

## FL 对脐血造血细胞长期液体培养的影响\*

张孝兵\*\* 蔡海波 赵 佼 谭文松 俞俊棠

(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** 用脐血进行干细胞移植有许多优点,但有一个主要的缺点是可获得的细胞数量有限,因此脐血干细胞的体外扩增对于其临床应用具有重要意义。考察了 Flt-3 配体(FL)和干细胞因子(SCF)、白介素 3(IL-3)、IL-6、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的组合对脐血细胞扩增和分化的影响。培养 42d,总细胞最多扩增了  $385.30 \pm 163.51$  倍(FL + SCF + G-CSF + GM-CSF),粒细胞巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)在第 28 天达到最高,最高扩增了  $409.52 \pm 189.50$  倍(FL + SCF + IL-3 + IL-6)。FL 与 SCF 等细胞因子具有协同作用,对所有考察的细胞因子组合中,加入 FL 都使总细胞和 CFU-GM 的扩增倍数增加。FL + SCF 培养的总细胞扩增最小,而 CFU-GM 长时间保持在较高水平,表明这 FL 和 SCF 有利于保持造血干细胞的活性,防止细胞分化。在存在 G-CSF 和 GM-CSF 的培养中,总细胞获得了最大的扩增,但 CFU-GM 达到最大后很快下降至 0,表明 G-CSF 和 GM-CSF 促进了细胞的分化。结果提示,细胞因子组合对脐血造血细胞的扩增和分化具有重要的作用,FL 和 SCF 可促进造血细胞的扩增,而 G-CSF 和 GM-CSF 等可导致细胞的过度分化。

**关键词** 造血干细胞,脐血,Flt-3 配体(FL),细胞培养,体外扩增

**分类号** Q952 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0343-48

人脐血中包含大量的造血干细胞(HSC),迄今为止至少已进行了 1000 例脐血移植用以治疗白血病等多种疾病,但由于每份脐血的量很少,人们希望通过体外扩增来增加脐血样本中 HSC 的数量<sup>[1,2]</sup>。细胞因子对于介导 HSC 的扩增和分化必不可少。迄今大部分的研究考察了 flt-3 配体(FL)和其他细胞因子对 CD34<sup>+</sup> 细胞的作用<sup>[3]</sup>,但没有深入研究对脐血单个核细胞(MNC)的作用。由于在 CD34<sup>+</sup> 细胞的筛选过程中可能造成 HSC 的大量丢失,故一般认为,体外 MNC 的扩增培养可能有更大的临床应用前景。FL 和干细胞因子(SCF)一样,主要作用于早期 HSC,促使细胞走出 G<sub>0</sub> 期,开始扩增<sup>[4]</sup>。各种细胞因子单独使用时,对细胞扩增的刺激作用都不大,联合使用时一般具有协同作用<sup>[5]</sup>。HSC 在体外培养过程中,不仅进行着自我更新,同时也不断分化为各种成熟血细胞。临床实践表明,CFU-GM 的数量与 HSC 的数量成正相关,干细胞移植的成败以及植入的速度都与 CFU-GM 计数有关<sup>[6]</sup>,本文也用它来衡量脐血 MNC 在体外液体培养中扩增的程度。细

\* 部分得到“九五”国家重点科技攻关计划(96-C02-03-03)、上海市科学技术发展基金和上海市曙光计划的资助(96SG06)。

\*\* 电话:021-64252536;E-mail: zhang-xb@163.net

收稿日期:1998-06-23,修回日期:1998-12-14。

胞因子的种类及其组合对 HSC 的扩增和分化有很大影响,因此我们进一步研究了 FL 和其他几种细胞因子联合使用对总细胞的粒细胞巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)扩增倍数的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 脐血单个核细胞分离方法

新鲜脐血用 3% 的明胶(Sigma)沉降,取上层平铺到比重为 1.077 的淋巴细胞分离液(上海华精生物技术公司)上,400g 离心 20~25min。收集界面层细胞,IMDM(Gibco)培养基洗涤 3 次待用。

### 1.2 细胞因子

细胞因子均为人重组蛋白,液体培养和半固体培养中使用的细胞因子的浓度相同。SCF、IL-6 和 IL-3。购于北京医科大学免疫室,其终浓度分别为 50ng/mL, 10ng/mL 和 10ng/mL;FL(Pepro Tech, 由深圳晶美生物工程公司代理),粒细胞集落刺激因子(G-CSF, 文中简称 G, 上海三维制药厂)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF, 文中简称 GM, 上海克隆技术公司)的使用浓度均为 20ng/mL。

### 1.3 短期液体培养

在 24 孔板(Nunc)中,使用 IMDM 培养基进行培养,添加 20% 胎牛血清(简称 FBS, Gibco)和细胞因子,每孔 1mL,接种密度  $1.5 \times 10^5$ /mL。培养 8d 后,取样计数总细胞并检测 CFU-GM。

### 1.4 长期液体培养

使用 IMDM 培养基在 24 孔板中进行培养,添加 20% 胎牛血清(简称 FBS, Gibco)和细胞因子,每孔 1mL,接种密度  $5 \times 10^5$ /mL。细胞培养在水饱和的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行,根据细胞的生长情况,每培养 3~7d 后取出部分细胞以使其密度不高于  $5 \times 10^5$ /mL,同时进行总活细胞计数和分析检测 CFU-GM。

### 1.5 CFU-GM 检测法

24 孔板中每孔加入 500 $\mu$ L 半固体培养基,其组成为:含 0.9% 甲基纤维素(4000cp, Sigma)的 IMDM 培养基,添加 20% FBS,用前再加入 SCF、IL-3、IL-6、G 和 GM,细胞接种密度  $1 \sim 2 \times 10^4$ /mL。培养 14d 后观察计数 CFU-GM,大于 50 个细胞的计为一个集落。

### 1.6 细胞计数

用血球计数板和台盼蓝染色法确定。

### 1.7 数据处理

扩增倍数定义为培养一定时间后的总细胞数及其 CFU-GM 数量与初始值的比值,同时假定取出的细胞与留下的细胞一样继续进行扩增。所有数据都是 3 个实验的平均值。

## 2 结果和讨论

### 2.1 脐血 MNC 的短期液体培养

脐血 MNC 添加不同的细胞因子培养 8d 后,总细胞的扩增倍数见图 1。FL 和 SCF 单独使用时,细胞不能得到扩增,再加入 IL-3,则有明显扩增。不存在 FL 和 SCF 时,组合

IL-3+IL-6+G+GM使总细胞有一定程度的扩增( $1.54 \pm 0.46$ 倍),加入SCF或FL后,总细胞的扩增倍数显著增加;而当两种细胞因子同时加入时又比单独加入时的扩增倍数显著增加,这表明SCF和FL对脐血MNC的扩增具有重要作用。

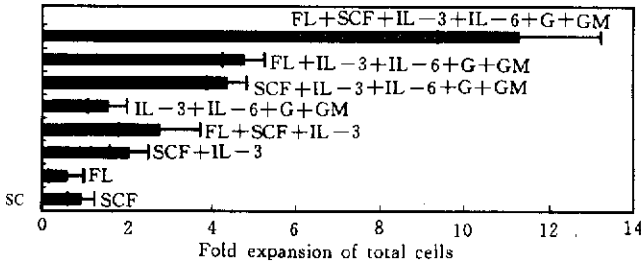


图1 脐血单个核细胞培养8d后的总细胞扩增

Fig. 1 Fold expansion of total cells after 8 days of culture

Cord blood MNC were cultured in IMDM containing 20% FBS supplemented with cytokine combinations designated.

The values represent the mean  $\pm$  SEM from three experiments.

细胞因子对CFU-GM的影响见图2。FL或SCF单独使用可扩增CFU-GM,而加入IL-3促使CFU-GM更大程度的扩增。同样的,组合IL-3+IL-6+G+GM中加入FL或SCF也使CFU-GM扩增倍数进一步增加,但两种细胞因子同时加入时其扩增倍数反而下降,这主要是由于该组合更大程度地促进了总细胞的扩增,但细胞产生的代谢废物使HSC的活性受到损害。因此,我们进一步考察了在不断更换培养基的条件下进行长期培养的情况。

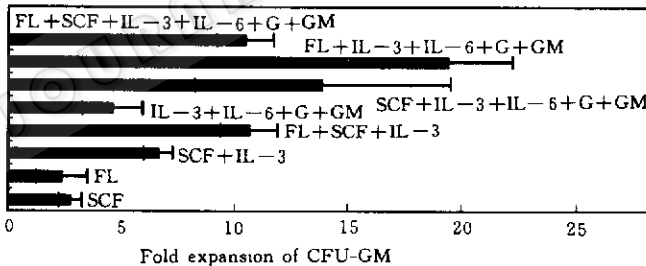


图2 脐血单个核细胞培养8d后CFU-GM的扩增

Fig. 2 Fold expansion of CFU-GM after 8 days of culture

The legends were the same as Fig. 1.

## 2.2 脐血MNC的长期液体培养

**2.2.1 总细胞的变化:** 我们以前的研究表明,SCF和FL等单独一种细胞因子不支持脐血MNC的长期培养,即使不断更换培养基,CFU-GM的扩增也不超过10倍。在图3所示的8种细胞因子组合中,组合SCF+FL的总细胞扩增倍数最低,23d时的最高值仅为 $10.73 \pm 2.22$ 倍。SCF+IL-3是一种常见组合,用这两种细胞因子进行培养后的细胞可加速短期植入<sup>[5]</sup>。培养28d后,总细胞最多可扩展至 $77.65 \pm 22.00$ 倍。该组合中,用FL取代SCF,可使总细胞的扩增持续到35d;而同时存在FL和SCF时,其扩增可持续到第42d。同样的,FL可增加组合SCF+IL-3+IL-6的扩增倍数,表明FL可显著增加总细胞

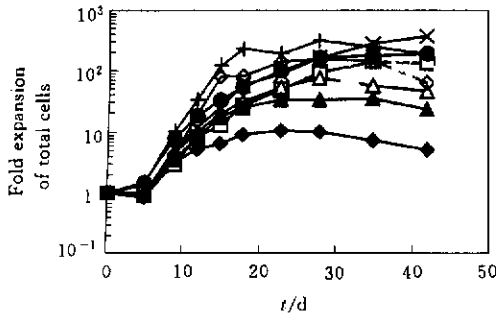


图 3 长期培养过程中总细胞的扩增

Fig.3 Time profiles for the expansion of total cells in long-term culture

The cultures were conducted in IMDM and 20% FBS with SF(◆), F3(□), S3(△), FS3(×), S36(▲), FS36(●), SG + GM(◇), FSG + GM(+). The data represent the mean of three experiments.

力不强,但能促使 CFU-GM 的扩增,第 23d 时扩增了  $94.81 \pm 14.65$  倍。在 SCF + IL-3 中加入 FL 也使 CFU-GM 增加,而该组合中,用 FL 取代 SCF,可使 CFU-GM 显著增加。

以前报道,SCF + IL-3 + IL-6 能支持造血细胞较好的扩增<sup>[7]</sup>,本研究也证明了这一点,再加入 FL 可进一步增加扩增倍数,在培养 23d 后差别显著。实验中组合 FL + SCF + IL-3 + IL-6 最能支持 CFU-GM 的扩增,28d 时扩增倍数达到最高,为  $409.52 \pm 169.50$  倍,且能长期维持。

存在 SCF + G + GM 时,CFU-GM 在第 15d( $33.78 \pm 18.96$  倍)后即不再增加,到 35d 时已下降到 0,这是最不利于 CFU-GM 扩增的一个组合。该组合中加入 FL,改善了 CFU-GM 的扩增状况,18d 时达到最高,扩增了  $92.36 \pm 41.58$  倍,但 CFU-GM 从此便迅速下降,表明它促进了细胞的分化,暗示组合中包括这两种细胞因子不利于 HSC 活性的保持。从图 4 可以看出,存在 FL 的组合与不存在该细胞因子的组合相比,在培养 18d 以后其 CFU-GM 的扩增倍数均较高,这表明 FL 确实能促进 CFU-GM 的扩增,同时较好地维持 HSC 的活性。

2.2.3 CFU-GM 和总细胞扩增相对比值的变化情况:为了进一步分析培养过程中脐血 MNC 进行自我更新和分化的情况,我们计算了 CFU-GM 和总细胞扩增倍数的比值,比值 >1,表明自我更新的程度大于分化的程度;比值 <1,表明自我更新程度小于分化程度(图未显示,根据图 3 和图 4 的数据可计算出来)。在所有组合的培养前 5d,比值迅速上升到

的扩增倍数。

在所有的培养中,3 周后均有贴壁细胞出现,而且不断增多,但只有存在 G 和 GM 时贴壁细胞最多,且具有树突状细胞形态。组合 SCF + G + GM 在培养的第 35 天时,CFU-GM 就下降到 0。在组合 SCF + G + GM 和组合 FL + SCF + G + GM 中,总细胞从培养的第 5 天开始到第 18d,扩增倍数在考察的 8 个组合中最大,此后就保持平稳,表明它们能使总细胞快速扩增。

2.2.2 CFU-GM 的扩增倍数:图 4 显示了培养过程中 CFU-GM 的扩增状况,扩增倍数降至 0 后在该对数图中未能正确显示。在培养的前 5d,CFU-GM 均获得了较大的扩增。SCF + FL 虽然支持总细胞扩增的能

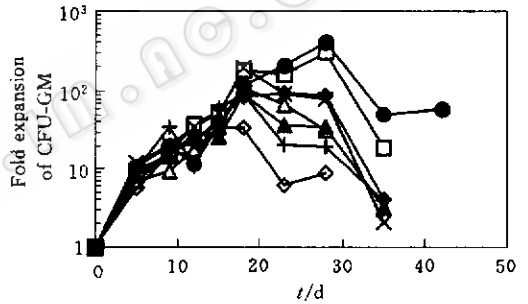


图 4 长期培养过程中 CFU-GM 扩增

Fig.4 Time profiles for the expansion of CFU-GM.

The symbols were the same as Fig.3.

10 左右,表明在培养的初期,分化程度很小,而自我更新程度很大,随后,相对比值均出现不同程度的下降。在第 28 天以前,组合 SCF + FL 的比值一直保持在最高水平,表明这两种细胞因子能较好地保持 HSC 的活性;而当培养中存在 G 和 GM 时,从第 5d 开始,其比值几乎一直呈指数下降,表明这两种细胞因子加速了细胞的分化。随着培养时间的延长,都出现下降并最终跌到 0,说明体外培养的时间过长可能会导致细胞的全面分化,这可能也是短期培养的细胞能够植入而长时间体外培养后的细胞不能植入的原因<sup>[8]</sup>。

对于存在 FL 的组合,在整个培养过程中比值总是较高,表明细胞因子组合中包括 FL 有利于 HSC 的活性。它的主要作用是促进了 HSC 更快地进入细胞周期<sup>[3]</sup>。当不存在 FL 时,一些 HSC 可能在体外培养一定时间后就开始凋亡。

本文报道的 FL 对扩增的影响没有某些作者所报道的结果之间的差别那样显著<sup>[3]</sup>,可能与使用的 FL 的浓度较低(文献中的使用浓度一般为 50~100ng/mL)有关。

### 符号说明

CFU-GM 粒细胞巨噬细胞集落形成单位

FBS 胎牛血清

FL flt-3 配体(简称 F)

G-CSF 粒细胞集落刺激因子(文中简称 G)

GM-CSF 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(文中简称 GM)

HSC 造血干细胞

IL-3 白介素 3(简称 3)

IL-6 白介素 6(简称 6)

MNC 单个核细胞

SCF 干细胞因子(简称 S)

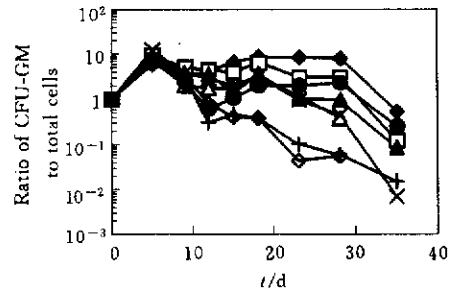


图 5 长期培养过程中 CFU-GM 与总细胞相对比值的变化

Fig. 5 Time profiles for the ratios of expansion of CFU-GM to that of total cells

The symbols were the same as in Fig. 3.

### 参 考 文 献

- [1] J. E. Wagner, N. A. Kernan, M. Steinbuch *et al.* *Lancet*, 1995, **346**:214~219.
- [2] J. Kurtzberg, M. Laughlin, M. L. Graham *et al.* *New. Engl. J. Med.*, 1996, **335**:157~166.
- [3] D. N. Haylock, M. J. Horsfall, T. L. Dowse *et al.* *Blood*, 1997, **90**(6):2260~2272.
- [4] V. C. Broudy *Blood*, 1997, **90**(4):1345~1364.
- [5] B. Durand, G. Migliaccio, N. S. Yee *et al.* *Blood*, 1994, **84**(11):3667~3674.
- [6] J. E. Kiss, W. B. Rybka, A. Winkelstein *et al.* *Bone Marrow Transplant*, 1997, **19**:303~310.
- [7] N. Debili, J. M. Masse, A. Katz *et al.* *Blood*, 1993, **82**(1):84~95.
- [8] Y. Yonemura H, Ku. F. Hirayama *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**(9):4040~4044.

## The Influence of FL on *in vitro* Expansion of Hematopoietic Cells from Cord Blood in Long-term Liquid Cultures\*

Zhang Xiaobing Tan Wensong Cai Haibo Zhao Jiao Yu Juntang

(The State Key Lab of Bioreactor Engineering,

East China University of Science and Biotechnology, Shanghai 200237)

**Abstract** Though use of umbilical cord blood (CB) for stem cell transplantation has a number of advantages, a major disadvantage is the rather low cell number available. Therefore, *in vitro* expansion were proposed to overcome this limitation. In this paper the effect of flt-3 ligand (FL), stem cell factor (SCF), interleukin (IL)-3, IL-6, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) on long-term *in vitro* expansion and differentiation of cord blood hematopoietic cells was investigated. In the culture containing FL + SCF + G-CSF + GM-CSF, the total cell expansion ratios reached the maximum ( $385.30 \pm 163.51$ -fold) at 28 day, whereas grown with FL + SCF + IL-3 + IL-6, CFU-GM expansion ratios reached a plateau ( $409.52 \pm 189.50$ -fold) at 28 day. FL synergized with SCF and other cytokines. In all the conditions investigated, the culture with FL obtained an increase of both total cell and CFU-GM expansion. Combination of FL + SCF don't benefit to the proliferation of the total cells, however, the expansion of CFU-GM keep at high level. Apparently both cytokines keep the activities of stem/progenitor cells and hamper differentiation. In the presence of G-CSF and GM-CSF, total cells enhanced quickly, and had the most expansion of total cells in comparison with other combinations. However, CFU-GM output peaked at 18 day and subsequently dropped to 0 promptly, suggesting that G-CSF and GM-CSF inspired differentiation.

**Key words** Hematopoietic stem cells, cord blood, flt-3 ligand, cell culture, *in vitro* expansion

\* This Work Was Partially Supported by the State "Ninth-Five" Key Science and Technology Project (96-C02-03-03), Shanghai Science and Technology Development Foundation (965419002), and Shanghai Shuguang Project(96SG06).