

G-CSF 动员大鼠外周血间质干细胞的初步实验研究

孙晓春* 蔡花 吴乐乐 许文荣 许化溪 陈巧林

(江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013)

摘要 用 G-CSF 为动员剂, 分离培养动员前后的大鼠骨髓和外周血来源的 MSCs。结果显示动员后外周血 CD44⁺ 细胞明显增加并与 G-CSF 呈剂量效应关系, 在未动员或 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF 动员的情况下, 外周血未能成功分离出 MSCs, 只在 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ G-CSF 动员的情况下从外周血中分离培养出典型的 MSCs 样集落。该细胞经流式细胞仪分析结果证实符合 MSCs 的表面标志特征。说明了在特定剂量的 G-CSF 的动员下, 大鼠外周血 MSCs 可以得到动员。

关键词 间质干细胞; 动员; 粒细胞集落刺激因子(G-CSF); 外周血

间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我更新、增殖和多向分化潜能的干细胞。大量文献研究表明间质干细胞具有多向分化潜能, 它在体内外都可以分化为骨细胞、软骨细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞以及神经元细胞等。MSCs 还具有免疫调节、体外增殖能力强, 以及无伦理学争议等诸多优点, 因此是很有应用前景的组织工程种子细胞^[1]。MSCs 还可以分泌多种造血细胞因子, 并且在造血重建中发挥重要作用^[2]。迄今为止, 已经有不少研究者在成人的骨髓、软骨、脂肪、真皮、甚至肿瘤组织中分离出 MSCs。但外周血中是否存在 MSCs, 则一直存在着争议^[3]。MSCs 可以归巢到炎症部位^[4,5], 所以移植 MSCs 对很多种疾病都具有治疗或辅助治疗价值。然而 MSCs 在体外培养扩增时需要比较长的时间周期, 因此, 我们设想是否可以通过动员剂来动员自身 MSCs 到外周血中。粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)是体内重要的调节因子, G-CSF 除可以动员造血干细胞外, 对其它的干细胞可能也存在一定的动员作用^[6]。本研究对 G-CSF 动员前后的大鼠外周血进行 MSCs 的分离培养与鉴定, 探讨 G-CSF 对大鼠外周血 MSCs 的动员效应。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂

2 月龄的 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体重 120~180g, 由江苏大学实验动物中心提供。L-DMEM 培养基(Gibco 公司)、G-CSF(吴中医药)、胎牛血清(Gibco 公司)、小鼠 IgG1(FITC)、小鼠 IgG2(PE)、CD29(FITC)、CD44(PE)、CD45(FITC)、CD90(FITC)

(BD 公司)、Ficoll 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 SD 大鼠分 4 组, ①对照组: 12 只大鼠连续 5d 每天间隔 24h 腹腔注射 0.9% NaCl 0.5ml; ②动员 I 组: 12 只大鼠每天用 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重剂量 G-CSF 行腹腔注射; ③动员 II 组: 12 只大鼠每天用 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重剂量 G-CSF 行腹腔注射; ④动员 III 组: 12 只大鼠每天用 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重剂量 G-CSF 行腹腔注射。

1.2.2 外周血和骨髓样本的采集培养 注射第 5 天间隔 6h 后, 将实验大鼠分别用 2% 的戊巴比妥腹腔注射麻醉, 心脏采血 2~3ml。肝素抗凝, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液(1.073 g/ml)分离外周血单个核细胞, 计数。用含 10% FBS 的 L-DMEM 营养液配成细胞悬液, 按 1×10^5 细胞/皿分别接种 3 只小培养皿(直径 3 cm)进行培养。然后将大鼠断颈处死, 采用无菌术分别取大鼠股骨, 剪去两端, 用 5ml 的注射器吸取 pH 7.2 PBS 反复冲洗骨髓腔, 收集骨髓冲洗液至离心管中, 离心洗涤 2 次后制成细胞悬液, 计数单个核细胞数量。同样以 1×10^5 细胞数量分别接种于 3 只培养皿。以上两种来源细胞分别置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中孵育。48h 后换液, 去除未贴壁细胞, 以后每 3d 换液一次, 注意观察贴壁细胞形态, 并计数每皿中所得的细胞集落数。

1.2.3 流式细胞分析

收稿日期: 2010-04-15 接受日期: 2010-08-19

国家自然科学基金(No.30471968)和江苏大学博士创新基金(No.1293000419)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0511-85038483, E-mail: sunxiaochun518@163.com

1.2.3.1 外周血单个核细胞表面标志分析 将上述分离后取得的部分单个核细胞,用 pH 7.2 PBS 洗涤,以 200 rpm/min 离心,分装到两个 EP 管中,每管大约 1×10^5 个细胞,加入羊抗大鼠的 CD44(PE), 4℃ 避光孵育 30 分钟,用 PBS 洗涤两次,再加入 500 μ l PBS 配成细胞悬液上机检测,每次都做同型对照。

1.2.3.2 外周血贴壁细胞表面标志分析 将所得成纤维样细胞集落细胞消化后,用 0.25% 的胰酶消化, pH 7.2 PBS 洗涤 2 次,然后进行流式分析细胞表面标志(按试剂操作说明完成)。

1.2.3.3 骨髓 MSCs 表面标志分析 将骨髓分离的第 3 代及以后 MSCs,用 0.25% 的胰酶消化,制成细胞悬液,然后进行流式分析细胞表面标志。

1.2.4 统计学方法 本研究用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 动员前后的大鼠外周血培养结果

各组培养出的纤维样细胞结果见表 1,其中动员 III 组与其它组别存在显著性差异($P < 0.05$)。外周血直接培养组以及正常对照组外周血全部未见有纤维样细胞贴壁(图 1A),动员 I 组和 II 组仅可以见到少许不典型纤维状细胞贴壁(图 1B),动员 III 组则大部分可以见到较典型纤维状细胞贴壁(图 1C)。

2.2 动员前后的骨髓培养结果

动员前后的骨髓都可以分离出典型的 MSCs(图 1D),不同组别的骨髓培养集落数统计分析见图 2。各组别间经统计分析都存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 外周血细胞流式分析

2.3.1 动员前后的外周血单个核细胞分析 对照组、动员 I 组与动员 II 组的外周血单个核细胞中的 CD44+ 细胞比例见图 3。经 SPSS 统计分析,除动员 I 组较对照组无显著差异外($P > 0.05$),其余各组间都存在显著性差异($P < 0.05$)。

2.3.2 外周血贴壁细胞流式分析 将动员 III 组所得的外周血培养的纤维状细胞进行流式分析(图 4)后

Table 1 The statistical table of typical fiber cell could be isolated from peripheral blood

Groups	n	The number of specimen which fiber cells could be isolated from PB
Control	12	0
Mobilized I	12	0
Mobilized II	12	1
Mobilized III	12	7*

*There are significant differences between mobilized III group and other groups ($P < 0.05$).

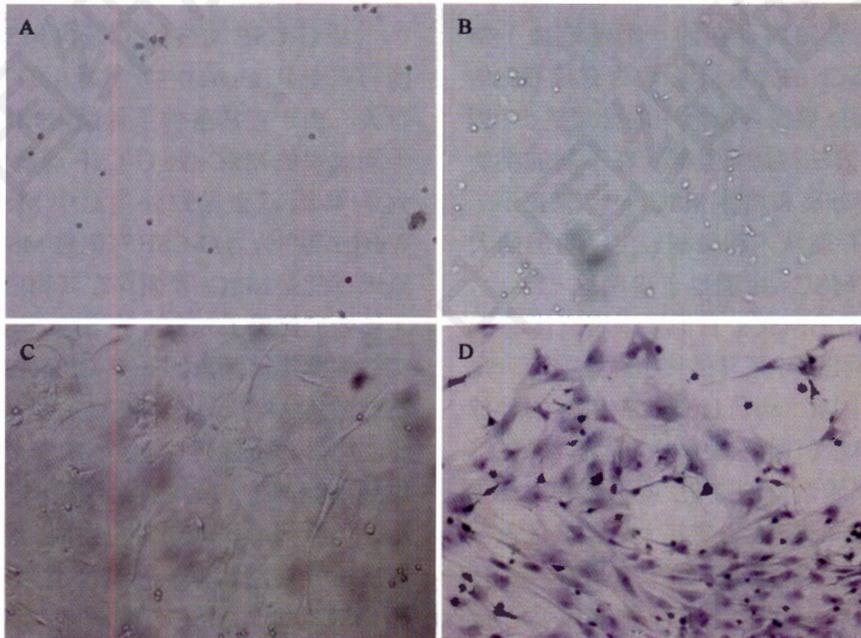


Fig. 1 The appearance of adherent cells from different groups

A: control group; B: mobilized I or II group; C: mobilized III group. The typical fiber cells could be observed; D: typical bone marrow MSCs.

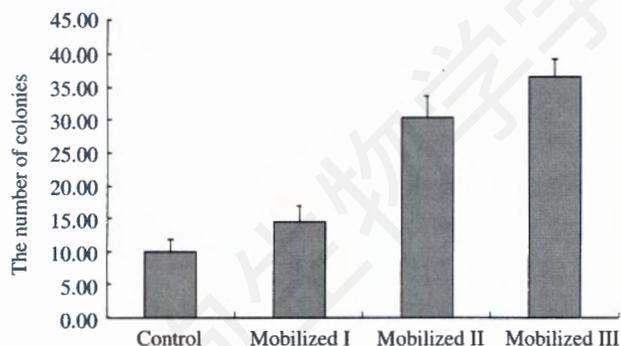


Fig. 2 The number of colonies from bone marrow

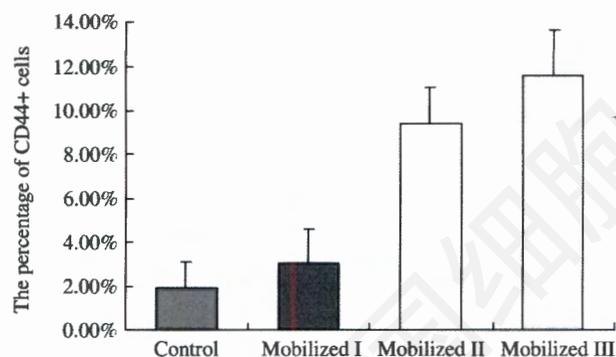


Fig. 3 The percentage of CD44+ cells in peripheral blood mononuclear cells

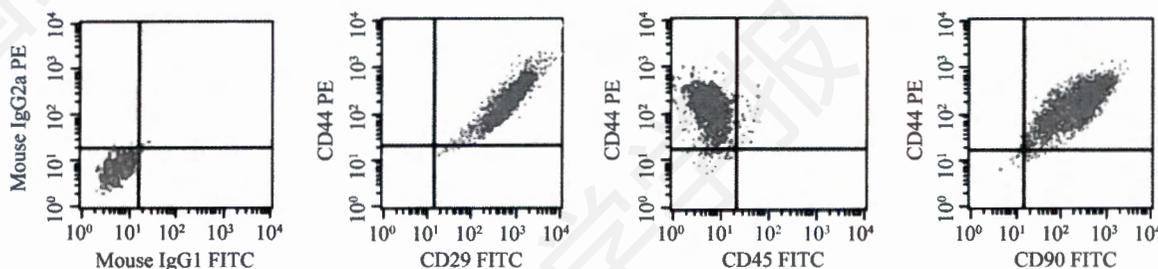


Fig. 4 Flow cytometry analysis with different markers

可知, CD45 阴性, 而 CD29、CD44、CD90 为阳性。骨髓所得的 MSCs 流式分析与此结果一致。

3 讨论

间质干细胞是骨髓内存在的一类非造血干细胞。体内骨髓中 MSCs 的含量很低, 约为有核细胞的 0.001%~0.01%^[7], 而外周循环血液中的含量更少, 因实验人员、环境、方法等因素影响, 在不同的实验条件下, 从外周血中分离和培养 MSCs 的结果也不一样。本研究结果没有能从未动员和轻度动员的的大鼠外周血中分离出 MSCs, 可能也正说明这一点。

要达到治疗剂量的 MSCs, 目前多采用离体培养, 这需要较长的时间周期, 并且异体移植还存在着一定程度的排异反应。因此, 动员自身的 MSCs 的释放是一种比较好的策略, 但循环血中由于存在的 MSCs 数量极少, 要达到细胞治疗的数量, 就必须利用外来的因素刺激动员骨髓的 MSCs, 使其大量释放进入循环血中。本文的实验结果证明在较大剂量的 G-CSF 动员下, 外周血单个核细胞中 CD44+ 细胞显著增加, 而 CD44+ 是 MSCs 的阳性标志之一, 随后的外周血培养结果也证实可以分离培养出 MSCs, 因此证实了

G-CSF 能有效动员外周血中的 MSCs, 骨髓 MSCs 集落形成试验也同样证明 MSCs 与 G-CSF 之间有一定的动员剂量依赖效应。我们的研究结果与文献结果基本一致^[8]。

经 G-CSF 动员后, 骨髓内 MSCs 的大量增加, 可能与在壁龛(niche)内处于静止的 MSCs 被激活增生有关。由于正常条件下骨髓内 MSCs 的量远远大于外周血中的 MSCs, 经 G-CSF 动员使骨髓 MSCs 释放到外周血, 就会导致外周血中 MSCs 量明显提高。Wexler 等^[9]认为 G-CSF 有促进 MSCs 增殖的作用, 其原因可能是 MSCs 表面存在其相应的受体, G-CSF 与之结合后促进了 MSCs 的增殖, 陈龙等^[10]则进一步证实粒细胞集落刺激因子 G-CSF 促进 MSCs 活性主要通过激活 AKT-mTOR-PKC 途径实现。另外, 文献^[11]还表明 G-CSF 除可以动员 MSCs 外, 还可以促进其聚集到炎症部位, 最终对组织损伤与炎症起到修复作用。但我们的实验同时也发现, 经 G-CSF 动员后外周血所分离的 MSCs, 经胰酶消化后传代数不如骨髓 MSCs, 因为 MSCs 在体外扩增也受一定代数的限制。是不是 G-CSF 动员导致 MSCs 快速分裂, 导致了终末期 MSCs 的形成, 从而使其分裂代数减少? 具

体原因与机制也还有待进一步研究。

由于应用G-CSF动员自身MSCs具有无创性,不需要应用免疫抑制剂,同时不需要MSCs的采集与体外扩增培养,也不涉及伦理问题等众多优点,动员后利用MSCs可以归巢到炎症和肿瘤部位的特性^[12],将为临床疾病的治疗提供一种新的思路。

参考文献(References)

- Motaln H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 2010; 116(11): 2519-30.
- Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytherapy* 2009; 11(5): 503-15.
- Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 2007; 38(4): S23-33.
- Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science* 2009; 324(5935): 1666-9.
- Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, *et al.* Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18(7): 846-58.
- Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005; 68(5): 1940-3.
- Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilized CFU-F can be found in the peripheral blood but have limited expansion potential. *Haematologica* 2008; 93(6): 908-12.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, *et al.* Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121(2): 368-74.
- 陈龙, 程范军, 刘岐焕, 唐俊明, 曾琴兵, 孔霞, 等. 粒细胞集落刺激因子促进骨髓源间充质干细胞活性的机制. *生理学报* 2009; 61(2): 169-74.
- Ripa RS, Haack-Sørensen M, Wang Y, Jørgensen E, Mortensen S, Bindslev L, *et al.* Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2007; 116(11): 124-30.
- Antoine EK, Ajeeta BD, Annie PV, Andrew S, Mary WB, George WB, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *nature* 2007; 449(7162): 557-65.

Study on the Mobilization of Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells from Rat by G-CSF

Xiao-Chun Sun*, Hua Cai, Le-Le Wu, Wen-Rong Xu, Hua-Xi Xu, Qiao-Lin Chen

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract To isolate and culture the mesenchymal stem cells (MSCs) of rat from peripheral blood and marrow, granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) was used. The percentage of CD44+ cells increased significantly higher after mobilization by G-CSF. MSCs were isolated and cultured unsuccessfully from peripheral blood control group and mobilized I group (mobilized by 20 μg/kg G-CSF). The typical colonies of MSCs were isolated after being mobilization by 50 μg/kg and 80 μg/kg G-CSF. Surface markers of obtained MSCs were accordance with MSCs from bone marrow by FACS assay. We confirmed that the peripheral blood MSCs from rat could be mobilized dependent on the dosage of G-CSF.

Key words mesenchymal stem cells; mboilization; granulocyte colony-stimulating factor; peripheral blood

Received: April 15, 2010 Accepted: August 19, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30471938) and the Doctor's Innovation Foundation of Jiangsu University(No.1293000419)

*Corresponding author. Tel: 86-511-85038483, E-mail: sunxiaochun518@163.com