

人脐带间充质干细胞对小鼠衰老进程中骨髓细胞集落生成的影响

许婷婷, 李 军, 周艳华, 谭广销, 刘革修

(暨南大学医学院血液病研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)对小鼠衰老进程中骨髓造血干细胞增殖能力的影响。方法: 由足月新生儿脐带分离间充质细胞(MSC)作供体, 6月龄 Balb/c 小鼠为受体, 将小鼠随机分为实验组和对照组, 实验组输注 MSC(5×10^5 /只), 每月1次, 共4次; 对照组输注生理盐水。干预开始后第3个月和第6个月分别比较两组的单侧股骨骨髓有核细胞计数(BMNC)、造血祖细胞集落培养(CFU-GM、CFU-E、CFU-MK)和外源性脾集落形成单位计数(CFU-S)。结果: 干预后第3个月时, 实验组 BMNC、CFU-GM 和 CFU-MK 高于对照组, 而 CFU-E 和 CFU-S 无明显差别; 干预后第6个月时, 实验组的上述指标均明显高于对照组, 且随着衰老出现下降的速度明显慢于对照组, 差异有显著性($P < 0.05$)。结论: 定期输注 hUC-MSC 可以相对增加宿主自身造血干细胞的生物学活性, 从而延缓小鼠造血组织的自然衰老进程。

[关键词] 间质干细胞; 脐带; 衰老; 造血干细胞; 集落生成单位(CFU)

[中图分类号] Q813 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0614-05

Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell on the colony-forming unit of bone marrow cells in aging mice

XU Ting-ting, LI Jun, ZHOU Yan-hua, TAN Guang-xiao, LIU Ge-xiu

(Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To explore the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC) on proliferative potential of hematopoietic stem cell/progenitor cell in bone marrow of aging mice. **Methods:** Human umbilical cord MSC obtained from full-term newborn infant were used as the donor, 6-month-old mice were used as the recipients which were randomly divided into two groups, experimental group were injected with MSC in a dosage of 5×10^5 /mouse, then repeated it for 3 times after every each month; while control group were injected with physiological saline correspondingly. After treated with MSC, on the third month and sixth month, compared the bone marrow nucleated cell count (BMNC), hematopoietic progenitor cell colony culture count (CFU-GM, CFU-E, CFU-MK) and exogenous spleen colony-forming units count (CFU-S) between two groups. **Results:** On the third month, BMNC, CFU-GM and CFU-MK of experimental group were higher than that of control group, with no significant difference on CFU-E and CFU-S; on the sixth month, all the indexes mentioned above of experimental group were much higher significantly than that of control group. The descending-tendency of all these indexes

[收稿日期] 2009-06-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30670902)

[作者简介] 许婷婷(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 间充质干细胞的基础与应用

通讯作者: 刘革修, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, Tel: 020-85220262; E-mail: tliugx@jnu.edu.cn

shown during the six months in experimental group was much slower than that in control group with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Regular injection of hUC-MSC could relatively improve the biological activity of hematopoietic stem cell/progenitor cell in bone marrow, therefore delay the recession of hematopoietic system of aging mice.

[Key words] mesenchymal stem cell; human umbilical cord; aging; hematopoietic stem cell; colony-forming unit (CFU)

当前,我国同世界上大多数国家一样,正快速步入老龄化社会,我国有超过3亿年龄60岁以上的老年人。衰老(aging or senescence)是复杂的自然现象,表现为机体结构和机能衰退,适应性和抵抗力降低。造血系统衰老主要表现为一系列复杂的造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)与多能干/祖细胞自我复制和增殖活性的下降。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)作为造血微环境主要成分——基质细胞的干/祖细胞,可分泌许多HSC生长因子,调节造血干细胞的生长和增殖分化^[1-2]。近年来许多研究证实骨髓MSC的质量和含量会随年龄的增长而不断的下降^[3];人类新生儿、青少年、50岁及80岁成年人骨髓中MSC克隆与骨髓有核细胞数的比率分别为1:10 000、1:100 000、1:400 000及1:1 000 000~1:2 000 000^[4];65岁以上人骨髓MSC增殖速度远低于65岁以下者^[5];而且MSC在体外随着传代次数的增加,MSC的增殖能力、成骨成脂能力也均有所下降,出现衰老迹象^[6]。MSC的不断衰老可导致其对造血系统的支持调控作用降低,本研究从健康新生儿脐带中分离的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSC)对小鼠自然衰老进行干预研究,观察其是否对造血系统有积极作用,为抗衰老研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)脐带 选择在暨南大学第一附属医院行足月剖宫产的新生儿脐带,产妇产前无传染性疾病,新生儿无畸形,并征得产妇同意。

(2)实验动物 6月龄雌性Balb/c纯系小鼠40只用于hUC-MSC对老年小鼠的干预实验;8周龄雌性Balb/c小鼠32只用于外源性脾集落形成单位计数测定,SPF级,体质量(20 ± 2)g,购自南方医科大实验动物中心,动物合格证号:0052825。

(3)主要试剂 DMEM-F₁₂培养基(Dulbecco's modified eagle's medium-F₁₂)、IMDM培养基(Iscove's

modified dulbecco's medium)、胶原酶IV和胰蛋白酶购自Gibco公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自PAA公司,PE标记的抗CD34、CD45、CD106, FITC标记的抗CD44、CD29、CDHLA-DR单克隆抗体及小鼠相应的同型对照购自Becton Dickinson公司,甲基纤维素购自美国Sigma公司,促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、干细胞生长因子和促血小板生成素购自Peprotech公司。

1.2 方法

(1)人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)的分离、培养、扩增及免疫表型鉴定 按文献[7]方法改进,脐带经PBS液冲洗剪碎,经等体积的体积分数为0.2%胶原酶IV消化4h,混悬液过200目筛网,收集滤过液,用PBS充分稀释后,离心并漂洗,得到悬浮细胞,计数接种于含体积分数为10%FBS的DMEM-F12完全培养液的培养瓶中,置于37℃、体积分数为5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,3d后全量换液,弃去非贴壁细胞,约5d或细胞融合达80%时,用质量分数0.25%胰酶消化,按1:2传代。以后每2d完全换液1次,约4d传代1次,留第2~4代细胞备用。用流式细胞仪检测其表面标志,取第4代细胞,用胰蛋白酶消化后,PBS洗涤3次,调整细胞至 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ /mL,分为每管0.1mL。阴性对照管加入鼠IgG-FITC、IgG-PE;其它管分别加入鼠抗人抗体CD106-PE、CD45-PE、CD34-PE、CD29-FITC、CD44-FITC、HLA-DR-FITC各20μL,室温孵育30min,流式细胞仪计数 $5.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 细胞。

(2)hUC-MSC输注对Balb/c小鼠衰老过程中骨髓细胞增殖能力的影响 6月龄雌性Balb/c小鼠40只,随机取8只小鼠,用于干预前测定骨髓有核细胞计数、造血祖细胞集落培养和外源性脾集落形成单位计数,作为实验前对照。剩余32只小鼠随机分为实验组和对照组,各16只,编号:实验组为1~16号,对照组为17~32号。饲养于层流无菌环境,无菌饮食、饮水。实验组为MSC干预组:经尾静脉输注hUC-MSC 0.1mL(含 5.0×10^5 个),每月输注

MSC 1次,共4次;对照组为未干预组:经尾静脉输注0.1 mL生理盐水,每个月后重复输注1次,共4次。两组小鼠分别于干预开始后第3个月和第6个月测定骨髓有核细胞计数(bone marrow nucleated cell, BMNC)、粒细胞-巨噬细胞集落培养计数(colony-forming unit-granulocyte macrophage, CFU-GM)、红细胞集落培养计数(colony-forming unit-erythrocyte, CFU-E)、巨核细胞集落培养计数(colony-forming unit-megakaryocyte, CFU-MK)和脾集落形成单位计数(colony-forming unit-spleen, CFU-S)。

①骨髓有核细胞计数(BMNC):于第3个月时处死第1~8号和17~24号小鼠,无菌条件下取出左侧股骨,按照常规方法,计数骨髓有核细胞。将制备好的细胞放置于4℃、含体积分数为2% FBS的培养基中保存,用于祖细胞集落培养和外源性脾结节测定。于第6个月时处死剩下的第9~16号和25~32号小鼠,方法同上。

②造血祖细胞集落培养:将制备好的骨髓有核细胞,接种于24孔板,0.5 mL/孔,1个复孔。CFU-GM培养体系:含体积分数为20%的FBS、质量浓度为60 ng/mL的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、质量浓度为20 ng/mL的干细胞因子(SCF)、接种密度为 2.0×10^5 /mL骨髓有核细胞和含质量分数为0.8%的甲基纤维素的IMDM培养基;CFU-E培养体系:含体积分数为20%的FBS、质量浓度为4 IU/mL的促红细胞生成素(EPO)、质量浓度为20 ng/mL的干细胞因子(SCF)、接种 2.0×10^5 /mL骨髓有核细胞和含质量分数为0.8%的甲基纤维素的IMDM培养基;CFU-MK培养体系:含体积分数为20%的FBS、质量浓度为60 ng/mL的促血小板生成素(TPO)、质量浓度为20 ng/mL的干细胞因子(SCF)、接种 2.0×10^5 /mL骨髓有核细胞和含质量分数为0.8%的甲基纤维素的IMDM培养基。置于37℃、体积分数

为5% CO₂、饱和湿度培养箱中孵育,3 d后计数CFU-E集落数,大于8个细胞计数为1个集落;7 d后计数CFU-GM集落数,大于50个细胞计数为1个集落;14 d后计数CFU-MK集落数,大于3个细胞计数为1个集落。

③脾集落形成单位计数(CFU-S):受者为8周龄雌性Balb/c小鼠。受体小鼠在接受致死量⁶⁰Coγ(8 Gy)照射后4 h左右,由尾静脉注射上述过程中得到的骨髓细胞各0.2 mL(2.0×10^5 个)。两周后,脱颈处死取出脾脏,浸在Bouin氏液中24 h,体积分数为80%乙醇中脱色3 d即每天换液1次,进行CFU-S计数。该计数反映供体小鼠骨髓细胞居留在脾脏造血组织中的干细胞数量,于干预后第3个月对第1~8号与17~24号小鼠进行测定比较,于第6个月对第9~16号与25~32号小鼠进行测定并比较。

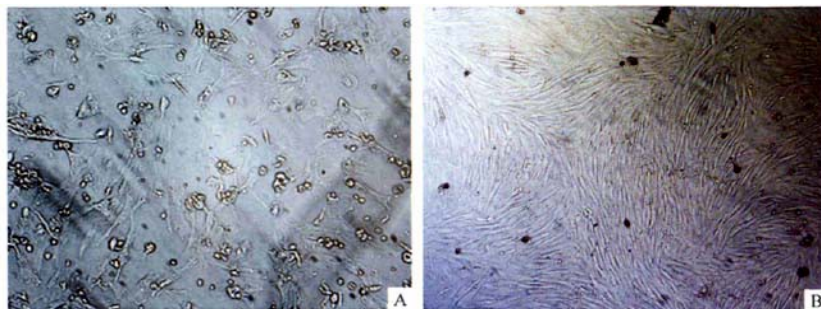
1.3 统计学处理方法

各组用(均数±标准差)($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 16.0统计软件,两组间的比较采用Independent-Sample T test检验,多因素实验采用Univariate析因分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)的分离、培养、扩增及免疫表型鉴定

从脐带组织中分离的细胞,小部分于12 h内开始贴壁(图1A),3 d内大部分细胞贴壁,细胞呈梭形、多角形,并可见多个细胞形成集落,但仍有不少圆形细胞混杂其中。4 d后传代,传代后的细胞主要呈长梭形,形态较原代均一,以平行排列生长为主,或呈漩涡状生长(图1B)。经流式细胞术检测,人脐带MSC强表达CD44、CD29,不表达造血干细胞标志CD34和CD45,不表达HLA-DR和CD106(图2)。



A 原代培养第24 h(×100);B 第3代细胞(×100)

图1 人脐带间充质干细胞的形态特征

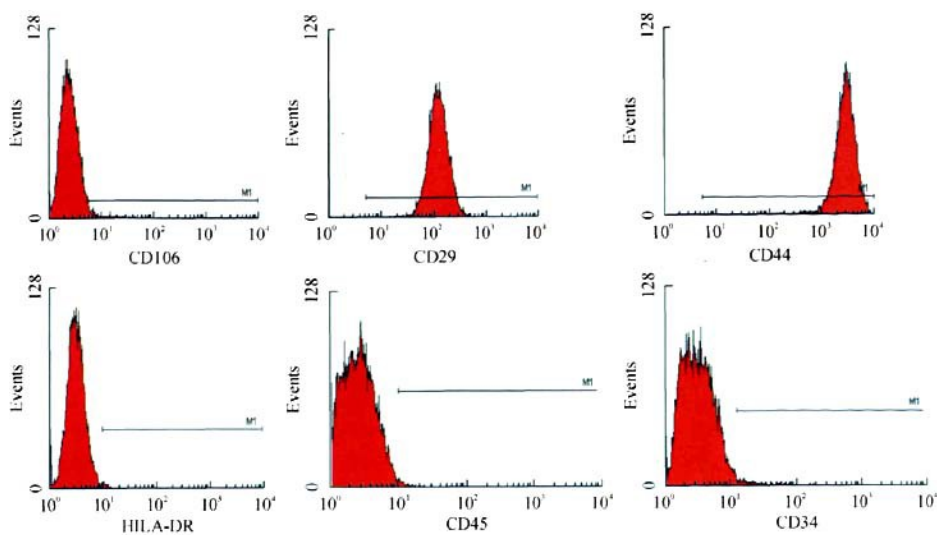


图2 人脐带间充质干细胞的细胞表面标志

2.2 hUC-MSC 输注对 Balb/c 小鼠衰老过程中骨髓细胞增殖能力的影响

干预后第 3 个月时,实验组的 BMNC、CFU-GM 和 CFU-MK 计数多于对照组,而 CFU-E 和 CFU-S 无

明显差别;干预后第 6 个月时,实验组的上述指标均明显高于对照组。经干预前、第 3 个月、第 6 个月出现不断下降,但实验组的下降速度明显慢于对照组,差异有显著性($P < 0.05$,表 1)。

表 1 人脐带 MSC 对小鼠 BMNC($\times 10^6$ /根股骨)计数、造血祖细胞集落生(个/ 2.0×10^5 BMNC)和 CFU-S(1.0×10^5 BMNC)($\bar{x} \pm s$)的影响

分组	干预前	实验组		对照组	
		第 3 个月	第 6 个月	第 3 个月	第 6 个月
BMNC ¹⁾	9.9±2.1	10.0±1.2 ²⁾	9.4±0.8 ⁴⁾	8.9±1.2	7.9±0.7
CFU-GM ¹⁾	37.0±8.7	35.1±6.5 ³⁾	31.6±8.6 ⁴⁾	27.5±8.3	21.3±9.6
CFU-E ¹⁾	29.9±6.0	25.8±7.8	25.6±6.9 ⁴⁾	25.3±7.0	19.0±6.1
CFU-MK ¹⁾	54.5±11.4	57.9±12.4 ²⁾	52.4±11.6 ⁴⁾	49.9±12.1	41.1±9.2
CFU-S ¹⁾	44.3±9.2	42.5±10.7	42.5±4.9 ⁴⁾	40.6±11.0	33.6±8.4

1) 实验组与对照组相比,其指标随时间变化的趋势不同, $P < 0.05$; 2) 与对照组第 3 个月时相比, $P < 0.05$; 3) 与对照组第 3 个月时相比, $P < 0.01$; 4) 与对照组第 6 个月时相比, $P < 0.01$

3 讨论

造血系统的衰老包括 HSC 和 MSC 的衰老两部分。造血干祖细胞数量及增殖活性的降低是造血系统衰老的关键部分,与全身各器官的营养供应及免疫防御密切相关。骨髓 MSC 是造血微环境的重要组成部分,对造血干祖细胞的自我更新和增殖分化具有重要的调控作用。有研究表明 MSC 来源较广泛、分离培养较方便、移植技术相对简单,尤其是 MSC 移植免疫反应弱。本实验通过检测骨髓有核

细胞计数、造血祖细胞集落培养和 CFU-S,发现自然衰老中的小鼠经 hUC-MSC 干预后,三者的下降速度都被不同程度的延缓,说明 hUC-MSC 输注可以延缓小鼠造血系统的自然衰老,同时也表明 hUC-MSC 属于较原始的、较早期的 MSC,具有较强的造血干祖细胞增殖调节活性。
MSC 的造血支持作用与其自身活性有关,而后者又与其不同的来源密切相关。人胚胎来源的

MSC与骨髓来源的MSC(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBM- MSC)相比,群体倍增时间短、传代能力强^[8];来源于早期胚胎的卵黄囊MSC,其自我更新和促进造血的能力强于成体MSC^[9]。来源的组织越原始,其MSC活性越强。最初,成人骨髓是MSC的主要来源,但是其数量及增殖分化潜能随供者年龄的增加而下降^[10],短时间不能扩增至临床所需要的细胞数量,而且病毒感染率较高,供者MSC的采集须行骨髓穿刺术,来源受到限制,使MSC的临床应用受到约束。最近研究发现新生儿脐带中存在丰富的MSC^[11],与hBM- MSC相比,其优势不仅在于来源广泛、取材容易且对供者无任何损伤、无伦理问题等,更为重要的是hUC- MSC的来源为极原始的胚胎性组织,其倍增时间短、活性更强,且免疫原性更弱,对造血系统的支持作用更强,移植效果更好。HUC- MSC的高分离成功率、高含量和高增殖特性使其有望成为骨髓的替代来源。

[参考文献]

- [1] STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008, 129(3): 163 - 173.
- [2] 郭子宽,唐佩弦,刘晓丹,等. 人骨髓间充质干细胞支持体外造血[J]. *中国实验血液学杂志*, 2000, 8(2): 93 - 96.
- [3] KOTEV EMETH S, SAVION N, PRI CHEN S, et al. Effect of maturation on the osteogenic response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor [J]. *Bone*, 2000, 27(6): 777 - 783.
- [4] SERVICE R F. Tissue engineering build new bone [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1498 - 1500.
- [5] MUELLER S M, GLOWACKI J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges [J]. *Cell Biochemical*, 2001, 82(4): 583 - 590.
- [6] 胡静波,周燕,蒋丹丹,等. 体外扩增过程中人骨髓间充质干细胞的增殖与分化规律[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(1): 7 - 10.
- [7] 吕璐璐,宋永平,魏旭东,等. 人脐带和骨髓间充质干细胞生物学特征的对比研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(1): 140 - 146.
- [8] SUN X, XU W, XU H, et al. Study of isolation and basic biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human different tissues [J]. *Journal of Jiangsu University*, 2005, 15(5): 369 - 372.
- [9] 那晓东,赵自平,张秀明,等. 人卵黄囊间质干细胞多向分化潜能的实验研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2005(S1): 95 - 98.
- [10] HUANG K, ZHOU D, HUANG S, et al. Age-related biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells from different age donors [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2005, 13(6): 1049 - 1053.
- [11] QIAO C, XU W, ZHU W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord [J]. *Cell Biology International*, 2008, 32(1): 8 - 15.

[责任编辑:朱颖娜]