

人脐带和骨髓源间充质干细胞对脐血单个核细胞增殖能力的影响^{*}

张玉琳,王静文,于纪棉(宁波卫生职业技术学院人体形态学教研室,浙江宁波 315104)

【摘要】 目的 探讨人脐带间充质干细胞(UCMSCs)与骨髓间充质干细胞(BMMSCs)在体外对造血干细胞的支持作用。**方法** 分别从人脐带和骨髓中分离、培养间充质干细胞,通过免疫细胞化学染色等方法对其进行表型鉴定;采用流式细胞仪测定脐血单个核细胞的周期分布,采用甲基纤维素法测定脐血单个核细胞混合集落形成单位(CFU-Mix),比较 UCMSCs 和 BMMSCs 对脐血单个核细胞细胞周期、CFU-Mix 形成能力的影响。**结果** 成功培养获得 UCMSCs 和 BMMSCs,鉴定结果符合预期;与非共培养组细胞相比,UCMSCs 和 BMMSCs 共培养均能促进脐血单个核细胞进入增殖周期,并增加其形成 CFU-Mix 的能力($P<0.05$),但 UCMSCs 和 BMMSCs 共培养组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 成功从人脐带和骨髓组织中培养获得间充质干细胞,两种来源的间充质干细胞均能提高脐血单个核细胞的体外增殖能力及 CFU-Mix 形成能力,均具有造血支持作用。

【关键词】 脐带; 骨髓; 间充质干细胞; 体外; 脐血单个核细胞; 细胞增殖

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.04.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)04-0433-03

Effects of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord on the proliferation of umbilical cord blood mononuclear cells^{*} ZHANG Yu-lin, WANG Jing-wen, YU Ji-mian (Department of Human Morphology, Ningbo College of Health Science, Ningbo, Zhejiang 315104, China)

【Abstract】 Objective To explore the supportive effects of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human umbilical cord (UCMSCs) and bone marrow (BMMSCs) on hematopoiesis in vitro. **Methods** MSCs were isolated from umbilical cord and bone marrow, and the purity of MSCs was analyzed by immunocytochemical stain. The distribution of mononuclear cell cycle was determined by flow cytometry. Half-solid methylcellulose was used to determine the colony forming unit-mixture (CFU-mix) of umbilical cord blood mononuclear cells. Influence of UCMSCs and BMMSCs on cell cycle and forming ability of CFU-Mix among umbilical cord blood mononuclear cells were compared. **Results** UCMSCs and BMMSCs were both successfully isolated and identified. Compared with the blank control group, there were more umbilical cord blood mononuclear cells in S+G₂+M phase and CFU-mix after intervening with UCMSCs and BMMSCs ($P<0.05$), but the difference between UCMSCs and BMMSCs was not significant ($P>0.05$). **Conclusion** UCMSCs and BMMSCs were successfully isolated and identified, both of which could in vitro improve the proliferation and CFU-Mix forming ability of umbilical cord blood mononuclear cells, and might be able to support hematopoiesis.

【Key words】 umbilical cord; bone marrow; mesenchymal stem cells; in vitro; umbilical cord blood mononuclear cells; proliferation

自 1989 年世界上第一例脐血移植成功治疗白血病以来^[1],越来越多的研究者对造血干细胞的来源及其移植治疗进行了深入的研究。间充质干细胞(MSCs)来源于中胚层,是一群具有自我更新及多向分化潜能的一类多能干细胞,对机体的造血功能具有一定的支持作用。目前,应用最多且技术较成熟的是骨髓间充质干细胞(BMMSCs),但 BMMSCs 存在许多的问题而限制了其临床应用,例如,随着移植时间的延长, BMMSCs 数量显著降低、增殖分化能力大幅衰退,其制备过程也不易实现质量控制等。因此,寻找骨髓以外的 MSCs 来源极为重要^[2]。近年来,脐带间充质干细胞(UCMSCs)以其来源丰富和生物学特性适合后续处理,已成为备受关注的成体干细

胞^[3]。为探讨 UCMSCs 是否能代替 BMMSCs 用于血液系统疾病的细胞移植治疗,本实验拟通过比较 UCMSCs 与 BMMSC 对脐血单个核细胞增殖能力和混合集落形成单位(CFU-Mix)形成能力的影响,验证和分析两种 MSCs 在造血支持方面的作用的优势,为将其应用于细胞移植治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用脐带与肋骨组织均来自于宁波某医院(经医院伦理委员会许可,产妇与外科手术患者均签署知情同意书)。外科手术患者作为肋骨组织供体,均排除血液疾病。健康产妇作为脐带供体,均为足月顺产孕妇,于胎儿娩出后剪

^{*} 基金项目:浙江省教育厅科研项目课题(Y201226068)。

作者简介:张玉琳,女,讲师,硕士研究生,主要从事肿瘤病理学研究。

下约 30 cm 脐带,反复冲洗后置于预先盛有伊思考夫改良杜尔贝可培养基(IMDM 培养基)的无菌瓶中。

1.2 主要试剂 胎牛血清购自北京源洋生物公司,IMDM 培养基购自美国 Gibco 公司,胰蛋白酶、胶原酶、姬姆萨染料、多聚赖氨酸、植物血凝素(PHA)和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司,2-巯基乙醇、氯化可的松、L-谷氨酰胺购自上海源聚生物科技有限公司,丝裂霉素购自浙江海正药业公司,淋巴细胞分离液购自宁波鼎鑫生物技术有限公司,细胞免疫化学试剂盒购自北京邦定泰克生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 UCMSCs 与 BMMSCs 的分离、培养及表型鉴定 无菌条件下将肋骨剪成长度约 3 cm 的小块,用含有 100 U/mL 庆大霉素的生理盐水冲洗数次,再用装满 IMDM 培养基的注射器反复冲洗髓腔,收集细胞悬液,离心后弃上清,用 IMDM 培养基重悬后以比重为 1.077 的淋巴细胞分离液分离细胞,洗涤 2 次后备用。配制 BMMSCs 培养体系:在 IMDM 培养基中加入 BMMSCs 至终浓度 2×10^6 个/毫升,加入 12.5% 马血清、12.5% 胎牛血清、 1×10^{-7} mol/L 氯化可的松;混匀后加入 24 孔培养板内,1 毫升/孔,37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,每周半量换液 1 次,直至 BMMSCs 达 80% 以上融合时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,按 1:3 的比例传代。UCMSCs 分离培养采用组织块贴壁法^[4]。在无菌条件下将脐带用含 100 U/mL 庆大霉素的生理盐水洗涤数次,剔除脐静脉与脐动脉,充分冲洗去除血凝块,剪成大小约 1 mm³ 的碎块,先后经 0.1% 胶原酶、0.25% 胰蛋白酶消化 30 min,收集悬浮细胞,接种于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基内,37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,每 3 天半量换液 1 次,待形成纤维样细胞且细胞达到 80% 汇合时,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,按 1:3 的比例传代。取传至第 3 代的 UCMSCs 与 BMMSCs,通过细胞化学染色法进行糖原(PAS)、丁酸萘酚酯酶(NBE)和过氧化物酶(POX)检测,通过免疫组织化学染色法检测表面标志物 CD29 和 CD34(碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶染色法)。

1.3.2 脐血单个核细胞的制备 取无菌条件下新鲜采集的脐血 1 份,枸橼酸钠抗凝,2 000 r/min 离心 20 min,弃上清,向沉积细胞内按体积比 1:10 的比例加入红细胞溶解缓冲液(NH₄Cl 0.166 mol/L, KHCO₃ 0.01 mol/L, 乙二胺四乙酸四钠 0.08 mmol/L),吹打混匀后,4 ℃ 静置 10 min,1 000 r/min 离心 10 min,重复上述步骤 1 次,静置时间缩短为 2~3 min,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,调整细胞浓度待用。

1.3.3 脐血造血细胞周期测定 收集上述待测细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加生理盐水 200 μL,悬浮细胞后将细胞悬液滴加至 4 ℃ 预冷的 70% 乙醇中,混匀后离心,弃上清,生理盐水洗涤 1 次,在沉淀细胞中加入 0.1% RNase 100 μL,置 37 ℃ 水浴 30 min,过 300 目尼龙网后上机检测。

1.3.4 脐血造血细胞集落培养 脐血造血细胞集落培养采用甲基纤维素法。培养体系包括: 1×10^{-4} mol/L 二巯基乙醇 200 μL、3% L-谷氨酰胺 20 μL、马血清 500 μL、脐血条件培养液 300 μL、促红细胞生成素(EPO)2 U、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF) 1 000 IU、重组人白细胞介素-3(rhIL-3) 100 IU、重组人白细胞介素-6(rhIL-6) 1 000 IU、脐血造血细胞 5×10^4 个/毫升、3.6% 甲基纤维素 0.5 mL、补加

IMDM 培养基至 2 mL^[5],加入 24 孔培养板中,0.5 毫升/孔,混匀,37 ℃、5% CO₂、饱和湿度下培养 14 d,计数细胞,50 个细胞聚集成团时判为 1 个集落。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UCMSCs 和 BMMSCs 形态及表型鉴定 原代培养的 UCMSCs 和 BMMSCs 在 24~48 h 内均进行贴壁生长,培养 72 h 后在倒置显微镜下可见成纤维样梭形、多角形细胞,当细胞生长达到 80% 汇合时,对其进行传代,连续传 5 代,细胞形态均无明显改变(见图 1~2)。对培养第 3 代的 UCMSCs 和 BMMSCs 进行免疫组化染色检测,结果显示其表面标志物 CD29 呈阳性,而造血细胞系表面标志物 CD34 为阴性(见图 3~4),免疫细胞化学染色结果显示: PAS 和 NBE 为阳性,POX 为阴性(见图 5~6)。

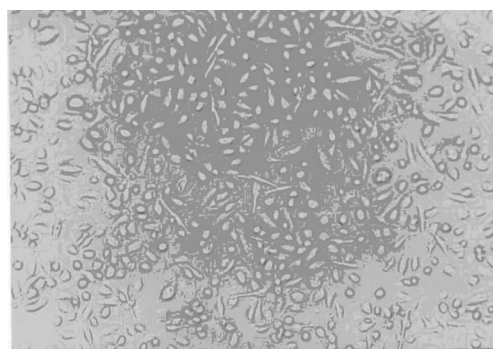


图 1 第 3 代 BMMSCs($\times 100$)

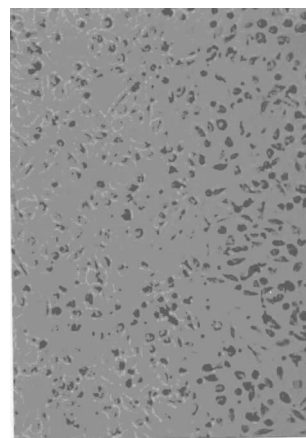


图 2 第 3 代 UCMSCs($\times 100$)

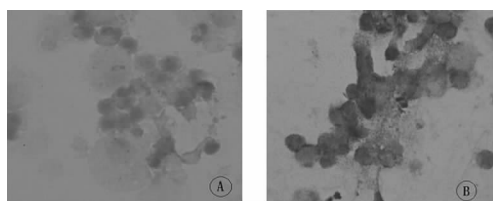


图 3 BMMSCs 表面标志物($\times 200$)

2.2 UCMSCs 和 BMMSCs 对脐血单个核细胞细胞周期、CFU-Mix 形成能力的影响 经 UCMSCs 或 BMMSCs 共培养的实验组与空白对照组相比,脐血单个核细胞 S+G₂+M 期的比例和 CFU-Mix 形成数量明显增高($P < 0.05$),见表 1。说明

两种来源的 MSCs 均能促进脐血单个核细胞进入增殖周期,并增加其形成 CFU-Mix 的能力,而两种来源的 MSCs 之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

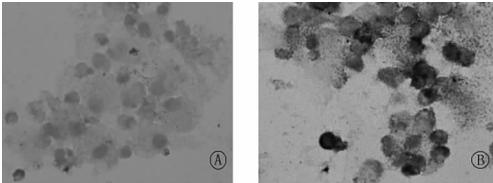


图 4 UCMSCs 表面标志物(×200)

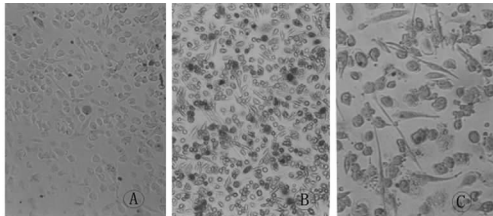


图 5 BMMSCs 细胞化学染色(×200)

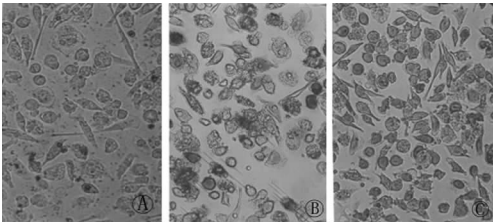


图 6 UCMSCs 细胞化学染色(×200)

表 1 UCMSCs 和 BMMSCs 对脐血单个核细胞细胞周期、CFU-Mix 形成能力的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期(%)		CFU-Mix [个/(5×10^4)]
	G ₀ /G ₁	S+G ₂ +M	
空白对照组	66.7±3.8	31.8±8.1	40.3±13.0
UCMSCs 共培养组	58.6±3.5	42.3±1.6*	57.8±4.2*
BMMSCs 共培养组	53.2±3.2	46.5±8.2*#	59.7±7.7*#

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 UCMSCs 共培养组比较,# $P>0.05$ 。

3 讨 论

造血干细胞在临床中的应用研究已较多,但在如何通过选择干细胞的来源以提高造血干细胞体外增殖能力方面尚无定论。MSCs 作为构成骨髓微环境的一部分,与造血祖细胞联合移植可加快造血干细胞移植后重建造血功能的速度,同时也能修复化疗或原发病导致的基质损伤或减轻移植抗宿主疾病(GVHD)^[6]。王丽娟等^[7]采用酶联免疫吸附法检测了 UCMSCs 的干细胞因子(SCF)、白细胞介素(IL)-3、IL-6、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达水平,结果在脐血贴壁细胞的条件培养液中检测到 SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF 和 TNF-α。TNF-α 能诱导许多造血因子 mRNA 的表达,例如 IL-1、IL-6、IL-8 和 GM-CSF。在共培养体系中,正是 MSCs 产生或诱导的多种生长因子的协同作用支持了脐血造血干/祖细胞的体外增殖和分化。与此同时,细胞与细胞间的相互作用亦可能为提高增殖潜能提供某种刺激信号。

在成人骨髓中, MSCs 通过细胞间的相互作用以及分泌造血生长因子和细胞因子,为造血干细胞的分化和增殖提供信号。Li 等^[8]的研究显示,人骨髓、脐血、脐带和胎盘来源的 MSCs 均表达 CD29、CD44、CD90、CD105,不表达 CD45、CD16、CD34、CD38、CD133 和人类白细胞抗原(HLA)-DR。本研究结果表明,脐带和骨髓来源的 MSCs 具有相似的生物学特征,也证实脐带与骨髓来源的 MSCs 均能够支持来源于同种异体的脐血造血干/祖细胞的体外增殖。虽然在本研究设计的共培养体系和非共培养体系中,培养条件是一致的,但共培养体系中造血干/祖细胞的增殖能力大大超过了非共培养体系。

大量实验研究已证实 MSCs 联合造血干细胞共移植,可减少 GVHD 的发生^[9]。骨髓作为造血干细胞移植的首选细胞来源,在临床应用已有约 50 年的历史,但采集骨髓时有可能对供者造成损伤,且骨髓疾病患者无法作为 BMMSCs 的供者供体,即使对于健康供者,骨髓的采集量亦不能太多。然而,UCMSCs 作为胎儿出生后的废弃物,具有诸多优势。本研究结果证实,UCMSCs 与 BMMSCs 具有相似的生物学特性和造血支持作用,可为造血干细胞移植治疗的细胞来源提供新的选择。

参考文献

[1] Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(10): 3828-3832.

[2] 顾蔚, 顾健. 脐带间充质干细胞的归巢机制[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6): 1135-1140.

[3] 韩之波, 杨舟鑫, 池颖, 等. 人脐带、胎盘绒毛膜来源间充质干细胞的生物学特性比较研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(3): 692-696.

[4] 张玉琳. 人脐带间充质干细胞抑制同种异体脐血淋巴细胞的转化[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(8): 930-934.

[5] 鞠晓红, 赵珍谊, 方芳, 等. 人脐血贴壁层细胞对脐血造血细胞体外扩增的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(7): 1280-1281.

[6] 乔淑敏, 陈广华, 王易, 等. 脐带间充质干细胞治疗儿童异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病疗效观察[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(3): 716-720.

[7] 王丽娟, 张叶萍, 王金福, 等. 脐血间充质干细胞的生物学特征及其对造血干/祖细胞体外扩增的支持作用[J]. 中华血液学杂志, 2005, 26(2): 65-68.

[8] Li G, Zhang XA, Wang H, et al. Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta implication in the migration[J]. Proteomics, 2009, 9(1): 20-30.

[9] McIntosh K, Klyushnenkova E, Shustova V, et al. Suppression of alloreactive T cell responses by human mesenchymal stem cells involves CD8+ cells[J]. Blood, 1999, 94(Suppl 10): S133-137.