论 文

粗粒内源性网络可预测血液系统髓系细胞分化和转分化的主要时序特征

苏杭¹, 王高伟¹, 袁若石^{1,2}, 敖平^{1,2,3,4*}

1. 上海交通大学系统生物医学研究院, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240;

2. 上海交通大学生物医学工程学院, 上海 200240;

3. 上海交通大学医学院, 上海肿瘤研究中心国家重点实验室, 上海 200240;

4. 上海大学定量生命科学国际研究中心和物理系, 上海 200444

* 联系人, E-mail: aoping@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-02-20; 接受日期: 2017-05-11; 网络版发表日期: 2017-06-13

国家自然科学基金(批准号: 91529306, 91329301, 91652930016)资助

摘要 揭示细胞命运决定过程中的分子调控机制对理解干细胞分化和组织稳态的建立和维持具有决定性的意义. 本文通过归纳从机制研究中积累的分子调控关系, 构建了血液系统髓系细胞分化相关的粗粒化内源性网络. 通过对网络动力学进行定量分析, 本文以稳态的概念对髓系主要细胞类型进行分类, 并定量预测了一系列细胞类型转换过程中出现的中间状态或过渡态. 基于计算结果和数学中动力学系统的原理, 本文提出了髓系细胞发育景观拓扑图, 并从高维非线性动力系统的基本特性出发, 讨论了实验中在特定基因操作下观测到的转分化现象, 并预测了相应过程中的分子动力学变化. 研究表明, 髓系细胞发育定量景观拓扑图的构建有助于全局性地阐述恶性肿瘤和再生障碍性疾病的发生发展.

关键词 造血系统, 发育景观, 内源性网络, 拓扑结构, 稳态, 过渡态, 动力学建模

血液是人体中一类快速进行自我更新的组织, 包含诸多具有不同功能的细胞类型. 由于血细胞本身流动的生活模式, 及其易分离易培养等诸多优良特性, 被广泛应用于研究干细胞分化和细胞命运决定过程中, 并积累了大量研究成果. 在过去的研究中, 根据细胞表面抗原的表达, 人们从实验中分离出造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和祖细胞(progenitors), 并根据其功能分析结果构建了经典的造血发育谱系图^[1]. 血液细胞来源于共同的祖先, 即长期造血干细胞(long-term hematopoietic stem cells, LT-HSCs). LT-HSCs

具有持续的自我更新能力, 以保证血液系统功能细胞的持续性补充. 在其分裂过程中, 一部分子细胞会继续保持干性, 余下的细胞则会根据细胞内外的环境和情况, 选择不同的细胞命运: LT-HSCs会分化产生短期造血干细胞(short-term hematopoietic cells, ST-HSCs)或多能祖细胞(multi-potent progenitors, MPPs), 这些细胞状态的复制能力进一步降低, 并产生不同的发育潜能; MPPs会进一步分化, 产生一些谱系特异性的前体细胞, 如定向髓系祖细胞(common myeloid progenitors, CMPs)或定向淋系祖细胞(common lymphoid progenitors, CLPs);

引用格式: 苏杭, 王高伟, 袁若石, 等. 粗粒内源性网络可预测血液系统髓系细胞分化和转分化的主要时序特征. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 616–628
Su H, Wang G W, Yuan R S, et al. Coarse-grained endogenous network predicts main dynamical sequences in myeloid differentiation and trans-differentiation. Sci Sin Vitae, 2017, 47: 616–628, doi: [10.1360/N052016-00309](https://doi.org/10.1360/N052016-00309)

CLPs不具备分化为髓系细胞的潜能,但能够分化产生所有的淋系细胞;CMPs会进一步分化为巨核-红系祖细胞(megakaryocyte-erythrocyte progenitors, MEPs)或粒系-单核系祖细胞(granulocyte-monocyte progenitors, GMPs). 这些双能祖细胞根据细胞内外特定的诱导或噪声影响最终分化为红细胞、能够产生血小板的巨核细胞或粒细胞、单核-巨噬细胞. 这一经典的造血发育谱系图强调了组织发育过程中的一些基本特点,如单向性、层次性和步进式命运决定等,并成为理解干细胞分化的范例^[2]. 同时,它也是一个标准生物模型来揭示细胞命运决定过程中的分子调控机制,研究它对于理解正常组织的发育和复杂疾病的发生发展具有极其重要的意义.

在这样高度层次分明的发育过程背后,调控细胞命运的分子机制是什么? 在过去的20年中,大量的工作试图揭示造血发育过程中决定细胞命运的分子调控机制. 一系列实验上的发现显示,造血发育的调控是由大量遗传和表观遗传调控因子的相互作用所决定的^[3]. 成百上千的调控因子之间通过相互作用形成一个复杂调控网络,接收处理内源、外源信号并进行细胞命运的选择. 然而,生物系统的复杂性使得一些特征无法仅从单个调控因子的研究中推断出来. 理解单个因子活性的变化如何影响整个调控网络,从而对表型产生影响的动力学过程依然是一个重要挑战.

关于细胞状态和细胞分化路径,历史上曾提出很多相关的概念模型,如20世纪, Waddington^[4]提出了发育景观学说,将细胞发育和干细胞分化过程比喻成管道系统: 细胞在不同的分叉口选择不同的路径,从而落入不同细胞命运. 基于细胞调控网络的动力学分析,人们对发育过程从定量的角度提出新的景观学理解,并以稳态的概念来解读不同细胞状态的维持^[5]. 之后,内源性网络理论提出了一套可行的方法来对生物系统中核心分子调控网络进行概括性描述和定量分析^[6-8],并进一步应用于包括癌症在内的许多复杂疾病的研究中^[6,7,9-12],从随机动力学的角度重新解读其发生发展过程^[13,14],并得出的一系列可被实验验证的预测. 在内源性网络的理论框架下,本文通过总结在长期的研究中所积累的分子调控机制,构建与髓系细胞分化相关的粗粒化内源性网络;通过将网络进行定量描述和动力学分析,得到了一组由网络结构所决定的态(state);根据每个态对局域扰动敏感性的不同,这些态被分为

稳态和不稳定(或过渡态);将模型与独立的实验数据进行对比,结果表明内源性网络产生的稳态分别对应不同的细胞类型,而过渡态对应着一些发育过程中经历的中间状态;通过对网络动力学进行进一步分析,讨论了态与态之间转换的可能路径,并模拟了在不同的基因操作下细胞转分化的过程. 内源性网络动力学预测了在特定基因操作下细胞表型的变化,一部分预测得到了实验中在相应的基因操作下观测到的转分化现象的支持. 模型进一步预测了在特定的细胞类型转换过程中,不同调控因子的含量或活性随时间的动力学变化,从而为调控造血发育过程中细胞分化和转分化提供新的思路.

部分分子生物学家很早就意识到要从网络角度来考察复杂生物过程,并要考虑其主要因素. 其中一个代表性的论证是所谓癌症主要标志假说^[15]. 该假说直接有粗粒化的层次. 有意思的是主要标志假说目前得到很大赞同,网络假说却没有得到充分认可. 在前期工作中,本课题组对这个问题进行了深入研究,提出的内源性网络理论不但发展这个思路,并进一步表明(非正常的)免疫因素,包括炎症反应和(非正常的)代谢因素都应该考虑进来^[6]. 尽管基因组不稳定和变异、以及染色体数目异常和癌症相关性很强,分析表明它们不是癌症的主要机制,并可能从内源性网络理论得到解释^[16]. 这4个相应的标志物构成了几年以后癌症主要标志第二代假说的主要内容^[17]. 在过去10年中内源性网络理论也得到很大发展,现已能与癌症的临床数据直接比对^[9-12]. 作为起点,本文主要讨论了内源性网络的最核心的一部分,下面称之为“粗粒内源性网络”,以求能对主要现象做出定量、时序的描叙和预测.

1 材料与方法

1.1 常微分方程动力系统,平衡点计算算法:

常微分方程组(ordinary differential equations, ODEs)由内源性网络结构转化而来,描述了每个因子在其他因子的调控下随时间进行动力学变化的过程. 本文采用了两种独立的算法来计算常微分动力系统平衡点. 以如下动力系统为例:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x)$$

(1) 算法1. 这一算法可以用于计算稳定平衡点, 通过随机产生一个八维的向量 x_0 作为系统的初始值, 使向量 x_0 随时间在 $x_{t+1}=x_t+\Delta t \times f(x_t)$ 条件下迭代. 在足够长时间的迭代后, 以 $(x_{t+1}-x_t)^2 < \varepsilon, f(x_t)^2 < \delta$ 来判断系统是否收敛, 参数取值如下 $\Delta t=0.1, N=800, \varepsilon=10^{-8}, \delta=10^{-8}$. 如果迭代后的向量 x_t 满足上述条件, 则将向量 x_t 记为系统产生的一个稳态. 如选取1000次随机系统初始值, 记录所有计算得到的稳态; 如果重复取样的次数在1000000或更多的情况下, 计算依然得到同样的计算结果, 则将以上计算得到的稳态作为模型初步的计算结果.

(2) 算法2. 该算法利用牛顿迭代法求解非线性方程 $\frac{dx(t)}{dt} = f(x) = 0$ 来计算稳定平衡点和不稳定平衡点. 通过随机产生一个八维的向量 x_0 作为系统的初始值, 利用牛顿迭代法对初始向量进行迭代, 找到满足 $f(x^*)=0$ 的解 x^* . 具体而言, 本文利用矩阵实验室Matlab中的函数fsolve对动力系统进行求解. 如果方程 $f(x^*)=0$ 在 x^* 处的雅克比矩阵的所有特征值均为负, 则 x_t 被判定为稳态; 如果方程 $f(x^*)=0$ 在 x^* 处的雅克比矩阵的所有特征值至少有一个为正, 则 x_t 被判定为不稳定状态. 每一个不稳定状态所对应的雅克比矩阵中正的特征值的个数也被记录下来. 通过重复对系统初始值随机取样, 如10000次, 记录所有计算得到的稳态与不稳定状态; 如果随机取样的次数重复更多次, 如100000或更多, 计算依然得到同样的结果, 则判定稳态与不稳态个数已经基本稳定. 模型结果显示动力系统参数在合理的范围内取值, 得到的结果非常稳健.

1.2 模型计算结果与表达数据对比方法

为了对模型结果在分子层次上进行进一步的验证, 将稳态N1, N2, N3, N4, N5的因子表达量与取自人体血液样本的功能细胞造血干细胞、粒细胞、红细胞和巨核细胞的RNA-seq表达数据进行对比. 根据细胞表面蛋白的特异性表达, 在人体血液样本中分离出38种不同的细胞类型, 代表了造血干细胞, 祖细胞和末端分化的功能性细胞类型. 这38中细胞类型通过211 Affymetrix array U133A测量和分析了其基因表达, 每一种细胞有4~7个平行. 针对样本的全局表达谱, 每一个基因的表达量作归一化处理, 使之均值为0. 本文设定0为阈值判断每一个基因的高表达或者低表达情况, 从而与网络计算结果进行比较. 每一种细胞类型选取

了4个平行样本分别对理论计算值进行验证. RNA-seq表达数据来源于<http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE24759>.

1.3 不稳定平衡点局域扰动

在ODE动力系统中, 当网络处于某一不稳定平衡点时, 以一个小的随机向量 $\Delta x(|\Delta x| < 0.005)$ 对系统进行局部微扰, 并以扰动后的状态作为初始值, 使之在动力方程组 $x_{t+1}=x_t+\Delta t \times f(x_t)$ 的约束下随时间进行迭代. 结果记录了扰动后的系统随时间演化的路径, 并记录了最终系统收敛到的稳态, 判断收敛的条件如下: $(x_{t+1}-x_t)^2 < \varepsilon, f(x_t)^2 < \delta$. 这里选用的参数值为 $\Delta t=0.1, N=800, \varepsilon=10^{-8}, \delta=10^{-8}$. 随机扰动实验重复多次后, 如1000次, 得到某一特定不稳定平衡点扰动后能够演化到的稳态, 当随机扰动重复更多次后, 如果依然得到了同样的结果, 则判定结果已经收敛.

2 结果

2.1 髓系细胞分化相关的粗粒内源性网络

在造血发育过程中, 细胞分化和命运决定受到严格调控以维持血液组织稳态平衡. 虽然造血发育过程中涉及诸多遗传和表观遗传调控因子的作用, 但在过去的研究中发现, 少数谱系特异性转录因子的表达与否决定了发育过程中细胞分化的方向, 是决定细胞命运的关键调控因子(master regulator)^[18-20]. 例如, 在髓系细胞分化早期, 初级决策者PU.1和GATA1之间的竞争性表达决定了细胞粒系和红系之间的命运抉择: 当PU.1高表达时, CMPs向粒系-单核巨噬细胞系分化; 当GATA1高表达时, CMPs向巨核-红系细胞系分化. 在这两个双能祖细胞各自的命运分叉点上, 次级决策因子的竞争性表达决定了进一步分化方向: 在GMPs时期, Gfi-1和Egr/Nab之间的相互竞争决定了细胞最终分化形成粒细胞或单核/巨噬细胞; 在MEPs时期, EKLF与Fli-1之间的相互竞争决定了MEPs最终分化为红细胞或者巨核细胞. 此外, 实验中观测到的不同细胞系之间重分化和转分化现象进一步证明这些谱系特异性的转录因子在细胞命运决定中的重要作用. 例如, 通过将MyoD蛋白在成纤维细胞中表达, 可以使成纤维细胞转换为肌肉细胞^[21]; 最近实验中通过将4个关键的转录因子在体细胞中表达所产生的iPS细胞更进一步证明了这一观点^[22]. 因此, 谱系特异性的转录因子

的表达集合可以视为不同细胞类型在分子层次上的定义^[20,23].

内源性网络被定义为生物系统在长期演化过程中形成的保守而自治的核心网络, 实现并调控与之相关的生物功能. 本文通过归纳和总结造血分化研究中积累的分子调控机制, 选择了与髓系细胞命运决定相关的一组关键调控因子对相关内源性网络进行概括性描述(图1), 包括早期造血干细胞相关的因子(GATA-2, C/EBPs)、初级命运决策因子(GATA-1, PU.1), 以及次级命运决策因子(EKLF, Fli-1, Egr/Nab, Gfi-1). 这些因子之间通过直接或间接的激活抑制关系相互调节(表1和2), 形成了一组保守的、封闭的、执行具体功能的内源性网络(图2). 因子和因子之间相互作用关系是在长期的机制研究中总结的结果, 被多

图 1 髓系细胞分化相关的粗粒内源性网络(网络版彩图) 根据积累的生物学知识, 本文选择了一组髓系细胞分化相关的谱系特异性转录因子作为内源性网络^[6]的节点. 因子与因子之间的相互作用是从已有的基因调控知识中总结而来的^[19]. 箭头表示激活或上调关系, 圆点表示抑制或者下调关系

表 1 髓系细胞分化相关的粗粒内源性网络节点

Key agent	Description
GATA-2	Transcription factor GATA-2
PU.1	Transcription factor PU.1, SP-1
Egr/Nab	Transcription factor Egr-1, Egr-2, Nab-2
C/EBPs	Transcription factor CCAAT Enhancer-binding Protein Family
Gfi-1	Transcription factor Growth factor independence 1
EKLf	Erythroid Kruppel-like factor (ELKf/KLF1)
GATA-1	Transcription factor GATA-1, FOG-1
Fli-1	Transcription factor FLI-1: a member of ETS family

表 2 粗粒内源性网络中因子与因子之间的相互作用

Key agents	Activated by	Inhibited by
GATA-2	GATA-2 ^[24]	PU.1 ^[25] GATA-1 ^[26] GATA-1 ^[28] GATA-2 ^[25] Gfi-1 ^[29]
PU.1	PU.1 ^[27]	Gfi-1 ^[30] GATA-1 ^[31]
Egr/Nab	PU.1 ^[30]	Egr/Nab ^[30]
C/EBPs	C/EBPs ^[29]	Egr/Nab ^[30]
Gfi-1	C/EBPs ^[29]	Egr/Nab ^[30]
EKLf	GATA-1 ^[32]	Fli1 ^[33]
GATA-1	GATA-2 ^[32] GATA-1 ^[34]	PU.1 ^[28,35] C/EBPs ^[31]
Fli-1	GATA-1 ^[36]	EKLf ^[33]

种实验手段和现象所验证, 如基因敲除、过表达、表达分析等^[19]. 相关的基因敲除模拟揭示了简化模型中因子选择的必要性(网络版附 图1).

2.2 定量描述和强健性分析

(1) 网络的布尔动力学实现. 对于图1中的粗粒内源性网络, 由于网络结构的复杂性和节点-节点之间非线性的相互作用, 一些网络动力学特性很难从直观或线性的逻辑推理中获得. 数学模型的建立提供了一种有效的办法来对上述非线性复杂网络进行定量分析.

本文首先运用离散动力系统——布尔网络分析法来对内源性网络进行分析. 布尔网络分析是一种常见的非线性动力系统分析方法, 被广泛运用于复杂生物系统的描述和分析中^[37,38]. 在布尔网络中, 每个节点的表达只有0和1两种形式, 分别对应节点的不表达和高表达. 节点表达量所组成的8维向量描述了系统在t时刻的状态. 在布尔网络分析中, 系统状态随离散的时间点进行迭代, 在t+1时刻每个因子的含量是由t时刻的系统状态所决定的 $x_{t+1} \leftarrow f(x_t)$. 状态迭代所遵循的布尔法则则是由网络结构转化而来: 网络中节点之间的激活抑制关系可以用and, or, not 3种布尔逻辑式表示出来, 如在图1中, GATA-2受自身的激活, 及GATA-1和PU.1的抑制, 三者关系可转化为以下逻辑关系式:

$$x_{Gata-2}(t+1) = x_{Gata-2}(t)and(notx_{Gata-1}(t))and(notx_{PU.1}(t)). \tag{1}$$

类似的, 其他7个节点之间的相互作用也可以通过

图 2 内源性网络中状态的强健性(网络版彩图)

A: 内源性网络结构产生的稳态. 通过布尔网络分析和不同参数条件下ODE动力系统分析, 发现如图5个稳态始终非常稳定地存在. 在布尔网络分析结果中, 深色代表因子表达为1, 浅色代表因子表达为0; 在ODE动力学分析结果中, 深色代表因子表达为1, 浅色代表因子表达为0; B: 内源性网络结构产生的不稳定状态. 在不同参数条件下进行ODE动力系统分析, 发现6个不稳定状态始终存在. 深色代表因子表达为1, 浅色代表因子表达为0

布尔逻辑关系表示出来(网络版补充材料). 通过随机地选取一些8维的初始值, 使不同的初始状态在这些逻辑关系的约束下随时间不断演化, 可以发现系统会逐步收敛到一些特定的稳态中. 如果通过对初始值进行1000次随机取样后, 在动力系统中共找到了5个稳态, 当随机次数达到10000次或更多的情况下, 依然只找到了5个相同的稳态, 则判定稳态数量已经收敛. 每个稳态对应着一组8维的向量(图2), 表示在不同的细胞状态下8个转录因子的不同表达量. 本文进一步发现, 内源性网络在两种不同的布尔逻辑式的实现形式下(网络版补充材料), 一部分稳态始终很稳定的存在(网络版附表1和2). 动力系统的一些其他复杂特性, 如极限环等, 在这一步的工作中暂时不作讨论.

(2) 网络的常微分方程动力系统实现. 本文进一步用一组常微分方程(ordinary differential equations, ODEs)来描述每一个因子的含量在其他因子的调控下随时间的动态变化. 本文采取了无量纲的建模框架, 将每一个因子的表达值归一化到0~1. 0代表因子完全不表达, 1代表因子最高表达状态. 由于希尔方程形式被广泛应用于描述生物系统中的基因调控过程^[39], 本文采用希尔方程作为基本形式来描述因子之间的非线性相互作用关系. 以因子 x 为例, 描述其含量变化的常微分方程(2)所示:

$$\frac{d[x(t)]}{dt} = f(X) - \frac{[x(t)]}{\tau_x}, \quad (2)$$

其中, $[x(t)]$ 代表 t 时刻的浓度或活性; $\frac{[x(t)]}{\tau_x}$ 表示在 t 时刻因子 x 降解或失活的速率; $f(X)$ 代表在自身及其他因子的调控作用下因子 x 的生成速率, 其中 X 代表了对因子 x 具有调控作用的因子含量或活性所组成的向量. $f(X)$ 可用以下式子进行表示:

$$f(X) = V_{\max} \times \frac{k_a \times \sum x_a^{n_a}}{1 + k_a \times \sum x_a^{n_a}} \times \frac{1}{1 + k_i \times \sum x_i^{n_i}},$$

或:

$$f(X) = V_{\max} \times \frac{k_a \times \sum x_a^{n_a}}{1 + k_a \times (\sum x_a^{n_a} + \sum x_i^{n_i})}, \quad (3)$$

其中, $V_{\max}$ 代表因子 x 最大合成速率, x_a 代表所有对 x 具有激活作用的因子浓度或活性, x_i 代表所有对 x 具有抑制作用的因子浓度或活性, k_a , k_i 分别为反映激活和抑

制反应的解离常数, n_a , n_i 为相关激活或抑制反应的希尔系数. 在这一无量纲的建模框架下, 最大产生速率 $V_{\max}$ 和最大降解系数 τ_x 归一化为1. 希尔系数 n 和解离常数 k 在合理的范围内变化以描述因子与因子之间的激活抑制关系的基本特征, 并设定了条件 $k \approx 2^n$ 来约束 n 与 k 之间的关系, 从而将S型曲线的阈值归一化到0.5附近. 如当 n 取3时, k 在8附近取值($k=8, 9, 10, \dots$). 当希尔系数 n 趋向于正无穷时 $n \rightarrow +\infty$, 微分方程所描述的因子与因子之间S型的变化曲线与布尔网络分析方法类似(本文假设简化网络中因子与因子之间的相互作用是等权重的, 激活与抑制关系之间抑制关系更强). 内源性网络在ODE动力系统的表达关系式见附录.

通过以上方法, 将构建的粗粒内源性网络转化为一组非线性常微分方程, 并对其进行动力学分析(见材料与与方法), 模拟网络随时间演化的过程, 寻找网络的平衡点. 本文采用两种独立的方程形式对网络结构进行描述, 并使参数在合理的范围内进行变化, 结果表明网络在不同的方程形式和参数条件下, 一部分态始终非常稳定的存在(网络版补充材料), 即在两种不同的方程形式、合理的参数条件和两种独立的算法下始终能够得到5个稳态和6个不稳定状态(图2). 对于在常微分方程动力系统中计算得到的稳态而言, 当设定阈值将每一个因子的表达量判定为0或1, 即因子含量大于阈值时为判定为1, 小于阈值时为判定为0时, 结果表明, 常微分方程动力系统计算得到的稳态与布尔网络分析中得到的稳态完全一致. 阈值的取值可以在0.3~0.7变化, 而不会影响最终的结果. 此外, 前期的工作发现在一种新的积分方式下, 通过常微分方程组计算得到的平衡点与对应的随机微分方程组(stochastic differential equations, SDEs)计算的结果完全一致^[13]. 这些计算结果进一步支持和验证了已往关于生物系统稳定性的研究^[40,41], 即网络的拓扑结构本身决定了系统状态的稳定性和适应性, 同时也反映了依照内源性网络理论所构造网络的合理性及可行性, 从而为进一步研究奠定基础.

(3) 稳态和过渡态的生物学意义. 生物中的景观概念自20世纪早期提出以来^[4,42], 在复杂系统的定量描述中得到了广泛的应用和发展^[5], 表型转换过程中遗传和表观遗传调控因子的作用在此框架下有了新的理解和讨论^[43-45]. 景观学中稳态的概念被广泛应用于理解细胞的不同状态及状态转移中^[6], 并作为一个桥

梁, 将分子机制和表型联系在一起. 每一个稳态对应着网络中特定的一组因子表达值, 在生物中可对应着在某一细胞状态下不同的转录因子的活性或表达量. 根据网络中因子在生物系统中的特殊功能, 可以通过分析模型结果中每个稳态下因子的特异性表达, 来推断其可能对应的生物学意义.

像上文讨论过的, 在干细胞分化过程中, 谱系特异性转录因子的表达与否对细胞命运的决定起到了关键的调控作用. 例如, 在髓系细胞分化早期, 初级决策者PU.1和GATA1之间的竞争性表达决定了细胞粒系和红系之间的命运抉择: 当PU.1高表达时, CMPs向粒系-单核巨噬细胞系方向分化; 当GATA1高表达时, CMPs向巨核-红细胞系分化. 在GMPs时期, PU.1和C/EBP α 的相对含量高低, 以及Gfi-1和Egr/Nab之间的相互竞争决定了细胞最终分化形成粒细胞或单核/巨噬细胞^[29,46]; 而在MEPs时期, EKLF与Fli-1之间的相互竞争决定了MEPs最终分化为红细胞或者巨核细胞^[29,36]. 因而, 特异性转录因子的共表达可以作为细胞类型在分子层次上的定义, 从而对细胞类型进行划分. 模型结果表明, 网络计算得到的稳态因子表达很好地对应了不同细胞类型在分子层次上的定义: 稳态N2描述了单核-巨噬细胞, 即PU.1(高比例), C/EBP α (低比例)和Egr/Nab共表达的状态; 稳态N3描述了粒细胞, 即C/EBP α (高比例), PU.1(低比例)Gfi-1的共表达状态; 稳态N4, 描述了红细胞GATA-1和EKLF共表达的状态; 稳态N5描述了巨核细胞GATA-1和Fli-1共表达的状态, 稳态N1对应着其他粒细胞的分子特征^[47].

进而, 本文将网络计算得到的5个稳态的因子表达量与实验中取自人类血液样本中对应的细胞类型(单核-巨噬细胞、两种粒细胞、红细胞和巨核细胞)RNA-seq数据^[48]进行对比, 以对网络计算结果进行进一步验证(见材料与方法). 分析结果表明, 网络计算结果中不同的稳态与相应的细胞类型表达数据的符合程度分别为68.8%, 87.5%, 75%, 84.4%, 75%(图3). 由于稳态中的因子表达是直接通过网络计算得来, 而高维非线性动力系统中稳态特征是很难进行操控或拟合的, 这一结果表明, 网络计算得到的不同稳态对应着血液细胞发育过程中的不同细胞类型.

本文进一步分析了由网络结构本身所决定的不稳定平衡点的生物学意义, 发现不稳定平衡点可能对应着细胞类型的中间状态. 从生物学机制上而言, 在

早期发育过程中, 初级命运决策者PU.1和GATA-1竞争性表达决定了CMPs向GMPs或MEPs分化. 当PU.1高表达的情况下, GMPs的进一步细胞命运决定由次级命运决策者Egr/Nab与Gfi-1的竞争性表达执行: 当Egr/Nab高表达的情况下, 祖细胞向单核-巨噬细胞分化; 当Gfi-1高表达的情况下, 祖细胞向粒细胞分化. 在网络计算结果中, 不稳定平衡点部分因子表达处于中间水平, 即在阈值0.3~0.7范围内. 其中, 两个不稳定平衡点的因子表达与在发育过程中相应因子相互竞争的中间状态有很好的-一致性: 不稳定状态U4中在初始命运决定转录因子PU.1和C/EBPs高表达的情况下, Egr/Nab和Gfi-1的表达值处于阈值(0.3~0.7)范围内, 与粒细胞-单核/巨噬细胞祖细胞时期的细胞命运决定过程有着很好的对应. 类似的, 当早期命运决策者GATA-1高表达的情况下, MEPs进一步的细胞命运决定由EKLF与Fli-1的竞争性表达决定: 当Fli-1高表达时, 祖细胞向巨核细胞分化; 当EKLF高表达时, 祖细胞向红细胞分化. 网络计算结果中不稳定状态U5的因子表达值则与巨核-红系祖细胞时期细胞命运决策状况十分一致, 即早期细胞命运决策者GATA-1高表达, 而EKLF和Fli-1的表达值处于阈值(0.3~0.7)范围内, 描述了在MEPs时期的细胞命运决定过程. 通过进一步将不稳定状态U4和U5的因子表达值与人类血液发育样本中两类祖细胞的RNA-seq数据^[48]进行对比, 发现两者符合的程度分别为75%, 62.5%. 这一结果证明了内源性网络本身所产生的不稳定或过渡状态对应着发育过程中细胞的中间状态.

(4) 网络的动力学分析揭示细胞命运决策过程及相关预测. 为了描述细胞命运决定的动力学过程, 本文进一步对网络进行局域扰动, 以研究不同态之间的相互连接和可能的转化途径(见材料与方法). 通过总结对所有不稳定的扰动结果, 将每一个不稳定平衡点扰动后演化到的稳态与网络计算得到的稳态进行对比, 本文构建了内源性网络发育景观拓扑图, 以描述不稳定状态与稳态之间的连接如图4, 从而讨论细胞命运之间的联系和相互转换过程.

本文对实验中基因操作进行对应的ODE网络动力学模拟, 发现在对网络节点表达值进行相应的处理后, 可以成功模拟出实验中观测到的表型变化. 如表3所示, 当系统处于MEPs状态, 即不稳定平衡点U5时, 使因子PU.1暂时性高表达, 发现在因子的相互作用下, 系统

图3 网络计算得到的稳态与取自人体血液组织不同血细胞的RNA-seq相应表达数据的对比图(网络版彩图)

A: 将网络计算得到的稳态与来自人类血液组织样本中分离的不同血细胞的RNA-seq表达数据进行对比,发现5个稳态与5种不同的血细胞在转录因子表达层次上达到70%左右的对应; B: 不稳定状态U4, U5与GMPs及MEPs的表达达到60%左右的对应. 深色代表因子高表达, 浅色代表因子低表达

表3 髓系细胞转分化现象在网络中的模拟^{a)}

Original cell types	Manipulation	Resulting cell type	Reference	Molecular dynamics
MEP	Inducible PU.1 *expr.	Myeloid cells	[49]	图 5A
GMP	Constant GATA1 *expr.	MEP	[50]	图 5B
Erythroid	Constant PU.1 *expr.	Monocyte	[51]	图 5C
Eosinophil	Constant GATA1 *expr.	MEP	[52]	图 5D

a) *expr.: 表达

图4 内源性网络动力学计算得到的发育景观拓扑图 (网络版彩图)

大圆表示网络中计算得到的稳态, 对应着髓系细胞发育产生的不同细胞类型. 小圆表示不稳定或过渡状态, 对应着细胞类型转换过程中可能经历的一些中间状态. 箭头表示了网络局域扰动结果, 即系统在每个不稳定或过渡状态下经扰动后演化到相应的一组稳态的过程

逐步演化至代表单核巨噬细胞的稳态N4; 当系统处于GMP即不稳定平衡点U4时, 使因子GATA-1持续性高表达, 发现系统逐步演化至代表MEP的不稳定平衡点U5附近; 当在代表嗜酸性粒细胞的稳态N1中使GATA-1持续性高表达, 发现系统也会逐步向MEP不稳定平衡点靠近; 当在代表红细胞的稳态N2中持续性高表达PU.1时, 发现系统会演变到类似于单核-巨噬细胞的状态. 通过与文献资料进行对比, 结果表明网络动力学得到的态转换预测可以用于解释已有的细胞命运转换实验观测(表3). 同时, 内源性网络动力学也进一步预测了相应的细胞命运转化过程中, 各谱系特异性转录因子随时间的变化过程(图5). 模型结果表明, 在细胞类型转化过程中, 因子的变化具有很强的非线性, 一些因子在转化过程中出现先增后减的现象, 预示了在细胞类型转化前后一些没有明显含量变化的因子, 在细胞类型转化的过程中可能依然起到了非常重要的作用. 内源性网络动力学模型结果为解读细胞命运转化过程中分子调控关系和解读实验观测提供新的启示.

3 讨论

从早期髓系细胞分化相关的内源性网络出发, 本文讨论了包括红细胞、巨核细胞、两种粒细胞和单

核-巨噬细胞在内不同细胞命运决定过程. 经查阅文献, 本文总结早期髓系细胞发育相关的转录调控因子和调控关系, 构建了粗粒内源性网络. 对网络进行定量分析和动力学模拟, 结果表明, 在合理的参数范围和定量描述下, 一些状态始终在动力系统中稳定存在. 基于模型结果, 本文预测这些由网络结构本身所决定的状态对应着不同的细胞类型, 并进一步预测了每种状态下因子的表达或活性情况; 通过与独立发表的人类血细胞RNA-seq表达数据进行对比, 发现网络动力学预测的状态对应着不同的细胞类型: 稳态对应着5种具有特定功能的成熟细胞类型, 不稳定状态对应着细胞发育的中间状态. 对不稳定状态进行局域扰动, 得到了态与态之间的连接及可能的转化路径, 并构建了血液系统髓系细胞发育相关的景观拓扑图. 本文进一步对态与态之间的转化进行动力学模拟, 发现从网络动力学的角度可以解释在实验中特定遗传学操作下观测到的分化和转分化现象, 并预测了相应过程中关键的转录因子随时间的动力学变化, 从而为干细胞诱导调控和细胞转分化现象提供新的理解.

在这一步的工作中, 粗粒内源性网络描述了转录层次髓系细胞命运决定的核心调控网络, 并从动力学角度解释了实验中观测到的态与态之间的转化过程. 然而, 在目前的网络中, 还没有办法回答更进一步的问题, 如造血发育过程中不同细胞功能如细胞分裂, 凋亡和分化之间的相互调控等. 在这个意义下, 目前的髓系细胞发育内源性网络模型可在多个层次进行进一步拓展. 在网络模型中加入更多的调控关系, 如信号转导通路, 细胞因子的诱导机制以及细胞与微环境之间的相互作用, 能够帮助进一步理解分化发育过程中细胞根据内外环境的状况决定命运的过程, 细胞数量分布及组织稳态平衡等问题.

总而言之, 本文从粗粒内源性网络动力学特性出发, 提出了一个高维景观拓扑图作为定量发育模型来讨论造血发育过程中细胞命运决定过程, 从稳态和过渡状态的角度对细胞类型进行初步分类, 从机制上解释了主要细胞类型的转换过程, 并预测了相应过程中的分子动力学变化. 这一理论框架将分子调控机制与细胞表型联系在一起, 为理解正常发育过程中组织稳态的建立和维持及一些恶性肿瘤和再生障碍性疾病的发生发展奠定了基础.

图5 髓系细胞命运决定过程中因子的动力学变化(网络版彩图)

A: 当系统处于MEPs状态, 即不稳定平衡点U5时, 使因子PU.1暂时性高表达, 网络因子随时间的动力学变化; B: 当系统处于GMP即不稳定平衡点U4时, 使因子GATA-1持续性高表达, 网络因子随时间的动力学变化; C: 当在代表嗜酸性粒细胞的稳态N1中使GATA-1持续性高表达, 网络因子随时间的动力学变化; D: 当在代表红细胞的稳态N2中持续性高表达PU.1时, 发现系统会演变到类似于单核-巨噬细胞的状态。图中横轴代表模拟的时间步数, 纵轴代表因子的相对活性

致谢 感谢上海交通大学医学院附属瑞金医院血液研究所任瑞宝教授、中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所刘小龙教授、美国加州大学尔湾分校数学与生物医学工程系聂青教授对本工作的建设性意见和明辨性讨论, 感谢上海交通大学敖平系统生物实验室徐岷涓和朱晓梅老师, 上海交通大学雷雪、李斯特、王俊强、程润坦等同学在研究中的帮助。

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 Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*, 2007, 26: 6687–6696
- 3 Cantor A B, Orkin S H. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11: 513–519
- 4 Waddington C H. *The Strategy of the Genes*. London & New York: Routledge, 2014
- 5 Ao P. Global view of bionetwork dynamics: adaptive landscape. *J Genet Genomics*, 2009, 36: 63–73
- 6 Ao P, Galas D, Hood L, et al. Cancer as robust intrinsic state of endogenous molecular-cellular network shaped by evolution. *Med Hypotheses*, 2008, 70: 678–684
- 7 Wang G, Zhu X, Hood L, et al. From Phage lambda to human cancer: endogenous molecular-cellular network hypothesis. *Quant Biol*, 2013, 1: 32–49
- 8 苏杭, 王高伟, 朱晓梅, 等. 复杂疾病的系统医学视角: 内源性网络理论. *自然杂志*, 2015, 37: 448–455
- 9 Wang G, Zhu X, Gu J, et al. Quantitative implementation of the endogenous molecular-cellular network hypothesis in hepatocellular carcinoma. *Interf Focus*, 2014, 4: 20130064–20130064
- 10 Li S, Zhu X, Liu B, et al. Endogenous molecular network reveals two mechanisms of heterogeneity within gastric cancer. *Oncotarget*, 2015, 6: 13607–13627
- 11 Yuan R, Zhu X, Radich J P, et al. From molecular interaction to acute promyelocytic leukemia: calculating leukemogenesis and remission from endogenous molecular-cellular network. *Sci Rep*, 2016, 6: 24307
- 12 Wang G, Su H, Yu H, et al. Endogenous network states predict gain or loss of functions for genetic mutations in hepatocellular carcinoma. *J R Soc Interf*, 2016, 13: 20151115
- 13 Yuan R, Ao P. Beyond Itô versus stratonovich. *J Stat Mech*, 2012, doi: 10.1088/1742-5468
- 14 Ao P, Galas D, Hood L, et al. Towards predictive stochastic dynamical modeling of cancer genesis and progression. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, 2010, 2: 140–144
- 15 Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57–70
- 16 Ao P. Orders of magnitude change in phenotype rate caused by mutation. *Cell Oncol*, 2007, 29: 67–69
- 17 Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646–674
- 18 Rosenbauer F, Tenen D G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 105–117
- 19 Laiosa C V, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 705–738
- 20 Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature*, 2009, 462: 587–594
- 21 Tapscott S J, Davis R L, Thayer M J, et al. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science*, 1988, 242: 405–411
- 22 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 23 Perić L, Naik S H. Toward defining a ‘lineage’—The case for dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 41: 3–8
- 24 Grass J A, Boyer M E, Pal S, et al. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8811–8816
- 25 Walsh J C, DeKoter R P, Lee H J, et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity*, 2002, 17: 665–676
- 26 Weiss M J, Keller G, Orkin S H. Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Gene Dev*, 1994, 8: 1184–1197
- 27 Okuno Y, Huang G, Rosenbauer F, et al. Potential autoregulation of transcription factor PU.1 by an upstream regulatory element. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 2832–2845
- 28 Orkin S H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, 2000, 1: 57–64
- 29 Laslo P, Spooner C J, Warmflash A, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 2006, 126: 755–766
- 30 Spooner C J, Cheng J X, Pujadas E, et al. A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity*, 2009, 31: 576–586
- 31 Querfurth E, Schuster M, Kulesa H, et al. Antagonism between C/EBPβ and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Gene Dev*, 2000, 14: 2515–2525

- 32 Doré L C, Crispino J D. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. [Blood](#), 2011, 118: 231–239
- 33 Siatecka M, Bieker J J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. [Blood](#), 2011, 118: 2044–2054
- 34 Yu C, Cantor A B, Yang H, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage *in vivo*. [J Exp Med](#), 2002, 195: 1387–1395
- 35 Zhang P, Zhang X, Iwama A, et al. PU. 1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. [Blood](#), 2000, 96: 2641–2648
- 36 Starck J, Cohet N, Gonnet C, et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. [Mol Cell Biol](#), 2003, 23: 1390–1402
- 37 Wang R S, Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. [Phys Biol](#), 2012, 9: 055001
- 38 Bornholdt S. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. [J R Soc Interf](#), 2008, 5: S85–S94
- 39 von Dassow G, Meir E, Munro E M, et al. The segment polarity network is a robust developmental module.. [Nature](#), 2000, 406: 188–192
- 40 Barkai N, Leibler S. Robustness in simple biochemical networks. [Nature](#), 1997, 387: 913–917
- 41 Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: systems biology. [Annu Rev Genomics Hum Genet](#), 2001, 2: 343–372
- 42 Waddington C H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. [Nature](#), 1942, 150: 563–565
- 43 Lei J, Levin S A, Nie Q. Mathematical model of adult stem cell regeneration with cross-talk between genetic and epigenetic regulation. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: E880–E887
- 44 Wang P, Song C, Zhang H, et al. Epigenetic state network approach for describing cell phenotypic transitions. [Interf Focus](#), 2014, 4: 20130068–20130068
- 45 Li C, Hong T, Nie Q. Quantifying the landscape and kinetic paths for epithelial-mesenchymal transition from a core circuit. [Phys Chem Chem Phys](#), 2016, 18: 17949–17956
- 46 Dahl R, Walsh J C, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. [Nat Immunol](#), 2003, 4: 1029–1036
- 47 Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. [Gene Dev](#), 2006, 20: 3010–3021
- 48 Novershtern N, Subramanian A, Lawton L N, et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. [Cell](#), 2011, 144: 296–309
- 49 Nerlov C, Graf T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. [Gene Dev](#), 1998, 12: 2403–2412
- 50 Kulesa H, Frampton J, Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts. [Gene Dev](#), 1995, 9: 1250–1262
- 51 Yamada T, Kihara-Negishi F, Yamamoto H, et al. Reduction of DNA binding activity of the GATA-1 transcription factor in the apoptotic process induced by overexpression of PU.1 in murine erythroleukemia cells. [Exp Cell Res](#), 1998, 245: 186–194
- 52 Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, et al. GATA-1 interacts with the myeloid PU. 1 transcription factor and represses PU. 1-dependent transcription. [Blood](#), 2000, 95: 2543–2551

Coarse-grained endogenous network predicts main dynamical sequences in myeloid differentiation and trans-differentiation

SU Hang¹, WANG GaoWei¹, YUAN RuoShi² & AO Ping^{1,2,3,4*}

1 Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2 School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

3 State Key Laboratory for Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240, China;

4 Shanghai Center for Quantitative Life Sciences and Physics Department, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Revealing the molecular dynamics of cell fate determination is fundamental to our understanding of stem cell biology, tissue homeostasis and disease genesis. In this work, we constructed a coarse-grained endogenous network by integrating the accumulated molecular knowledge. Quantifying this coarse-grained endogenous network, we classified myeloid cell types by the structurally robust stable states generated from the endogenous network. We further predicted a series of intermediate states (transition states) in the cell-fate transition process. Accordingly, we established a quantitative scheme from the endogenous network dynamics to understand the early myelopoiesis. It not only explained the trans-differentiation events upon specific gene manipulation, but also predicted the molecular dynamics along each cell fate transition process. The quantitative scheme of early myelopoietic development can lead to a better understanding of the establishment and maintenance of tissue homeostasis and further contribute to elucidating malignant or aplastic diseases genesis systematically.

hematopoietic development, landscape, endogenous network, topology, stable states, transition states, dynamical modeling

doi: [10.1360/N052016-00309](https://doi.org/10.1360/N052016-00309)