

## 白血病微环境对正常造血的影响

宫跃敏 程涛

**The impact of leukemic microenvironment on normal hematopoiesis** Gong Yuemin, 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

正常造血稳态的维持有赖于造血微环境。造血微环境是由一群组织细胞和细胞外基质构成的,通过细胞间接触和信号分子的作用维持和调控造血干细胞(HSC)的局部组织微环境<sup>[1]</sup>,其功能单元称为niche。按解剖位置,骨髓造血微环境可分为骨内膜微环境和血管微环境,前者主要由成骨细胞、破骨细胞等组成,后者主要由血管内皮细胞、富含CXCL12的网状细胞组成。其他niche细胞包括Nestin<sup>+</sup>间充质干细胞(MSC)、巨噬细胞、无髓鞘Schwann细胞等<sup>[2]</sup>。

目前研究认为,白血病起源于白血病干细胞(LSC),细胞群体内部存在等级分化<sup>[3]</sup>。LSC是指能够自我更新和分化成白血病细胞群体中所有细胞的一类恶性干细胞,被认为是维持白血病细胞群体、复发和耐药的根源<sup>[4-5]</sup>。白血病发展过程中始终存在恶性细胞与正常造血细胞的竞争。白血病细胞直接或通过恶化造血微环境影响正常HSC的数量和功能。

### 一、白血病微环境下造血干祖细胞(HSPC)动力学变化

Hu等<sup>[6]</sup>利用Notch1诱导的小鼠急性T淋巴细胞白血病(T-ALL)模型首次证明正常HSC和造血祖细胞(HPC)对白血病微环境的反应不同。研究发现,正常HSC(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>, LSK细胞)和HPC(Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>, LSK<sup>-</sup>细胞)在白血病宿主体内的增殖均受抑制,但后者在移植早期出现一过性增多。细胞周期检测发现白血病宿主体内HSC更多地进入静止期,HPC则过度增殖而逐渐耗竭,从而解释了白血病状态下正常造血受抑的原因。令人惊讶的是,白血病宿主体内分离出的HSC在二次竞争性移植时反而表现出比正常供体来源的HSC更强的造血重建能力,表明白血病状态下正常造血的抑制是可逆的,正常HSC可能通过某种涉及细胞

周期的机制使其数量和功能得以保存。Miraki-Moud等<sup>[7]</sup>利用急性髓系白血病(AML)异种移植模型再次证明,在人白血病病程的早中期,正常长期造血干细胞(long-term HSC, LT-HSC)不减少,体外长期培养启动细胞和体内移植后重建细胞数量甚至高于对照组;正常HPC数量则显著下降。细胞周期检测发现处于分裂期的正常HSC减少,提示白血病抑制正常造血并非是通过削减正常HSC的数量,而是抑制其分化。在AML患者确诊时的骨髓穿刺和活检标本上也发现了同样的现象。

Tian等<sup>[8]</sup>进一步研究发现,白血病环境下,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)家族成员p21及其上游调控分子Hes1在HSC中表达增加,而在HPC中无明显变化。p21已被证明对于维持HSC的静息状态和自我更新至关重要<sup>[9-10]</sup>,Hes1被证明能抑制HPC的增殖<sup>[11]</sup>。Cheng等<sup>[9]</sup>的研究显示,过表达Hes1可保护HSPC,抵抗白血病环境对其数量和功能的抑制;过表达Hes1的HSPC进入G<sub>0</sub>期的比例增多。以上结果表明,Hes1-p21信号通路介导了HSC和HPC对白血病环境的不同反应。

### 二、白血病对骨内膜造血微环境的影响

Ishikawa等<sup>[12]</sup>在AML异种移植小鼠模型上发现,CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>人类白血病干细胞归巢并定居在骨髓处成骨细胞丰富的骨内膜表面,这些部位原本是正常HSC的微环境<sup>[13]</sup>。但Ishikawa的实验模型经过放射处理,不能排除射线对骨内膜微环境的破坏。Ninomiya等<sup>[14]</sup>利用未照射的AML异种移植模型证实白血病细胞归巢、定居并在骨内膜表面活跃增殖,且与成骨细胞直接接触。Frisch等<sup>[15]</sup>在未照射的AML小鼠模型上研究了白血病对成骨细胞的影响,发现在肿瘤负荷较低、外周血中尚检测不到白血病细胞的情况下,即可出现成骨细胞数量减少,功能受抑,长骨骨量明显减少。此时破骨细胞仅一过性增多,抑制破骨细胞只能部分逆转骨质的丧失,说明白血病致骨质减少的原因并不仅是破骨增多,而是成骨与破骨的失衡。鉴于成骨细胞对HSC扩增和移植后存活的促进作用<sup>[16]</sup>,这些研究结果提示白血病细胞可能通过影响骨内膜微环境来抑制正常造血。

在此基础上,Schepers等<sup>[17]</sup>利用BCR-ABL条件性诱导小鼠慢性髓性白血病(CML)模型证明CML将骨内膜niche改造成了有利于白血病细胞生长的肿瘤niche。研究发现,CML的发生发展引起成骨细胞显著增生、小梁骨形成增加和骨髓纤维化,而这些变化可随着BCR-ABL基因表达的关闭而被逆转。增生的成骨细胞是由MSC在肿瘤细胞的刺激下增殖分化而来的,其支持正常造血的功能严重受损,表现

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.01.021

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB964800);国家自然科学基金重大项目(81090411);国家自然科学基金创新群体(81421002)

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

为与发病小鼠来源的成骨细胞共培养的HSC移植后定居能力明显下降,而LSC不受影响。

多种细胞因子参与了白血病细胞对正常造血微环境的改造。Frisch等<sup>[15]</sup>的体外实验表明,白血病细胞分泌的细胞因子足以造成骨质的丧失,其中趋化因子CCL3(又名MIP-1 $\alpha$ )可能起了重要作用。Baba等<sup>[18]</sup>进一步证实,白血病细胞表达的CCL3与正常造血细胞表面的CCR1和CCR5相互作用,使白血病细胞获得生长优势,并促进正常HSPC从骨髓动员到外周血中,可能是白血病导致正常造血受抑的机制之一。Schepers等<sup>[17]</sup>的研究也显示,白血病细胞刺激MSC增殖除需要细胞间直接接触以外,还有TPO和CCL3的参与。另外,Zhang等<sup>[19]</sup>在BCR-ABL诱导的小鼠CML模型上发现,白血病细胞分泌的MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等因子抑制正常LT-HSC的增殖而有利于LSC的增殖。白血病细胞分泌的G-CSF增多,使骨髓基质细胞表达CXCL12减少,导致正常LT-HSC移植后归巢和定居到骨髓的数量减少。而且CML患者骨髓活检显示,伊马替尼治疗后骨髓CXCL12表达有所增加但仍明显低于正常水平,提示传统治疗手段不能完全逆转白血病引起的骨髓造血微环境的改变,可能是治疗后复发和正常造血恢复不佳的原因。

以上研究在揭示了白血病对骨内微环境影响的同时,也显示出不同疾病类型的显著差异。例如,AML与CML骨髓中均发现CCL3表达增加,前者的效应是骨质丧失,而后的效应是骨形成增加。这说明白血病细胞对造血微环境的影响与其类型和生物学特性有关,或者还有其他在两类疾病中表达明显差异的因子参与其中,有待进一步探究。

### 三、白血病对血管造血微环境的影响

白血病对血管微环境的重塑也涉及肿瘤niche的形成。Sipkins等<sup>[20]</sup>利用多光子共聚焦显微镜体内实时成像技术,在Nalm-6急性B淋巴细胞白血病(Nalm-6 pre-B-ALL)SCID小鼠异种移植模型中研究了白血病细胞与骨髓微环境的动态相互作用,发现白血病细胞主要迁移至表达E-选择素和SDF-1的血管区域,而该区域在正常情况下是CD34<sup>+</sup>HPC归巢的部位,提示白血病细胞利用了正常的血管niches。Colmone等<sup>[21]</sup>进一步研究发现,这些被白血病细胞定居的血管niches相比正常对照,SDF-1水平显著下降,致使正常HPC归巢到非典型区域。但HPC并不在这些非典型区域或无瘤区定居,而是继续迁移至SDF-1阴性的肿瘤区,提示肿瘤细胞创造了一个能够募集HPC的肿瘤niche。然而,新生成的肿瘤niche不能维持HPC的数量,还降低了HPC的动员能力。肿瘤niche对正常HPC的影响与该niche中白血病细胞分泌的干细胞因子(SCF)有关,其效应可被SCF中和抗体阻断。

白血病骨髓微环境存在明显的低氧状态<sup>[22]</sup>,促使低氧诱导因子(HIF-1)表达增加,继而上调VEGF、血管生成素(angiotensin)等促血管生成因子,促进肿瘤血管形成<sup>[23-24]</sup>。除了细胞间直接接触和传统的VEGF信号通路外,Ohyashiki课题组<sup>[25-26]</sup>发现低氧促进了白血病细胞释放包涵miR-210等

多种miRNA的外体(exosome),将这些miRNA转运至内皮细胞,通过抑制抗血管生成因子EFNA3的表达,促进内皮细胞形成血管结构。这些发现提示表观遗传因素(非编码RNA)参与了白血病状态下微环境的重塑。低氧对维持HSC的静息状态起重要作用<sup>[27-29]</sup>,可能是白血病环境引起HSC动力学变化的机制之一。

另外,Wang等<sup>[30]</sup>最近研究发现,niche细胞尤其是内皮细胞Notch/RBPL信号通路受阻可使miR-155表达上调,激活NF- $\kappa$ B,使G-CSF、TNF- $\alpha$ 等促炎因子大幅增多,Hes1表达减少,致髓系祖细胞大量增殖,引起类似骨髓增殖性疾病的表型。ALL模型中发现白血病环境下HPC过度增殖<sup>[6]</sup>,以及CML中HSC向脾脏迁移<sup>[19]</sup>可能就与niche细胞信号通路异常所导致的骨髓炎性环境有关。

### 四、白血病对其他微环境成分的影响

Medyouf等<sup>[31]</sup>对骨髓增生异常综合征(MDS)患者研究发现,原本支持正常造血的MSC经恶性微环境改造后,反而支持MDS表型的维持,其重要的黏附分子和受体表达发生了显著改变。Geyh等<sup>[32]</sup>的研究结果显示,MDS患者的MSC生长受抑,衰老细胞比例增加,成骨分化能力受损,原因可能是HOXB1、PITX2、TBX15等与细胞增殖、成骨分化相关的基因甲基化状态和表达水平发生了变化。另外,Kit-ligand、osteopontin、Angpt1、Jagged1等介导MSC与HSPC相互作用的细胞因子在患者MSC表达水平明显区别于健康人,以致其在体外支持HSPC生长的能力减弱。而且,健康人HSPC与患者MSC共培养后G<sub>0</sub>期细胞增加,G<sub>1</sub>期减少,表明MSC能直接影响HSPC的细胞周期。与Hu等<sup>[6]</sup>的研究结果相呼应,Geyh等发现MDS患者的HSPC处于G<sub>0</sub>期的比例增多,而与健康人MSC共培养可在一定程度逆转早期MDS患者HSPC细胞周期的变化。

单核-巨噬细胞对于HSPC滞留在骨髓起重要作用。G-CSF能去除骨髓中的单核-巨噬细胞,尤其是CD169<sup>+</sup>巨噬细胞,造成骨髓基质细胞分泌的CXCL12显著减少,Nestin<sup>+</sup>MSC表达的与保存造血干细胞有关的分子减少,HSPC被从骨髓中动员出来<sup>[33-34]</sup>。Zhang等<sup>[19]</sup>发现CML环境中G-CSF增多,导致正常LT-HSC从骨髓迁移到脾脏,其中可能也有单核-巨噬细胞的参与。此外,Mussai等<sup>[35]</sup>发现AML白血病细胞通过上调精氨酸酶,影响微环境中L-精氨酸代谢,使单核细胞极化为有免疫抑制特性的M2型,同时抑制了正常HSPC的增殖。其效应可被精氨酸酶抑制剂逆转。

### 五、总结与展望

综合以上研究成果,在白血病发展过程中,白血病细胞将正常造血微环境改造成了有利于自身生长而抑制正常HSPC的白血病微环境。正常HSC在白血病微环境中多数进入静止期,不能分化为HPC;HPC则过度分裂增殖,逐渐消耗,最终导致正常造血受抑。正常HSC的这种变化是可逆的,但传统治疗手段往往不能充分逆转白血病对骨髓造血微环境的影响,因此亟需寻找新的治疗靶点来特异性抑制LSC,促进正常HSPC数量和功能的恢复,从而提高白血病患

者的生存质量和时间,减少对血制品的依赖,也为造血干细胞移植提供更加有利的条件。

目前的研究仍存在一些问题:首先,诸多证据表明,不同发育阶段的HSC具有各自独特的niches<sup>[1,36]</sup>。正常HSC和HPC对白血病的不同反应可能就是受不同niches调控的结果。因此在未来的研究中需要将白血病对微环境的影响细化到具体的niche成分,将对正常HSPC的影响具体到各个分化阶段的细胞。这对寻找niche细胞和不同阶段HSC的特异性表型提出了挑战。其次,实验模型需进一步优化。同种移植和异种移植小鼠模型能够多大程度反映人类造血微环境的变化尚不确定;不同白血病类型对微环境的影响是否有差异,其结论是否通用还待证实。第三,鉴于白血病通过影响造血微环境来抑制正常造血,且诸多研究证明这种抑制作用是可逆的,关注表观遗传调控在其中的作用,尤其是对正常HSC细胞周期的调控机制具有重要意义,或成为未来研究的一个重要突破口。

### 参考文献

- [1] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 327-334.
- [2] Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment[J]. *Br J Haematol*, 2014, 164(6): 767-778.
- [3] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [4] Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 311-321.
- [5] Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities[J]. *Blood*, 2009, 114(6): 1150-1157.
- [6] Hu X, Shen H, Tian C, et al. Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model[J]. *Blood*, 2009, 114(18): 3783-3792.
- [7] 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[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33): 13576-13581.
- [8] Tian C, Zheng G, Cao Z, et al. Hes1 mediates the different responses of hematopoietic stem and progenitor cells to T cell leukemic environment[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(2): 322-331.
- [9] Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1[J]. *Science*, 2000, 287(5459): 1804-1808.
- [10] Yu H, Yuan Y, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners[J]. *Blood*, 2006, 107(3): 1200-1206.
- [11] Yu X, Alder JK, Chun JH, et al. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 876-888.
- [12] Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1315-1321.
- [13] 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.
- [14] Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, et al. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice[J]. *Leukemia*, 2007, 21(1): 136-142.
- [15] Frisch BJ, Ashton JM, Xing L, et al. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2012, 119(2): 540-550.
- [16] Calvi LM. Osteolineage cells and regulation of the hematopoietic stem cell[J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013, 26(3): 249-252.
- [17] Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, et al. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(3): 285-299.
- [18] Baba T, Naka K, Morishita S, et al. MIP-1 $\alpha$ /CCL3-mediated maintenance of leukemia-initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(12): 2661-2673.
- [19] Zhang B, Ho YW, Huang Q, et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 577-592.
- [20] Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment[J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 969-973.
- [21] Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1861-1865.
- [22] Benito J, Shi Y, Szymanska B, et al. Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: high efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23108.
- [23] Storti P, Bolzoni M, Donofrio G, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction[J]. *Leukemia*, 2013, 27(8): 1697-1706.
- [24] Yamakawa M, Liu LX, Date T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors[J]. *Circ Res*, 2003, 93(7): 664-673.
- [25] Tadokoro H, Umezu T, Ohyashiki K, et al. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(48): 34343-34351.
- [26] Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, et al. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs[J]. *Oncogene*, 2013, 32(22): 2747-2755.

- [27] Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, et al. Very low O<sub>2</sub> concentration (0.1%) favors G<sub>0</sub> return of dividing CD34+ cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 65-73.
- [28] Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche [J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(4): 298-310.
- [29] Danet GH, Pan Y, Luongo JL, et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions [J]. J Clin Invest, 2003, 112(1): 126-135.
- [30] Wang L, Zhang H, Rodriguez S, et al. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- $\kappa$ B-dependent manner [J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(1): 51-65.
- [31] Medyouf H, Mossner M, Jann JC, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(6): 824-837.
- [32] Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells [J]. Leukemia, 2013, 27(9): 1841-1851.
- [33] Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche [J]. J Exp Med, 2011, 208(2): 261-271.
- [34] Christopher MJ, Rao M, Liu F, et al. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice [J]. J Exp Med, 2011, 208(2): 251-260.
- [35] Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, et al. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment [J]. Blood, 2013, 122(5): 749-758.
- [36] Benito J, Zeng Z, Konopleva M, et al. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment [J]. Int J Hematol Oncol, 2013, 2(4): 279-288.

(收稿日期:2014-09-02)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

## 2015年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液 PBS

胎牛血清 FBS

血红蛋白 HGB

白细胞计数 WBC

血小板计数 PLT

核因子- $\kappa$ B NF- $\kappa$ B

聚合酶链反应 PCR

逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR

酶联免疫吸附实验 ELISA

动脉血氧分压 PaO<sub>2</sub>动脉血二氧化碳分压 PaCO<sub>2</sub>

辅助性T淋巴细胞 Th

丙氨酸转氨酶 ALT

天冬氨酸转氨酶 AST

谷氨酰转氨酶 GGT

碱性磷酸酶 ALP

乳酸脱氢酶 LDH

凝血酶原时间 PT

部分激活的凝血酶时间 APTT

EB病毒 EBV

巨细胞病毒 CMV

乙型肝炎病毒 HBV

丙型肝炎病毒 HCV

人类免疫缺陷病毒 HIV

自然杀伤细胞 NK细胞

白细胞介素 IL

干扰素 IFN

肿瘤坏死因子 TNF

红细胞生成素 EPO

血小板生成素 TPO

干细胞生长因子 SCF

粒细胞集落刺激因子 G-CSF

粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF

巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF

链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶 S-P

粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM

细胞毒性T淋巴细胞 CTL

佛波醇酯 TPA

噻唑蓝实验 MTT实验

弥漫性血管内凝血 DIC

磁共振成像 MRI

正电子发射断层扫描 PET

乙二胺四乙酸 EDTA

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE

二甲基亚砜 DMSO

荧光原位杂交 FISH

美国国家综合癌症网络 NCCN

本刊编辑部