

特约综述



本实验室目前的研究方向涵盖了人类多潜能干细胞(包括ESC和hiPSC)向造血系细胞诱导分化,以及脐带血和骨髓造血干细胞的各种应用研究。我们开发了高效的人类ESC/iPSC细胞向各种成熟血液细胞诱导分化的培养体系。运用这个研究体系,我们获得了大量功能成熟的血细胞,包括红细胞、结合组织型肥大细胞、嗜酸性/嗜碱性粒细胞等。我们正进一步深入研究人类多潜能干细胞向特定谱系的血细胞诱导分化的分子基盘和生物学特性,目的是安全有效地将人类多潜能干细胞应用于临床治疗。

<http://www.camsibt.cn/>

hESCs/hiPSCs体外诱导产生红细胞的研究进展 及其临床应用的展望

毛 斌 马 峰*

(中国医学科学院输血研究所干细胞研究中心, 成都 610052)

摘要 人类胚胎干细胞和多功能诱导性干细胞的诞生,标志着干细胞研究已经跨入了全新的应用时代。干细胞研究领域的一个重要方向是特定谱系成熟细胞的定向诱导分化。在诸多的血细胞中,成熟红细胞因为无核而携带着最小量的遗传物质,可能作为最早的干细胞治疗产品而应用于输血替代治疗。最近,干细胞向造血细胞(包括红细胞)的研究正方兴未艾。但由于方法学上的偏差,诱导产生的红细胞的成熟度各有所不同。该文在结合了作者实验室的工作经验的基础上,对目前人类多潜能干细胞向红细胞特定诱导分化的方法做了综合的描述,并提出了该研究领域亟需解决的重大科学问题。

关键词 hESCs; hiPSCs; 红细胞; 原始造血; 成体造血

干细胞具有自我更新和无限增殖的能力,可以分化出一种或多种类型的组织细胞,并且能功能重建其来源组织^[1]。根据来源,干细胞分为胚胎型和成体型两类:前者源于胚胎;后者也称为组织特异性干细胞(tissue specific stem cells, TSSCs),来源于胎儿或成体的组织器官。按分化潜能的大小,干细胞分为全能性(totipotent)干细胞、多潜能性(pluripotent)干细胞、多能性(multipotent)干细胞和专能性(unipotent)干细胞。全能性干细胞具有形成完整个体的潜能,可分化出胚胎期及个体发育过程中会形成的任何组织和器官,一般指胚胎期发育至桑椹胚(morula)阶段的干细胞。多潜能性干细胞具有分化出跨胚层细胞和组织的能力,包括生殖细胞和所有成体细胞,从囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)分离获得

的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)被认为是多潜能性干细胞。多能性干细胞是一种或多种组织的起源细胞,它能分化出多种类型的细胞。TSSCs是多能性干细胞,其中的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是特征最显著的一种多能性干细胞,能分化成血液系统所有谱系的细胞。专能干细胞来源于多能干细胞,具有向某一种特定种类的细胞分化的能力,一般位于特定组织内,如肌肉里的肌卫星细胞(myosatellite)和红系祖细胞等。

国家自然科学基金面上项目(No.81170466/H0801)和国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2011AA020114)资助项目

*通讯作者。中国医学科学院特聘教授,中国医学科学院北京协和医学院输血研究所/干细胞研究中心主任。Tel: 028-61648510, E-mail: mafeng@hotmail.co.jp

干细胞研究兴起于上世纪60年代对体外受精和胚胎干细胞的研究^[2-3],直到从人胚胎中分离培养出人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)细胞株^[4-6],干细胞研究才进入了新时代。最近,运用体细胞重编程技术获得类似ESC特性的干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[7-9],跨越了hESC在未来临床应用中的个体差异、伦理限制和法律程序等问题,进一步推动了新型干细胞医学的发展。

定向分化是干细胞研究的一个重要方向,目的是从干细胞产生特定细胞谱系的功能成熟细胞,为再生医学提供细胞来源。已有大量关于从hESCs体外成功分化出三个胚层来源成熟细胞的报道:如来源于外胚层的神经细胞^[10-12]和皮肤细胞^[13]、来源于中胚层^[14-17]的心肌细胞、血液细胞、内皮细胞、肌肉细胞和软骨细胞,以及来源于内胚层的胰腺细胞^[18]等。

血液细胞因为单个细胞的游离性和发育过程中的流动性,作为干细胞的研究模式细胞有着很好的优势。人类在出生后,血细胞的不断更新和替换是由骨髓中的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)来完成的。在新生儿的脐带血中也富含这样的HSCs。这两类来源不同的HSCs已经被用作造血重建的种子,广泛地应用于血液系统和其他疾病的临床治疗。hESC/hiPSC作为无限制的干细胞来源,在造血发生领域正被广泛地关注和研究。一方面,对hESC诱导产生的各类成熟血细胞的研究向我们展示了和成体造血不同的人类胚性造血的特性,并可以在体外重现胚胎期造血发育分化的历程;另一方面,从hESC/hiPSC诱导产生的各种功能成熟的血细胞有望作为细胞治疗的替代物广泛应用于临床。但到目前为止,虽然几乎所有的血细胞都能从hESC诱导分化而来^[19],但尚无法在体外获得从hESC/hiPSC诱导分化而来的HSCs。这在很大程度上与体外培养体系的不够健全和我们对ESC/iPSC生物学特性的认识不足有关。在诸多的血细胞谱系中,成熟红细胞和血小板因为没有细胞核,最小限度地携带了个体特异的遗传物质,因而可能作为最早的hESC/hiPSC产生的细胞产品而被应用于临床治疗^[19]。本文就hESC/hiPSC向红细胞发育的体外诱导分化体系作一简要的综述,并就存在的问题和研究前景作一展望。

1 hESCs/hiPSCs建株对干细胞研究领域的推动

1.1 hESCs

1998年, Thomson等^[4]建立了hESCs细胞株。hESCs来源于人类胚胎的ICM,具有自我更新、无限增殖的能力,同时具有保持分化成个体所有类型细胞的潜能,当然也包括分化出所有谱系血液细胞的潜能。hESCs的这些特点,使人们对干细胞基础研究以及临床应用方面都有了更多期许。

一方面, hESCs具有多潜能性和胚胎性,提供了一个探索人类早期发育基本机制的独特模式,也提供了人类胚胎时期造血发生研究的理想模式;另一方面, hESCs作为一个无限的干细胞来源,不仅可以应用于再生医学,也可以用于研究糖尿病^[20]、脊髓损伤^[21]、帕金森病^[22]、心肌梗死^[23]和癌症^[24]等复杂疾病的发生机制,以及筛选新型治疗药物。

虽然hESC在人类发生发育学研究领域具有无可替代的价值,但由于hESC作为干细胞来源在临床治疗时存在着个体排异的障碍,开发个体特异性的治疗性克隆技术(therapeutic cloning)就成为必经之路。然而,人类克隆制作技术上的困难和宗教法律层面上的限制,致使hESC无法在短期内很快成为干细胞治疗的主要方向。

1.2 hiPSCs

2007年, Yamanaka等课题组通过确定的组合因子诱导人类成体细胞重新编程,成功建立了hiPSC株^[7-9]。hiPSC与hESC具有许多相似的特点,如细胞形态、增殖方式、对饲养层细胞的依赖性、基因表达、细胞表面标志、端粒酶活动规律、多向分化潜能、体内可致畸胎瘤等。

hiPSC是否可以完全代替hESC?虽然这个问题目前尚无定论,但是已有研究显示, hiPSC与hESC在发育和分化潜能方面有明确差异。从造血分化方面看,有研究显示^[25], hiPSC产生的血液血管祖细胞(hemangioblast)的扩增能力不如hESC来源的细胞,且易于老化。但是hiPSC有hESC不可比拟的优势:首先,由于hiPSCs可以很容易地从任何个体获得,并具备了类似hESC的多潜能干性(stemness),回避了长期以来围绕人类胚胎使用问题的法律和伦理争论,因而成为再生医学的一个重要的潜在细胞来源被广泛地研究;其次,源自病人个体的hiPSCs带有相关疾病的遗传学特征,这为各种特异性疾病患者的个体化治

疗提供了全新的可能性。事实上已通过hiPSCs建立了许多疾病模型,如镰刀状红细胞贫血的小鼠模型、帕金森疾病的大鼠模型、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)疾病的iPSC株等^[26-28]。

2 hESCs/hiPSCs向各种成熟血液细胞分化的方法进展

hESCs和hiPSCs的成功建株极大地拓宽了我们在干细胞研究领域的视野。在过去的十余年中, hESCs已成为研究造血细胞发育的特征分子和研究细胞机制的良好模式。包括我们在内的许多研究小组,已报道了hESCs可分化成各种功能成熟的血细胞,这些细胞包括功能成熟的红细胞^[29-30]、中性粒细胞^[31-32]、血小板^[33]、巨核细胞^[34]、嗜酸性粒细胞^[35]、单核细胞和树突状细胞^[36]、自然杀伤细胞^[37]、肥大细胞^[38]以及B淋巴细胞和T淋巴细胞^[39-40]。

在目前诸多的hESCs/hiPSCs体外诱导分化产生成熟血细胞的方法中,造血发育的过程大致可分为两个阶段(图1)。首先是通过特异诱导的方法使hESCs/hiPSCs向中胚层和造血发生的方向分化,形成具有造血和造血管内皮共同的前体细胞,称为血液血管祖细胞(hemangioblasts)。然后添加各种特定的造血诱导因子组合物,诱导hemangioblasts定向分化为某特定谱系的成熟血液细胞。体外形成血液血

管祖细胞的方法主要有由hESCs/hiPSCs形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)或与造血发生组织的基质细胞共培养。

2.1 EBs

在体外悬浮培养过程中, hESC会发育形成一种拟似胚胎早期发育微环境的囊样结构,即EB。EB结构很大程度上模拟了发育早期的卵黄囊结构,可为hESCs的自发分化提供合适的条件。当在培养体系中加入诱导中胚层和造血分化发育的因子(如BMP、Flt-3 ligand、SCF等)时,EB可以产生hESC来源的原始造血细胞。然而,能顺利穿透进入这个复杂的结构的外加因子是有限的,因此这种自发性的早期EB造血更接近于卵黄囊的原始造血,具有很强的胚胎造血特性,它们产生的红细胞表达很低的血红蛋白量(成体型造血的特定标志),因此这种EB结构不利于调控hESC向最终功能成熟的血细胞发育分化^[41]。

2.2 与基质细胞共培养

与形成EBs结构相比,将hESCs与取自胎儿/新生儿造血龛位(niche)的基质细胞共培养产生血液血管祖细胞是一种更精确和更有效的产生成熟血细胞的方式^[42]。已有多种基质细胞株被应用于hESCs向血液祖细胞分化的共培养系统。

OP-9细胞株来源于新生的op/op小鼠的颅腔骨基质细胞,这种小鼠编码巨噬细胞集落刺激因

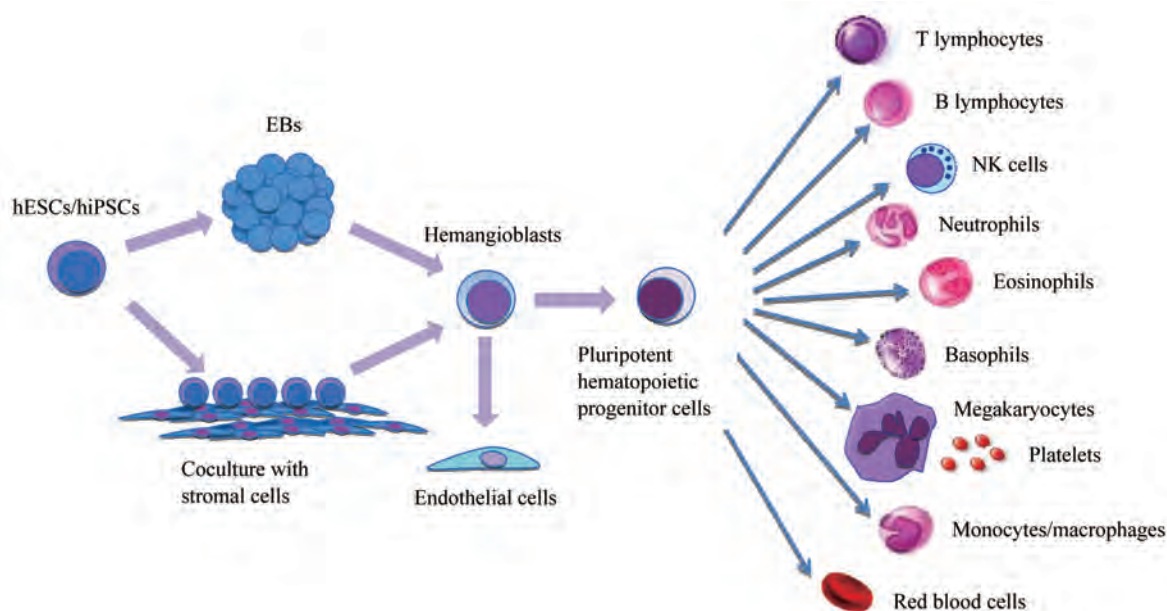


图1 hESCs/hiPSCs向各种成熟血液细胞分化示意图

Fig.1 The diagram of mature blood cells derived from hESCs and hiPSCs

子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)的基因突变,不会产生M-CSF。基质细胞OP-9使用最广泛,可用于支持早期造血细胞的产生以及支持骨髓来源HSCs向B淋巴细胞分化及增殖。关于将hESC与OP-9基质细胞共培养获得血液细胞的报道很多:Slukvin等^[36]将hESC与OP-9基质细胞共培养,9~10 d后将共培养的细胞消化并继续使用含GM-CSF的无血清培养基悬浮培养扩增其中的髓系细胞,成功产生了成熟的树突状细胞;Gaur等^[34]将hESC与OP-9基质细胞共培养获得了巨核细胞和少量血小板;Takayama等^[33]将hESC与OP-9或C3H10T1/2细胞株共培养获得了巨核细胞和功能成熟的血小板,其中C3H10T1/2是从14~17 d大的C3H老鼠胚胎中建立起来的细胞系;Choi等^[43]研究了将多株hiPSCs细胞与OP-9细胞共培养,可以产生造血祖细胞(CD34⁺CD43⁻)和内皮细胞(CD31⁺CD43⁻);Trivedi等^[44]将hESC与OP-9细胞共培养可以产生CD34⁺的原始造血细胞和CD73⁺的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)。另外,还有文献报道,通过转基因手段使OP-9基质细胞表达Delta-like 1分子,可以使造血祖细胞缺失向B淋巴细胞分化的能力,而具有向成熟T淋巴细胞分化的能力^[45-46]。

Kaufman等^[15]将hESC分别与来源于小鼠的骨髓基质细胞株S17和源于小鼠卵黄囊的内皮基质细胞株C166共培养,在不加入外源细胞因子的条件下可以产生造血祖细胞。S17比C166细胞株支持造血集落产生的效率高。hESC与S17共培养约10天,产生造血祖细胞,用胶原酶和胰酶消化共培养的细胞,分选其中的CD34⁺细胞进一步在半固体培养基中培养,可以得到髓系、红系和巨核细胞的集落。这些hESC来源的造血集落与骨髓和脐血来源的CD34⁺细胞得到的集落相似,并且也表达正常的细胞抗原。hESC与S17共培养约14天产生的造血祖细胞可形成大量的红细胞集落(CFU-E)。通过RT-PCR检测各种血红蛋白基因的表达情况,结果显示,CFU-E集落表达成体造血的特征性分子 β 血红蛋白,证明hESC分化而来的红细胞具有成体造血的特性。

Qiu等^[47]比较了S17和人类胎肝细胞株FH-B-hTERT对hESC向血液细胞分化的支持能力,发现后者能更好地支持成熟血细胞的发育。这个研究结果为后续研究hESC体外分化的红细胞血红蛋白如何开关工作^[48]建立了实验体系。

我们也报道了一种hESC与妊娠中期小鼠胎肝基质细胞(mouse fetal liver stromal cells, mFLSCs)共培养分化血液细胞的高效方法^[49]:将hESC细胞株(H1)与辐照过的mFLSCs共培养,经过合适的分化时间(约12~14 d),可以产生大量的鹅卵石(cobblestone)样CD34⁺细胞。用胰酶消化整个共培养的细胞并进行血细胞集落培养或者悬浮培养,可分化产生各种髓系的成熟血液细胞,包括成熟红细胞(图2)。

3 hESC/hiPSCs向成熟红细胞发育分化必须从原始造血阶段跨入成体造血阶段

hESC向各种血液细胞分化方法的突破为研究造血发生提供了良好的模式。然而,hESC/hiPSCs向血液细胞分化是一个复杂而漫长的过程,需要跨越多胚层发育阶段并经由中胚层进入造血发生、发育过程。在一个成体,所有功能成熟的血细胞均来源于骨髓里的HSC。而在胚胎阶段,造血的早期发育是一个随着时间和空间发展变化的复杂过程。在哺乳类动物体内,血液发生在时序上可以观察到一个原始造血(primitive hematopoiesis)向成体造血(definitive hematopoiesis)演变的过程。由于受伦理和法律的限制,不能使用活的人类胚胎作为研究对象,我们对早期造血发育的大部分理论是从小鼠实验积累得来的^[50-51]。以小鼠为例(图3),随着胚胎发育,造血发生起始于卵黄囊,后转移至主动脉/性腺/中肾(aorta/gonad/mesonephros, AGM)区域,在妊娠中期,胎儿肝脏和脾脏成为血细胞产生的主要位置,出生后造血中心转移到骨髓并终身定居于此。

3.1 原始造血和成体造血

学术界普遍认同原始造血发生起源于卵黄囊^[52]。在第7.5天胚鼠的卵黄囊血岛区出现了最早的血细胞,主要为有核的巨大原始红细胞和少量巨噬细胞^[53]。这些卵黄囊衍生的血细胞代表初期的第一次造血,称为原始造血。第二次造血产生的血细胞谱系与成体中的血细胞类型极为相似,称为成体造血(或永久造血)。一般以是否产生能长期支持造血的造血干细胞(LT-HSCs)、将细胞移植后是否能长期重建致死剂量辐射小鼠的造血功能为判断标准。对于成体造血究竟起源于何处学术界存在着一定的争论。多数研究证实成体造血起源于AGM区域^[54],也有学者在小鼠第9天胚胎的卵黄囊发现了功能不完整的HSCs,可以重建新生小鼠的造血功能,但不能重建

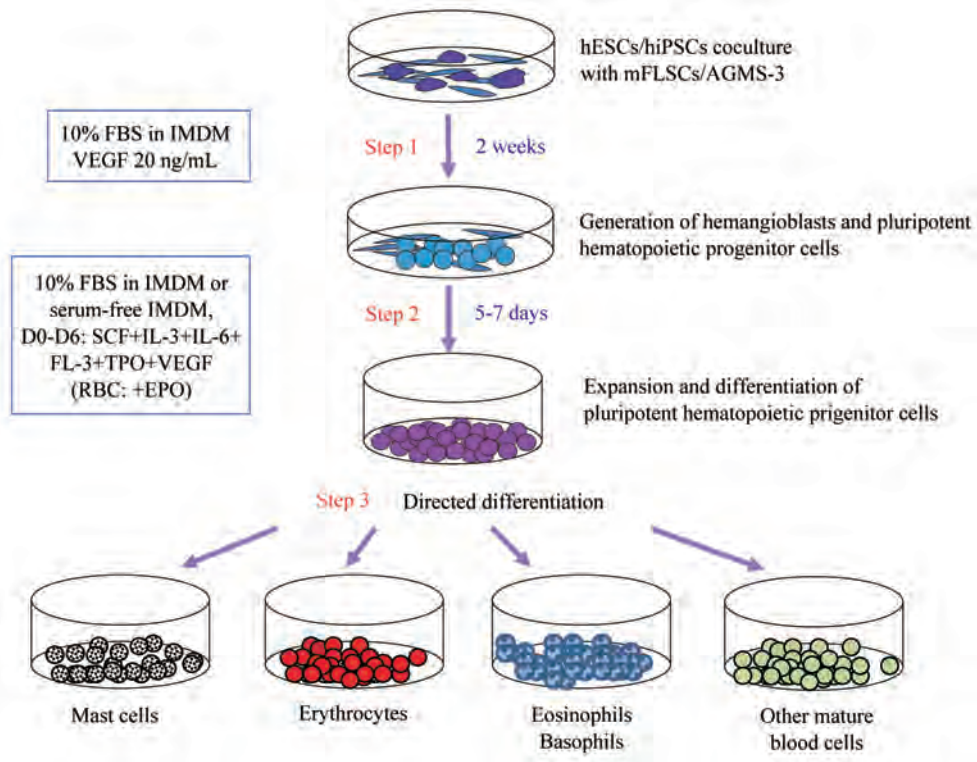


图2 本实验室诱导人类多潜能干细胞分化血细胞的方法图解

Fig.2 The illustration of the induction method of blood cells from human pluripotent stem cells in our laboratory

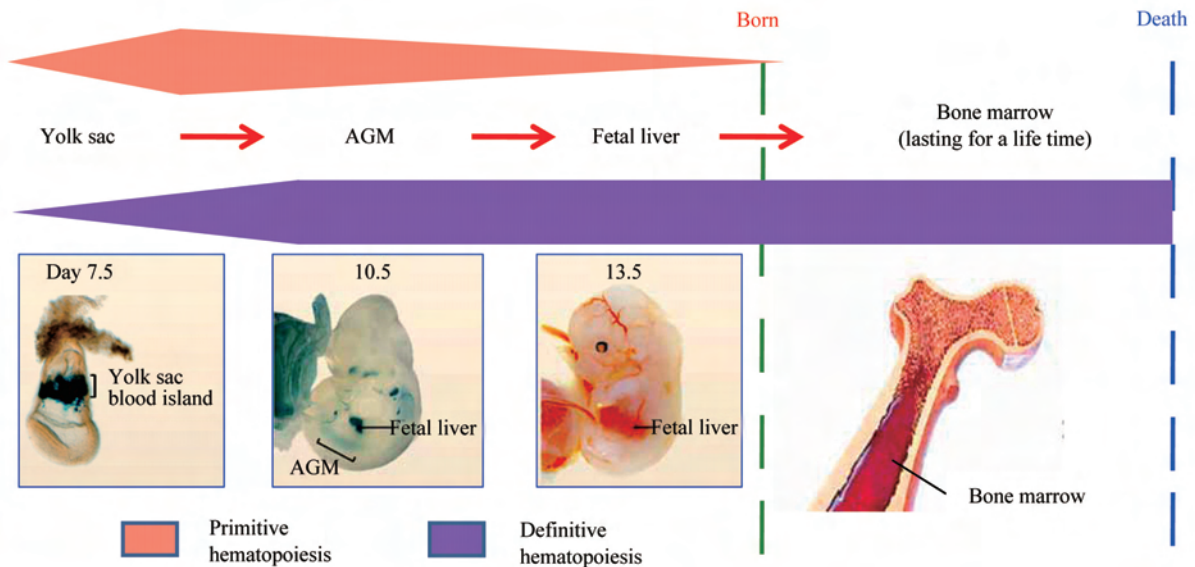


图3 小鼠胚胎早期造血的发生过程

Fig.3 The developmental process of hematopoiesis in early embryo of mouse

成年小鼠的造血功能^[55]。

关于小鼠原始造血和成体造血细胞之间的关系也有不同见解。有的学者认为两次造血有着共同的向各谱系血细胞分化的祖细胞。一次造血的祖细胞

是暂时性的细胞亚群, 只具有向原始红细胞分化的潜能, 而不具备其他谱系的分化能力。造血祖细胞随着发育过程迁移到不同的造血区域形成造血中心^[56]。也有学者认为不同的造血区域有着不同的微

环境, 诱导产生不同分化潜能的造血干/祖细胞。将妊娠9.5天的小鼠卵黄囊造血细胞直接注射给致死剂量照射的小鼠并不能重建受体小鼠的造血系统, 而当这样的卵黄囊造血细胞在预先和AGMS-3共培养4天后再输入致死照射的小鼠, 就可以成功地重建造血。这说明, 具有胚胎特性的原始造血干细胞需要在胎儿特定的成体造血环境中进一步“教育”成为成体型的造血干细胞, 才能具备重建造血的能力^[57]。这种原始造血干细胞和成体之间的差别, 提示了hESC在体外向造血细胞诱导分化的过程中, 也需要得到特定的成体造血微环境的“教育”, 才有望进一步向成体造血细胞发育成熟。

一个经典的观察原始造血和成体造血差别的方法是通过检测红细胞的血红蛋白构成来判断细胞成熟的程度。原始造血产生的血细胞主要为有核的原始红细胞和少量巨噬细胞。原始红细胞只表达胚胎型的血红蛋白, 而成体造血产生的红细胞大量表达成体型的血红蛋白。另外, 成体造血产生的LT-HSC移植后能长期重建致死剂量辐射小鼠的造血功能, 并能分化产生与成体中的血细胞类型极为相似的各种成熟血细胞, 包括红系、髓系、粒系和T、B淋巴系细胞。

人与小鼠分属哺乳动物纲的不同目, 故发育过程中会存在差异。例如, 小鼠的原始红细胞同时表达胚胎型和成体型血红蛋白, 成体造血期积累表达成体型血红蛋白^[58-59]; 而人类原始红细胞只表达胚胎型血红蛋白, 随着成体造血的开始, 胚胎型血红蛋白的表达逐渐降低, 成体型血红蛋白逐渐积累, 最终前者完全被后者取代。因此, 迫切需要建立一种理想的体外研究模式, 以探索人类早期胚胎的造血发育情况。

3.2 hESCs/hiPSCs体外向红细胞的诱导分化研究

在原始造血向成体造血的演变过程中, 红细胞发育的显著差异为hESCs/hiPSCs体外向红细胞诱导分化研究提供了良好的切入点。hESCs在体外成功分化为血液细胞的实例, 也验证了从原始造血逐渐进入成体造血的过程。Lu等^[60]将hESCs与S17共培养, 获得了造血祖细胞(表型CD34⁺CD38⁻), 与从骨髓分离出的造血祖细胞群的表达基因谱系比较, 发现两种来源的细胞存在很大的差异: 骨髓来源的造血祖细胞更大量或专属表达某些种类的功能基因。其中, hESCs来源的造血祖细胞表达胚胎型的血红蛋白 ϵ 、 ζ ,

胚胎型血红蛋白 γ , 而不表达成体型血红蛋白 β ; 而骨髓来源的细胞表达血红蛋白 γ 、 ζ 和 β , 与骨髓中GPA⁺红细胞的表达情况相似。这说明胚胎型干细胞向血细胞分化的过程会经历原始造血过程, 而成体型的造血祖细胞则直接进入成体造血过程。

Papayannopoulou课题组^[61]报道了hESCs经由EB分化出的红细胞形态特征类似成体型, 但是血红蛋白的表达情况与成体型不同(高表达胚型 ϵ 和胎儿型 γ 的血红蛋白, 几乎不表达成体型的血红蛋白 β)。胚胎型干细胞可以得到类似于成体型的红细胞, 但是又不完全成熟, 血红蛋白的演变是如何开关的呢?

Qiu等^[48]在2008年发表了一篇关于血红蛋白开关问题的文章。将hESCs与人的肝细胞株(FH-B-hTERT)共培养, 14天后产生的CD34⁺细胞可诱导分化产生卵黄囊时期的带核的巨大原始红细胞。这些原始红细胞在成熟的晚期阶段, 血红蛋白会发生第一次转变, 组成由 $\zeta_2\epsilon_2$ 转变为 $\alpha_2\epsilon_2$ 。这些hESC来源的红细胞虽然可以脱核, 但是成体型血红蛋白表达量还是很少(低于2%)。文章也提到有必要摸索一种可以表达成体型血红蛋白红细胞的分化方法。

本课题组在此方面进行了探索, 开发出了一种可以产生功能成熟的红细胞的培养方法^[49]。随后, 我们进一步研究了红细胞血红蛋白的变化过程^[29], 考察了共培养、集落培养以及悬浮培养3个阶段中红细胞血红蛋白的表达情况。

(1) 共培养

H1与mFLSCs共培养8~10 d时, 出现GPA⁺细胞, 为产生红细胞的第一个波。免疫染色显示人类血红蛋白(Hb)阳性的红细胞中, 血红蛋白 α 、 ϵ 、 γ 全为阳性, β 全为阴性。到11~12 d时, 才开始出现 β^+ 细胞。随着共培养时间的推移, γ 、 ϵ 一直有表达, 而 β 随时间表达增加, 到18天时能达到50%~60%, 说明在共培养阶段成体型造血是一个逐渐提高的过程。

(2) 集落培养

进一步将共培养不同时间点(D12、D14、D16、D18)获得的造血祖细胞进行集落培养, 15 d后随机挑选BFU-E集落分析血红蛋白表达, 发现随着共培养时间的增加, 表达血红蛋白 β 的细胞比例也逐渐增加, 由(60.3%±19.0%)(D12)增加到(98.1%±1.1%)(D18), 表达血红蛋白 ϵ 的细胞比例从(97.1%±4.3%)(D12)逐渐下降到(62.4%±16.0%)(D18)。

(3) 悬浮培养

将共培养15 d的血液祖细胞, 集落培养12 d以后, 进一步在克隆水平追踪随机挑出的BFU-E集落再悬浮培养6 d, 发现表达血红蛋白 β 的细胞比例从26.4%±17.0%增加到99.8%±0.6%。

我们的研究结果第一次证明了hESCs在体外向成熟红细胞分化的过程是一个逐渐成熟的过程。只要提供合适的培养条件(比如和成体造血发生区域的基质细胞共培养), hESC就可以与成体造血一样得到功能成熟的成体红细胞。

4 体外产生红细胞的方法

成熟红细胞由于不带细胞核, 不会给受者带来异源基因的侵袭, 具有良好的临床应用前景, 因此备受人们的关注。很多研究组做了大量的工作致力于优化体外大量产生成熟红细胞的方法。

4.1 成体造血干细胞诱导分化的红细胞

已经建立了从成体造血干细胞(外周血、骨髓、脐血中的CD34⁺)向红细胞定向分化的成熟方法^[62-63]。法国Douay研究组报道了一种高效的分化方法^[63]。他们先用磁珠法分选CB中的CD34⁺造血干细胞, 依次用含不同细胞因子的无血清培养基分阶段悬浮培养: 阶段一, 先使用含有SCF(stem cell factor)、IL-3(interleukin 3)、EPO(erythropoietin)的红细胞分化液(EDM)培养8 d以向红系细胞定向分化; 阶段二, 细胞与MS-5/MSC共培养, 更换只含有EPO的培养液培养3 d, 最后使用不含细胞因子的培养液继续与基质细胞共培养7 d, 使红细胞成熟脱核。这种方法诱导红细胞的产生具有很多优点。第一是产量高——D18时CD34⁺细胞产生的红细胞数量达到峰值, 扩增了大约(0.93~2.77)×10⁵倍; 第二是纯度高——D8从形态上判断红细胞可达到95%~98%; 第三是脱核效率高——D18脱核细胞达90%~100%。收获的这些红细胞可以直接应用于临床。近期该课题组报道了将自体外周血CD34⁺细胞分化的红细胞用⁵¹Cr同位素标记后回注给本人, 回输1 h后开始追踪到体内有⁵¹Cr⁺红细胞, 一直持续到第26天^[64]。首次证明了体外分化的红细胞可以在人体内存活, 发挥正常的生物学功能。

4.2 hESCs诱导分化的红细胞

除了成体造血干细胞, 人们也积极探索hESC/hiPSC体外大量产生成熟红细胞的方法, 并陆续有相关报道。Lu等^[30]探索了诱导hESCs向红细胞分化

的方法, 并对得到的红细胞的生物学特性进行了较全面的呈现。他们将包括了H1、MA01、MA99、HuES-3的多株hESCs细胞作为研究对象, 首先使hESCs形成3.5天EBs, 诱导分化形成血液血管祖细胞样前体细胞, 然后添加10余种细胞因子来大量扩增血液血管祖细胞。再向红系细胞定向分化并扩增, 最后与基质细胞OP-9共培养促进红细胞进一步成熟脱核。这种培养方法产量较高, 分化培养21天hESC得到的红细胞可以扩增(2.2~4.2)×10³倍; 脱核率高, 与OP-9共培养7天后大约有30%~65%细胞脱核; 但该方法获得的红细胞成熟度较低, 表达血红蛋白 β 的细胞比例仅约16%。

我们也报道了hESCs分化为包括红细胞在内的多种成熟血细胞的有效方法^[49]。在我们的培养体系中, hESC分化而来的成熟红细胞具有明显的脱核功能, 并能正常携氧和放氧, 和人类脐带血CD34⁺细胞产生的红血球氧解离曲线相吻合。这种方法中, 由hESC分化得到的红细胞扩增量可达100倍以上。最近我们实验室用hESC与小鼠AGM区域的基质细胞株(AGM-S3)共培养的方法也获得了大量的造血细胞。我们发现用这个培养体系得到的造血干/祖细胞向红细胞定向分化时, 分化效率更高, 扩增倍数可达到数百倍以上(数据未发表)。

近期也有将hiPSCs分化为红细胞的报道。Lapillon等^[65]将hiPSCs与H1进行对照研究。他们先将两种细胞培养形成EBs, 再定向分化为红细胞。结果显示两种来源的红细胞都只表达胚胎型血红蛋白, 几乎不表达成体型血红蛋白。

考察不同实验室的实验结果(表1), 浮现出一个值得进一步探索的现象: 用EBs产生血液血管祖细胞的方法, 从hESC产生的红细胞与胚胎期的原始红细胞的特性更接近; 而早期hESC和成体造血微环境基质细胞共培养的方法可以得到更多具有成体造血功能的成熟红细胞。这提示体外由hESCs/hiPSCs产生的功能成熟的红细胞, 基质细胞提供的适宜的微环境必不可少。这种成体造血微环境的细胞生物学特性和促进成体型造血的分子机制亟待广泛而深入的研究。

5 hESCs/hiPSCs产生红细胞的临床应用障碍

hESCs/hiPSCs向血细胞分化包括原始和成体造

表1 hESCs/hiPSCs体外不同诱导方法产生红细胞比较

Table 1 Comparison of erythrocyte derived from hESCs/hiPSCs by different inducing methods *in vitro*

| 方法 Methods | 产量 Productivity | 血红蛋白β表达比例 Expression ratio of Hb-β | 脱核率 Enucleation ratio | 相关文献 References | |
|------------------|---|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|------------|
| EB | Step1: hESC→EBs, SF/SC; Step2: differentiation to erythrocyte, SF. | High(10 ³ fold) | Little(2%) or no | High(34%~48%) | [61,65] |
| | Step1: hiPSCs→EBs, SF; Step2: differentiation to erythrocyte, SF. | Moderate(10 ² fold) | No | Low(4%~10%) | [65] |
| Coculture | Step1: hESC+Stromal cells, SC; Step2: expansion of hemagioblasts, SC; Step3: differentiation to erythrocyte, SC/SF; Step4: enhancing enucleation ratio by coculture with stromal cells(OP-9/MS-5), SF. | Moderate(10 ² fold) | High(99.8%±0.6%) | | [15,29,48] |
| EB+ coculture | Step1: hESC→EBs, SF; Step2: differentiation to erythrocyte, SF; Step3: enhancing enucleation ratio by coculture with stromal cells(OP-9/MS-5), SF. | | Low(0~16%) | High(30%~65%) | [30] |

SC: 含血清培养; SF: 无血清培养。

SC: serum containing culture; SF: serum free culture.

血过程。在向成熟红细胞分化的过程中尚有许多机理未被阐明。hESCs/hiPSCs体外分化产生的红细胞距离实际的临床应用还存在以下障碍。

5.1 体外扩增效率低

hESCs体外诱导产生的成熟红细胞可作为临床输血的新来源,然而在扩增效率上还远远不够。目前,每10⁴个hESCs/hiPSCs大约可产生10⁶~10⁷红细胞,而一次简单的输血需要(1~2.5)×10¹²红细胞(约500 mL全血,每mL全血约含5×10⁹红细胞),大约需要约10⁹~10¹⁰数量级的hESCs,可以想象细胞培养规模之大。在hESC/hiPSC大量产生红细胞并应用于临床之前,还需要进一步提高红细胞产生的效率。

5.2 异源培养体系

综合目前由hESC/hiPSC产生红细胞的报道,大部分培养体系存在成本较高、周期长、过程繁琐、不易于大规模生产等弊端。另外,培养过程还一定程度上依赖于饲养层细胞(多数为小鼠来源)、胎牛血清等异源物质,达不到临床应用的安全标准,迫切需要摸索开发出操作简单、成本较低的全人源化培养体系。

Miharada等^[66]将ES细胞由EBs向红细胞分化,在红细胞成熟末期,不使用基质细胞,加入D-甘露醇、腺嘌呤和米非司酮混合物脱核效率可达75%~80%。韩国Back等^[67]开发出了一种无血清、无基质细胞的红细胞分化培养体系。他们研究发现,在脐血中的CD34⁺向红系分化培养过程中,从13天开始添加 poloxamer 188(p188)聚合物(一种已知的利于细胞

应对流体应力的聚合物)能提高红细胞膜的稳定性、降低脆性,从而提高红细胞成熟末期的最终存活量,细胞脱核率可达到95%。我们研究组也在尝试以人源的AGM细胞代替鼠源的基质细胞,筛选可高效支持造血的人源AGM细胞株(感谢刘斌教授的馈赠),并已取得可喜的进展(数据未发表)。

5.3 活体移植模型的缺乏

hESC/hiPSC产生的红细胞应用于人体之前,我们需要建立一个评估人类红细胞在生理和疾病状态下移植效率和生物功能的动物模型。目前还缺乏一个高效而敏感的免疫缺陷小鼠模型用以体内移植人源红细胞。最近有报道提到这是因为人类红细胞对免疫缺陷小鼠的巨噬细胞高度敏感,易产生排斥反应^[68]。这提示我们可以建立一种防止人类红细胞被巨噬细胞排斥反应的免疫缺陷小鼠来作为研究人类红细胞功能的活体模型。

5.4 红细胞体外培养过程中脱核困难

红细胞在最后阶段会发生染色质浓缩并且将核挤出细胞,形成完全成熟的无核红细胞。hESC/hiPSC只有产生这样的脱核红细胞才能保证临床应用的安全。然而,目前在所有的体外培养体系中,由hESC/hiPSC产生红细胞的脱核效率都不高。红细胞脱核过程与多种分子和细胞路径相关^[69],包括肌动蛋白、胞浆移动、细胞凋亡、细胞吞噬作用、微环境、小分子物质、囊泡运输等,新近研究的热点主要集中在以下几个方面。

(1)囊泡运输(vesicle trafficking)

近期报道显示,如果抑制细胞的囊泡运输,对细胞的增殖、分化及凋亡没有影响,而会阻抑红细胞的脱核^[70]。说明囊泡运输的形成、移动和随后空泡在细胞核与胞质的交界处结合,是哺乳动物红细胞脱核过程的一个关键步骤。

(2)微环境

微环境主要包括巨噬细胞与红细胞的相互作用、细胞外基质等,对红细胞成熟脱核过程有着重要的影响^[71]。

红细胞与巨噬细胞之间通过二者间的黏附分子产生作用。最早发现成熟的巨噬细胞表面表达红细胞巨噬细胞蛋白(erythroblast macrophage protein, Emp),可与红细胞表面的Emp结合;而不成熟的巨噬细胞表面不表达Emp,不能与红细胞黏附。进一步研究还表明,在红细胞分化晚期,Emp介导的红细胞与巨噬细胞结合,可能有利于抑制红细胞凋亡的发生^[72-73]。McGrath等^[74]提到原始造血的有核红细胞循环至胎肝处,其整合蛋白 $\alpha 4\beta 1$ 与胎肝处的巨噬细胞黏附分子VCAM-1结合后,开始脱核。哺乳动物胚胎期原始造血的有核红细胞在体外不会自发脱核,但是与巨噬细胞共培养,就可以脱核^[74]。黏附分子ICAM-4与红系造血岛(erythroblastic islands)的形成有关^[75],近期又发现,红细胞的黏附分子ICAM-4与巨噬细胞的整合蛋白 αV 结合,可以促进血岛(blood island)结构的形成^[76-77]。ICAM-4的同种分泌型ICAM-4S在分化晚期表达上调,利于新生的网织红细胞从血岛结构解离出来进入血液循环。这些研究都提示,巨噬细胞在红细胞的成熟以及凋亡等过程中起着重要的作用。

(3)小分子物质

microRNA是一类约有22个核苷酸的小RNA片段,是近年来的研究热点,能在转录后水平降低特异靶基因的表达水平,有些microRNA对红细胞的脱核过程起到重要的调节作用,如miR-191可以阻断小鼠红细胞的脱核^[78]。而另一些蛋白多肽分子可以促进脱核。有专利报道阿黑皮素(POMC)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促脂解激素(LPH)、内啡肽等可以使红细胞成熟的最后一个阶段——脱核在短时间内完成^[79]。小分子具有用量少、效率高、成分确定等优点,利用小分子物质促进脱核,是一个很有前景的研究领域。

(4)组蛋白脱乙酰作用

Ji等^[80]近期报道了组蛋白脱乙酰激酶-2在哺乳动物红细胞发育末期的染色质凝缩和脱核过程起着重要的调节作用。虽然红细胞脱核的关键机制还不清楚,但是随着研究的推进,相信不久的将来红细胞的脱核机理会被清楚阐明,这将有利于指导hESC/iPSC体外产生红细胞大量脱核,以达到临床应用的安全标准。

5.5 对红细胞膜功能了解匮乏

红细胞膜附着在红细胞膜骨架(erythrocyte membrane skeleton)上面,红细胞膜骨架主要成分为血影蛋白和肌动蛋白,是一种能变形的圆盘状网架结构,有助于红细胞形状的改变。成熟的红细胞呈双面凹陷或单面凹陷的盘状,表面积与体积的比值较大,有利于细胞在循环过程中的变形、气体携带与交换。红细胞膜表面有许多抗原物质(包括400多种抗原),但是目前对hESCs/iPSCs体外产生红细胞的细胞膜特性了解甚微。

(1)血型分子

至今在红细胞膜上已发现30余个血型系统,血型分子与输血安全息息相关。关于由hESC/hiPSC分化得到的红细胞的血型分子表达的研究报道较少。Lu等^[30]在文献中提到,用免染的方法检测到hESC形成的EB产生的红细胞血型表达率仅约5%。可能是产生的红细胞源于原始造血,成熟程度不高的缘故。也可能是检测手段的灵敏度不够。我们研究组正在以H1与基质细胞共培养产生的红细胞为研究对象,尝试通过改变检测手段、提高检测灵敏度来探索红细胞表面的血型分子表达情况。

(2)表型分子

判断hESC产生红细胞发育阶段的标准,除了血红蛋白开关,还可以通过检测细胞表面表型分子的表达来实现。我们以往的研究发现,脐血来源的成熟红细胞(GPA⁺)不表达CD81分子^[81],而我们近期的研究发现hESC早期产生的CD45⁻GPA⁺红细胞与CD81分子共表达,随着血红蛋白 β 量的增加而逐渐下调^[29]。这些现象提示,CD81分子可以作为hESC来源的红细胞发育进程的标志性分子来追踪分化的过程。鉴于我们对人类胚胎造血细胞表面分子缺乏完整而明确的认识,有必要在hESC/hiPSC向造血分化发育的过程中进一步探索并分选出不同表型特征的细胞亚群分别继续培养,以判别不同表型特征细胞的分化命运。

6 展望

虽然人类干细胞研究仍存在着许多亟待解决的问题,随着hESCs/hiPSCs分化为红细胞研究的深入进展,我们可以阐明人类胚胎早期造血发生的过程,进而揭开从原始造血进入成体造血的调控机制。同时,hiPSC也可用于阐明各种遗传性血液疾病的发病机制,开拓个体化治疗方法。通过基因手段,我们可以对hiPSCs进行基因修饰,产生特定表型的红细胞(例如万能血型或稀有血型的红细胞),这将大大提高体外分化血细胞的临床应用可能性。在不远的将来,人类多潜能干细胞产生的成熟红细胞必将替代目前的输血治疗模式而广泛地造福于人类。

参考文献 (References)

- Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol* 2008; 25: 57-9.
- Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-4.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 1963; 62: 327-36.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9(11): 2110-7.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18(4): 399-404.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(12): 1129-33.
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhart E, Itzik A, *et al.* Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(12): 1134-40.
- Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, *et al.* Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001; 913(2): 201-5.
- Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by *in vitro* replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007; 25(5): 1145-55.
- Passier R, Oostwaard DW, Snapper J, Kloots J, Hassink RJ, Kuijk E, *et al.* Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 2005; 23(6): 772-80.
- Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10716-21.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 407-14.
- Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(7): 4391-6.
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50(8): 1691-7.
- Kaufman DS. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2009; 114(17): 3513-23.
- Rezania A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, *et al.* Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 2012; 61(8): 2016-29.
- Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, Momoshima S, Nakamura M, Okano H. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells. *Neurotherapeutics* 2011; 8(4): 668-76.
- Arenas E. Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1): 152-6.
- Li Z, Wilson KD, Smith B, Kraft DL, Jia F, Huang M, *et al.* Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction. *PLoS One* 2009; 4(12): e8443.
- Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Kirschmann DA, Lipavsky A, Wheaton WW, *et al.* Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(11): 4329-34.
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, *et al.* Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 2010; 28(4): 704-12.
- Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casasady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5856-61.

- 28 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 29 Ma F, Ebihara Y, Umeda K, Sakai H, Hanada S, Zhang H, *et al.* Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(35): 13087-92.
- 30 Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 112(12): 4475-84.
- 31 Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, *et al.* A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(1): 59-67.
- 32 Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, *et al.* Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* 2009; 113(26): 6584-92.
- 33 Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, *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(11): 5298-306.
- 34 Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: A genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 436-42.
- 35 Choi KD, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest* 2009; 119(9): 2818-29.
- 36 Slukvin, II, Vodyanik MA, Thomson JA, Gumenyuk ME, Choi KD. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* 2006; 176(5): 2924-32.
- 37 Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *J Immunol* 2005; 175(8): 5095-103.
- 38 Kovarova M, Latour AM, Chason KD, Tilley SL, Koller BH. Human embryonic stem cells: A source of mast cells for the study of allergic and inflammatory diseases. *Blood* 2010; 115(18): 3695-703.
- 39 Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: Efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005; 105(2): 617-26.
- 40 Timmermans F, Velghe I, Vanwalleghem L, de Smedt M, van Coppennolle S, Taghon T, *et al.* Generation of T cells from human embryonic stem cell-derived hematopoietic zones. *J Immunol* 2009; 182(11): 6879-88.
- 41 Sakamoto H, Tsuji-Tamura K, Ogawa M. Hematopoiesis from pluripotent stem cell lines. *Int J Hematol* 2010; 91(3): 384-91.
- 42 Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renstrom J, Lang R, *et al.* Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008; 3(1): 85-98.
- 43 Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehrauer W, Vodyanik M, *et al.* Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(3): 559-67.
- 44 Trivedi P, Hematti P. Simultaneous generation of CD34+ primitive hematopoietic cells and CD73+ mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells cocultured with murine OP9 stromal cells. *Exp Hematol* 2007; 35(1): 146-54.
- 45 Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity* 2002; 17(6): 749-56.
- 46 La Motte-Mohs RN, Herer E, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 *in vitro*. *Blood* 2005; 105(4): 1431-9.
- 47 Qiu C, Hanson E, Olivier E, Inada M, Kaufman DS, Gupta S, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp Hematol* 2005; 33(12): 1450-8.
- 48 Qiu C, Olivier EN, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood* 2008; 111(4): 2400-8.
- 49 Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaike Y, *et al.* Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Hematol* 2007; 85(5): 371-9.
- 50 Dzierzak E, Medvinsky A. Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* 1995; 11(9): 359-66.
- 51 Yoder MC. Introduction: Spatial origin of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 2001; 98(1): 3-5.
- 52 Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 2001; 29(8): 927-36.
- 53 Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, *et al.* Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* 2001; 97(7): 2016-22.
- 54 Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86(6): 897-906.
- 55 Yoder MC, Hiatt K, Mukherjee P. *In vivo* repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(13): 6776-80.
- 56 Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, *et al.* A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997; 386(6624): 488-93.
- 57 Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, Xu M, Ebihara Y, Ishii T, *et al.* Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* 2001; 98(1): 6-12.
- 58 Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 2004; 104(1): 19-25.
- 59 Brotherton TW, Chui DH, Gauldie J, Patterson M. Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(6): 2853-7.
- 60 Lu SJ, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an

- embryonic gene expression pattern. *Blood* 2004; 103(11): 4134-41.
- 61 Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, *et al.* Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006; 108(5): 1515-23.
- 62 Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, *et al.* Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002; 20(5): 467-72.
- 63 Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, *et al.* *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(1): 69-74.
- 64 Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Penec PY, *et al.* Proof of principle for transfusion of *in vitro*—generated red blood cells. *Blood* 2011; 118(19): 5071-9.
- 65 Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, Tropel P, Giarratana MC, Zanella-Cleon I, *et al.* Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: Perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 2010; 95(10): 1651-9.
- 66 Miharada K, Hiroshima T, Sudo K, Nagasawa T, Nakamura Y. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated *in vitro* from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24(10): 1255-6.
- 67 Baek EJ, Kim HS, Kim JH, Kim NJ, Kim HO. Stroma-free mass production of clinical-grade red blood cells (RBCs) by using poloxamer 188 as an RBC survival enhancer. *Transfusion* 2009; 49(11): 2285-95.
- 68 Hu Z, van Rooijen N, Yang YG. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. *Blood* 2011; 118(22): 5938-46.
- 69 Ji P, Murata-Hori M, Lodish HF. Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol* 2011; 21(7): 409-15.
- 70 Keerthivasan G, Small S, Liu H, Wickrema A, Crispino JD. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood* 2010; 116(17): 3331-40.
- 71 Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: Niches for erythropoiesis. *Blood* 2008; 112(3): 470-8.
- 72 Hanspal M, Hanspal JS. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: A 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood* 1994; 84(10): 3494-504.
- 73 Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 1998; 92(8): 2940-50.
- 74 McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. *Blood* 2008; 111(4): 2409-17.
- 75 Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med* 1995; 181(1): 411-5.
- 76 Lee G, Lo A, Short SA, Mankelov TJ, Spring F, Parsons SF, *et al.* Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 2006; 108(6): 2064-71.
- 77 Lee G, Spring FA, Parsons SF, Mankelov TJ, Peters LL, Koury MJ, *et al.* Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4: Potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions. *Blood* 2003; 101(5): 1790-7.
- 78 Zhang L, Flygare J, Wong P, Lim B, Lodish HF. miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Rik3 and Mxi1. *Genes Dev* 2011; 25(2): 119-24.
- 79 Hatta. Method for enucleating nucleated erythrocyte, and enucleation inducer. 2012.
- 80 Ji P, Yeh V, Ramirez T, Murata-Hori M, Lodish HF. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica* 2010; 95(12): 2013-21.
- 81 Ma F, Wada M, Yoshino H, Ebihara Y, Ishii T, Manabe A, *et al.* Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. *Blood* 2001; 97(12): 3755-62.

Generation of Functionally Mature Erythrocytes From Human Pluripotent Stem Cells: A Review on Methodology

Mao Bin, Ma Feng*

(Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu 610052, China)

Abstract The knowledge about the early development in human ontogeny has been greatly expanded by the establishment of human embryonic stem cell (hESC) lines and, recently, induced pluripotent stem cells (hiPSC). In the past decade, hESCs and hiPSCs have been proved good tools in characterization of molecular and cellular mechanisms controlling the normal and diseased differentiation of hematopoietic progenitors and mature, functional blood cells. Most of the types of hematopoietic cells (HCs) derived from hESCs have recently been shown with functionally mature properties, including erythrocytes, neutrophils, platelets, megakaryocytes, eosinophils, monocytes, dendritic cells (DC), nature killer (NK) cells, mast cells (MCs) and B/T-lineage lymphoid cells. Along with the advances in research, a clinical translation of hESC/hiPSC-derived HCs as novel therapies has been foreseen in near future. However, different efficiencies in blood cell production have been reported when using different culture systems. We recently established efficient blood cell-inducing systems by co-culture of hESC/hiPSCs with murine fetal stromal cells. In our culture system, hESC/hiPSC-derived hematopoietic progenitors are further induced along to a specific blood cell lineage, such as erythrocytes, MCs and eosinophils, etc. We gained large quantity of purified erythrocytes with maturity and function. In this review, we illustrate the co-culture methods developed in our laboratory, along with many different methods developed by other groups, and the technique to induce hESC/hiPSCs to hematopoietic cells and mature erythrocytes. The direction and the problems urgently needing a breakthrough in future research are also addressed.

Key words human ES cells; human iPS cells; erythrocytes; primitive hematopoiesis; definitive hematopoiesis

This work was supported by the General Program of National Natural Sciences Foundation of China (No.81170466/H0801) and National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2011AA020114)

*Corresponding author. Professor and Chair of the Center for Stem Cell Therapy, Institute of Blood Transfusion; Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College. Tel: 86-28-61648510, E-mail: mafeng@hotmail.co.jp