DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.002
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
882 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0882-03

不同条件下体外扩增造血细胞促造血恢复能力的比较

孔佩艳[1],罗成基[2],郭朝华[2],周燕虹[2],施 炎[2],邹仲敏[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院血液内科,[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 比较研究不同条件下体外扩增的造血细胞回输体内后促进造血功能恢复作用的差异,方法 在小鼠骨髓单个核细胞液体培养体系中,分别加入几种细胞因子组合和/或基质细胞层存在的条件下进行体外扩增,然后将不同条件下扩增的细胞经尾静脉回输至经致死量照射的小鼠体内,动态观察小鼠的外周血象变化及其一般状况和生存率。结果 ①单纯细胞因子介导BMMNC体外扩增后并不能增进这些细胞促造血恢复的能力;②含有骨髓基质细胞底层的体外扩增,无论是否加入细胞因子,均有明显的促进移植受体造血功能迅速恢复的作用。结论 骨髓基质细胞支持下的造血细胞体外扩增可能有助于维持扩增后造血干/祖细胞造血重建的功能,值得深入研究和应用。

关键词:体外扩增;骨髓单个核细胞;基质细胞;造血恢复
中图法分类号:R329.24;R331.2;R394.2 文献标识码:A

Comparison on the capacity of bone marrow cells *ex vivo* expanded under different conditions for hematopoietic repair

KONG Pei-yan, LUO Cheng-ji, GUO Chao-hua, ZHOU Yan-hong, SHI Yan, ZOU Zhong-min (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To compare the effects of *ex vivo* expanded bone marrow cells under different conditions on hematopoietic repair of irradiated mice. Methods The mouse bone marrow mononuclear cells (BMMNC) were expanded for 5 d in the liquid expanded cultural system with several cytokines and/or bone marrow stromal cells layer and the expanded cells were transplanted to the lethal-dose irradiated mice respectively via the caudal vein. The hematopoietic recovery of mice after transplantation was evaluated by analyzing the peripheral blood Hb, WBC, and TBC, and by observing the state and survival rates of the mice. Results *Ex vivo* expansion of BMMNC under the cultural conditions with combined cytokines didn't improve the hematopoietic recovery of irradiated mice, but the expansion with the aid of bone marrow stromal cells accelerated this process significantly. Conclusion The results suggest that the ex vivo hematopoietic cells expansion supported by bone marrow stromal cells can maintain the properties of the hematopoietic stem/progenitor cells.

Key words: *ex vivo* expansion; bone marrow mononuclear cells; stromal cells; hemotopoietic recovery

关于造血细胞体外扩增(*Ex vivo* hematopoietic progenitor expansion)的研究已有较多报道,而骨髓单个核细胞经细胞因子介导进行体外扩增后,是否具有促进造血修复和造血重建的能力,目前的研究结果颇不一致;而且基质细胞对体外扩增造血细胞移植后重建能力作用迄今也未见在体研究的报告。本研究拟进行不同条件下体外扩增的造血细胞回输体内后促进造血功能恢复的比较研究,以探讨上述问题,为寻求更完善的造血细胞体外扩增方案奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及来源

健康BALb/c小鼠购自重庆医科大学实验动物所,共150只,其中雄性30只,其余为雌性小鼠。体重在20~24 g之间,用于实验前在本室动物实验室喂养1周。

本实验中,体外培养观察全部用雄性BALb/c小鼠,体内输入实验对象全部为雌性BALb/c小鼠。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠骨髓单个核细胞(Bone marrow mononuclear cell, BMMNC)悬液制备及骨髓基质细胞培养 BMMNC悬液制备及基质细胞培养按本室已建立的方法进行[1]。培养4周后在倒置显微镜下观察,可见基质细胞基本长满培养瓶底。选取生长状态良好并融合成单层的基质细胞,经^{60}Coγ射线一次性照射10 Gy(剂量率87.76 cGy/min,距离120 cm,照射时间12 min 5 s),去除所有上清液并用RPMI1640培养液冲洗两次后备用。

1.2.2 骨髓粒-巨噬祖细胞克隆(CFU-GM)、红系祖细胞集落(CFU-E, BFU-E)及多系造血祖细胞集落培养 参照文献[2]中所介绍的方法及本室已建立的方法进行[4,6]。

1.2.3 骨髓单个核细胞的体外液体扩增体系 基本扩增培养体系为IMDM培养基中含12.5%HS、12.5% FCS、10^{-6} mol/L氢化可的松、骨髓单个核细胞2×10^5/ml。上述体系接种于含有或不含照射后基质细胞层的50 ml体积培养瓶中,每瓶10 ml(即每个培养瓶中接种的细胞总数为2×10^6),加或不加各种造

基金项目:全军"九五"指令性攻关课题(96L045)
作者简介:孔佩艳(1958-),女,河南省郏县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事造血调控和各种血液病的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755000-74609
收稿日期:2001-09-08;修回日期:2002-07-05

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

血生长因子组合, 置于 37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱内连续培养 5 d 后, 取出观察、照相并收集。

按不同培养条件, 分为以下实验组: ① 含有几种重组造血生长因子组合、不含有照射后基质细胞层的液体扩增组(简称 F 组); ② 不含几种重组造血生长因子组合、只含有照射后基质细胞层的基质支持扩增组(简称 S 组); ③同时含有造血生长因子组合及照射后基质细胞层的体外扩增组(简称 S+F 组)。

培养体系中几种重组生长因子的来源及终浓度: 干细胞因子(SCF, 邦定) 20 ng/ml; 白细胞介素-3(IL-3, Kirin) 20 ng/ml; 白细胞介素-6(IL-6, 邦定) 20 ng/ml; 红细胞生成素(EPO, Amegen) 1 μ/ml; 粒—巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, Kirin) 50 ng/ml; 粒细胞集落刺激因子(G-CSF, Kirin) 50 ng/ml。

1.2.4　扩增后细胞的收集　　分别收集每个培养瓶中的细胞。依培养条件不同收集细胞的方法也有差别。

1.2.4.1　不含照射后基质细胞层的扩增细胞的收集　　倒置显微镜下观察可见在这种培养体系中有少量的贴壁细胞形成, 收集时用细胞刮子(Sigma)温和地刮下此部分细胞后, 与扩增后的悬浮细胞一同离心, 然后将沉淀细胞用培养液洗两次, 重新悬浮为 0.3~0.5 ml 的细胞悬液, 计数有核细胞总数后备用。

1.2.4.2　含有照射后基质细胞层的扩增细胞的收集　　先分别将每个培养瓶中的培养上清液吸至一刻度离心管中, 再加入少量培养液后用细胞刮子将贴壁层细胞刮下, 充分吹打后转移至新的培养瓶中, 再度贴壁 1 h, 收集非贴壁细胞作为粘附于贴壁层中的非贴壁细胞, 然后与上清液中的悬浮细胞一同在 4 ℃条件下 1 000 r/min×10 min 离心后弃上清, 沉淀细胞洗两次, 重新悬浮并计数有核细胞后备用。

1.2.5　小鼠照射移植模型　　健康 BALB/c 小鼠, 雌性, 体重 20~24g, 共 60 只, 每组 10 只。除一组正常对照(N 组)外, 其余小鼠给予 $^{60}Co\gamma$ 射线一次性全身致死量照射(6Gy, 照射量率为 120.51cGy/min, 距离 100 cm)。照射后随机分为 5 组, 1 组为照射不输注细胞对照组, 另 4 组为照射后输注细胞组。均在照射后 6~8 h 经尾静脉给予相应的输注处理: 1 组照射空白对照组: 输入 0.3 ml 的 IMDM 培养液, 称为 R 组; 2 组输注未培养新鲜骨髓单个核细胞组: 输入新鲜分离的骨髓单个核细胞, 输入的细胞数为 2×10^6/只, 称为 T-U 组; 3 组输注无基质的液体扩增培养细胞组即 F 组细胞: 输入量以 2×10^6个起始培养细胞为标准, 即每瓶培养细胞输入 1 只照射后小鼠体内, 称为 T-F 组; 4 组输注无生长因子的基质支持扩增组即 S 组细胞, 称为 T-S 组; 5 组输注基质及生长因子合用扩增组即 S+F 组细胞, 称为 T(S+F)组。1 组和 6 组输注细胞量同 3 组。

移植后小鼠在室温 25~30 ℃条件下相对隔离饲养, 自由进食水。

1.2.6　移植后不同时间小鼠外周血 Hb、WBC 和 TBC 测定　在移植后不同时相点, 尾静脉取血、常规方法测定 Hb、WBC 和 TBC。Hb 测定用紫外分光光度仪为 Beckman 产品, 测定所用波长为 540 nm。

1.3　统计学分析

采用第四军医大学统计学教研室研制的 SPLM 软件对实验结果进行 t 检验和单因素方差分析。

2　结果

将不同条件下扩增的雄性 BALb/C 小鼠的造血细胞输入照射后雌性小鼠体内通过观察小鼠一般状态, 存活率及外周血各项指标的变化, 来判断其对造血恢复的作用。

2.1　移植后小鼠的存活情况

照射后经尾静脉输注 0.3 ml 培养液的对照组, 在同样饲养及隔离条件下在照射后 10 d 内全部死亡, 死亡高峰在照射后 3~5 d。移植新鲜骨髓细胞组及各扩增细胞组小鼠照射后 30 d 的死亡情况为: T-F 组 3 只, T(S+F)组 1 只, T-U 组和 T-S 组全部存活。

2.2　移植后动物的外周血检测

在上述不同条件下扩增的细胞收集后, 经 RPMI1640 培养液洗两次后经小鼠尾静脉输入经致死量照射的小鼠体内。存活小鼠每周经尾静脉取血检测外周血白细胞计数(WBC)、血小板数(TBC)和血红蛋白值。

2.2.1　Hb 测定　　Hb 值在回输后第 1 周到第 4 周, 各组间无显著差异($P>0.5$), 但至第 6 周时, 单纯细胞因子扩增细胞输入组(T-F 组)的 Hb 值明显高于其它各组($P<0.05$ 和 <0.01), 见表 1。

表 1　移植后不同时间小鼠外周血 **Hb** 的测定($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Peripherial blood Hb of irradiated mice at different time after transplantation (week)($\bar{x}\pm s$)

Group	Value of Hb (g/dl)				
	1	2	3	4	6
N	19.10±3.00	18.34±2.99	18.76±3.21	20.30±1.89	14.74±1.04
R	18.00±3.50	ND	ND	ND	ND
T-U	19.51±4.88	17.66±1.18	17.07±5.01	16.62±1.97	16.33±2.03
T-F	17.75±2.82	18.91±4.05	20.71±1.90	20.21±2.65	20.42±2.64
T-S	17.93±0.84	20.47±1.94	16.97±5.26	18.79±1.54	15.11±1.11
T(S+F)	18.34±1.65	19.82±2.04	17.01±2.77	15.75±1.50	16.62±0.58
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.01

ND: Not done, due to the death of experiment animals

2.2.2　WBC 测定　　移植后小鼠外周血白细胞计数(WBC)情况见表 2。

表 2　移植后不同时间小鼠外周血 **WBC** 的测定($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　WBC count of mice at different time after transplantation (week)($\bar{x}\pm s$)

Group	Value of WBC ($\times10^9$/L)				
	1	2	3	4	6
N	2.67±0.47	2.85±0.59	3.01±0.78	2.56±1.10	2.98±1.30
R	1.02±0.27 **△△	ND	ND	ND	ND
T-U	1.02±0.16 **△△	14.21±3.13 **△△	7.46±3.61 *△	7.35±1.87 **	5.00±1.50 *
T-F	1.15±0.36 **△△	6.10±0.62 **△△	9.18±0.74 **△	11.55±6.26 **	5.23±0.35 *
T-S	2.20±0.22	4.83±1.45 *	8.80±2.78 *△	7.23±0.32 **	3.35±1.27
T(S+F)	4.63±3.51	4.53±0.91 *	14.77±2.03 **	8.82±2.25 **	4.47±1.15

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* N; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* T (S+F)

由上述结果可见, 在输入细胞后第 1 周, 基质支持扩增细胞输入组[T-S 和 T(S+F)组] 的 WBC 值即与正常对照组无差别, 但明显高于输入未培养细胞组和单纯细胞因子扩增细胞输入组; 以后几周各移植组 WBC 值均维持高水平, 至第 6 周, 基质支持扩增细胞输入组又降至正常对照组水平。而其他两个实验组仍高于正常水平($P<0.05$)。

2.2.3　TBC 测定　　各输入组小鼠外周血 TBC 结果, 见表 3。

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

表 3 移植后不同时间小鼠外周血 TBC 的测定($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 TBC count in peripheral blood of mice at different time after transplantation (week) ($\bar{x}\pm s$)

Group	Value of TBC ($\times 10^9$/L)				
	1	2	3	4	6
N	918.60±77.52	901.18±81.40	892.44±102.00	926.24±69.10	940.62±106.22
R	445.25±43.67 **△△	ND	ND	ND	ND
T-U	592.00±75.91 **△△	620.00±40.21 **	847.00±109.41	879.80±118.38	1070.00±119.44
T-F	1069.17±74.99 **△△	754.60±261.69	856.25±283.94	793.75±144.42	761.00±201.80 *△△
T-S	600.24±71.00 **	565.00±148.49 **	866.67±73.20	963.75±53.13	997.33±7.51
T(S+F)	650.00±65.00 **	621.67±73.20 **	888.33±56.20	936.75±41.90	967.33±32.50

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* N; △△: $P<0.01$ *vs* T (S+F)

分析表明,在输入后第 1 周,单纯细胞因子扩增输入组(T-F 组)的外周血 TBC 明显高于正常对照组,其他各实验组则明显低于正常对照组,但仍明显高于照射对照组($P<0.01$),第 2 周仍以 T-F 组较高,其它组仍低于正常对照组;但至输入后第 6 周,则 T-F 组 TBC 值低于正常对照组($P<0.05$)和其他实验组($P<0.01$),而其他实验组已达正常水平(P 值均>0.05)。

3 讨论

3.1 关于单纯细胞因子促进的骨髓单个核细胞体外扩增后对造血恢复的作用

造血细胞体外扩增技术是继输血、成分输血、骨髓移植及造血干细胞移植之后发展起来的新一代的细胞移植疗法[3]。在适当伍用多种重组造血生长因子的条件下,纯化的造血干/祖细胞具有很强的扩增效应。但这些细胞在体外大量扩增其数量的同时,往往失去或部分失去其造血重建的能力,进而使移植无法达到预期的目的,这一点已逐渐引起广大研究者的重视。

由于未经分离纯化的骨髓单个核细胞中含有造血辅助细胞成分,有作者认为这些细胞的存在可能有利于体外扩增时维持造血干/祖细胞造血重建的功能。

本研究在 SCF、IL-6、IL-3、GM-CSF、G-CSF 和 EPO 共同存在的培养体系中,短期培养扩增 BALB/c 小鼠的骨髓单个核细胞,5 d 后检测其细胞总数及各系祖细胞的形成能力。结果证实了在细胞因子介导的未分离纯化的骨髓单个核细胞的体外扩增中,有核细胞总数和各系造血祖细胞数均有一定的扩增作用[4],尤其是 CFU-E 增加最为显著。

造血细胞输入受体后能够长期重建骨髓已经丧失的造血功能,即表明这些细胞中含有具长期重建造血活性的造血干细胞和早期造血祖细胞[5]。本研究在体外检测骨髓单个核细胞经细胞因子作用扩增后的有核细胞总数及造血祖细胞含量的同时,将这些扩增后的细胞输至经致死量 γ 射线照射的小鼠体内,观察其促进造血恢复的能力并与同样起始量的未培养骨髓单个核细胞进行比较。结果表明,对回输后造血功能恢复的促进作用仅表现为第 1 周外周血 TBC 的明显增高,而第 2 周的 WBC 和第 6 周的 TBC 值均较对照组明显降低(P 值均<0.01,见表 3 和表 4),其余时相点两组均无差别;第 6 周 Hb 值较其它组为高可能与 T-F 组小鼠状态较差、血液浓缩有关。对小鼠的存活数及一般情况观察也表明,实验组明显差于对照组。这说明本实验条件下单纯细胞因子促进扩增的骨髓单个核细胞与未扩增细胞相比,并不具有理想的促进移植后受体造血恢复的能力。

3.2 关于基质细胞支持的骨髓单个核细胞体外扩增后输入对造血恢复的促进作用

在照射后基质细胞存在的情况下,同时含有细胞因子组合的培养体系,对细胞总数及集落形成细胞数的扩增作用几乎均明显高于其它各组仅 CFU-E 与单纯细胞因子扩增组间无差别[6]。对造血恢复的作用观察表明,输入含基质细胞扩增组细胞的动物存活及一般状态明显优于单纯细胞因子扩增回输组,其外周血 TBC 和 WBC 也在输注后第 1 周明显高于单纯细胞因子扩增输入组和未扩增细胞输入组,表明基质细胞支持的 BMMNC 体外扩增,无论是否加入细胞因子,其扩增细胞输入后,均有促进造血功能早期恢复的作用,且在以后的几周内,该组小鼠的外周血各项指标检测也可维持于相对正常的水平。

通过对本研究结果的分析,我们得出以下结论:①单纯细胞因子介导 BMMNC 体外扩增后并不能增进这些细胞促造血恢复的能力;②含有骨髓基质细胞低层的体外扩增,无论是否加入细胞因子,均有明显的促进移植受体造血功能迅速恢复的作用。因此认为有必要深入研究基质细胞促进造血细胞体外扩增的意义及其临床应用价值,并在此基础上进一步探讨其长期重建造血的能力。

参考文献:

[1] 郭朝华,罗成基,孔佩艳 等. 放射复合伤小鼠骨髓基质细胞对粒单系祖细胞生长的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 1999, 7(1):65-68.
[2] 李家增,王鸿利,韩忠朝,主编. 血液实验学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1997. 119-124.
[3] Emerson S G. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics[J]. Blood, 1996, 87(9): 3 082-3 091.
[4] 孔佩艳,郭朝华,罗成基 等. 细胞因子组合对骨髓单个核细胞的体外扩增作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1 167-1 169.
[5] Osawa M, Hanada K, Hamada H, *et al*. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cells[J]. Science, 1996, 273(5 272): 242-245.
[6] 孔佩艳,郭朝华,罗成基 等. 基质细胞对造血细胞体外扩增的促进作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 891-894.

(编辑 陈聪连)

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