

微血管内皮细胞对小鼠造血干细胞增殖的影响*

钱 怡, 杨 敏, 林凡莉, 汪姝玥, 李晓明, 黄纯兰[△]
(西南医科大学附属医院血液内科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探索微血管内皮细胞(MECs)对造血干细胞(HSCs)增殖的影响,以建立一种促进 HSCs 增殖的方法。**方法** 选取 C57BL/6 小鼠和 C57 系 GFP 小鼠,处死获取肺叶组织。(1)MECs 的分离、培养和鉴定:肺组织经 I 型胶原酶消化获得的细胞在含 20% 胎牛血清(FBS)、2 ng/mL 血管内皮生长因子(VEGF)、100 U/mL 肝素、0.1 mg/mL 青霉素及链霉素的 DMEM-F12 培养基培养,第 8 天进行 CD31 荧光鉴定,“铺路石”细胞用于共培养并以流式细胞仪(FCM)检测八因子相关抗原(vWF)、CD31、CD34、CD45 表达率。(2)GFP 小鼠 HSCs 的分离、鉴定:密度梯度离心法和 MACs-CD117⁺ 磁珠法分选 HSCs,FCM 检测纯度及 CD117 CD34 共表达率。(3)MECs 促 HSCs 增殖:设立对照组(HSCs)、共培养组(MECs+HSCs),培养 7 d,观察 HSCs 生长情况并计数、计算扩增倍数;第 7 天,收集共培养组 HSCs,FCM 检测 CD117 CD34 共表达率。**结果** (1)肺 MECs:第 3 天形成细胞簇,第 6 天成“血管样”改变,第 14 天为“铺路石”外观。培养第 8 天 CD31 阳性率为 54.5%。vWF、CD31、CD34、CD45 阳性率分别为 81.39%、45.80%、57.48%、0.17%。(2)平均每只小鼠骨髓经 MACs 分选后可获约 4.7×10^5 个 CD117⁺ 细胞,纯度为 99.51%。(3)随着培养时间的延长,两组 HSCs 计数均有所增加,但共培养组 HSCs 扩增倍数大于对照组($P < 0.05$)。第 1~7 天共培养组与对照组细胞数相对变化倍数分别为 1.21、1.35、1.50、1.72、1.71、1.75 和 1.78($P < 0.05$),第 4 天变化最明显。共培养 7 d 后 HSCs 的 CD117 CD34 共表达率为 92.06%。**结论** MECs 对 HSCs 增殖有促进作用,共培养第 4 天促进作用最明显,并且 MECs 可以促进 HSCs CD34 的表达。

[关键词] 微血管内皮细胞;造血干细胞;增殖

[中图分类号] R551.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)18-2408-05

The effect of microvascular endothelial cells on the proliferation of hematopoietic stem cells in mice*

QIAN Yi, YANG Min, LIN Fanli, WANG Shuyue, LI Xiaoming, HUANG Chunlan[△]

(Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of microvascular endothelial cells (MECs) on the proliferation of hematopoietic stem cells (HSCs), in order to establish a method to promote the proliferation of HSCs. **Methods** The C57BL/6 and C57 GFP mice were selected and sacrificed to obtain lung tissues. (1) Isolation, culture and identification of MECs: MECs were obtained by digestion of lung tissue with type I collagenase and cultured in DMEM-F12 supplemented with 20% FBS, 2 ng/mL VEGF and 100 U/mL heparin, and were identified by immunofluorescence assay with FITC-CD31 at the 8th day after isolation. The expression rates of vWF, CD31, CD34 and CD45 of the cobblestone-like cells were detected by flow cytometry (FCM), and the cells were used for co-culture in the subsequent experiments. (2) Isolation and identification of GFP mice HSCs: density gradient centrifugation and MACs-CD117⁺ magnetic beads were performed to isolate HSCs, and the purity and the co-expression of CD117 and CD34 were detected by FCM. (3) Investigation of the promoting effects of MECs on the HSCs proliferation: all cells in the control group (HSCs) and the co-culture group (MECs+HSCs) were cultured for 7 days, then observed the status of HSCs, counted and calculated the relative fold changes. At the 7th day, the expression ratio of CD117⁺ CD34⁺ HSCs in the co-culture group were detected by FCM analysis. **Results** (1) Pulmonary MECs: the cell clusters formed at the 3th day, the vascular like changes emerged at the 6th day, a paving stone appearance formatted at the 14th day. The positive rate of CD31 was 54.5% at the 8th day. The positive rates of vWF, CD31, CD34 and CD45 were 81.39%, 45.80%, 57.48% and 0.17% respectively. (2) On average, 4.7×10^5 CD117⁺ cells were obtained from each mice bone marrow, and the purity was about 99.51%. (3) The number of HSCs were increased in the two groups, accompanied by the extension of cultivation time. While the co-culture group increased significantly than the control

group ($P < 0.05$). The ratios (relative change of HSCs number in co-culture group over in control group) were 1.21, 1.35, 1.50, 1.72, 1.71, 1.75 and 1.78 ($P < 0.05$), the most obvious effect happened at the 4th day. The co-expression rate of CD117 CD34 on HSCs was 92.06% at the 7th day of co-cultivation. **Conclusion** MECs could enhance the proliferation of HSCs, the most significant effect happens at the 4th day of co-cultivation; additionally, MECs could promote the expression of CD34 on HSCs.

[Key words] microvascular endothelial cells; hematopoietic stem cells; proliferation

造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSCs)存在于造血组织,具有高度的自我更新能力和多向分化潜能,是所有成熟血细胞的前体细胞。造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是治疗恶性血液病、遗传性疾病及免疫缺陷病的重要手段之一。骨髓微环境对于 HSCs 的增殖、分化、迁移及归巢等具有重要的调控作用^[1]。HSCT 并非仅仅是单纯的 HSCs 输注,还包括骨髓基质细胞和其他造血调节因子的同时输注,以便更好、更快地重塑造血系统和免疫系统。然而,人骨髓中 HSCs 比例较低,极大地限制了 HSCT 的发展和临床应用。本文通过研究微血管内皮细胞(microvascular endothelial cells, MECs)对 HSCs 增殖的影响,建立一种促进 HSCs 增殖的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 体质量 20~25 g, 4~6 周龄, 雄性或雌性, 无特殊病原体(SPF)级 C57BL/6 小鼠(购自成都达硕生物科技有限公司)和 C57 系 GFP 小鼠(购自重庆腾鑫生物公司)。

1.1.2 主要仪器与试剂 CO₂ 培养箱(Thermo Forma 公司), 超净工作台(Air Tech 公司), 台式离心机(Bioridge 公司), 倒置荧光显微镜及照相系统(Olympus 公司), 流式细胞仪(BD 公司), 质谱(MS)分离柱、mini MACS 磁珠分选装置、CD117 细胞分选试剂盒、小鼠白细胞介素(IL)-3、小鼠干细胞因子(SCF)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗鼠 CD31(CD31-FITC)及藻蓝蛋白(APC)标记的 CD117(CD117-APC)购自 Miltenyi Biotec 公司, 血管内皮生长因子(VEGF)购自 ACRO 公司, I 型胶原酶、明胶粉购自 Sigma 公司, 藻红蛋白标记的兔抗鼠 CD34(CD34-PE)及多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)标记的 CD45(CD45-PerCP)购自 BD 公司, 羊抗八因子相关抗原(vWF)多克隆抗体、FITC 标记的驴抗羊 IgG(IgG-FITC)购自 Abcam 公司, Ficoll 分离液购自 TBD 公司, DMEM-F12 购自南京三生生物公司。

1.2 方法

1.2.1 MECs 分离、培养及鉴定

1.2.1.1 MECs 的培养 MECs 使用添加有 20% 胎牛血清(FBS)、2 ng/mL VEGF、100 U/mL 肝素、0.1 mg/mL 青霉素及链霉素的 DMEM-F12 完全培养基进行培养。

1.2.1.2 MECs 的分离与培养 颈髓离断处死小鼠, 75% 乙醇浸泡约 5 min。逐层剪开胸腔, 剥离肺组

织外的脏层胸膜, 剪取肺叶组织, 除掉可见的支气管和大血管。剪碎肺组织至 1 mm 左右, 装入离心管。加入与组织等量的含 2% 牛血清蛋白(BSA)和 0.1% I 型胶原酶的消化液, 吹打混匀, 37 °C 摇床消化。每 5 分钟吹打 1 次, 共消化约 30 min。加入 FBS 和 DMEM-F12 终止消化, 过 200 目滤网。300 × g 离心 10 min, 弃上清液。加入 DMEM-F12 重悬, 400 × g 离心 10 min, 弃上清液, 用 DMEM-F12 完全培养基重悬。经细胞计数及活力测定。以 1 × 10⁶ 个/cm² 密度接种于 0.1% 明胶包被的 24 孔板, 置于 37 °C、5% CO₂、95% 湿度培养箱培养。培养 24 h 后进行首次全量换液, 此后每 2~3 天换 1 次, 逐日显微镜下观察。0.25% 胰蛋白酶消化“铺路石”样贴壁细胞用于流式细胞仪(FCM)鉴定和共培养。

1.2.1.3 免疫荧光鉴定 第 8 天 24 孔板中的细胞 2 孔, 设对照孔、实验孔, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后加 4% 多聚甲醛 200 μL, 室温固定 15 min。去掉多聚甲醛, PBS 洗涤 2 次, 加入 5% BSA 封闭 30 min。实验孔加 5 μL CD31-FITC 和 45 μL PBS, 对照孔加 50 μL PBS, 4 °C 冰箱避光孵育 10 min。PBS 洗涤后加 100 μL 0.2% Triton X-100 溶液, 混匀, 5 min 后 PBS 洗涤。加入 5 μL 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)和 100 μL PBS, 混匀, 避光孵育 3 min, PBS 洗涤。荧光显微镜下观察采图, 随机选取 3 个视野(×200), 计算阳性细胞百分率。

1.2.1.4 流式鉴定 设对照管、实验管 1、实验管 2、实验管 3, 均加上述制备的细胞悬液 200 μL (细胞数大于 1 × 10⁵ 个)。对照管加 IgG-FITC、IgG-PE、IgG-PerCP 各 5 μL, 实验管 1 加 5 μL CD31-FITC, 实验管 2 加 5 μL CD34-PE, 实验管 3 加 5 μL CD45-PerCP, 混匀, 4 °C 避光孵育 15 min。PBS 洗涤, 200 × g 离心 5 min, 去上清液。400 μL PBS 重悬上机检测。

1.2.1.5 vWF-FITC 流式鉴定 设置对照管、实验管, 均加备用细胞悬液 200 μL。离心后加 200 μL 0.4% 多聚甲醛重悬, 室温下固定 20 min, PBS 洗涤离心后加 200 μL 0.2% 皂素溶液重悬, 静置 20 min, PBS 洗涤离心。200 μL PBS 混匀细胞。实验管加 4 μL 羊抗 vWF 多克隆抗体, 对照管加 4 μL 羊 IgG, 室温孵育 30 min。PBS 洗涤离心后 200 μL PBS 重悬, 加 4 μL 驴抗羊 IgG-FITC, 室温避光孵育 20 min。洗涤, 400 μL PBS 重悬上机检测。

1.2.2 GFP 小鼠骨髓 HSCs 的分离、鉴定

1.2.2.1 密度梯度离心与磁珠分选 颈椎脱臼法处死小鼠, 置于 75% 乙醇中浸泡约 5 min。逆向解剖法

剥离股骨、胫骨, PBS 冲洗。剪去骨端约 2 mm, 暴露髓腔。1 mL 注射器插入骨髓腔, 用 PBS 反复冲洗髓腔至发白, 冲出的骨髓收集于离心管, 过 200 目滤网。离心去上清液, 加 1 mL PBS 重悬, 混匀。加 2 mL 复温的 Ficoll 分离液(1.084 g/mL)于离心管, 加样枪沿管壁缓慢加入上述细胞悬液。20 °C 400×g 离心 30 min。收集中间云雾层(即单个核细胞层), 以 1:3 比例加入 PBS 稀释, 制成细胞悬液, 400×g 离心 10 min, 弃上清液, 重复 1 次。经活力测定及计数。加入预冷 Buffer[0.5% BSA、2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、PBS]3 mL, 吹打混匀, 22 °C 300×g 离心 10 min, 弃上清液。按照每 1×10^8 个 MNCs 用 80 μ L 预冷 Buffer 重悬, 每 1×10^7 个 MNCs 加 20 μ L CD117 微珠标记细胞, 混匀, 4 °C 冰箱避光孵育 15 min。每 1×10^7 个 MNCs 用 1 mL Buffer 洗涤, 300×g 离心 10 min, 去上清液, 每 1×10^8 个 MNCs 加入 500 μ L Buffer 重悬。连接 MACS 分选装置, 500 μ L Buffer 润湿 MS 柱, 骨髓细胞悬液滴入 MS 柱, 收集洗脱细胞。Buffer 冲洗 MS 柱 3 次, 每次 500 μ L。MS 柱移出磁场, 加 1 mL Buffer, 配备活塞加压快速推出滞留在 MS 柱内的标记细胞, 离心管收集。对 CD117⁺ 细胞进行活力测定并计数, 留作流式纯度鉴定和共培养使用。

1.2.2.2 FCM 检测 CD117⁺ 细胞纯度及 CD117 CD34 表达率 设置对照管、实验管 1 和 2。对照管加 MNCs 悬液 200 μ L、IgG-APC 和 IgG-PE 各 5 μ L, 实验管 1 和 2 均加分选后的阳性细胞悬液 200 μ L 和 5 μ L CD117-APC, 实验管 2 再加 CD34-PE 5 μ L, 混匀, 4 °C 冰箱避光孵育 30 min, PBS 洗涤离心, 加 400 μ L PBS 重悬上机检测。

1.2.3 MECs 促进 HSCs 增殖

1.2.3.1 HSCs 培养基 添加有 20% FBS、25 ng/mL SCF、25 ng/mL IL-3、0.1 mg/mL 青霉素及链霉素的 DMEM-F12 完全培养基。

1.2.3.2 分组 (1)对照组:HSCs 单培养;(2)共培养组:HSCs+MECs。

1.2.3.3 细胞准备 (1)MECs:“铺路石”的 MECs 经胰酶消化后, 收集入离心管, PBS 洗涤离心。MECs 培养基重悬, 密度为 5.0×10^4 个/mL。(2)HSCs:MACS 收获的 HSCs, PBS 洗涤离心。HSCs 培养基重悬, 密度

为 5.0×10^4 个/mL。

1.2.3.4 种板与换液 (1)共培养组:MECs 接种于 24 孔板, 每孔 200 μ L, 设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂、95% 湿度孵箱培养, 细胞贴壁后去掉培养基每个复孔均加 HSCs 悬液 200 μ L、HSCs 培养基 300 μ L, 继续培养。(2)对照组:24 孔板, 每孔 HSCs 悬液 200 μ L、HSCs 培养基 300 μ L, 设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂、95% 湿度孵箱中培养。每 3 天半量换液, 培养 7 d。

1.2.3.5 荧光显微镜观察 荧光显微镜下观察生长情况, 每天取 3 个复孔悬浮细胞计数, 计算扩增倍数。

1.2.3.6 FCM 检测共培养组扩增后 CD117 CD34 表达率 收集 MECs 组 3 个复孔 HSCs, PBS 洗涤离心, 400 μ L PBS 重悬, 一式两份, 1 份加 IgG-APC、IgG-PE 各 5 μ L, 混匀, 作同型对照; 另 1 份加 CD117-APC、CD34-PE 各 5 μ L, 混匀。4 °C 冰箱避光孵育 30 min, PBS 洗涤离心, 400 μ L PBS 重悬上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内比较采用配对 *t* 检验, 组间比较用两独立样本 *t* 检验; 计数资料以例数或百分率表示, 比较采用 χ^2 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MECs 分离、培养、鉴定

2.1.1 MECs 原代培养 接种后 6 h 见贴壁细胞, 第 3 天细胞聚集生长, 形成形态大小较一致的细胞簇, 第 6 天相邻细胞突起彼此相连, 成“血管样”改变, 第 14 天达 80% 融合, 呈“铺路石”外观, 见图 1。

2.1.2 CD31 免疫荧光鉴定 荧光显微镜下, 细胞呈绿色, 细胞核呈蓝色, 见图 2; 培养第 8 天阳性细胞百分率为 54.5%。

2.1.3 MECs 流式鉴定 vWF、CD31、CD34、CD45 的阳性率分别为 81.39%、45.80%、57.48%、0.17%, 见图 3。

2.2 GFP 小鼠骨髓 HSCs 分离、鉴定

2.2.1 骨髓 HSCs 分离 骨髓经密度梯度离心后分 4 层, 中间的云雾层即为 MNCs。平均每只小鼠骨髓可获得约 1.1×10^8 个 MNCs, 活细胞率为 98%。

2.2.2 CD117⁺ 细胞回收及纯度 每只小鼠 MNCs 经 MACS 分选后可获约 4.7×10^5 个 CD117⁺ 细胞, 活细胞率为 97%, 纯度为 99.51%, 见图 4。

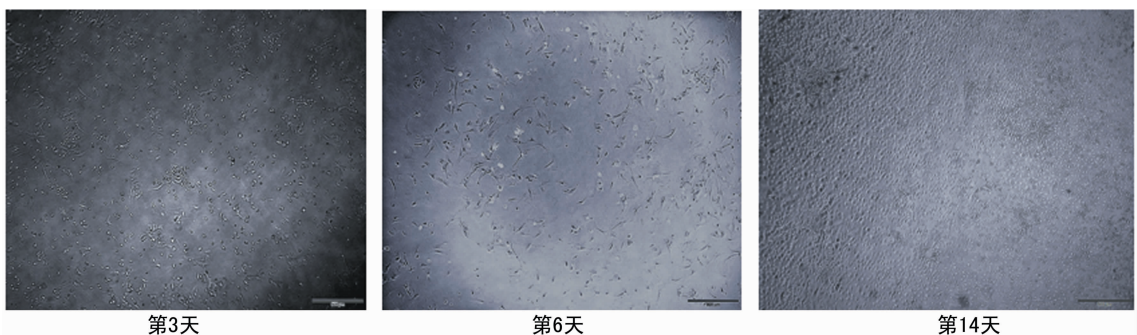
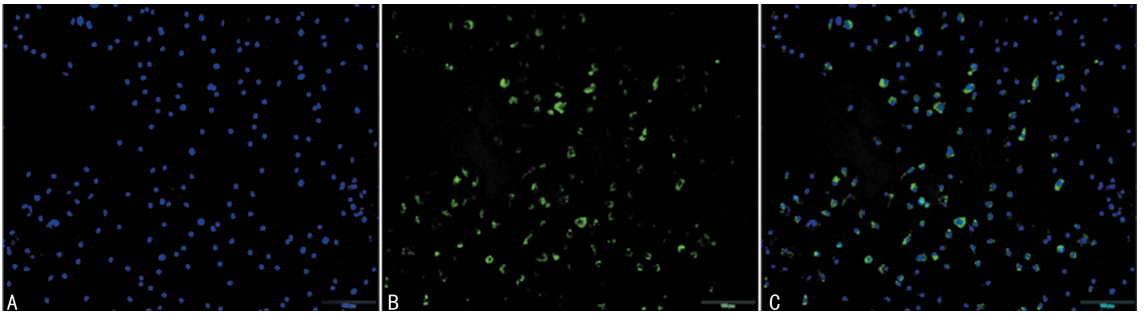


图 1 MECs 原代培养(×40)



A:DAPI 染色图;B:CD31 抗体染色图;C:A、B 合成图

图 2 CD31 抗体免疫荧光鉴定(×200)

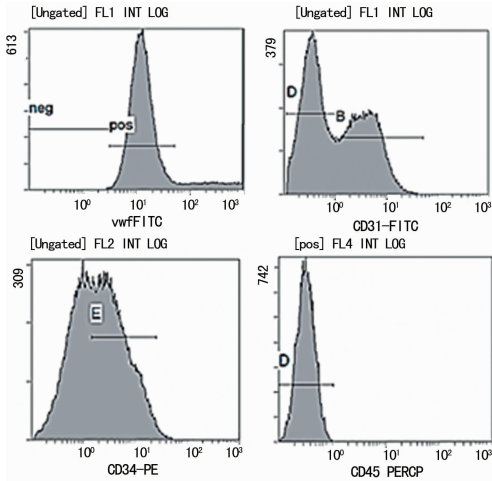


图 3 流式检测 MECs 的 vWF、CD31、CD34、CD45 表达

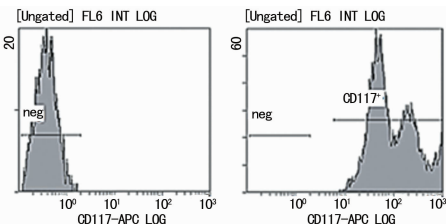


图 4 MACS 分选后的 CD117⁺ 细胞纯度分析

2.3 MECs 促 HSCs 增殖

2.3.1 对照组和共培养组细胞扩增变化 共培养第 0 天,两组 HSCs 计数均为 1.00×10^4 个;共培养第 7 天,对照组、共培养组 HSCs 计数分别为 6.92×10^4 、 12.31×10^4 个,见表 1。荧光显微镜下观察 HSCs 生长情况:共培养第 2、4、6、7 天,共培养组绿色荧光细胞多于对照组,见图 5。第 1~7 天,共培养组与对照组细胞计数的相对变化倍数分别为 1.21、1.35、1.50、1.72、1.71、1.75 和 1.78,两组细胞计数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1;第 4 天变化最明显,见图 6。对照组第 1~7 天较第 0 天的 HSCs 细胞计数比较:第 1 天扩增 0.99 倍($P > 0.05$),第 2~7 天扩增倍数分别为 1.42、2.30、4.25、5.66、6.45、6.92 ($P < 0.05$)。共培养组第 1~7 天较第 0 天的 HSCs 细胞计数比较:第 1~7 天扩增倍数分别为 1.20、1.92、3.45、7.31、9.72、11.28、12.31 ($P < 0.05$)。

2.3.2 共培养组共培养前后 HSCs CD117 CD34 共表达率变化 共培养前 HSCs CD117 CD34 共表达率为 75.85%,见图 7。共培养后 HSCs CD117 CD34 共

表达率为 92.06%,见图 8。共培养 7 天后,共培养组 HSCs CD117 CD34 共表达率增加。

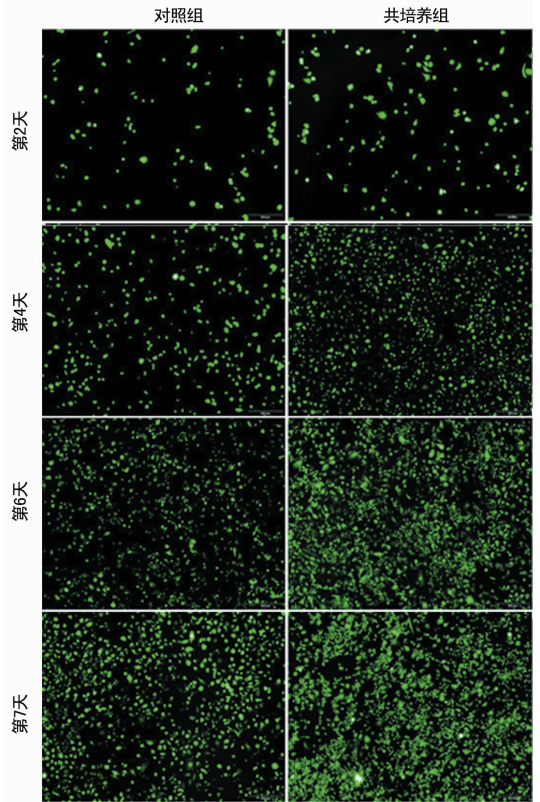


图 5 荧光显微镜下观察 HSCs 生长情况(×100)

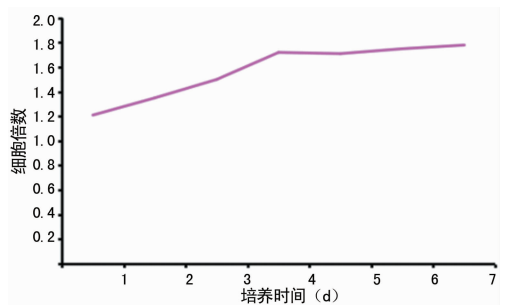


图 6 共培养组与对照组 HSCs 细胞计数的相对变化

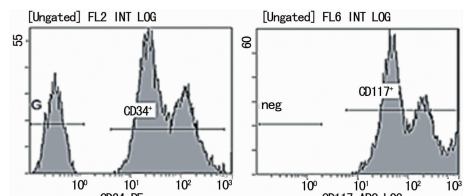


图 7 共培养前 HSCs D117 CD34 共表达率流式检测

表 1 共培养过程中两组 HSCs 扩增细胞数比较($\times 10^4$ 个)

组别	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
对照组	1.00	0.99 \pm 0.03	1.42 \pm 0.02	2.30 \pm 0.06	4.25 \pm 0.20	5.66 \pm 0.12	6.45 \pm 0.14	6.92 \pm 0.17
共培养组	1.00	1.20 \pm 0.04*	1.92 \pm 0.45*	3.45 \pm 0.09*	7.31 \pm 0.06*	9.72 \pm 0.12*	11.28 \pm 0.12*	12.31 \pm 0.11*

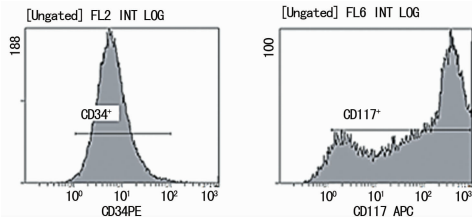
* : $P < 0.05$, 与对照组比较

图 8 共培养后 HSCs CD117 CD34 共表达率流式检测

3 讨 论

骨髓龛按照骨髓解剖部位和功能作用差异分为两类:以成骨细胞为主的成骨龛,以内皮细胞(endothelial cells, ECs)为主的血管龛^[2]。前者维持 HSCs 的稳态,后者调控 HSC 增殖、分化、动员及归巢^[3]。然而不同组织来源的 ECs 生物学特性存在差异。MECs 存在于毛细血管、微静脉及微动脉,肺组织含量最多^[4],取材简便,因此作为本实验 ECs 来源。目前 ECs 鉴定方法主要有 3 种:细胞形态、细胞抗原标记、细胞器超微结构。W-P 小体是代表性的 ECs 细胞器超微结构,但是该小体会因种属、部位、培养条件、细胞状态的差异而呈现不同的形状和结构,出现概率极低^[5-7]。故本实验选用前两种方法鉴定 ECs。CD31、CD34、vWF 是 ECs 鉴定较为理想的抗原标记。本实验小鼠肺组织经 I 型胶原酶消化的细胞在培养第 6 天细胞突起彼此相连,成血管样改变,第 14 天长至 80% 融合,呈“铺路石”样。培养第 8 天的细胞 CD31 荧光检测阳性率为 54.5%。第 14 天细胞流式检测 vWF、CD31、CD34、CD45 的阳性率分别为 81.39%、45.80%、57.48%、0.17%,符合文献报道^[8]。故本实验成功培养出肺 MECs。

HSCs 主要存在于骨髓龛,目前骨髓分离 HSCs 的方法主要有免疫磁珠分选和流式细胞分选。免疫磁珠分选法操作简便、快速,MACs 分离纯度高达 99%,细胞损伤小,可直接用于培养研究和流式检测。CD117 即 SCF 受体,主要表达于造血干/祖细胞。本实验选用 CD117 作为分选小鼠 HSCs 免疫标记。每只小鼠骨髓经 CD117 磁珠分选后可收获 4.7×10^5 个阳性细胞,纯度为 99.51%,成功分选出骨髓 HSCs。

共同起源学说认为血管 ECs 与早期 HSCs 都是由胚胎卵黄囊血岛细胞分化而来^[9]。激活小鼠 ECs 中的蛋白激酶 B1(AKT1),不仅可以扩增 HSCs,还能重建辐射小鼠的造血系统^[10]。脑 MECs 通过胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)功能性克隆促进 CD34⁺CD38⁻ HSCs 体外增殖^[11]。MECs 能促进损伤后 HSCs 的保持和更新^[12]。ECs 作为脐血细胞的滋养层,可明显增加扩增 CD34⁺CD38⁻ 细胞数量^[13]。

综上所述,ECs 会调控 HSC 增殖、分化、归巢。本研究发现共培养过程中:(1)培养时间增加,两组 HSCs 数量均增加,MECs 组较对照组增加更明显。(2)第 1~7 天均与第 0 天对比,共培养组及对照组 HSCs 均扩增,且共培养组扩增倍数大于对照组,第 4 天 MECs 促进 HSCs 增殖的作用最明显。由此可见,MECs 促进 HSCs 增殖,且第 4 天最明显。

综上所述,共培养第 7 天的共培养组悬浮细胞 HSCs CD117 CD34 共表达率增加,而既往研究发现小鼠年龄和状态会影响 HSCs CD34 抗原表达。5 周龄以下的小鼠,包括胚胎期、新生小鼠,所有的 HSCs 都表达 CD34,7 周龄小鼠有 CD34⁻ 的 HSCs,10~20 周龄大多数 HSCs 不表达 CD34^[14]。小鼠 CD34⁺ HSCs 与 CD34⁻ HSCs 可以相互转化,活化状态下的 HSCs 表达 CD34^[15],人 HSCs CD34 抗原表达是可逆的^[16]。4~6 周龄小鼠 HSCs 分为 CD34⁺ 和 CD34⁻ 群^[17]。笔者认为 MECs 可以促进 HSCs CD34 表达,但其具体机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] MENDELSON A, FRENETTE P S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration[J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 833-846.
- [2] ZHAO M, LI L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(12): 1209-1215.
- [3] MERCIER F E, RAGU C, SCADDEN D T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 12(1): 49-60.
- [4] WINIARSKI B K, ACHESON N, GUTOWSKI N J, et al. An improved and reliable method for isolation of microvascular endothelial cells from human omentum[J]. *Microcirculation*, 2011, 18(8): 635-645.
- [5] BLEAU C, FILLIOL A, SAMSON M, et al. Brain invasion by mouse hepatitis virus depends on impairment of tight junctions and beta interferon production in brain microvascular endothelial cells[J]. *J Virol*, 2015, 89(19): 9896-9908.
- [6] METCALF D J, NIGHTINGALE T D, ZENNER H L, et al. Formation and function of Weibel-Palade bodies[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 1): 19-27.
- [7] LIU Y, XUE Q, TANG Q, et al. A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2013, 90: 199-205.
- [8] WANG J D, KHAFAGY E S, KHANAFER K, et al. Organization of endothelial cells, pericytes, and astrocytes into a 3d microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier[J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(3): 895-906.
- [9] ROBERTSON S, KENNEDY M, KEL- (下转第 2417 页)

- [2] GRAY R T, CANTWELL M M, COLEMAN H G, et al. Evaluation of PTGS2 expression, PIK3CA mutation, aspirin use and colon cancer survival in a population-based cohort study[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(4): e91.
- [3] LI T, LIU X, JIANG Q, et al. High expression of partitioning defective 3-like protein is associated with malignancy in colorectal cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39 (4): 1010428317698393.
- [4] 全伟兵, 刘志苏. 长链非编码 RNA 核仁小分子 RNA 宿主基因 12 在肝细胞癌的表达及作用机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(3): 87-92.
- [5] WANG Q, LI Q, ZHOU P, et al. Upregulation of the long non-coding RNA SNHG1 predicts poor prognosis, promotes cell proliferation and invasion, and reduces apoptosis in glioma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 906-911.
- [6] LIU J, LU C, XIAO M, et al. Long non-coding RNA SNHG20 predicts a poor prognosis for HCC and promotes cell invasion by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 857-863.
- [7] ZHAO L, GUO H, ZHOU B, et al. Long non-coding RNA SNHG5 suppresses gastric cancer progression by trapping MTA2 in the cytosol [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (44): 5770-5780.
- [8] BIRGANI M T, HAJJARI M, SHAHRISA A, et al. Long Non-Coding RNA SNHG6 as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24 (2): 329-337.
- [9] LIU Y, PAN S, LIU L, et al. A genetic variant in long non-coding RNA HULC contributes to risk of HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35145.
- [10] TAN L, YU J T, HU N, et al. Non-coding RNAs in Alzheimer's Disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 382-393.
- [11] SCHONROCK N, HARVEY R P, MATTICK J S. Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology[J]. *Circ Res*, 2012, 111(10): 1349-1362.
- [12] HE Y, MENG X M, HUANG C, et al. Long noncoding RNAs: novel insights into hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(1): 20-27.
- [13] FANG X Y, PAN H F, LENG R X, et al. Long noncoding RNAs: novel insights into gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt B): 357-366.
- [14] 陈宝珍, 林贤东, 陈刚, 等. 长链非编码 RNA SNHG8 在 EB 病毒相关胃癌中的表达及其临床意义[J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(2): 89-92.
- [15] CHANG L, YUAN Y, LI C, et al. Upregulation of SNHG6 regulates ZEB1 expression by competitively binding miR-101-3p and interacting with UPF1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2): 183-194.
- [16] MARCHESI V. Breast cancer: epithelial-mesenchymal transitions in human breast cancer samples[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(4): 184.
- [17] WAY T D, HUANG J T, CHOU C H, et al. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2): 366-378.
- [18] MOODY S E, PEREZ D, PAN T C, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence[J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 197-209.
- [19] 代剑波, 王继见, 郝亚琴. 探讨 Snail 调控上皮间质转化在结直肠癌侵袭、转移方面的作用及意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(6): 645-649.

(收稿日期: 2018-01-01 修回日期: 2018-03-06)

(上接第 2412 页)

- LER G. Hematopoietic commitment during embryogenesis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 872: 9-16.
- [10] KOBAYASHI H, BUTLER J M, O'DONNELL R, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11): 1046-1056.
- [11] LIU L Q, SPOSATO M, LIU H Y, et al. Functional cloning of IGFBP-3 from human microvascular endothelial cells reveals its novel role in promoting proliferation of primitive CD34⁺ CD38⁻ hematopoietic cells in vitro[J]. *Oncol Res*, 2003, 13(6/10): 359-371.
- [12] NOLAN D J, GINSBERG M, ISRAELY E, et al. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration [J]. *Dev Cell*, 2013, 26(2): 204-219.
- [13] ROSLER E, BRANDT J, CHUTE J, et al. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34⁺ CD38⁻ cells [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(7): 841-852.
- [14] OGAWA M, TAJIMA F, ITO T, et al. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. Developmental changes and kinetic alterations[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 938: 139-145.
- [15] SATO T, LAVER J H, OGAWA M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 1999, 94(8): 2548-2554.
- [16] DAO M A, AREVALO J, NOLTA J A. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution [J]. *Blood*, 2003, 101(1): 112-118.
- [17] MOREL F, GALY A, CHEN B, et al. Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34⁺ and CD34⁻ fractions of Thy-1lowLin-/lowSca-1⁺ bone marrow cells [J]. *Exp Hematol*, 1998, 26(5): 440-448.

(收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-11-26)