

• 综 述 •

# 巨核细胞体外扩增和分化研究进展

高 蕾<sup>1,2</sup>, 卓海龙<sup>1</sup>, 齐凤青<sup>1</sup>, 王海平<sup>1</sup>综述, 王全立<sup>1△</sup>审校

(1. 军事医学科学院附属医院, 北京 100071;

2. 中国人民解放军北京军区总医院二六三临床部检验科, 北京 101149)

**关键词:** 巨核细胞; 血小板; 细胞因子**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.028**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)05-0572-02

造血干细胞移植是临床应用最为成熟的干细胞治疗方法, 主要用于血液病、恶性实体瘤大剂量放疗和化疗后重建骨髓造血功能。植入的造血干细胞向红系、粒系、淋巴系和巨核系细胞增殖分化, 最终产生红细胞、淋巴细胞和血小板等功能细胞, 参与机体正常生理活动, 但骨髓移植、动员的外周血移植和脐带血移植都存在巨核系造血延迟现象<sup>[1]</sup>。解决该问题的有效途径之一, 是利用造血干/祖细胞进行定向诱导分化、体外扩增巨核细胞<sup>[2]</sup>。巨核细胞是生成血小板的前体细胞, 体外培养获得足够数量巨核细胞输注到患者体内, 能在体内进一步发育, 并生成血小板, 从而加速患者血小板恢复, 缩短血小板缺乏期<sup>[3]</sup>。

造血干细胞分化形成巨核系祖细胞, 巨核系祖细胞增殖、分化为未成熟的巨核细胞, 再进一步分化为成熟的巨核细胞并释放血小板的过程受多种细胞因子调节<sup>[4-5]</sup>。血小板生成素(TPO)又称巨核细胞生长发育因子(MGDF)或血小板生长因子(TSF)发挥主要作用, 多种其他细胞因子也不同程度地参与该过程, 包括干细胞因子(SCF)、白细胞介素(IL)-3、IL-1、IL-6、血小板源性生长因子(PDGF)和 IL-11。SCF、IL-3、IL-1、IL-6 可维持干/祖细胞增殖, 而 PDGF 和 IL-11 则促进干/祖细胞向巨核系分化; 利用干/祖细胞具有多向分化潜能, 采用不同的造血因子组合, 可以协同 TPO 促进巨核系祖细胞的增殖和分化<sup>[6]</sup>。有研究比较了 TPO、PDGF、IL-11 在促进巨核系增殖、分化及成熟过程中的不同作用效果, 结果表明 TPO 对巨核系的扩增效果明显强于 PDGF 和 IL-11, 说明在体外诱导脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞向巨核细胞分化和增殖过程中, TPO 起着最重要的作用<sup>[7]</sup>。也有研究发现, 单独使用 TPO 可诱导 CD34<sup>+</sup> 细胞向 CD41<sup>+</sup> 细胞分化, 但白细胞总数扩增有限<sup>[8-9]</sup>。当多种细胞因子共同作用时, CD34<sup>+</sup> 细胞保持了部分干细胞特性, 具有扩增效应, 扩增的干细胞在多种生长因子的作用下向巨核系分化, 从而使 CD41<sup>+</sup> 细胞能够更大程度地扩增。

用间充质干细胞体外扩增培养巨核细胞可能更有意义。造血微环境中的基质细胞、基质细胞分泌的细胞外基质和各种造血因子对巨核细胞的生成均有重要作用<sup>[10]</sup>。研究发现, 人骨髓间充质干细胞共培养体系可促进巨核细胞增殖, 且血小板数量有所增加, 但试验所采用的间充质干细胞和造血干细胞来源不一致, 以及培养体系成分不同会导致试验结果的误差<sup>[11-12]</sup>。说明不同的基质细胞条件培养液以及含有不同成分的同一种基质细胞条件培养液对巨核细胞的扩增有不同的作用, 不同的基质细胞可分泌不同的细胞因子而且不同成分的同一种条件培养液所含细胞因子也不同, 骨髓间充质干细胞能够为脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞的扩增提供增殖信号或分泌刺激子, 其机

制有待进一步研究。体内试验也可以得到类似结论。有研究者将鼠源性骨髓基质细胞和造血干细胞联合输入同系小鼠体内, 发现骨髓基质细胞移植后仍保持其免疫表型不变, 且具有调控骨髓造血干细胞分化和增殖的功能, 骨髓间充质细胞培养液能促进成熟巨核细胞的生成<sup>[13-14]</sup>。研究证实, 用骨髓间充质细胞培养液代替或部分代替细胞因子, 具备重建造血微环境、修复造血功能的作用, 促进巨核细胞增殖和血小板生成的优势明显, 可作为一种安全有效地促进放/化疗或造血干细胞移植后血小板数量和功能恢复的方法, 有很好的临床应用前景<sup>[15]</sup>。

最近, 笔者发现异基因浓缩血小板汇集 5 d 的血浆具有促进巨核系细胞发育成熟并释放血小板的作用, 可能与浓缩血小板中含有的来源于不同供者的白细胞相互刺激使淋巴细胞活化并释放某些细胞因子有关。上述作用不依赖于 TPO, 并且在培养 3 d 时实现了巨核系细胞的快速增殖、分化。尽管细胞因子能在体外刺激巨核祖细胞或成熟巨核细胞的生成, 但在培养过程中使用的细胞因子大部分不能应用于临床; 培养 2~3 周时达到增殖分化高峰, 但生成的成熟巨核细胞有限, 不能充分满足临床需要。而异基因浓缩血小板汇集 5 d 的血浆具有高效、无需使用重组细胞因子等优势。因此, 深入研究体外诱导造血细胞向巨核系定向分化和扩增的机制具有重要意义。

诱导分化产生的巨核细胞及血小板功能的检测也是亟待研究的重要内容。不同发育阶段的巨核细胞表达不同的免疫标志<sup>[15]</sup>。CD41、CD34、HLA-DR 为巨核祖细胞免疫标志, PF4、CD61、CD42b、CD41a 为早期巨核祖细胞免疫标志, CD42a 为晚期巨核祖细胞免疫标志<sup>[16]</sup>。CD41 是巨核细胞和血小板的特异性表面标志, 可通过流式细胞仪以荧光标记 CD41<sup>+</sup> 单克隆抗体检测细胞表面的 CD41 抗原。血小板和巨核细胞均为 CD41<sup>+</sup> 细胞, 但血小板的体积远小于巨核细胞, 因此, 在流式细胞仪上可利用 CD41 抗体和前向角(FSC)区分血小板和巨核细胞。培养细胞经低速离心 10 min 后取上清液, 向上清液中加入凝血酶, 在倒置相差显微镜下观察结果, 原以分散形式存在的血小板可聚集成堆, 提示有具备生理功能的血小板生成<sup>[17]</sup>。在加入凝血酶诱导剂前后, 以流式细胞仪观测 FSC 的变化, 可判断血小板的功能。

巨核细胞的核内复制是巨核细胞走向成熟的过程, 与血小板的产生也密切相关, 一系列转录因子参与了巨核细胞的分化过程。通过观察培养周期中 GATA-1、NF-E2、GP II b 的表达情况, 证实 GATA-1 和 NF-E2 在巨核细胞的生成过程中发挥关键作用<sup>[18]</sup>。GATA-1 是 GATA 家族中具有锌指结构的蛋白质, 主要在巨核细胞生成的早期至中期起调节作用, 促进巨

△ 通讯作者, E-mail: wangql77@yahoo.com.cn.

核细胞胞浆成熟和 DNA 核内复制。NF-E2 是巨核细胞生成血小板所必需的,是包含 2 个碱性亮氨酸锌指亚单位的异二聚体,可调控晚期巨核细胞分化和血小板生成。缺乏 NF-E2 的巨核细胞不能生成产板型巨核细胞和血小板,重新转入 NF-E2 基因可恢复产板型巨核细胞和血小板的生成<sup>[19-20]</sup>。巨核细胞的分化包括特异性抗原的表达,早期巨核细胞增生即可同时获得特异性的系分化标志 GP II b,晚期巨核分化成熟并进一步获得系分化标志,表达持续到血小板形成,其含量随巨核细胞的分化成熟而不断增加。

成熟的多倍体巨核细胞是血小板生成的唯一来源。血小板是由巨核细胞浆破碎而产生的,正常的巨核细胞是由造血干细胞发育成定系的巨核祖细胞,再经 3~5 次核内有丝分裂形成多倍体巨核细胞。不同的培养体系都以保持巨核细胞数量和纯度,提高多倍体巨核细胞的比例为基础。有研究提示诱导脐血造血细胞产生的巨核细胞在成熟时大多为 2 倍体细胞,而且在释放血小板时巨核细胞已发生凋亡。

研究发现,加入异基因浓缩血小板汇集 5 d 的血浆可使外周造血干细胞 NF-E2 在培养第 4 天时表达增强,到第 7 天时表达已非常明显,而第 10 天时的表达仍然显著;GATA-1 在第 3 天时有低水平表达,但 7 d 后表达迅速增强<sup>[21-22]</sup>。GP II b 虽在第 5 天无表达,但在第 10 天时表达显著。GATA-1、NF-E2、GP II b 的表达呈时间依赖性,且在培养后期的表达均十分显著<sup>[23]</sup>。由此可推断,异基因浓缩血小板汇集 5 d 的血浆在第 5 天时能促进巨核细胞分化。用异基因浓缩血小板汇集 5 d 的血浆培养 Meg-01 细胞,也发现其对体外扩增巨核系祖细胞及成熟巨核细胞有良好的作用<sup>[24]</sup>。但对于来源于不同人的白细胞间相互作用过程中,究竟释放了哪些具有作用的细胞因子,有待进一步研究。

综上所述,系统研究体外诱导造血细胞向巨核系定向分化和扩增具有重要的意义,能够为化疗或移植后的血小板减少提供可能的治疗途径<sup>[25]</sup>。

## 参考文献

- [1] 凌艳英,邓家德,陈江玲,等. 血小板相关参数在造血干细胞移植后巨核系重建中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(5):427-429.
- [2] 蔡海波,康自珍,孙淑惠,等. GM-CSF 体外促进多倍体巨核细胞的生成[J]. 华东理工大学学报,2003,29(8):363-366.
- [3] 周小莹,黄艳红,王琦如,等. 骨髓成纤维细胞条件培养液对体外巨核系细胞生成的促进作用[J]. 中南大学学报,2004,29(6):658-661.
- [4] 陈淑萍,陈慧菁,叶韵斌,等. TPO、PDGF、IL-11 在脐血巨核细胞生长和分化中的作用[J]. 福建医科大学学报,2006,40(4):330-332.
- [5] 冯钊,卓光生. 干细胞因子联合血小板生成素在体外抑制脐血巨核细胞凋亡的实验研究[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(7):606-608.
- [6] 李昕,陈方平,刘竞,等. 脐血 CD34+ 细胞体外培养生成成熟巨核细胞并产生血小板的研究[J]. 中南大学学报,2006,31(5):776-781.
- [7] 王海莲,鞠秀丽,葛伟,等. 脐血造血干细胞向巨核细胞诱导分化的研究[J]. 临床血液学杂志,2010,23(5):295-298.
- [8] Nakamura T, Miyakawa Y, Miyamura A, et al. A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis[J]. Blood, 2006, 107(11):4300-4307.
- [9] Pastos KM, Slayton WB, Rimsza LM, et al. Differential effects of recombinant thrombopoietin and bone marrow stromal-conditioned media on neonatal versus adult megakaryocytes[J]. Blood, 2006, 108(10):3360-3362.
- [10] 陈舒,戴兵,朱发明,等. 骨髓间充质干细胞对脐血 CD34+ 细胞分化为巨核细胞的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2008,24(1):77-79.
- [11] 甘凤英,肖丽霞,陈彬娟,等. 骨髓间充质干细胞的分离培养和生物学鉴定[J]. 赣南医学院学报,2007,12(6):837-839.
- [12] 高蕾,张曦,陈幸华,等. 人脐血源基质细胞移植重建造血微环境促进巨核细胞生成的实验研究[J]. 解放军医学杂志,2009,34(3):318-321.
- [13] Kawano Y, Kobune M, Chiba H, et al. Ex vivo expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood CD133+ progenitor cells on coculture with human stromal cells[J]. Exp Hematol, 2006, 34(2):150-158.
- [14] Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, et al. Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells [J]. J Immunother, 2009, 32(3):219-231.
- [15] 陈晓. 人骨髓间充质干细胞向造血细胞分化潜能的研究[D]. 吉林:吉林大学,2005.
- [16] 孙强,邱勇. BMPs 信号通路调控骨髓间质干细胞的成骨分化[J]. 临床骨科杂志,2005,8(5):471-474.
- [17] 戴兵,何吉,陈舒,等. 血管紧张素 II 对脐血 CD34+ 细胞体外分化为巨核细胞的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2006,14(4):741-744.
- [18] 刘基铎,孙武,何惠,等. 获得性单纯巨核细胞减少性血小板减少性紫癜 20 例临床分析及转归规律探讨[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):720-721.
- [19] 冯钊,卓光生. RT-PCR 动态检测体外扩增脐血巨核细胞 GATA-1、NF-E2、GP II bmRNA 的表达[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2006,11(2):49-52.
- [20] 叶韵斌,陈淑萍,陈慧菁,等. 脐血干细胞向巨核细胞分化后信号转导基因的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(50):10200-10204.
- [21] 蔡文琴,钱桂生. 几条重要的信号转导通道研究的概况及临床意义[J]. 第三军医大学学报,2003,21(2):425-431.
- [22] Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells[J]. Int J Mol Med, 2006, 17(4):681-685.
- [23] 李国辉,黄思勇,康志杰,等. Notch 信号在造血祖细胞扩增中作用的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(5):1227-1231.
- [24] 吴德全,高峰,金光鑫,等. 足月胎儿脐血间充质干细胞体外培养方法的比较[J]. 哈尔滨医科大学学报,2007,41(5):429-433.
- [25] Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, et al. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation[J]. Blood, 2005, 105(6):2340-2342.

(收稿日期:2011-12-18)