

脐血造血细胞的体外扩增 2. 造血细胞生长因子和 培养液更换的作用

应小飞 张元兴* 谭文松

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘 要 研究了造血干细胞生长因子、白介素-3、白介素-6、粒-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子及红细胞生成素对脐血造血细胞体外培养的影响及其剂量关系, 考察了造血细胞因子单独与联合作用对造血细胞体外培养的影响, 证实细胞因子组合使用比细胞因子单独使用效果更好, 发现 SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF + EPO 组合对总细胞扩增最佳, SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF 组合对 CFU-GM 扩增最佳。实验发现培养液更换可大大提高脐血造血细胞总数和祖细胞数产出。在每天更换 50% 培养液下, 脐血总细胞数在第三周扩增了 27 倍, 祖细胞数扩增了 21 倍。

关键词 造血细胞 细胞因子 培养液更换 扩增 细胞培养

中图分类号 Q953.31 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0713-05

造血细胞生长因子是细胞因子的一个重要组成部分, 在血细胞生成和调节机制中有重要的意义^[1]。这些因子主要包括干细胞因子(SCF), 多功能性集落因子(Multipotent-CSF)即白细胞介素-3(IL-3), 白细胞介素-6(IL-6), 粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)及红细胞生成素(EPO)。这些因子协同地或单独地调节造血多能性细胞的增生、分化和生存以及成熟血细胞的一些机能。IL-3 直接刺激多能性干细胞的生长和发育以及各类前阶段祖细胞, 并导致各类粒细胞的成熟^[2]; GM-CSF 促进中性粒细胞、红细胞和嗜酸性细胞前阶段祖细胞的生长和发育; SCF 作用于造血干/祖细胞, 促进其分化和增殖^[3]; GM-CSF 促进粒细胞集落形成单位(CFU-G)发育成粒细胞; EPO 刺激红细胞的增生和成熟。

研究表明^[4,5], 不同培养液更换频率对造血基质细胞分泌细胞因子功能有很大影响。因此, 在造血细胞批培养后期, 如果没有培养液的更换, 营养成份的耗竭和代谢副产物的积累均可能抑制造血细胞的进一步生长^[6,7]。更换新培养液补充了营养成分和移走部分代谢副产物, 可以减轻批培养后期产生的不良影响。所以, 我们采用了 4 种不同培养液更换频率, 来考察更换频率对造血细胞扩增的影响。

1 材料与方法

1.1 脐血来源

脐血由国际妇婴保健院和上海市第六人民医院提供^[8]。

1.2 细胞因子

考察的 6 种造血细胞生长因子都是基因重组产品。干细胞因子(SCF)购自 Sigma, 白细胞介素 3(IL-3), 白细胞介素 6(IL-6), 粒-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和粒细胞刺激因子(G-CSF)购自北京原平生物公司, 红细胞生成素(EPO)来自第二军医大学克隆公司。

1.3 方法

脐血单个核细胞(MNCs)分离、甲基纤维素半固体培养集落形成单位(CFU)分析和脐血单个核细胞体外培养已在本文描述^[8]。

在培养液更换对细胞生长影响的实验中, 脐血单个核细胞接种密度为 2×10^5 /mL。根据培养经验, 取 4 种不同培养液更换频率: 每天更换 50% 培养液, 每 2 天更换 50% 培养液, 每 3 天更换 50% 培养液和没有培养液更换。换液方法为用 1 mL 移液管从静置的培养板中轻轻移去 0.5 mL 上清, 添加等量的新鲜培养液。

2 实验结果与讨论

2.1 6种细胞因子对脐血 MNCS 半固体培养集落形成的影响

实验考察了6种细胞因子(SCF, 100 ng/mL; G-CSF, 100 u/mL; GM-CSF, 200 u/L; IL-3, 100 u/mL; IL-6, 100 u/mL; EPO, 2 u/mL)对脐血 MNCs 体外半固体培养形成 CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix 集落的影响(图1)。对于 CFU-GM 集落, GM-CSF 的作用最明显, 生成 CFU-GM 最多, 其次为 G-CSF 的作用, 然后为 SCF、IL-6 和 IL-3 的作用。EPO 作用生成 CFU-GM 集落数很少。另外, 它们单独作用时形成 CFU-GM 集落的形态也有不同。SCF 和 IL-3 作用与 GM-CSF、G-CSF 和 IL-6 作用相比, 形成的集落尺寸大, 细胞数多。

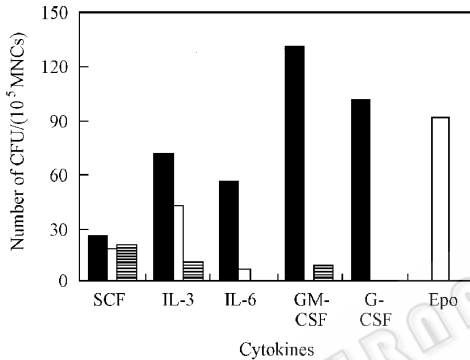


图1 不同细胞因子对 CFU-GM, BFU-E 和 CFU-Mix 的作用

Fig. 1 Effects of different cytokines on CFU-GM (■) and BFU-E (□) and CFU-Mix (▨)

1×10^5 cells were seeded in 35-mm Petri-dish

with 1 mL medium supplemented with 0.9% methylcellulose and 30% FBS and the examined cytokine.

对于 BFU-E 集落形成, EPO 作用形成 BFU-E 集落数最多, 其次为 IL-3 和 SCF。GM-CSF 和 G-CSF 对 BFU-E 集落形成数几乎没有影响。在体外半固体培养体系中, 单独使用 GM-CSF 和 G-CSF 时很少可以看到 BFU-E 集落形成。

对于 CFU-Mix 集落形成, 当这 6 种细胞因子单独添加时, 只有添加 SCF 和 IL-3 这两种因子的培养体系才形成 CFU-Mix 集落。EPO、G-CSF 和 GM-CSF 单独作用时培养体系不能形成 CFU-Mix 集落。

从上述结果可以看出, 每种细胞因子对脐血 MNCs 体外半固体集落培养的效果是不一样的。对于 CFU-GM 集落, 细胞因子的作用大小顺序为 GM-CSF > G-CSF > IL-6 > SCF、IL-3 > EPO; 对于

BFU-E, 其作用大小顺序为 EPO > SCF、IL-3、IL-6 > GM-CSF、G-CSF; 对于 CFU-Mix, 其作用大小顺序为 SCF、IL-3 > GM-CSF、G-CSF、EPO。从生成不同类型造血祖细胞集落, 可以看出每种细胞因子对不同阶段造血细胞形成的作用是不一样的。SCF、IL-3 和 IL-6 主要作用于早期造血祖细胞, GM-CSF、G-CSF 和 EPO 则作用于较晚期造血祖细胞。

2.2 细胞因子剂量与造血细胞集落形成的关系

实验发现, 不仅不同细胞因子对集落形成有不同影响, 而且集落形成数对同一细胞因子的不同浓度也相当敏感。不同剂量的 GM-CSF 和 G-CSF 对 CFU-GM 集落形成数和不同剂量的 EPO 对 BFU-E 集落形成数都有一定影响。当细胞因子浓度比较低时, 集落形成较少。随着细胞因子浓度增加, 集落形成数随之增加。当细胞因子达到一定浓度时, 集落形成数不再变化。此时的细胞因子浓度可称为半固体培养的集落形成的临界浓度。GM-CSF、G-CSF 和 EPO 的临界浓度分别为 200, 100 和 2 u/mL。集落形成数与细胞因子剂量的关系可以拟合为:

$$N = \frac{N_m u}{K_u + u}$$

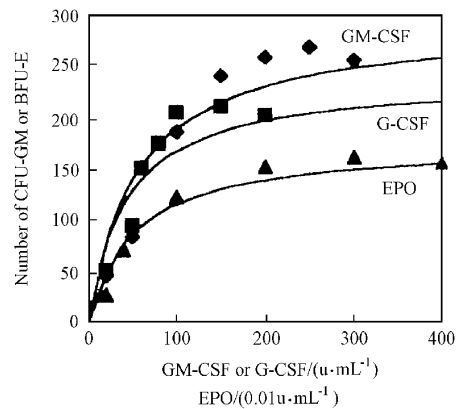


图2 GM-CSF 和 G-CSF 对 CFU-GM 以及 EPO 对 BFU-E 形成的浓度作用

Fig. 2 The concentration effects of GM-CSF (◆) and G-CSF (■) on CFU-GM and EPO (●) on BFU-E.

The curves represent the values of model. The initial cell density of 2×10^5 CB MNCs were seeded at 35 mm Petri-dish added with 1 mL cell suspension in medium supplemented with 30% FBS 0.9% methylcellulose and the examined cytokine

其中 N 为集落形成数, N_m 为最大集落形成数, K_u 为常数, u 为细胞因子的剂量。参数拟合得 GM-CSF、G-CSF 和 EPO 的 N_m 分别为 295、240 和 175, K_u 分别为 55、43 和 0.5 u/mL。此式可以估计在一定生长因子浓度下所能达到的集落形成数。

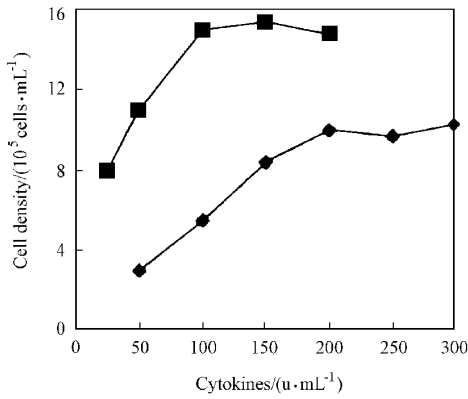


图3 GM-CSF 和 GM-CSF + IL-3 对总细胞扩增的作用

Fig. 3 Effects of concentrations of GM-CSF (◆) and GM-CSF + IL-3 (■) on expansion of total cells.

CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 cells/mL in 24-well plates. Every well was added 1 mL cell suspension. The related GM-CSF or GM-CSF + IL-3 was supplemented to medium at the beginning of culture. After 10 days culture, wells were harvested and counted using hemocytometer and trypan blue exclusion.

在半固体培养中集落形成数与细胞因子浓度存在剂量关系,是因为对于一定数量的脐血单个核细胞,所含有的造血祖细胞数是一定的。当细胞因子的剂量比较小时,其作用尚不能使造血祖细胞充分分化和增殖,集落形成数相应较少。细胞因子浓度达到临界水平,能使所有造血祖细胞分化和增殖,集落形成数达到最大值。再进一步提高细胞因子的剂量,不再影响造血祖细胞集落形成数。

在体外液体培养条件下,实验观察了不同浓度 GM-CSF 对造血总细胞产出的影响(图3),发现细胞因子对于造血细胞扩增有同样的作用。GM-CSF 单独可以刺激造血细胞增殖,当 GM-CSF 浓度比较低时,造血总细胞产出也比较少;当 GM-CSF 浓度提高,造血总细胞产出随之提高;当 GM-CSF 浓度达到 200u/mL 时,细胞数达到最大值。然后,继续增加 GM-CSF 浓度,细胞数没有相应提高。其它细胞因子,如 IL-3、IL-6、G-CSF 和 EPO 也有相类似作用(数据未给出)。当 GM-CSF 和 IL-3 两者联合作用,它们的剂量与总细胞产出也存在一定的关系(图3),并且造血总细胞数显著高于 GM-CSF 和 IL-3 (1:1) 分别单独作用时。由此可见,造血细胞产出与细胞因子浓度和细胞因子组合有关。

2.3 细胞因子组合对脐血单个核细胞扩增影响

造血细胞在体外增殖,需要多种造血细胞生长因子的协同作用,包括刺激增殖的刺激因子和维持

细胞存活的存活因子。根据各种造血细胞生长因子的不同功能,合理进行搭配可以起到协同的效果。Brugger 等^[9]研究了 IL-1 β 、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、M-CSF 及 SCF 等因子的 36 种不同组合对外周血 CD34⁺ 细胞扩增的影响,并对造血细胞生长因子的合理搭配进行了探讨。国内外对脐血造血细胞体外扩增的研究重点是 CD34⁺ 细胞体外扩增,细胞因子组合对脐血造血细胞扩增的研究也针对 CD34⁺ 细胞,有关细胞因子组合对脐血单个核细胞体外扩增作用报道甚少,而脐血造血细胞的体外扩增对造血细胞的实际应用有重要价值。我们考察了细胞因子组合对脐血单个核细胞扩增的影响,即在悬浮培养下用 SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF 和 EPO 6 种细胞因子(均取临界浓度)的不同组合来研究它们对脐血造血总细胞和祖细胞扩增的影响。

图4表示了细胞因子单独使用时对总细胞数扩增的影响。当 SCF 单独使用时,对造血总细胞数扩增几乎没有影响。IL-3 和 IL-6 分别单独作用于脐血造血细胞培养时,对细胞扩增影响不大。GM-CSF、G-CSF 和 EPO 单独作用于造血细胞悬浮培养时,能使造血细胞扩增,但效果尚不显著。总之,细胞因子单独作用于悬浮培养的造血细胞,对造血细胞体外扩增效果并不令人满意。

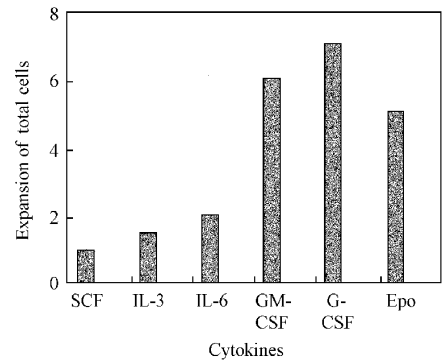


图4 悬浮培养下细胞因子对总细胞数扩增的作用

Fig. 4 Effects of cytokines on the expansion of total cells in suspension culture.

CB MNCs were inoculated at an initial density of 2×10^5 cells/mL in 24-well plate. To each well 1 mL cell suspension in medium was added. The examined recombinant growth factors were supplemented to medium at the beginning of culture. After 10 days culture, wells were harvested and viable cell numbers were assayed.

研究已经证明,不管造血细胞来源(骨髓、外周血和脐血),要获得比较理想的扩增效果,必须同时添加 SCF、IL-3 和 IL-6^[10,11]。基于这一点,本研究在 SCF、IL-3 和 IL-6 组合基础上添加其它细胞因

子 构 成 8 种 细胞 因子 组 合 ,体 外 培 养 脐 血 单 个 核 细胞 ,考 察 造 血 总 细胞 和 祖 细胞 的 产 出 ,以 找 出 最 优 的 细胞 因子 组 合 。 这 8 种 组 合 为 (A)SCF + IL-3 + IL-6 (B)SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF (C)SCF + IL-3 + IL-6 + G-CSF (D)SCF + IL-3 + IL-6 + EPO ; (E)SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF (F)SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + EPO (G)SCF + IL-3 + IL-6 + G-CSF + EPO (H)SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF + EPO。 实 验 结 果 见 图 5。

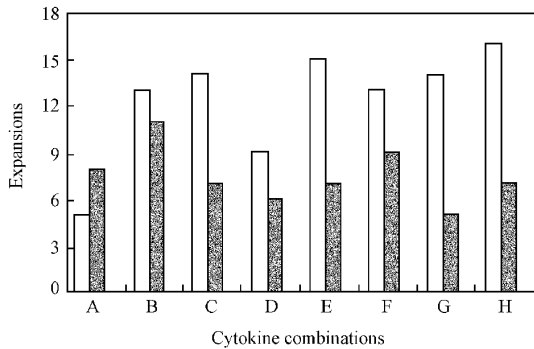


图 5 悬浮培养下细胞因子组合对总细胞数和 CFU-GM 扩增的作用

Fig. 5 Effects of cytokine combinations on expansion of total cell(□)and CFU-GM(■)

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. The examined cytokine combinations were supplemented to medium at the beginning of culture. After 14-days culture, wells were harvested and viable cell numbers and CFU-GM numbers were assayed.

对于总细胞扩增 (H)组合总细胞扩增数最大,其次为(E)组合和(C)组合,而(A)组合总细胞扩增数最小。

对于 CFU-GM 扩增 (B)组合扩增 CFU-GM 效果最佳,其次为(E)和(A)组合,(G)组合扩增效果最差。

2.4 不同培养液更换频率对造血总细胞和祖细胞扩增的影响

图 6 表示不同培养液更换频率对造血总细胞数产出的影响。在培养第一周,在 4 种不同换液培养条件下,总细胞扩增数是相同的。在培养第二周,每天更换 50% 培养液组总细胞数扩增最多,其次为每两天更换 50% 培养液组,没有培养液更换组总细胞扩增数最少。尽管这四组扩增有差别,但扩增数差别不是十分明显。到了培养第三周,不同换液方式对扩增的影响变得显著,但是培养液更换频率对细胞数扩增的影响的顺序没有变化。此时,每天更换 50% 培养液组扩增了 27 倍,每两天更换 50% 培养液组扩增了 24 倍,每三天更换 50% 培养液组扩增

了 20 倍,没有培养液更换组只扩增了 2 倍。

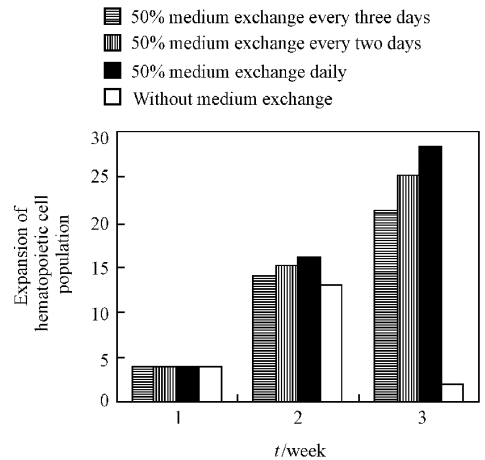


图 6 不同换液频率下造血细胞群体的扩增

Fig. 6 Expansions of hematopoietic cell population under four different medium exchange frequencies.

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

由于对培养条件的适应,造血细胞在培养第一周生长并不旺盛,对营养成分消耗量不大,产生代谢副产物也不多。因此,在培养第一周内,不同换液频率对造血细胞生长影响不大,对总细胞扩增数没有明显影响。在培养第二周,造血细胞进入生长期,细胞数迅速增加,对营养成分的消耗加快,代谢副产物产生也加速。采用不同培养液更换频率,营养成分和细胞因子更新速率不同,代谢副产物移走速率也不同,造成造血细胞生长速率产生差别。换液频率优化应与培养细胞密度有关。在培养过程中,刚接种时可少换液或不换液,随着细胞密度提高,培养液更换频率也要相应加快,以获得更高的细胞密度。

不同培养液更换频率对造血祖细胞(CFU-GM)的扩增也有明显影响(图 7)。培养 2 周后,在 3 种不同换液条件下 CFU-GM 的扩增数分别为 7、12 和 15,每天更换 50% 培养液组祖细胞扩增数最大。培养 3 周后,在 3 种不同换液条件下 CFU-GM 的扩增数分别为 10、15 和 21,同样,每天更换 50% 培养液组祖细胞扩增数最大。

3 结 论

本文研究了造血干细胞生长因子、白介素-3、白介素-6、粒-巨噬细胞集落刺激因子、粒细胞集落刺激因子及红细胞生成素对造血细胞体外培养的影响。这些因子对集落形成存在一定剂量关系,在甲基纤维素半固体培养下,G-CSF、GM-CSF 和 EPO 作用的临界浓度分别为 100 u/mL 、 200 u/mL 和

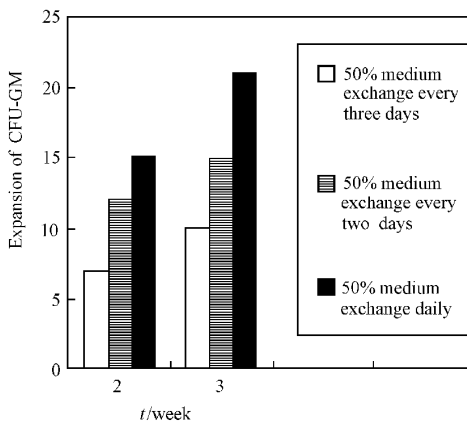


图 7 不同换液频率下 CFU-GM 的扩增

Fig. 7 Expansions of CFU-GM under three different medium exchange frequencies.

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

2 u/mL。考察了造血细胞因子单独与联合作用对脐血单个核细胞体外培养的影响,证实细胞因子组合使用比细胞因子单独使用效果更好。同时,发现 SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF + EPO 组合对总细胞扩增最佳,SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF 组合对 CFU-GM 扩增最佳。

本文也考察了 4 种不同培养液更换频率对脐血单个核细胞中细胞群体和祖细胞扩增的影响。这 4 种不同培养液更换频率分别为:每天更换 50% 培养液、每二天更换 50% 培养液、每三天更换 50% 培养液、不更换培养液。通过这 4 种更换频率的研究,发现培养液更换对造血细胞体外扩增有很大作用。通过培养液更换,脐血总细胞数和祖细胞数产出大大提高。在每天更换 50% 培养液培养条件下,脐血总细胞数在第三周扩增了 27 倍,祖细胞数扩增了 21 倍。

参 考 文 献

- [1] Aggarawala B B. Human Cytokines. Blackwell Scientific Publication ,1991
- [2] Schrader J W. *Ann. Rev Immunol* ,1986 **4** :203~130
- [3] Brandt J ,Briddell R A ,Srouf E F *et al. Blood* ,1992 **79** :634~641
- [4] Emerson S G ,Pallson B O ,Clarke M F. *J Cell Biochem* ,1991 **45** :268~272
- [5] Caldwell J ,Pallson B O ,Locey B *et al. J Cell Physiol* ,1991 **147** :344~353
- [6] Schwarz R M ,Pallson B O ,Emerson S G. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 **81** :6760~6764
- [7] Koller M R ,Pallson B O. *Biotechnol Bioeng* ,1993 **42** :909~930
- [8] 张元兴,应小飞,谭文松. *生物工程学报* ,2000 **16** (5) :623~626
- [9] Brugger W. *Blood* ,1993 **81** :2579~2584
- [10] Muech M O ,Schneider J G ,Moore A S. *Exp hematol* ,1992 **20** :339~349
- [11] Meadams T A ,Miller W M ,Papoutsakis E T. *TIBTECH* ,1996 **14** :341~349

The *ex vivo* Expansion of Cord Blood Hematopoietic Cells 2. Effects of Cytokines and Medium Exchange Frequency on Expansion

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

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

Abstract The effects of some cytokines such as SCF ,IL-3 ,IL-6 ,GM-CSF ,G-CSF and EPO on the *ex vivo* expansion of cord blood hematopoietic cells were investigated. The colony forming depended on the concentrations of those factors and the critical concentrations of G-CSF ,GM-CSF and EPO bringing into full play were ,respectively ,100 ,200 and 2 u/mL in semi-solid culture on methylcellulose. The effects of the individual and combined cytokines were compared and it was demonstrated that the combined cytokines got the best of the individual. It was found in further study that the combination SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF + G-CSF + EPO was optimum for the expansion of total cells while the combination SCF + IL-3 + IL-6 + GM-CSF was the best for the expansion of CFU-GM. The effects of four different medium exchange frequencies on the *ex vivo* expansions of mononuclear cell populations and progenitor cells were experimentally studied. Culture with medium exchange resulted in the expansions of total cells up to 27 folds and that of CFU-GM up to 21 folds.

Key words Hematopoietic cell cytokine medium exchange expansion cell culture