·综述·

造血干细胞异质性

陈晨　郝莎　程涛

Heterogeneity of hematopoietic stem cell　*Chen Chen, Hao Sha, Cheng Tao*

Corresponding author: Cheng Tao, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin　300020, China. Email: chengtao@ihcams.ac.cn

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞。越来越多的证据表明,从细胞增殖、分化、自我更新及寿命等多个角度来看,HSC是一个具有异质性特征的细胞群体[1-3]。HSC异质性的存在增加了我们了解HSC功能及其在疾病中作用的难度。因此,本文我们综述HSC异质性的特征、检测方法与技术、与疾病发生的关系和在治疗中的应用,以期为全面深入认识HSC生物学特性及未来的转化应用奠定理论基础。

一、HSC异质性

1. HSC表型异质性:HSC表型异质性主要表现在其纯化方案的局限性与非特异性。自20世纪50年代FORD等[4]发现移植的供体骨髓在致死剂量照射的受体上具有重要的造血重建作用起,骨髓HSC的活性和功能开始受到广泛关注。20世纪80年代,Spangrude等[5]根据细胞表面标志表达,利用荧光激活细胞分选(fluorescent-activated cell sorting, FACS)技术,首次从小鼠骨髓中富集得到HSC(Thy-1^{lo}Lin^{-}Sca-1^{+})。此后,其他实验室也开始用不同的表面标志组合对HSC的纯化方法进行改良和优化。Okada等[6]于1992年提出经典的c-Kit^{+}Sca-1^{+}Lin^{-}(KSL)富集HSC的方案,KSL细胞约占全骨髓有核细胞的0.1%。至此,HSC已可被相对富集。但通过移植实验发现,在该群体中具有自我更新能力的长周期HSC(LT-HSC)仅占20%,仍是一个非常异质性的群体,其中包括多能祖细胞(multipotent progenitor, MPP)、短周期HSC(ST-HSC)和LT-HSC。因此,研究人员不断增添一些附加标志以排除分化的祖细胞,降低HSC异质性。Morrison和Weissman[7]于1994年在KSL的基础上附加Thy1.1阴性表达,该标志在B6背景小鼠品系骨髓HSC上多不表达,即用KSL Thy1.1^{-}(KTSL)组合纯化小鼠HSC。接着,Krause等[8]提出附加CD34^{-}表达纯化小鼠HSC,即KSL CD34^{-};2001年Christensen和Weissman[9]又在之前的组合上附加了Flk-2^{-}表达,即KSL Thy1.1^{lo}Flk-2^{-}。CD34和Flk-2标志通常与KSL联用,分选LT-HSC(CD34^{-}Flk-2^{-} KSL)、ST-HSC(CD34^{+}Flk-2^{-} KSL)和MPP(CD34^{+}Flk-2^{+}KSL)。

ST-HSC和LT-HSC是对HSC分型最经典的认识[10]。ST-HSC和LT-HSC不仅可以从表型区分,也可从维持重建受体的时间分型。传统对ST-HSC的定义是维持重建受体时间在6周左右的HSC,LT-HSC为超过16周的HSC[11]。而Ema等[12]建议根据粒细胞重建状态对HSC重新分类,ST-HSC定义为可以维持重建6个月的HSC,LT-HSC为超过12个月的HSC。

另外,新的HSC表面标志也被不断发现,如Tie-2[13]和Endoglin(CD105)[14]。此外,Morrison及其同事用SLAM家族,即CD150^{+}CD244^{-}CD48^{-}可以将HSC富集率提高到接近50%[15]。值得注意的是,不同品系和发育不同阶段小鼠表面标志的表达也有变化。人类HSC的表面标志与小鼠的也不太相同,例如,CD34表达于人的HSC上而不表达于小鼠的HSC上。除了表面标志,还有其他纯化方案。1996年,Goodell等[16]在小鼠骨髓中发现侧群细胞(side population, SP),即Hoechst 33342弱染的细胞,可用Hoechst 33342弱染或拒染来富集活跃的LT-HSC,继而联用表面标志抗体染色来提高纯化率。

2. HCS功能异质性:HSC在照射后受体中对免疫系统受损受体的影响,如造血重建速度、产生成熟细胞所用时间的长短及受体中产生的可自我更新的细胞数量存在差异[17-19]。通常,根据HSC移植后重建受体造血的动力学特征可将HSC进行不同分类。

Müller-Sieburg等[19]根据重建细胞淋系和髓系细胞比例(L/M)将HSC分成偏髓系(My-bi)、平衡(Bala)和偏淋系(Ly-bi)3类。其中,L/M≤3属于My-bi HSC,L/M≥10属于Ly-bi HSC,L/M为4~9即被归为Bala HSC。在该分类模式下,评估移植后20周以上造血重建特征,My-bi HSC在缓慢重建淋系后可更显著重建髓系,具有更强大的自我更新能力;Ly-bi HSC重建髓系的能力较低,仅前几个月可检测到髓系重建,而淋系重建可持续相对长的时间。Bala HSC在重建髓系后迅速重建淋系,且强度相近,髓系和淋系细胞比例与正常小鼠外周血中的比例相似。Bala HSC被很多研究人员看作是典型的HSC,因此My-bi和Ly-bi HSC被长期忽视。

Eaves及其同事根据髓系嵌合百分比相对于淋系嵌合百分比(M/L比率)将HSC分为α、β、γ、δ。α为淋系缺陷(lymphoid-deficient)HSC,β为平衡(balanced)HSC,γ和δ是髓

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.10.018

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2011CB964800);国家自然科学基金创新群体(81421002);国家自然科学基金(81300374)

作者单位:300020　天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院;实验血液学国家重点实验室

通信作者:程涛,Email:chengtao@ihcams.ac.cn

系缺陷(myeloid-deficient) HSC[20]。在该分类模式下,评估移植后16周以上重建情况。M/L分类并不是简单的L/M的倒数,因为竞争细胞的贡献也被计入M/L比率。M/L≥2为α细胞,M/L≤0.25为γ或δ细胞。其中,当髓系嵌合超过1%时,划分为γ细胞,小于1%时,划分为δ细胞,M/L > 0.25且 < 2时为β细胞。

基于相似依据的分类,如My-bi/Bala/Ly-bi和α/β/γ/δ分类法,使拥有不同名称的HSC之间存在一定的交叉重叠和关联。例如Ema等[12]发现ST-HSC与γ细胞及Ly-bi HSC具有高度的重叠性,揭示了各种分类法是相互补充的。另外,Ema等[12]对目前公认的HSC检测的金标准,即具有长期(≥16周)多系重建能力的才为HSC,也提出了质疑。他们发现一些潜在的LT-HSC的特殊形式,并不能在移植后4个月表现出多系重建能力,而这些HSC的确可在较晚甚至是二次移植后才展现出显著的多系重建能力。因此完善HSC的鉴定标准,以更全面理解HSC是必需的。Yamamoto等[21]还发现了直接来源于LT-HSC的具有巨核系和红系分化能力的MyRP(myeloid repopulative progenitors),对传统造血模型也进行了修订完善。

3. HSC定位的异质性:近年来,随着对骨髓龛研究的发展,位于骨髓龛不同位置的HSC也被发现具有不同的特征,这反映了由骨髓内定位所决定的HSC异质性。大多原始的HSC处于静息状态,Zhang等[22]通过DNA标记实验发现Brdu和H2B-GFP标记的标记滞留细胞(label-retaining cells, LRC)主要位于骨内膜,后来证明LRC是一群原始的HSC[23]。静息的HSC有更好的长期重建能力,却不能大量补充血细胞。然而,另有研究显示大多小鼠HSC处在更加活跃的周期[23]。Li及Clevers[24]提出的"分区"模型可以解释这两种相异的观点,即静息和活跃的干细胞同时存在于相同的组织中。活跃的干细胞是待发的群体,处于更加活跃的细胞周期,是产生血细胞的主力军;而静息的干细胞是储备的群体,在损伤应激或病理条件下可被迅速激活以补充活跃的干细胞。不同区域不同的信号调控维持了HSC不同的状态。稳态条件下,静息HSC位于骨内膜区域,骨衬细胞提供主要的抑制信号,如BMP、OPN和sFRP1。反之,位于中央骨髓区域的HSC,受内皮细胞、巨核细胞和CAR细胞分泌的Wnt、FGF和SDF1刺激。正常情况下,静息HSC会代替损伤的活跃HSC,防止活跃HSC池的枯竭及清除DNA复制过程中累积的潜在致癌突变;相反,在一些极其特殊的情况下活跃HSC也可能代替丢失或损伤的静息HSC。Venkatraman等[25]发现当H19-Igf2位点的基因组印记提供的表观遗传控制被除去时,可以导致大量的静息HSC被激活。彼此互惠的HSC群体为保持生理条件下的自我更新与损伤状态下的自我修复提供了强大的运转机制。

一般,LT-HSC维持在静息或缓慢的细胞周期,而ST-HSC则处于活跃的细胞周期[26]。换言之,从成骨龛和血管龛结构来看,成骨龛是维持HSC处于静息状态的,即LT-HSC主要位于骨内膜附近;而血管龛营养丰富,氧及生长因子含量较高,促进HSC的增殖与进一步分化。另外,活跃HSC在其分裂方式上又有不同,对称/不对称分裂控制着HSC自我更新与分化间的平衡。同一龛中不同的生理环境可以引起干细胞对称与不对称分裂间的转换[27]。

二、HSC异质性研究的检测方法与技术

1. 流式细胞术:流式细胞术分选细胞是研究HSC的基础,利用KSL分离纯化HSC是最经典的方法,也是大多分选HSC方案的基础。在此基础上,附加相对特异的表面标志来提高HSC的纯度,这些表面标志有在HSC表面高度特异表达的,如CD150、Tie-2、Endoglin等。也有其他分化细胞表面特异表达的,用以排除该类细胞对HSC群体的污染,如CD41、Thy1.1、Flk-2等。

2. 功能实验:HSC传统研究方法主要是利用建立在体内、体外的造血重建模型,即根据HSC功能进行鉴定分析。已有的实验方法可分为体外培养与体内移植两种。

体外培养即集落分析法,或称为骨髓造血细胞的体外克隆性生长实验[28]。该方法利用HSC在特定的条件下可向某一系细胞分化的特性,从而在半固体培养基上形成一个个的克隆,即集落,1个集落代表一个造血干/祖细胞。传统方法是在半固体培养基上培养10~14 d,随后在显微镜下计数集落,50个细胞以上的细胞团为1个集落。该方法可获知样本中HSC的百分数,通过集落分析与流式细胞术进行比较,可以更加准确地获知HSC的含量。另外,通过计数CFU-E、BFU-E[29]、CFU-GM、CFU-GEMM等各系分化集落,或通过血细胞涂片结合人工计数各系细胞比例,可以分析HSC分化能力与分化水平。然而,用相同标准分离得到的HSC,在相同培养条件下培养相同时间,可分化得到由不同数目、不同种类及不同比例细胞组成的集落,这表明即使单个表型相同的HSC仍然存在着内在差异。

体内移植实验是将HSC移植给经致死剂量照射的受鼠,在移植后不同时间点检测供体细胞的重建和分化能力,是用于分析HSC自我更新和多向分化能力的常用实验[4]。该实验方法主要是观察研究HSC在受鼠体内"归巢→自我更新→分化产生各系祖细胞→分化产生血液系统"的整个造血过程。其中,单细胞移植重建受体造血是鉴定HSC功能的金标准,可在单个HSC水平对其特性和功能进行评价。HSC单细胞移植是将单个HSC加之一定数量的保护细胞一同移植给致死剂量照射的受鼠,在移植后不同时间点检测受鼠外周血中供体来源细胞的重建情况。然而HSC单细胞移植耗时较长,且不能收集足够的数据以表达整个异质性细胞群体的情况,使我们在许多重要的生物及临床中不能进行研究[30-32]。单细胞的分离仍是基于现有HSC表面标志的纯化,由于标志物的局限,不能保证得到的单个细胞之间都是完全相同的,因此目前的单细胞移植也只是一种相对的同质,各个细胞之间的异质性仍有待区分,这些不同可能是解释单细胞实验中重建效率及分化谱系方面出现波动的关键。

3. 基因表达及测序技术:基因组和转录组测序成为了细胞生物学重要的检测手段。基因组测序可发现在特定基因

的序列信息，分析是否存在某些特定的突变。通过对单个HSC的基因表达情况进行测序，可获知该HSC的转录组信息。单细胞RT-PCR技术是在原有的PCR技术上发展起来的高通量检测技术。该技术通过设计高度特异的探针，利用单细胞PCR仪在单细胞水平高通量检测多种基因表达。技术原理为分选单个细胞于微量裂解液中，首先对样品RNA进行逆转录，再利用Taqman探针对样品cDNA中的靶基因进行预扩增，之后利用单细胞PCR在动态微阵列芯片上检测不同基因的表达水平[33]。

4. 基于遗传标志的追踪系统：体外分离单细胞已经是比较成熟的技术，然而，如果能够在HSC群体中区分出单个HSC，并且使这群HSC在体内进行增殖分化等生理行为，就可以对单个HSC进行更深层次的研究。最初描绘单个HSC发育过程的实验工具是从病毒得到的启发，病毒可随机插入宿主基因组，每个独特的病毒插入位点标记了一个HSC，这个HSC的子代，即由它分化得到的祖细胞及更加成熟的血细胞都拥有这个独特的标志。逆转录病毒作为转运基因载体具有许多特有优势，包括高效、稳定整合、低拷贝数和确定的前病毒结构，利用它向HSC引入新的基因已有很多研究。如Jordan及Lemischka[3]用逆转录病毒标记法描述了一个在产生成熟淋系细胞和髓系细胞数量方面不同的HSC亚群。Guenechea等[34]利用逆转录病毒转导人脐血干细胞，移植给非糖尿病-重症联合免疫缺陷（NOD-SCID）小鼠，在克隆追踪分析中发现大多数克隆在数周内对人移植物有贡献，而另一些克隆出现较晚而持续存在。除了逆转录病毒载体，还有其他病毒载体可供使用。Mazurier等[35]用慢病毒载体以最低培养干扰条件转导HSC而后进行连续骨髓移植，证明了ST-再植细胞（SCID repopulating cells，SRC）和LT-SRC的存在不是实验中的人为条件得到的，而是其HSC池状态的反应。

在HSC的研究中，单纯的病毒转导也渐渐不能满足研究的需要，科学家尝试用鉴定植物的Barcoding技术来对单个HSC进行标记。Barcoding是在植物鉴定学中广泛应用的一种分析技术[36]，现被用于HSC中的克隆追踪。利用病毒向单个HSC中随机引入特定唯一的序列，其子代便可通过这个标记被区分出来。Lu等[37]应用此技术，研究移植有大量高纯度HSC小鼠的造血输出情况。相比于单细胞移植技术，barcoding技术中单个HSC受到其他HSC的竞争性影响更大，然而他们发现三系输出模式较单细胞移植并无差别，这证明单个HSC的异质分化行为并不显著受到移植时所输注的HSC数量的影响。同时，这也证明了该技术的可靠性，而且还节约实验动物。然而，该技术也有其缺点，比如，HSC在病毒转导培养过程中性质有所改变，病毒序列插入致突变等[38]。另外，该技术十分依赖测序得到的统计假设，数据庞大，处理复杂，需要花费大量精力来完成。

最近有研究报道用转座子作为条形码标记血细胞。转座子是一种当暴露于转座酶（transposase）下时，可以跳跃至DNA中随机位点的遗传密码。Camargo等[39]利用了一种特殊的转基因小鼠，它们的所有血细胞中都具有一个来源自鱼类的转座子。当将小鼠暴露于转座酶下时，每个血细胞转座子均改变了位置。转座子移至的DNA位点充当了细胞的条形码，当在几个月后取得小鼠的血液时，可将具有相同转座子定位的细胞与它的祖先细胞联系起来。这种标记方法比起体外病毒标记再回输体内降低了污染的风险，因此采用该技术追踪HSC也是一个潜在的方法。

三、HSC异质性与疾病的发生和治疗

HSC池的异质性在一定程度上决定了疾病的异质性。Muller-Sieburg等[40]认为在衰老过程中或疾病HSC池的变化，是克隆成分的变化，而不是单个HSC的改变。例如，骨髓增殖性肿瘤（MPN）患者JAK2 V617突变已被发现，然而，一个单独的JAK2突变会引起3种不同的MPN表型：红细胞增多症（PV）、原发性血小板增多症（PT）和原发性骨髓纤维化（PMF）。James等[41]研究发现，PV和PMF患者中JAK2 V617F和JAK2野生型的SRC比例不同，这种HSC池成分的差异导致了疾病的异质性，这意味着JAK2抑制剂需要靶向不同组分的HSC池。另外，从急性髓系白血病（AML）患者中纯化出的造血干/祖细胞、成熟细胞有DNMT3高频突变（$DNMT3A^{mut}$）的现象，$DNMT3A^{mut}$的HSC与非突变HSC相比，在异种移植中具有更好的多系重建能力，可以此为依据鉴别其为前白血病HSC，在疾病恶化引起更大治疗抵抗前对前白血病克隆进行检测和治疗有重要意义[42]。

HSC是第一个成功用于治疗和治愈患者的成体干细胞。然而，HSC池包含不同类型具有预先确定的分化和自我更新潜能的HSC，这种异质性使HSC在再生医学中的应用依旧阻碍重重。识别不同亚型的HSC意味着选择性地扩增一种亚型以适用于不同的临床需要。骨髓细胞减少症可以通过输注My-bi HSC进行选择性治疗。由于My-bi HSC趋向于缓慢地产生成熟细胞[43]，这些HSC可以通过短期暴露在低浓度TGF-β而被激活[44]。输注My-bi HSC会持续产生髓系细胞，而淋巴细胞水平较低，可降低移植物抗宿主病的发生。相反，治疗淋巴细胞减少症可以考虑移植Ly-bi HSC。 Ly-bi HSC迅速供给淋巴细胞和一些髓系细胞。大多数Ly-bi HSC寿命较短，会限制长期不良反应。另外，Ly-bi HSC可用于改善衰老相关的免疫缺陷。衰老HSC池中Ly-bi HSC丢失，随之而来的是衰减的免疫功能，补充年轻的Ly-bi HSC可以增强老年人的免疫功能。目前，HSC移植是否是治疗衰老相关免疫缺陷疾病的可行方式仍有待商榷。然而，更好地了解不同亚型HSC的生物学特征，可能会实现在原位延缓或阻滞年轻HSC的丢失。

四、小结

总之，HSC异质性反映了细胞内在状态与环境可变因素二者综合作用的结果。单细胞水平分析技术的丰富对机制的深入研究具有举足轻重的作用。目前对人类HSC的研究远比小鼠或其他动物模型少得多，这些适用于小鼠HSC的结论是否可类推于人HSC有待考证。因此，我们期待HSC异质性得到更深入研究，从而在疾病治疗、再生医学等领域

起到重要作用。

参考文献

[1] Enver T, Heyworth CM, Dexter TM. Do stem cells play dice?[J]. Blood, 1998, 92(2): 348-351; discussion 352.

[2] Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation[J]. Blood, 1998, 92(2): 345-347; discussion 352.

[3] Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse[J]. Genes Dev, 1990, 4(2): 220-232.

[4] FORD CE, HAMERTON JL, BARNES DW, et al. Cytological identification of radiation-chimaeras[J]. Nature, 1956, 177(4506): 452-454.

[5] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells[J]. Science, 1988, 241(4861): 58-62.

[6] Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, et al. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells[J]. Blood, 1992, 80(12): 3044-3050.

[7] Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype[J]. Immunity, 1994, 1(8): 661-673.

[8] Krause DS, Ito T, Fackler MJ, et al. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells[J]. Blood, 1994, 84(3): 691-701.

[9] Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14541-14546.

[10] Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors [J]. Development, 1997, 124(10): 1929-1939.

[11] Osawa M, Hanada K, Hamada H, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell[J]. Science, 1996, 273(5272): 242-245.

[12] Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells[J]. Exp Hematol, 2014, 42(2): 74-82.e2.

[13] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche[J]. Cell, 2004, 118(2): 149-161.

[14] Chen CZ, Li M, de Graaf D, et al. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(24): 15468-15473.

[15] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells[J]. Cell, 2005, 121(7): 1109-1121.

[16] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo[J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806.

[17] Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, et al. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets[J]. Blood, 2006, 107(6): 2311-2316.

[18] Uchida N, Dykstra B, Lyons KJ, et al. Different in vivo repopulating activities of purified hematopoietic stem cells before and after being stimulated to divide in vitro with the same kinetics [J]. Exp Hematol, 2003, 31(12): 1338-1347.

[19] Müller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, et al. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation[J]. Blood, 2002, 100(4): 1302-1309.

[20] Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 690-697.

[21] Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells[J]. Cell, 2013, 154(5): 1112-1126.

[22] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size[J]. Nature, 2003, 425(6960): 836-841.

[23] Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair[J]. Cell, 2008, 135(6): 1118-1129.

[24] Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals[J]. Science, 2010, 327(5965): 542-545.

[25] Venkatraman A, He XC, Thorvaldsen JL, et al. Maternal imprinting at the H19-Igf2 locus maintains adult haematopoietic stem cell quiescence[J]. Nature, 2013, 500(7462): 345-349.

[26] Passegué E, Wagers AJ, Giuriato S, et al. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates[J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1599-1611.

[27] Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche[J]. Cell, 2004, 116(6): 769-778.

[28] Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro[J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1966, 44(3): 287-299.

[29] Suda T, Suda J, Ogawa M. Single-cell origin of mouse hemopoietic colonies expressing multiple lineages in variable combinations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80(21): 6689-6693.

[30] Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. Cell, 2000, 100(1): 157-168.

[31] Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves[J]. Cell, 2007, 128(3): 445-458.

[32] Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells[J]. EMBO Rep, 2011, 12(2): 113-122.

[33] Sanchez-Freire V, Ebert AD, Kalisky T, et al. Microfluidic single-cell real-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns[J]. Nat Protoc, 2012, 7(5): 829-838.

[34] Guenechea G, Gan OI, Dorrell C, et al. Distinct classes of

human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential [J]. Nat Immunol, 2001, 2(1): 75-82.

[35] Mazurier F, Gan OI, McKenzie JL, et al. Lentivector-mediated clonal tracking reveals intrinsic heterogeneity in the human hematopoietic stem cell compartment and culture-induced stem cell impairment[J]. Blood, 2004, 103(2): 545-552.

[36] Ajmal Ali M, Gyulai G, Hidvégi N, et al. The changing epitome of species identification - DNA barcoding[J]. Saudi J Biol Sci, 2014, 21(3): 204-231.

[37] Lu R, Neff NF, Quake SR, et al. Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(10): 928-933.

[38] Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? [J]. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1456-1465.

[39] Sun J, Ramos A, Chapman B, et al. Clonal dynamics of native haematopoiesis[J]. Nature, 2014, 514(7522): 322-327.

[40] Muller-Sieburg CE, Sieburg HB. Clonal diversity of the stem cell compartment[J]. Curr Opin Hematol, 2006, 13(4): 243-248.

[41] James C, Mazurier F, Dupont S, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity[J]. Blood, 2008, 112(6): 2429-2438.

[42] Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia[J]. Nature, 2014, 506(7488): 328-333.

[43] Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L, et al. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness[J]. Blood, 2004, 103(11): 4111-4118.

[44] Challen GA, Boles NC, Chambers SM, et al. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1 [J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(3): 265-278.

（收稿日期：2015-04-14）

（本文编辑：刘爽）

·读者·作者·编者·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学符号：按GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定，统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计：应告知研究设计的名称和主要方法。例如：调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究；实验设计应告知具体的设计类型，如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等；临床试验设计应告知属于第几期临床试验，采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡4个基本原则概要说明，尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述：用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表达近似服从正态分布的定量资料，用中位数（四分位数间距）[M（Q_R）]表达呈偏态分布的定量资料。用统计表时，要合理安排纵横标目，并将数据的含义表达清楚。用统计图时，所用统计图的类型应与资料性质相匹配，并使数轴上刻度值的标法符合数学原则。用相对数时，分母不宜小于20，要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择：对于定量资料，应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的，选用合适的统计学分析方法，不应盲目套用t检验和单因素方差分析。对于定性资料，应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的，选用合适的统计学分析方法，不应盲目套用χ^2检验。对于回归分析，应结合专业知识和散布图，选用合适的回归类型，不应盲目套用简单直线回归分析；对具有重复实验数据检验回归分析资料，不应简单化处理；对于多因素、多指标资料，要在一元分析的基础上，尽可能运用多元统计分析方法，以便对各因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达：当$P<0.05$（或$P<0.01$）时，应表述为对比组之间的差异有统计学意义，而不应表述为对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异；应写明所用统计学方法的具体名称(如：成组设计资料的t检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的q检验等)，统计量的具体值（如$t=3.45$，$\chi^2=4.68$，$F=6.79$等）；在用不等式表示P值的情况下，一般情况下选用$P>0.05$、$P<0.05$和$P<0.01$表达方式，无须再细分为$P<0.001$或$P<0.0001$。当涉及总体参数（如总体均数、总体率等）时，在给出显著性检验结果的同时，应再给出95%可信区间。

本刊编辑部