

人脐带间充质干细胞对脐血 CD34⁺ 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内造血重建的影响

郝 牧¹, 漆佩静¹, 李 刚¹, 孟恒星², 徐 燕¹,
李长虹¹, 王亚非¹, 邱录贵^{1,2}

¹中国医学科学院 北京协和医学院 血液学研究所 血液病医院实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

²协和干细胞基因工程有限公司, 天津 300384

通信作者: 邱录贵 电话: 022-23909172, 电子邮件: drqiu99@medmail.com.cn

摘要: **目的** 探讨人脐带间充质干细胞对脐血 CD34⁺ 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内造血重建的影响。**方法** 将 3.5×10^5 个脐血 CD34⁺ 细胞单独 (单移植组) 或与 5.0×10^6 个人脐带间充质干细胞共同 (共移植组) 输入经 ¹³⁷Cs 3.0Gy 照射后的 NOD/SCID 小鼠体内, 观察移植后 6 周内小鼠外周血象的变化情况。于移植后第 6 周处死小鼠, 采用流式细胞术检测小鼠骨髓、脾脏及外周血人源细胞 (hCD45⁺) 含量, 并分别检测小鼠骨髓中人源淋巴系 (CD3/CD19)、粒系 (CD33)、单核系 (CD14)、血小板 (CD61)、红系 (CD235a) 等各系血细胞比例, 比较间充质干细胞共移植对 CD34⁺ 细胞植入率的影响。**结果** 移植后 3 周, 两组小鼠外周血象开始有不同程度恢复; 移植后 6 周, 共移植组外周血白细胞和血小板计数均已达高峰, 明显高于单移植组 ($P < 0.05$), 两组小鼠的红细胞计数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。移植后 6 周, 共移植组骨髓及外周血中人源细胞 hCD45⁺ CD34⁺ 比例分别为 $(42.66 \pm 2.57)\%$ 和 $(4.74 \pm 1.02)\%$, 明显高于单移植组的 $(25.27 \pm 1.67)\%$ 和 $(1.19 \pm 0.54)\%$ ($P = 0.006$)。移植后 6 周, 共移植组小鼠骨髓内的 CD19⁺、CD33⁺、CD14⁺、CD61⁺ 和 CD235a⁺ 细胞比例均明显高于单移植组 ($P < 0.05$), CD3⁺ T 淋巴细胞比例明显低于单移植组 ($P = 0.003$); CD19⁺ B 淋巴细胞得到优势扩增, 明显高于其他各系血细胞比例 ($P < 0.05$)。**结论** 脐带间充质干细胞与脐血 CD34⁺ 细胞共移植可促进造血干细胞的植入, 缩短 CD34⁺ 细胞移植后造血恢复时间。

关键词: 人脐带间充质干细胞; CD34⁺ 细胞; 造血重建; 造血干细胞移植

中图分类号: R329.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2010)01-0071-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.01.017

Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on the CD34⁺ Cells Transplantation in NOD/SCID Mice

HAO Mu¹, QI Pei-jing¹, LI Gang¹, MENG Heng-xing², XU Yan¹,
LI Chang-hong¹, WANG Ya-fei¹, QIU Lu-gui¹

¹State key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital,
CAMS and PUMC, Tianjin 300020, China

²Union Stem cell & Gene Engineering Co. Ltd, Tianjin 300384, China

Corresponding author: QIU Lu-gui Tel: 022-23909172, E-mail: drqiu99@medmail.com.cn

ABSTRACT: Objective To study the effect of human umbilical blood (UB) mesenchymal stem cells (MSC) on the CD34⁺ cells transplantation in NOD/SCID Mice. **Methods** Umbilical blood CD34⁺ cells (3.5×10^5 cells) alone or combined with umbilical cord MSC cells were transplanted into NOD/SCID mice that had been irradiated with ¹³⁷Cs (3.0Gy) before transplantation. Changes in peripheral blood cells within 6 post-transplantation weeks were detected. The mice were sacrificed 6 weeks after transplantation. The human hematopoietic cells (hCD45⁺) and multi-lineage engraftment cells (CD3/CD19, CD33, CD14, CD61, and CD235a) in NOD/SCID recipients' bone marrow, spleen, and peripheral blood were analyzed by flow cytometry. **Results** In the 3rd post-transplantation week, white blood cells (WBC), platelets (PLT), and red blood cells (RBC) began to increase in both two groups. In the 6th post-transplantation week, WBC and PLT counts in CD34⁺ + MSC group reached peak levels and were significantly higher than CD34⁺ alone group ($P < 0.05$), while RBC level was not significantly different between these two groups ($P > 0.05$). hCD45⁺ cell levels in bone marrow and peripheral blood were (42.66 ± 2.57)% and (4.74 ± 1.02)% in CD34⁺ + MSC group, which were significantly higher than those in CD34⁺ alone group [(25.27 ± 1.67)% and (1.19 ± 0.54)% , respectively, $P = 0.006$]. Also in the 6th post-transplantation week, the proportions of CD19⁺, CD33⁺, CD14⁺, CD61⁺, and CD235a⁺ in CD34⁺ + MSC group were significantly higher than those in CD34⁺ alone group ($P < 0.05$), while the proportion of CD3⁺ T lymphocyte in CD34⁺ + MSC group was significantly lower than that in CD34⁺ alone group ($P = 0.003$). The amplification of CD19⁺ B lymphocyte was significantly higher than other blood cell lineages ($P < 0.05$). **Conclusion** The co-transplantation of MSC cells and CD34⁺ cells can promote hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic recovery *in vivo*.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; CD34⁺ cell; hematopoietic recovery *in vivo*; hematopoietic stem cells transplantation

Acta Acad Med Sin, 2010, 32(1):71-75

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 是骨髓基质的前体细胞,也是造血微环境的重要组成部分,对血细胞生成、发育具有重要的支持和调节作用,并可下调免疫反应,减轻移植物抗宿主病的发生 (graft versus host disease, GVHD)^[1]。脐血是造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 又一来源,由于其具有来源丰富、移植后 GVHD 发生率低、对供者无不良影响等优点,多数学者认为无关供者的脐血移植 (umbilical cord blood transplantation, UCBT) 具有与骨髓造血干细胞移植 (bone marrow transplantation, BMT) 相同甚至更好的应用和发展前景。UCBT 的主要缺点是干/祖细胞数量不足,可导致移植后的造血重建延迟乃至植入失败。本研究将 MSC 与脐血 CD34⁺ 细胞共同移植,观察了移植后 MSC 对 CD34⁺ 细胞体内造血重建、植入效率的影响,以期 MSC 与脐血 CD34⁺ 细胞共移植的临床研究提供实验依据。

材料和方法

主要仪器和试剂 淋巴细胞分离液 (密度:

1.077 g/L, 天津灏洋生物公司), 流式细胞仪 (FACS Calibur 型, 美国 BD 公司), DF-12 培养液 (美国 Gibco 公司), CD34⁺ 细胞磁珠分选试剂盒 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA), 小鼠抗人直标荧光抗体 CD45、CD34、CD3、CD19、CD14、CD33、CD61、CD235a 等 (美国 BD 公司)。

脐带 MSC 分离和培养 健康足月顺产胎儿脐带标本 (天津市妇产中心医院提供), 参考本室已建立的方法分离培养 MSC, 具体如下: 用 D-Hanks' 液冲洗后将脐带剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块, 用 0.1% II 型胶原酶和 0.25% 胰酶各消化 30 min, 将消化下的细胞接种于 2% DF-12 培养液中^[2]。

MSC 免疫表型的鉴定 MSC 消化后制备单细胞悬液, 分别加入小鼠抗人 PE、FITC 标记的单抗 CD73、CD105、HLA-DR、CD31、vWF、KDR、CD34、CD45、CD235a 及同型对照 IgG1 (美国 BD 公司), 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤后用 10 g/L 多聚甲醛固定, 流式细胞仪 (flow cytometry, FACS) 检测分析。

人脐血 CD34⁺ 细胞分离 脐血标本取自健康足

月妊娠产妇（天津市妇产医院提供），枸橼酸钠抗凝，采集后 4 h 内新鲜分离。用淋巴细胞分离液分离得到的单个核细胞（mononuclear cell, MNC）。按 CD34⁺ 细胞分选试剂盒说明书分离纯化 CD34⁺ 细胞。台盼兰染色测定细胞活力，并调整细胞数备用。

NOD/SCID 小鼠饲养及移植处理 雄性 NOD/SCID 小鼠 15 只，购自中国医学科学院实验动物研究所，SPF 级，鼠龄 7 周，饲养于无菌层流环境，无菌饮食、饮水。移植前 4 h 将小鼠置于无菌透气的纸盒中，外罩消毒巾，¹³⁷Cs 照射 3.0 Gy。之后随机分为 3 组：（1）单移植组（*n* = 6）：经尾静脉输注 3.5×10^5 个 CD34⁺ 细胞；（2）共移植组（*n* = 6）：经尾静脉缓慢输注 3.5×10^5 个 CD34⁺ 细胞和 5.0×10^6 个 MSC；（3）空白对照组（*n* = 3）：照射后不作细胞移植。每份细胞标本均调整为 400 μl。

小鼠一般状况及外周血常规测定 移植后每天观察小鼠一般状况，每周检测小鼠体重，记录小鼠存活情况，并计数小鼠外周血白细胞、红细胞、

血小板，观察外周血象恢复情况。

CD34⁺ 细胞植入率及各系血细胞比例测定 移植后第 6 周，采用 FACS 检测各组小鼠骨髓、脾脏及外周血中 hCD45⁺ 表达情况，并检测小鼠骨髓人源淋巴系 CD3/CD19、单核系 CD14、粒系 CD33、血小板 CD61、红系 CD235a 等各系血细胞比例。

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差表示，多样本均数间比较采用方差分析，同一样本前后均数的比较采用配对 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

表型鉴定结果 FACS 检测脐带来源 MSC 免疫表型结果显示，MSC 不表达造血细胞标记 CD45、CD34、HLA-DR、CD235a 和内皮细胞标记 CD31、KDR、vWF；常用的人 MSC 标记 CD73、CD105 高表达，分别为 $(96.59 \pm 2.25)\%$ 和 $(98.35 \pm 2.16)\%$ （图 1）。

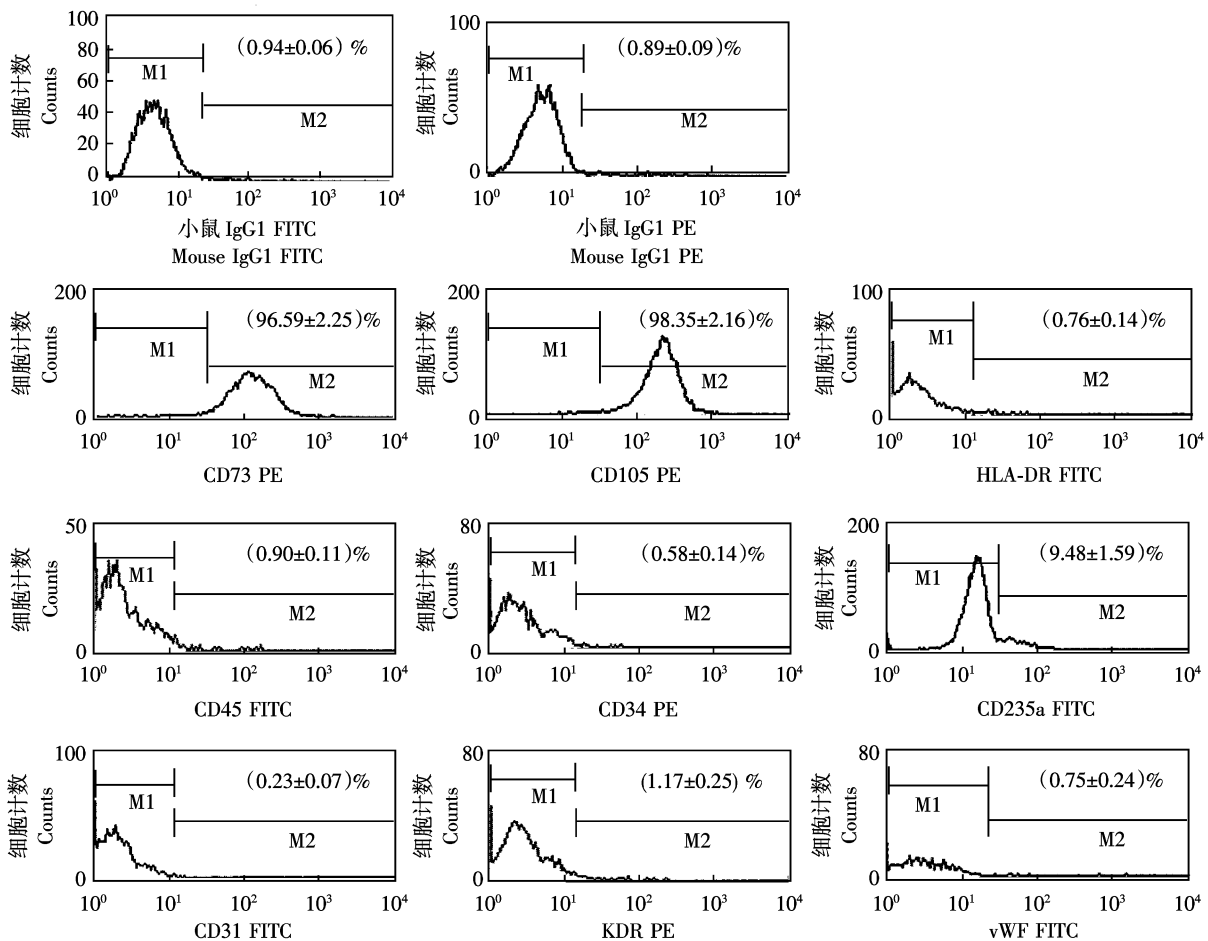


图 1 间充质干细胞免疫表型鉴定

Fig 1 Identification of the immunotypes of mesenchymal stem cells

CD34⁺ 细胞纯度 采集脐血 98 ml, 分离脐血 MNC 计数为 1.1×10^8 , 经 CD34⁺ 磁珠标记分离后, 收集得到的阳性细胞经台盼兰染色测定细胞活力大于 95%, CD34⁺ 细胞数为 6.4×10^6 , FACS 检测 CD34⁺ 细胞纯度为 99.54% (图 2)。

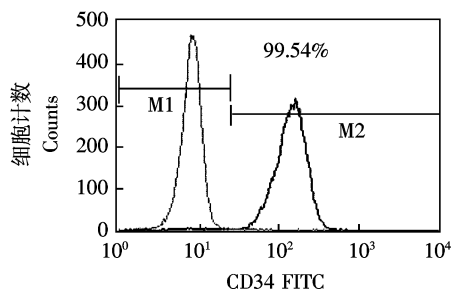


图 2 流式细胞术检测脐纯度血分选得到 CD34⁺ 细胞
Fig 2 Flow cytometry of the selected CD34⁺ cells

小鼠存活情况 单移植组和共移植组小鼠移植后一般状况均良好, 体重无明显减轻, 活动自如, 小鼠存活时间均达到 6 周。空白对照组 3 只小鼠在照射后 2~3 周先后死亡。

外周血白细胞、红细胞、血小板计数 移植后 3 周内, 单移植组和共移植组小鼠外周血白细胞、红细胞和血小板均维持在较低水平。之后, 两组小鼠外周血白细胞和血小板计数均有不同程度增加, 共移植组较单移植组增加更为明显, 移植后 6 周时达到高峰, 共移植组明显高于单移植组 ($P < 0.05$); 但两组红细胞计数差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

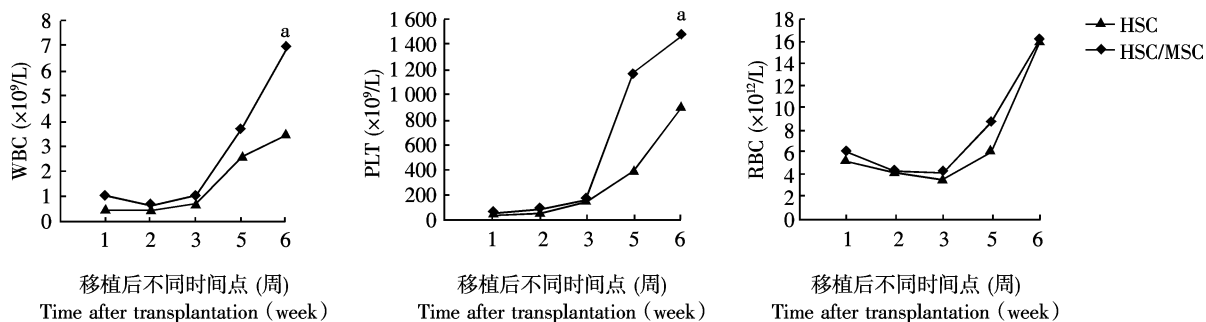
CD34⁺ 细胞植入后小鼠体内细胞 hCD45⁺ 检测结果 移植后第 6 周共移植组小鼠骨髓、外周血和

脾脏细胞 hCD45⁺ 比例分别为 $(42.66 \pm 2.57)\%$ 、 $(4.74 \pm 1.02)\%$ 和 $(4.63 \pm 1.19)\%$, 单移植组分别为 $(25.27 \pm 1.67)\%$ 、 $(1.19 \pm 0.54)\%$ 和 $(7.36 \pm 0.41)\%$; 其中共移植组的骨髓和外周血细胞 hCD45⁺ 比例明显高于单移植组 ($P = 0.006$), 但脾脏细胞 hCD45⁺ 比例两组间差异尚无统计学意义 ($P = 0.057$)。

骨髓各系血细胞比例 移植后 6 周, 共移植组小鼠骨髓中 hCD45⁺ 群的 CD3⁺、CD19⁺、CD33⁺、CD14⁺、CD61⁺ 和 CD235a⁺ 细胞比例分别为 $(0.99 \pm 0.05)\%$ 、 $(54.97 \pm 2.33)\%$ 、 $(17.91 \pm 0.34)\%$ 、 $(11.19 \pm 0.07)\%$ 、 $(3.30 \pm 0.06)\%$ 和 $(1.86 \pm 0.06)\%$, 单移植组分别为 $(4.46 \pm 0.27)\%$ 、 $(48.05 \pm 1.53)\%$ 、 $(8.34 \pm 0.26)\%$ 、 $(3.24 \pm 0.14)\%$ 、 $(0.44 \pm 0.03)\%$ 和 $(0.36 \pm 0.04)\%$; 共移植组小鼠的 CD19⁺、CD33⁺、CD14⁺、CD61⁺ 和 CD235a⁺ 细胞比例明显高于单移植组 ($P < 0.05$), CD3⁺ 细胞比例明显低于单移植组 ($P = 0.003$); hCD45⁺ CD19⁺ 细胞比例在两组中均显示出优势扩增, 与其他细胞间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

HSC 移植是治疗白血病和淋巴瘤等恶性肿瘤、代谢性疾病、自身免疫性疾病及先天免疫缺陷等严重危害人类健康疾病的最有效治疗方法之一^[3]。脐带血是除骨髓和外周血干细胞之外另一种重要的 HSC 来源, 但由于采集的脐血量有限, 所含造血干细胞少, 限制了脐血移植在成人的发展。脐血 HSC



WBC: 白细胞; PLT: 血小板; RBC: 红细胞; HSC: 造血干细胞; MSC: 间充质干细胞; 与单移植组比较, $^*P < 0.05$

WBC: white blood cell; PLT: platelet; RBC: red blood cell; HSC: hematopoietic stem cell; MSC: mesenchymal stem cell; $^*P < 0.05$ compared with HSC group

图 3 移植后 6 周外周血象检测结果

Fig 3 Routine analysis of mice peripheral blood cells from one to six weeks after transplantation

的体外扩增及优化脐血移植方案是解决这一难题的重要途径^[4]。移植后 HSC 的植入和造血恢复与骨髓微环境密切相关,作为骨髓微环境重要成分的 MSC 对血细胞生长、发育及免疫细胞的功能发挥有重要的支持和调节作用。MSC 上述生物学特性提示,其可促进 HSC 的植入和机体的造血恢复。

本课题组前期研究结果显示,将 MSC 细胞与 CD34⁺细胞在体外培养,能同时使造血干、祖细胞得到明显扩增并维持造血干、祖细胞的生物学特性^[2]。此外,MSC 与 CD34⁺细胞体外共培养能够维持 CD34⁺细胞表面 CD11a、CD31、CD62L 和 CD49e 等黏附分子的持续表达,有利于 CD34⁺向骨髓、脾脏等造血器官的归巢^[5]。在此基础上,为了探讨脐带 MSC 细胞对脐血 HSC 移植的促进作用,本研究将 CD34⁺细胞单独或与 MSC 细胞共输入 NOD/SCID 小鼠体内,分析了 MSC 细胞对 CD34⁺移植造血重建的影响。结果显示,移植后第 3 周起两组小鼠外周血象开始恢复,其中白细胞、血小板恢复时间较快,移植后 6 周时共移植组白细胞、血小板计数达到高峰,且明显高于 CD34⁺单移植组。红细胞恢复速度较慢,且两组间差异不明显。提示 MSC 共移植可促进移植后白细胞和血小板的恢复,缩短恢复时间。本研究还同时设立了空白对照组,结果该组小鼠均于照射后 2 周死亡。

CD45⁺为人源造血细胞表面特有标记,可以区别于鼠源造血细胞,因此 CD45⁺细胞含量可以作为移植后 HSC 植入的检测指标。本研究发现,移植后第 6 周,共移植组小鼠骨髓和外周血细胞 hCD45⁺比例分别为 (42.66 ± 2.57)% 和 (4.74 ± 1.02)%,明显高于单移植组的 (25.27 ± 1.67)% 和 (1.19 ± 0.54)%。进一步检测骨髓中 hCD45⁺细胞群各系血细胞比例后发现,除 CD3⁺(T 淋巴细胞)外,共移植组 CD19⁺(B 淋巴细胞)、CD33⁺(粒细胞系)、CD14⁺(单核细胞系)、CD61⁺(血小板)、CD235a⁺(红细胞系)等各系血细胞比例均明显高于单移植组。hCD45⁺CD19⁺B 淋巴细胞比例在两组

中均显示出明显增殖优势,可达 50% ~ 60%。但是共移植组骨髓 hCD45⁺CD3⁺(T 细胞)比例一直维持在较低水平,明显低于单移植组。该结果提示,MSC 与 CD34⁺共移植能够促进骨髓各系造血细胞的恢复,同时还可抑制 CD3⁺T 细胞增殖,有利于减轻或抑制移植后的 GVHD 的发生。

综上所述,在脐血 CD34⁺HSC 数量较低的情况下,同时移植脐带 MSC 能够促进 CD34⁺细胞在骨髓的早期植入,缩短移植后造血恢复时间,提高植入率。MSC 共移植并未影响 CD34⁺向各系血细胞分化的趋势,脐带 MSC 能够促进 CD34⁺HSC 较早地向各系血细胞分化发育,同时抑制向 CD3⁺(T 细胞)方向的分化。本研究结果证实脐带 MSC 细胞与脐血 CD34⁺细胞共移植能促进体内造血植入和重建,提高移植成功率,但 MSC 能否促进 CD34⁺细胞长期植入还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 郝牧, 李斯丹, 吴瞳, 等. 间充质干细胞对脐血 CD34⁺细胞扩增及其细胞特性变化的影响 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(6):1403-1407.
- [3] Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(4):314-317.
- [4] Mukhopadhyay A, Madhusudhan T, Kumar R. Hematopoietic stem cells: clinical requirements and developments in *ex vivo* culture [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 86: 215-253.
- [5] 郝牧, 孟恒星, 李刚, 等. 脐带间充质干细胞对 CD34⁺细胞在 NOD/SCID 小鼠体内归巢的影响及其机制研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(2):87-93.

(收稿日期: 2009-03-27)