

· 论 著 ·

# SDF-1/RUNX1 融合蛋白介导的间充质干细胞对造血干细胞增殖和趋化作用的研究\*

罗红春<sup>1</sup>,张红宾<sup>2△</sup>,秦 波<sup>1</sup>,汪嘉莉<sup>1</sup>,刘 倩<sup>3</sup>  
(重庆医科大学附属第一医院:1. 感染科;2. 血液科 400016;  
3. 重庆市渝北区人民医院消化内科 401120)

**摘 要:****目的** 研究基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/RUNX1 融合蛋白介导的间充质干细胞(MSCs)对造血干细胞(HSCs)增殖和趋化能力的作用。**方法** 分离培养人脐带源性 MSCs 和人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞。重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 感染 MSCs,免疫荧光显微镜下观察感染效率,ELISA 方法检测上清液中 SDF-1 和 RUNX1 的表达。流式细胞仪检测感染了重组腺病毒的 MSCs 对 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数,Transwell 试验测定 CD34<sup>+</sup> 干细胞的迁移指数。**结果** 重组腺病毒感染人脐带源性 MSCs 后,第 3 天的转染效率和 SDF-1/RUNX1 的表达最高,第 7 天也有较高表达,两者比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。感染重组腺病毒的 MSCs 和 CD34<sup>+</sup> 干细胞共培养第 3、7、14 天,B1、C1 组较 A1 组 CD34<sup>+</sup> 干细胞显著扩增( $P<0.05$ )。培养第 7、14 天,B1 组中 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数显著高于 C1 组( $P<0.05$ )。Transwell 试验中,B2、C2 组的迁移指数明显高于 A2 组( $P<0.05$ ),并且 C2 组的迁移指数明显高于 B2 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** SDF-1/RUNX1 融合蛋白介导的 MSCs 可促进 CD34<sup>+</sup> 干细胞的增殖和归巢。

**关键词:**趋化因子 CXCL12;RUNX1 基因;间质干细胞;造血干细胞  
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.001 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2012)30-3129-03

## MSCs mediated by SDF-1/RUNX1 fusion protein induce the proliferation and chemotaxis of HSCs\*

Luo Hongchun<sup>1</sup>,Zhang Hongbin<sup>2△</sup>,Qin Bo<sup>1</sup>,Wang Jiali<sup>1</sup>,Liu Qian<sup>3</sup>

(1. Department of Infectious Diseases;2. Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China;3. Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Yubei District of Chongqing City,Chongqing 401120,China)

**Abstract: Objective** To investigate the proliferation and chemotaxis of HSCs influenced by MSCs which mediated by SDF-1/RUNX1 fusion protein. **Methods** We isolated and cultured MSCs derived from human umbilical cord and HSCs derived from human cord blood. The recombinated adenovirus pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP infected MSCs. The efficiency of infection was detected by fluorescence microscope. ELISA was used to assay the expression of SDF-1/RUNX1 in supernatant fluid. Then, we detected the proliferation and the immigration index of CD34<sup>+</sup> stem cell influenced by MSCs infected by the recombinated adenovirus. **Results** After 3 days MSCs infected by recombinated adenovirus, the efficiency of transfection and the expression of SDF-1/RUNX1 were the highest. And after 7 days infection, they were still very high( $P>0.05$ ). There was no statistics difference. MSCs infected by recombinated adenovirus and CD34<sup>+</sup> stem cell co-cultured, after 3, 7, 14 days, the proliferation of CD34<sup>+</sup> stem cell in group B1, C1 were more significant than in group A1( $P<0.05$ ). After 7, 14 days, the proliferation of CD34<sup>+</sup> stem cell in group B1 was higher than in group C1( $P<0.05$ ). In transwell experience, the immigration indexes of CD34<sup>+</sup> stem cell in group B2, C2 were higher than in group A2( $P<0.05$ ). Meanwhile, the immigration index of CD34<sup>+</sup> stem cell in group C2 was obviously increased than in group B2( $P<0.05$ ). **Conclusion** MSCs mediated by SDF-1/RUNX1 fusion protein promote the proliferation and homing of CD34<sup>+</sup> stem cell.

**Key words:** chemokine CXCL12; RUNX1 gene; mesenchymal stem cells; hematopoietic stem cells

骨髓移植是治疗血液病、实体瘤、免疫系统疾病、急性放射病等疾病的有效方法之一,但移植后的造血重建问题一直是临床工作的难点。研究发现基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/CXCR4 生物轴对造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的归巢和植入起到了重要的作用。另外, RUNX1 基因作为一种造血细胞分化早期的关键调控因子,对 HSCs 自我更新与分化间的平衡起着调节作用<sup>[1-2]</sup>。目前,本课题组已经成功构建

pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体。在本实验中,作者将转染 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒载体入间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),并检测 SDF-1/RUNX1 融合蛋白介导的 MSCs 对 HSCs 增殖和趋化能力的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 人脐带标本和脐带血标本,由本院妇产科志愿者

\* 基金项目:重庆市卫生局医学科研计划基金资助项目(2010-2-095)。 △ 通讯作者, Tel: (023)89012014; E-mail: wdlz1299@163.com。



产妇提供(均系采自健康男性新生儿胎盘的脐血,其孕母排除病毒性肝炎、艾滋病、梅毒等感染)。

**1.2 试剂** 采用 Mesencult 培养液(Stem Cell 公司);DMED 培养基(上海佳和科技生物有限公司);Ficoll 淋巴细胞分离液(天津生物技术研究);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);CD29、CD13、CD44、CD34、CD31 抗体(BD 公司);RUNX1 ELISA 试剂盒(北京华夏远洋科技有限公司);SDF-1 ELISA 试剂盒(厦门慧嘉生物科技有限公司)。

**1.3 脐带源性 MSCs 的体外培养及生物学鉴定** 标本于采集后 6 h 内,进行间充质干细胞的分离:将脐带剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 的小块后用 D-Hanks 液冲洗,先后经 0.1%胶原酶Ⅱ、0.25%胰酶各消化 30 min,收集悬浮细胞,接种于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 Mesencult<sup>+</sup>培养液,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱培养,4~5 d 后全量换液,弃去非贴壁细胞,此后每 3~4 d 半量换液,观察细胞至 80%融合时,用 0.25%胰酶和 1 mmol/L EDTA 消化,按 1:3 传代。贴壁细胞常规消化后,以 CD29、CD13、CD44、CD34、CD31 抗体孵育。流式细胞术测定细胞纯度。

**1.4 人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的体外培养及生物学鉴定** 无菌条件下取足月妊娠、正常分娩的新鲜脐血(内加抗凝剂),标本于采集后 6 h 内分离。按 1:1 体积比加入 D-Hanks 液稀释,以 Ficoll 淋巴细胞分离液密度梯度离心,1 500 r/min 离心 15 min。吸取血浆层和分离液层之间的白色云雾状有核细胞层,以低糖 DMED 培养液洗涤备用。应用 MACS 免疫磁珠激活分选系统分离 CD34<sup>+</sup> 细胞,过分选柱 2 次以提高纯度,以流式细胞术测定 CD34<sup>+</sup> 细胞纯度。

**1.5 重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 对人脐带源性 MSCs 转染效率的测定** 分别用感染指数(moi)为 25、50、100、200 的重组腺病毒感染 NIH<sub>3</sub>T<sub>3</sub> 细胞。NIH<sub>3</sub>T<sub>3</sub> 细胞接种于 24 孔板,密度为 2×10<sup>6</sup> 个/毫升,以 DMED 培养液作为阴性对照。1 h 后吸弃病毒液,加入培养液。此后每 12 h 在荧光显微镜下观察细胞 GFP 的表达情况。为后续试验选择最佳的 moi。MSCs 培养至第 3 代时,调整密度为 2×10<sup>5</sup> 个/毫升,加入 24 孔板中,培养 24 h 后,选择最佳 moi 的重组腺病毒感染入 MSCs。荧光显微镜下观察感染后 1、3、7、14 d 的感染效率。ELISA 方法检测重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 感染 MSCs 后 SDF-1 和 RUNX1 的表达。

**1.6 检测含重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 的人脐带源性 MSCs 对人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增作用** 调整 CD34<sup>+</sup> 干细胞的密度为 2×10<sup>4</sup> 个/毫升。制备 MSCs 细胞滋养层;CD34<sup>+</sup> 细胞种植于有滋养层的 24 孔板中培养,隔日半量换液 1 次。按照实验目的分 3 组,A1 组:CD34<sup>+</sup> 干细胞;B1 组:CD34<sup>+</sup> 干细胞和 MSCs;C1 组:CD34<sup>+</sup> 干细胞和基因修饰后的 MSCs。每组均设 3 个复孔。培养第 1、3、7、14 天检测 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数。

**1.7 检测含重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 的人脐带源性 MSCs 对人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的趋化作用** 采用 Transwell 试验,用培养液制成 CD34<sup>+</sup> 干细胞的单细胞悬液,将细胞密度调整为 2.5×10<sup>5</sup> 个/毫升。分 3

组,A2 组:在 24 孔板内加入培养液;B2 组:在 24 孔板内加入 MSCs;C2 组:在 24 孔板内加入基因修饰后的 MSCs(已培养 3 d)。培养 24 h 后检测 CD34<sup>+</sup> 干细胞的穿膜细胞数。在 100 倍光镜下,随机挑选 5 个视野,计算穿膜细胞数并取其平均值,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**1.8 统计学处理** 运用 SPSS17.0 软件进行数据处理,组间比较采用单因素方差分析。

2 结 果

**2.1 人脐带源性 MSCs 的培养及鉴定** 人脐带源性 MSCs 长势良好,呈辐射状或涡旋状排列。流式细胞仪检测培养第 3 代的 MSCs 的表面标记物 CD29 的阳性率为 99.83%,CD13 的阳性率为 98.12%,CD44 的阳性率为 98.89%;不表达 CD34、CD31。

**2.2 人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的纯化及鉴定** 经 2 次过分选柱,每个标本收集 CD34<sup>+</sup> 细胞数范围为 (2.6~5)×10<sup>6</sup>,0.4%台盼蓝染色计数活细胞率均大于 96%。流式细胞仪检测 2 次分选后 CD34<sup>+</sup> 细胞纯度在 98.30%以上。

**2.3 重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 感染人脐带源性 MSCs 的效率** 当重组腺病毒感染的 moi 为 50 pfu/细胞时,转染效率最高,可达 90%以上。以 moi 为 50 pfu/细胞的重组腺病毒感染 MSCs 后 1、3、7、14 d 的转染效率分别为 (28.42±8.15)%、(80.58±9.05)%、(68.77±6.27)%、(21.34±7.29)%,见封 2 图 1。ELISA 方法检测出重组腺病毒感染 MSCs 后 3 d SDF-1 和 RUNX1 的表达最高。感染后 7 d,SDF-1 和 RUNX1 的表达仍然较高(表 1)。感染后 14 d 时,还有少量 SDF-1 和 RUNX1 表达。

表 1 重组腺病毒感染人脐带源性 MSCs 后 SDF-1 和 RUNX1 的表达( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

项目	1 d	3 d	7 d	14 d
SDF-1	1.125±0.785	3.657±0.542*	3.183±0.663#	0.924±0.003
RUNX1	1.657±0.123	4.418±0.643*	3.866±0.182#	1.104±0.217

\*:P<0.05,与第 1、14 天比较;#:P>0.05,与第 3 天比较。

**2.4 感染重组腺病毒的人脐带源性 MSCs 对人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增作用** 按照 1.6 中的分组,培养第 1 天,3 组中 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数比较差异无统计学意义(P>0.05)。培养第 3、7、14 天,B1 组、C1 组较 A1 组 CD34<sup>+</sup> 干细胞显著扩增(P<0.05)。培养第 7、14 天,B1 组中 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数显著高于 C1 组(P<0.05),见表 2。

表 2 感染重组腺病毒的人脐带源性 MSCs 对人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增倍数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1 d	3 d	7 d	14 d
A1 组	1.957±0.134	3.067±0.413	5.983±0.898	8.614±0.732
B1 组	2.839±0.225	6.798±0.184*	12.673±1.033#	16.542±1.568#
C1 组	2.707±0.341	5.825±0.203*	8.765±0.432	10.638±1.031

\*:P<0.05,与 A1 组比较;#:P<0.05,与 C1 组比较。

**2.5 感染重组腺病毒的人脐带源性 MSCs 对人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞的趋化作用** 按照 1.7 中的分组,共培养 24 h 后,Transwell 检测 CD34<sup>+</sup> 干细胞的迁移指数分别是:A2 组(302±8),B2 组(435±20),C2 组(612±18)。B2 和 C2 组的迁



移指数明显高于 A2 组 ( $P<0.05$ ), 并且 C2 组的迁移指数明显高于 B2 组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

3 讨 论

干细胞移植后的造血重建过程是一个多阶段、多因素的过程, 其中造血微环境(Niche)的修复, 影响着归巢造血干细胞 HSCs 的自我更新、增殖和分化, 对于机体重建造血功能具有重要意义<sup>[3-6]</sup>。但移植后 HSCs 归巢率低且自我增殖能力有限, 成为制约骨髓重建的瓶颈问题。

MSCs 作为造血微环境主要细胞成分的前体细胞, 在造血调控中发挥重要作用。MSCs 分化产生的多种骨髓基质细胞, 表达多种基质分子, 通过细胞-细胞间接触和分泌多种促造血细胞因子支持造血, MSCs 还诱导归巢受体、分泌基质细胞衍生因子促使 HSCs 归巢到骨髓<sup>[7-8]</sup>, 对 HSCs 保持干细胞特性和造血干细胞归巢具有重要的支持和趋化作用<sup>[9-10]</sup>。有报道 MSCs 与 HSCs 联合移植可促进 HSCs 的植活率, 缩短无髓期, 减少死亡率。因此, 有必要在移植中充分考虑 MSCs 的因素<sup>[11-12]</sup>。

研究发现 SDF-1/CXCR4 生物轴对 HSCs 的归巢和植入起到了重要的调节作用<sup>[12]</sup>。内皮细胞、成骨细胞和其他基质细胞均表达 SDF-1, 而 HSCs 表达 CXCR4。内皮细胞表达的 SDF-1 通过 E-和 P-选择素引导 HSCs 的跨内皮迁移。作者在前期试验中发现, 体内刺激因子较多, 可导致 HSCs 过度分化, 使 HSCs 自我更新能力下降。所以, 应更多地关注干细胞干性的保持问题。RUNX1 基因作为一种造血细胞分化早期的关键调控因子, 即为一个较佳的选择。

作者成功分离培养出人脐带源性 MSCs 和人脐血源性 CD34<sup>+</sup> 干细胞, 且具有较高的纯度。利用前期构建的 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 腺病毒转染人脐带源性 MSCs, 经检测转染后第 3 天, 转染效率可高达 (80.58 ± 9.05)%。第 7 天时, 转染效率仍可达 (68.77 ± 6.27)%, 虽有所下降, 二者比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。同样, 作者用 ELISA 检测出重组腺病毒感染人脐带源性 MSCs 后 SDF-1 和 RUNX1 的表达也是第 3 天最高, 第 7 天时仍有较高表达。

在 CD34<sup>+</sup> 干细胞的扩增试验中, 感染了重组腺病毒 pAD-SDF-1-(GlySer)3-RUNX1-IRES-GFP 的 MSCs 可促进 CD34<sup>+</sup> 干细胞的增殖, 但其扩增程度远不及未感染重组腺病毒的 MSCs。由此说明, 该重组腺病毒既有利于扩增 CD34<sup>+</sup> 干细胞, 且又不至于让 CD34<sup>+</sup> 干细胞过度的增殖分化。在 Transwell 趋化试验中, 感染了重组腺病毒的 MSCs 和未感染重组腺病毒的 MSCs 均可显著促进 CD34<sup>+</sup> 干细胞的迁移, 且前者的趋化作用高于后者 ( $P<0.05$ )。由此说明, 该重组腺病毒感染 MSCs 后, 有明显的诱导 CD34<sup>+</sup> 干细胞归巢的作用。

参考文献:

[1] Burns CE, Traver D, Mayhall E, et al. Hematopoietic stem cell fate is established by the Notch-Runx pathway[J].

Genes Dev, 2005, 19(17): 2331-2342.  
[2] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter[J]. Nature, 2009, 457: 887-891.  
[3] Flidner TM, Poesles R, Sirohi B, et al. Radiologic and nuclear events: the METREPOL severity of effect grading system[J]. Blood, 2008, 111(37): 5757-5758.  
[4] Weisdorf D, Apperley J, Courmelon P, et al. Radiation emergencies: evaluation, management, and transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007, 13(1): 103-106.  
[5] Weisdorf D, Chao N, Waselenko J, et al. Acute radiation injury: contingency planning for triage, supportive care, and transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(4): 672-682.  
[6] Borhane G, Mickie B. Transplantation of human hematopoietic repopulating cells: mechanisms of regeneration and differentiation using human-mouse xenografts[J]. Current Opinion in Organ Transplantation, 2008, 13(1): 44-52.  
[7] Bell E. Transplantation: making space for HSCs[J]. Nature Biotechnology, 2008, 8(1): 4-5.  
[8] Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor[J]. Nature, 2006, 439(4): 599-603.  
[9] Goncalves R, Lobato da Silva C, Cabral JM, et al. A Stro-1 (+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system[J]. Exp Hematol, 2006, 34(10): 1353-1359.  
[10] Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, et al. Expansion of LTC-1cs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34<sup>(+)</sup>/CD38<sup>(-)</sup> early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer[J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 573-582.  
[11] Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells[J]. Leukemia, 2007, 21(12): 1733-1738.  
[12] Poloni A, Leoni P, Buscemi L, et al. Engraftment capacity of mesenchymal cells following hematopoietic stem cell transplantation in patients receiving reduced-intensity conditioning regimen[J]. Leukemia, 2006, 20(2): 329-335.

(收稿日期: 2012-03-10 修回日期: 2012-05-12)