

体外培养脐血单个核细胞与 CD34⁺ 富集细胞

王 斌 康自珍 迟占有 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 对比 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞在 SCF + IL-3 + IL-6 + FL + Tpo 细胞因子组合下的体外扩增特性,发现 CD34⁺ 富集细胞具有很高的扩增潜力,在本实验条件下其总细胞持续扩增了 8 周,扩增倍数达 31270.9 ± 8640.5 倍;而 MNC 在培养至第 4 周扩增就已呈现下降趋势,最大仅扩增了 53.3 ± 6.2 倍。对比集落和 CD34⁺ 细胞的扩增发现, MNC 的集落密度和 CD34⁺ 细胞含量由第 0 天至第 7 天有一个上升的过程,而 CD34⁺ 富集细胞在培养过程中,集落密度和 CD34⁺ 细胞含量却始终呈下降趋势。在体外培养过程中,CD34⁺ 富集细胞的 CFU-GM 和 CD34⁺ 细胞最大分别扩增了 185.7 ± 14.1 和 191.7 ± 188.8 倍,明显高于 MNC 的 12.4 ± 3.2 和 50.6 ± 33.2 倍,而 CD34⁺ 富集细胞和 MNC 的 BFU-E 则只实现了少量扩增,分别为 7.2 ± 5.2 和 10.1 ± 3.4 倍。结果显示,从 CD34⁺ 富集细胞出发扩增造血干/祖细胞,可以得到更多的 CD34⁺ 细胞和 CFU-GM 集落形成细胞。

关键词 造血干/祖细胞,脐血, MNC, CD34⁺ 细胞, 长期培养

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0343-05

脐血作为一种可替代造血干细胞来源,可重建骨髓造血及免疫,用于治疗骨髓衰竭、恶性及非恶性血液病、某些遗传病、重型免疫缺陷等疾病^[1-3]。与骨髓和外周血相比,脐血作为移植来源具有很多优势,首先,脐血中原始干/祖细胞的比例高于骨髓和动员的外周血^[4];其次减少了移植中病毒性疾病的传播,并且降低了移植物抗宿主病(GVHD)的发生率^[5];另外,脐血来源广泛,采集方便,所以近年来有关脐血移植的研究越来越广泛。但是由于单份脐血量少,一般为 100mL 左右,只能满足较小儿童移植的需要,因此人们希望通过体外培养来增加脐血中造血干/祖细胞的数量以满足较大儿童和成人移植的需要^[6]。

在目前的研究中,单个核细胞和 CD34⁺ 富集细胞都可通过体外培养扩增造血干/祖细胞,但是哪种方式更为有利仍存在争议。本实验在相同的条件下体外培养脐血单个核细胞(MNC)和 CD34⁺ 富集细胞,对比考察了 2 种起始细胞的总细胞扩增、集落形成和 CD34⁺ 细胞扩增等特性。

1 材料和方法

1.1 脐血的采集和制备

脐血由上海国际和平妇幼保健院提供。要求供者为身体健康,发育良好的非高龄产妇,无遗传病史,无血液系统疾病,无寄生虫及地方病,HIV、肝炎、梅毒等检测均为阴性。每次实际采集脐带血 50 ~ 120mL。采集后脐带血经 PBS 缓冲液稀释,经 1.077g/mL Ficoll 密度梯度离心后收集单个核细胞(MNC),洗涤备用。

1.2 CD34⁺ 细胞的分离纯化

采用 MiniMACS 免疫磁性吸附柱分离装置,用 CD34⁺ 细胞选择试剂盒(Milienyi Biotech 公司)按其说明进行 CD34⁺ 细胞的分离与纯化。每 1.0×10^8 细胞悬浮于 0.3mL MACS 缓冲液中,加 50 μ L 偶联于磁珠的小鼠抗人 CD34 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min,洗涤一遍后悬浮于 0.5mL 的 MACS 缓冲液,将细胞加入固定于高强度磁场中的 MiniMACS 吸附柱中进行分离,未与磁珠结合的 CD34⁺ 细胞随缓冲液流出,与磁珠结合的 CD34⁺ 细胞保留在吸附柱中,将吸附柱移出磁场后用 MACS 缓冲液冲洗吸附柱即获得纯化

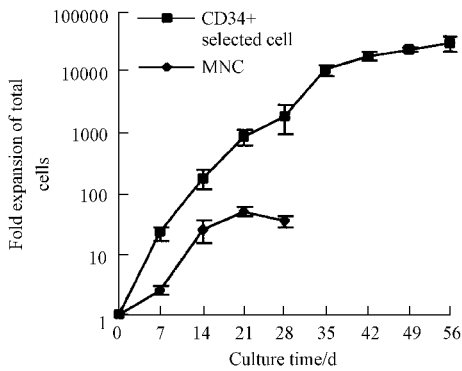


图 1 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞体外培养过程中总细胞扩增情况对比

Fig.1 Total cell expansion from MNC and CD34⁺ selected cells during culture period

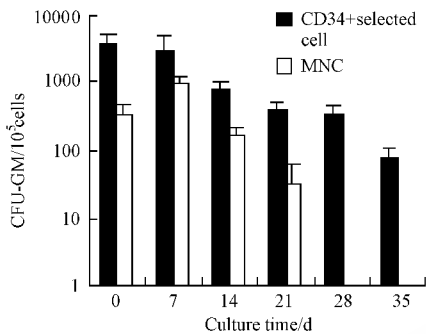


图 2 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞体外培养过程中 CFU-GM 集落密度变化的比较

Fig.2 CFU-GM density of MNC and CD34⁺ selected cells at different culture time

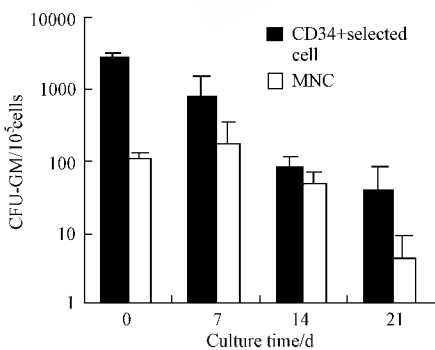


图 3 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞体外培养过程中 BFU-E 集落密度变化的比较

Fig.3 BFU-E density of MNC and CD34⁺ selected cells at different culture time

146.6 个/ 10^5 cells 上升至第 7 天的 1015.9 ± 273.6 个/ 10^5 cells, 随后开始下降, 至第 21 天降为 33.0 ± 29.9 个/ 10^5 cells, 培养至 28 天则几乎没有集落检出了。而 CD34⁺ 富集细胞的 CFU-GM 密度, 则由初始的 3621.3 ± 1598.2 个/ 10^5 cells 持续下降至 35 天的 $79.5 \pm$

$28.5/10^5$ cells, 期间没有上升的趋势。

MNC 的 BFU-E 密度则由第 0 天的 $103.2 \pm 28.5/10^5$ cells 至第 7 天的 $175.1 \pm 156.6/10^5$ cells, 有一个微弱的上升趋势, 随后开始下降, 至 14d 为 $72.5 + 30.2/10^5$ cells, 21d 则几乎检测不到了。CD34⁺ 富集细胞的 BFU-E 密度则由初始的 $2548.0 \pm 512.6/10^5$ cells 迅速下降至 14d 的 $76.5 \pm 38.4/10^5$ cells, 至 21d 同样几乎检测不到了。

从以上结果可以看出, CD34⁺ 富集细胞培养至第 5 周仍有集落形成能力, 而 MNC 在第 3 周以后就很难再有集落检出了; 另外, 培养过程中 MNC 的 CFU-GM 和 BFU-E 密度都有一个上升的过程, 而 CD34⁺ 富集细胞的集落密度却始终呈下降趋势; 两者相似之处是, 培养过程中 BFU-E 相对于 CFU-GM 的比例都一直呈下降趋势, 在第 3 周以后就很难检测到了。

2.4 造血干/祖细胞总集落扩增分析

考虑到细胞总数的扩增, 以集落密度乘以细胞总数即得到总的集落数, 由此计算出集落扩增倍数,

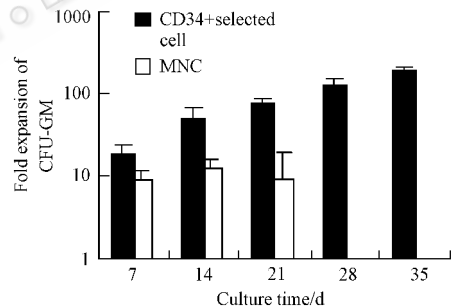


图 4 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞体外培养过程中 CFU-GM 扩增比较

Fig.4 Fold expansion of CFU-GM from MNC and CD34⁺ selected cells at different culture time

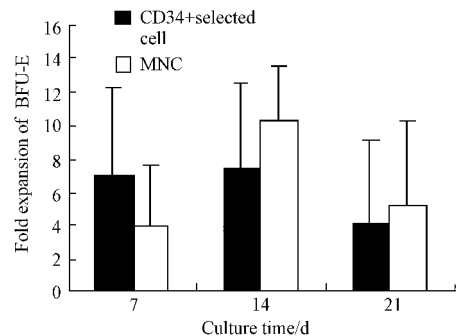


图 5 MNC 和 CD34⁺ 富集细胞体外培养过程中 BFU-E 扩增比较

Fig.5 Fold expansion of BFU-E from MNC and CD34⁺ selected cells at different culture time

结果见图 4 和 5。MNC 起始培养的细胞,CFU-GM 和 BFU-E 扩增倍数在 14 天达到最大值,分别为 12.4 ± 3.2 倍和 10.1 ± 3.4 倍,随后开始下降。 $CD34^+$ 富集细胞的 CFU-GM 扩增倍数则始终呈上升趋势,在第 35 天达到最大值,为 185.7 ± 14.1 倍。而其 BFU-E 最大扩增倍数则在 14 天达到最大值,为 7.2 ± 5.2 倍。

通过以上结果发现, $CD34^+$ 富集细胞的 CFU-GM 最大扩增倍数远大于 MNC,两者具有显著差异($p <$

0.05)。结合集落分析的结果还可以看出,MNC 的集落在培养过程中其集落密度和集落数量都曾实现了增高,而 $CD34^+$ 富集细胞的集落则只实现了数量上的扩增,单位细胞所形成的集落数并没有明显的增高过程。

2.5 培养过程中 $CD34^+$ 细胞扩增情况

在本实验中,对比了培养过程中 $CD34^+$ 细胞的扩增情况,结果见表 1。

表 1 MNC 与 $CD34^+$ 富集细胞培养过程中 $CD34^+$ 细胞的扩增情况

Table 1 Proliferation of $CD34^+$ cells in MNC and $CD34^+$ selected cell cultures

	% $CD34^+$ cells (of total cells)						Maximum expansion fold of $CD34^+$ cells
	0d	7d	14d	21d	28d	35d	
MNC ($n = 3$)	1.09 ± 0.36	3.14 ± 1.91	2.42 ± 2.39	0.57 ± 0.55	ND	ND	50.6 ± 33.2
$CD34^+$ selected cell ($n = 3$)	76.6 ± 7.6	28.7 ± 11.1	9.92 ± 4.47	2.98 ± 1.83	2.15 ± 1.57	1.33 ± 1.17	191.7 ± 180.8

由表所示数据,与集落密度所示情况相似,MNC 的 $CD34^+$ 细胞含量在第 7 天有一个明显上升的过程,由 $1.09 \pm 0.36\%$ 增至 $3.14 \pm 1.91\%$,而 $CD34^+$ 富集细胞在培养过程中 $CD34^+$ 细胞含量则由第 0 天的 $76.6 \pm 7.6\%$ 持续降至第 35 天的 $1.33 \pm 1.17\%$,始终呈下降趋势。从 $CD34^+$ 细胞的扩增倍数看,MNC 在第 14 天达到了最大值,为 50.6 ± 33.2 倍,随后开始下降; $CD34^+$ 富集细胞则始终呈上升趋势,在第 35 天达到了最大值,为 191.7 ± 180.8 倍。

2.6 两种起始细胞培养得到的集落总数及 $CD34^+$ 细胞总数对比

$CD34^+$ 富集细胞最大集落总数/MNC 最大集落总数(CFU-GM) = 1.64 倍; $CD34^+$ 富集细胞最大集落总数/MNC 最大集落总数(BFU-E) = 0.18 倍; $CD34^+$ 富集细胞所得最大 $CD34^+$ 细胞总数/MNC 所得最大 $CD34^+$ 细胞总数 = 2.77 倍。

由以上计算所得结果我们发现,经过体外长期培养,由 $CD34^+$ 富集细胞培养所得的 $CD34^+$ 细胞总数和 CFU-GM 总数均高于 MNC。

3 讨 论

MACS 技术在实验室处理低细胞量情况下,是目前纯化 $CD34^+$ 细胞较好的方法^[7]。本文利用 MiniMACS 系统富集 $CD34^+$ 细胞,与同批单个核细胞在相同的条件下进行体外长期培养,结果表明 $CD34^+$ 富集细胞具有非常高的扩增潜力,其各项扩增参数值都远大于 MNC。从中可以看出 $CD34^+$ 细胞是一类更具扩增和分化潜力的造血干/祖细胞,而

MNC 中存在大量已分化而无扩增潜力的成熟细胞,这些成熟细胞可能对 $CD34^+$ 细胞的扩增有抑制作用^[8]。在培养过程中,MNC 的 CFU-GM、BFU-E 集落密度和 $CD34^+$ 细胞含量在培养至第 7 天有一个上升的过程,而 $CD34^+$ 富集细胞却始终呈下降趋势。这表明培养前期 MNC 中的 $CD34^+$ 细胞可能对 $CD34^+$ 细胞及集落形成细胞的扩增有直接或间接的促进作用,而 $CD34^+$ 富集细胞则只是在数量上实现了 $CD34^+$ 细胞和集落的扩增,其含量则始终呈下降趋势,表明 $CD34^+$ 富集细胞在培养过程中分化趋势始终大于扩增,其总细胞的大量扩增则说明在培养过程中存在大量分化,此结果不会引起 $CD34^+$ 细胞和集落形成细胞含量的增加,但是会使得 CFU-GM 和 $CD34^+$ 细胞的总数在培养后期大大提高。同时还发现,在培养过程中,2 种起始细胞形成的 CFU-GM 比例都逐渐升高,而 BFU-E 含量却一直呈下降趋势,在 2 周后就很难检测到了,这说明本实验所采用的细胞因子组合(不含 EPO)对红系祖细胞的扩增缺乏支持作用,而对粒-巨噬细胞的扩增有较好的促进作用。

在临床移植中,通过 $CD34^+$ 选择,可以间接地清除移植中污染的肿瘤细胞 3~6 个对数级^[9],达到净化的效果;而且通过 $CD34^+$ 选择,还可以去除 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞,有报道表明通过 $CD34^+$ 阳性选择预防 GVHD 极为有效^[10]。 $CD34^+$ 细胞具有良好的扩增潜力,通过体外长期培养,5 周内即可以得到更多的 CFU-GM 形成细胞和 $CD34^+$ 细胞。而且在相关实验中发现,以 $CD34^+$ 富集细胞定向诱导分化

DC 细胞 ,巨噬细胞的结果都优于 MNC(数据未显示 ,文章另文发表) ,可见 CD34⁺ 细胞的大量扩增也为造血干/祖细胞的定向诱导分化提供了有利条件。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gluckman E ,Broxmeyer H E ,Auerbach A D *et al.* . Hematopoietic re-constitution in a patient with Fanconi 's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* ,1989 ,**321** : 1174 ~ 1178
- [2] Gluckman E ,Wagner J ,Hows J *et al.* . Special report :cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant* ,1993 ,**11** :199 ~ 200
- [3] Rubinstein P ,Carrier C ,Scaradavou A *et al.* . Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* ,1998 ,**339** :1565 ~ 1577.
- [4] Mayani H ,Lansdorp P M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* ,1998 ,**16** :153 ~ 165
- [5] Kurtzberg J ,Laughlin M ,Graham M L *et al.* . Placental blood as a

source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* ,1996 ,**335** :157 ~ 166

- [6] McCowage G B ,Kurtzberg J ,Rubinstein P. Transplantation of cord-blood cells. *N Engl J Med* ,1996 ,**333** (1) :67 ~ 69
- [7] De Wynter E A ,Coutinho L H ,Pei X *et al.* . Comparison of purity and enrichment of CD34⁺ cell of bone marrow ,umbilical cord and peripheral blood(primed of apheresis)using five separation systems. *Stem Cell* ,1995 ,**13** :524 ~ 532
- [8] Gary L Gilmore ,Darlene K Depasquale ,John Lister *et al.* . *Ex vivo* expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34⁺ hematopoietic stem cells. *Exp Hemat* , 2000 ,**28** :1297 ~ 1305
- [9] Vescio R ,Schiller G ,Stewart A K *et al.* . Multicenter phase III trial to evaluate CD34⁺ selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* , 1999 ,**93** :1858 ~ 1868
- [10] Handgrtinger R ,Schumm M ,Lang P *et al.* . Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *ANYAS* ,1999 ,pp. 351 ~ 362

In vitro Culture of Umbilical Cord Blood MNC and CD34⁺ Selected Cells

WANG Bin KANG Zi-Zhen CHI Zhan-You TAN Wen-Song*

(*The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ,ECUST , Shanghai 200237 , China*)

Abstract For *in vitro* studies , both CD34⁺ selected cell and mononuclear cell (MNC) can be used to expand hematopoietic stem/progenitor cells. To investigate the expansion characteristics of mononuclear cells (MNC) and CD34⁺ selected cells the two cell fractions were cultured in the medium containing cytokine cocktails of SCF + IL-3 + IL-6 + FL + Tpo. It was found that the CD34⁺ selected cells had presented a high proliferation potential. The expansion of CD34⁺ selected cells could be maintained for 8 weeks while that of MNCs declined after 4 weeks. During the culture period ,the maximum expansion of total cells in CD34⁺ selected cell culture achieved 31270.9 ± 8640.5 times ,while that of MNC reached 50.9 ± 8.2 times only. In the culture of MNCs , the colony density and the proportion of CD34⁺ cells increased from day 0 to day 7. However in the culture of CD34⁺ selected cells ,both the colony density and the proportion of CD34⁺ cells declined continuously during the whole culture period. During the *ex vivo* culture of CD34⁺ selected cells , the maximum expansion of CFU-GM and CD34⁺ cells achieved 185.7 ± 14.1 fold and 191.7 ± 188.8 fold , respectively. They are much higher than that of MNC , which were 12.4 ± 3.2 fold and 50.6 ± 33.2 fold only. While the BFU-E of both cell fractions only expanded by few times , which were 7.2 ± 5.2 and 10.1 ± 3.4 times , respectively. The results showed that the CD34⁺ selected cells culture could obtain more CFU-GM cells and CD34⁺ cells during the whole culture period.

Key words hematopoietic stem/progenitor cells , umbilical cord blood , MNC , CD34⁺ cell , long-term culture

Received : 09-25-2001

This work was supported by Grant from the State " 863 " High Technology R&D Project of China (No. 102-12-08-01) and the Shanghai Modern Biology and Medicine Program (No. 004319003) .

* Corresponding author. Tel 86-21-64253394 ; Fax 86-21-64250948 ; E-mail cszhan@ecust.edu.cn ; <http://journals.im.ac.cn>