

Gata1/FLI1 重编程 B 淋巴细胞生成巨核细胞样细胞*

朱俊先, 袁紫慧, 胡志月, 姚红, 谢华锋

华南理工大学医学院, 广东 广州 510006

摘要: 血小板短缺是临床实践中的常见问题, 基于细胞重编程的工程化血小板制备技术是解决该难题的一种潜在方案。本研究以 B 淋巴细胞为起始细胞, 探索通过转录因子 Gata1 和 FLI1 驱动细胞重编程生成巨核细胞的可能性。研究发现, 通过过表达转录因子 Gata1, 部分小鼠原代 B 淋巴细胞能够被诱导表达巨核细胞特异性标志物 Cd41 和 Cd42, 显示其向巨核细胞样细胞转分化的潜力。进一步研究表明, 共表达 FLI1 和 Gata1 或使用 Ezh2/Ezh1 抑制剂 UNC1999 处理, 均可显著提高细胞重编程效率。重编程细胞经过 10~14 d 培养, 部分细胞呈现前血小板形态特征。值得注意的是, 过表达 BCR-ABL 诱导的永生化 B 淋巴细胞仍保持对 Gata1/FLI1 诱导的响应性。综上所述, 本研究表明 B 淋巴细胞具有重编程为巨核细胞的潜力, 有望成为工程化血小板制备的起始细胞。此外, 由于 B 淋巴细胞具备悬浮培养特性, 并且在永生化过程中仍保持对重编程因子的响应性, 基于 B 淋巴细胞的重编程体系可能在实际应用中更易于实现大规模制备。

关键词: B 淋巴细胞; 细胞重编程; 巨核细胞; UNC1999

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2026)02-0088-11

Gata1/FLI1-mediated reprogramming of B lymphocytes into megakaryocyte-like cells

ZHU Junxian, YUAN Zihui, HU Zhiyue, YAO Hong, XIE Huafeng

School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: Platelet shortages are a common issue in clinical practice, and the growing demand for platelet transfusions has made this problem even more prominent. Platelets generated through cell reprogramming may provide a promising solution to address this critical challenge. Here, we report that enforced expression of transcription factors Gata1 and FLI1 reprograms murine bone marrow B lymphocytes into megakaryocytes. Notably, the expression of Gata1 alone in B lymphocytes was sufficient to induce the activation of megakaryocyte-specific markers, such as Cd41 and Cd42. Co-expression of FLI1 or treatment with the Ezh2/Ezh1 inhibitor UNC1999 significantly enhanced reprogramming efficiency. After 10–14 days, the reprogrammed cells acquired megakaryocyte morphology, and some cells proceeded to form pro-platelets. Importantly, we found that B lymphocytes retain their plasticity even after immortalization, this maybe the reason that Gata1/FLI1 could reprogram both primary and BCR-ABL-immortalized B lymphocytes. These findings suggest that B

* 收稿日期: 2025-07-01 录用日期: 2025-09-15 网络首发日期: 2025-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(31970625)

作者简介: 朱俊先(1994年生), 男; 研究方向: 细胞生物学; E-mail: 202220156458@scut.edu.cn;

袁紫慧(1995年生), 女; 研究方向: 细胞生物学; E-mail: 1552558097@qq.com

(朱俊先、袁紫慧并列第一作者)

通信作者: 谢华锋(1976年生), 男; 研究方向: 表观遗传学、干细胞生物学、肿瘤生物学;

E-mail: xiehuafeng@scut.edu.cn

全文阅读



ZR20250119

lymphocytes are a promising starting cell type for generating platelets through cell reprogramming and may be more suitable for large-scale production compared to adherent cells due to their suspension growth characteristics.

Key words: B lymphocytes ; cell reprogramming; megakaryocyte; UNC1999

巨核细胞是骨髓中特有的多核大型细胞,由多能祖细胞在促血小板生成素(TPO, thrombopoietin)诱导下经髓系分支定向分化形成(Li et al., 2024; 王家胜等, 2025),其成熟过程受特定转录因子网络的精密调控(Noh, 2021)。CD41(整合素 α IIb)和CD42(糖蛋白Ib复合物)作为巨核细胞的特异性表面标志物(Lacey et al., 2022),兼具重要生物学功能与谱系鉴定作用。成熟巨核细胞通过骨髓血管壁释放伪足状前血小板进入循环系统,经终末分化形成具有止血功能的血小板(Semple et al., 2011; Gremmel et al., 2024)。临床上,同种异体血小板输注是治疗血小板减少症的核心方案,亦广泛用于创伤性出血及化疗后出血风险管控(Stubbs et al., 2021)。近年来,人口老龄化与公共卫生事件的叠加效应导致血小板需求激增,而伴随着供体数量持续下降、血小板体外保存周期短以及同种免疫风险排斥等问题致使供需矛盾日趋严峻(刘燕等, 2020)。为此,建立体外规模化血小板生产技术,成为缓解临床输血资源短缺问题的创新性解决方案。

随着再生医学研究的持续推进,体外巨核细胞制备技术已发展出多种技术路径,但现有制备方法均存在一定的局限性(Furniss et al., 2024)。例如,基于CD34⁺造血干祖细胞和诱导多能干细胞(iPSCs)的正向诱导分化方法存在周期长、成本高等缺陷(Matsunaga et al., 2006)。脂肪组织来源间充质干细胞系诱导培养策略受限于分化效率低下及血小板功能异常等问题(Tozawa et al., 2019)。小分子化合物诱导策略则面临起始细胞来源受限与产率相对较低的双重挑战(Qin et al., 2022)。转录因子表达介导的细胞重编程技术可有效实现细胞的命运转换,鉴于血小板的无核生物学特性,采用病毒载体介导的转录因子递送系统可有效规避基因组整合风险,使该技术成为血小板体外再生研究中极具潜力的方案。已有研究表明,过表达如Gata1等关键转录因子可成功将成纤维细胞重编程为功能性巨核细胞并产生血小板(Pulecio et al., 2016),但成纤维细胞的贴壁依赖性严重制约了规模化应用可能。

B淋巴细胞具备天然悬浮生长、规模化扩增能

力以及可工程化永生等生物学特性。更为重要的是,B淋巴细胞展现出的可塑性,已在多项跨谱系转分化研究中得到证实。例如,通过外源表达C/EBP可同时下调B淋巴细胞中晚期淋巴系标志物并上调髓系标志物,进而将其高效地重编程为巨噬细胞(Xie et al., 2004)。类似地,转录因子Hoxb5可通过负向调控B细胞关键转录因子并激活T细胞特异性转录程序,实现B细胞向T细胞的身份转变(Zhang et al., 2018)。这些特性使得B淋巴细胞成为一种理想的重编程起始细胞类型。除起始细胞的类型外,转录因子的选择对于能否实现重编程也至关重要。GATA1是造血发育过程中的核心转录因子之一,对巨核细胞的分化和成熟具有不可替代的作用(Ling et al., 2018),Gata1缺陷的小鼠体内巨核细胞数量会显著减少且血小板功能出现异常(Hughan et al., 2005)。在重编程应用中,GATA1不仅能够替代OCT4使体细胞恢复多能状态(Shu et al., 2015),也可推动包括成纤维细胞向巨核细胞转分化在内的多种细胞命运转变,展现出广泛的重编程调控潜力。

本研究建立了一种基于B淋巴细胞的细胞重编程方法,通过过表达巨核细胞分化相关的关键转录因子诱导其向巨核细胞命运转化。该方法获得的部分诱导细胞不仅表达巨核细胞特异性表面标志物,还具备典型的巨核细胞形态特征,验证了B淋巴细胞向巨核细胞重编程的可行性。在此基础上,通过转录因子协同表达以及表观遗传修饰调控进一步提高了重编程效率。本研究不仅拓宽了巨核细胞体外制备的细胞来源,也为基于永生化细胞系的巨核细胞规模化制备提供了新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用C57BL/6小鼠购自集萃药康生物科技有限公司,饲养于华南理工大学实验动物中心SPF级屏障环境。所有动物实验均通过华南理工大学实验动物中心实验动物伦理委员会审核,伦理审查编号:2019006。

1.1.2 细胞株、质粒、菌株 Plat-E、HEK293T、小

鼠骨髓基质细胞(OP9, X射线辐照后使用)为本实验室购买后冻存的细胞。永生小鼠B淋巴细胞系P210-B6B由本实验室构建,系通过MSCV-BCR/ABL(p210)-IRES-GFP逆转录病毒感染C57BL/6小鼠骨髓Cd19⁺B淋巴细胞,通过持续培养、筛选获得。MSCV-BCR/ABL(p210)-IRES-GFP、MSCV-IRES-GFP(MIG)受赠于Thomas Graf实验室。

MSCV-Gata1-IRES-GFP(MIG-Gata1)、MSCV-FLI1-E2A-Gata1-IRES-GFP(MIG-FLI1-Gata1)、MSCV-IRES-mScarlet-I(MISI)、MSCV-Gata1-IRES-mScarlet-I(MISI-Gata1)、MSCV-Gata1-E2A-FLI1-IRES-mScarlet-I(MISI-FLI1-Gata1)、MSCV-BCR/ABL(p210)-IRES-GFP质粒由本实验室构建,并通过Western blot验证了蛋白表达功能(图1)。

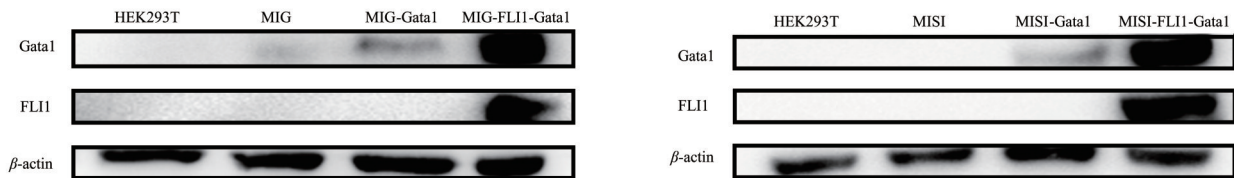


图1 Western blot检测逆转录表达载体蛋白表达情况

Fig. 1 Western blot assay the expression of target protein

1.1.3 主要试剂 高糖培养基(DMEM)粉末、高糖培养基(IMDM)粉末、RPMI 1640均购自美国Thermo公司。胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司。Streptavidin microbeads购自德国Miltenyi公司, Purified anti-mouse Cd16/Cd32、Biotin anti-mouse Cd19、FITC anti-mouse Cd19、PE Conjugated anti-mouse Cd19、APC anti-mouse Cd41a、PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse/rat Cd42d、PE/Dazzle™ 594 anti-mouse Cd19抗体均购自美国Biolegend公司。重组生长因子Murine IL-7、Murine Flt3-Ligand、Murine TPO购自美国Thermo公司, Mouse SCF购自美国Bio-Techne公司, rhEPO购自日本麒麟公司。

1.2 小鼠原代B淋巴细胞的富集

选取5~6周龄小鼠,采用颈椎脱臼法处死。在无菌条件下剪取四肢,剔除残留的毛发与肌肉组织,使用研钵研磨骨骼,研磨后通过多次过滤重悬为单细胞悬液。于室温条件下400×g离心10 min,弃上清,加入1.5 mL 1×红细胞裂解液[500 mL 10×红细胞裂解液配方:40.12 g NH₄Cl(1.5 mol/L), 5.00 g KHCO₃(100 mmol/L), 0.15 g 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),加入灭菌超纯水稀释为1×红细胞裂解液使用],裂解1 min后加入15 mL 1×PBS中止反应。随后,以每1×10⁸细胞对应2 mL的比例,用FACS缓冲液重悬[FACS缓冲液成分:1×PBS+2%(φ)FBS],并在每100 μL细胞悬液中加入0.1 μg抗小鼠Cd16/Cd32抗体,置于旋转摇床上4℃孵育10 min。孵育结束后,每100 μL细胞悬液加入0.1 μg生物素标记的抗小鼠Cd19抗体,继续于旋转摇床上4℃孵育20 min。孵育完成后,用磁珠分选缓冲液[500 mL

磁珠分选缓冲液配方:0.29 g EDTA(2 mmol/L)、2.50 g牛血清白蛋白(BSA, bovine serum albumin)]洗涤细胞2次,每次以400×g离心10 min。随后,按每1×10⁷ cells细胞悬液中加入10 μL Streptavidin microbeads,于旋转摇床上4℃孵育15 min。将细胞悬液加入充分润洗后磁吸于LS Column的大号柱子中,待细胞液自然滴尽后使用推子将磁吸细胞推出,经过2轮磁珠分选后即获取目的CD19⁺B淋巴细胞。

1.3 细胞培养

小鼠骨髓来源的B淋巴细胞在预先铺有OP9基质细胞的培养板中培养,所用培养基为含φ=10% FBS的RPMI 1640,并添加10 ng/mL rmIL-7、10 ng/mL rmFlt3-L、10 ng/mL rmSCF; P210-B6B细胞则在相同生长因子条件下的φ=10% FBS IMDM培养基中培养。Plat-E细胞培养于φ=10% FBS的DMEM培养基。所有细胞均置于37℃、φ=5% CO₂培养箱中培养。

1.4 细胞感染与诱导

将Plat-E细胞接种至培养皿中,在细胞汇合度约90%时进行转染。采用PEI转染法,制备PEI-DNA核酸混合物,并将混合物逐滴加入细胞中,轻轻混匀后放置在培养箱中培养。转染10 h后更换为新鲜、预热的培养基,继续培养48 h后收集病毒上清液,上清液经0.45 μm滤器过滤。将polybrene加入病毒上清液至终浓度2 μg/mL,混合后加入待感染细胞的培养基中,700×g离心1 h完成第1次感染,随后置于培养箱中培养3 h再更换为新鲜培养基。继续培养4 h后重复感染过程1次。第2次感

染结束后更换含有转录因子的新鲜培养基,并标记为重编程第0天。将感染后的细胞以 2.5×10^5 每孔密度铺于12孔板中,并在培养基中额外添加3 U/mL rhEPO与10 ng/mL rmTPO以诱导分化。

1.5 流式细胞术检测表面特异性抗原表达

收集0.5 mL细胞至1.5 mL EP管中并做好标记,同时向原孔补充0.5 mL培养基以及0.5 μ L 3 U/mL rhEPO与10 ng/mL rmTPO。样品经 $500 \times g$ 离心5 min后弃去上清,用30 μ L FACS缓冲液重悬,并分别加入0.2 μ g相应抗体,充分吹打混匀。于冰上避光孵育20 min。孵育完成后,在1.5 mL EP管中加入1 mL FACS缓冲液, $500 \times g$ 离心5 min以洗脱未结合抗体。弃去上清后经200目尼龙网过滤重悬在流式细胞管中,避光放置于冰上。使用BD FACSCelesta™流式细胞分析仪对多种表面特异性抗原表达进行检测。

1.6 流式分选GFP⁺/mScarlet-I⁺细胞

收集重编程细胞样品,制备单细胞悬液,使用BD FACSAria™ III流式分选仪分选GFP⁺/mScarlet-I⁺细胞。分选后的细胞以 6×10^5 每孔的密度接种于12孔板中,使用额外添加3 U/mL rhEPO和10 ng/mL rmTPO的培养基进行培养。对照组细胞则维持与OP9基质细胞共培养。

1.7 Western Blot验证逆转录表达载体功能

收集转染质粒48 h后的HEK293T细胞,使用预冷的1 \times PBS重悬清洗1~2次。加入160 μ L预冷蛋白裂解缓冲液(RIPA裂解液+25 \times 蛋白酶抑制剂),固定置于冰上,使用超声破碎仪破碎细胞。 $12\ 000 \times g$ 离心20 min去除细胞碎片,按BCA蛋白定量试剂盒(Pierce™ BCA Protein Assay Kit)说明书进行蛋白浓度测定,加入4 \times Loading buffer蛋白上样缓冲液,95 $^\circ$ C热激5 min使蛋白变性。在SDS-PAGE凝胶中上样,Marker上样5 μ g,样品上样30 μ g。80 V恒压电泳30 min后100 V恒压电泳2 h,再恒流0.4 A转膜30 min将蛋白转移至PVDF膜上。使用 $w=5\%$ 脱脂牛奶室温摇床中封闭1 h,加入相应待检测蛋白一抗4 $^\circ$ C孵育过夜。次日先使用1 \times TBST洗膜3次,每次5 min,然后再加入相应HRP标记的二抗,室温避光孵育1 h,再次用1 \times TBST洗膜3次,每次5 min。最后,配置显影液,使用超灵敏多功能成像仪进行成像。

1.8 细胞形态鉴定

收取细胞置于新的孔板内,加入Hoechst 33342至终质量浓度2 μ g/mL,使用锡箔纸包裹孔板避光,在恒温培养箱中孵育30 min。使用蔡司Axio

Observer.7荧光显微镜对分选后的原代细胞对照组与实验组拍照,在brightfield通道拍摄明场照片,在FITC通道拍摄细胞自身带有的绿色荧光。使用蔡司LSM 800显微镜对分选后的P210-B6B细胞系对照组与实验组拍照,在ESID-T1拍摄明场照片,在mCherry-T1通道拍摄红色荧光,在DAPI通道中拍摄Hoechst33342与双链DNA结合的蓝色荧光。

1.9 统计分析

使用GraphPad Prism10.1.2进行统计学分析,结果数据使用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)形式表示。2组样本比较采用配对或非配对双侧Student's *t*-test检验,同时存在2个独立变量的采用two-way ANOVA检验,3组以上样本采用one-way ANOVA检验,并进行Dunnett's多重比较检验。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$,以及 $^{***}P < 0.001$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录因子Gata1诱导原代B淋巴细胞表达巨核特异性标志物

为了探究B淋巴细胞向巨核细胞重编程的可行性,本研究采用免疫磁珠富集法从小鼠骨髓中分离了纯度大于99%的原代B淋巴细胞(图2a),分别感染携带绿色荧光蛋白的空载体病毒或过表达转录因子Gata1的逆转录病毒(图2b)。病毒感染后第6天,实验组(MIG-Gata1)中7.2%的GFP⁺细胞表达了Cd41a,其中80.5%的Cd41a⁺细胞显著下调了B细胞特异性标志物Cd19的表达。43.5%的Cd41a⁺细胞同时表达了更成熟巨核细胞的表面标志物Cd42d,而对照组细胞(MIG)在相同培养条件下未检测出明显的巨核细胞特异性标志物(图2c)。在细胞重编程过程中,GFP⁺细胞占比逐渐下降,Cd41a⁺细胞的比例在达峰值后趋于稳定,而Cd41a⁺Cd42d⁺细胞占比则持续上升(图2d)。以上结果表明,原代B淋巴细胞中强制表达转录因子Gata1可诱导细胞向巨核细胞谱系重编程,巨核细胞谱系特征标志物Cd41a与Cd42d的表达水平呈现时序性上调,同时表征B细胞谱系身份的Cd19抗原呈显著下调。

2.2 永生化的B淋巴细胞维持细胞重编程潜能

自体细胞重编程技术凭借其免疫相容性、个性化治疗潜力等优势,在多种疾病治疗中展现出广阔应用前景(Wang et al., 2024b; Ma et al., 2025)。为模拟由患者来源永生化的自体细胞重编程产生巨核细胞的过程,同时探究细胞系作为重编程起始细胞的可行性,本

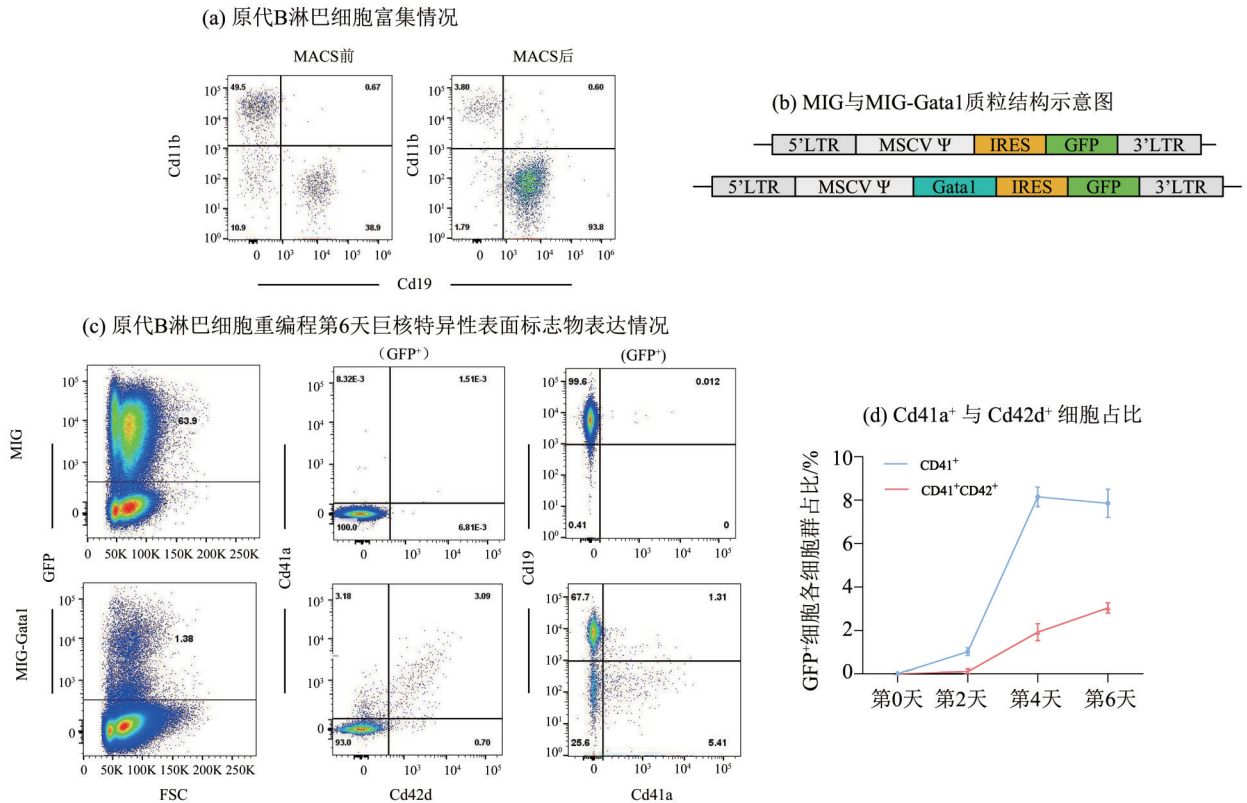


图2 Gata1介导的原代B淋巴细胞重编程

Fig. 2 Gata1-mediated reprogramming of primary B lymphocytes

研究对BCR-ABL永生化的B淋巴细胞系P210-B6B的细胞谱系可塑性进行了评估。以携带红色荧光蛋白的空载体病毒与过表达转录因子Gata1的逆转录病毒(图3a)感染P210-B6B细胞,培养后第6天,1.4% mScarlet-I⁺细胞出现微弱的Cd41a抗原表达。随着培养时间延长至第10天,实验组(MISI-Gata1)中Cd41a⁺细胞在感染细胞中占比逐渐升高至9.2%,43.1%的Cd41a⁺细胞进一步表达成熟巨核细胞表面标志物Cd42d(图3b~c)。对照组(MISI)细胞直至培养至第10天,仍未检测出Cd41a⁺Cd42d⁺或Cd41a⁺Cd42d⁺细胞(图3b)。上述结果表明,永生化的B淋巴细胞仍维持被细胞重编程的潜能,但相较于原代细胞表现出更缓慢的重编程进程,可能与细胞永生过程中的表观遗传重塑相关。

2.3 转录因子FLI1协同Gata1促进重编程效率

转录因子FLI1是巨核细胞谱系发育的关键调控因子,能够激活巨核细胞成熟相关通路并调控蛋白表达(Giraud et al., 2021)。鉴于单转录因子Gata1在推动细胞转化过程中的效率受限,本研究进一步探究了Gata1与FLI1双转录因子协同诱导重编程的策略。以不同荧光蛋白标记的携带Gata1与FLI1基因的逆转录病毒分别感染原代B淋巴细胞

与P210-B6B细胞系(图4a),感染后第6天共表达Gata1/FLI1的原代B淋巴细胞较Gata1单表达组Cd41a⁺细胞比例由5.1%提高到11.8%(图4b~c)。类似地,在病毒感染P210-B6B细胞后第10天,Cd41a⁺细胞比例由单Gata1感染细胞的11.0%提高到占Gata1/FLI1共表达细胞的33.4%(图4d~e)。这些数据说明FLI1与Gata1在细胞重编程中具有协同效应,可显著提升B淋巴细胞向巨核细胞样细胞的细胞重编程效率。

2.4 EZH2/EZH1抑制剂UNC1999处理可有效增强转化效率

抑制性表观遗传修饰通常会阻碍转录因子与染色质的结合,从而限制转录因子激活转录起始的能力(Ebrahimi, 2015)。UNC1999是组蛋白H3K27甲基转移酶EZH2/EZH1的抑制剂,能够降低与基因表达抑制相关的组蛋白标记H3K27me3水平。以终浓度500 nmol/L UNC1999处理Gata1病毒感染的原代B淋巴细胞,在病毒感染后第5天(第0天加入UNC1999),GFP⁺细胞中Cd41a⁺细胞占比由溶剂处理组中的8.1%提高到22.4%(图5a),重编程效率得到显著提升(图5b)。UNC1999处理同样也能提高P210-B6B细胞系的重编程效率,并呈现剂量依赖

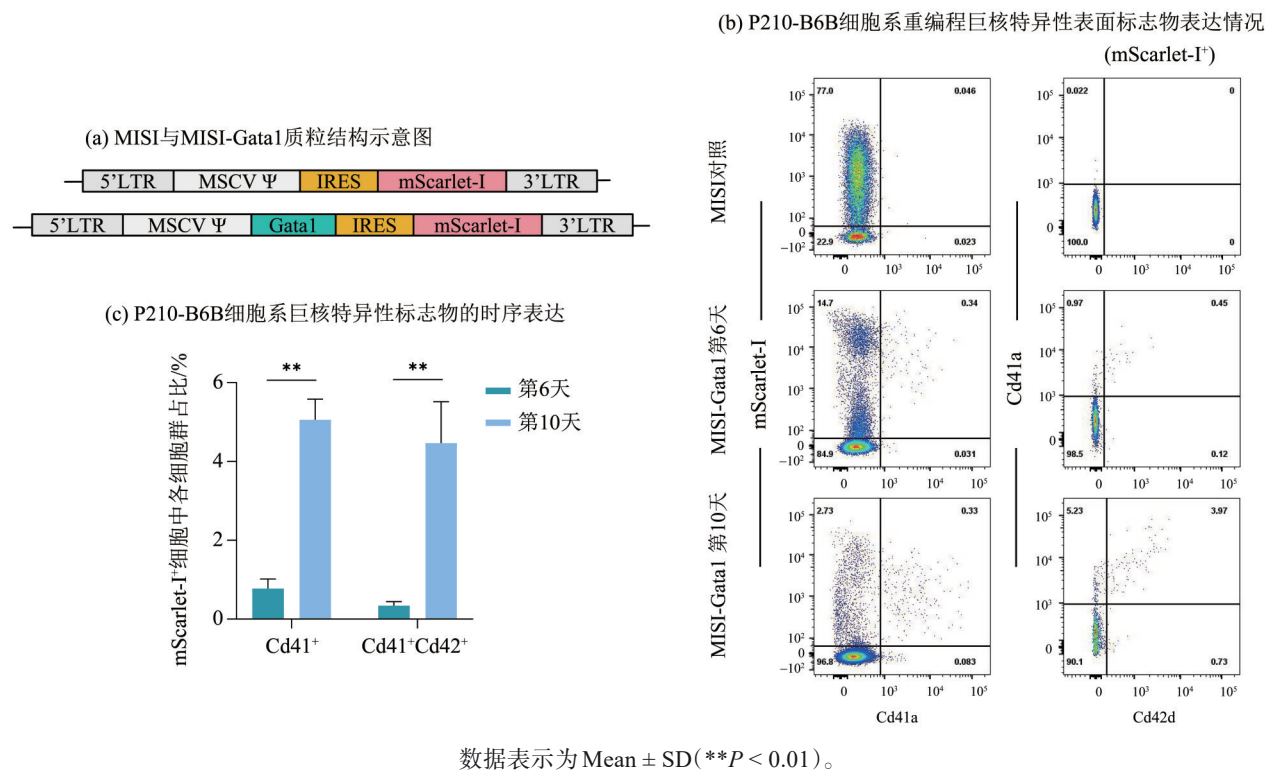


图3 转录因子Gata1诱导P210-B6B细胞系重编程

Fig. 3 Transcription factor gata1-induced reprogramming of P210-B6B

性促进作用。病毒感染后第7天,终浓度500 nmol/L和1 μmol/L的UNC1999处理Gata1/FLI1共表达的细胞中Cd41a⁺细胞的比例由溶剂处理组中的12.5%分别提高到19.7%和25.8%(图5c~d)。值得注意的是,UNC1999处理同时提高了Cd41a抗原的表达强度。综上所述,EZH2/EZH1抑制剂UNC1999可有效增强B淋巴细胞向巨核细胞样细胞的重编程效率,提示表观遗传修饰是B淋巴细胞向巨核细胞谱系重编程的一种障碍。

2.5 重编程细胞形态发生变化

巨核细胞成熟分化过程中,巨核细胞体积和颗粒度均会显著增加(Vainchenker et al., 2020)。在原代细胞重编程第6天,对照组(MIG)GFP⁺Cd41a⁻Cd42d⁻细胞、实验组(MIG-Gata1)GFP⁺Cd41a⁻Cd42d⁻细胞、GFP⁺Cd41a⁺Cd42d⁻细胞、GFP⁺Cd41a⁺Cd42d⁺细胞的FSC信号平均强度比例为1:1.09:1.20:1.46,SSC平均强度比例为1:1.31:1.68:2.07。在P210-B6B细胞系重编程第10天,对照组(MISI)mScarlet-I⁺Cd41a⁻Cd42d⁻细胞、实验组(MISI-FLI1-Gata1)mScarlet-I⁺Cd41a⁻Cd42d⁻细胞、mScarlet-I⁺Cd41a⁺Cd42d⁻细胞、mScarlet-I⁺Cd41a⁺Cd42d⁺细胞的FSC与SSC平均强度比例分别为1:1.96:1.4:1.60与1:1.19:1.66:1.84(图6a)。以上结果表明,原代细胞和细胞系经重编

程后均表现出显著的体积增大和颗粒度增加等特征。在正常生理情况下,骨髓巨核细胞会通过向血窦延伸细长胞质突起(前血小板)来完成血小板生成(Cuenca-Zamora et al., 2019)。为了更直观地观察细胞的形态变化,对原代细胞重编程实验中GFP⁺细胞与P210-B6B细胞重编程实验中mScarlet-I⁺细胞进行流式分选并进行持续培养(图6b)。研究发现,部分细胞体积显著增大并出现分叶核(图6c~d),部分细胞展现出由多个伪足样突起及延伸分支通过细胞质桥连接形成串珠或链状构型的前血小板样结构(图6e~f)。上述结果显示,在B淋巴细胞中强制表达转录因子Gata1等可诱发巨核细胞谱系特异性基因表达上调,同时部分细胞发生形态学变化,逐步呈现巨核细胞表型并形成前血小板样结构,进一步说明转录因子可诱导B淋巴细胞向巨核细胞样细胞的重编程。

3 讨论

随着全球临床用血小板需求持续增长与献血人数不断减少,开发体外制备巨核细胞/血小板技术已成为重要的研究方向。细胞重编程技术在众多疾病治疗与再生医学解决方案中展现出突出潜力,该技术通过精确调控关键靶点,不仅能有效缩短细

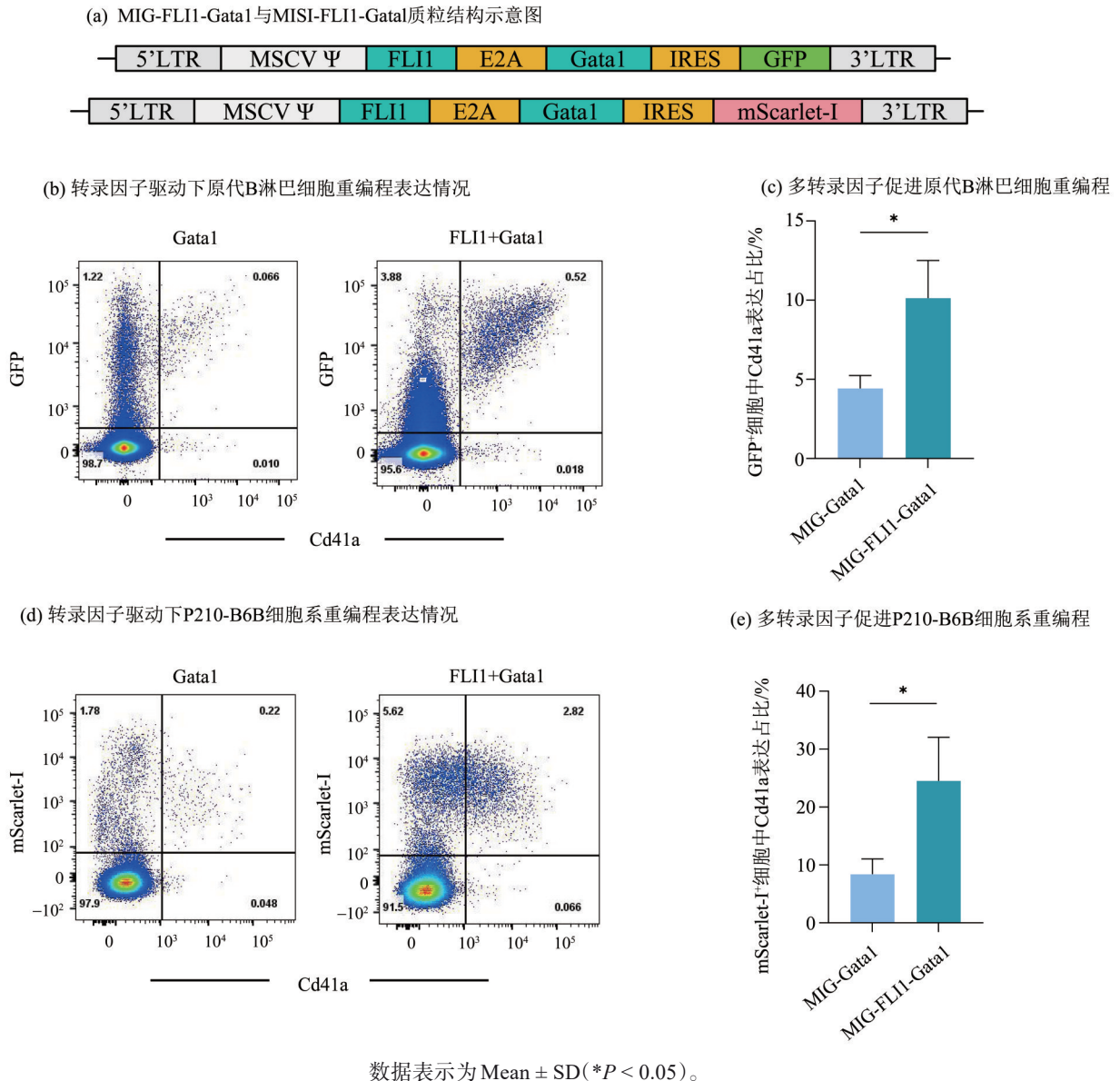


图4 转录因子FLI1联合Gata1共表达促进细胞身份转变

Fig. 4 Transcription factor FLI1 co-expressed with Gata1 promotes Cd41a expression

胞命运转化周期,还可逆转细胞发育进程,使其重获分化全能性或定向分化潜能,并显著降低转化过程中遗传和表观遗传变异的累积风险(Mertens et al., 2015)。然而,由于对巨核细胞谱系发育的分子调控网络机制认识仍不完善,现有体外制备体系仍存在显著技术瓶颈,主要表现为分化效率低、分化周期漫长、难以大规模应用等问题。本研究创新性地以具备天然悬浮生长特性的B淋巴细胞作为起始细胞,通过转录因子调控策略,探索了一条体外巨核细胞制备的新技术路径。

起始细胞类型与特定转录因子的选择是共同决定细胞重编程效率的关键因素。B淋巴细胞以其易获取性、可塑性及悬浮培养适应性等优势,被广

泛视为细胞重编程研究的理想起始材料。本研究基于上述特性,首次将其应用于巨核细胞定向重编程体系的建立。转录因子Gata1在巨核细胞早期发育中高表达,通过结合巨核细胞谱系相关基因启动子区域,促进巨核细胞基因表达(Wang et al., 2024a)。在成熟阶段,GATA1则通过调控MYH10基因沉默影响巨核细胞多倍化(Yuan et al., 2023)。在本研究中,Gata1在B淋巴细胞中的强制表达成功激活了巨核细胞特异性标志物Cd41a和Cd42d的表达,首次证实了B淋巴细胞具有重编程为巨核细胞的潜力。据报道,髓系/红系祖细胞(MEP)向巨核细胞分化的关键调控因子FLI1,可通过调控WAS/WIP等通路表达巨核细胞成熟密切相关的蛋白并抑制红

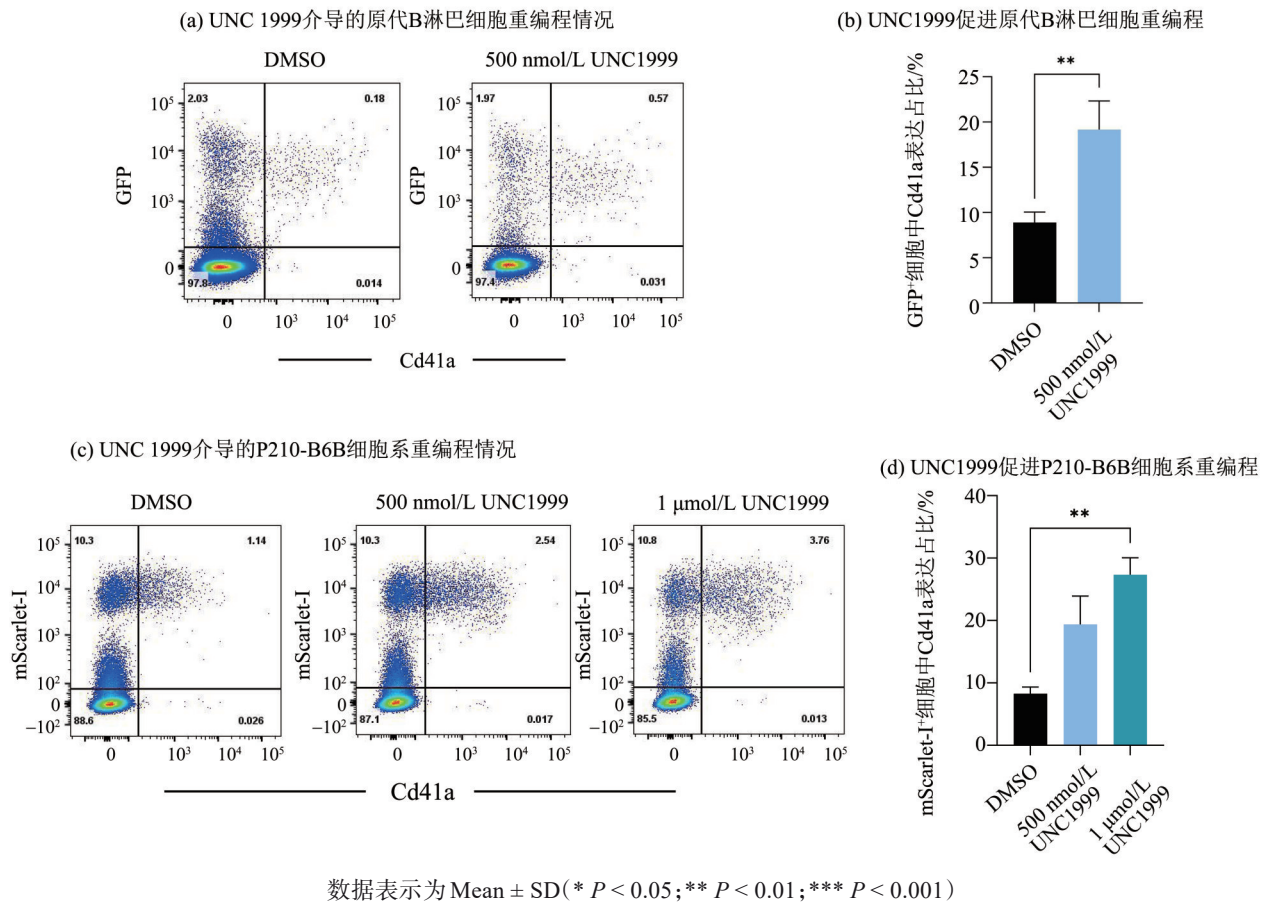


图5 表观遗传修饰抑制剂UNC1999促进重编程效率

Fig. 5 Epigenetic inhibitor UNC1999 enhances reprogramming efficiency

系的分化(Vo et al., 2017; Wang et al., 2021),此外在人诱导性多能干细胞(iPSC)中,过表达转录因子如Gata1和FLI1,可以显著提高巨核细胞及血小板的重编程效率(Moreau et al., 2016)。为评估Gata1/FLI1共表达策略在B淋巴细胞重编程体系中的适用性,本研究在原代细胞与细胞系中复现了转录因子联用方案。强制共表达显著促进了B淋巴细胞向巨核样细胞转分化,这一发现不仅证实跨体系策略的可行性,也为后续优化本重编程体系提供了思路。鉴于转录因子调控网络具有复杂性、动态性和环境依赖性,双转录因子协同作用可能通过重塑下游靶基因网络驱动细胞命运转变,其精确机制需进一步解析。针对重编程中阳性细胞比例急剧下降的现象,我们提出2种可能的机制解释:其一,细胞身份转变伴随的增殖速率显著降低;其二,外源Gata1与B细胞固有PU.1竞争共享基因组靶位点——鉴于二者在造血分化中的天然拮抗关系(Wheat et al., 2020)——导致转录网络失衡并激活凋亡通路。

前血小板(proplatelet)的形成依赖于细胞骨架蛋白构成的细丝状结构,这些结构为血小板的最终脱落提供了必要的结构基础。本研究中,经转录因子诱导的B淋巴细胞虽可呈现典型的巨核细胞形态学特征(包括分叶核及前血小板类似结构),但此类细胞数量稀少,推测部分原因可能是缺乏机械力刺激,从而降低了丝状结构的形成。因此,为实现输血级血小板的大规模制备,后续研究应考虑建立基于生物反应器的细胞扩增与促成熟体系。

除转录因子调控外,表观遗传障碍是影响细胞重编程效率的另一关键因素(Onder et al., 2012)。据报道,使用表观遗传抑制剂能够有效降低抑制性表观遗传修饰,促使更多转录因子与染色质的结合,显著提高细胞重编程的效率(Xie et al., 2016)。EZH2是一种具有组蛋白甲基转移酶活性的表观遗传调控蛋白,能够在组蛋白H3第27位赖氨酸残基上添加甲基,从而导致基因沉默。有研究通过短发夹RNA(shRNA)抑制脐带血中EZH2的表达,成功诱导更多巨核细胞谱系标志物的表达,从而促进巨

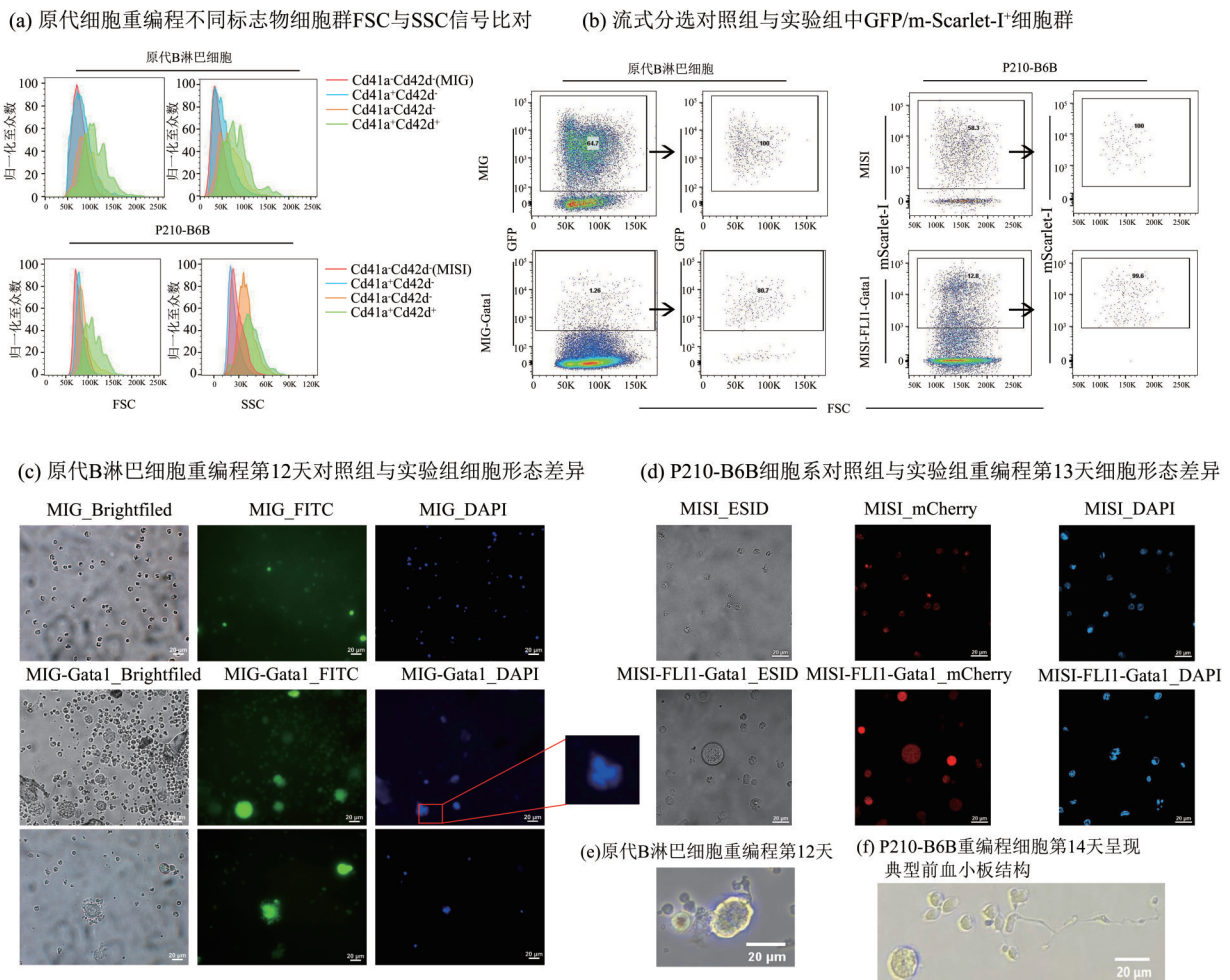


图 6 重编程细胞形态向巨核细胞形态转变

Fig. 6 Reprogramming cell morphology towards megakaryocyte morphology transformation

核细胞命运的承诺(Mazzi et al., 2021)。在本研究中,通过在重编程阶段使用一种特异性抑制 EZH2/EZH1 活性的小分子抑制剂 UNC1999,巨核细胞特异性表面标志物的表达水平显著提升。这一结果表明,B淋巴细胞向巨核细胞重编程的过程可能受到阻滞性表观遗传修饰的调控,例如 EZH2 介导的 H3K27me3 抑制性标记或 DNA 甲基化,这些修饰通过关闭染色质的可及性,阻碍关键转录因子与靶基因区域的结合,从而限制重编程效率。后续研究可进一步筛选和优化表观遗传调控化合物,并通过动态监测染色质开放性和转录因子结合情况,明确其协同作用机制。这一策略有望突破表观遗传屏障,显著提高重编程效率。

临床同种异体输血面临血源性感染与免疫并发症的双重风险(Panch et al., 2023),而基于自体细胞的重编程技术可从根本上规避此类问题(Sugimoto et al., 2022)。BCR/ABL 蛋白具有激活酪氨酸激酶的特性,该蛋白的存在导致正常细胞生

长调控机制的失调,从而促使细胞获得增殖优势(Zenebe et al., 2023)。课题组前期研究发现,原代 B 淋巴细胞过表达 BCR/ABL 融合基因后筛选得到的 B 淋巴细胞 P210-B6B,能够在无基质细胞支持的条件下进行体外大量扩增。本文中,在转录因子 Gata1 的诱导下,P210-B6B 同样可以成功转化为 CD41a⁺CD42d⁺ 巨核细胞样细胞,表明永生化和重编程并未消除细胞重编程潜能。后续研究可在永生化和重编程 B 淋巴细胞系中构建时序性转录因子调控网络,利用分子开关精确调控关键转录因子的时空表达,建立诱导分化体系以获得功能成熟的巨核细胞。最终,将优化的重编程方案应用于患者自体细胞,结合血小板无核且可辐照灭活的特性,开发具有完全免疫相容性的血小板治疗产品,为临床转化提供可行方案。

综上,本文首次揭示了转录因子 Gata1 在驱动 B 淋巴细胞向功能性巨核细胞重编程中的核心调控作用。同时,通过构建多转录因子协同作用与表观

遗传调控,进一步促进了重编程效率。本文建立了无须依赖造血干细胞的巨核细胞体外规模化生产

新思路,为巨核细胞/血小板的体外制备提供全新的技术路径。

参考文献:

- 刘燕,沈云青,李蓬,等,2020. 2012和2017年中国不同地理区域采供血机构的采供血情况调查分析[J]. 国际输血及血液学杂志, 43(4): 338-344.
- 王家胜,李飞,何越,等,2025. c-Mpl新型剪切体c-Mpl-D在急性髓系白血病中的表达与功能[J]. 中山大学学报(自然科学版), 64(3): 47-59.
- CUENCA-ZAMORA E J, FERRER-MARIN F, RIVERA J, et al, 2019. Tubulin in platelets: When the shape matters [J]. *Int J Mol Sci*, 20(14): 3484.
- EBRAHIMI B, 2015. Reprogramming barriers and enhancers: Strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency[J]. *Cell Regen*, 4: 10.
- FURNISS J A, TARASSOVA NPOOLE A W, 2024. Platelet generation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Blood*, 144(22): 2283-2294.
- GIRAUD G, KOLOVOS P, BOLTSIS I, et al, 2021. Interplay between FLI-1 and the LDB1 complex in murine erythroleukemia cells and during megakaryopoiesis [J]. *iScience*, 24(3): 102210.
- GREMMEL T, A L III FRELINGER, MICHELSON A D, 2024. Platelet physiology[J]. *Semin Thromb Hemost*, 50(8): 1173-1186.
- HUGHAN S C, SENIS Y, BEST D, et al, 2005. Selective impairment of platelet activation to collagen in the absence of GATA1[J]. *Blood*, 105(11): 4369-4376.
- LACEY J, WEBSTER S J, HEATH P R, et al, 2022. Sorting nexin 24 is required for α -granule biogenesis and cargo delivery in megakaryocytes[J]. *Haematologica*, 107(8): 1902-1913.
- LI J J, LIU J, LI Y E, et al, 2024. Differentiation route determines the functional outputs of adult megakaryopoiesis [J]. *Immunity*, 57(3): 478-494. e6.
- LING T, CRISPINO J D, ZINGARIELLO M, et al, 2018. GATA1 insufficiencies in primary myelofibrosis and other hematopoietic disorders: consequences for therapy [J]. *Expert Rev Hematol*, 11(3): 169-184.
- MA Z X, WU X F, CAO L, et al, 2025. Regenerative fibroblasts derived from autologous skin tissue for the treatment of Sjögren's syndrome: A case report [J]. *Front Immunol*, 16: 1529883.
- MATSUNAGA T, TANAKA I, KOBUNE M, et al, 2006. *Ex vivo* large-scale generation of human platelets from cord blood CD34⁺ cells [J]. *Stem Cells*, 24(12): 2877-2887.
- MAZZI S, DESSEN P, VIEIRA M, et al, 2021. Dual role of EZH2 in megakaryocyte differentiation [J]. *Blood*, 138(17): 1603-1614.
- MERTENS J, PAQUOLA A C M, KU M, et al, 2015. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects [J]. *Cell Stem Cell*, 17(6): 705-718.
- MOREAU T, EVANS A L, VASQUEZ L, et al, 2016. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming [J]. *Nat Commun*, 7: 11208.
- NOH J Y, 2021. Megakaryopoiesis and platelet biology: Roles of transcription factors and emerging clinical implications [J]. *Int J Mol Sci*, 22(17): 9615.
- ONDER T T, KARA N, CHERRY A, et al, 2012. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming [J]. *Nature*, 483(7391): 598-602.
- PANCH S R, GUO LVASSALLO R, 2023. Platelet transfusion refractoriness due to HLA alloimmunization: Evolving paradigms in mechanisms and management [J]. *Blood Rev*, 62: 101135.
- PULECIO J, ALEJO-VALLE O, CAPELLERA-GARCIA S, et al, 2016. Direct conversion of fibroblasts to megakaryocyte progenitors [J]. *Cell Rep*, 17(3): 671-683.
- QIN J, ZHANG J, JIANG J, et al, 2022. Direct chemical reprogramming of human cord blood erythroblasts to induced megakaryocytes that produce platelets [J]. *Cell Stem Cell*, 29(8): 1229-1245.e7.
- SEMPLE J W, ITALIANO J E, JR. FREEDMAN J, 2011. Platelets and the immune continuum [J]. *Nat Rev Immunol*, 11(4): 264-274.
- SHU J, ZHANG K, ZHANG M, et al, 2015. GATA family members as inducers for cellular reprogramming to pluripotency [J]. *Cell Res*, 25(2): 169-180.
- STUBBS J R, HOMER M J, SILVERMAN T, et al, 2021. The current state of the platelet supply in the US and proposed options to decrease the risk of critical shortages [J]. *Transfusion*, 61(1): 303-312.
- SUGIMOTO N, NAKAMURA S, SHIMIZU S, et al, 2022. Production and nonclinical evaluation of an autologous

- iPSC-derived platelet product for the iPLAT1 clinical trial [J]. *Blood Adv*, 6(23): 6056–6069.
- TOZAWA K, ONO-URUGA Y, YAZAWA M, et al, 2019. Megakaryocytes and platelets from a novel human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell line [J]. *Blood*, 133(7): 633–643.
- VAINCHENKER WRASLOVA H, 2020. Megakaryocyte polyploidization: Role in platelet production [J]. *Platelets*, 31(6): 707–716.
- VO K K, JAROCHA D J, LYDE R B, et al, 2017. FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology [J]. *Blood*, 129(26): 3486–3494.
- WANG C, HU M, YU K, et al, 2024a. An intricate regulatory circuit between FLI1 and GATA1/GATA2/LDB1/ERG dictates erythroid vs. megakaryocytic differentiation [J]. *Mol Med Rep*, 29(6): 107.
- WANG C, SAMPLE K M, GAJENDRAN B, et al, 2021. *FLI1* induces megakaryopoiesis gene expression through WAS/WIP-dependent and independent mechanisms; implications for wiskott-Aldrich syndrome [J]. *Front Immunol*, 12: 607836.
- WANG S, DU Y, ZHANG B, et al, 2024b. Transplantation of chemically induced pluripotent stem-cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient [J]. *Cell*, 187(22): 6152–6164.e18.
- WHEAT J C, SELLA Y, WILLCOCKSON M, et al, 2020. Single-molecule imaging of transcription dynamics in somatic stem cells [J]. *Nature*, 583(7816): 431–436.
- XIE B, ZHANG H, WEI R, et al, 2016. Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming [J]. *Reproduction*, 151(1): 9–16.
- XIE H, YE M, FENG R, et al, 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages [J]. *Cell*, 117(5): 663–676.
- YUAN H, LIU Y, ZHANG J, et al, 2023. Transcription factors in megakaryocytes and platelets [J]. *Front Immunol*, 14: 1140501.
- ZENEBE B, NIGUSSIE H, BELAY G, et al, 2023. A review on characterization of BCR-ABL transcript variants for molecular monitoring of chronic myeloid leukemia phenotypes [J]. *Hematology*, 28(1): 2284038.
- ZHANG M, DONG Y, HU F, et al, 2018. Transcription factor Hoxb5 reprograms B cells into functional T lymphocytes [J]. *Nat Immunol*, 19(3): 279–290.

(责任编辑 张 冰)