

脐血造血细胞的体外扩增 :1. 生长规律的研究

张元兴 应小飞 谭文松

(华东理工大学生物反应器工程重点实验室 上海 200237)

摘 要 考察了在添加细胞因子和未添加细胞因子培养条件下的造血细胞群体的生长和代谢,研究了长期培养条件下造血祖细胞生长规律。在静态培养条件下,脐血造血细胞群体的比生长速率为 0.34d^{-1} ,倍增时间为 2d。培养后期,造血细胞消耗了大部分葡萄糖,乳酸浓度可达 40 mmol/L 。在造血细胞长期培养条件下,CFU-GM 产出最高峰在培养第 2 周与第 3 周之间。BFU-E 产出最高峰在培养第 1 周。每天换 50% 培养液,造血细胞总数扩增了 14 倍,CFU-GM 扩增了 13 倍,BFU-E 扩增了 5 倍。

关键词 造血细胞,生长动力学,细胞培养

中图分类号 Q953.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0623-04

用于体外重建造血组织的造血细胞除了来自骨髓外,也可以来自外周血、胎肝和脐血^[1]。脐血来源丰富,含有较丰富原始的造血干/祖细胞^[2]。因此,在实验过程中选择了脐血单个核细胞为对象,研究了造血细胞在体外的生长、代谢和扩增。

细胞生长的生化环境对细胞生长起着很重要的作用。所谓生化环境,指的是细胞培养液的成份、浓度、代谢产物的积累等与细胞生长和代谢直接相关的因素。考察生化环境对造血细胞的生长、增殖和代谢的影响,能为造血细胞体外培养的研究、工艺设计和反应器放大提供重要信息。因此,我们考察了在不同生化环境下造血细胞群体和祖细胞生长扩增以及代谢的规律。

1 材料与方法

1.1 脐血来源

健康新生儿的产妇分娩后,立即无菌采集脐血(加肝素钠 20u/mL)。脐血由国际妇婴保健院和上海市第六人民医院提供。

1.2 脐血单个核细胞分离

采用淋巴细胞分离液(上海试剂总厂, 1.077g/mL)梯度离心(Beckman, 300g)分离脐血单个核细胞。然后用 IMDM 培养基(GIBCO)洗涤 3 次。脐血单个核细胞采用台盼蓝染色计数,实验用的单个核细胞细胞存活率大于 98%。

1.3 甲基纤维素半固体培养 CFU 分析

半固体培养体系为 IMDM 培养基添加 30% 胎牛血清(GIBCO), 4 mmol/mL 谷氨酸胺(Sigma), 0.01mmol/L 2-巯基乙醇(Sigma), 0.9% 甲基纤维素(Sigma),以及重组造血细胞生长因子。这些造血细胞生长因子包括干细胞因子(SCF)、白细胞介素 3(IL-3)、粒-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、粒细胞刺激因子(G-CSF)和促红细胞生成素(EPO)。最终以细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 在 35mm 培养皿(Nunc)中接种 1mL 细胞悬浮液后在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的恒湿二氧化碳培养箱中培养。培养 14 d 后,进行粒-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)、混合集落形成单位(CFU-Mix)和红系爆发式形成单位(BFU-E)集落计数,大于 50 个细胞为集落。

1.4 脐血单个核细胞(CB-MNCs)体外培养

体外培养体系由 IMDM 培养基添加 15% 胎牛血清、15% 马血清(GIBCO), 0.01mmol/L 氢化可的松(Sigma)以及相应的造血细胞生长因子(是否添加细胞因子根据实验要求)构成。脐血单个核细胞置于 24 孔板(Nunc),每孔 1mL 细胞悬浮液,在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的恒湿二氧化碳培养箱中培养。

2 结果与讨论

2.1 批培养造血细胞群体生长动力学

2.1.1 未添加造血细胞生长因子时脐血单个核细

胞群体生长规律:在没有添加造血细胞生长因子情况下,造血细胞单个核细胞群体生长曲线如图 1 所示。造血细胞单个核细胞生长速率很低。在接种浓度为 2×10^5 或 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 时,造血细胞单个核细胞群体很少生长,第 5 天以后,细胞停止生长,细胞数开始逐渐减少。第 10 天后,细胞数已经很少。从细胞代谢情况来看,葡萄糖消耗量不大,乳酸的积累也不高(图 2)。培养 12d 后,乳酸浓度接近 7 mmol/L 。培养 10d 后,在光学显微镜下观察到细胞的体积逐渐膨大,细胞的表面比较粗糙。造血细胞已进入死亡期。此时葡萄糖还远远没有被消耗完,乳酸的浓度也不高,它们都不可能是细胞存活的限制因素。由此可见,在批培养条件下,没有添加造血生长因子,也没有使用能分泌一些造血细胞生长因子的基质细胞(Tromal cells)^[3,4],造血细胞单个核细胞在体外不能得到有效扩增。

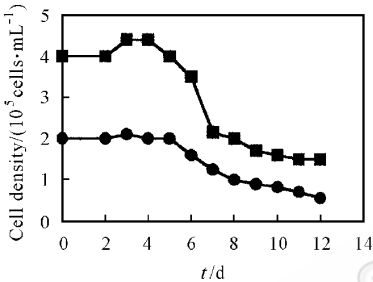


图 1 在不添加造血细胞生长因子下,造血细胞的群体生长

Fig. 1 Growth kinetics of hematopoietic cell population in batch cultures without hematopoietic growth factors
CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 (●) or 4×10^5 (■) cells/mL in 24-well plate. To each well 1 mL cell suspension was added

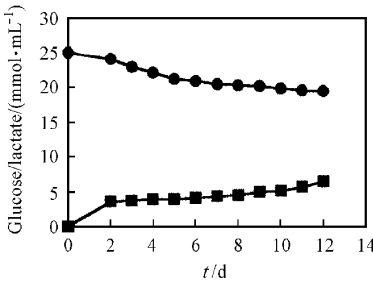


图 2 在不添加造血细胞生长因子的造血细胞分批培养中,葡萄糖的利用和乳酸的生成

Fig. 2 Glucose uptake (●) and lactate formation (■) in batch culture of hematopoietic cells without hematopoietic growth factors

CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 cells/mL in 24-well plates. To each well 1 mL cell suspension was added

2.1.2 添加造血细胞生长因子时造血单个核细胞群体生长规律:在没有进行培养液更换的情况下,造血单个核细胞群体生长曲线如图 3 所示。在培养前 2 d,造血细胞处于延迟期,生长非常缓慢。第 3 天开始,细胞数上升,造血细胞进入生长期。在指数生长期,利用如下公式: $dX/dt = \mu X$ 可得造血细胞在静态培养时比生长速率为 0.34 d^{-1} ,倍增时间约为 2d。培养第 10 天,造血细胞数达到最高。随着造血细胞的大量繁殖,培养基中的营养物质迅速消耗,加之有害代谢物的积累,造血细胞的生长速率下降。培养第 10 天后,造血细胞进入静止期。培养第 12 天以后,造血细胞数开始下降,造血进入死亡期,活细胞浓度不断下降。

2.2 添加细胞生长因子时造血细胞群体代谢

从造血细胞代谢曲线(图 4)可以看出,在造血细胞培养的前 3 d,葡萄糖消耗缓慢,乳酸生成量较少。因为此时造血细胞分裂非常缓慢,造血细胞代谢不旺盛。培养 4 d,造血细胞进入生长期,造血细胞代谢明显加快。随着造血细胞数的快速增加,细胞对葡萄糖的消耗加快,乳酸的生成量明显增多。培养 10 d 后,造血细胞进入静止期,细胞已消耗了大部分葡萄糖,葡萄糖从最初浓度 25 mmol/L 下降到 7 mmol/L ,乳酸的浓度达到 35 mmol/L 。这样高的乳酸浓度,可能对造血细胞生长产生抑制作用。

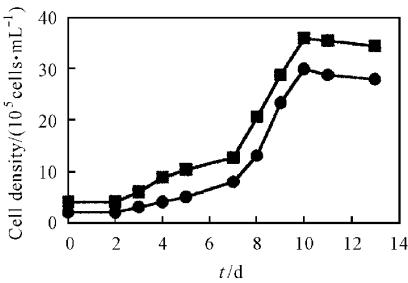


图 3 在添加造血细胞生长因子下,分批培养的造血细胞的生长

Fig. 3 Growth of hematopoietic cells in batch culture supplemented with hematopoietic growth factors
CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 (●) or 4×10^5 (■) cells/mL in 24-well plates
To each well 1 mL medium supplemented with recombinant hematopoietic growth factors SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF and EPO was added at the beginning of culture

2.3 细胞接种量对细胞生长的影响

对于悬浮培养的哺乳动物细胞来说,接种密度一般要求不低于 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ ^[5]。通过对造血细胞单个核细胞的研究,我们也发现了类似的规律。

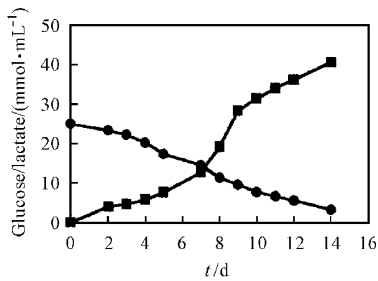


图 4 在添加造血细胞生长因子的造血细胞分批培养中,葡萄糖的利用和乳酸的生成
Fig. 4 Glucose uptake (●) and lactate formation (■) in batch culture of hematopoietic cells supplemented with hematopoietic growth factors

CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 cells/mL in 24-well plates. Each well 1 mL suspension in medium supplemented with recombinant hematopoietic growth factors SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF and EPO was added at the beginning of culture

图 5 表示了静态培养时不同接种密度对造血细胞生长的影响。由图可见,当接种密度为 8.0×10^5 /mL 时,细胞适应期很短,第 8 天以后达到最大细胞密度。当接种量为 2.0×10^5 和 4.0×10^5 /mL 时,造血细胞生长与更高接种量时的情况相似。二者都要经过一个适应期,且达到最大细胞密度的时间比更高接种量时要迟 2~3d。当接种量为 0.5×10^5 /mL 时,造血细胞生长非常缓慢,并且达到的最大细胞密度远比高接种量时低。

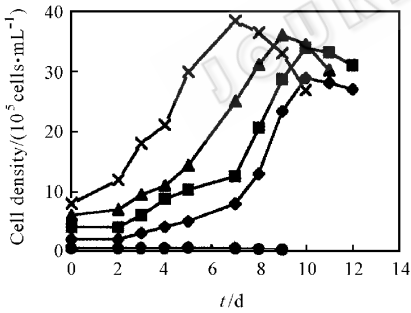


图 5 细胞接种密度对造血细胞生长的影响
Fig. 5 Effects of initial cell densities on growth of hematopoietic cells.

CB MNCs were inoculated at an initial density of 0.5 (●) 2 (◆) 4 (▲) 8 (×) $\times 10^5$ cells/mL in 24-well plates.

To each well 1 mL cell suspension in medium supplemented with recombinant hematopoietic growth factors SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF and EPO was added at the beginning of culture

细胞接种量对细胞生长的影响可以用细胞间协同作用来解释。细胞在生长过程中,合成一些对细胞生长必不可少而在培养基中不存在或不足的因素,只有这些因素积累到临界浓度以上,细胞才能生

长。因此要获得一定浓度的这些因子,必须有一定的细胞接种密度。对于造血细胞,在静态培养时,建议接种密度为 $2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ /mL 比较合适。

2.4 造血细胞长期培养动力学

2.4.1 造血细胞长期培养的群体扩增:在添加细胞因子或未添加细胞因子和每天更换 50% 培养基(轻轻移去上清,避免移走细胞)的培养条件下,造血细胞群体生长曲线如图 6 所示。在添加细胞因子的情况下,在培养前 3 个星期,造血细胞单个核细胞在扩增,到第 3 个星期,造血细胞总细胞扩增数达到最高峰,扩增倍数(=产出细胞数/接种细胞数)为 14。然后,扩增倍数逐渐下降,在第 5 星期,扩增倍数为 6。在没有添加细胞因子情况下,造血细胞只有在第 1 星期有轻微扩增。从第 2 星期开始,造血细胞总细胞扩增数逐渐下降。从长期培养生长曲线可知,在静态培养条件下,造血细胞在一定培养时间内扩增倍数最大,因此,要获得最多造血细胞数,存在一个最佳收获时间。对于总细胞数产出而言,最佳的收获时间在培养开始后的第 2 星期与第 3 星期之间。

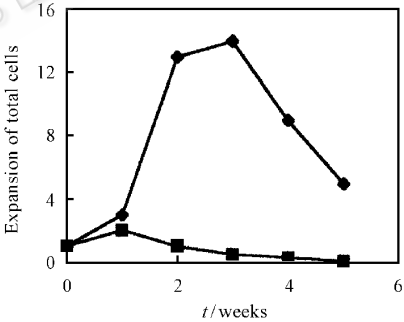


图 6 单核细胞在悬浮培养中的扩增
Fig. 6 The expansion of MNCs in suspension culture with (◆) or without (■) the hematopoietic growth factors

CB MNCs were inoculated at an initial density of 4×10^5 cells/mL in 24-well plates. To each well 1 mL cell suspension in medium supplemented recombinant hematopoietic growth factors SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF and EPO was added at the beginning of culture

2.4.2 造血祖细胞的扩增:在造血细胞长期培养条件下,造血祖细胞扩增动力学如图 7 所示。

对于 CFU-GM 而言,CFU-GM 数在培养过程中不断增加,直到第 2 星期,此时 CFU-GM 数达到最大值,扩增了 13 倍,然后 CFU-GM 数基本上保持不变。从第 4 星期开始,CFU-GM 数开始下降。到第 5 星期,CFU-GM 数接近于接种时 CFU-GM 数。从 CFU-GM 扩增曲线和造血细胞群体的扩增的比较可知,CFU-GM 数变化与造血细胞总细胞数变化相一致。

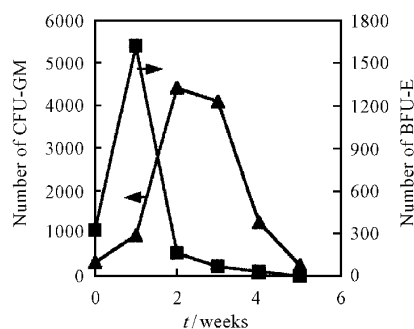


图7 造血细胞长期培养中 CFU-GM 和 BFU-E 生成动力学

Fig. 7 The productions of CFU-GM (▲) and BFU-E

(■) in long-term hematopoietic cell culture.

CB MNCs were inoculated at an initial density of 4×10^5 cells/mL in 24-well plates. To each well 1 mL cell suspension in medium supplemented with recombinant hematopoietic growth factors CSF, IL-3, IL-6, GM-CSF and EPO was added at the beginning of culture

对于 BFU-E 而言,只有在第 1 星期中有 BFU-E 扩增,扩增了 5 倍,从第二星期开始,BFU-E 开始迅速下降。到培养的第 4 星期,很少看到 BFU-E。从造血祖细胞扩增动力学曲线可得到一个重要结论:对于 CFU-GM 和 BFU-E 有不同最佳收获时间。CFU-GM 最佳收获时间在培养后第 2 星期与第 3

星期之间,而 BFU-E 最佳收获时间在第 1 星期。Palsson 等^[6]在灌注培养系统培养骨髓造血细胞中发现 CFU-GM 最佳收获时间是在培养后第 10 天,BFU-E 最佳收获时间为培养后第 4 天。最佳收获时间不同的原因可能在于两个方面,一是造血细胞的来源不同,另一个是培养系统的差别。

3 结 论

本文主要研究了在不同培养条件下脐血中造血祖细胞、造血细胞群体体外生长规律。考察了在添加细胞因子和未添加细胞因子培养条件下的造血细胞群体的生长和代谢,研究了长期培养条件下造血祖细胞生长的规律。得出结论为:1)在静态培养条件下,脐血造血细胞群体的比生长速率为 $0.34d^{-1}$,倍增时间为 2d 左右;2)在静态培养条件下,到了培养后期,造血细胞消耗了大部分葡萄糖,乳酸的浓度为 40mmol/L 左右;3)在造血细胞长期培养条件下,CFU-GM 产出最高峰在培养 2 周与 3 周之间,BFU-E 产出最高峰在培养第 1 周;4)在每天换 50% 培养液培养的情况,造血总细胞数扩增了 14 倍,CFU-GM 扩增了 13 倍,BFU-E 扩增了 5 倍。

参 考 文 献

- [1] Sandstrom C S, Miller W M, Papoutsakis E T. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 706~733
- [2] Apperley J F. *Bone Marrow Transplant*, 1994, **14**: 187~196
- [3] Muller-Sieburg C E. *Stem Cells*, 1995, **13**: 477~486
- [4] Koller M R, Manchel I, Palson B O et al. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **50**: 505~513
- [5] 孙祥明, 谭文松, 张元兴等. *华东理工大学学报*, 1999, **25**: 367~370
- [6] Palsson B O, Paek S H, Schwartz R M et al. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 368~371

The ex vivo Expansion of Cord Blood Hematopoietic Cells: 1. Cell Growth Behavior

ZHANG Yuan-Xing YING Xiao-Fei TAN Wen-Song

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract The population growth and metabolism of hematopoietic cells from cord blood were investigated without and with hematopoietic growth factors and the long-term growth kinetics of cells was studied. In static cultivation of hematopoietic cells, the population specific growth rate was $0.34 d^{-1}$, and the average double time 2 days. The greater part of glucose was consumed and 40 mmol/L lactate was formed during cell culture. For the long-term culture, the maximum output of CFU-GM appeared between the 2nd and 3rd weeks and that of BFU-E in the first week. With 50% medium exchange, the expansions of total cells, CFU-GM and BFU-E came up to 14, 13, and 5 times, respectively.

Key words Hematopoietic cell growth behavior, cell culture