

技术与方法

小鼠骨髓造血干细胞的分离纯化及电镜观察

张小翠¹ 谷 浩² 赵霖鹏¹ 符 蓉¹ 于 卓^{2*}(¹上海交通大学医学院基础医学公共技术平台, 上海 200025; ²上海交通大学医学院病理生理学系, 上海 200025)

摘要 应用免疫磁珠分选结合流式细胞术与透射电镜术对小鼠骨髓造血干细胞进行了分离、纯化及透射电镜观察。结果显示, 20只小鼠的骨髓细胞经分离纯化后, 共收集到 2×10^5 个造血干细胞, 纯度达95%以上; 其形态类似于小淋巴细胞, 呈单核, 近圆形, 直径约5~7 μm , 核大细胞质少, 染色质电子密度不均, 除了线粒体和一些囊泡外, 较少见到其他细胞器。经分离纯化的小鼠骨髓造血干细胞纯度好、活率高, 可制成透射电镜标本, 并能清晰观察其超微结构特征。该研究方法试图找出小鼠骨髓造血干细胞在形态学上的特征, 为后续研究提供实验基础, 且对探讨造血细胞结构与功能的关系具有一定的应用价值。

关键词 小鼠骨髓; 造血干细胞; 免疫磁珠分选; 流式细胞术; 超微结构

Isolation and Purification of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells in Mice and Electron Microscopy Observation

Zhang Xiaocui¹, Gu Hao², Zhao Benpeng¹, Fu Rong¹, Yu Zhuo^{2*}(¹Core Facility of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;²Department of Pathology and Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract The hematopoietic stem cells were isolated and purified from the mice bone marrow using immunomagnetic beads and flow cytometry, and observed by means of transmission electron microscopy. The results showed that 2×10^5 hematopoietic stem cells were collected from the 20 mice bone marrow, with a purity of more than 95%. They were single nuclear cells, similar to lymphocyte, suborbicular, about 5~7 μm in diameter, large nuclear/cytoplasmic ratios, uneven chromatin electron density. Other organelles were hard to observe, except for some mitochondria and vacuoles. It concluded that the purified mice bone marrow hematopoietic stem cells had high purity and high activity, which could be used as transmission electron microscope specimen and observed its ultrastructure characteristics clearly. This study attempts to find the character of mice bone marrow hematopoietic stem cells in morphology and provide basic data for future research, and to have certain application value in relationship with the structure and function.

Keywords bone marrow; hematopoietic stem cells; immunomagnetic beads; flow cytometry; ultrastructure

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是血液成分之一, 是生成各种血细胞的最起始细

胞, 又称多能造血干细胞。它以极低数量存在于哺乳动物的骨髓、胎肝、外周血及脐带血中, 被称作

收稿日期: 2017-10-26 接收日期: 2018-01-15

上海市自然科学基金(批准号: 17ZR1415500)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776912, E-mail: yuzhuo78@shsmu.edu.cn

Received: October 26, 2017 Accepted: January 15, 2018

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.17ZR1415500)

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776912, E-mail: yuzhuo78@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-04-16 17:06:01

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1705.024.html>

“niche”的特定环境所包围^[1]。HSCs具有高度的自我更新能力, 又具有进一步分化为各系统祖细胞的能力, 根据其造血重建能力可以分为长期造血干细胞(long-term HSCs, LT-HSCs)和短期造血干细胞(short-term HSCs, ST-HSCs)。前者能够恢复致死剂量照射鼠的终生各系造血能力, 后者仅能维持致死剂量照射鼠3个月以内的造血功能。HSCs继续向下分化形成多能造血祖细胞(multipotential hematopoietic progenitor cell, MPP), MPP再分化形成髓系祖细胞CMP和淋系祖细胞CLP^[2]。

目前, 造血干细胞移植和骨髓移植已成功地用于治疗免疫系统和血液系统等多种疾病^[3-4], 而对于含量极低的造血干细胞而言, 精确的干细胞分离及鉴定是确保移植成功的关键。近年来, 随着单克隆抗体及流式细胞术的发展, 分离纯化造血干细胞的技术也日趋成熟, 关于检测小鼠骨髓造血干细胞表型的方法就有LSK、SLAM和SP等标记^[5-8]。而多年来对小鼠骨髓造血干细胞的研究均局限于其分离富集和功能方面的探索, 却少见对其形态、超微结构等生物学特征的研究。本文利用免疫磁珠分选与流式细胞术分选结合的方法, 将小鼠骨髓造血干细胞分离纯化, 制成透射电镜标本, 然后经电镜观察, 试图找出造血干细胞在形态学上的特征与意义, 为后续研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只C57BL/6健康小鼠, 周龄为8~10周, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供。以上小鼠饲养于上海交通大学医学院动物科学部清洁屏障内, 饲养条件和动物管理严格遵守伦理委员会规定。动物实验通过上海交通大学医学院实验动物使用和管理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 Biotinylated lineage cocktail(anti-CD3、anti-CD5、anti-B220、anti-Mac-1、anti-Gr-1和anti-Ter119)和Streptavidin Particles Plus-DM磁珠购自BD Pharmingen公司; EasySep磁力器购自Stem Cell公司; Streptavidin-PE/Cy5.5、anti-Sca-1-FITC、anti-c-Kit-APC、anti-Flk2-PE和anti-CD34-eFluo450抗体购自eBioscience公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞分选仪(MoFlo Astrios^{EQ})购自Beckman Coulter公司, 透射电子显微镜(Philips

CM-120)购自Philips公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓细胞采集 颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌条件下取其胫骨和股骨, 用5 mL注射器吸取含2% FBS的PBS冲洗骨髓腔, 换1 mL注射器的4号针头将骨髓细胞悬液反复吹打, 70 μ m的滤器过滤后成为单细胞悬液, 600 $\times$ g离心5 min; 加入2 mL红细胞裂解液, 充分混匀, 室温孵育10 min, 600 $\times$ g离心5 min, 弃上清液后清洗1次。

1.2.2 小鼠Lin⁻细胞免疫磁珠分选 将上述收集到的骨髓细胞重悬于1 mL PBS中, 加入20 μ L生物素抗体Biotinylated lineage cocktail(1:100), 4 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS清洗1次; 加入400 μ L抗生物素抗体Streptavidin Particles Plus-DM磁珠, 4 $^{\circ}$ C孵育15 min, PBS清洗1次; 重悬细胞加PBS至2.5 mL, 将试管放置在EasySep磁力器上5 min, PBS冲洗管壁2次各5 min, 收集含Lin⁻细胞的分选液。

1.2.3 造血干细胞的流式细胞术分析与分选 采集磁珠分选后Lin⁻细胞溶液, 按比例加入抗体Sca-1-FITC(1:100)、c-Kit-APC(1:100)、Flk-2-PE(1:100)和CD34-eFluo450(1:100), 4 $^{\circ}$ C避光孵育15 min, PBS洗2次; 选用70 μ m的喷嘴, 调节液流稳定, 选择纯度分选模式, 40 μ m的过滤器过滤, 分析和分选含免疫表型为Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺Flk2⁻CD34⁺的长期造血干细胞(LT-HSCs)。

1.2.4 透射电镜样品制备 将分选后的造血干细胞(2×10^5 个)混入到人外周血红细胞(1×10^6 个)中, 1 200 $\times$ g离心10 min, 弃上清; 加入2 mL 2.5%戊二醛, 4 $^{\circ}$ C下固定2 h, PBS漂洗, 再用1%锇酸4 $^{\circ}$ C下固定2 h, 蒸馏水漂洗, 梯度酒精脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铅、柠檬酸铅染色后, 透射电子显微镜观察并照相; 将未分选的骨髓细胞经红细胞裂解后, 同样制成透射电镜标本, 用以观察其超微结构。

2 结果

2.1 小鼠骨髓造血干细胞的分离纯化

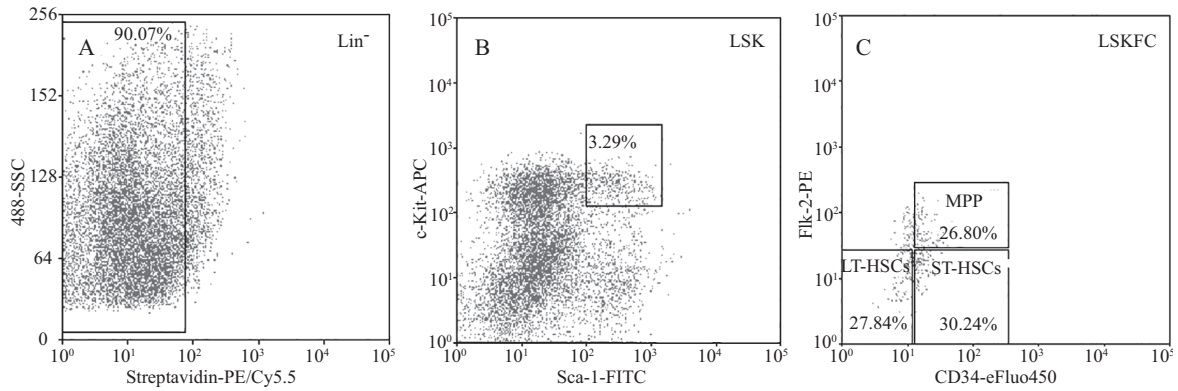
20只小鼠共收集约 8×10^8 个的骨髓细胞, 平均每只小鼠可收集 4×10^7 个的骨髓细胞, 经红细胞裂解及免疫磁珠分选纯化后, 富集到的Lin⁻细胞数约为 8×10^7 个, 每只小鼠约 4×10^6 个。

造血干细胞的流式细胞术分析结果如图1。磁珠分选后的Lin⁻细胞群, 纯度达90.07%(图1A), 经过多个

抗体标记后,造血干细胞群($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$)的比例为 $90.07\% \times 3.29\%$ (图1B), 长期造血干细胞群($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Flk2}^- \text{CD34}^-$)的比例为 $90.07\% \times 3.29\% \times 27.84\%$ (图1C)。分选后的细胞经过计数, 总量约为 2×10^5 个, 细胞活率为 95.83% , 回测纯度达 95% 以上。

2.2 小鼠骨髓造血干细胞的电镜观察

将分选所得的小鼠骨髓造血干细胞(2×10^5 个)加入到人红细胞(1×10^6 个)溶液中, 制成透射电镜标本。结果显示, 有核细胞即是小鼠骨髓造血干细胞, 无核且中央凹陷的细胞是人红细胞(图2A和图2B)。

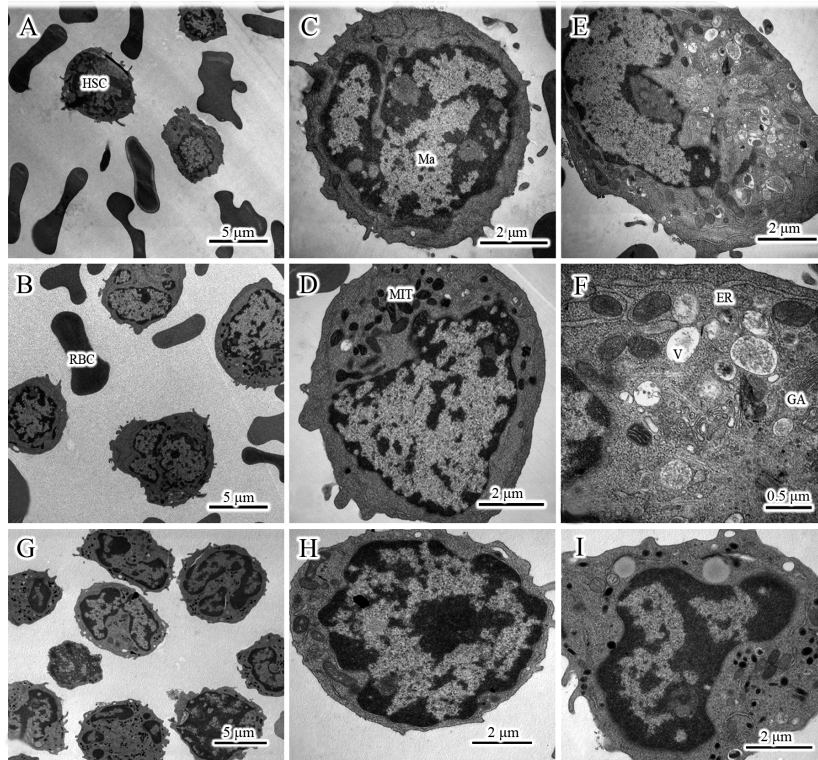


A: Lin^- 细胞群; B: 造血干细胞群; C: 长期造血干细胞(LT-HSCs)、短期造血干细胞(ST-HSCs)和多潜能祖细胞(MPP)。

A: Lin^- cells; B: HSCs; C: long-term HSCs (LT-HSCs), short-term HSCs (ST-HSCs) and multipotential hematopoietic progenitor cells (MPP).

图1 小鼠骨髓造血干细胞的流式细胞术分析

Fig.1 HSCs in the BM of mice analyzed by the flow cytometry



A, B: 小鼠骨髓造血干细胞和人红细胞(HSC: 造血干细胞; RBC: 红细胞); C-E: 造血干细胞结构(Ma: 大核; MIT: 线粒体); F: 造血干细胞放大结构(V: 囊泡; ER: 内质网; GA: 高尔基体复合体); G: 骨髓细胞; H: 淋巴细胞; I: 单核细胞。

A, B: HSC in the BM of mice and red blood cell in human (HSC: hematopoietic stem cell; RBC: red blood cell); C-E: the structure of HSC (Ma: macronucleus; MIT: mitochondria); F: the magnification structure of HSC (V: vesicles; ER: endoplasmic reticulum; GA: Golgi apparatus); G: bone marrow cells; H: lymphocyte; I: monocyte.

图2 小鼠骨髓造血干细胞的电镜观察结果

Fig.2 HSC in the BM of mice observed under the transmission electron microscope

放大显示, 造血干细胞为单核, 近圆形, 直径约为5~7 μm , 表面可见数根绒毛或微绒毛, 核大细胞质少, 染色质电子密度不均, 除了线粒体和一些囊泡外, 较少见到其他细胞器(图2C~图2E)。进一步放大显示, 线粒体双层膜结构, 直径约0.5 μm , 内膜折叠成较深的脊, 囊泡单层膜结构, 泡内含低电子密度物质, 偶见内质网和高尔基体复合体(图2F)。骨髓细胞中以粒细胞系统占比最大, 呈圆形; 胞核随细胞成熟的程度而不同, 幼稚型的呈杆状或马蹄形, 成熟型的呈分叶状, 其中三叶的较多(图2G)。小淋巴细胞近圆形, 直径约5 μm , 核相对较大, 细胞质较少, 核内染色质多, 呈块状分布在核膜周围, 胞质内线粒体相对较少, 内质网较丰富(图2H)。单核细胞体积较大, 胞质丰富, 胞核常呈肾形或马蹄形, 细胞形状不一, 有圆形、多角形(图2I)。

3 讨论

造血干细胞是具有高度自我更新和多项分化潜能的一类细胞, 观察其超微结构有些困难。首先, 造血干细胞在体内含量甚微, 成年人的造血干细胞约占骨髓细胞的0.05%, 小鼠造血干细胞约占骨髓细胞的0.01%^[9]; 其次, 造血干细胞与其他单核细胞在形态上很难区分开来, 且分离纯化方法落后, 使得到的细胞少、活率低、纯度不高, 无法对其下一步继续研究; 此外, 制作透射电镜样本过程复杂, 步骤繁多, 需要多步离心、重悬, 容易损失细胞。

由于造血干细胞在小鼠体内含量不足万分之一, 本实验需采集20只小鼠的骨髓细胞, 每只小鼠可得骨髓细胞约 4×10^7 个, 获取到的骨髓总细胞数为 8×10^8 个, 从如此多的细胞中将造血干细胞分离出来实属不易。故本实验利用免疫磁珠分选的方法将骨髓细胞标记上生物素抗体 Biotinylated lineage cocktail, 利用抗体与抗生物素抗体 Streptavidin Particles Plus-DM 磁珠结合, 此方法孵育时间短, 操作过程快, 且不会对细胞造成机械性压力, 分选后可以去除大部分 Lin^+ 成熟细胞, 收集到的 Lin^- 细胞约有 8×10^7 个。这样可排除大量无关细胞的干扰, 同时也可节约抗体的使用。

目前还没有一个表面标记可以单独分离出造血干细胞, 通常是多个标记共同使用, 本实验在LSK的基础上再加上CD34和Flk2标记, 以期获得纯度更好的造血干细胞。在流式细胞术分选技术上, 采取

了对仪器各项参数的优化, 包括对喷嘴的选择、激光器的使用、如何设门以及分选模式的选取。喷嘴选择是流式细胞术分选的基础, 喷嘴太大会影响分选的准确性, 太小则会影响分选的速度, 甚至发生堵塞, 其原则是细胞大小一般不超过喷嘴孔径的1/5^[10]。由于待分选细胞较小, 本实验选用70 μm 的喷嘴, 这样在保证分选纯度和分选得率的基础上, 还能提升细胞的分选速度, 缩短分选时间。4种荧光染料用4根不同的激光器去激发, 这样可减少各荧光通道之间的补偿, 提高了细胞的分选纯度, 降低了人为因素影响的误差。在设门时, 利用散点图前向角散射光强度(FSC)和侧向角散射光强度(SSC)排除细胞碎片、死细胞和黏连体。选择纯度(Purity-1)模式分选细胞。

制备电镜标本需要将细胞固定、漂洗、梯度酒精脱水、环氧树脂包埋等多个步骤, 每一步都需要离心、重悬细胞, 容易造成细胞的丢失, 这对于为数不多(2×10^5 个)的造血干细胞而言, 显然又是一个挑战。本实验把分选所得的造血干细胞混入到人的红细胞中, 二者细胞形态差异较大、容易辨别, 而且互不影响, 这样既降低了细胞在操作过程中的损失, 又不影响电镜制样后的形态学观察。

电镜下显示造血干细胞近圆形, 核大, 细胞质少, 除线粒体外, 其他细胞器均少或无, 符合细胞的高度静止状态, 结果与之前研究报道过的人类造血干细胞相似^[11-12], 推测此类细胞为小鼠骨髓造血干细胞。此类细胞在形态类上类似小淋巴细胞, 但与小淋巴细胞比较, 造血干细胞的细胞核大致呈圆形, 多不规则, 凹陷不如小淋巴细胞深; 核染色质细小、弥散, 而小淋巴细胞染色质较深, 呈块状分布在核膜周围; 造血干细胞胞质内, 与小淋巴细胞比较, 含较多的线粒体, 较少的高尔基体、内质网和溶酶体等细胞器。这些形态结构上的差异反映了造血干细胞与淋巴细胞功能上的不同, 对于探索造血干细胞的结构与功能的关系具有一定的指导意义。

参考文献 (References)

- 1 田 晨, 张翼鹭. 小鼠造血干细胞表型及其分离纯化的研究进展. 中国实验血液学杂志(Tian Chen, Zhang Yizhuo. Recent research advances on markers, isolation and purification of mouse hematopoietic stem cells. Journal of Experimental Hematology) 2012; 20(1): 196-9.
- 2 Chan WI, Hannah RL, Dawson MA, Pridans C, Foster D, Joshi A,

- et al.* The transcriptional coactivator Cbp regulates self-renewal and differentiation in adult hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* 2011; 31(24): 5046-60.
- 3 Storb R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation—yesterday, today, and tomorrow. *Exp Hematol* 2003; 31(1): 1-10.
- 4 Zheng X, Beissert T, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Altschmied J, Stolz C, *et al.* Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. *Blood* 2004; 103(9): 3535-43.
- 5 Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry A* 2013; 83(1): 27-37.
- 6 Tian C, Zhang Y. Purification of hematopoietic stem cells from bone marrow. *Ann Hematol* 2016; 95(4): 543-7.
- 7 Chen J, Ellison FM, Kewanfar K, Omokaro SO, Desierto MJ, Eckhaus MA, *et al.* Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice. *Exp Hematol* 2008; 36(10): 1236-43.
- 8 Lin KK, Goodell MA. Purification of hematopoietic stem cells using the side population. *Methods Enzymol* 2006; 420: 255-64.
- 9 Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2011; 17(17): 5553-8.
- 10 汪 艳, 胡 悦, 刘 伟, 乔志仙, 李婷婷. 流式细胞分选技术的质量控制. 中国科技期刊数据库(Wang Yan, Hu Yue, Liu Wei, Qiao Zhixian, Li Tingting. Quality control of cell sorting in flow cytometry. *Journal of Chinese Technical Database*) 2015; 24: 252-3.
- 11 孙 莉, 罗朝东, 李丽亚, 董其源. 脐血CD34⁺细胞的分离纯化及电镜观察. 广西医学(Sun Li, Luo Chaodong, Li Liya, Dong Qiyuan. Isolation and purification of CD34⁺ cells in umbilical cord blood and electron microscopy observation. *Guangxi Medical Journal*) 1996; 18(4): 323-4.
- 12 奚永志, 张双喜, 江飞子, 唐佩弦, 魏 文, 孔繁华. 人正常骨髓CD34⁺造血干/祖细胞的超微结构. 科学通报(Xi Yongzhi, Zhang Shuangxi, Jiang Feizi, Tang Peixuan, Wei Wen, Kong Fanhua. The ultrastructure of CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells in human normal bone marrow. *Chinese Science Bulletin*) 1997; 42(5): 532-5.