

研究论文

小鼠胎肝红系细胞在分化过程中形态学观察 及时序性表达分析

郑雅娟 陈 涛 杨祖立 曹玲玲 毛群铨 薛建有 吴业卿 张世馥*

(浙江理工大学生命科学院蛋白质组学与分子酶学实验室, 杭州 310018)

摘要 小鼠胎肝是小鼠发育早期主要的造血器官, 红系细胞在胎肝造血过程中形态特征和组成成分等方面发生了明显变化。根据红系细胞体积的变化, 利用Count star细胞计数仪对小鼠E12.5-E17.5胎肝中直径8~14 μm 细胞进行数量统计, 再结合观测到的红系细胞的形态特征和血红蛋白表达量的不同, 将E9.5-E17.5胎肝中的细胞分为10类。统计结果显示, 随着胎肝造血系统的发育, 哺乳类红系细胞在终末分化时出现细胞体积减小、细胞核固缩、排核和血红蛋白表达量增加等时序性变化。红系细胞表面特异标志Ter119和CD71在EryD中高表达而在成体骨髓细胞和外周血细胞中表达较低的结果表明胎肝中红系细胞具有较高的分化能力。这些数据为研究红系分化、克隆红系分化相关基因及探讨红白血病发生的机制提供了理论依据。

关键词 胎肝; 红系细胞; 时序性分化; 免疫细胞化学

胚胎时期造血最早始于卵黄囊的中胚层^[1]。小鼠E7.5时, 在卵黄囊的造血岛产生最初的红系细胞——原始的成红细胞(primitive erythroblasts, EryP), EryP随后进入胚胎血流、肝脏, 在胎肝中进行排核^[2], 直至E16.5从血循环中消失。随着胚胎发育造血中心发生转移, 造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)在E10.5时转移到肝脏, 肝脏成为胚胎时期主要的造血器官^[3]。此时胎肝中除含有EryP外还出现了另一种红系细胞——特定性成红细胞(definitive erythroblasts, EryD)。EryD进入终末分化, 历经原幼红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、网织红细胞、成熟的红细胞五种细胞类型。在此分化过程中细胞出现时序性特征: 细胞开始停止分裂、表达红系细胞特异的血红蛋白、细胞体积变小、细胞核偏位、核固缩、自然排核等。这一过程的转变, 除了与红系细胞分化的微环境, 与巨噬细胞^[4-7]、间充质细胞^[8-9]等之间的相互作用外, 与一些红系时序性分化相关的因子, 如Runx1^[10]、GATA-1、EKLf、FOG-1、NF-E2等之间的相互协同作用对其时序性分化也具有重要作用。而鉴定这些因子作用于红系分化的哪个阶段, 对阐明红系细胞终末分化的机制及红系细胞癌变机理的研究具有重要的意义。目前, 运用小鼠胎肝这

一模型来研究红白血病机制的报道很多, 但对红系细胞在正常发育过程中的形态特征、表面标志、数量的变化等详细的时序性改变未见报道。本文运用Count star细胞计数仪、形态学分析和免疫荧光结合激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)等方法对小鼠E9.5-E17.5肝脏组织中红系细胞的大小、种类进行分类统计, 揭示了胎肝中每类红系细胞在造血过程中不同阶段的数量比例, 为后续的差异蛋白质组学和红系分化相关因子的定量定性以及功能研究提供了理论依据, 并对红系细胞表面标志Ter119和CD71进行了定量分析^[11-13], 为揭示胎肝红系细胞的分化能力^[14]奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 ICR小鼠, 6~8周龄, 性成熟, 雌鼠体重25~30 g, 雄鼠体重35~40 g, 购自浙江中医药大学。自由取食、饮水, 人工控温22~24 $^{\circ}\text{C}$, 光照周期为12 h光照/12 h黑暗。适应性饲养1周后, 每天晚

收稿日期: 2011-11-16 接受日期: 2012-01-18

浙江理工大学研究生创新基金(No.YCX-S11019)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86843336, E-mail: cklzhang@yahoo.com.cn

上8:00将雌雄小鼠以1:1的比例合笼,次日晨以发现阴栓为妊娠,以中午12时定为妊娠第0.5 d。

1.1.2 主要试剂 4%多聚甲醛(Sigma公司),胎牛血清(HyClone公司),IMDM培养基(Gibco公司),联苯胺(中国远航试剂厂),吖啶橙/溴化乙锭(南京凯基生物科技发展有限公司),瑞氏染液(杭州微生物试剂厂),CD71抗体(武汉博士德生物工程有限公司),Ter-119抗体(Abcam公司),FITC标记的二抗(羊抗鼠)IgG和Cy3标记的羊抗兔IgG(Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 胚胎的分离与固定 将妊娠9.5~17.5 d的ICR小鼠颈椎脱臼处死,在解剖显微镜下分离胚胎,保持胚胎的结构完整,将胚胎置于含有4%多聚甲醛的试管中固定4 h后置于解剖显微镜下拍照观察。

1.2.2 胎肝细胞的分离与培养 上述方法取出胚胎后,从胚胎腹部剥离肝脏组织,将胚胎肝脏置于D-hank's缓冲液中,肝脏组织剪碎后,依次过100目和200目细胞筛,将单个细胞转至15 mL离心管中,200×g,于室温离心10 min,弃上清,用D-hank's缓冲液洗2次,计数后接种于含有20% FBS的IMDM培养基中,于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.3 联苯胺染色对胎肝中红系细胞的形态学观察 联苯胺染色:取胎肝细胞,1 000 r/min、3 min,弃上清,加入200 μL生理盐水洗1次,去除残留培养基,离心后弃上清,加入预混的联苯胺染液:30% H₂O₂(50:1, V:V)100 μL,滴片镜检。

1.2.4 胎肝细胞大小统计 采用Count star自动细胞计数仪(Inno-Alliance Biotech),对小鼠E12.5-E17.5胎肝中细胞大小进行统计。取出上述胎肝细胞20 μL于细胞计数板上计数并统计细胞大小。

1.2.5 胎肝中红系细胞和非红系细胞分类统计 联苯胺染色同1.2.3。瑞氏染色:常规瑞氏染色。吖啶橙(AO)/溴化乙锭(EB)双荧光染色:取5×10⁵/mL胎肝细胞涂片;将AO和EB等体积轻轻混匀;吸10 μL混合液滴于玻片上,于荧光显微镜510 nm激发波长下观察。E9.5-E17.5的胎肝细胞每组重复3次,每次在滴片中任意选取50个区域观测统计。

1.2.6 红系特异表面标志Ter119和CD71在红系细胞和非红系细胞中的定量分析 胎肝细胞爬片培养后,4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗3次,预冷的丙酮孵育3 min,1% BSA封闭30 min。样品封闭后与一抗CD71(1:1 000稀释)和Ter119(1:3 000稀释)混合,4℃孵育过夜,次日PBST洗3次,与FITC标记的

二抗(羊抗鼠)IgG(1:2 000稀释)和Cy3标记的羊抗兔IgG(1:2 000稀释)混合,避光孵育1 h, PBST漂洗后滴加抗荧光淬灭剂,盖玻片密封,暗室中用激光共聚焦显微镜扫描,利用EZ-C1 3.20软件对红系细胞和非红系细胞中两种蛋白质进行定量分析。每组样品重复3次,每组照片划分为5个视野进行荧光统计观察。

1.2.7 统计学分析 实验中定量数据均以平均值±偏差表示,使用Minitab 15软件进行统计学分析,t检验以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠E9.5-E17.5胚胎及肝脏的形态学观察

肝脏是胚胎发育过程中的主要造血器官,E12.5-E15.5是肝脏造血活跃期。E12.5出现肉眼可见的肝脏组织,且随胚胎发育,肝脏组织逐渐增大,直至胚胎发育成熟(图1A)。E13.5肝脏已经发育完善,储存有大量造血细胞,体积较大,约占胚胎体积的1/6(图1B黑色箭头所示和图1C)。

2.2 小鼠E9.5-E17.5胎肝中红系细胞形态学观察

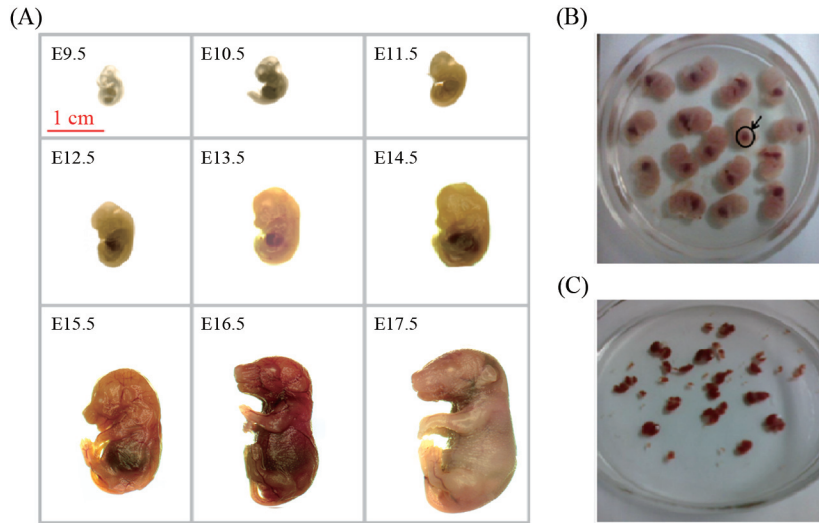
小鼠E9.5-E17.5胎肝中红系细胞出现明显动态变化。E9.5-E11.5胎肝中红系细胞体积较大,细胞直径在10~14 μm之间,联苯胺染色细胞核和细胞质着色都很深,表明有大量血红蛋白表达(图2A红色箭头所示,图2B为EryP的放大图),随着胚胎发育,细胞数量逐渐减少,直至E15.5时消失,据报道^[3],此类细胞是EryP。

在E10.5时,EryD中的原幼红细胞开始出现,EryD联苯胺着色与EryP不同,它的细胞核着色深,而胞质着色浅(图2A黑色箭头所示,图2C为EryD的放大图),EryD细胞在E10.5-E11.5时所占比例很低,但在E12.5-E17.5先是以指数比率增加,成为胎肝中的主要细胞类型,而后逐渐减少,在此期间细胞形态发生明显变化:细胞体积逐渐变小(细胞直径在8~12 μm之间)、细胞核偏位、核固缩、自然排核等,EryD对应上述特征历经原幼红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、网织红细胞五种细胞类型。

成体肝脏细胞从E15.5天开始出现,并迅速取代已分化完全的红系细胞,成为胎肝中的主要细胞类型(图2A紫色箭头所示,图2D为成体肝脏细胞放大图)。

2.3 小鼠E12.5-E17.5胎肝中直径8, 10, 12, 14 μm的细胞数量统计

采用Count star自动细胞计数仪,对E12.5-17.5胎肝中直径8, 10, 12, 14 μm的细胞进行统计(表1),结果(图3)显示直径14 μm的细胞比例较低,维持在3%



A: E9.5-E17.5小鼠胚胎图谱; B: E13.5小鼠胚胎; C: E13.5小鼠胚胎肝脏。

A: atlas of E9.5-E17.5 embryos of mouse; B: E13.5 embryos of mouse; C: E13.5 fetal livers of mouse.

图1 小鼠E9.5-E17.5胚胎及肝脏的形态学观察

Fig.1 The morphological observation of E9.5-E17.5 mouse fetal livers

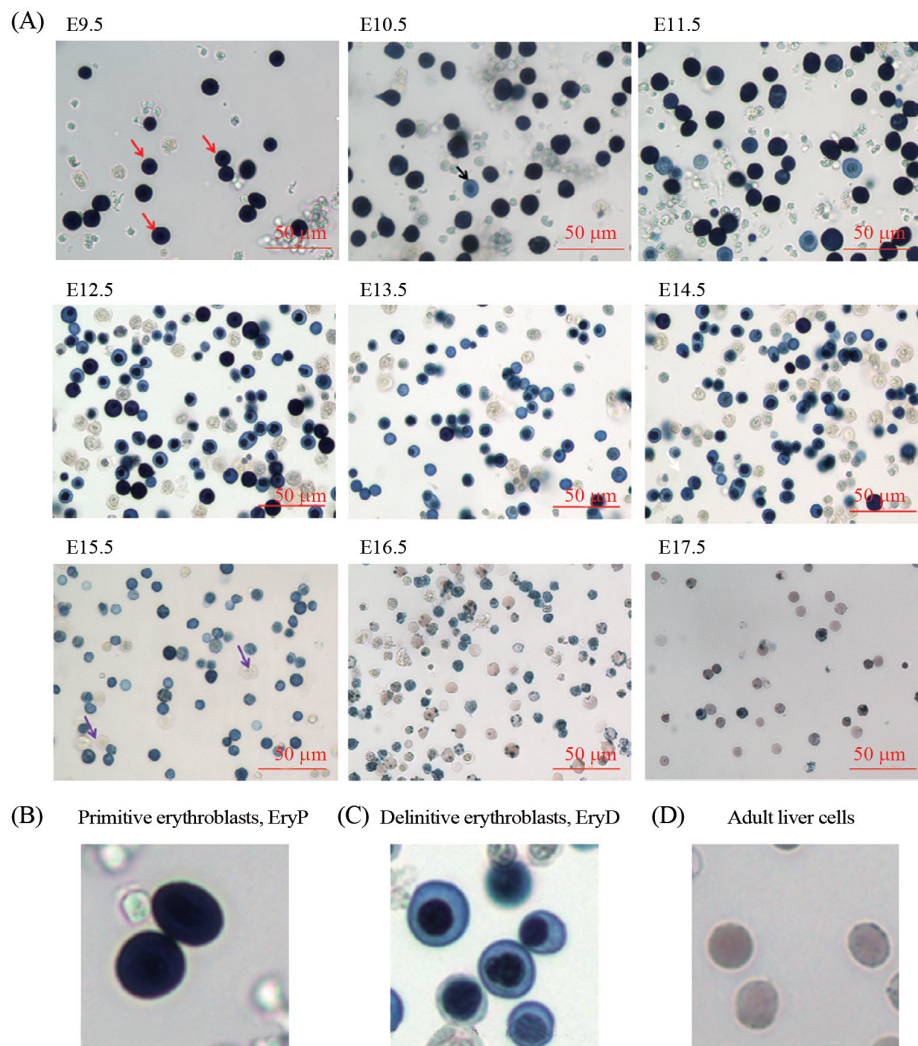


图2 小鼠E9.5-E17.5胎肝细胞联苯胺染色结果

Fig.2 The benzidine stained of E9.5-E17.5 mouse fetal liver cells

表1 小鼠E12.5-E17.5胎肝中直径8, 10, 12, 14 μm 细胞数量的统计结果
Table 1 Number of 8, 10, 12, 14 μm cells in E12.5-E17.5 mouse fetal livers

天数 Days	8 μm 直径细胞 8 μm diameter cells	10 μm 直径细胞 10 μm diameter cells	12 μm 直径细胞 12 μm diameter cells	14 μm 直径细胞 14 μm diameter cells
E12.5	2 348±46	5 987±116	6 062±252	432±18
E13.5	2 532±249	5 645±682	5 242±671	437±82
E14.5	3 408±32	3 920±245	2 205±82	263±14
E15.5	3 90±22	508±13	203±26	11±3
E16.5	4 714±294	1 963±210	1 191±140	133±3
E17.5	745±27	398±12	196±3	11±1

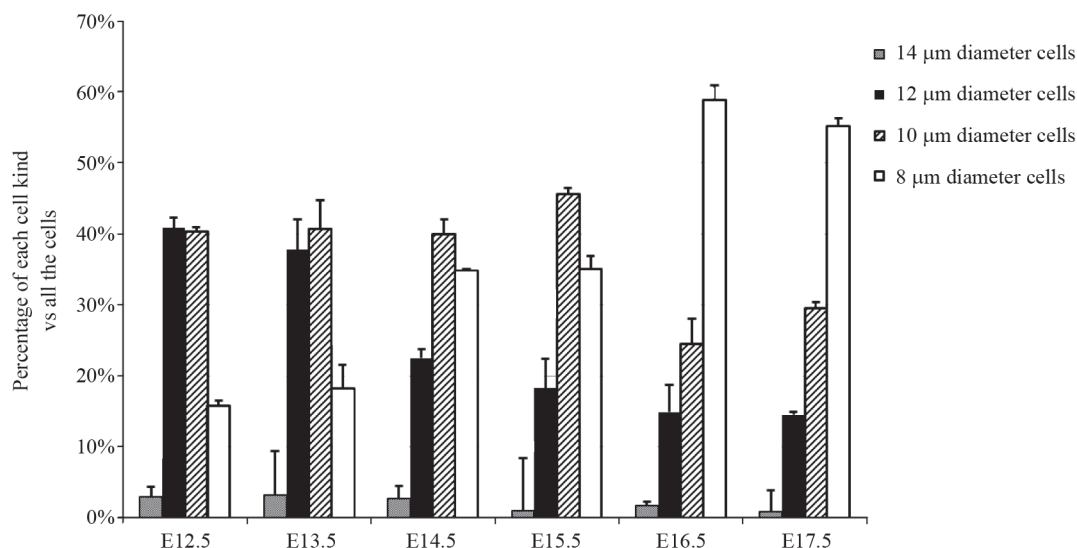


图3 8, 10, 12, 14 μm 直径细胞在小鼠E12.5-E17.5胎肝中的变化趋势
Fig.3 The trend of 8, 10, 12, 14 μm diameter cells in E12.5-E17.5 mouse fetal livers

左右; 12 μm 的细胞比例逐渐减少, 从E12.5的40%降到E17.5的15%; 直径10 μm 的细胞呈现先增加后减少的趋势; 而直径8 μm 的细胞比例逐渐增加, 由E12.5的15%增加到E17.5的60%。

根据2.2对E9.5-E17.5胎肝中EryD的数量和形态学观察及文献的报道^[5], 14 μm 的细胞可能是一些小的细胞团, 而12 μm 细胞是原幼红细胞和部分EryP, 10 μm 细胞是早幼红细胞和中幼红细胞, 8 μm 细胞是晚幼红细胞和网织红细胞。

2.4 红系细胞在小鼠E9.5-E17.5胎肝造血过程中的时序性分化

根据Count star细胞计数仪的统计结果和联苯胺染色后细胞形态及血红蛋白表达量的不同将E9.5-E17.5胎肝中的细胞分为10类, 分别是: 原始成红细胞、原幼红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、排核期细胞、网织红细胞、分裂期细胞、

联苯胺染色阴性细胞和肝脏细胞, 细胞的形态特征描述见图4。

EryP是E9.5-E11.5胎肝中的主要细胞类型, 占70%, 而后迅速减少(图5A), 被呈指数增加的EryD所取代(图5B)。原幼红细胞从E10.5出现, 随着红系分化, 逐渐减少, 在所有的EryD中所占比例较少; 早幼红细胞从E11.5出现, 与原幼红细胞有相似的变化趋势; 中幼红细胞和晚幼红细胞数量都是先增加再减少, 两者的最高峰分别出现在E14.5和E15.5; 排核期细胞和网织红细胞从E11.5出现, 排核率在E16.5达到最大, 此时排核期细胞和网织红细胞的总和达到60%。分裂期的红系细胞虽然有先增加再减少的趋势, 但在整个分化过程中比例很低, 只占2.5%左右(图5C), 表明造血过程中红系细胞进入分化途径而不增殖。联苯胺染色阴性细胞即淋巴细胞在整个红系分化过程中比例较恒定, 维持在30%左右(图5D)。











Cell types	Morphological characteristics
 Primitive erythroblasts	Cell diameter is from 10 μm to 14 μm , it changed during the terminal differentiation, but the volume of cells has changed inapparently. The colour of benzidine staining is dark shade in cytoplasm and nucleus.
 Proerythroblast	Cell diameter is from 11 μm to 13 μm , the volume of cell nucleus is bulky, nuclear and cytoplasmic volume ratio is about 4/5. The nuclear colour of benzidine staining is dark, but cytoplasmic is light-colored.
 Basophilic erythroblast	Cell diameter is from 9 μm to 11 μm , the nuclear and cytoplasmic volume ratio is about 2/3. The nuclear colour of benzidine staining is dark and cytoplasmic is light-colored.
 Polychromatic erythroblast	Cell diameter is from 7 μm to 9 μm , the nuclear and cytoplasmic volume ratio is about 1/2. The nuclear colour of benzidine staining is dark and cytoplasmic is light-colored.
 Orthochromatic erythroblast	Cell diameter is from 6 μm to 8 μm , the nuclear and cytoplasmic volume ratio is under 1/2. The nuclear colour of benzidine staining is dark and cytoplasmic is light-colored. It's nuclear has occurred condensation and deviation.
 Denucleating erythroblast	Definitive erythroblasts are denucleating.
 Reticulocyte	Cell has no nuclear, it is the precursor of erythrocyte. The cytoplasmic colour of benzidine staining is dark.
 Denucleating erythroblast	Definitive erythroblasts are denucleating.
 Benzidine staining negative cells	Lymphocytes in the blood system, the benzidine staining is negative.
 Liver cells	Adult liver cells.

图4 小鼠胎肝中10类细胞的形态特征
Fig.4 The morphological characteristic of ten kinds of cells in mouse fetal liver

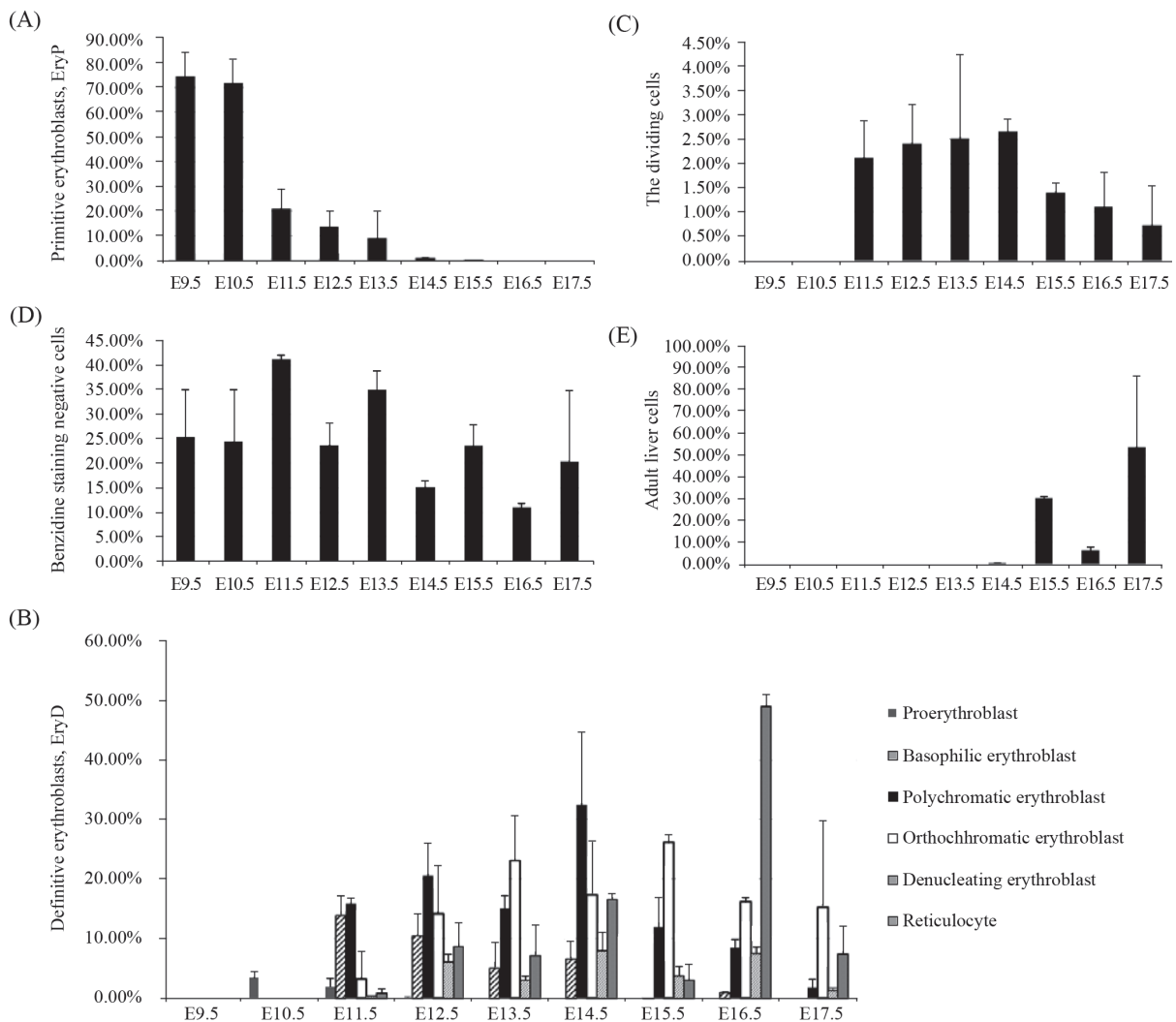


图5 10类细胞在小鼠E9.5-E17.5胎肝中的变化趋势
Fig.5 The trend of ten different kinds of cells in E9.5-E17.5 mouse fetal livers

成体肝脏细胞从E15.5出现, 细胞数量迅速增加取代红系细胞, 直至胚胎出生(图5E)。

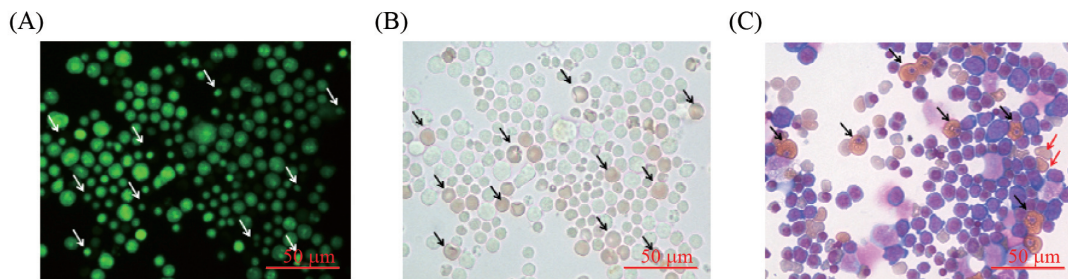
E9.5-E14.5中的EryP与EryD相似, 在分化过程中也出现时序性分化特征, 如细胞体积逐渐减小, 细胞核减小、核固缩、排核等明显特征。但与EryD不同的是, 绝大部分晚期的EryP只是发生细胞核固缩、偏位(图6A和6B), 并未排核, 只有少部分细胞发生排核, 而后从E15.5起消失(图6C, 黑色箭头所指为未排核的EryP, 红色箭头所指为排核后的EryP)。

2.5 红系细胞特异表面标志在胎肝红系细胞中表达量高, 而在成体红系细胞中表达量较低

Ter119和CD71是红系细胞的表面标志, 两者表达量可以判断红系细胞分化的能力。比较E9.5-E17.5

胎肝细胞中这两种蛋白质的表达情况, 发现随着胚胎发育红系细胞中这两种蛋白质的表达量较恒定, 除了Ter119表达量在E15.5-E17.5中有增加趋势外, 两种蛋白质并未出现明显递增或递减的变化趋势(图7)。由于胚胎发育过程中肝脏持续造血, 需大量不同分化阶段的红系细胞, 无论EryP还是EryD中的5类红系细胞其分化能力较一致, 故两种蛋白质的表达量在E9.5-E17.5中并未呈现规律性变化。

选取E11.5的胎肝细胞, 与成体正常骨髓细胞、外周血细胞和小鼠红白血病细胞MEL比较, 并用NIH3T3细胞做阴性对照。发现胎肝红系细胞中这两种蛋白质的表达量明显高于成体骨髓细胞和外周血细胞(表2), 除MEL恶性增殖需要大量铁元素而



A: AO/EB双荧光染色; B: A对应的可见光; C: 瑞氏染色。
A: the AO/EB double stained; B: visible light of A; C: Wright's stained.

图6 小鼠E12.5胎肝中的EryP染色观察

Fig.6 The stained observation of EryP in E12.5 mouse fetal livers

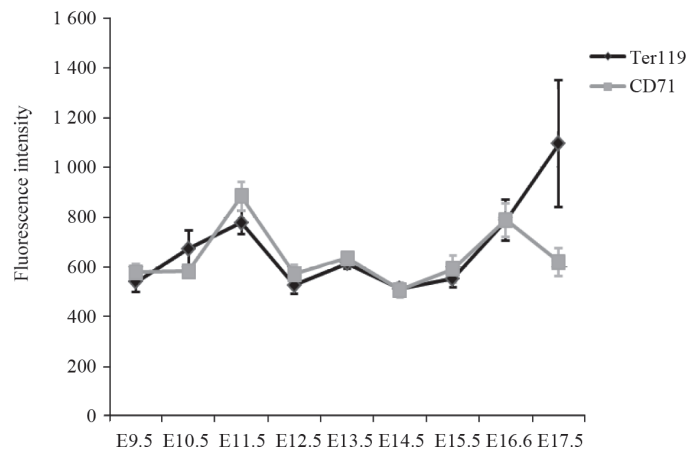


图7 Ter119和CD71在E9.5-E17.5胎肝红系细胞中的荧光强度变化趋势

Fig.7 The trend of Ter119 and CD71 fluorescence intensity in E9.5-E17.5 mouse fetal livers

表2 Ter119和CD71在5种细胞中的荧光强度

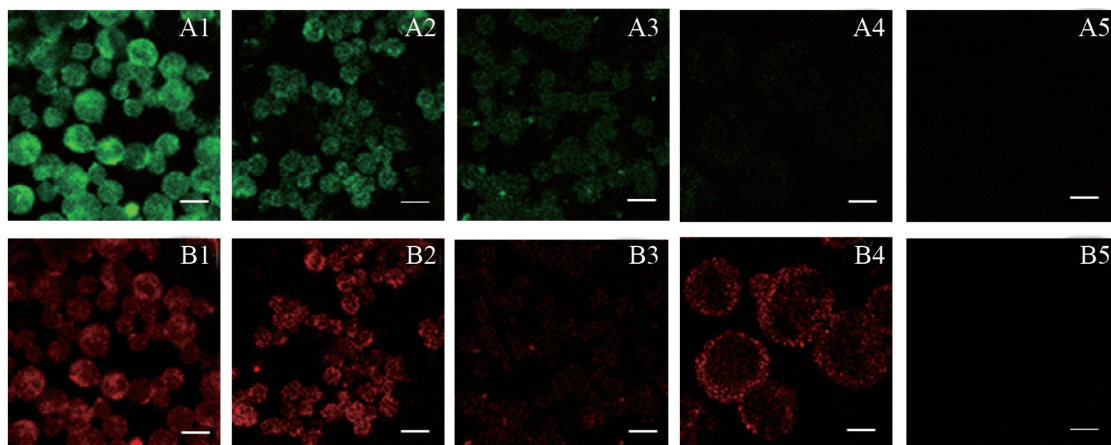
Table 2 Ter119 and CD71 fluorescence intensity in 5 different kinds of cells

表面标志	E11.5胎肝细胞	成体骨髓细胞	外周血细胞	MEL细胞	NIH3T3细胞
Surface markers	E11.5 fetal liver cells	Adult bone marrow cells	Peripheral blood cells	MEL cells	NIH3T3 cells
Ter119	725.710 8±47.182 5	509.177 0±88.717 8	344.771 8±61.576 5	79.098 9±9.686 3	31.017 1±3.545 7
CD71	708.986 8±58.535 9	541.467 0±101.531 4	250.415 9±49.687 9	522.511 7±62.313 4	7.647 6±0.594 2

5种细胞中Ter119和CD71荧光强度的比较均具有极显著性差异(P<0.01)。

Comparisons of Ter119 and CD71 fluorescence intensity in five kinds of cells were significantly different (P<0.01).

CD71高表达外, Ter119的表达量从胎肝红系细胞到 NIH3T3细胞基本呈现递减趋势(图8), 表明胎肝中红



A1~A5: E11.5胎肝细胞、成体骨髓细胞、成体外周血细胞、MEL细胞、NIH3T3细胞的Ter119免疫荧光染色结果(显绿色); B1~B5: E11.5胎肝细胞、成体骨髓细胞、成体外周血细胞、MEL细胞、NIH3T3细胞的CD71免疫荧光染色结果(显红色)。标尺=10 μm 。

B1~B5: the results of Ter119 immunofluorescence in E11.5 fetal liver cells, adult bone marrow cells, peripheral blood cells, MEL, NIH3T3 cells, respectively (green); B1~B5: the results of CD71 immunofluorescence in E11.5 fetal liver cells, adult bone marrow cells, peripheral blood cells, MEL, NIH3T3 cells, respectively (red). Bar=10 μm .

图8 5种细胞的Ter119和CD71免疫荧光结果

Fig.8 The immunofluorescence results of Ter119 and CD7 in five different kinds of cells

系细胞的分化能力高于成体红系细胞。

3 讨论

哺乳类红系细胞在胚胎造血过程中形态特征和组成成份等方面发生明显变化。依据形态特征和血红蛋白表达量的变化将E9.5-E17.5胎肝中的细胞分为10类, 对这10类细胞进行统计分析, 发现从HSCs在小鼠E10.5转移到肝脏开始终末造血作用起, 红系细胞的分化便出现时序性特征, 如: 细胞停止分裂、表达红细胞特异的血红蛋白、细胞体积变小、细胞核偏位、核固缩、自然排核等。

EryP是小鼠胚胎中第一个出现的红系细胞, 与EryD相似, 随着分化发生珠蛋白基因的上调、细胞粘附蛋白的表达、骨架的重组、增殖减慢和细胞核固缩并排核等时序性特征^[16]。两者除了祖细胞来源和成熟的地方不同外, 最显著的差异在于EryD只能表达成体血红蛋白, 而EryP既能表达胚胎血红蛋白又能表达成体血红蛋白, 它们之间的进化关系目前还不清楚。

对胎肝细胞和其他类别细胞中红系特异标志Ter119和CD71两种蛋白质的定量分析表明, 胎肝中的红系细胞正处于由胚胎造血系统分化形成转向为胎儿日益扩张的循环容量和氧需求提供足够红细胞

的过渡时期^[17], 需迅速分化并大量合成血红蛋白, 故转铁蛋白受体CD71高表达。随着分化程度的降低, 胎肝、骨髓、外周血中这两种蛋白质的表达量也逐渐降低, 所以Ter119和CD71可以作为红系细胞分化程度的表面标志。

本文采用细胞计数仪、形态学观察、免疫荧光结合激光共聚焦显微镜等方法对小鼠E9.5-E17.5胎肝中红系细胞的大小、比例及表面标志的表达量进行了系统研究, 详细的时序性变化为后续的差异蛋白质组学和红系分化相关因子的定量定性以及功能研究提供了理论依据, 并为红系细胞血系调控发育和终末分化及癌变机制的探讨和研究奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 1970; 18(3): 279-96.
- 2 Isern J, Fraser ST, He Z, Baron MH. The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(18): 6662-7.
- 3 Liu XS, Li XH, Wang Y, Shu RZ, Wang L, Lu SY, *et al.* Disruption of palladin leads to defects in definitive erythropoiesis by interfering with erythroblastic island formation in mouse fetal liver. *Blood* 2007; 110(3): 870-6.
- 4 Bessis M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Rev Hematol* 1958; 13(1): 8-11.

- 5 Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. *Blood* 2008; 112(3): 470-8.
- 6 Bessis MC, Breton-Gorius J. Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: A critical review. *Blood* 1962; 19: 635-63.
- 7 Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005; 437(7059): 754-8.
- 8 Lichtman MA. The ultrastructure of the hematopoietic environment of the marrow: A review. *Exp Hematol* 1981; 9(4): 391-410.
- 9 Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 1984; 12(7): 517-21.
- 10 Yokomizo T, Hasegawa K, Ishitobi H, Osato M, Ema M, Ito Y, *et al.* Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* 2008; 111(8): 4075-80.
- 11 Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006; 121(2): 144-58.
- 12 Prutki M, Poljak-Blazi M, Jakopovic M, Tomas D, Stipancic I, Zarkovic N. Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett* 2006; 238(2): 188-95.
- 13 张洪明. 转铁蛋白受体的结构、表达及功能. *实用临床医药杂志* 2008; 12(3): 114-7.
- 14 Weaver JL, Torous D. Flow cytometry assay for counting micronucleated erythrocytes: Development process. *Methods* 2000; 21(3): 281-7.
- 15 Cantù C, Ierardi R, Alborelli I, Fugazza C, Cassinelli L, Piconese S, *et al.* Sox6 enhances erythroid differentiation in human erythroid progenitors. *Blood* 2011; 117(13): 3669-79.
- 16 Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104(1): 19-25.
- 17 Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(22): 10302-6.

The Morphological Observation and Time-dependent Changes Analysis of Erythroblasts during Differentiation in Mouse Fetal Livers

Zheng Yajuan, Chen Tao, Yang Zuli, Cao Lingling, Mao Qunquan,
Xue Jianyou, Wu Yeqing, Zhang Shifu*

(Proteomics & Molecular Enzymology Lab of College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Mouse fetal liver is an important early-stage blood-forming organ. During hematopoiesis, the morphology change of erythroblasts is significant. In view of the volume change of erythroblasts, the quantity of the diameter 8 μm to 14 μm erythroblasts from mouse E12.5-E17.5 fetal liver was measured by Count star cytometer. The erythroblasts from mouse E12.5-E17.5 fetal liver were divided into ten groups based on their morphology and hemoglobin expression. This study showed that with the development of fetal liver hematopoietic system, cell volume reduction, nuclear condensation, denucleation and hemoglobin up-regulation as well as time-dependent changes occurred during the terminal differentiation of mammalian erythroblasts. Quantitative immunocytochemical analysis of erythro-specific marker Ter119 and CD71 further confirmed that the differentiation capability of fetal liver erythroblasts was higher than that of adult bone marrow cells and peripheral blood cells. These data together provided theoretical support to investigate the mechanisms of erythroid differentiation and erythroleukemia.

Key words fetal liver; erythroblast; time-dependent differentiation; immunocytochemical

Received: November 16, 2011 Accepted: January 18, 2012

This work was supported by Graduate Innovation and Creativity Founs of Zhejiang Sci-Tech University (No.YCX-S11019)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843336, E-mail: cklzhang@yahoo.com.cn