生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, October 25, 2016, 68(5): 691–698
DOI: 10.13294/j.aps.2016.0082 http://www.actaps.com.cn

研究论文

混合培养体系中间充质干细胞与造血干细胞生物学特性

魏 伟*，许 超，叶志勇，黄晓君，袁嘉恩，马天宝，林汉标，陈秀琼

广东省脐带血造血干细胞库，广州 510663

摘 要：为了体外同时获得符合鉴定标准的造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cell, HSC/HPC)和间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)，本研究采用Ficoll淋巴细胞分离液方法从脐带血中分离出脐带血单个核细胞，MACS免疫磁珠法分离出$CD34^+$的造血干细胞。分离出的细胞与MSC同时接种在培养瓶中，利用15% AB型脐血浆的IMDM培养基添加白细胞介素3 (interleukin-3, IL-3)、IL-6、血小板生成素(thrombopoietin, TPO)、干细胞因子(stem cell factor, SCF)和Flt-3配体(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L)因子培养体系来同时培养扩增HSC/HPC和MSC。为了评估扩增出的HSC/HPC和MSC是否符合细胞鉴定标准，本研究通过倒置显微镜观察HSC/HPC和MSC生长状态，并计数细胞。流式细胞仪检测HSC/HPC表面抗原CD34阳性百分率，检测第4代 (P4) MSC表面抗原CD105、CD90、CD73、CD45、CD34和HLA-DR阳性表达率。半固体集落培养检测HSC/HPC的粒细胞-巨噬细胞集落形成能力。将共培养至P4的MSC行成骨、成软骨、成脂肪诱导鉴定。通过秋水仙素法进行MSC核型分析。结果显示，体外共培养的HSC/HPC依然有高增殖能力、集落形成能力和CD34阳性百分率。MSC具有向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞诱导分化的能力。MSC染色体核型维持稳定。以上结果提示本研究成功建立了一种合适的MSC和HSC/HPC混合培养体系，通过该体系可同时获得两种干细胞，共培养后的MSC依然有典型的MSC的生物学功能；共培养后的HSC/HPC的粒细胞-巨噬细胞集落培养、细胞数量和流式表型符合鉴定标准，HSC/HPC生物学功能没有受到影响。

关键词：造血干/祖细胞；间充质干细胞；共培养
中图分类号：Q254

Biological characteristics of mesenchymal stem cell and hematopoietic stem cell in the co-culture system

WEI Wei*, XU Chao, YE Zhi-Yong, HUANG Xiao-Jun, YUAN Jia-En , MA Tian-Bao , LIN Han-Biao, CHEN Xiu-Qiong
Guangdong Cord Blood Bank, Guangzhou 510663, China

Abstract: The aim of the present study was to obtain the qualified hematopoietic stem/progenitor cells (HSC/HPC) and human umbilical cord-mesenchymal stem cells (MSC) *in vitro* in the co-culture system. Cord blood mononuclear cells were separated from umbilical cord blood by Ficoll lymphocyte separation medium, and then $CD34^+$ HSC was collected by MACS immunomagnetic beads. The selected $CD34^+$ HSC/HPC and MSC were transferred into culture flask. IMDM culture medium with 15% AB-type cord plasma supplemented with interleukin-3 (IL-3), IL-6, thrombopoietin (TPO), stem cell factor (SCF) and FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L) factors were used as the co-culture system for the amplification of HSC/HPC and MSC. The cellular growth status and proliferation on day 6 and 10 after co-culture were observed by using inverted microscope. The percentage of positive expression of CD34 in HSC/HPC, as well as the percentages of positive expressions of CD105, CD90, CD73, CD45, CD34 and HLA-DR in the 4^{th} generation MSC, was tested by flow cytometry. Semisolid colony culture was used to test the HSC/HPC colony forming ability. The osteogenic, chondrogenesis and adipogenic ability of the 4^{th} generation MSC were assessed. The karyotype analysis of MSC was conducted by colchicines. The results demonstrated that the HSC/HPC of co-culture group showed higher ability of amplification, CFU-GM and higher $CD34^+$ percentage compared with the control group. The co-cultured MSC maintained the ability to differentiate into bone cells, fat cells and chondrocytes. And the karyotype stability of MSC remained normal. These results reveal that

Received 2016-06-06 Accepted 2016-07-20
*Corresponding author. Tel: +86-20-82075848-316; Fax: +86-20-32218867; E-mail: wwei@chinacord.org

the appropriate co-culture system for MSC and HSC is developed, and via this co-culture system we could gain both two kinds of these cells. The MSCs under the co-culture system maintain the biological characteristics. The CFU-GM ability, cell counting and the flow cytometry results of HSC/HPC under the co-culture system are conform to the criterion, showing that the biological functions of HSC/HPC are maintained.

Key words: hematopoietic stem/progenitor cells; mesenchymal stem cell; co-culture system

造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 是血液成分之一，是生成各种血细胞的最起始细胞，又称造血多能干细胞，存在于骨髓、胚胎肝、外周血及脐带血中。它既具有高度自我更新能力，又具有进一步分化为血液系统祖细胞的能力。目前在临床上，HSC 已经得到了广泛的应用。造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 可用来治疗多种造血系统疾病，例如白血病、再生障碍性贫血、范可尼贫血、重症联合免疫缺陷症等 [1,2]。但是，脐带血中 HSC/ 造血祖细胞 (hematopoietic progenitor cell, HPC) 含量相对较低，限制了其临床应用。因此，体外进行 HSC/HPC 大量扩增是满足临床所需脐带血 HSC/HPC 数量的重要途径。随着世界范围内对 HSC/HPC 扩增研究的不断深入，相关报道不断发表。Long 等发现脐带血 HSC 体外扩增前，先把 $CD34^+$ 细胞纯化，能使脐带血 HSC 在扩增时达到最佳状态 [3]。HSC/HPC 在体外扩增时，细胞因子的选择有重要意义。一般认为，干细胞因子 (stem cell factor，SCF，又称 c-Kit 配体)、血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 和 Flt-3 配体 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, Flt-3L) 对原始造血细胞的生长具有促进作用 [4]。细胞因子通过特异性受体 c-Kit、c-Mp1、Flt2/Flt3 直接作用于人 HSC，Urashima 等 [5] 用细胞因子 [SCF、白细胞介素 3 (interleukin-3, IL-3)、IL-6、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、干扰素 -γ (interferon gamma, IFNγ)] 不同的组合体外培养脐带血单个核细胞 4 周，结果显示 SCF+IL-3+IL-6+EPO 及 SCF+IL-3+IL-6+G-CSF 组合促生长作用最好，分别扩增 $CD34^+/CD38^+$ 细胞达 19.8 倍及 18.3 倍，SCF+IL-3+IL-6 组合扩增 $CD34^+/CD38^-$ 细胞 15.5 倍。Kusadasi 等 [6] 短期体外培养脐带血来源的 $CD34^+$ 细胞，证实 Flt-3L+TPO 是体外扩增所必需的，2 周培养能把脐带血 $CD34^+$ 细胞数量扩增 10~20 倍并能植入 NOD/SCID 鼠骨髓内。最近的研究表明，使用 G-CSF、SCF、TPO、IL-6、IL-11 和 Flt-3L 等细胞因子的不同组合可以使 HSC/HPC ($CD34^+$ 细胞) 体外扩增几十倍到上百倍 [7]。

另一方面，培养体系中的基质细胞对 HSC 的扩增也有重要作用。Majundar 等 [8] 指出间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 在体外培养和诱导分化过程中能表达 IL-6、IL-11、LIF、G-CSF、SCF、GM-CSF 等多种重要的造血细胞因子，提示 MSC 可为 HSC 在体外扩增提供极佳环境。虽然有文献已经表明，MSC 作为饲养层，可以有效地支持 HSC 的扩增 [9]，但是尚没有文献报道在 MSC 和 HSC 共培养体系中 MSC 的生物学特性。

MSC 和异基因 HSC 联合输注可以预防和缓解植体排斥宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 的发生，促进 HSC 植入，加速造血重建 [10]。近年来，国内使用 MSC 和 HSC 联合输注报道逐渐增多 [11,12]。根据一般方法，MSC 和 HSC 须分别进行分离制备，工作效率有待提高。

本研究通过建立 MSC 和 HSC/HPC 的共培养体系，尝试达到同时扩增 MSC 和 HSC/HPC 的目的，从而可大幅提高 MSC 和 HSC/HPC 的制备效率。同时我们对获得的细胞进行生物学特性研究，评估所制备的细胞是否符合干细胞的鉴定标准。本研究将为今后这两种干细胞的同时制备，缩减实验操作步骤，提高制备效率，并最终应用于临床提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料来源 脐带血来自医院足月妊娠健康产妇，产前检查乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、艾滋、巨细胞病毒、G-6PD 缺陷症和地中海贫血等均阴性。产妇及家属对脐带和脐带血用于实验研究均知情同意。本研究方案得到广东省脐带血造血干细胞库伦理委员会的批准。采集的脐带血于 4 °C 冰箱贮存，4 h 内处理。

1.2 主要试剂和仪器 IMDM 培养基 (美国 Hyclone 公司)；胰蛋白酶 (美国 GIBCO 公司)；细胞因子：IL-3、IL-6、TPO、SCF、Flt-3L (美国 PeproTech 公司)；秋水仙素 (美国 Sigma 公司)；

MethoCult® H4534 培养基 (美国 Stem Cell 公司)；Ficoll 淋巴细胞分离液 (挪威 Axis-Shield 公司)；CD34 免疫微珠 (德国 Miltenyi Biotee 公司)；抗 IgG-FITC 抗体、抗 CD34-PE 抗体、抗 CD105-PE 抗体、抗 CD90-FITC 抗体、抗 CD73-PE 和抗 CD45-FITC 抗体均购自美国 BD 公司。超净工作台 (苏净安泰公司)；二氧化碳培养箱 (日本三洋公司)；倒置显微镜 (美国 Olympus 公司)；高速离心机 (美国 Thermo 公司)；MACS 手动分选器 (德国 Miltenyi Biotee 公司)；手动可调移液器 (法国 Gilson 公司)；流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 $CD34^+$ 细胞的磁珠标记和分选 首先用 Ficoll 淋巴细胞分离液从脐带血中分离出单个核细胞，加 100 μL FcR 封闭试剂和 100 μL CD34 免疫微珠到细胞悬液中，混匀，放入冰箱，4 °C 孵育 30 min。用 MACS 液冲洗进行洗脱，去除细胞碎片和杂细胞等。取下柱子放在收集管上，加入 MACS 液 (LS 柱：5 mL)，接上柱塞，用力快速推下冲洗出吸附的细胞。重复进行过柱一次，之后离心力 300 *g*，离心 10 min 去上清，500 μL MACS 液重悬细胞。收集细胞，进行细胞计数，流式细胞仪进行 $CD34^+$ 细胞纯度测定，准备体外扩增培养。

1.4 HSC/HPC 和 MSC 的体外培养及扩增 MSC 由本血库人员从脐带中分离培养获得，分选出的 $CD34^+$ 细胞与 MSC 按照 15:1 的数量比，用含 15% 人 AB 型脐血浆的 IMDM 培养基重悬，同时接种在 T25 培养瓶中，根据得到的 $CD34^+$ 细胞的数量来确定加入培养基的体积，确保 $CD34^+$ 细胞接种密度为 5×10^4 个 /mL，第 3 代 MSC 接种数量 2×10^4 个 / T25 瓶。在培养基内加入 IL-3 (20 ng/mL)、IL-6 (20 ng/mL)、SCF (50 ng/mL)、TPO (20 ng/mL) 和 Flt-3L (50 ng/mL)。于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。每 3 天添加适量 IMDM 培养基及细胞因子，第 6 天，同时收集悬浮生长的 HSC/HPC 和贴壁生长的 MSC，HSC/HPC 与 MSC 按照 50:1 的数量比同时接种在 T25 培养瓶中，根据扩增后的 HSC/HPC 的数量来确定加入培养基的体积，确保 HSC/HPC 密度为 1×10^6 个 /mL，MSC 密度为 2×10^4 个 /T25 瓶，4 天后收获 HSC/HPC 和 MSC。设置对照组为 HSC/HPC 单独培养组，其它培养条件与共培养组一致。

1.5 细胞表面抗原检测 应用流式细胞仪分析扩增前后 HSC/HPC 的表面抗原。取培养 0、6、10 d 的 HSC/HPC，经离心收集至少 1×10^5 个细胞，生理盐水离心洗涤 2 次。同型对照管加入小鼠 IgG-FITC，检测管加入小鼠抗人 CD34-PE 和 CD45-FITC，各 5 μL。室温避光孵育 30 min，流式细胞仪检测。设置对照组为 HSC/HPC 单独培养组，其它培养条件与实验组一致。取共培养的第 4 代 (P4) MSC，经 0.25% 胰蛋白酶消化收集后，生理盐水离心洗涤 2 次。同型对照管加入小鼠 IgG-FITC、IgG-PE，各 5 μL。检测管分别加入小鼠抗人 CD105-PE、CD90-FITC、CD73-PE、CD45-FITC、CD34-PE 各 5 μL。室温避光孵育 30 min，流式细胞仪检测。

1.6 细胞集落形成能力检测 集落形成能力分析可以用来检测造血潜能。本实验主要进行粒单系集落形成单位 (granulocyte macrophage-colony forming unit, CFU-GM) 集落的培养。采用 Stem Cell 公司的甲基纤维素半固体培养基 H4534，检测脐带血 HSC/HPC 扩增后的 CFU-GM。检测于 6 孔板中进行，脐带血 $CD34^+$ 扩增细胞的 CFU-GM 密度为 5×10^3 / 孔，培养 10 天后，显微镜下观察，并计算集落数。设置对照组为 HSC/HPC 单独培养组，其它培养条件与实验组一致。

1.7 MSC 诱导鉴定能力检测 取共培养后的 P4 MSC，用生理盐水离心洗涤 2 次，将细胞按 3×10^4 / 孔的细胞量接种于经多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片的 6 孔板内，置 37 °C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。待细胞生长至 80% 融合时，实验组吸去原培养基，分别加入成骨诱导培养基 (以 DMEM/F12 为基础培养基，添加 0.1 μmol/L 地塞米松、50 μmol/L 维生素 C、10 mmol/L β- 磷酸甘油钠、5% 胎牛血清)、成软骨诱导培养基 (以 DMEM 高糖为基础培养基，添加 6.25 μg/mL 胰岛素、6.25 μg/mL 转铁蛋白、10 ng/mL TGF-β1、0.1 μmol/L 地塞米松、50 μg/mL 维生素 C、5% 胎牛血清)、成脂肪诱导培养基 (以 DMEM/F12 为基础培养基，添加 1 μmol/L 地塞米松、100 μmol/L 吲哚美辛、0.5 mmol/L IBMX、10 μg/mL 胰岛素、5% 胎牛血清)，对照组用原培养基继续培养。每 3 天换液一次，培养 21 天后终止，爬片固定。分别行茜素红染色、阿利新蓝染色和油红 O 染色鉴定 [14]。

1.8 MSC 染色体核型分析 用秋水仙素 (终浓度 0.05 μg/mL) 处理 P4 MSC，2 h 后收集细胞，用 0.075 mol/L 的 KCL 溶液 5 mL 低渗处理细胞 30 min，固定、制片。将制片标本放置 65 °C 烘烤 3 h，室温存放 3~7 d。37 °C，0.25% 胰蛋白酶溶液中预处理

10~20 s，然后用 GKN 溶液和自来水依次漂洗数秒，立即用 Giemsa 染色 10~15 min，封片，显微镜下观察并做染色体核型分析。

1.9 统计学分析 数据以 mean ± SD 表示，统计学分析用 SPSS13.0 软件处理，组间差异采用单因素方差分析，采用 LSD 两两比较方法，$P < 0.05$ 时认为差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 细胞生长状态

脐带血 HSC/HPC 与 MSC 共培养的第 1 天，显微镜下观察，脐带血 HSC/HPC 悬浮生长，成圆形，体积很小，MSC 贴壁生长，成扁平单层细胞，细胞形态多见长梭形细胞，少量的星形细胞，圆形细胞极少。培养至第 2 天，细胞形态未发生明显改变，镜下也未能见到明显的 HSC/HPC 数量增加。至第 3 天起，脐带血 HSC/HPC 数量开始逐渐增加，并有成簇的细胞团出现，细胞体积变大，胞体透亮，细胞胞质丰富。培养至第 6 天，脐带血 HSC/HPC 已经很密集，呈分散状态，细胞体积大而圆，有部

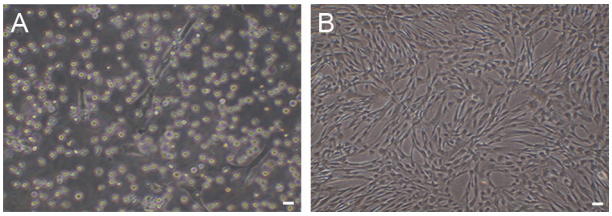

图 1. 倒置显微镜观察MSC和HSC/HPC的形态图

Fig. 1. Morphology of MSC and HSC/HPC in inverted microscope. *A*: HSC/HPC morphology. *B*: P4 MSC morphology. Scale bar, 10 μm.

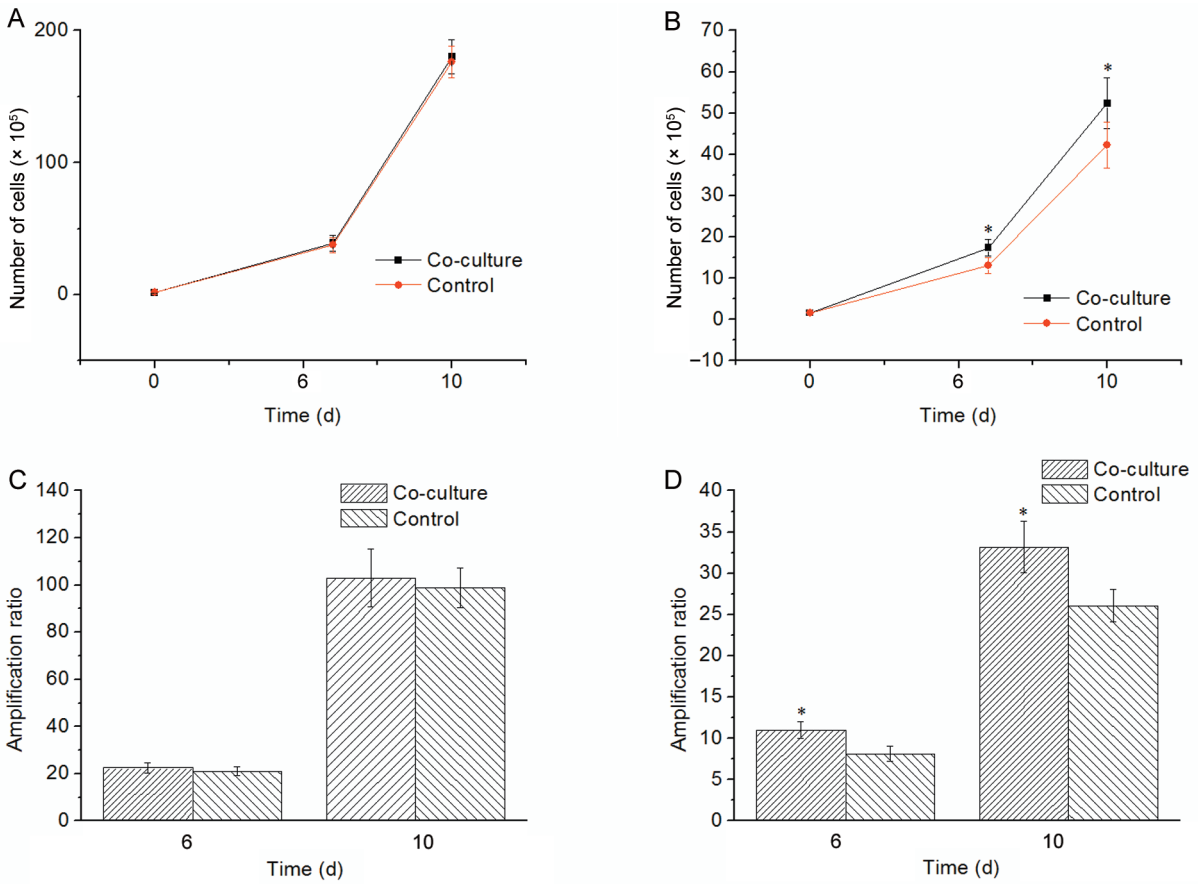

图 2. HSC/HPC细胞增殖倍数

Fig. 2. HSC/HPC amplification times. *A*: Compared with the control group, co-culture group shows no significant difference of total cell amount. Mean ± SD, $n = 6$. *B*: $CD34^+$ cell amount of co-culture group is significantly higher than that of control group. Mean ± SD, $n = 6$. $^*P < 0.05$ *vs* control. *C*: Amplification times of total nuclear cells (TNC) shows no significant difference between co-culture group and control group. Mean ± SD, $n = 6$. *D*: Amplification times of $CD34^+$ cells of co-culture group is significantly higher than that of control group. Mean ± SD, $n = 6$. $^*P < 0.05$ *vs* control.

分细胞粘附在 MSC 上生长。此时 MSC 细胞数量达到 80% 融合，细胞形态变得细长，形态类似成纤维细胞，成平行排列生长或旋涡状生长。细胞进行传代，继续培养 4 天，培养至第 10 天的脐带血 HSC/HPC，形态多为圆形，但也有部分细胞呈现异质性，镜下可见多种细胞形态 (见图 1)。HSC/HPC 单独培养组的细胞状态与共培养组一致。

2.2 细胞体外增殖情况

HSC/HPC 与 MSC 共培养，同时联合细胞因子组合 (SCF+TPO+IL-3+IL-6+Flt-3L)，能使总细胞数量由第 0 天的 $(1.7 \pm 0.2) \times 10^5$ 个，增殖到第 10 天的 $(1.8 \pm 0.2) \times 10^7$ 个，体外扩增倍数达到 (103.0 ± 12.3) 倍，与对照组相比无显著性差异；$CD34^+$ 细胞数量由第 0 天的 $(1.5 \pm 0.1) \times 10^5$ 个增殖到第 10 天的 $(5.2 \pm 0.8) \times 10^6$ 个，$CD34^+$ 细胞体外扩增倍数达到 (33.1 ± 3.1) 倍，显著高于对照组的 (26.0 ± 2.1) 倍 (图 2)。

2.3 HSC/HPC表面抗原分析

经 MidiMACS 免疫磁珠法纯化的人脐带血 HSC/HPC 经流式细胞仪检测，$CD34^+$ 细胞的百分比为 (91.6 ± 5.1)%，刚刚纯化的细胞 CD45 抗原的表达较弱，CD34 抗原高表达，细胞体积小，细胞内颗粒少，为一较集中分布的细胞群。扩增 10 天后 $CD34^+$ 细胞的比例下降到 (29.0 ± 2.7)%，细胞 CD45 抗原的表达增强，而细胞 $CD34^+$ 表面抗原的表达成连续性 (见图 3)。对照组的表面抗原变化规律与实验组一致，但是扩增 10 天后 $CD34^+$ 细胞的比例下降到 (23.0 ± 2.1)%，显著低于共培养组 (见图 4)。

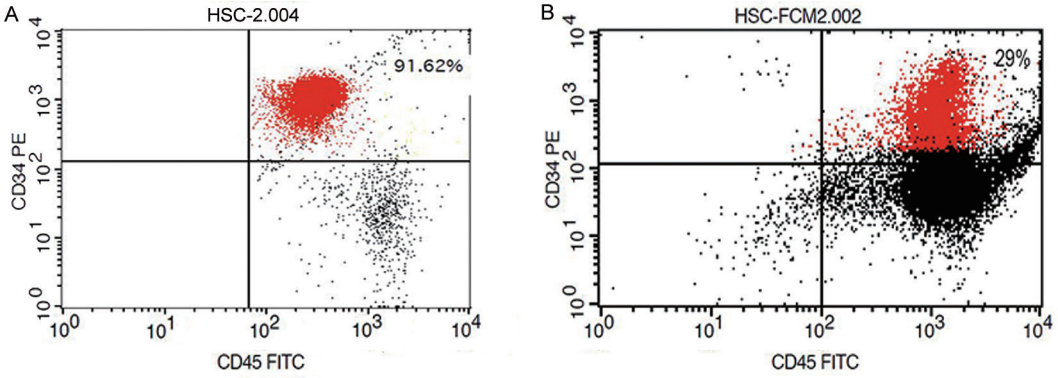

图 3. HSC/HPC $CD34^+$表达百分率逐渐降低，$CD45^+$表达百分率逐渐升高。

Fig. 3. $CD34^+$ percentage of HSC/HPC decreased gradually, whereas $CD45^+$ percentage increased gradually. *A*: $CD34^+$ and $CD45^+$ expression status of HSC/HPC on day 0. *B*: $CD34^+$ and $CD45^+$ expression status of HSC/HPC on day 10.

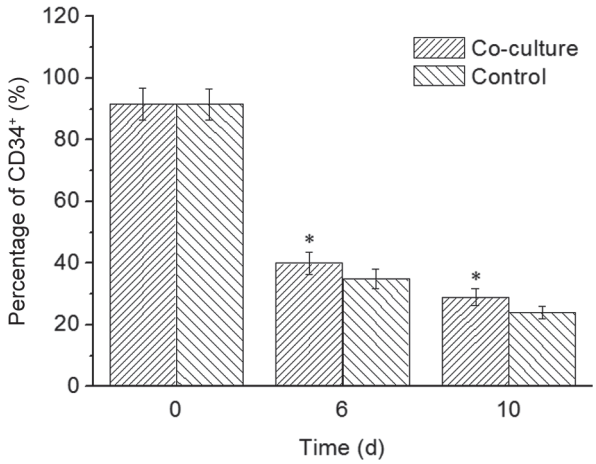

图 4. HSC/HPC细胞$CD34^+$表达百分率

Fig. 4. $CD34^+$ expression percentage of HSC/HPC. Compared with control group, co-culture group showed significantly higher $CD34^+$ percentage of cells. Mean ± SD, $n = 6$. $^*P < 0.05$ *vs* control.

2.4 人脐带MSC表面标志物的检测

P4 MSC 高表达 CD90、CD105 和 CD73，而 CD34、CD45 和 HLA-DR 均低表达或不表达，符合 MSC 的特性 (见表 1)。

2.5 集落形成能力测定

扩增后的 HSC/HPC 进行 CFU 检测，细胞接种

表1. MSCs表面标志物表达阳性率(%)

Table 2. MSCs surface marker positive rate (%)

Cell phenotype	CD90	CD73	CD105	CD34	CD45	HLA-DR
P4 MSCs	94.6 ± 1.2	94.1 ± 3.1	93.1 ± 3.4	0.6 ± 0.1	2.2 ± 1.3	2.9 ± 0.2

Mean ± SD, $n = 6$.

密度为 5 000 个 / 孔。至接种后 3~4 天起逐渐有成小簇的脐带血细胞团出现，随着培养时间的延长，细胞团块不断变大。接种后 10 天时，肉眼下已可见有针尖大小的绒毛样细胞团块。甲基纤维素培养基 H4534 中有大量 CFU-GM 生长，计数为 (254 ± 26) 个集落 /5 × 10^3 个，显著高于对照组的 (201 ± 22) 个集落 /5 × 10^3 个 (图 5、6)。

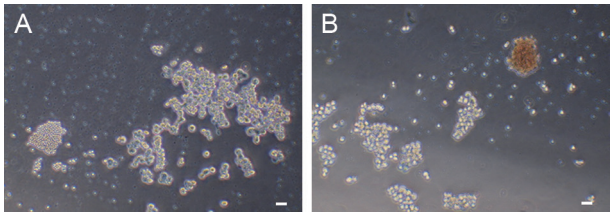

图 5. 第10天HSC/HPC细胞集落形态

Fig. 5. HSC/HPC CFU-GM on day 10. *A*: CFU-GM of co-culture group on day 10. *B*: CFU-GM of control group on day 10. Scale bar, 10 μm.

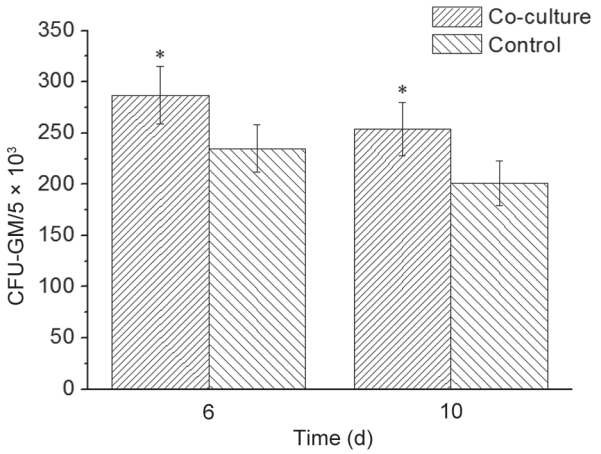

图 6. HSC/HPC 细胞集落计数

Fig. 6. CFU-GM counting of HSC/HPC. Compared with that of control group, CFU-GM amount of co-culture group is significantly higher on day 6 and 10. Mean ± SD, n = 6. $^*P < 0.05$ *vs* control.

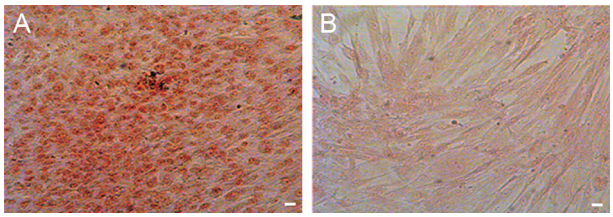

图 7. P4 MSC成骨细胞诱导分化结果

Fig. 7. Osteogenic induction results of P4 MSCs. *A*: Alizarin red staining of MSCs. Co-culture group shows the orange because of the mineralized nodule in cells. *B*: Control group shows no coloring. Scale bar, 10 μm.

2.6 人脐带MSC具有分化成骨、软骨、脂肪细胞的能力

茜素红染色结果显示，在成骨诱导的条件下，与 HSC/HPC 共培养的 P4 MSC 呈阳性，细胞被染成橙红色，表明有矿化结节的形成；对照组着色很浅 (图 7)。

阿利新蓝染色结果显示，在成软骨诱导的条件下，与 HSC/HPC 共培养的 P4 MSC 均呈明显异染，细胞及细胞外基质均呈蓝色，表明其分泌了大量的糖胺聚糖；对照组着色很浅 (图 8)。

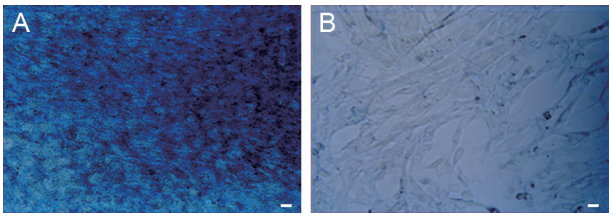

图 8. P4 MSC成软骨细胞诱导分化结果

Fig. 8. Chondrogenesis induction results of P4 MSCs. *A*: Alcian blue staining of MSCs. Co-culture group shows the blue because of the glycosaminoglycan in cells. *B*: Control group shows no coloring. Scale bar, 10 μm.

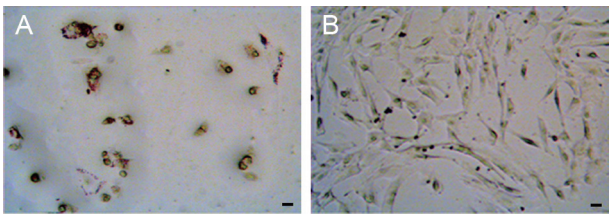

图 9. P4 MSC成脂肪细胞诱导分化结果

Fig. 9. Adipogenic induction results of P4 MSCs. *A*: Oil red O staining of MSCs. Co-culture group shows the red because of the adipogenic object in cells. *B*: Control group shows no coloring. Scale bar, 10 μm.

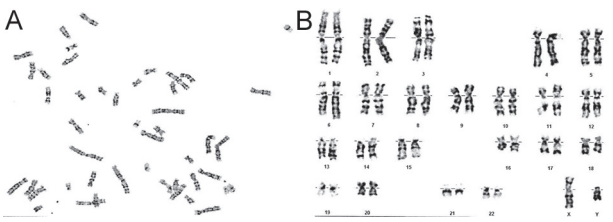

图 10. P4 MSC染色体核型分析

Fig. 10. Karyotype analysis of P4 MSCs. *A*: Enlarged drawing of P4 MSCs. *B*: Chromosome karyotype of P4 MSCs. Karyotype results shows no variation of P4 MSCs in co-culture goup.

油红 O 染色结果显示，在成脂诱导的条件下，与 HSC/HPC 共培养的 P4 MSC 均呈阳性，细胞的胞浆内出现亮红色的颗粒，表明胞浆内容物为脂肪滴；对照组未着色 (图 9)。

2.7 MSCs染色体核型分析结果

P4 MSC 遗传的稳定性和染色体核型均保持正常，未见遗传变异 (图 10)。

3 讨论

脐带血 HSC 被发现能作为 HSCT 的供源，大大地拓宽了 HSCT 的来源及治疗范围，但单份脐带血细胞数量相对较少，又使临床应用有一定限制。临床脐带血移植证实：每千克受者体重的总有核细胞数 (total nuclear cell, TNC) 及 $CD34^+$ 细胞数是移植后受者造血重建及长期生存的关键因素，因此，对脐带血 HSC/HPC 进行体外扩增是解决单份脐带血 HSC 数量不足，不容易用于高体重患者移植的重要途径。目前考虑到，从脐带血中提取的单个核细胞是淋巴细胞、单核细胞及小部分具有低增殖能力的粒系祖细胞等的混合物，一些非增殖细胞成分在培养的初期即死亡并释放其胞浆成分而影响 HSC/HPC 的扩增，因此目前扩增 HSC/HPC 最有效的方法是纯化 $CD34^+$ 细胞并使其接种密度为 1×10^4~1×10^5 /mL，本研究采用免疫磁珠法对 $CD34^+$ 细胞进行分选过柱，实验显示一次过柱脐带血 $CD34^+$ 百分率为 60% 左右，经两次过柱脐带血 $CD34^+$ 百分率可达到 90% 以上，两次过柱明显提高了分选纯度，与 Giarratana 等 [13] 报道一致，但细胞回收率下降。

目前许多实验室在体外扩增培养 HSC/HPC 时，应用 MSC 为饲养层与外源细胞因子共培养，以此提高 HSC/HPC 的扩增效率。我们实验室在共培养方面也做了深入的研究，并将相关内容申请了专利 (ZL201310302780.0)。本研究选择了 MSC 与 HSC 共培养，联合细胞因子组合的方法来扩增 HSC，扩增 10 天后 $CD34^+$ 细胞扩增倍数达到 33 倍，证明该扩增体系是有效的。HSC/HPC 与 MSC 共培养能够促进 HSC/HPC 扩增，其主要原因是 MSC 作为基质细胞构成了造血微环境，在造血调控中发挥重要的作用。体外培养研究表明，MSC 能够分泌 IL-6、SCF、M-SCF 等细胞因子，可促进 HSC 增殖；MSC 除了可分泌调节血液生成的细胞因子外，和 HSC/HPC 间的直接接触也是提高 HSC 扩增效果不可或缺的因素；MSC 细胞膜上有多种粘附因子表达，如 VCAM-1、CD41/CD61、CD49d 和 CD49 等 [14]。而 HSC/HPC 上也有相应粘附分子配体表达。通过粘附分子相互作用，造血干细胞可粘附于 MSC 上，这种细胞间直接接触对于 HSC/HPC 的扩增是非常必要的。本研究结果也显示，部分脐带血 HSC 在培养过程中粘附在 MSCs 细胞上生长，这一现象提示细胞之间的直接接触对于 HSC/HPC 的扩增也是非常必要的。此次研究两种干细胞的培养过程中，HSC 与 MSC 以合适的密度同时接种在培养瓶中培养，达到了同时促进 HSC/HPC 和 MSC 增殖与维持干细胞特性的效果，而且得到的两种干细胞的生物学功能都符合临床应用的要求。

有研究显示，在培养过程中，HSC/HPC 在 7~10 时天保持数量的增加，而随着培养时间的增加，干、祖细胞数量自 12 天开始下降 [15]。本研究显示，脐带血 $CD34^+$ 细胞体外扩增 10 天可获得较多的干 / 祖细胞。HSC 体外扩增自我复制的同时不断地向骨髓各系细胞分化，随着体外培养时间的延长，最原始的 HSC 逐渐减少。本研究结果也证实了 $CD34^+$ 比例随着培养时间的延长不断下降，在 6 天时为 40% 左右，然而在 10 天时降至 29%。第 10 天流式细胞术结果显示，CD45 高表达，CD34 表达呈现连续性，也说明了 HSC 随着培养时间的延长慢慢地分化成祖细胞及成熟细胞，该结果与 Park 等 [15] 结果一致。培养 10 天后，HSC/HPC 集落形成能力达到 254 个集落 /5×10^3 个细胞。共培养后的 HSC/HPC 的 CFU-GM 集落培养、细胞数量和流式表型符合鉴定标准，HSC/HPC 生物学功能没有受到影响。

本研究对共培养后的 MSC 进行生物学特性分析，结果显示细胞的形态、流式表型 (高表达 CD90、CD73 和 CD105，不表达 CD34 和 CD45)、染色体核型都符合 MSC 的鉴定标准，对细胞进行成骨、成软骨及成脂肪诱导实验证实，细胞传代培养后，依然显示出显著的分化成骨、软骨及脂肪细胞的能力，即 MSC 向骨、软骨、脂肪细胞分化的能力也未受影响，因此共培养后的 MSC 依然有典型的 MSC 生物学功能。

从临床应用价值来看，理想的 HSCT 供体应该是由 HSC 和 HPC 共同组成的混合体，移植早期造血恢复依靠 HPC，长期造血重建依靠 HSC[16]。如果同时配合 MSC 的联合输注，可以解决高体重患

者移植的需要，促进 HSC 植入，加速移植早期造血恢复，降低 GVHD 的发生。

综上所述，本研究成功建立了一种合适的 MSC 和 HSC 混合培养体系，通过该体系可同时获得两种干细胞，缩短 MSC 和 HSC 的制备时间，可能会取得更好的临床效果。

参考文献

1 Apperley JF. Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. The International Conference Workshop on Cord Blood Transplantation, Indianapolis, November 1993. Bone Marrow Transplant 1994; 14(2): 187–196.

2 Isoyama K, Yamada K, Hirota Y, Ishikawa K, Imai M, Notake Y. Study of the collection and separation of umbilical cord blood for use in hematopoietic progenitor cell transplantation. Int J Hematol 1996; 63(2): 95–102.

3 Long MW, Briddell R, Walter AW, Bruno E, Hoffman R. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. J Clin Invest 1992; 90(1): 251–255.

4 Ma YP (马艳萍), Zhou P, Xiao J, Huang SA. Xiang JP. Short term regulation effect of FLT3, TPO and SCF on umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cell. Chin J Hematol (中华血液学杂志) 2001; 22(5): 262–263 (in Chinese).

5 Urashima M, Hoshi Y, Akiyama M, Kamijo M, Kato Y, Akatsuka J, Maekawa K, Matsuzaki M, Ohnishi J, Kaihara C. *Ex vivo* expansion of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells by combinations of cytokines. Acta Paediatr Jpn 1995; 37(2): 160–165.

6 Kusadasi N, Koevoet JL, van Soest PL, Ploemacher RE. Stromal support augments extended long-term *ex vivo* expansion of hemopoietic progenitor cells. Leukemia 2001; 15(9): 1347–1358.

7 Lazzari L, Lucchi S, Rebulla P, Porretti L, Puglisi G, Lecchi L, Sirchia G. Long-term expansion and maintenance of cord blood haematopoietic stem cells using thrombopoietin, Flt3-ligand, interleukin (IL)-6 and IL-11 in a serum-free and stroma-free culture system. Br J Haematol 2001; 112(2): 397–404.

8 Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9(6): 841–848.

9 Yuan XL (袁晓莉), Meng HX, Hao M, Li CH, Han JL, Qiu LG. Effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on *ex vivo* expansion of umbilical cord blood $CD34^+$ cells. J Clin Tissue Eng Res (中国组织工程研究与临床康复) 2009; 13(14): 2645–2650 (in Chinese with English abstract).

10 Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004; 363(9419): 1439–1441.

11 Chen (陈广华), Yang T, Tian H, Qiao M, Liu HW, Fu CC, Miao M, Jin ZM, Tang XW, Han Y, He GS, Zhang XH, Ma X, Chen F, Hu XH, Xue SL, Wang Y, Qiu HY, Sun AN, Chen ZZ, Wu DP. Clinical study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for treatment of nineteen patients with steroid-resistant severe acute graft-versus-host disease. Chin J Hematol (中华血液学杂志) 2012; 33(4): 303–306 (in Chinese with English abstract).

12 Qiao SM (乔淑敏), Chen GH, Wang Y, Hu SY, Sun XD, Wu DP. Curative effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of acute graft-versus-host disease of children after allo-HSCT. J Exp Hematol (中国实验血液学杂志) 2013; 21(3): 716–720 (in Chinese).

13 Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol 2005; 23(1): 69–74.

14 Guo CJ (郭春娟), Hou D, Gao Y, Xi YM, Wang JF. Analysis on expansion potentials and pre-clinical safeties of hematopoietic stem cells from human umbilical cord blood. J Zhejiang Univ (Sci Ed) (浙江大学学报理学版) 2009; 36(3): 328–334 (in Chinese with English abstract).

15 Park B, Yoo KH, Kim C. Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. Blood Res 2015; 50(4): 194–203.

16 Sun ZM (孙自敏), Wu JS. Umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. J Clin Trans Lab Med (临床输血与检验) 1999; 1(1): 58–60 (in Chinese).