

• 论 著 •

人造血干细胞在不同氧浓度下生长、凋亡状况观察研究^{*}

叶 果, 杨 鑫[△]

(重庆大学附属肿瘤医院头颈肿瘤中心, 重庆 400030)

摘 要:目的 研究不同氧浓度下人造血干细胞(HSCs)生长及凋亡状况的差异,探究不同氧浓度对 HSCs 生长的抑制作用。方法 将 HSCs 分别在不同氧浓度下培养,3%、5%、15%氧浓度作为实验组,20%氧浓度作为对照组。分别培养 4、7、10 d,研究红系集落形成单位(CFU-E)集落数;分别培养 6、12、24 h,观察 HSCs 细胞凋亡情况。结果 培养 4、7、10 d,5%氧浓度组 CFU-E 集落数最高,3%和 5%氧浓度组与对照组 CFU-E 集落数比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。培养 6 h,5%氧浓度组 HSCs 凋亡率最低,3%和 5%氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);培养 12 h,5%氧浓度组 HSCs 凋亡率最低,5%和 15%氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);培养 24 h,5%氧浓度组 HSCs 凋亡率最低,3%和 5%氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。培养 4、7、10 d,氧浓度变动与 CFU-E 集落数均呈正相关($P<0.05$)。培养 6、12、24 h,氧浓度变动与 HSCs 凋亡率均呈正相关($P<0.01$)。结论 不同氧浓度对 HSCs 的生长和凋亡有直接影响。5%的氧浓度能促进 HSCs 生长,同时又能抑制 HSCs 凋亡。

关键词:人造血干细胞; 生长; 凋亡; 氧浓度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.15.007

中图法分类号:R551

文章编号:1673-4130(2020)15-1822-04

文献标识码:A

Growth and apoptosis of hematopoietic stem cells in different oxygen concentrations^{*}

YE Guo, YANG Xin[△]

(Head and Neck Cancer Center, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

Abstract:Objective To study the differences in the growth and apoptosis of hematopoietic stem cells (HSCs) under different oxygen concentrations, and to explore the inhibitory effect of various oxygen concentrations on the growth of HSCs. **Methods** HSCs were cultured at a variety of different oxygen concentrations, 3%, 5% and 15% oxygen concentration were taken as the experimental group, and 20% oxygen concentration was taken as the control group. The number of erythroid colony forming unit (CFU-E) clusters was studied after 4, 7 and 10 days. HSCs were cultured for 6, 12 and 24 hours respectively for observing the apoptosis of HSCs cells. **Results** After 4, 7, 10 days of cultivation, 5% oxygen concentration group had the highest number of CFU-E colonies, and the differences between 3% and 5% oxygen concentration group and control group were statistically significant ($P<0.05$). After cultivation for 6 hours, the HSCs apoptosis rate in 5% oxygen concentration group was the lowest, and the differences between 3% and 5% oxygen concentration group and control group were statistically significant ($P<0.05$). 5% oxygen concentration group had the highest number of cfu-e colonies, and the difference between 3% group and control group was statistically significant ($P<0.05$). After cultivation for 12 hours, the apoptosis rate of HSCs in 5% oxygen concentration group was the lowest, and the differences between 5% and 15% oxygen concentration group and control group were statistically significant ($P<0.05$). After cultivation for 24 hours, the HSCs apoptosis rate in 5% oxygen concentration group was the lowest, and the differences between 3% and 5% oxygen concentration group and control group were statistically significant ($P<0.05$). 4, 7 and 10 days after cultivation, the changes of oxygen concentration were positively correlated with the results of CFU-E colony number ($P<0.05$). After 6, 12 and 24 hours of cultivation, the changes of oxygen concentration was positively correlated with the apoptosis rate

^{*} 基金项目:重庆市卫生局医学技术研究项目(2010-2-314)。

作者简介:叶果,男,主治医师,主要从事肿瘤和干细胞的基础与临床研究。 [△] 通信作者, E-mail:117289462@qq.com。

本文引用格式:叶果,杨鑫.人造血干细胞在不同氧浓度下生长、凋亡状况观察研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(15):1822-1825.

of HSCs ($P < 0.01$). **Conclusion** The growth and the apoptosis of HSCs are directly influenced by different oxygen concentrations. The oxygen concentration of 5% can promote the growth of HSCs and inhibit the apoptosis of HSCs.

Key words: human hematopoietic stem cells; growth; apoptosis; oxygen concentration

人造血干细胞(HSCs)在不同因素直接影响下增殖、分化成各种细胞,如骨髓组织细胞、淋巴组织细胞、白细胞、红细胞、上皮组织细胞等。HSCs 具备不停自我更新和变异的潜力。1988 年 THOMSON 等^[1]在实验室成功建立了胚胎干细胞系。从此以后, HSCs 在实验室被进一步培养为多种细胞,包括骨细胞、软骨细胞^[2]、血细胞、神经细胞、肌肉细胞、胰岛细胞等^[3-4]。基于 HSCs 优良的不断增殖和多向分化能力,在组织损伤重建的研究中 HSCs 表现出突出的作用^[5]。与此同时,在临床修复治疗中 HSCs 的多向分化性也获得了广泛应用。在干细胞的培养条件中环境因素至关重要,不同的环境因素包括氧浓度、pH 值、温度、渗透压等,均能影响干细胞的增殖与分化。氧浓度对干细胞的生长和凋亡有至关重要的影响, JOBIN 等^[6]的研究发现,在体外培养的低氧环境下,干细胞的生长受到明显干预。本研究主要观察 HSCs 在人体外培养的状况下,在不同氧浓度中的生长和凋亡情况,为将来的基础性试验与临床应用提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料 HSCs 由上海拜沃生物科技有限公司提供。RPMI1640 培养液(上海钰森生物技术有限公司)、Metho CultTMHCC4230 培养基(加拿大 Stem cell Technologies Inc 公司)、IMDM 培养基(上海北诺生物科技有限公司)、二氧化碳培养箱(长沙长锦科技有限公司)、Annexin V(美国 Becton, Dickinson and Company)、微氧手套箱(COY Laboratory Products 公司)、6 孔培养板(广州洁特生物过滤股份有限公司)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检验试剂盒(杭州昊鑫生物科技股份有限公司)、CKC-TR-2W 型倒置显微镜(Olympus, Japan)、YJ-875 型超净化工作台(苏州安泰净化设备厂)、BD-CAN7 型流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HSCs 用 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养。

1.2.2 不同氧浓度的细胞培养处置方式 将 HSCs 分为实验组和对照组。实验组细胞在微氧手套箱中培养的氧浓度分别设定为:3%、5%、15%;对照组细胞在微氧手套箱中培养的氧浓度设定为 20%。

1.2.3 红系集落形成单位(CFU-E)集落培养 采用 Metho CultTMHCC4230 培养基,0.9 mL 培养基加入 0.1 mL 的细胞悬液(细胞密度 2×10^9 个/升),用

IMDM 培养基补足为 1 mL,充分混匀后转移至 35 mm 的 6 孔培养板,每份标本重复 5 孔,置不同氧浓度,37 °C 饱和湿度的培养箱内,培养 4、7、10 d 时分别计数 CFU-E 集落数。

1.2.4 流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率 采用 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,0.9 mL 培养基加入 0.1 mL 的细胞悬液(细胞密度 2×10^9 个/升),用 IMDM 培养基补足为 1 mL,将 HSCs 在不同氧浓度下分别培养 6、12、24 h,使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检验试剂盒,通过 BD-CAN7 型流式细胞仪检测 HSCs 凋亡率。

1.2.5 相关性分析 氧浓度为 3%、5%、15%、20% 分别记作 3%氧浓度组、5%氧浓度组、15%氧浓度组、对照组。培养 4、7、10 d 时研究不同氧浓度和 CFU-E 集落数的相关性;培养 6、12、24 h 时研究不同氧浓度和 HSCs 凋亡率的相关性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时间、不同氧浓度下统计数据比较采用 LSD-*t* 检验;相关性采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人造血干细胞 倒置显微镜下观察分离培养的人血干细胞,见图 1。

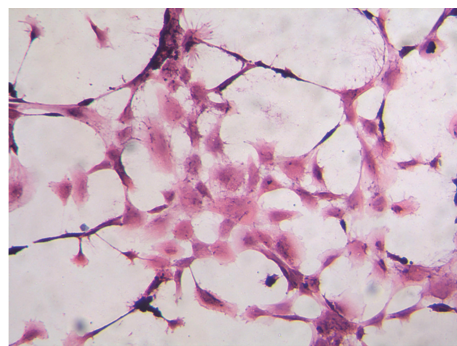


图 1 人造血干细胞(HE×400)

2.2 CFU-E 集落数结果 培养 4、7、10 d,5%氧浓度组 CFU-E 集落数最高,3%和 5%氧浓度组与对照组 CFU-E 集落数比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 不同氧浓度组 HSCs 凋亡率比较 培养 6 h, 5%氧浓度组 HSCs 凋亡率最低,3%和 5%氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);培养 12 h,5%氧浓度组 HSCs 凋亡率最低,5%和 15%氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较,

差异均有统计学意义($P<0.05$)；培养 24 h, 5% 氧浓度组 HSCs 凋亡率最低, 3% 和 5% 氧浓度组与对照组 HSCs 凋亡率比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

表 1 各组 CFU-E 集落数比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	4 d	7 d	10 d
3% 氧浓度组	3.400 $\pm$ 1.817*	15.200 $\pm$ 4.438*	20.200 $\pm$ 3.768*
5% 氧浓度组	4.200 $\pm$ 2.168*	17.400 $\pm$ 3.647*	23.600 $\pm$ 6.189*
15% 氧浓度组	2.600 $\pm$ 1.140	8.600 $\pm$ 2.302	12.600 $\pm$ 2.302
对照组	1.800 $\pm$ 0.837	4.200 $\pm$ 1.140	8.800 $\pm$ 2.589

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

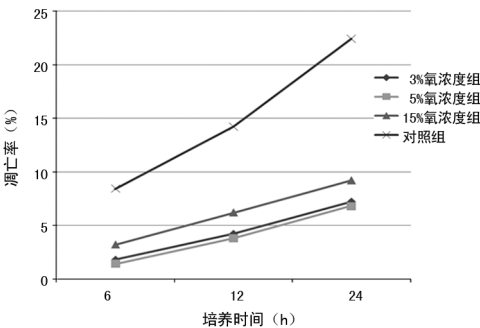


图 2 流式细胞仪测定 HSCs 凋亡率

2.4 不同氧浓度和 CFU-E 集落数、HSCs 凋亡率相关性分析

2.4.1 分别培养 4、7、10 d, 不同氧浓度和 CFU-E 集落数相关性分析 培养 4、7、10 d 氧浓度变化与 CFU-E 集落数均呈正相关($r=0.486、0.848、0.813$, $P<0.05$)。

2.4.2 分别培养 6、12、24 h, 不同氧浓度和 HSCs 凋亡率相关性分析 培养 6、12、24 h 后氧浓度变动与 HSCs 凋亡率均呈正相关($r=0.743、0.785、0.773$, $P<0.01$)。

3 讨论

HSCs 在增殖、分化、凋亡过程中受不同环境因素的影响, 包括温度、氧浓度、渗透压、pH 值等, 其中至关重要的一项因素就是氧浓度, 而最容易忽视的一项因素也是氧浓度。在不同氧浓度下, HSCs 的生物学行为显现出多种多样。有科学研究推测出 HSCs 在人体内最适宜生存的微环境不是常氧状态, 而是低氧状态^[7-8]。低氧状态是人体内普遍存在的一种生理环境, 因此, 也促进了人体内细胞的发育及多种病变的转变^[9]。目前, 国际和国内对于 HSCs 的体外培养, 普遍采用常氧状态, 而体内低氧状态与实验室中的常氧状态有巨大差异, 却较少有研究关注低氧状态下 HSCs 的增殖、分化、凋亡情况。因此, 本研究选用不同氧浓度培养 HSCs, 可更为真实地模拟人体内不同的真实生存环境状态。

HSCs 在自我修复、更新及分化方面有明显优势。

同时, HSCs 的增殖、复制、归巢后重建造血、多向分化、凋亡等生物学方面的功能也受周围各种环境因素的广泛制约^[10-11]。在人体内骨髓环境中为低氧状态, 而这正是 HSCs 主要的生存区域^[12-13]。人体内的这种低氧状态, 对于 HSCs 生物学方面的基本功能的持续保持起关键作用^[14-16]。有研究发现, 低氧状态会促进神经干细胞的增殖, 与此同时神经干细胞的凋亡却出现明显抑制效果^[17]。人体内部的低氧诱导因子(HIF)-1 是细胞在低氧状态下适应与应答调节中的主要转录因子, HIF-1 在细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生物学活动中起举足轻重的作用。HIF-1 有 α 和 β 2 个亚基, 常氧状态下, 因为被蛋白酶系统降解的原因, HIF-1 α 在细胞质内处于失活状态。而在低氧状态下, HIF-1 α 大量聚集活化, 同时转移到细胞核内, 与细胞核内的 HIF-1 β 相结合构成 HIF-1 分子, 进而辨识、结合其中包含有低氧化学反应元件的 DNA 序列, 从而介导、调节和管控与低氧反应所涉及基因的表达^[18]。在人体内骨髓中平均氧浓度为 5%, 静脉血平均氧浓度为 12%~15%, 动脉血平均氧浓度为 20%。本研究将体外培养环境中各组氧浓度分别设定为 3%、5%、15%、20%, 正是要模拟 HSCs 在人体内不同氧浓度下的生长、凋亡状况。而这方面的研究工作国际和国内的报道相对较少。

4 结论

本研究发现, HSCs 分别培养 4、7、10 d, 其中 5% 氧浓度组 CFU-E 集落数最高; 分别培养 6、12、24 h, 其中 5% 氧浓度组 HSCs 凋亡率最低。由此推测, 不同氧浓度对 HSCs 的生长和凋亡有直接影响, 而其中 5% 氧浓度能促进 HSCs 的生长, 同时也能抑制 HSCs 的凋亡, 可为今后的临床应用和实验室研究提供一定理论依据。

参考文献

[1] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Scisnce, 1998, 282(5395):1145-1147.

[2] 周晓红, 杨鑫. 人造血干细胞在不同氧浓度下调亡情况及体外诱导分化为软骨细胞的观察研究[J]. 医药前沿, 2017, 24(7):115-117.

[3] BRAGANÇA J, LOPES J A, MENDES-SILVA L, et al. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications[J]. World J Stem Cells, 2019, 11(7):421-430.

[4] OMOLE A E, FAKOYA A O J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications[J]. Peerj, 2018, 6:e4370.

[5] GORECKA J, KOSTIUK V, FEREDDOONI A, et al. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1):

- 87-89.
- [6] JOBIN C, CLOUTIER M, SIMARD C, et al. Heterogeneity of invitro-cultured CD34⁺ cells isolated from peripheral blood[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(10):1472-1484.
 - [7] LIU Y, DENG W. Reverse engineering human neurodegenerative disease using pluripotent stem cell technology[J]. *Brain Res*, 2016, 1638(Pt A):30-41.
 - [8] JING D, WOBUS M, POITZ D M, et al. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro[J]. *Haematologica*, 2012, 97(3):331-339.
 - [9] HUANG L, WANG G. The effects of different factors on the behavior of neural stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017:9497325.
 - [10] 邹仲之, 李继承. 组织学与胚胎学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:36-37.
 - [11] 邓雅文, 朱刚, 贾书花. 人造血干细胞的临床应用研究[J]. *长治医学院学报*, 2018, 32(1):74-76.
 - [12] KHATRI R, KRISHNAN S, ROY S, et al. Reactive oxygen species limit the ability of bone marrow stromal cells to support hematopoietic reconstitution in aging mice[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(12):948-958.
 - [13] MOIRANGTHEM R D, SINGH S, ADSUL A, et al. Hypoxic niche-mediated regeneration of hematopoiesis in the engraftment window is dominantly affected by oxygen tension in the milieu[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(20):2423-2436.
 - [14] ZHAO M, LI L. Regulation of hematopoietic stem cells in the niche[J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(12):1209-1215.
 - [15] BROXMEYER H E, O'LEARY H A, HUANG X, et al. The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells ex vivo[J]. *Curr Opin Hematol*, 2015, 22(4):273-278.
 - [16] ALENZE F Q, ALENAZI B Q, AHMAD S Y, et al. The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal[J]. *Yale J Biol med*, 2009, 82(1):7-18.
 - [17] STUDER L, CSETE M, LEE S H, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(19):7377-7383.
 - [18] BANDARA K V, MICHAEL M Z, GLEADLE J M, et al. MicroRNA biogenesis in hypoxia[J]. *Microna*, 2017, 6(2):80-96.

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-04-20)

(上接第 1821 页)

- [5] ZHANG G, YANG C, KANG X, et al. The combination of cerebrospinal fluid procalcitonin, lactate, interleukin-8 and interleukin-10 concentrations for the diagnosis of postneurosurgical bacterial meningitis: a prospective study[J]. *Ann Clin Biochem*, 2019, 56(1):133-140.
- [6] ZHANG G, ZHENG G, ZHANG Y, et al. Evaluation of a micro/nanofluidic chip platform for the high-throughput detection of bacteria and their antibiotic resistance genes in post-neurosurgical meningitis[J]. *Int J Infect Dis*, 2018, 70(5):115-120.
- [7] DZIRI R, KLIBI N, LOZANO C, et al. High prevalence of staphylococcus haemolyticus and staphylococcus saprophyticus in environmental samples of a tunisian hospital[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(2):136-140.
- [8] DUVAL R E, GRARE M, DEMORÉ B. Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right bacteria[J]. *Molecules*, 2019, 24(17):31-52.
- [9] BELLO-LÓPEZ J M, CABRERO-MARTÍNEZ O A, IBÁÑEZ CERVANTES G, et al. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *aeromonas* spp[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9):1-11.
- [10] ALCÀNTAR-CURIEL M D, ROSALES-REYES R, JARRILLO-QUIJADA M D, et al. Carbapenem-resistant acinetobacter baumannii in three tertiary care hospitals in mexico: virulence profiles, innate immune response and clonal dissemination[J]. *Front Microbiol*, 2019, 20(10):2116-2119.
- [11] GUO J, LI C. Molecular epidemiology and decreased susceptibility to disinfectants in carbapenem-resistant acinetobacter baumannii isolated from intensive care unit patients in central China[J]. *J Infect Public Health*, 2019, 12(6):890-896.
- [12] PEDERSEN T, SEKYERE J O, GOVINDEN U, et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical enterobacteriaceae in durban, south africa[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(5):e02178.
- [13] MAURYA N, JANGRA M, TAMBAT R, et al. Alliance of efflux pumps with β -lactamases in multidrug-resistant klebsiella pneumoniae isolates[J]. *Microb Drug Resist*, 2019, 25(8):1155-1163.

(收稿日期:2019-12-10 修回日期:2020-02-20)