

造血干细胞体外培养模式的研究进展

李 秀 何明生[△]

(云南省肿瘤医院血液科 云南 昆明 650118)

摘要 造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSC)的体外培养可为造血干细胞移植提供大量的造血干细胞,具有重要的临床意义。HSC 体外培养方式从二维培养发展到三维培养,从静态培养发展到动态培养,其培养技术及效果日趋成熟,其中以生物反应器为主的动态三维培养具有明显的优势。本文就 HSC 体外培养的研究进展作一综述。

关键词 造血干细胞 三维培养 生物反应器

中图分类号 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1376-03

The Progress of Hematopoietic Stem Cells Culture Model in Vitro

LI Xiu, HE Ming-sheng[△]

(Department of Hematology, Yunnan Tumor Hospital, Yunnan 650118, China)

ABSTRACT: Hematopoietic stem cells (HSC) cultured in vitro can provide a large number of hematopoietic stem cells for hematopoietic stem cell transplantation. The development of HSC cultured methods in vitro from two-dimensional to three-dimensional culture, from static to dynamic culture, the cultural technology and effects matured day by day. In the paper, we reviewed the progress of HSC culture in vitro.

Key words: Hematopoietic stem cells; Three-dimensional culture; Bioreactor

Chinese Library Classification(CLC): Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1376-03

前言

造血干细胞移植临床应用存在的主要问题是造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSC)数量的不足^[1],但通过体外扩增可获得大量的 HSC,具有重要的临床意义。HSC 体外培养模式有多种,从静态培养到动态培养,从二维培养到三维培养,尤其是近年来各种生物反应器的应用,使 HSC 体外培养取得了较大的进展^[2]。本文就 HSC 体外培养的研究进展作一综述。

1 静态培养

1.1 二维静态培养

传统的 HSC 培养是通过在二维培养系统中添加外源性细胞因子、基质细胞等方法来维持干细胞的自我更新或扩增。添加外源细胞因子虽然可提高 CD34⁺ 细胞数,但扩增的细胞在二次移植时就表现出再植能力下降,研究表明在静态条件下培养的初级细胞会失去其独特的干细胞特性^[3]。临床研究也发现经细胞因子扩增的脐血干细胞并无再植优势,并且所需要的细胞因子浓度远比骨髓细胞因子浓度高^[4]。说明外源性细胞因子在增加祖、前体细胞的同时,伴有早期细胞的消耗及干细胞自我更新能力的降低。研究表明,T 型瓶、培养囊或多孔板是不适于 HSC 培养的,因为经此培养的细胞倾向于簇集于底部而无适合的营养和氧分布情况^[5]。总之,传统的二维造血干细胞培养体系在空间结构、细胞外基质、细胞因子等方面还不能模拟体内

的造血微环境。

1.2 三维(3D)静态培养

HSC 所生存的微环境具有三维组织结构,3D 支架培养能很好的模拟 HSC 微环境。Ehring 等^[6]用覆盖有粘连蛋白 3D 的碳质基质在无血清/无细胞因子等介质的条件下进行脐血 HSC 培养。2 周后,集落生成单位(CFU)扩增了 2.6 倍,CD45⁺ 和 CD34⁺ 细胞均扩增了 3 倍。将扩增的 HSC 移植到 NOD/SCID 模型小鼠体内,6 周后小鼠造血器官中仍可检测到人源性造血细胞,表明在无血清及细胞因子条件下进行 HSC 体外培养和扩增是可行的。Feng 等^[7]采用粘连蛋白固化的 3D 聚对苯二甲酸乙酯支架进行 HSC 培养,无血清的条件下培养 10 天,CD34⁺ 细胞扩增高达 100 倍,长期培养始动细胞(Long term culture initiating cells, LTC-IC)扩增了 47 倍,扩增的干细胞也可使 NOD/SCID 模型小鼠造血重构。Schubert 等^[8]采用陶瓷泡沫制作的类骨质结构 3D 支架进行培养,12-27 天后,3 种不同形态的细胞簇覆盖在陶瓷表面,并很好的保持了细胞的多能活性,但细胞数量并没有提高。表明采用 3D 支架的静态培养可以很好的保持干细胞的移植活性。总的来说,静态的 3D 培养 HSC 模式比传统的 2D 静态培养更有效。但单采用细胞因子支持进行 HSC 培养的扩增效果不佳,而采用基质细胞培养还需要额外的步骤去复原细胞。因此,这两种方式均可能损失或降低扩增的细胞数。

很多研究者试图建立共同培养方式为 HSC 培养提供适合的 3D 微环境。Fujimoto 等^[9]采用包含微胶囊化的小鼠基质细胞和人间质干细胞(MSC)的条件培养基进行 CD34⁺ 细胞的共同培养,结果单核细胞及 CD34⁺ 细胞分别扩增了 194 倍、7.4 倍。Jang 等^[10]采用脐血间质干细胞作为 HSC 培养的滋养层,结

作者简介 李秀(1984-),女,硕士研究生。E-mail hemuzi312@126.com
[△]通讯作者 何明生(1957-),男,血液学博士,硕士生导师,主要从事造血干细胞移植、血液肿瘤研究。E-mail 1145553479@qq.com
(收稿日期 2010-10-22 接受日期 2010-11-17)

果 CFU 扩增了 3.46 倍。Xie 等^[11]采用逆转录病毒转导的 MSCs 诱导 Flt-3L 和其他细胞因子作为滋养层来联合培养脐血干细胞。7 天后,联合培养的单核细胞扩增倍数几乎是仅采用细胞因子培养的两倍,集落生成单位扩增了 13.55 ± 4.15 倍,而仅采用细胞因子只扩增了 3.23 倍。在 NOD/SCID 小鼠模型中, LTC-IC 也显示出更高的扩增倍数及与原细胞更接近的植入活性。总的来说,采用滋养层系统进行共同培养确实可以获得 HSC 的扩增^[12]。但此方法仍有许多问题需要解决 ①因需培养前准备好单独的滋养层,限制了培养的速度,且在收获干细胞时还需要额外的操作,可能会损伤细胞;②可能出现的移植后免疫反应及病原菌感染仍需进一步研究,且扩增后 HSC 的移植能力仍不清楚;③目前均为小剂量的培养,要应用于临床还需进行大剂量的培养。因此目前这种方法是否可以用于临床仍需进一步探讨。

1.3 其他静态培养

Madhambayan 等^[13]设计了一个静态生物加工模式,包含两个用磁性装置分开透气的培养袋,用以除去不需要的细胞。结果显示 细胞总数、CD34⁺ 细胞、CFU、LTC-IC 的扩增倍数分别达到 24.6 ± 3.6 、 30.8 ± 7.2 、 31.3 ± 5.8 及 32.6 ± 7.5 倍。并在 NOD/SCID 模型的小鼠上取得了良好的植入效果,而且该系统培养容量可达 24 ml,显示有大容量扩增并应用于临床移植的可能。

2 动态培养

虽然静态培养获得了 HSC 扩增,但仍有许多局限性 ①因缺乏有效混合,导致 pH 值、溶氧、生长因子与代谢产物等存在浓度梯度,由于所培养细胞的初始条件不同,导致梯度有很大差异;②培养中换液需要重复处理,并还不能进行实时监测及数据采集;③其表面积有限,不适合进行大规模培养。从上世纪 90 年代起生物反应器培养体系就替代传统静态细胞培养应用于 HSC 的体外培养扩增。近年已经取得了很大进展。

2.1 搅拌式生物反应器

搅拌式生物反应器可以提供一个较均一的细胞生长环境,易于操作和放大,容易监测和控制培养条件,并适于研究不同培养参数对造血细胞扩增的影响。Li 等^[14]对静态培养和搅拌式生物反应器培养脐血 HSC 进行了比较,结果发现与动态培养相比,静态培养的细胞有 11 个基因过度表达,还发生了氧化应激反应及 DNA 损伤修复。原因可能是低氧和低营养供应所致。还发现 DLK-1 基因也过度表达,而 DLK-1 基因有阻断 HSC 祖细胞分化的作用。在基因水平上证明了动态培养优于静态培养 HSC。但在该研究对 MNC、CD34⁺、CFU 分别扩增了仅 1.27 倍、5.43 倍和 10.60 倍,应用于临床的潜力小。迟占有等^[15]采用搅拌式生物反应器对 HSC 进行灌注培养,12 天后,第一次总细胞、CFU、CD34⁺ 细胞分别扩增了 4.05 倍、14.41 倍及 15.37 倍,第二次总细胞、CFU、CD34⁺ 细胞分别扩增了 6.0 倍、20.37 倍及 17.47 倍。说明采用该方法进行培养可达到较高的扩增倍数,但灌注培养后期细胞密度较高,细胞生长会受到抑制。Eibes 等^[16]在搅拌式生物反应器中采用明胶微载体支持干细胞的粘附和扩展,结果第 8 天干细胞扩增了 8.4 ± 0.8 倍。表明微载体可促进干细胞的体外扩增。Luni 等^[17]开发了一种靠浮力驱动的搅拌

生物反应器组,经 7 天培养后 CD34⁺ 细胞扩增了 16.2 ± 6.0 倍,由于该生物反应器组可精细控制各种数值,对细胞产生的不利影响较小,可有效地促进 HSC 的体外扩增。

由于搅拌克服了营养和代谢物质扩散的限制,悬浮生长的 HSC 能够在这种反应器中生长。但因 HSC 对剪切力敏感,搅拌可能会改变细胞表面生长因子受体,从而直接影响扩增效果。

2.2 灌注式生物反应器

灌注式生物反应器是根据提高培养基灌注速率并补充生长因子来进一步扩增 HSC。Cantini 等^[18]采用计算流体动力技术优化了灌注式生物反应器,通过微通道供应支架进行 HSC 培养,结果表明微通道为培养介质创造了优先通道,通过细孔可减低剪切力和阻力,并通过推动氧气渗入支架来改善氧浓度,取得了较好的效果。Cho 等^[19]采用肝素聚氨基葡萄糖所制支架的灌注式生物反应器进行 HSC 培养,培养过程中氧消耗持续上升,提示细胞稳定增长,比静态培养有更高的初级祖细胞百分比及更优的集落生成单位,并发现低氧(5%)较高氧(19%)更能促进 CD34⁺ 细胞及 CFU 的增长。灌注式反应器可以支持造血细胞的体外培养,但是灌注式反应器中较高速度流动的流体,不适合 HSC 体外扩增,这可能会使造血细胞受到物理损伤。

2.3 旋转壁式生物反应器(Rotating wall vessel, RWV)

在旋转壁式生物反应器内由于细胞所受剪切力极低,细胞之间还有三维联系的机会,因而所培养细胞功能更接近于自然细胞。这种反应器已经被应用到培养造血干细胞中。Liu 等^[20]用 RWV 培养人脐血 HSC,8 天后,总细胞、CD34⁺ 细胞和 CFU-GM 的扩增分别超过了 400 倍、30 倍和 20 倍,且培养基的 pH 值和渗透压都保持在适合 HSC 扩增的范围内。刘洋等^[21]采用脐血单核细胞和包埋有兔骨髓间充质干细胞的海藻酸钠·壳聚糖-海藻酸钠微胶囊在 RWV 中进行动态悬浮共培养。7 天后总有核细胞、CD34⁺ 细胞以及 CFU-Cs 分别扩增了 107.05 ± 6.08 倍、 26.52 ± 1.5 倍及 19.2 ± 3.18 倍。表明此动态微囊化共培养体系支持了 HSC 的大规模体外扩增,旋转壁式生物反应器提供了低剪切力的悬浮培养环境。

2.4 其他生物反应器

Astori 等^[22]开发了名为 "DIDECO" 的商用多细胞系统培养新鲜/冷冻的人脐血 CD34⁺ 细胞,12 天后,经分析表明大多数祖细胞扩增为髓系及巨核细胞系。一个 38 ml 的新鲜脐血 CD34⁺ 细胞样本培养中,获得的 MNC 及 CD34⁺ 细胞扩增倍数分别达 249.1 ± 49.5 倍和 33.0 ± 14.3 倍,并能很好的移植到 NOD/SCID 小鼠模型中,暂无用于人类的报道。该系统显示出高倍的 MNC 扩增,有可能应用于临床。

Kasper 等^[23]设计了新的一次性包装的可收缩床(DPBC)生物反应器,包含一个慢速旋转的陶瓷碟,可让细胞在介质和空气之间轮替。因该设备类似人工肺不需要搅拌和喷射氧气,降低了切应力。该设备已成功用于生产不同蛋白质及病毒,也适用于贴壁细胞或非贴壁细胞。DPBC 可用于 HSC 的培养,但要使培养的 HSC 从反应器中成功提取是一个要克服的问题。

3 总结

HSC 体外扩增具有重要的临床意义,目前所有的 HSC 体外培养模式都致力于模拟真实的体内干细胞生成微环境。总的

说来,采用三维立体培养及生物反应器的动态培养在保持造血干细胞活性及扩增倍数上均具有明显优势。但要取得较优的HSC及较高的扩增数量还存在一些问题,且应用于临床的研究还很少。以后的研究应结合临床,为临床应用提供支持。

参考文献 (References)

- [1] Kresnowati MT, Forde GM, chen XD. Model-based analysis and optimization of bioreactor for hematopoietic stem cell cultivation[J]. Bio-process Biosyst Eng, 2010, 33(7):1-13
- [2] Chen X, Xu H, Wan C, et al. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24 (9): 2052-2059
- [3] Schoemans H, Theunissen K, Maertens J, et al. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review [J]. Bone Marrow Transplant, 2006;38 (2):83-93
- [4] Shpall E J, Quinones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2002, 8 (7): 368-376
- [5] Andrade-Zaldivar H, Santos L, De Leon Rodriguez A. Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives [J]. Cytotechnology, 2008, 56 (3): 151-160
- [6] Ehring B, Biber K, Upton TM, et al. Expansion of HPCs from cord blood in a novel 3D matrix [J]. Cytotherapy, 2003, 5 (6): 490-499
- [7] Feng Q, Chai C, jiang XS, et al. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin [J]. J Biomed Mater Res A, 2006, 78 (4): 781-791
- [8] Schubert H, Garrn I, Berthold A, et al. Culture of haematopoietic cells in a 3-D bioreactor made of Al₂O₃ or apatite foam [J]. J Mater Sci Mater Med, 2004, 15 (4): 331-334
- [9] Fujimoto N, Fujita S, Tsuji T, et al. Microencapsulated feeder cells as a source of soluble factors for expansion of CD34⁺ hematopoietic stem cells [J]. Biomaterials, 2007, 28 (32): 4795-4805
- [10] Jang YK, Jung DH, Jung MH, et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells [J]. Ann Hematol, 2006, 85 (4): 212-225
- [11] Xie C, Jia B, Xiang Y, et al. Support of hMSCs transduced with TPO/FL genes to expansion of umbilical cord CD34⁺ cells in indirect co-culture [J]. Cell and tissue research, 2006, 326 (1): 101-110
- [12] Robinson S, Niu T, De Lima M, et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood[J]. Cytotherapy, 2005, 7(3): 243-250
- [13] Madlambayan GJ, Rogers I, Purpura KA, et al. Clinically relevant expansion of hematopoietic stem cells with conserved function in a single-use, closed-system bioprocess [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12 (10): 1020-1030
- [14] Li Q, Liu Q, Cai H, et al. A comparative gene-expression analysis of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells grown in static and stirred culture systems [J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11 (4): 475-487
- [15] 迟占有, 姜华, 蔡海波, 等. 搅拌式生物反应器中造血细胞的灌注培养[J]. 生物工程学报, 2005, 21 (4): 622-627
Chi Zhan You, Jiang Hua, Cai Hai Bo, et al. Perfusion Culture of Hematopoietic Cells in a Stirred Tank Bioreactor [J]. Chinese journal of biotechnology, 2005, 21 (4): 622-627
- [16] Eibes G, Dos Santos F, Andrade PZ, et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system [J]. J Biotechnol, 2010, 146 (4): 194-197
- [17] Luni C, Feldman HC, Pozzobon M, et al. Microliter-bioreactor array with buoyancy-driven stirring for human hematopoietic stem cell culture [J]. Biomicrofluidics, 2010, 41 (3): 1-13
- [18] Cantini M, Fiore GB, Redaelli A, et al. Numerical fluid-dynamic optimization of microchannel-provided porous scaffolds for the co-culture of adherent and non-adherent cells [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15 (3): 615-623
- [19] Cho CH, Eliason JF, Matthew HW. Application of porous glycosaminoglycan-based scaffolds for expansion of human cord blood stem cells in perfusion culture [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86 (1): 98-107
- [20] Liu Y, Liu T, Fan X, et al. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel [J]. J Biotechnol, 2006, 124 (3): 592-601
- [21] 刘洋, 刘天庆, 范秀波, 等. 旋转壁式生物反应器中微囊化骨髓间充质干细胞支持造血干/祖细胞的体外扩增 [J]. 高校化学工程学报, 2008, 22 (3): 471-477
Liu Yang, Liu Tian Qing, Fan Xiu Bo, et al. Ex Vivo Expansion of Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor with Support of Microencapsulated Mesenchymal Stem Cells in Rotating Wall Vessel [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2008, 22 (3): 471-477
- [22] Astori G, Adami V, Mambrini G, et al. Evaluation of ex vivo expansion and engraftment in NOD-SCID mice of umbilical cord blood CD34⁺ cells using the DIDEKO "Pluricell System" [J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 35 (11): 1101-1106
- [23] Kasper C, Suck K, Anton F, et al. A newly developed rotating bed bioreactor for bone tissue engineering [J]. Topics in tissue engineering, 2007, 5(3): 1-15