

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.003

## 人造血干细胞在不同温度下生长、凋亡的实验研究\*

杨 鑫,周晓红<sup>△</sup>

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院,重庆 400030)

**摘要:**目的 通过观察不同温度对人造血干细胞(HSCs)生长及凋亡情况的影响,探讨不同温度对 HSCs 生长的抑制情况。**方法** 将 HSCs 在不同温度下培养分为 5 组:33℃组、35℃组、37℃组、39℃组、41℃组,其中 37℃组作为对照组。分别培养 4、7、10 d,观察红系集落形成单位(CFU-E)集落数;分别培养 6、12、24 h,观察 HSCs 细胞凋亡情况。**结果** 培养 4 d,37℃组 CFU-E 集落数最高,33℃组和 35℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );培养 7 d,37℃组 CFU-E 集落数最高,33℃组、41℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );培养 10 d 后,37℃组 CFU-E 集落数最高,33℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。培养 6 h,33℃组 HSCs 凋亡率最低,33℃组、35℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );培养 12 h,33℃组 HSCs 凋亡率最低,35℃组、39℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );培养 24 h,33℃组 HSCs 凋亡率最低,35℃组、41℃组与 37℃组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。培养 6、12、24 h,温度变化与流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率均具有相关性( $P<0.01$ )。**结论** 不同温度对 HSCs 的生长和凋亡有影响。37℃能促进 HSCs 的生长,温度降低可以抑制 HSCs 的凋亡。

**关键词:**人造血干细胞; 温度; 生长; 凋亡

中图分类号:R318.52

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)20-3011-03

## Experimental study on growth and apoptosis of human hematopoietic stem cells in different temperatures\*

YANG Xin, ZHOU Xiaohong<sup>△</sup>(Affiliated Tumor Hospital of Chongqing University/Chongqing Municipal Tumor Institute/  
Chongqing Municipal Tumor Hospital, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the inhibiting situation of different temperatures on the growth of human hematopoietic stem cells (HSCs) by observing the influence of different temperatures on growth and apoptosis of HSCs. **Methods** HSCs cultured under different temperatures were divided into 5 groups: 33℃, 35℃, 37℃, 39℃ and 41℃, in which the 37℃ group served as the control group, and cultured for 4, 7, 10 d. The colony number of the erythroid colony forming unit (CFU-E) was observed and the apoptotic situation of HSCs after culture for 6, 12, 24 h was observed. **Results** After 4 d culture, the colony number of CFU-E in the 37℃ group was the highest, which had statistical difference between the 33℃ group and 35℃ group with 37℃ group; after 7 d culture, the colony number of CFU-F in the 37℃ group was the highest, which had statistical difference between the 33℃ group and 41℃ group with the 37℃ group ( $P<0.05$ ); after 10 d culture, the colony number of CFU-E in the 37℃ group was the highest, which had statistical difference between the 33℃ group and 37℃ group ( $P<0.05$ ). After 6 h culture, the apoptotic rate of HSCs in the 33℃ group was the lowest, which had statistical difference between the 33℃ group and 35℃ group with the 37℃ group ( $P<0.05$ ); after 12 h culture, the apoptotic rate of HSCs in the 33℃ group was the lowest, which had statistical difference between the 35℃ group and 39℃ group with the 37℃ group ( $P<0.05$ ); after 24 h culture, the apoptotic rate of HSCs in the 33℃ group was the lowest, which had statistical difference between the 35℃ group and 41℃ group with the 37℃ group ( $P<0.05$ ). After culture for 6, 12, 24 h, the temperature change had the correlation with HSCs apoptosis rate detected by flow cytometry. **Conclusion** Different temperatures have the effect on the growth and apoptosis of HSCs. 37℃ can promote the growth of HSCs and the temperature decrease can inhibit the apoptosis of HSCs.

**Key words:** human hematopoietic stem cells; temperature; growth; apoptosis

\* 基金项目:重庆市卫生局医学技术研究项目(2010-2-314)。

作者简介:杨鑫,男,主治医师,主要从事肿瘤的基础和临床研究。△ 通信作者,E-mail:117289462@qq.com。

人造血干细胞(HSCs)具有自我更新能力并能分化为各种血细胞前体细胞,最终生成各种血细胞成分(包括红细胞、白细胞和血小板),HSCs也可以分化成其他细胞。有研究者在1961年通过“脾集落形成试验”,首先描述了HSCs的特性。威斯康星大学的THOMSON等<sup>[1]</sup>在1988年成功建立了胚胎干细胞系。在此之后,HSCs被进一步分化为神经细胞、造血细胞、肌肉细胞、胰岛细胞、心肌细胞、内皮细胞等<sup>[2-5]</sup>。HSCs良好的分化增殖能力对患者损伤组织的修复具有重要意义,使得干细胞能更加广泛地应用于临床。温度在细胞的培养条件中至关重要,有研究发现温度环境对细胞的生长和凋亡有影响<sup>[6-9]</sup>。目前关于温度影响HSCs生长和凋亡方面的报道较少。因此,本研究以温度作为干预条件,观察不同温度下体外培养HSCs的生长及凋亡情况,为进一步科研和临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 上海拜沃生物科技有限公司提供HSCs。

**1.2 仪器与试剂** RPMI1640培养液(上海元龙生物技术有限公司),IMDM培养基(GIBCO公司),Metho Cult™ HCC4230培养基(加拿大Stem cell Technologies Inc公司),Annexin V(美国Becton, Dickinson and Company),二氧化碳培养箱(美国Thermo Fisher公司),LHC-250-I恒温恒湿二氧化碳培养箱(北京陆希科技有限公司),CKC-TR-2W型倒置显微镜(Olympus公司),YJ-875型超净化工作台(苏州安泰净化设备厂),6孔培养板(北中杉金桥生物技术有限公司),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(南京碧波生物科技有限公司),BD-CAN7型流式细胞仪(美国Becton, Dickinson and Company)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** HSCs采用10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养。

**1.3.2 不同温度的细胞培养处理** 将HSCs分成实验组和对照组。实验组细胞在恒温恒湿二氧化碳培养箱中培养的温度分别设定为33、35、39、41℃;对照组细胞在恒温恒湿二氧化碳培养箱中培养的温度设定为37℃。

**1.3.3 红系集落形成单位(CFU-E)集落培养** 采用Metho Cult™ HCC4230培养基,0.9 mL培养基加入0.1 mL的细胞悬液(细胞密度为每升 $2 \times 10^9$ 个),用IMDM补充为1 mL,充分混匀后转移至35 mm的6孔培养板,每个标本重复5孔,置不同温度下培养,饱和湿度的培养箱内,培养4、7、10 d分别计数CFU-E集落,以含50个细胞以上的细胞团为1个集落。

**1.3.4 流式细胞仪检测HSCs凋亡率** 采用10%胎牛血清的RPMI1640培养基,0.9 mL培养基加入0.1 mL的细胞悬液(细胞密度为每升 $2 \times 10^9$ 个),用IMDM补充为1 mL,将HSCs在不同温度下分别培养

6、12、24 h,使用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,通过流式细胞仪检测HSCs凋亡率。

**1.3.5 相关性分析** 不同温度(33、35、37、39、41℃)下培养6、12、24 h,研究不同温度变化和流式细胞仪检测HSCs凋亡率的相关性分析。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS20.0统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时间、不同温度下的数据间比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验;相关性分析采用Pearson相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HSCs染色结果** 经HE染色,细胞呈扁平状向外延伸生长,细胞核呈紫蓝色,细胞质和细胞外基质呈红色,见图1。

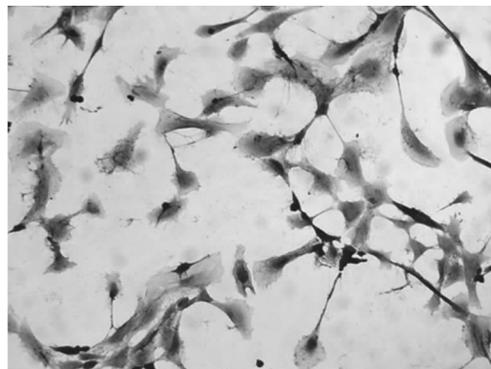


图1 HSCs染色结果(HE, ×400)

**2.2 CFU-E集落分析结果** 培养4 d,37℃组(对照组)CFU-E集落数最高,33℃组和35℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );培养7 d,37℃组CFU-E集落数最高,33℃组、41℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );培养10 d,37℃组CFU-E集落数最高,33℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

表1 CFU-E集落分析( $\bar{x} \pm s$ ,个)

组别	CFU-E集落		
	4 d	7 d	10 d
33℃组	0.800 ± 0.447*	2.200 ± 0.837*	4.000 ± 0.707*
35℃组	1.200 ± 0.447*	3.800 ± 2.167	6.600 ± 2.408
37℃组	2.200 ± 1.447	5.400 ± 2.074	9.800 ± 2.589
39℃组	1.800 ± 0.837	4.200 ± 2.588	7.600 ± 2.702
41℃组	1.400 ± 1.140	3.400 ± 0.548*	5.400 ± 2.702

注:与37℃组比较,\* $P < 0.05$

**2.3 流式细胞仪检测HSCs凋亡率** 培养6 h,33℃组HSCs凋亡率最低,33℃组、35℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );培养12 h,33℃组HSCs凋亡率最低,35℃组、39℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );培养24 h,33℃组HSCs凋亡率最低,35℃组、41℃组与37℃组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表 2 流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	凋亡率		
	6 h	12 h	24 h
33 ℃组	1.200±0.837*	5.200±1.924	11.400±3.647
35 ℃组	5.000±1.000*	10.600±4.775*	18.000±1.581*
37 ℃组	8.800±2.588	14.600±2.074	22.800±4.817
39 ℃组	10.200±1.924	15.800±5.630*	24.200±4.604
41 ℃组	13.600±3.975	19.600±3.975	27.000±1.871*

注:与 37 ℃组比较, \*  $P < 0.05$

**2.4 相关性分析** 分别培养 6、12、40 h, 在不同温度下流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率; 培养 6 h 后温度变化与流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率具有相关性( $r = 0.888, P < 0.01$ ); 培养 12 h 后温度变化与流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率具有相关性( $r = 0.795, P < 0.01$ ); 培养 24 h 后温度变化与流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率具有相关性( $r = 0.834, P < 0.01$ )。

### 3 讨 论

HSCs 在一定的温度条件下才能维持生命和代谢, 根据细胞周围环境中温度的差异, 其生物学行为也会随之表现不同。细胞在人体内生存的平均温度为 37 ℃, 因此目前细胞培养大多采用 37 ℃作为标准温度。温度的变化对细胞的生长和凋亡存在一定的影响, 温度的变化也促成了胚胎发育和多种病变的发展<sup>[10-14]</sup>。但目前对于 HSCs 的培养多采用常温环境, 这与其在体内存在的具体环境存在一定的差异, 因此采用不同温度培养 HSCs 可更加真实地模拟其体内外的生长环境。

作为前体细胞的 HSCs 最大的特点就是具有高度自我更新、自我修复和多向分化的能力。HSCs 的复制、增殖、多向分化、归巢后重建造血、凋亡等生物功能受到周围各种环境因素的影响。HSCs 主要生存于骨髓区、静脉血、动脉血中, 37 ℃是其生存的平均温度, 人体各个器官和组织的温度存在差异, 在 HSCs 移植过程中温度也必然发生变化, 温度的变化也将影响 HSCs 的各项生物学功能<sup>[15]</sup>。本研究中将各组温度设定为 33、35、37、39、41 ℃, 正是要观察 HSCs 在不同温度下的生长情况, 而关于这方面的研究国内外报道较少。

本研究发现 HSCs 培养 4、7、10 d, 37 ℃组 CFU-E 集落数最高; HSCs 培养 6、12、24 h, 33 ℃组 HSCs 凋亡率最低。由此推测, 不同温度对 HSCs 的生长和凋亡有影响。37 ℃能促进 HSCs 的生长, 温度降低可以抑制 HSCs 的凋亡, 为今后的临床试验提供了依据。

### 参考文献

[1] THOMSON J A, ITS KOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S

S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.

[2] PRECIOUS S V, ZIETLOW R, DUNNETT S B, et al. Is there a place for human fetal-derived stem cells for cell replacement therapy in Huntington's disease[J]. Neurochem Int, 2017, 106(1): 114-121.

[3] 李献帅, 袁树民, 穆军升, 等. 悬浮培养诱导人胚胎干细胞分化为心肌细胞的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(1): 93-97.

[4] GOLAS M M, SANDER B. Use of human stem cells in Huntington disease modeling and translational research[J]. Exp Neurol, 2016, 278(1): 76-90.

[5] 时洋, 沈军生, 毋涛涛, 等. 人胚胎干细胞向内皮细胞的分化诱导[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(32): 3394-3399.

[6] LIN C Y, HUANG Z, WEN W, et al. Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123562.

[7] ITO A, NAGAI M, TAJINO J, et al. Culture temperature affects human chondrocyte messenger RNA expression in monolayer and pellet culture systems[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128082.

[8] PEEKEN J C, VAUPEL P, COMBS S E, et al. Integrating hyperthermia into modern radiation oncology: what evidence is necessary[J]. Front Oncol, 2017, 7(1): 132-136.

[9] 蒋文, 边莉, 李瑰琦, 等. 蛋白激酶 C- $\delta$  在热诱导舌鳞癌 Tca8113 细胞凋亡中的作用研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(5): 539-542.

[10] ARMSTRONG J P, PERRIMAN A W. Strategies for cell membrane functionalization[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(10): 1098-1106.

[11] NETTLESHIP J E, WATSON P J, RAHMAN-HUQ N, et al. Transient expression in HEK 293 cells: an alternative to E. coli for the production of secreted and intracellular mammalian proteins[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1258(1): 209-222.

[12] 田亚丽, 张晓霞. BT 细胞在不同温度, 时间下的维持及传代细胞生长试验[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(3): 37-38.

[13] AL ASMARI A K, AL SADOON K T, OBAID A A, et al. Protective effect of quinacrine against glycerol-induced acute kidney injury in rats[J]. BMC Nephrol, 2017, 18(1): 41-49.

[14] 庄园. 不同高温温度致神经上皮细胞凋亡的研究[J]. 科技信息, 2011, 29(27): 807-808.

[15] 沈雪, 李光勤. 体温调节异常的神经系统损害[J]. 中国医药导报, 2014, 11(30): 155-158.

(收稿日期: 2018-01-28 修回日期: 2018-04-11)