

# Transwell培养体系中人AGM区基质细胞支持脐血CD34<sup>+</sup>细胞造血

张绪超, 陈惠芹, 黄绍良, 吴燕峰, 包蓉, 吴北燕, 周敦华  
(中山大学附属第二医院干细胞研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨Transwell系统中人胚主动脉-性腺-中肾(AGM)区基质细胞对脐带血造血干/祖细胞的造血能力长期维持及扩增的作用。【方法】采用免疫磁珠方法分离人脐带血CD34<sup>+</sup>细胞,接种于底层铺有人AGM区基质细胞的Transwell培养板的Inserts中,非接触共培养7~35d,每星期取样检测细胞总数,用半固体培养基分析CFU-C及HPP-CFU集落形成数,流式细胞术检测CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞百分率。【结果】在Transwell中非接触共培养条件下,人AGM区基质细胞培养体系较胚胎躯干基质细胞和无饲养层培养体系对有核细胞总数、CFC和CD34<sup>+</sup>细胞均具有明显的扩增作用,共培养14d的CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>造血干/祖细胞均获得峰值扩增(2.62±0.8和2.15±1.04,  $P < 0.05$ ),而MNC总数和CFC均在21d获得最大扩增(32.5±4.3和4.2±0.6倍,  $P < 0.05$ )。克隆分析发现CFU-Mix、CFU-GM、BFU-E在共培养4~5星期后均仍然可见。原始祖细胞HPP-CFC在3星期也得到2.23倍的扩增,较空白及hFT对照组均有显著性差异( $P < 0.05$ ),并在共培养35d后仍可见HPP-CFU集落形成。【结论】人AGM区基质细胞hAGM-S3/hAGM-S4均具有造血支持作用,在非接触共培养条件下中可长期维持脐血中造血干/祖细胞的多系造血能力和高增殖潜能达21~35d,对脐血CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数也有一定程度的扩增作用。

**关键词:**Transwell; 主动脉-性腺-中肾; 基质细胞; CD34<sup>+</sup>细胞

**中图分类号:**R329.28

**文献标识码:**A

**文章编号:**1672-3554(2005)02-0231-05

## Supportive Effects of Stromal Cells of Human Embryonic Aorta-gonad-mesonephros (AGM) on Umbilical Cord Blood CD34<sup>+</sup> Stem/Progenitor Cells in Transwell Culture System

ZHANG Xu-chao, CHEN Hui-qing, HUANG Shao-liang, WU Yan-feng, BAO Rong,  
WU Bei-yan, ZHOU Dun-hua

(Center for Stem Cell Research, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the supportive effects of stromal cells of human aorta-gonad-mesonephros region on umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells in transwell non-contact culture system. 【Methods】CD34<sup>+</sup> cells were positively selected from human umbilical cord blood through immunomagnetic beads selection method and seeded into inserts of 24-transwell plate, and non-contact co-cultured for 1~5 weeks. Different stromal cells from human AGM region or fetal trunk were cultured on the bottom of each well as feeder cells. Then at every week, total nucleated cells number were count, frequencies of CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells detected by flow cytometry, and CFU-C and HPP-CFU determined by semi-solid medium clonal culture. 【Results】Of different tissue-derived stromal cells in the transwell non-contact culture system, human AGM cells supported proliferation of nucleated cells, CD34<sup>+</sup> cells and CFC for 2~3 weeks more than groups of fetal trunk fibroblasts and controls without feeder cells. CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> hematopoietic stem/progenitor cells were expanded 2.62 and 2.15 folds respectively after 2 weeks co-culture ( $P < 0.05$ ), while mononucleated cells number, colony forming cells were 32.5 and 4.20 times expanded after 21 days of co-culture with AGM cells *in vitro* ( $P < 0.05$ ). In colony analysis, CFU-Mix, CFU-GM, and BFU-E could be detected under phase contrast microscope after 4~5 weeks of co-culture. More primitive

**收稿日期:**2004-12-12

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30300377); 中国博士后科学基金资助项目(20003033432); 教育部博士点基金; 资助项目(20030558070); 广东省卫生厅基金资助项目(A2004201)

**作者简介:**张绪超(1974-),男,安徽无为,人,博士后;黄绍良,教授,通讯作者. E-mail: hshl@gzsums.edu.cn

progenitor cells HPP-CFC could be expanded 2.23 folds at 3 weeks of co-culture with AGM stromal cells, which showed AGM cells were better than hFT cells in HPP-CFC expansion ( $P < 0.05$ ). HPP-CFU could still be detected even after 5 weeks of cord blood cells co-culture with AGM stromal cells. 【Conclusions】 In non-contact culture system, human AGM stromal cell lines hAGM-S3 and hAGM-S4 both significantly supported the expansion of human umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells, and could maintain the multi-lineage differentiation and high proliferation potential abilities of those hematopoietic stem/progenitor cells up to 3~5 weeks *in vitro*.

**Key words:** Transwell; aorta-gonad-mesonephros, stromal cell, CD34<sup>+</sup> cell

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci).2005,26(2): 231-235, 239]

近年在人类胚胎造血发生与发育研究中发现孕 30~37 d 开始出现胚内 AGM (主动脉-性腺-中肾)造血<sup>[1]</sup>。AGM 区目前被认为是人类永久造血发生的最早部位。该部位含造血干细胞(HSC)数目仅数百个,但为胎肝造血准备了“种子”细胞。AGM 区基质细胞对原始的胚胎干细胞向 HSC 发育分化理论上提供重要的局部‘龕’位环境的生物学意义。因此 AGM 区造血微环境的研究对阐明人类胚胎造血发生机制具有重要理论及应用意义。作为早期造血微环境主要成分的 AGM 区基质细胞正成为研究重点<sup>[2,3]</sup>,为此,本室已建立了多个人 AGM 区基质细胞株<sup>[4]</sup>,其能否在体外长期维持造血干/祖细胞的造血干性能力值得进一步研究。本研究拟采用本实验室建立的早期人胚胎 AGM 区基质细胞系作为支持细胞,以分隔式 Transwell 培养系统探讨人 AGM 区基质细胞对人脐血 CD34<sup>+</sup>HSC 的造血干性长期维持能力及可能的扩增作用,为研究人 AGM 区基质细胞调控造血功能及定向诱导胚胎干细胞造血分化体系提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 脐血的采集和细胞制备

取健康足月妊娠的胎盘组织,消毒条件下采取脐血于脐血采集袋中。加羟乙基淀粉(1:4)混匀后静置 40 min 后去红细胞离心收获细胞,定容后等体积缓慢加入有 Ficoll 密度梯度离心剂的离心管中,400 × *g* 离心 30 min,收集单个核细胞(MNC)层细胞,PBS 洗涤离心两次,加 MACS 缓冲液(含 10 g/L 的人血清白蛋白,6 g/L ACD-A 的 PBS),制成 MNC 细胞悬液,准备作免疫磁珠分选 CD34<sup>+</sup>HSC。

### 1.2 试剂与仪器

CD34<sup>+</sup>细胞的纯化采用 Miltenyi Biotech 公司的 MidiMACS 免疫磁珠分离装置;甲基纤维素培

养基为 MethoCult™ GF<sup>+</sup> H4435 (StemCell 公司);流式细胞分析用 BD Calibur 流式细胞仪。H5100 培养基购自 Stemcell Technology 公司。α-MEM、马血清、2-巯基乙醇、Glutamax- I、2.5 g/L 胰蛋白酶购自 Gibco 公司。特级胎牛血清购自 Hyclone 公司。Hydrocortisone 为 Sigma 公司产品。荧光标记小鼠抗人抗体 CD34-PE、CD38-FITC 均为 Pharming 公司产品。培养系统为聚苯乙烯 Transwell 24 孔培养系统,每孔插入子(Insert,φ6.5 mm)底部为 0.4 μm 孔径的聚碳酸酯透水膜,购自 Nunc 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 人 AGM 区基质细胞及脐带血(UCB)CD34<sup>+</sup>HSC 细胞培养 将本室建立的两株 AGM 基质细胞系 hAGM-S3 和 hAGM-S4<sup>[4]</sup>,接种至预先铺有 1 g/L 明胶的 24 孔培养板中,培养基为含有 200 mL/L 胎牛血清、50 mL/L 马血清、10 μmol/L 2-巯基乙醇、1 mmol/L Glutamax- I、1 μmol/L Hydrocortisone 的 α-MEM。培养至 90%融合(confluency)时丝裂霉素处理 2 h,置于 37℃、体积分数 5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中备用。尽快分离新鲜的人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞以 2×10<sup>4</sup> cells/孔接种于插入子中体积为 800 μL,培养基更换为 Stemcell 公司的 H5100 营养培养基,3~4 d 换液。每星期收获细胞,作 CFC-C 及流式细胞术检测。对照组设无基质细胞组及人胚胎躯干(hFT)基质细胞组,其它培养条件同 AGM 基质细胞组。hFT 细胞为本室 AGM 取材时同发育阶段的人胚胎躯干部位基质细胞。

1.3.2 CD34<sup>+</sup>细胞的分离纯化 参照 Miltenyi 试剂盒说明书进行 CD34<sup>+</sup>细胞分离纯化,每 1×10<sup>8</sup> 细胞悬浮于 300 μL 的 MACS 缓冲液中,加入 100 μL FeR 封闭非特异结合位点,6~12℃孵育 15 min,加入 100 μL 免疫磁珠混匀,6~12℃孵育 30 min。缓冲液洗涤后悬浮于 500 μL 缓冲液中,加入固定于磁场中的 MidiMACS MS 吸附柱中进行分离,先洗脱 CD34<sup>+</sup>细胞,再脱离磁场后洗脱 CD34<sup>+</sup>细胞,定

容计数后备用。

1.3.3 造血细胞集落分析 采用干细胞公司 MethoCult™ GF<sup>+</sup> H4435 甲基纤维素培养基, 内含多种因子 (含 SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, Epo) 接种每次收获的 2 000 个细胞于 1 mL 半固体培养基中 (0 天以 500 个细胞接种), 于体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 培养箱中培养 28 d。在 14~21 d 计数集落形成单位总数 (total colony forming units in culture, CFU-C), 包括粒单系集落形成单位 (CFU-GM), 红系爆式集落形成单位 (BFU-E), 和多系或混合集落形成单位 (CFU-Mix/ CFU-GEMM), 在 28 d 后计数高增殖潜能集落形成单位 (HPP-CFU, 直径大于 0.5 mm, 高密度粒单细胞型集落)。

1.3.4 流式细胞仪检测 UCB CD34<sup>+</sup>细胞分别在 Transwell 系统中与基质细胞非接触共培养 1~4 星期后, 将 Inserts 中的造血细胞收集并用 PBS 洗涤后, 分别加入荧光标记小鼠抗人抗体: CD34-PE、CD38-FITC, 室温孵育 30 min, PBS 洗去未结合抗体, 10 g/L 多聚甲醛固定, 应用流式细胞仪检测细胞上述表面抗原的表达情况, 同型 IgG 作为相应的阴性对照。结果用 CellQuest 软件分析 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>百分率。

#### 1.4 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果采用单因素方差分析及组间  $q$  检验方法。

## 2 结果

### 2.1 脐血标本的检测

共取 6 份标本, 体积为 60~100 mL, 免疫磁珠法分离 CD34<sup>+</sup>细胞, 每次流式检测 CD34<sup>+</sup> 比例均数为 90% 以上。以  $2 \times 10^4$  接种于每孔 Insert 中。每孔 Transwell 培养体积为 1.8 mL, 每 5 d 换液, Insert 换 0.2 mL, 孔内换液 0.6 mL, 分别于培养后 7~35 d 后分别进行 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞比例及 CFC 分析。

### 2.2 各基质细胞组共培养后 MNC、CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数变化

人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞在 Transwell 系统中与胎躯干及 AGM 区基质细胞非接触共培养 1~4 星期后, 造血细胞总数、CD34<sup>+</sup>及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞均得到不同程度的扩增。人 hAGM-S3 和 hAGM-S4 两株细胞共培养组 MNC 总数可达 28.2、32.5 倍,

均较人胎躯干基质细胞和无基质细胞组有统计学显著性差异 ( $P < 0.05$ )。共培养两星期后 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞分别可扩增 1.89/2.62 (hAGM-S3 组)、1.51/2.15 倍 (hAGM-S4 组), 与 hFT 组结果比较差异均有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。提示人 AGM 区基质细胞体外非接触培养系统可一定程度上支持人 UCB 造血干/祖细胞增殖 (表 1)。共培养 4 星期后 hAGM-S3 组仍维持 1.03 倍的 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数, 但 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞在 hAGM-S4 组均有减少趋势。在 5 星期后各样本的 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞比例流式检测极低, 表中未列出。

表 1 不同基质细胞与 CB CD34<sup>+</sup>细胞共培养后造血干/祖细胞的扩增倍数

Table 1 Expansion folds of hematopoietic stem/progenitor cells after co-culture of CB CD34<sup>+</sup> cells with different stromal cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

	Week	MNC	CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>
Control	1	0.50±0.10	0.27±0.10	0.38±0.21
	2	0.44±0.10	0.04±0.02	0.05±0.01
	3	0.44±0.12	0.01±0.00	0.01±0.00
	4	0.23±0.10	0.01±0.00	0.01±0.00
hFT	1	3.85±0.60 <sup>1)</sup>	1.39±0.78 <sup>1)</sup>	0.14±0.06
	2	4.68±1.10 <sup>1)</sup>	1.16±0.41 <sup>1)</sup>	1.29±0.76 <sup>1)</sup>
	3	15.85±2.00 <sup>1)</sup>	0.63±0.14	0.04±0.01
	4	11.88±1.30 <sup>1)</sup>	0.74±0.21	0.02±0.01
hAGM-S3	1	3.74±1.10 <sup>1)</sup>	1.60±0.62 <sup>1)</sup>	1.40±1.01 <sup>1)</sup>
	2	9.35±2.90 <sup>1,2)</sup>	1.89±1.02 <sup>2)</sup>	1.51±1.01 <sup>1,2)</sup>
	3	28.22±5.10 <sup>1,2)</sup>	0.82±0.16	0.84±0.02
	4	13.5±3.20 <sup>1)</sup>	0.40±0.21	1.03±0.51 <sup>3)</sup>
hAGM-S4	1	3.58±2.10 <sup>1)</sup>	1.27±0.91 <sup>1)</sup>	1.43±1.03 <sup>1)</sup>
	2	16.23±3.40 <sup>1,2)</sup>	2.62±1.12 <sup>1,2)</sup>	2.15±1.04 <sup>1,2)</sup>
	3	32.50±6.20 <sup>1,2)</sup>	0.98±0.51	1.04±0.54 <sup>2)</sup>
	4	12.50±4.10 <sup>1)</sup>	0.42±0.31 <sup>3)</sup>	0.47±0.20 <sup>2,3)</sup>

Compared with controls with the same culture duration 1)  $P < 0.05$ ; Compared with hFT group with the same culture duration 2)  $P < 0.05$ ; Compared with the same stromal cells group at 2 weeks of co-culture 3)  $P < 0.05$

### 2.3 Transwell 体系中与基质细胞共培养后脐血 CD34<sup>+</sup>细胞的集落形成能力

在形成造血集落能力方面, 结果显示 hAGM-S3 及 hAGM-S4 两株细胞均能在非接触培养条件下支持脐血中集落形成细胞的扩增, 分别最大扩

增 CFC 至 3.83、4.20 倍, 优于 hFT ( $P < 0.05$ , 见表 2)。hAGM 细胞能维持 CFU-Mix、CFU-GM、BFU-E 等各系集落形成, CFC 细胞在共培养 2~3 星期达峰值, 扩增 4~5 星期后集落数减少, 但仍有相对较多的 CFU-Mix 及 BFU-E。而人 hFT 共培养组多见 CFU-GM 粒系集落, CFU-E 及 CFU-Mix 非常少见, 提示造血微环境来源的 AGM 基质细胞能体外长

期维持造血干/祖细胞的不被完全耗竭, 并具有多系造血能力(表 2 及图 1)。HPP-CFU 分析亦表明人 AGM 基质细胞优于 hFT 细胞, 人 hAGM-S3 和 hAGM-S4 组 HPP-CFU 在第 21 天可分别增至 2.23、2.54 倍 ( $P < 0.05$ )。结合表 1 结果分析, 21~28 d CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数已减少, 但其中的 HPP-CFU 在 hAGM-S4 组仍得到 2.54(21 d)、0.83

表 2 脐血 CD34<sup>+</sup>细胞与不同基质细胞共培养后的 CFU 分析结果

Table 2 Colony forming unit assay of UCB stem/progenitor cells after co-culture of CD34<sup>+</sup> cells with different stromal cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Time	Condition	CFU-GM	BFU-E	CFU-Mix	Total CFU	HPP-CFU
0		133±11	42±8	32±7	207±21	58±9
7 d	without stroma	21±6	0	2	23±14	8±3
	hFT	81±12 <sup>1)</sup>	6±3	3±1	65±16 <sup>1)</sup>	23±9 <sup>1)</sup>
	hAGM-S3	211±32 <sup>1)</sup>	62±12 <sup>1)</sup>	52±9 <sup>1)</sup>	99±37 <sup>1)</sup>	32±32 <sup>1)</sup>
	hAGM-S4	194±24 <sup>1)</sup>	51±13 <sup>1)</sup>	38±13 <sup>1)</sup>	140±38 <sup>1)</sup>	59±29 <sup>1),2)</sup>
14 d	without stroma	21±6	0	0	21±6	12±3
	hFT	81±12	6±3	3±1	90±16 <sup>1)</sup>	51±8 <sup>1)</sup>
	hAGM-S3	211±32 <sup>1),2)</sup>	62±12 <sup>1),2)</sup>	52±9 <sup>1),2)</sup>	325±41 <sup>1),2),(1.62)<sup>4)</sup></sup>	77±48 <sup>1),2),3),(1.34)<sup>4)</sup></sup>
	hAGM-S4	194±24 <sup>1),2)</sup>	51±13 <sup>1),2)</sup>	38±13 <sup>1),2)</sup>	283±32 <sup>1),2),(1.39)<sup>4)</sup></sup>	88±48 <sup>1),2),3),(1.53)<sup>4)</sup></sup>
21 d	without stroma	12±5	0	0	12±5	7±1
	hFT	130±14 <sup>1)</sup>	20±5 <sup>1)</sup>	10±4	160±11 <sup>1)</sup>	63±38 <sup>1)</sup>
	hAGM-S3	532±82 <sup>1),2)</sup>	132±31 <sup>1),2)</sup>	81±23 <sup>1),2)</sup>	545±102 <sup>1),2),(3.83)<sup>4)</sup></sup>	128±57 <sup>1),2),3),(2.23)<sup>4)</sup></sup>
	hAGM-S4	551±89 <sup>1),2)</sup>	152±41 <sup>1),2)</sup>	112±27 <sup>1),2)</sup>	815±112 <sup>1),2),(4.20)<sup>4)</sup></sup>	146±62 <sup>1),2),3),(2.54)<sup>4)</sup></sup>
28 d	without stroma	0	0	0	0	9±2
	hFT	55±13 <sup>1)</sup>	2±1	0	57±15 <sup>1)</sup>	35±4 <sup>1)</sup>
	hAGM-S3	66±21 <sup>1)</sup>	21±11 <sup>1),2)</sup>	10±3	97±27 <sup>1)</sup>	45±4 <sup>1),2),(0.78)<sup>4)</sup></sup>
	hAGM-S4	81±14 <sup>1),2)</sup>	31±8 <sup>1),2)</sup>	9±7	120±22 <sup>1),2)</sup>	48±20 <sup>1),2),(0.83)<sup>4)</sup></sup>
35 d	without stroma	0	0	0	0	1±0
	hFT	13±3 <sup>1)</sup>	0	0	13±3 <sup>1)</sup>	6±2
	hAGM-S3	24±5 <sup>1)</sup>	6±2 <sup>1)</sup>	3±1	33±7 <sup>1)</sup>	9±2 <sup>1),2),3)</sup>
	hAGM-S4	36±9 <sup>1),2)</sup>	5±2 <sup>1)</sup>	4±2	45±11 <sup>1),2)</sup>	13±3 <sup>1),2),3)</sup>

Compared with controls with the same co-culture duration 1)  $P < 0.05$ ; Compared with hFT group with the same co-culture duration 2)  $P < 0.05$ ; 3) Compared with the same stromal cells group at 7 d co-culture  $P < 0.05$ ; 4) the values in the brackets indicate the proliferation folds

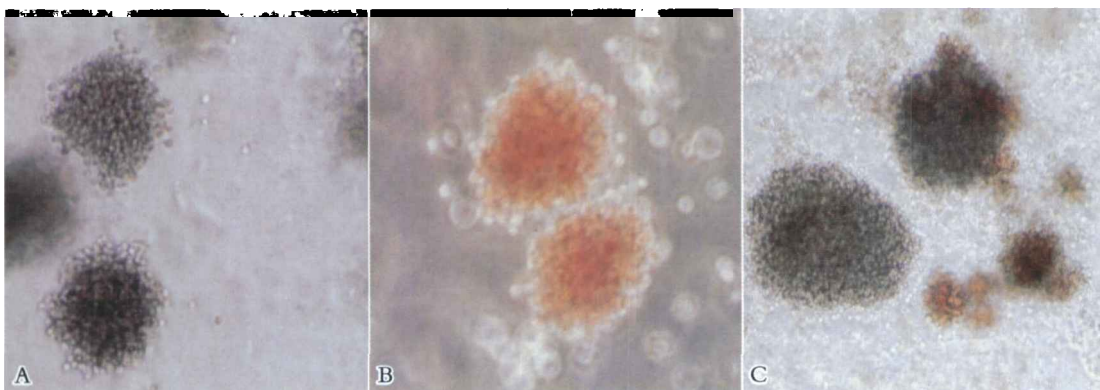


图 1 CB HSC 与 hAGM4 基质细胞非接触共培养 28 d 后的粒系、红系、混合系集落形成

Fig.1 Colonies CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix derived from CB HSCs after 28 d non-contact co-culture with hAGM-S4 stromal cells

A. CFU-GM (100)×; B. BFU-E (100)×; C. CFU-Mix (100)×

(28 d)倍的扩增,提示人 AGM 基质细胞具有长期维持较原始的和一定数量的高增殖潜能干/祖细胞的能力。

### 3 讨论

在哺乳动物小鼠胚胎造血发育研究已证实主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区是永久造血发生部位,为机体终生造血准备了“种子”细胞<sup>[2]</sup>。但人类胚胎发育中 AGM 区造血发育研究特别是其造血微环境基质细胞的研究限于条件,资料尚不多。本室已深入对人类胚胎 AGM 区研究,建立了多株人 AGM 区基质细胞并鉴定了 Tenascin-C 及  $\alpha$ -OSM 等分子表型<sup>[4]</sup>。在此基础上,为进一步探讨 AGM 基质细胞调控造血功能,本研究检测了 hAGM-S3/hAGM-S4 两株人 AGM 区基质细胞通过分泌的可溶性造血调控因子对 HSC 的支持作用。采用的分隔式 Transwell 培养体系可提供细胞间非接触共培养,适用于细胞间的趋化或分泌因子的相互作用的研究。

结果显示人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞在 Transwell 系统中与胎躯干及 AGM 区基质细胞非接触共培养 1~5 个星期后,在未加细胞因子条件下造血细胞总数、CD34<sup>+</sup>及 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞均得到不同程度的扩增。人 hAGM-S3/hAGM-S4 两株细胞对 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>亚群细胞可扩增 1.89/2.62、1.51/2.15 倍,与 hFT 组差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。说明人 AGM 细胞体外非接触培养系统可一定程度上扩增人脐血造血干/祖细胞。造血干/祖细胞功能体外集落形成能力分析结果显示 hAGM-S3 及 hAGM-S4 两株细胞均能在非接触培养条件下支持脐血中集落形成细胞的扩增,分别最大扩增 CFC 至 3.83、4.20 倍, HPP-CFU 分别达 2.23、2.54 倍,均优于 hFT 细胞组。与 AGM 基质细胞共培养的 CFC 细胞在培养 2~3 星期后达峰值,4~5 星期后集落数减少,但仍有相对较多的 HPP-CFU、CFU-Mix 及 BFU-E,提示早期造血部位的 AGM 细胞具有明显的长期维持造血干/祖细胞的干性能力。以上结果表明:①hAGM-S3,4 两株细胞支持扩增 HSC 能力与 hFT 细胞有明显差别,进一步证实这两株基质细胞是来自 AGM 区造血微环境的基质细胞。②hAGM-S3,4 具有分泌调控因子功能,本研究已检测出 hAGM-S3,4 培养上清液中含有

SCF、Flt-3L、IL-6 等重要因子(另文发表)。另有报道<sup>[5]</sup>小鼠 AGM 基质细胞可分泌 BMP1、FGF7、MCP3、M-CSF 等因子促进造血。从本文 hAGM-S3 组 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数看,共培养第 1 星期为  $1.40 \pm 1.01$  倍直至第 4 星期仍维持有  $1.03 \pm 0.51$  倍, hAGM4 组 HPP-CFU 第 1 星期为  $59 \pm 29$ ,至第 4 星期仍达  $48 \pm 20$  个,第 5 星期  $13 \pm 3$  个,而晚期造血祖细胞集落则明显减少,可见 hAGM 基质细胞分泌的因子主要具有维持 HSC 干性功能。③相对于其它细胞因子或联合基质细胞的扩增研究,AGM 基质细胞扩增效率较低,可能的原因是 AGM 作为早期背主动脉内的造血微环境,主要生物学作用即是为了维持 HSC 的发生数量及其原始干细胞功能,为胎肝造血准备“种子”细胞条件。在本研究中 3~4 星期 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞数逐渐减少,而此时 AGM 基质细胞可一定程度上长期维持原始祖细胞的高增殖潜能和一定数量。这也体现了 AGM 区微环境的上述特定发育生物学作用。

胚胎的 AGM 区是永久造血 HSC 的起源部位,该区的 HSC 具有向粒、红、淋巴系等造血各系分化的能力<sup>[2,3]</sup>。1998 年 Xu 等<sup>[6]</sup>从孕 10.5 d 小鼠胚胎中分离出 AGM 区组织,建立了 3 株具有造血支持作用的基质细胞系 (AGM-S1,S2,S3)。2002 年 Oostendorp 等<sup>[7]</sup>取孕 11 d 小鼠胚胎的 AGM 区组织,亦建立了具有造血支持作用的基质细胞系。其中 AGM-S3 研究表明小鼠的 AGM 基质细胞虽然能扩增人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞 4 星期后仍含有长期造血重建活性的 HSC,但在非接触培养系统中,却不能维持 LTR-CFC,造血克隆分析仅见 CFU-GM 粒系克隆。这似乎表明小鼠 AGM 区基质细胞在非接触条件下不能维持 HSC 的长期造血重建活性。但另一研究<sup>[8]</sup>认为在用非接触培养体系条件下,将骨髓来源的 HSC 分别与泌尿生殖嵴(UG)、胎肝(EL)基质细胞共培养 21 d 发现,与 UG 非接触共培养的 HSC 能维持造血重建能力,而与胎肝共培养的 HSC 并不具有造血重建能力。这说明 UG 细胞较胎肝基质细胞更能维持骨髓 HSC 的长期造血重建能力。而本研究中使用的人 AGM 基质细胞系能够在非接触共培养条件下可长期维持 CD34<sup>+</sup> HSC 的多系造血能力,明显优于小鼠的 AGM-S3 细胞,因后者不能在非接触条件下维持 HSC 产生 CFU-Mix 和 BFU-E,这可能是人与小鼠 AGM 的种间差

(下转第 239 页 to page 239)

单纯放射治疗者预后佳。

声门上区分为两个亚区:上喉区包括舌骨以上会厌、两侧杓会厌皱襞、两侧杓状软骨,上喉区以外的声门上区包括舌骨以下的会厌喉面、两侧喉室、两侧室带。我们资料中可以明确看到上喉区癌患者比上喉区以外者生存率差,可能是由于上喉区癌位于声门上区边缘,更容易向喉外扩散,也更容易发生颈淋巴结转移。肿瘤分化程度也是影响预后的因素之一,分化差即恶性程度高,其向周围组织浸润的能力强;分化差则细胞间的粘着力低,容易分离,因而易发生转移。

本研究多因素分析结果表明,原发灶治疗方式和颈淋巴结转移情况为影响声门上喉癌患者预后的独立因素,因此,对于声门上喉癌患者,选择以手术为主的治疗方式,同时积极处理临床颈淋巴结转移,对临床无颈淋巴结转移的T3以上患者行应施行Ⅱ、Ⅲ区颈淋巴结清扫术,Ⅲ区受累时行颈侧清扫术(Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ),有望提高患者生存率,改善患者预后。

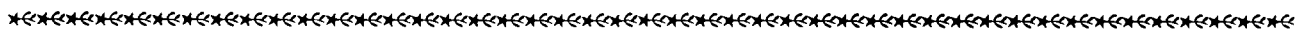
#### 参考文献:

[1] 屠归益. 喉癌下咽癌现代理论与临床[M]. 济南:山东

科技出版社,2002. 464-5.

- [2] 李庆宏,屠规益,唐平章,等. 喉癌术前放射治疗及单纯手术疗效的比较[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33(6): 364-7.
- [3] Suarez C, Rodrigo JP, Herranz J, *et al.* Supraglottic laryngectomy with or without postoperative radiotherapy in supraglottic carcinoma[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995, 104(5): 358-63.
- [4] 李进让. 声门上喉癌颈淋巴结处理的新进展[J]. 国外医学耳鼻咽喉科学分册, 1996, 20(1): 30-2.
- [5] Myers EN, Alvi A. Management of carcinoma of the supraglottic larynx: evolution, current concepts, and future trends[J]. *Laryngoscope*, 1996, 106(5Pt1): 559-67.
- [6] 时耀啼,关超,陈兆琳,等. 声门上喉癌颈淋巴结转移临床病理研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1990, 25(4): 234-6.
- [7] Resnick JM, Uhlman D, Niehans CA, *et al.* Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1995, 104(9Pt1): 685-94.
- [8] 杨安奎,曾宗渊,陈福进,等. 声门上喉癌隐性颈淋巴结转移对预后的影响[J]. 癌症, 2000, 19(7): 678-80.

(编辑 黄小延)



(上接第 235 页 to page 235)

异,而能否重建造血需要进一步作动物体内实验。

本实验首次研究了人胚 AGM 区基质细胞的造血支持作用,发现其具有在 Transwell 非接触及不加外源因子条件下长期维持脐血造血干/祖细胞的多系造血能力和高增殖潜能,且能一定程度上扩增 CD34<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> HSC 数量。推测 AGM 基质细胞的分泌型因子能维持脐血造血干细胞增殖和多系造血能力。证实了本室建立的人 AGM 细胞系 hAMG-S3,4 具有造血支持作用,为进一步研究人 AGM 区造血发育机制及建立诱导胚胎干细胞定向造血分化体系奠定了条件。

#### 参考文献:

- [1] Tavian M, Coulombel L, Luton D, *et al.* Aorta-associated CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells in early human embryo [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 67-72.
- [2] Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region [J]. *Cell*, 1996, 86(6): 897-906.
- [3] Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, *et al.* Intraembryonic,

but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution [J]. *Immunity*, 2001, 15(3): 477-85.

- [4] 陈惠芹,张绪超,黄绍良,等. 人 AGM 区基质细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2005, 26(1): 21-4.
- [5] Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N, *et al.* Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity[J]. *Blood*, 2002, 99(4): 1183-9.
- [6] Xu MJ, Tsuji K, Ueda T, *et al.* Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines [J]. *Blood*, 1998, 92(6): 2032-40.
- [7] Oostendorp RJ, Harvey KN, Kusadasi N, *et al.* Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity [J]. *Blood*, 2002, 99(4): 1183-9.
- [8] Dzierzak E. Ontogenic emergence of definitive hematopoietic stem cells [J]. *Curr Opin Hematol*, 2003, 10(3): 229-34.

(编辑 张恩健)