

经胎鼠腹腔途径进行人脐血造血干细胞宫内移植的实验

刘英¹, 庄广伦¹, 游泽山¹, 李树浓², 孔庆瑜³

(中山医科大学 1. 附属第一医院妇产科; 2. 病理生理教研室; 3. 肾内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨经胎鼠的腹腔途径用人脐血造血干细胞进行宫内移植后出现的并发症及移植情况, 建立人脐血造血干细胞鼠宫内移植的动物模型, 为临床某些遗传性疾病的宫内治疗及脐血的应用研究提供理论基础。【方法】将人脐血单个核细胞注入胎龄 15~17d 胎鼠的腹腔内, 并设阴性及空白对照组, 观察手术并发症及妊娠结局, 待出生后 1 个月及 2 个月, 分别用流式细胞仪和免疫组化检测移植情况。【结果】小鼠外周血中检测到逐渐增加的人 CD₃ 细胞, 种植率为 64%, 出生后 1 个月测得的人 CD₃ 细胞平均值为 0.28%±0.05%, 出生后 2 个月为 0.41%±0.05%, 二者比较有显著性差异($P<0.05$)。出生后 2 个月在小鼠的肝、脾及胸腺组织中均检测到人 CD₃、CD₂₀ 及 CD₃₄⁺ 阳性细胞。手术并发症及妊娠结局, 实验组与阴性对照组间无显著性差异($P>0.05$), 与空白对照组间有显著性差异($P<0.05$)。【结论】人脐血造血干细胞经胎鼠的腹腔进行宫内移植后, 可在体内生长并增殖; 手术有一定的并发症, 并影响妊娠结局。

关键词: 造血干细胞移植; 胎血

中图分类号: R714.430.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0022-03

Experimental of Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells in Utero Transplantation through Abdominal Cavity of Fetal Rats

LIU Ying¹, ZHUANG Guang-lun¹, YOU Ze-shan¹, LI Shu-nong², KONG Qing-yu³

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, 2. Department of Pathophysiology, 3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the complication and engraftment of human cord blood hematopoietic stem cells in utero transplantation through abdominal cavity of fetal rats, and to establish an animal model for clinical application. 【Methods】 Human cord blood (MNC) cells were transplanted into the abdominal cavity of fetal rats, the complications and the outcome of pregnancy were observed. The condition of engraftment was detected by flow cytometry and immunohistochemistry methods after the fetus were born. 【Results】 Human CD₃ cells were detected in rats and the engraftment rate was 64%. At 1 and 2 months of age, the mean value of human CD₃ cells were 0.28%±0.05% and 0.41%±0.05% respectively ($P<0.05$). Human CD₃、CD₂₀ 及 CD₃₄⁺ cells were also detected in liver, spleen and thymus of rats at 2 months of age. The incidence of complication was significantly different between transplanted group and non-transplanted group. 【Conclusion】 Human cord blood cells transfused into the abdominal cavity of fetal rats were engrafted. There were some complications occurred during operations which affected the outcome of pregnancy.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation; fetal blood

对于先天性造血系统疾病和某些代谢缺陷病, 目前国内外尚无根治疗法, 骨髓移植(BMT)虽是

目前最有效的治疗方法, 但因骨髓来源困难, 强烈的免疫抑制所带来的严重并发症, 以及移植后的移

收稿日期: 2000-02-23

基金项目: 广东省科委攻关基金资助项目(9827821)

作者简介: 刘英(1970-), 女, 湖南郴州人, 在读博士生, 现在北京妇产医院工作

植物抗宿主病(GVHD)等, BMT的疗效和应用均受严重影响。

宫内移植造血干细胞是在孕期的某一时期将造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)输入宫内的胎儿体, 使植入的HSC能在受者的造血器官定居并增殖具有供体的造血及免疫功能, 为遗传性疾病的治疗带来了新的希望。国内外研究^[1]表明脐血富含造血干细胞/祖细胞, 已作为一种极有潜力的造血干/祖细胞移植的新来源。本研究根据胎儿宫内免疫耐受性强这一特点^[2,3], 利用人脐血造血干细胞, 在妊娠期胎儿免疫尚未完全建立以前, 经鼠胎的腹腔途径进行宫内移植, 建立人脐血造血干细胞宫内移植的动物模型, 为临床某些遗传性疾病的宫内治疗及脐血的应用研究提供有用的异种宫内移植的动物模型。这在国内外尚未见报道。

1 材料与方 法

1.1 动物选择

SD大鼠由中山医科大学实验动物中心提供, 8~12周龄, 雌、雄合笼, 检查雌鼠如见阴栓为交配成功。分笼, 算妊娠第0天, 待妊娠至第15~17天手术。

1.2 人脐血单个核细胞悬液的制备

选择本院足月妊娠健康孕妇, 新生儿娩出后, 立即断脐, 消毒胎盘侧脐带, 将脐血导入无菌瓶内, 以肝素抗凝(10~20 u/mL), 脐血采集量约60~100 mL。用Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液梯度离心, 收集界面层悬浮细胞即为脐血单个核细胞(MNC), 经PBS缓冲液洗涤后备用。

1.3 移植及实验分组

A组(实验组): 将SD孕鼠麻醉后, 剖开腹部, 暴露子宫, 记录妊娠胎鼠个数, 在显微镜下通过胎鼠的腹腔注入脐血MNC, 1×10^7 细胞/只胎鼠, 20 μ L体积。术中注意避开胎盘、子宫血管, 并暴露好胎鼠腹部, 尽量避免损伤胎鼠脏器, 注射完毕缝合母鼠腹部切口, 妊娠至分娩, 期间观察手术并发症及妊娠结局。B组(阴性对照组): 方法同上, 仅注入PBS缓冲液, 体积20 μ L/只胎鼠。C组(空白对照组): 只剖开孕鼠腹部, 暴露子宫, 记录妊娠胎鼠个数后关腹, 对胎鼠不做任何处理。

1.4 移植结果的检测

1.4.1 流式细胞仪检测 待小鼠出生1个月, 采

集尾静脉血, 加入直接荧光标记抗体CD₃-异硫氰荧光素(FITC)单克隆抗体(鼠抗人), 同时设阴性对照, FACSscan流式细胞仪检测。Lysis II软件处理数据, 并在小鼠出生2个月再次复查。所用抗体购自PHARMINGEN公司。

1.4.2 H-E染色 将流产或死产小鼠, 存活者则在小鼠出生2个月后, 取其肝、脾、肾、肺、胸腺组织, 体积分数10%甲醛固定, 石蜡包埋, 制成5 μ m切片, 用二甲苯及乙醇脱腊, 依次放入苏木精及伊红中染色, 然后用乙醇及二甲苯脱水, 树胶封片, 光镜下观察, 并设阴性对照。

1.4.3 免疫组化 小鼠出生2个月后, 取其肝、脾、肾、肺、胸腺组织, 同上法制成切片后, 脱蜡至水, 将切片放入枸橼酸盐缓冲液中, 置微波炉加热15 min(温度92 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C), PBS冲洗后行LSAB免疫组化染色。加10%山羊血清封闭, 室温孵育10 min, 分别加上抗人CD₃、CD₂₀及CD₃₄⁺抗体, 40 $^{\circ}$ C过夜, PBS冲洗; 加生物素标记二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS冲洗; 加辣根酶标记链菌素, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS冲洗; 加DAB显色剂显色5 min, 中止显色, 复染, 干燥封片。光镜下观察, 并设阴性对照, 所用试剂盒购自Dako公司。

1.5 统计学处理

实验数据采用SPSS 6.0进行 χ^2 /卡方检验、*t*检验等统计学分析。

2 结 果

2.1 流式细胞仪检测结果

存活的25只小鼠, 出生后1个月采集尾静脉血, 经流式细胞仪检测, 16只检测到人CD₃细胞, 其余小鼠及阴性对照鼠未检测到人CD₃细胞, 移植成功率为64%, 测得的人CD₃细胞平均值为(0.28 \pm 0.05) %。出生2个月后, 此16只小鼠再次检测到人CD₃细胞, 测得的人CD₃细胞平均值为(0.41 \pm 0.05) %, 较原来增加约(0.14 \pm 0.02) %, 两者比较有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化结果

移植成功的16只鼠, 出生后2个月的内脏组织切片, 经免疫组化染色, 光镜下见CD₃及CD₃₄⁺阳性细胞着色主要在细胞膜, CD₂₀阳性细胞着色主要在细胞浆。脾脏、胸腺均有人CD₃、CD₂₀及CD₃₄⁺阳性细胞, 肝脏有散在的人CD₃、CD₂₀及CD₃₄⁺阳性细

胞,而阴性对照均未见上述3种阳性细胞。

2.3 移植物抗宿主病(GVHD)情况

流产、死产小鼠及出生后小鼠的组织切片经H-E染色,光镜下未见明显GVHD病变。

2.4 手术并发症

3组手术中,A组57例,B组56例,C组47例。A、B组对胎儿行腹腔注射术者,均有出血(bleeding)、羊水渗出(amniotic fluid exudation)、羊膜囊外突(amniotic sac proptosis)、胎儿损伤(fetal

trauma)等并发症,两者间无显著性差异($P > 0.05$)。C组未行胎儿手术者无上述并发症,与A、B组间有显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 妊娠结局

3组均有流产者,A组流产32只(56.1%),B组流产31只(55.4%),C组流产9只(19.1%),A组与C组相比、B组与C组相比流产率均有显著性差异($P < 0.05$),A组与B组间无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 3组间的手术并发症比较

Table 1 Comparison of complications in three groups

n (%)

Group	<i>n</i>	Bleeding	Amniotic fluid exudation	Amniotic sac proptosis	Fetal trauma
A ¹⁾	57	3(5.3)	27(47.4)	10(17.5)	5(8.8)
B ²⁾	56	2(3.8)	25(44.7)	10(17.9)	4(7.1)
C	47	0(0.1)	0(0.1)	0(0.1)	0(0.1)

1), 2) Group A and B compared with group C, $P < 0.05$

3 讨论

宫内移植造血干细胞国内未见报道,国外尚在临床试验阶段。本研究造血干细胞宫内移植成功的动物模型建立,证实了造血干细胞宫内移植的可行性和有效性。宫内移植与产后移植比较,具有下列优越性^[2~4]:①由于胎儿时期宿主对异体抗原的反应表现为免疫耐受,对外来的移植物不易发生免疫排斥反应,所以无须作组织配型且较易植入;不必用强烈免疫抑制药物作预处理,避免对正常组织的任何损伤,不发生免疫抑制药物引起的有关副作用。②胚胎早期,骨髓腔相对比较空旷,造血细胞龕(niche)尚有许多处在空虚状态,异体造血干细胞进入后较易定居而增殖分化。③胎儿时期个体小、体重轻,所需造血干细胞相对甚少。④子宫是造血干细胞移植最理想的“隔离室”,除无微生物侵袭的后顾之忧外,母体的生理调节作用可保证对胎儿的营养、生长发育,有利于造血干细胞的植入。本研究选择孕龄15~17d的胎鼠,在其免疫尚未完全建立以前,用人脐血造血干细胞进行宫内移植,种植率64%,移植前均未用免疫抑制药物作预处理,病理切片证实未发生GVHD,说明胎儿对异体抗原的反应表现为免疫耐受,易接受外来移植物。A、B组对胎儿行腹腔注射术者,均有出血、羊水渗出、羊

膜囊外突、胎儿损伤等并发症,且流产率高,两者间无显著性差异;C组未行胎儿手术者无上述手术并发症,且流产率低,与A、B组间有显著性差异,说明并发症的发生与手术本身有关,而与移植物无明显关系。本实验因胎鼠小,手术操作较困难,可能出现一定的偏差影响实验结果。如何改善手术操作,是否减少注入剂量及减慢注射速度,可以减少并发症的发生,有待于进一步研究。

造血干细胞的来源主要有骨髓、胎肝及脐血。本研究选用脐血作为造血干细胞,经胎鼠腹腔途径注射人脐血造血干细胞,在小鼠出生后1个月及2个月均在外周血中检测到人CD₃细胞,并增加约0.14%±0.02%,二者比较有显著性差异($P < 0.05$);且用免疫组化法证实小鼠的肝、脾、胸腺等组织中有CD₃、CD₂₀及CD₃₄⁺细胞。CD₃₄⁺是造血干细胞的标志,CD₃细胞是总T淋巴细胞的标志,CD₂₀是总B淋巴细胞的标志。本研究在胎鼠时期注入人脐血造血干细胞,出生后2个月仍能在小鼠各组织中检测到人CD₃、CD₂₀及CD₃₄⁺细胞。这表明人脐血造血干细胞不仅可在异种受体内移植成功,而且可在各组织中定居并增殖、分化,成功地建立了人脐血造血干细胞宫内移植的动物模型,这在国内外均未见报道,为临床的进一步研究和应用提供了依据。

(下转第28页)

接枝率越大,亲水性增加越多,材料表面的亲-疏水结构可能更类似生物体的高级结构(由亲水性区域和疏水性区域形成的微观结构)。

一般认为,含水量高的聚合物与蛋白质或细胞的作用小。由于材料表面与血液接触,首先是发生血浆蛋白的吸附,然后引起血小板和白血球等细胞水平的反应,最终才可能导致血栓的形成。与蛋白质或细胞作用小的聚合物与血液接触时造成血栓的可能性当然也小。并且亲水性材料与血液接触时,表面优先吸附白蛋白,而白蛋白的吸附可以减少血小板的进一步粘附,对抗凝血性的提高是有利的。因此 PU-PHEMA 的血液相容性比 PU 好,并且在试验的分子质量范围内, PHEMA 接枝率越大 PU 表面血液相容性越好。

本实验用 TDI 作偶联剂在 PU 表面接枝 PHEMA 后,材料的抗张强度基本不变,其表面粘附的血小板个数比 PU 少,所粘附的血小板变形也比

PU 轻。PU-PHEMA 是一种具有良好的机械性能和血液相容性的材料。

参考文献:

- [1] 潘仕荣,周 群. 共聚物表面亲疏水微相分离与抗凝血性[J]. 生物医学工程学杂志, 1989, 6(3): 201.
- [2] 潘仕荣,周 群,许教文,等. 医用高分子材料表面血浆蛋白吸附对血小板粘附的影响[J]. 中山医科大学学报, 1989, 10(2): 4.
- [3] Engbers G H M, Dost L, Hennink W E, *et al*. An in vitro study of the adhesion of blood platelets onto vascular catheters. Part II[J]. J Biomed Mater Res 1987, 21(5): 613.
- [4] Park K, Mao F W, Park H. Morphological characterization of surface-induced platelet activation[J]. Biomaterials 1990, 11(1): 24.

(编辑 黄小延)

(上接第 24 页)

造血干细胞宫内移植的途径,在人主要通过胎儿脐静脉或胎儿腹腔内注射两条途径,本研究通过胎鼠腹腔途径移植成功。Blaza BR 等^[8, 9]的实验表明:经腹腔注射较脐静脉注射易种植成功,推测宿主腹腔的间皮细胞提供支架基质作用,使腹腔如同一个造血干细胞库,它不断地把造血干细胞甚至造血干细胞已分化的细胞输送到血循环。本研究通过胎鼠腹腔途径移植成功率 64%,且有一定的手术并发症,可否通过胚胎更早期的结构(例如胚外体腔及卵黄囊等结构)进行宫内移植,使成功率提高,并减少并发症的发生,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Broxmeyer H E, Kurtzberg J, Gluckman E, *et al*. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation[J]. Blood Cells, 1991, 17(2): 313.
- [2] Shields L E, Bryant E M, Easterling T R, *et al*. Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons[J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 173(4): 1157.

- [3] Touraine J L, Raudrant D, Royo C, *et al*. In utero transplantation of hemopoietic stem cells in humans[J]. Transplant Proc, 1991, 23(1): 1706.
- [4] Yuh D D, Gandy K L, Hoyt G, *et al*. A rodent model of in utero chimeric tolerance induction[J]. J Heart Lung Transplant, 1997, 16(2): 222.
- [5] Clare T H. Umbilical cords: turning garbage into clinical gold science[J]. Science, 1995, 268(5): 805.
- [6] Amos T, Gordon M Y. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation—a review[J]. Cell transplantation, 1995, 4(6): 547.
- [7] 陆道培. 造血干细胞移植的现状与展望[J]. 实验血液学杂志, 1996, 4(4): 337.
- [8] Blazar B R, Taylor P A, Vallera D A, *et al*. Adult bone marrow derived pluripotent hematopoietic stem cells are engraftable when transferred in utero into moderately anemic fetal recipients[J]. Blood, 1995, 85(3): 833.
- [9] Blazar B R, Taylor P A, Vallera D A, *et al*. In utero transfer of adult bone marrow cells into recipients with severe combined immunodeficiency disorder yields lymphoid progeny with T- and B-cell functional capabilities[J]. Blood, 1995, 86(11): 4353.

(编辑 关淡庄)