人多能干细胞分化为巨核细胞和血小板高效功能筛选模型的建立

涂茜^{1,2,3}, 刘翠翠^{1,2,3}, 吴丹^{1,2,3}, 温玉琪^{1,2,3}, 王洪涛^{1,2,3}, 苏培^{1,2,3}, 刘懿莹^{1,2,3}, 马峰^{1,4}, 石莉红^{1,2,3}, 周家喜^{1,2,3*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020;

2. 中国医学科学院干细胞医学中心, 天津 300020;

3. 北京协和医学院干细胞与再生医学系, 天津 300020;

4. 中国医学科学院输血研究所, 成都 610052

* 联系人, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-12; 接受日期: 2017-11-05; 网络版发表日期: 2017-12-14

天津市重点应用基础一般项目(批准号: 16JCZDJC33100)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2016-I2M-1-018)、北京协和医学院研究生创新基金项目(批准号: 2016-0710-09)、2017国家重点实验室自主课题(批准号: Z17-05)和中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(批准号: 2016ZX310184-5)资助

摘要 人多能干细胞具有分化为包括巨核细胞在内的多种成熟血细胞的能力, 诱导人多能干细胞高效分化产生功能性血小板, 为解决临床上血小板来源不足提供了潜在的新来源. 建立高效的功能筛选平台, 寻找调控巨核分化和血小板产生的关键基因和作用机制, 有助于实现体外高效和大规模产生血小板. 利用脐带血CD34⁺细胞巨核分化和血小板产生体系以及转录组测序鉴定了调控巨核细胞分化的关键信号通路和基因. 利用小鼠(*Mus musculus*) mAGM-S3基质细胞共培养策略, 建立了人多能干细胞高效产生功能性血小板颗粒的模型. 利用此模型, 对候选的基因进行了功能筛选. 结果表明, 转录因子*RUNX1*和*ERG*显著促进人多能干细胞分化为巨核细胞和血小板. 本研究建立的筛选平台可用于揭示人多能干细胞巨核分化和血小板发生的机制. 同时, 鉴定的转录因子可作为重要的编程因子用于规模化血小板的生产.

关键词 人多能干细胞, 巨核细胞, 血小板, 功能筛选

血小板是血液系统中成熟巨核细胞胞质片段化的活性产物, 在机体止血、血栓形成、免疫调节等生理和病理过程中发挥重要作用. 血小板减少是再生障碍性贫血、特发性血小板减少性紫癜等血液系统疾病以及放化疗过程中常见的并发症^[1]. 目前, 志愿者捐献的浓缩血小板输注是临床治疗血小板减少的唯一手段. 但健康供者来源有限、血小板贮存时间短且易

被污染、反复输注产生抗体等问题^[2]严重限制了血小板输注的广泛应用, 导致供需矛盾日益尖锐. 尚无公认的临床可用的血小板生长刺激因子, 因此迫切需要寻求血小板新来源. 人多能干细胞包括人胚胎干细胞和诱导人多能干细胞^[3], 理论上具有无限的自我更新能力和多向分化的潜能, 能够体外模拟巨核细胞分化和血小板发生过程, 是研究人类巨核发育分化的重要

引用格式: 涂茜, 刘翠翠, 吴丹, 等. 人多能干细胞分化为巨核细胞和血小板高效功能筛选模型的建立. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1363–1374
Tu Q, Liu C C, Wu D, et al. Establishment of the screening model for highly efficient generation of megakaryocytes and platelets from human pluripotent stem cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1363–1374, doi: [10.1360/N052017-00270](https://doi.org/10.1360/N052017-00270)

工具,并具有大规模生产血小板用于临床输注的潜能。

人多能干细胞向巨核细胞分化以及生产血小板已经取得了一定的进展。最早的尝试见于2001年Kaufman等人^[4]的报道,该研究将人多能干细胞与基质细胞S17共培养,可产生CD34⁺的造血前体细胞,这些细胞分化产生的混合细胞克隆中包含巨核细胞。日本著名学者Nakauchi课题组^[5]利用人多能干细胞与OP9或者C3H10T1/2细胞共培养的方法获得大量多潜能造血前体细胞,进一步分化获得可被激活的血小板,这是首次从人多能干细胞获得血小板的报道。此后,卢世江等人^[6]通过体内功能实验证明人多能干细胞来源的血小板在小鼠(*Mus musculus*)体内参与损伤修复,首次证实了人多能干细胞来源的血小板在体内具有一定的生理功能。但是,目前人多能干细胞诱导分化为巨核细胞的效率较低,培养周期长,且分化产生血小板的效率也远低于体内的产生效率,尚不能够规模化生产血小板。因此,建立人多能干细胞高效分化模型,深入剖析巨核分化和血小板生成中关键基因或信号通路的作用和机制,并在此基础上优化血小板高效诱导策略,对体外规模化生产血小板具有重要的理论研究和临床应用价值。

转录调控在细胞的命运决定中发挥重要作用。近年来,利用转录因子直接实现细胞命运的转变从而获得巨核细胞和血小板的策略也取得了初步进展。Matsubara课题组^[7]同时过表达*p45NF-E2*, *Maf G*和*Maf K* 3个基因,可使人类和小鼠的3T3成纤维细胞转变成CD41⁺巨核样细胞,并在小鼠体内产生具有部分促凝血功能的小血小板样颗粒。Eto课题组^[8]在人多能干细胞中过表达*BM11*, *BCL-XL*以及*c-MYC* 3个基因,使其永生化为稳定的巨核前体细胞系,而停止3个外源基因的表达,此前体细胞即可以分化产生功能性血小板,为大量产生临床输注用血小板开辟了新的途径。Moreau等人^[9]利用*GATA1*, *FLI1*和*TALI* 3个转录因子成功将人多能干细胞分化为具有长期增殖能力的巨核细胞,且体外扩增的巨核细胞能够持续生成功能性血小板。以上研究表明,转录因子可能作为编程因子成为生产血小板的重要工具。但是,目前利用转录因子调控血小板生成的效率仍然比较低,已经鉴定功能的转录因子还比较有限。因此,利用人多能干细胞分化模型,筛选鉴定新的重要转录因子,可能成为获得用于规模化生产血小板的重要工具。

本研究首先基于脐带血CD34⁺细胞巨核分化体系并利用RNA-SEQ和生物信息学分析,筛选出多个调控巨核分化和血小板产生的重要信号通路和转录因子。利用新建立的人多能干细胞巨核分化和血小板发生模型,对上述关键转录因子进行了功能筛选并鉴定了几种显著增强巨核分化和血小板发生的转录因子。本研究为下一步体外规模化生产血小板提供了重要的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 细胞与质粒。hESCs细胞系H1购自Wicell研究所; mAGM-S3细胞系由中国医学科学院输血研究所马峰教授提供; pCDH-EF1a-MCS质粒由浙江大学医学院黄河教授惠赠; HEK293T细胞由本实验室保存; pMD2G, PsPAX2购自Addgene (美国); pSin-EF2-GFP质粒由本实验室构建; Trans 5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术公司; pGEM-T Easy Vector System购自Promega (美国)。

(2) 实验材料。mTeSR1培养基购自STEMCELL (美国); α -MEM基础培养基、胎牛血清、DMEM/F12培养基和L-谷氨酰胺购自Hyclone (美国); DMEM高糖培养基购自Thermo (美国); IMDM, Accutase消化酶、青霉素/链霉素和非必需氨基酸购自Gibco (美国); 细胞因子TPO, IL-6, SCF, IL-3和IL-11购自PeproTech (美国); 抗坏血酸、转铁蛋白、丝裂霉素C、蛋白质免疫印迹抗体和明胶粉末购自Sigma (美国); Matrigel, Dispase消化酶及流式分析用小鼠抗人单克隆抗体均购自BD (美国); 胰酶/EDTA, DAPI, LA Taq酶、T4连接酶和免疫荧光二抗购自Invitrogen (美国); 质粒小提试剂盒Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System及转染试剂FuGENE HD Transfection Reagent购自Promega; 限制性内切酶*Bmt* I, *Spe* I购自New England Biolabs (美国); β -巯基乙醇购自Biotech (德国); 化学小分子购自Sellseck (美国)。

1.2 人造血前体细胞巨核细胞的诱导分化

利用本课题组前期建立的hESCs与mAGM-S3共培养造血诱导分化体系^[10],在分化第10天,机械剥离“卵石样”细胞,用200目滤膜去除基质细胞团块。收集

细胞, 按 1×10^5 个/mL的细胞密度重悬接种在丝裂霉素C处理过的mAGM-S3基质细胞上. 在造血分化培养基中加入TPO (50 ng/mL), SCF (20 ng/mL), IL-6 (15 ng/mL), IL-3 (15 ng/mL), IL-11 (15 ng/mL), 每3天换液一次, 培养条件为 37°C , 5% CO_2 .

1.3 脐带血CD34⁺细胞巨核细胞诱导分化模型

两次磁珠分选获得纯度为95%以上的脐带血CD34⁺细胞, 按 1×10^5 个/mL的细胞密度接种于StemSpanTM SFEM培养基中. 在分化的第0~6天, 在培养基中加入TPO (50 ng/mL), SCF (20 ng/mL), IL-3 (15 ng/mL), 第6~15天培养基中加入TPO (50 ng/mL), IL-11 (20 ng/mL), 每3天换液一次. 培养条件为 37°C , 5% CO_2 .

1.4 Wright-Giemsa染色以及免疫荧光染色

取 2×10^4 个细胞, 重悬于50 μL PBS缓冲液中, 在细胞离心涂片机中, $50 \times g$ 离心5 min. 分别进行Wright-Giemsa染色和免疫荧光染色(Alexa flour-594-CD41; FITC-488-phalloidine)^[10].

1.5 病毒包装和感染

利用慢病毒包装体系pMD2G, PsPAX以及FuGENE HD进行细胞转染. 取细胞 1×10^5 个, 重悬于200 μL 造血分化培养基中, 加入10 μL 浓缩病毒和polybrene (6 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-aldrich, 美国), 室温 $300 \times g$ 离心90 min. 10 h后更换巨核分化培养基诱导巨核分化.

1.6 血小板的获取

正常供者来源的血小板的获取: 将富含血小板的血浆 $200 \times g$ 离心5 min, 收集上清, $800 \times g$ 离心10 min, 将细胞沉淀用HEPES-台式缓冲液重悬.

分化诱导体系中血小板样颗粒的获取: 收集培养后期的培养上清10 mL, $800 \times g$ 离心10 min, 将沉淀用包含1 mmol/L的前列腺素E1 (PGE1, Sigma-Aldrich)的2 mL CGS缓冲液(10 mmol/L 柠檬酸钠、30 mmol/L D-葡萄糖、120 mmol/L氯化钠, 用柠檬酸调节pH至6.5)重悬, (2%~12%) BSA密度梯度离心 $80 \times g$ 离心10 min, 收集最上层细胞悬液, $800 \times g$ 离心10 min即可获得血小板样颗粒.

1.7 血小板功能分析

黏附: 用100 $\mu\text{g/mL}$ 纤维蛋白原包被盖玻片, 随后将血小板铺在盖玻片上, 加入2 U/mL凝血酶 37°C 孵育30 min. 随后用鼠抗人CD41a一抗联合Alexa flour-594荧光标记的山羊抗鼠二抗标记细胞的表面标志蛋白分子CD41a, 同时用FITC-488荧光标记的鬼笔环肽特异性结合骨架蛋白的微丝结构中, 观察血小板铺展状态.

聚集: 用1 $\mu\text{g/mL}$ 钙黄绿素(Invitrogen)分别标记人外周血来源的血小板和培养获得的血小板颗粒(2×10^5 个), 分别与人外周血小板(2×10^7 个)混合, 混合的血小板重悬于在用100 $\mu\text{g/mL}$ 纤维蛋白原包被的24孔细胞培养皿中, $80 \times g$ 离心5 min. 用PBS洗一遍后, 用含0.5 U/mL的凝血酶的培养基 37°C 孵育15 min. 最后用Alexa flour-594荧光标记的鬼笔环肽指示血小板骨架.

1.8 流式细胞术

离心后分别收集细胞沉淀和培养上清, 以1:100的比例稀释抗体(APC-CD41a和PE-CD42b), 室温标记30 min. 流式细胞仪(LSR II, BD)分别检测巨核细胞和血小板颗粒的比例. 用FlowJo.V10软件进行数据分析.

1.9 RNA-SEQ和数据分析

在脐带血CD34⁺细胞向巨核分化的第6, 8, 10天分别收集 2×10^6 个细胞, Trizol (Ambion, 美国)裂解提取RNA, 质检后由华大基因BGI公司进行转录组测序分析. 利用GSEA, GO分析差异基因(FPKM>1, 且d10/d6 ≥ 2)的富集情况, IPA (ingenuity pathways analysis)软件分析显著变化的信号通路(FPKM>1, 且d10/d6 ≥ 2), 基因热图基于转录因子的相对表达量log10 (FPKM+1)做出.

1.10 数据统计

每次实验独立重复3次, 检测数据以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示. 利用GraphPad Prism软件对实验数据作标准t检验分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 RNA-SEQ分析探究调控脐带血造血前体细胞巨核分化的机制

本课题组前期以脐带血CD34⁺细胞为模型, 基于

一种三维旋转培养装置并与化学小分子组合,建立了可高效诱导巨核分化和产生血小板的体系.该培养体系极大地提高了活性血小板的产量,较目前已有方法提高了近10倍^[11].为了进一步探究该过程的机制,在巨核分化的不同时间点(第6, 8, 10天)分别收集细胞进行全基因组转录组测序,以期筛选调控巨核细胞分化和血小板产生的关键基因和信号通路.基于巨核分化第6天和第10天的RNA-SEQ数据,首先筛选出1172个随着巨核分化显著上调的基因($d10/d6 \geq 2$).通过GSEA (gene set enrichment analysis)分析发现,巨核细胞标志分子、肌动蛋白细胞骨架调节、血小板以及血小板聚集和血栓形成相关基因都特异性富集在分化第10天一侧(图1A).随后对差异基因进行GO (Gene Ontology)分析,其结果显示,这些差异表达的基因多与血小板激活和功能、骨架蛋白变化以及细胞黏附等相关(图1B).上述结果在分子水平验证了在采用的体系中,巨核细胞分化和功能性血小板产生成功发生.

利用IPA进一步分析了巨核分化后期(d10)显著变化的信号通路.如图示(图1C), Ras-MAPK, cGMP-PKG, PI3K-Akt等信号通路在巨核分化后期显著激活($Z \text{ score} > 2$),提示这些信号通路可能在巨核细胞分化和血小板生成过程中发挥正向调控作用.为了验证上述假设,在巨核诱导过程中分别添加多种信号通路的小分子抑制剂,检测其对巨核分化和血小板生成的影响,同时以已知的ROCK抑制剂Y-27632^[12,13]作为阳性对照.流式检测发现,PKG抑制剂HA-1004和HA-1007, CaMK II 抑制剂KN-62, KN-93, PI3K抑制剂LY 294002以及Akt抑制剂Triciribine均显著抑制巨核分化(图1D). Y-27632则显著促进巨核分化,与已有的报道一致.而在后期血小板生成阶段, MAPK抑制剂SB-202190和PD-98059, PI3K抑制剂Wortmannin, Akt抑制剂Triciribine均显著抑制血小板颗粒的生成,而Y-27632则促进血小板颗粒的生成(图1E).上述结果表明,该脐带血巨核分化模型筛选鉴定的重要信号通路结果可被验证,提示其他筛选基因也具有验证价值.

已有的研究表明,转录因子在巨核分化和血小板生成过程中发挥至关重要的作用^[14-18].因此,同时也富集了上述筛选体系中随着巨核分化显著变化的转录因子.如图所示(图1F),随着巨核分化, *NFE2*, *GATA1*, *GFI1B*等已经报道的调控巨核分化和血小板发生的重要转录因子表达逐渐上升,提示本课题组的筛选体系

也富集了众多调控巨核分化和血小板发生的重要转录因子.因此,基于热图分析和文献报道选取其中一些转录因子(表1)作为候选基因,继续进行下一步的功能筛选.

2.2 转录因子文库构建与功能鉴定

为了探索上述转录因子在巨核分化和血小板生成中的功能,将候选的21个转录因子(表1)全部构建到带有FLAG标签和GFP蛋白的pSin-EF2-GFP-Gene过表达质粒(图2A).利用FLAG标签的Western blot (图2B)和GFP荧光表达(图2C)均表明,所有的转录因子表达载体构建成功.

为了初步验证这些转录因子是否可以促进巨核分化和血小板发生,首先在脐带血CD34⁺细胞巨核分化的第3天进行病毒感染,感染后第2天可见绿色荧光, GFP阳性率可达到50%左右(图2C).随后,利用流式细胞术分别在第6, 9, 12天检测GFP⁺细胞中CD41a⁺CD42b⁺巨

表1 候选转录因子文库

候选基因编号	转录因子	荧光标签	蛋白标签
1	<i>NFE2</i>	GFP	Flag
2	<i>GATA1</i>	GFP	Flag
3	<i>GFI1B</i>	GFP	Flag
4	<i>TAL1</i>	GFP	Flag
5	<i>MEIS1</i>	GFP	Flag
6	<i>GATA2</i>	GFP	Flag
7	<i>RUNX1</i>	GFP	Flag
8	<i>PBX1</i>	GFP	Flag
9	<i>GFI</i>	GFP	Flag
10	<i>HOXA9</i>	GFP	Flag
11	<i>ERG</i>	GFP	Flag
12	<i>FLI1</i>	GFP	Flag
13	<i>GATA3</i>	GFP	Flag
14	<i>HLF</i>	GFP	Flag
15	<i>HHEX</i>	GFP	Flag
16	<i>SOX7</i>	GFP	Flag
17	<i>SOX17</i>	GFP	Flag
18	<i>LMO2</i>	GFP	Flag
19	<i>HIF1A</i>	GFP	Flag
20	<i>FOS</i>	GFP	Flag
21	<i>FOSB</i>	GFP	Flag

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00270>

图2 转录因子文库构建与功能鉴定

A: 构建pSin-EF2-GFP-Pur的转录因子过表达质粒; B: Western blot验证Flag标签蛋白的表达。EV: empty vector, 空载对照; C: 过表达造血相关转录因子后, 流式分析可见绿色荧光; D: 流式分析过表达转录因子对细胞胞体大小的影响, *RUNX1*, *ERG*过表达可使细胞胞体明显增大; E: 流式分析过表达转录因子对CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞产生的影响, *RUNX1*, *ERG*和*SOX7*过表达后可促进巨核细胞成熟; F: Nikon Eclipse系列倒置显微镜(日本)下观察过表达转录因子后前血小板生成情况, *RUNX1*, *ERG*和*SOX7*过表达后前血小板增多, 标尺: 20 μm; G: 转录因子过表达对CD41a⁺CD42b⁺血小板样颗粒(platelet-like particles, PLPs)生成的影响, 过表达*RUNX1*, *ERG*和*SOX7*促进血小板颗粒生成

核细胞的比例。结果表明, 过表达*RUNX1*和*ERG*全程显著促进巨核细胞生成, 与对照组相比, CD41a⁺CD42b⁺细胞的比例有大约2~3倍的提高(图2D)。而*SOX7*过表达明显促进分化后期(d12)巨核细胞的生成, *HOXA9*等则对巨核分化无显著促进作用(图2D)。形态观察发现, 随着巨核分化, *RUNX1*, *ERG*过表达组细胞胞体明显增大, 流式大小统计进一步证明, *RUNX1*, *ERG*过表达促进胞体增大(图2E), 提示其促进巨核细胞多倍

体化。同时, 在后期血小板生成阶段, 与对照组相比, *RUNX1*, *ERG*过表达组产生大量典型的伪足状前血小板(图2F)。流式进一步检测培养上清中CD41a⁺CD42b⁺的血小板颗粒发现, 与对照组相比, 过表达*RUNX1*显著促进血小板生成, 使CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒的比例从10.3%增加到35.4%; 过表达*ERG*也使血小板颗粒的比例增加了24.3% (10.3%±1.4% vs. 24.3%±2.5%, $P<0.05$); 同时过表达*SOX7*对血小板生成也有一定促

进作用(图2G). 以上结果说明, 在脐带血巨核分化模型中, *RUNX1*, *ERG*和*SOX7*显著促进巨核细胞成熟和血小板生成, 构建的转录因子文库可用, 可以进一步应用于人多能干细胞巨核分化和血小板发生的筛选.

2.3 人多能干细胞定向分化产生巨核细胞和功能性血小板

为了深入探索调控巨核分化和血小板生成的关键基因, 以不受供者来源限制、方便基因操作的人多能干细胞为模型, 建立并优化了人多能干细胞体外巨核分化体系. 该培养体系主要分为早期造血分化和后期巨核分化两部分, 即在造血分化后期得到“卵石

样”造血前体细胞, 将其机械剥离后继续诱导巨核分化(图3A). 在巨核细胞定向分化诱导的第0天, 细胞状态良好, 折光性强; 第3天可见部分胞体变大的细胞(白色箭头); 第6天胞体变大的细胞增多, 并伸出伪足状前血小板(黑色箭头); 第9天前血小板比例明显增多. 多倍体化即细胞胞体较大、多核且细胞核多分叶, 是对巨核细胞进行形态辨认最直接的特性^[19]. 瑞氏-吉姆萨染色表明, 分化后期出现的胞体增大的细胞具有巨核细胞典型的多倍体特征(图3B). 而且, 这些巨核细胞在凝血酶(thrombin)的刺激下, 会通过其骨架蛋白F-actin的重排使细胞进一步铺展(图3C), 证明培养得到的多倍体巨核细胞具有功能.

图3 人多能干细胞定向分化产生巨核细胞和功能性血小板

A: 人多能干细胞来源的造血前体细胞定向巨核分化模型的建立, 白色箭头指示胞体变大的细胞, 黑色箭头指示伪足状前血小板, 标尺: 20 μm ; B: 瑞氏-吉姆萨染色见多倍体巨核细胞, 标尺: 10 μm ; C: 荧光显微镜下见凝血酶可激活巨核细胞, 使其铺展, 标尺: 20 μm ; D: 荧光显微镜下见静息条件外周血来源与人多能干细胞来源的血小板颗粒均具有典型的 β -tubulin环状结构, 标尺: 5 μm ; E: 荧光显微镜下见外周血来源与人多能干细胞来源的血小板均可被凝血酶激活, 标尺: 5 μm ; F: 荧光显微镜下见人多能干细胞来源的血小板参与血小板的聚集, 标尺: 5 μm . DAPI即4',6-二脒基-2-苯基吡啶, 进行核复染, CD41a是巨核细胞表面标志蛋白分子, FITC-488荧光标记鬼笔环肽特异性结合骨架蛋白的微丝结构

为了评价该体系的血小板生成能力, 利用BSA密度梯度离心从巨核分化后期的培养上清中富集分离出血小板颗粒. 与正常外周血血小板相比, 培养得到的血小板颗粒具有典型的 β -tubulin环状结构(图3D). 为了进一步评价血小板颗粒的功能, 利用人外周血血小板做对照, 对富集纯化的血小板颗粒进行了体外功能检测. 首先, 分别用凝血酶刺激外周血血小板以及培养获得的血小板颗粒并进行骨架蛋白染色. 结果表明, 两者均可以在凝血酶的作用下成功激活黏附, 并进一步铺展成板状结构, 形态上没有显著差异(图3E). 而且, 与外周血来源的血小板相比, 该诱导体系获得的血小板颗粒也可以在凝血酶的刺激下, 激活并参与血小板的聚集(图3F). 以上结果表明, 本课题组建立的体系可成功诱导人多能干细胞高效分化产生具有典型结构的巨核细胞和功能性血小板颗粒.

2.4 人多能干细胞模型筛选巨核相关转录因子

随后, 分别将上述转录因子在人多能干细胞模型中进行进一步的功能鉴定. 在巨核定向分化的起始阶段病毒感染hESCs来源的造血前体细胞, 感染后的第2天即可见绿色荧光. 分别在病毒感染后第3, 6天检测GFP⁺的细胞中CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞的比例, 同时检测培养上清中CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒的比例. 结果表明, 过表达*RUNX1*使得CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞的比例增加了64.3% (17.1% $\pm$ 2.7% vs. 28.1% $\pm$ 2.6%, $P<0.05$), 过表达*ERG*则使巨核细胞的比例增加了86.5% (17.1% $\pm$ 2.7% vs. 31.9% $\pm$ 3.3%, $P<0.05$), 说明*RUNX1*, *ERG*过表达均显著促进人多能干细胞巨核分化(图4A). 而*HOXA9*, *SOX7*, *SOX17*等基因过表达对巨核分化无显著影响(图4A). 本课题组同时检测了巨核细胞的成熟情况. Nikon Eclips^{ti}系列倒置显微镜下观察发现, *RUNX1*过表达的细胞(GFP⁺细胞)胞体相对较大, 流式进一步统计GFP⁺细胞的大小发现, *RUNX1*过表达能够明显促进细胞胞体增大, 提示*RUNX1*过表达促进巨核细胞的多倍体化过程(图4B). 而*ERG*, *HOXA9*等基因过表达则对胞体大小并没有显著影响(图4B). 在后期血小板生成阶段(病毒感染第6天), 与对照组相比, 过表达*RUNX1*显著促进伪足状前血小板形成, 而*ERG*过表达组前血小板的产生的比例也高于对照组(图4C). 流式统计进一步证明, *RUNX1*过表达使CD41a⁺CD42b⁺血小板颗粒的比例增加了34.1% (17.6% $\pm$ 1.0% vs. 23.6% $\pm$ 2.2%), 而*ERG*过

表达组血小板颗粒的比例提高了33.5% (17.6% $\pm$ 1.0% vs. 23.5% $\pm$ 2.3%), 而其他各组对血小板生成无显著影响(图4D). 综上所述, *RUNX1*, *ERG*过表达能够明显促进人多能干细胞向巨核细胞分化和血小板生成, 这两种转录因子可能用作重要的编程因子用于血小板的规模化生产.

3 讨论

本研究首先基于脐带血巨核分化体系并采用转录组分析, 初步鉴定了调控脐带血CD34⁺细胞巨核分化和血小板生成的关键信号通路和核心转录因子. 同时, 为了开展候选转录因子的功能筛选, 利用基质细胞共培养的模型使人多能干细胞成功分化为巨核细胞并产生功能性的血小板. 通过功能筛选, 发现*RUNX1*和*ERG*过表达显著促进人多能干细胞巨核分化和血小板生成, 提示它们可能作为重要的编程因子用于血小板的规模化生产.

本课题组前期研究建立了脐带血CD34⁺细胞高效巨核分化和血小板生成模型, 该体系与静息状态相比能够产生4倍以上的活性血小板^[11]. 为了探究巨核细胞成熟和血小板生成的重要转录因子和信号通路, 对分化不同阶段的细胞进行了转录组测序, 同时利用GSEA, GO, IPA等多种策略进行了生物信息学分析. 采用此策略, 系统揭示了调控脐带血CD34⁺细胞巨核分化和血小板的重要信号通路, 这一结果具有重要的创新意义. 同时, 利用此模型, 确定了可能调控巨核分化和血小板发生的重要候选转录因子.

人多能干细胞不受供者来源限制, 能够模拟体内造血分化和巨核发生过程, 是研究人类巨核发育和用于临床生产血小板的重要工具. 本研究以人多能干细胞为模型, 建立了体外造血分化和巨核分化体系, 可以快速高效获得功能性血小板颗粒. 近年来, 关于人多能干细胞定向分化为巨核细胞和血小板的研究取得了初步进展, 但分化效率低一直是研究者努力突破的难题. Eto等人^[20]在2002年利用hESC与OP9细胞共培养, 可以使 1×10^4 hES细胞经历12天的分化后产生 4×10^4 巨核细胞, 但这些巨核细胞仅有10%能产生血小板. 卢世江等人^[6]在2011年对hESC来源的成血管细胞(hemangioblasts, BC)进行巨核细胞诱导分化, 使得 1.0×10^7 hESCs可以高效产生 6×10^8 CD41a⁺巨核细胞, 但是每个巨核细胞仅能产生 6.7 ± 0.4 个血小板. AGM

图4 人多能干细胞模型筛选巨核相关转录因子

A: 流式分析过表达转录因子CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞产生的影响, *RUNX1*, *ERG*过表达显著促进人多能干细胞巨核分化; B: Nikon Eclipsi系列倒置显微镜下观察过表达转录因子(GFP阳性细胞)胞体大小变化, *RUNX1*, *ERG*过表达后胞体增大(上), 标尺: 20 μm, 流式分析过表达转录因子(GFP阳性细胞)胞体大小变化, *RUNX1*, *ERG*过表达后细胞胞体增大(下); C: Nikon Eclipsi系列倒置显微镜下观察过表达*RUNX1*, *ERG*后细胞胞体增大, 标尺: 20 μm; D: 转录因子过表达对CD41a⁺CD42b⁺ PLPs生成的影响, 过表达*RUNX1*, *ERG*促进血小板生成

区是胚胎成年造血的部位。毛斌等人^[21]在2016年利用人胚胎干细胞与mAGM-S3基质细胞共培养体系, 得到了具有成年造血特性的脱核红细胞, 证明该体系能够很好地模拟体内的造血发生过程。而在本研究建立的巨核分化体系中, 平均每个人多能干细胞可产生约120~240个“卵石样”造血前体细胞, 进一步分化产生大约360~720个CD41a⁺CD42b⁺巨核细胞, 而每个巨核细胞可以产生12~36个血小板, 使得人多能干细胞分化为巨核细胞和血小板效率大大提高。当然, 与体内

一个巨核细胞可产生约2000~10000个血小板相比, 效率依旧显著低下, 因此人多能干细胞高效生成巨核细胞和血小板还有巨大的提高空间。

利用转录因子直接实现细胞命运的转变对于优化血小板生成策略有重要的提示意义。为了筛选调控巨核分化和血小板生成的关键基因, 本研究利用人多能干细胞巨核分化体系进行了转录因子文库的功能鉴定。结果发现, *RUNX1*和*ERG*可以显著促进巨核细胞分化、成熟和血小板生成。前期已有研究证

明, *RUNX1*和*ERG*对于血细胞的分化成熟具有重要作用^[14-18]. 本研究则清晰地证明*RUNX1*和*ERG*能显著促进人多能干细胞巨核分化和血小板生成. 此外, 还筛选了在造血发生的早期阶段或其他谱系发生中发挥重要作用的*HOXA9*, *SOX7*, *SOX17*等基因^[22-28]. 在本诱导体系中, 过表达*HOXA9*, *SOX7*, *SOX17*等基因对巨核细胞和血小板的产生都没有明显的促进作用, 提示该巨核细胞诱导模型可以用于特异性筛选巨核分化和血小板生成相关的基因. 而在脐带血模型中显著促进巨核细胞成熟的*SOX7*, 在人多能干细胞模型中则未

见明显的促进作用, 说明这两种模型存在某些基因功能的特异性.

综上所述, 本研究利用人多能干细胞来源的造血前体细胞, 可高效产生功能性的血小板, 为规模化生产血小板提供了可能. 另外, 该体系可以对巨核分化和血小板生成相关的基因进行特异性功能筛选, 在后续的研究中, 这些基因可作为编程因子或者联合运用化学小分子和三维旋转培养装置进一步完善巨核分化和血小板生成体系, 为体外血小板的规模化生产和临床应用奠定基础.

参考文献

- Thon J N, Italiano J E. Platelet formation. *Semin Hematol*, 2010, 47: 220-226
- Williamson L M, Devine D V. Challenges in the management of the blood supply. *Lancet*, 2013, 381: 1866-1875
- Telias M, Ben-Yosef D. Modeling neurodevelopmental disorders using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10: 494-511
- Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10716-10721
- Takayama N, Nishikii H, Usui J, et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*, 2008, 111: 5298-5306
- Lu S J, Li F, Yin H, et al. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional *in vitro* and in the microcirculation of living mice. *Cell Res*, 2011, 21: 530-545
- Ono Y, Wang Y, Suzuki H, et al. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood*, 2012, 120: 3812-3821
- Nakamura S, Takayama N, Hirata S, et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 535-548
- Moreau T, Evans A L, Vasquez L, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun*, 2016, 7: 11208
- 高洁, 杨亦青, 庞素蕾, 等. 人胚胎干细胞高效分化为巨核细胞模型的建立. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36: 1470-1477
- Yang Y, Liu C C, Lei X, et al. Integrated biophysical and biochemical signals augment megakaryopoiesis and thrombopoiesis in a three-dimensional rotary culture system. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5: 175-185
- Avanzi M P, Chen A, He W, et al. Optimizing megakaryocyte polyploidization by targeting multiple pathways of cytokinesis. *Transfusion*, 2012, 52: 2406-2413
- Avanzi M P, Goldberg F, Davila J, et al. Rho kinase inhibition drives megakaryocyte polyploidization and proplatelet formation through *MYC* and *NFE2* downregulation. *Br J Haematol*, 2014, 164: 867-876
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*, 2004, 10: 299-304
- Growney J D, Shigematsu H, Li Z, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood*, 2005, 106: 494-504
- Kuvaridina O N, Herglotz J, Kolodziej S, et al. RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood*, 2015, 125: 3570-3579
- Loughran S J, Kruse E A, Hacking D F, et al. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 2008, 9: 810-819
- Rainis L, Toki T, Pimanda J E, et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Res*, 2005, 65: 7596-7602
- Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 2008, 111: 981-986
- Eto K, Murphy R, Kerrigan S W, et al. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc*

- [Natl Acad Sci USA](#), 2002, 99: 12819–12824
- 21 Mao B, Huang S, Lu X, et al. Early development of definitive erythroblasts from human pluripotent stem cells defined by expression of glycoporphin A/CD235a, CD34, and CD36. [Stem Cell Rep](#), 2016, 7: 869–883
 - 22 Ramos-Mejia V, Navarro-Montero O, Ayllón V, et al. HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood*, 2014, 124: 3065–3075
 - 23 Hu Y L, Fong S, Ferrell C, et al. HOXA9 modulates its oncogenic partner Meis1 to influence normal hematopoiesis. [Mol Cell Biol](#), 2009, 29: 5181–5192
 - 24 Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, et al. Stauprimide priming of human embryonic stem cells toward definitive endoderm. *Cell J (Yakhteh)*, 2014, 16: 63
 - 25 Gandillet A, Serrano A G, Pearson S, et al. Sox7-sustained expression alters the balance between proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors at the onset of blood specification. [Blood](#), 2009, 114: 4813–4822
 - 26 Lilly A J, Costa G, Largeot A, et al. Interplay between SOX7 and RUNX1 regulates hemogenic endothelial fate in the yolk sac. [Development](#), 2016, 143: 4341–4351
 - 27 Choi E, Kraus M R C, Lemaire L A, et al. Dual lineage-specific expression of Sox17 during mouse embryogenesis. [Stem Cells](#), 2012, 30: 2297–2308
 - 28 Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, et al. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. [Blood](#), 2013, 121: 447–458

Establishment of the screening model for highly efficient generation of megakaryocytes and platelets from human pluripotent stem cells

TU Qian^{1,2,3}, LIU CuiCui^{1,2,3}, WU Dan^{1,2,3}, WEN YuQi^{1,2,3}, WANG HongTao^{1,2,3}, SU Pei^{1,2,3},
LIU YiYing^{1,2,3}, MA Feng^{1,4}, SHI LiHong^{1,2,3} & ZHOU JiaXi^{1,2,3}

1 State Key Laboratory of Experimental Hematology, Blood Diseases Hospital (Institute of Hematology),

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

2 Center for Stem Cell Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China;

3 Department of Stem Cell & Regenerative Medicine, Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China;

4 Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu 610052, China

Human pluripotent stem cells (hPSCs) have the capacity to differentiate into all mature blood cell types including megakaryocytes, providing a potential source to generate large-scale platelets to cope with the urgent clinical shortage. To generate platelets in large-scale *in vitro*, it is urgent to establish a highly efficient model and identify critical genes mediating the megakaryocytic differentiation and platelet generation. In this study, we performed RNA-Seq analysis in cord blood CD34⁺ cells collected from day 6 to day 10 after megakaryocytic differentiation and identified several signal pathways and transcriptional factors involved in this process. To explore the key regulators mediating megakaryocytic differentiation and platelet generation from hPSCs, we subsequently established a megakaryocytic differentiation system by co-culturing hPSCs with the mouse AGM-S3 (mAGM-S3) feeder cells and found that functional platelet could be generated. Through functional validation, we found that RUNX1 and ERG significantly promoted the generation of megakaryocytes and platelets from hPSCs. In conclusion, we established a highly efficient screening platform suitable for the identification of key regulators mediating megakaryocytic differentiation and platelet generation from hPSCs. The identified regulators could be potentially manipulated for large-scale generation of platelets for therapeutic applications in regenerative medicine.

human pluripotent stem cells, megakaryocytes, platelets, functional screening

doi: [10.1360/N052017-00270](https://doi.org/10.1360/N052017-00270)