. Hedgehog signaling via a calcitonin receptor-like receptor can induce arterial differentiation independently of VEGF signaling in zebrafish. *Blood*, 2012, 120: 477–488
- 35 Eilken H M, Nishikawa S, Schroeder T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, 2009, 457: 896–900
- 36 Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*, 2009, 457: 892–895
- 37 Bertrand J Y, Chi N C, Santoso B, et al. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*, 2010, 464: 108–111
- 38 Boisset J C, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, et al. *In vivo* imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 2010, 464: 116–120
- 39 Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010, 464: 112–115
- 40 Zhang P, Liu F. *In vivo* imaging of hematopoietic stem cell development in the zebrafish. *Front Med*, 2011, 5: 239–247
- 41 Lam E Y, Hall C J, Crosier P S, et al. Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells. *Blood*, 2010, 116: 909–914
- 42 Dooley K A, Davidson A J, Zon L I. Zebrafish scl functions independently in hematopoietic and endothelial development. *Dev Biol*, 2005, 277: 522–536
- 43 Patterson L J, Gering M, Patient R. Scl is required for dorsal aorta as well as blood formation in zebrafish embryos. *Blood*, 2005, 105: 3502–3511
- 44 Ren X, Gomez G A, Zhang B, et al. Scl isoforms act downstream of etsrp to specify angioblasts and definitive hematopoietic stem cells. *Blood*, 2010, 115: 5338–5346

- 45 Zhen F, Lan Y, Yan B, et al. Hemogenic endothelium specification and hematopoietic stem cell maintenance employ distinct *Scl* isoforms. *Development*, 2013, 140: 3977–3985
- 46 Chen M J, Yokomizo T, Zeigler B M, et al. *Runx1* is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*, 2009, 457: 887–891
- 47 Cai X, Gaudet J J, Mangan J K, et al. *Runx1* loss minimally impacts long-term hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 2011, 6: e28430
- 48 Lim K C, Hosoya T, Brandt W, et al. Conditional *Gata2* inactivation results in HSC loss and lymphatic mispatterning. *J Clin Invest*, 2012, 122: 3705–3717
- 49 Gao X, Johnson K D, Chang Y I, et al. *Gata2* cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med*, 2013, 210: 2833–2842
- 50 de Pater E, Kaimakis P, Vink C S, et al. *Gata2* is required for HSC generation and survival. *J Exp Med*, 2013, 210: 2843–2850
- 51 Pimanda J E, Ottersbach K, Knezevic K, et al. *Gata2*, *Fli1*, and *Scl* form a recursively wired gene-regulatory circuit during early hematopoietic development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 17692–17697
- 52 Nottingham W T, Jarratt A, Burgess M, et al. *Runx1*-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a *Gata/Ets/SCL*-regulated enhancer. *Blood*, 2007, 110: 4188–4197
- 53 Iacovino M, Chong D, Szatmari I, et al. *HoxA3* is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 72–78
- 54 Lancrin C, Mazan M, Stefanska M, et al. *GFI1* and *GFI1B* control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood*, 2012, 120: 314–322
- 55 Yue R, Li H, Liu H, et al. Thrombin receptor regulates hematopoiesis and endothelial-to-hematopoietic transition. *Dev Cell*, 2012, 22: 1092–1100
- 56 Nguyen P D, Hollway G E, Sonntag C, et al. Haematopoietic stem cell induction by somite-derived endothelial cells controlled by *meox1*. *Nature*, 2014, 512: 314–318
- 57 Kobayashi I, Kobayashi-Sun J, Kim A D, et al. *Jam1a*-*Jam2a* interactions regulate haematopoietic stem cell fate through Notch signalling. *Nature*, 2014, 512: 319–323
- 58 Burns C E, Traver D, Mayhall E, et al. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-*Runx* pathway. *Genes Dev*, 2005, 19: 2331–2342
- 59 Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, et al. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand *Jagged1*. *EMBO J*, 2008, 27: 1886–1895
- 60 Richard C, Drevon C, Canto P Y, et al. Endothelio-mesenchymal interaction controls *runx1* expression and modulates the notch pathway to initiate aortic hematopoiesis. *Dev Cell*, 2013, 24: 600–611
- 61 Wei Y, Ma D, Gao Y, et al. *Ncor2* is required for hematopoietic stem cell emergence by inhibiting *Fos* signaling in zebrafish. *Blood*, 2014, 124: 1578–1585
- 62 Goessling W, North T E, Loewer S, et al. Genetic interaction of *PGE2* and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell*, 2009, 136: 1136–1147
- 63 Lengerke C, Schmitt S, Bowman T V, et al. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the *Cdx-Hox* pathway. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 72–82
- 64 Ruiz-Herguido C, Guiu J, D'Altri T, et al. Hematopoietic stem cell development requires transient Wnt/ β -catenin activity. *J Exp Med*, 2012, 209: 1457–1468
- 65 Chanda B, Ditadi A, Iscove N N, et al. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development. *Cell*, 2013, 155: 215–227
- 66 Clements W K, Kim A D, Ong K G, et al. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature*, 2011, 474: 220–224
- 67 Sadlon T J, Lewis I D, D'Andrea R J. BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells*, 2004, 22: 457–474
- 68 Wilkinson R N, Pouget C, Gering M, et al. Hedgehog and Bmp polarize hematopoietic stem cell emergence in the zebrafish dorsal aorta. *Dev Cell*, 2009, 16: 909–916
- 69 Durand C, Robin C, Bollerot K, et al. Embryonic stromal clones reveal developmental regulators of definitive hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 20838–20843
- 70 McReynolds L J, Gupta S, Figueroa M E, et al. *Smad1* and *Smad5* differentially regulate embryonic hematopoiesis. *Blood*, 2007, 110: 3881–3890

- 71 Lan Y, He W, Li Z, et al. Endothelial Smad4 restrains the transition to hematopoietic progenitors via suppression of ERK activation. *Blood*, 2014, 123: 2161–2171
- 72 Pimanda J E, Donaldson I J, de Bruijn M F, et al. The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 840–845
- 73 Fitch S R, Kimber G M, Wilson N K, et al. Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 554–566
- 74 Irion S, Nostro M C, Kattman S J, et al. Directed differentiation of pluripotent stem cells: from developmental biology to therapeutic applications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73: 101–110
- 75 Murry C E, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008, 132: 661–680
- 76 Kaufman D S. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood*, 2009, 114: 3513–3523
- 77 Peters A, BurrIDGE P W, Pryzhkova M V, et al. Challenges and strategies for generating therapeutic patient-specific hemangioblasts and hematopoietic stem cells from human pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol*, 2010, 54: 965–990

Molecular Regulation of Hematopoietic Stem Cell Development

WANG Lu, ZHANG ChunXia & LIU Feng

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

Hematopoietic stem cells (HSCs) are capable of self-renewal and differentiation into all lineages of blood including erythroid, myeloid and lymphoid lineages. In vertebrates, the earliest HSCs are derived from a subset of endothelial cells in the ventral wall of dorsal aorta, via an endothelial-to-hematopoietic transition process during embryogenesis. The emergence and maintenance of HSCs is tightly orchestrated by a complex of transcription factors and signaling pathways. Dysregulation of this process will lead to developmental hematopoiesis defects or severe diseases such as leukemia and anemia. This review summarizes recent advances on the roles of key regulatory factors during HSC development in vertebrates (including zebrafish and mouse models). We hope that this review not only can help better understand molecular mechanisms of HSC biology, but also can provide useful insights into regenerative medicine.

hematopoietic stem cell, hemogenic endothelium, endothelial-to-hematopoietic transition, transcription factor, signaling pathway

doi: 10.1360/N052015-00251