

脐血单个核细胞体外诱导 分化为粒系细胞的研究

陈琳 谢小燕 聂纪芹 陈东丽 黄安平 房芳
曲洺逸 南雪 何丽娟 范增 岳文 裴雪涛

【摘要】 目的 探索脐血来源单个核细胞体外诱导分化为粒系细胞的方法。方法 采用羟乙基淀粉沉降红细胞,淋巴细胞分离液分离单个核细胞。选择不同的培养基、添加剂以及培养模式诱导粒系细胞分化,显微镜观察细胞形态,流式细胞术检测细胞表型,免疫荧光测定粒系细胞CD18表达,并检测细胞吞噬功能。结果 采用X-VIVO™15中添加细胞因子TPO、SCF、G-CSF诱导粒系细胞,细胞存活率、细胞数、粒系细胞分化效率均优于添加胎牛血清组。与SCGM培养基诱导粒系细胞相比,X-VIVO™15培养基效果更佳,且成本低。采用造血干细胞扩增和在基础培养基X-VIVO™15中添加细胞因子TPO、SCF、G-CSF诱导粒系细胞的两阶段扩增、诱导模式,21 d细胞扩增倍数近132倍;流式细胞术检测表明,粒系细胞分化效率滞后于直接诱导模式,粒系标志CD15表达分别为(69.60±1.06)%和(97.73±0.39)%;瑞氏-吉姆萨染色可见成熟的分叶核粒细胞;免疫荧光方法检测显示溶酶体蛋白CD18的表达;成熟的粒细胞具有较强吞噬墨汁的功能,吞噬效率为(51.43±0.05)%。且在细胞趋化因子IL-8作用下,粒细胞具有趋化作用。结论 优化了诱导粒系细胞培养体系和培养模式,获得了具有一定功能的粒系细胞。

【关键词】 胎血; 单个核细胞; 粒系细胞

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2013AA020107);广州市协同创新重大专项(201400000003);广东省前沿与关键技术创新专项(2015B020226001)

Mononuclear cells of umbilical cord blood differentiation to granulocyte cell in vitro Chen Lin*, Xie Xiaoyan, Nie Jiqin, Chen Dongli, Huang Anping, Fang Fang, Qu Mingyi, Nan Xue, He Lijuan, Fan Zeng, Yue Wen, Pei Xuetao*. *Stem Cell and Regenerative Medicine lab, Beijing Institute of Transfusion Medicine, South China Research Center for Stem Cell & Regenerative Medicine, Beijing 100850, China
Corresponding author: Pei Xuetao, Email: peixt@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To explore an optimal method for granulocyte cell production from umbilical cord blood mononuclear cells. **Methods** Erythrocytes were precipitated by hydroxyethyl starch. Mononuclear cells were isolated through Ficoll density gradient centrifugation. Different media, additives and cultivation model were chosen for granulocyte induction. Cell morphology was observed by microscopy, and cell phenotype was detected by flow cytometry. The CD18 expression of granulocytes was tested by immunofluorescence assay, and phagocytosis test was executed as well. **Results** Compared to fetal bovine serum (FBS) treatment group, cell viability, counts and differentiation rate of granulocytes induced by X-VIVO™15 combined with TPO, SCF, G-CSF but without FBS were superior. And X-VIVO™15 medium was better than SCGM medium at effectiveness and cost. Using two-stage mode of hematopoietic stem cell expansion followed by granulocyte induction with X-VIVO™15 combining TPO, SCF and G-CSF, cell proliferation was nearly 132 times at day 21. Flow cytometry showed that the differentiation was lagged in 2-stage mode than in direct induction mode, CD15 expression was (69.60±1.06)% vs (97.73±0.39)%; Wright - Giemsa staining demonstrated mature granulocytes; immunofluorescence

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.06.013

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院野战输血研究所, 全军干细胞与再生医学重点实验室(陈琳、谢小燕、聂纪芹、房芳、曲洺逸、南雪、何丽娟、范增、岳文、裴雪涛); 华南生物医药研究院(陈东丽、黄安平)

通信作者: 裴雪涛, Email: peixt@nic.bmi.ac.cn

showed the expression of lysosomal proteins CD18. A strong phagocytic function of mature granulocytes was demonstrated by phagotrophic efficiency of $(51.43 \pm 0.05)\%$. And granulocyte had chemotaxis ability under the role of chemotactic factor IL-8. **Conclusion** Optimized culture media and cultivation mode are achieved for functional granulocytes induction in vitro.

【Key words】 Cord blood; Mononuclear cells; Granulocyte cells

粒系细胞是血液非特异性免疫系统的重要组成部分,特别是中性粒细胞,在非特异性免疫应答中执行重要的生理功能。粒细胞缺乏常导致头晕、乏力,此外还可出现严重感染症状,感染部位以肺、尿路、皮肤等多见,易发生脓毒血症或败血症,病死率可达 25%。中性粒细胞减少症是由于外周血中性粒细胞数量减少而产生的综合征,是肿瘤治疗中最常见的并发症,在接受化疗的实体肿瘤患者中发生率为 10%~20%,院内的病死率达到 9.8%。尽管重组 G-CSF 可通过促进人造血干细胞向粒系分化,从而发挥预防中性粒细胞减少症的作用,但其治疗效果并不明显。对于抗生素治疗无效而感染风险极高的粒细胞减少症,需通过移植粒细胞的方法进行治疗。CD34⁺造血干细胞诱导、分化为粒细胞的研究多有报道^[1-2]。本研究我们探索脐血来源的单个核细胞体外诱导粒系细胞的最佳培养体系和培养模式,以期为临床应用治疗粒细胞减少症奠定实验基础。

材料与方 法

一、一般资料

5 份脐血来自足月健康新生儿,脐血的获取均得到产妇的知情同意。

二、仪器与试剂

6%羟乙基淀粉和人淋巴细胞分离液均购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;X-VIVO™15 培养基购自瑞士 Lonza 公司;SCGM 无血清培养基购自德国 Cell Genix 公司;生长因子 hSCF、hFlt-3、hIL-6、hIL-3、hG-CSF、IL-8 均购自美国 PeproTech 公司;胎牛血清(FBS)购于美国 Gibco 公司。TPO 购自沈阳三生制药有限责任公司;抗人 CD15-PE 单克隆抗体、抗人 CD35-APC 单克隆抗体和抗人 CD11b-Percp 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司;小鼠抗人 CD-18 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;山羊抗小鼠 IgG-FITC 抗体购自中杉金桥 ZSGB-BIO 公司;瑞氏-吉姆萨 A 液和 B 液购自 BaSo 珠海贝索生物科技有限公司;得阁墨汁购自北京利明恒通工贸有限公司;0.9%生理盐水购自石家庄四药有限公

司;Transwell 小室及 24 孔板购于美国 Corning 公司;Vi-CELLXR 细胞活力分析仪购自德国贝克曼公司;5910 型低温离心机购自日本久保田公司;CKS31 倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;TXD3 细胞涂片离心机购自湘仪离心机公司;倒置荧光显微镜和正置显微镜购自日本 Nikon 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

三、粒系细胞获得

1. 粒系细胞诱导:脐血采用 6%羟乙基淀粉室温沉降红细胞 15~30 min。小心吸取上清,生理盐水重悬细胞。缓慢加入含淋巴细胞分离液的管中,室温密度梯度离心 20 min,收集中间白膜层,生理盐水洗涤 2 次,细胞计数。接种单个核细胞,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行诱导扩增、传代,诱导 14~21 d 后取细胞进行检测。

2. 粒系细胞培养条件选择:采用含 50 ng/ml SCF、50 ng/ml G-CSF 的 X-VIVO™15 无血清培养基,添加不同 50 ng/ml TPO、10%FBS 诱导脐血单个核细胞分化为粒系细胞,24 孔板培养,检测细胞数、存活率及标志分子 CD15、CD11b 和 CD35 表达。

脐血单个核细胞采用不同的无血清培养基 X-VIVO™15 和 SCGM,并添加 50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF、50 ng/ml G-CSF 进行粒系细胞诱导扩增,24 孔板培养,检测细胞数以及标志分子 CD15、CD11b 和 CD35 的表达。

3. 粒系细胞扩增诱导模式的选择:采用含 50 ng/ml SCF、10 ng/ml TPO、20 ng/ml IL-3、10 ng/ml IL-6、50 ng/ml Flt3 的 stemspan 培养基扩增脐血单个核细胞,含 50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF、50 ng/ml G-CSF 的 X-VIVO™15 培养基粒系诱导的两阶段培养、诱导模式,细胞接种密度为 4×10^6 /ml,于培养瓶中进行扩大培养。

四、粒系细胞形态学观察

取 2×10^5 /片细胞 1 200 r/min 离心 3 min(离心机半径为 7.5 cm)。瑞氏-吉姆萨染色,显微镜观察细胞形态。

五、免疫荧光检测粒系细胞 CD18 表达

取 2×10^7 个细胞于 EP 管中,PBS 洗 1 次,4%多聚

甲醛 4 ℃ 固定 1 h 后,弃上清。加入 300 μl 含 0.1% Triton 的 PBS 中,4 ℃ 处理 15~30 min,离心,弃上清。PBS 洗涤,加 1% BSA 混匀,加入 1:300 稀释的小鼠抗人 CD18 抗体,4 ℃ 孵育 1 h。PBS 洗涤,弃上清。PBS 重悬细胞,加入 1:200 稀释的 FITC 标记的抗小鼠二抗,4 ℃ 孵育 1 h,PBS 洗涤,离心,弃上清。PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min 甩片(离心半径 7.5 cm),荧光显微镜下观察。

六、流式细胞术检测粒系细胞表面标志

每管取 2×10⁵ 个细胞,生理盐水洗 2 次,加入 100 μl 生理盐水重悬,以不同荧光标记 IgG 抗体为对照组,实验组为分别加入 CD15-PE、CD35-APC、CD11b-Percp 抗体以及三种抗体同时加入组,每个样品重复检测 3 次。4 ℃ 孵育 30 min。生理盐水洗 2 次,加入 200 μl 重悬,筛网过滤,上机检测。

七、粒细胞吞噬功能检测

生理盐水按 1:1 000 稀释墨汁,取 1×10⁶ 个细胞悬于 100 μl 生理盐水中,加入 100 μl 稀释好的墨汁,37 ℃ 孵育 3 h,生理盐水洗 2~3 次,1 000 r/min 离心 5 min 甩片(离心半径 7.5 cm)。瑞氏-吉姆萨染色,显微镜观察 100 个细胞中墨汁的吞噬情况。

八、粒系细胞趋化作用^[3]

X-VIVO™ 培养基稀释 IL-8 浓度分别为 50、100 ng/ml,以 X-VIVO™ 培养基作为空白对照组,加入 24 孔板中,每孔 1 000 μl。装入 Transwell 小室,并加入生理盐水稀释的细胞(1×10⁶/ml),每孔 100 μl,放置于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中 60 min,0.2% 结晶紫染色 Transwell 小室 30 min,显微镜观察并拍照,计算粒细胞的趋化效率。

九、统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理,多组均数比较采用方差分析,两组间均数的比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、血清对粒系细胞诱导扩增的影响

采用含 SCF、G-CSF 细胞因子的 X-VIVO™15 培

养基中,添加影响粒系细胞培养诱导成分 FBS 或 TPO 诱导 14 d,观察对粒系细胞诱导扩增的影响。结果显示,加入 FBS 抑制粒系细胞扩增和表达(表 1)。故选择含 SCF、G-CSF、TPO 的 X-VIVO™15 培养基作为诱导扩增粒系细胞的培养基。

二、不同培养基培养诱导粒系细胞的效果

选择含 TPO、SCF、G-CSF 因子组合 X-VIVO™15 或 SCGM 培养基,诱导扩增粒系细胞 14 d,结果显示,粒系细胞在 X-VIVO™15 培养基中细胞数及 CD15⁺ 表达高于 SCGM;两种培养基诱导的晚幼粒及成熟粒系细胞表型 CD15⁺CD11b⁺,CD35⁺CD15⁺ 表达差异无统计学意义(P>0.05),因此,首选 X-VIVO™15 作为粒系细胞基础培养基(表 2)。用该培养体系继续诱导粒系细胞 21 d,CD15⁺、CD15⁺CD11b⁺ 表达差异无统计学意义[分别为(91.68±0.32)% 和 (47.50±2.55)%],CD35⁺CD15⁺ 表达 [(78.65±1.63)%]与诱导 14 d 相比,明显增高。

瑞氏-吉姆萨染色,细胞形态观察可见在粒系细胞诱导分化过程中出现大量的分叶核粒细胞,同时有少量早幼粒细胞及更原始的祖细胞(图 1)。

三、分阶段扩增诱导粒系细胞

采用先扩增造血干细胞 7 d,再进行粒系细胞诱导 14 d 的两阶段培养法,扩增倍数为 132 倍,粒系细胞表面标志 CD15⁺ 表达水平为(69.6±1.06)%,CD15⁺CD11b⁺ 为(34.11±1.27)%,CD15⁺CD35⁺ 为(26.83±1.17)%。粒系细胞分化效率滞后于直接诱导模式。

1. 诱导的粒系细胞形态:在倒置显微镜下观察体外诱导的粒系细胞,多数细胞为圆形、体积小,在生长因子的刺激下可诱导分化为粒系细胞,仅存在少量、体积大的巨噬系细胞(图 2A)。瑞氏-吉姆萨染色可见不同阶段的粒细胞。成熟的分叶核粒细胞胞核更致密,呈带状钝弯或分叶状,核质比更小,胞质嗜碱性消失,着色淡红(图 2B)。

2. 诱导的粒系细胞 CD18 检测:CD18 是粒细胞中的溶酶体蛋白,免疫荧光检测显示,脐血单个核细胞经体外诱导获得的粒系细胞 CD18 抗体检测为阳性,发绿色荧光(图 3)。

表 1 血清对粒系细胞诱导扩增的影响(̄x±s)

组别	细胞数(×10 ⁷)	存活率(%)	CD15 ⁺ 细胞(%)	CD15 ⁺ CD11b ⁺ 细胞(%)
TPO ⁺ /FBS ⁺	2.58±0.03 ^a	95.11±0.13 ^a	94.05±0.40 ^a	52.60±3.54
TPO ⁺ /FBS ⁻	1.09±0.04	89.28±0.25	88.22±0.38	44.13±4.40
TPO ⁻ /FBS ⁺	0.79±0.02	86.60±0.36	84.53±0.21	47.85±4.88

注:TPO⁺/FBS⁺ 组与其他两组比较,^aP<0.01。每组设 3 个复孔,实验重复 4 次

表2 不同培养基培养诱导粒系细胞($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞数($\times 10^7$)	CD15 ⁺ 细胞(%)	CD15 ⁺ CD11b ⁺ 细胞(%)	CD35 ⁺ CD15 ⁺ 细胞(%)
X-VIVO™15培养组	1.46±0.03	97.73±0.39	53.15±2.33	49.35±1.06
SCGM培养组	0.86±0.01	84.35±1.91	51.35±4.74	49.90±8.06
t值	0.873	3.468	0.024	-0.008
P值	<0.001	<0.001	0.677	0.932

注:每组设3个复孔,实验重复4次

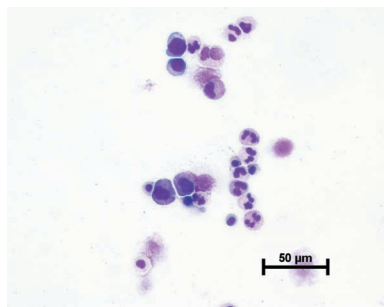
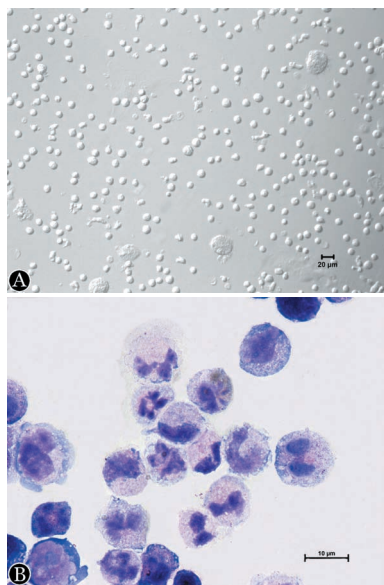


图1 X-VIVO™15培养基体外诱导的粒系细胞形态(瑞氏-吉姆萨染色,×400)



A: 倒置显微镜下观察诱导的粒系细胞;B: 普通显微镜下观察诱导的粒系细胞(瑞氏-吉姆萨染色,×1 000)

图2 体外诱导粒系细胞显微镜下形态

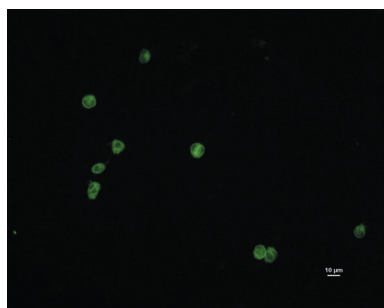


图3 荧光显微镜下观察示体外诱导的粒系细胞CD18表达阳性

3. 诱导的粒系细胞吞噬功能: 墨汁吞噬实验表明, 体外扩增诱导的粒系细胞具有一定的吞噬墨汁

的功能, 吞噬效率为(51.43±0.05)% (图4)。

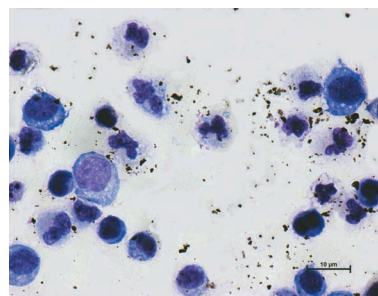


图4 体外诱导的粒系细胞吞噬功能(瑞氏-吉姆萨染色,×1 000)

4. 诱导的粒系细胞趋化作用: 粒细胞趋化作用研究显示, 0、50、100 ng/ml IL-8作用下, 粒细胞趋化效率分别为(37.50±3.69)%、(71.58±5.96)%、(97.28±1.32)%, 随着细胞趋化因子IL-8浓度增加, 粒细胞趋化效率增强。

讨 论

近十年来, 随着造血干细胞研究的进一步深入, 造血干/祖细胞在体外诱导分化为血液细胞的临床应用越来越受到人们重视^[4-6]。临床上, 粒细胞移植治疗存在血型、HLA配型、移植剂量、移植后治疗效果和细胞数量等问题^[7-8]。而造血干细胞移植, 中性粒细胞重建存在滞后现象, 体外诱导造血干细胞制备的粒细胞则为粒细胞移植治疗提供了新的希望。Haylock等^[9]通过添加均为10 ng/ml的IL-1、IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF、SCF诱导CD34⁺造血干祖细胞体外制备CFU-GM。有文献报道, 采用添加SCF、FL、IL-3和TPO的X-VIVO 15专用培养基扩增正常人的造血干/祖细胞, 获得的细胞产品命名为CLT-008, 用于治疗化疗患者粒细胞减少症的临床实验^[10], 为保证获得足量的造血干/祖细胞, 需要多名供血者以满足需求。由于脐血对配型要求低, 但存在细胞植入时间偏长的问题, 可以通过体外诱导扩增满足移植的需要。Nielsen研究团队采用stemline™ II培养基, 通过WAVE生物反应器实现大规模诱导扩增脐血来源的CD34⁺造血干祖细胞为中性粒细胞, 并且命名为eNeut。来源于脐血的细胞, 免疫

原性低,可以直接用于异体移植,或采用25 Gy照射诱导的粒细胞,以避免移植物抗宿主病(GVHD),照射的细胞其体内功能不会受到影响^[11-13]。

由于脐血易于获得,其造血干细胞与骨髓相当,高于外周血,而造血干细胞来源于单个核细胞^[14]。本研究则采用脐血来源的单个核细胞作为种子细胞,探索不同培养诱导配方、模式对粒系诱导扩增的影响。结果表明,采用X-VIVO™15中添加TPO、SCF、G-CSF进行脐血单个核细胞诱导粒系细胞,细胞存活率、细胞数、粒系细胞分化效率均优于添加胎牛血清组。与SCGM培养基诱导粒系细胞相比,X-VIVO™15培养基效果更佳,成本更低。且随着诱导时间延长,成熟粒细胞分化效率增加。为了获得更多的粒细胞,采用造血干细胞扩增和在基础培养基X-VIVO™15中添加TPO、SCF、G-CSF诱导粒系细胞的两阶段扩增、诱导模式,培养21 d细胞扩增倍数为132倍,28 d扩增倍数为2 590.5倍。以1份脐血获得10⁸单个核细胞计算,体外诱导28 d可获得10¹¹细胞,能够满足移植需求。有研究显示,当粒细胞移植量在(2~10)×10¹⁰时,移植后体内中性粒细胞水平在24 h内可维持于正常水平。流式细胞术检测粒系细胞表面标志表明,采用两阶段模式,粒系细胞分化效率滞后于直接诱导[CD15⁺表达分别为(69.6±1.06)%和(97.73±0.39)%,CD15⁺CD11b⁺表达分别为(34.11±1.27)%和(53.15±2.33)%,CD15⁺CD35⁺表达分别为(26.83±1.17)%和(49.35±1.06)],可通过延长诱导时间以增加粒系细胞分化效率和数量;瑞氏-吉姆萨染色观察可见,经体外培养产生成熟的具有分叶核的粒系细胞,此外仍可见早期的粒细胞,与文献^[15]报道一致;免疫荧光检测,粒系细胞胞内表达溶酶体蛋白CD18分子;成熟的粒细胞具有吞噬墨汁的功能,吞噬效率为(51.43±0.05)%。粒细胞对细胞趋化因子IL-8具有趋化作用,且随着IL-8浓度增加趋化效率增强,IL-8浓度为100 ng/ml时,粒细胞趋化效率为97.28%。该研究表明,脐血单个核细胞经体外扩增、诱导可获得大量的、具有吞噬功能和趋化作用的粒系细胞,为临床应用提供实验基础。

参考文献

[1] 曹星玉,陈方平,王光平,等.脐血CD34+细胞向粒、红细胞和血小板定向诱导分化研究[J].中国医师杂志,2004,6(9):1153-1154,1157. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2004.09.001.

[2] 呼沛然,白苗娜,李萌璐,等.3种获得中性粒细胞方法的比较

及应用的探讨[J].国际检验医学杂志,2014,(16):2123-2125. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.002.

- [3] 宋红,吴织芬,史俊南,等.IL-8对外周血粒细胞和单个核细胞的体外趋化作用[J].细胞与分子免疫学杂志,1998,14(3):214,174. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.002193.
- [4] Tura O, Barclay GR, Roddie H, et al. Optimal ex vivo expansion of neutrophils from PBSC CD34+ cells by a combination of SCF, Flt3-L and G-CSF and its inhibition by further addition of TPO[J]. J Transl Med, 2007, 5:53. DOI: 10.1186/1479-5876-5-53.
- [5] Sawai N, Koike K, Ito S, et al. Neutrophilic cell production by combination of stem cell factor and thrombopoietin from CD34(+) cord blood cells in long-term serum-deprived liquid culture[J]. Blood, 1999, 93(2):509-518.
- [6] Paquette RL, Gonzales E, Yoshimura R, et al. Ex vivo expansion and differentiation of unselected peripheral blood progenitor cells in serum-free media[J]. J Hematother, 1998, 7(6):481-491. DOI: 10.1089/scd.1.1998.7.481.
- [7] Rimajova V, Sopko L, Martinka J, et al. Granulocyte transfusions[J]. Bratisl Lek Listy, 2012, 113(3):175-181.
- [8] Strauss RG. Role of granulocyte/neutrophil transfusions for haematology/oncology patients in the modern era[J]. Br J Haematol, 2012, 158(3):299-306. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09190.x.
- [9] Haylock DN, To LB, Dowse TL, et al. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage[J]. Blood, 1992, 80(6):1405-1412.
- [10] Brunck ME, Nielsen LK. Concise review: next-generation cell therapies to prevent infections in neutropenic patients[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(4):541-548. DOI: 10.5966/sctm.2013-0145.
- [11] Timmins NE, Palfreyman E, Marturana F, et al. Clinical scale ex vivo manufacture of neutrophils from hematopoietic progenitor cells[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 104(4):832-840. DOI: 10.1002/bit.22433.
- [12] Marturana F, Timmins NE, Nielsen LK. Short-term exposure of umbilical cord blood CD34+ cells to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor early in culture improves ex vivo expansion of neutrophils[J]. Cytotherapy, 2011, 13(3):366-377. DOI: 10.3109/14653249.2010.518610.
- [13] 王斌,康自珍,迟占有,等.体外培养脐血单个核细胞与CD34+富集细胞[J].生物工程学报,2002,18(3):343-347. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3061.2002.03.019.
- [14] 王桂云,孙立荣.脐血单个核细胞的免疫学研究进展[J].青岛大学医学院学报,2007,43(5):466-468,470. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4488.2007.05.036.
- [15] Choi KD, Vodyanik M, Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells[J]. Nat Protoc, 2011, 6(3):296-313. DOI: 10.1038/nprot.2010.184.

(收稿日期:2016-09-26)

(本文编辑:王叶青)