DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.033

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0540-03

体外诱导脐血造血细胞定向分化的研究

张 伶[1],李 维[2],黄宗干[3] (1重庆医科大学临床血液学教研室,重庆 400016;2重庆市血液中心输血研究室,重庆 400015;3重庆医科大学临床学院血液科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨造血生长因子体外诱导脐血造血细胞向粒系细胞分化的能力。方法 从新鲜的脐血标本中分离的单个核细胞接种于含脐血血清和造血生长因子的IMDM培养液中悬浮培养5周,采用有核细胞计数、免疫荧光染色计数和祖细胞集落测定对有核细胞总数、$CD34^+$细胞和粒单系祖细胞进行动态检测。结果 用粒系集落刺激因子、粒单系集落刺激因子、干细胞因子、白介素-3和白介素-6培养脐血单个核细胞3周,可以显著扩增有核细胞总数和CFU-GM,扩增倍数分别为培养前的58.3倍和12.2倍,且培养后的细胞以中性粒细胞为主。而$CD34^+$细胞占细胞总数的比例则从0.97%下降到0.05%。按照此培养条件,可以使单份新鲜脐血样本中有核细胞总数增加(5.1±2.3)倍,CFU-GM增加(2.2±0.95)倍。结论 本培养体系在体外可以诱导脐血造血细胞向粒系定向诱导分化,从而增加单份脐血中粒单系祖细胞和粒细胞数量。

关键词:胎血;造血细胞;细胞因子;诱导分化
中图法分类号:R329.2;R331.1 文献标识码:A

Committed differentiation of hematopoietic cells from human umbilical cord blood *in vitro*

ZHANG Ling, LI Wei, HUANG Zong-gan (Department of Clinical Hematology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the capacity of hematopoietic cells from human umbilical cord blood (UCB) induced by hematopoietic growth fators (HGFS) to differentiate committedly to granulocyte *in vitro*. Methods Suspension culture of isolated mononuclear cells from fresh UCB samples were conducted for 5 weeks in IMDM medium containing UCB serum and HGFS. The expansion folds of nucleated cells, the changes of CD34+ antigen by immunofluorometry, and the colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) by progenitor clonogenic assay were observed. Results Culture of mononuclear cells with the combination of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF), interluekin-3 (IL-3) and interleukin-6 (IL-6) for 3 weeks markedly increased the total count of nucleated cells and CFU-GM, being 58.3 and 12.2 folds of the pre-cultured, and the cultured cells were mainly neutrophils. However, CD34+ cells in nucleated cells declined from 0.97% to 0.05%. According to the culture condition, a single portion of fresh UCB could increase nucleated cells by (5.1±2.3) fold and CFU-GM by (2.2±0.95) fold. Conclusion Hematopoietic cells of UCB may be induced to differentiate committedely to granulocyte lineage by this culture system *in vitro* to result in the increase of granulocytes and CFU-GM in single portion of cord blood.

Key words: fetal blood; hematopoietic cell; cytokines; induced differentiation

大剂量化疗是临床治疗恶性肿瘤和骨髓移植前预处理的常规手段之一,但它可导致粒细胞减少,从而引发严重的感染。虽然应用抗生素和造血生长因子可以减少感染并发症,但大剂量化疗往往损伤的是晚期祖细胞和白细胞,由此而导致的感染则需成熟的白细胞来治疗。而临床实践显示,成人外周血来源的浓缩白细胞中巨细胞病毒的污染率较高,且中性粒细胞的寿命短暂。脐血作为一种新的血源,病毒污染率大大低于成人血液,其中还含有大量具有自我复制和多向分化潜力的造血干、祖细胞。目前体外扩增脐血祖细胞

基金项目:重庆市卫生局青年人才基金资助项目(00-3003)
作者简介:张 伶(1970-),女,重庆市人,硕士,讲师,主要从事脐血的基础与临床方面的研究,电话:(023)68805938
收稿日期:2002-04-10;修回日期:2002-06-05

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

并尝试用于干细胞移植取得了一定的进展[1], 而对脐血细胞定向分化的研究仅限于针对分离纯化的 $CD34^+$ 细胞[2]。实际工作中无论脐血的保存还是脐血的输注或移植多采用分离的有核细胞或全血细胞, 为此我们用分离的单个核细胞体外培养, 通过添加不同的造血生长因子组合来诱导脐血干/祖细胞向粒系定向分化, 扩大粒细胞池数量, 为单份脐血粒细胞输注治疗大剂量化疗后的感染奠定实验理论基础。

1　材料与方法

1.1　脐血的采集和单个核细胞分离

无菌采集健康足月顺产新生儿脐带血, 脐静脉穿刺取血, ACD 抗凝液(Acidic citrate, citric acid, dextroglucose)抗凝。共 20 份。新鲜脐血在 24 h 内经 Ficoll(相对密度 1.077)梯度离心分离单个核细胞, IMDM(Iscove's modified dulbecco's medium)培养液(GIBCO)洗涤两次后制成浓度为(2.0~5.0)×10^6/ml 的细胞悬液。台盼蓝染色, 活细胞数大于 96%。

1.2　体外诱导培养

按文献[3]方法稍加改良。培养体系包括营养物质 3 mmol/L L-谷氨酰胺, 20% 脐血血清(代替 20% 小牛血清)和 10^{-5}mol/L 2-巯基乙醇。新鲜脐血单个核细胞(2.0~5.0)×10^6/ml。生长因子包括干细胞因子(Stem cell factor, SCF)100 ng/ml(Promega), 白介素-3(Interleukin-3, IL-3)、白介素-6(Interleukin-6, IL-6)各 5 ng/ml(Promega), 粒系集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)和粒单系集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)各 10 ng/ml(Promega), 组成 3 种因子配伍搭配: ① G-CSF/GM-CSF/SCF/IL-3/IL-6(G/GM/SCF/3/6)、② G-CSF/GM-CSF(G/GM)、③ SCF/IL-3/IL-6(SCF/3/6)。IMDM 培养液补足体系总量后加入 25 ml 培养瓶(5 ml/瓶)。CO_2 孵箱连续培养 5 周, 每周半量换液 1 次, 进行有核细胞计数、涂片形态学检查、$CD34^+$ 细胞含量检测以及粒单系祖细胞(Colony-forming unit granulocyte-macrophage, CFU-GM)培养, 同时补充半量新鲜培养液继续培养。

1.3　有核细胞计数及形态学观察

全自动血细胞分析仪(日本东亚 K4500)分别检测培养前、后悬浮液中有核细胞数量, 两者之比为有核细胞的扩增倍数。吸出的细胞悬液离心涂片, 经瑞-姬氏染色, 观察细胞形态。

1.4　$CD34^+$ 细胞检测

采用直接免疫荧光法分别检测液体培养前、后 $CD34^+$ 造血干/祖细胞数量: 100 μl 细胞悬液加入 10 μl FITC 标记的鼠抗人 CD34 单抗(MONO-BRYTER CD34, BioRad 公司), 4 ℃冷孵育 30 min 后于荧光显微镜下计数阳性细胞, $CD34^+$ 细胞阳性率=$CD34^+$ 细胞/500 个细胞×100%。

1.5　粒单系祖细胞培养

祖细胞产率按文献[4]配制 CFU-GM 培养体系检测。根据液体培养前、后 CFU-GM 数量变化计算其扩增倍数。

1.6　统计学处理

采用 t 检验。

2　结果

2.1　脐血的一般特征

20 份新鲜脐血样本, 平均体积(75.3±20.1)ml, 最大体积 120 ml, 最小体积 49 ml。脐血白细胞总数(12.01±2.25)×10^9/L, 其中粒细胞为(7.66±2.43)×10^9/L, 有别于成人外周血的正常参考范围: 白细胞为(4.0~10.0)×10^9/L, 粒细胞为(2.0~7.0)×10^9/L。

2.2　不同因子配伍诱导 CFU-GM 的生成

体外液体培养中分别加入 3 种因子配伍, 培养 1 周单个核细胞中 CFU-GM 的扩增倍数稍有增加, 培养 3 周达高峰, 4 周显著下降, 到第 5 周时处于更低水平。3 种因子组合中, 以 G/GM/SCF/3/6 组合促进 CFU-GM 生成作用最强, G/GM 次之, SCF/3/6 最弱, 见图 1。

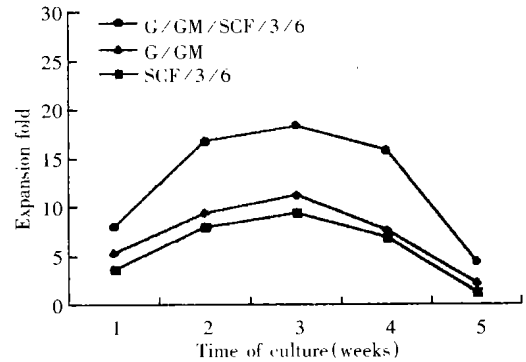


图 1　不同因子配伍刺激粒单系祖细胞的动态变化(n=5)

Fig 1　Dynamic changes of CFU-GM by growth fator cocktails(n=5)

2.3　G/GM/SCF/3/6 对脐血细胞的诱导分化

2.3.1　$CD34^+$ 细胞含量变化: 新鲜脐血中 $CD34^+$ 细胞含量差异较大, 10 份样本中 $CD34^+$ 细胞占有核细胞的最高比例为 1.05%, 最低比例为 0.31%, 经因子刺激后 $CD34^+$ 细胞比例明显下降, 其中 2 份样本培养 3 周后, 平均 $CD34^+$ 细胞含量从 0.97%逐周下降为 0.68%、0.13%、0.05%。

2.3.2　有核细胞总数、CFU-GM 的改变

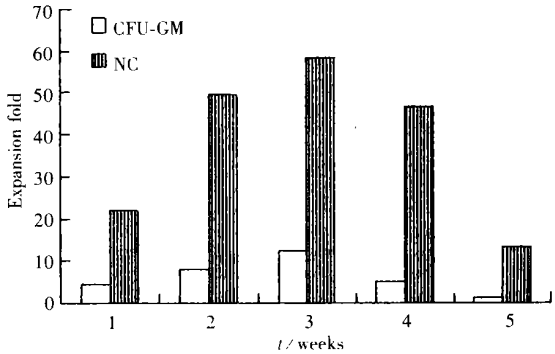


图 2　不同培养时间粒单系祖细胞、有核细胞的扩增倍数(n=5)

Fig 2　The expansion fold of CFU-GM, nucleated cells (NC) in different culture times (n=5)

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

从图 2 可知，体外培养中加入 G-CSF、GM-CSF、SCF、IL-3、IL-6，从第 1 周开始有核细胞和 CFU-GM 明显扩增，第 3 周时有核细胞可扩增 58.3 倍，CFU-GM 扩增 12.2 倍，随后二者皆逐渐下降。相同培养时间内有核细胞的扩增倍数明显高于 CFU-GM（$P<0.01$）。除细胞数量的改变外，培养中细胞形态也发生了变化：第 1 周前很少有粘附细胞生成，主要为单个核细胞，1 周后少量粘附细胞存在，并逐渐形成贴壁细胞层，同时体系中的粒细胞呈现优势生长，到第 3 周时出现大量的中性粒细胞。

2.3.3 脐血样本培养前、后细胞数量的变化 见表 1，体外培养 3 周后，每份脐血样本中有核细胞总数和 CFU-GM 较培养前有显著差异（$P<0.01$），其中培养后的全血样本中有核细胞增加了（5.1±2.3）倍，CFU-GM 增加了（2.2±0.95）倍。

表 1 培养前后脐血样本中有核细胞和粒单系祖细胞数量的比较（$n=10$）

Tab 1 Comparison of nucleated cells (NC), colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) in fresh or cultured cord blood sample ($n=10$)

Group	NC×10^6/ml ($\bar{x}\pm s$)	CFU-GM×10^4/ml ($\bar{x}\pm s$)
Before culture	8.74±1.68	10.25±6.33
After culture for 3wk	48.32±17.55 *	23.16±9.43 *

*: $P<0.01$ *vs* before culture

3 讨论

脐血造血细胞对多种造血生长因子敏感，具有扩增潜能，通过体外培养可以增加单份脐血造血祖细胞数量[5]。利用脐血细胞的这一特性，改变造血生长因子的组合，尝试将脐血造血细胞定向扩增，促使大部分造血细胞向粒系分化成熟，以增加单份脐血中粒细胞群数量。结果表明：以第一种因子组合的诱导作用最强，体外培养脐血单个核细胞 3 周，G-CSF、GM-CSF、IL-3 能诱导其中的 $CD34^+$ 造血干/祖细胞向粒单系祖细胞分化，使 $CD34^+$ 细胞含量明显下降，同时生成大量的粒系祖细胞和成熟粒细胞，SCF、IL-6 则对其具有明显的协同作用。比较曹祥山等[3]采用 SCF、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF 联合红细胞生成素（Erythropoietin，EPO）扩增脐血单个核细胞的结果，有核细胞的扩增效果（培养 3 周，扩增 58.3 倍）不及后者（培养 5 周，累计扩增 252 倍）。但是 CFU-GM 的扩增效果（扩增 12.2 倍）则与通过纯化的 $CD34^+$ 细胞来定向扩增 CFU-GM 的实验结果[培养 2 周，扩增（12.87±2.25）倍]相接近[2]。当然各实验室结果间的差异还与选择不同的造血生长因子组合和不同的培养条件有关。实验中我们观察到培养 1 周后有少部分细胞逐渐贴壁，到 3 周时形成的贴壁细胞层上悬浮着较多的中性粒细胞。Prindull 等[6]研究证实脐血含有成纤维祖细胞（Colony forming-units fibroblast，CFU-F），体外培养时可形成贴壁细胞层，在贴壁细胞层上接种新鲜脐血单个核细胞后可形成造血灶。本实验中贴壁细胞层对粒系细胞的作用尚有待进一步研究。此外，培养中我们加入脐血血清以替代小牛血清，结果脐血血清仍能支持造血细胞向粒系细胞的分化成熟，可能与脐血血清含有 G-CSF、GM-CSF 等造血生长因子，可以在体外刺激造血细胞增殖有关[7]。而脐血血清的应用既降低了培养成本又避免了临床应用时异种蛋白的输入。

脐血作为继成人外周血后的又一种血源，富含造血细胞和各种血细胞，其中粒细胞含量较成人血高 1 倍，可通过脐血输注使大剂量化疗后的患者白细胞快速恢复。我们在 1995－1997 年进行了 2 000 余例肿瘤病人的脐血输注，发现单份脐血可采量有限，病人一次常需输注多个脐血。本实验结果表明，通过体外诱导培养，可以使单份脐血中有核细胞总数增加 5.1 倍（以中性粒细胞为主），CFU-GM 增加 2.2 倍，而后者的增多可能在输注后持续地生成粒细胞以弥补粒细胞寿命短暂的不足。目前体外培养后的脐血粒细胞输注仍限于实验研究阶段，为适于临床应用，如何缩短培养时间、减少因子用量以及开发大规模的培养体系将是今后的研究方向。

参考文献：

[1] Broxmeyer H E, Hangoc G, Cooper S, *et al*. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential fro transplantion in adults[J]. Proc Natl Acad Scid USA, 1992, 89(9): 4109－4113

[2] 裴雪涛，王立生，徐 黎，等. $CD34^+$ 造血祖细胞的定向诱导分化研究[J]. 中华血液学杂志，1998, 19(6): 289－293.

[3] 曹祥山，邹正辉，虞 斐，等. 脐血造血细胞的体外扩增及其意义[J]. 中华医学杂志，1997, 77(6): 422－424

[4] 张林生，王逸兰，陆道培. 脐血造血干/祖细胞集落产率的研究[J]. 中华血液学杂志，1996, 17(5): 233－236.

[5] 张 伶，刘国卿. 体外扩增对脐血细胞重建造血功能的影响[J]. 临床血液学杂志，2001, 14(1): 24－25.

[6] Prindull G, Ben-Ishay Z, Ebell W, *et al*. CFU-F circulating in cord blood [J]. Blut, 1987, 54(6): 351－359

[7] 伍 钢，应大明，林 梓，等. 脐血血浆体外对造血祖细胞增殖的影响[J]. 中华血液学杂志，1997, 18(5): 237－239.

（编辑 冯崇英）

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