

[文章编号] 1000-4718(2007)05-0995-04

脐带血造血前体细胞在间质干细胞微环境中的增殖和分化特性研究

岑洪¹, 林茂芳²¹广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科, 广西南宁 530021;²浙江大学医学院第一附属医院血液科骨髓移植中心, 浙江杭州 310003)

[摘要] 目的: 用间质干细胞(MSC)体外模拟造血微环境, 探讨脐带血造血前体细胞在 MSC 微环境中的增殖和分化特性。方法: 实验组(CK + MSC 组)以 MSC 为基质层细胞, 建立基于 MSC 的体外造血细胞扩增体系, 接种脐带血单个核细胞, 培养体系中加入外源性造血生长因子 SCF、Flt3L、TPO 和 IL-6, 培养第 1、2、3、4 周对扩增的细胞进行细胞计数、集落培养, 对照组为单纯细胞因子组(CK 组, 无 MSC 基质层细胞)和单纯 MSC 组(无脐带血单个核细胞)。结果: (1)第 4 周时 CK + MSC 组的细胞数扩增 108 倍, 而 CK 组只有 7.8 倍。(2)CK + MSC 组和 CK 组扩增的集落形成细胞(CFC)数量在第 3 周时达高峰, 第 4 周时 CFC 数量已迅速下降。(3)红系 CFC 和高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)均于扩增 1 周后到达高峰, CK + MSC 组的扩增效率要优于 CK 组, 到第 3 周时两组均降为零。(4)粒单系 CFC 则在扩增第 3 周时到达高峰, CK + MSC 组扩增效率优于 CK 组, 从第 4 周开始出现回落。(5)扩增 1 周后, 单位细胞(10^4 个 MNC)中的 CFC 数到达高峰, CK + MSC 组优于 CK 组, 从第 2 周开始每 10^4 个 MNC 中的 CFC 数迅速呈下降趋势, 到第 4 周时已降至低于扩增前水平。(6)单纯 MSC 组无造血细胞生长。结论: (1)体外扩增脐带血造血前体细胞时, 基于 MSC 的扩增体系要优于单纯细胞因子体系。(2)MSC 在体外有利于脐带血造血前体细胞扩增的同时, 并不能阻止其分化。(3)红系扩增出现在体外扩增的早期, 粒单系扩增持续的时间比红系长, 扩增的 CFC 数量更多。

[关键词] 间质干细胞; 胎血; 细胞分化**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

Proliferation and differentiation patterns of hematopoietic precursor from umbilical blood in mesenchymal stem cell microenvironment

CEN Hong¹, LIN Mao-fang²¹ Department of Chemotherapy, The Affiliated Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ² Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the proliferation and differentiation patterns of hematopoietic precursors from cord blood in mesenchymal stem cell(MSC) microenvironment. **METHODS:** MSC was used as feeder cells, the mononuclear cells (MNCs) from cord blood were expanded in MSC microenvironment in the presence of stem cell factor(SCF), FMS-like tyrosine kinase 3 ligand(Flt3L), thrombopoietin (TPO) and IL-6. MNC count and colony-forming cell (CFC) culture were performed at week 1, 2, 3 and 4. **RESULTS:** (1) The number of MNCs increased and reached 108-fold in group MSC + CK(cytokine), but 7.8-fold in group CK at week 4. (2) CFC increased and reached the peak at week 3, the total number of CFC was higher in group MSC + CK than that in group CK, a rapid decline was observed at week 4. (3) The greatest expansion of erythroid CFC and high proliferative potential colony-forming cells(HPP-CFC) occurred at week 1, went down rapidly and dropped to zero at week 3, expansions in group MSC + CK were greater than that in group CK. (4) Myeloid CFC expanded continuously and the greatest expansion occurred at week 3, and declined at week 4. Myeloid CFC expanded greater in group MSC + CK than that in group CK. (5) CFC number per 10^4 MNCs reached the peak after one week of expansion, then declined rapidly from week 2, and dropped lower than that before expansion by the end of week 4. **CONCLUSION:** (1) Expansion ability of hematopoietic precursors from cord blood in MSC microenvironment is better than that in culture system without MSC. (2) Even expansion is performed in MSC microenvironment, differentiation could not be prevented. (3) Expansion of erythroid precursors occurs in the early stages of *ex vivo* expansion. Expansion of myelomonocytic precursors lasts longer than that of erythroid.

[KEY WORDS] Mesenchymal stem cells; Fetal blood; Cell differentiation

[收稿日期] 2006-05-31

[修回日期] 2006-12-05

骨髓造血微环境为造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)提供生长、发育的场所。造血微环境细胞成分主要由骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)分化产生的成纤维细胞、脂肪细胞、成骨细胞和内皮细胞及其分泌的细胞外基质构成,通过与造血细胞直接接触、分泌多种细胞因子调控造血,维持造血微环境的结构和功能完整性,维持骨髓正常造血。MSC作为造血微环境主要细胞成分的前体细胞,在造血微环境和造血调控中发挥重要作用。近年来有报道, MSC与HSC联合移植能够促进HSC的植活率,缩短无髓期,减少死亡率^[1,2]。但目前对MSC与造血调控之间的关系所知甚少。本研究观察脐带血造血前体细胞在MSC微环境中的增殖和分化特性,探讨MSC是否能在体外调控造血,以及如何调控造血。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

细胞因子 SCF、Flt3L、TPO、IL-6、IL-3、GM-CSF、EPO 均为 Peprotech 公司产品, IMDM、DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品, L-谷氨酰胺、2-巯基乙醇、琼脂和牛血清白蛋白均购于上海生物工程公司, CD45-FITC、CD44-FITC、HLA-DR-FITC、CD34-PE、CD29-PE 和 CD166-PE 单克隆抗体为 Immuntech 公司产品。

2 骨髓来源的 MSC 体外培养和鉴定

骨髓取材于骨髓移植的正常供者,置于 Percoll 分离液(比重 1.073)上, $900 \times g$ $4^{\circ}C$ 离心 20 min, 收集培养液与分离液界面上的单个核细胞。用含体积分数为 10% 胎牛血清(FCS)低糖 DMEM 培养液洗涤细胞 2 次,重悬细胞并计数。以 5×10^9 cells/L 密度接种于 25 mL 培养瓶中,每瓶 5 mL,置于 $37^{\circ}C$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱孵育,24 h 后更换培养基,弃去非贴壁细胞,每 3 d 换液 1 次。原代培养细胞贴满培养瓶底 80% 时,吸尽培养基, PBS 液洗涤 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化,吸取细胞离心洗涤 1 次,分两瓶进行传代培养,此时的细胞称第 1 代细胞。同法进行第 2、3 代培养。培养的 MSC 经流式细胞仪分析均表达 CD44、CD29 和 CD166,不表达 CD45、HLA-DR 和 CD34;并能分化为成骨细胞和脂肪细胞。

3 脐带血单个核细胞分离

取脐带血 20 mL,肝素抗凝,用等量的无血清 IMDM 培养液稀释,用密度为 1.077 的 Ficoll 淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 2500 r/min 离心 25 min,

小心吸出白膜层单个核细胞,用无血清 IMDM 培养液洗涤 2 遍, 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清,细胞悬液计数,用含 10% (V/V) 胎牛血清的 IMDM 培养液调整细胞浓度为 1×10^9 cells/L。

4 脐带血造血前体细胞在 MSC 微环境中扩增

实验分 3 组。(1)单纯细胞因子(CK)组:培养于 6 孔板,接种 5×10^5 个脐带血单个核细胞,培养基为 2 mL 含 10% FCS 的 IMDM,细胞因子浓度为 SCF 和 Flt3L 各 $50 \mu g/L$, IL-6 和 TPO 各 $20 \mu g/L$,置于 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中,每周半量换液 2 次,补充造血生长因子。(2)CK + MSC 组:将第 3 代 MSC 消化,制成单个细胞悬液,接种 6 孔板,每孔接种细胞数 1×10^6 ,培养 48 h,细胞长满培养板底,经丝裂霉素处理后,每孔接种 5×10^5 个脐带血单个核细胞,培养条件同 CK 组。(3)单纯 MSC 组:将第 3 代 MSC 消化,制成单个细胞悬液,接种 6 孔板,每孔接种细胞数 1×10^6 ,培养 48 h,细胞长满培养板底,经丝裂霉素处理后,每孔加入细胞因子浓度同 CK 组,不接种脐带血单个核细胞。每 7 d 对换出的细胞进行细胞计数和集落培养,实验重复 4 次。

5 扩增细胞计数

扩增培养第 1、2、3、4 周分别进行单个核细胞计数。

6 造血祖细胞集落培养

培养前(1×10^5 个 MNC)及体外扩增培养 1、2、3、4 周收集的细胞(1×10^4 个 MNC),用 IMDM 洗涤后,在含 0.3% 琼脂、30% FCS、10% BSA、 5×10^{-5} mol/L β -巯基乙醇(2-MG)的 IMDM 半固体培养基中培养。细胞因子浓度 SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF 各 $20 \mu g/L$, EPO 2×10^3 U/L。在 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 条件下培养 14 d,分别计数 CFU-GM、BFU-E、CFU-E 和 HPP-CFC。

7 细胞集落计数标准

CFU-GM:粒单系集落,细胞数 > 50 ; CFU-E:红系集落,细胞数 20-50; BFU-E:红系集落,细胞数 > 50 ; HPP-CFC(高增殖潜能集落形成细胞):直径 > 0.5 mm 的粒单核系集落,细胞数 > 50000 。CFC(克隆形成细胞数) = CFU-GM + BFU-E + CFU-E + HPP-CFC。

8 细胞和集落计数校正公式

每周测定的单个核细胞和细胞集落数为校正后的总数,公式为校正后细胞数(集落数) = 未校正细胞数(集落数) $\div (1/2)^n$, n = 半量换液时丢弃细胞的次数。

结 果

1 脐带血造血前体细胞能在 MSC 微环境中高效扩增

1.1 脐带血造血前体细胞在不同培养条件下扩增产生 MNC 的比较 如表 1 所示,脐带血单个核细胞在第 1 周数量变化不明显,单纯细胞因子(CK)组细胞数减少,而 CK + MSC 组细胞数量略有增加,到第 3、4 周细胞数量迅速增加,CK + MSC 组细胞数量明显高于单纯 CK 组,到第 4 周时 MNC 扩增最高可达 108.47 倍(与最初接种的细胞数比)。

表 1 脐带血单个核细胞体外扩增倍数

Tab 1 Expansion folds of MNCs from cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
CK	0.14 ± 0.03	0.98 ± 0.13	2.89 ± 0.66	7.82 ± 1.71
CK + MSC	3.21 ± 0.57*	11.60 ± 2.02*	46.50 ± 10.62*	108.47 ± 19.73*

* $P < 0.01$ vs CK.

1.2 脐带血造血前体细胞体外扩增形成 CFC 的能力 本研究动态观察了造血细胞体外扩增培养 1 - 4 周形成的总 CFC 数(CFC 为 CFU - GM、CFU - E、BFU - E 和 HPP - CFC 数的总和)(校正后数值)。如表 2 所示,随体外培养时间延长,CFC 总数增加,第 3 周达高峰,第 4 周逐渐下降,CK + MSC 组扩增 CFC 的能力要明显高于单纯 CK 组。

表 2 脐带血造血前体细胞体外扩增形成的 CFC 数

Tab 2 Counts of CFC expanded from cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	1 week ($\times 10^3$)	2 weeks ($\times 10^3$)	3 weeks ($\times 10^3$)	4 weeks ($\times 10^3$)
CK	0.31 ± 0.08	1.03 ± 0.26	1.85 ± 0.49	0.96 ± 0.30
CK + MSC	10.60 ± 2.40*	14.00 ± 3.80*	38.10 ± 8.70*	18.10 ± 6.70*

* $P < 0.01$ vs CK.

2 红系造血前体细胞体外扩增的增殖动力学

如表 3 所示,体外扩增 1 周后,红系 CFC 数(BFU - E + CFU - E)达高峰,CK + MSC 组要明显高于 CK 组,此后红系 CFC 数迅速减少,第 3 周时降为 0。

表 3 脐带血造血前体细胞体外扩增形成的红系 CFC 数

Tab 3 Counts of erythroid CFC expanded from cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	1 week	2 weeks	3 weeks
CK	158.81 ± 47.22	157.11 ± 50.54	0
CK + MSC	5 891.20 ± 1 355.19*	2 795.00 ± 640.60*	0

* $P < 0.01$ vs CK.

3 粒单系造血前体细胞体外扩增的增殖动力学

如表 4 所示,随体外扩增时间延长,CFU - GM 数增加,CK + MSC 组要明显高于 CK 组;扩增 3 周后,CK 组和 CK + MSC 组的 CFU - GM 数达高峰,此后 CFU - GM 数迅速减少。

表 4 脐带血造血前体细胞体外扩增形成的 CFC - GM 数

Tab 4 Counts of CFC - GM expanded from cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	1 week ($\times 10^3$)	2 weeks ($\times 10^3$)	3 weeks ($\times 10^3$)	4 weeks ($\times 10^3$)
CK	0.14 ± 0.08	0.86 ± 0.25	1.85 ± 0.49	0.96 ± 0.20
CK + MSC	4.12 ± 0.81*	10.63 ± 2.75*	31.50 ± 6.80*	18.30 ± 3.40

* $P < 0.01$ vs CK.

4 脐带血造血前体细胞体外扩增后出现分化趋势

4.1 体外扩增后单位细胞中(10^4 个 MNC)的 CFC 数呈下降趋势 由表 5 可看出,于体外扩增 1 周后,每 10^4 个 MNC 中的 CFC 数最高,CK + MSC 组要高于 CK 组,从第 2 周开始呈下降趋势,到第 4 周时,CK 组和 CK + MSC 组均低于扩增前水平。

表 5 体外扩增后单位细胞(10^4 个 MNC)的 CFC 数

Tab 5 Counts of CFC expanded from 10^4 MNCs of cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
CK	20.63 ± 6.51	217.00 ± 71.36	102.33 ± 32.53	61.33 ± 18.34	11.33 ± 3.11
CK + MSC	20.63 ± 6.51	322.00 ± 76.62*	116.67 ± 37.07	64.67 ± 20.40	16.33 ± 4.04

* $P < 0.01$ vs CK.

4.2 体外扩增后单位细胞(10^4 个 MNC)中的 HPP - CFC 数下降 如表 6 所示,脐带血造血前体细胞在体外扩增 1 周,每 10^4 个 MNC 中的 HPP - CFC 数最多,CK + MSC 组要高于 CK 组;此后随体外扩增时间延长,HPP - CFC 数迅速减少,到第 3 周时降为 0。

表 6 体外扩增后单位细胞(10^4 个 MNC)中的 HPP - CFC 数

Tab 6 Counts of HPP - CFC expanded from 10^4 MNCs of cord blood *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

	1 week	2 weeks	3 weeks
CK	10.70 ± 2.70	1.70 ± 0.50	0
CK + MSC	19.00 ± 3.60*	4.70 ± 1.50*	0

* $P < 0.01$ vs CK.

5 单纯 MSC 组扩增结果

该组 MSC 细胞贴培养板底生长,未培养出造血细胞。

讨 论

间质干细胞(MSC)作为造血微环境主要细胞成

分的干/祖细胞,通过自我更新和多向分化,在造血微环境、造血调控中发挥重要作用。Azizi 等^[3]的研究表明,MSC 无需诱导即表达 IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 11、IL - 12、IL - 14、IL - 15、LIF、M - CSF、Flt - 3 配体、SCF,可由 IL - 1 诱导产生 G - CSF、GM - CSF。有报道证实 MSC 与 HSC 的联合移植促进了 HSC 的植入,造血重建明显加速^[4,5]。大量的实验研究表明,MSC 具有造血支持作用^[6]。但目前对 MSC 与造血调控之间的关系所知甚少。

在本研究中观察到,脐带血造血前体细胞体外扩增时,CK + MSC 组的扩增效率要明显高于单纯 CK 组。随培养时间延长,扩增的细胞数逐渐增加,从培养第 3 周开始,细胞增加的速度明显加快,到第 4 周时,CK + MSC 组的 MNC 扩增 108 倍,而 CK 组只有 7.8 倍。仅用扩增的细胞数来评价扩增的效果显然是不够的,因为经体外扩增后,部分造血前体细胞可能会分化成熟,丧失了克隆形成能力。因此,本实验中采用集落培养方法,检测经体外扩增培养后,集落形成细胞(CFC,为 BFU - E + CFU - E + CFU - GM + HPP - CFC 的总和)增加的情况。结果显示,随体外扩增时间延长,CFC 数量增加,到第 3 周时达高峰,CK + MSC 组扩增的 CFC 数要明显高于 CK 组。上述结果表明,基于 MSC 的体外扩增体系能更有效地扩增脐带血造血前体细胞。CK 组和 CK + MSC 组,体外扩增至第 4 周时,CFC 数量迅速降低,说明在第 4 周时,尽管 MNC 数量继续增加,但 CFC 数已开始迅速下降,扩增的细胞质量不佳,其中包含有大量的终末分化细胞。此外,通过对单位细胞(10^4 个 MNC)中的 CFC 进行分析,结果表明,扩增 1 周后每 10^4 个 MNC 中的 CFC 数到达高峰,CK + MSC 组要明显优于 CK 组,但从第 2 周开始,每 10^4 个 MNC 中的 CFC 数呈迅速下降趋势,到第 4 周时已降至低于扩增前水平。以上结果表明,脐带血造血前体细胞在体外扩增时,同时出现分化倾向。

高增殖潜能集落形成细胞(HPP - CFC)是公认的最早期造血祖细胞之一,目前常用来体外检测人类的 HSC。研究造血细胞体外形成及扩增 HPP - CFC 的能力,是评价体外扩增造血细胞质量的最佳指标之一。本研究中,观察了造血细胞体外扩增培养后形成 HPP - CFC 的能力。结果表明,体外扩增 1 周后产生的 HPP - CFC 数最多,此后迅速降低,到第 3 周时已为 0,其中 CK + MSC 组要比 CK 组扩增效率高约 1 倍。上述结果表明,基于 MSC 的扩增体系能更有效地扩增原始的造血前体细胞。HPP - CFC 的扩增发生在体外培养的早期,提示经体外扩增后,造

血前体细胞会迅速出现分化,故在体外扩增造血细胞时,时间不宜过长。

为研究不同系造血前体细胞在 MSC 微环境中的增殖和分化特性,本研究分别对红系 CFC(CFU - E + BFU - E)和粒单系 CFC(CFU - GM)进行分析。结果发现红系 CFC 的增殖特性与 HPP - CFC 相似,扩增 1 周后迅速达到高峰,CK + MSC 组的扩增效率要明显优于 CK 组,表明 MSC 微环境同样有利于红系造血前体细胞的扩增。此后红系 CFC 数量迅速下降,第 2 周时为 0。在 CK 组和 CK + MSC 组观察到,CFU - GM 在体外扩增过程中逐渐增高,第 3 周时到达高峰,从第 4 周开始出现回落,CK + MSC 组的扩增效果明显优于 CK 组。说明基于 MSC 的扩增体系,也有利于粒单系造血前体细胞的扩增,粒单系造血前体细胞在体外维持扩增的时间比红系更长。

与单纯细胞因子扩增体系相比,本研究建立的基于 MSC 的体外扩增体系能更有效地扩增脐带血造血前体细胞(包括原始阶段的造血前体细胞和红系、粒单系造血祖细胞);同时基于本研究的实验数据,我们认为体外扩增时间不宜过长,以免大量造血前体细胞分化,影响扩增质量。

[参 考 文 献]

- [1] Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 996(5): 235 - 244.
- [2] Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation[J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7(6): 358 - 363.
- [3] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(7): 3908 - 3913.
- [4] Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow - derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood - derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice[J]. Exp Hematol, 2003, 31(10): 881 - 889.
- [5] Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of *in vitro* expanded Stro - 1⁻ or Stro - 1⁺ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment [J]. Blood, 2004, 103(9): 3313 - 3319.
- [6] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment[J]. Blood, 2006, 107(5): 1878 - 1887.