DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.016
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1167-03

论著

细胞因子组合对小鼠骨髓单核细胞的体外扩增作用

孔佩艳[1],郭朝华[2],罗成基[2],周燕虹[2],邹仲敏[2],施 炎[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院血液内科,重庆 400037;[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 了解细胞因子组合对小鼠骨髓单个核细胞的体外扩增作用。方法 采用SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF和EPO等6种细胞因子组合在体外扩增培养小鼠骨髓单个核细胞5 d后,收集培养细胞作体外半固体培养计数各不同阶段祖细胞数,并计数细胞总数,与未经扩增培养的细胞作比较以判断其扩增情况。结果 有核细胞总数扩增不显著,为(1.360±0.126)倍,但造血祖细胞却获得了明显扩增,其中CFU-E达培养扩增前的(7.04±1.26)倍,BFU-E为(4.74±1.04)倍,CFU-GM和CFU-Cs则分别为(1.78±0.47)和(1.74±0.48)倍。由此可见,在此培养体系中以红系祖细胞的扩增最为显著。结论 小鼠骨髓单个核细胞在单纯细胞因子存在的扩增体系中具有一定的扩增其细胞总数和集落形成祖细胞数的能力,为进一步作体内实验判断其造血重建的功能奠定了理论基础。

关键词:细胞因子;骨髓单个核细胞;体外扩增
中图法分类号:R329.24;R392.11;R977.1 文献标识码:A

Effects of a combined cytokines on *ex vivo* expansion of BMMNC

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

Abstract Objective To study the effects of combined application of cytokines including SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF and EPO on *ex vivo* hematopoietic progenitor expansion. Methods Using the techniques of *ex vivo* bone marrow mononuclear cells expansion, semisolid culture of colony forming unit-progenitor cells. Results While adding the cytokines to the cultural systems of *ex vivo* expansion of BMMNC for 5 days, the number of total cells was (1.360±0.126) times, CFU-E, BFU-E, CFU-GM and CFU-Cs were increased notably than those of the uncultured control group. Conclusion The results indicated that the *ex vivo* expansion of BMMNC in the system containing combined cytokines could obviously promote the expansion of the hematopoietic progenitors, and this meight be the basis for the further study of the effects of *ex vivo* expanding BMMNC on hematopoietic constitution *in vivo*.

Key words cytokines; bone marrow mononuclear cells; *ex vivo* expansion

造血细胞体外扩增(*Ex vivo* hematopoietic progenitor proliferation)是近年来发展起来的新技术。以多种方法纯化造血干/祖细胞,然后进行在多种造血生长因子协同作用下的体外扩增,是近年来研究最多的一种造血细胞体外扩增的模式。在此条件下,细胞总数、造血祖细胞数和CD34阳性细胞数的扩增效应最为卓著[1~3]。因此有人认为造血干/祖细胞分离纯化是造血细胞体外扩增的前提和基础,并提出在体外扩增中应尽可能富集较原始的造血细胞[4]。

但后来的研究发现,将这些明显扩增的细胞输注至体内后,往往达不到理想的移植效果,尤其是难以获得长期的造血重建,因此许多作者认为细胞因子介导的造血干/祖细胞体外扩增在造血细胞大量增殖的同时,难以维持其造血干、祖细胞的性能[5~8],而未经分离的骨髓单个核细胞中含有的造血辅助细胞或其产生的辅助因子,可能对维持体外扩增中造血干/祖细胞的造血重建活性有重要的作用。但目前对这种扩增条件下可否达到细胞总数和祖细胞数的大量扩增,以及扩增细胞回输后的造血恢复及重建作用是否优于未经扩增培养的骨髓单个核细胞,尚无肯定的结论。

本实验研究不分选的小鼠骨髓单个核细胞在多种细胞因子组合存在的体系中扩增培养5 d后细胞总数及各种集落形成细胞的数量,以探讨细胞因子对骨髓单个核细胞的扩增作用,为进一步将此方法用于造血细胞体外扩增回输的体内实验及临床实践奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及来源

健康BALB/c雄性小鼠30只,购自重庆医科大学实验动物所。体重在20~24 g之间,实验前在本室动物实验室喂养1周。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠骨髓细胞的制备 将小鼠脱颈椎处死后,放入75%酒精中浸泡5 min,然后无菌分离双侧股骨和胫骨并剪去骨端,用充满IMDM(Gibco)培养液的注射器冲出骨髓,再以7号针头→5号针头反复抽吸吹打以制成单细胞悬液,用白细胞稀释液稀释作骨髓有核细胞计数后备用。

1.2.2 脾细胞条件培养液的制备 将小鼠脱颈椎处死后无菌取脾脏,置于35 mm培养皿中,加入适量IMDM培养液,用无

基金项目:全军"九五"指令性攻关课题(96L045)
作者简介:孔佩艳(1958—),河南省郏县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事血液学专业的临床和科研方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755000-74609
收稿日期:2000-07-25;修回日期:2000-09-18

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

菌注射器芯轻轻碾磨挤压，去除膜块，然后经4号针头反复抽打，使成单细胞悬液，4 ℃ 1 500 r/min× 15 min 离心弃上清，再用培养液洗两次后加入培养体系中。培养体系含有1%的植物血凝素、20% FCS、100 U/ml的青霉素和0.1 mg/ml链霉素，细胞浓度为1× 10^6/ml。以每瓶10 ml的量接种于培养瓶中，置于37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱内，培养4 d或7 d，倒置显微镜下观察细胞生长良好，分布密集，吸取培养上清液，4 ℃ 1 500 r/min× 15 min 离心后收集并分装，－20 ℃冰箱保存备用。培养4 d和7 d所收集的脾条件培养液分别称为4 d SCM和7d SCM。

1.2.3 骨髓单个核细胞的分离 文献报道小鼠骨髓单个核细胞的密度在1.083～1.085之间，因此本实验以此作为分离小鼠骨髓单个核细胞的密度范围。

Percoll(Pharmacia)原液用灭菌的1.5 mol/L和0.15 mol/L的NaCl溶液配制成所需比重的分离液，加入刻度离心管中，然后将欲分离的骨髓细胞悬液以大约1∶1的比例加至分离液表面，形成清晰界面，用低温低速水平离心机4 ℃ 1 750 r/min× 25 min离心。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，重新悬浮即得到骨髓单个核细胞悬液。

1.2.4 骨髓单个核细胞的体外液体扩增体系 收集健康雄性BALB/c小鼠的骨髓细胞后，以前述的方法分离骨髓单个核细胞。

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氢化考的松、骨髓单个核细胞2× 10^5/ml。上述体系接种于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)，每组6瓶，重复实验3次。置于37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱连续培养5 d后，取出观察、照相并收集。

扩增培养所加入重组造血生长因子(rHGFs)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 U/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。

1.2.5 扩增后细胞的收集 分别收集每个培养瓶中的细胞。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。

1.2.6 骨髓粒-巨噬祖细胞克隆(CFU-GM)培养 培养体系为IMDM培养液，内含25%的马血清。加入小鼠的未经培养的BMMNC或培养后的有核细胞1× 10^5/ml后，37 ℃水浴15 min，加入琼脂(终浓度为0.2%)，然后加入重组GM-CSF 100 ng，充分混匀后置于饱和湿度5% CO_2 培养箱内，37 ℃孵育7 d，倒置显微镜下观察，计数≥50个细胞组成的细胞团为CFU-GM集落。

1.2.7 骨髓红系祖细胞(CFU-E，BFU-E)培养 每种培养体系配制2 ml，其中含10^{-4}巯基乙醇0.2 ml、3%谷氨酰胺0.03 ml、HS 0.70 ml、EPO 0.2 ml(2 U)、7 d SCM 0.1 ml、未经培养的BMMNC或扩增培养后的有核细胞2× 10^5/ml、2.7%甲基纤维素0.6 ml，充分震荡混匀后加入96孔板，每孔0.2 ml。放入饱和湿度5% CO_2 培养箱内，37 ℃孵育3 d(CFU-E)和7 d(BFU-E)，倒置显微镜下观察结果，由8个以上的细胞组成的细胞团为CFU-E；50个以上细胞组成的细胞团为BFU-E。

1.2.8 多系造血祖细胞集落培养 甲基纤维素培养体系中含马血清35%、L-谷氨酰胺3 mmol/L、2-巯基乙醇10^{-5} mol/L、EPO 1 U/ml、4 d SCM 5%、甲基纤维素0.9%和适量IMDM。加入未经培养的BMMNC或扩增培养后的有核细胞浓度为2× 10^5/ml。培养在24孔板(每孔1 ml)、37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱内进行，培养12～14 d，倒置显微镜下观察，计数CFU-GM、CFU-E、BFU-E、多向祖细胞集落(CFU-GEMM)及其它两系或三系细胞组成的混合集落，其总数即为造血集落形成细胞(CFU-Cs)数。

1.3 统计学分析

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

2 结果

2.1 对骨髓单个核细胞(BMMNC)的扩增作用

经密度为1.083～1.085的Percoll分离后的BALB/c小鼠骨髓单个核细胞在体外扩增培养5 d后，倒置显微镜下可见到细胞数明显增多，并有少量贴壁细胞形成。有核细胞总数是初始接种细胞数的(1.360±0.126)倍。半固体造血祖细胞集落培养检测结果表明，其CFU-E，BFU-E CFU-GM，CFU-Cs数量也均得到了不同程度的扩增，见表1。

表1 小鼠BMMNC体外扩增后各种造血祖细胞半固体培养分析

Tab 1 Expansion of progenitor cells in short-term cultures of BMMNC

Group	The number of colony forming cells			
	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-Cs
Uncultured cells	317.00±54.58	68.33±19.46	74.00±5.45	35.60±5.18
Expanded cells	2 151.42±295.17 *	308.33±33.96 *	131.04±35.49 *	60.40±11.56 *

*：$P<0.01$ *vs* uncultured cells

上述实验结果表明，在小鼠骨髓单个核细胞液体扩增体系中加入SCF，IL-3，IL-6，GM-CSF G-CSF及EPO等细胞因子培养5 d后，有核细胞总数扩增并不显著，但造血祖细胞却获得了明显扩增，其中CFU-E达培养扩增前的(7.04±1.26)倍，BFU-E为(4.74±1.04)倍，CFU-GM和CFU-Cs则分别为(1.78±0.47)和(1.74±0.48)倍。由此可见，在此培养体系中以红系祖细胞的扩增最为显著。

2.2 扩增后细胞集落的形态观察

对集落形态的观察结果表明，细胞因子介导扩增后细胞所产生的CFU-E、BFU-E、CFU-GM较未培养的细胞大而密集，而培养的14 d集落，两组形态相似。

研究还发现，当CFU-GM集落培养至7 d计数后，继续在原培养条件下培养至第14天，则培养和未培养细胞的CFU-GM数趋于相近($P>0.05$)。

3 讨论

利用造血干/祖细胞具有高度增殖能力和多向分化潜能的特性，短时间内在体外扩增其细胞数，尤其是扩增早期具有自我更新能力和长期重建功能的造血干/祖细胞数，以满足临床移植的需要，这即是受到实验血液学和临床血液学工作者广泛关注的造血细胞体外扩增技术，它是继输血、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[1]。

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

随着各种重组造血生长因子的相继问世与培养条件的不断优化, 造血细胞体外扩增技术近年已取得长足的进步。前已述及, 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。但输注后的移植效果却往往不能令人满意, 这一点已逐渐引起广大研究者的重视。由于临床移植的目的是使由各种原因引起的造血功能障碍患者达到满意的造血恢复和长期造血重建, 而造血干细胞才是重建造血功能的主要细胞, 因此在体外扩增的同时如何保留造血干/祖细胞的性能, 则成为本项技术研究的关键。

造血干细胞大部分处于 G_0 期, 对造血因子刺激反应并不敏感, 且经细胞生长因子作用进入细胞周期后, 往往大量增殖和过度分化, 难以维持造血干/祖细胞的性能, 这样就使得造血细胞在体外大量扩增其数量的同时, 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。因此继续寻找更合理的扩增手段, 以使这一技术更趋完善, 最终达到既扩增细胞数量又保持干细胞性能的理想境地, 才能使造血细胞体外扩增技术最终能在临床移植的实践中发挥其积极的作用。

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及辅助因子, 因此有作者认为这些成分的存在可能有利于造血干细胞的体外扩增, 并维持造血干/祖细胞造血重建的功能, 但尚未得到充分实验资料的证实。

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。结果表明, 在我们的培养条件下, 对有核细胞总数的扩增作用并不很明显, 虽然与接种的细胞数量相比较, 两者的差异具有显著性($P<0.01$), 但在数值上仅为起始培养的骨髓单个核细胞的(1.36 ± 0.126)倍, 证实了细胞因子介导进行的未分离纯化的骨髓单个核细胞的体外扩增, 并不能像文献[2] 报道的纯化 CD34 阳性细胞那样使扩增后的有核细胞总数达到几倍甚至几十倍的扩增水平, 这可能与未经纯化的骨髓单个核细胞中含有较多的分化终末细胞有关, 因为这些细胞并不再具有体外继续增殖、分化的能力, 而且在体外培养中还可能随培养时间的推移而不断发生凋亡和崩解; 此外, 这些细胞中还含有一定数量的造血辅助细胞, 如造血基质祖细胞、成熟基质细胞等, 它们可能在体外培养扩增中产生多种细胞因子, 其中除具有造血刺激作用的因子外, 还可产生抑制不同阶段细胞增殖分化的的负调控因子, 如转化生长因子-β(TGF-β), 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及白细胞介素-1(IL-1)等, 这些作用也可能使有核细胞总数的扩增受到一定的影响[9, 10]。

对于扩增后细胞中各系造血祖细胞的检测结果表明, 其中的 CFU-E, BFU-E 及 CFU-GM 和 CFU-Cs 含量均较培养扩增前有明显的增加($P<0.01$), 尤其是 CFU-E 增加最为显著, 可达到未培养前的(7.04 ± 1.26)倍, BFU-E, CFU-GM 和 CFU-CS 也分别是原来的(4.74 ± 1.04), (1.78 ± 0.47), (1.74 ± 0.48)倍, 表明在这种培养条件下, 对造血祖细胞数量较有核细胞总数有更高的扩增倍数。但由于我们检测的体外克隆形成造血祖细胞的性质分别为定向造血祖细胞和多系分化造血祖细胞, 目前认为它们可能已不具有自我更新能力和非常强的增殖能力[7], 因此这些细胞的增加对输入后促进造血功能受损机体的造血恢复和短期造血重建可能有作用, 但可能并不具备长期重建造血的能力。具有长期造血重建能力的造血干细胞和早期造血祖细胞在这种短期培养条件下不能形成造血细胞克隆[11], 对它们的检测需要长期的体外培养, 或对其输入体内后长期造血重建能力的追踪观察, 可能后者的结果更为可靠。因此下一步实验我们将准备把这些扩增后的细胞输至经致死量 γ 射线照射的小鼠体内, 观察其重建造血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, 以了解其促进造血恢复和重建造血的能力。

参考文献:

[1] Kabayashi M, Laver J H, Kato T, *et al*. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3[J]. Blood, 1996, 88(2): 429—436.

[2] 裴雪涛, 王立生, 徐　黎, 等. 造血生长因子对脐血 $CD34^+$ 细胞的体外扩增作用[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(6): 304—307.

[3] Bertolini F, Saligo D, Lazzari L, *et al*. The effect of interleukin-12 in *ex-vivo* expansion of human heamopoietic progenitors[J]. Br J Hematol, 1995, 90(4): 935—938.

[4] 王立生, 裴雪涛, 吴祖泽. 造血细胞体外扩增的研究进展及应用前景[J]. 中华血液学杂志, 1995, 16(8): 441—443.

[5] Peter S O, Kittler E L W, Ramshaw H S, *et al*. *Ex vivo* expansion of murine marrow cells with interleukin—3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impared engraftment in irradiated hosts[J]. Blood, 1996, 87(1): 30—37.

[6] Varas F, Bernard A, Bueren J A. Restrictions in the stem cell function of murine bone marrow grafts after ex vivo expansion of short-term repopulating progenitors[J]. Exp Hematol, 1998, 26(2): 100—109.

[7] Abkowitz J L, Laboada M R, Sabo K M, *et al*. The *ex vivo* expansion of feline marrow cells leads to increased numbers of BFU-E and CFU-GM but a loss of reconstituting ability[J]. Stem Cells, 1998, 16(4): 288—293.

[8] Tisdale J F, Hanazono Y, Sellers S E, *et al*. *Ex vivo* expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability[J]. Blood, 1998, 92(4): 1 131—1 141.

[9] Nemunaitis J, Tompkins C K, Andrews D F, *et al*. Transforming growth factor β expression in human marrow stromal cells[J]. Eur J Haematol 1991, 46(2): 140—148.

[10] Jacobsen S E, Jacobsen F W, Fahlman C, *et al*. TNF-alpha, the great imitator: role of p55 and p75 TNF receptors in hematopoiesis[J]. Stem Cells, 1994, 12(Suppl 1): 111—117.

[11] Gupta P, Mccarthy J B, Verfaillie C M. Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated *ex vivo* maintenance of human long-term culture-initialing cells[J]. Blood, 1996, 87(8): 3 229—3 236.

（编辑　陈聪连）

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