

小分子造血干细胞扩增剂的研究进展

杨宜球

摘要 造血干/祖细胞(HSCs)的体外扩增一直是干细胞领域的研究热点,目前有很多的方法在体外对 HSCs 进行扩增,取得了一定成果。本文主要从目前已发现的对 HSCs 具有扩增效应的小分子化合物以及可能的作用的信号通道进行综述,为深入研究 HSCs 的扩增机制以及寻找新型的对 HSCs 具有扩增效应的小分子化合物提供参考。

关键词 造血干细胞移植 造血干细胞 扩增剂 小分子

中图分类号 R9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.003

造血干/祖细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是血液系统中具有分化潜能的成体干细胞,是一个特异性的群体,在某些应激条件下能够长期自我更新和分化成各类成熟血细胞。人类对 HSCs 的研究热情自其被发现以来一直未减。1959 年 Thomas 等^[1]利用骨髓的造血干细胞进行了人类首例造血干细胞移植,从此开创了人类造血干细胞移植的篇章。经过几十年来科研工作者以及临床医生的不断努力,发现 HSCs 移植可以治疗许多血液系统疾病,如急性白血病、慢性粒细胞白血病、骨髓增生异常综合征等。而且应当强调的是,慢性粒细胞白血病、骨髓增生异常综合征都是由于造血干细胞异常所引起的造血系统恶性肿瘤,尽管目前有很多先进的药物从遗传学水平治疗这些患者,但是异基因造血干细胞移植仍是治愈这些疾病的唯一治疗手段。

一、造血干细胞移植

1. 移植技术的困境:目前造血干细胞移植的造血干细胞来源于骨髓、外周血和脐带血,而早期干细胞主要来源于骨髓。目前全球登记在册的自愿捐献骨髓者名单已经超过了 700 万,但仍有 30% 的患者由于缺乏相合的人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)而无法进行造血干细胞移植^[2]。除了寻找相合的 HLA 困难外,移植物抗宿主反应(graft versus host reaction, GVHD)才是阻碍骨髓造血干细胞移植的主要障碍,研究发现 HLA 全相合的异基因骨髓造血干细胞移植发生急性 GVHD 的概率为 43% ~ 70%,而且大约 50% 患有广泛慢性 GVHD 的患者最

终死于免疫系统紊乱^[3]。为了减少 GVHD 带来的影响,将移植物中的 T 细胞去除后在一系列的异基因 HLA 不相合或者单倍异基因相合的移植中取得了令人鼓舞的效果^[4]。但移植失败率高,免疫重建能力不足导致的感染,移植后的淋巴增生症以及复发率仍然令人担忧^[5,6]。

2. 脐带血移植:脐带血是胎儿出生后、脐带结扎并断脐后保留在脐带和胎盘中的血液,近十几年来国内外的研究发现,脐带血中含大量的 HSCs,而且利用这些 HSCs 进行移植可以重建人体造血系统和免疫系统。与骨髓相比,脐带血中的 HSCs 和造血刺激因子丰富,集落形成能力以及自我更新和增殖潜力强,细胞毒性低,而且在移植和配型方面有更高的成功率^[7]。因此脐血已经逐渐成为替代骨髓造血干细胞的另一个可供移植的造血干细胞,脐血移植得到了快速的发展。

但研究发现输注细胞剂量可影响植入、移植相关病死率和生存率。Gluckman 等^[8]发现移植的总有核细胞数高于 $3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 时,能明显缩短中性粒细胞的恢复时间。Wagner 等^[9]也发现,当移植的总有核细胞数低于 $1.8 \times 10^7/\text{kg}$ 或者 $\text{CD}34^+$ 细胞数低于 $1.7 \times 10^5/\text{kg}$ 时移植成功率和生存率都较低,而且嗜中性粒细胞的恢复速度与移植的 $\text{CD}34^+$ 细胞数以及有核细胞总数呈正相关,除此之外移植高剂量 $\text{CD}34^+$ 细胞能有效降低发生急性 GVHD 的概率。而单份脐带血中含有的总有核细胞数只能满足儿童或者体重较轻的成人的移植需求,限制了脐带血移植在成人中的应用。近年来双份脐带血在临床上的应用,扩展了脐带血造血干细胞移植在成人中的应用,但与此同时也增加了移植后发生急性 GVHD 的风险和移植成本。因此科研工作者希望通过体外扩增脐带血

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2016A030313676)

作者单位:523808 东莞,广东医科大学药学院

通讯作者:杨宜球,电子信箱:670909616@qq.com

中的 HSCs 以克服成人造血干细胞移植总有核细胞数不足的难题,从而扩展其应用领域。

3. HSCs 扩增研究进展:HSCs 体外扩增研究一直是干细胞领域的研究热点,扩增的同时保持干细胞的长期自我更新和分化潜能是其难点。目前在体外扩增 HSCs 的方法主要有细胞因子联合培养法、模拟骨髓微环境法、基因调控表达技术法。尽管运用这些方法在体外进行 HSCs 扩增取得一定的成果,但由于造血细胞因子的生产成本较高以及多种造血生长因子联合培养条件下扩增后的造血干细胞,其移植后持续造血能力的不确定性,令细胞因子联合培养法的应用前景不容乐观。而模拟骨髓微环境法实验的成功表明了细胞之间相互作用的重要性,该法多选择用骨髓、脐血等来源的基质细胞、附壁细胞、内皮细胞作为饲养层,扩增取得了很好的效果,但由于饲养细胞获取需要多次采集,并且由此给捐献者的健康带来负担,所以该法在临床上大量应用方面还需要考虑。近年来,研究发现一些小分子化合物在体外能有效促进造血干细胞的增殖,这引起了科研工作者的重视。

二、小分子扩增剂

1. 视黄酸:视黄酸(valproic acid, RA)是视黄醇的衍生物,在体内以小分子的形式存在,在血液中含有量较低。研究表明类视黄醇对机体内多种细胞的分化和维持细胞的动态平衡具有重要的意义。而且对视黄酸受体具有兴奋作用的所有反式 RA 在治疗血液性肿瘤中具有很好的效果,能诱导白血病细胞的分化^[10]。在视黄酸受体基因敲除的小鼠中,其 HSCs 细胞数明显减少,但利用类视黄醇体外进行 HSCs 扩增的机制尚未清楚。Purton 等^[11,12]在一系列的移植实验中发现反式 RA 能促进老鼠 HSCs 细胞的自我更新和扩增。除此之外,Notch1 和 HoxB4 的 mRNA 的转录水平也上升,这表明反式 RA 很可能是通过调节 HSCs 内 Notch1 和 HoxB4 的信号通道从而产生扩增效应^[13]。但也有研究发现 RA 在体外能抑制 HSCs 的扩增,因此 RA 对 HSCs 的自我更新和扩增效应还有待于进一步研究。

2. 丙戊酸:丙戊酸(valproic acid, VPA)是组蛋白脱乙酰基酶抑制剂,对急性髓细胞白血病具有较好的治疗效果,近年来多个研究小组发现在体外的培养实验中,VAP 对 HSCs 具有重要的调节作用。Bug 等^[14]发现在液体培养基中 VAP 能抑制人骨髓造血干细胞 CD34⁺的分化,而且该效应对 VAP 具有浓度依赖性。即使在含有 FCS 和 G-CSF 催化因子的培养基中,

150 μg/ml 的 VAP 依然能使 CD34⁺细胞数增加 21.5%,而且在半固体培养基中,能使人类脐带血 CD34⁺细胞扩增 10 倍,对老鼠 HSCs 同样具有扩增效应。Bug 等^[14]研究发现,VAP 主要通过下调 p21^{cip-1/waf-1}和激活 GSK-3β 依赖性信号通道以及上调 HoxB4 来实现对 HSCs 细胞的扩增。

3. (2'Z,3'E)-6-溴靛玉红-3'-肟:糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3β)是一种在进化上非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,普遍存在于哺乳动物真核细胞中,除去最早发现的调控糖原合成酶的活性外,GSK-3β 还能作用于众多信号蛋白、结构蛋白和转录因子,调节 β-链蛋白(β-catenin)的代谢。而 β-catenin 在造血干细胞中能上调 c-myc 和 HoxB4 基因的表达,c-myc 与 HoxB4 对造血干细胞的自我更新和增殖发挥着重要作用。近年来研究发现 GSK-3β 的拮抗剂在 NOD/SCID 小鼠中能提高人和老鼠 HSCs 的自我更新能力。Holmes 等^[15]发现 GSK-3β 抑制剂(2'Z,3'E)-6-溴靛玉红-3'-肟(BIO)能抑制 GSK-3β 的活性,使 β-catenin 的代谢减少,与空白对照相比其 c-myc 与 HoxB4 表达明显上调。而且经 BIO 处理的脐带血 CD34⁺细胞分裂减缓,但移植活性增强。除此之外,BIO 还能延缓脐带血 CD34⁺细胞的凋亡。

4. 前列腺素 E₂:前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)在体内发挥着重要的调节功能,参与了包括发热、炎症反应、疼痛感知、糖脂代谢、生殖活动和细胞生长及分化等生理及病理过程。North 等^[16]在利用斑马鱼进行高通量药物筛选时发现 PGE₂ 是 HSCs 自我更新的调节因子。研究发现在斑马鱼和小鼠胚胎中促进前列腺素的合成,能使 HSCs 的数目增多,而抑制前列腺素的合成,而 HSCs 的数目减少,这说明了前列腺信号通道很可能对 HSCs 的生物学特性具有调节作用。而且在人类和老鼠的基质细胞和 HSCs 中都发现了前列腺信号通道以及 PGE₂ 受体的组成部分^[16]。将经过 PGE₂ 处理的成熟造血干细胞移植入老鼠中,发现具有短期或长期更新潜能的造血干细胞数目都增多^[16]。Hoggatt 等^[17]也观察到了 PGE₂ 对老鼠 HSCs 具有扩增效应。尽管目前 PGE₂ 对 HSCs 的扩增效应机制尚不清楚,很可能是通过上调调节 HSCs 生存、扩增和自我更新的生存素基因的表达,抑制细胞凋亡 caspase-3 的表达从而产生扩增效应。

5. NR-101:血小板生成素(thrombopoietin, TPO)

是促进 HSCs 在体外增殖和生存的最有效细胞因子,常与其他细胞因子联用在体外促进 HSCs 的扩增。TPO 通过与其受体 c-MPL 结合,对维持 HSCs 生物学特性和更新具有重要的作用。目前发现有很多小分子对 c-MPL 受体具有激活效应,Nishino 等^[18]通过筛选 400 个小分子化合物发现小分子 NR-101 能激活 c-MPL 受体,而且与 TPO 相比在体外对 HSCs 具有更强的扩增活性,细胞扩增实验发现 NR-101 能有效扩增 CD34⁺ 和 CD34⁺CD38⁻ 的细胞,而且在 NOD/SCID 中造血干细胞的增殖率也比经 TPO 和未处理的高。而 NR-101 主要通过激活 TPO/c-MPL 信号通道产生效应,但与 TPO 相比, NR-101 还能持续激活 STAT5,而 STAT5 对 HSCs 的自我更新具有重要的调节作用。

6. Me6TREN: Me6TREN 是一类饱和胺类化合物,属于一类新型医药中间体,可用于制备远螯聚合物的原子转移自由基聚合配体。杨舒等^[19]发现皮下注射 Me6TREN 能将小鼠骨髓中的 HSCs 快速有效地动员至外周血。并在随后的研究中发现实验小鼠皮下注射 Me6TREN 能增加骨髓细胞的集落形成能力,同时也促进了骨髓 HSCs 的扩增。而且在体外分离培养小鼠骨髓单个核细胞的实验中, Me6TREN 同样能增加 HSCs 的集落形成能力和促进造血干细胞的扩增^[20]。这些结果都证实了 Me6TREN 对 HSCs 确实有扩增效应,但其是否能促进 HSCs 的长期扩增及其可能的机制仍须进行深入的研究。

7. SR1 与 UM171:近年来有研究报道通过无差别地对化合物进行筛选能发现对 HSCs 具有扩增活性的新型化合物。Boitano 等^[21]利用高通量筛选技术发现对多环芳香烃受体具有拮抗效应的小分子化合物 StemRegenin1 (SR1) 对人类 HSCs CD34⁺ 细胞具有扩增效应,在含有 SR1 的培养基中脐带血 CD34⁺ 细胞出现了很高的净增率。而更重要的是经 SR1 处理的人类 HSCs 其总有核细胞数增加了 17 倍,而且这些 HSCs 能重建经非致死量照射小鼠的造血系统。Fares 等^[22]对 5280 个小分子化合物进行筛选,发现了对多环芳香烃受体具有激活活性的小分子化合物 UM171 在脐带血的体外培养实验中能对 HSCs 有很好的扩增的活性。与 SR1 相比, UM171 对 HSCs 总有核细胞的增殖率差别不大,但 UM171 更趋向扩增早期的造血祖细胞,而且 SR1 联用在体外能更好的促进 HSCs 的增殖并能抑制祖细胞的分化。目前对多环芳香烃受体调节 HSCs 的扩增机制尚未明确,而其激动剂

和拮抗剂都能促进 HSCs 的扩增很可能是由于多环芳香烃受体在 HSCs 繁殖分化的不同阶段具有不同的调节作用。

三、展 望

目前在体外进行 HSCs 扩增的研究已经有很多,例如多种细胞因子联合培养法、利用信号分子激活细胞信号通道或者转录因子的过表达促进 HSCs 的扩增等,但结果不尽人意,这给造血干细胞体外扩增的研究带来一定的打击。但令人欣慰的是,近年通过海量筛选发现了像 NR-101、SR1、UM171 等小分子化合物在体外对 HSCs 具有很好的扩增活性,而且扩增物能重建经半致死量照射小鼠的造血系统,这重新点燃了科研工作者的热情。小分子化合物在今后造血干细胞的扩增研究中很可能替代目前常用的细胞因子成为促进 HSCs 增殖因子。从目前的研究成果发现,小分子化合物基本都是通过海量筛选发现的,这无疑给科研工作者加重了负担和增加了难度。而这也归咎于目前对这些小分子促进 HSCs 扩增机制尚未清楚。因此要高效地发现对 HSCs 具有扩增活性的分子,还必须深入对 HSCs 自我更新和增殖机制的研究。与细胞因子相比,小分子化合物具有来源易得,而且结构明了,作用靶点和机制容易深入研究,因此小分子化合物对促进 HSCs 的增殖具有很好的应用前景,而发现在体外对造血干细胞具有安全可靠扩增效应的小分子化合物是解决目前脐带血中造血干细胞不足的有效方法。

参考文献

- 1 Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, *et al.* Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man[J]. J Clin Invest, 1959, 38(10): 1709-1716
- 2 Confer DL. Unrelated marrow donor registries[J]. Curr Opin Hematol, 1997, 4(6): 408-412
- 3 Aversa F, Tabilio A, Velardi A, *et al.* Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype[J]. New Engl J Med, 1998, 339(17): 1186-1193
- 4 Soiffer RJ, Fairclough D, Robertson M, *et al.* CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission[J]. Blood, 1997, 89(8): 3039-3047
- 5 Hale G, Waldmann H. Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases[J]. Bone Marrow Transplant, 1994, 13(5): 597-611
- 6 Antin JH, Bierer BE, Smith BR, *et al.* Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effec-

tive prophylaxis for graft – versus – host disease in patients with hematologic malignancies[J]. Blood, 1991, 78(8): 2139 – 2149

- 7 Norkin M, Lazarus HM, Wingard JR. Umbilical cord blood graft enhancement strategies: Has the time come to move these into the clinic? [J]. Bone Marrow Transplant, 2013, 48(7): 884 – 889
- 8 Gluckman E, Rocha V, Boyer – Chamard A, *et al.* Outcome of cord – blood transplantation from related and unrelated donors [J]. New Engl J Med, 1997, 337(6): 373 – 381
- 9 Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment – related mortality and survival[J]. Blood, 2002, 100(5): 1611 – 1618
- 10 Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, *et al.* All – trans – retinoic acid in acute promyelocytic leukemia[J]. New Engl J Med, 1997, 337(15): 1021 – 1028
- 11 Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All – trans retinoic acid delays the differentiation of primitive hematopoietic precursors (lin – c – kit + Sca – 1 +) while enhancing the terminal maturation of committed granulocyte/monocyte progenitors [J]. Blood, 1999, 94(2): 483 – 495
- 12 Purton LE, Bernstein ID, Collins SJ. All – trans retinoic acid enhances the long – term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells[J]. Blood, 2000, 95(2): 470 – 477
- 13 Purton LE, Dworkin S, Olsen GH, *et al.* RAR γ is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self – renewal and differentiation[J]. J Exp Med, 2006, 203(5): 1283 – 1293
- 14 Bug G, Gül H, Schwarz K, *et al.* Valproic acid stimulates proliferation and self – renewal of hematopoietic stem cells[J]. Cancer Res,

- 2005, 65(7): 2537 – 2541
- 15 Holmes T, O’Brien TA, Knight R, *et al.* Glycogen synthase kinase – 3 β inhibition preserves hematopoietic stem cell activity and inhibits leukemic cell growth[J]. Stem Cells, 2008, 26(5): 1288 – 1297
- 16 North TE, Goessling W, Walkley CR, *et al.* Prostaglandin E2 regulates vertebrate hematopoietic stem cell homeostasis [J]. Nature, 2007, 447(7147): 1007 – 1011
- 17 Hoggatt J, Singh P, Sampath J, *et al.* Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation [J]. Blood, 2009, 113(22): 5444 – 5455
- 18 Nishino T, Miyaji K, Ishiwata N, *et al.* Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small – molecule agonist of c – MPL [J]. Exp Hematol, 2009, 37(11): 1364 – 1377
- 19 杨舒, 张静, 王思涵, 等. 小分子化合物 Me6TREN 促进小鼠骨髓中造血干/祖细胞的增殖 [J]. 生物技术通讯, 2015, 26(6): 759 – 762
- 20 Zhang J, Ren X, Shi W, *et al.* Small molecule Me6TREN mobilizes hematopoietic stem/progenitor cells by activating MMP – 9 expression and disrupting SDF – 1/CXCR4 axis [J]. Blood, 2014, 123(3): 428 – 441
- 21 Boitano AE, Wang J, Romeo R, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells [J]. Science, 2010, 329(5997): 1345 – 1348
- 22 Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, *et al.* Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self – renewal[J]. Science, 2014, 345(6203): 1509 – 1512

(收稿日期: 2017 – 07 – 18)

(修回日期: 2017 – 08 – 15)

(上接第 3 页)

- 13 Niesters M, Martini C, Dahan A. Ketamine for chronic pain: risks and benefits[J]. Br J Clin Pharmacol, 2014, 77(2): 357 – 367
- 14 McNicol RS. A systematic review and meta – analysis of ketamine for the prevention of persistent post – surgical pain[J]. Acta Anaesthesiol, 2014, 58(10): 1199 – 1213
- 15 Bell RF, Eccleston C, Kalso EA. Ketamine as an adjuvant to opioids for cancer pain [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 11: CD003351
- 16 Bourgoin JA, Wereszczynski N. Safety of sedation with ketamine in severe head injury patients: comparison with sufentanil[J]. Crit Care Med, 2003, 31(3): 711 – 717
- 17 Bar – Joseph G, Guilburd Y, Tamir A, *et al.* Effectiveness of ketamine in decreasing intracranial pressure in children with intracranial hypertension[J]. J Neurosurg Pediatr, 2009, 4(1): 40 – 46
- 18 Hertle JPD, J Woitzik JAH, Bullock R. Cooperative Study of Brain Injury Depolarizations COSBID. Effect of analgesics and sedatives on the occurrence of spreading depolarizations accompanying acute brain injury[J]. Brain, 2012, 135(8): 2390 – 2398

- 19 Gaspard N, Foreman B, Judd LM, *et al.* Intravenous ketamine for the treatment of refractory status epilepticus: a retrospective multicenter study[J]. Epilepsia, 2013, 54(8): 1498 – 1503
- 20 Berman RM, Capparelli A, Anand A, *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients [J]. Biol Psychiatr, 2000, 47(4): 351 – 354
- 21 McCloud TL, Caddy C, Jochim J, *et al.* Ketamine and other glutamate receptor modulators for depression in bipolar disorder in adults [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 9: CD011611
- 22 Aan hRM, Collins KA, Murrough JW, *et al.* Safety and efficacy of repeated – dose intravenous ketamine for treatment – resistant depression[J]. Biol Psychiatr, 2010, 67(2): 139 – 145
- 23 Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, *et al.* Antidepressant efficacy of ketamine in treatment – resistant major depression: a two – site randomized controlled trial [J]. Am J Psychiatr, 2013, 170(10): 1134 – 1142

(收稿日期: 2017 – 12 – 11)

(修回日期: 2017 – 12 – 13)