

红细胞成熟脱核机制的研究*

房芳 谢小燕 岳文 裴雪涛**

(军事医学科学院野战输血研究所, 全军干细胞与再生医学重点实验室, 北京 100850)

摘要 面对解决血液来源匮乏的问题, 开发新的血源已经成为当前医疗中的迫切需要, 其中一种重要的手段就是体外产生功能性的红细胞, 而脱核是关键的一步. 虽然目前的研究表明已经可以在体外条件下产生成熟的脱核红细胞, 但是诱导分化的效率相对较低. 不仅如此, 我们对红细胞脱核机制研究的并不是很清楚. 本文对于目前研究比较成熟的三种脱核理论, 包括细胞凋亡学说、不对称分裂学说、膜泡运输理论, 以及脱核过程中重要的蛋白质、microRNA 进行了阐述, 并对体外制备血细胞的前景进行了展望.

关键词 红细胞, 体外诱导, 成熟分化, 脱核

学科分类号 R331.1, Q461

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00477

在造血功能障碍、常规的贫血及休克治疗中, 输血是一个关键的环节. 虽然在发达国家有相对充足的血液供应, 但是存在血源性病毒无法完全清除的问题. 在发展中国家血液供应长期处于供不应求的状况, 近年来, 我国多个城市甚至出现“血荒”的说法. 要解决血液来源匮乏的问题, 开发新的血源已经成为当前医疗中的迫切需要. 其中的一个途径就是通过自体或者是通过干细胞研究的相关手段产生红细胞, 这包括脐带、成人骨髓、外周血来源的造血干/祖细胞及胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC). 这些细胞都可以作为种子细胞, 通过大量诱导扩增生成可用于移植的红细胞. 这样不仅可以避免血源性病毒无法完全清除的问题, 而且是一种新型的缓解供血不足的手段. 红细胞的成熟脱核对于输注医学应用意义重大, 但是迄今为止在诱导干细胞红系分化的体系中, 只有在基质细胞的辅助下诱导造血干/祖细胞才能实现较为高效的成熟和脱核效率, 而无基质细胞体系、或是以胚胎干细胞、诱导多能干细胞为起始细胞的诱导体系中, 红细胞成熟和脱核效率仍然有待提高. 以 hESC 和 iPSC 为例, Lu 研究团队^[1]的结果表明, 在体外条件下通过诱导 hESC 可以获得脱核红细胞, 并且该细胞有早期血红蛋白的表达和一定

的携氧能力, 并且在体外培养条件下也可以产生更为成熟的成人 β -珠蛋白, 但是其脱核效率在 60% 左右, 并且 β -珠蛋白的产生比例也仅维持在 16%. Ma 等^[2]的研究表明, 对于体外输血而言, 所需的红细胞在 $1 \times 10^{12} \sim 2.5 \times 10^{12}$ (500 ml 全血, 红细胞的数目维持在 5×10^9 /ml), 但是体外诱导分化所得的脱核红细胞的数目仅维持在由 10^4 的 hESC 可以获得 10^6 的成熟脱核红细胞, 由此看来所得到的脱核红细胞的数目远低于临床的需求. 此外, 由皮肤成纤维细胞、胚胎期的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)及胎儿 MCS 来源的 iPSC 在体外诱导条件下也可以获得类似 hESC 来源的早期红细胞^[3], 并且 iPSC 也可经诱导分化获得晚幼红细胞, 但是其脱核效率较低, 仅有 4%~10%^[4]. 不仅如此, 不同 hESC/iPSC 产生的红细胞的脱核效率和 hESC/iPSC 的代数及培养状态有很大的关系, 所以如何在体外诱导条件下高效获得功能性脱核红细胞仍是研究的重点.

* 国家高技术研究发展计划(863)(2011AA020109), 国家自然科学基金(31071303)和北京市科技新星计划(2011104)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2012-10-24, 接受日期: 2013-01-09

1 哺乳动物红细胞的形态及功能

哺乳动物的红细胞是构成血液细胞中含量最多的一种细胞, 约占血量的 94%。其细胞体积较小, 在形态学上呈两面凹的圆饼状, 这种形状可以最大限度地从周围摄取氧气。同时它还具有一定的弹性和柔韧性, 这使得它可以通过毛细血管, 并释放氧分子。血红蛋白是红细胞中含量最高的蛋白质, 它在氧含量高的地方容易与氧结合, 在氧含量低的地方又容易与氧分离。由于血红蛋白的这一特性, 使红细胞具有运输氧气的功能。不仅如此, 同哺乳动物其他细胞相比, 红细胞最大的特点就是没有细胞核。红细胞之所以要脱核的原因是由于有核红细胞的携氧能力低于脱核红细胞, 而且有核红细胞在跨越狭窄的毛细血管时容易发生溶血, 并且由于脱核细胞丢失了染色体和分裂能力, 移植后导致受者恶性转化的风险也明显降低。除此之外, 红细胞还承担着其他的一些功能, 如运送部分来自组织细胞中的二氧化碳、增强吞噬作用、免疫黏附作用、防御感染及其他的一些免疫学相关功能。

2 红细胞的发生

造血发生分为胚胎造血发生和成体造血发生。胚胎造血的器官主要根据胚胎发育的时间有所不同。胚胎时期的造血首先产生于卵黄囊的血岛处, 之后是胎肝造血期, 最后是骨髓进行造血发生。成人造血主要是由骨髓中的红骨髓来完成。红细胞就是由红骨髓中的造血干细胞持续产生的。整个红细胞的成熟需要 7 天左右, 之后成熟的红细胞进入血液循环系统, 还可以存活约 120 天, 最终衰老的红细胞会被脾脏、肝脏里的内皮系统破坏分解, 并被巨噬细胞吞噬。

骨髓中的造血干细胞向红系定向分化的过程经历了早期红系祖细胞(爆式集落形成单位(burst-forming unit-erythroid, BFU-E))→晚期红系祖细胞(红系集落形成单位(colony-forming unit-erythroid, CFU-E))→原成红细胞(也称为原始红细胞, proerythroblast)→嗜碱性成红细胞(也称为早幼红细胞, basophilic erythroblast)→多染性成红细胞(也称为中幼红细胞, ploychromatophilic erythroblast)→正染性成红细胞(也称为晚幼红细胞, orhtochromatic erythroblast)→网织红细胞(reticulocyte)→成熟红细胞(erythrocytes or red blood cells)几个阶段, 其中具有携氧作用的血红蛋白产

生起始于早幼红细胞阶段, 而细胞核的排出则发生在晚幼红细胞阶段。血红蛋白的生成和细胞核的排出是红细胞成熟的指标。在红细胞逐渐成熟的过程中, 会伴随着细胞体积的缩小、细胞核的凝集以及核质比的降低。而最终的脱核过程又可以具体到染色质凝集、核极化、膜蛋白聚类、核排出并被巨噬细胞吞噬几个阶段。

在生理条件下, 参与红细胞生成的物质包括氨基酸、脂肪、碳水化合物以及铁和一些生长因子, 如叶酸和维生素 B₁₂。在体内条件下红细胞的发生离不开促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)。EPO 产生于肾脏的毛细血管上皮中(肝脏也有此功能, 只是其分泌量相对少很多), 然后再进入血液随着循环系统作用于骨髓, 促进早期红细胞的生成及分化, 但是在网织红细胞阶段, 对 EPO 的需要会大大降低。此时, 细胞会通过自分泌作用分泌一些和细胞进一步脱核成熟相关的因子, 从而参与到终末分化信号通路, 促进红细胞的最终成熟。

3 红细胞脱核机制的研究

红细胞的脱核是红细胞成熟终末阶段发生的关键事件^[5]。所谓的红细胞脱核指的是在红细胞分化成熟的终末阶段(晚幼红细胞阶段), 细胞核发生皱缩、边缘化并与细胞质分离的过程^[6]。生理条件下, 细胞核的脱落是在成红细胞岛中进行的, 并且该过程的发生与巨噬细胞密切相关。有研究报道, 通过透射电子显微镜和扫描电镜的观察, 发现巨噬细胞处于红细胞岛中央位置, 周边环境有即将脱核红细胞。进一步的研究表明, 巨噬细胞表面有众多黏附分子, 包括红细胞巨噬细胞蛋白(erythroblast macrophage protein, EMP)^[7]、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)^[8]、 α_v 整合蛋白^[9], 红细胞表面也有 $\alpha_4\beta_1$ 整合蛋白和细胞间黏附分子 4 (intercellular adhesion molecule-4, ICAM-4)等蛋白质。这些蛋白质为二者的相互接触提供了条件。巨噬细胞不仅有锚定红细胞的功能, 并且还可以吞噬红细胞成熟过程中脱出的细胞核。除此之外, 巨噬细胞还可以通过胞吐作用分泌由自身合成的铁蛋白, 从而促进红细胞的成熟、分化。

我们已经认识到一部分生理条件下红细胞是如何进行脱核的, 但是目前对脱核机制研究并不明确, 并且体外成熟红细胞的制备技术也仍待改进, 特别是多种类型的干细胞诱导生成的成红细胞中脱核效率的提高。该机制的研究对于我们进一步认识

红细胞的成熟, 实现体外高效诱导获得功能性红细胞具有重要意义. 目前对于红细胞脱核机制的研究主要有三种理论: 细胞凋亡学说、不对称分裂学说以及膜泡运输理论.

3.1 细胞凋亡学说

在形态及分子变化上, 红细胞成熟的过程中伴随着细胞体积的缩小、胞膜的形成、线粒体膜电位消失以及由于组蛋白 H3K9 的甲基化和 H4K12 的去乙酰化导致的染色质皱缩^[10]、细胞核凝集、部分核物质的溶解及外漏至胞浆. 细胞凋亡过程中也会出现类似的现象. 另外, 已经有证据表明在角蛋白细胞^[11]及晶状体上皮细胞^[12]脱核的过程中有类似细胞程序性死亡的机制, 比如该过程中存在类细胞凋亡家族蛋白 CPP32 的表达上调, 而其抑制表达则会明显地抑制细胞脱核.

虽然该学说有一些上述生物学现象的支持, 但是也有否定的观点. 例如 Clark 等^[9]进行的关于半胱天冬蛋白酶 3(caspase-3)信号通路在红细胞分化成熟过程中的研究. 我们都知道半胱天冬蛋白酶在凋亡过程中起着必不可少的作用, 细胞凋亡的过程实际上是该蛋白酶不可逆有限水解底物的级联放大反应过程. 但是在作者的进一步研究中发现, caspase-3 信号通路在红细胞成熟过程中的表达并不在于促进红细胞类似凋亡现象的发生, 从而进一步促进红细胞脱核. 因为作者使用 caspase-3 信号通路抑制剂以及特异性 caspase-3 的 siRNA 虽然观察到了红细胞的脱核效率下降了 50%, 但是其 siRNA 的使用并未对整个过程中的凋亡比例产生影响, 并且有大量细胞不能够完成从原始红细胞到嗜碱性红细胞的分化成熟. Krauss 等^[13]进一步的研究是在小鼠的红细胞中检测由 caspase 所致的靶蛋白降解, 这些靶蛋白都是有丝分裂的重要组件, 包括 lamin B(其在丝状网络中与核信封蛋白及 DNA 的相互作用)、NuMA (nuclear mitotic apparatus)、剪接因子 Sm 和 SC35. 研究结果表明, 这些蛋白质仍可以在红系分化的晚期保持正常功能, 这进一步表明 caspase 并未通过凋亡信号通路影响到该阶段这些重要核蛋白的正常功能. 不仅如此, 在人^[14]和小鼠胎肝^[15]中的实验也表明 caspase 信号通路抑制剂的添加会影响红细胞早期的分化, 并且通过线粒体途径激活的 caspase 信号通路、核纤层切割蛋白的表达均不会导致细胞程序性死亡的发生, 这些结果进一步表明 caspase 信号通路在红系分化成熟过程中并不是发挥了促进凋亡的作用. 这些证据都表

明, 虽然 caspase 参与到红系分化成熟的过程中, 但并不是针对脱核过程而发生的, 而是对早期红细胞的分化成熟有重要影响.

3.2 不对称分裂学说

细胞有丝分裂的过程是细胞中染色体凝集后, 纺锤体出现, 随后子染色体被平均分配到两个子细胞中, 这种分裂方式普遍见于高等动植物细胞. 有研究证据表明, 红细胞脱核的过程是一种特殊形式的有丝分裂过程, 只不过这个分裂是不对称的, 一个子代细胞分裂得到细胞核和少量胞浆, 另外一个获得大量的胞浆, 但是没有核, 也就是所谓的脱核红细胞. 该学说的证据就是在红细胞脱核的过程中会有整个细胞骨架的参与, 出现肌动蛋白的聚集, 并且最终产生类似 2 个子代细胞. 相关的实验证据就是在早期的研究中, 免疫荧光的相关实验结果表明肌动蛋白聚集于红细胞细胞核和细胞质的收缩区域^[16-18]. Ji 等^[19]在小鼠的红细胞脱核研究中表明, 在脱核的阶段, Rac GTP 酶(Rac GTPases)和下游的 mDia2 蛋白在未影响小鼠胎肝成红细胞增殖和分化的情况下, 参与肌动蛋白的富集并形成有丝分裂沟, 从而促进该区域的断裂, 进一步甩出细胞核. 使用抑制肌动蛋白聚合的松胞菌素 D 则会抑制细胞的分化和脱核^[17, 20-23]. 不仅如此, 有一种在终末分化的红细胞中高表达的非肌球蛋白 II b, 若使用该蛋白质小分子化合物抑制剂 blebbistatin 抑制该蛋白激酶的作用则会明显抑制细胞的分裂和脱核^[24]. 这些证据都充分说明肌动蛋白和细胞骨架对红细胞的终末分化成熟有重要作用, 但是, 对于肌动蛋白及细胞骨架到底在脱核过程中发挥的作用并没有进行明确的阐述. 该学说反面的观点是在早期的研究中有证据表明, 我们熟知的参与细胞骨架及细胞分裂过程的微管蛋白并没有参与到终末的脱核过程中. 尽管有研究表明微管对晚幼红细胞脱核前的准备(胞质分裂沟形成之前)——细胞极性的产生有重要的作用^[25], 并且 Wang 等^[26]的研究结果也表明由微管介导的 PI3K 信号通路的活化会引发 Actin 的不对称聚集, 从而导致细胞极化现象的产生, 并且这种现象的产生为下一步细胞核的移位及最终细胞核的排出会有重要的意义. 但是 Koury 研究团队^[27]进一步的研究表明使用微管相关的抑制剂并不会影响脱核效率, 类似的研究结果是对参与到胞质分裂沟形成的 RhoA 蛋白进行的研究^[28-30], 结果表明使用 RhoA 突变体或者是添加 RhoA 特异性抑制剂 C3 胞外酶都不会对红细胞的脱核产生影响^[19]. 这些结

果进一步表明参与细胞骨架组成的微管仅参与到脱核前的准备阶段, 但是对红细胞的终末脱核并没有作用。

3.3 膜泡运输理论

膜泡运输包括内吞和外排作用, 不仅参与到细胞内部内膜系统各个部分之间的物质传递, 而且对于细胞间营养物质的交换及信号的传递都有重要作用。比如在红细胞分化成熟过程中所需要的转铁蛋白都是通过受体介导的内吞作用进行的。

近年来有越来越多的证据支持这种脱核机制。电镜观察结果揭示, 在红细胞即将脱核的胞浆端有大量膜泡的聚集^[31-33]。Keerthivasan 等^[31]的研究结果进一步表明使用膜泡运输的化学抑制剂肉豆蔻基三甲基铵溴化物(myristyl trimethyl ammonium bromides, MitMAB)和莫能菌素(monensin)会明显地抑制红细胞的脱核, 并且对细胞的分化、增殖及凋亡都没有明显的影响。使用 siRNA 的技术手段下调网格蛋白(一种形成膜泡的重要蛋白)的形成, 会明显地抑制晚期红细胞的脱核。相反, 若使用膜泡形成的促进剂 vacuolin-1 却可以明显地促进脱核细胞的比例。该研究小组认为, 膜泡的形成、运输及最后的融合对于脱核都有重要的作用。虽然作者认为膜泡

在脱核的过程中发挥了重要作用, 但是作者并不否认肌动蛋白的作用。他们认为也许肌动蛋白的主要作用是对红细胞形态的维持及改变, 并且对于膜泡的形成、运输以及其他细胞器的运输都有重要意义^[31]。但是 Keerthivasan 等最后只是通过示意图显示了膜泡运输对于红细胞脱核的影响, 并没有真正影像学的证据证明这个过程的发生, 作者仅仅是在脱核的胞浆端观察到了膜泡的存在。

虽然每种学说都有自己充分的证据, 但是也有一些不利的因素。目前对于红细胞终末分化成熟的机制, 我们还是知之甚少, 只是通过少量现象学的观察进行的猜测。笔者认为, 当前的研究结果对于凋亡学说的支持越来越少, 红细胞的脱核到底要归因于不对称分裂还是膜泡运输, 或者是其他的机制, 还需要进一步深入的研究。按照目前的研究结果, 一种可能的机制是将膜泡运输和不对称分离学说相结合(图 1)——即将脱核的细胞响应脱核信号, 发生细胞骨架(图 1-1 虚线箭头所示)的重排, 并通过骨架将部分膜泡向细胞核与胞浆的交界处运送, 之后膜泡联合肌动蛋白(图 1-2 图形虚线所示)所形成的胞质分裂沟共同促进了细胞核的脱落。

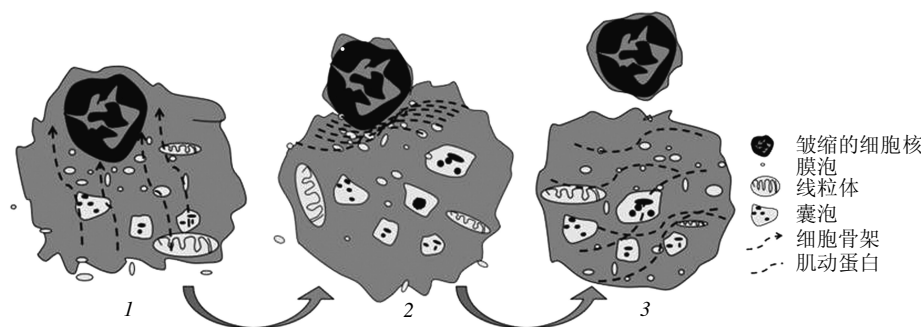


Fig. 1 The schematic diagram of erythrocyte enucleation

图 1 红细胞脱核模式图

1: 红细胞脱核早期, 细胞骨架重排, 细胞核发生皱缩并边缘化。2: 红细胞脱核中期, 肌动蛋白聚集于边缘化的细胞核与胞浆的交界处, 促进胞质分裂沟的形成。同时细胞中的小膜泡向分裂沟处运输并发生融合。3: 红细胞脱核晚期, 胞质分裂沟和发生聚集、融合的膜泡共同促进了细胞核与细胞质的分离并最终完成红细胞的脱核。

4 其他参与脱核的重要因素

在红细胞脱核的过程中, 有众多的蛋白质及因子参与其中。去除参与上述理论的蛋白质外, 下面

介绍一些重要的蛋白质和 micorRNA。

4.1 细胞周期相关蛋白质

4.1.1 视网膜母细胞瘤蛋白。视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)是一种细胞周期相关蛋

白, 其对细胞的增殖和分化都有重要的调控作用. Rb 缺陷的小鼠会在胚胎发育第 14.5 天死于包括成熟红细胞明显减少在内的一些发育缺陷^[34-36]. Rb 缺陷型的胎肝细胞在体外进行集落形成实验时, BFU-E 中血红蛋白的产生会明显降低, 而由 BFU-E 进一步扩增和成熟所形成的 CFU-E 的数量也会明显减少^[35]. 这些证据都表明 Rb 在红细胞成熟过程中发挥了重要作用. Clark 等^[37]的研究表明细胞内源性产生的磷酸化 Rb(phosphorylated Rb, pRb)对细胞周期的调控及红细胞的终末分化成熟都是必需的. Spike 等^[38]的研究表明在压力造血的情况下, pRb 也同样发挥了重要的作用.

4.1.2 p38 α . Schultze 等^[39]的研究表明, 在高浓度的 EPO 及模拟压力造血的情况下, p38 α , 一种丝裂原活化蛋白, 会被激活表达, 而它的缺失会下调 p21 的表达, 进一步抑制 Rb 的磷酸化, 从而完全阻断早期红细胞的脱核.

4.2 细胞核及染色质凝集相关蛋白

4.2.1 组蛋白去乙酰化酶 2 (histone deacetylase, HDAC2). 组蛋白的乙酰化和去乙酰化对于其功能的发挥有重要的调控作用. Ji 等^[40]的研究表明, 在 14.5 天小鼠胎肝红系发生过程中, 使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古霉素 A 和丙戊酸作用于即将脱核的细胞, 会明显地抑制染色体的凝集、肌动蛋白收缩环的形成以及细胞的脱核. 进一步的研究还表明在该发育阶段的细胞中, 组蛋白去乙酰化酶 1、2、3 和 5 都高表达, 通过 siRNA 技术, 作者进一步发现是 HDAC2 发挥了作用. 这表明染色质的凝集和肌动蛋白收缩环的形成对红细胞的脱核都有重要意义, 在这些过程中, HDAC2 又发挥了重要的调控作用.

4.2.2 c-Myc(Myc). Jayapal 等^[41]的研究表明在正常情况下, 原癌基因 c-Myc 的表达含量在红系分化成熟的晚期阶段明显降低, 而进一步的研究结果表明, c-Myc 持续性表达会特异性地抑制红细胞细胞核的凝集及脱核过程的发生. 这是因为在晚期红细胞阶段, c-Myc 的存在使得组蛋白乙酰基转移酶 Gcn5 的表达量增加, 而 Gcn5 的异常表达会抑制晚期红细胞细胞核的凝集并且会抑制组蛋白 H3 及 H4 中赖氨酸残基的去乙酰化作用, 从而可以抑制红细胞的脱核. 这些结果表明, 在红细胞成熟的晚期, c-Myc 的下调表达对红细胞的正常脱核有重要意义.

4.2.3 MENT(mature erythrocyte nuclear termination stage specific protein). 该蛋白质在鸡红细胞发生的终末阶段表达量较高, 并且在成熟的鸡红细胞核中聚集表达. 研究结果表明 MENT 可以促进末期成熟鸡红细胞染色体凝聚和核塌陷, 并且对体外条件下非成熟红细胞染色质的凝集有重要作用^[42-43].

4.3 细胞骨架相关蛋白

肌动蛋白(actin)作为细胞骨架的重要组成部分, 参与细胞形态的维持、变形及细胞有丝分裂的过程. 虽然介绍了上述三种不同的脱核理论, 但是每种理论都不排除 actin 对红细胞终末分化成熟的作用. 大量的文献表明, 在脱核过程中免疫荧光的结果显示有大量的 actin 聚集于即将脱核的胞质分裂沟处^[19, 44-45], 并且也参与到了细胞形态的重塑中. 不仅如此, 添加 actin 的抑制剂——松胞菌素会明显地抑制细胞核极化现象的产生及脱核^[45].

4.4 转录抑制因子

MTB (more than blood), 该蛋白质是小鼠 condensin II subunit mCAP-G2 的同源类似物. Xu 等^[46]的研究表明, MTB 可以与碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子家族的干细胞白血病基因(stem cell leukemia, SCL)及 E12 相互作用, 从而抑制了由 SCL/E12 所介导的转录调控作用. 由于 SCL 本身对红细胞的终末分化成熟有重要的作用, 所以在小鼠红白血病细胞系 MEL 细胞中过表达全长的 MTB 会明显地促进联苯胺染色阳性细胞的表达, 作者认为 MTB 促进红细胞的终末分化成熟的作用有可能是通过与 SCL/E2 的相互作用而发生的, 也有可能调控了其他相关基因, 但是作者仅提出了这两个假说并未进行深入的研究.

4.5 microRNA

作为一种小的非编码调控 RNA, microRNA 在转录后水平对基因的表达进行调控. 研究发现, 在造血分化中, miRNA 的表达也发生有规律的变化, 它们通过靶转录因子、生长因子受体以及响应细胞外刺激的特异转录本发挥作用. 目前的研究表明有众多的 microRNA 也参与到红系发生过程中, 包括 miR-15a、miR-16-1、miR-126、miR-144、miR-191、miR-451 和 miR-210^[47], 在这些 microRNA 中, 对红细胞脱核有直接促进作用的包括 miR-191 和 miR-144/451. 其中 miR-191 可以通过下调表达组蛋白乙酰化相关的 Riok3 和 Mxi1,

来调控组蛋白的乙酰化、细胞质的凝集以及脱核的发生^[48]。由 GATA1 激活的 miR-144/451 则分别靶向 Klf1^[49]和 GATA2^[50]的表达来促进斑马鱼红系的脱核成熟。本实验室对 microRNA 参与红细胞脱核也很感兴趣。虽然目前的研究表明有大量的 microRNA 参与到红系的分化过程中,但是参与红细胞终末脱核成熟的 microRNA 并不是很多,仅有上述的 miR-191 和 miR-144/451。目前的研究结果至少表明确有 microRNA 参与到红细胞的终末分化成熟过程中。microRNA 种类繁多,调控的下游靶基因也比较多,我们希望通过研究可以发现更多的参与红细胞终末分化成熟的 microRNA。这样就可以通过过表达或者是下调表达来调控相应 microRNA 的表达,并通过下游靶基因的作用来促进红细胞的脱核,最终实现脱核效率的提高,这对于体外制备红细胞应用于临床将具有重要的意义。

当红细胞完成脱核后,还要通过自噬体的形成来进行一些细胞器的清除,例如线粒体、核糖体等^[51],之后才会完成最终的成熟,进入血液循环系统中。

5 小结与展望

在之前的研究中,科学家们对体外条件下红细胞成熟及脱核有了进一步的认识,形成了一系列的理论、学说。这对我们认识红细胞的发生、成熟都是很有帮助的。但是对这个复杂过程的发生,我们还有很多不清楚的地方,比如:红细胞脱核的机制到底是什么;参与红细胞成熟脱核过程中众多蛋白质里的核心蛋白是哪个;有哪些信号通路参与到整个过程,其中又是哪条信号通路发挥了主导作用;我们又该如何通过这些核心蛋白或者关键信号通路提高红细胞体外脱核效率使其可以应用到临床水平;或者是通过影响这些蛋白质或者是信号通路的小分子及 microRNA 发挥作用。这些都是有待解决的问题。

在干细胞与再生医学的研究平台上,我们希望通过红细胞成熟与脱核机制的充分解析,实现体外大量制备成熟红细胞的目标,供应临床需求。其中, hESC 或 iPSC 由于具有长期大量扩增和定向诱导分化的潜能,是我们重点关注的种子细胞之一。将 hESC/iPSC 诱导生成成熟红细胞需要经历中/内胚层-红系祖细胞-成熟红细胞几个阶段,基于现有的研究水平,这是一个耗时长、成本昂贵且诱导效率偏低的过程。为了降低细胞培养成本,

本实验室开展了过表达碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factors, bFGF)的人源化胎肝基质细胞作为饲养层细胞并在体外培养 hESC, 研究结果表明该饲养层细胞可以很好地维持 hESC 的干性^[52]。不仅如此,引入人源化的胎肝基质细胞还避免了鼠源基因污染细胞的问题^[53]。同时本实验室还开展了利用人胎肝基质细胞联合细胞因子诱导 hESC 高效产生红系祖细胞的实验,获得的红系细胞不仅有早期血红蛋白的表达、一定的携氧能力,而且还可在体外条件下诱导分化为成熟的脱核红细胞^[54]。红系祖细胞的输注可用于治疗红细胞减少相关的慢性疾病,但是在急性损伤的情况下,对大量成熟红细胞仍有较高的需求,需要我们进一步研究红细胞高效诱导成熟脱核的方法。我们将通过对 microRNA 调控红细胞终末分化脱核的研究提高这一过程的效率,获得可用于临床的功能性红细胞。这些都为以 hESC 作为起始细胞大规模诱导产生红细胞应用于临床奠定了一定的基础。

综上所述,理解红细胞成熟脱核的机制是红细胞应用于临床的基础,但是目前还有很多有待解决的问题。我们相信随着科技的进步及上述问题的解决,基于前期理论基础的指导下建立的基因修饰或者是外源小分子、蛋白质或者是 microRNA 的修饰而形成的成熟红细胞的脱核体系,可以在体外条件下使用不论是以脐带、成人骨髓、外周血来源的造血干/祖细胞或者是 hESC/iPSC 这些细胞作为种子细胞制备功能性红细胞,而最终这些红细胞会伴随着高安全性、低免疫原性、高存活率应用到临床,这是解决血源性病毒无法完全清除及缓解供血压力的有效途径。

参 考 文 献

- [1] Lu S J, Feng Q, Park J S, *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*, 2008, **112**(12): 4475-4484
- [2] Ma F, Ebihara Y, Umeda K, *et al.* Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105** (35): 13087-13092
- [3] Chang C J, Mitra K, Koya M, *et al.* Production of embryonic and fetal-like red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2011, **6**(10): e25761
- [4] Lapillonne H, Kobari L, Mazurier C, *et al.* Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica*, 2010, **95**(10): 1651-1659
- [5] Clark A J, Doyle K M, Humbert P O. Caspase-3 has a nonapoptotic

- function in erythroid maturation. *Blood*, 2004, **103**(11): 4310–4316
- [6] Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino J D. Erythroblast enucleation. *Stem Cells International*, 2011, **2011**: 139851 (DOI: 10.4061/2001/139851)
- [7] Hanspal M, Hanspal J. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparinbinding protein is involved in this contact. *Blood*, 1994, **84**(10): 3494–3504
- [8] Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med*, 1995, **181**(1): 411–415
- [9] Lee G, Lo A, Short S A, *et al.* Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*, 2006, **108**(6): 2064–2071
- [10] Popova E Y, Krauss S W, Short S A, *et al.* Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res*, 2009, **17**(1): 47–64
- [11] Nagata S. Breakdown of chromosomal DNA. *Cornea*, 2002, **21** (2): S2–S6
- [12] Ishizaki Y, Jacobson M D, Raff M C. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biology*, 1998, **140**(1): 153–158
- [13] Krauss S W, Lo A J, Short S A, *et al.* Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. *Blood*, 2005, **106**(6): 2200–2205
- [14] Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*, 2001, **193**(2): 247–254
- [15] Kolbus A, Pilat S, Husak Z, *et al.* Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med*, 2002, **196**(10): 1347–1353
- [16] Xue S P, Zhang S F, Du Q, *et al.* The role of cytoskeletal elements in the two-phase denucleation process of mammalian erythroblasts *in vitro* observed by laser confocal scanning microscope. *Cell Mol Biol*, 1997, **43**(6): 851–860
- [17] Koury S T, Koury M J, Bondurant M C. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biology*, 1989, **109**(6 Pt 1): 3005–3013
- [18] Wickrema A, Koury S T, Dai C H, *et al.* Changes in cytoskeletal proteins and their mRNAs during maturation of human erythroid progenitor cells. *J Cell Physiology*, 1994, **160**(3): 417–426
- [19] Ji P, Jayapal S R, Lodish H F. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(3): 314–321
- [20] Mohandas N. Exit strategy: one that works. *Blood*, 2012, **119**(4): 906–907
- [21] Repasky E A, Eckert B S. A reevaluation of the process of enucleation in mammalian erythroid cells. *Prog Clin Biol Res*, 1981, **55**: 679–692
- [22] Repasky E A, Eckert B S. The effect of cytochalasin B on the enucleation of erythroid cells *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, 1981, **221**(1): 85–91
- [23] Yoshida H, Kawane K, Koike M, *et al.* Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, 2005, **437**(7059): 754–758
- [24] Ubukawa K, Guo Y M, Takahashi M, *et al.* Enucleation of human erythroblasts involves nonmuscle myosin II B. *Blood*, 2012, **119**(4): 1036–1044
- [25] Konstantinidis D G, Pushkaran S, Johnson J F, *et al.* Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood*, 2012, **119**(25): 6118–6127
- [26] Wang J X, Ramirez T, Ji P, *et al.* Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt 2): 340–349
- [27] Koury S T, Koury M J, Bondurant M C. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biology*, 1989, **109**(6): 3005–3013
- [28] Bement W M, Benink H A, von Dassow G. A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol*, 2005, **170**(1): 91–101
- [29] D'Avino P P, Savoian M S, Glover D M. Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 8): 1549–1558
- [30] Glotzer M. The molecular requirements for cytokinesis. *Science*, 2005, **307**(5716): 1735–1739
- [31] Keerthivasan G, Small S, Liu H, *et al.* Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. *Blood*, 2010, **116** (17): 3331–3340
- [32] Simpson C F, Kling J M. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol*, 1967, **35**(1): 237–245
- [33] Iacopetta B J, Morgan E H, Yeoh G C. Receptor-mediated endocytosis of transferrin by developing erythroid cells from the fetal rat liver. *J Histochem Cytochem*, 1983, **31**(2): 336–344
- [34] Clarke A R, Maandag E R, van Roon M, *et al.* Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature*, 1992, **359** (6393): 328–330
- [35] Jacks T, Fazeli A, Schmitt E M, *et al.* Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, 1992, **359**(6393): 295–300
- [36] Lee E Y, Chang C Y, Hu N, *et al.* Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, 1992, **359** (6393): 288–294
- [37] Clark A J, Doyle K M, Humbert P O. Cell-intrinsic requirement for pRb in erythropoiesis. *Blood*, 2004, **104**(5): 1324–1326
- [38] Spike B T, Dirlam A, Dibling B C, *et al.* The Rb tumor suppressor is required for stress erythropoiesis. *The EMBO J*, 2004, **23**(21): 4319–4329
- [39] Schultze S M, Mairhofer A, Li D, *et al.* p38 α controls erythroblast enucleation and Rb signaling in stress erythropoiesis. *Cell Research*, 2012, **22**(3): 539–50
- [40] Ji P, Yeh V, Ramirez T, *et al.* Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*, 2010, **95**(12): 2013–2021

- [41] Jayapal S R, Lee K L, Ji P, *et al.* Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *J Biol Chem*, 2010, **285**(51): 40252–40265
- [42] Grigoryev S A, Woodcock C L. Stage-specific expression and localization of MENT, a nuclear protein associated with chromatin condensation in terminally differentiating avian erythroid cells. *Exp Cell Res*, 1993, **206**(2): 335–343
- [43] Grigoryev S A, Solovieva V O, Spirin K S, *et al.* A novel nonhistone protein (MENT) promotes nuclear collapse at the terminal stage of avian erythropoiesis. *Exp Cell Res*, 1992, **198**(2): 268–275
- [44] Ji P, Murata-Hori M, Lodish H F. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol*, 2011, **21**(7): 409–415
- [45] Wang J X, Ramirez T, Ji P, *et al.* Mammalian erythroblast enucleation requires PI3K-dependent cell polarization. *J Cell Sci*, 2012, **125**(Pt 2): 340–349
- [46] Xu Y, Leung C G, Lee D C, *et al.* MTB, the murine homolog of condensin II subunit CAP-G2, represses transcription and promotes erythroid cell differentiation. *Leukemia*, 2006, **20**(7): 1261–1269
- [47] Bianchi N, Zuccato C, Finot A, *et al.* Involvement of miRNA in erythroid differentiation. *Epigenomics*, 2012, **4**(1): 51–65
- [48] Zhang L, Flygare J, Wong P, *et al.* miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Mxi1 and Rik3. *Genes Dev*, 2011, **25**(2): 119–124
- [49] Fu Y F, Du T T, Dong M, *et al.* Mir-144 selectively regulates embryonic α -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood*, 2009, **113**(6): 1340–1349
- [50] Pase L, Layton J E, Kloosterman W P, *et al.* miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation *in vivo* via its target GATA2. *Blood*, 2009, **113**(8): 1794–1804
- [51] Ney P A. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol*, 2011, **18**(3): 152–157
- [52] Xi J F, Wang Y F, Zhang P, *et al.* Human fetal liver stromal cells that overexpress bFGF support growth and maintenance of human embryonic stem cells. *Plos one*, 2010, **5**(12): e14457
- [53] 杨超, 习佳飞, 岳文, 等. 胚胎干细胞向造血干/祖细胞定向诱导分化的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(7): 797–802
- Yang C, Xi J F, Yue W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(7): 797–802
- [54] Liu Y X, Yue W, Ji L, *et al.* Production of erythroid cells from human embryonic stem cells by fetal liver cell extract treatment. *BMC Dev Biol*, 2010, **10**: 85(DOI: 10.1186/1471-213X-10-85)

The Mechanism of Erythrocytes Enucleation*

FANG Fang, XIE Xiao-Yan, YUE Wen, PEI Xue-Tao**

(Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract To solve the shortage of blood sources has become an urgent need in the current medical. One of the important solutions is functional production of erythrocytes *in vitro* using stem/progenitor cells. But enucleation remains one of the critical rate-limiting steps. Even though reticulocytes could be produced *in vitro*, the low efficiency should be concerned. To uncover the molecular mechanism of erythroblast enucleation will facilitate *ex vivo* production of functional erythrocytes. This review summarizes three prevalent enucleation mechanisms, including apoptosis, asymmetric cytokinesis and vesicle trafficking, discusses proteins and microRNAs playing important role in the process, and evaluates the prospects for *ex vivo* production of red blood cells.

Key words erythrocyte, maturation and differentiation, enucleation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00477

* This work was supported by grants from National High Technology Research and Development Program of China (2011AA020109), The National Natural Science Foundation of China (31071303), Science and Technology Project of Beijing (2011104).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: October 24, 2012 Accepted: January 9, 2013