



周家喜, 博士。中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)研究员, 博士生导师, 国家杰出青年基金获得者。长期从事人多能干细胞造血分化的机理与应用研究, 重点探究巨核细胞分化和血小板生成的策略与机理, 血小板规模化生产及临床输注, 同时研究多种血液病状态下巨核细胞和血小板的功能与再生, 为疾病的诊疗提供新思路。近年来, 先后鉴定了间质基因、R-spondin/LGRs以及MSX2相关调控网络在人多能干细胞早期造血分化中的重要作用和机理, 率先报道了人类巨核细胞的异质性及其内皮起源, 并利用三维旋转培养以及生物化学手段建立了体外高效生产血小板的策略。以通讯作者身份在*Cell Stem Cell*、*Cell Research*等杂志上发表SCI论文20余篇, 获得国家发明专利授权3项。
<http://www.chinablood.com.cn/laboratories/teaching/tutor/4290.html>

血小板生成研究进展

黄柏铭 刘翠翠 赵晶晶 王洪涛 周家喜*

(中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 细胞生态海河实验室, 天津 300020)

摘要 血小板生成, 即血小板颗粒由巨核细胞释放, 进而在外周血逐步成熟的过程。随着解析血小板功能多样性以及高效再生策略的需求, 对于血小板生成过程的全面认知显得尤为重要。然而, 以往研究大多聚焦在造血干祖细胞和巨核细胞分化阶段, 对于后期血小板生成过程的了解相对较少。该文对血小板生成过程中血小板形态、分子特征、功能的动态变化以及调控机制等进行了系统梳理, 以期理解血小板功能多样性、转录组异质性以及体外再生策略等方面提供新的思路。

关键词 血小板生成; 前血小板; 血小板前体; 网织血小板

Current Progress in Thrombopoiesis

HUANG Baiming, LIU Cuicui, ZHAO Jingjing, WANG Hongtao, ZHOU Jiayi*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Haihe Laboratory of Cell Ecosystem, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract Thrombopoiesis, the maturation process of platelets released by mature megakaryocytes, is the last part of platelet generation in the peripheral blood. Currently, with the deepening understanding of platelet functional diversity and the need of efficient generation strategy, it is important to have a comprehensive cognition of thrombopoiesis. While past researches tend to focus on the differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2021-11-29

中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(批准号: 2021-RC310-019)、北京协和医学院中央高校基本科研业务费(批准号: 3332020054)、国家自然科学基金(批准号: 81870099)和京津冀基础研究合作专项[批准号: 19JCZDJC65700(Z)]资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

Received: November 5, 2021 Accepted: November 29, 2021

This work was supported by the Non-profit Central Research Institute Fund of Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.2021-RC310-019), the Special Research Fund for Central Universities, Peking Union Medical College (Grant No.3332020054), National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870099) and Cooperation Project of Beijing-Tianjin-Hebei Basic Research [Grant No.19JCZDJC65700(Z)]

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909412, E-mail: zhoujx@ihcams.ac.cn

and megakaryocytes, very little attention has been paid to the process of thrombopoiesis. In this paper, the changes of platelet morphology, RNA content and variety, as well as the molecular features and functions during thrombopoiesis were systematically reviewed. It will provide new insights into the platelet functional diversity, transcriptome heterogeneity and *in vitro* generation strategies

Keywords thrombopoiesis; proplatelet; preplatelet; reticulated platelet

自从110年前WRIGHT^[1-2]提出骨髓巨核细胞负责释放被形容为“血尘”的血小板后,人们不断从多个角度对血小板的形态、大小和功能进行探索。血小板作为巨核细胞的子代细胞,是血液系统中体积最小的成员,平均直径仅2~4 μm ,但其数量却十分可观,成年人的血液循环中含有近 1×10^{12} 个血小板^[3]。为了迅速对血管损伤等刺激作出应答,血小板内部并无细胞核,仅含有线粒体、溶酶体、 α 颗粒和致密颗粒等直接发挥功能的超微结构^[4]。小巧的体积使得血小板可以灵活游走于各级血管中而不被阻挡或挤压破坏,以便及时抵达破损位置,充当血管的“创可贴”,启动机体止血凝血过程^[5-6]。此外,血小板在机体免疫防御、血管/淋巴管发育、肿瘤转移等多种生理病理过程中也发挥重要作用^[7-9]。

鉴于血小板在机体稳态维持中的重要作用,在临床预防性和紧急性输血中都需要持续的血小板供应。目前,血小板输注完全依赖于健康供者捐献,但是,随着血小板需求量逐年增加、供者来源短缺、血小板体外保质期短以及无效输注等诸多问题导致血小板供需矛盾日益突出^[10]。近年来,包括本课题组在内的多个研究团队尝试利用人多能干细胞体外诱导获得功能性血小板^[11-16],为血小板的输注提供新的来源。然而,纵使体内每个巨核细胞平均可释放2 000~3 000个血小板颗粒,体外诱导的单个巨核细胞却仅能产生1~30个血小板^[12,17],极低的体外产板效率大大限制了血小板的规模化生产。而对于血小板生成过程的完整了解和精细调控,有望突破该技术瓶颈,为血小板再生提供新的思路。

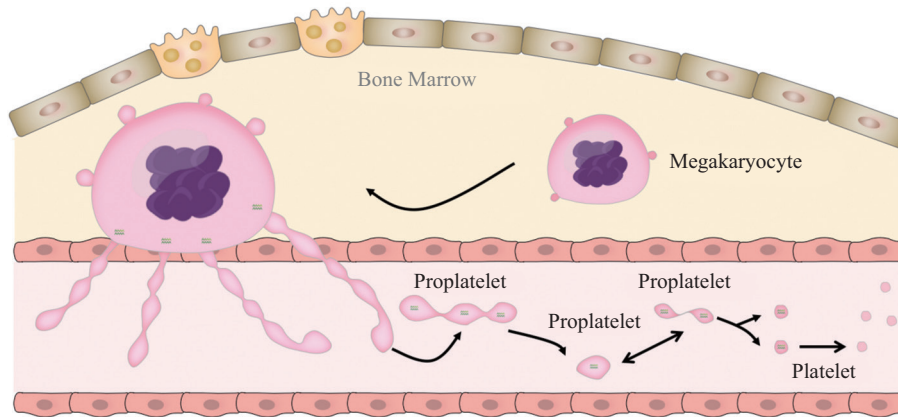
血小板生成过程(thrombopoiesis)是指成熟的亲代巨核细胞借助血流剪切力,将无核的血小板颗粒释放到外周血后,子代血小板在外周血中进一步发育至功能成熟的过程^[18-20]。虽然人们鉴定了多种调控巨核细胞成熟和血小板释放的关键因子^[16,21-23],但对于外周血中血小板成熟过程的精细调控及分子机制尚不清楚。而且,对于血小板生成过程所经历的形态、分子和功能变化,目前也知之甚少。本文主

要围绕血小板生成过程中的细胞生物学特征、分子特征、功能变化和调控机制的最新研究进展进行了总结,并对未来的探索进行了展望。

1 血小板生成方式研究进展

近30年来,血小板生成方式在领域内一直饱受争议。1986年,FELDMAN等^[24]利用扫描电子显微镜对犬和大鼠骨髓中的巨核细胞进行了观察。他们发现,巨核细胞的胞质会形成细长且带有分支的突起延伸入骨髓血窦,这些突起远端会形成折痕,随后在折痕处断裂逐渐与主体脱离,释放常规认知中的血小板。他们将这类胞质突起称为前血小板(proplatelet)(图1)。随后,多个研究团队分别在体内外检测到前血小板的存在^[25-27]。但起初,受限于当时技术手段,难以对体内外各成熟状态血小板进行独立收集和分析^[25],对于血小板释放后期的研究始终进展缓慢。直到2010年,JONATHAN等^[28]建立了一套新的密度梯度沉降的方法,才得以成功分离出体外巨核细胞产生的前血小板。电镜观察发现,刚刚从巨核细胞释放的前血小板,其形态多为两端膨大呈泪珠状的哑铃形结构或无核的串珠结构,直径可达到30~50 μm 。前血小板多个膨大的突起之间由较细的微管骨架结构相连,这部分微管骨架能够围绕其中心扭转断裂,进而分裂为多个圆盘状的成熟血小板(图1)。该团队进而发现,部分前血小板并不直接生成成熟血小板,而是会转化为同样具有圆盘结构但直径较成熟血小板更大的血小板前体(preplatelet)^[28-29](图1)。这些血小板前体大小不等,直径多在2~10 μm ,内部含有维持其圆盘形状的周质微管环以及大量线粒体、分泌颗粒等内容物^[28]。血小板前体可以通过骨架蛋白及微管蛋白的收缩扭转恢复至哑铃状或串珠状的前血小板状态,两者之间可以相互转化,最终分化为直径较小的成熟血小板。据估算,最大的血小板前体可以生成6~20个成熟血小板^[27]。

然而,近年来陆续有研究者认为前血小板在体内比例极低,前血小板释放的血小板远远低于机体



巨核细胞胞质延伸膨大, 形成前血小板。前血小板与血小板前体可以相互转换, 进而生成成熟血小板。巨核细胞胞质中的RNA和蛋白等物质可以传递至子代血小板。

The cytoplasm of megakaryocytes extends and expands to form proplatelets. Proplatelet can be converted into preplatelets, which possesses the capacity to revert to mature platelet. Materials such as RNA and proteins in megakaryocytes can be transferred to progeny platelets.

图1 前血小板、血小板前体和成熟血小板

Fig.1 Proplatelet, preplatelet and mature platelet

所需的血小板量。因此, 形成前血小板可能并非巨核细胞在体内大量产生血小板的方式^[24,30]。2005年, 日本KOSAKI团队^[31-32]提出了原血小板(proto-platelet)的理论, 他们认为成熟的巨核细胞内会形成多个细胞区室, 这些区室内分配有血小板所需要的骨架蛋白、线粒体、颗粒等物质, 在机体应激情况下或巨核细胞衰老时, 巨核细胞胞膜破裂, 同时释放区室内大量血小板颗粒, 快速补充机体所需要的血小板。这些破裂之后的细胞碎片呈现比成熟血小板更大的体积, 而后在通过毛细血管网时被再次分割成体积更小的血小板。

2020年, POTTS团队^[33]同样发现, 巨核细胞存在额外的产板方式以满足机体对大量血小板的需求, 即胞膜出芽(membrane budding)。他们利用定量3D/4D成像技术对胚胎和成体血小板的产生过程进行观察, 对比发现, 通过出芽产生血小板的方式比形成前血小板更加快速高效, 且在敲除NF-E2之后, 机体会出现明显的小血小板减少, 但前血小板的形成却并未受到影响, 反倒是巨核细胞胞膜出芽的过程大受干扰。由此推测, 胞膜出芽才是真正供应机体血小板大量需求的方式, 其产板效率远超前血小板模式。此外, 在不同器官中, 如卵黄囊和肺脏, 其内的巨核细胞也存在出芽现象^[34-38]。但最近, 来自哈佛大学医学院的ITALIANO团队^[39]对该胞膜出芽的方式提出了质疑。他们认为, 巨核细胞通过出芽产生的颗粒缺少常规血小板所具有的胞质内颗粒及线

粒体等结构, 仅仅是巨核细胞释放的微囊泡, 并非真正的小血小板。对于此争论, 目前仍缺乏足够的证据达成统一认知。总的来说, 血小板生成是一个复杂且充满未知的过程, 领域内对于血小板生成的模式还存有诸多争议, 而血小板在该过程中的形态变化以及各形态与血小板功能之间的联系更是有待未来进一步的探索和解析。

2 血小板生成过程的分子特征研究进展

血小板脱离巨核细胞进入外周血后, 其分子特征并非仅仅是巨核细胞简单的延续, 其内RNA及蛋白质仍在不断发生改变。

血小板虽然体积小且没有细胞核, 内部的RNA成分却十分丰富。除了负责编码蛋白的mRNA外, 也含有大量microRNA、lincRNA以及rRNA等非编码RNA^[43]。其中, 大部分RNA来自亲代巨核细胞, 被包裹在胞质中随着血小板释放传递给子代血小板^[44](图1)。除此之外, 血小板在外周血中还可以通过直接交换或借助微囊泡等方式与血管内皮细胞、红细胞、白细胞等其他细胞进行交流, 从这些细胞中摄取各类RNA^[45]。而与RNA类似, 血小板内蛋白质也同样具有沿袭自巨核细胞和摄取自其他细胞两部分来源。此外, 血小板本身具有独立的翻译体系, 能够进行独立的翻译过程^[40]。因此, 除了被亲代巨核细胞赋予的分子特征外, 血小板在其生成过程中也会不断接受不同刺激而呈现不同的分子特征。

被巨核细胞释放之后,血小板内RNA含量及种类均会随成熟发生变化。不同成熟阶段血小板之间RNA的变化在网织血小板与成熟血小板的对比中尤为明显。网织血小板(reticulated platelet)是1969年由INGRAM和COOPERSMITH^[41]首次描述的一种亚甲基蓝染色后显示点状凝聚的血小板类型,由于亚甲基蓝来源于网状细胞,这部分血小板被称为“网织血小板”。与网织红细胞类似,网织血小板被认为是一类由巨核细胞释放后尚未发育成熟的血小板,是最早脱离巨核细胞进入循环的血小板^[42]。网织血小板形态与血小板前体类似,呈直径较大的圆盘状,而基于其易识别、易分离、应激状态下含量明显上升等特点^[43-44],网织血小板常常用来作为未成熟血小板的代表,与成熟血小板进行对比,以揭示血小板生成过程中各层面变化趋势。这其中,最突出的变化就是RNA总量的差异^[40](表1)。1990年,KIENAST和SCHMITZ团队^[45]即运用噻唑橙标记RNA的方式来区分网织血小板与成熟血小板。与成熟血小板相比,网织血小板中含有更多能够与噻唑橙结合的核酸成分,在流式分析中出现噻唑橙强阳性群体,印证了网织血小板内RNA含量高于成熟血小板的现象。随后,DIETMAR及其团队^[46]通过定量对比发现,单个新生成的网织血小板内总RNA平均含量(0.76~1.14 fg)约为成熟血小板(0.22~0.56 fg)的2~3倍。进一步通过定量数据,证实血小板内RNA含量会随血小板成熟逐渐降低。

除了RNA含量外,随着血小板成熟,RNA种类也会发生明显变化。有研究认为,在巨核细胞和新生血小板中,mRNA含量丰富。而随着血小板成熟,mRNA大量“丢失”,circular RNA因其不易降解的特性则被保留下来,逐渐成为成熟血小板内RNA的主要成分^[47-48]。甚至有报道称,血小板内circular RNA的富集是其转录组降解的标志^[49-50]。但血

小板内mRNA降解的机制目前还没有得到公认的解析。有学者认为,降解的这部分mRNA是巨核细胞中本就即将降解的部分,随胞质沿袭至血小板,随即在血小板内降解。也有说法称血小板中mRNA是否降解取决于血小板所接受的外界刺激,血小板外刺激通过整合素等胞膜蛋白将信号传递至血小板内,启动不同的蛋白翻译,甚至激活一部分剪切体对Pre-mRNA进行修饰剪切后再启动特定蛋白的翻译,而没有接收到信号刺激的mRNA则迅速降解。在此过程中,细胞骨架蛋白等会在一定程度上维持RNA的稳定,起到一定的保护作用^[40]。

除RNA含量与种类的整体变化外,通过各类转录组测序等手段,陆续有研究团队报道不同成熟阶段血小板转录组之间也存在显著差异。2019年,PEANO和BERNLOCHNER团队^[49]首次比较了从健康献血者外周血分离的网织血小板与成熟血小板转录组学之间的差异。总RNA测序显示,与成熟血小板相比,网织血小板中有1 744个基因表达与成熟血小板存在差异。其中血小板糖蛋白GPVI、凝血酶受体PAR4和参与钙信号传导的三磷酸腺苷受体P2RX1等转录本在网织血小板中显著上调。GO分析显示,网织血小板富集了大量血小板活化和细胞凋亡相关的基因^[49]。随后,DIETMAR团队^[46]也通过long-RNA测序发现相较于成熟血小板,在网织血小板中有1 212个基因表达上调,这些基因也同样与血小板形状改变、聚集和激活有关。这提示,未成熟的网织血小板具有更强的止凝血功能,能够更灵敏地对激活血小板的刺激作出应答。DIETMAR团队^[46]还发现,多种免疫相关蛋白的基因随着血小板成熟显著上调,包括促炎蛋白IL7、抗炎蛋白ANXA1等。虽然很难界定网织血小板在免疫反应中的具体作用,但可以肯定的是,网织血小板在免疫系统中的作用要远远弱于成熟血小板。

表1 网织血小板与成熟血小板特征对比

Table 1 Contrast between reticulated platelets and mature platelets

类别 Types	网织血小板 Reticulated platelet	成熟血小板 Mature platelet	参考文献 Reference
Diameter / μm	2-8	2-4	[47]
Total RNA conten /fg	0.76-1.14	0.22-0.56	[40,46]
mRNA content	High	Low	[45,47-50]
Expression of surface markers	High	Low	[43,51]
Response to stimulation	High	Low	[43,46,51]

此外,在蛋白表达水平,不同成熟阶段血小板亦存在差异。CD41、CD61等作为参与血小板黏附、聚集过程的重要表面标志分子,其在网织血小板中的表达均高于成熟血小板^[43,51]。而在接受ADP或TRAP刺激后,网织血小板表面P-selectin的表达也显著高于成熟血小板。这些差异与不同成熟阶段血小板的转录组特征相符,提示网织血小板能够更灵敏地对刺激作出反应,具有更强的执行止凝血功能的潜力^[46,51](表1)。

依据以上血小板生成过程中的分子特征变化,我们猜测,或许在血小板未完全成熟时,止凝血功能是唯一相对完善的功能,且与成熟状态相比能够更迅速地作出应答,而随着血小板逐渐成熟,其余方面的功能逐渐得到完善,开始有能力在免疫防御等其他方面发挥作用,同时,相对削弱了自身在止凝血功能中的贡献。

3 血小板生成过程的调控机制研究进展

基于以上形态变化、分子特征变化及功能变化,不难看出血小板生成是一个漫长而复杂的过程。而对于该过程中每一个环节调控机制的探索,一直是领域内关注的重点,近年来不断在各方面取得突破。

对于巨核细胞成熟分化过程调控机制的研究是整个血小板生成过程中认知最为深入的阶段。本课题组前期对于血小板生成调控机制的探索也主要集中在巨核细胞成熟分化阶段。例如TPO作为巨核谱系造血重要的细胞因子,早在1994年便被证实对巨核细胞成熟分化具有重要的促进作用^[22,52-54],本课题组在前期工作中也发现,敲入TPO能够显著促进人多能干细胞向巨核细胞分化,且可以部分替代外源TPO的添加^[55]。同样在对于人多能干细胞分化的研究中,我们还发现,敲除*MEIS1*能够显著抑制巨核细胞分化并对巨核细胞多倍体化达到完全阻断的效果^[16],可见调控因子对巨核细胞的成熟分化有决定性作用。而除了传统调控因子外,激素对巨核细胞成熟分化也具有显著的调控作用,以雌激素为例,在不依赖TPO的条件下,雌激素能够调控GATA1转录和STAT1活化,进而促进巨核细胞多倍体化^[56]。除此之外,近年来随着微小RNA逐渐进入人们视野,其在巨核细胞成熟分化过程中的调控作用也逐渐被发掘。例如miR-223-3p能够通过调节MYH10的表达以促进巨核细胞多倍体化^[57]; miR-125b能够通过调控

细胞周期而促进巨核细胞的成熟和分化^[58-59]; miR-1915-3p能够促进造血干细胞及巨核前体细胞内吞应激状态下产生的血小板微囊泡,进而抑制RHOB蛋白的表达,从而使前体细胞不依赖TPO刺激即可启动向巨核细胞的分化及后续血小板生成^[60];众多微小RNA的调控作用被陆续报道,不断揭示巨核成熟分化过程中新的调控机制。

在血小板生成后期,血小板脱离巨核细胞进入外周血的过程依旧需要接受精密的调控。随着对各种产板方式认知的深入,领域内在前血小板生成以及血小板颗粒释放的调控机制研究中也不断取得新进展。首先,微管蛋白等骨架调节蛋白和血流剪切力等外力作用的影响越来越得到重视。近来有研究报道,微小RNA miR-125a-5p可以作用于LCP1来降低L-plastin表达水平,从而干扰巨核细胞内肌球蛋白束的作用而影响巨核细胞迁移及前血小板形成^[61]。而另有研究发现,骨架调节蛋白对于前血小板的产生在体内外存在差异。肌球蛋白myosin IIA对体内前血小板的生成不可或缺。在体内,myosin IIA参与维持前血小板的延伸。但在体外培养中,myosin IIA却限制前血小板形成的数量及丰度^[62]。同时, β -tubulin在体内外前血小板的生成中也存在类似的现象。在敲除 β -tubulin的小鼠体内,巨核细胞数量相比野生型对照组明显增加,但其表面伸出的突起数量却比对照组降低45%。而在体外培养体系中,敲除 β -tubulin的巨核细胞并没有出现突起增多的现象^[62]。作者认为,体内外调控结果出现差异的原因可能是微环境即体内血流剪切力等因素的影响。在本研究组前期的工作中同样发现了血流剪切力等外力因素的重要性。我们通过三维旋转培养装置(rotary cell culture system, RCCS)模拟血流剪切力和微重力对巨核细胞进行培养,结果显示与传统二维培养相比,该体系可以显著促进巨核细胞释放前血小板,血小板产量可提高3~4倍^[63]。其次,体内激素水平对前血小板产生同样具有重要调控作用。生长激素在造血过程中的促进作用早已得到认可^[64],在血小板生成过程中,最近也被证实,IGF-1与褪黑素能够活化Akt信号通路及ERK通路以促进巨核细胞骨架蛋白运动,进而促进血小板释放^[23,65]。此外,多巴胺等交感神经递质对前血小板的形成也有重要作用。已有研究报道骨髓腔内分布有大量交感神经^[66],交感神经递质通过 α 2-肾上腺素受体介导ERK1/2信号通路的活化可以显

著增强巨核细胞骨架重排能力, 进而促进前血小板形成^[67-68]。

总的来说, 在近期对于血小板生成调控机制的研究中, 传统转录因子渐渐不再成为领域内关注的重点, 微小RNA、内源性微囊泡、激素以及微环境等角度吸引了越来越多研究者的兴趣。此外, 对于血小板生成的调控目的也不再仅仅局限于产量, 基于血小板功能多样性及巨核细胞异质性, “按需生产”血小板逐渐成为调控血小板生成的未来方向。在本研究组近期的工作中, 我们发现不同发育阶段、不同组织器官中的巨核细胞从形态大小到分子特征均有所不同^[38,69], 巨核细胞各亚群在执行产板、增殖、免疫等功能时具有不同的侧重和倾向^[36-38]。因此, 我们认为, 巨核细胞作为血小板的亲代细胞, 其异质性对血小板生成具有重要影响, 从巨核细胞异质性着手对血小板生成进行调控无疑是可行且新颖的切入点。例如, 特异性增加具有高产板潜能的巨核细胞亚群能够从源头促进血小板生成。而基于巨核细胞功能的异质性, 我们甚至可以特异性产生“止血血小板”、“免疫血小板”等不同功能的小血小板用于不同疾病下血小板的输注治疗^[70]。但是, 不同巨核细胞亚群与子代血小板形态及功能多样性之间的对接并不明确, 因此其间的调控机制仍有待进一步探索与验证。

4 展望

纵观血小板生成的整个过程, 我们一度猜测, 血小板在其生成过程中体现出的各层面差异或许由两种模式决定。一是继承其亲代巨核细胞, 即具有特定特征的巨核细胞通过特定的产板方式产生具有特定特征的血小板, 二是血小板释放到外周血后, 不断接受各类刺激并陆续启动不同的转录翻译过程, 最终呈现不同的特征。无论从哪个角度来看, 血小板生成都是一个漫长而复杂的过程。在这个过程中, 仍充满大量未知有待探索, 例如, 哪些因素会对血小板生成过程中的形态转换进行调控; 前血小板、血小板前体和成熟血小板所具有的不同形态与其功能又有何联系? 不同产板方式由哪些机制调控, 而不同产板方式所生成的血小板之间又存在哪些差异? 诸多问题仍有待更深入详细的探索来回答。

在未来, 也许单细胞技术的进展会对血小板生成过程的探索产生重要影响。借助于单细胞技术,

我们不仅能够将不同成熟状态的血小板进行区分, 通过更具针对性的分析来揭示血小板生成过程中的分子及功能变化; 也能够通过对比不同组织器官中巨核细胞、不同产板方式所产生的血小板, 探索不同血小板生成过程带来的差异。同时, 结合更精准的谱系示踪技术, 我们有望完整追溯血小板生成过程, 为从源头调控血小板生成奠定基础。

凭借其数量庞大且移动灵活的特点, 游离于外周血和各器官中的血小板更像是各细胞间的“帮手”或“邮差”, 能够在循环中从多个方面维持机体稳态。一旦我们打破对血小板生成过程的认知壁垒, 则能够更为完整地解析血小板获得各种功能的途径和机制, 血小板将有机会成为有力的工具被应用于各个方面, 无论是通过加速其产生进行产业化增殖, 还是调控其功能达到“按需生产”^[70], 亦或是“改造”血小板将其作为载体应用于机体免疫防御以及恶性肿瘤诊治, 血小板都将在再生领域与临床诊疗中发挥不可估量的作用。

参考文献 (References)

- [1] WRIGHT J H. A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites [J]. *J Med Res*, 1902, 7(1): 138-44.
- [2] SANTINI V. On raising the “dust of blood”: from unrevealing thrombopoiesis to treatment of thrombocytopenias with thrombomimetic drugs [J]. *Semin Hematol*, 2015, 52(1): 1-3.
- [3] SCHMITT A, GUICHARD J, MASSE J M, et al. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets [J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(11): 1295-302.
- [4] THON J N, ITALIANO J E. Platelets: production, morphology and ultrastructure [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, (210): 3-22.
- [5] SEMPLE J W, ITALIANO J E Jr, FREEDMAN J. Platelets and the immune continuum [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4): 264-74.
- [6] ITALIANO J E Jr, BERGMEIER W, TIWARI S, et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape [J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4789-96.
- [7] XU X R, ZHANG D, OSWALD B E, et al. Platelets are versatile cells: new discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2016, 53(6): 409-30.
- [8] VIEIRA-DE-ABREU A, CAMPBELL R A, WEYRICH A S, et al. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum [J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34(1): 5-30.
- [9] LEBLANC R, PEYRUCHAUD O. Metastasis: new functional implications of platelets and megakaryocytes [J]. *Blood*, 2016, 128(1): 24-31.
- [10] MARGRAF A, NUSSBAUM C, SPERANDIO M. Ontogeny of platelet function [J]. *Blood Adv*, 2019, 3(4): 692-703.

- [11] NAKAMURA S, TAKAYAMA N, HIRATA S, et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2014, 14(4): 535-48.
- [12] ITO Y, NAKAMURA S, SUGIMOTO N, et al. Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale *ex vivo* production [J]. Cell, 2018, 174(3): 636-48, e18.
- [13] FENG Q, SHABRANI N, THON J N, et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cell Rep, 2014, 3(5): 817-31.
- [14] NAKAMURA S, SUGIMOTO N, ETO K. *Ex vivo* generation of platelet products from human iPS cells [J]. Inflamm Regen, 2020, 40(1): 30.
- [15] SUGIMOTO N, ETO K. Platelet production from induced pluripotent stem cells [J]. J Thromb Haemost, 2017, 15(9): 1717-27.
- [16] WANG H, LIU C, LIU X, et al. MEIS1 regulates hemogenic endothelial generation, megakaryopoiesis, and thrombopoiesis in human pluripotent stem cells by targeting TAL1 and FLI1 [J]. Stem Cell Rep, 2018, 10(2): 447-60.
- [17] MOREAU T, EVANS A L, VASQUEZ L, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11208.
- [18] GIANNINI S, LEE-SUNDLOV M M, RIVADENEYRA L, et al. Beta4 GALT1 controls beta1 integrin function to govern thrombopoiesis and hematopoietic stem cell homeostasis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 356.
- [19] ASQUITH N L, MACHLUS K R. Teamwork makes the dream work in thrombopoiesis [J]. Blood, 2019, 134(10): 791-2.
- [20] KAUSHANSKY K. Thrombopoiesis [J]. Semin Hematol, 2015, 52(1): 4-11.
- [21] METCALF D. Blood. Thrombopoietin-at last [J]. Nature, 1994, 369(6481): 519-20.
- [22] KAUSHANSKY K, LOK S, HOLLY R D, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin [J]. Nature, 1994, 369(6481): 568-71.
- [23] CHEN S, QI Y, WANG S, et al. Melatonin enhances thrombopoiesis through ERK1/2 and Akt activation orchestrated by dual adaptor for phosphotyrosine and 3-phosphoinositides [J]. J Pineal Res, 2020, 68(3): e12637.
- [24] HANDAGAMA P, JAIN N C, KONO C S, et al. Scanning electron microscopic studies of megakaryocytes and platelet formation in the dog and rat [J]. Am J Vet Res, 1986, 47(11): 2454-60.
- [25] BEHNKE O, FORER A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream [J]. Eur J Haematol Suppl, 1998, 61: 3-23.
- [26] ITALIANO J E Jr, LECINE P, SHIVDASANI R A, et al. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes [J]. J Cell Biol, 1999, 147(6): 1299-312.
- [27] JUNT T, SCHULZE H, CHEN Z. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow [J]. Science, 2007, 317(5845): 1767-70.
- [28] THON J N, MONTALVO A, PATEL-HETT S, et al. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release [J]. J Cell Biol, 2010, 191(4): 861-74.
- [29] SCHWERTZ H, WEYRICH A S. Platelet precursors display bipolar behavior [J]. J Cell Biol, 2010, 191(4): 699-700.
- [30] HANDAGAMA P J, JAIN N C, FELDMAN B F, et al. Scanning electron microscope study of platelet release by canine megakaryocytes *in vitro* [J]. Am J Vet Res, 1987, 48(6): 1003-6.
- [31] CLARKE M C, SAVILL J, JONES D B, et al. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death [J]. J Cell Biol, 2003, 160(4): 577-87.
- [32] KOSAKI G. *In vivo* platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets [J]? Int J Hematol, 2005, 81(3): 208-19.
- [33] POTTS K S, FARLEY A, DAWSON C A, et al. Membrane budding is a major mechanism of *in vivo* platelet biogenesis [J]. J Exp Med, 2020, 217(9): e20191206.
- [34] YAMADA E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen [J]. Acta Anat (Basel), 1957, 29(3): 267-90.
- [35] SUN S, JIN C, SI J, et al. Single-cell analysis of ploidy and the transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis [J]. Blood, 2021, 138(14): 1211-24.
- [36] PARISER D N, HILT Z T, TURE S K, et al. Lung megakaryocytes are immune modulatory cells [J]. J Clin Invest, 2021, 131(1): e137377.
- [37] YEUNG A K, VILLACORTA-MARTIN C, HON S, et al. Lung megakaryocytes display distinct transcriptional and phenotypic properties [J]. Blood Adv, 2020, 4(24): 6204-17.
- [38] WANG H, HE J, XU C, et al. Decoding human megakaryocyte development [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(3): 535-49 e8.
- [39] ITALIANO J E, BENDER M, MERRILL-SKOLOFF G, et al. Microvesicles, but not platelets, bud off from mouse bone marrow megakaryocytes [J]. Blood, 2021, 138(20): 1998-2001.
- [40] HARRISON P, GOODALL A H. "Message in the platelet"-more than just vestigial mRNA! [J]. Platelets, 2008, 19(6): 395-404.
- [41] INGRAM M, COOPERSMITH A. Reticulated platelets following acute blood loss [J]. Br J Haematol, 1969, 17(3): 225-9.
- [42] AULT K A, KNOWLES C. *In vivo* biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation [J]. Exp Hematol, 1995, 23(9): 996-1001.
- [43] HANDTKE S, STEIL L, PALANKAR R, et al. Role of platelet size revisited-function and protein composition of large and small platelets [J]. Thromb Haemost, 2019, 119(3): 407-20.
- [44] HILLE L, CEDERQVIST M, HROMEK J, et al. Evaluation of an alternative staining method using SYTO 13 to determine reticulated platelets [J]. Thromb Haemost, 2019, 119(5): 779-85.
- [45] KIENAST J, SCHMITZ G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders [J]. Blood, 1990, 75(1): 116-21.
- [46] HILLE L, LENZ M, VLACHOS A, et al. Ultrastructural, transcriptional, and functional differences between human reticulated and non-reticulated platelets [J]. J Thromb Haemost, 2020, 18(8): 2034-46.
- [47] GUTMANN C, JOSHI A, ZAMPETAKI A, et al. The landscape of coding and noncoding RNAs in platelets [J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(15): 1200-16.
- [48] PROVOST P. Platelets enrich their transcriptome circle [J]. Blood, 2016, 127(9): 1080-1.
- [49] BONGIOVANNI D, SANTAMARIA G, KLUG M, et al. Transcriptome analysis of reticulated platelets reveals a prothrombotic

- profile [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(11): 1795-806.
- [50] ALHASAN A A, IZUOGU O G, AL-BALLOOL H H, et al. Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation [J]. *Blood*, 2016, 127(9): e1-11.
- [51] HAMAD M A, SCHANZE N, SCHOMMER N, et al. Reticulated platelets-which functions have been established by *in vivo* and *in vitro* data [J]? *Cells*, 2021, 10(5): 1172.
- [52] BARTLEY T D, BOGENBERGER J, HUNT P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl [J]. *Cell*, 1994, 77(7): 1117-24.
- [53] DE SAUVAGE F J, HASS P E, SPENCER S D, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand [J]. *Nature*, 1994, 369(6481): 533-8.
- [54] KAUSHANSKY K. The mpl ligand: molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development [J]. *Stem Cells*, 1994, 12 Suppl 1: 91-6.
- [55] ZHANG L, LIU C, WANG H, et al. Thrombopoietin knock-in augments platelet generation from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 194.
- [56] DU C, XU Y, YANG K, et al. Estrogen promotes megakaryocyte polyploidization via estrogen receptor beta-mediated transcription of GATA1 [J]. *Leukemia*, 2017, 31(4): 945-56.
- [57] SHI R, ZHOU X, JI W J, et al. The Emerging role of miR-223 in platelet reactivity: implications in antiplatelet therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 981841.
- [58] KANDI R, UNDI R, GUTTI R K. MiR-125b regulates cell proliferation and survival in neonatal megakaryocytes [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93(6): 1065-6.
- [59] QU M, FANG F, ZOU X, et al. miR-125b modulates megakaryocyte maturation by targeting the cell-cycle inhibitor p19(INK4D) [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(10): e2430.
- [60] QU M, ZOU X, FANG F, et al. Platelet-derived microparticles enhance megakaryocyte differentiation and platelet generation via miR-1915-3p [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4964.
- [61] BHATLEKAR S, MANNE B K, BASAK I, et al. miR-125a-5p regulates megakaryocyte proplatelet formation via the actin-bundling protein L-plastin [J]. *Blood*, 2020, 136(15): 1760-72.
- [62] BORNERT A, BOSCHER J, PERTUY F, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate *in vivo* and *in vitro* proplatelet formation [J]. *Haematologica*, 2021, 106(5): 1368-80.
- [63] YANG Y, LIU C, LEI X, et al. Integrated biophysical and biochemical signals augment megakaryopoiesis and thrombopoiesis in a three-dimensional rotary culture system [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(2): 175-85.
- [64] WELNIAK L A, TIAN Z G, SUN R, et al. Effects of growth hormone and prolactin on hematopoiesis [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 38(5/6): 435-45.
- [65] CHEN S, HU M, SHEN M, et al. IGF-1 facilitates thrombopoiesis primarily through Akt activation [J]. *Blood*, 2018, 132(2): 210-22.
- [66] MENDELSON A, FRENETTE P S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration [J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 833-46.
- [67] CHEN S, DU C, SHEN M, et al. Sympathetic stimulation facilitates thrombopoiesis by promoting megakaryocyte adhesion, migration, and proplatelet formation [J]. *Blood*, 2016, 127(8): 1024-35.
- [68] CHEN S, HU M, SHEN M, et al. Dopamine induces platelet production from megakaryocytes via oxidative stress-mediated signaling pathways [J]. *Platelets*, 2018, 29(7): 702-8.
- [69] LIU C, WU D, XIA M, et al. Characterization of cellular heterogeneity and an immune subpopulation of human megakaryocytes [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(15): e2100921.
- [70] LIU C, HUANG B, WANG H, et al. The heterogeneity of megakaryocytes and platelets and implications for ex vivo platelet generation [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(12): 1614-20.