

小鼠骨髓造血干细胞、外周血组成随年龄的变化趋势及其相关性分析

赵凯¹ 杨星宇¹ 万颖寒² 孙瑞林^{2*} 费俭^{1,2}

(¹同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201210)

摘要 造血干细胞是具有自我更新能力并能分化为血液中各种血细胞组分的多能干细胞。近来研究显示, 不同造血干细胞表面标志物标记的造血干细胞具有分化为不同血细胞的趋势, 但是这种分化的内在关系仍不清楚。对小鼠CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞、外周血组成随小鼠年龄增长的变化情况进行了分析, 结果显示: 随着年龄的增长, 骨髓中的CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞比率显著增加; 而外周血各组分则随年龄变化呈现不同的趋势。对不同年龄段小鼠的骨髓造血干细胞及其他组分与外周血组分的同步分析发现, 外周血中血小板密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞变化情况相关系数为0.804 8; 外周血中淋巴细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞的变化情况相关系数为0.947 97; 外周血中白细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞变化情况相关系数为0.763 1 (大于0.9为极度相关, 0.7到0.9为高度相关)。

关键词 骨髓造血干细胞; 外周血; 相关性

正常情况下人体内的造血干细胞每天分化出数以亿计的白细胞、红细胞和血小板等血细胞^[1], 随着机体的衰老, 造血干细胞的数量和活性会出现相应的变化, 导致机体造血功能的退化, 引起机体贫血^[2]、造血作用失去平衡^[3]等一系列症状。目前, 对于造血干细胞在机体一生中的变化规律, 虽有一些文献报道^[4-6], 但年龄段的选取和跨度还不够全面, 对骨髓造血干细胞与外周血各种血细胞间的相互关系仍不清楚。在本研究中, 我们选取了20天、2月龄、5月龄、14月龄、25月龄五个年龄段的小鼠, 利用造血干细胞表面标志物CD34、Sca-1对骨髓中的造血干细胞及其他细胞组分进行了分析, 同时对各年龄段小鼠外周血组成变化情况进行了同步研究。

近年来, 通过大量高纯度的单一造血干细胞移植实验证明, 造血干细胞群是一个异质性的群体, 不同造血干细胞亚型具有向不同细胞系分化的趋势^[7-8]。但是, 作为外周血组分来源的造血干细胞与作为分化终端的外周血组分, 两者之间在数量上具有何种关联性, 仍然还有待分析。我们利用CD34/Sca-1两种骨髓造血干细胞标志物对不同年龄段小鼠的骨髓细胞组分和外周血细胞组分的变化趋势进行了分析, 结果显示不同标记物标出的骨髓细胞与

不同的外周血组分间确有高度相关性, 然而这种相关性是否存在必然的联系还需要进一步证实。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物分组及处理 不同年龄的雄性C57BL/6J小鼠由上海南方模式生物研究中心提供, 其中出生后20天和14月龄每组各7只, 2月龄和5月龄每组各8只, 25月龄组4只。处死小鼠进行外周血和骨髓细胞的分离提取。所有动物实验方案都经过上海南方模式生物研究中心动物实验伦理委员会的审核和批准。

1.1.2 仪器 离心机(Eppendorf centrifuge 5810R), Vi-cell XR细胞计数仪(BECKMAN COULTER), 流式细胞仪FACS Calibur (B&D公司), pocH-100iV动物专用血液分析仪(希森美康公司)。

1.1.3 主要试剂 南美洲胎牛血清(Hyclone公司), PBS (上海生博医学生物工程科技有限公司), 叠氮钠(碧云天), 红细胞裂解液(碧云天), FITC标记的大鼠抗小鼠CD34 (eBioscience)、阴性对照大鼠IgG2a-FITC

收稿日期: 2011-06-09 接受日期: 2011-08-29

科技部重大专项(No.2010CB945501)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-50793648, E-mail: rlsun@126.com

(eBioscience)、PE标记的大鼠抗小鼠Sca-1 (eBioscience)、阴性对照大鼠IgG2a-PE (eBioscience)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠取血 摘取小鼠眼球取血, 置于抗凝管中, 上机待检。

1.2.2 小鼠骨髓细胞分离 将小鼠颈椎脱臼处死后置于75%酒精浸泡约30 s, 分离出小鼠股骨, 尽量去除表面的附着组织, 吸取2 mL细胞流式液(2% FBS、0.1%叠氮钠的PBS溶液), 将骨髓细胞吹到培养皿内, 用枪头反复轻轻吹打成细胞悬液, 转到15 mL离心管, 4 °C离心5 min, 加入5倍体积的红细胞裂解液, 作用2 min, 4 °C离心5 min, 去上清(如红细胞处理的不充分可重复此步骤), 加入2 mL细胞流式液, 吹打成细胞悬液, 4 °C离心5 min, 去上清, 共洗三次。

1.2.3 细胞计数 加入100 μ L细胞流式液, 吹打成细胞悬液, 300目尼龙筛网过滤, 取10 μ L用细胞流式液稀释50倍, 上机待检。

1.2.4 造血干细胞表面标记CD34和Sca-1检测

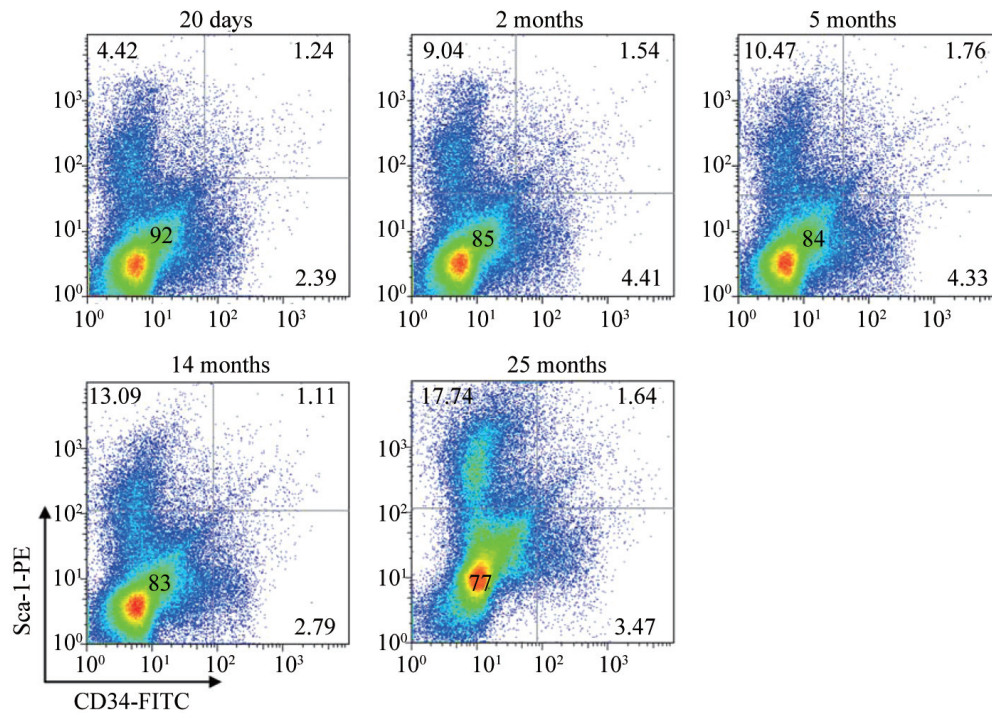
分别吸取 1×10^6 个细胞, 细胞流式液定容到100 μ L, 各加入2 μ L CD34抗体和1.25 μ L Sca-1抗体。同时各自做阴性对照, 4 °C避光孵育30 min, 细胞流式液洗三次, 固定液固定(也可直接上机), 上机待检。

1.2.5 统计学分析 细胞流式结果采用FlowJo v5.7.2和Origin 8.0软件分析, 外周血组分分析结果采用Origin 8.0软件分析, 相关性分析采用Matlab 2010a软件分析, 数值用means \pm SE表示, $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 不同年龄小鼠骨髓造血干细胞及其他组分比例分析

利用造血干细胞表面标志物CD34和Sca-1对不同年龄段C57BL/6J小鼠的骨髓造血干细胞及其他组分进行分析。



利用CD34/Sca-1分析不同年龄小鼠骨髓细胞组分变化的流式结果代表图, 不同年龄(20天、2月龄、5月龄、14月龄、25月龄) C57BL/6J小鼠的骨髓细胞取自小鼠两侧的胫骨腓骨。

Age-related changes in the CD34/Sca-1 cell population. Bone marrow cells were isolated from left and right femurs and tibiae of young and old (20 days, 2 months, 5 months, 14 months, 25 months) C57BL/6J mice, and the expression of CD34, Sca-1 was analyzed by flow cytometry. Representative FACS profiles are shown.

图1 不同年龄小鼠骨髓细胞CD34、Sca-1流式结果代表图

Fig.1 Representative FACS profiles

流式细胞仪检测结果表明,骨髓中的CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞和Sca-1⁺骨髓细胞比例随小鼠年龄的增长显著增加(图2A和图2D); CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞和CD34⁺骨髓细胞比例在20天、2月龄、5月龄组中随年龄的增加显著升高,14月龄组较5月龄组显著下降,而25月龄组较14月龄组则显著增加(图2B和图2C)。

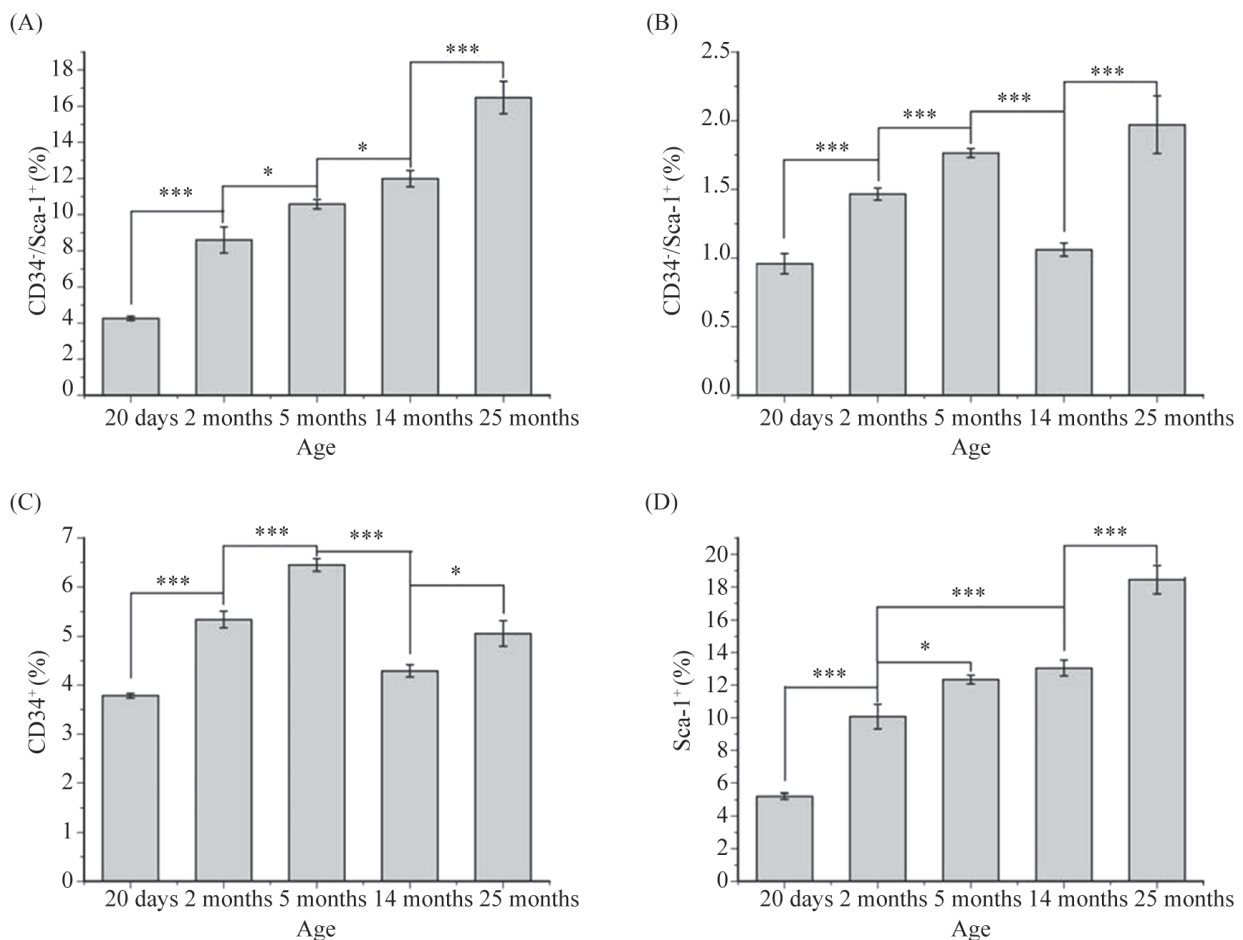
2.2 不同年龄小鼠外周血各细胞组分分析

外周血中的血细胞是由造血干细胞分化来的,为了对机体的造血干细胞和外周血中血细胞的相互关系进行分析,我们同时对不同年龄小鼠外周血中各细胞组分进行了分析,结果显示:外周血中淋巴细胞密度在20天、2月龄、5月龄小鼠中随年龄的增加不断升高,之后不断降低(图3A)。外周血中血小板

密度随年龄的增加不断增多(图3B)。白细胞密度呈现先增加后降低再升高的趋势,在20天、2月龄、5月龄小鼠中随年龄的增加不断升高,在14月龄小鼠中显著下降,而在25月龄小鼠中又升高(图3C)。外周血中红细胞密度(图3D)及血红蛋白浓度(图3E)随年龄增加在20天、2月龄、5月龄和14月龄小鼠中呈不断上升趋势,在25月龄小鼠中呈下降趋势;而外周血红细胞平均体积(图3F)、红细胞平均血红蛋白量(图3G)和红细胞平均血红蛋白浓度(图3H)随着小鼠年龄的增加均呈不断下降趋势。

2.3 CD34/Sca-1两种骨髓造血干细胞标志物标出的各种骨髓细胞组分变化趋势与外周血组分变化趋势之间的相关性分析

为了探讨造血干细胞与外周血组分,两者之间

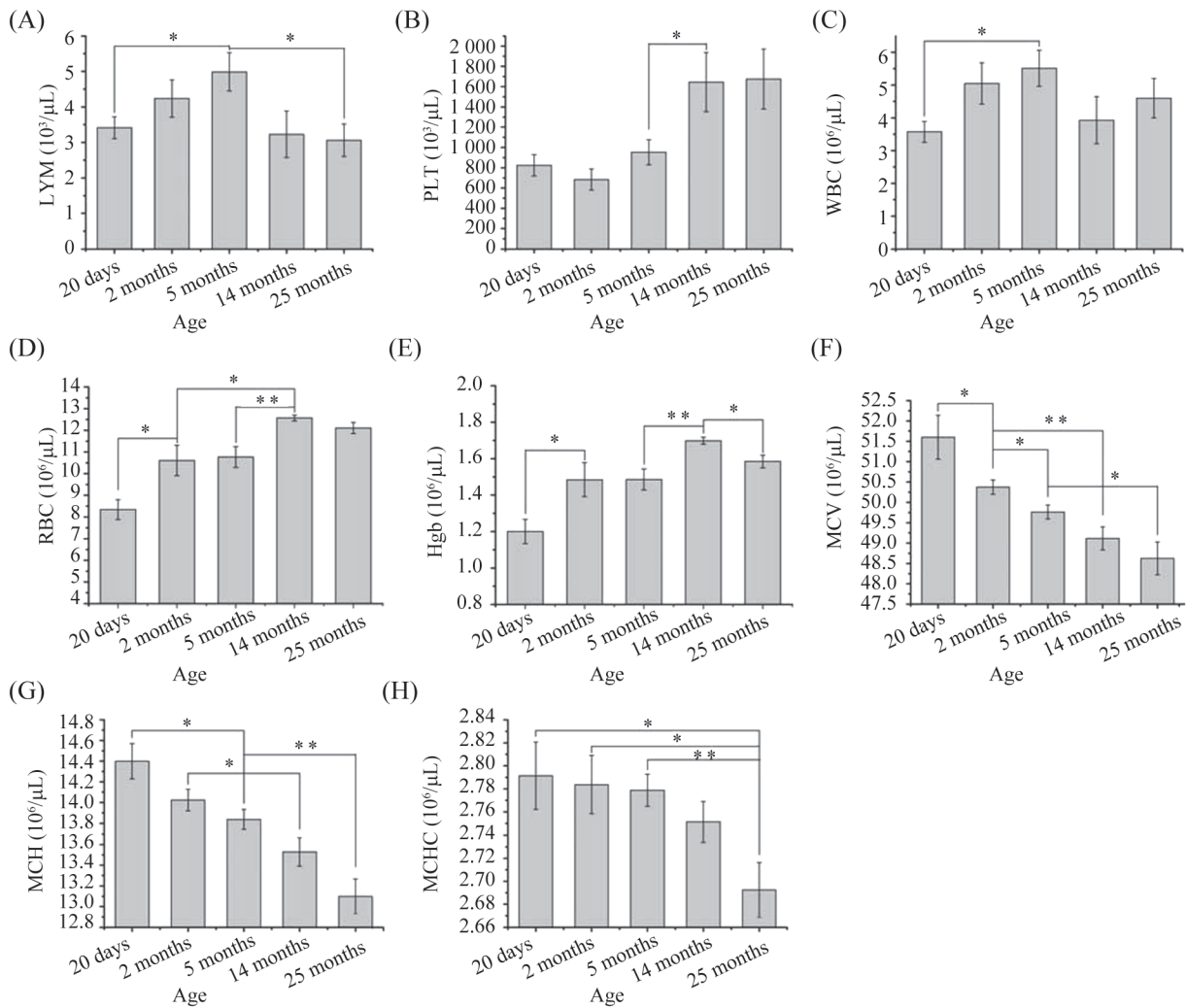


A: CD34⁺/Sca-1⁺细胞; B: CD34⁺/Sca-1⁺细胞; C: CD34⁺细胞; D: Sca-1⁺细胞 (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001)。

A: CD34⁺/Sca-1⁺ cells; B: CD34⁺/Sca-1⁺ cells; C: CD34⁺ cells; D: Sca-1⁺ cells (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001)。

图2 随年龄增长小鼠表达不同造血干细胞表面标志物的骨髓细胞比例

Fig.2 The percentage of cells expressed different cell surface markers in bone marrow with increasing age



A: 外周血中淋巴细胞的密度; B: 外周血中血小板的密度; C: 外周血中白细胞的密度; D: 外周血中红细胞的密度; E: 外周血中血红蛋白浓度; F: 外周血中红细胞平均体积; G: 外周血中红细胞平均血红蛋白量; H: 外周血中红细胞平均血红蛋白浓度(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

A: the density of lymphocyte (LYM) in peripheral blood; B: the density of blood platelet (PLT) in peripheral blood; C: the density of white blood cell (WBC) in peripheral blood; D: the density of red blood cell (RBC) in the peripheral blood; E: the concentration of hemoglobin (Hgb) in peripheral blood; F: the mean corpuscular volume (MCV) in peripheral blood; G: the mean corpuscular hemoglobin (MCH) in peripheral blood; H: the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in peripheral blood (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

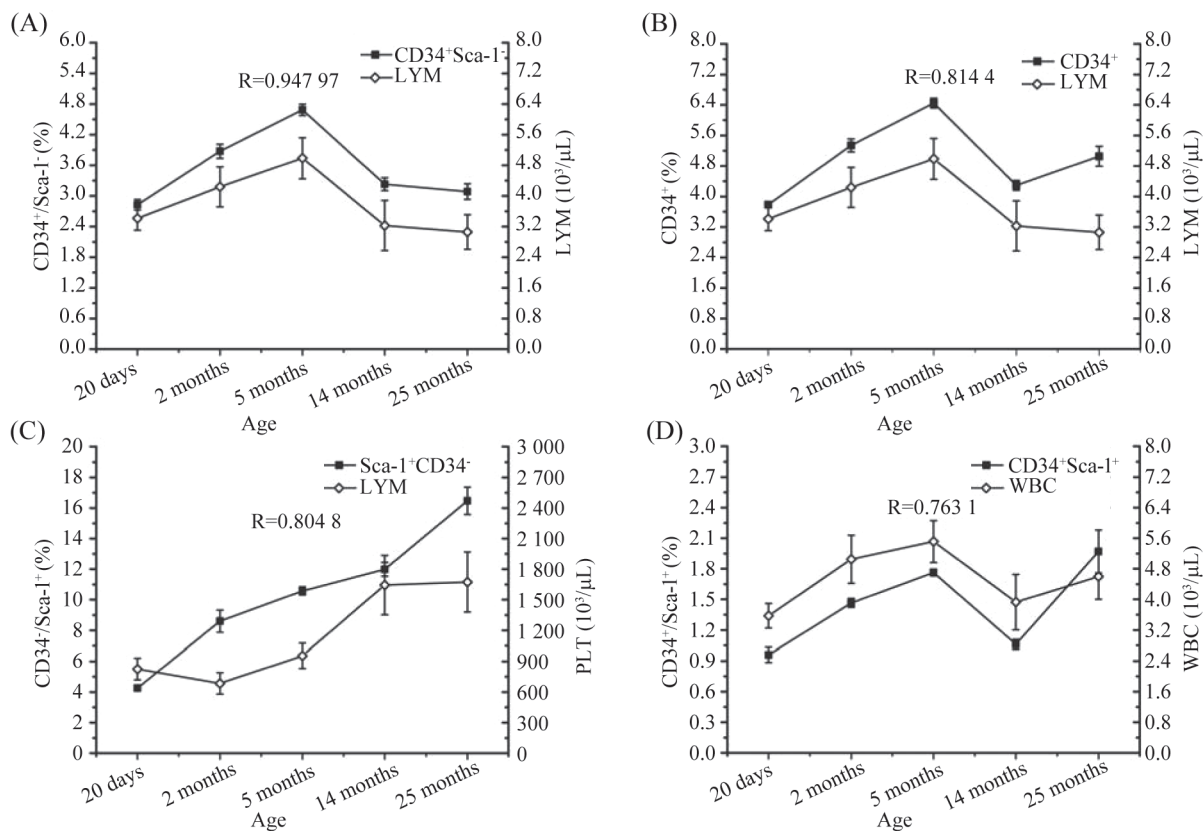
图3 不同年龄小鼠外周血各组分结果

Fig.3 The results of blood tests

是否在数量上具有某种相关性,我们对CD34/Sca-1两种骨髓造血干细胞标志物标出的骨髓细胞比例变化趋势与外周血组分变化趋势进行了相关性分析。

结果显示:外周血中淋巴细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞和CD34⁺骨髓细胞变化趋势相似,相关系数R分别为0.947 97和0.814 4,为极度

相关和高度相关(0.7~0.9为高度相关,0.9~1.0为极度相关,图4A和图4B);外周血中血小板密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞变化趋势相似,R=0.804 8,为高度相关(图4C);外周血中白细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞变化趋势相似,R=0.763 1,为高度相关(图4D)。



A: CD34⁺/Sca-1⁻骨髓细胞与外周血中淋巴细胞密度的相关性; B: CD34⁺骨髓细胞与外周血中淋巴细胞密度的相关性; C: CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞与外周血中血小板密度的相关性; D: CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞与外周血中白细胞密度的相关性。

A: the correlation of CD34⁺/Sca-1⁻ bone marrow cells and lymphocyte density in peripheral blood; B: the correlation of CD34⁺ bone marrow cells and lymphocyte density in peripheral blood; C: the correlation of CD34⁺/Sca-1⁺ bone marrow cells and blood platelet density in peripheral blood; D: the correlation of CD34⁺/Sca-1⁺ bone marrow cells and white blood cell density in peripheral blood.

图4 骨髓造血干细胞及其他骨髓细胞组分与外周血细胞组分的相关性分析

Fig.4 The relationship between bone marrow hematopoietic stem cells, other bone marrow cells and the cells of peripheral blood

3 讨论

造血干细胞能够分化出各种血细胞,包括红细胞、白细胞、血小板、各种淋巴细胞等。但是作为各种血细胞来源的造血干细胞和作为分化终端的外周血各组分细胞间的互动关系,目前仍不清楚。在本文中我们对不同年龄段小鼠的骨髓造血干细胞及其他骨髓细胞组分进行了分析,同时对相应各年龄段小鼠的外周血组分进行了对应分析。

目前,检测造血干细胞最常用的方法是通过其表面标志物,常用的造血干细胞表面标志物有CD34^{lo/-}、Sca-1⁺、Thy1.1^{+/lo}、CD38⁺、c-Kit⁺、lin⁻等^[9]。研究显示尽管这些表面标志物被广泛应用,但并不是所有的造血干细胞都表达这些标志物,同时人和小鼠的造血干细胞表面标志物也有很大不同,如在

人类中CD34⁺为造血干细胞的标记物^[10],而在小鼠中则认为胚胎期和幼儿期的小鼠骨髓造血干细胞是表达CD34的,但随着年龄的增长CD34的表达量逐渐降低,8周后骨髓造血干细胞主要集中在CD34⁺的骨髓细胞中^[7]。在本研究中我们选择CD34和Sca-1作为造血干细胞筛选标记物,将CD34⁺/Sca-1⁺的骨髓细胞称为骨髓造血干细胞。

在本文中我们对出生后20天、2月龄、5月龄、14月龄、25月龄五个年龄段的小鼠CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞及其他组分变化情况进行了分析,在时间点分布和时间跨度上较以前的研究更加广泛。骨髓中的CD34⁺/Sca-1⁺骨髓造血干细胞和Sca-1⁺骨髓细胞随小鼠年龄的增长不断增加(图2A和图2D),而CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞和CD34⁺骨髓细胞在20天、2

月龄、5月龄组中随年龄的增加显著升高,14月龄组较5月龄组显著下降,而25月龄组较14月龄组显著上升(图2B和图2C)。造血干细胞数量随年龄增加不断增多这一结果与其他文献报道的一致^[4,11]。

外周血组分分析结果显示不同的外周血组分随年龄增加呈现不同的变化趋势。在与红细胞相关的多个指标中,红细胞密度及血红蛋白浓度呈现先增加后降低的趋势,而外周血红细胞平均体积(图3F)、红细胞平均血红蛋白量(图3G)和红细胞平均血红蛋白浓度(图3H)随着小鼠年龄的增加均呈不断下降趋势,这些结果说明随着年龄的增加,尤其是在老年小鼠中,有发生贫血的倾向。这些结果与有关研究显示的衰老对成熟血细胞的组成和功能都有很大的影响相一致^[2]。

研究证实造血干细胞是一个异质性的群体,不同的造血干细胞亚群具有不同的分化倾向。2002年, Muller-Sieburg小组^[9,12]根据造血干细胞向淋系和髓系分化的比例将造血干细胞分为平衡性的造血干细胞、偏淋系的造血干细胞和偏髓系的造血干细胞三类。进一步的研究表明功能不同的造血干细胞克隆在很大程度上决定了之后的血细胞组分,利用干细胞表面标志物从幼年小鼠中分离出的不同功能亚系的造血干细胞,可以分化为不同的血细胞,如高表达Slamf1的骨髓干细胞倾向于向髓系细胞分化,低表达Slamf1的骨髓造血干细胞能够分化出各种比较平衡的血细胞^[8]。那么某种表面标志物阳性的造血干细胞是否具有分化成某种或某些外周血细胞组分的倾向。我们对CD34/Sca-1两种骨髓造血干细胞标志物标出的骨髓细胞比例变化趋势与外周血组分变化趋势之间的相关性进行了分析,结果得出外周血中淋巴细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁻骨髓细胞和CD34⁺骨髓细胞变化趋势分别为极度相关和高度相关(图4A和图4B);外周血中血小板密度整体趋势与CD34/Sca-1⁺骨髓造血干细胞变化趋势为高度相关(图4C);外周血中白细胞密度变化趋势与CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞变化趋势为高度相关(图4D)。那么,CD34⁺骨髓细胞是否具有向淋巴细胞分化的倾向,CD34/Sca-1⁺骨髓造血干细胞是否决定了外周血中血小板数量的多少,CD34⁺/Sca-1⁺骨髓细胞和外周血中白细胞之间有没有必然联系?我们仅从数量上证明了它们的相关性,这种相关性是巧合还是具有内在联系的必然性还有待进一步研究。

本文对出生后20天、2月龄、5月龄、14月龄、25月龄小鼠的骨髓造血干细胞及其他组分进行了多点、大跨度的分析,丰富了我们对骨髓造血干细胞与年龄关系的认识;同时对外周血组成的平行分析,增加了我们对骨髓造血干细胞和外周血组分互动关系的了解;最后我们对骨髓造血干细胞及其他组分与外周血组分的相关性进行了分析,这种相关性的意义还有待进一步研究。

致谢

感谢同济大学陈小平教授和研究生孙琳在细胞流式方面给予的帮助。感谢上海南方模式生物研究中心的研究生和相关工作人员在器材、试剂、动物实验等方面的帮助。

参考文献 (References)

- 1 Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003; 10(1): 9-16.
- 2 Berkahn L, Keating A. Hematopoiesis in the elderly. *Hematology* 2004; 9(3): 159-63.
- 3 Rothstein G. Disordered hematopoiesis and myelodysplasia in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2003; 51(3 Suppl): S22-6.
- 4 Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000; 192(9): 1273-80.
- 5 Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2005; 106(4): 1479-87.
- 6 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242-5.
- 7 Matsuoka S, Ebihara Y, Xu M, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H, *et al.* CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* 2001; 97(2): 419-25.
- 8 Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, *et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2007; 1(2): 218-29.
- 9 Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 2002; 100(4): 1302-9.
- 10 Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34-hematopoietic stem cells: Current concepts and controversies. *Stem Cells* 2003; 21(1): 15-20.
- 11 De Haan G, Van Zant G. Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood* 1999; 93(10): 3294-301.

- 12 Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlsson L, Huang JF, Sieburg HB. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood* 2004; 103(11): 4111-8.

Age-related Study on Mice Bone Marrow Stem Cell and Peripheral Blood Composition as well as Their Correlation

Zhao Kai¹, Yang Xingyu¹, Wan Yinghan², Sun Ruilin^{2*}, Fei Jian^{1,2}

(¹*School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;*

²*Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)*

Abstract Peripheral blood cells are known to be derived from a self renewing population of hematopoietic stem cells residing in the bone marrow, but the relation between hematopoietic stem cells and the cells of peripheral blood is rarely understood. We explore the changes of CD34⁺/Sca-1⁺ hematopoietic stem cell population in bone marrow and peripheral blood composition of C57BL/6J mouse during aging. The CD34⁺/Sca-1⁺ cell population in bone marrow is increasing during the aging. We also study on the tendency of different cell lineages in peripheral blood and compare the tendency with that of bone marrow cells. The tendency of blood platelet density in peripheral blood shows high correlation with the percentage current of CD34⁺/Sca-1⁺ bone marrow hematopoietic stem cells. The tendency of lymphocyte density in peripheral blood shows extreme correlation with the percentage current of CD34⁺/Sca-1⁻ bone marrow cells. The tendency of white blood cell density in peripheral blood shows high correlation with the percentage current of CD34⁺/Sca-1⁺ bone marrow cells.

Key words bone marrow hematopoietic stem cell; peripheral blood; correlation

Received: June 9, 2011 Accepted: August 29, 2011

This work was supported by Major Projects of the Ministry of Science and Technology (No.2010CB945501)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648, E-mail: rlsun@126.com