



投稿



查稿



网上商城



考试



期刊



视频

专科文献

在线投稿

稿件查询

期刊阅读

搜索

请输入您想要的信息

搜索

高级搜索

您当前位置: 首页 >> 专科文献>> 血液内科

血液内科

人胎盘与脐动、静脉造血干/祖细胞归巢相关黏附分子表达的研究

发表时间: 2011-12-12 10:14:50 来源: 创新医学网医学编辑部推荐

作者: 苏蕊,陈代雄,方宁,陈琦,龚芳泽 作者单位: 遵义医学院附属医院血液科, 贵州省细胞工程重点实验室, 遵义 563003

【摘要】为了评价人胎盘组织造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)的归巢能力, 采用机械法制备人胎盘组织单个细胞悬液, 用流式细胞术分析胎盘组织及脐动、静脉血有核细胞中CD34⁺细胞及其亚群的含量, 检测三者来源的CD34⁺细胞表面归巢相关黏附分子CD44、CD11a、CD62L、CD49d、CD49e和CD54的表达水平。结果显示, 胎盘组织CD34⁺细胞及CD34⁺CD38⁻细胞百分率明显高于脐动、静脉血;脐动脉与脐静脉血中HSPC百分率没有明显差异。胎盘来源CD34⁺细胞高度表达黏附分子CD11a、CD49d、CD44、CD49e及CD54, 其中表达CD49e及CD54水平明显高于脐动、静脉血CD34⁺细胞。胎盘来源的CD34⁺CD62L⁺细胞百分率为(64.58±15.52)%, 低于脐静脉血

来源的表达。结论: 人胎盘富含HSPC。胎盘来源的CD34⁺细胞多数黏附分子的表达水平近似或高于脐血, 提示胎盘HSPC的归巢能力有可能强于脐带血。

【关键词】 胎盘

Abstract The aim of this study was to evaluate the homing capabilities of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) derived from human placenta tissues (PT). Single cell suspension of human PT was prepared by mechanical method. The expression levels of homing-related adhesion molecules (HRAM) including CD11a, CD49d, CD44, CD49e, CD62L and CD54 on CD34⁺ cells and the percentages of CD34⁺ cells and their subpopulations in nucleated cells (NC) from fresh human PT, umbilical cord arterial blood (UCAB) and umbilical cord venous blood(UCVB) were detected by using flow cytometry. The results showed that the percentage of CD34⁺cells and CD34⁺CD38⁻ cells in placenta were higher than those in UCAB and UCVB. There were no significant difference in percentage of HSPC between UCAB and UCVB. Placenta-derived CD34⁺ cells strongly expressed CD11a, CD49d, CD44, CD49e and CD54, among which expression levels of CD49e and CD54 on placenta-derived CD34⁺ cells were significantly higher than those on UCAB and UCVB-derived CD34⁺ cells. While the percentage of CD34⁺CD62L⁺ cells in placenta was only lower than that in UCVB. It is concluded that human placenta is rich in HSPC. Moreover, the expression levels of most HRAM in CD34⁺ cells from PT are higher than those from UCAB and UCVB or are close to them. It suggested that HSPCs derived from PT might have stronger homing capabilities than those from UCB.

Key words placenta; umbilical cord artery; umbilical cord vein; hematopoietic stem/progenitor cell; adhesion molecule; homing

自发现脐带血富含造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC)以来, 脐血HSPC的移植已成为治疗骨髓造血功能衰竭、恶性血液病、重症免疫缺陷、某些遗传病等疾病的重要手段[1-4]。但是, 单份脐血所含的HSPC数量难以使一个成人获得造血干细胞重建。因此, 寻找富含HSPC的新资源是非常必要的, 国内已有学者发现胎盘组织中含有比脐带血更丰富的HSPC [5]。作为HSPC的成

特色服务
Serves

- 在线投稿
- 投稿指南
- 绿色通道
- 特色专区
- 服务流程
- 常见问题
- 编辑中心
- 期刊阅读

期刊约稿

- 中国社区医师
- 吉林医学
- 中外医疗
- 中国医学工程
- 中国卫生产业

推荐期刊

吉林医学



- 期刊介绍
- 在线阅读
- 在线订阅
- 在线投稿

职称晋升政策汇总
让您的晋升不留下半点遗憾

我要立即投稿

--最便捷的绿色通道

在线客服...

QQ交谈 1254635326
QQ交谈 4006089123
545493140(重要)
400-6089-123 68590972

功移植,除要有足够数量的HSPC外,还要求HSPC能及时、高效地归巢至骨髓造血微环境“龕”,这对HSPC的植活与造血重建具有决定意义[6]。HSPC表面黏附分子的正常表达是干细胞移植时HSPC实现归巢及成功植入的关键。本研究中,我们利用了胎儿胎盘血循环的特点,即脐动脉血是由胎儿流到胎盘,而脐静脉血则是由胎盘流回胎儿,分别测定脐动、静脉血及胎盘组织中HSPC的含量及三者CD34+细胞表面黏附分子的表达,初步探讨了胎盘HSPC的归巢能力,以期为人胎盘HSPC最终应用于临床移植提供有价值的实验依据。

材料和方法

主要试剂

荧光标记的CD分子系列单克隆抗体, anti-human CD34 Cy-chrome购自美国PharMingen公司。FITC标记的CD38单克隆抗体、CD49d单克隆抗体和CD54单克隆抗体及PE标记的CD11a单克隆抗体均购自晶美公司, PE标记的CD62L及CD44单克隆抗体购自Biolegend公司, FITC标记的CD49e单克隆抗体购自SBA公司。IMDM培养液为Sigma公司产品。

胎盘和脐带血标本

经知情同意后,无菌采集足月分娩胎儿的胎盘和脐动、静脉血标本6份,乙肝表面抗原(HBsAg)均为阴性。新生儿娩出后,在距胎儿脐部最近端结扎两处,从中间剪断脐带。胎盘残存于子宫内,并将距胎盘最近端脐带夹闭以防止血液流出。碘伏充分消毒脐带,用注射器分别穿刺脐动脉和脐静脉,收集脐带静脉血及动脉血各约5 ml于收集管内,同时收集胎盘。脐动、静脉血分别用肝素抗凝(终浓度均为20 U/ml),4小时内进行实验。

胎盘细胞的制备

用Hank's液冲洗除去血块,剪碎胎盘组织,并反复冲洗,尽量除去血液。将组织块浸泡于IMDM培养液,采用搓网法分离细胞,收集细胞悬液,用320目尼龙网过滤,115×g离心3分钟,收集细胞沉淀,悬浮于IMDM培养液中,台盼蓝染色示细胞活力>95%,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

多色荧光染色

分脐动、静脉血组和胎盘细胞悬液组,每组样品100 μl 均分别与以下荧光标记的CD分子抗体组合进行染色。用小鼠IgG作同型对照。① CD34-PE-Cy5 20 μl , CD38-FITC 10 μl ; ② CD34-PE-Cy5 20 μl , CD49d-FITC 10 μl 和CD11a-PE 10 μl ; ③ CD34-PE-Cy5 20 μl , CD49e-FITC 10 μl 和CD44-PE 20 μl ; ④ CD34-PE-Cy5 20 μl , CD54-FITC 10 μl , CD62L-PE 20 μl 。充分混匀,室温避光静置20分钟。每管加入2 ml红细胞裂解液,混匀,室温静置10分钟,180×g离心5分钟,弃上清,重新悬浮细胞。每管加入2 ml含1 g/L NaN₃的PBS,混匀,180×g 1%的多聚甲醛,混匀,2-8℃避光放置,逐一上机分析。

流式细胞仪检测表面标志

应用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson)对荧光染色的胎盘细胞和脐动、静脉血样品进行HSPC含量及表面黏附分子表达检测。样品的采集和分析采用Cell Quest软件,根据淋巴和单核细胞的大小设定CD34细胞门。

统计学处理

应用SPSS 11.0软件处理实验数据,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示。若方差齐性,则采用方差分析;若方差不齐,则采用非参数检验。

结果

CD34+细胞及其亚群的含量

实验结果表明,脐动脉血和脐静脉血之间HSPC含量无显著性差别,胎盘组织和脐动脉、静脉血中CD34+细胞百分率分别为(2.99±0.55)%、(1.46±0.39)%及(1.53±0.33)% , CD34+CD38-细胞百分率在胎盘组织为(1.40±0.53)% ,显著高于脐动脉、静脉血(0.08±0.04, 0.21±0.20)。这说明胎盘组织中含有比脐带血更丰富的HSPC(表1)。Table 1. Comparison in proportional distribution of hematopoietic stem/progenitor cells in nucleated cells from placenta tissues, umbilical cord arterial and venous blood(略)

脐动脉、静脉血和胎盘组织中CD34+细胞表达黏附分子的百分率

从表2可以看出,CD11a、CD49d和CD44在脐动脉、静脉血及胎盘组织来源的CD34+细胞中均呈现高表达率,但三者之间均无显著性差异($P>0.05$)。胎盘组织CD34+细胞表达CD49e和CD54分子百分率分别为(85.36±2.68)%和(72.44±11.58)% ,显著高于脐动脉[(27.18±11.00)%和(22.89±13.58)%]及脐静脉血CD34+细胞表达[(34.15±11.61)%和(28.39±13.38)%] ,三者之间均有非常显著差异($P<0.001$,附图)。脐动脉、静脉血和胎盘来源的CD34+细胞中CD62L表达率分别为(76.46±9.88)%、(81.62±10.02)%和(64.58±15.52)% ,与脐静脉血相比,胎盘CD34+表达CD62L偏低($P<0.05$,附图)。6种黏附分子在脐动脉、静脉血CD34+细胞的表达率均无显著差异($P>0.05$)。Table 2. Expression of homing-related adhesion molecules on CD34+ cells from placenta tissue, umbilical cord arterial and venous blood (略)

讨论

自Takahashi[7]发现小鼠胎盘绒毛膜具有造血功能后,曾风华等[8]采用免疫组织化学的方法,发现妊娠6-42周的人胎盘绒毛膜间质存在CD34⁺细胞。本研究结果显示,在足月妊娠分娩胎儿的胎盘组织中,CD34⁺细胞及CD34⁺CD38⁻细胞含量均明显高于脐动脉、静脉血中的含量。据此我们认为,胎盘组织中含有比脐血更丰富HSPC,而且是更为“早期”的CD34⁺CD38⁻造血干细胞。这似乎支持陈代雄等[8]早先提出的脐带血HSPC来源于胎盘的观点,人胎盘在胎儿发育期具有重要的造血功能。

本研究未发现脐动脉、静脉血中HSPC含量的差别,这与曾风华等人的实验结果不同。这可能与实验方法和分析不同有关。目前普遍采用的方法是不分离单个核细胞(mononuclear cell, MNC),而用全血进行直接免疫荧光标记[9]。本实验采用直接对脐动脉、静脉全血进行抗体标记,进一步提高了实验结果的准确性和可靠性。另一方面,在进行流式细胞仪检测时,为了使得到的数据更为准确,在分析结果时一般对目标细胞都要设门(gate)。而曾风华等人在文献中并没有提到设CD34细胞门,这显然会影响分析结果的准确性。此外,值得提出的是,HSPC的迁移包括2个阶段,即HSPC的归巢和HSPC的迁出。为了寻求更适宜的造血微环境,骨髓中部分HSPC迁出骨髓。因此,脐静脉和脐动脉血中HSPC含量没有差别是极有可能的。

HSPC归巢是指HSPC经外周血循环输入供体后,经过复杂的分子间相互作用、介导,特异性地定位于骨髓微环境合适的“龕”位。体外抗体阻断实验证实,CD49d、CD11a和CD44在造血细胞与基质细胞和细胞外基质成分间的黏附中起重要作用,而且CD11a参与了HSPC的植入,当CD11a被抗体中和之后,HSPC明显降低了植入水平[10]。因此,CD11a、CD49d及CD44分子在3种来源的CD34⁺细胞的高表达有利于HSPC的黏附与植入。

胎盘来源CD34⁺细胞高表达CD49e和CD54,其CD34⁺CD49e⁺细胞及CD34⁺CD54⁺细胞百分率明显高于脐动脉、静脉血(P<0.001)。Peled等[10]研究发现,脐血CD34⁺/CXCR4⁺细胞在基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)的诱导下,穿过骨髓基质细胞的定向迁移依赖CD49d和CD49e的共同作用,当这2个分子被各自抗体中和后,CD34⁺细胞在非肥胖性糖尿病-重症联合免疫缺陷小鼠(nonobese diabetic-severce combined immunodeficient mice, NOD/SCID)体内的植入过程被阻断。另外,CD54与CD11a这对分子可能与黏附和穿过内皮有关,当CD54与CD11a之间的相互作用被阻断后,CD34⁺细胞与基质的黏附被部分破坏。

胎盘组织CD34⁺细胞表达CD62L的细胞百分率明显低于脐静脉血CD34⁺细胞表达。研究表明,CD62L参与了移植后CD34⁺细胞的归巢过程,CD62L与祖细胞上的CD34结合后,上调HSPC上白细胞功能相关抗原-1(leukocyte function-associated antigen-1, LFA-1)的亲中性,而后者在细胞穿越细胞内皮过程中起重要作用[11]。Watanabe等[12]还发现,在自体干细胞移植中,输注CD34⁺CD62L⁺细胞的数量与患者体内中性粒细胞和血小板恢复到正常水平所需时间呈负相关。但L-选择蛋白基因敲除的小鼠未发生造血障碍[13],用抗L-选择蛋白单克隆抗体处理对动物与细胞也无任何影响。CD62在长期培养始动细胞(long-term culture initiating-cell, LTC-IC)表面表达较低,而在相对分化成熟的造血祖细胞表达则较高[14],这进一步证实了胎盘比脐带血含有更丰富的较原始HSPC的结论。

我们所测的脐动脉、静脉血中CD34⁺细胞表面的6个黏附分子的表达百分率与文献报道一致[15],这表明用先进的三色或四色流式细胞术检测HSPC表面黏附分子表达具有明显价值,值得今后试用。陈代雄等[5]及本观察都证实了胎盘组织CD34⁺CD38⁻细胞含量高于脐带血,Kollet等[16]通过观察移植后小鼠造血干细胞表型的表达及二次移植后体内多系造血的重建,证实CD34⁺CD38⁻细胞亚群为更早期的造血干细胞,归巢能力较高,这些研究结果支持了我们提出的,胎盘HSPC可能具有比脐血更强归巢能力的推测。

HSPC是一个复杂的过程,需要多种因子的共同作用,本研究结果显示,在胎盘CD34⁺细胞与脐动脉、静脉血CD34⁺细胞都具有CD11a、CD44及CD49d 3个分子的高表达率的前提下,胎盘CD34⁺细胞高度表达CD49e及CD54分子,均显著高于脐血,这也许能提示胎盘HSPC比脐血有更强的归巢能力,值得通过功能学试验进一步研究。

【参考文献】

- 1 Knudtzon S. In vitro growth of granulocyte colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 1974; 43: 357-361
- 2 Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution of a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 1989; 321:1174 -1178
- 3 Gluckman E, Wagner J, Hows J, et al. Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation: an international cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant*, 1993;11:199-200
- 4 Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 1998; 339:1565- 1577
- 5 陈代雄, 方宁, 刘祖林等. 人胎盘造血干/祖细胞及淋巴细胞亚群表型的研究. *中华血液学杂志*, 2004; 25:175- 178
- 6 Quesenberry PJ, Becker PS. Stem cell homing: rolling, crawling, and nesting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95:15155-15157
- 7 Takahashi K, Naito M, Katabuchi H, et al. Development, differentiation, and maturation of macrophage in the chorionic villi of mouse placenta with special reference to the origin of Hofbauer cells. *J Leukoc Biol*, 1991; 50:57-68
- 8 曾风华, 沈柏均, 王红美等. 脐动、静脉造血干细胞/祖细胞的比较. *中华儿科杂志*, 2001;39:335-338

9刘艳荣, 陈珊珊, 于弘. 流式细胞术计数CD34阳性细胞的标准化和质量控制. 中国实验血液学杂志, 2000;8: 302-306

10Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-5, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood, 2000; 95:3289-3296

11Majdic O, Stockl J, Pickl WF, et al. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. Blood, 1994; 83:1226-1234

12Watanabe T, Dave B, Heimann DG, et al. Cell adhesion molecule expression on CD34+ cells in grafts and time to myeloid and platelet recovery after autologous stem cell transplantation. Exp Hematol, 1998; 26:10-18

13Arbones ML, Ord DC, Ley K, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. Immunity, 1994; 1:247-260

14Timeus F, Crescenzo N, Basso G, et al. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34+ cells. Stem Cell, 1998;16:120-126

15郑以州, 张莉, 王慧君等. 不同来源的造血干/祖细胞表面归巢相关分子表达谱的比较研究. 中华血液学杂志, 2004; 25:736-739

16Kollet O, Spiegel A, Peled A, et al. Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low) CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. Blood, 2001; 97: 3283-3291

最热点击



考试宝典-高分练兵场



揭秘论文“低价”根源



医学编辑中心



邮箱投稿视频教程

相关文章



- ▶ 人胎盘与脐动、静脉血造血干/祖细胞归巢相关黏附分子表达的研究 2011-12-12
- ▶ 植入性胎盘11例临床分析 2011-11-30
- ▶ 人胎盘组织造血干/祖细胞的分离富集 2011-11-23
- ▶ 前置胎盘、胎盘植入、胎盘黏连与人工流产的关系 2011-11-21

加入收藏夹
 复制给朋友
 分享到外站

评论内容

请文明上网，文明评论。

发表评论

重置

电话: 400-6089-123 029-68590970 68590971 68590972 68590973 传真: 029-68590977

服务邮箱: vip@yixue360.com QQ: 1254635326 (修稿) QQ: 545493140 (项目合作)

Copyright @ 2007 - 2012 www.yixue360.com , All Rights Reserved 陕ICP备:08003669号

