

间充质干细胞及其培养上清与融冻产物对脐血 CD34⁺ 细胞扩增及分化的作用

周敦华, 黄科, 吴燕峰, 沈婷, 黄绍良
(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨人骨髓间充质干细胞(MSC)及其培养上清、融冻产物对脐血 CD34⁺ 细胞扩增及分化的作用。【方法】分离纯化人骨髓 MSC, 收集纯化三代的 MSC 培养上清, 采用反复冻融法获得 MSC 融冻产物, 采用免疫磁珠分选系统纯化脐血 CD34⁺ 细胞。实验分为 4 组, 分别为含 MSC 滋养层组、MSC 上清组、MSC 融冻产物组及单纯造血生长因子(HGFs) 对照组。流式细胞仪检测人脐血 CD34⁺ 细胞在这四种培养体系中第 6 天和第 12 天有核细胞数及 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻、CD41⁺、CD19⁺、CD3⁺ 细胞含量。【结果】①MSC 滋养层组对脐血有核细胞和对脐血 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻ 的扩增能力最强, MSC 培养上清组和 MSC 滋养层相比具有类似的作用, 但其作用强度减弱 ($P < 0.05$)。②MSC 培养上清和 MSC 均具有抑制脐血 CD34⁺ 细胞分化为 CD3⁺ 和 CD19⁺ 细胞的作用, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。③MSC 培养上清和 MSC 均具有促进脐血 CD34⁺ 细胞向 CD41⁺ 细胞分化的作用, MSC 滋养层的作用强于 MSC 培养上清 ($P < 0.05$)。④MSC 融冻产物已完全丧失对脐血 CD34⁺ 细胞扩增和分化作用, 与单纯因子对照组相似 ($P > 0.05$)。【结论】MSC 培养上清对脐血 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻ 细胞均具有扩增作用, 而且可促进脐血 CD34⁺ 细胞向 CD41⁺ 细胞分化。

关键词: 间充质干细胞; 脐血 CD34⁺ 细胞; MSC 培养上清; MSC 融冻产物

中图分类号: R329.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0039-06

Effects of Mesenchymal Stem Cells Feeder Layer, Culture Sera and Freeze-thaw Lysates on Expansion and Differentiation of Cord Blood CD34⁺ Cells in Vitro

ZHOU Dun-hua, HUANG Ke, WU Yan-feng, SHEN Ting, HUANG Shao-liang
(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of mesenchymal stem cells (MSC) feeder layer, culture sera and freeze-thaw lysates on expansion and differentiation of cord blood CD34⁺ cells in vitro. 【Methods】 MSC were isolated from human bone marrow and cultured until the third passage. Sera were obtained from the cultured MSC, and freeze-thaw lysates were obtained by repeated freeze-thaw procedures. Cord blood CD34⁺ cells were isolated by magnetic cell separation system, and were co-cultured with the MSC feeder layer, culture sera, freeze-thaw lysates and hematopoietic growth factors (HGFs), respectively. The nucleated cells, CD34⁺ cells, CD34⁺CD38⁻ cells, CD41⁺ cells and CD3⁺ cells in the above culture system were detected by flow cytometry on day 6 and day 12. 【Results】 ①MSC feeder layer had a strong effect on nucleated cells, CD34⁺、CD34⁺CD38⁻ cells expansion. The MSC sera and freeze-thaw lysates had similar effect on cell expansion, but the effect was weaker than that of feeder layer ($P < 0.05$). ②Both MSC sera and feeder layer inhibited cord blood CD34⁺ cells differentiation toward CD3⁺ cells or CD19⁺ cells, and no significant differences were found between these two groups ($P > 0.05$). ③Both MSC sera and feeder layer promoted cord blood CD34⁺ cells differentiation toward CD41⁺ cells, and the effect was stronger in the feeder layer than that of the sera ($P < 0.05$). ④Freeze-thaw lysates had no effect on cell expansion and differentiation, and were similar with that of HGFs ($P > 0.05$). 【Conclusions】 The MSC sera have positive effects on expansion of cord blood CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, moreover they have the ability of promoting cord blood CD34⁺ cells differentiation toward CD41⁺ cells.

Key words: mesenchymal stem cells, MSC culture sera, MSC freeze-thaw lysates, CD34⁺ cells of cord blood

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):39-44]

收稿日期: 2009-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(30872786); 广东省科技计划引导项目(2008B030301305)

作者简介: 周敦华, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 小儿血液病, E-mail: zdunhua@yahoo.com.cn.

近年的研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)不但可加速造血重建,还可抑制 T 细胞的增殖,减少移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)的发生^[1-3]。脐血移植后造血和免疫恢复明显延迟,导致移植相关死亡率高。因此, MSC 与脐血造血干细胞共移植可能是解决脐血移植后造血、免疫重建延迟有效方法之一。目前 MSC 的联合移植,均采用活细胞输注的方法,由于异体细胞输注的伦理问题及是否存在致瘤性的问题,给 MSC 临床应用带来极大的不方便。本实验试图通过含 MSC 滋养层、MSC 培养上清及 MSC 裂解产物的不同扩增体系对人脐血 CD34⁺ 细胞的扩增和分化作用的比较,探讨 MSC 及其相关产物对脐血 CD34⁺ 细胞增殖及分化的影响,从而进一步阐明 MSC 加速造血重建和减少 GVHD 发生的机制并为 MSC 及其制品更方便应用于临床提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

脐血来自本院及广州市妇婴医院健康足月妊娠分娩之胎儿脐静脉血,用含枸橼酸钠的一次性采血袋收集,采血量为 80 ~ 100 mL,共 8 份。骨髓:来源于健康供者髂后上棘,共 5 份,每份 5 ~ 10 mL,其中,男 2 例,女 3 例,年龄 16 ~ 30 岁。

1.2 CD34⁺ 细胞的分选

采用免疫磁珠分选法,分选后流式细胞仪检测所得 CD34⁺ 细胞的纯度。本实验 8 份脐血单个核细胞分选所获 CD34⁺ 细胞的纯度为(98.27 ± 0.65)%,回收率近 75%,富集倍数近 100 倍。

1.3 骨髓间充质干细胞的培养

按常规分离方法分离骨髓单个核细胞(MNC),按照 MNC 2 × 10⁶/mL 密度接种于 25 cm² 的塑料培养瓶,加入含 L-DMEM 的完全培养基,置于 37 °C,体积分数 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中,3 ~ 5 d 后全量换液,去除非贴壁细胞,以后每 3 d 换液 1 次。

1.4 MSC 培养上清的收集

在第三代 MSC 融合至 80% ~ 90% 时,收集培养上清,-20 °C 冰箱保存备用。

1.5 MSC 滋养层的建立

取 P2 ~ P4 代的骨髓 MSC 悬液 1 mL,加入

24 孔培养板中,细胞密度为 1 × 10⁴/mL, MSC 铺满孔底时予丝裂霉素 C 处理液 2 h 30 min, PBS 洗涤 3 次,加入 L-DMEM 完全培养液过夜,第 2 天吸出 L-DMEM,接种人脐血 CD34⁺ 细胞,采用 IMDM 培养基联合造血细胞因子扩增体系。

1.6 MSC 的融冻产物

第三代 MSC,细胞密度为 1 × 10⁷/mL,反复冻存、解冻 3 次获得。

1.7 脐血 CD34⁺ 细胞的扩增培养

按每孔终体积为 1 mL,含 2 × 10⁴ 个 CD34⁺ 细胞的不同培养体系接种于 24 孔板,每组每孔复种 6 孔。各组细胞因子的组成和浓度一致,组合为:IL-6 + SCF + TPO,终浓度分别为:IL-6 20 ng/mL, SCF 50 ng/mL, TPO 20 ng/mL。建立:MSC 滋养层、不同浓度 MSC 培养上清、MSC 融冻产物培养体系,并设立单纯细胞因子对照体系。将上述扩增体系置 37 °C 饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 半量换液 1 次。MSC 滋养层细胞为 P2-4 代, MSC 培养上清组采用收集的 MSC 培养上清原液。

1.8 扩增后的细胞收集及检测

收获不含 MSC 滋养层支持的细胞,即将所有悬浮细胞吸出。收获含 MSC 滋养层的细胞时先将孔中的非贴壁细胞吸出后,用 0.25% 的胰酶消化 3 min,使之脱壁并吹打成单个核细胞悬液,IMDM 完全培养基洗涤后,悬浮于 L-DMEM 完全培养基,并置于 25 cm² 的培养瓶中,37 °C 饱和湿度,CO₂ 培养箱中培养 1 h,收获上层的非贴壁细胞,此作为粘附在贴壁细胞层中的非贴壁细胞,与同体系中的非贴壁细胞混合,即为扩增后的细胞。于扩增前,扩增培养第 6 天和第 12 天分别收获细胞,计算细胞总数和流式分析 CD34⁺、CD34⁺ CD38⁻、CD3⁺、CD19⁺、CD41⁺ 含量变化。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 13.0 版本软件包,实验数据以均数 ± 标准差表示,进行多组间的 one-way ANOVA Test,检验水准为 α = 0.05。

2 结果

2.1 不同扩增体系对脐血有核细胞扩增倍数的影响

MSC 滋养层组对脐血有核细胞的扩增能力最

强,明显高于其它四组,而 MSC 培养上清组的扩增能力又明显强于其它 3 组。MSC 融冻产物组和对照组之间无统计学差异,结果见表 1。

2.2 不同扩增体系对 CD34⁺ 细胞含量及倍数的扩增

纯化的脐血 CD34⁺ 细胞 (98.27 ± 0.65)%, 经体外扩增后 CD34⁺ 细胞含量明显下降, 随扩增时间延长, 下降幅度明显增大, MSC 滋养层组的第 6、12 天的 CD34⁺ 细胞含量明显高于其它 3 组, 其对 CD34⁺ 细胞的扩增倍数也明显高于其它 3 组。而 MSC 培养上清组第 6、12 天的 CD34⁺ 细胞含量及 CD34⁺ 细胞的扩增倍数明显高于融冻产物组和对照组。MSC 融冻产物组和对照组之间无统计学

表 1 不同扩增体系对脐血有核细胞(NC)的扩增倍数
Table 1 Expansion multiples of umbilical cord blood nuclear cells in different culture systems ($\bar{x} \pm s$)

Group	Day of expansion	
	d 6	d12
Controlling group	11.6 ± 1.9	13.6 ± 3.9
Feeder layer group	21.6 ± 3.0 ¹⁾	22.8 ± 3.5 ¹⁾
Culture sera group	17.1 ± 3.1 ¹⁾²⁾	18.2 ± 2.6 ¹⁾²⁾
Freeze-thaw lysates group	11.0 ± 1.4	12.4 ± 1.3
<i>F</i>	12.6	14.2
<i>P</i>	0.02	0.03

1) VS all groups, $P < 0.05$; 2) VS MSC feeder layer group, $P < 0.05$

差异,结果见表 2。

表 2 不同扩增体系中 CD34⁺ 含量 (%) 和 CD34⁺ 扩增倍数

Table 2 Percentage and expansion multiples of umbilical cord blood CD34⁺ cells in different culture systems ($\bar{x} \pm s$)

Group	d6		d12	
	Percentage of CD34 ⁺	Multiples of CD34 ⁺	Percentage of CD34 ⁺	Multiples of CD34 ⁺
Controlling	9.8 ± 6.1	2.0 ± 0.3	5.8 ± 4.5	1.9 ± 0.6
Feeder layer	36.4 ± 25.7 ¹⁾	9.5 ± 3.0 ¹⁾	16.2 ± 9.7 ¹⁾	4.9 ± 2.5 ¹⁾
Culture sera	24.1 ± 13.3 ¹⁾²⁾	6.4 ± 1.8 ¹⁾²⁾	11.2 ± 5.2 ¹⁾²⁾	3.8 ± 2.0 ¹⁾²⁾
Freeze-thaw lysates	8.1 ± 4.7	2.2 ± 0.6	5.5 ± 2.6	1.8 ± 0.7
<i>F</i>	27.8	17.4	15.6	11.3
<i>P</i>	0.001	0.01	0.01	0.03

1) VS all groups, $P < 0.05$; 2) VS MSC feeder layer group, $P < 0.05$

2.3 不同扩增体系对 CD34⁺CD38⁻ 细胞含量及倍数的扩增

纯化脐血 CD34⁺ 细胞中 CD34⁺CD38⁻ 细胞含量为 (3.63 ± 2.16)%, 随扩增时间延长, 与对 CD34⁺ 扩增的结果不同, CD34⁺CD38⁻ 扩增的倍数增加的同时, CD34⁺CD38⁻ 细胞含量也有所增加, 四组扩增体系相比, MSC 滋养层组的第 6、12 天的

CD34⁺CD38⁻ 细胞含量明显高于其它 3 组, 其对 CD34⁺CD38⁻ 细胞的扩增倍数也明显高于其它 3 组。而 MSC 上清组第 6、12 天的 CD34⁺CD38⁻ 细胞含量及 CD34⁺CD38⁻ 细胞的扩增倍数明显高于融冻产物组和对照组。MSC 融冻产物组和对照组之间无统计学差异, 结果见表 3。

表 3 不同扩增体系中 CD34⁺CD38⁻ 含量 (%) 和 CD34⁺CD38⁻ 扩增倍数

Table 3 Percentage and expansion multiples of umbilical cord blood CD34⁺CD38⁻ cells in different culture systems ($\bar{x} \pm s$)

Group	d6		d12	
	Percentage of CD34 ⁺ CD38 ⁻	Multiples of CD34 ⁺ CD38 ⁻	Percentage of CD34 ⁺ CD38 ⁻	Multiples of CD34 ⁺ CD38 ⁻
Controlling group	4.3 ± 1.2	14.2 ± 4.0	1.9 ± 0.8	7.8 ± 3.4
Feeder layer group	9.8 ± 1.4 ¹⁾	47.2 ± 8.6 ¹⁾	6.5 ± 1.4 ¹⁾	44.6 ± 9.8 ¹⁾
Culture sera group	7.9 ± 2.4 ¹⁾²⁾	39.8 ± 14.8 ¹⁾²⁾	4.8 ± 2.0 ¹⁾²⁾	30.0 ± 12.4 ¹⁾²⁾
Freeze-thaw lysates group	5.4 ± 2.2	19.3 ± 7.7	2.3 ± 0.8	8.8 ± 3.3
<i>F</i>	8.6	18.4	12.6	48.2
<i>P</i>	0.04	0.01	0.02	0.001

1) VS all groups, $P < 0.05$; 2) VS MSC feeder layer group, $P < 0.05$

2.4 不同扩增体系对 CD3⁺和 CD19⁺细胞含量的影响

随着扩增时间的延长,所有体系中 CD3⁺和 CD19⁺细胞的比例均有所下降,四组扩增体系相比,MSC 滋养层组和 MSC 上清组在第 6、12 天的

CD3⁺和 CD19⁺细胞含量明显低于其它两组,且 MSC 滋养层组和 MSC 上清组之间差异无统计学意义。MSC 融冻产物和对照组之间差异无显著性,结果见表 4。

表 4 不同扩增体系中 CD3⁺和 CD19⁺细胞含量(占扩增后 NC 细胞的%)
Table 4 Percentages of CD3⁺ and CD19⁺ in different culture systems ($\bar{x} \pm s$)

Group	d6		d12	
	CD3 ⁺	CD19 ⁺	CD3 ⁺	CD19 ⁺
Controlling group	24.0 ± 14.0	2.5 ± 1.66	20.2 ± 14.5	2.3 ± 1.4
Feeder layer group	19.2 ± 12.9 ¹⁾	2.0 ± 1.6 ¹⁾	16.1 ± 9.1 ¹⁾	1.6 ± 0.9 ¹⁾
Culture sera group	20.8 ± 12.0 ¹⁾	2.0 ± 1.1 ¹⁾	15.5 ± 10.0 ¹⁾	1.4 ± 0.9 ¹⁾
Freeze-thaw lysates group	24.0 ± 12.1	2.2 ± 2.2	19.8 ± 7.1	2.9 ± 1.9
<i>F</i>	8.5	6.8	13.1	7.3
<i>P</i>	0.01	0.02	0.001	0.01

1) VS all groups, $P < 0.05$

表 5 不同扩增体系对脐血 CD41⁺细胞的扩增倍数
Table 5 Expansion multiples of umbilical cord blood CD41⁺ cells in different culture systems ($\bar{x} \pm s$)

Group	Day of expansion	
	d6	d12
Controlling group	6.1 ± 2.2	5.5 ± 3.5
Feeder layer group	10.2 ± 0.9 ¹⁾	8.4 ± 2.9 ¹⁾
Culture sera group	8.2 ± 2.4 ¹⁾²⁾	7.4 ± 2.6 ¹⁾²⁾
Freeze-thaw lysates group	5.6 ± 3.0	5.0 ± 3.1
<i>F</i>	9.2	8.4
<i>P</i>	0.01	0.01

1) VS all groups, $P < 0.05$; 2) VS MSC feeder layer group, $P < 0.05$

2.5 不同扩增体系对 CD41⁺细胞扩增的影响

MSC 滋养层组对脐血 CD41⁺细胞的扩增能力最强,明显高于其它 3 组,而 MSC 上清组的扩增能力又明显强于融冻产物组和对照组。MSC 融冻产物组和对照组之间无统计学差异,结果见表 5。

3 讨论

移植失败和造血恢复的延迟与放/化疗预处理导致骨髓造血微环境的严重破坏密切相关^[4]。造血干细胞主要定居于骨髓造血微环境中,健

全的骨髓造血微环境对 HSC 的植入及造血恢复有着极其重要的意义^[5]。骨髓 MSC 是骨髓基质细胞的前体细胞,具有分化成基质细胞的作用,同骨髓基质细胞一样具有促进 CD34⁺细胞增殖、分化的能力。体外的研究已经证实,含 MSC 联合细胞因子组合体系对造血干细胞的扩增作用最强^[6-8]。

根据 MSC 与骨髓造血微环境理论,国内外已经进行了人 MSC 与造血干细胞共移植的临床应用研究,近年来动物模型及临床研究发现,MSC 与造血干细胞联合移植可加速造血及免疫恢复,减少 GVHD^[9,1-3]。目前 MSC 的使用主要采取活细胞输注的方法,由于 MSC 活细胞输注是否有致瘤性及异基因 MSC 使用的伦理问题等,给临床应用带来很大的不方便。且到目前为止 MSC 如何促进造血恢复及抑制 GVHD 的机制尚未清楚。因此,寻求 MSC 的有效成份,例如 MSC 的上清、MSC 的多肽蛋白等,来替代活细胞的输入值得研究。

3.1 MSC 及其上清具有扩增脐血 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻细胞的作用

我们的研究发现,MSC 上清含有 MSC 所分泌的细胞因子,其中以 IL-6、SCF 和 FLT-3L 三种细胞因子的分泌水平较稳定。P1 代至 P3 代细胞因子的水平逐渐升高,至 P3 ~ P10 代水平接近,呈平台^[10]。但有关于 MSC 上清及 MSC 细胞成分、多

肽蛋白等对造血干细胞扩增的作用,目前罕见相关报道。由于 MSC 的多肽蛋白提取困难,本实验选用了第三代的 MSC 反复裂解后的产物代替 MSC 多肽蛋白以及第三代 MSC 上清联合 HGFs 短期体外扩增脐血 CD34⁺细胞,从而初步了解 MSC 不同成分对脐血 CD34⁺细胞的扩增及分化的影响。我们的结果显示,MSC 滋养层组对脐血有核细胞和对脐血 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻细胞的扩增能力最强,MSC 培养上清和 MSC 滋养层相比具有类似的作用,但其作用强度稍弱。MSC 融冻产物已完全丧失对脐血 CD34⁺细胞扩增和分化作用的影响。这表明,MSC 滋养层的培养体系具有在短时间内大量扩增早期造血祖细胞,并维持其不分化的能力,这与国内外文献报道一致^[11-13]。有意义的是,MSC 上清对 CD34⁺、CD34⁺CD38⁻细胞含量的维持及扩增作用明显高于对照组和 MSC 融冻产物组,提示 MSC 上清对早期的造血祖细胞的扩增有一定的作用,这可能与 MSC 上清中,含有多种造血生长因子有关。本实验采用的 MSC 上清为第 3 代 MSC 培养 3 d 所分泌的上清,未进行浓缩或稀释,不能全面反应 MSC 上清的作用,仅提示 MSC 分泌的造血生长因子对造血干/祖细胞的扩增有一定的作用。MSC 融冻产物组已丧失对 CD34⁺及 CD34⁺CD38⁻细胞的扩增作用,提示 MSC 破坏后,其细胞内成份对造血干/祖细胞不起扩增作用。MSC 滋养层的作用最强说明,MSC 支持造血干/祖细胞的扩增与其持续分泌多种造血生长因子及细胞与细胞间的直接接触,粘附分子直接作用于造血干/祖细胞有关。

3.2 MSC 及其上清对脐血 CD34⁺向 T、B 淋巴细胞分化的影响

近年研究证实,MSC 除具有支持造血,促进体内造血重建外,还对同种异体免疫反应具有调节作用。异基因移植的受者常因为异源性 T 细胞的大量存在而发生 GVHD。MSC 在体内外对 T 细胞增生有抑制作用,能减轻 GVHD 的发生和严重程度,在体内外均得到证实,MSC 目前已用于 GVHD 的治疗^[1-3]。但目前为止,MSC 抑制 GVHD 的作用机制仍未明确。目前大多数学者都认为,MSC 是通过分泌可溶性因子来抑制 T 细胞增生。MSC 细胞所分泌的可溶性因子存在于其培养上清,那么 MSC 上清是否同样具有抑制作用。本实验通过动态检测各培养体系的脐血 CD34⁺细胞扩增后的

CD3⁺(T 细胞)、CD19⁺(B 细胞)细胞的含量变化,发现 MSC 滋养层组和 MSC 上清组 CD3⁺、CD19⁺细胞含量均明显低于裂解产物组和对照组,且 MSC 滋养层组和 MSC 上清组之间无差异。这提示在抑制脐血 CD34⁺细胞向淋巴细胞的分化过程中,MSC 上清具有和 MSC 滋养层同样的作用,且作用能力一致。国外也有类似的报道,Tse 发现^[14],将 BM-MS-C 与外周血单个核细胞用半透明膜分隔后,仍然不能去除其对异体 T 细胞的抑制,可见 MSC 对 T 细胞的抑制作用有可能主要通过 MSC 分泌的可溶性细胞因子,而不需要通过细胞间的直接接触,提示直接使用 MSC 上清来预防或治疗 GVHD,值得进一步探讨。

3.3 MSC 及其上清对脐血 CD34⁺向巨核系分化的影响

移植后造血恢复的延迟明显增加移植相关死亡率,引起患者死亡的一个主要原因是巨核系恢复延迟所致的出血。因此,如何促进巨核细胞的植入,已成为移植领域的一个值得关注问题。其解决的有效途径之一就是利用造血祖细胞进行定向诱导分化、体外扩增巨核系祖细胞,再将扩增所得巨核细胞回输给患者,以最快的恢复血小板的数目和功能。在动物移植模型中已证实 MSC 和造血干细胞联合移植可以加速巨核系重建,促进血小板的恢复^[15]。本实验动态检测了不同扩增体系对脐血 CD34⁺细胞向 CD41⁺(巨核系)细胞分化,发现 MSC 滋养层组的效果最佳,但 MSC 培养上清对脐血 CD34⁺向巨核细胞的分化亦有促进作用,但作用较 MSC 滋养层组弱。说明 MSC 活细胞对促进脐血 CD34⁺向巨核系分化的作用最强,MSC 上清也有一定的作用,MSC 融冻产物对脐血 CD34⁺向巨核系的分化无影响,提示 MSC 分泌的细胞因子具有部分促进脐血 CD34⁺细胞向巨核系分化的功能。

总之,本研究发现 MSC 活细胞对脐血造血干/祖细胞、脐血有核细胞和脐血 CD41⁺细胞的扩增作用最强,但其对 T、B 系淋巴细胞的抑制作用与 MSC 上清相似,MSC 融冻产物不具有以上作用。提示在对脐血 CD34⁺向 T、B 淋巴细胞分化的抑制作用方面,MSC 上清有可能完全代替 MSC 活细胞的功能,但其在对脐血 CD34⁺的扩增和促进脐血 CD34⁺细胞向巨核系分化中仅可部分代替 MSC 的作用。这也进一步提示,MSC 的作用主要通

过其分泌细胞因子,但细胞与细胞间的直接作用也具有非常重要的意义。MSC 融冻裂解后的细胞成分不具有任何作用。鉴于 MSC 上清的保存和临床应用与 MSC 活细胞相比,更安全方便,值得深入研究。

参考文献:

- [1] Ball LM, Bernardo ME, Locatelli F, et al. Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2008, 42(Suppl 2):S60-66.
- [2] Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(6):1479-1482.
- [3] Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study [J]. *Lancet*, 2008, 371(9624):1553-1554.
- [4] del Cañizo MC, Lopez N, Vazquez L, et al. Hematopoietic damage prior to PBSCT and its influence on hematopoietic recovery [J]. *Haematologica*, 1999, 84(6):511-516.
- [5] Cui J, Wahl RL, Shen T, et al. Bone marrow cell trafficking following intravenous administration [J]. *Br J Haematol*, 1999, 107(4):895-902.
- [6] Huang GP, Pan ZJ, Jia BB, et al. Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood [J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(6):579-585.
- [7] Bakhshi T, Zabriskie RC, Bodie S, et al. Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture [J]. *Transfusion*, 2008, 48(12):2638-2644.
- [8] Isaikina Y, Shman T. Influence of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of children with oncohematological diseases on proliferation and self-renewal of hematopoietic progenitor cells in vitro [J]. *Exp Oncol*, 2008, 30(2):121-128.
- [9] Tian Y, Deng YB, Huang YJ, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation [J]. *Immunol Invest*, 2008, 37(1):29-42.
- [10] 周敦华,魏菁,黄绍良,等.人脐血来源 MSC 的主要生物学特性的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(8):1606-1609.
- [11] Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, et al. Homing of in vitro expanded Stro-1 - or Stro-1 + human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment [J]. *Blood*, 2004, 103(9):3313-3319.
- [12] 马俐君,高磊,周虹,等.人骨髓间充质干细胞体外支持脐血 CD34⁺细胞增殖的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(5):949-954.
- [13] Fujimoto N, Fujita S, Tsuji T, et al. Microencapsulated feeder cells as a source of soluble factors for expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(32):4795-4805.
- [14] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. *Transplantation*, 2003, 75(3):389-397.
- [15] Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(5):413-420.

(编辑 张恩健)

(上接第 22 页 from page 22)

医鉴定中心、贵州省人口和计划生育司法鉴定所、国家人口计生委科学技术研究所司法鉴定所、海南省血液中心、河南省人口和计划生育科研院司法鉴定所、河南省郑州市公安局刑侦支队刑科所、河南新乡医学院法医学系、华东政法大学司法鉴定所、江西科正医学基因学司法鉴定中心、南昌大学医学院司法鉴定所、南京医科大学法医系法医鉴定中心、江苏南通大学附属医院司法鉴定所、浙江省衢州市公安局刑科所、山东省医学科学院基础医学研究所司法鉴定所、上海市公安局物证鉴定中心、四川大学华西基础医学与法医学院物证教研室、江苏省苏州市立医院司法鉴定所、香港政府化验所、澳门司法警察局刑事技术厅、浙江大学医学院附属妇产科医院浙江大学司法鉴定中心、浙江省金华市公安局刑科所、郑州大学司法鉴定中心、重庆法正司法鉴定所、重庆市人口和计划生育科学技术研究院司法鉴定所、广东省珠海市妇幼保健院遗传研究所司法鉴定所。