

· 论 著 ·

诱导性多能干细胞移植重建造血衰竭小鼠模型造血功能的研究*

阮光萍, 庞荣清, 姚翔, 邓永丽, 朱向情, 王金祥, 王强, 马丽花, 潘兴华[△]

(解放军昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨诱导性多能干细胞对造血衰竭小鼠模型进行造血重建的作用。方法 建立雌性小鼠造血衰竭模型, 移植经天然活性物质诱导的雄性小鼠脾细胞, 检测受体小鼠生存时间、外周血 WBC、脾湿重及脾集落(CFU-S)数, 进行 G 带染色体分析受体小鼠是否有 Y 染色体。结果 经天然活性物质诱导的雄性小鼠脾细胞 5×10^6 个输注给致死剂量照射后的雌性小鼠, 可明显延长其存活时间, 提高受体小鼠外周血 WBC 数, 也能增加脾湿重, 提高脾集落数, 经 G 带染色体分析进行 Y 染色体检测, 受体小鼠骨髓检测可观察到 20% 的 Y 染色体。结论 经天然活性物质诱导的小鼠脾细胞含有多能干细胞, 回输入造血衰竭的小鼠能重建小鼠造血功能。

关键词:移植; 诱导性多能干细胞; 造血重建; 造血衰竭; 天然活性物质

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)18-2043-03

Reconstitution of hematopoiesis in mice with hematopoietic failure by transplantation of induced multipotent stem cells*

Ruan Guangping, Pang Rongqing, Yao Xiang, Deng Yongli, Zhu Xiangqing,

Wang Jinxiang, Wang Qiang, Ma Lihua, Pan Xinghua[△]

(Research Center of Stem Cell, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of PLA, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To study the effectiveness of induced multipotent stem cells for the reconstitution of hematopoiesis in mice with hematopoietic failure. **Methods** Female mice models of hematopoietic failure were established and were transplanted with natural active substances-induced spleen cells of male mice. Survival time, peripheral WBC, spleen wet weight and spleen colony number of recipient mice were detected, and the G band chromosome analysis was processed to determine whether Y chromosome could be detected in female mice models. **Results** 5×10^6 natural active substances-induced male mice spleen cells were infused to lethally irradiated female mice, and could significantly prolong survival time, increase the number of WBC in peripheral blood of recipient mice, increase the spleen wet weight and numbers of spleen colony(CFU-S). Chromosome analysis by G band staining indicated that the positive rate of Y chromosome in recipient mice was 20%. **Conclusion** Natural active substances-induced spleen cells could contain multipotent stem cells, and could reconstitute hematopoietic function in mice with hematopoietic failure by infusion.

Key words: transplantation; induced pluripotent stem cells; hematopoietic reconstruction; hematopoietic failure; natural active substances

诱导性多能干细胞是用天然活性物质(鱼卵抽提物)诱导成体细胞逆向分化为多能干细胞。既往研究发现,用天然活性物质能将皮肤成纤维细胞诱导为多能干细胞,表达干细胞的标志抗原 Oct-3/4 等。经天然活性物质诱导 BALB/C 小鼠脾细胞后能否产生多能干细胞,产生的多能干细胞能否重建造血功能需要进一步实验证实。本研究采用建立的造血衰竭雌性小鼠模型,用天然活性物质诱导雄性小鼠的脾细胞,检测诱导后干细胞的标志抗原 Oct-3/4 的表达,并移植给雌性小鼠,观察受体小鼠生存时间,检测外周血白细胞(WBC)数、脾湿重及脾集落数(CFU-S),染色体分析等实验血液学技术研究诱导性多能干细胞对骨髓抑制小鼠的造血重建作用,为天然活性物质诱导的多能干细胞重建造血功能提供理论与实验依据。

1 资料与方法

1.1 材料 实验动物为 8~12 周龄清洁级 BALB/C 小鼠,雌、雄各半,体质量 17~21 g,成都军区昆明总医院实验动物中心提供。

1.2 制备鱼卵抽提物 采用当地产的鲫鱼,剖腹取鱼卵,用生理盐水洗干净,再加入等量生理盐水,用搅拌机搅匀,

1 000 r/min 离心 10 min,取上清液,再 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液并过滤除菌。检测蛋白含量为 20 mg/mL。

1.3 方法

1.3.1 脾细胞采集和诱导 雄性 BALB/C 小鼠(供体小鼠)取脾,制备成脾细胞悬液,分两瓶培养,一瓶加天然活性物质,每 10 mL 加入鱼卵抽提物 100 μ L,使鱼卵抽提物终浓度为 0.2 mg/mL,另一瓶不诱导,培养 72 h 后回输。留一部分细胞进行形态观察,拍照然后做免疫组化观察诱导性多能干细胞的标志抗原 Oct-3/4 的表达。

1.3.2 造血衰竭小鼠模型的建立和诱导性多能干细胞移植 雌性 BALB/C 小鼠(受体小鼠)置入横切面面积为 15 cm \times 15 cm 的特制有机玻璃鼠盒内,经直线加速器射线对全身一次性进行致死剂量(8.0 Gy)照射,照射距离为 100 cm,剂量率为 50 cGy/min。照射后 4~6 h 内,经尾静脉输注雄性供体小鼠的脾细胞,移植后小鼠在无菌层流架内饲养,饮水、饲料、垫料均经高温高压消毒。实验分组:阴性对照组 10 只,为受体小鼠照射后未输注脾细胞;未诱导组 10 只,为通过尾静脉移植未诱导的脾细胞, 5×10^6 个/只;诱导组 10 只,为通过尾静脉移植经天

* 基金项目:云南省自然科学基金重点项目资助(2003M0013Z)。

[△] 通讯作者, E-mail: panxhynkm@yahoo. cn.

然活性物质诱导的脾细胞, 5×10^6 个/只。

1.3.3 外周血 WBC 检测及生存时间的观察 移植后定期尾静脉取血检测各组受体小鼠 WBC; 观察移植后各组受体小鼠的生存时间和 30 d 存活率。

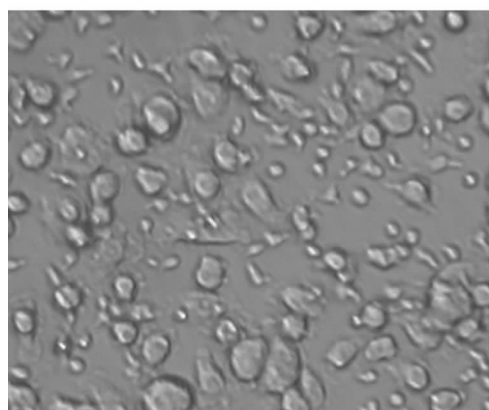
1.3.4 脾湿重及脾集落数的检测 移植后 13 d 取受体小鼠脾脏, 称脾湿重后放入 Bouin's 液中固定 24 h。5 d 后观察脾脏表面结节并记数。

1.3.5 受体小鼠 Y 染色体分析 取移植后第 20 天诱导组和未诱导组小鼠, 先注射秋水仙酰胺, 3 h 后取小鼠骨髓, 经 G 带染色体分析进行 Y 染色体检测, 诱导组小鼠骨髓细胞检测可观察到 Y 染色体, 阳性率为 20%。而未诱导组小鼠未检测到 Y 染色体。

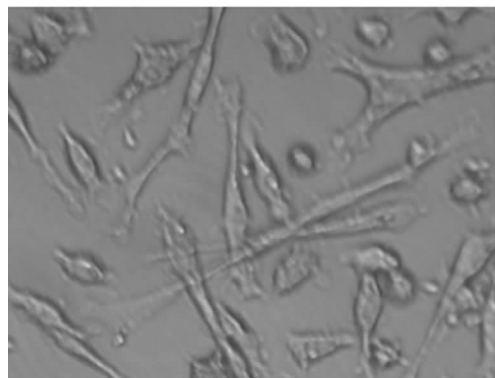
1.4 统计学处理 所有数据均经 SPSS 统计软件进行方差分析和 *t* 检验。

2 结 果

2.1 脾细胞诱导后形态学观察和免疫组化结果 诱导后的脾细胞由圆形变为长梭形, 并有部分贴壁生长(图 1)。将脾细胞涂于玻片上固定, 做免疫组化, 一抗为抗鼠 Oct-3/4 抗原的抗体, 二抗为标记 HRP 的羊抗鼠二抗, DAB 显色, 结果显示诱导后的脾细胞有大部分表达 Oct-3/4 抗原(图 2)。



A: 未诱导的脾细胞。



B: 诱导后的脾细胞。

图 1 诱导(B)和未诱导(A)的脾细胞形态学观察

3.2 移植后受体小鼠生存时间和 30 d 存活率的观察 阴性对照组小鼠照射后 15 d 内全部死亡; 未诱导组小鼠移植后 40 d 内全部死亡; 诱导组小鼠存活时间均大于 26 d, 其中有 3 只存活时间超过了 90 d, 见表 1。

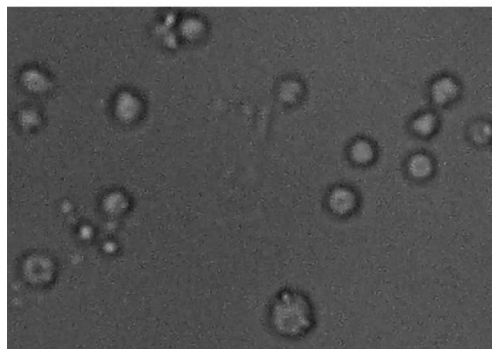
3.3 移植后受体小鼠外周血 WBC 的变化 照射后 3~4 d 小鼠外周血 WBC 数迅速下降, 阴性对照组小鼠死亡前 WBC 数均小于 1×10^5 /mL。未诱导组小鼠移植后 2 周 WBC 开始有

一定程度上升, 存活小鼠外周血 WBC 在 30 d 后(仅存活 3 只)恢复至 56×10^5 /mL。诱导组小鼠 WBC 于移植 2 周后开始上升, 存活小鼠外周血 WBC 在 30 d 后逐渐接近正常范围, 以后仍持续升高。

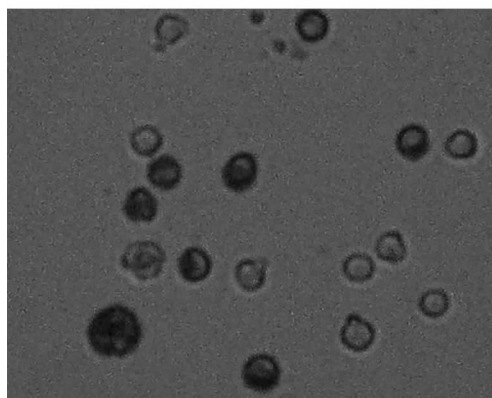
表 1 移植后各组小鼠 30 d 存活情况比较

组别	小鼠数量(只)	存活数量(只)	存活率(%)
阴性对照组	10	0	0
未诱导组	10	3	30
诱导组	10	9	90*

*: 与阴性对照组和未诱导组比较, $P < 0.05$ 。



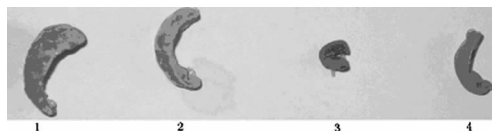
A: 未诱导的脾细胞。



B: 诱导的脾细胞, 深色细胞为阳性, 一抗为抗鼠 Oct-3/4 抗原的抗体。

图 2 诱导(B)和未诱导(A)的脾细胞进行免疫组化的结果

3.4 移植后受体小鼠脾湿重及脾集落计数 经尾静脉给受体小鼠输注 5×10^6 个供体小鼠脾细胞, 13 d 后将受体存活小鼠处死, 取脾脏, 肉眼观察形态, 称脾湿重, 计数脾集落数。结果表明, 阴性对照组的脾脏萎缩, 体积变小, 未见脾集落, 诱导组的脾脏在体积上明显比未诱导组和阴性对照组大。未诱导组和诱导组的脾湿重分别为 (99.6 ± 14.3) 和 (166.5 ± 5.8) mg/10 g 体质量, 阴性对照组的脾湿重为 (62.86 ± 7.8) mg/10 g 体质量。3 组脾集落的计数分别为 0、 (0.4 ± 1) 和 (10 ± 3) 个, 其差异有统计学意义。见图 3。



1: 诱导组; 2: 未诱导组; 3: 阴性对照组; 4: 正常小鼠。

图 3 各组小鼠脾脏对比

3.5 受体小鼠 Y 染色体的分析 移植后 20 d 取诱导组和未

诱导组的小鼠骨髓,经 G 带染色体分析进行 Y 染色体检测,诱导组受体小鼠骨髓检测可观察到 Y 染色体,阳性率为 20%,证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠。

4 讨 论

本研究采用的免疫组化一抗是 Oct-4 抗体,Oct-4(八聚体结合蛋白-4)是由 POU5f1 编码的八基序相连转录因子,属于 POU 转录因子家族。Oct-4 在鼠胚胎早期卵裂球、囊胚内细胞团(ICM)、上胚层和原始生殖细胞以及畸胎瘤细胞(EC)、胚胎干细胞(ESC)、胚胎生殖细胞(EG)内均有表达;在卵子或精子进入无丝分裂时,Oct-4 表达缺失,提示其在维持细胞多能性中具有重要作用。大部分的 ESC 系均表达高水平的 Oct-4,Oct-4 是鉴定 hESC 的重要标志物,所以本实验中免疫组化的一抗是鼠 Oct-4 单克隆抗体^[1-9]。

脾集落形成实验是检测小鼠造血干细胞的经典实验方法,利用该实验可以检测造血干细胞的相对数量^[10-13]。对小鼠血液和骨髓中 CFU-S 的观察结果证明血液和骨髓中的干细胞处于动态平衡,造血干细胞在外周血或非造血器官中都不能正常发育,通过血液循环迁移的干细胞最终将回归至造血器官的一定位置才能行使其生理功能。如果把干细胞移植到造血衰竭的小鼠中,那么骨髓和脾脏中的干细胞必然会增殖、分化,重建造血功能,在干细胞移植后比较短的时间内,脾脏将会发挥它短期造血重建作用,即从外周血分布到脾脏的干细胞开始增殖、分化,那么脾脏在外观和质量上也会发生相应的改变。所以本研究通过观察移植后小鼠脾脏的湿重和脾集落的计数来检测移植到小鼠体内的干细胞。实验结果表明,移植后 13 d 诱导组的脾脏在形态上明显比未诱导组增大;诱导组的脾湿重和 CFU-S 数显著高于未诱导组,更进一步说明移植到小鼠体内的脾细胞中含有较多的干细胞,同时在脾脏表面也形成了造血细胞集落。这些实验结果已经间接地证明了干细胞成功植入。但未排除受体造血功能自行恢复的可能性,遗传学的直接证明才最具有说服力。

取移植后 20 d 诱导组和非诱导组的小鼠骨髓,经 G 带染色体分析进行 Y 染色体检测,诱导组小鼠骨髓检测可见 Y 染色体,阳性率为 20%,而未诱导组没有检测到 Y 染色体,证实雌性受体小鼠重建的造血细胞来自雄性供体小鼠^[14-15]。本研究初步观察到经天然活性物质诱导的小鼠脾细胞对小鼠造血功能重建的作用,为进一步探讨诱导性多能干细胞的作用及其机制提供了理论与实验依据。

参 考 文 献

[1] Athanasiadou R, de Sousa D, Myant K, et al. Targeting of de novo DNA methylation throughout the Oct-4 gene regulatory region in differentiating embryonic stem cells[J]. PLOS One, 2007, 5(4): 9937.

[2] Bentz EK, Kenning M, Schneeberger C, et al. OCT-4 expression in follicular and luteal phase endometrium; a pilot study[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2008, 8(1): 38.

[3] Firth AL, Yao W, Remillard CV, et al. Upregulation of Oct-4 isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(4): 548-557.

[4] Kim S, Lim B, Kim J. EWS-Oct-4B, an alternative EWS-Oct-4 fusion gene, is a potent oncogene linked to human epithelial tumours[J]. Br J Cancer, 2007, 102(2): 436-446.

[5] Lee J, Go Y, Kang I, et al. Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells[J]. Biochem, 2008, 426(2): 171-181.

[6] Lu T, Hao H, Luo M, et al. Cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow multipotent progenitor cells is associated with down-regulation of Oct-4 expression[J]. Tissue Eng Part, 2006, 17(20): 3341-3344.

[7] Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, et al. Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos[J]. Cell Reprogram, 2007, 12(1): 67-74.

[8] Ratajczak MZ, Shin DM, Liu R, et al. Epiblast/germ line hypothesis of cancer development revisited: lesson from the presence of Oct-4(+) cells in adult tissues[J]. Stem Cell Rev, 2008, 23(16): 8180-8183.

[9] Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, et al. Expression profile of the embryonic markers nanog, oct-4, SSEA-1, SSEA-4 and FRIZ-ZLED-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 17(23): 664-666.

[10] Cole LJ. Spleen colony formation and hemopoietic restoration in lethally x-irradiated mice after injection of isogenic peritoneal cells[J]. Res Dev Tech Rep, 2006, 13(12): 546-549.

[11] Fu JX, Zhang XG. Effects of recombinant human macrophage colony stimulating factor (rhM-CSF) on stromal cell derived during the time of mice colony formation unit-spleen(CFU-S) and its role on CD34+ cells expansion in vitro[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2001, 23(5): 523-527.

[12] Hofer M, Pospisil M, Netikova J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and drugs elevating extracellular adenosine act additively to enhance the hemopoietic spleen colony formation in irradiated mice[J]. Physiol Res, 1999, 48(1): 37-42.

[13] Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, et al. Increased mobilization of c-kit+ Sca-1+ Lin-(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(1): 188-194.

[14] Speevak MD, Dolling J, Terespolsky D, et al. An algorithm for the prenatal detection of chromosome anomalies by QF-PCR and G-banded analysis[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(13): 1221-1226.

[15] Wagner J, Dzijan S, Pavan JD, et al. Analysis of multiple loci can increase reliability of detection of fetal Y-chromosome DNA in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2008, 28(5): 412-416.

(收稿日期: 2011-06-17)