

含脐血 MSCs 体系扩增后的脐血重建 NOD/SCID 小鼠造血的研究

周敦华, 张绪超, 黄绍良, 方建培, 吴燕峰, 魏菁, 包蓉, 黄科, 黎阳

(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨含人脐血(umbilical cord blood, UCB)来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)联合造血生长因子(hematopoietic growth factors, HGFs)体系扩增后的脐血造血细胞在 NOD/SCID 小鼠体内植入及重建小鼠造血的能力。【方法】①用含女性胎儿脐血 MSCs(UCBMSCs)及 HGFs 组合的无血清扩增体系体外扩增男性新生儿 UCB CD34⁺细胞。②收获扩增第 6 天的 UCB 细胞,经尾静脉移植给亚致死量照射后的雌性 NOD/SCID 小鼠。③动态观察移植后小鼠生存情况及外周血象的恢复。④移植后 8 周,流式细胞仪检测存活小鼠骨髓中人 CD45⁺、CD45⁺CD33⁺、CD45⁺CD41⁺、CD45⁺CD3⁺和 CD45⁺CD19⁺细胞含量;PCR 法检测移植小鼠外周血中人 Y 染色体表达。【结果】①非扩增组小鼠存活率为 60%,扩增组存活率为 90%。②动态观察发现:扩增组白细胞和血红蛋白于移植后第 20 天恢复,PLT 于移植后第 40 天恢复,明显短于非扩增组。③移植后 8 周,两组小鼠外周血中人 Y 染色体检测均为阳性,扩增组和非扩增组小鼠骨髓中人 CD45⁺细胞的含量分别为 18.5%±8.3%和 16.5%±5.7%,差异无统计学意义($P>0.05$)。④移植后 8 周,扩增组小鼠体内 CD45⁺CD33⁺和 CD45⁺CD41a⁺细胞的百分率均高于非扩增组,但 CD45⁺CD3⁺、CD45⁺CD19⁺细胞百分比均低于非扩增组。【结论】①含人 UCBMSCs 体系扩增后的 UCB 细胞具有 NOD/SCID 小鼠体内植入并重建小鼠造血的能力,但不具有提高小鼠体内植入率的作用。②扩增后的 UCB 移植可显著促进移植后小鼠造血恢复,提高小鼠存活率。③扩增后的 UCB 移植主要促进小鼠髓系及巨核系的植入,但对淋巴系的植入有抑制作用。

关键词:间充质干细胞;植入;造血重建;NOD/SCID 小鼠

中图分类号:R329.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)06-0639-05

NOD/SCID Mice Hematopoietic Repopulating Ability of *ex vivo* Expanded Umbilical Cord Hematopoietic Blood Cells which Co-cultured with MSCs from Human Umbilical Cord Blood

ZHOU Dun-hua, ZHANG Xu-chao, HUANG Shao-liang, FANG Jian-pei, WU Yan-feng,

WEI Jing, HUANG Ke, LI Yang

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To evaluate the engraftment and hematopoietic reconstruction ability of *ex vivo* expanded umbilical cord blood (UCB) hematopoietic cells which co-cultured with MSCs from human umbilical cord blood combined with hematopoietic growth factors (HGFs) in NOD/SCID mice. 【Methods】(1) Human male UCB CD34⁺ cells were incubated in the system with contains female UCBMSCs, HGFs and serum free medium. (2) The expanded UCB hematopoietic cells on the 6th day were infused into sublethally irradiated (250 cGy) NOD/SCID mice through lateral tail vein injection. (3) Existence state and hematopoietic recover of transplanted mice were detected dynamically. (4) On the 8th week after transplantation, human derived CD45⁺, CD45⁺CD33⁺, CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD19⁺, CD45⁺CD33⁺ cells in the BM of mice were detected by flow cytometry assay and human Y chromosome was detected in the peripheral blood by PCR method. 【Results】(1) The survival rate of un-expanded group and expanded group were 60% vs 90%. (2) The expanded group had rapid recovery in WBC, hemoglobin, and platelet. (3) Eight weeks after

收稿日期:2005-06-07

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(00137);广东省卫生厅基金资助项目(E200040)

作者简介:周敦华(1967-),女,安徽寿县人,博士,副教授,硕士生导师.E-mail:zdunhua@yahoo.com.cn

transplantation, human Y chromosomes were all positive in transplanted mice, and there was no significant difference ($P > 0.05$) between control and test groups in the percent of human CD45⁺ cells in mice BM. (4) Eight weeks after transplantation, the CD45⁺CD33⁺ cells and CD45⁺CD41a⁺ cells were significantly higher in expanded group than that in unexpanded group, and CD45⁺CD3⁺ cells and CD45⁺CD19⁺ cells were significantly lower in expanded group. [Conclusion](1) Expanded UCB hematopoietic cells can reconstitute the hematopoiesis in irradiated NOD-SCID mice, but it can not increase engraftment rate. (2) Expanded UCB hematopoietic cells can enhance the recovery of hematopoiesis reconstitution and improved the longevity of transplanted mice. (3) Expanded UCB transplantation mainly enhanced the engraftment of granulocytes and megacaryocyte, but it can inhibit the engraftment of lymphocyte.

Key words: mesenchymal stem cells; engraftment; hematopoietic reconstitution; NOD/SCID mice

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(6):639-643, 691]

目前的研究证实含基质支持的培养体系对造血干/祖细胞 (hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC) 的扩增效果优于无基质支持体系。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是基质细胞的祖细胞, 已有成人骨髓和胎儿骨髓 (bone marrow, BM) MSCs 支持体系体外扩增 HSPC 的报道。脐血 (umbilical cord blood, UCB) MSCs 与 BMMSCs 的生物学特性及其相似^[1,2], 但含人 UCB MSCs 体系扩增后的人 UCB 造血细胞是否仍具有造血植入能力及其移植效果如何, 国内外罕见报道。本实验旨在探讨含 UCB MSCs 体系扩增后的人 UCB 细胞在 NOD/SCID 小鼠体内植入及其重建小鼠造血的能力。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

重组人造血细胞生长因子 (英国 Peprotech EC 公司): 干细胞生长因子 (SCF)、酪氨酸激酶-3 配体 (FLT-3L)、血小板生长因子 (TPO)、白细胞介素 3 (IL-3)、白细胞介素 6 (IL-6), 无血清培养基 QBSF60 (美国 Quality Biological 公司), 单克隆抗体 (美国 Pharmingen 公司): Anti-CD34-FITC、Anti-CD41a-PE、Anti-CD45-FITC、Anti-CD3-PE、Anti-CD19-PE、Anti-CD33-PE、小鼠 IgG1-FITC、小鼠 IgG1-PE, 丝裂霉素 C (美国 Sigma 公司), CD34⁺ MidiMACS 细胞磁珠分离系统 (MACS, 德国 Miltenyi Biotech 公司), QIAampDNA 抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司产品), 人 Y 染色体检测试剂盒 (美国生命技术公司合成)。

1.2 方 法

1.2.1 人脐血 CD34⁺ 细胞的纯化 新鲜脐血取自本院健康足月男性新生儿, 共 5 份, 采用 MidiMACS 细胞磁珠分离装置, 用 CD34⁺ 细胞选择试剂盒, 按

说明操作, 分离、纯化 CD34⁺ 细胞。

1.2.2 人 UCB CD34⁺ 细胞的扩增 按本实验室方法^[1]分离、纯化人 UCB MSCs, 取 P2~P4 代的女性胎儿 UCB MSC 接种于 25 cm² 的培养瓶, 融合 80%~90% 时, 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, 第二天吸出 L-DMEM, 接种人 UCB CD34⁺ 细胞, 1×10⁵ 个/瓶。采用无血清 (QBSF60) 联合 HGFs 培养体系, HGFs 组合为: IL-3 + IL-6 + SCF + TPO + FLT-3L。终浓度分别为: IL-3 20 ng/mL, IL-6 20 ng/mL, SCF 50 ng/mL, TPO 20 ng/mL, FLT-3L 50 ng/mL。培养体系中含 L-谷氨酰胺 (L-Glu) (终浓度为 2 mmol/L) 和 α-巯基乙醇 (α-ME) (终浓度 5×10⁻⁵ mmol/L)。3 d 半量换液, 将取出的细胞悬液接种于铺有丝裂霉素处理后的脐血 MSC 的 25 cm² 培养瓶, 各补充含 2 倍细胞因子的 QBSF60, 6 d 时收获细胞。每 1×10⁵ 个 CD34⁺ 细胞来源的扩增后细胞冻存 1 管, -70℃ 保存备用。

1.2.3 人 UCB-NOD/SCID 小鼠移植模型的建立 雌性 NOD/SCID 小鼠 32 只, 照射前 2 周移入中山大学肿瘤研究所 SPF 级无菌层流室内, 高压灭菌的饮水中加入庆大霉素 (40 万 U/L) 和二性霉素 B (50 mg/L)。移植前接受 2.5 Gy 的 ⁶⁰Co 照射, 剂量率为 0.2 Gy/min。小鼠照射后在 24 h 内由尾静脉分别输注 1×10⁵ 个/只扩增前或由 1×10⁵ 个 CD34⁺ 细胞扩增 6 d 的全部细胞。照射对照组输注 0.3 mL 的 QBSF60。

1.2.4 实验分组 ①非扩增脐血 CD34⁺ 细胞移植组 (QBSF60 0.3 mL 含非扩增脐血 CD34⁺ 细胞 1×10⁵ 个/只) 10 只。②扩增后脐血细胞移植组 (QBSF60 0.3 mL 含 1×10⁵ 个新鲜脐血 CD34⁺ 细胞扩增 6 d 后的全部有核细胞/只) 10 只。③对照组: 正常对照组 (不照射, 予 QBSF60 0.3 mL/只) 6 只。照射对照组 (照射+QBSF60 0.3 mL/只) 6 只。

1.2.5 小鼠存活状况观察 每日观察小鼠活动力、外表、饮食、大便及体重等,记录每组死亡情况。

1.2.6 人脐血造血细胞植入水平的检测 于移植后 10、20、30、40 d 分别断尾,微量吸管采取肝素抗凝外周血约 0.2 mL,第 56 天眼球摘除法留取外周血,用血细胞计数仪,了解小鼠外周血象中白细胞、血红蛋白和血小板恢复情况。于移植后第 8 周,取出双侧股骨和胫骨髓,流式分析小鼠骨髓中人 CD45⁺、CD45⁺CD34⁺、CD45⁺CD3⁺、CD45⁺CD19⁺和 CD45⁺CD33⁺的含量。

1.2.7 人脐血造血细胞植入证据的检测 采用 QIAampDNA 试剂盒,按操作说明提取移植小鼠外周血 DNA,PCR 法检测移植后小鼠体内人 Y 染色体表达。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软

件包作单因素 ANOVA 及植入率的 *t* 检验,检验水准, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 人 UCB MSC 体系对人 UCBCD34⁺细胞的扩增作用

1.0×10⁵ 个脐血 CD34⁺细胞在该扩增体系扩增 6 d 后的细胞数为(46±27)×10⁵,CD34⁺细胞为(17±9)×10⁵。

2.2 移植小鼠一般观察和存活率的比较

小鼠经射线照射后 12 h 出现被毛凌乱、蓬松,次日出现消瘦、弓背、反应迟钝,少动拒食。约 7~10 d 后,体质量开始恢复,毛发变柔顺,活动增加,反应灵敏,进食及饮水量增加。非扩增组 6 只存活至 8 周,存活率为 60%,扩增组 9 只存活至 8 周,存活

表 1 移植后 10、20、30、40 和 56 d 小鼠外周白细胞的恢复

Table 1 The recovery of white blood cell in peripheral blood of transplanted mice on d10, d20, d30, d40, and d56 (×10⁹/L)

| Group | n | d10 | d20 | d30 | d40 | d56 |
|-------------|---|-------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Un-expanded | 6 | 1.34±0.41 ¹⁾ | 2.13±0.36 ¹⁾ | 5.46±1.96 | 6.24±2.23 | 5.98±2.43 |
| Expanded | 9 | 1.20±0.36 ¹⁾ | 5.36±1.25 | 5.76±2.18 | 5.68±2.32 | 5.36±2.47 |
| Control | 6 | 5.36±2.38 | 6.02±2.09 | 5.98±1.96 | 6.56±2.19 | 6.46±2.38 |
| F | | 4.01 | 4.92 | 1.35 | 1.68 | 1.59 |
| P | | 0.042 | 0.031 | 0.074 | 0.066 | 0.068 |

Compared with control group 1) P< 0.01

表 2 移植后 10、20、30、40 和 56 d 小鼠外周血红蛋白的恢复

Table 2 The recovery of hemoglobin in peripheral blood of transplanted mice on d10, d20, d30, d40, and d56 (g/L)

| Group | n | d10 | d 20 | d30 | d40 | d56 |
|-------------|---|---------------------|---------------------|--------|--------|--------|
| Un-expanded | 6 | 74±13 ¹⁾ | 81±15 ¹⁾ | 138±23 | 143±20 | 141±21 |
| Expanded | 9 | 89±20 ¹⁾ | 138±28 | 143±18 | 141±12 | 139±13 |
| Control | 6 | 138±11 | 142±13 | 135±13 | 136±16 | 134±17 |
| F | | 4.61 | 4.35 | 2.03 | 1.97 | 1.89 |
| P | | 0.038 | 0.040 | 0.061 | 0.064 | 0.065 |

Compared with control group 1) P< 0.01

表 3 移植后 10、20、30、40 和 56 d 小鼠外周血小板的恢复

Table 3 The recovery of platelet in peripheral blood of transplanted mice on d10, d20, d30, d40, and d56 (×10⁹/L)

| Group | n | d10 | d20 | d30 | d40 | d56 |
|-------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Un-expanded | 6 | 116±29 ²⁾ | 123±24 ²⁾ | 274±34 ²⁾ | 314±29 ¹⁾ | 434±39 |
| Expanded | 9 | 128±19 ²⁾ | 187±49 ²⁾ | 389±32 ¹⁾ | 498±25 | 502±22 |
| Control | 6 | 488±43 | 503±67 | 463±39 | 512±38 | 467±23 |
| F | | 4.82 | 5.73 | 4.05 | 3.89 | 2.35 |
| P | | 0.033 | 0.021 | 0.042 | 0.043 | 0.058 |

Compared with control group 1) P< (0.05,2) P< 0.01

率为 90%。

2.3 扩增后 UCB 移植对小鼠外周血像恢复的影响

扩增组血象恢复最快,于移植后 d20 白细胞和血红蛋白基本恢复正常($P < 0.01$);非扩增组于移植后 d30 恢复正常。两组血小板的恢复均较血红蛋白和白细胞恢复延迟,但扩增组恢复明显短于非扩增组,分别于移植后 d40 和 d56 恢复正常($P < 0.01$)(表 1~3)。

2.4 扩增后脐血细胞移植对小鼠各系植入的影响

移植后第 8 周,非扩增组存活的 6 只小鼠和扩增组存活的 9 只小鼠,骨髓中均检测到人 CD45⁺、

CD45⁺CD34⁺、CD45⁺CD19⁺、CD45⁺CD3⁺、CD45⁺CD33⁺和 CD45⁺CD41a⁺抗原的表达。照射对照组小鼠和正常对照组外周血 CD45⁺细胞均为阴性。扩增组 CD45⁺细胞含量稍高于非扩增组,分别为 18%±8%和 17%±6%,但两组差异无显著性($P > 0.05$)。扩增组小鼠体内 CD45⁺CD33⁺和 CD45⁺CD41a⁺细胞的百分率均高于非扩增组(P 均小于 0.01),但 CD45⁺CD3⁺、CD45⁺CD19⁺细胞百分比均低于非扩增组(P 均小于 0.01)(表 4)。CD45⁺CD34⁺在扩增组和非扩增组小鼠体内的含量分别为 0.47±0.34 和 0.82±0.36 ($P < 0.01$)。

表 4 移植 8 周小鼠各组植入率和各系植入的比较

Table 4 Comparison of the engraftment rate of myo-lineage hematopoietic stem cells in the BM of mice after transplanted for 8 weeks(%)

| Group | n | CD45 ⁺ | CD45+CD34 ⁺ | CD45+CD19 ⁺ | CD45+CD3 ⁺ | CD45+CD33 ⁺ | CD45+CD41a ⁺ |
|-------------|---|-------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Un-expanded | 6 | 16.5±5.7 | 0.8±0.3 | 4.3±2.1 | 2.4±1.5 | 7.8±4.2 | 0.7±0.3 |
| Expanded | 9 | 18.5±8.3 | 0.5±0.3 ¹⁾ | 2.3±1.3 ¹⁾ | 0.6±0.3 ¹⁾ | 13.8±5.3 ¹⁾ | 2.4±1.2 ¹⁾ |
| t | | 0.524 | 2.590 | 2.451 | 4.031 | 2.298 | 3.061 |

Compared with un-expanded group 1) $P < 0.01$

2.5 植入证据检测

8 周时照射对照组存活的 2 只小鼠和 6 只正常对照组小鼠外周血均不表达人 Y 染色体,扩增组和非扩增组存活的小鼠外周血 Y 染色体均为阳性(图 1)。



图 1 脐血移植后小鼠体内人 Y 染色体表达情况

Fig1 Human Y chromosome expression in mice after transplantation of umbilical cord hematopoietic cells

Lane M: marker; Lane 1: negative control group; Lane 6: represent positive control group; Lanes 2 and 3: normal and control group; Lanes 4 and 5: expanded and un-expanded group

3 讨论

扩增后的造血细胞在 NOD/SCID 体内植入能力的检测是目前评价干细胞质量的最佳方法。将人类造血细胞输注给 NOD/SCID 小鼠后能产生各系造血重建,这种能在小鼠体内重建造血的细胞称为 SCID 小鼠体内造血重建细胞(SCID-repopulating cells, SRCs),检测 SRC 有助于对造血细胞体内植入能力的客观评价。目前对扩增后的造血细胞是否具有体内植入能力仍有争议,大多数的学者认为扩增后的脐血造血细胞仍具有体内植入的能力,但扩增后细胞中 SRC 含量有所下降,但与总扩增倍数相比, SRC 的绝对值仍得到一定程度的扩增。亦有学者认为扩增后脐血细胞的体内植入能力随扩增天数的增加逐渐消失,甚至有学者报道扩增 9 d 以上的脐血细胞完全丧失体内的植入能力。

3.1 含人 UCBMSC 体系对人 CD34⁺细胞植入能力和造血重建的影响

2001 年 Yamaguchi 等^[3]报道成人骨髓基质细胞联合 SCF、TPO 和 FLT-3L 在无血清体系中,2 至 4 周分别扩增脐血 CD34⁺细胞 CFC 达 100~1 000 倍,扩增 CAFC 达 18~60 倍,SCR 分析发现扩增后

的细胞显著促进NOD/SCID小鼠的造血重建,效果优于与无基质组。Kasadasi等^[4]报道含成人骨髓基质细胞联合SCF、TPO、FLT-3L、IL-6的含血清培养体系,10周时最高扩增CD34⁺、CD34⁺CD38⁻细胞达4 066和117 235倍,而无基质组最高分别扩增1 197和30 937倍,且扩增后的细胞具有NOD/SCID小鼠体内造血重建功能,他们认为含基质体系对原始HSPC的扩增具有重要的意义。Xu等^[5]报道,SCF、IL-6、MGDF和FLT-3L单纯因子体系扩增脐血CD34⁺细胞,12 d后CD34⁺细胞、CD34⁺CD38⁻细胞和CFC均得到相当倍数的扩增,但扩增后细胞在NOD/SCID小鼠体内植入能力明显降低。Bhatia等^[6]报道,SCF、FLT-3L、G-CSF、IL-3、IL-6单纯因子体系扩增脐血CD34⁺CD38⁻细胞,4 d时CD34⁺CD38⁻和CFC分别扩增2和4倍,SRC扩增2~4倍;9 d时CD34⁺CD38⁻和CFC分别扩增4和10倍,但SRC耗竭。以上的资料提示,含基质细胞体系在SRC的扩增和支持上起着重要作用,这可能与基质细胞分泌多种HGFs对HSC的调控及细胞和细胞之间的相互作用有关。

本实验两组小鼠移植8周时,存活小鼠外周血人Y染色体的检测结果表明,人脐血造血细胞均在两组小鼠体内植入。进一步研究发现,8周时两组的植入率(小鼠骨髓中人CD45⁺细胞的含量)无差异,扩增组和非扩增组小鼠骨髓中CD45⁺细胞的含量分别为18.5%±8.3%和16.5%±5.7%,表明扩增后的脐血细胞同样具有体内重建造血的能力,但非扩增组的每只小鼠移植CD34⁺细胞为1×10⁵,而扩增后组每只小鼠移植CD34⁺细胞为(17.5±8.5)×10⁵,表明扩增后的细胞在剂量增加10余倍的情况下并不能增加植入率,提示扩增后HSPC的质量有所下降,但不会导致SRC的明显减少或耗竭。

动态检测移植小鼠外周血象表明,扩增组小鼠的三系造血恢复均明显提前,WBC和Hb于移植后20 d基本恢复正常而非扩增组于移植后30 d才恢复正常。两组PLT的恢复均较Hb和WBC恢复延迟,但扩增组于移植后40 d恢复正常,明显短于非扩增组(于移植后56 d恢复正常)。说明含脐血MSC扩增体系扩增6 d后的脐血细胞含有大量的定向HPC,这些细胞进入体内后,增殖分化为各系终末细胞的周期短,具有快速恢复各系造血的功能,这在临床上具有非常重要的实际意义。本实验对两组小鼠存活率的观察发现扩增组小鼠+8周存

活率为90%,而非扩增组的存活率为60%,说明扩增后的脐血移植明显提高了小鼠的存活率。因此,从促进造血恢复和降低移植相关死亡率的角度出发,扩增后的脐血移植值得继续探讨。

3.2 扩增对脐血CD34⁺细胞长期植入的影响

虽然不少学者认为扩增后的造血细胞具有体内植入的能力,但近年亦有不少学者认为短期体外扩增部分丧失HSC的长期植入能力,长期扩增将全部丧失HSC的长期植入能力。McNiece等^[7]报道,脐血CD34⁺细胞在含SCF、MGDF和G-CSF的无基质培养体系中分别扩增7 d和14 d,将不同扩增时间的脐血细胞移植给60 d的胎羊,发现扩增14 d的脐血细胞与扩增7 d和未扩增细胞相比,明显加速了早期植入。但移植后16个月的长期植入检测表明,扩增14 d的脐血细胞不具有长期植入能力,而扩增7 d和未扩增的脐血细胞具有良好的长期植入能力。对CD34⁺细胞再植能力检测发现,扩增14 d的脐血细胞不具有再植能力,扩增7 d的细胞的再植能力亦明显降低。本研究发现扩增组小鼠移植后8周时,体内CD45⁺CD34⁺细胞的比例明显低于非扩增组,是否提示扩增后脐血的长期植入能力减低呢?本实验未进行追踪观察,但这是一个值得关注的问题。

3.3 扩增对脐血CD34⁺细胞在受鼠体内定向分化能力的影响

本实验对移植后8周小鼠骨髓中人源性各系造血细胞检测发现,扩增组小鼠体内CD45⁺CD33⁺和CD45⁺CD41a⁺细胞的百分率均高于非扩增组,但其CD45⁺CD3⁺、CD45⁺CD19⁺细胞百分比均低于非扩增组。Cheng等^[8]采用含成人骨髓MSC体系扩增人CD34⁺细胞,7~14 d时CD41⁺细胞和CFU-MK显著扩增,他们认为两方面因素表明含MSCs体系扩增巨核祖细胞:①在原代培养骨髓MSCs时,黏附的造血集落中含大量CD41⁺的巨核细胞;②MSCs表达TPO mRNA,该因子是巨核系增殖发育的重要因子。此外,他们推测含MSCs体系中可能含有CD34⁺细胞向巨核系分化的关键性的因子或刺激信号。我们的动物体内实验与他们的体外扩增的结果一致,说明体外扩增的髓系和巨核系HPC有利于体内快速植入并重建受体造血。而含脐血MSCs扩增体系对淋巴系祖细胞增殖的抑制作用导致扩增后脐血移植小鼠体内淋巴系造血重建的延迟,可能会减轻

(下转第691页 to page 691)

- Hum Reprod, 2004, 19(3): 490 - 503.
- [2] Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, *et al.* Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study[J]. Fertil Steril, 2004, 81(3):567-71.
- [3] Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, *et al.* Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation[J]. Fertil Steril, 2002, 78(2):221-33.
- [4] Gaglione R, Valentini AL, Pistilli E, *et al.* A comparison of hysteroscopy and hysterosalpingography [J]. Int J Gynaecol Obstet, 1996, 52(2):151-3.
- [5] Wang CW, Lee CL, Lai YM, *et al.* Comparison of hysterosalpingography and hysteroscopy in female infertility[J]. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 1996, 3(4): 581-4.
- [6] Ragni C, Diaferia D, Vegetti W, *et al.* Effectiveness of sonohysterography in infertile patient work-up: a comparison with transvaginal ultrasonography and hysteroscopy[J]. Gynecol Obstet Invest, 2005, 59(4): 184-8.
- [7] Balmaceda JP, Ciuffardi I. Hysteroscopy and assisted reproductive technology [J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 1995, 22(3):507-18.
- [8] Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, *et al.* Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK[J]. BJOG. 2005, 112(6):773-80.
- [9] Hinckley MD, Milki AA. 1000 office-based hysteroscopies prior to *in vitro* fertilization: feasibility and findings[J]. JSLS, 2004, 8(2):103-7.
- [10] Surrey ES, Lietz AK, Schoolcraft WB. Impact of intramural leiomyomata in patients with a normal endometrial cavity on *in vitro* fertilization-embryo transfer cycle outcome [J]. Fertil Steril, 2001, 75 (2) : 405-10.
- [11] Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, *et al.* Uterine cavity findings and hysteroscopic interventions in patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer who repeatedly cannot conceive[J]. Fertil Steril, 2003, 80(6): 1371-5.
- [12] Feghali J, Bakar J, Mayenga JM, *et al.* Systematic hysteroscopy prior to *in vitro* fertilization [J]. Gynecol Obstet Fertil, 2003, 31(2): 127-31.
- [13] Denirol A, Gurgan T. Effect of treatment of intrauterine pathologies with office hysteroscopy in patients with recurrent IVF failure[J]. Reprod Biomed Online, 2004, 8 (5): 590-4.

(编辑 张恩健)

(上接第 643 页 from page 643)

移植时 GVHD 的发生,但也有可能增加感染发生率。

参考文献:

- [1] 周敦华,黄绍良,吴燕峰,等. 人间充质干细胞体外扩增及其生物学特性的研究[J]. 中华儿科杂志, 2003, 44(8):607-11.
- [2] 朱美玲,陈汝光,刘 华,等. 人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间充质干细胞基本生物学特性的比较 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2004, 25(6):504-7.
- [3] Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, *et al.* Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells[J]. Exp Hematol, 2001, 29(2): 174-82
- [4] Kusadasi N, Oostendorp RA, Koevoet WJ, *et al.* Stromal cells from murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region, liver and gut mesentery expand human umbilical cord blood-derived CAFC (week6) in extended long-term cultures [J]. Leukemia, 2002, 16(9): 1782-90.
- [5] Xu R, Reems JA. Umbilical cord blood progeny cells that retain a CD34⁺ phenotype after ex vivo expansion have less engraftment potential than unexpanded CD34⁺ cells [J]. Transfusion, 2001, 41(2): 213-8.
- [6] Bhatia M, Bonnet D, Kapp U, *et al.* Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term *ex vivo* culture [J]. J Exp Med, 1997, 186(4): 619-24.
- [7] McNiece IK, Almeida-Porada G, Shpall EJ, *et al.* *Ex vivo* expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engraftment potential [J]. Exp Hematol, 2002, 30(6): 612-6.
- [8] Cheng L, Qasba P, Vanguri P, *et al.* Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 2000, 184(1): 58-69.