



低氧环境中微囊化成骨细胞支持造血干/祖细胞扩增*

宋克东¹⁾ 刘天庆^{1)**} 赵国峰¹⁾ 武爽¹⁾ 方美云²⁾ 石芳鑫³⁾
朱丽丽³⁾ 马学虎¹⁾ 崔占峰⁴⁾

¹⁾ 大连理工大学干细胞与组织工程研发中心, 大连 116024; ²⁾ 大连医科大学附属第一医院血液科, 大连 116011;

³⁾ 大连医科大学附属第一医院妇产科, 大连 116011; ⁴⁾ Department of Engineering Science, Oxford University, Parks Road, Oxford OX1 3PJ, UK)

摘要 在模拟骨髓造血壁龛(hematopoietic niche)的氧分压条件下, 探讨微囊化成骨细胞(osteoblasts, OB)对脐血造血干/祖细胞(HSPC)体外扩增的支持和调控机理. 分离培养人髂骨 OB, 采用聚电解质络合法将第3代的 OB 以密度为 8×10^5 ml 包埋在直径为 0.5 mm 的明胶-海藻酸钠-壳聚糖(GAC)微胶珠中. 将微珠+造血干/祖细胞(A'组)、造血干/祖细胞(B'组)及微珠(C'组)置于6孔板, 在5%氧分压下进行培养. 同时在20%常氧条件下设置同样分组培养作为对照(A, B, C). 通过流式细胞分析和半固体细胞集落培养, 观察比较各培养体系中造血干/祖细胞的扩增, 并检测体系内白血病抑制因子(LIF)和白介素-6(IL-6)的含量变化以探讨作用机理. 经过倒置相差显微镜观察, 人成骨细胞在微珠中分散均匀, 生长状态良好. 微珠内部有丰富的孔道供营养物质传递, 有大量造血干/祖细胞弱黏附于微珠表面. 经过7天的培养, A'、B'、A、B四组造血细胞的扩增倍数分别为(49.0 ± 4.6), (3.3 ± 0.5), (17.7 ± 1.2)和(1.9 ± 0.2). A'、B'、A组的CD34⁺细胞分别扩增了(87.6 ± 8.3), (2.2 ± 0.3)和(14.9 ± 1.0)倍, B组则出现下降. A'、B'、A、B四组CFU-Cs集落扩增倍数分别为(9.8 ± 0.8), (3.5 ± 0.4), (6.9 ± 0.7)和(2.6 ± 0.2). 低氧共培养体系比常氧共培养体系和非共培养体系对造血干/祖细胞的扩增有更大的促进作用. A'、B'、C'中IL-6和LIF含量明显高于对应的A、B、C组, 与扩增倍数的差异相对应. 微囊化成骨细胞对造血干/祖细胞扩增有明显的促进作用, 5%氧分压接近体内造血壁龛氧环境, 在此环境中成骨细胞分泌细胞因子量增多并通过其对造血干/祖细胞的扩增进行调节.

关键词 低氧, 造血干/祖细胞, 微胶珠, 成骨细胞, 共培养
学科分类号 R318

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00727

近年来, 对骨髓造血微环境(hematopoietic niche)的体内研究证实, 成骨细胞是其中的重要组成部分, 成骨细胞在调节造血干/祖细胞扩增方面有重要的作用^[1-3]. 但目前对于成骨细胞的调节方式尚不明确, 有研究认为成骨细胞与造血细胞的直接接触是必不可少的, 也有学者认为成骨细胞分泌的多种细胞因子能够起到刺激造血干/祖细胞扩增的作用^[4-5]. 此外, 对造血微环境氧分压的研究发现, 骨髓腔中氧分布不均匀, 靠近骨内壁的造血微环境区域的氧浓度只有3%~7%, 远低于普通的20%氧含量^[6-7]. 因此, 如何在体外模拟骨髓造血微环境以促进造血干/祖细胞的有效扩增具有非常重要的研究意义和临床应用价值. 本研究将人成骨细胞(hOB)包埋在明胶-海藻酸钠-壳聚糖(GAC)微胶

珠内, 并将微珠与脐血造血干/祖细胞(HSPC)在低氧和常氧条件下分别进行共培养, 通过对比, 确定体外培养的适宜条件, 达到在模拟体内造血微环境条件下有效扩增造血干/祖细胞的目的.

1 材料和方法

1.1 材料

三气培养箱(Galaxy R, 英国 RS Biothch), 倒置

* 国家自然科学基金(30670525, 30700181), 大连理工大学青年教师培养基金项目(893228)和教育部博士点新教师基金(20070141055)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0411-84706360, Fax: 0411-83633080, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

收稿日期: 2009-12-23, 接受日期: 2010-02-02

相差显微镜(IX70-131 OLYMPUS). IMDM 培养基、HG-DMEM 培养基和胰蛋白酶等均购自美国 Gibco 公司; 重组人生长因子(IL-3, SCF, G-CSF, GM-CSF, FL 和 TPO 等)购自美国 Peprotech 公司; 人淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque)购自瑞典 Amersham Biosciences 公司; 造血祖细胞半固体培养基使用 Methocult™ GF H4435, 购自加拿大 Stem Cell Technologies 公司; 白血病抑制因子(LIF)和白细胞介素 -6 (IL-6)试剂盒购自上海轩昊科技公司; 包囊材料: 明胶购自美国 Solarbio 公司; 海藻酸钠购自美国 Sigma 公司; 壳聚糖购自济南海得贝生物工程有限公司. 其他试剂均为国产分析纯. 微囊制备装置为大连理工大学干细胞与组织工程研究中心自制.

1.2 人成骨细胞(hOB)分离与培养

人髂骨碎片来自临床患者手术弃骨, 均经患者知情同意. 将其置于含有 D-Hank's 培养皿中, 仔细剔除骨内、外膜, 并剪除骨缝间组织, 反复浸泡、洗涤 3 次. 将骨块修整为 1~2 mm² 大小组织块, 离心除去上清液, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶溶液, 在 37℃ 水浴中消化 15~20 min, 加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化, 离心去上清. 加入 1 g/L II 胶原酶溶液消化 90 min, 离心除去上清液. 加入 DMEM 培养液, 调节细胞密度至 1×10⁵/ml 左右接种培养, 2 天后换液, 除去未贴壁的细胞. 然后以 1:2 的比例用差速黏附纯化法分瓶接种培养. 传代 3 次之后, 纯化的成骨细胞用于后续实验.

1.3 载成骨细胞明胶-海藻酸钠-壳聚糖(GAC)微珠的制备

取生长状态良好的成骨细胞进行消化离心, 加入明胶溶液(2.0%, 溶于 DMEM 培养基中)使细胞重悬, 调整细胞密度为 2×10⁶/ml. 在培养箱中孵育 30 min, 使成骨细胞与明胶充分接触. 按海藻酸钠: 明胶 = 3:1 的比例加入海藻酸钠溶液(2.0%), 混合均匀后, 加入到注射器中, 此时细胞密度为

5×10⁵/ml. 开动微囊制备装置, 在电压 6 kV, 流速 40 ml/h 条件下, 滴加 1 ml 细胞混合液到 30 ml CaCl₂(1.1%)溶液中进行凝胶化反应, 形成载细胞明胶海藻酸钠微胶珠. 然后将胶珠加到壳聚糖溶液(0.5%)中覆膜反应 10 min, 形成载细胞 GAC 微胶囊. 用 PBS 洗涤 3 次, 再用无血清 IMEM 洗涤 1 次. 将制备好的微囊加到 6 孔板中, 并添加适量 IMEM 培养基, 在培养箱中培养过夜. 每种条件下设置 3 组平行实验.

1.4 造血干/祖细胞(HSPC)的分离

脐带血(UCB)由大连市沙区妇幼保健站提供, 采自健康足月分娩产妇, 经产妇及其家人知情同意. 将采集到的脐带血(含抗凝剂)缓慢叠加到 Ficoll 淋巴分离液上, 两者体积比为 1:1~2:1. 然后, 进行密度梯度离心(2 500 r/min, 25 min), 吸取中间白膜层. 将吸取到的白膜层细胞用含有 10% 胎牛血清的 D-Hank's 平衡盐溶液离心洗涤 2 次(1 000 r/min, 5 min), 之后调整细胞密度接种到培养瓶中备用. 在接种到 6 孔板共培养以前, 造血细胞在 T 形瓶中培养过夜, 以适应体外生长条件.

1.5 造血干/祖细胞与载成骨细胞 GAC 微囊共培养

实验分组如表 1 所示. 调整脐带血总有核细胞密度为 2×10⁵/ml, 将其接种于装有成骨细胞微珠的 6 孔板中, 每孔添加 2 ml, 每组平行 3 孔. 培养基采用无血清 IMEM, 添加少量生长因子, 包括 2.4 μg/L IL-3, 10 μg/L FL, 20 μg/L SCF, 2.0 μg/L GM-SCF 和 3.2 μg/L TPO. 共培养 7 天, 每天取样前轻轻吹散细胞, 使成骨细胞分泌的信号因子和造血生长因子等分散均匀, 每孔取 0.2 ml 细胞悬液进行各种检测, 取样后补加相同体积的新鲜培养液. 当细胞密度超过 2×10⁶/ml 后进行半量换液. 另外, 进行造血细胞单独培养作为对照组, 培养和检测方法与共培养组相同. 低氧环境中脐血造血干/祖细胞与成骨细胞微珠共培养组记为 A', 脐血造血干/

Table 1 Experimental design

Groups	Oxygen tension	Cell type	SCF 20 μg/L	LIF 和 IL-6
A'	5%	hOB+HSPC	+	-
B'	5%	HSPC	+	-
C'	5%	hOB	-	-
A	20%	hOB+HSPC	+	-
B	20%	HSPC	+	-
C	20%	hOB	-	-

祖细胞单独培养记为 B', 成骨细胞微珠单独培养记为 C'. 常氧环境下对应分组记为 A、B、C.

1.6 细胞计数

使用血球细胞计数板和台盼蓝拒染法进行有核细胞(nucleated cells, NC)计数.

1.7 CD34⁺ 细胞检测

使用 CellQuest Pro 流式细胞仪对新分离以及培养后的造血细胞(细胞数大于 1.0×10^6 /组)进行表面抗原检测. 用含有 1% 胎牛血清的 PBS 溶液将细胞离心洗涤 1 次 (1 000 r/min, 5 min), 加入 CD34⁺ 抗体, 并在 4℃ 下避光孵育 30 min. 然后使用 PBS 离心洗涤 1 次细胞 (1 000 r/min, 5 min), 最后上机进行检测.

1.8 集落形成能力检测

将扩增前的总有核细胞和扩增后的有核细胞分别以 1×10^5 /ml 的密度接种于甲基纤维素半固体培养基中, 内含 30% FBS、10 g/L 牛血清白蛋白、 1×10^{-4} mol/L 2- 巯基乙醇、2 mmol/L L- 谷氨酰胺、50 μ g/L SCF、20 μ g/L IL-3、20 μ g/L IL-6、20 μ g/L GM-CSF、20 μ g/L G-CSF 和 3U/ml EPO, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养 14 天后计数. 按照不同的集落分别计红系爆增式集落形成单位(BFU-E), 粒细胞及巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)和粒细胞、红细胞、单核细胞及巨核细胞集落形成单位(CFU-GEMM), 将这 3 种集落总和记为 CFU-Cs.

1.9 数据统计分析

实验中统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, A', B', A 和 B 四组间扩增因素影响的考察选用双因素方差分析, 用 SPSS 11.5 软件包进

行统计分析.

2 结 果

2.1 有核细胞的扩增

微囊化成骨细胞与造血细胞的共培养如图 1a 所示, 微珠表面带有正电荷, 因此可以弱黏附大量造血细胞在微珠表面, 使其与成骨细胞有更多的近距离通讯机会. 成骨细胞贴近壁面处形成造血生态位区, 造血细胞更容易集中在此区域成簇生长和扩增. 这种近距离的接触, 使得造血细胞与成骨细胞有更多的细胞间通讯机会, 对于调节脐血有核细胞集落(UCB-NCs)的扩增非常有利. UCB-NCs 扩增倍数如图 1b 所示, 低氧共培养条件下细胞扩增倍数最大, 达到了 (49.0 ± 4.6) 倍, 常氧共培养达到了 (17.7 ± 1.2) 倍, B' 组和 B 组分别为 (3.3 ± 0.5) 倍和 (1.9 ± 0.2) 倍. 将是否共培养和氧气浓度作为两个条件, 对四组进行析因方差分析的结果表明, 载成骨细胞 GAC 微囊的加入对 UCB-NCs 扩增有显著影响 ($F_{\text{共培养}}=408.6$; $P_{\text{共培养}} < 0.05$), 而低氧条件对 UCB-NCs 的扩增影响不显著. 实验结果还表明, 在低剂量生长因子添加条件下, 单纯降低 O₂ 含量, 并不能显著提高 UCB-NCs 的扩增能力, 而载成骨细胞 GAC 微囊的加入则能够使 UCB-NCs 明显扩增. 对不同氧浓度下共培养的两组做 *t* 检验, 发现结果有显著性差异 ($t > t_{0.005}$), 即共培养时, 氧浓度对结果有显著性影响. 而非共培养时 *t* 刚刚大于 $t_{0.01}$, 组间也有差异. 说明低氧条件能够刺激成骨细胞发挥更大的造血支持作用, UCB-NCs 在低氧和成骨细胞的共同作用下扩增最显著.

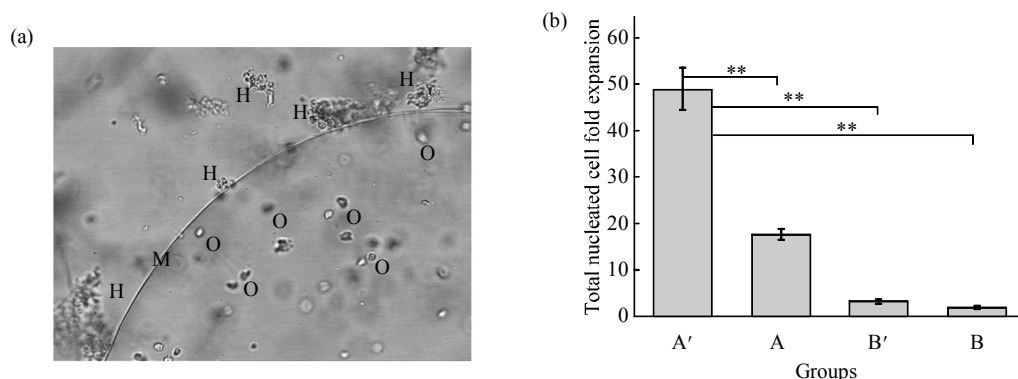


Fig. 1 Morphology of coculture of HSPCs with encapsulated osteoblasts and expansion of nucleated cells during culture

(a) Coculture of HSPCs and encapsulated osteoblasts (M: Microcapsules, H: HSPCs, O: Osteoblasts). (b) Expansion of nucleated cells after one week of culture, nucleated cells' expanding fold. A': HSPCs were co-cultured with osteoblasts under hypoxic condition (5%). A: HSPCs were co-cultured with osteoblasts under normoxic condition (20%). B': HSPCs were cultured under hypoxic condition. B: HSPCs were cultured under normoxic condition.

** $P < 0.01$.

2.2 CD34⁺细胞扩增

培养前后 CD34⁺ 细胞数量变化见表 2。培养前, CD34⁺ 细胞含量为 1.9%。经低氧共培养之后, CD34⁺ 细胞含量升为 3.4%, 但其他 3 组培养之后 CD34⁺ 细胞含量都有所下降。其中, A 组 CD34⁺ 细

胞含量降为 1.6%, B' 组降为 1.3%, 而常氧非共培养组 CD34⁺ 细胞含量下降最大, 降为 0.4%。说明没有基质细胞支持的常氧情况下, CD34⁺ 细胞在体外很难维持生长。相比之下, 低氧环境对 CD34⁺ 细胞则有较好的维持。

Table 2 CD34⁺ cell concentration change

Groups	CD34 ⁺ cell concentration before culture	CD34 ⁺ cell concentration after culture	Expanding fold
A'	1.9%	3.4%	87.6 ± 8.3
B'	1.9%	1.3%	2.2 ± 0.3
A	1.9%	1.6%	14.9 ± 1.0
B	1.9%	0.4%	0.4 ± 0

A' 组 CD34⁺ 细胞扩增最为显著, 达到(87.6±8.3)倍, A 组为(14.9±1.0)倍, B' 组为(2.2±0.3)倍, 而 B 组 CD34⁺ 细胞总量则有所下降, 仅为初始值的 40%。在低氧共培养条件下, 不但总细胞量有上升, CD34⁺ 细胞含量也有所上升, 因此 CD34⁺ 细胞扩增才这样显著。而在常氧共培养条件下, CD34⁺ 细胞含量下降, 但是总细胞数上升较多, 因此 A 组细胞 CD34⁺ 总数也有一定的扩增。这说明低氧和共培养条件都是必要的且二者可协同作用。

2.3 细胞集落培养

四组造血细胞集落培养后的扩增倍数如图 2 所示。在 BFU-E 集落中, 共培养的两组集落扩增较多, 分别为(9.4±0.8)倍和(6.4±1.1)倍; 而非共培养

两种集落扩增较少, 分别为(3.5±0.2)倍和(2.5±0.3)倍。可以看出成骨细胞的支持和调控对造血 BFU-E 集落的扩增有明显的促进作用。而不同的氧分压环境扩增出的细胞, BFU-E 集落也有一定的差异。

在 CFU-GM 集落扩增图中可以看出, A' 和 A 组显著高于 B' 和 B 组, 四组扩增结果分别为: (8.5±0.6)倍, (7.7±0.9)倍, (4.2±0.8)倍和(3.6±0.3)倍。可以看出, 氧分压的不同没有造成结果的明显差异, CFU-GM 集落在常氧条件下一样可以扩增得很好。扩增倍数高低只与是否有成骨细胞支持有关, 说明成骨细胞分泌的某些因子对于 CFU-GM 扩增有促进作用。

CFU-GEMM 结果体现了培养后更原始造血细胞的扩增情况。而这四组结果差异很大, A' 组扩增最多, 达到(13.3 ± 1.7)倍, A 组扩增了(6.1 ± 0.9)倍, B' 和 B 组分别为(2.1 ± 0.2)倍和(1.1 ± 0.4)倍。说明低氧条件和成骨细胞支持都对结果有显著影响, 并且具有协同作用。因此, 为了获得最好的扩增结果, 应该采用成骨细胞支持, 并同时在 5% 低氧环境下进行共培养。

CFU-Cs 是上述 3 种集落的综合, 反应了干/祖细胞的整体扩增能力。A' 组 CFU-Cs 集落扩增了(9.8±0.8)倍, A 组为(6.9 ± 0.7)倍, B' 组(3.5 ± 0.4)倍, B 组(2.6 ± 0.2)倍。

2.4 白介素-6(IL-6)的变化

在培养过程中 IL-6 浓度变化如图 3 所示。成骨细胞微珠单独培养组反应了成骨细胞分泌 IL-6

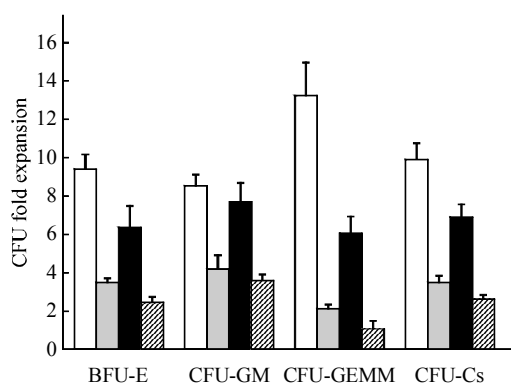


Fig. 2 CFU fold expansion

Nucleated cells obtained from different culture conditions were cultured in Methyl cellulose semisolid medium two weeks to detect their colony-forming ability. ** $P < 0.01$. □: 5%+HSPC+hOB(A'); ▤: 5%+HSPC(B'); ■: 20%+HSPC+hOB(A); ▨: 20%+HSPC(B).

的能力, 7 天中, IL-6 分泌一直在增加, 其中低氧组的含量显著高于常氧组. 而在造血细胞单独培养时, 造血细胞也会分泌一定量的 IL-6, 但是总浓度不超过 26 mg/L, 且低氧组略高于常氧组. 对于共培养组, IL-6 浓度初期在不断上升, 在第 3 天到第 5 天, 趋势明显变缓, 这是因为造血细胞在第 3 天经过了换液, 体系内生长因子明显减少, 在第 5 天到第 7 天, 则出现了明显的下降, 这是因为换液之后, 造血细胞出现很快的扩增, 因此需要消耗较多的生长因子.

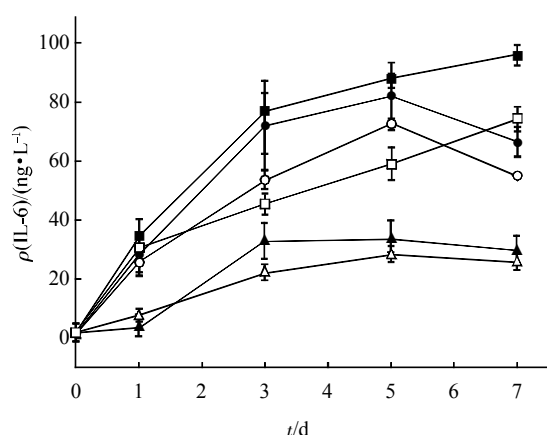


Fig. 3 IL-6 concentration variation curve

The concentration of IL-6 was measured with IL-6 ELISA Kit. ●—●: 5%+HSPC+hOB; ▲—▲: 5%+HSPC; ■—■: 5%+hOB; ○—○: 20%+HSPC+hOB; △—△: 20%+HSPC; □—□: 20%+hOB.

IL-6 因子的主要作用是促进造血总细胞扩增. 因此, 成骨细胞通过分泌 IL-6 因子促进造血细胞的扩增. 在不同的氧分压下, 成骨细胞分泌的 IL-6 量不同, 这就解释了共培养下造血细胞在常氧和低氧下扩增结果有差异的原因.

2.5 白血病抑制因子(LIF)的变化

在培养过程中 LIF 浓度的变化如图 4 所示. 成骨细胞微珠在低氧和常氧下单独培养时, 分泌的 LIF 差异十分显著. 低氧条件下, LIF 的分泌在第 7 天达到 (151.1 ± 4.2) mg/L, 常氧条件下, 第 7 天只有 (66.8 ± 8.2) mg/L, 有超过 2 倍的差距. 在造血细胞单独培养时, 两种氧浓度条件下细胞分泌的 LIF 量很接近. 说明氧浓度条件对造血细胞的 LIF 分泌没有影响. 在两种细胞共培养的情况下, LIF 的含量也有显著的差异. 低氧条件下, 体系内的

LIF 含量明显高于其在常氧条件下的含量, 第 7 天时, 体系内 LIF 浓度分别为 (165.9 ± 5.8) mg/L 和 (82.0 ± 3.6) mg/L.

LIF 对造血干 / 祖细胞性状的保持至关重要, 其作用在于抑制造血干 / 祖细胞分化. 通过 LIF 的分泌曲线, 可以解释不同培养条件下 CD34⁺ 细胞含量的变化差异, 并且可以看出 LIF 促进了 CFU-GEMM 和 BFU-E 细胞的维持与扩增.

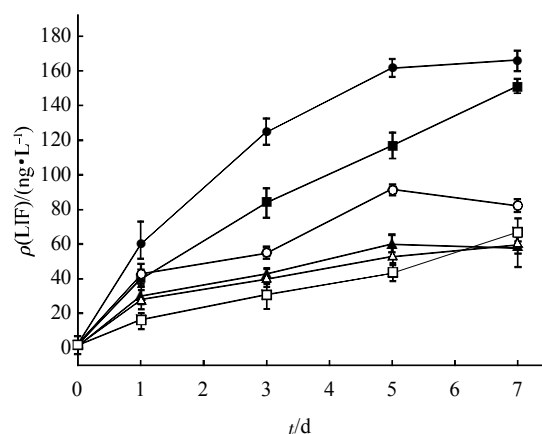


Fig. 4 LIF concentration variation curve

The concentration of LIF was measured with LIF ELISA Kit. ●—●: 5%+HSPC+hOB; ▲—▲: 5%+HSPC; ■—■: 5%+hOB; ○—○: 20%+HSPC+hOB; △—△: 20%+HSPC; □—□: 20%+hOB.

3 讨 论

自 Schofield (1978 年) 首次提出干细胞增殖和发育存在微环境(microenvironment)的假说之后, 大量研究均充分证明了干细胞生态位区(Niche)的存在^[8-10]. 长期以来, 造血微环境被认为是由网状细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、脂肪细胞及细胞外基质等组构成. 成骨细胞仅为骨髓造血提供支架结构, 起保护作用. 但近年来相关研究证实^[11-12], 成骨细胞是组成成人骨髓内造血微环境重要的细胞成分之一, 是构建造血生态位区(hematopoietic niche)至关重要的支撑成分, 并对位居其中的 HSPCs 发育、增殖和分化及成熟等生理活动发挥着关键性的调控作用.

对于成骨细胞支持和调控造血干 / 祖细胞扩增的作用机理尚不明确. 有研究者认为, 成骨细胞与造血干 / 祖细胞间的直接接触对于 CD34⁺ 细胞性状

和数量上的维持有重要作用^[13]。另有研究认为, 成骨细胞可以通过分泌各种细胞因子来刺激造血细胞扩增和干细胞特性的维持。研究表明, 成骨细胞能分泌调节造血干细胞功能的细胞因子^[14], 包括粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony-stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony-stimulating factor, M-CSF)、GM-CSF、白介素 1 (interleukin 1, IL-1)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF) 和白介素 6 (interleukin 6, IL-6)等。

本研究利用微囊化成骨细胞在体外进行支持和调控造血干/祖细胞扩增的研究, 有利于对两种细胞间的相互作用进行单独考察, 排除了以往体内研究中由其他细胞或周围组织成分所造成的影响。本文通过检测 IL-6 和 LIF 两种生长因子来探讨成骨细胞的作用机理。结果表明, 在低氧环境中, IL-6 和 LIF 分泌量都明显高于常氧环境中, 成骨细胞对造血干/祖细胞的干细胞特性维持和数量扩增作用都更为显著。我们认为原因在于 5%氧浓度接近体内骨髓腔中造血干细胞生态位区的真实氧浓度, 在这种适宜的条件下, 成骨细胞分泌生长因子含量升高, 有利于造血干/祖细胞的扩增, 并且减少了氧自由基对生长因子的氧化损伤, 使得造血生长因子可以长期存在于体系中。成骨细胞在这种氧浓度下也可能会分泌其他未知的信号因子, 从而进一步刺激造血干/祖细胞的体外有效扩增。

通过对培养后细胞的 CFU-Cs 检测发现, 共培养组的集落扩增倍数明显升高, 而非共培养组集落数则出现下降。因此, 成骨细胞而非低氧条件, 是促使干/祖细胞性状维持的重要影响因素。但在低氧条件下, 成骨细胞的存在对造血干/祖细胞特性的维持更加显著。

以往的共培养研究中, 通常采用直接接触的培养方法^[15], 在收获造血细胞时, 就难免会有基质细胞混入其中。此外, 本研究室还尝试使用 transwell 共培养板检测人脂肪组织源 ADSCs 作为基质细胞和 HSPCs 间接共培养的支持效果, 结果发现单核细胞、CD34⁺ 细胞和集落的扩增倍数分别为 (15.1±0.2)、(5.0±0.1)和(8.5±0.5)倍, 扩增效果并不显著。因此, 我们采用微囊包被的方法将成骨细胞与造血细胞隔离开来, 避免了细胞污染和免疫排斥反应。本实验所使用的 GAC 微珠, 是与常见的 AC 微珠^[16]结构类似的一种组织工程材料, 添加明胶是为了给成骨细胞增殖提供更适宜的环境, 而不

用海藻酸钠进行表面电荷中和是因为壳聚糖表面带有正电荷, 可以弱吸附大量造血细胞, 从而加强两种细胞间的近距离通讯。此外, 微珠内部有丰富的孔道, 保证了成骨细胞生长所需要的营养物质的扩散, 同时可以使成骨细胞分泌的造血生长因子扩散到 UCB-NCs 聚集处, 起到刺激和调控造血干/祖细胞扩增的作用。而微珠材料本身又对生长因子的扩散起到缓释作用, 生长因子可以均匀扩散到整个培养环境中, 微珠表面生长因子浓度梯度增大, 这对于生长因子的长期作用很有帮助。此外, 微囊化的成骨细胞形成了 3D 环境, 与贴壁培养的成骨细胞共培养模式相比, 一方面可以使培养体系中包含更多的成骨细胞, 另一方面也使其具有更大的 UCB-NCs 与 OBs 作用面积。

经过体外培养的造血干/祖细胞, 其 CD34⁺ 细胞占总细胞的百分率通常都是下降的^[17-18], 而本研究中低氧共培养组的 CD34⁺ 细胞百分比却上升, 扩增倍数更是明显提高。此外, 以往静态培养条件下的有核细胞扩增倍数一般在 2~20 倍^[7, 19], 而本研究中 A'组有核细胞的扩增倍数达到了近 50 倍。以上结果均表明本培养体系具有较明显的优势。

需要说明的是, 国内外许多研究者对造血干/祖细胞扩增的研究都是使用分离纯化的 CD34⁺ 细胞。对分选之后的细胞进行培养, 虽然能够获得较大的扩增倍数, 但 CD34⁺ 细胞能由 CD133⁺CD34⁺ 细胞体外培养产生^[20]。因此分选细胞不可避免地会造成 CD34⁺ 细胞的丢失, 同时也可能丢失比它们更加早期的造血细胞组分。而用于临床移植的脐血主要是以单个核细胞或全血的方式来储存的, 脐血造血干细胞移植的归巢重建速度也主要和整个有核细胞数有关^[21]。所以, 本研究选用 UCB-NCs 作为培养的起始细胞, 以期实验结果可以更接近于临床应用。

参 考 文 献

- [1] Calvi L M, Adams G B, Weibrecht K W, *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003, **425**(6960): 841-846
- [2] Zhang J, Niu C, Ye L, *et al.* Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, **425**(6960): 836-841
- [3] Song K, Zhao G, Liu T, *et al.* Effective expansion of umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells by regulation of microencapsulated osteoblasts under hypoxic condition. *Biotechnol Lett*, 2009, **31**(7): 923-928
- [4] Crean S M, Meneski J P, Hullinger T G, *et al.* N-linked sialylated

- sugar receptors support haematopoietic cell-osteoblast adhesions. *Br J Haematol*, 2004, **124**(4): 534-546
- [5] Nakajima H, Ito M, Morikawa Y, *et al.* Wnt modulators, SFRP-1, and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **390**(1): 65-70
- [6] Smith S, Broxmeyer H E. The influence of oxygen tension on the long-term growth *in vitro* of hematopoietic progenitor cells from human cord blood. *Br J Haematol*, 1986, **63**(1): 29-34
- [7] Koller M R, Bender J G, Papoutsakis E T, *et al.* Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood*, 1992, **80**(2): 403-411
- [8] Watt F M, Hogan B L M. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*, 2000, **287**(5457): 1427-1430
- [9] Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*, 2001, **414**(1): 98-104
- [10] Goldman D C, Bailey A S, Pfaffle D L, *et al.* BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood*, 2009, **114**(20): 4393-4401
- [11] Lemischka I R, Moore K A. Stem cells: Interactive niches. *Nature*, 2003, **425**(6960): 778-779
- [12] Engin F, Lee B. NOTCHing the bone: Insights into multi-functionality. *Bone*, 2010, **46**(2): 274-280
- [13] Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 2000, **28**(11): 1197-1205
- [14] Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*, 2005, **26**(8): 426-433
- [15] 黄晓兵, 刘 霆, 孟文彤, 等. 骨髓间充质干细胞诱导成骨细胞模拟造血龛支持造血干 / 祖细胞增殖. *中华血液学杂志*, 2006, **27**(12): 795-800
- Huang X B, Liu T, Meng W T, *et al.* *Chin J Hematol*, 2006, **27**(12): 795-800
- [16] Limor B, Marcelle M. Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: effect on mechanical properties and on long-term viability. *Biopolymers*, 2006, **82**(6): 570-579
- [17] Fujimoto N, Fujita S, Tsuji T, *et al.* Microencapsulated feeder cells as a source of soluble factors for expansion of CD34 (+) hematopoietic stem cells. *Biomaterials*, 2007, **28**(32): 4795-4805
- [18] Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, *et al.* Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*, 2000, **105**(7): 1013-1021
- [19] McNiece I, Harrington J, Turney J, *et al.* *Ex vivo* expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2004, **6**(4): 311-317
- [20] Summers Y J, Heyworth C M, de-Wynter E A, *et al.* AC133⁺ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells *in vitro*. *Stem Cells*, 2004, **22**(5): 704-715
- [21] Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 2000, **28**(11): 1197-1205

Microencapsulated Osteoblasts Support Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion in Hypoxic Environment*

SONG Ke-Dong¹⁾, LIU Tian-Qing^{1)**}, ZHAO Guo-Feng¹⁾, WU Shuang¹⁾, FANG Mei-Yun²⁾,
SHI Fang-Xin³⁾, ZHU Li-Li³⁾, MA Xue-Hu¹⁾, CUI Zhan-Feng⁴⁾

¹⁾ Dalian R&D Center for Stem Cell and Tissue Engineering, State Key Laboratory of Fine Chemicals,
Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

²⁾ Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China;

³⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China;

⁴⁾ Department of Engineering Science, Oxford University, Parks Road, Oxford OX1 3PJ, UK)

Abstract Microencapsulated osteoblasts were cocultured with hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) under hematopoietic niche oxygen concentration to investigate the promoting effort of hematopoietic microenvironment on the expansion of umbilical cord blood HSPCs. The osteoblasts were isolated from human iliac bone and cultured, the third passage of osteoblasts at a density of 8×10^5 cells/ml were encapsulated in gelatin-alginate-chitosan (GAC) beads with a diameter of 0.5 mm by the polyelectrolyte-complexation method. Three groups of cells were cultured in 5% oxygen incubator, A' group with microencapsulated osteoblasts and hematopoietic cells, B' with only hematopoietic cells and C' with only microencapsulated osteoblasts. Meanwhile, the similarly grouped cells were cultured under 20% oxygen condition, named as A, B and C groups, respectively. The expansion of HSPCs was evaluated by flow cytometry analysis and colony-forming assays. And the concentrations of two kinds of cytokines, LIF and IL-6, were tested to investigate the mechanism of osteoblast's action. The results showed that human osteoblasts dispersed uniformly and grew well in microbeads. There were amount of micro holes in the beads for nutrients transmission. Lots of hematopoietic cells adhered weakly on the surface of microbeads. After 7 days of culture, the hematopoietic cell expansion folds were (49.0 ± 4.6) , (3.3 ± 0.5) , (17.7 ± 1.2) and (1.9 ± 0.2) respectively for group A', B', A and B. And CD34⁺ cells in groups A', B' and A were expanded (87.6 ± 8.3) -fold, (2.2 ± 0.3) -fold and (14.9 ± 1.0) -fold, but CD34⁺ cells in group B descended. CFU-Cs expansion folds in group A', B', A and B were (9.8 ± 0.8) , (3.5 ± 0.4) , (6.9 ± 0.7) and (2.6 ± 0.2) respectively. It was indicated that Hypoxic co-culture system could promote HSPCs expansion much more than normoxic co-culture system and somatic cell-free culture system. IL-6 and LIF concentrations in A', B' and C' were significantly higher than those in groups A, B and C, which were consistent with their expansion results. Moreover, microencapsulated osteoblasts could support the expansion of umbilical cord blood HSPCs, especially in 5% oxygen condition. Osteoblasts lived in low oxygen condition could secrete more cytokines and thus regulate HSPCs expansion.

Key words hypoxia, hematopoietic stem/progenitor cell, microbead, osteoblasts, co-culture

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00727

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30670525, 30700181), Young Teacher Culture Foundation of Dalian University of Technology (893228) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China (20070141055).

**Corresponding author.

Tel: 86-411-84706360, Fax: 86-411-83633080, E-mail: liutq@dlut.edu.cn

Received: December 23, 2009 Accepted: February 2, 2010