

人主动脉-性腺-中肾区基质细胞诱导胚胎干细胞分化为造血干细胞及体内造血重建*☆

蔡耘^{1,2}, 张绪超^{2,3}, 陈惠芹^{1,2}, 黄绍良²

Differentiation of murine embryonic stem cells into hematopoietic stem cells induced by stromal cells in human aorta-gonad-mesonephros region and hematopoietic reconstitution *in vivo*

Cai Yun^{1,2}, Zhang Xu-chao^{2,3}, Chen Hui-qin^{1,2}, Huang Shao-liang²

Abstract

BACKGROUND: Up to now it has been confirmed that under proper conditions of hematopoietic growth factors, feeder layers of stromal cells from hematopoietic niches and their conditioned media, embryonic stem cells (ESCs) can be induced into hematopoietic stem cells (HSCs).

OBJECTIVE: To direct murine ESCs into HSCs *in vitro* by the support of human aorta-gonad-mesonephros (AGM) region stromal cells, and to compare the function of hematopoietic reconstitution *in vivo* by different routes of HSCs transplantation in mice.

METHODS: Firstly, E14 murine ESCs were induced into embryoid body (EB). Then the cells from EB were further co-cultured with human AGM region stromal cells in Transwell non-contact system for 6 days. The induced EB cells were collected for Sca-1⁺c-Kit⁺ cells analysis by flow cytometry, checked for teratoma formation and transplanted to BALB/C female mice conditioned with lethal dose ⁶⁰Co γ-ray irradiation. The recipient mice were divided into four groups at random, including intravenous injection group, bilateral tibia intra-bone marrow (IBM) injection group, irradiation control group and normal control group. The survival rates, reconstitution of hematopoietic and engraftment of donor cells of different groups were monitored.

RESULTS AND CONCLUSION: Sca-1⁺c-Kit⁺ cells in EB cells after co-cultured with human AGM region stromal cells accounted for (13.12±1.30)%. Teratoma could be detected in NOD-SCID mice after subcutaneous injection of EB cells co-cultured with human AGM region stromal cells, while there was no teratoma in the mice after IBM injection of that cells. The recipients in intravenous injection group all died. The survival rate was 55.6% in IBM group, in which the peripheral blood cell count was near to the normal at day 21 after transplantation and Sry gene copies from donor could be detected. It suggested that feeder cells from human AGM region can induce directed differentiation of murine ESCs into HSCs which can reconstruct hematopoiesis *in vivo* without teratoma by IBM administration.

¹Department of Pediatrics, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China;
²Center for Stem Cell Research, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China;
³Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Cai Yun☆, Doctor, Attending physician, Department of Pediatrics, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China; Center for Stem Cell Research, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
wcyf@163.com

Correspondence to: Zhang Xu-chao, Doctor, Associate investigator, Center for Stem Cell Research, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
zhuxuchao3000@yahoo.com.cn

Cai Y, Zhang XC, Chen HQ, Huang SL. Differentiation of murine embryonic stem cells into hematopoietic stem cells induced by stromal cells in human aorta-gonad-mesonephros region and hematopoietic reconstitution *in vivo*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6776-6780. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究证实多种造血生长因子、基质细胞饲养层及其条件培养液可促进胚胎干细胞向造血干细胞分化。

目的: 以人主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros,AGM)区基质细胞为饲养层体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为造血干细胞, 并比较不同移植途径对造血干细胞体内造血重建能力的影响。

方法: 将小鼠 E14 胚胎干细胞诱导为拟胚体, 采用 Transwell 非接触共培养体系在人 AGM 区基质细胞饲养层上诱导 6 d, 接种 NOD-SCID 小鼠检测体内致瘤性。再将诱导后的拟胚体细胞移植经致死量 ⁶⁰Co γ 射线辐照的 BALB/C 雌鼠, 受鼠随机分为静脉移植组、骨髓腔移植组、照射对照组及正常对照组。

结果与结论: 拟胚体细胞经人 AGM 区基质细胞诱导后 Sca-1⁺c-Kit⁺细胞占(13.12±1.30)%。NOD-SCID 小鼠皮下接种经人 AGM 区基质细胞诱导的拟胚体细胞可出现畸胎瘤, 经骨髓腔接种未见肿瘤形成。静脉移植组动物全部死亡, 骨髓腔移植组生存率为 55.6%, 移植后 21 d 外周血象基本恢复, 存活受鼠检测到供体来源 Sry 基因。提示小鼠胚胎干细胞经人 AGM 区基质细胞诱导分化的造血干细胞通过骨髓腔移植安全并具有一定的造血重建能力。

关键词: 主动脉-性腺-中肾区; 胚胎干细胞; 造血干细胞; 拟胚体; 造血重建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.029

蔡耘, 张绪超, 陈惠芹, 黄绍良. 人主动脉-性腺-中肾区基质细胞诱导小鼠胚胎干细胞分化为造血干细胞及体内造血重建[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6776-6780. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前研究表明单独或联合应用多种造血生长因子、基质细胞饲养层及其条件培养液均可促进胚胎干细胞向造血干细胞分化^[1]。主动脉旁胚胎壁(paraaortic splanchnopleura, P-Sp)/ 主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros,

AGM)区是脊椎动物胚胎确定造血的造血干细胞起源部位^[2], 其微环境为原始造血干细胞产生提供了必要的细胞、细胞外基质、分泌因子等起始条件。

实验室前期已制备人AGM区基质细胞系^[3], 课题组以含骨形态发生蛋白4 (bone morphogenesis protein, BMP4)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)

的半固体培养基首先诱导胚胎干细胞为富含造血起源细胞的拟胚体, 再将拟胚体细胞与人AGM区基质细胞饲养层共培养, 检测造血干细胞分化效率及致瘤性, 并经小鼠静脉或骨髓腔输注两种移植途径检测其体内造血重建能力。

1 材料和方法

设计: 细胞学观察, 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-01/2010-01在中山大学附属第二医院干细胞研究中心完成。

材料: 小鼠E14胚胎干细胞系^[4](建株自129/Ola雄鼠)由中山二院干细胞研究中心引进。人AGM区基质细胞株取自孕28~35 d经米非司酮及米索前列醇药物流产的人胚AGM组织^[3], 经患者和家属知情同意, 实验方案经医院伦理委员会批准。无特定病原体(SPF级)BALB/C雌鼠, 七八周龄, 体质量16~18 g; 6~8周龄NOD-SCID小鼠, 体质量18~20 g, 由中山大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2004-0011。动物置于无菌层流室洁净饲养柜中, 对其处置符合动物伦理学标准^[5]。

主要试剂:

试剂	来源
α-MEM、IMDM、I型胶原酶、β-巯基乙醇、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸	美国 Gibco 公司
小鼠 BMP-4、VEGF、干细胞因子(SCF)、FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(FLT-3L)	美国 PeproTech 公司
大鼠抗小鼠 FITC-Sca-1、PE-c-Kit	美国 eBiosciences 公司
小鼠造血集落培养基 MethoCult™ GF+ M4434	美国 Stem cell 公司
QIAampDNA 抽提试剂盒	德国 Qiagen 公司
Y 染色体检测试剂盒	上海生命技术公司

实验方法:

人AGM区基质细胞饲养层的制备^[6]: 按本室方法将人AGM区基质细胞接种至6孔板, 置于37℃、体积分数5%CO₂及饱和湿度培养箱中, 培养基为含体积分数20%FBS、5%马血清、10 μmol/L β-巯基乙醇、2mmol/L Glutamax-1、1 μmol/L Hydrocortisone的α-MEM。细胞生长融合达80%~90%时予10 mg/L丝裂霉素C处理2 h, PBS洗3次后加培养基过夜, 次日即可接种拟胚体细胞。

诱导小鼠E14胚胎干细胞向拟胚体分化: 按本室方法进行小鼠E14 胚胎干细胞传代培养^[7]。将脱离小鼠胚胎成纤维细胞饲养层二三代的胚

胎干细胞按 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种至35 mm细胞培养皿, 加入含10 g/L甲基纤维素、体积分数15%胎牛血清、0.1 mmol/L β-巯基乙醇、2 mmol/L L-谷氨酰胺、25 μg/L BMP4及10 μg/L VEGF的IMDM半固体培养基, 置于37℃、体积分数5%CO₂及饱和湿度培养箱中, 每两三天半量换液, 观察拟胚体形成情况。培养9 d用1 g/L胶原酶消化、收获细胞, 加入大鼠抗小鼠FITC-Sca-1、PE-c-Kit, 同型IgG为阴性对照, 流式细胞仪检测Sca-1+c-Kit+细胞含量。

拟胚体细胞在人AGM区基质细胞饲养层上诱导: 取上述培养9 d的拟胚体细胞以 4×10^5 /孔接种于Transwell 6孔板插入子中, 加入含体积分数15%胎牛血清、4 μg/L碱性成纤维细胞生长因子、10 μg/L 白细胞介素6、25 μg/L BMP4、20 μg/L FLT-3L及50 μg/L 干细胞因子的IMDM完全培养基, 与人AGM区基质细胞饲养层在37℃、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下共培养, 每两三天半量换液。培养6 d收获拟胚体细胞检测Sca-1⁺c-Kit⁺细胞含量。

诱导后拟胚体细胞体内致瘤实验: 取人AGM区基质细胞诱导6 d的拟胚体细胞, 分别经大腿内侧皮下或单侧胫骨骨髓腔注射各接种2只NOD-SCID小鼠, 骨髓腔注射法参考文献^[8]。皮下或骨髓腔注射浓度及剂量分别为 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 、0.5 mL和 $3.3 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 、30 μL。对照组用未分化胚胎干细胞, 饲养6周后观察畸胎瘤。

BALB/C小鼠移植实验: BALB/C雌鼠随机分为4组, 每组9只: ①静脉移植组。②双侧胫骨骨髓腔移植组(骨髓腔移植组)。③照射对照组。④正常对照组。前3组术前8 h予8.0 Gy [⁶⁰Co γ]射线全身一次性辐照, 剂量率0.5 Gy/min。静脉移植组和骨髓腔移植组每只受鼠移植经人AGM区基质细胞诱导后拟胚体细胞 1×10^6 , 静脉、骨髓腔注射浓度分别为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 、 $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。照射及正常对照组均予双侧骨髓腔注射IMDM共50 μL。观察移植后受鼠生存情况及移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)表现60 d, 绘制Kaplan-Meier生存函数曲线; 第7, 14, 21, 60天断尾法检测存活小鼠外周血白细胞、红细胞、血小板计数; 第60天制备各组存活受鼠下肢骨髓细胞悬液, 提取DNA, PCR扩增供体来源Y染色体性别决定基因Sry, 引物设计参考文献^[9], 反应产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳, Sybr Gold染色, 凝胶成像仪中成像分析。同期取骨髓单个核细胞 2×10^4 以1 mL甲

Correspondence to:
Huang Shao-liang,
Professor, Doctoral
supervisor, Center for
Stem Cell Research,
the Second Affiliated
Hospital, Sun Yat-sen
University,
Guangzhou 510120,
Guangdong Province,
China
hshl@gzsums.edu.cn

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China, No.
30300377*

Received: 2011-02-19
Accepted: 2011-04-12

¹ 中山大学附属第三医院儿科, 广东省广州市510630; ² 中山大学附属第二医院干细胞研究中心, 广东省广州市510120; ³ 广东省人民医院医学研究中心, 广东省广州市510080

蔡耘☆, 女, 1974年生, 广东省广州市人, 汉族, 2006年中山大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事儿科血液/肿瘤临床科研工作。
wcyf@163.com

通讯作者: 张绪超, 博士, 副研究员, 广东省人民医院医学研究中心, 广东省广州市510080
zhxuchao3000@yahoo.com.cn

并列通讯作者: 黄绍良, 教授, 博士生导师, 中山大学附属第二医院干细胞研究中心, 广东省广州市510120
hshl@gzsums.edu.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)36-06776-05

收稿日期: 2011-02-19
修回日期: 2011-04-12
(20110219004/W · W)

基纤维素半固体培养基接种于35 mm细胞培养皿, 在37 °C、体积分数5% CO₂及饱和湿度条件下培养并计数造血集落形成单位, 按文献[10]方法7 d计数粒单系集落形成单位, 14 d计数红系爆式集落形成单位、混合集落形成单位, 21 d计数高增殖潜能集落形成单位。

主要观察指标: ①人AGM区基质细胞诱导前后拟胚体细胞中Sca-1⁺c-Kit⁺细胞含量。②诱导后拟胚体细胞体内致瘤性。③各组BALB/C鼠移植后生存情况、外周血象、造血集落计数及供体植入证据。

统计学分析: 第一、二作者采用SPSS11.5软件进行配对样本 t 检验或多组间单因素方差分析及LSD- t 检验, 比较Kaplan-Meier生存函数曲线。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 拟胚体的发育形成 E14 胚胎干细胞在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上呈克隆性生长, 边界清晰, 保持良好的未分化状态, 见图1。将脱离饲养层细胞仍可形成克隆的胚胎干细胞接种于甲基纤维素半固体培养基中诱导分化, 两三天后细胞逐渐形成小拟胚体, 至5~8 d时拟胚体明显增多、变大, 光镜下结构为一群致密的细胞团, 见图2; 12~15 d时拟胚体形态仍较完整。

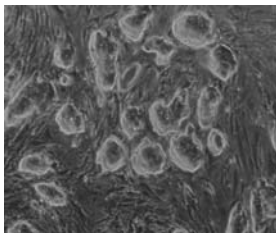


Figure 1 Colonies of E14 embryonic stem cells on feeder layers of murine embryonic fibroblasts ($\times 100$)
图1 E14 胚胎干细胞在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上的克隆性生长($\times 100$)

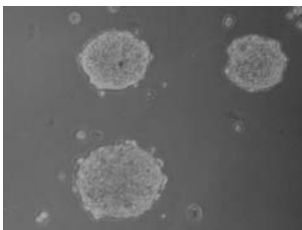
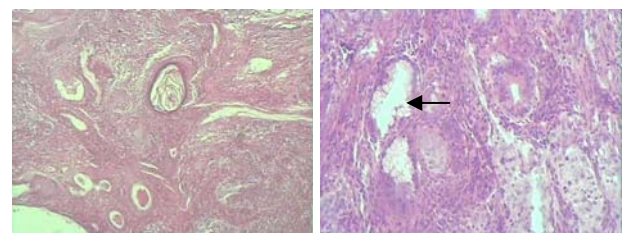


Figure 2 Morphology of embryoid body (EB) cultured in semisolid medium for 6 d ($\times 100$)
图2 半固体培养基中培养6 d的EB($\times 100$)

2.2 经人AGM区基质细胞诱导后拟胚体细胞中Sca-1⁺c-Kit⁺细胞检测结果 经流式细胞仪检测, 人AGM区基质细胞诱导前后拟胚体细胞中Sca-1⁺c-Kit⁺细胞含量分

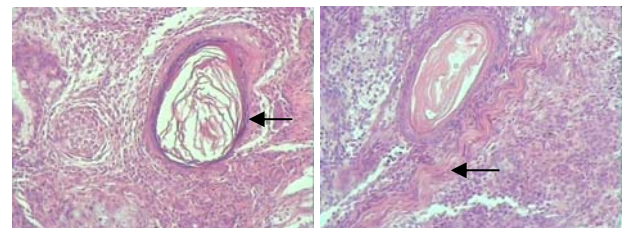
别为(5.42 $\pm$ 1.63)%、(13.12 $\pm$ 1.30)%, 诱导后阳性细胞比例明显增高($t = -52.175$, $P < 0.01$)。

2.3 经人AGM区基质细胞诱导后拟胚体细胞致瘤实验结果 NOD-SCID小鼠皮下接种未分化胚胎干细胞和经人AGM区基质细胞诱导的拟胚体细胞, 约2周可见局部皮肤隆起, 肿块进行性增大, 6周平均体积6.5 cm³, 病理学检查为畸胎瘤。经骨髓腔途径接种后, 未分化胚胎干细胞在注射侧胫骨内形成畸胎瘤, 镜下表现为骨骺端结构紊乱, 骨小梁断裂, 骨髓腔内可见上皮样、平滑肌、软骨等组织, 见图3。而接种人AGM区基质细胞诱导后拟胚体细胞者胫骨组织形态正常, 未见肿块形成, 见图4; 解剖接种部位及相邻区域组织结构正常, 探查全身未见肿瘤。



a: Teratoma in bone cavity of tibia ($\times 40$)

b: Mucous gland in teratoma (Arrow, $\times 100$)



c: Squamous epithelium in teratoma (Arrow, $\times 100$)

d: Smooth muscle tissue in teratoma (Arrow, $\times 100$)

Figure 3 Teratoma in tibia at 28 d after injection of E14 embryonic stem cells through bone marrow cavity (Hematoxylin-eosin staining)

图3 骨髓腔途径接种E14 胚胎干细胞 28 d时胫骨形成畸胎瘤(苏木精-伊红染色)

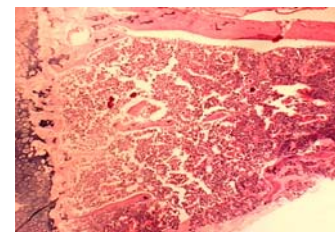


Figure 4 Morphology of the tibia at 28 d after injection of embryoid body cells induced by human stromal cells in aorta-gonad-mesonephros (AGM) region through bone marrow cavity (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图4 髓腔途径接种经人AGM区基质细胞诱导的EB细胞 28 d时胫骨的组织形态(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

2.4 移植后受鼠生存状况及GVHD 各移植组均未见

皮肤黏膜红肿、溃疡或腹泻等GVHD表现。60 d, 正常对照组全部存活; 照射对照组、静脉移植组2周内全部死亡, 中位生存时间分别为8, 12 d; 骨髓腔移植组存活率55.6%(5/9), 死亡时间为第12~15天, 各组生存函数曲线见图5。Log rank检验提示骨髓腔移植组生存率明显高于静脉移植组和照射对照组($Q_{PH}=31.64$, $P < 0.01$)。

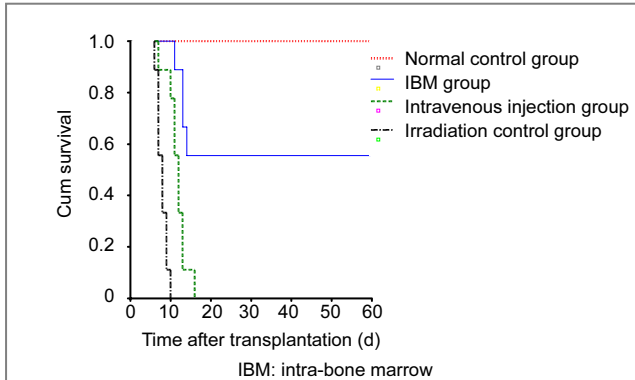


Figure 5 Survival function curve of recipient mice after transplantation ($n=9$)
图5 移植后各组小鼠生存函数曲线($n=9$)

2.5 移植后受鼠体内造血重建 照射对照组辐照后10 d内均死于造血衰竭; 静脉移植组在14 d时白细胞、红细胞有所恢复, 但仍在15 d内死亡; 骨髓腔移植组血象于移植后14 d逐步回升, 21 d已接近正常, 尤其是红细胞计数与正常值无明显差异, 第60天全面恢复。两个移植组比较, 14 d时骨髓腔移植组白细胞、血小板计数明显高于静脉移植组, 见表1。

表1 各实验组小鼠不同时点外周血细胞计数结果
Table 1 The results of peripheral blood cell count in experimental groups at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Peripheral blood	Intra-bone marrow	Intravenous	Irradiation control	Normal control
WBC ($\times 10^9/L$)				
7 d	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	0.20 $\pm$ 0.02 ^a	0.21 $\pm$ 0.03 ^a	4.86 $\pm$ 0.52
14 d	2.46 $\pm$ 0.22 ^{ab}	1.04 $\pm$ 0.08 ^a	/	/
21 d	3.66 $\pm$ 0.22 ^a	/	/	/
60 d	4.91 $\pm$ 0.46	/	/	/
PLT ($\times 10^9/L$)				
7 d	33 $\pm$ 4 ^a	36 $\pm$ 2 ^a	32 $\pm$ 3 ^a	261 $\pm$ 45
14 d	48 $\pm$ 5 ^{ab}	35 $\pm$ 2 ^a	/	/
21 d	184 $\pm$ 15 ^a	/	/	/
60 d	228 $\pm$ 31	/	/	/
RBC ($\times 10^{12}/L$)				
7 d	3.23 $\pm$ 0.41 ^a	3.03 $\pm$ 0.11 ^a	2.01 $\pm$ 0.10 ^a	7.82 $\pm$ 1.02
14 d	5.80 $\pm$ 0.66 ^a	5.35 $\pm$ 0.83 ^a	/	/
21 d	6.18 $\pm$ 0.66	/	/	/
60 d	6.98 $\pm$ 0.77	/	/	/

^a $P < 0.05$, vs. normal group; ^b $P < 0.05$, vs. intravenous group at the same time points

移植后60 d骨髓腔移植组存活小鼠骨髓单个核细胞可形成各造血集落, 粒单系集落形成单位、红系爆式集落形成单位、混合集落形成单位、高增殖潜能集落形

成单位计数分别为192 $\pm$ 13, 25 $\pm$ 4, 15 $\pm$ 1和9 $\pm$ 2, 均达正常水平。

2.6 供体植入证据检测结果 移植后60 d, 骨髓腔移植组5只受鼠均检测到Y染色体Sry基因, 见图6。

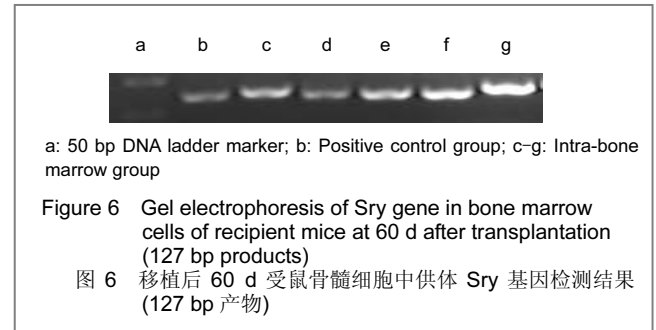


Figure 6 Gel electrophoresis of Sry gene in bone marrow cells of recipient mice at 60 d after transplantation (127 bp products)

图6 移植后60 d受鼠骨髓细胞中供体Sry基因检测结果(127 bp产物)

3 讨论

造血发生发育过程中各造血位点微环境对造血发生与分阶段完善存在重要的“时空”调控作用^[11]。在体外诱导模型中, 充分模拟胚胎造血微环境可提高胚胎干细胞向造血干细胞分化的效率和造血功能^[12-13]。哺乳动物长期重建造血的造血干细胞最早衍生区域为AGM区背主动脉腹侧壁^[14], 在人胚出现时间为孕30~37 d, 小鼠则是孕9.5~11.5 d。Taylor等^[15]发现11 d鼠胚AGM区组织可在体外扩增永久造血干细胞, Tavian等^[16]发现人孕30~37 d胚胎AGM区已存在大约含800个细胞的CD34⁺造血细胞簇。研究AGM区微环境对胚胎干细胞向造血干细胞分化的调控作用有助于体外控制胚胎干细胞分化时相, 提高造血干细胞分化比例, 得到更多处于分化早期、可重建造血的造血干细胞。

实验采用Transwell体系, 经人AGM区基质细胞诱导后拟胚体细胞中代表原始造血干细胞的Sca-1⁺c-Kit⁺细胞明显增高^[17-18], 提示人AGM区基质细胞体外非直接接触培养可在一定程度上诱导拟胚体细胞分化为造血干细胞。Gordon-Keylock等^[19]研究发现来源于小鼠AGM区主动脉及周围间充质的基质细胞可促进中胚层细胞分化为造血祖细胞。Buckley等^[20]将小鼠Lin⁻骨髓细胞分别与AGM区、胎肝基质细胞在Transwell体系中共培养, 发现AGM区基质细胞Wnt5a表达明显高于胎肝基质细胞, 可维持竞争性重建造血造血干细胞活性3周, 而胎肝基质细胞无以上作用。若将25% AGM区与75%胎肝基质细胞作为混合饲养层, 或将Wnt5a加入单纯胎肝基质细胞饲养层中均可维持造血干细胞活性, 提示AGM区基质细胞可通过分泌可溶性因子如Wnt5a发挥其特定生物学作用。

实验发现人AGM区基质细胞诱导后的拟胚体细胞经皮下接种仍有致瘤性, 可能是胚胎干细胞残留或分化异常的拟胚体细胞所致。预实验时将拟胚体细胞直接接

种于AGM区基质细胞饲养层上共培养,发现单个拟胚体细胞呈贴壁生长并可再次形成胚胎干细胞克隆,提示AGM区在一定条件下具有维持细胞原始不分化的作用。而经骨髓腔途径接种诱导后拟胚体细胞未见畸胎瘤形成,本课题组尚发现经人AGM区和骨髓基质细胞依次诱导后的拟胚体来源细胞皮下接种NOD-SCID小鼠亦无致瘤性(待发表资料),原因未明,可能与骨髓微环境对该细胞的进一步诱导造血分化作用有关。

实验中静脉移植组动物全部死亡,骨髓腔移植组超过半数生存,血象恢复,可检测到供体来源Sry基因,提示小鼠胚胎干细胞经人AGM区基质细胞诱导分化的造血干细胞通过骨髓腔途径移植安全,具有一定造血重建能力,但植入水平需进一步检测。胚胎干细胞源性造血干细胞体内造血重建能力、受体生存率与诱导条件、预处理方法、移植细胞分选、移植途径等密切相关。Fu等^[21]采用BALB/C鼠AGM区基质细胞与小鼠D3 胚胎干细胞来源拟胚体细胞共培养7 d, CD34⁺、CD34⁺Sca-1⁺细胞分别达到(39.71±1.76)%、(21.64±1.78)%,免疫磁珠分选CD34⁺细胞后, IV移植经环磷酸胺预处理的BALB/C雄鼠,生存率为62.5%,存活受鼠获得造血重建。Burt等^[22]以SCF、白细胞介素3、白细胞介素6等细胞因子诱导拟胚体细胞7~10 d,可产生7% c-Kit⁺细胞和5% CD45⁺细胞,受鼠IV输注未分选的诱导后拟胚体细胞全部死亡,而经骨髓腔注射者长期存活率为2%~12%,约30%(2/7)出现畸胎瘤。Verda等^[23]以上述细胞因子诱导小鼠R1 胚胎干细胞 9~11 d,分选c-Kit⁺细胞,经骨髓腔或静脉移植亚致死量辐照的NOD/LtJ鼠,存活率分别为90%和60%,移植后24周流式细胞仪检测受鼠CD45⁺细胞中供体比例分别为(9.1±6.7)%、(3.6±2.7)%($P < 0.05$),作者认为骨髓腔途径供体植入率较高,可能因为体外培养的胚胎干细胞源性造血干细胞选择素和/或整合素表达受损而经IV移植时影响骨髓归巢,或骨髓微环境可诱导该造血干细胞向造血细胞或造血支持细胞分化,其机制待深入研究。

4 参考文献

- [1] Lee KY, Fong BS, Tsang KS, et al. stromal niches enhance human embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation and globin switch. *Stem Cells Dev.*2011;20(1):31-38.
- [2] Tavian M, Biasch K, Sinka L, et al. Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol.*2010;54(6-7):1061-1065.
- [3] Chen HQ, Zhang XC, Huang SL, et al. Zhongshan Daxue Xuebao: Yixue Kexueban. 2005;26(1):20-23.
陈惠芹,张绪超,黄绍良,等.人AGM区基质细胞系的建立及其生物学特性[J].中山大学学报:医学科学版,2005,26(1):20-23.
- [4] Taylor T, Kim YJ, Ou X, et al. Toll-like receptor 2 mediates proliferation, survival, NF-kappaB translocation, and cytokine mRNA expression in LIF-maintained mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.*2010; 19(9):1333-1341.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

- [6] Chen HQ, Zhang XC, Huang SL, et al. *Zhonghua Xueyexue Zazhi.* 2006;27(6):390-393.
陈惠芹, 张绪超,黄绍良等.人胚胎AGM区基质细胞在体外培养中对脐血CD34⁺细胞的支持作用. *中华血液学杂志*,2006,27(6): 390-393.
- [7] Zhang XC, Chen HQ, Huang SL, et al. *Zhongguo Bingli Shengli Zazhi.*2007;23(9):1747-1751.
张绪超, 陈惠芹, 黄绍良,等. 含人AGM区基质细胞培养体系定向诱导胚胎干细胞为造血干细胞的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*,2007, 23(9):1747-1751.
- [8] Cai Y, Huang SL, Huang K, et al. *Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi.*2007;15(5):998-1004.
蔡耘,黄绍良,黄科,等.不同途径输注造血干细胞对小鼠移植效果的比较[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007,15(5):998-1004.
- [9] Pomp D, Good BA, Geisert RD, et al. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci.* 1995;73(5):1408-1415.
- [10] Zheng DX, Wu KF, Chu JX. Beijing: Peking Medical University and Peking Union Medical College Press. 1999:36-59.
郑德先, 吴克复, 褚建新. 现代实验血液学研究方法与技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999:36-59.
- [11] Zhou K, Huang L, Zhou Z, et al. Wnt and Notch signaling pathways selectively regulating hematopoiesis. *Ann Hematol.* 2010;89(8):749-757.
- [12] Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell.*2008;3(1):85-98.
- [13] Orlovskaya I, Schraufstatter I, Loring J, et al. Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. *Methods.*2008;45(2): 159-167.
- [14] Peeters M, Ottersbach K, Bollerot K, et al. Ventral embryonic tissues and Hedgehog proteins induce early AGM hematopoietic stem cell development. *Development.*2009;136(15):2613-2621.
- [15] Taylor E, Taoudi S, Medvinsky A. Hematopoietic stem cell activity in the aorta-gonad-mesonephros region enhances after mid-day 11 of mouse development. *Int J Dev Biol.*2010;54(6-7):1055-1060.
- [16] Tavian M, Coulombel L, Luton D, et al. Aorta-associated CD34⁺ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood.*1996;87(1): 67-72.
- [17] Ciriza J, Garcia-Ojeda ME. Expression of migration-related genes is progressively upregulated in murine Lineage-Sca-1+c-Kit⁺ population from the fetal to adult stages of development. *Stem Cell Res Ther.*2010;1(2):14.
- [18] Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, et al. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood.*2009;114(20):4393-4401.
- [19] Gordon-Keylock SA, Jackson M, Huang C, et al. Induction of hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells by an AGM-derived stromal cell line is not further enhanced by overexpression of HOXB4. *Stem Cells Dev.*2010;19(11): 1687-1698.
- [20] Buckley SM, Ulloa-Montoya F, Abts D. Maintenance of HSCs by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line. *Exp Hematol.* 2011;39(1):114-123.
- [21] Fu JR, Liu WL, Zhou YF, et al. Expansive effects of aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cells on hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *Chin Med J (Engl).*2005; 118(23):1979-1986.
- [22] Burt RK, Verda L, Kim DA, Oyama Y, Luo K, Link C. Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med.*2004; 199(7): 895-904.
- [23] Verda L, Kim DA, Ikehara S. Hematopoietic mixed chimerism derived from allogeneic embryonic stem cells prevents autoimmune diabetes mellitus in NOD mice. *Stem Cells.*2008; 26(2): 381-386.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30300377)。

作者贡献: 第一、二作者参与各过程,其他作者参与实验实施。均经过系统培训,未采用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。