

胚胎干细胞来源造血细胞的细胞表型和功能分析

陈晓勤¹, 那晓东^{2*}, 余伟华², 李树浓², 张秀明², 曾有健¹, 林承光¹, 郑芹², 蒋涛³
(1. 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 2. 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080;
3. 广东省人民医院, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】分析经卵黄囊(YS)、胎肝(FL)和骨髓来源(BM)的基质细胞条件培养液(SCCM)诱导产生的胚胎干细胞(ES)来源造血细胞的细胞表型与功能差异。【方法】制备 YS-SCCM、FL-SCCM 及 BM-SCCM, 将 3 种基质细胞条件培养液分别加入 ESE 14.1 细胞分化培养体系培养 7 d, 通过对分化 ESE14.1 细胞造血发育表面标志 FLK-1、Integrin- α 4 (整联蛋白- α 4)、Sca-1(干细胞抗原-1)、CD34 的检测、体外高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)分析及体内脾集落形成单位(CFU-S)检测, 评价 3 种基质细胞条件培养液对 ESE14.1 细胞体外造血发育的调控作用。【结果】经 FL-SCCM 诱导的 EB 细胞 Flk-1⁺、Integrin α 4⁺ 和 Sca-1⁺ 细胞均高于 YS-SCCM 和 BMSC-CM 诱导组, 分别为 3.03%、2.9% 和 13.74%; 经 BMSC-CM 诱导产生的 CD34⁺ 细胞比例最高, 为 1.07%。经 FLSC-CM 或 BMSC-CM 诱导产生的造血细胞其 HPP-CFC 产率明显高于对照组, 分别为 7.4 个/10⁵ 细胞 ($P < 0.01$) 和 5.8 个/10⁵ 细胞 ($P < 0.05$); 经 FLSC-CM 或 BMSC-CM 诱导产生的造血细胞其 CFU-S 产率亦明显高于对照组, 分别为 8.5 个/5 × 10⁵ 细胞和 6.75 个/5 × 10⁵ 细胞 ($P < 0.001$)。【结论】YS-SCCM、FL-SCCM 及 BM-SCCM 均可诱导 ESE14.1 向造血细胞分化, FL-SCCM 和 BM-SCCM 造血定向诱导效率较高, 所产生的细胞具备造血细胞的正常功能, FL-SCCM 诱导产生的造血细胞原始程度高于 BM-SCCM 诱导产生的造血细胞。

关键词: 胚胎; 发育; 造血; 分化

中图分类号: R363 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)04-0367-05

Phenotypic and Functional Analysis of Embryonic Stem Cell Derived Hematopoietic Cells

CHEN Xiao-qin¹, NA Xiao-dong^{2*}, YU Wei-hua², LI Shu-nong², ZHANG Xiu-ming², ZEN You-jian¹,
LIN Cheng-guang¹, ZHENG Qin², JIANG Tao³

(1. Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To establish an effective and stable method to induce hematopoietic cells from embryonic stem(ES) cells, the phenotype and function of ES-derived hematopoietic cells induced by stromal cell conditioned medium (SCCM) of yolk sac (YS), fetal liver (FL) or bone marrow (BM) were analyzed and compared. 【Methods】10% of YS-SCCM, FL-SCCM or BM-SCCM was added to culture system for differentiation of ES cells. Flow cytometric analysis was used to identify expression of Flk1, Integrin α 4, Sca-1, and CD34. Colony analysis was used to identify the quantity of high proliferative potential colony-forming cells (HPP-CFC) in differentiated ES cells. The yield of CFU-S (colony-forming unit-spleen) was also analyzed by transplanting ES cell derivatives into lethally irradiated mice. 【Results】Expression of Flk1, Integrin α 4, Sca-1, and CD34 could be tested on induced EB cells. The percentage of Flk-1⁺, Integrin α 4⁺ and Sca-1⁺ cells induced by were 3.03%, 2.9%, and 13.74%, respectively, which are greater than other groups. The percentage of CD34⁺ cells induced by BMSC-CM was 1.07% which was greater than other groups. The yields of HPP-CFC from hematopoietic cells induced by FLSC-CM or BMSC-CM were 7.4 /10⁵ cells ($P < 0.01$) and 5.8 /10⁵ cells ($P < 0.05$) which were greater than the yields of control group. The yields of CFU-S from hematopoietic cells induced by FLSC-CM or BMSC-CM were 8.5/5 × 10⁵ cells and 6.75/5 × 10⁵ cells which were also greater than the yields of

收稿日期: 2009-02-04

基金项目: 国家自然科学基金(30400225), 广东省自然科学基金(04300227)

作者简介: 陈晓勤, 硕士, 主治医师, E-mail: xqchen2005@hotmail.com; * 通讯作者: 那晓东, 医学博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: naxd@mail.sysu.edu.cn

control group ($P < 0.001$). 【Conclusion】 Both YS-SCCM, FL-SCCM, and BM-SCCM could promote hematopoietic differentiation of ESE14.1 cells. Hematopoietic differentiation induced by FL-SCCM or BM-SCCM is more effective, which generates hematopoietic progenitor cells with normal function. Application of FL-SCCM generates more primitive hematopoietic progenitor cells than that of BM-SCCM.

Key words: embryo; development; hematopoiesis; differentiation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4):367-371]

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)细胞是维持未分化状态和保持全能分化能力的最原始干细胞。ES 细胞在无分化抑制因子的培养体系中或体内表现出全能分化特性,在自然状态下,ES 细胞的自发分化是随机的和不同步的。由于细胞成份的不确定性及可能存在未分化细胞,自发分化的 ES 细胞不适于作为细胞治疗的细胞来源^[1]。通过提供定向分化的诱导环境可提高 ES 细胞向特定细胞类型分化的效率,研究表明应用造血生长因子、各种来源的基质细胞层及其条件培养液均可促进 ES 细胞向造血细胞的分化^[2-4]。本研究应用卵黄囊、胎肝和骨髓基质细胞条件培养液(stromal cell conditioned medium, SCCM)促进 ESE 14.1 细胞向造血细胞的定向分化,并对不同诱导方法产生的 ES 来源造血细胞进行细胞表型和功能分析,以期稳定和优化 ES 细胞向造血细胞定向分化的培养体系,并对 ES 来源造血细胞的进行综合评价。

1 材料和方法

1.1 材料

6 ~ 8 周龄 SCID 小鼠、昆明小鼠,昆明孕鼠(交配后 9 ~ 11 d),SPF 级,由中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂

高糖 DMEM 培养基、进口胎牛血清、牛血清白蛋白(BSA)、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、L-谷氨酰胺购自 Gibco BRL,rmSCF、rmEPO、rmIL-3、rmIL-6、rmGM-CSF 均为 Pepro Tech 公司产品,小鼠白血病抑制因子(murine leukemia inhibitory factor, mLIF)购自 CHEMICON,甲基纤维素、琼脂为 Sigma 公司产品,马血清购自中国军事医学科学院,FITC-rat anti mouse Sca-1、PE-rat anti mouse CD34、FITC-/PE-rat IgG2a 购自 BD Biosciences Pharmingen。

1.3 方法

1.3.1 三种来源基质细胞条件培养液的制备 颈

椎脱白处死孕鼠(交配后 9 ~ 11 d),体积分数 75%乙醇消毒,剪开子宫,取出全部胚胎,从第 9 天的胚胎中分离卵黄囊,从第 10 ~ 11 天的胚胎中分离胎肝,用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化,离心,分别收集卵黄囊和胎肝细胞。用含 10 mol/L FBS 的 DMEM 培养液重悬细胞。取成年小鼠双侧股骨,用含 10 mol/L FBS 的 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,制备骨髓单细胞悬液。在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度环境中分别培养卵黄囊、胎肝和骨髓基质细胞,待细胞生长汇合至亚融合状态(80%),更换为无血清 DMEM,培养 48 h,离心收集上清,经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,分装于 -20 °C 保存。

1.3.2 ES 细胞的造血分化培养 传代培养的 ESE14.1 细胞经消化脱壁后,取细胞微团接种于造血分化培养体系(含 8 g/L 甲基纤维素、15 mol/L FBS、450 μ mol/L 硫代甘油)。实验组分别加入体积分数 10% 卵黄囊基质细胞条件培养液(YS-SCCM)、胎肝基质细胞条件培养液(FL-SCCM)或骨髓基质细胞条件培养液(BM-SCCM),对照组不加条件培养液,置于 Petri dish 中悬浮培养,隔日换液。培养 7 d 后将胚胎体消化为单细胞悬液,进行表面标志检测及造血集落分析。

1.3.3 分化 ES 细胞表面标志的检测 取诱导分化后的 ESE14.1 细胞,消化、离心后重悬细胞,调整浓度为 1×10^6 cells /mL。在制备好的细胞悬液中分别加入以下荧光素标记抗体:Fluorescein isothiocyanate (FITC)-rat anti mouse Sca-1, Phycoerythrin (PE)-rat anti mouse Flk-1、Integrin α 4 (CD49d) 和 CD34, FITC-/PE-rat IgG2a, 4 °C 孵育 30 min,用含体积分数 0.1% BSA 的 PBS 洗涤、重悬细胞,移入专用测试管,应用流式细胞仪(FACSVantage)检测,联机专用软件 Cell Quest 分析。

1.3.4 分化 ES 细胞的高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)分析 取分化诱导后的 ES 细胞进行 HPP-CFC 的集落培养。HPP-CFC 培养体系为:

DMEM 培养液含体积分数 30% 马血清、3 g/mL 琼脂、单个核细胞浓度 2×10^5 /mL、rmGM-CSF 50 U/mL、rmSCF 50 ng/mL、rmIL-3 50 U/mL 和 rmIL-6 75 ng/mL; 每培养体系 0.5 mL, 每组种 3 孔, 用 24 孔板培养, 置 33 °C、体积分数 5%CO₂、饱和湿度下培养 14 d。倒置显微镜下观察 HPP-CFC 集落直径大于 1.0 mm, 细胞数大于 50 000 个, 集落松散均匀, 但有一个致密的集落中心, 细胞形态学检查, 集落主要由粒细胞和单核细胞组成, 计数 HPP-CFC 集落数。

1.3.5 分化 ES 细胞中 CFU-S12 的检测⁴ 取 5 d 前开始饮用含庆大霉素 (32×10^4 U/L) 和红霉素 (250 mg/L) 水的 SPF 级 C57 小鼠, 经 ⁶⁰Co 全身照射 (TBI) (9.0 Gy, 剂量率为 0.5 Gy/min) 后, 经尾静脉注射移植诱导分化的细胞 (5×10^5 /只)。在层流柜中无菌饲养。移植细胞后第 12 天取出脾脏, 固定后计数脾脏表面的脾结节数目。

1.3.6 统计学分析 实验数据为 5 次以上结果, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Excel 软件作图, 各组间比较采用方差分析, 两两比较采用 *q* 检验。

2 结 果

2.1 三种来源基质细胞条件培养液造血活性的检测

取原代培养的卵黄囊、胎肝和骨髓基质细胞, 制备无血清条件培养液层。在分化诱导培养体系中分别加入 3 种来源基质细胞条件培养液, 观察不同浓度条件培养液 (体积分数 5% ~ 30%) 对造血祖细胞 CFU-GM 和 HPP-CFC 产率的剂量反应关系, 结果表明: 浓度为体积分数 10% ~ 15% 的 3 种来源基质细胞条件培养液均适于造血细胞的体外生长。本研究在分化诱导培养体系中使用体积分数 10% 的基质细胞条件培养液。

2.2 分化 ESE14.1 细胞造血发育相关表面标志的检测

取各组诱导分化 7 d 的 ESE14.1 细胞进行造血发育相关表面标志的检测 (图 1), FCM 结果表明: 各组 EB 细胞均可检测到造血发育相关表面标志 Flk-1、Integrin $\alpha 4$ 、Sca-1 和 CD34 的表达, 对照组 EB 细胞中原始造血细胞比例最低, CD34⁺ 细胞为 0.26%; 经 FL-SCCM 诱导的 EB 细胞 Flk-1⁺、Integrin $\alpha 4$ ⁺ 和 Sca-1⁺ 细胞均高于 YS-SCCM 和

BMSC-CM 诱导组, 分别为 3.03%、2.9% 和 13.74%; 经 BMSC-CM 诱导的 EB 细胞中 CD34⁺ 细胞比例最高, 为 1.07% (图 2)。

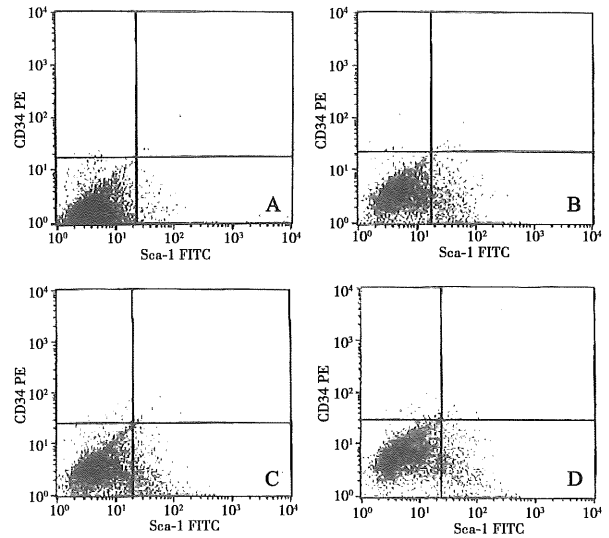


图 1 诱导分化 7 d ESE 14.1 细胞表型的流式检测结果
Fig.1 Phenotype of differentiated ESE 14.1 cells on d 7

A: control EB cells; B: EB cells induced by YS-SCCM; C: EB cells induced by FL-SCCM; D: EB cells induced by BM-SCCM

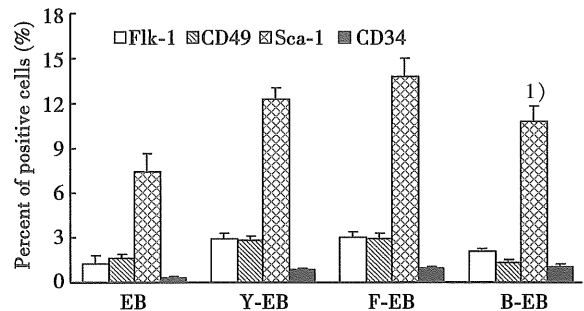


图 2 分化诱导 7 d 各组小鼠 ESE 14.1 的表面标志分析
Fig.2 Comparison phenotypes of differentiated ESE 14.1 cells on d 7

EB: control EB cells; Y-EB: EB cells induced by YS-SCCM; F-EB: EB cells induced by FL-SCCM; B-EB: EB cells induced by BM-SCCM, 1) $P < 0.05$ ($n = 5$)

2.3 分化 ESE14.1 细胞的高增殖潜能集落形成细胞 (HPP-CFC) 分析

取各组诱导分化 7 d 的 ESE14.1 细胞进行 HPP-CFC 培养, HPP-CFC 计数结果见图 3, 对照组 EB 细胞中 HPP-CFC 最少, 为 2.6 个/ 10^5 细胞; 经 FL-SCCM 和 BMSC-CM 诱导的 EB 细胞 HPP-CFC 数量较对照组明显增多, 分别为 7.4 个/ 10^5 细胞

($P < 0.01$)和 5.8 个/ 10^5 细胞($P < 0.05$)。

2.4 分化 ESE14.1 细胞中 CFU-S 的检测

将各组诱导分化 7 d 的 ESE14.1 细胞经尾静脉注射移植给经致死剂量照射的小鼠体内, 移植后第 12 天, 取出脾脏, 肉眼可见脾脏表面有因造血灶细胞增生形成的结节, 即 CFU-S。各组 CFU-S 计数结果见图 4, 未移植细胞的照射对照组小鼠脾脏无 CFU-S 形成, 对照组及经 YSSC-CM 诱导组 EB 细胞中 CFU-S 最少, 不到 1 个/ 5×10^5 细胞; 经 FLSC-CM、BMSC-CM 诱导的 EB 细胞中 CFU-S 较多, 分别为 8.5 个/ 5×10^5 细胞和 6.75 个/ 5×10^5 细胞($P < 0.001$)。

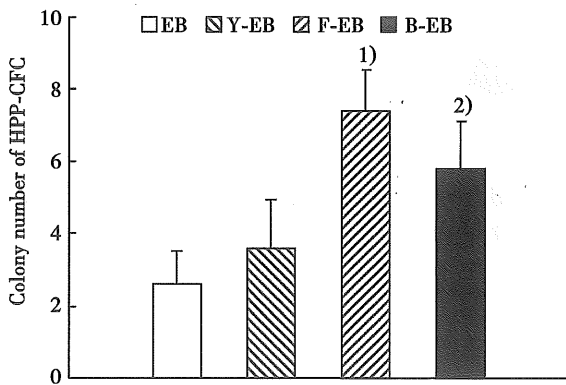


图 3 各组分化小鼠 ESE 14.1 细胞的高增殖潜能集落形成细胞(HPP-CFC)集落产率分析

Fig.3 HPP-CFC analysis of differentiated ESE 14.1 cells

EB: control EB cells; Y-EB: EB cells induced by YS-SCCM; F-EB: EB cells induced by FL-SCCM; B-EB: EB cells induced by BM-SCCM, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ ($n = 5$)

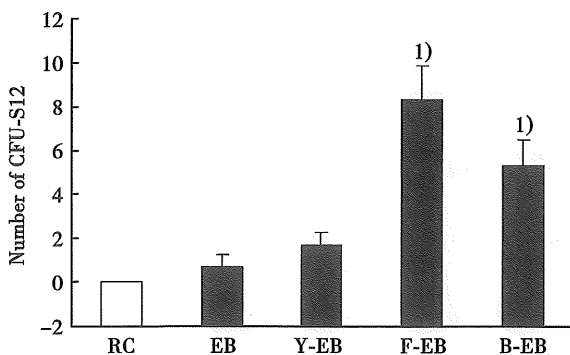


图 4 各组分化小鼠 ESE 14.1 细胞的脾集落形成单位(CFU-S12)产率分析

Fig.4 CFU-S12 analysis of differentiated ESE 14.1 cells

RC: Irradiation control; EB: control EB cells; Y-EB: EB cells induced by YS-SCCM; F-EB: EB cells induced by FL-SCCM; B-EB: EB cells induced by BM-SCCM, 1) $P < 0.001$.

3 讨论

在胚胎造血发育研究中, ES 细胞主要的科研优势在于为胚胎发育研究提供了易于获取的细胞材料。从临床应用角度考虑, ES 细胞来源的造血干细胞与传统来源如骨髓、脐血的造血干细胞相比有许多优势。合适的供体骨髓来源困难; 脐血虽已建库, 但脐血中的造血干细胞数目极为有限, 不适用于成人治疗, 目前尚无有效方法将这些来源的造血干细胞有效扩增并保持其长期重建造血功能。与此相反, ES 细胞可在体外无限扩增, 而且将来极可能通过体细胞的重新程序化获取与患者表型一致的 ES 细胞, 借助于定向分化诱导技术将有望生产足够数量的细胞用于造血干细胞移植治疗。

ES 细胞生成血细胞的能力最初为 Doetschman 等关注^[5]。他们将 ES 细胞通过悬浮培养诱导分化形成胚胎体, 其中许多胚体发育为含血红蛋白的血岛。目前已有较多文献报导 ES 细胞可在体外诱导分化为造血细胞, 但目前 ES 细胞分化为造血细胞的比例较低, 并且产生的造血细胞迅速向成熟血细胞分化。如能在体外模拟造血发育微环境, 将有利于提高 ES 细胞向造血细胞的分化效率, 并使生成的造血干细胞通过体外培养得到有效扩增。

基质细胞是构成血发育微环境的主要功能成份, 造血基质细胞层及其条件培养液中含多种刺激造血的功能成份, 可在体外较好模拟胚胎造血发育环境。在胚胎造血发育过程中伴随着造血位点的迁移, 卵黄囊是哺乳动物胚胎发育的第一个造血中心, 卵黄囊的基质细胞在启动胚胎造血发育中发挥了重要的作用^[6-7]。当卵黄囊的造血干细胞迁移到肝脏后进一步发育, 获得成年造血重建能力^[8-9]。在肝脏中发育完善的造血干细胞定居到骨髓, 骨髓成为延续终生的造血部位。本研究将源自不同发育阶段的基质细胞条件培养液加入分化体系, 以期为 ES 细胞提供一个支持造血发育的环境。造血干细胞发育的早期存在 FLK-1、Integrin- $\alpha 4$ 、Sca-1 及 CD34 等表面标志的顺序表达^[10-11], 我们在实验中采用 FLK-1、Integrin- $\alpha 4$ 、Sca-1 和 CD34 比较不同分化体系中 ES 细胞向造血细胞分化的效率并对分化产生造血细胞的原始程度进行评

价。结果表明:与自发分化的对照组相比,3种来源的基质细胞条件培养液均可支持ES细胞向造血细胞分化,FLSC-CM诱导形成的造血细胞表达FLK-1、Integrin- α 4和Sca-1的比例均高于YSSC-CM和FLSC-CM诱导形成的造血细胞,提示FLSC-CM能有效促进ES细胞向造血细胞分化,经FLSC-CM诱导的EB细胞中Sca-1⁺细胞比例最高,提示所产生的造血细胞维持在较原始的造血干细胞阶段;经BMSC-CM诱导的EB细胞中CD34⁺细胞比例最高,而Sca-1的表达水平明显低于YSSC-CM和FLSC-CM诱导形成的造血细胞,提示经BMSC-CM诱导产生的造血细胞可能存在过度分化。

ES在分化为造血细胞的过程中,不仅表达造血细胞表面标志,同时也获得了造血功能。与红系祖细胞和粒巨噬系祖细胞等定向祖细胞相比,CFU-S和HPP-CFC为更为原始的髓系造血祖细胞^[12],具有一定的自我更新能力,能进一步分化为各系造血祖细胞并发育为多种类型的血细胞,CFU-S和HPP-CFC的产率既可以反映ES来源造血细胞的原始程度,也可以反映ES来源造血细胞的功能状况,经FLSC-CM诱导的EB细胞中CFU-S和HPP-CFC集落产率最高,这与细胞表面标志的检测结果是-致的;经YS-SCCM诱导的EB细胞中HPP-CFC集落产率最低,提示经YS-SCCM诱导产生的造血细胞功能发育尚不完善。ES来源造血细胞的功能分析结果提示:在3种基质细胞条件培养液中,FLSC-CM诱导ES向造血细胞定向分化的效果最佳。

应用来源于胚胎干细胞的细胞进行移植治疗时,首先必须保证植入的细胞必需具有正常机能;同时,应排除移植细胞可能存在未分化的胚胎干细胞。本研究将不同方法诱导分化的ES细胞注射到SCID小鼠体内观察分化细胞的致瘤性,结果发现经3种基质细胞条件培养诱导发育形成的胚胎体细胞注射至SCID小鼠体内均未形成瘤体组织,以上结果提示经定向诱导发育产生的造血细胞有望成为造血干细胞移植的理想细胞来源。

参考文献:

[1] Srivastava AS, Malhotra R, Esmaeli-Azad B, et al. Prospects of embryonic stem cells in treatment of hematopoietic disorders [J]. *Curr Pharm Biotechnol*,

2007,8(5):305-317.

- [2] Tian X, Morris JK, Linehan JL, et al. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2004,32(10):1000-1009.
- [3] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential [J]. *Blood*, 2005,105(2):617-626.
- [4] Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,98(19):10716-10721.
- [5] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, et al. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1985,87(1):27-45.
- [6] Na XD, Wang QR. The effects and mechanism of YSEC-CM on the growth of yolk sac hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Leuk Res*, 2004,28(11):1189-1195.
- [7] 那晓东,王绮如,赵自平. 小鼠卵黄囊内皮细胞的体外培养及其细胞因子表达的检测 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003,19(12):1603-1606.
- [8] Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, et al. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002,78(4):442-453.
- [9] Charbord P, Oostendorp R, Pang W, et al. Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues [J]. *Exp Hematol*, 2002,30(10):1202-1210.
- [10] Shinoda G, Umeda K, Heike T, et al. alpha4-Integrin (+) endothelium derived from primate embryonic stem cells generates primitive and definitive hematopoietic cells [J]. *Blood*, 2007,109(6):2406-2415.
- [11] Yao H, Liu B, Wang X, et al. Identification of high proliferative potential precursors with hemangioblastic activity in the mouse aorta-gonad-mesonephros region [J]. *Stem Cells*, 2007,25(6):1423-1430.
- [12] Yang G, Hisha H, Cui Y, et al. A new assay method for late CFU-S formation and long-term reconstituting activity using a small number of pluripotent hemopoietic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2002,20(3):241-248.

(编辑 王晓鹰)