

造血干/祖细胞的体外扩增和临床应用

熊福银 陈昭烈

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 介绍造血干/祖细胞的体外培养和扩增取得的显著进展:包括各种生物反应器的应用,三维培养系统的建立。扩增后的造血细胞在动物模型和临床上的应用已取得了初步成效。

关键词 造血干/祖细胞 扩增 培养

体外造血干/祖细胞的培养和扩增在基础研究和临床上有着重要意义,包括造血调控机制的研究、基因治疗、肿瘤细胞的排除和移植等^[1]。由于骨髓是一个复杂的环境,它由干细胞、祖细胞和成熟的血细胞以及对于造血必需的辅助细胞(基质细胞)和在细胞外基质中的粘附分子所组成。基质细胞和细胞外基质通过产生生长因子及细胞间的直接接触来介导细胞的分化和增殖。造血系统的复杂性给造血细胞的体外培养带来了巨大的挑战,为了能使体内造血系统一样顺利地生成各种血细胞成分和对造血干/祖细胞进行扩增而不损伤其细胞活力和多能性,研究者在生物学和生物工程学领域进行了大量研究。近年来,在造血干/祖细胞的体外扩增及扩增后的临床应用方面取得了不少进展。

1 有血清和无血清培养基的培养

传统的造血细胞培养很大程度上依赖于在基础培养基中添加动物血清,通常是胎牛血清和/或马血清。血清是必需营养成分、激素及生长因子的来源,并能保护细胞免受培养系统中的一些潜在有害因素的损害。血清对细胞培养会产生有利影响,同时也给培养系统带来了不确定因素。另外,血清中还包含有如 TGF- β 等抑制因素,该因子被证实对红系前体细胞的增殖有抑制作用^[2],它能诱导红系前体细胞向更成熟阶段的红系细胞分化^[3]。对小鼠骨髓细胞或人脐带血细胞培养系统用 anti-TGF- β 处理后的扩增效果明显优于未处理的对照组。而且,如果培养后的细胞是应用于临床,血清可能会引起严重的免疫反应。

无血清培养基比之有血清培养基在临床治疗上有很大优势。但不同的无血清培养基系统其效果有差异。De Bruyn 等认为无血清培养系统中脐血 CFU-GM 产率高于添加胎牛血清的系统^[4],但其他研

究者则发现骨髓 CD34⁺ 细胞在无血清培养系统中的扩增效果及其产生的成熟中性粒细胞吞噬能力不如添加胎牛血清的培养系统^[5]。无血清培养的不足可以通过添加自体血浆来加以弥补,这在临床上要优于在培养系统中添加胎牛血清。脐血血浆能增强来源于脐血的祖细胞和总细胞数的扩增,但更倾向于扩增更成熟阶段的祖细胞^[6]。

2 生物反应器的应用

静置培养体系,如多孔培养板或方瓶,最常用于扩增造血细胞。尽管应用广泛,但在营养成分及代谢产物浓度的调节控制方面有许多局限性。传统的 Dexter 骨髓细胞培养体系是将方瓶中的培养基每周用新鲜培养基置换 50%。由每周换液一半改为每天换液一半,可以增加多孔培养板中的总细胞数和 CFU-GM 的集落数^[7]。由每天半量换液改为每天全量换液并不能进一步改善培养结果,这可能是由于每天全量换液使细胞分泌的一些重要因子丢失,或者是破坏了基质细胞和造血细胞间的相互作用。

持续灌流生物反应器可以连续置换培养系统中的培养基,但并不影响重要因子的浓度,也不会造成细胞的机械损伤。早期的持续灌流系统与静态培养相比较,可以进一步促进小鼠骨髓细胞的生长^[8],此外,它还可以促进脐血 LTC-IC 扩增^[9]。与静态培养相比较,持续灌流系统可以将葡萄糖和 IL-3 保持在较高水平,而将乳酸保持在较低水平。类似的持续灌流系统还可以扩增人骨髓细胞 CFU-GM 和 BFU-E^[10]。

由于培养环境一致,悬浮搅拌系统在样品和数据的收集及培养条件的控制等许多方面都要优于静置培养和持续灌流系统,悬浮搅拌已被应用于许多动物细胞的培养。已有报道表明相对于静置培养,单个核细胞在悬浮搅拌系统中的总细胞数、集落形

成细胞数及 LTC - ICs 均可以得到更大程度的扩增^[11]。

3 造血干/祖细胞的三维培养

为了能更好地模拟体内骨髓微环境的三维结构, Wang 等 in 多孔胶原微球基质中培养小鼠骨髓细胞, 通过电镜发现, 该体系成功地维持了三系造血细胞的生长^[12]。在悬浮的尼龙膜上附着基质细胞后, 可以维持植入的新鲜或冻存过的骨髓细胞的多系统造血: 在大鼠模型中可以维持到 70 天以后, 而人类的则可以维持 12 周以上, 这可以通过流式细胞仪分析和集落形成实验得到证实。James Bagley 等发现, 在一种新型的三维材料 TCPB (tantatunr coated porous biomaterial) 中, 即使经过长期培养后, 造血祖细胞的表型和多能性都可以得到很好的保持、甚至扩增: 在不加细胞因子的情况下培养 1 周后, 造血细胞可以扩增 1.5 倍, 培养 6 周后, 集落形成细胞增加了 6.7 倍; 而在同等条件下的对照实验组中造血祖细胞的活性和多能性都不能很好地保持。这一发现为临床上造血干细胞的扩增、骨髓移植和基因治疗提供了一条新途径^[13]。Mark C. Poznansky 等在一种钽包被的碳基质三维材料上接种上小鼠胸腺的基质细胞后, 与人源骨髓 CD34⁺ 或 AC133⁺ 造血祖细胞共培养 14 天后发现: 该培养体系中生成的细胞 70 % 以上为高度表达 TREC (T cell receptor excision circles) 的 CD3⁺ T 细胞。这表明体外也能生成具有功能的成熟 T 细胞^[14]。该系统为体外研究造血祖细胞生成淋巴细胞的潜能及利用体外培养体系生成 T 细胞来治疗免疫缺陷性疾病提供了可能。另外, 细胞在表层覆盖有胶原的 PVF 树脂上接种基质细胞后, 骨髓细胞的活力可以得到长期很好的保持。将接种有基质细胞的 PVF 植入小鼠体内一段时间后进行组织学检查, 发现其中有宿主来源的造血发生。并且, X - 射线照射破坏造血系统后的受体中移植培养于 PVF 中的骨髓细胞后, 约 15 % 的移植骨髓细胞可以植入受体体内。这表明 PVF 是一种很好的骨髓细胞三维培养材料, 可以很好地保持造血干/祖细胞的活性^[15]。

Athanassios Mantalaris 等在一个生物反应器中装上多孔微球以模拟骨髓的三维环境而对骨髓细胞进行培养。该体系不单是从物理形状上模拟了骨髓的三维环境, 并能象体内骨髓一样支持多系造血: 在低浓度 (0.2U/ml) EPO、SCF、IL - 3、GM - CSF、IGF - 1 (insulin-like growth factor-I) 的作用下, 该培养体系能

长期维持红系造血 (能持续产生红系细胞 5 周以上), 并且, 在所生成的非贴壁细胞中约 60 % 为红系细胞。利用红系细胞特有的表面标志分子 CD71 和 glycophorin - A (GP - A) 对细胞进行的分析表明, 培养系统中产生的细胞包括早期、中期、晚期各阶段的红系细胞。随着培养时间的延长, 红系细胞逐渐向成熟的细胞类型转变。与该三维培养系统相比, 传统的方瓶培养并不能维持长期的红系造血^[16]。这表明三维培养系统能提供一种具有介导红系造血的更接近体内生理条件的微环境, 是一个较好的研究骨髓造血的模型。

4 扩增培养后细胞的体外分析

近年来的研究表明, 造血干细胞的表面表型并不是表示体外扩增后仍具有相应功能的造血干细胞数量的可靠指标。扩增后的细胞中仍具有造血干细胞表型的细胞数量并不与具有髓系和淋巴系造血重建功能的细胞数量增加相关^[17,18]。另外, 尽管祖细胞分析, 如 CFU - GM (colony forming unit of granulocyte macrophage) 在分析未扩增细胞的质量中是一个有用的指标 (CFU - GM 的数量与骨髓造血功能的重建有着直接的关系); 但在扩增后的细胞中应用 CFU - GM 的数量对造血重建功能进行分析则会导致对其功能的过高估计^[19,20]。许多实验室用 LTC - IC (long term culture initiating cell) 或 CAFC (cobblestone area forming cell) 作为干/祖细胞的替代分析^[21]。这些分析在观察原始造血细胞的扩增中十分有用。但值得注意的是仅仅是造血干/祖细胞的替代分析, Larochelle 等已证明在 NOD/SCID 小鼠中重建造血的人类细胞是比 LTC - IC 更为早期的细胞^[22]。

5 扩增细胞的体内分析

一系列免疫缺陷小鼠模型已被用于扩增后的造血细胞的造血重建功能的分析^[23,24,25]。但由于将人的造血干细胞移植到异种造血微环境, 相比于移植到自体或人类异体受者中有很大的区别, 所以这些动物模型仍然仅仅只能作为一种替代分析。将胎儿骨髓或胸腺移植到 SCID 鼠 (severe combined immunodeficient) 以构建一个具有人类造血微环境的动物模型^[26], 该系统已在许多实验室成功应用。但构建 SCID - 人小鼠的不易和构建该模型所需胎儿组织的缺乏, 及须用极限稀释分析来对具有造血功能的细胞进行定量, 所有这些都限制了该模型在评估人类造血干细胞重建造血功能中的应用。

由于 SCID 动物模型只是作为人类造血重建功能的替代分析,为了更好地模拟扩增后的造血干细胞在人体内重建造血时所处的条件,已有研究者用重度骨髓抑制的非人灵长类动物进行实验^[27]。该途径由于在人和非人灵长类动物间存在一些具有交叉反应性的分离造血干细胞的单克隆抗体和交叉活性的重组细胞因子而变得更为切实可行。

6 体外扩增细胞的临床应用

Paquette 等用体外扩增培养 9 天后的外周血祖细胞对 24 名经过化疗后的乳腺癌患者进行移植,移植体外扩增细胞后的患者并未出现毒性作用。其中 11 名患者(46%) 在移植 5 天或 6 天后 $ANC > 500/\mu L$, 而 78 名历史对照组患者中无一人移植后第 6 天出现中性粒细胞恢复的状况;8 名患者(33%) 仅有 3 天甚至更少一些的时间有中性粒细胞缺乏症,11 名患者从未出现中性粒细胞缺乏所引起的发烧或需要接受广谱抗生素的治疗^[27]。

已有研究表明:患者每千克体重移植的 $CD34^+$ 细胞数和造血系统恢复时间之间有着相关性。但每千克体重移植的 $CD34^+$ 细胞数达到一阈值后,再增加 $CD34^+$ 细胞的移植剂量并不能使造血恢复的时间加快。当 $CD34^+$ 细胞移植剂量为 $2-2.5 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 到 $20 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 时,中性粒细胞造血恢复的时间最快为 7 天。Ian McNiece 等对移植过 $CD34^+$ 细胞的两组患者再次输入扩增后的 $CD34^+$ 细胞:第一组($n=10$) 和第二组($n=11$) 输注的剂量分别为 $3.8 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells/kg}$ 和 $6.6 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells/kg}$ 。第一组输注细胞的总剂量(包括未扩增的和扩增后的 $CD34^+$ 细胞)的中位数为 $8.5 \times 10^6 \text{ CD34}^+ \text{ cells/kg}$ 。结果发现,患者达到 $ANC > 500/\mu L$ 的时间和输注的每千克体重 $CD34^+$ 细胞总剂量间无显著相关性($r^2 = 0.24$)。同样,每千克体重输注的扩增后的 $CD34^+$ 细胞剂量与 ANC 恢复时间的相关性也极低($r^2 = 0.24$)。但 ANC 恢复时间与每千克体重输注的扩增后的有核细胞数(TNC, total nucleated cells)之间有着非常显著的相关性($r^2 = 0.79$)。研究中发现,输注剂量最少为 $40 \times 10^6 \text{ TNC/kg}$ 的患者其中性粒细胞造血恢复的时间为 8 天或更少,而输注剂量少于 $40 \times 10^6 \text{ TNC/kg}$ 的患者其中性粒细胞造血恢复的时间较慢(9 到 16 天)。该扩增后的 TNC 输注剂量低于未扩增的骨髓单核细胞移植剂量($2 \times 10^8 \text{ MNC/kg}$),这说明扩增后的细胞中含促进中性粒细胞造血恢复的细胞含量高。在第二组病人中只输

注扩增后的细胞以考察扩增后的细胞的长期移植能力,所有患者到现在已经移植后 12 个月,而造血系统继续保持稳定。为了鉴别患者体内长期重建造血的能力并非来自患者体内自身残留的干细胞,应对扩增后的细胞进行基因标记并证明标记细胞能在患者体内长期重建造血。对第二组患者输注的扩增后细胞同时在 SCID 小鼠中进行的 SRC (SCID repopulating cells) 分析表明,扩增后的细胞中存在 SRC。而在移植未扩增细胞和扩增细胞的患者之间,其血小板恢复时间并无显著差别^[28]。

7 结语

研究表明,体外扩增后的造血祖细胞能缩短大剂量化疗后的癌症患者中性粒细胞的恢复时间^[27,28],而为了使中性粒细胞更快地移植,Ian McNiece 等应用了一种两步扩增培养法,该方法能增加有核细胞的产量及产生更为成熟的中性粒细胞前体细胞^[28]。随着各种新的生长因子的发现和各种新的培养体系和方法的建立,造血干/祖细胞的体外培养和扩增势必取得更大进展,这将为临床细胞治疗提供更有力的支持,也会推进造血干细胞生物学的发展。在上述各种培养方法中,造血干/祖细胞的三维培养为造血调控的体外研究提供了一个很好的模型,或许在不久的将来,人工骨髓就会为许多患者带来福音。

参考文献

- [1] Scheding S, Kratz-Albers K, Meister B et al. Semin Hematol 1998, 35:232 - 240.
- [2] Dybedal I, Jacobsen SEW. Blood 1995, 86:949 - 957.
- [3] Krystal G, Lam V, Dragowska W et al. J Exp Med 1994, 180:851 - 860.
- [4] De Bruyn C, Delforge A, Bron D et al. Stem Cells 1994, 12:616 - 625.
- [5] Lill MC, Lynch M, Fraser JK et al. Stem Cells 1994, 12:626 - 637.
- [6] Ruggieri L, Heinfield S, Broxmeyer HE. Blood Cells 1994, 20:436 - 454.
- [7] Schwartz RM, Palsson B, Emerson SG et al. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:6760 - 6764.
- [8] Koller MR, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller. Ann NY Acad Sci 1992, 665:105 - 116.
- [9] Koller MR, Bender JG, Miller WM et al. Biotechnology 1993, 11:358 - 363.
- [10] Palsson B, Paek S-H, Schwartz RM et al. Biotechnology 1993, 11:368 - 372.
- [11] Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM. Biotechnology 1994, 12:909 - 914.

- [12] Wang TY, Brennan JK, Wu JH et al. *Exp Hematol* 1995, 23:26 - 32.
- [13] James Bagley, Michael Rosenzweig, Douglas et al. *Exp Hematol* 1999, 27:496 - 504.
- [14] Mark C. Poznansky, Richard H. Evans, Russell B. Foxall et al. *Nature Biotechnology* 2000, 18:729 - 734.
- [15] Tunt T, Miyoshi H, Ema H et al. *ASAIO J* 2000, 46(5): 522 - 526.
- [16] Athanassios Mantalaris, Peter Keng, Patricia Bourne et al. *Biotechnol Prog* 1998, 14:126 - 133.
- [17] Allbella B, Segovia JC, Bueren JA. *Blood* 1997, 90:464 - 470.
- [18] Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE et al. *Blood* 1998, 92:1131 - 1141.
- [19] Bhatia R, McGave PB, Miller JS et al. *Exp Hematol* 1997, 25:980 - 981.
- [20] Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H et al. *Nature Medicine* 1996, 2:1329 - 1337.
- [21] Guenechea G, Segovia JC, Albella B et al. *Blood* 1999, 93:1097 - 1105.
- [22] Dao MA, Hashino K, Kato I et al. *Blood* 1998, 92:4612 - 4621.
- [23] Brandt JE, Galy AHM, Luens KM et al. *Exp Hematol* 1998, 26: 950 - 961.
- [24] Norol F, Drouet M, Debili N et al. *Blood* 1998, 92(suppl 1): 127a.
- [25] Reiffers J, Cailliot C, Dazey B et al. *Lancet* 1999, 354(9184): 1092.
- [26] Paquette R: Clinical experience with ex vivo expanded unselected peripheral blood progenitor cells. *Int Conference on Hematopoietic Stem Cell Biology and Transplantation*. 2000, Paris, France.
- [27] Ian McNiece, Roy Jones, Scott I. Bearman et al. *Blood* 2000, 96(9):3001 - 3007.
- [28] Ian McNiece, Dax Kubegov, Patrick Kerzic et al. *Exp Hematol* 2000, 28:1181 - 1186.

Ex Vivo Expansion and Clinical Application of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells

Xiong Fuyin, Chen Zhaolie

(Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract During the past few years, ex vivo culture and expansion of hematopoietic stem/progenitor cell have progressed significantly: including using a variety of bioreactor systems and establishing three dimensional culture system. Preliminary success has been achieved in application of ex vivo expanded hematopoietic cells in animal model and clinical trials.

Key words Hematopoietic stem/progenitor cells, Culture Expansion