

# 小鼠胚胎干细胞来源的 HPP-CFC 体外和体内造血活性分析

刘 兵<sup>1,2</sup> 侯春梅<sup>1</sup> 吴 英<sup>1</sup> 张双喜<sup>1</sup> 毛 宁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( 军事医学科学院基础医学研究所细胞生物学研究室 北京 100850 )

<sup>2</sup>( 第二军医大学基础部免疫学教研室 上海 200433 )

**摘 要** 小鼠的造血系统起源于胚胎发育 7d 的卵黄囊胚外中胚层,研究表明胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES cells)体外分化模型能够模拟卵黄囊造血的发生过程,此外,诱导 ES 细胞体外定向造血细胞分化对于建立治疗性克隆以治愈多种血液病具有重要的研究和应用价值。高增殖潜能集落形成细胞(High proliferative potential colony-forming cells, HPP-CFC)是体外培养的最原始的多潜能造血前体细胞之一。本研究发现:小鼠 ES 细胞在体外分化 5~14d 形成的拟胚体中含有 HPP-CFC。其再生潜能与胚胎期 9d 的卵黄囊来源的 HPP-CFC 相似,与骨髓来源则不同。RT-PCR 分析表明:ES 细胞来源的 HPP-CFC 表达与造血干细胞增殖相关的特异性转录因子和多种造血生长因子受体。但分化 12d 的拟胚体细胞和 HPP-CFC 集落细胞移植受致死剂量照射的小鼠不能产生典型的脾结节。因此,ES 细胞来源的 HPP-CFC 在体外和体内造血活性的差异值得更深入地研究。

**关键词** 胚胎干细胞,高增殖潜能集落形成细胞,脾结节形成单位

中图分类号 R331.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0312-06

小鼠胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)由 3.5d 囊胚的内细胞团建系,可在体外合适的培养环境中传代生长并保持其分化潜能。大量研究证实 ES 细胞在体内可分化形成机体的所有组织,体外诱导能产生 3 个胚层来源的多种细胞。在合适的造血细胞诱导体系中胚胎干细胞可分化形成多种造血集落形成细胞(Colony-forming cells, CFC),包括原始红系前体细胞、永久红系前体细胞、混合集落形成细胞及粒单系集落形成细胞<sup>[1]</sup>,在基质细胞系共培养体系中可诱导产生 B 细胞。我们首次报道<sup>[2]</sup>分化 6d 的拟胚体中能产生具有自我更新能力的高增殖潜能集落形成细胞(High proliferative potential colony-forming cells, HPP-CFC),并且对 TGF- $\beta$  的抑制效应极为敏感,表明其早期造血前体细胞的原始特性。但是 6d 拟胚体中存在大量未分化的可形成二级拟胚体的幼稚细胞,在体内有成瘤危险,而且我们对 ES 细胞来源的 HPP-CFC 的体内造血活性并未进行研究。

基于上述发现,本研究对较晚期拟胚体中的 HPP-CFC 的体外及体内造血活性进行了重点分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 ES 细胞培养

选用 CCE 细胞系(129/sv 小鼠来源),StemCell Technologies Inc. 惠赠。CCE 细胞的未分化培养体系包括:DMEM 培养液(Hyclone),15% 特级胎牛血清(Hyclone)和 1000u/mL 重组小鼠白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)。

### 1.2 造血分化体系

基本分化体系和方法参见文献[1]。第一步为造血拟胚体(Embryoid bodies, EB)形成。即将 2000 个未分化的 CCE 细胞接种于 35mm 培氏培养皿(Greiner)。分化体系组成:0.9% 甲基纤维素(Stem-Cell Technologies),DMEM 培养液(Hyclone),15% 特级胎牛血清(Hyclone),干细胞因子(Stem cell factor, SCF, PeproTech)20ng/mL,白细胞介素 11(Interleukin 11, IL-11, PeproTech)10ng/mL。第二步为 HPP-CFC 的培养和鉴定。分化 5~14d 的拟胚体用 0.25% 胰酶(Hyclone)或胶原酶(Sigma)消化获得单个细胞,接种于含细胞因子:SCF 50ng/mL,IL-3 (PeproTech)

10ng/mL, IL-11 10ng/mL, GM-CSF( PeproTech )10ng/mL, Epo( Kirin )6u/mL的半固体体系中培养 14d 后鉴定。鉴定标准:致密集落直径 > 0.5mm, 疏散集落直径 > 1.0mm, 细胞数 >  $1 \times 10^4$ 。

### 1.3 单个 HPP-CFC 的分化多向性的检测

挑取单个 HPP-CFC 集落并分散成单个细胞种植于 HPP-CFC 培养体系, 14d 后观察计数。

### 1.4 RT-PCR

收集未分化 ES 细胞、d12 拟胚体和 d9.5 卵黄囊培养形成的 HPP-CFC 集落, 用 TRIzol ( Gibco )提取总 RNA。用 RT-PCR 试剂盒( TaKaRa )检测基因的表达。具体引物序列见表 1。

### 1.5 小鼠脾结节形成单位( Spleen colony-forming unit, CFU-S )实验

8 ~ 10 周雌性 129 小鼠, 900 cGy  $^{60}\text{Co}$  照射, 尾静

脉分别注射  $2 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$  雄性 129 小鼠骨髓细胞,  $1 \times 10^6$  12d 拟胚体单个细胞或  $1 \times 10^6$  HPP-CFC 细胞, 8 ~ 12d 计数 CFU-S 数目。

### 1.6 SCID 小鼠造血重建的检测

6 ~ 8 周雌性 BALB/C-SCID 小鼠( 购自北京大学动物中心 ), 200 cGy  $^{60}\text{Co}$  照射 4h 后尾静脉注射: 分化 12d 拟胚体单个细胞  $1 \times 10^6$ /每只小鼠。移植后用流式细胞仪检测 ES 细胞来源的造血细胞的植入时间视小鼠状态而定。受体小鼠骨髓细胞按常规分离。ES 细胞来源于 129 小鼠, 其 MHC I 类分子特征为 H-2K<sup>b</sup>, 而受体小鼠为 H-2K<sup>d</sup>, 并结合造血细胞特异性的标记分子, 包括: CD4, CD8, B220, CD11b, Ter119 等分析造血细胞的植入。抗体均为 PharMingen 公司产品。

表 1 RT-PCR 所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequence	T/°C *	Size/bp	Reference
SCL	5'-TATGAGATGGAGATTCTGATG-3' 5'-GCTCCTCTGTGTAAGTCTCC-3'	55	396	[ 3 ]
GATA-2	5'-CTCCAGCTCACCCTAAGCAG-3' 5'-CATAAGGTGGTGGTGTCTCT-3'	60	254	[ 2 ]
AML1	5'-GACCGCAGCATGGTGGAGTACT-3' 5'-ACTCAGTGAGAAGACCAGAGACTTCTA-3'	60	269	[ 2 ]
IL-3 R	5'-TTCCITTTGGGCTCTTCTATCGC-3' 5'-CCAGGACCAAGGTGAAGATGAG-3'	60	554	[ 4 ]
GM-CSF R <sub>α</sub>	5'-GCGGGCGACACGAGGATGAAGCAC-3' 5'-CTAGGGCTGCAGGAGTCTTCTCT-3'	60	264	[ 5 ]
c-kit	5'-TGTCCTCCAGTTCCCTGC-3' 5'-TTCAGGACTCATGGGCTCA-3'	50	765	[ 1 ]
HPRT	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3' 5'-CACAGGACTAGAACCTGC-3'	55	249	[ 1 ]

Abbreviations: HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase.

\* Annealing temperature.

## 2 结 果

### 2.1 分化 12d 的 EB 含有的 HPP-CFC 在体外具有多向造血分化潜能

本研究的主要目的是优化适合 ES 细胞来源的

HPP-CFC 发育和扩增的培养条件, 而非分化为较之更成熟的祖细胞, 如 CFC。首先是细胞因子组合的选择。我们选择的五因子组合: SCF, IL-3, IL-11, GM-CSF 和 Epo 比传统的适合骨髓 HPP-CFC 集落形成的因子组合( SCF, IL-1 $\alpha$ , IL-3, GM-CSF 和 M-CSF )

更能有效促进 ES 细胞来源的 HPP-CFC 形成巨大集落(数据未显示)。其次是血清的筛选。6 个批号的特级胎牛血清(Hyclone)对于 HPP-CFC 数目的扩增存在差异。不同批次的血清对分化 5 至 6d 拟胚体中 HPP-CFC 数目的影响未见显著差异(图 1)。但在 ES 细胞分化 10d 时,仅有一个批次的血清(图 1,血清 1)能刺激 HPP-CFC 扩增 5 倍,其余血清(图 1,以血清 2 为代表)仅能维持 HPP-CFC 的数量。因此,下述 HPP-CFC 实验均采用五因子组合及筛选的血清 1 进行。

同既往的观察结果相似<sup>[6]</sup>,在第 4 天拟胚体中发现原始红系集落和巨噬细胞 24h 后,HPP-CFC 出现(彩版 I-图 2C)。ES 细胞来源的 HPP-CFC 形成的巨大集落应仔细判断,易与一些造血拟胚体混淆。排除的方法是造血拟胚体中央是非常致密的细胞团。

研究表明:卵黄囊、胎肝和成体骨髓来源的 HPP-CFC 都能够产生二级集落,尽管其细胞组成不同<sup>[6]</sup>。因此,我们对 12d 拟胚体,9d 卵黄囊和骨髓来源 HPP-CFC 的再生能力进行比较。结果表明 3 个不同来源的 HPP-CFC 均可形成二级 HPP-CFC 集落,约 40% 的 ES 细胞来源的 HPP-CFC 能形成二级 HPP-CFC。但三者产生二级 CFC 的性质不同,骨髓来源的 HPP-CFC 只能产生 CFU-GM,而 ES 细胞和卵黄囊来源的可产生含有永久红系细胞的 CFU-mix(彩版 I-图 2E)和爆式红系集落(Erythroid burst-forming unit, BFU-E,彩版 I-图 2F)。多种二级集落的细胞组成通过瑞氏-吉姆萨染色进行了分析和证实(彩版 I-图 2G、I)。

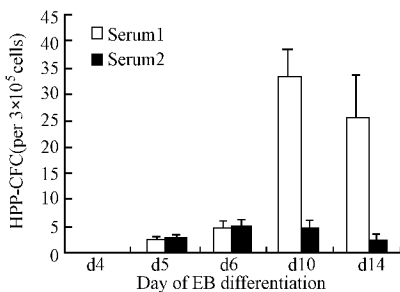


图 1 血清批次对 ES 细胞来源的 HPP-CFC 发育动力学的影响

Fig.1 Effect of serum lots on development kinetics of ES cells-derived HPP-CFC

## 2.2 ES 细胞来源的 HPP-CFC 在转录水平表达多种造血特异性的转录因子和细胞因子受体

研究表明,小鼠骨髓和胎肝来源的多潜能造血前体细胞具备广泛的造血特异性转录因子和造血生

长因子受体表达<sup>[7]</sup>。鉴于 ES 细胞来源的 HPP-CFC 向红系、粒单系的分化潜能,我们检测了其基因表达模式。RT-PCR 结果显示,HPP-CFC 在转录水平表达与造血干细胞发生、扩增相关的转录因子 SCL、GATA-2、AML-1 及诸如干细胞因子受体 c-kit、GM-CSF 受体和 IL-3 受体等造血生长因子受体(彩版 I-图 3)。

## 2.3 ES 细胞来源的造血细胞在体内不能形成典型的 CFU-S

研究表明,HPP-CFC 和 CFU-S 是体外和体内造血分化的对应物,即具有 HPP-CFC 活性的造血前体细胞能够在体内形成 CFU-S<sup>[8]</sup>。我们应用分化 12d 的拟胚体或直接挑取 HPP-CFC 集落进行 CFU-S 实验。作为阳性对照的骨髓细胞能形成典型 CFU-S,但实验组均未发现。

与既往报道一致,分化 12d 的拟胚体细胞重建亚致死剂量照射的 SCID 小鼠造血的能力有限<sup>[9]</sup>。在照射后 4~7d 内,4 只未输注细胞的对照组小鼠全部死亡,3 只实验小鼠死亡。移植后 20d 时,取剩余 6 只小鼠骨髓细胞作流式细胞仪检测,发现只有极低比例,约 2%~3% 的 ES 细胞来源的造血细胞出现(图 4)。

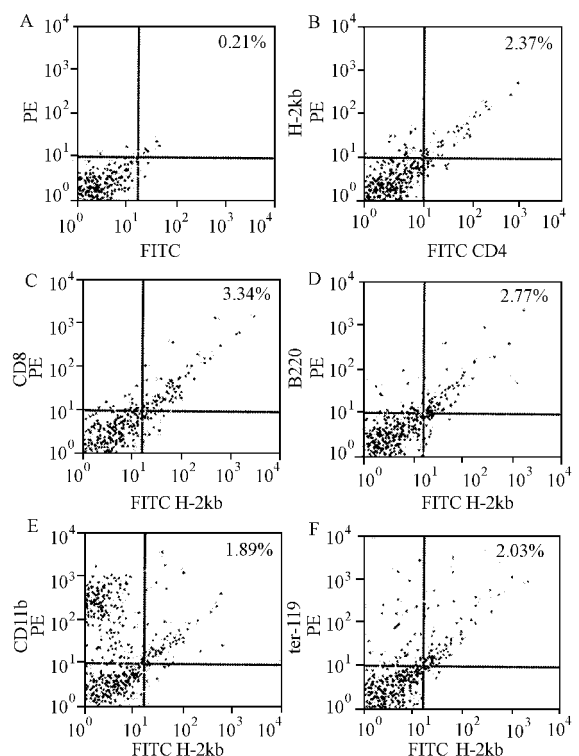


图 4 流式细胞仪分析 ES 细胞来源的造血细胞在 SCID 小鼠体内的分布

Fig.4 Analysis of hematopoietic contribution of ES cells derived EB cells to sublethally irradiated SCID mice

### 3 讨 论

近 10 年来,小鼠 ES 细胞体外定向造血分化主要应用于与胚胎造血发育和分化相关基因的功能研究,并逐渐成为一种常规手段。由于既往研究的基因几乎都正向的参与造血发育和分化的调控,因此对早期造血前体细胞的研究止步于 CFC 检测,而此类集落的鉴定主要依靠对集落中所含细胞形态的分类。对小鼠骨髓和胎肝的研究认为,HPP-CFC 是比 CFC 更早期的造血前体细胞,是在体外无基质细胞支持体系中能够鉴定的最原始的细胞,其子代细胞具有 CFU-S 形成活性。Yoder 小组和我们的研究认为,ES 细胞经体外诱导在分化 5~6d 拟胚体中可发现 HPP-CFC<sup>[2,6]</sup>。鉴于分化 12d 之前的拟胚体中还含有未分化的 ES 细胞,可在造血集落培养中形成二级拟胚体,有体内成瘤活性。因此,本研究在此基础上分析了较晚期拟胚体中 HPP-CFC 的体外增殖和体内造血分化的特点。从发生时机和自我更新能力而言,ES 细胞来源的 HPP-CFC 与卵黄囊相似,进一步验证了 ES 细胞体外分化能模拟早期胚胎造血。同时发现,筛选血清中的未知物质能刺激较晚期拟胚体中 HPP-CFC 的扩增。但是,体外发现的 HPP-CFC 在体内未发现 CFU-S 活性。本研究认为,在增殖和自我更新能力方面,ES 细胞来源的造血前体细胞和胚胎造血组织相似,其缺乏体内造血重建能力是否与归巢能力相关值得进一步的研究。此外,ES 细胞/HPP-CFC 模型的建立为研究与早期干/祖细胞发育负向调控的相关基因功能提供了灵敏和有效的系统。但是,本研究建立的 HPP-CFC 系统尚存在一些待研究的问题,如在体外是否有淋巴系统的分化潜能?国内研究曾报道合适的体系可诱导小鼠 ES 细胞向浆细胞的高效分化<sup>[10]</sup>。

ES 细胞定向造血细胞分化的另一诱人前景是其相应的治疗克隆策略在血液病治疗中的应用。这在很大程度上取决于体外分化能否获得能够长期重建体内造血系统的原始细胞。但是,目前研究仅能够接近这个目标,有两项研究的结果是有代表性的。1995 年,Palacios 等应用基质细胞系 RP010 与 ES 细胞共培养,辅以 IL-3、IL-6 和胎肝基质细胞上清刺激,产生的单个核细胞经细胞分选获得 PgP-1 + Lin-亚群,能重建受照射的 SCID 小鼠的髓系和淋系造血功能,一级受体小鼠的骨髓还能支持二级受体小鼠的造血重建,表明诱导获得的细胞有广泛的自我更

新能力<sup>[11]</sup>。但此项研究并未表明能够重建正常成体小鼠的造血。2002 年,Daeley 小组应用 HoxB4 转导的小鼠卵黄囊细胞及拟胚体细胞能重建受照射的成体小鼠的髓系和淋系造血。但此项研究的缺陷在于持续的 HoxB4 表达更加支持髓系分化,从而使淋系分化减弱<sup>[12]</sup>。作者认为,幼稚或未成熟的胚胎型造血干细胞向成熟的功能性的成体型造血干细胞的转变可能和胚胎发育时期不同造血组织的基质微环境的作用有关。

### REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T *et al.* Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (1): 473 - 486
- [ 2 ] Liu B, Sun Y X, Jiang F Z *et al.* Disruption of Smad5 gene leads to enhanced proliferation of high-proliferative potential precursors during embryonic hematopoiesis. *Blood*, 2003, **101** (1): 124 - 133
- [ 3 ] Begley C G, Visvader J, Green A R *et al.* Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, **88**: 869 - 873
- [ 4 ] Schmitt R M, Bruyns E, Snodgrass H R. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes Dev*. 1991, **5**: 728 - 740
- [ 5 ] Park L S, Martin U, Sorensen R *et al.* Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, **89**: 4295 - 4299
- [ 6 ] Palis J, Chan R J, Koniski A *et al.* Spatial and temporal emergence of high proliferative potential hematopoietic precursors during murine embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, **98**: 4528 - 4533
- [ 7 ] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman I L. A clonogenic common myeloid progenitor that give rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000, **404**: 193 - 197
- [ 8 ] McNiece I K, Bertoncello I, Krieger A B, Quesenberry P J. Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *International Journal of Cell Cloning*, 1990, **8**: 146 - 160
- [ 9 ] Muller A M, Dzierzak E A. ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development*, 1993, **118**: 1343 - 1351
- [ 10 ] QIAO C F (乔春平), LI S N (李树浓), HUANG S I (黄绍良) *et al.* Induction of plasma cells from embryonic stem cells *in vitro* culture. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 1999, **15** (1): 24 - 27
- [ 11 ] Palacios R, Golunski E, Samaridis J. *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**: 7530 - 7534
- [ 12 ] Kyba M, Perlingeiro R, Daely G. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell*, 2002, **109**: 29 - 37

## The Investigation of Hematopoietic Capacity of HPP-CFC Derived from Murine Embryonic Stem Cells *in vitro* and *in vivo*

LIU Bing HOU Chun-Mei WU Ying ZHANG Shuang-Xi MAO Ning\*

<sup>1</sup>( Department of Cell Biology , Institute of Basic Medical Sciences , Beijing 100850 , China )

<sup>2</sup>( Department of Immunology , Secondary Military Medical University , Shanghai 200433 , China )

**Abstract** The hematopoietic system of the mouse arises from extraembryonic mesoderm that migrate through primitive streak to the presumptive yolk sac at day 7.0 of gestation. However, the mechanisms regulating mesoderm commitment to hematopoietic lineages remain poorly understood. Previous studies demonstrated that the development kinetics and growth factor responsiveness of hematopoietic precursors derived from embryonic stem cells (ES cells) is similar to that found in the yolk sac, indicating that the onset of hematopoiesis within the embryoid bodies (EBs) parallels that found in the embryo. Furthermore, *in vitro* differentiation of ES cells to hematopoietic cells is valuable for establishment of therapeutic clone against a variety of hematological disorders. Despite the identification of multipotential hematopoietic progenitors in EBs, a subset of more primitive progenitors, identical to the high proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC) derived from human and murine hematopoietic tissues, have not been clearly identified regarding particular their replating potential *in vitro*. HPP-CFC is among the most primitive hematopoietic multipotent precursors cultured *in vitro*. In this study, our aim was to investigate the *in vitro* and *in vivo* hematopoietic capacity of HPP-CFC within the day 12 EBs, rather than the expansion of more committed progenitors. In this study the HPP-CFC could be detected within EBs differentiated for 5 to 14 days of murine ES cells, but the development dynamics of the HPP-CFC differed greatly among distinct serum lots. Qualitatively HPP-CFC is capable of forming secondary colonies. As to our expectation the ES cells-derived HPP-CFC demonstrated similar regeneration capacity to those from yolk sac, giving rise to secondary granulocyte, erythrocyte, macrophage and mast cells, however largely differed from the counterparts of adult bone marrow. In addition, by RT-PCR ES cells-derived HPP-CFC were found to express transcription factors associated closely with stem cell proliferation including SCL, GATA-2 and AML1 as well as various receptors of hematopoietic growth factors such as c-kit, GM-CSF receptor and interleukin 3 receptor *et al.* Finally, in order to understand the *in vivo* hematopoietic capacity of the ES cells-derived HPP-CFC, spleen colony-forming unit (CFU-S) assay was performed. Nevertheless, typical CFU-S was not observed after transplantation of the day 12 EB cells or HPP-CFC colonies into lethally irradiated adult murine. In conclusion the HPP-CFC differentiated from murine ES cells displayed robust hematopoietic activity *in vitro*, however their *in vivo* reconstitution ability was not detected. The difference between *in vitro* and *in vivo* hematopoietic activities of ES cells-derived primitive hematopoietic precursors deserves further investigation.

**Key words** embryonic stem cells, HPP-CFC, CFU-S

Received : 12-03-2002

This work was supported by grant from national 863 program ( No. 2001AA217131 ) and national 973 program ( No. G1999054302 ).

\* Corresponding author. Tel : 86-10-66931320 ; Fax : 86-10-68213039 ; E-mail : maoning@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>