

促红细胞生成素基因修饰的胎肝基质细胞促进 脐血 CD34⁺ 细胞向红系分化*

杨超^{1)**} 吉蕾^{1, 2)**} 施双双¹⁾ 岳文¹⁾ 何丽娟¹⁾ 南雪¹⁾ 裴雪涛^{1)***}

¹⁾ 军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850;

²⁾ 中国科学院动物研究所, 计划生育与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 通过重组慢病毒系统感染人胎肝基质细胞(fetal liver stromal cells, FLSCs), 建立了能够稳定高效表达促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的细胞株 EPO/FLSCs. 从胎儿肝脏克隆 EPO 基因, 构建重组慢病毒 EPO 的表达载体, 感染 FLSCs, 根据荧光表达强弱进行流式分选, 获得能够继续稳定传代的高表达 EPO 基因的 FLSCs, RT-PCR 和 ELISA 结果证实, 细胞株中的 EPO 基因稳定表达. RT-PCR 结果显示, FLSCs 的 EPO 在 mRNA 水平的表达分别是未转染 FLSCs 和转染空载体 FLSCs 的 5.63 倍和 5.71 倍. ELISA 法检测了转染重组慢病毒 EPO 表达载体的 FLSCs EPO 蛋白表达水平, 结果显示 EPO 蛋白的表达水平也明显升高. 收集 EPO/FLSCs 的条件培养基, 体外诱导脐血 CD34⁺ 细胞向造血细胞分化, 结果显示向红系定向分化的细胞比例明显居多, 有可能为临床细胞治疗提供稳定、高质量的细胞来源.

关键词 胎儿肝脏, 基质细胞, 慢病毒, 促红细胞生成素, 转基因

学科分类号 R36

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00588

红细胞输注是目前临床细胞治疗的常用手段, 可以用来治疗恶性血液疾病、遗传性疾病、重症免疫缺陷等疾病, 尤其适用于自身免疫性溶血性疾病的患者、骨髓移植及既往有过输血反应的患者^[1]. 但血细胞来源短缺仍然是临床面临的主要问题之一, 乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)等病原体的污染也使临床用血的安全性受到了极大的挑战^[2-3]. 因此, 人们期望更为安全、有效的血细胞资源. 随着干细胞研究及其相关领域生物技术的快速发展, 使得人类有可能在体外定向诱导干细胞分化为所需要的各种组织细胞以供临床应用^[4]. 近年来, 造血干细胞工程, 尤其是以人胚胎干细胞作为启动细胞的造血干细胞工程为许多临床疾病的治疗提供了新的措施和希望, 也为解决临床输血不足提供了新的解决方法.

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是促进红系祖细胞的增殖、分化和红细胞成熟的主要刺激因子, 主要来源于肾脏和肝脏, 而脑、肺、脾也能少量产生^[5-6]. EPO 能促进造血干细胞向原始红细胞分化, 加速幼红细胞的分裂、增殖, 促进血红蛋

白的合成^[5-8]. 近年来, 随着基因工程技术的发展, 以及人们对基因重组促红细胞生成素(rh-EPO)研究的不断深入, rh-EPO 开始应用于肾衰、尿毒症伴随的贫血、人类免疫缺陷病毒(HIV)相关贫血和心肌梗死后的心肌损伤等临床疾病的治疗^[9-12]. 不同组合的细胞因子能够促进造血干细胞体外扩增并向红系细胞分化^[13-14]. 但各种细胞因子多为基因工程产品, 价格昂贵. 因此, 人们一直期望建立一种高效、经济的诱导造血干细胞向红系分化的方案. 本研究建立了转 EPO 基因的滋养层细胞, 通过收集胎肝基质细胞的条件培养基, 促进脐血 CD34⁺ 细胞向红系细胞分化, 有可能为细胞治疗提供新的细胞来源, 并在组织工程和细胞治疗中发挥重要作用.

* 国家高技术研究发展计划(863)重大专项(2006AA02A107), 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB522702)和北京市科委科技计划研发攻关类(D07050701350702)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2009-10-11, 接受日期: 2009-11-27

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞质粒和菌株. 人胎肝基质细胞(fetal liver stromal cells, FLSCs)为军事医学科学院输血医学研究所分离保存; 293FT 细胞系购自 Invitrogen 公司; 携带加强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, eGFP)基因的慢病毒载体为意大利 Luigi Naldini 教授惠赠^[15]; 慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和包膜质粒 pLP/VSVG 购自 Invitrogen 公司; pEasy T1 simple 载体购自全式金公司; 感受态细胞购自天为时代公司.

1.1.2 主要试剂. TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000、Opti-MEM® I 培养基、高糖 DMEM 和 DMEM/F12 培养基购自 Invitrogen 公司; Solution I 连接酶、dNTP、TaqDNA 聚合酶、反转录试剂盒、DNA Marker DL2000 以及限制性内切酶 *Nhe* I、*Xba* I、*Pst* I 购自大连宝生物公司; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; Methocult™ GF H4434 购自 Stem Cell 公司; 淋巴细胞分离液购自天津中国医学科学院血液学研究所; 瑞氏-吉姆萨染色液购自珠海贝索生物技术有限公司; rhIL-3、rhSCF、rhEPO 等均购自 R&D 公司; 鼠抗人 EPO 抗体购自 R&D 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 细胞培养板购自 Nunc 公司.

1.2 方法

1.2.1 慢病毒表达载体的构建. 设计人 EPO 基因(NM_000799)编码区全长的 PCR 引物, 正向引物 5' CGCTAGCGGATGGGGGTGCACGAATGT 3', 反向引物 5' CTCTAGAGGTCATCTGTCCCCTGT-CCTG 3', 在 2 条引物中分别加入了 *Xba* I 和 *Nhe* I 的限制性酶切位点, 退火温度为 54.5℃, RT-PCR 方法自胎儿肝脏组织提取的总 RNA 中克隆 EPO 基因, 所得 PCR 产物片段大小为 598 bp. EPO 基因连入 T 载体后用 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶切鉴定, 酶切产物回收纯化后连入慢病毒载体, 重组慢病毒载体用 *Xba* I 和 *Pst* I 酶切鉴定, 选择含插入片段的克隆进行基因测序.

1.2.2 慢病毒包装. 分别将慢病毒表达载体质粒 pBPLV-EPO 和阴性对照质粒与包装质粒 pLP1、pLP2、包膜质粒 pLP/VSVG, 在无血清 Opti-MEM® I 培养基中与 42 μ l lipofectamine2000 混合, 室温孵

育 20 min, 形成 DNA-lipofectamine 2000 复合物. 293FT 包装细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 同时加入 0.1 mmol/L 非必需氨基酸(NEAA)、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%青-链霉素和 500 mg/L G418 的培养基培养, 细胞长至 90%汇合时, 胰酶消化, 收集约 6×10^6 个细胞重悬于 5 ml 的生长培养基中, 与 DNA-lipofectamine 2000 复合物混匀, 加入含有 5 ml 生长培养基的 10 cm 细胞培养皿中, 37℃ CO₂ 孵箱中培养过夜, 次日用含有 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基换液. 转染 48~72 h 后收集上清, 4℃, 3 000 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片, 病毒液用 0.45 μ m 滤膜过滤后分装冻存于 -80℃ 冰箱.

1.2.3 细胞转染和流式细胞术分选. 取第 3 代 FLSCs 以 3×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板中, 待其长至 80%汇合时每孔加入 2 ml 毒液, 同时加入 6 mg/L 的聚凝胺(Polybrene)促进病毒的转染效率, 转染 6 h 后换新鲜培养基, 继续培养至 72 h. 转染 24~72 h 于荧光显微镜下观察细胞转染效率, 收集转染后的细胞进行流式分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS), 获得高表达 eGFP 的 FLSCs.

1.2.4 半定量 RT-PCR 方法检测转染细胞的 EPO 表达. 分别取未转染的 FLSCs、转染空载体的 FLSCs 和分选后强荧光表达的 FLSCs, 提取细胞总 RNA 后, 用 RT-PCR 方法检测 EPO 基因在 mRNA 水平的表达, 用 GAPDH 作为内参, 其正向引物 5' CTGACTTCAACAGCGACACC 3'; 反向引物 5' TGCTGTAGCCAAATTCGTTGT 3', 片段大小 110 bp. PCR 反应条件: 94℃ 5 min 预变性; 94℃ 30 s, 53.5℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳, 用 Alpha Imager3300 软件分析结果.

1.2.5 ELISA 双抗体夹心法检测 EPO 蛋白分泌量的变化. 收集培养细胞上清液, EPO 单克隆抗体(1:500 稀释)包被 ELISA 酶标板, 100 μ l/孔, 室温孵育过夜. 次日用含 0.05% Tween20 的 PBS 溶液洗涤每孔 3 次, 1% BSA 37℃ 封闭 2 h. 加入培养细胞上清液 100 μ l/孔, 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 按 100 μ l/孔加入生物素化的 EPO 检测多克隆抗体, 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗涤, 加入 HRP 标记二抗, 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 50 μ l 终止液终止. 酶标仪 450 nm 波长检测各孔吸光度值(A). 根据样品 A 值在标准曲线图上位置查出相应各组细胞培养上清中 EPO 的含量.

1.2.6 体外诱导脐带血 CD34⁺ 细胞向红系细胞分化.

a. 脐带血 CD34⁺ 细胞的分离. 脐血按 1:1 与 PBS 混匀, 加入总体积 1/4 的 0.5% 甲基纤维素, 混匀后室温静置 30 min, 吸取血浆层, 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 细胞用 PBS 重悬, 按 1:1 缓慢加入淋巴细胞分离液 Ficoll(1.0770±0.0002) g/L 界面上, 采用密度梯度离心法(4℃, 1 800 r/min 离心 25 min)分离脐血单个核细胞(MNC). 吸取中间界面的 MNC 层, 用 PBS 洗涤 3 次, 调整细胞浓度备用.

b. 脐血 CD34⁺ 细胞的标记. 每 10⁸ 个脐血 MNC 重悬于 300 μl PBS 中, 加入 100 μl 非特异阻断性抗体 FcR 封闭剂, 混匀, 再加入 100 μl 磁珠偶联的 CD34 单克隆抗体(QBEND10), 混匀, 4℃ 孵育 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次, 1 800 r/min 离心 5 min, 然后用 PBS 重悬备用.

c. 脐血 CD34⁺ 细胞的分选. 将分离柱置于磁场中, 用 PBS 冲洗分离柱, 将标记的脐血 MNC 悬液缓慢加入分离柱, 待其自然流出后用 500 μl PBS 洗涤未结合的细胞. 将分离柱移出磁场, 加 1 ml PBS 加压洗脱分离柱吸附的细胞, 收集的细胞为 CD34⁺ 细胞.

1.2.7 诱导脐血 CD34⁺ 细胞向红系分化. 转染的 FLSCs 于高糖 DMEM 和 DF12 培养基 1:1 混合后加入 10% FBS 的培养基培养. 待细胞长至 80% 汇合时, 改为含 10% 血清的 IMDM 培养基培养, 经 96 h 培养后收集条件培养基. 同时, 细胞以 1:2 传代培养, 连续收集 6 代. 使用前, 条件培养基以 0.22 μm 的滤器过滤. 阳性对照组培养条件如下: IMDM 培养基添加 10% 胎牛血清, 其中加入 3U/ml EPO、10 μg/L IL-3、50 μg/L SCF. 阴性对照组培养条件如下: IMDM 培养基添加 10% 胎牛血清.

1.2.8 集落形成(CFCs)实验. CD34⁺ 细胞以 1×10⁶ 孔密度接种于半固体培养基 MethocultTM GF H4434 中, 每种条件培养 3 孔, 置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养至 21 天, 分别于第 7 天、第 14 天、第 21 天在倒置显微镜下计数 CFU-E、CFU-GM、CFU-GEMM 集落数, 取 3 个平行孔计数的平均值, 比较不同培养条件对 CFCs 扩增的影响.

1.2.9 细胞形态学观察及瑞氏吉姆萨染色. 在半固体培养基中培养 14 天后, 将细胞由培养基中吸出, PBS 洗涤后离心, 弃上清, 加入少量 PBS 将细胞制成悬液, 取适量涂片, 待片子完全晾干后加入 4% 多聚甲醛固定 10~15 min, 用瑞氏吉姆萨染液染

色, 于显微镜下观察, 发现细胞着色后冲去染色液, 观察、拍照.

1.2.10 细胞免疫荧光检测. 诱导 14 天后将细胞从培养基中吸出, PBS 洗涤后离心, 弃上清, 加入 100 μl PBS 将细胞制成细胞悬液, 取适量涂片, 待片子完全晾干后用 4% 多聚甲醛固定 10~15 min, 用 PBS 洗涤细胞, 加入 CD71-FITC 抗体, 于室温孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 于荧光显微镜下观察、拍照.

1.2.11 流式细胞检测. 收集诱导的细胞, 胰酶消化制成细胞悬液, 取 3×10⁶ 个细胞, PBS 洗涤一遍, 分别置于 1.5 ml 的 EP 管中, 分别加入小鼠抗人 GPA-PE、CD71-FITC 抗体, 阴性对照加小鼠 IgG-PE 和小鼠 IgG-FITC, 室温下避光作用 30 min. 1 200 r/min 离心 5 min 后弃上清, PBS 洗涤 2 遍, 流式细胞仪分析所有细胞中各表面标志物阳性细胞的比率.

1.2.12 统计学处理. 各组数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析. 配对组间比较采用 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 为存在显著性差异.

2 结 果

2.1 慢病毒载体 pBPLV-EPO 的构建及鉴定

重组 T 载体用 *Nhe* I 和 *Xba* I 双酶切, 重组慢病毒载体用 *Xba* I 和 *Pst* I 双酶切, 均得到目的片段 EPO (图 1), 经基因测序证实与 GenBank 报道的序列完全一致, 重组质粒构建成功.

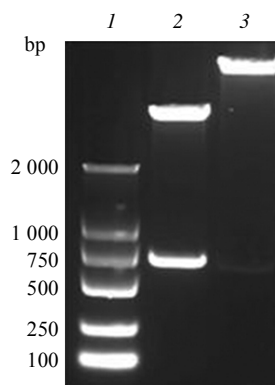


Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by restrict endonuclease digestion

M: DL2000 marker; 1: Recombinant T vector cut with *Xba* I /*Nhe* I; 2: Recombinant lentiviral plasmid cut with *Xba* I /*Pst* I.

2.2 慢病毒的包装

293-FT 细胞包装慢病毒 24 h 后, 于荧光显微镜下即可见细胞中有绿色荧光蛋白的表达, 并且由于 VSVG 糖蛋白使 293FT 融合的作用, 见到多细胞合胞体的大量形成(图 2a), 且呈现绿色荧光的细胞在包装 48~72 h 后超过 98%(图 2b), 病毒包装质量较高. 包装 72 h 后, 收集毒液过滤备用.

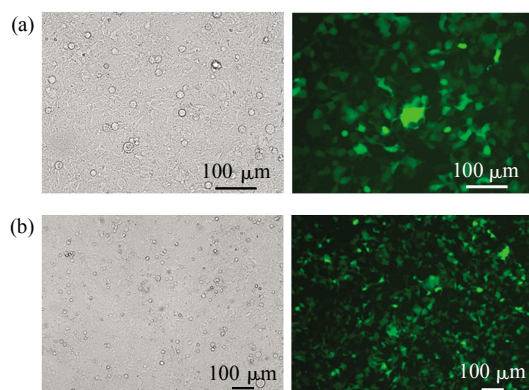


Fig. 2 Producing lentivirus in 293FT cells by fluorescence microscope

(a) The appearance of multinucleated syncytia of 293FT cells. (b) The eGFP expression of 293FT cells producing lentivirus for 48~72 h.

2.3 流式细胞术检测慢病毒转染 FLSCs 效率与细胞分选

包装好的慢病毒转染 FLSCs, 24 h 后于荧光显微镜下观察, 发现表达绿色荧光蛋白的细胞很少, 持续培养至 72 h 后, 表达 eGFP 的细胞逐渐增多, 但总数不超过 10%(图 3a). 为获得高表达慢病毒

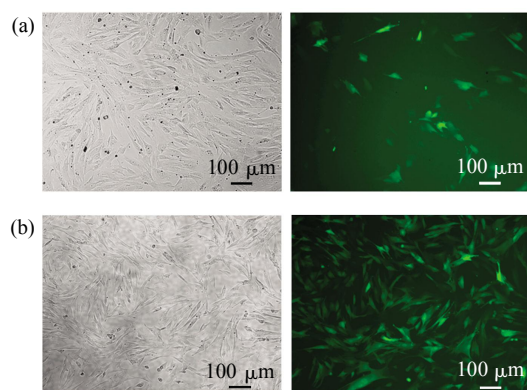


Fig. 3 eGFP expression of non-sorted and sorted transfected-FLSCs

(a) Transfected FLSCs cultured for 72 h. (b) eGFP expression of sorted FLSCs.

表达载体的细胞, 对转染 72 h 的 FLSCs 根据 eGFP 阳性表达进行流式分选, 获得其中仅 5% 的强表达 eGFP 的细胞, 分选后细胞荧光显微镜下观察, 表达 eGFP 的细胞基本达 100%(图 3b).

2.4 EPO 基因在 FLSCs 中的表达鉴定

RT-PCR 检测转染空载体和荧光表达 FLSCs 的 EPO 基因在 mRNA 水平的表达. 在未转染细胞和转染空载体的细胞中 EPO 表达水平较低, 过表达 EPO 基因的 FLSCs, EPO 在 mRNA 水平明显高于未转染组和转染空载体的细胞(图 4a, b). 结果用 Alpha Imager3300 分析软件进行灰度扫描分析, 荧光表达细胞的 EPO 在 mRNA 水平表达与未转染细胞和转染空载体细胞相比具有显著性差异($P < 0.05$), 分别为未转染细胞和转染空载体细胞的 5.63 倍和 5.71 倍.

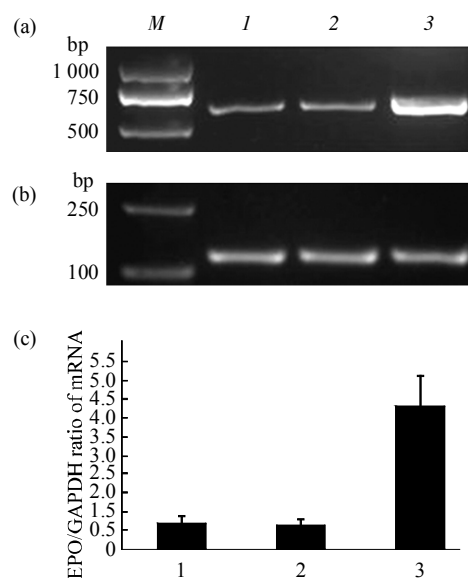


Fig. 4 RT-PCR analysis of EPO gene expression in FLSCs

(a) Expression of EPO. (b) Expression of GAPDH. (c) Relative amount of EPO. M: DL2000 marker; I: Untransfected group; 2: Negative control group; 3: pBPLV-EPO transfection group.

2.5 ELISA 双抗体夹心法检测 EPO 蛋白的表达

收集各组细胞的培养上清, ELISA 法检测 EPO 蛋白的分泌量, 结果显示, 转染 pBPLV-EPO 的细胞, 上清中 EPO 含量高于未转染和转染空载体的细胞, 转染 pBPLV-EPO 的细胞 EPO 蛋白含量达 263 U/L, 与未转染和转染空载体细胞相比较具有显著差异($P < 0.05$).

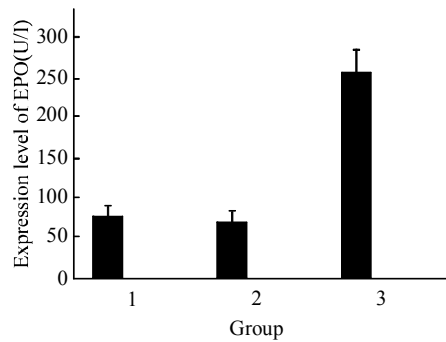


Fig. 5 Secretory volume of EPO protein in culture supernatants detected by ELISA

1: Untransfected group. 2: Negative control group. 3: pBPLV-EPO transfection group.

2.6 脐血 CD34 + 细胞向红系细胞分化

2.6.1 将不同条件下培养 的细胞接种于半固体培养基中检测其克隆形成能力，培养 6 天后即可在半固体培养基中观察到造血集落的形成。随着培养时间的延长集落 的数量逐渐增多，并于第 14 天达到峰值，此时在显微镜下对 不同培养条件下所产生的造血集落进行计数。结果表明，条件培养基诱导产生的细胞接种于半固体培养基后产生的造血克隆最多，且多为红系克隆，与对照组相比具有显著差异 (表 1)。为了进一步观察诱导产生集落的形态，对条件培养基诱导 14 天的细胞进行瑞氏吉姆萨染色，结果可见较多幼红细胞和少数粒细胞 (图 6)。

Table 1 The colony forming ability of CD34+ cells treated with different medium

Day	Medium	CFU number	
		Total number	E
7	IMDM+10%FBS	3.7 ± 0.2*	1.2 ± 0.1*
	IMDM+10%FBS+SCF、IL-3、EPO	12.3 ± 0.5**	3.0 ± 0.6**
	Conditioned medium	14.2 ± 0.4	6.7 ± 0.9
14	IMDM+10%FBS	5.4 ± 0.3*	1.4 ± 0.2*
	IMDM+10%FBS+SCF、IL-3、EPO	26.7 ± 1.0**	13.3 ± 1.0**
	Conditioned medium	34.1 ± 1.8	16.1 ± 0.5
21	IMDM+10%FBS	5.1 ± 0.7*	0.8 ± 0.1*
	IMDM+10%FBS+SCF、IL-3、EPO	25.5 ± 1.9**	12.2 ± 0.8**
	Conditioned medium	34.6 ± 1.6	17.5 ± 1.3

* $P < 0.05$, compared with the conditioned medium group; ** $P < 0.05$, compared with the conditioned medium group($n=3$).

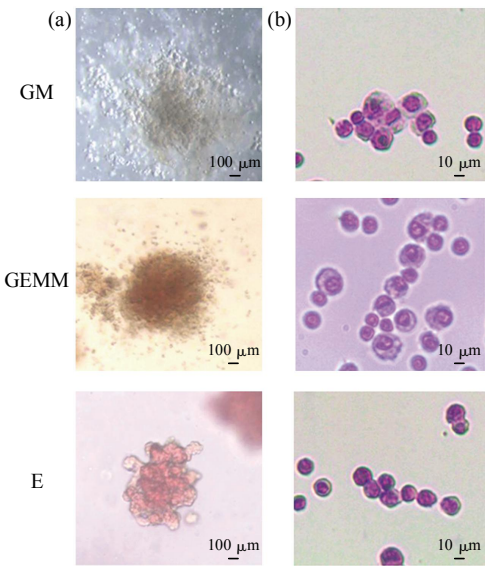


Fig. 6 The hematopoietic colonies came from CD34 + cells treated with conditioned medium

(a) The cells derived from CD34 + cells could form typical CFU-GM, CFU-GEMM and CFU-E colonies after being cultured with conditioned medium. (b) The cells is stained by Wright-Giemsa.

2.6.2 免疫荧光检测。用免疫荧光法分别检测了对照和条件培养基诱导脐血 CD34+ 细胞 14 天后产生的造血细胞红系相关标志 CD71 的表达情况，结果可见条件培养基诱导的细胞呈现绿色荧光的比率明显高于对照组(图 7)，进一步证实了集落形成实验的结果。

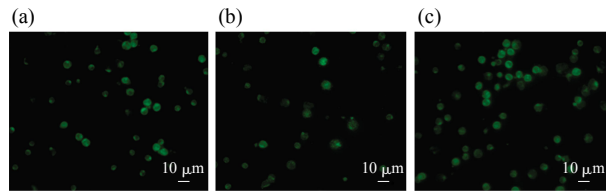


Fig. 7 Fluorescent immunocytochemistry analysis of CD71 expression

(a) IMDM +10% FBS +SCF、IL-3、EPO. (b) IMDM +10% FBS. (c) Conditioned medium.

2.6.3 流式细胞检测。在诱导过程中收集诱导 14 天的细胞进行流式分析，结果表明 3 种不同的培养

体系均能诱导脐血 CD34⁺ 细胞向造血细胞分化。在不添加任何因子的情况下, 脐血 CD34⁺ 细胞向造血细胞分化的诱导效率较低, GPA 和 CD71 阳性率分别为 7.28% 和 5.32%。在添加细胞因子 SCF、IL-3 和 EPO 的情况下, 脐血 CD34⁺ 细胞向造血细

胞分化的能力明显增强, GPA 和 CD71 阳性率分别为 79.63% 和 28.65%。条件培养基则能更为高效地诱导脐血 CD34⁺ 细胞向造血细胞分化, GPA 和 CD71 阳性率分别为 92.79% 和 42.71% (图 8)。

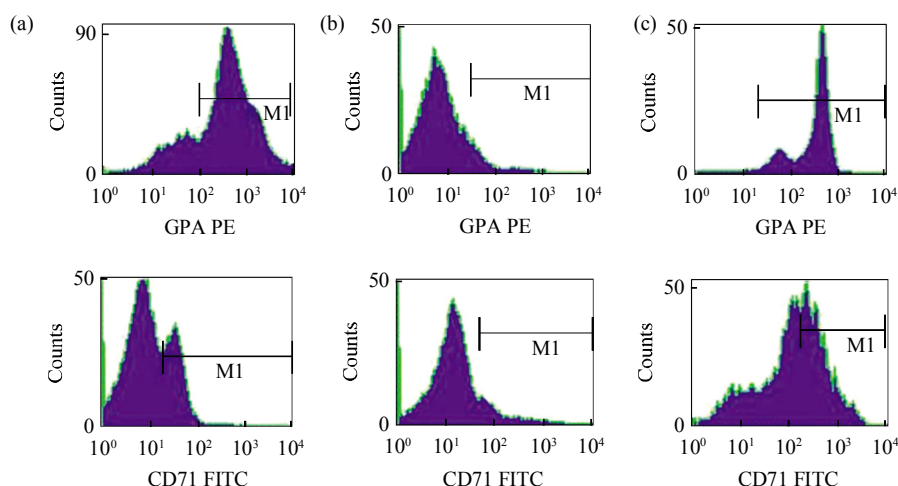


Fig. 8 Flow cytometric analysis of GPA and CD71 expression

(a) IMDM+10%FBS+SCF, IL-3, EPO. (b) IMDM+10%FBS. (c) Conditioned medium.

3 讨 论

红细胞源于骨髓多能造血干细胞, 是血液中数量最多的一种血细胞, 在全血中容积百分比约为 50%, 通过血红蛋白起着运输氧和二氧化碳的重要生理功能。红细胞输注是目前治疗贫血的常用手段^[16]。为了缓解临床应用的压力, 近年来越来越多的研究人员致力于体外诱导红细胞的研究, 并建立了多种诱导红细胞生成的体系如细胞因子诱导体系、饲养层共培养体系等^[17-22]。造血干细胞在体外向红细胞定向诱导分化, 可以扩增产生大量的红细胞和少量粒细胞的前体细胞。将体外诱导的细胞混以细胞代用品予以患者输入以替代传统的血细胞, 这不仅可在一定程度上缓解血细胞来源紧张的问题, 在输血安全性和预防血源性感染等方面亦具有一定的优势, 在细胞治疗方面亦具有广阔的应用前景。然而, 诱导使用的各种细胞因子多为基因工程产品, 成本较高, 诱导效率仍难以满足临床需要, 异源饲养层的危险性也极大地限制了其应用前景。

红细胞的产生受到造血因子和造血干细胞自身内在基因的共同调控, 其中促红细胞生成素(EPO)是其产生的最重要的因子。EPO 是一种糖基化的

蛋白质激素, 可促进红系前体细胞增殖分化为成熟的红细胞。EPO 缺乏时, 红系前体细胞将被降解死亡。因此, EPO 通过抑制红系祖细胞凋亡及刺激红系祖细胞的增殖分化来调节红细胞的产生^[23-24]。EPO 与位于造血干细胞的特殊受体相结合, 使与受体相连的 JAK2 发生磷酸化而被激活, 从而促进造血干细胞增生分化, 使之定向发育成为成熟的红细胞。EPO 缺乏时, 红系前体细胞将被降解死亡。因此, EPO 通过抑制红系祖细胞凋亡及刺激红系祖细胞的增殖分化来调节红细胞的产生^[25-26]。基于以上的研究背景, 我们希望建立一种高效率、低成本的造血干细胞向红系细胞定向诱导分化的方法。

慢病毒载体是一种新型病毒载体, 病毒大部分基因被删除或替换, 不具备自身复制能力, 且因为删除了 LTR 3' U3 使病毒不能产生病毒 RNA, 可自身灭活, 具有获得病毒周期短、滴度高、宿主范围广、可以感染分裂与非分裂细胞、在稳定整合宿主基因组的基础上增加了高效感染细胞及高表达外源蛋白且能逃避甲基化抑制等特点。慢病毒载体系统的这些特点使其在分子生物学和细胞生物学等多种学科多个领域得到了广泛应用。

本研究应用慢病毒系统建立了稳定表达 EPO 基因的 FLSCs, 持续分泌一定量、具有生物学活性的 EPO 蛋白, 从而避免了添加外源细胞因子, 极大地降低了实验成本。进一步用表达 EPO 基因的 FLSCs 条件培养基诱导脐血 CD34 + 细胞向造血细胞分化, 并通过集落形成实验、瑞氏吉姆萨染色、免疫荧光检测和流式细胞检测等方法对诱导的细胞进行了相关鉴定, 结果显示诱导的细胞呈现红细胞的形态特征。条件培养基诱导的细胞红系相关标志 GPA 和 CD71 的表达比率明显高于对照组。这表明与对照组相比, 稳定表达 EPO 基因的 FLSCs 的条件培养基更能高效地诱导脐血 CD34 + 细胞向红系细胞分化, 同时避免了异源饲养层所带来的污染, 为以胚胎干细胞或造血干细胞为启动细胞的大规模诱导产生红细胞奠定了基础, 也有可能成为细胞治疗和未来输血医学新的细胞来源。

参 考 文 献

- [1] 向国春, 张佳思, 成晓玲, 等. 输注去白细胞红细胞悬液预防发热性非溶血性输血反应的临床应用分析. 第三军医大学学报, 2001, **23**(7): 872-873
Xiang G C, Zhang J S, Cheng X L, *et al.* Acta Acad Med Mil Tert, 2001, **23**(7): 872-873
- [2] Dhingra N, Hafner V. Safety of blood transfusion at the international level. The role of WHO. Transfus Clin Biol, 2006, **13**(3): 200-202
- [3] Spiess B D. Red cell transfusions and guidelines: a work in progress. Hematol Oncol Clin North Am, 2007, **21**(1): 185-200
- [4] Douay L, Andreu G. *Ex vivo* production of human red blood cells from hematopoietic stem cells: what is the future in transfusion?. Transfus Med Rev, 2007, **21**(2): 91-100
- [5] Maxwell A P, Lappin T R, Johnston J, *et al.* Erythropoietin production in kidney tubular cells. Br J Haematol, 1990, **74**(4): 535-539
- [6] Koury S T, Bondurant M C, Koury M J, *et al.* Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. Blood, 1991, **77**(11): 2497-2503
- [7] Baker J E. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. Vascular Pharmacology, 2005, **42**(5-6): 233-241
- [8] Koury M J, Bondurant M C. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cell. Cell Physiol, 1988, **137**(1): 65-74
- [9] Fischl M, Galpin J E, Levine J D, *et al.* Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. N Engl J Med, 1990, **322**(21): 1488-1493
- [10] Moreno García M. Erythropoietin treatment of anemia associated with human immunodeficiency virus infection. Med Clin (Barc), 1997, **108**(7): 266-271
- [11] Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, *et al.* Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. Blood, 2005, **106**(7): 2280-2286
- [12] Raddino R, Robba D, Caretta G, *et al.* Erythropoietin: a new perspective in cardiovascular therapy. Monaldi Arch Chest Dis, 2008, **70**(4): 206-213
- [13] 裴雪涛, 王立生, 徐黎, 等. CD34+ 造血祖细胞的定向诱导分化研究. 中华血液学杂志, 1998, **19**(6): 289-293
Pei X T, Wang L S, Xu L, *et al.* Chin J Hematol, 1998, **19**(6): 289-293
- [14] Fibach E, Prus E. Differentiation of human erythroid cells in culture. Curr Protoc Immunol, 2005, Chapter **22**: Unit 22F.7
- [15] Amendola M, Venneri M A, Biffi A, *et al.* Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. Nat Biotechnol, 2005, **23**(1): 108-116
- [16] Yazdanbakhsh K. Development of complement therapeutics for inhibition of immune-mediated red cell destruction. Transfusion, 2005, **45**(2 Suppl): 122S-129S
- [17] Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Rodríguez M, Mayani H. *In vitro* proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. Arch Med Res, 2002, **33**(2): 107-114
- [18] Giarratana M C, Kobari L, Lapillonne H, *et al.* *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol, 2005, **23**(1): 69-74
- [19] Mihařada K, Hiroshima T, Sudo K, *et al.* Efficient enucleation of erythroblasts differentiated *in vitro* from hematopoietic stem and progenitor cells. Nat Biotechnol, 2006, **24**(10): 1255-1256
- [20] Soni S, Bala S, Gwynn B, *et al.* Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. J Biol Chem, 2006, **281**(29): 20181-20189
- [21] Baek E J, Kim H S, Kim S, *et al.* *In vitro* clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34 + cells. Transfusion, 2008, **48**(10): 2235-2245
- [22] Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, *et al.* *Ex vivo* large-scale generation of red blood cells from cord blood CD34 + cells by co-culturing with macrophages. Int J Hematol, 2008, **87**(4): 339-350
- [23] Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. Regulation of the erythropoietin gene evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science, 1988, **242**(4884): 1412-1415
- [24] Sawyer S T, Krantz S B, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. Blood, 1989, **74**(1): 103-109
- [25] Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. Regulation of the erythropoietin gene evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science, 1988, **242**(4884): 1412-1415
- [26] Sawyer S T, Krantz S B, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. Blood, 1989, **74**(1): 103-109

Differentiation of CD34⁺ Cells Into Erythroid Cells by Human Fetal Liver Stromal Cells Expressing Erythropoietin*

YANG Chao^{1)**}, JI Lei^{1,2)**}, SHI Shuang-Shuang¹⁾, YUE Wen¹⁾, HE Li-Juan¹⁾, NAN Xue¹⁾, PEI Xue-Tao^{1)***}

¹⁾ Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institution of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China;

²⁾ State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Erythropoietin (EPO) plays an important role in modulating proliferation and differentiation of erythrocytes. The fetal liver stromal cell lines (FLSCs) expressing EPO has been established steadily by lentiviral system. The EPO gene was cloned from human fetal liver by RT-PCR. The EPO recombinant lentiviral plasmid was steadily transfected into FLSCs. The efficiency of virus transfection was identified by expression of enhanced green fluorescence protein (eGFP) analyzed by fluorescence microscope, then the high eGFP expression FLSCs were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) according to strong eGFP expression. Analysis of strong eGFP expression was detected by RT-PCR and ELISA. The EPO expression at mRNA level of strong eGFP expression FLSCs are 5.63 and 5.71-fold for the FLSCs no transfected and the FLSCs transfected by the control lentivirus. And at protein level, the content of EPO expression is 263 U/L. Then the supernatant from the EPO transfected FLSCs could induce the CD34⁺ cell differentiated into hematopoietic cell, especially erythrocytes. This would provide an alternative for cell therapy and blood cell transfusion.

Key words fetal liver, stromal cells, lentivirus, erythropoietin (EPO), transgene

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00588

*This work was supported by grants from National High Technology Research and Development Program of China (2006AA02A107), The Major State Basic Research Program of China (2005CB522702) and The Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (D07050701350702).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-10-66932240, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: October 11, 2009 Accepted: November 27, 2009