

· 论 著 ·

人胎盘提取物对脐带血造血干细胞的体外扩增实验研究

刘禄斌, 刘畅[△], 张 华, 刘菊莲, 陈凤娟

(重庆市妇幼保健院 400013)

摘要:目的 研究人胎盘提取物对脐带血造血干细胞体外扩增的影响。方法 分离脐带血造血干细胞体,用常规培养法和加入人胎盘提取物的方法进行体外扩增培养,扩增培养第 1、2、3、4 周分别进行单个核细胞(MNC)计数和造血祖细胞集落培养及计数。结果 到第 4 周时胎盘提取物组 MNC 扩增最高可达 78.25 倍,而常规培养组仅增加了 8.32 倍;造血祖细胞集落计数显示第 3 周达高峰,第 4 周逐渐下降,但胎盘提取物组扩增集落形成细胞(CFC)的能力明显高于常规培养组。结论 胎盘提取物能有效促进脐带血造血干细胞的体外增殖,但应避免长时间的体外扩增培养,以防止细胞发生分化,影响扩增质量。

关键词:人胎盘提取物;脐带血造血干细胞;扩增

中图分类号:R475.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)11-1342-02

Effect of human placental extract(intacellin) on proliferation of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells in vitro

LIU Lu-bin, LIU Chang[△], ZHANG Hua, et al.

(Chongqing Maternal and Child Health Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human placental extract(Intacellin) on proliferation of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells in vitro. **Methods** After hematopoietic stem cells were isolated from umbilical cord blood, the cells were culture in routine method or with human placental extract, and MNC count and colony-forming cell(CFC) culture were performed at week 1, 2, 3 and 4. **Results** The number of MNCs increased and reached 78.25-fold in human placental extract culture group, while 8.32-fold in routine culture group at week 4. CFC increased and reached the peak at week 3, the total number of CFC was higher in human placental extract culture group than that in routine culture group, then a rapid decline was observed at week 4. **Conclusion** Expansion ability of hematopoietic stem cells from cord blood in media with human placental extract is better than that in routine culture system without human placental extract, but long time culture in vitro should avoid to prevented cell differentiation and remain expansion quality.

Key words: human placental extract(Intacellin); Umbilical Cord Blood hematopoietic Stem Cells(UCB-HSCs); Proliferation

1988 年 Broxmeyer 首先以实验证明脐带血中富含造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs), 随后 Gluckman 等成功实施了世界上首例脐带血移植术。此后, 脐带血 HSCs 的研究逐渐成为干细胞研究的热点。与传统的骨髓 HSCs 相比, 脐带血 HSCs 具有其独特的优势: (1) 对供者无伤害; (2) 传染病传播概率较小; (3) 移植后抗宿主病的发病率较低。但脐带血中 HSCs 的绝对值偏低, 限制了其在成年患者中的使用, 导致移植失败和植入延迟。因此, 如何对其进行体外扩增, 且扩增同时尽量减少其分化, 已成为当前研究的热点。目前, 脐带血 HSCs 的体外扩增主要通过添加外源性的生长因子以阻止细胞凋亡, 刺激细胞增殖, 从而达到扩增脐带血 HSCs 的目的, 但是往往都是以牺牲原始细胞为代价, 即在扩增细胞的同时促进了原始细胞的分化, 使长期造血能力减弱^[1]。因此, 本文通过在常规培养物中加入胎盘提取物, 模拟体内脐带血细胞的发育环境, 研究其对脐带血 HSCs 体外增殖和分化的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 细胞因子 G-CSF、SCF、TPO 为 Peprotech 公司产品, DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品, L-谷氨酰

胺、 β -巯基乙醇、琼脂和牛血清清蛋白购于上海生工生物工程公司, Ficoll 淋巴细胞分离液及羟乙基淀粉(HES)购自 Sigma 公司。

1.2 人胎盘提取物的提取 胎盘组织取自重庆市妇幼保健院产科, 用生理盐水反复冲洗后称重量, 按照 Tis-组织蛋白抽提试剂(北京康为世纪生物科技有限公司)说明书要求, 按照 1:20(g/mL)的比例加入 Tis-组织蛋白抽提试剂并匀浆处理。4℃条件下 10 000×g 离心 5 min, 收集上清液, 0.22 μ m 滤膜过滤, -20℃储存备用。用 Bradford 法测蛋白浓度。

1.3 脐带血单个核细胞(mononuclear cell, MNC)分离 参考刘斌等^[2]方法采用密度梯度离心法沉降、分离单个核细胞; 加入脐血体积 1/4 的 HES(6%), 颠倒混匀, 4℃自然沉降 2 h, 去除部分 RBC。将析出的上层液体低速离心后, 取析出的细胞沉淀物, 以 PBS 液重悬, 滴入等体积的 Ficoll(1.077)液中, 梯度密度离心, 吸出悬浮于中层的细胞即为 MNC。

1.4 脐带血造血前体细胞的体外扩增 实验分为常规培养组和胎盘提取物组。常规培养组培养条件: 6 孔板内每孔接种 5×10^5 个脐带血 MNC, 培养基为含 10% FCS 的 DMEM(含

[△] 通讯作者, E-mail: LC1403@126.com。

100 u/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素,2 mM L-谷氨酰胺,100 ng/mL G-CSF,100 ng/mL SCF,100 ng/mL TPO),置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,每周半量换液 2 次。胎盘提取物组除在培养基中加入终浓度为 100 μg/mL 的胎盘提取物外,其余条件同常规培养组^[3]。

1.5 扩增细胞计数 扩增培养第 1、2、3、4 周分别进行 MNC 计数。

1.6 造血祖细胞集落培养及计数 培养前(1×10⁵ 个 MNC)及体外扩增培养 1、2、3、4 周收集的细胞(1×10⁴ 个 MNC)用 DMEM 洗涤后,在含 0.3%琼脂、30%FCS,10%BSA,5×10⁻⁵ mol/L β-巯基乙醇的 DMEM 半固体培养基中培养。在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 14 d,分别计数粒细胞及巨噬细胞集落形成单位(colony forming unit-granulocyte and macrophage, CFU-GM)、红系爆式集落形成单位(burst forming unit-erythroid, BFU-E)、红系集落形成单位(colony forming unit-erythroid, CFU-E)和高增殖潜能集落形成细胞(colony forming cells with a high proliferative potential, HPP-CFC)。细胞集落计数标准及计数校正公式参考岑洪和林茂芳^[4]的报道。

1.7 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较方差采用配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脐带血 HSCs MNC 的扩增 胎盘提取物组在各个时间点均显著性高于常规培养组,到第 4 周时 MNC 扩增最高可达 78.25 倍,而常规培养组只增加了 8.32 倍,见表 1。

表 1 脐带血 MNC 体外扩增倍数($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
常规培养组	0.28±0.03	1.02±0.15	2.80±0.59	8.32±1.83
胎盘提取物组	4.25±0.55*	13.06±1.87*	53.24±8.37*	78.25±8.33*

与常规培养组比较,* : *P* < 0.01。

2.2 脐带血 HSCs 体外扩增形成集落形成细胞(colony forming cell,CFC)的能力 随培养时间延长,CFC 总数增加,第 3 周达高峰,第 4 周逐渐下降,胎盘提取物组扩增 CFC 的能力明显高于常规培养组,见表 2。

表 2 脐带血 HSCs 体外扩增形成的 CFC 数($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^3$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
常规培养组	0.42±0.07	1.21±0.18	1.96±0.38	1.02±0.28
胎盘提取物组	8.96±1.32*	13.25±3.26*	40.56±7.87*	15.08±4.56*

与常规培养组比较,* : *P* < 0.01。

2.3 胎盘提取物对粒单系造血前体细胞体外扩增的影响 胎盘提取物组 CFU-GM 扩增能力明显高于常规培养组。扩增 3 周后,两组的 CFU-GM 数均达到高峰,此后 CFU-GM 数迅速减少,见表 3。

2.4 胎盘提取物对红系造血前体细胞体外扩增的影响 体外扩增 1 周后,两组红系 CFC 数(BFU-E+CFU-E)均达高峰,此后红系 CFC 数迅速减少,第 3 周时降为 0。且胎盘提取物组红系 CFC 扩增能力明显高于常规培养组,见表 4。

表 3 脐带血造血前体细胞体外扩增形成的 CFU-GM 数($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^3$)

组别	1 周	2 周	3 周	4 周
常规培养组	0.18±0.05	0.93±0.26	1.99±0.36	1.03±0.18
胎盘提取物组	3.89±1.32*	12.12±2.16*	33.62±5.37*	20.50±3.50*

与常规培养组比较,* : *P* < 0.01。

表 4 脐带血造血前体细胞体外扩增形成的红系 CFC 数($\bar{x} \pm s, n=5, \times 10^3$)

组别	1 周	2 周	3 周
常规培养组	0.16±0.05	0.17±0.05	0
胎盘提取物组	5.96±1.43*	2.83±0.63*	0

与常规培养组比较,* : *P* < 0.01。

3 讨 论

在 HSCs 移植中,脐带血 HSCs/祖细胞以其独有的特性,成为骨髓及外周血 HSCs 的极佳替代来源,已经应用于临床治疗多种恶性和非恶性疾病^[5]。脐带血中 HSCs/HPCs 的质与量是决定其临床应用效果的最重要因素,但是单份脐带血所含有的 HSCs 数目相对少,因此如何对其进行体外扩增,且扩增的同时尽量减少其分化,已成为临床和科研中感兴趣的新课题。

本研究表明,胎盘提取物组的脐带血 HSCs 扩增效率明显高于常规培养组。随培养时间延长,扩增的细胞数逐渐增加,从培养第 3 周开始,细胞增加的速度明显加快,到第 4 周时,胎盘提取物组的 MNC 扩增达 78.25 倍,而常规培养组只有 8.32 倍。其原因可能是由于胎盘提取物含有脐带血发育的天然活性成分,模拟了脐带血的体内发育微环境。

为进一步研究体外培养的分化情况,本实验采用集落培养方法,检测经体外扩增培养后集落形成细胞 CFC 增加的情况,以判断 HSCs 是否因为分化成熟而丧失其克隆形成能力。结果显示,随体外扩增时间延长,CFC 数量增加,到第 3 周时达高峰,但两组体外扩增至第 4 周时,CFC 数量迅速降低。胎盘提取物组扩增的 CFC 数在各时间点明显高于常规培养组,说明添加胎盘提取物的体外扩增体系能更有效地扩增脐带血造血前体细胞,但随着培养时间延长,尤其在第 4 周时,尽管 MNC 数量继续增加,而 CFC 数已开始迅速下降,说明脐带血 HSCs 在体外扩增的同时出现分化倾向,扩增细胞的质量开始下降。

为研究不同系造血前体细胞在体外的增殖和分化特性,本研究分别对红系 CFC 和粒单系 CFC(CFU-GM)进行分析。结果发现在红系 CFC 和粒单系 CFC 的扩增过程中,胎盘提取物组的扩增效果明显优于常规培养组,表明胎盘微环境同样有利于红系造血前体细胞和粒单系造血前体细胞的扩增,但粒单系造血前体细胞在体外维持扩增的时间比红系更长。

本研究表明,胎盘提取物能有效地促进脐带血 HSCs 的体外增殖,但体外扩增时间不宜过长,以免发生分化,影响扩增质量。

细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及退化有密切的关系^[13-14],也是许多植物、化学物质抑癌活性的机制之一^[15-16]。有研究表明,SS能够诱导不同类型的肿瘤细胞凋亡^[3-5]。本实验用 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡法检测发现,TS、SG-A 和 SG-B 均能诱导 HepG2 细胞发生凋亡,作用 24 h 后主要发生早期凋亡(Annexin V⁺/PI⁻),且 SG-B 诱导细胞早期凋亡的活性显著高于 SG-A,差异有统计学意义($P < 0.05$),后者则又显著高于 TS,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着作用时间的延长,细胞主要以晚期凋亡或坏死(Annexin V⁺/PI⁺)为主。

本实验结果表明,SG(SG-A 和 SG-B)抑制人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的活性高于 TS,诱导细胞凋亡可能是其机制之一,且 SG 诱导细胞凋亡的活性同样高于 TS。同时,SG-A 和 SG-B 诱导细胞凋亡的活性也有差异,其诱导细胞凋亡的信号通路调控机制有待于进一步研究。此外,SG 为 SS 的肠道分解产物,而肠道微生物菌群是否会影响 SS 的分解代谢,并进而影响 SS 抗癌活性的效果尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Guclu-Ustunda O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007, 47(3): 231.
- [2] Hu J, Reddy MB, Hendrich S, et al. Soyasaponin I and Saponogenol B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavailability in women[J]. J Nutr, 2004, 134: 1867.
- [3] Fournier DB, Erdman JW, Gordon GB. Soy, its components and cancer prevention; a review of the in vitro, animal, and human data[J]. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 1998, 7: 1055.
- [4] Xiao JX, Huang GQ, Zhang SH. Soyasaponins inhibit the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis[J]. Exp Toxicol Pathol, 2007, 59: 35.
- [5] Zhang W, Popovich DG. Effect of soyasapogenol A and soyasapogenol B concentrated extracts on Hep-G2 cell proliferation and apoptosis[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 2603.
- [6] Ellington AA, Berhow MA, Singletary KW. Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(1): 159.
- [7] Gurfinkel DM, Rao AV. Soyasaponins: the relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity[J]. Nutr Cancer, 2003, 47(1): 24.
- [8] Gurfinkel DM, Reynolds WF, Rao AV. The isolation of soyasaponins by fractional precipitation, solid phase extraction and low pressure liquid chromatography[J]. Int J Food Sci Nutr, 2005, 56(7): 501.
- [9] Bennink MR. Dietary soy reduces colon carcinogenesis in human and rats, soy and colon cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 492: 11.
- [10] Rao AV, Sung MK. Saponins as anticarcinogens[J]. J Nutr, 1995, 125: 717.
- [11] Zhang W, Yeo MC, Tang FY, et al. Bioactive responses of Hep-G2 cells to soyasaponin extracts differs with respect to extraction conditions[J]. 2009, 47: 2202.
- [12] 全吉淑,徐俊萍,许惠仙,等.大豆皂甙及甙元抗结肠癌作用的实验研究[J].食品科技,2009,34(2):176.
- [13] 李青国,陈龙舟,周士福.新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响[J].重庆医学,2009,38(1):58.
- [14] 姜果,张建华,姜荣健,等.膀胱移行细胞癌 survivin 表达临床特征及与肿瘤细胞增殖和凋亡的关系[J].重庆医学,2006,35(16):1468.
- [15] Melet A, Song K, Bucur O, et al. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 615: 47.
- [16] 刘晓春,蓝娇,潘莉莉,等.芸豆皂甙诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡及其对细胞内钙含量的影响[J].广西医学,2009,31(5):616.

(收稿日期:2009-11-02 修回日期:2010-03-23)

(上接第 1343 页)

参考文献:

- [1] 姚雯,孙自敏.脐带血干/祖细胞的体外扩增实验研究进展[J].国际儿科学杂志,2007,34(3):202.
- [2] 刘斌,廖灿,魏佳雪,等.3种不同方法分离脐血造血细胞的比较[J].中华血液学杂志,1999,20(5):271.
- [3] Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. Superior ex-vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cell[J]. Bone Marrow Transplant, 2006, 37(4): 359.
- [4] 岑洪,林茂芳.脐带血造血前体细胞在间质干细胞微环境中的增殖和分化特性研究[J].中国病理生理杂志,2007, 23(5):995.
- [5] 李玉艳,梁志清,李彩霞,等.人脐带血 CD34⁺细胞的提取及慢病毒载体转染的初步研究[J].重庆医学,2008,37(14):1570.

(收稿日期:2009-08-13 修回日期:2010-01-13)