文章编号:1000-5404(2006)22-2219-04

论著

血管活性肠肽对人脐血 CD34$^+$ 细胞增殖分化的影响

王　利[1],王春晖[2],黄明慧[2],唐承薇[2]　([1]重庆医科大学附属第一医院血液科,重庆 400016;[2]四川大学华西医院人类疾病生物治疗教育部重点实验室人类疾病相关多肽研究室,成都 610041)

提　要: 目的　探索血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)对造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)增殖分化的影响及其可能机制。**方法**　采用免疫磁珠分选技术纯化人脐血 CD34$^+$ 细胞;VIP 孵育人 CD34$^+$ 细胞后,通过体外集落形成、扩增培养了解细胞增殖;ELISA 测定细胞内外 TNF-α、TGF-β 水平;流式细胞术检测细胞表面 CD13、CD14、CD71、CD41、CD19、CD4/CD8、CD33、CD34 等抗原;生物分子相互作用系统检测人 CD34$^+$ 细胞 VIP 受体;RT-PCR 分析其受体亚型。**结果**　在 $1\times10^{-7}\sim1\times10^{-12}$ mol/L 浓度范围内,VIP 抑制人 CD34$^+$ 细胞集落形成及扩增倍数,其细胞集落形成抑制与 VIP 浓度呈正相关($r=0.925$, $P<0.01$)。VIP(1×10^{-8} mol/L)作用于人 CD34$^+$ 细胞 14 d 后,粒系(CD13$^+$ 蓝色)及单核系(CD14$^+$)细胞百分比均明显下降($P<0.05$)。VIP 增加人 CD34$^+$ 细胞的 CD34 抗原表达($P<0.05$)。VIP 作用后 CD34$^+$ 细胞内、外 TNF-α 及 TGF-β_1 浓度显著增加($P<0.05$);人脐血 CD34$^+$ 细胞表达 VIP I 型受体。**结论**　VIP 通过人脐血 CD34$^+$ 细胞上 VIP I 型受体介导,提高造血抑制因子 TNF-α、TGF-β 水平,抑制人 CD34$^+$ 细胞的增殖、维持其干细胞特性,阻止其向粒、单系细胞分化。

关键词: 造血干细胞;血管活性肠肽;造血抑制
中图法分类号: Q516;R329.28;R392.1　　**文献标识码**: A

Effect of vasoactive intestinal polypeptide on proliferation and differentiation of human CD34$^+$ cells derived from cord blood

WANG Li[1], WANG Chun-hui[2], HUANG Ming-hui[2], TANG Cheng-wei[2] ([1]Department of Hemotology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Division of Peptides Related with Human Diseases, Key Laboratory of Biotherapy of Human Diseases, Ministry of Education, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective　To investigate the effect and mechanisms of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells (HSC). **Methods**　Mononuclear cell (MNC) derived from human cord blood was isolated by Ficoll, Then MACS assay was used to purify human CD34$^+$ cells from MNC. After treated with VIP, colony forming unit (CFU) enumeration and amplification were done to assess the effect on proliferation of human CD34$^+$ cells. TNF-α and TGF-β in human CD34$^+$ cells or its supernatant were measured with ELISA. the antigens such as CD13, CD14, CD71, CD41, CD19, CD4/CD8, CD33, CD34 were identified by flow cytometry (FCM). Biomolecular interaction analysis and reverse transcriptation polymerase chain reaction were used to quantify receptor for VIP(VIPR) and detect its subtype. **Results**　VIP at concentration of 1×10^{-12} to 1×10^{-7} mol/L inhibited the proliferation of human CD34$^+$ cells. The inhibition of CFU forming bore a positive relation with the concentration of VIP ($r=0.925$, $P<0.01$). VIP(1×10^{-8} mol/L) decreased the ratio of granulocyte (CD13$^+$) and monocytes(CD14$^+$) in human CD34$^+$ cell population ($P<0.05$). Expression of CD34 in human CD34$^+$ cells was up-regulated by VIP ($P<0.05$). The concentration of TNF-α or TGF-β_1 of human CD34$^+$ cells treated with VIP was increased as compared to control group ($P<0.05$). Human CD34$^+$ cells expressed receptor for VIPR-1. **Conclusion**　Mediated by VIPR-1 in human CD34$^+$ cells, VIP inhibited the proliferation of human CD34$^+$ cells due to increasing the intracellular

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(39725012)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (39725012)
作者简介:王　利(1973-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事白血病的基础与临床方面的研究。电话:(023)89012933
通讯作者:唐承薇, E-mail: cwtang57@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-12-05;**修回日期**:2006-04-05

concentrations of TNF-α and TGF-β, the inhibitive cytokines for hematopoiesis. VIP tended to keep characteristics of human $CD34^+$ cells and inhibit the differentiation of human $CD34^+$ cells to granulocyte-monocytes.

Key words: hematopoietic stem cells; vasoactive intestinal polypeptide; inhibitive cytokines for hematopoiesis

人体从胚胎到成年,造血功能先后由6个器官承担,肝脏为其中之一。人胚6周,造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)从卵黄囊迁入肝,即进入了肝脏造血期,至胚胎6个月肝脏造血逐渐减弱,到出生时由骨髓造血所取代。胃肠道内分泌细胞分泌的血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)具有多种生物学功能,由于大量VIP随门静脉血流进入肝脏,使富含VIP的肝脏为造血干细胞的发育提供了独特的造血微环境,故此VIP可能对造血干细胞的发育继而对肝脏造血有着重要影响。CD34抗原是造血干/祖细胞最重要的抗原标记,本研究以人脐血$CD34^+$细胞作为研究对象,探讨VIP对其增殖、分化的可能影响。

1 材料与方法

1.1 标本

健康孕妇足月顺产儿的脐血标本30份,分别来自四川大学妇产儿童医院、成都市妇幼保健院产科。30份脐血标本平均采集78 ml/例。

1.2 试剂

VIP-28(Saxon Biochemicals GmbH公司产品);rhSCF、rh-FLT3-L、IL-3(Pepro Tech公司产品);StemSpan无血清培养基、甲基纤维素培养基(StemCell Technologies公司产品);抗人CD34、CD33、CD38、CD13、CD14、CD71、CD41、CD19、CD4、CD8单克隆抗体(BD公司产品);TNF-α、TGF-β ELISA KIT(DSL公司产品);RT-PCR试剂(Fermentas);CM-5生物芯片(Amersham Biosciences)。

1.3 脐血单个核细胞(MNC)分离及人脐血$CD34^+$细胞分离纯化及鉴定

无菌条件下,取足月妊娠、正常分娩的新鲜脐血,所有标本在6 h之内分离。按1∶1体积比加入Hanks液稀释,以Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度离心,3 000 r/min离心25 min,从梯度界面吸取MNC并以PBS洗2次,细胞计数后备用。

应用MiniMACS免疫磁珠分选系统(Miltenyi Biotec Ltd)分离$CD34^+$细胞,过分选柱2次以提高纯度,具体方法参照说明书。纯化的$CD34^+$细胞计数及抗体标记后上流式细胞仪检测纯度。

1.4 $CD34^+$细胞体外扩增培养

1.4.1 $CD34^+$细胞集落培养 将分离纯化所得的$CD34^+$细胞稀释于含2%胎牛血清的RPMI1640中,分组加入不同浓度的VIP,调节细胞密度为0.25×10^5/ml,将细胞液按1∶10体积比与甲基纤维素培养基Methocult GF H4434充分混合后,接种于24孔板中,每孔0.5 ml,每孔1.25×10^4个细胞。在37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养14 d,于第7、10、14天计数集落。分别做6例不同的标本,每例标本做2~3复孔。

1.4.2 $CD34^+$细胞液体培养 将$CD34^+$细胞稀释于无血清培养基,调节细胞密度为1×10^4/ml,分组加入不同浓度的VIP,再加入细胞因子50 ng/ml rhSCF、50 ng/ml rhflt3-L、10 ng/ml rhIL-3、50 ng/ml rhGM-CSF、3 U/ml rhEPO,培养于24孔板中。在37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养,于培养第7、10、14天分别取少量细胞计数,计算扩增倍数。分别做6例不同的标本,每例标本2~3个复孔。

1.5 VIP对$CD34^+$细胞各种表面标志的影响

将$CD34^+$细胞稀释于无血清培养基,调节细胞密度为1×10^4/ml,加入VIP,孵育浓度为1×10^{-8} mol/L,容量为1 ml。在37 ℃、5% CO_2饱和湿度培养箱中培养,分别孵育7 d和14 d,取出细胞离心洗涤后分别加入抗人CD34、CD33、CD38、CD13、CD14、CD71、CD41、CD19、CD4、CD8等单克隆荧光抗体,用流式细胞仪读取阳性细胞比例。

1.6 VIP对$CD34^+$细胞内、外液TNF-α及TGF-β含量的影响

在$CD34^+$细胞液体培养体系(1 ml,1×10^4细胞)中加入VIP(10^{-8}mol/L),培养7 d后离心收集液体培养上清;将离心沉淀的细胞反复冻融数次离心后,作为细胞内液。按照ELISA试剂盒说明书测定细胞内及上清液中的TNF-α和TGF-β浓度。

1.7 RT-PCR检测$CD34^+$细胞VIP受体亚型

取人脐血MNC及$CD34^+$细胞,用Trizol试剂提取出总RNA,经核酸蛋白定量仪对RNA定量,$D(260)/D(280)$值>1.6的样本进行下一步实验。采用常规两步法进行反应。设计VIP受体引物[1]为:VIPR Ⅰ上游5′-CTTCTGGTCGCCACAGCTATCCTG-3′,下游5′-ACTGCTGTCACTCTTCCTGATATC-3′;VIPR Ⅱ上游5′-CGTCACGGTGCCCTGCCCAAAAGT-3′,下游5′-GCCCCTCACAGCAGCCAGAAGA-3′;GAPDH引物[2]上游5′-GGTGAAGTTCGGAGTCAACGGA-3′,下游5′-GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3′。PCR反应条件为:94 ℃ 1 min,60 ℃ 2 min,72 ℃ 3 min,40个循环。扩增产物用15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 生物分子相互作用系统(Biacore,Amersham Biosciences Ltd)检测$CD34^+$细胞上的VIP受体量

提取人脐血$CD34^+$细胞的总蛋白备用。用氨基耦联法将VIP-28多肽纯品1 mg/ml注入CM-5空白芯片,使芯片表面上的结合位点最大限度与VIP-28结合,经上样孔分别加入各个标本总蛋白液100 μl,空白对照为蛋白提取缓冲液,按结合—结合/解离—洗脱—表面再生过程完成检测。用BIAevaluation软件(Amersham Biosciences Ltd)分析总结合和非特异性结合两条曲线,特异性结合=总结合-非特异性结合。各标本受体结合量以RU(resonance units)/μg蛋白为单位。

1.9 统计学处理

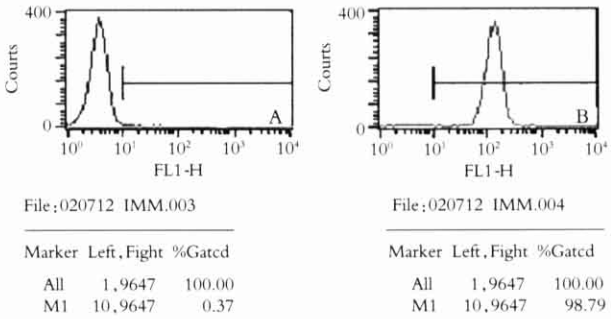
结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件组间比较用成

组 t 检验，多组比较用方差分析，相关分析用直线回归与相关分析。

2　结果

2.1　CD34⁺ 细胞纯化与鉴定

经 2 次过分选柱，每个标本收集 CD34⁺ 细胞数范围为 $5\times10^4\sim5\times10^5$，0.4% 台盼蓝染色计数活细胞率均 >96%。流式细胞仪检测 2 次分选后 CD34⁺ 细胞纯度在 98% 以上，见图 1。



A：对照；B：人脐血 CD34⁺ 细胞

图 1　人脐血 CD34⁺ 细胞纯度

2.2　VIP 对人 CD34⁺ 细胞集落形成的影响

在 $1\times10^{-12}\sim1\times10^{-7}$ mol/L 浓度范围内，VIP 抑制 CD34⁺ 细胞集落形成，在培养第 7 天抑制作用已明显，随着浓度增加，抑制作用亦加强（$r=0.925$，$P<0.01$），在 10^{-8}mol/L 抑制作用最强，各浓度组与对照组相比较均有显著抑制（$t>4.805$，$P<0.05$）。在第 7 天及第 10 天，VIP 均显著抑制 HSC 集落形成。而第 14 天，抑制率减弱（图 2）。

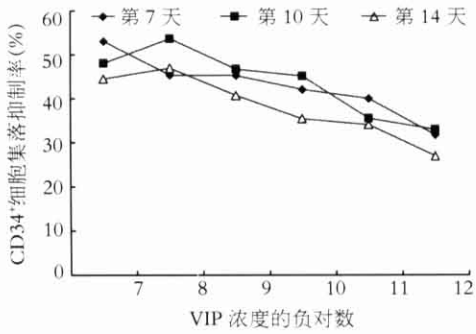


图 2　VIP 抑制 CD34⁺ 细胞集落形成

2.3　VIP 对人 CD34⁺ 细胞增殖的影响

液体培养体系中，CD34⁺ 细胞显示出较强的扩增潜能。在 VIP（10^{-8}mol/L）作用下，其增殖能力较对照组显著降低。VIP 作用 7、10、14 d 时，CD34⁺ 细胞扩增倍数分别为（11.78 ± 4.39）、（16.71 ± 2.98）、（21.69 ± 3.28），均较对照组［（20.13 ± 3.32）、（25.64 ± 3.81）、（28.33 ± 2.61）］的扩增倍数明显降低（$P<0.05$）。

2.4　VIP 对人 CD34⁺ 细胞向各系分化的影响

VIP（10^{-8} mol/L）作用于 CD34⁺ 细胞 14 d 后，粒系（CD13⁺）及单核系（CD14⁺）细胞百分比均明显下降（$P<0.05$）。但作用 7 d 时，仅 CD14⁺ 细胞百分比明显下降（$P<0.05$），CD13⁺ 的细胞百分比无明显改变（$P>0.05$）（表 1）。CD34⁺ 细胞在 VIP（10^{-8}mol/L）作用的第 7 天和第 14 天，红系（CD71⁺）、巨核（CD41⁺）、B 淋巴（CD19⁺）、T 淋巴（CD4⁺/CD8⁺）、祖（CD33⁺）细胞等百分比均无显著改变（$P>0.05$）（表 1）。VIP 在第 7 天对 CD34⁺ 细胞的 CD34 表达有促进作用（$P<0.05$），但在第 14 天则没有显著改变（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　CD34⁺ 细胞上各种细胞分化抗原标志变化（%，$x\pm s$）

抗原	对照		血管活性肠肽	
	第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天
CD13	18.60 ± 3.21	93.35 ± 5.56	22.80 ± 2.67	80.33 ± 1.86[a]
CD14	13.80 ± 2.32	22.55 ± 3.74	8.20 ± 0.85[a]	15.15 ± 1.04[a]
CD71	82.80 ± 2.23	19.90 ± 1.16	79.55 ± 1.58	17.75 ± 1.56
CD41	1.80 ± 0.73	0.70 ± 0.54	1.10 ± 0.34	0.40 ± 0.41
CD19	0.90 ± 0.39	0	0	0
CD4/CD8	0.40 ± 0.45	0	0.70 ± 0.78	0
CD33	98.80 ± 0.52	0	98.70 ± 0.67	0
CD34	18.25 ± 0.48	2.30 ± 0.80	22.00 ± 1.08[a]	3.80 ± 0.63

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.5　VIP 对人 CD34⁺ 细胞内外液 TNF-α 及 TGF-β_1 的影响

VIP（10^{-8}mol/L）作用于 CD34⁺ 细胞 7 d 后，细胞内 TNF-α 及 TGF-β_1 浓度均较对照组明显升高，分别增加 50.70% 及 43.46%（$P<0.05$）；细胞外液 TNF-α 及 TGF-β_1 浓度也较对照组明显升高，分别增加 31.70% 及 42.64%（$P<0.05$），见表 2。

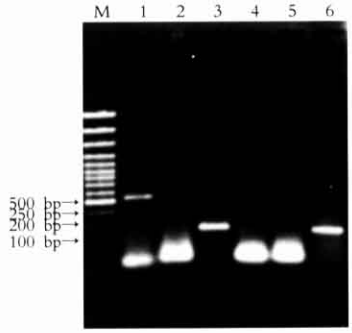
表 2　VIP 对 CD34⁺ 细胞内外液 TNF-α 及 TGF-β_1 浓度的影响（$n=3$，pg/ml）

组别	TNF-α 浓度		TGF-β_1 浓度	
	细胞内	细胞外	细胞内	细胞外
对照	247.59 ± 6.80	646.52 ± 4.78	168.41 ± 8.65	200.13 ± 3.24
VIP 组	373.11 ± 7.40[a]	851.48 ± 5.01[a]	241.60 ± 7.67[a]	285.47 ± 5.33[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.6　人 CD34⁺ 细胞表达 VIPR-1 mRNA

人脐血 MNC 及 CD34⁺ 细胞均表达 VIP-1 受体 mRNA，未见 VIP-2 受体 mRNA 表达，见图 3。



M：标准；1－3：MNC；4－6：CD34⁺ 细胞；1,4：VIPR-1；2,5：VIPR-2；3,6：GAPDH

图 3　人 CD34⁺ 细胞 VIPR-1 mRNA 结果

2.7 人 CD34$^+$ 细胞表达 VIP 受体

生物分子相互作用系统测得 CD34$^+$ 细胞对 VIP 的特异性结合 = (1 500.00 ± 61.50) RU/μg 蛋白,可以认为 CD34$^+$ 细胞表达有特异性 VIPR。

3 讨论

目前已知对造血有调节作用的细胞因子按其作用可分为促进造血和抑制造血两大类。已知抑制造血的细胞因子种类比较少,主要有转化生长因子 β(transforming growth factor, TGF-β)、血小板第Ⅳ因子等[3]。本研究观察到 VIP 体外抑制人 CD34$^+$ 细胞的增殖。显然,VIP 是一种新被认识的造血干/祖细胞增殖抑制剂。

TGF-β 是造血负调节因子,在其5个亚型中,TGF-β_1、-β_2、-β_3与造血发生有关[4]。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)是一种多功能细胞因子[5],在多数情况下抑制细胞生长[6]。本研究表明 CD34$^+$ 细胞本身有合成 TGF-β 及 TNF-α 的能力,这可能是造血干细胞增殖的重要负性调节因素。进一步实验表明,VIP 显著增加 CD34$^+$ 细胞内外 TGF-β 及 TNF-α 含量,提示 VIP 促使 CD34$^+$ 细胞合成 TGF-β 及 TNF-α,从而发挥二者的造血抑制作用。VIP 抑制人 CD34$^+$ 细胞增殖的现象虽然仅在体外实验中被观察到,但曾有学者报道,VIP 可抑制巨噬细胞产生促进造血干/祖细胞增殖分化的多种细胞因子。这些信息提示 VIP 在体内抑制人 CD34$^+$ 细胞增殖既可通过本研究所观察到的、直接促进造血抑制性因子 TGF-β 及 TNF-α 的合成,还可通过减少促进性因子等间接途径来实现。实际上 VIP 对造血干细胞增殖的影响是多方面的,最终的结果取决于诸方面的平衡。

胚胎期,肝脏红系造血占绝对优势、粒单系细胞数量少,这种现象虽已被观察到很久,但长期以来机制不明。根据本研究结果,我们推测,胚胎期由于 VIP 不影响造血干细胞向红系分化但却抑制其向粒单细胞分化,因此形成了上述肝脏造血的独特之处。VIP 抑制人 CD34$^+$ 细胞向粒、单核细胞分化的现象可能仅是造血干细胞分化过程中的早期事件,这一现象是否贯穿其全过程尚有待进一步研究。本研究观察到 VIP 作用后可使人 CD34$^+$ 细胞百分比较对照组升高。这一结果与 Antonawich 等[7]研究结果类似,他们研究发现 VIP 具有调控神经细胞凋亡及稳定神经干细胞的作用。在发育过程中,胚胎期肝脏 VIP 含量较低[8],有利于造血干细胞发育,这符合胚胎期肝脏是重要的造血器官。出生后,肝脏 VIP 含量增加,这一微环境对造血干细胞发育不利,抑制肝脏造血干细胞生长,逐渐促进了肝脏造血转移为骨髓造血。

VIP 受体有 VIP1 和 VIP2 两个亚型,都可与 VIP 结合而产生作用。与其他胃肠多肽受体类似,VIP 受体常因其微量、实验检测方法敏感性低而难以测得。本研究通过 RT-PCR 及生物分子相互作用系统分别从受体的 mRNA 及蛋白表达2个层面上首次确定人脐血 CD34$^+$ 细胞表达 VIP1 型受体。生物分子相互作用系统是基于表面等离子共振技术实时跟踪生物分子间的相互作用,由于其特异性和敏感性极高,该项技术是目前受体分子检测的最先进技术[9]。人脐血 CD34$^+$ 细胞表达 VIP Ⅰ型受体提示该细胞有接受 VIP 调控的物质基础,为探讨干细胞发育打开了新的思路。

慢性肝病或肝细胞急性损伤时,肝细胞表面的 VIP 受体数量大大减少,对 VIP 的降解能力降低,肝脏内及血循环 VIP 含量增加,这是否能导致造血微环境内 VIP 含量升高,从而影响成人造血干细胞的发育、分化及繁殖?尽管尚少见对造血微环境 VIP 含量的直接研究资料,但 VIP 通过与人 CD34$^+$ 细胞上相应受体结合所介导的抑制人 CD34$^+$ 细胞增殖、稳定干细胞特性的作用可能有助于进一步思考造血干细胞迁徙、急慢性肝病后造血功能的变化以及造血干细胞恶性增殖等疾病的发生机制。

参考文献:

[1] PARK S K, OLSON T A, ERCAL N, *et al*. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on human megakaryocytes and platelets [J]. Blood, 1996, 87(11): 4629-4635.

[2] SANFILIPPO L, LI C K, SETH R, *et al*. Bacteroides fragilis enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) by human colonic epithelial cells[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 119(3): 456-463.

[3] 吴克复, 饶 青. 造血干细胞调控因子[M]//韩忠朝. 造血干细胞理论与移植技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000: 17-35.

[4] FORTUNEL N O, HATZFELD A, HATZFELD J A. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis [J]. Blood, 2000, 96(6): 2022-2036.

[5] 查纪坤, 舒红兵. 肿瘤坏死因子信号传导的分子机理[J]. 中国科学(C辑), 2002, 32(1): 1-12.

[6] AGGARWAL B B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(9): 745-756.

[7] ANTONAWICH F J, SAID S I. Vasoactive intestinal peptide attenuates cytochrome c translocation, and apoptosis, in rat hippocampal stem cells[J]. Neurosci Lett, 2002, 325(3): 151-154.

[8] 王 利, 唐承薇, 王春晖, 等. 发育过程中肝脏血管活性肠肽及其受体量的变化[J]. 生理学报, 2005, 57(3): 379-383.

[9] NELSON R W, NEDELKOV D, TUBBS K A. Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1155-1163.

(编辑 汪勤俭)