

Wnt3a 转基因基质细胞的建立及其对脐血 CD34⁺造血干/祖细胞扩增作用的研究*

师伟 韩姝 李艳华 谢小燕 施双双 陈琳
白慈贤 闫舫 南雪 王韞芳 裴雪涛**

(军事医学科学院输血研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 Wnt 信号通路在造血干/祖细胞自我更新的过程中发挥至关重要的作用. 纯化的 Wnt3a 蛋白可以实现造血干/祖细胞的扩增. 通过病毒转染原代小鼠骨髓基质细胞, 建立转基因滋养层细胞. 通过共培养对转基因滋养层细胞扩增 CD34⁺造血干/祖细胞的作用进行了研究. 实验结果显示, 与普通滋养层加细胞因子组相比, 经转基因滋养层加细胞因子组培养的 CD34⁺造血干/祖细胞集落形成能力 (CFC) 是其 (1.55±0.06) 倍; 混合集落形成能力是其 (1.95±0.26) 倍; 高增殖潜能集落形成能力 (HPP-CFC) 是其 (1.45±0.40) 倍; LTC-IC 活性是其 (3.83±0.86) 倍. 结果表明, 转基因滋养层细胞通过分泌具有天然活性的 Wnt3a 蛋白能在体外有效地扩增造血干/祖细胞的数量.

关键词 Wnt3a, 滋养层细胞, 造血干/祖细胞, 扩增

学科分类号 Q71

目前造血干细胞移植已经成为临床多种血液疾患和肿瘤大剂量放疗化疗患者骨髓重建的重要手段. 为得到治疗所需的细胞数量, 许多科学家试图通过不同手段 (包括使用饲养细胞以及各种细胞因子联用等) 对造血干/祖细胞进行规模化扩增. 但是目前常用的方法扩增造血干细胞的效率十分有限, 而且造血干细胞在体外扩增的过程中自我更新能力下降并显示出分化的特征, 依然不能从根本上解决造血干细胞移植面临的供体严重短缺的问题^[1].

1982 年 Nusse 首次从小鼠乳腺癌中克隆出了 Wnt 基因, 后来人们又从不同物种分离出多种 Wnt 基因, 这些基因共同组成了 Wnt 家族. 研究表明, Wnt 通过复杂的信号传递通路控制胚胎早期的发育, 决定细胞分化、细胞增殖及生长的调节^[2]. 近来研究证明, Wnt3a 基因在造血干/祖细胞自我更新的过程中发挥至关重要的作用^[3]. 提高其表达水平不仅可以扩增造血干/祖细胞数量、减轻其分化; 而且不影响其重建造血的功能. 值得注意的是虽然 Wnt3a 编码分泌型蛋白, 但经通常方法纯化得到的 Wnt3a 蛋白在外界条件下极易发生去棕榈酰化, 这样纯化得到蛋白质就丧失活性而不能发挥其正常功能^[4].

在体外扩增造血干/祖细胞的研究中, 常采用骨髓基质细胞作为滋养层, 通过细胞间接触作用和其分泌的细胞因子协同其他细胞因子, 从而支持造

血干/祖细胞扩增. 本研究试图建立转 Wnt3a 滋养层, 通过骨髓基质细胞分泌出天然状态的具有活性的 Wnt3a 蛋白, 提高其扩增造血干/祖细胞的效率, 建立一种高效的造血干/祖细胞扩增新方法, 为临床造血干细胞移植提供稳定、高质量的细胞来源.

1.1 材料及试剂盒

各种分子生物学内切酶、连接酶均为 TaKaRa 公司产品; pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司; BSA、甲基纤维素、2-巯基乙醇、HRP 为 Sigma 公司产品; AdEasy Vector System 购自 Quantum Biotechnologies 公司; 脐血取自北京中西医结合医院妇产科足月顺产产妇; 磁性细胞分离仪和 CD34⁺ 细胞分离试剂盒 (miniMACS magnetic cell sorting system) 购自 Miltenyi Biotech GmbH 公司; IMDM、 α MEM、胎牛血清、马血清和脂质体 lipofectAMINE 为 Gibco 公司产品; 造血集落培养和 LTC-IC 检测采用的试剂盒为 Stem Cell 公司 Methocult™ GF H4434、Methocult™ H5100; 淋巴

*国家重点基础研究发展规划项目(973)(2001CB509906)和国家高技术“863”计划重大专项资助项目(2002AA205051, 2003AA205160).

**通讯联系人.

Tel: 010-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2005-04-05, 接受日期: 2005-05-27

细胞分离液购自天津中国医学科学院血液学研究所; rhIL3、rhG-CSF、rhGM-CSF 等均购自 Peprotech 公司; 细胞培养板为 Nunc 公司产品; Wnt3a 单克隆抗体购自 R&D 公司.

1.2 Wnt3a 基因的获得

以小鼠胎盘 cDNA 为模板, 通过 PCR 得到目的基因 Wnt3a. 引物如下: P1 5' TCTAGAGTT AACATGGCTCCTCTCGGATACCT 3'; P2 5' AGA TCT GGA TCCCTACTTGACAGGTGTGCAC GT 3'. PCR 条件为: 94℃ 变性 3 min; 94℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 2 min, 28 个循环; 72℃ 7 min. 反应产物克隆至 pGEM-T easy 载体, 并进行测序.

1.3 重组病毒载体的构建

将目的基因片段插入到 pAdTrack 载体获得重组质粒 pAdTrack-Wnt3a. pAdTrack-Wnt3a 用 *Pme* I 线性化后, 凝胶回收 10 000 bp 的目的片段, 去磷酸化乙醇沉淀后, 将其转入含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌中, 挑取克隆, 抽提得到重组病毒质粒 pAd-Wnt3a. 用 *Pac* I 对 pAd-Wnt3a 重组病毒质粒进行酶切鉴定, 然后在 DH5 α 菌中进行二次转化, 获得稳定的重组腺病毒载体.

1.4 重组病毒载体在 293 细胞的包装、病毒纯化和滴度测定

提取 pAd-Wnt3a 质粒 DNA, 用 *Pac* I 酶切, 回收 39 000 bp 的片段. 用 lipofectAMINE 转染 293 细胞. 7~10 天后可观察到多数 293 细胞中有 GFP 的表达 (发生 CPE 现象), 然后收取细胞, 在 -70℃/37℃ 条件下反复冻融 4 次, 裂解细胞, 离心取含病毒的上清再次感染 293 细胞以扩增重组病毒, 3 天后收集细胞, 反复冻融 3 次. 取 200 μ l 毒液加至 293 细胞培养瓶中, 于 37℃ 孵育 3 h, 换新鲜培养基继续培养 18~24 h, 于荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞数, 并计算病毒滴度.

1.5 转基因基质细胞滋养层的建立

1.5.1 原代小鼠基质细胞的分离与培养. 取 BABL/c 小鼠股骨和胫骨, 用针管抽 PBS 将骨髓冲出, 用 200 目筛网过滤, 1 500 r/min 离心 4 min. 将细胞重悬于玻璃离心管中, 接种培养. 接种后 7 天首次换液. 之后, 3~4 天换液 1 次, 7~10 天传代. 传 3~4 代后备用^[5].

1.5.2 建立高效、稳定表达 Wnt3a 的骨髓基质细胞. 弃去培养液, 加入 1~2 ml 的 α -MEM 培养基. 然后向其加入毒液, 二氧化碳培养箱中培养 3 h, 再加入新鲜培养液, 孵育 72 h, 荧光显微镜下观

察. 体外扩大培养转 Wnt3a 的骨髓基质细胞, 2.0 $\times$ 10⁵/ml 接种 24 孔板, 待细胞长至 90% 以上时接受 ⁶⁰Co γ 射线 10.5 Gy^[6] 照射, 建立滋养层细胞.

1.5.3 转基因滋养层细胞分泌蛋白的检测. 转基因滋养层细胞建立后, 任意选取种有该细胞的 24 孔板中的 4 孔细胞, 将其换为无血清培养. 24 h 后, 收集培养基, 超滤浓缩至 400 μ l, 分装冻存. 同法处理未转基因的滋养层细胞作为对照.

蛋白质检测: 取 15 μ l 浓缩液进行蛋白质免疫印记杂交, 其中一抗是 Wnt3a 单克隆抗体, 二抗是羊抗大鼠 IgG.

蛋白质分泌量: 取 15 μ l 浓缩液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 对结果中 Wnt3a 的电泳条带的点密度与电泳标准点密度进行比较, 半定量计算 Wnt3a 蛋白 24 h 的分泌量.

1.6 脐血 CD34⁺ 细胞的分离

1.6.1 脐血 MNC (mononuclear cell) 的制备. 脐血按 1:1 与 PBS 混匀, 再加入总体积 1/4 的含 0.5% 甲基纤维素的生理盐水, 室温静置 30 min, 吸取血浆层, 1 500 r/min 离心 8 min, 弃上清, 细胞用 PBS 悬浮, 按 1:1 缓慢滴加淋巴细胞分离液 Ficoll (1.0770 $\pm$ 0.000 2) g/L 界面上, 采用密度梯度离心法 (20℃ 1 500 r/min 离心 20 min) 分离脐血 MNC. 吸取 MNC 层 (中间界面白膜层), PBS 洗涤 3 次, 调整细胞浓度备用.

1.6.2 脐血 CD34⁺ 细胞的标记. 每 10⁸ 脐血单个核细胞 (MNC) 悬浮于 300 μ l PBS 中, 加 100 μ l 非特异性阻断抗体 FcR 封闭剂, 混匀. 然后再加 100 μ l 磁珠偶联的 CD34 单克隆抗体 (QBEND10), 混匀, 4℃ 孵育 30 min. 用 PBS 洗 2 次, 1 500 r/min 离心 4 min, 然后用 PBS 悬浮备用.

1.6.3 脐血 CD34⁺ 细胞的分选. 将分离柱置于磁场中, 以 PBS 冲洗分离柱, 将标记的脐血 MNC 悬液缓慢加入并通过分离柱, 待其自然流出后用 500 μ l PBS 洗涤不结合的细胞. 将分离柱移出磁场, 加 1 ml PBS 加压洗脱吸附细胞, 收集组份为 CD34⁺ 细胞.

1.7 CD34⁺ 细胞与滋养层细胞的共培养

将 CD34⁺ 细胞加入含有 50 μ g/L rhSCF、10 μ g/L rhIL-3、10 μ g/L 1 rhIL-6、2 U/ml EPO 和 20 μ g/L rhFL 的 IMDM 培养基中, 接种于铺好滋养层细胞的 24 孔板 (2.0 $\times$ 10⁵/孔), 细胞密度为 1.0 $\times$ 10⁴/ml, 每孔 1 ml 培养体系. 试验组孔板中的滋养层细胞为转 Wnt3a 的骨髓基质细胞. 对照组为未转

Wnt3a的骨髓基质细胞. 每组 3 孔. 24 孔板置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 12 天. 试验分组依次为: 转基因滋养层加因子、转基因滋养层、滋养层、滋养层加因子.

1.8 混合集落 (CFC) 培养及计数

1000 个细胞接种于 0.5 ml Methocult™ GF H4434 中, 按 24 孔板中每孔加入 0.5 ml, 培养至 14~16 天形成的各种集落. 细胞和集落计数采用血球计数板, 取 3 次计数平均值. 集落计数在倒置显微镜 (Nikon) 下直接观察, 大于 50 个细胞的为一个集落, 取 3 个平行孔的平均值.

1.9 高增殖潜能集落形成细胞 (HPP-CFC) 的集落培养及计数

1000 个 CD34⁺ 细胞接种于 0.5 ml Methocult™ GF H4434 中, 按 24 孔板中每孔加入 0.5 ml, 培养至 14 天时每孔滴加 0.2 ml 含 20% 脐血血浆的 IMDM, 继续培养至 28 天, 在倒置显微镜 (Nikon) 下计数直径 > 0.5 mm (细胞数 > 5 万) 的细胞集落为一个 HPP-CFC, 取 3 个平行孔的平均值.

1.10 细胞周期分析

培养 12 天后, 收集转基因滋养层加因子组和未转基因滋养层加因子组中的细胞, 用 PBS 洗涤后, 每 10⁶ 细胞用 1 ml 70% 冷乙醇固定, 4℃ 冰箱过夜. 用 PBS 洗去乙醇, 加入 200 μl PBS 配制的 1 g/L RNaseA, 37℃ 作用 30 min, 再加入 400 μl 含 1.0% Triton X-100、0.9% NaCl 的 50 mg/L PI 染液重悬, 进行 DNA 染色, 4℃ 避光 30 min. 最后 PBS 洗涤 3 次, 以 FACS Sort 流式细胞仪读取分析数据.

1.11 LTC-IC 活性检测

培养 12 天后, 从转基因滋养层加因子组和未转基因滋养层加因子组中分别取 2×10⁵ 个细胞, 将其接种至事先已经铺好小鼠骨髓基质细胞 (经照射) 的 24 孔板中, 每孔中加入 Methocult™ H5100 培养基 1ml, 每周半量换液. 培养 5 周后将孔内所有的细胞接种于 Methocult™ GF H4434 中. 按 24 孔板中每孔加入 0.5 ml, 培养至 14~16 天计算每孔中 CFC 个数. 每组 3 个复孔, 取平均值.

1.12 统计学分析

数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用具有重复测量的方差分析与两两比较 *q* 检验 (SAS 软件) 检验判断组间差异.

2 结 果

2.1 基因获得与载体构建

通过设计特异引物从小鼠胎盘 cDNA 中扩增 Wnt3a 基因 (图 1), 并插入 T 载体中, 随机选择 4 个克隆以通用引物进行测序, 与 GenBank 相比其结果正确. 大小为 1 059 bp. 测序正确的 T-Wnt3a 质粒酶切回收后, 将 Wnt3a 片段插入到 pAdTrack 载体, 获得重组质粒 pAdTrack-Wnt3a. 对其进行正、反向测序及分析表明, 其开放阅读框正确. 腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 转入 BJ5183 菌中, 再将线性化的 pAdTrack-Wnt3a 转入含有 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌, 最终得到重组病毒质粒 pAd-Wnt3a (图 2). 用 *Pac* I 对 pAd-Wnt3a 重组病毒质粒进行酶切鉴定 (图 3), 结果正确.

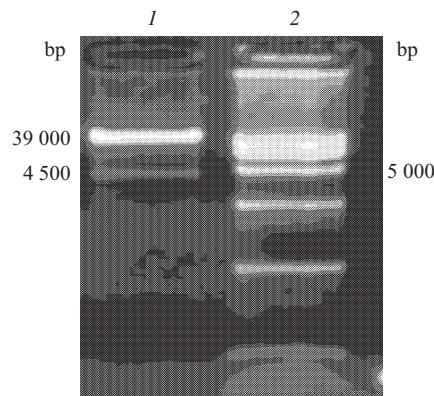


Fig.1 Identification of the recombinant adenoviral vector by electrophoresis

1: pAd-Wnt3a; 2: DNA marker DL15000.

2.2 重组腺病毒的构建

用 *Pac* I 酶切使 pAd-Wnt3a 重组质粒线性化, 通过脂质体转染 293 细胞. 7~10 天后可以在荧光显微镜下观察到 293 细胞中有 GFP 的表达 (图 2). 多

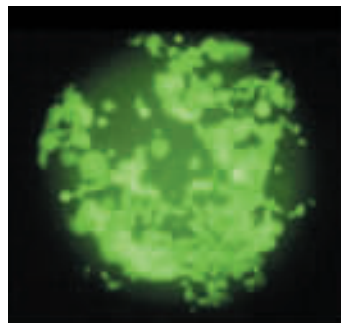


Fig.2 Expression of GFP can be observed when 293 cells were transfected with the recombinant adenoviral vector

次感染后, 反复冻融, 离心取病毒上清. 将病毒液进行梯度稀释, 加入到 1×10^5 个 293 细胞中, 感染 48 h, 用荧光显微镜观察, 按以下公式计算病毒滴度: 病毒滴度 =GFP 细胞阳性数 $\times$ 病毒上清稀释倍数 /0.4 ml (pfu/ml). 结果表明病毒滴度为 3.16×10^7 pfu/ml.

2.3 转 Wnt3a 基质细胞的鉴定与分析

通过蛋白质免疫印迹杂交, 我们在蛋白质水平检测到转基因滋养层细胞上清中 Wnt3a 的表达 (图 3). 通过半定量方法得到了 24 孔板中单孔滋养层细胞 Wnt3a 蛋白 24 h 的分泌量为 $0.216\ 4\ \mu\text{g}$ (图 4).

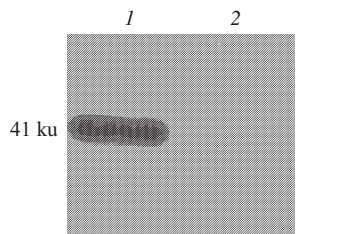


Fig.3 Western blot analysis of Wnt3a protein
1: supernatant derived from transgenic stromal cells; 2: supernatant derived from nontransgenic stromal cells.

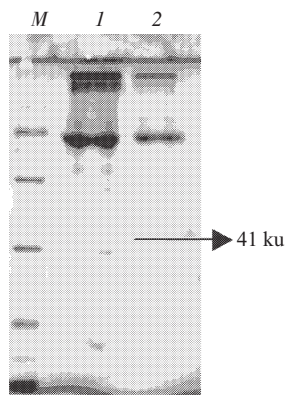


Fig.4 Semi-quantitive SDS-PAGE detection of the Wnt3a protein expression within 24 h
1: supernatant derived from transgenic stromal cells; 2: supernatant derived from nontransgenic stromal cells. M: middle range protein molecular mass marker.

2.4 CD34⁺细胞与滋养层细胞的共培养

分离得到小鼠基质细胞, 传至 1~2 代. 将病毒载体转染小鼠基质细胞, 照射后接种 24 孔板. 通过免疫磁珠法分离 CD34⁺ 细胞, 每份平均 65 ml 脐血中大约可以获得单个核细胞 $(1.8\pm 1.2)\times 10^8$ 个, CD34⁺ 细胞 $(2.6\pm 1.9)\times 10^6$ 个. 分离的细胞与已照射后的滋养层细胞共培养. 试验分组为: 1. 转基因滋养层加细胞因子; 2. 转基因滋养层; 3. 滋养层;

4. 滋养层加细胞因子.

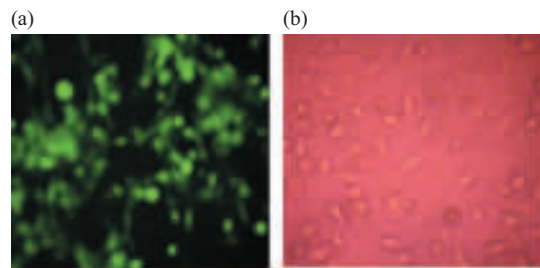


Fig.5 CD34⁺ cells were cocultured with transgenic feeder layer
(a) light micrograph, (b) observed in fluorescence micrograph.

2.5 转 Wnt3a 滋养层细胞体外扩增脐血来源 CD34⁺细胞

通过免疫磁珠法分离 CD34⁺ 细胞, 取多次分离的细胞长期培养. 分别在培养的第 0、4、12 天收集细胞并对其进行分析.

在集落形成的能力上(表 1 和图 6), 第 4 天转 Wnt3a 滋养层加因子组效果与普通滋养层加因子组效果大致相当, 均高于另外两组. 第 12 天时, Wnt3a 的作用效果开始显示. 转 Wnt3a 滋养层加因子组形成的集落总数和混合集落数最多, 分别比 0 天增加 (6.52 ± 0.15) 倍和 (8.33 ± 0.67) 倍. 与普通滋养层加因子组相比也分别增加 (1.55 ± 0.06) 倍和 (1.95 ± 0.26) 倍. 结果还发现转染 Wnt3a 后, 无论是

Table 1 The colony forming ability of CD34⁺ hematopoietic stem cells treated with SC, SC-Wnt3a, and cytokines combination, respectively

Day	Medium	CFC number	
		Total	Mix
0		78.5 $\pm$ 10.6***	10.0 $\pm$ 2.0***
4	Sc-wnt3a+C	276.0 $\pm$ 26.2***	35.3 $\pm$ 5.8***
	Sc-wnt3a	183.0 $\pm$ 19.2**	24.3 $\pm$ 2.5**
	Sc	100.0 $\pm$ 7.5	11.3 $\pm$ 2.5
	Sc+C	247.0 $\pm$ 5.02**	29.0 $\pm$ 2.0**
12	Sc-wnt3a+C	512.7 $\pm$ 12.1***	83.3 $\pm$ 5.4***
	Sc-wnt3a	456.3 $\pm$ 26.6**	70.0 $\pm$ 1.0**
	Sc	122.3 $\pm$ 6.8	16 $\pm$ 5.6
	Sc+C	332 $\pm$ 19.7**	43 $\pm$ 2.6**

$P<0.01$ There is significant difference in various groups; ** $P<0.01$ compared with the Sc-wnt3a+C group; *** $P<0.001$ compared with the Sc group. SC: Stromal cells; SC-Wnt3a: Wnt3a transfected BM stromal cells; SC-Wnt3a +C:Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines; C: cytokines,including rhSCF 50 $\mu\text{g/L}$, rhIL-3 10 $\mu\text{g/L}$, rhIL-6 10 $\mu\text{g/L}$, rhFL 20 $\mu\text{g/L}$, EPO 2 U/ml.

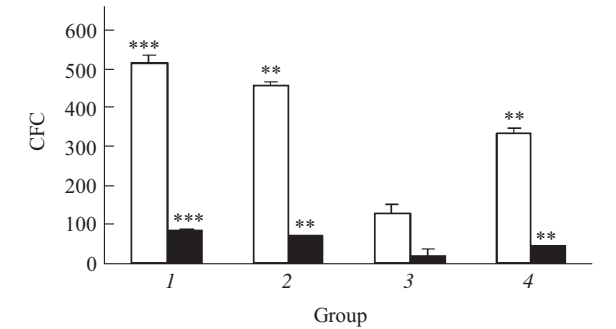


Fig.6 The colony forming ability of CD34⁺ cells (12d)
□—□: Total; ■—■: Mix.
P<0.01 There is significant difference in various groups; ***P*<0.01 compared with the Sc-wnt3a+C group; ****P*<0.001 compared with the Sc group. SC: Stromal cells; SC-Wnt3a: Wnt3a transfected BM stromal cells; SC-Wnt3a +C:Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines; C: cytokines,including rhSCF 50 μg/L, rhIL-3 10 μg/L, rhIL-6 10 μg/L, rhFL 20 μg/L, EPO 2 U/ml.

否加入因子, 集落形成力均强于普通滋养层加因子组(*P*<0.01). 在 HPP-CFC 形成能力上(表 2), 各组中 4 天时的集落个数均高于 12 天时各组的集落数. 4 天时, 转 Wnt3a 滋养层加因子组集落数最多. 12 天时, 转 Wnt3a 滋养层加因子组集落数仍然最高, 普通滋养层加因子组次之, 且转 Wnt3a 滋养层加因子组集落数是普通滋养层加因子组的(1.45±0.40)倍. LTC-IC 活性分析结果中(图 7), 转 Wnt3a 滋养层加因子组集落数是普通滋养层加因子组的 (3.83±0.86) 倍. 在细胞周期测定显示(图 8): 转 Wnt3a 滋养层加因子组 G0-G1 期(56.00±2.56)%, 普通滋养层加因子组 G0-G1 期 (83.75±10.16)%.

Table 2 The high proliferative potential colony forming ability in CD34⁺ hematopoietic stem cells treated with SC, SC-Wnt3a, and cytokines combination, respectively

Medium	HPP-CFC	
	4 days	12 days
Sc-wnt3a+C	15.7±5.5***	7.3±0.6***
Sc-wnt3a	12.7±3.1**	4.0±1.7**
Sc	10.7±3.8	2.7±0.6
Sc+C	11.0±3.0*	5.3±1.5**

P*<0.05, *P*<0.01 compared with Sc group, ****P*<0.01 compared with Sc+C group. SC: Stromal cells; SC-Wnt3a: Wnt3a transfected BM stromal cells; SC-Wnt3a +C: Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines;C: cytokines,including rhSCF 50 μg/L, rhIL-3 10 μg/L, rhIL-6 10 μg/L, rhFL 20 μg/L, EPO 2 U/ml.

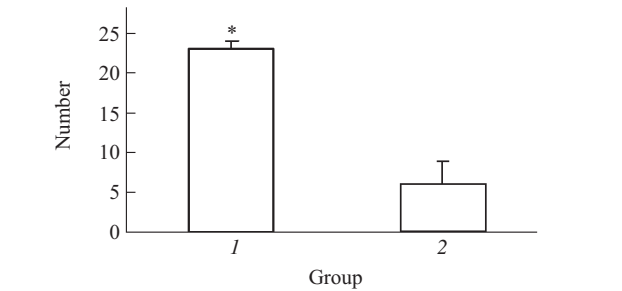


Fig.7 Long-term culture-initiating culture out put after 12 days of culture
**P*<0.01 compared with SC+C group. 1: Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines; 2: nontransgenic stromal cells with cytokines, cytokines,including rhSCF 50 μg/L, rhIL-3 10 μg/L, rhIL-6 10 μg/L, rhFL 20 μg/L, EPO 2 U/ml.

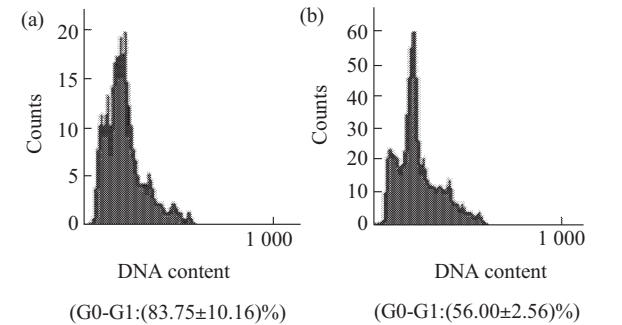


Fig.8 Cell cycle analysis of CD34⁺ cells after 12 days of culture by Flow
(a) Nontransgenic stromal cells with cytokines group. (b) Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines group, cytokines, including rhSCF 50 μg/L, rhIL-3 10μg/L, rhIL-6 10 μg/L, rhFL 20 μg/L, EPO 2 U/ml.

3 讨 论

Wnt 家族蛋白及其受体、调节蛋白等一起组成了复杂的信号通路, 在动物的发育与干细胞命运的调控方面都起着重要的作用. Wnt 信号通路不仅直接促进造血干细胞的自我更新, 而且还通过影响造血干细胞微环境而间接地影响造血干细胞的功能^[7]. Wnt3a 能用于离体条件下长期维持造血干 / 祖细胞的自我更新能力并扩增其数量, 主要是通过 Wnt3a 激活 Wnt 信号通路, 上调 β-catenin 的表达, 从而提高造血干细胞的自我更新能力^[8].

临床上造血干细胞移植已经开展多年, 其中脐血移植与骨髓和外周血移植相比更显示出诸多优势. 尽管如此, 脐血移植还存在着明显缺陷,特别是血小板恢复迟缓等. 研究认为, 这主要是由于脐血移植中造血干 / 祖细胞的含量较低. 因此, 科学

家们一直在探索一种体外扩增脐血来源的 CD34⁺ 细胞的新方法, 提高造血干 / 祖细胞的比例, 从而改善临床移植效果.

许多研究已经表明, 在骨髓基质细胞支持下协同因子作用比单用因子组合有更好的扩增造血干 / 祖细胞的效果. 因为骨髓造血微环境是造血细胞生长、分化和发育的场所, 主要由骨髓基质细胞、胞外基质和细胞因子等组成. 骨髓基质细胞是其中的重要有形成分, 造血微环境的造血调控作用是通过骨髓基质细胞和胞外基质成分与造血细胞的密切接触以及各类造血调控因子来实现的. 骨髓基质细胞可合成分泌多种细胞黏附因子, 包括胞间粘连分子(ICAM)、血管细胞粘连分子(VCAM)、血小板内皮细胞粘连分子(PECAM)等. 还可以稳定表达 IL-1 IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、G-CSF、GM-CSF 等造血调控因子及多种趋化因子. 因此, 对体内造血微环境的模拟对于探索体外扩增造血细胞的新方法尤为重要. Kanai 等^[9]研究表明, 小鼠骨髓基质细胞系 MS-5 和 TPO、FL 等因子组合能实现造血干 / 祖细胞的有效扩增, 而 MS-5 与细胞被滤膜隔开其扩增效果降至 1/4, 提示, 作为滋养层的基质细胞提供了可刺激造血早期祖细胞及可移植干细胞扩增的微环境, 是滋养层和造血干 / 祖细胞的接触有效扩增所必需的.

Wnt 信号通路在造血干细胞自我更新的过程中发挥着重要调控作用, 有研究表明其家族成员之一 Wnt3a 蛋白在体外能有效扩增造血干 / 祖细胞的数量, 并维持其自我更新的能力, 降低其分化比例^[9]. 但是有效发挥生物学功能的 Wnt3a 蛋白是在非常特定的条件下纯化得到的, 一般方法得到的纯化 Wnt3a 蛋白都是丧失活性和功能的, 这是因为 Wnt3a 蛋白的一个保守半胱氨酸在这类纯化条件下极易发生去棕榈酰化, 使得保持蛋白质活性的一个必需条件脂修饰状态被破坏, 从而 Wnt3a 蛋白丧失活性而不能发挥其正常功能^[9]. Wnt3a 蛋白是一种分泌型蛋白, 因此我们建立了表达 Wnt3a 的转基因骨髓基质细胞, 并进一步研究其对脐血来源的 CD34⁺ 细胞的体外支持扩增作用, 通过转基因细胞组成的滋养层分泌有活性的 Wnt3a 蛋白改变造血微环境, 从而探索一种体外扩增造血干 / 祖细胞的新方法. 对转基因滋养层脐血来源 CD34⁺ 的扩增效果进行了初步研究, 通过分组我们对造血干 / 祖细胞进行短期培养 12 天, 主要对混合集落 (CFC) 形成能力、高增殖潜能集落 (HPP-CFC) 形成能力、

LTC-IC 活性与细胞周期进行了比较研究. 对于混和集落数, 转基因滋养层加因子组在第 4 天和 12 天的 CFC 扩增倍数分别为 (3.53 ± 0.58) 和 (8.33 ± 0.67) 倍, 转基因滋养层不加因子组在第 4 天和 12 天的 CFC 扩增倍数分别为 (2.43 ± 0.25) 和 (7.0 ± 0.50) 倍, 普通滋养层加因子组在第 4 天和 12 天的 CFC 扩增倍数分别为 (2.90 ± 0.20) 和 (4.30 ± 0.26) 倍, 普通滋养层不加因子组在第 4 天和 12 天的 CFC 扩增倍数分别为 (1.13 ± 0.25) 和 (1.60 ± 0.57) 倍, 各组对脐血 CFC 的扩增能力由大到小为: 转基因滋养层加因子组 > 转基因滋养层不加因子组 > 普通滋养层加因子组 > 普通滋养层不加因子组. 由此可见转 Wnt3a 基质细胞作为滋养层有很好的扩增造血干 / 祖细胞的效果, 在 12 天内 CFC 最高扩增倍数达到 (8.33 ± 0.67) 倍, 转基因滋养层不加因子组的 CFC 扩增能力 (7.0 ± 0.50) 倍优于普通滋养层不加因子组 (4.30 ± 0.26) 倍. 以上结果表明 Wnt3a 可扩增较原始的造血祖细胞. HPP-CFC 与 LTC-IC 分析可以反应更早期造血祖细胞的增殖状态. 与普通滋养层加因子组相比, 转基因滋养层 HPP-CFC 与 LTC-IC 分别增加 (1.45 ± 0.40) 和 (3.83 ± 0.86) 倍. 细胞周期结果显示在 Wnt3a 作用下 G0-G1 比例下降, 启动了更多的细胞进入了增殖分裂状态. 由此可见, Wnt3a 可以维持造血干 / 祖细胞自我更新的特性并扩增其数量. 这表明作为干细胞生长因子 Wnt3a 比传统的多种因子组合有比较显著的优势, 将来有可能代替传统因子组合而作为一种更为便捷的扩增方案. 在接下来的研究中, 我们将通过动物实验进一步验证转 Wnt3a 基质细胞滋养层扩增造血干 / 祖细胞的作用, 尤其是其对 SCID 小鼠造血重建的效果进行检测. 在此基础上建立以人源基质细胞为滋养层的无血清培养扩增体系, 探索出一种扩增效果稳定、应用更为方便的方法, 实现造血干 / 祖细胞的规模化扩增.

参考文献

- 1 Tang P X. The physiology basic of hematopoietic stem/progenitor cells' transfusion. Chinese Pathophysiology, 2000, **16** (10): 932-934
- 2 Nusse R, Varmus H E. Wnt Genes. Cell, 1992, **69** (7): 1073-1087
- 3 Reya T, Duncan A W, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature, 2003, **423**(6938): 409-414
- 4 Willert K, Brown J D, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature, 2003, **423** (6938): 448-452
- 5 施小凤, 傅晋翔, 朱孝中. 骨髓来源基质细胞促进造血重建的实验

- 研究. 中国血液流变学杂志, 2004, **14** (1): 43~45
- Shi X F, Fu J X, Zhu X Z. Chin J Hemorheology, 2004, **14** (1): 43~45
- 6 Sun L, Liu W L, Sun H Y, *et al.* Effect of Ligustrazine on the expression of vascular endothelial growth factor in bone marrow stromal cells of radiation injured mice. Chin J Experimental Hematology, 2004, **12** (1): 86~89
- 7 Van Den Berg D J, Sharma A K, Bruno E, *et al.* Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. Blood, 1998, **92** (9): 3189~3202
- 8 Nelson W J, Nusse R. Convergence of Wnt, β catenin, and cadherin pathways. Science, 2004, **303** (5663):1483~1487
- 9 Kanai M, Hirayama F, Yamaguchi M, *et al.* Stromal cell-dependent *ex vivo* expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity. Bone Marrow Transplant, 2000, **26** (8): 837~844

Establishment of Wnt3a-transfected Bone Marrow Stromal Cells and Study on Expansion of Human Umbilical Cord Blood CD34⁺ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells *In vitro**

SHI Wei, HAN Shu, LI Yan-Hua, XIE Xiao-Yan, SHI Shuang-Shuang, CHEN Lin,
BAI Ci-Xian, YAN Fang, NAN Xue, WANG Yun-Fang, PEI Xue-Tao**

(Department of Stem Cell Biology, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The Wnt signalling pathway plays an important role in regulation of haematopoietic stem cells (HSCs) self-renewal. Purified Wnt3a could remarkably enhance expansion of HSCs. A transgenic bone marrow stromal cells were established by using adenoviral vector mediated Wnt3a gene transfection. The effect of transgenic stromal cells as feeder layer on expansion of CD34⁺ cells was studied. The group of Wnt3a transfected BM stromal cells with cytokines displays the best expansion effect on of human umbilical cord blood CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells in four groups. *In vitro*, expansion of CD34⁺ cells, when cocultured with Wnt3a modified stromal cells in the presence of cytokines, was significantly enhanced: CFC by (1.55±0.06) fold; CFC(mix) by (1.95±0.26) fold; HPP-CFC by (1.45±0.40) fold; LTC-IC by (3.83±0.86) fold, compared with nontransgenic stromal cells with cytokines group. These results strongly suggest that Wnt3a modified BM stromal cells may be a suitable feeder layer for expansion of haematopoietic stem/progenitor cells *in vitro*.

Key words Wnt3a, feeder layer, hematopoietic stem/progenitor cells, expansion

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2001CB509906), State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA205051, 2003AA205160).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: April 5, 2005 Accepted: May 27, 2005