

研究论文

人胚胎干细胞高效分化为巨核细胞模型的建立

高洁^{1#} 杨亦青^{1,2#} 庞素蕾¹ 刘鑫¹ 卢利莎³ 雷晓华⁴ 熊涛³ 王洪涛¹
马峰⁵ 周家喜^{1*}

(¹中国医学科学院, 北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020;
²河北北方学院医学检验学院, 张家口 075000; ³长江大学生命科学学院, 荆州 434025; ⁴中国科学院动物研究所,
北京 100101; ⁵中国医学科学院, 北京协和医学院输血研究所, 成都 610052)

摘要 人胚胎干细胞具有无限增殖潜能, 且能够分化为包括巨核细胞在内的大多数的成熟血细胞。因此, 为解决临床治疗血小板来源不足而建立一种由人胚胎干细胞高效分化获得成熟巨核细胞的分化模型具有重要应用前景。该文利用人胚胎干细胞与mAGM-S3基质细胞系共培养进行早期造血前体细胞的定向分化, 并在分化第14 d获得大量“卵石样”造血前体细胞(CD43⁺细胞、CD45⁺细胞)。将“卵石样”造血前体细胞分离后, 用无血清培养基分阶段添加SCF、TPO、IL-6、IL-3、Flt-3、IL-11等细胞因子进行巨核细胞定向诱导分化。结果显示, 在分化的第3 d, CD41a⁺细胞比例可高达48.5%, CD42b⁺细胞比例可高达30.0%。对分化第6 d的细胞进行Wright-Giemsa染色, 可见形态典型的巨核细胞。综上所述, 该研究初步建立了一种人胚胎干细胞高效分化为巨核细胞的模型, 为体外获得大量巨核细胞奠定了基础。

关键词 人胚胎干细胞; mAGM-S3; 造血分化; 巨核细胞

Establishment of a Highly Efficient Megakaryocytes Differentiation Model from Human Embryonic Stem Cells

Gao Jie^{1#}, Yang Yiqing^{1,2#}, Pang Sulei¹, Liu Xin¹, Lu Lisha³, Lei Xiaohua⁴, Xiong Tao³, Wang Hongtao¹,
Ma Feng⁵, Zhou Jiayi^{1*}

(¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; ²Hebei North University, Faculty of Medical Laboratory Sciences, ZhangJiaKou 075000, China; ³College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; ⁴Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁵Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu 610052, China)

Abstract Human embryonic stem cells (hESCs) have unlimited proliferative capacity and are able to differentiate into all mature blood cell types including megakaryocytes. Hence, establishment of a highly efficient megakaryocytes differentiation model from hESCs may shed light on solving the problem of limited platelet source

收稿日期: 2014-06-18 接受日期: 2014-08-11
天津市应用基础面上项目(批准号: 11JCYBJC27300)资助的课题
#共同第一作者

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

Received: June 18, 2014 Accepted: August 11, 2014

This work was supported by the Application and Foundation General Program of Tianjin (Grant No.11JCYBJC27300)

#These authors contributed equally to this work

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

网络出版时间: 2014-10-24 11:47 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0210.html>

in clinical applications. Herein, we applied a model of hESCs co-cultured with mAGM-S3 stromal cell line for hematopoietic differentiation. In this model, we could obtain abundant “cobblestone-like” (CD43⁺CD45⁺ cells) hematopoietic progenitor cells on the differentiation of day 14. Moreover, we isolated “cobblestone-like” hematopoietic progenitor cells and induced these cells to differentiate into megakaryocytes by adding cytokines, like SCF, TPO, IL-6, IL-3, FLt-3 and IL-11 by stages in serum free medium. Our research showed that the proportion of CD41a⁺ cells could reach 48.5%, and the proportion of CD42b⁺ cells could reach 30.0% on the differentiation of day 3. In addition, cells on the differentiation of day 6 showed characteristic of megakaryocytes by Wright-Giemsa staining. In conclusion, our research has preliminarily established a highly efficient megakaryocytes differentiation model from human embryonic stem cells, which provides a basis for obtaining plenty of megakaryocytes *in vitro*.

Key words human embryonic stem cells; mAGM-S3; hematopoietic differentiation; megakaryocytes

巨核细胞源自造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC), HSC在骨髓中首先分化为巨核-红系祖细胞(megakaryocyte-erythroid precursor, MEP), 然后分化为原始巨核细胞, 再经过胞核的多倍体化及各种特有细胞器的发育等过程进而形成成熟巨核细胞, 后者通过一系列复杂的细胞骨架变化才能释放血小板^[1]。由于体内巨核细胞占骨髓细胞比例不超过0.1%, 无法通过直接分离的方法获得满足研究所需的大量巨核细胞^[2]。因此, 建立高效的巨核细胞体外分化模型不仅为探寻其分化、成熟机理及进行相关疾病研究奠定基础, 同时, 体外诱导产生的功能性血小板也为解决临床上血小板供给不足提供可能。

目前, 体外诱导生成巨核细胞的来源主要有脐血、骨髓、动员后外周血的造血干细胞及人多能干细胞(包括胚胎干细胞和诱导性多能干细胞), 后者因在体外可无限扩增而具有更为广阔的应用前景^[3]。2001年, Kaufman等^[4]将人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)与基质细胞S17共培养, 可产生包含巨核细胞的混合克隆(GEMM克隆), 这是关于hESCs分化为巨核细胞的首次报道。此后, 不同研究组采用hESCs与OP9基质细胞共培养或“拟胚胎”培养等方式, 相继获得具有不同程度产生血小板能力的巨核细胞^[5-7]。但目前的巨核分化体系主要还是依赖于与基质细胞共培养及血清的添加, 无法直接用于临床治疗或药物筛选。此外, 目前国内利用多能干细胞进行巨核细胞分化的研究尚未见报道。本研究利用hESCs与小鼠主动脉-性腺-中肾区(aorta-gonad-mesonephros, AGM)基质细胞系mAGM-S3共培养所得的造血前体细胞, 在无血清培养条件下分阶段添加干细胞因子(stem cell factor, SCF)、促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、白细胞介

素-3(interleukin-3, IL-3)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-11(interleukin-11, IL-11)等细胞因子。结果发现, 在分化的第3 d, CD41a⁺细胞比例可高达48.5%, CD42b⁺细胞比例高达30.0%。综上所述, 本研究初步建立了一种不完全依赖于基质细胞和血清的人胚胎干细胞向巨核细胞诱导分化模型。

1 材料与方法

1.1 材料

hESCs细胞系H1购自Wicell研究所; mAGM-S3细胞系由中国医学科学院输血研究所马峰教授惠赠; mTeSR1和StemSpanTM SFEM培养基购自STEM CELL公司; α -MEM基础培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清和L-谷氨酰胺购自Hyclone公司; IMDM、消化酶Accutase、非必需氨基酸和青霉素/链霉素购自Gibco公司; 细胞因子VEGF、TPO、SCF、IL-6、IL-3、FLt-3和IL-11购自PeproTech公司; 抗坏血酸、丝裂霉素C、转铁蛋白和明胶粉末购自Sigma公司; Matrigel、Dispase及流式分析用小鼠抗人单克隆抗体均购自BD公司; T抗体购自R&D公司; CD31抗体和CD45抗体购自Abcam公司; CD34抗体和CD43抗体购自Santa Cruz公司; 胰酶/EDTA、DAPI和免疫荧光二抗购自Invitrogen公司; β -巯基乙醇购自Biotech公司; Rho/ROCK阻断剂(Y-27632)购自Calbiochem公司; Wright-Giemsa染液购自北京赛默生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

1.2.1 hESCs的培养 hESCs用mTeSR1培养基接种在由matrigel基质包被的培养板上, 培养条件为37 °C、5% CO₂, 每24 h更换一次培养基。hESCs传代周期约为4~5 d, 以克隆的形式传代时用2 U/mL Dispase于

37 °C消化细胞3~5 min, 然后用DMEM/F12培养基清洗细胞3次以终止Dispase的消化。加入新鲜mTeSR1培养基, 用移液管的管尖将细胞克隆以小块的形式刮离, 收集刮离的细胞克隆, 以1:5的比例接种细胞。以单细胞形式传代时用Accutase于37 °C消化细胞3~5 min, 然后用DMEM/F12培养基吹打收集单细胞于离心管中, 1 000 r/min离心5 min收集细胞, 用新鲜的mTeSR1培养基重悬细胞, 加入Y-27632(5 μmol/L), 按照实验需求的比例铺种细胞。

1.2.2 小鼠AGM区基质细胞mAGM-S3的培养 小鼠AGM区基质细胞mAGM-S3细胞用5% FBS/ α -MEM培养基培养在0.2%明胶基质包被的培养板上, 培养条件为37 °C、5% CO₂。每2 d传代一次, 传代时用0.05%的胰酶/EDTA 37 °C消化细胞1 min, 加入4 °C预冷的PBS以终止胰酶的消化作用, 反复吹打细胞使其分散为单个细胞, 1 000 r/min离心5 min以收集细胞, 用新鲜5% FBS/ α -MEM培养基重悬细胞, 以1:4的比例进行细胞传代。

1.3 hESCs与mAGM-S3共培养造血诱导分化

hESCs以克隆的形式用mTeSR1培养基铺种在用丝裂霉素C(5 μg/mL)处理过的基质细胞mAGM-S3上, 37 °C、5% CO₂共培养。mTeSR1培养基培养1~2 d后更换造血分化培养基(表1)。此时记为造血诱导分化0 d, 0~6 d每24 h换液一次, 7~14 d每12 h换液一次; 14 d后收获造血前体细胞。

1.4 巨核细胞的诱导分化

hESCs与mAGM-S3共培养造血诱导分化14 d, 用加样器吸头轻轻剥离“卵石样”细胞, 反复吹打后过滤膜将基质细胞团块去除。1 000 r/min离心5 min以收集细胞, 按 3×10^5 /mL密度重悬于StemSpan™

SFEM培养基, 接种至12孔超低吸附细胞培养板, 培养条件为37 °C、5% CO₂。此时记为巨核诱导分化0 d。0~6 d在培养基中加入TPO(50 ng/mL)、SCF(20 ng/mL)、IL-6(20 ng/mL)、IL-3(10 ng/mL), 7~12 d加入TPO(50 ng/mL)、SCF(5 ng/mL)、IL-11(20 ng/mL), 每3 d换液一次。

1.5 细胞免疫荧光染色

获得诱导分化不同时期的细胞, 用PBS洗1~2次后, 4%多聚甲醛室温固定细胞20 min, PBS洗细胞2次, 每次5 min, 用0.2% Triton X-100通透细胞15 min, PBS洗细胞2次, 每次5 min, 用0.2% BSA室温封闭1 h后, 用0.2% BSA以1:200的比例稀释一抗来标记特异性蛋白, 4 °C过夜。标记荧光二抗前先用PBS洗涤3次, 每次10 min, 用0.2% BSA稀释荧光二抗, 室温标记1 h, 1×DAPI室温孵育5 min标记细胞核, PBS洗细胞3次, 每次10 min。最后用PerkinElmer UltraVIEW VoX转盘式荧光显微镜进行拍摄, 获取荧光图像。

1.6 流式细胞术分析

采用0.25%胰酶/EDTA将共培养的细胞消化为单细胞, 过细胞筛(200目)收集细胞, PBS洗细胞1次, 用0.2% BSA重悬细胞, 以1:100的比例稀释抗体, 室温标记细胞30 min。PBS洗细胞1次, 用300 μL 1%多聚甲醛重悬细胞, 上机检测前需再次过细胞筛(200目), 流式细胞仪为LSR II数字化分析型流式细胞仪(BD公司), 测试结束后, 用FlowJo 7.6.1软件进行数据分析。

1.7 血细胞涂片

收集 2×10^4 细胞, 重悬于50 μL PBS中, 在细胞甩片离心机中以1 000 r/min离心5 min。室温晾干数分钟后进行Wright-Giemsa染色。

1.8 统计学方法

每次实验独立重复至少3次, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据采用SPSS 13.0软件包进行统计分析。

2 结果

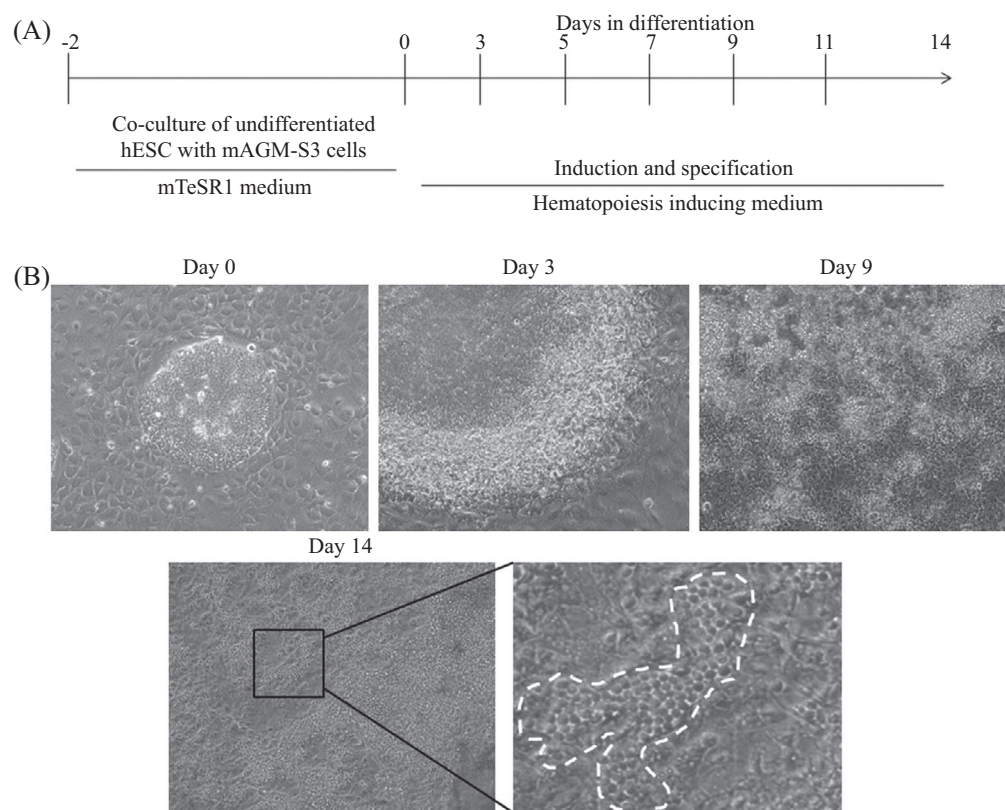
2.1 hESCs在共培养造血分化过程中的形态变化

hESCs克隆与mAGM-S3基质细胞在mTeSR1的条件下共培养1~2 d, 待hESCs克隆保持未分化状态生长到一定大小时, 更换造血分化培养基, 并计为造血分化0 d, 此后在造血分化培养基条件下诱导分化14 d(图1A)。在造血分化的1 d开始克隆边缘细胞变得松散, 并且细胞形态逐渐变成长梭形, 随着分化

表1 共培养造血分化培养基成分

Table 1 Hematopoiesis inducing medium in co-culture system

组成成分 Composition	添加体积 Volume
IMDM	172 mL
Fetal bovine serum	20 mL
Nonessential amino acid	2 mL (100×)
L-glutamine	4 mL (100×)
Penicillin-streptomycin	2 mL (100×)
VEGF	200 μL (10 ng/mL)
Transferrin	22.2 μL (70 mg/mL)
Ascorbic acid	200 μL (50 mg/mL)
β -mercaptoethanol	1.7 μL



A: hESC与mAGM-S3共培养造血分化流程; B: hESC与mAGM-S3共培养造血分化细胞形态学变化(100 \times), 14 d右图在原图的基础上放大了9倍, 白色虚线圈出的区域为“卵石样”细胞。

A: the process of hematopoietic differentiation in hESC and mAGM-S3 co-culture system; B: the variations of cell morphology in hESC and mAGM-S3 co-culture system (100 \times). The image on the right of day 14 has been magnified 9 \times on the basis of the original image, and the circled area contains large amounts of “cobblestone-like” cells.

图1 hESC与mAGM-S3共培养造血诱导分化过程

Fig.1 The process of hematopoietic differentiation in hESC and mAGM-S3 co-culture system

时间的推移, 到分化5 d时边缘细胞已逐渐形成“网络状”结构。到造血分化的7 d可以在“网络状”结构中观察到“卵石样”细胞, 并且随着分化时间的推移, “卵石样”细胞逐渐增多, 8~9 d时“卵石样”细胞可排列形成“血管样”结构, 到造血分化14 d时, “卵石样”细胞几乎布满整个培养皿(图1B)。

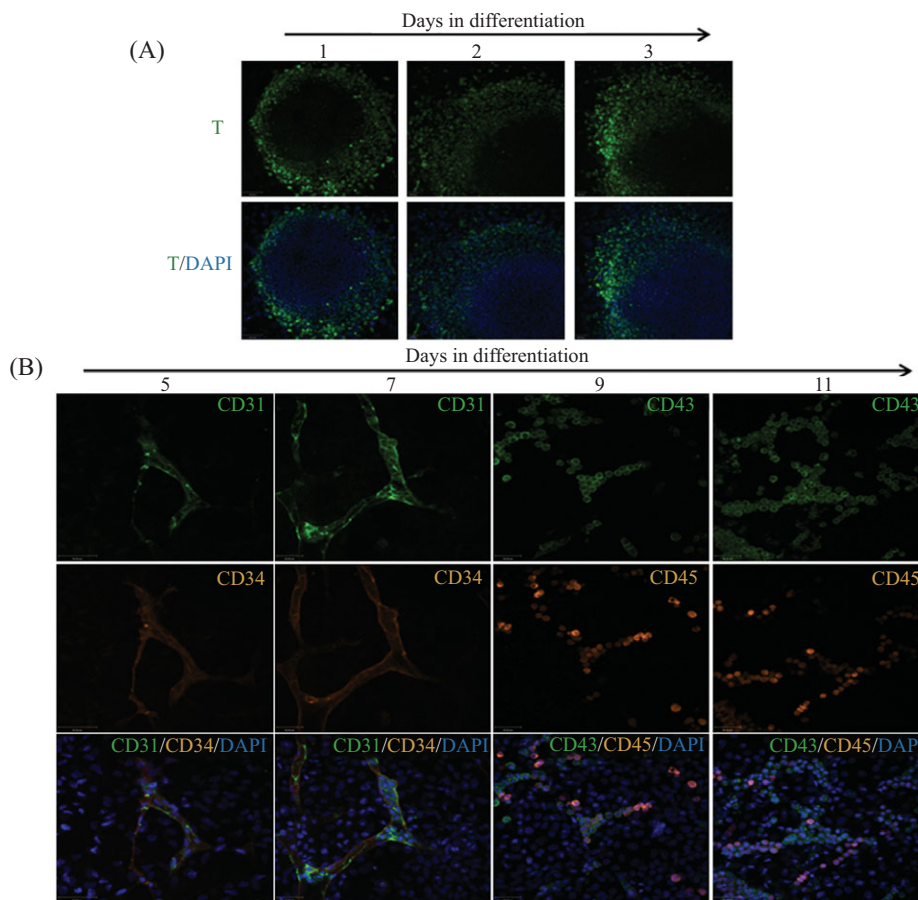
2.2 hESCs共培养造血分化获得大量造血前体细胞

hESCs与mAGM-S3共培养造血分化过程中, 用免疫荧光染色对分化不同阶段各类造血前体细胞进行分析与鉴定, 以探究hESCs造血共培养的分化过程。分化1~3 d时, 细胞克隆边缘松散的细胞为中胚层前体细胞(T^+ 细胞, 图2A)。分化5 d出现的“网络状”细胞为生血内皮前体细胞($CD31^+CD34^+$ 细胞), 分化7 d产生的“卵石样”细胞为 $CD31^+$ 或 $CD34^+$ 细胞, 分化9 d时产生的“卵石样”细胞主要为 $CD43^+$ 或 $CD45^+$ 细胞, 并随着分化时间的推移, “卵石样”

的 $CD43^+$ 或 $CD45^+$ 细胞逐渐增多(图2B)。经过一系列的分析鉴定之后发现, “卵石样”细胞大部分为 $CD43^+CD45^+$ 细胞, 并且细胞量随着分化的进行逐渐升高, 因此我们在分化14 d时分离出这些“卵石样”造血前体细胞, 进行进一步的巨核细胞定向分化诱导。

2.3 造血前体细胞定向诱导分化产生成熟巨核细胞

hESCs与mAGM-S3共培养所得造血前体细胞向巨核细胞分化过程中细胞形态学发生变化。在倒置相差显微镜下观察, 0 d细胞状态良好, 折光性强(图3A); 3 d易见部分胞体变大的细胞(图3B); 6 d胞体变大的细胞仍可见(图3C); 9 d部分细胞可伸出丝状突起使细胞成团(图3D); 12 d崩解坏死的细胞增多, 易见胞浆脱落的碎片和血小板颗粒(图3E)。取6 d细胞进行Wright-Giemsa染色, 可见形态典型的巨核细胞: 细胞胞体大, 胞浆丰富, 出现伪足状突起, 浆中颗粒增多, 胞核多分叶(图3F)。

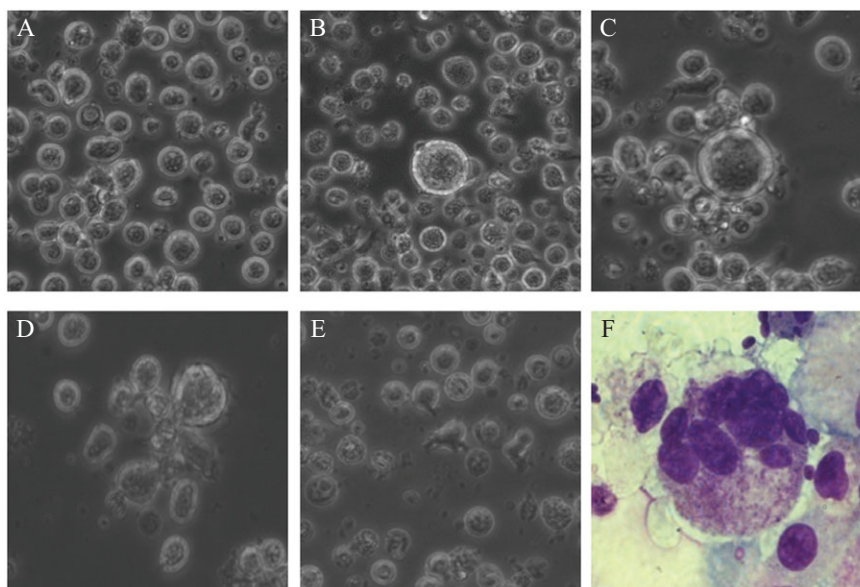


A: 免疫荧光染色T的表达(100×); B: 免疫荧光染色CD31、CD34、CD43、CD45的表达(200×)。

A: the expression of T via immunofluorescence staining (100×); B: the expressions of CD31, CD34, CD43 and CD45 via immunofluorescence staining (200×).

图2 hESC与mAGM-S3共培养可获得大量造血前体细胞

Fig.2 The mass production of hematopoietic progenitor cells from hESC and mAGM-S3 co-culture system



A~E: 分化0, 3, 6, 9, 12 d的细胞形态图像(200×); F: 分化6 d细胞的Wright-Giemsa染色图像(1 000×)。

A~E: the cell morphological images on the differentiation of day 0, 3, 6, 9 and 12 (200×); F: Wright-Giemsa staining on the differentiation of day 6 (1 000×).

图3 巨核细胞分化过程中细胞形态学变化

Fig.3 The variations of cell morphology during megakaryocyte differentiation

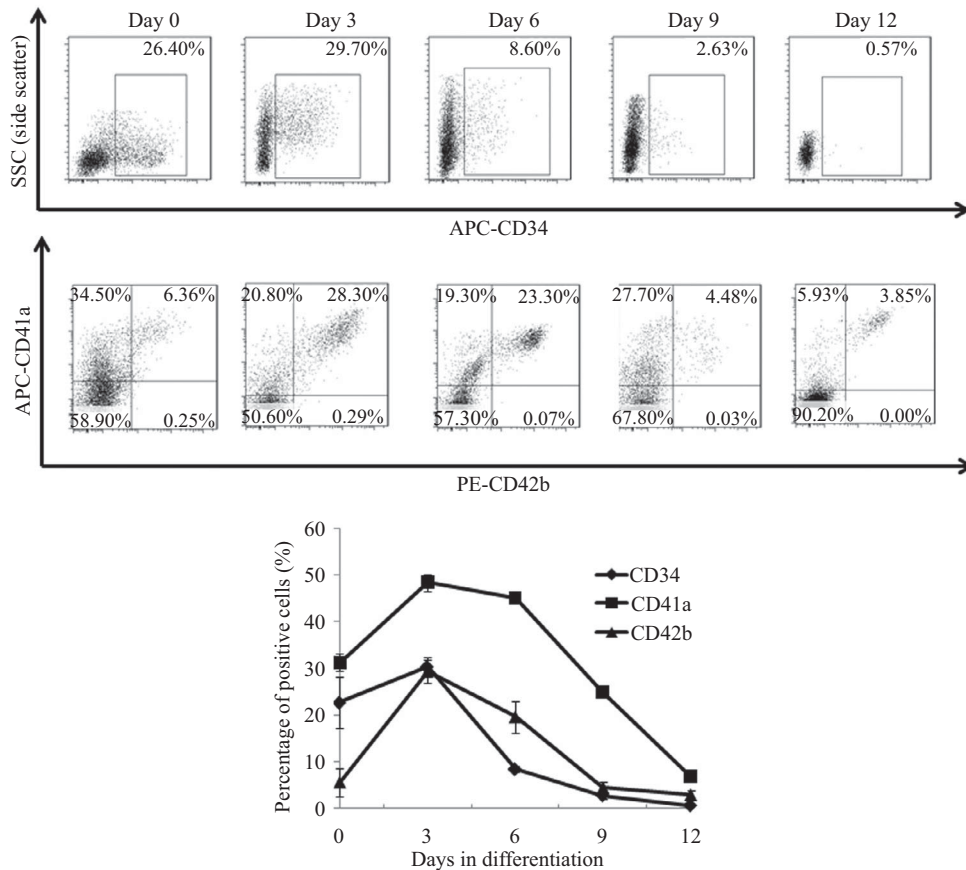


图4 巨核细胞分化过程中CD34、CD41a、CD42b的表达变化
Fig.4 Expressions of CD34, CD41a and CD42b during megakaryocyte differentiation

CD41a与CD42b通常被用来作为鉴定巨核细胞分化的标志分子^[8]。我们对不同分化阶段细胞CD34、CD41a和CD42b进行流式分析,结果显示,分化0 d CD34⁺细胞比例为22.7%, 3 d上升为30.3%。随着巨核细胞进一步分化和成熟, CD34⁺细胞比例逐渐下降, 6, 9, 12 d分别为8.4%、2.8%、0.7%。CD41a⁺细胞比例在3 d可达48.5%, 6 d为45.1%, 随后逐渐降低。CD42b的变化趋势和CD41a一致, 在3 d可达30.0%(图4)。

3 讨论

目前, 从hESCs获得早期造血前体细胞主要有三种方法, 第一种是通过悬浮培养形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)^[9-10]; 第二种是将hESCs以单层形式培养在细胞外的基质蛋白上^[11-12]; 第三种方法是将hESCs与特定的基质细胞共培养^[13-15]。常用的基质细胞为小鼠骨髓OP9细胞系、MS-5细胞系及mAGM-S3基质细胞系。mAGM-S3基质细胞系来源于第10.5 dpc小鼠胚胎永久造血期的主动脉-性腺-

中肾区。已有研究表明, mAGM-S3细胞系能很好地将hESCs诱导为造血前体细胞, 并且应用该基质细胞能较好地模拟早期血细胞在体内发生的情况^[16], 为研究人类造血发生发育奠定了良好的应用基础。

在本研究中, 我们对此共培养造血分化模型进行了表型鉴定和分化效率分析。在该分化过程中, 首先由人胚胎干细胞分化产生中胚层前体细胞(T⁺细胞), 再由中胚层前体细胞进一步分化产生生血内皮前体细胞(CD31⁺CD34⁺细胞), 造血分化7 d以后, 较为成熟的CD43⁺细胞、CD45⁺造血前体细胞(“卵石样”细胞)分化产生, 并且比例逐渐升高, 因此, 在共培养造血分化的过程中, 分化产生的造血前体细胞会在增殖的同时伴随着向成熟血细胞的定向分化。明确这个造血方式的分化过程为以后研究人胚胎干细胞早期造血分化机理机制奠定了良好的研究基础。

巨核细胞体外培养, 培养条件和生长因子是关键影响因素。造血生长因子是促进造血干细胞增殖、分化和定向成熟的一系列活性蛋白, 用于体外培养

巨核细胞的因子主要包括SCF、TPO、IL-3、IL-6、IL-9和IL-11等。其中以TPO最为重要,可协同其他生长因子促进HSC的自我更新,增加巨核祖细胞的数量,提高巨核细胞的倍体数等^[17-18]。IL-3和SCF主要在发育早期协同促进巨核祖细胞扩增。IL-11可诱导巨核细胞体积增大、增加其多倍体化、启动细胞骨架改变及促进血小板释放等,目前重组IL-11是临床上用来治疗血小板减少症的药物之一^[19]。不同细胞因子作用的侧重点不同,有效的因子组合要兼顾巨核祖细胞的扩增与成熟两方面,因此本研究采用的培养方案是0~6 d在培养基中加入50 ng/mL TPO、20 ng/mL SCF、20 ng/mL IL-6和10 ng/mL IL-3;7~12 d加入50 ng/mL TPO、5 ng/mL SCF和20 ng/mL IL-11。

在生长因子的作用下,造血前体细胞向巨核细胞分化。巨核细胞是哺乳动物体细胞中唯一只进行核内染色体复制但不伴随细胞质分裂的细胞。这种特点使得细胞的染色体倍数成倍增加,形成8N、16N,最多可达128N的细胞,称为多倍体细胞。细胞的多倍体化是对巨核细胞进行形态辨认最直接的特性^[20]。本研究结果显示,在培养体系中可见胞体较大的细胞,且具有胞核多分叶等典型巨核细胞形态特点。

随着巨核细胞的分化,CD34⁺细胞比例逐渐下降,表达巨核细胞相关表面标志CD41a、CD42b的细胞比例随着巨核细胞的分化成熟逐渐上升。CD41a为GPIIb,CD61为GPIIIa,作为巨核系分化较早的标志,从巨核系祖细胞开始,持续表达至血小板。CD42b为GPIba,比GPIIb/GPIIIa出现晚,是较成熟巨核细胞的标志。GPIIb与GPIIIa两者形成异源二聚体GPIIb/GPIIIa,可与纤维蛋白原、玻黏蛋白、血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)等结合;GPIba是vWF受体,以上均是血小板发挥黏附与聚集功能的重要结构基础^[8-21]。本研究采用CD41a和CD42b作为鉴定巨核细胞分化的标志,发现CD41a⁺细胞比例在分化起始为31.3%,3 d可达48.3%,随后逐渐降低;CD42b⁺细胞比例起始为5.6%,变化趋势和CD41a一致,在3 d达最高值29.3%,提示在hESCs和mAGM-S3细胞共培养14 d所获的“卵石样”细胞中已有分化的巨核细胞。最近的研究发现,CD41(GPIIb/GPIIIa)并不是巨核系特有的标志,也在小鼠胎肝中表达,作为永久造血建立的标志^[22]。

小鼠骨髓HSC也可表达CD41,且具有向髓系细胞发育的优势^[23],但在人类造血发育过程中是否也存在类似的现象还不清楚。因此,在本研究中巨核分化起始检测到的CD41a⁺细胞可能并不是真正意义上的巨核细胞。CD41a⁺及CD42b⁺细胞到培养后期比例的降低,可能是因为随着成熟巨核细胞胞浆的脱落而形成血小板后,细胞退化形成裸核而丧失了CD41a及CD42b表面标志。

总之,本研究初步建立了一种不完全依赖于基质细胞共培养和血清的hESCs向巨核细胞体外分化体系,即首先将hESCs与mAGM-S3基质细胞共培养获得造血前体细胞,再在无血清、化学成分明确的培养条件下继续分化产生一定比例的巨核细胞。目前的研究结果显示,该体系尚有很多待优化之处,例如,获得hESCs和mAGM-S3共培养分化最佳时间点的造血前体细胞,添加促巨核分化的细胞因子或小分子化合物等。因此,hESCs向巨核细胞分化的相关分化体系的优化还需要进一步的研究与探讨,为今后体外巨核细胞分化的分子机理的探索及相关血液疾病模型的研究奠定基础。

参考文献 (References)

- Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol* 2010; 47(3): 212-9.
- Levine RF. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. *Brit J Haematol* 1980; 45(3): 487-97.
- Reems JA, Pineault N, Sun S. *In vitro* megakaryocyte production and platelet biogenesis: State of the art. *Transfus Med Rev* 2010; 24(1): 33-43.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lu SJ, Li F, Yin H, Feng Q, Kimbrel EA, Hahm E, *et al.* Platelets generated from human embryonic stem cells are functional *in vitro* and in the microcirculation of living mice. *Cell Res* 2011; 21(3): 530-45.
- Lepage A, Leboeuf M, Cazenave JP, de la Salle C, Lanza F, Uzan G. The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells

- to megakaryocytes. *Blood* 2000; 96(13): 4169-77.
- 9 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.
- 10 Mountford JC, Turner M. *In vitro* production of red blood cells. *Transfus Apher Sci* 2011; 45(1): 85-9.
- 11 Yu C, Liu Y, Miao Z, Yin M, Lu W, Lü Y, *et al.* Retinoic acid enhances the generation of hematopoietic progenitors from human embryonic stem cell-derived hemato-vascular precursors. *Blood* 2010; 116(23): 4786-94.
- 12 Wang C, Tang X, Sun X, Miao Z, Lü Y, Yang Y, *et al.* TGFbeta inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res* 2012; 22(1): 194-207.
- 13 Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* 2004; 32(10): 1000-9.
- 14 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.
- 15 Kaufman DS. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2009; 114(17): 3513-23.
- 16 Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, Kawasaki H, Zaika 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.
- 17 Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis. *ASH Edu Pro* 2009: 147-52.
- 18 Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Brit J Haematol* 2014; 165(2): 259-68.
- 19 Ciurea SO, Hoffman R. Cytokines for the treatment of thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2007; 44(3): 166-82.
- 20 Kaushansky K. Historical review: Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood* 2008; 111(3): 981-6.
- 21 Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 2007; 5 Suppl 1: 318-27.
- 22 Mikkola HK, Fujiwara Y, Schlaeger TM, Traver D, Orkin SH. Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo. *Blood* 2003; 101(2): 508-16.
- 23 Gekas C, Graf T. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 2013; 121(22): 4463-72.