

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*

王家胜^{1,2}, 李飞², 何越², 吴乐燕², 李春谋³, 曾茂桢², 陈俊汝²,
陈海生², 郭琪琪², 范加希², 王淇², 黄莹², 陈伟庭¹, 张擎^{2,4}

1. 嘉应学院生命科学学院, 广东 梅州 514015
2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275
3. 中山大学附属第七医院, 广东 深圳 518107
4. 中山大学深圳研究院, 广东 深圳 518057

摘要: 促血小板生成素(TPO, thrombopoietin)通过其受体c-Mpl调控巨核细胞发育以及促进血小板生成, 与多种肿瘤预后和生存有负相关性, 这与循环TPO的内化降解及c-Mpl可变剪接体c-Mpl-D内吞有关。本研究首先用逆转录表达系统构建了UT-7/c-Mpl-D稳定系细胞以研究c-Mpl-D单独存在情况下的功能, 通过电转的方式构建了Dami/c-Mpl-D稳定系细胞, 进而研究c-Mpl-D对c-Mpl-F功能的调控, 进一步通过交联剂与免疫共沉淀研究c-Mpl-D与TPO的相互作用。结果表明, 当c-Mpl-D与c-Mpl-F共存时, c-Mpl-D可促进Dami细胞增殖, 抑制Dami细胞凋亡, 阻止Dami细胞往巨核细胞方向成熟。同时, c-Mpl-D在细胞中TPO刺激后显著降低了受体内化效应。综上所述, 本研究提出了随巨核细胞分化成熟c-Mpl-D表达量不断上升相关生理意义的模型, 为c-Mpl-D和巨核细胞增殖分化的关系提供了新的认识, 为巨核细胞增殖分化机制的分析提供了新的实验依据, 有助于与c-Mpl-D相关病症的预防、诊断及治疗。

关键词: c-Mpl-D; 巨核细胞; 增殖; 分化; 内化

中图分类号: Q461; Q254; Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2025)03-0047-13

Expression and functional analysis of the novel c-Mpl splice variant c-Mpl-D in acute myeloid leukemia

WANG Jiasheng^{1,2}, LI Fei², HE Yue², WU Leyan², LI Chunmou³, ZENG Maozhen², CHEN Junru²,
CHEN Haisheng², GUO Qiqi², FAN Jiayi², WANG Qi², HUANG Xuan², CHEN Weiting¹, ZHANG Qing^{2,4}

1. School of Life Sciences, Jiaying University, Meizhou 514015, China
2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
3. The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China
4. Lab Institute of Sun Yat-sen University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China

- * 收稿日期: 2024-09-05 录用日期: 2024-11-27 网络首发日期: 2025-01-23
基金项目: 国家自然科学基金(82273467); 嘉应学院人才启动项目(323E0467); 深圳市科技创新委员会基础研究计划(JCYJ20210324120812035); 中山大学中央高校基本科研业务费(24qnpy180)
作者简介: 王家胜(1986年生), 男; 研究方向: 肿瘤生物学; E-mail: wangjsh55@mail.sysu.edu.cn;
李飞(1992年生), 男; 研究方向: 肿瘤生物学; E-mail: lifei67@mail.sysu.edu.cn;
何越(1994年生), 男; 研究方向: 分子药理学; E-mail: heyue35@mail2.sysu.edu.cn
(王家胜、李飞、何越并列第一作者)
通信作者: 张擎(1966年生), 男; 研究方向: 分子药理学; E-mail: sszq@mail.sysu.edu.cn;
陈伟庭(1978年生), 男; 研究方向: 动物生理学; E-mail: chenwt@jyu.edu.cn
(张擎、陈伟庭为共同通信作者)

全文阅读



ZR20240274

Abstract: Thrombopoietin (TPO) regulates the development of megakaryocytes and the production of platelets through its receptor c-Mpl, and has a negative correlation with the prognosis and survival of various tumors, which is related to the internalization and degradation of circulating TPO and the endocytosis of the c-Mpl splice variant c-Mpl-D. This study constructed a UT-7/c-Mpl-D stable cell line using a reverse transcription expression system to study the function of c-Mpl-D in isolation. A Dami/c-Mpl-D stable cell line was also constructed by electroporation to investigate the regulatory effect of c-Mpl-D on c-Mpl-F function. Further, the interaction between c-Mpl-D and TPO was studied using crosslinking and immunoprecipitation. The results indicated that, when coexisting with c-Mpl-F, c-Mpl-D can promote Dami cell proliferation, inhibit Dami cell apoptosis, and prevent Dami cells from maturing towards megakaryocytes. Additionally, c-Mpl-D significantly reduced the receptor internalization effect after TPO stimulation. In summary, this study proposes a model related to the physiological significance of the increasing expression of c-Mpl-D with the differentiation and maturation of megakaryocytes, providing new insights into the relationship between c-Mpl-D and the proliferation and differentiation of megakaryocytes. It offers new experimental evidences for the analysis of the mechanisms of megakaryocyte proliferation and differentiation, and promotes the prevention, diagnosis, and treatment of c-Mpl-D-related diseases.

Key words: c-Mpl-D; megakaryocytes; proliferation; differentiation; internalization

临床上较为常见的血小板减少症可发生在多种疾病中,包括炎症疾病、骨髓疾病和肿瘤,能引起外科手术并发出血(Orsini et al., 2017)或自发出血(Brook et al., 2024),增加肿瘤等疾病的死亡率。临床上主要通过输注血小板或促血小板生长因子如重组人血小板生成素(TPO, Thrombopoietin)来治疗血小板相关疾病(Liu et al., 2023)。

在巨核祖细胞的增殖成熟、前巨核母细胞的核内有丝分裂到其发育成熟形成巨核细胞并释放血小板的整个过程中, TPO 及其受体 c-Mpl 发挥着关键作用, TPO/c-Mpl 在某些细胞系中促进巨核细胞分化的功能不具替代性(Kaushansky et al., 1995)。TPO 通过与受体 c-Mpl 结合而诱导 c-Mpl 构象发生改变,产生配体依赖的二聚化受体(Alexander et al., 1995)。Mpl 转录后能产生 Mpl-F、Mpl-K、Mpl-S、Mpl-tr、Mpl-del 等多种剪接体,其中 Mpl-F 编码全长 Mpl,是 TPO 分子在生理状态下唯一具有激活下游信号通路功能的受体(Kaushansky et al., 1994)。TPO 及其受体 c-Mpl 水平的变化是血小板生成的重要影响因素, TPO 参与调控巨核细胞发育和血小板生成,循环 TPO 水平通过血小板的内化作用动态调节,与血小板数量呈负相关(Chen et al., 1995),临床数据表明循环 TPO 与肿瘤预后和死亡率也密切相关(Vincent et al., 2021; Philip et al., 2018)。

血小板通过 c-Mpl 介导 TPO 内化降解是一个趋

向饱和的过程(Li et al., 1999)。研究发现 tpo(-/-)和 c-Mpl(-/-)小鼠依然有低水平(10%~15%)的血小板,骨髓中也有少量的巨核细胞,说明 TPO/c-Mpl 系统并不是唯一的血小板调控因素(Gurney et al., 1994)。受血小板可变剪切体如 c-Mpl-del、c-Mpl-K 等的影响, TPO 无法完全内化(Millot et al., 2002); c-Mpl-D 作为 c-Mpl 新型剪切体,研究表明 c-Mpl-del 表达量随着巨核细胞分化成熟逐渐增加,在血小板中达到峰值(Li et al., 2000),这些证据表明 c-Mpl-del 可能对巨核细胞成熟和产生血小板有重要作用。

本文基于前期的研究,在巨核细胞系 Dami 细胞中发现了 c-Mpl-D,其缺失外显子 8 和 9 中 72 个碱基对, TPO 可与 c-Mpl-D 结合,激活 ERK1/2 信号转导途径(Wang et al., 2013),而巨核细胞细胞系 UT-7 不表达 c-Mpl,可作为实验对照模型。本研究由此开展 c-Mpl-D 对巨核细胞增殖和分化的研究,说明不同细胞受体分布的改变可能影响细胞对细胞因子的应答及细胞进化的命运,同时为 c-Mpl-D 和巨核细胞增殖分化的关系提供新的认识,也为巨核细胞增殖分化机制的分析提供了新的实验依据。

本文以急性髓系白血病(AML, Acute Myeloid Leukemia)巨核细胞株为研究材料,构建了 c-Mpl-D 在不同增殖和分化状态的 UT-7 及 Dami 肿瘤细胞过表达细胞模型,在此基础上研究了其在细胞增殖、

凋亡及分化方面的功能,同时研究了c-Mpl-D与c-Mpl-F共存时c-Mpl-D对c-Mpl-F的调控作用,并且进一步发掘了c-Mpl-D内化调控机制,这将为巨核细胞增殖分化机制的分析提供了新的实验依据,以期c-Mpl-D作为c-Mpl新型剪切体,对相关病症的预防、诊断及治疗提供新的分子标记和治疗靶点。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

pCMV-HA载体、pCMV-Myc载体购自美国Clontech; pIRES2-Mpl-F、pEGFP-Mpl-D质粒由本实验室构建,保存于-80℃;大肠杆菌DH5 α 菌株、人胚肾细胞系HEK 293T细胞为本实验室保存;人巨核系白血病细胞系UT-7/EPO细胞、UT-7/c-Mpl-F稳定系细胞、逆转录病毒包装细胞系GP2-293细胞、pLXRN载体均由徐培林实验室惠赠。

重组人促血小板生成素(TPO)、重组人促红素注射液(EPO)购自沈阳三生制药有限公司; β -巯基乙醇、二甲基亚砷购自美国Amresco; SDS、EDTA、Tris、甘氨酸购自上海生工公司;聚凝胺、PMSF、牛血清白蛋白和联苯四唑溴化物(MTT)购自美国Sigma; DMEM培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清、 $w=0.25\%$ 胰酶、100 \times 青霉素和链霉素购自美国HyClone; 碘化丙锭、Lipofectamine 2000转染试剂、G418硫酸盐、氨苄霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、TRIzol RNA提取试剂购自美国Invitrogen; PCR preMix、逆转录试剂盒、SYBR Green I Master购自日本Takara; β -actin一抗、c-Mpl一抗、TPO一抗、ALP二抗、PE二抗购自美国Santa Cruz; PE-CD41(美国Biolegend); 蛋白交联试剂EGS(美国Thermo scientific)。

实时定量PCR仪(美国Bio-Rad); 二氧化碳培养箱(美国Thermo fisher); 蛋白核酸分析仪(DU530,美国BECKMAN); 电泳仪(北京六一); Tanon-1600全自动成像分析系统(上海天能); 垂直流超净工作台和生物安全柜(新加坡ESCO); CYTOMICS FC500流式细胞仪(美国BECKMAN); Eppendorf centrifuge 5415D离心机(上海安亭); 倒置光学显微镜(日本OLYMPUS); Power PAC3000电源和半干法蛋白质电转移仪(美国Bio-Rad); 通用酶标仪(美国Bio-Tek)。

1.2 UT-7/c-Mpl-D、Dami/c-Mpl-D稳定系细胞的构建

UT-7/c-Mpl-D稳定系细胞的构建(图1a)首先

进行pLXRN-Mpl-D载体构建,然后包装逆转录病毒,即将5 μ g pLXRN-c-Mpl-D和pLXRN无菌质粒分别稀释于500 μ L Opti-MEM中,每管再加入5 μ g包装质粒pVSV-G; 20 μ L Lipo 2000稀释于500 μ L Opti-MEM中,室温孵育5 min; 将含有质粒与Lip2000的Opti-MEM培养基轻轻混匀,室温孵育20 min; 把1 mL复合物逐渐均匀滴加到60 mm细胞培养皿中的细胞上,轻轻摇动使之迅速混匀; 转染后细胞于37℃、 $\phi=5\%$ CO $_2$ 、饱和空气湿度条件下培养,8 h后换液继续培养。细胞转染后继续培养48~72 h,等到大部分细胞浮起时用培养皿中培养基将细胞全部吹起,转入15 mL离心管室温500 \times g离心10 min,收集的上清即含逆转录病毒。UT-7/c-Mpl-D稳定系细胞培养:将逆转录病毒孵育后的UT-7细胞以1:10的比例传代至60 mm细胞培养皿中,于37℃、 $\phi=5\%$ CO $_2$ 、饱和空气湿度条件下培养。待其恢复24 h后加入G418开始筛选,筛选期间每3~5 d根据培养基颜色变化换液并补加相应浓度G418。如果有大量细胞死亡,则可把G418浓度减半维持筛选,等细胞状态转好时,再恢复G418筛选浓度并适当延长筛选时间。可采用低速离心的方法去除死细胞:800~900 r/min离心10 min。筛选10~14 d后可见有抗性克隆出现,此时停药培养待其逐渐扩增。当细胞大量增殖后,收集并裂解部分细胞用于Western Blot检测目的蛋白c-Mpl-D,并收集细胞用流式细胞仪检测c-Mpl-D在细胞表面的表达。

Dami/c-Mpl-D稳定系细胞的构建(图1b)用电转法, pIRES2-Mpl-D载体的构建,首先用引物F2Eco-del和R2Sal-del扩增c-Mpl-D; 上游引物含EcoRI和起始密码子,下游引物含Sal I和终止密码子(下划线标记酶切位点):

F_{2Eco-del} -
ATCGAATTCTGATGCCCTCCTGGGCCCTCTT;
R_{2Sal-del} -
CGAGTCGACTCAAGGCTGCTGCCAATA GCTT。

c-Mpl-D PCR回收产物双酶切, pIRES2-EGFP载体双酶切,酶切后回收载体和目的片段,按照插入片段:载体片段摩尔比为3:1的原则进行连接反应; CaCl $_2$ 法制备DH5 α 感受态细胞,将连接产物转化至制备好的DH5 α 感受态细胞中,涂布含卡那霉素的LB平板。37℃过夜培养,提取阳性克隆的质粒,重组质粒命名为pIRES2-c-Mpl-D。

按照Lonza电转试剂盒说明书在Nucleofector电

转分别电转 pIRES2-EGFP 质粒(用于构建阴性对照 Dami/GFP 稳定系细胞)与 pIRES2-c-Mpl-D 质粒(用于构建 Dami/c-Mpl-D 稳定系细胞),电转后细胞恢复生长 48 h。以 Dami 细胞为阴性对照设门,分选后带荧光细胞,将荧光细胞 1 000 r/min 离心 5 min 除去鞘液,细胞于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂、饱和空气湿度条件下培养恢复 24 h。将分选后荧光 Dami 细胞以 1:10 的比例传于 60 mm 细胞培养皿中,于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂、饱和空气湿度条件下培养。加入 G418 开始筛选,筛选期间每 3~4 d 根据培养基颜色变化情况以及细胞生长情况换液并补加相应浓度 G418。以绿色荧光蛋白为参照,筛选期间以及筛选得到的稳定系细胞定期在荧光显微镜下观察。

1.3 MTT

将处于指数生长期的 UT-7 细胞、UT-7/c-Mpl-F 细胞、UT-7/c-Mpl-D 细胞、Dami/GFP 细胞和 Dami/c-Mpl-D 细胞离心后, PBS 清洗 3 遍,用无血清 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂、饱和空气湿度培养箱中过夜饥饿。用无血清 RPMI 1640 培养基将细胞密度调整至 6×10^4 个/mL,按每孔 100 μ L 种于 96 孔板,设置 6 个重复,同时设置调零孔(不含细胞的培养液)和对照孔(无 TPO)。分别加入终质量浓度为 0.1、1、10、50 和 100 ng/mL 的 TPO,培养 48 h 每孔加入 20 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h;小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μ L DMSO,吹打均匀后放置 10 min,使蓝紫色结晶充分溶解;酶标仪测量 490 nm 各孔吸光值,用 Excel 分析作图得到实验结果。

1.4 细胞周期检测

收集 5×10^5 个待测细胞,加入终质量浓度为 80 ng/mL 的 TPO,培养 48 h,室温下 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,用 0.3 mL 预冷 PBS 重悬细胞,一边轻摇细胞一边缓慢滴入 4.7 mL 预冷的 $\phi=75\%$ 乙醇,4 °C 过夜固定;200 \times g 离心 10 min 收集细胞,500 μ L PI/Triton X-100 染色液(PI 20 μ g/mL, DNase-free RNase 100 U/mL, 0.1% (V/V) Triton X-100)重悬细胞,室温避光染色 15 min,轻轻吹打均匀细胞后经 300 目细胞筛网过滤,用 CYTOMICS FC500 流式细胞仪分析细胞周期,本实验重复 6 次。

1.5 细胞凋亡检测

收集 5×10^5 个待测细胞, PBS 漂洗干净后重悬于 500 μ L annexin 结合缓冲液;加入试剂盒自带的 5 μ L Annexin-V-FITC 液和 10 μ L PI 染液,室温下避光孵育 5 min;轻轻吹打均匀细胞后经 300 目细胞

筛网过滤,用 CYTOMICS FC500 流式细胞仪分析细胞周期(FITC 信号 FL1 检测, PI 信号 FL2 检测),本实验重复 6 次。

1.6 细胞表面特异性抗原 CD41 的表达

收集 5×10^5 个待测细胞,按实验设计加入终质量浓度为 80 ng/mL 的 TPO,此时定为 0 h,于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂、饱和空气湿度培养箱中培养 48 h 用于检测细胞表面特异性抗原 CD41 的表达。室温 1 000 r/min 离心 5 min 去上清,100 μ L PBS 重悬细胞,加入 PE-CD41 单克隆抗体,混匀后室温避光孵育 1 h;室温 200 \times g 离心 5 min 去上清。预冷的 100 μ L 固定缓冲液($w=0.5\%$ 多聚甲醛)重悬细胞,避光放置于 4 °C 8 min,用于固定细胞;4 °C 200 \times g 离心 5 min,去上清,加 200 μ L $w=1\%$ 多聚甲醛重悬细胞后置于 4 °C 避光保存,将细胞轻轻吹打均匀后经 300 目细胞筛网过滤,用 CYTOMICS FC500 流式细胞仪分析细胞表面特异性抗原 CD41 的表达,本实验重复 6 次。

1.7 qRT-PCR

收集细胞,按照 TRIzol 法提取总 RNA,以 30 μ L 无 RNA 酶 DEPC 水溶解洗脱获得总 RNA,进行 RNA 浓度测定。获得总 RNA 后,采用 Takara 逆转录试剂盒参照说明书进行基因组 DNA 去除和反转录获得 cDNA。随后参照检测引物(表 1)检测。参照试剂盒说明书配制 qRT-PCR 反应体系,然后以 95 °C 预变性 30 s,95 °C 15 s,60 °C 35 s 进行 40 个循环,最后以 95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s 采集溶解曲线,以 β -actin 为内参,根据检测所得 CT 值计算相对表达量。

1.8 细胞转染

分别做两个转染系列转染 293T 细胞,用于研究 c-Mpl-D、c-Mpl-F 在 mRNA 水平和蛋白水平的相互影响,如表 2~3。

转染后细胞于 37 °C、 $\phi=5\%$ CO₂、饱和空气湿度条件下培养 6 h 后换液。换液后培养 24 h 用于荧光定量 PCR 检测 mRNA 含量,换液后培养 48 h 用于 Western Blot 检测蛋白含量。

1.9 免疫共沉淀

免疫共沉淀系统包含两个载体,带 HA 标签的 pCMV-HA 与带 Myc 标签的 pCMV-Myc。本实验将 c-Mpl-F、c-Mpl-D 分别构建至 pCMV-HA 载体,将 TPO 构建至 pCMV-Myc 载体。上游引物含 EcoR I 酶切位点,下游引物含 Sal I 酶切位点(下划线标记酶切位点),引物序列如下:

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primers used in qRT-PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
cyclinD1 Forward	AATGACCCCGCACGATTC
cyclinD1 Reverse	TCAGGTTTCAGGCCTTGAC
cyclinD2 Forward	TTACCTGGACCGTTTCTTGG
cyclinD2 Reverse	CCTGAGGCTTGATGGAGTTG
Bax Forward	TTTCTCACGGCAACTTCAAC
Bax Reverse	GGAGGAAAGTCCAATGTCCAG
Bcl-XL Forward	ACATCCCAGCTCCACATCAC
Bcl-XL Reverse	CGATCCGACTCACCAATACC
CD41 Forward	CTCCTTTGACTCCAGCAACC
CD41 Reverse	CTGTTCTGCTCCCTCTCACC
CD61 Forward	TATAGCATTGGACGGAAGGC
CD61 Reverse	GACCTCATTGTTGAGGCAGG
c-Mpl-F Forward	ACTTGCACTGGAGGGAGAT
c-Mpl-F Reverse	GCTGTAAACGGTAGCGAGAT
c-Mpl Forward	AGGTCTCAAGTGAAGGC
c-Mpl Reverse	AGCTGCAAGCTGTAGCGA
β -actin Forward	GATCATGTTTGAGACCTTC
β -actin Reverse	GGCATACCCCTCGTAGATG

表2 c-Mpl-D影响c-Mpl-F
Table 2 c-Mpl-D vs c-Mpl-F

组别	组分
EP管1	1 μ g pIRES2-Mpl-F+ 4 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管2	2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管3	2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 1 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管4	2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 0.2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管5	2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 0 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
5 mL管	50 μ L Lipofectamine 2000+1 250 μ L Opti-MEM

F_{c-Mpl} -

CGCGAATTCGGCAAGATGTCTCCTTGCTGGC

R_{c-Mpl} -

ATAGTCGACTCACCAGGCGGTCTCGGTGGCGG

F_{TPO} -

ATAGAATTCTGAGCCCGGCTCCTCCTGCTTG

R_{TPO} -

CGCGTCTGACTCATTACCCTTCTGAGACAGAT

表3 c-Mpl-F影响c-Mpl-D
Table 3 c-Mpl-F vs c-Mpl-D

组别	组分
EP管1	4 μ g pIRES2-Mpl-F+ 1 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管2	2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管3	1 μ g pIRES2-Mpl-F+ 2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管4	0.2 μ g pIRES2-Mpl-F+ 2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
EP管5	0 μ g pIRES2-Mpl-F+ 2 μ g pEGFP-Mpl-D + 250 μ L Opti-MEM
5 mL管	50 μ L Lipofectamine2000+1 250 μ L Opti-MEM

用引物 F_{c-Mpl} 和 R_{c-Mpl} 扩增 c-Mpl-F 和 c-Mpl-D, 用引物 F_{TPO} 和 R_{TPO} 扩增 TPO, 酶切, 连接反应后, 用 CaCl₂ 法制备 DH5 α 感受态细胞, 将连接产物转化至制备好的 DH5 α 感受态细胞中, 涂布含 Amp 的 LB 平板, 提取阳性克隆的质粒, 获得 pHA-Mpl-F、pHA-Mpl-D、pMyc-TPO, pHA-Mpl-F 或 pHA-Mpl-D 分别与 pMyc-TPO 共转染 293T 细胞, PBS 重悬细胞, 把 EGS 母液加到细胞悬浮液中至终浓度 2 mmol/L, 4 $^{\circ}$ C 反应 2 h。细胞中加入 600 μ L 细胞裂解液, 吹打均匀后在冰上放置 30 min; 13 800 \times g 离心 10 min, 除去细胞碎片以及 DNA, 将上清转移至新的 EP 管中; 将 proteinA/G beads 原液在 4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入裂解液制成 proteinA/G beads 悬液备用。20 μ L proteinA/G beads, 在 4 $^{\circ}$ C 水平摇床上低速摇动 30 min 以除去非特异性杂蛋白降低背景, 接续 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 5 min, 上清加入抗 HA 抗体 (1:200), 在 4 $^{\circ}$ C 水平摇床上低速摇动 2 h; 加入 30 μ L proteinA/G beads, 在 4 $^{\circ}$ C 水平摇床上低速摇动 8 h。10 000 r/min 离心 2 min 收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物; 加入 600 μ L 预冷的细胞裂解液 (加入蛋白酶抑制剂), 轻轻重悬 proteinA/G beads, 10 000 r/min 离心 2 min 吸取上清; 吸干珠子上方的水层后, 加入 50 μ L 5 \times 蛋白电泳上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 以游离抗原、抗体和珠子, 吸取上清作 SDS-PAGE 和 Western 检测。

1.10 Western blot

收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行冰上裂解 20 min 提取总蛋白, 12 000 \times g 离心 5 min 去除细胞碎片, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒按照说明书进行蛋白浓度测定, 加入蛋白上样缓冲

液, 煮沸 10 min, 取 10 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳, 120 V 恒压电泳 1 h, 再恒流 200 mA 转膜 2 h 将蛋白转移至 PVDF 膜上, $w=5\%$ 脱脂奶粉室温进行膜封闭 2 h, 加入相应待检测蛋白一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天先 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入相应 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, 再次 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后滴加 ECL 化学发光液于天能化学发光成像系统进行成像记录蛋白表达。

1.11 受体内化检测分析

首先使用阴性对照管细胞荧光分布调整并排除细胞的非特异性染色和细胞的自发荧光的可能, 以阴性对照管设为阴性门, 以对照组细胞 CD110-PE 荧光分布的区域为阳性门, 并计算表达 Mpl 的细胞所占百分比, 记为 FB, 处理组细胞因 TPO 刺激后, 会有受体内化的趋势导致细胞表面能检测到的 CD110-PE 荧光降低, 记为 FA, $[(FB - FA)/FB] \times 100\%$ 为 TPO 刺激后内化的 Mpl 占比, 而 $\{1 - [(FB - FA)/FB]\} \times 100\%$ 的值即为 TPO 刺激后内化的细胞膜上剩余的 Mpl 占比。

1.12 统计学分析

所有实验均进行 3 次或 3 次以上重复, 结果数据采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 形式表示, 两组间样本比较采用配对或非配对双侧 Student's *t*-test, 对于 3 组以上样本间比较采用 one-way ANOVA 进行检验。数据分析与绘图采用 GraphPad Prism 进行, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 以及 *** $P < 0.001$ 均认为具有显著性统计学差异。

2 结果与分析

2.1 c-Mpl-D 对 UT-7 和 Dami 的 c-Mpl-D 稳转细胞系增殖状况的影响

为了观察 c-Mpl 及其剪切体 c-Mpl-D 对巨核细胞系的发育影响, 我们首先用逆转录表达系统构建了 UT-7/c-Mpl-D 稳定系细胞以研究 c-Mpl-D 单独存在情况下的可能功能, 又通过电转的方式构建了 Dami/c-Mpl-D 稳定系细胞以研究 c-Mpl-D 对 c-Mpl-F 功能的调控机制。我们观察到野生型 UT-7 细胞没有显示 Mpl 蛋白条带, UT-7/c-Mpl-F 和 UT-7/c-Mpl-D 稳定系细胞均能检测到特异性 Mpl 条带 (图 1a), 说明这些稳定系细胞是正确的。流式细胞术检测到有 75.2% 的 UT-7/c-Mpl-D 细胞表面表达 c-Mpl-D 蛋白 (图 1a), 说明 c-Mpl-D 虽然在胞外段近膜区缺失了 24 个氨基酸, 但缺失这些氨基酸并不影响其整合至细胞膜上。UT-7/c-Mpl-D 细胞在 5 个质量浓度 TPO 刺激下吸光值与 UT-7 细胞

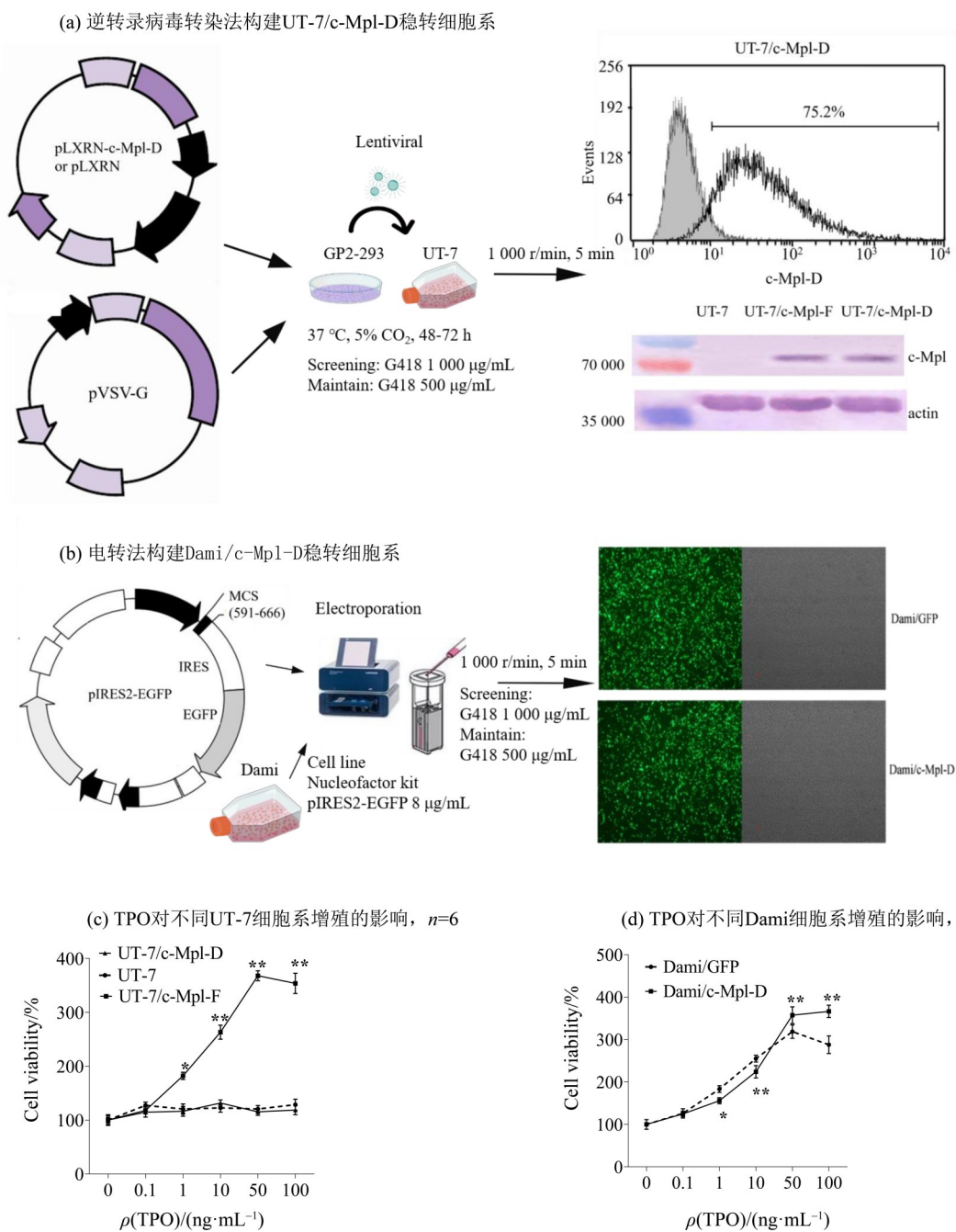
无显著性差异, UT-7/c-Mpl-F 细胞则表现出明显的增殖现象 (图 1c)。

另外, 我们在构建的 Dami/c-Mpl-D 稳定系细胞中, 观察到 80% 以上带有绿色荧光 (图 1b), 证明构建 Dami/c-Mpl-D 稳定系细胞成功。Dami/c-Mpl-D 细胞在 4 个不同质量浓度 TPO 刺激下增殖能力与 Dami/GFP 细胞相比均存在显著性差异 (图 1d): 1 和 10 ng/mL TPO 作用下 Dami/c-Mpl-D 细胞增殖能力弱于 Dami/GFP 细胞, 但在 50 和 100 ng/mL TPO 刺激下 Dami/c-Mpl-D 细胞增殖能力则更强, 提示 c-Mpl-D 与 c-Mpl-F 共存时 c-Mpl 可能通过形成同源二聚体或异源二聚体的方式, 最终促进 Dami 细胞增殖。

2.2 c-Mpl-D 调控 Dami 细胞周期的变化

为了从分子角度阐释 c-Mpl-D 对细胞周期的调控情况, 我们发现, 在经 50 ng/mL 的 TPO 作用后 UT-7/c-Mpl-F 细胞周期调控蛋白 cyclin D1 和 cyclin D2 的 mRNA 分别上调至 4.01 与 4.24 倍, 经 80 ng/mL 的 TPO 作用后 mRNA 则分别上调至 4.77 与 4.94 倍, 与 UT-7 细胞相比具有显著性差异。UT-7/c-Mpl-D 细胞周期调控蛋白 cyclin D1 和 cyclin D2 的 mRNA 水平有轻微上调 (经 80 ng/mL TPO 作用后 mRNA 则分别上调至 1.250 与 1.26 倍), 但与 UT-7 相比没有显著性变化。对比经 50 ng/mL 的 TPO 作用后 Dami/c-Mpl-D 细胞周期调控蛋白 cyclin D1 和 cyclin D2 的 mRNA 较 Dami/GFP 细胞分别上调至 1.24 与 1.20 倍, 经 80 ng/mL 的 TPO 作用后 Dami/c-Mpl-D 细胞内 mRNA 较 Dami/GFP 细胞则分别上调至 1.21 与 1.16 倍 (图 2a~b)。

进一步经流式检测 UT-7 细胞的周期情况, 由于 UT-7 细胞的 c-Mpl-F 过表达, G1 期的细胞比例由 63.4% 显著降至 40.2%, S 期的细胞比例由 27.3% 显著升至 48.4%, G2 期的细胞比例由 9.35% 升至 11.4% (图 2d、h), 而 c-Mpl-D 过表达细胞的 G1、S 和 G2 三个时期比例与 UT-7 细胞相比没有显著变化 (图 2e、h), 表明 TPO 与 c-Mpl-D 结合后对 UT-7 细胞周期不产生明显影响。然而, 在 TPO 刺激 Dami/c-Mpl-D 细胞比 Dami/GFP 细胞表现出更强的增殖能力的同时, c-Mpl-D 过表达促使 G1 期的细胞比例由 50.8% 上升至 60.0%; S 期的细胞比例由 32.0% 降至 26.7%; G2 期的细胞比例由 17.2% 降至 13.3% (图 2f~g)。这些数据说明大部分 Dami 细胞被阻抑在 S 期和 G2 期, 而 c-Mpl-D 的过表达则促使细胞进入正常细胞周期, 最终表现出更强的增殖能力 (图 2h)。



数据表示为 Mean ± SD (*P < 0.05; **P < 0.01)。

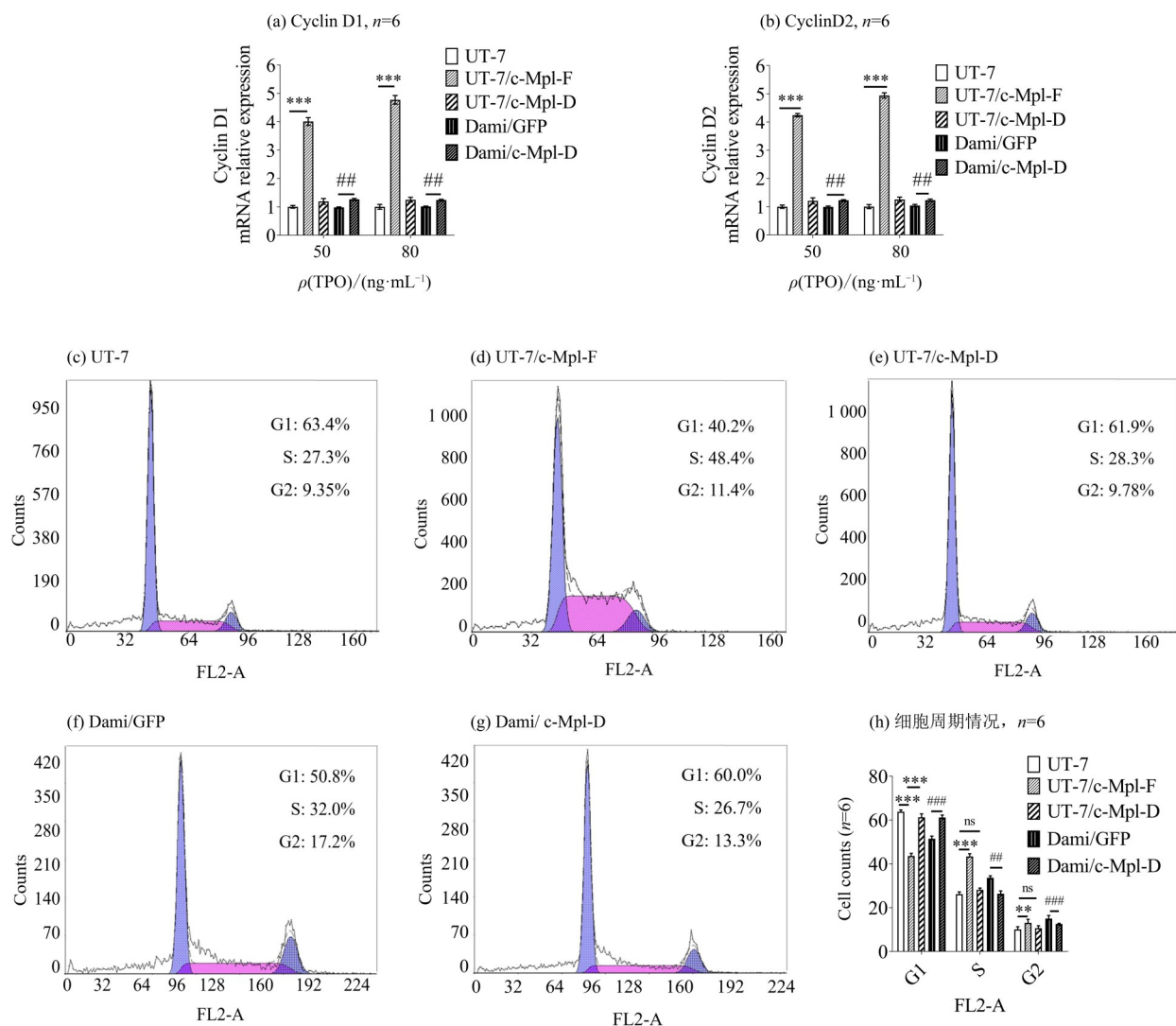
图1 c-Mpl可改变TPO对UT-7和Dami稳转细胞系增殖的影响

Fig. 1 c-Mpl alters the effects of TPO on the proliferation of UT-7 and Dami cell lines

2.3 c-Mpl-D抑制Dami细胞凋亡

为了研究TPO对Dami/c-Mpl-D细胞抗凋亡能力的影响, 我们发现50与80 ng/mL TPO作用后UT-7/c-Mpl-F细胞内促凋亡蛋白Bax的mRNA水平分别下降了35.1%和50.3%, 而抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA水平分别上调至2.33与2.80倍, 较UT-7细胞具有显著性差异, 对比UT-7/c-Mpl-D细胞促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA水平则

发生轻微变化(经80 ng/mL TPO作用后Bax mRNA表达下调了5.1%, 而抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA则上调至1.15倍), 但与UT-7相比没有显著性变化(图3a~b)。UT-7细胞和UT-7/c-Mpl-D细胞凋亡率接近, 高达18.8%与19.4%的细胞进入凋亡早期; 而UT-7/c-Mpl-F细胞凋亡比例则只有2.2%(图3c~e)。上述结果提示c-Mpl-F可抑制UT-7细胞凋亡, 而c-Mpl-D即使在TPO存在时也无法影响UT-



数据表示为 Mean \pm SD (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$).

图2 c-Mpl-D过表达可促进Dami细胞增殖

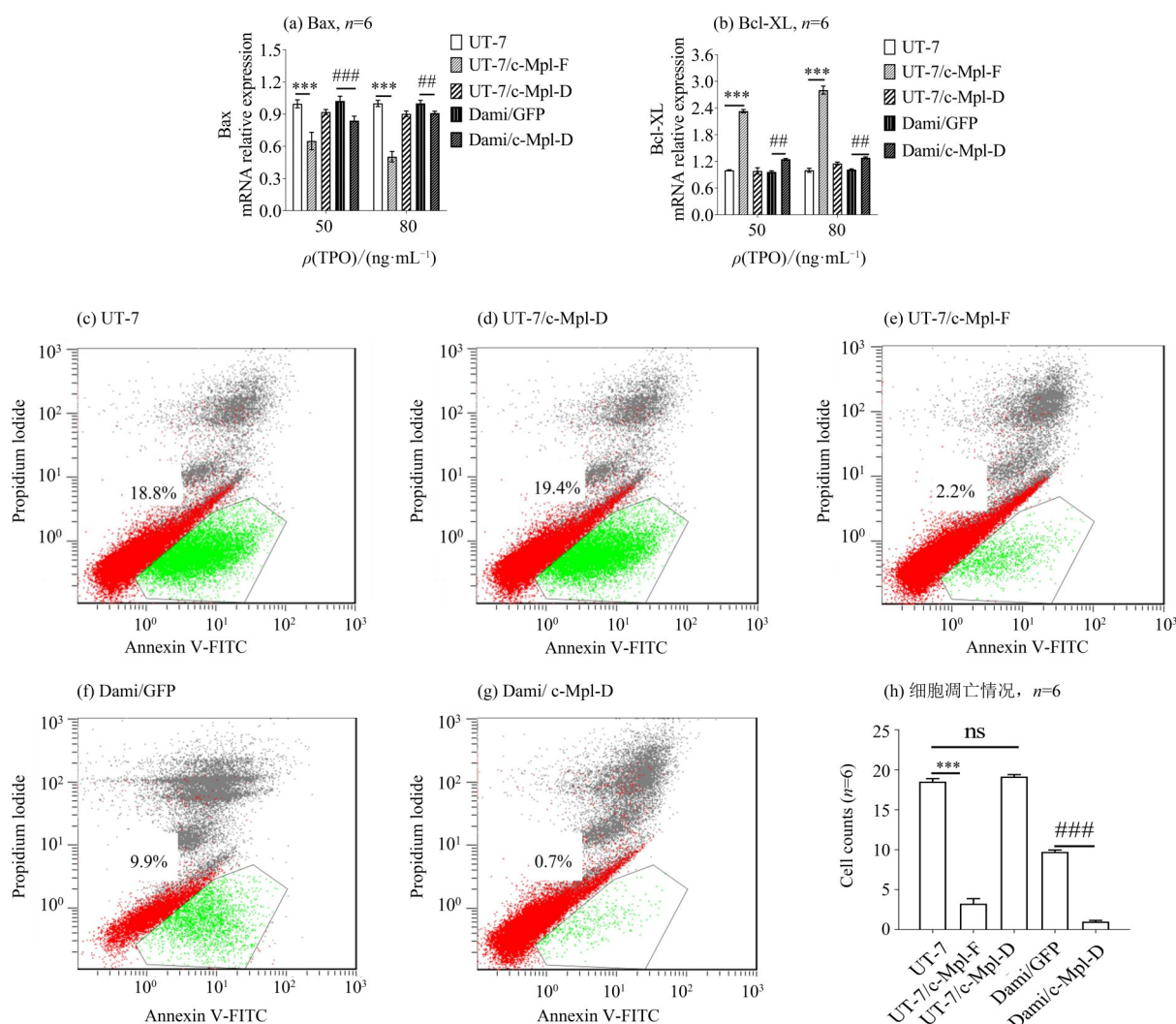
Fig. 2 Overexpression of c-Mpl-D can promote proliferation of Dami cells

7细胞凋亡,这与UT-7细胞,UT-7/c-Mpl-F细胞以及UT-7/c-Mpl-D细胞内促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA水平变化相一致(图3c、h)。

重要的是,50与80 ng/mL TPO作用后Dami/c-Mpl-D细胞内促凋亡蛋白Bax的mRNA水平较Dami/GFP细胞分别下降了20.0%和15.5%,而抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA水平较Dami/GFP细胞分别上调至1.12倍与1.19倍(图3a~b)。这些数据表明c-Mpl-D过表达可抑制Dami细胞凋亡。9.9%的Dami/GFP细胞进入凋亡早期,而Dami/c-Mpl-D细胞凋亡比例则只有0.7%(图3f~h)。这与Dami/GFP细胞和Dami/c-Mpl-D细胞内促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白Bcl-XL的mRNA水平变化相一致。

2.4 c-Mpl-D抑制Dami细胞分化

TPO具有促进巨核细胞向血小板方向分化的功能,首先,经过TPO刺激后,巨核细胞分化标记蛋白CD41和CD61的mRNA水平在UT-7/c-Mpl-F都有极其显著的提高(图4a~b),然而,TPO作用后UT-7/c-Mpl-D细胞内CD41和CD61的mRNA水平与UT-7细胞没有显著性差异,提示UT-7/c-Mpl-D细胞没有分化迹象高(图4a~b)。c-Mpl-F过表达后,能够显著加强CD41的表达,81.3%的细胞表面检测到CD41的表达,这些结果证实c-Mpl-F促进了UT-7细胞的成熟(图4c~e,h)。而c-Mpl-D过表达细胞在TPO作用后则只有2.6%的细胞表面检测到CD41表达,与UT-7细胞相比没有显著性差异(1.2%)。进一步通过流式细胞仪检测,经过TPO作用后,Dami/c-Mpl-D



数据表示为 Mean \pm SD (** $P < 0.001$; # $P < 0.01$; ### $P < 0.001$)。

图3 c-Mpl-D过表达可抑制UT-7细胞和Dami细胞凋亡

Fig. 3 Overexpression of c-Mpl-D can inhibit apoptosis of UT-7 and Dami cells

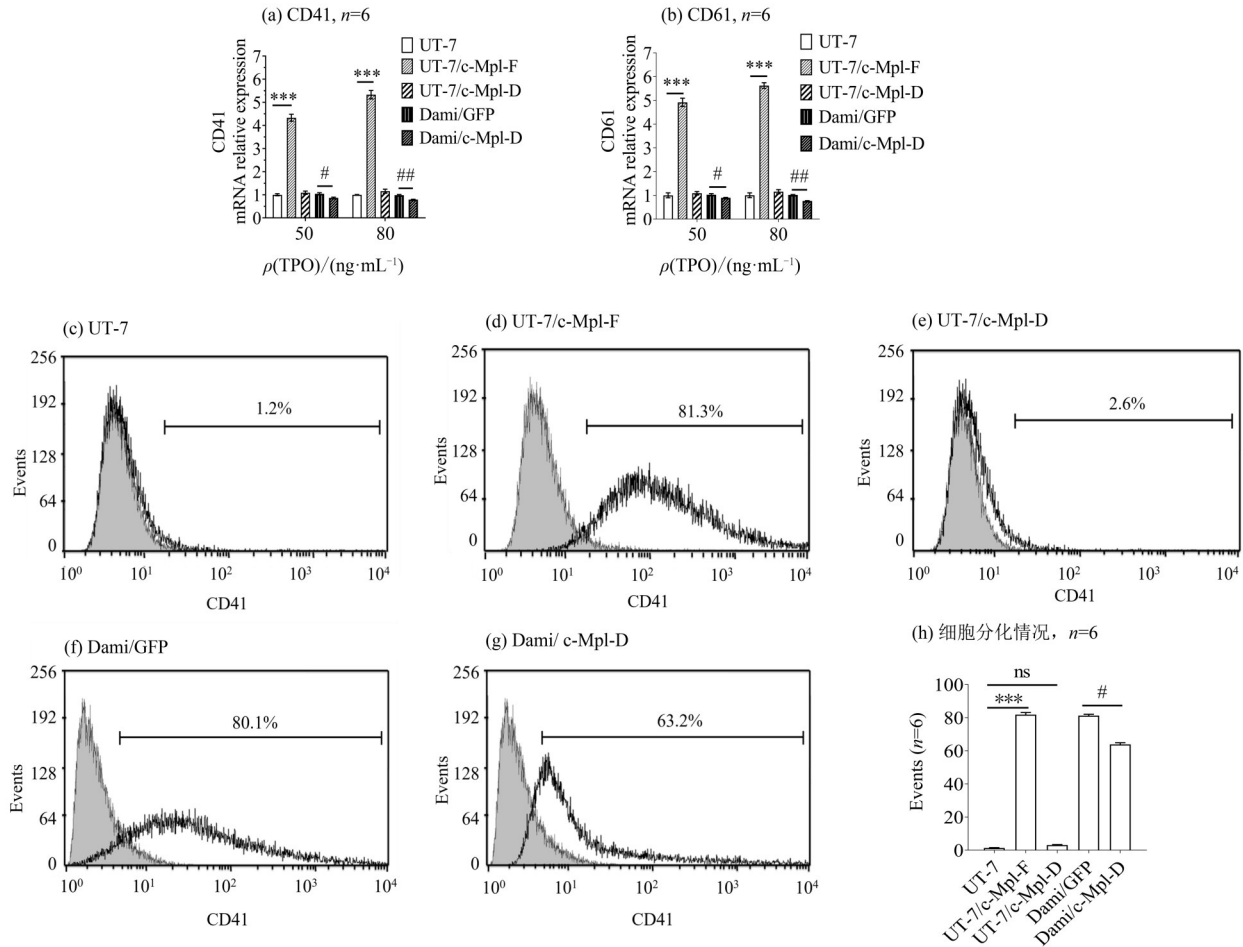
只有63.2%的细胞表面检测到CD41表达, 而Dami/GFP对照组则有80.1%的细胞表面检测到CD41表达, 提示c-Mpl-D在Dami细胞中过表达后, 抑制了Dami细胞的分化趋势(图4f-h)。

2.5 c-Mpl-D与c-Mpl-F相互作用

考虑到c-Mpl-D与c-Mpl-F有受体异源二聚化形成的能力, 我们开展了c-Mpl-D与c-Mpl-F在mRNA和蛋白质水平上是否有相互作用的研究。首先, 当从0.2 μ g到4 μ g加大c-Mpl-D转染浓度时, 虽然c-Mpl-D的蛋白和mRNA表达量增加, 但c-Mpl-F蛋白和mRNA的 Δ Ct值未有显著改变(图5a)。反之亦然, Western Blot结果也与Real-time PCR保持一致。当从0.2 μ g到4 μ g加大c-Mpl-F转染浓度时, 虽然c-Mpl-F的蛋白和mRNA表达量增

加, 但c-Mpl-D蛋白和mRNA的 Δ Ct值未有显著改变(图5b)。上述结果说明c-Mpl-F与c-Mpl-D在mRNA水平与蛋白水平相互没有干扰, 提示c-Mpl-D对于c-Mpl-F的调控作用可能通过其他途径来实现的。

为了确定c-Mpl-D与TPO是否具有相互作用, 我们验证了293T细胞成功共转c-Mpl-F/c-Mpl-D(图5c)。在此基础上, 为了克服配体与受体的可能瞬时性作用的缺点, 我们先用交联剂EGS将相互作用蛋白共价交联后再进行免疫共沉淀实验, 结果发现当加EGS组则出现c-Mpl-F与TPO交联蛋白(140 000), c-Mpl-D与TPO交联蛋白(140 000)(图5d)。如图5d显示只加DMSO组(对照组, EGS先溶解于DMSO配置成母液, 再按相应浓度要求添加至细胞反应液中)没有出现目的蛋白条带, 研究已证明



数据表示为 Mean ± SD (***) $P < 0.001$; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ 。

图4 c-Mpl-D过表达可抑制Dami细胞分化

Fig. 4 Overexpression of c-Mpl-D can inhibit differentiation of UT-7 and Dami cells

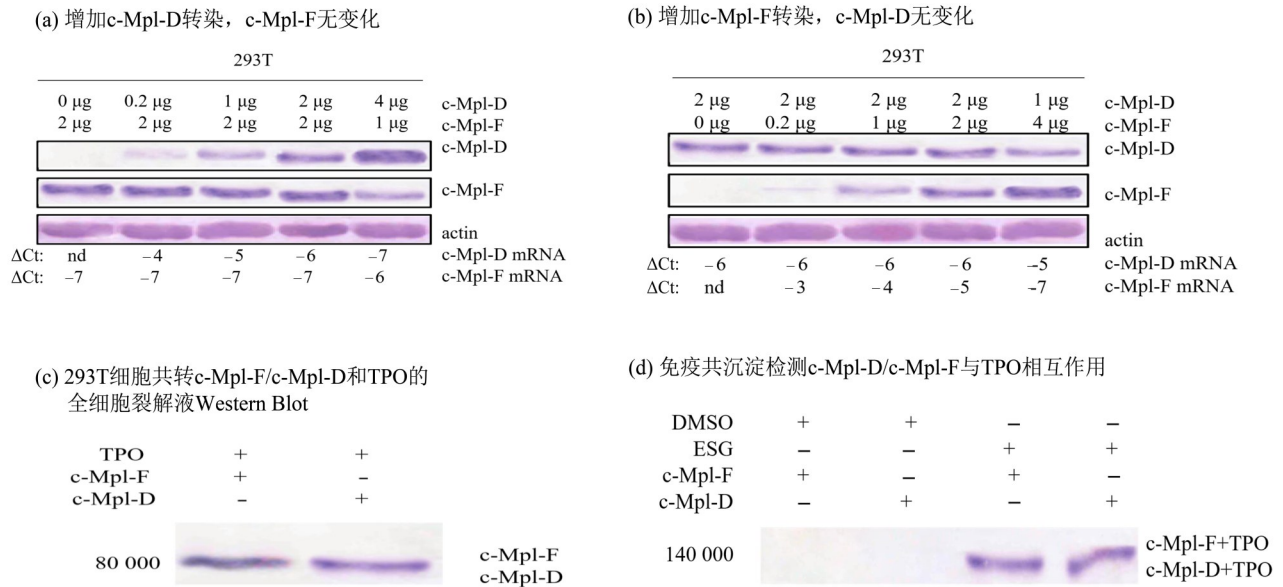


图5 293T细胞系中c-Mpl-D对c-Mpl-F的影响及与TPO的相互作用

Fig. 5 The effect of c-Mpl-D on c-Mpl-F and Co-immunoprecipitation of with TPO in 293T cells

c-Mpl-F 与 TPO 能够结合, 阳性对照在本实验中得到阴性结果。这证明 c-Mpl-D 也具有与 TPO 结合的能力, 说明 c-Mpl-D 可能与 TPO 存在相互作用。

2.6 TPO 降低 c-Mpl-D 受体的内化效应

c-Mpl 在细胞表面抗原分类中又名 CD110, 通过流式细胞仪检测 PE 标记的 CD110 在细胞表面的分布情况来判断 TPO 的刺激对细胞表面受体内化效应的影响。我们采用 20 ng/mL 这个质量浓度的 TPO 刺激 UT-7/c-Mpl-D 细胞和 UT-7/c-Mpl-F 细胞, 选择 30 和 60 min 2 个时间节点来比较 c-Mpl 含量的变化。经过 TPO 刺激 UT-7/c-Mpl-D 细胞 30 min 后细胞膜上剩余的 c-Mpl-D 占比为 97.1%, 60 min 后细胞膜上剩余的 c-Mpl-D 占比为 99.9%。刺激 UT-7/c-Mpl-F 细胞 30 min 后细胞膜上剩余的 c-Mpl-F 占比为 87.1%, 60 min 后细胞膜上剩余的 c-Mpl-F 占比为 90.3%, 提

示相比野生型 c-Mpl-F 受体, TPO 更能够降低 c-Mpl-D 受体的内化效应(图 6a~f)。

根据 Cancer today 数据库 (<https://gco.iarc.fr/today/en>) 获取中国人群肿瘤发病率及死亡率情况, Gepia 数码库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 获取主要肿瘤的生存曲线, 生存分析显示, TPO 高表达患者的总生存期明显低于 TPO 低表达组(图 6g~i)。TPO 信号转导增加可能是肿瘤患者血小板水平异常的原因, 血小板异常可引起肿瘤增殖进而造成转移和扩散, 是多种肿瘤不良预后的因素(Gay et al., 2011)。研究表明 TPO 可激活 EGFR/Akt/Erk1/2 促进非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1299 的增殖和克隆形成, 敲减 c-Mpl 可显著抑制 TPO 诱导的 EGFR 激活和肿瘤细胞增殖(Zou et al., 2020)。临床上通过降低循环 TPO 水平将有利于控制多种肿瘤的预后。

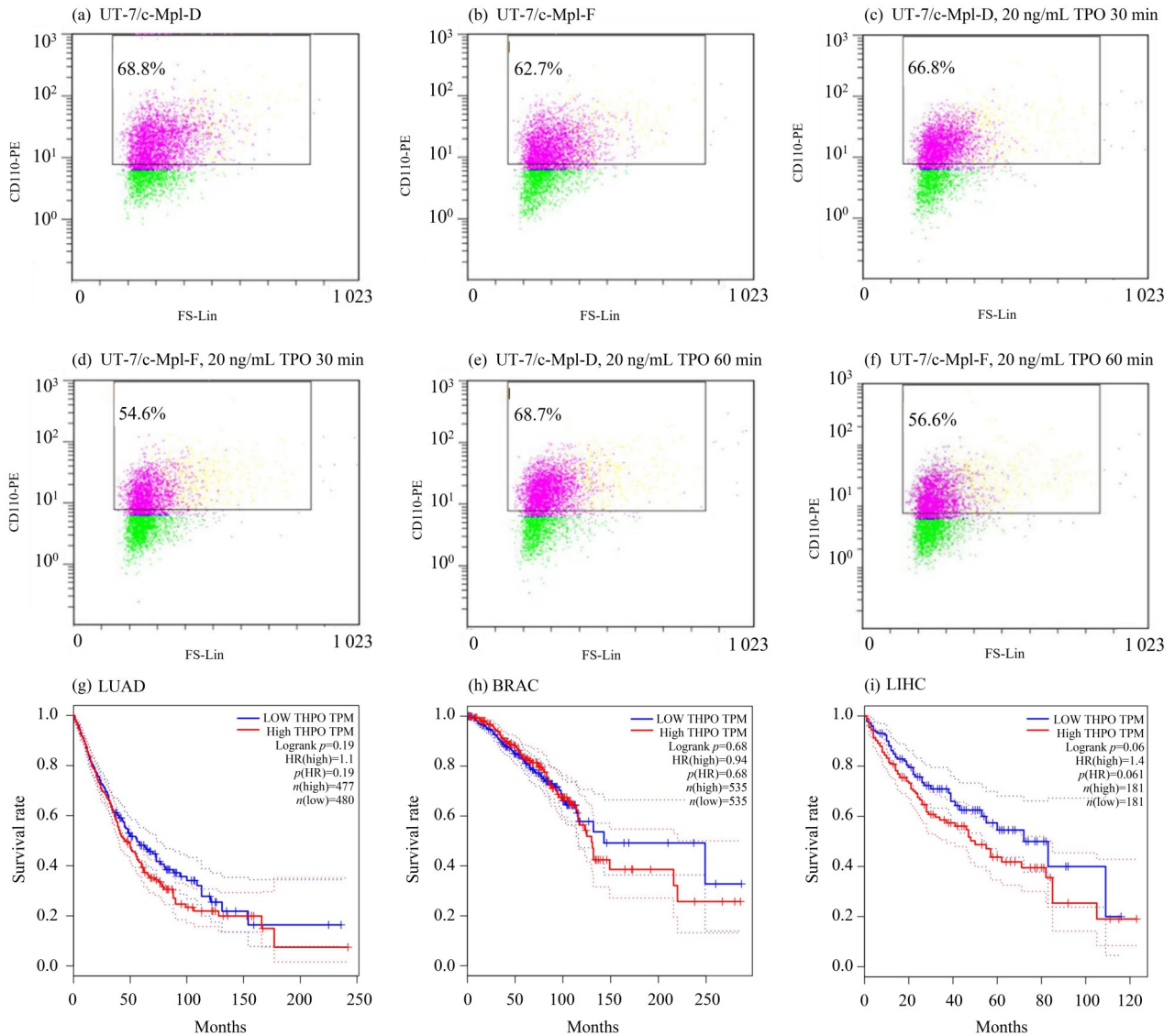


图 6 TPO 降低 c-Mpl-D 受体的内化效应及其关联肿瘤预后状况

Fig. 6 The effect of TPO reduction on the internalization of the c-Mpl-D receptor and its associated tumor prognosis

3 讨论

生理条件下, TPO 主要是促进巨核细胞的增殖和分化成熟并生成血小板 (Kaushansky 2024; Kaushansky et al., 2014; Deutsch et al., 2006); 其与全长受体 c-Mpl-F 结合后可形成活性状态的二聚化受体 (Ding et al., 2009), 进而发生 TPO/c-Mpl 复合物内化降解 (Märklin et al., 2020)。循环 TPO 水平的调节主要是这个方式, 而不是通过 TPO 合成量的改变 (Chang et al., 1996; Shivdasani et al., 1997), 因而血浆中 TPO 水平取决于其内化降解量。血小板通过 c-Mpl 介导的 TPO 内吞降解是一个趋向饱和的过程, 其表面存在不同 c-Mpl 亚型, 如 Mpl-K 无法实现 TPO 内化, 导致 TPO 即使延长也无法全部内化 (Li et al., 1999); Mpl-del 为 c-Mpl 另外一种剪接体, 可能参与 Mpl 功能的负向调节 (Li et al., 2000)。UT-7、Dami 细胞是人源巨核细胞白血病细胞系 (de Sauvage et al., 1996), 生长迅速, 传代培养方便, UT-7 细胞不表达 c-Mpl 却具有向巨核细胞分化的潜能 (Komatsu et al., 1993)。Dami 细胞在外源细胞因子例如 TPO 作用下会表现出巨核细胞增殖、分化和成熟过程的全部特征, 本实验室在 Dami 细胞中发现了 c-Mpl-D, 同时 Dami 细胞本身表达 c-Mpl-F, 是研究 c-Mpl-F 与 c-Mpl-D 相互作用的较好模型 (Greenberg et al., 1988), 有利于研究 c-Mpl-D 和巨核细胞增殖分化的关系, 为调节循环 TPO 水平提供依据。我们的研究表明, 在 TPO 存在时 Dami/c-Mpl-D 细胞比 Dami/GFP 细胞表现出更强的增殖能力, 即当 Dami 细胞中有 c-Mpl-F/c-Mpl-F, c-Mpl-F/c-Mpl-D, c-Mpl-D/c-Mpl-D 这三类二聚体存在的情况下, 用 TPO 刺激 Dami 细胞能够表现出更强的增殖效应。

另外, 在巨核细胞发育过程中, 尤其在末期成熟阶段其凋亡与成熟紧密相关。形成前血小板形态的巨核细胞已进入凋亡状态, 抑制巨核细胞凋亡会引发巨核细胞不完全成熟而出现血小板减少症状。对于巨核细胞而言其分化伴随着凋亡现象的出现, 分化过程中增殖能力也相应减弱, 即细胞分化与细胞增殖呈负相关, 而与凋亡呈正相

关。正如本研究结果证明的 c-Mpl-D 具有促进 Dami 细胞增殖, 抑制 Dami 细胞凋亡和分化的功能, 值得注意的是, Dami 细胞为较成熟的巨核细胞系, 即使不经 TPO 作用其本身表达一定量的 CD41 蛋白 (van der Vuurst et al., 1997), 从流式细胞术检测结果来看 c-Mpl-D 在 Dami 细胞中过表达后, 抑制了 Dami 细胞分化。然而, TPO 与 c-Mpl-D 与结合后所启动的关键信号尚未明确, 需要进一步地深入研究, 尤其是在肿瘤细胞中, c-Mpl-D 表达量已明显高于具有完整功能的 c-Mpl-F, 此时 c-Mpl-F 与 c-Mpl-D 共同作用如何调控白血病细胞的增殖和分化, 这是迫切需要回答的关键科学问题。

影响肿瘤细胞生物学行为除了涉及细胞信号传导途径的改变外, 分子配体的内吞和受体的内化的联动机制也决定了肿瘤的增殖和分化的程度。我们前期研究发现, UT-7/c-Mpl-D 细胞内吞 TPO 的能力弱于 UT-7/c-Mpl-F 细胞。而 UT-7/c-Mpl-D 细胞表面的 c-Mpl-D 在应答 TPO 刺激后, 内化比例较少。在同样条件的 TPO 的刺激下, UT-7/c-Mpl-D 细胞调动细胞内部 c-Mpl-D 循环补充到细胞膜上的机制优于 UT-7/c-Mpl-F 细胞, 使得 c-Mpl-D 能够在短时间内恢复初始值, 从而使细胞表面 c-Mpl-D 变化量较小, 提示肿瘤细胞中 c-Mpl-D 的剪切体的出现, 导致了细胞内吞 TPO 能力的降低和受体内化能力的降低, 从而加强肿瘤的信号传导强度。对于血液肿瘤 c-Mpl-D 的靶向调控将有利于控制白血病的恶性进程, 这将为白血病的防治提供重要的理论依据。

总之, 我们的研究表明 c-Mpl-D 在 AML 中高表达, 并参与 AML 细胞增殖、凋亡和细胞分化过程。我们还揭示 c-Mpl-D 可能通过降低受体内化效应, 而持续激活肿瘤细胞的恶化进程。初步证明 c-Mpl-D 促进细胞增殖与抑制细胞分化的癌性功能与 c-Mpl-D 的过表达相关。这些发现为 c-Mpl-D 与巨核细胞增殖分化的关系提供了新的认识, 表明 c-Mpl-D 可为 AML 潜在的临床诊断分子标记物, 并且是一个 AML 治疗的潜在靶点。

参考文献:

ALEXANDER W, METCALF D, DUNN A, 1995. Point mutations within a dimer interface homology domain of c-Mpl induce constitutive receptor activity and

tumorigenicity[J]. EMBO J, 14 (22): 556-559.
BROOK R, WANG J, BARIT D, et al, 2024. Spontaneous bleeding in chronic kidney disease: Global coagulation

- assays may predict bleeding risk [J]. *Res Pract Thromb Haem*, 8 (5): 102520.
- CHANG M, SUEN Y, MENG G, et al, 1996. Differential mechanisms in the regulation of endogenous levels of thrombopoietin and interleukin-11 during thrombocytopenia: Insight into the regulation of platelet production [J]. *Blood*, 88 (9): 3354-3362.
- CHEN J, HERCEG-HARJACEK L, GROOPMAN J E, et al, 1995. Thrombopoietin serum concentration in patients with reactive and myeloproliferative thrombocytosis [J]. *Blood*, 86 (11): 4054-4062.
- de SAUVAGE F J, CARVER-MOORE K, LUOH S M, et al, 1996. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin [J]. *J Exp Med*, 183 (2): 651-656.
- DEUTSCH V R, TOMER A, 2006. Megakaryocyte development and platelet production [J]. *Brit J Haematol*, 134 (5): 453-466.
- DING J, KOMATSU H, IIDA S, et al, 2009. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity [J]. *Blood*, 114(15): 3325-3328.
- GAY L J, FELDING-HABERMANN B, 2011. Contribution of platelets to tumour metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 11 (2): 123-134.
- GNRNEY A, CARVER MOORE K, de SAUVAGE F, et al, 1994. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice [J]. *Science*, 265 (5177): 1445-1447.
- GREENBERG S M, ROSENTHAL D S, GREELEY T A, et al, 1988. Characterization of a new megakaryocytic cell line: The Dami cell [J]. *Blood*, 72 (6): 1968-1977.
- KAUSHANSKY A, KAUSHANSKY K, 2014. Systems biology of megakaryocytes [J]. *Adv Exp Med Biol*, 844: 59-84.
- KAUSHANSKY K, 1995. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production [J]. *Thromb Haemostasis*, 74 (1): 521-525.
- KAUSHANSKY K, 2024. Thrombopoietin, the primary regulator of platelet production: From mythos to logos, a thirty-year journey [J]. *Biomolecules*, 14(4): 489.
- KAUSHANSKY K, LOK S, HOLLY R, et al, 1994. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin [J]. *Nature*, 369 (6481): 568-579.
- KOMATSU N, YAMAMOTO M, FUJITA H, et al, 1993. Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7 [J]. *Blood*, 82 (2): 456-464.
- LI J, SABATH D F, KUTER D J, 2000. Cloning and functional characterization of a novel c-mpl variant expressed in human CD34 cells and platelets [J]. *Cytokine*, 12 (7): 835-844.
- LI J, XIA Y, KUTER D J, 1999. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics [J]. *Brit J Haematol*, 106 (2): 345-356.
- LIU X G, HOU Y, HOU M, 2023. How we treat primary immune thrombocytopenia in adults [J]. *J Hematol Oncol*, 16(1): 4.
- MÄRKLIN M, TANDLER C, KOPP H G, et al, 2020. C-Cbl regulates c-MPL receptor trafficking and its internalization [J]. *J Cell Mol Med*, 24(21): 12491-12503.
- MILLOT G A, FEGER F, GAR O L, et al, 2002. Mpl K, a natural variant of the thrombopoietin receptor with a truncated cytoplasmic domain, binds thrombopoietin but does not interfere with thrombopoietin-mediated cell growth [J]. *Exp Haematol*, 30 (2): 166-175.
- ORSINI S, NORIS P, BURY L, et al, 2017. Bleeding risk of surgery and its prevention in patients with inherited platelet disorders [J]. *Haematologica*, 102(7): 1192-1203.
- PHILIP R, FRANK L, KATHARINA G, et al, 2018. Immature platelet fraction and thrombopoietin in patients with liver cirrhosis: A cohort study [J]. *PLoS One*, 13 (2): e0192271.
- SHIVDASANI R A, FIELDER P, KELLER G A, et al, 1997. Regulation of the serum concentration of thrombopoietin in thrombocytopenic NF-E2 knockout mice [J]. *Blood*, 90 (5): 1821-1827.
- van der VUURST H, van WILLIGEN G, van SPRONSEN A, et al, 1997. Signal transduction through trimeric G proteins in megakaryoblastic cell lines [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (9): 1830-1836.
- VINCENT J, ALISON R, EDWARD F, et al, 2021. Clinical applications of thrombopoietin silencing: A possible therapeutic role in COVID-19? [J]. *Cytokine*, 146: 155634.
- WANG Q, SUN R, WU L, et al, 2013. Identification and characterization of an alternative splice variant of Mpl with a high affinity for TPO and its activation of ERK1/2 signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 45 (12): 2852-2863.
- ZOU Z, FAN X, LIU Y, et al, 2020. Endogenous thrombopoietin promotes non-small-cell lung carcinoma cell proliferation and migration by regulating EGFR signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 24(12): 6644-6657.