DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.010
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1243-03

论著

人脐血CD34$^+$细胞体外DEXTER基质细胞培养的动态观察

张 曦,陈幸华,刘 林,彭贤贵,孔佩艳,刘 红,张 怡,高 蕾,钟永明,王庆余 (第三军医大学附属新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要:目的 动态观察人脐血CD34$^+$细胞DEXTER基质细胞培养的情况。方法 应用MACS磁珠分离系统分离脐带血CD34$^+$细胞,按照DEXTER法行脐血基质细胞培养,观察不同时间、不同细胞因子组合基质细胞的生长状态。结果 SCF及SCF+BFGF组合可促进基质细胞集落的生成,脐血基质细胞在生长情况、组成成分、细胞形态等方面与骨髓基质细胞有不同的生物学特性。结论 脐血CD34$^+$细胞在生长因子的辅助下能促进基质细胞集落的形成,有望成为新的基质细胞来源。

关键词:基质细胞;细胞因子;扩增;脐带血;CD34$^+$细胞
中图法分类号:R329.2$^+$4; R331.1$^+$4 文献标识码:A

Dynamic observation of the DEXTER culture of cord CD34$^+$ cells *in vitro*

ZHANG Xi, CHEN Xing-hua, LIU lin, PENG Xian-gui, KONG Pei-yan, LIU Hong, ZHANG Yi, GAO Lei, ZHONG Yong-ming, WANG Qing-yu (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe dynamically the DEXTER culture of cord CD34$^+$ cells *in vitro*. Methods CD34$^+$ cord cells were separated by MACS system from 9 fresh samples. Stromal cells in umbilical blood were cultured by using DEXTER culture system. After adding the different cytokine(s)individually, the number of cord stromal cell colony was counted and the morphology of the cord stromal cells in culture was observed respectively at different time points. Results SCF+BFGF, SCF could promote the growth of cord stromal cell colony. The biological properties of cord stromal cells were different from those of bone marrow stromal cells at many aspects such as growth condition, conformation, cell morphology, *etc*. Conclusion Cord CD34$^+$ cells with the aid of some hematopoietic growth factors have promoting effects on the expansion of cord stromal cells and may become a new resource of stromal cells.

Key words: stromal cells; cytokine; *in vitro* expansion; cord CD34$^+$ cell

人脐带血的造血干细胞资源已被临床广泛使用,作为造血细胞的支撑系统,脐带血中造血微环境的生物学特性,脐血基质细胞能否有效扩增是目前尚不十分清楚的问题。本实验先分离出脐血CD34$^+$细胞,按照DEXTER法行基质细胞培养,观察不同时间、不同细胞因子及其组合的贴壁细胞生长状态,为更好地利用脐血细胞资源奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

脐血取自第三军医大学附属新桥医院和西南医院妇产科健康育龄产妇足月顺产或剖腹产婴儿脐带,共采集脐血标本9份。

1.2 主要仪器设备及药品试剂

1.2.1 主要仪器设备 流式细胞仪(Becton Dickinson公司,FACStar plus型,美国)、二氧化碳培养箱(SHELD-M2300型 美国)、超净工作台(重庆无线电专用设备厂)、倒置显微镜(Olympus相差显微镜 日本)、台式低温离心机(80-2型 上海手术器械厂)。

1.2.2 主要药品试剂 吸附单克隆抗体—磁珠分离系统(MACS)、RPMI1640(Gibco公司),Ficoll淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)、新生小牛血清(Hyclone公司,-20 ℃冻存),马血清(华西医科大学,-20 ℃冻存),SCF(干细胞生长因子,晶美生物试剂公司),BFGF(碱性成纤维细胞生长因子,晶美生物试剂公司),CD106(VCAM-1)、纤维粘连蛋白(Fn)、层粘连蛋白(Lm)、胶原Ⅳ单抗(晶美生物试剂公司)。

1.3 方法和步骤

1.3.1 人脐血单个核细胞的制备 所有脐血样品均在采集24 h内分选,肝素抗凝终浓度为20 U/ml,用PBS 1∶1稀释,与37 ℃明胶(3%)等比混合,室温静置20 min或至血浆与红细胞界面形成后,吸取血浆层,2 000 r/min离心5 min,弃上清后悬浮

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070327)
作者简介:张 曦(1972-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事造血微环境功能损伤机制及救治措施方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68755300
通信作者:陈幸华,电话:(023)65200687
收稿日期:2003-02-21;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于5 ml IMDM 中。按2∶1比例加到 Ficoll(1.077 g/L)表面,用低温低速水平离心机4 ℃1 750 r/min 离心25 min。离心后轻轻吸取悬于分层液面的膜状白细胞层,再用 RPMI1640 培养液洗3次,重新悬浮即得到脐血单个核细胞悬液。经 PBS 缓冲液稀释,Ficoll 相对密度梯度离心。收集界面层单个核细胞(MNC),洗涤备用。

1.3.2 $CD34^+$ 细胞的分离纯化 利用吸附单克隆抗体—磁珠分离系统(MACS)进行分离。抗CD34 抗体与细胞悬液1∶5 混匀,4 ℃孵育20 min,1∶5加入羊抗鼠 IgG1 免疫磁珠,8~10 ℃孵育15 min,洗涤,制成单细胞悬液。标记细胞通过置于磁场中的分离柱,洗脱去除 $CD34^-$ 细胞,将分离柱移出磁场,加压洗脱,收集 $CD34^+$ 细胞。流式细胞仪(FACS)测定其纯度。

1.3.3 $CD34^+$ 细胞体外液体培养扩增基质细胞 按表1配制4组不同生长因子组合的培养液,行 DEXTER 法基质细胞培养,每皿加入的 $CD34^+$ 细胞使其浓度为 5×10^4/ml,每组5个培养皿(3.5 cm)置于37 ℃、5%CO_2 培养箱内孵育,培养24 h 弃去上清,之后每周半量换液,在同样条件下共培养5周。

表1 4种不同生长因子组合的培养体系

Tab 1 Culture architecture with four different types of growth factors

Reagent	Control	SCF	bFGF	SCF+bFGF
HS(%)	12.5	12.5	12.5	12.5
FCS(%)	12.5	12.5	12.5	12.5
Hydrogenated Cortisol (mol/L)	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}
SCF(ng/ml)		10		10
BFGF(ng/ml)		1	1	

1.3.4 观察指标 在培养时间内每周在普通光镜、倒置显微镜下观察脐血基质细胞生长情况,形态学特征;取培养成熟的基质细胞进行普通组织化学染色(碱性磷酸酶、非特异性酯酶、糖原染色、过氧化物酶)、免疫组化检查:CD106(VCAM-1)、纤维连接素(Fn)、层粘连蛋白(Lm)、胶原Ⅳ;培养至第3周时计数每皿中脐血基质细胞集落数量(≥6个细胞为一集落)。

1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

本实验共采集9份脐血标本,平均采集量(85±28.6)ml,有核细胞数(1.85±0.72)$\times10^7$/ml,Ficoll 分离后 MNC(2.43±1.37)$\times10^8$,MACS 分离 $CD34^+$ 细胞(5.47±2.29)$\times10^6$,流式细胞仪检测纯度为(0.91±0.04)。

2.1 贴壁细胞生长的动态观察

脐血 $CD34^+$ 细胞在 DEXTER 培养3~4 d 可见贴壁细胞,为圆形、三角形或不规则形,9~14 d(平均11.2 d)开始形成基质细胞集落,以15~22 d(平均19.6 d)集落数量最多,随着培养时间的延长,细胞体积逐渐增大,成圆形、椭圆形或梭形,细胞类型以巨噬样细胞、成纤维细胞、上皮样细胞为主;至第4周贴壁细胞数量显著增多铺满皿底,但是仅有第4组(SCF+ bFGF)可见呈索条状排列融合成片的基质细胞,见图1,1、2、3组未见。

2.2 细胞因子及其组合对基质细胞集落形成的影响

基质细胞集落散在,细胞数6~25之间,形成时间平均为11.2 d,培养第3周计数基质细胞集落的数量,见表2;各实验组出现不同的结果:SCF(2组)、SCF+bFGF(4组)(图2)组合与空白对照组(1组)、BFGF(3组)组合比较有显著性差异($P<0.01$),其中 SCF+BFGF(4组)与其他组间(1、2、3组)比较又存在显著性差异($P<0.01$)。



图1 培养第4周 SCF+bFGF 组形成脐血基质细胞层(倒置显微镜×10)

Fig 1 The layer of cord blood stromal cell in the SCF+bFGF group at the 4th week (Invert microscopy×10)

表2 培养第3周时基质细胞集落计数($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Count of colonies of stromal cells on the 3rd week of culture($\bar{x}\pm s$)

Group	Control	2	3	4
Number of colony of stroma cells	8.2±1.3	52.5±10.8*	9.2±2.3	126.2±16.3*#

*: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.01$ *vs* group 4



图2 培养第3周 SCF+bFGF 组的脐血基质细胞集落(倒置显微镜×10)

Fig 2 The colony of cord blood stromal cell in the SCF+bFGF group at the 3th week (Invert microscopy×10)

2.3 脐血基质细胞的形态学特征

普通光镜和倒置显微镜发现从形态上观察扩增后的人脐血基质主要包括3种细胞成分:①"成纤维样"细胞,细胞呈梭形,胞浆丰富,紫红色,核染色质较粗,核仁1~3个,见图3;②"巨噬样"细胞,细胞胞体较大,圆形,细胞间胞浆突起有嵌合,胞浆丰富,核染色质粗,核仁明显,见图4;③不明性质的"小圆"细胞,胞体较小,类似淋巴细胞,胞浆蓝色,核染色质细,核仁明显,见图3;普通组化:糖原染色、过氧化物酶阳性,非特异性酯酶弱阳性,碱性磷酸酶阴性;免疫组化检查:CD106(VCAM-1)图5、纤维连接素(Fn)、层粘连蛋白(Lm)、胶原Ⅳ阳性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　脐血基质中的"成纤维样"细胞和性质不明的"小圆"细胞　(HE× 100)

Fig 3　"Fibroblast-like" cells and unknown "small-round" cells medium in cord blood stromal cell medium　(HE× 100)



图 4　脐血基质细胞"巨噬样"细胞　(HE× 100)

Fig 4　"Macrophage-like" cells in cord blood stromal cell medium　(HE× 100)

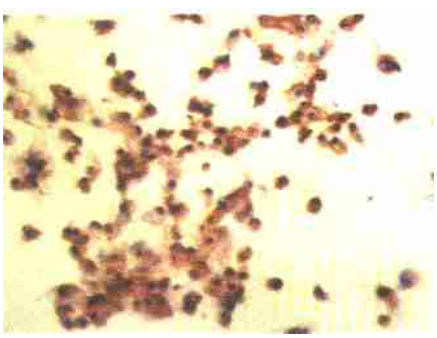


图 5　扩增后脐血基质细胞胞膜 **CD106** 阳性表达　(S-P× 40)

Fig 5　CD106 positive in the membrane of cord stromal cells after amplification　(S-P× 40)

3　讨论

基质细胞是造血微环境中的重要成分。它不仅与造血干/祖细胞的归巢定位和增殖分化有密切的关系,而且在血液系统疾病的发生、发展及转归过程中也具有非常重要的地位[1,2]。目前对骨髓基质细胞的研究已较为深入,但是在脐血中基质细胞的生物学特性,有效体外扩增的方法一直是有待研究的课题。

本课题的初步实验结果表明:脐血 CD34$^+$ 细胞可通过体外培养扩增得到基质细胞,提示脐血中存在基质细胞的前体细胞。脐血来源的基质细胞体外生长较传统的骨髓基质细胞时间长,集落形成时间约晚 1 周左右,不使用生长因子辅助其基质细胞集落难以形成且单独使用生长因子的效果不及联合运用,分析可能的原因为 SCF 及 BFGF 在细胞发育过程中的作用位置各不相同,时相点上存在贯续性而出现协同作用[3],其细胞增殖调控作用是通过一系列复杂的细胞信号转导途径来完成的[4]。

本研究的结果还显示,扩增后脐血基质细胞在形态学上亦有自己的特点,主要包括 3 种不同类型的细胞成分:①"成纤维样"细胞;②"巨噬样"细胞;③不明性质的"小圆"细胞;基质细胞集落以粒-巨噬细胞集落样结构较多见。这些现象可能提示在细胞因子作用下,骨髓基质细胞发生了向不同细胞系列的定向分化和扩增,尚需采用进一步的实验手段加以明确。

许多疾病本身即有严重的造血基质细胞功能损伤,如再生障碍性贫血、白血病、骨髓纤维化等,血液恶性肿瘤的大剂量放化疗也对基质细胞造成了不可逆的严重损伤[5],因此研究如何促进基质细胞数量和功能恢复有重要的理论价值和临床意义。骨髓基质细胞体外培养后回输已为临床证实是一种可行重建造血微环境功能的方法[6],但是由于自身存在病变,异体存在组织相容性问题限制了其在临床上的广泛运用。而脐血由于其自身优势,临床运用潜能巨大,我们拟通过系列研究证实人脐血中基质细胞的存在,将人脐血作为基质细胞的又一新型来源来开发,扩大脐血的临床用途;建立高效稳定的人脐血基质细胞体外扩增体系并对扩增后脐血基质细胞的生物学特性进行观察。尝试解决既往因脐血基质细胞含量少不能有效扩增而限制其临床应用的关键性问题,为造血功能损伤寻求新的治疗途径。

参考文献:

[1] Long M W. The hemaopoietic microenvironment: the functional and structural basis of blood cell development[M]. Baltimore: John Hopkins University Press, 1993. 2—3.

[2] 杨吉成, 盛伟华, 李丽娥, 等. 骨髓基质细胞的造血支持作用等生物学特性的研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2000, 10(2): 87—93.

[3] 罗成基, 裴雪涛. 造血微环境[M]. 西安: 世界医药出版社, 2001. 97—101.

[4] 吴祖泽, 贺福初, 裴雪涛. 造血调控[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2001. 142—146.

[5] Deeg H J, Beckham C, Loken M R, *et al*. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Leuk Lymphoma, 2000, 37(3—4): 405—414.

[6] Perkins S, Fleischman R A. Hematopoietic microenviroment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice[J]. J Clin Invest, 1988, 81(8): 1072—1080.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net