

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.45.012

[http://www.crter.org]

王振玲, 王金焕, 郭青, 赵智刚. 多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞冻存前后的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(45):7898-7903.

多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞冻存前后的生物学特性***◆

王振玲, 王金焕, 郭青, 赵智刚(天津医科大学肿瘤医院血液肿瘤科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市 300060)

文章亮点:

1 既往实验证实造血干细胞可以在液氮中长期冻存, 复苏后仍然具有良好的造血重建能力。但是, 患者自体间充质干细胞经过低温冻存和复苏, 其增殖能力、支持造血和免疫调节功能是否会受影响尚不清楚。

2 实验中, 作者发现多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞经过短期(1个月)和长期(12个月)冻存后的形态及生长方式与冻存前间充质干细胞相同; 短、长期冻存后间充质干细胞仍可以在体外长期传代培养, 通过体外扩增的办法获取需要的细胞数量, 用于联合造血干细胞移植。

3 结果表明冻存后的间充质干细胞仍可以发挥免疫调节功能, 可以减轻移植相关的排斥反应; 冻存前、后间充质干细胞均可以促进粒细胞-巨噬细胞集落形成单位、红系集落形成单位和混合集落形成单位的增殖, 而且间充质干细胞对定向祖细胞以及不同阶段造血祖细胞的增殖和分化能力在冻存前、后没有明显差别。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 多发性骨髓瘤; 间充质干细胞; 冻存; 生物学特性; 支持造血; 粒细胞-巨噬细胞集落形成单位; 红系集落形成单位; 混合集落形成单位; 国家自然科学基金

主题词:

干细胞; 多发性骨髓瘤; 间充质干细胞; 低温保存; 冷冻

基金资助:

国家自然科学基金项目(30801051, 81172833)**

摘要

背景: 多发性骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞具有多向分化、免疫调节和支持造血作用, 但是这些功能是否受冻存的影响目前尚不清楚。

目的: 探讨冻存对多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞生物学特性的影响。

方法: 采用细胞贴壁法获取多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞, 将传代后的细胞用 IMDM 细胞冻存液(含10%的二甲基亚砷和体积分数40%的胎牛血清)保存在-196℃液氮中。检测短期(1个月)和长期(12个月)冻存复苏后间充质干细胞的活性和增殖能力; 将冻存后多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞作为滋养层, 应用甲基纤维素半固体培养, 检测其支持造血的能力; 混合淋巴细胞反应检测冻存后多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞调控免疫能力。

结果与结论: 经过短、长期冻存后多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的细胞活性分别为(92.9±7.5)%和(86.7±9.2)%; 短、长期冻存后细胞的增殖能力与冻存前间充质干细胞相似; 冻存后多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞仍具有支持造血祖细胞生长的作用和抑制T淋巴细胞增殖的能力, 与冻存前相比, 没有明显差别。说明冻存可以降低多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的细胞活性, 但是并不影响间充质干细胞的增殖、支持造血和免疫调节的能力。

Biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients before and after cryopreservation

Wang Zhen-ling, Wang Jin-huan, Guo Qing, Zhao Zhi-gang (Department of Hematology and Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients are characterized by pluripotential differentiation, immunoregulation and supporting hematopoiesis, but whether these features are affected after cryopreservation is unclear.

OBJECTIVE: To study the biological characteristics of cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cell derived from multiple myeloma patients.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients were cryopreserved in -196℃ liquid nitrogen for 1 month (short term) and 12 months (long term) with Iscove's modified Dulbecco's medium containing 10% dimethyl sulfoxide and 40% fetal bovine serum as cryoprotectant. The viability and proliferation ability of thawed bone marrow mesenchymal stem cells were investigated. Hematopoiesis support of thawed bone marrow

王振玲★, 女, 1988年生, 山东省临沂市人, 汉族, 天津医科大学在读硕士, 主要从事干细胞生物学研究。

wzl0539tc@163.com

通讯作者: 赵智刚, 博士, 副主任医师, 天津医科大学肿瘤医院血液肿瘤科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市 300060
zhao58@jupui.edu

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)45-07898-06

修回日期: 2013-08-12

(201303047W · W)

Wang Zhen-ling★, Studying for master's degree, Department of Hematology and Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China
wzl0539tc@163.com

Corresponding author: Zhao Zhi-gang, M.D., Associate chief physician, Department of Hematology and Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China
zhao58@jupui.edu

Accepted: 2013-08-12

mesenchymal stem cells *in vitro* was detected by long-term bone marrow culture and the methylcellulose progenitor assay. The immunoregulatory ability of thawed mesenchymal stem cells was detected by mixed lymphocyte culture assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The cell viability was $(92.9 \pm 7.5)\%$ and $(86.7 \pm 9.2)\%$ for mesenchymal stem cells cryopreserved as long as 1 month or 12 months, respectively. Furthermore, thawed bone marrow mesenchymal stem cells possessed the ability of supporting colony forming and could significantly suppress proliferation of T lymphocytes. At last, there were no changes detected as compared with pre-cryopreserved mesenchymal stem cells in the abilities of proliferation, hematopoiesis support and immunoregulation. Cryopreservation can decrease the cell viability of bone marrow mesenchymal stem cells derived from the patients with multiple myeloma, but cannot affect the abilities of proliferation, hematopoiesis support and immunoregulation.

Subject headings: stem cells; multiple myeloma; mesenchymal stem cells; cryopreservation; freezing

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30801051*, 81172833*

Wang ZL, Wang JH, Guo Q, Zhao ZG. Biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients before and after cryopreservation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(45):7898-7903.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一类具有多向分化潜能和自我更新能力的细胞群体。既往研究证实间充质干细胞在体内外均有支持造血的作用,同时具有免疫抑制和诱导免疫耐受的作用,因此具有广阔的临床应用潜能^[1-3]。既往研究发现多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者骨髓间充质干细胞同样具有表达造血相关因子、体外支持造血和免疫调控的功能,因此是一种可应用于临床治疗的理想种子细胞。冻存是细胞长期保存最主要的方法,利用冻存技术将细胞置于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中低温保存,可以使细胞暂时脱离生长状态而将细胞特性保存起来,在需要的时候再复苏细胞并进行培养使用^[4-6]。但是冻存是否影响多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的生物学特性,目前尚不清楚。

实验获取多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞并冻存于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中,研究短期(1个月)和长期(12个月)冻存后间充质干细胞的增殖能力、支持造血和免疫调节功能,为其在临床中的应用提供初步实验数据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于2011年4至11月在天津医科大学附属肿瘤医院实验室完成。

材料:

多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞冻存前后的生物学特性观察实验所需主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
IMDM 培养基、DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清、鼠抗人 CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD105 和 HLA-DR 抗体	美国 Hy-clone 公司
重组人干细胞生长因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、白细胞介素 3	美国 PharMingen 公司 美国 Peprotech 公司

骨髓标本: 骨髓取自 16 例多发性骨髓瘤患者(41-69 岁;平均 58 岁),均为本院门诊与住院病例,所有患者在获取骨髓标本时均未接受任何治疗并获取患者知情同意。多发性骨髓瘤的诊断标准参见张之南编写的血液病诊断及疗效标准(第三版)^[7]。

实验方法:

骨髓间充质干细胞的分离和培养: 经多发性骨髓瘤患者的髂后上棘穿刺抽取骨髓,用相对密度为 1.077 的淋巴细胞分离液 $400 \times g$ 离心 20 min,获取全部单个核细胞,计数后接种于含 40%MCDB、体积分数 2%胎牛血清的 DF12 培养液中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱内,24 h 后更换新鲜培养基,去除未贴壁细胞。当细胞达到 80%融合时,应用胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化后按照 1:3 的比例传代。

骨髓间充质干细胞的冻存和复苏: 将 1×10^6 个细胞加入 IMDM 细胞冻存液[含 10%的二甲基亚砷和体积分数 40%的胎牛血清]中,总体积 1.8 mL。先置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱半小时,然后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱半小时后转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱过夜,第 2 天转入 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中冻存。复苏时将冻存的间充质干细胞置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中快速复温,冻融后加入 8 mL IMDM 混匀后离心,然后再用 IMDM 洗涤 1 次,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%的 CO_2 培养箱中培养。第 2 天更换新鲜培养基。

细胞活性和增殖能力: 应用锥虫蓝拒染回收率(TBR)试验检测复苏细胞的活性。将冻存前、后的间充质干细胞接种在 24 孔板中(5×10^3 个细胞/孔),置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中,每隔 1 d 取 2 孔细胞进行计数,计算均值,绘制生长曲线。

$$\text{TBR}(\%) = \frac{\text{冻存后活细胞计数} + \text{冻存前活细胞计数} \times \text{锥虫蓝拒染率}}{\text{锥虫蓝拒染率}} \times 100\%$$

细胞造血因子的检测: 应用人转化生长因子 $\beta 1$, 干细胞生长因子,白细胞介素 6 和白细胞介素 12 ELISA 检测试剂盒,按照试剂盒说明书检测未冻存、短期冻存和长期冻存复苏后的间充质干细胞上述细胞因子的水平。

混合淋巴细胞反应: 将骨髓间充质干细胞用 ^{60}Co γ 射线照射 30 Gy 以去除增殖能力。应用 CD3^+ 磁珠分选健康志愿者外周血单个核细胞, 以获取 CD3^+ T 淋巴细胞, 将 CD3^+ T 淋巴细胞接种在 96 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞。每孔中分别加入 0.5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^4 和 5×10^4 个间充质干细胞; 用单纯的 CD3^+ T 淋巴细胞作为空白对照组。加入 2 mg/L 的植物血凝素(PHA)以刺激 T 淋巴细胞增殖, 每组设 6 个复孔。调整培养液到 200 μL , 在 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养 5 d, 结束培养前 18 h 掺入 3.7×10^4 Bq 氚-胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR), 收获细胞, β 液闪烁仪记录计数每孔的放射值, 即每分钟闪烁次数。

支持造血的能力: 将骨髓间充质干细胞经 ^{60}Co γ 射线 10.0 Gy 照射, 然后接种于长期 IMDM 培养基(含体积分数 12.5% 胎牛血清、体积分数 12.5% 马血清、2 mmol/L 谷氨酰胺以及 1×10^{-6} mol/L 氢化考的松)中。获取健康成人骨髓单个核细胞, 预先培养 4 h, 以去除贴壁细胞, 将悬浮细胞按照 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种在照射后的间充质干细胞中, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 中培养, 每周半量换液。4 周后获取全部细胞接种于甲基纤维素体系中, 测定其集落形成能力。IMDM 培养体系为: 含体积分数 30% 马血清、1 g/L 牛血清白蛋白(BSA)、2 mmol/L 谷氨酰胺、 1×10^{-4} mol/L $\beta 2$ 巯基乙醇、10 g/L 甲基纤维素和重组细胞因子。细胞因子包括: 50 $\mu\text{g/L}$ 的重组干细胞因子、10 $\mu\text{g/L}$ 的白细胞介素 3、50 $\mu\text{g/L}$ 的粒-巨噬细胞集落刺激因子和 4 U/mL 的促红细胞生成素。集落形成试验在 24 孔培养板中进行, 每孔接种 1×10^6 个细胞, 在 37 $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内培养 14 d。14 d 后在倒置显微镜下计数集落数, 50 个以上细胞为 1 个集落。

主要观察指标: ①细胞形态学及生长特点变化。②细胞的活性率及增殖能力。③ELISA 法检测转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 12, 干细胞生长因子的分泌水平。④混合淋巴细胞反应检测免疫调控能力。⑤集落生成单位数目检测支持造血能力。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较应用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

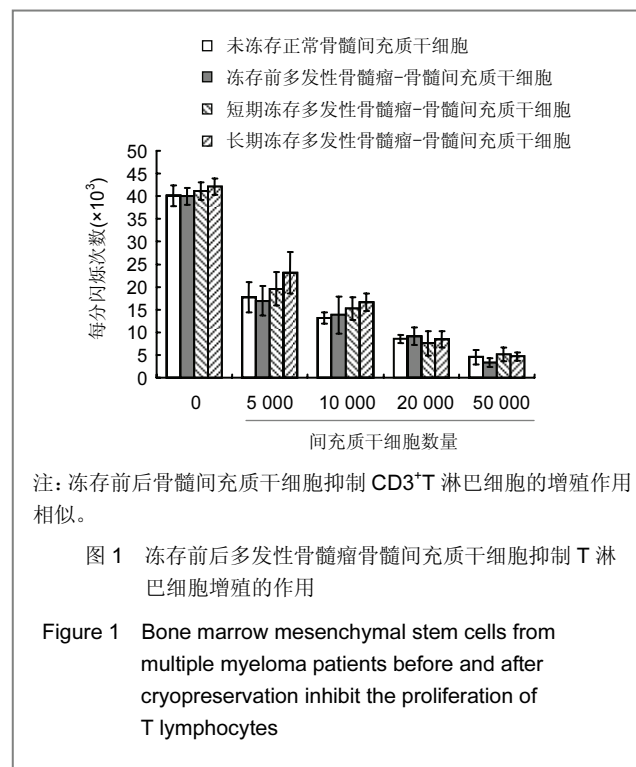
2 结果 Results

2.1 冻存后骨髓间充质干细胞的形态和生长特点 冻存前后多发性骨髓瘤患者骨髓具有相似的形态。倒置显微镜下多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞胞浆丰富, 核染色质细, 核仁明显, 平行排列或“漩涡”样生长。根据细胞生长曲线, 间充质干细胞的倍增时间为 (47.6 ± 5.7) h。细胞形态和倍增时间随着细胞传代并不发生改变。

2.2 冻存后间充质干细胞的活性率和增殖能力 冻存

可以减弱多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的活性, 并且与冻存时间有一定关系。短期冻存间充质干细胞的锥虫蓝拒染回收率为 $(92.9 \pm 7.5)\%$; 长期冻存间充质干细胞的锥虫蓝拒染回收率为 $(86.7 \pm 9.2)\%$, 二者相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。但是, 冻存后间充质干细胞的增殖能力与冻存前比较, 没有明显差异。依据生长曲线可以得出短期和长期冻存后骨髓间充质干细胞的倍增时间分别为 (51.8 ± 4.8) h 和 (49.6 ± 3.6) h。

2.3 冻存后间充质干细胞抑制 T 淋巴细胞的增殖作用 冻存后的多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞同样具有抑制 T 淋巴细胞增殖的作用, 这种抑制作用随着间充质干细胞细胞数量的增加而增强。在间充质干细胞数量分别为 0.5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^4 和 5×10^4 个时, 相应的 T 淋巴细胞 ^3H -TdR 掺入的每分钟闪烁次数平均值分别为: 短期冻存后 $(2.0 \pm 0.4) \times 10^4$, $(1.5 \pm 0.3) \times 10^4$, $(0.8 \pm 0.3) \times 10^4$ 和 $(0.5 \pm 0.2) \times 10^4$; 长期冻存后 $(2.3 \pm 0.5) \times 10^4$, $(1.7 \pm 0.2) \times 10^4$, $(0.8 \pm 0.2) \times 10^4$ 和 $(0.5 \pm 0.1) \times 10^4$ 。而未加入间充质干细胞的 CD3^+ T 淋巴细胞每分钟闪烁次数平均值为 $(4.0 \pm 0.7) \times 10^4$ 。冻存前多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞在上述细胞数量时的 T 淋巴细胞 ^3H -TdR 掺入的每分钟闪烁次数平均值分别为: $(1.7 \pm 0.3) \times 10^4$ 、 $(1.4 \pm 0.4) \times 10^4$ 、 $(0.9 \pm 0.2) \times 10^4$ 和 $(0.3 \pm 0.1) \times 10^4$ 。冻存前、后骨髓间充质干细胞抑制 CD3^+ T 淋巴细胞的增殖作用相似, 见图 1。



2.4 冻存后间充质干细胞分泌细胞造血因子的测定 通过 ELISA 实验发现所有获取的多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞无论是经过短期冻存还是经过长期冻存同样具有分泌转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 6、白细胞

素12, 干细胞生长因子的功能, 上述细胞因子的分泌水平随着细胞冻存时间增长没有明显的改变, 见表1。

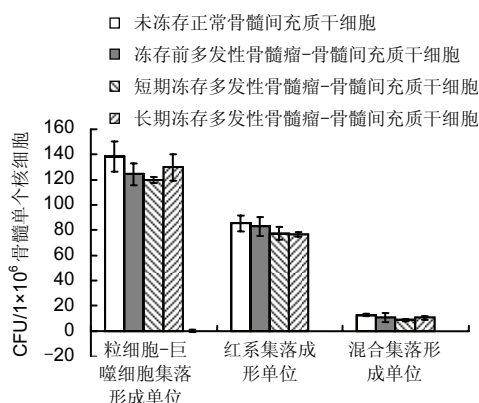
表1 骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞分泌细胞因子

Table 1 Cytokines secreted from bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

项目	冻存前多发性骨髓瘤-骨髓间充质干细胞	短期冻存多发性骨髓瘤-骨髓间充质干细胞	长期冻存多发性骨髓瘤-骨髓间充质干细胞
转化生长因子 $\beta 1$	478.2 $\pm$ 27.5	507.1 $\pm$ 31.2	482.3 $\pm$ 40.5
干细胞生长因子	627.6 $\pm$ 38.5	599.7 $\pm$ 59.8	606.4 $\pm$ 49.7
白细胞介素 6	128.5 $\pm$ 10.2	123.1 $\pm$ 11.2	135.8 $\pm$ 13.5
白细胞介素 11	81.6 $\pm$ 4.9	76.9 $\pm$ 6.6	78.9 $\pm$ 7.1

注: 短期冻存 1 个月及长期冻存 12 个月的多发性骨髓瘤-骨髓间充质干细胞同样具有分泌转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 6、白细胞介素 12, 干细胞生长因子的功能, 其分泌水平随着细胞冻存时间增长没有明显的改变。

2.5 冻存后间充质干细胞造血支持作用 为了评估冻存是否影响间充质干细胞支持造血的能力, 骨髓单个核细胞被接种于照射过的冻存前和冻存后复苏的间充质干细胞中, 在长期骨髓培养基中培养4周后检测集落生成单位(CFU)的生成情况。如图2所示, 冻存前、后的间充质干细胞均具有造血支持作用。粒细胞-巨噬细胞集落形成单位、红系集落形成单位和混合集落形成单位的产率(CFU/ 1×10^6 单个核细胞)在冻存前、短期冻存和长期冻存后(间充质干细胞为滋养层的骨髓长期培养体系中)分别为: 冻存前124.3 $\pm$ 8.7, 82.9 $\pm$ 7.4和10.6 $\pm$ 3.4; 短期冻存后119.7 $\pm$ 2.4, 77.5 $\pm$ 5.2和8.6 $\pm$ 0.9; 长期冻存后129.8 $\pm$ 10.4, 76.4 $\pm$ 1.8和10.4 $\pm$ 1.6, 经分析差异无显著性意义($P > 0.05$)。



注: 冻存前后的骨髓间充质干细胞均具有造血支持作用。

图2 冻存前后多发性骨髓瘤骨髓间充质干细胞支持造血作用

Figure 2 Hematopoiesis support of bone marrow mesenchymal stem cells from multiple myeloma before and after cryopreservation

3 讨论 Discussion

多发性骨髓瘤为起源于浆细胞的恶性克隆性骨髓增殖性疾病, 多发于中老年, 主要特征为骨髓和外周血中出现异常单克隆浆细胞, 血清或尿中出现异常单克隆免疫球蛋白, 同时可以出现高钙血症、肾功能衰竭、贫血、骨质破坏、淀粉样变、高黏血症和反复感染等临床症状。多发性骨髓瘤患者的生存期有长有短, 临床证实可以经化疗进行有效控制, 但是达到完全缓解的很少^[7-8]。

研究发现多发性骨髓瘤患者行异基因间充质干细胞/自体间充质干细胞联合造血干细胞移植有显著疗效^[9]。间充质干细胞是造血微环境中的主要组成部分, 通过合成、分泌多种造血因子和黏附分子来调控造血干细胞的增殖分化和自我更新。间充质干细胞具有维持长期培养起始细胞(LTC-IC)的能力, 促进造血干细胞的增殖和分化, 而且联合间充质干细胞的移植还可以促进造血干细胞的植入和移植后的造血恢复^[10-13]。

多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞具有正常核型, 表达造血相关因子并具有体外支持造血的作用^[14-15]。既往研究发现多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞可以在体外大量扩增并维持低分化状态, 在特定的条件下可以向多种组织分化。因此, 希望通过自体间充质干细胞联合异体造血干细胞共同移植以提高异基因造血干细胞移植治疗多发性骨髓瘤的疗效。

由于种种条件的限制, 临床上无法将动员的间充质干细胞直接回输至患者体内, 临床实际工作中最常用的方法是将多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞在移植前获取、并在体外大量扩增后冻存。因为体外长期维持骨髓间充质干细胞的生存需要耗费大量的人力和物力, 而且随细胞传代次数增多, 其增殖能力会逐渐下降, 细胞衰老、凋亡的现象也难以避免^[16]。这些都对骨髓间充质干细胞的生物活性和功能产生影响, 所以临床上最常用的方法是将骨髓间充质干细胞在体外扩增冻存后待时机成熟后复苏回输至患者体内^[17]; 然而, 既往很多报道发现移植前的预处理会损害骨髓中的间充质干细胞的一些特性, 从而影响造血干细胞的植入和移植后患者的造血恢复。既往临床实验证实造血干细胞可以在液氮中长期冻存, 复苏后仍然具有良好的造血重建能力^[18]。但是, 患者自体间充质干细胞经过低温冻存和复苏, 其增殖能力、支持造血和免疫调节功能是否会受影响尚不清楚。

实验中, 作者发现多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞经过短期(1个月)和长期(12个月)冻存后的形态及生长方式与冻存前间充质干细胞相同, 仍为梭形, 贴附在培养瓶底呈平行或“漩涡”样生长。冻存后间充质干细胞的活性率下降, 随着冻存时间的延长, 复苏后间充

质干细胞活性率下降越明显;但冻存并不影响复苏后间充质干细胞的增殖能力,冻存前和短期、长期冻存后间充质干细胞的倍增时间均在50 h左右,差异无统计学意义。另外,短、长期冻存后间充质干细胞仍可以在体外长期传代培养,通过体外扩增的办法获取需要的细胞数量,用于联合造血干细胞移植。

体外试验发现自体 and 异基因骨髓间充质干细胞均具有在体外抑制T淋巴细胞增殖的能力^[19-23]。体内动物实验发现骨髓间充质干细胞移植可以抑制异体免疫反应,可以减轻移植相关的排斥反应,从而延长异体移植物的存活时间。近年的临床试验发现间充质干细胞联合造血干细胞移植可以促进造血恢复、降低移植失败率并减轻移植抗宿主病^[24]。对于冻存是否影响间充质干细胞的免疫调节功能的问题,既往并无报道。

实验中,作者通过混合淋巴细胞培养实验,研究冻存前、后多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞抑制异体T淋巴细胞增殖的能力是否发生改变。结果发现冻存前、短期冻存后、长期冻存后的多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞抑制T淋巴细胞增殖的作用并无统计学差异,且这种抑制作用是随着间充质干细胞细胞数量的增加而增强。结果表明冻存后的间充质干细胞仍可以发挥免疫调节功能,可以减轻移植相关的排斥反应。

研究报道,骨髓间充质干细胞合成、分泌多种造血因子,如巨核细胞集落刺激因子,粒巨核细胞集落刺激因子、转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素6、白细胞介素12、干细胞生长因子和白血病抑制因子等,支持造血干祖细胞的生长^[25-28];同时骨髓间充质干细胞通过分泌多种黏附分子,如整合素家族分子和其他多种黏附分子来实现对造血细胞的相互识别和作用,进而调控造血;间充质干细胞还通过分泌细胞外基质,如胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白等,促进间充质干细胞对造血细胞的增殖和归巢^[29-31]。

另有研究报道,多发性骨髓瘤患者和正常人骨髓骨髓间充质干细胞中白细胞介素6的表达无统计学差异,多发性骨髓瘤患者骨髓间充质干细胞的白细胞介素6的表达可能与支持造血有关^[32-35]。但是多发性骨髓瘤患者间充质干细胞冻存前后支持造血能力是否发生改变尚不明确。

实验中,作者通过造血调控因子的测定及集落形成试验探求冻存前后间充质干细胞支持造血能力是否发生改变。冻存前、短期冻存、长期冻存的间充质干细胞都具有分泌转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素6、白细胞介素12,干细胞生长因子的功能,且细胞因子的分泌水平随着细胞冻存时间增长没有明显的改变。骨髓单个核细胞在以冻存前、短期冻存和长期冻存后间充质干细胞作为滋养层的骨髓长期培养体系中培养,4周后的骨髓单个核细胞CFU生成率在各体系之间没有显著性差别,上

述结果说明冻存并没有改变间充质干细胞支持造血的能力。进一步分析上述不同培养体系中粒细胞-巨噬细胞集落形成单位、红系集落形成单位和混合集落形成单位的生成情况,结果表明冻存前、后间充质干细胞均可以促进粒细胞-巨噬细胞集落形成单位、红系集落形成单位和混合集落形成单位的增殖,而且间充质干细胞对定向祖细胞以及不同阶段造血祖细胞的增殖和分化能力在冻存前、后没有明显差别。

致谢:感谢天津医科大学附属肿瘤医院及实验室所有给予本研究帮助支持的工作人员。

作者贡献:设计、实施、评估均为本文作者,均经过专业培训。

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。

伦理要求:所有患者在获取骨髓标本时均未接受任何治疗并获取患者知情同意。

学术术语:黏附分子—一类介导细胞与细胞间或细胞与胞外基质蛋白间结合的分子统称。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Ash S, Stein J, Askenasy N, et al. Immunomodulation with dendritic cells and donor lymphocyte infusion converge to induce graft vs neuroblastoma reactions without GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Cancer*. 2010; 103:1597-1605.
- [2] Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood*. 2009;113:2088-2095.
- [3] Kronsteiner B, Peterbauer-Scherb A, Grillari-Voglauer R, et al. Human mesenchymal stem cells and renal tubular epithelial cells differentially influence monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Cell Immunol*. 2011;267:30-38.
- [4] 柯俊龙, 许志恩, 李华, 等. 较高温度下骨髓间充质干细胞的复苏率及复苏后分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(27): 4975-4978.
- [5] Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):342-349.
- [6] 张之南, 沈悝. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [7] Shen Jianliang, Huang Youzhang, Xu Shixia. Effectiveness of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow cryopreserved for 23-25 years. *Cryobiology*. 2012;64(3): 167-175.
- [8] 赵智刚, 唐晓琼, 黎纬明, 等. 冻存前后骨髓间充质干细胞的生物学特性和支持造血的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(2): 304-307.

- [9] Zhao ZG, Li WM, Chen ZC, et al. Hematopoiesis capacity, immunomodulatory effect and ex vivo expansion potential of mesenchymal stem cells are not impaired by cryopreservation. *Cancer Invest.* 2008;26(4):391-400.
- [10] Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-427.
- [11] Gonda K, Shigeura T, Sato T, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(2):401-410.
- [12] Mamidi MK, Nathan KG, Singh G, et al. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *Cell Biochem.* 2012;113(10): 3153-3164.
- [13] Yang H, Robinson SN, Nieto Y, et al. Ex vivo graft purging and expansion of autologous blood progenitor cell products from patients with multiple myeloma. *Cancer Res.* 2011;71(14): 5040-5049.
- [14] Corre J, Mahtouk K, Attal M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007;21:1079-1088.
- [15] Martínez-Jaramillo G, Vela-Ojeda J, Flores-Guzmán P, et al. In vitro growth of hematopoietic progenitors and stromal bone marrow cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2011;35(2):250-255.
- [16] Görgün G, Calabrese E, Soydan E, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood.* 2010;116(17): 3227-3237.
- [17] Feng Y, Wen J, Mike P, et al. Bone marrow stromal cells from myeloma patients support the growth of myeloma stem cells. *Stem Cells.* 2010;19(9): 1289-1296.
- [18] Gahrton Gösta. Progress in allogeneic transplantation for multiple myeloma. *Eur. J Haematology.* 2010;85(4): 279-289.
- [19] Bensinger W. Role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in myeloma. *Leukemia.* 2009;23(3):442-448.
- [20] Capitini CM, Herby S, Milliron M, et al. Bone marrow deficient in IFN- γ signaling selectively reverses GVHD-associated immunosuppression and enhances a tumor-specific GVT effect. *Blood.* 2009;113:5002-5009.
- [21] Auletta Jeffery J, Deans Robert J, Bartholomew Amelia M. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood.* 2012;119(8): 1801-1809.
- [22] Kumar A, Loughran T, Alsina M, et al. Management of multiple myeloma: a systematic review and critical appraisal of published studies. *Lancet Oncology.* 2003;4(5):293-304.
- [23] Garderet L, Mazurier C, Chapel A, et al. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leukemia Lymphoma.* 2007;48(10):2032-2041.
- [24] Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2007;21(1):158-163.
- [25] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-49.
- [26] Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:235-239.
- [27] Lee K, Majumdar M, Buyaner D, et al. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. *Mol Ther.* 2001;3:857-864.
- [28] Lazarus H, Curtin P, Devine S. Role of mesenchymal stem cells in allogeneic transplantation: early phase I clinical results. *Blood.* 2000;392:1691-1698.
- [29] Zhao Z, Tang X, You Y, et al. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hematopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Res.* 2006;30(8):993-1003.
- [30] Zhang ZY, Teoh SH, Hui JH, et al. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials.* 2012;33(9):2656-2672.
- [31] Shi C. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology.* 2012;136(2):133-138.
- [32] Hao i, Sun H, Wang J, et al. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *Hematol.* 2012;95(1):34-46.
- [33] Martino A, Buda G, Maggini V, et al. Could age modify the effect of genetic variants in IL6 and TNF- α genes in multiple myeloma? *Leuk Res.* 2012;36(5):594-597.
- [34] Brown CO, Salem K, Wagner BA, et al. Interleukin-6 counteracts therapy-induced cellular oxidative stress in multiple myeloma by up-regulating manganese superoxide dismutase. *The Biochem J.* 2012;444(3): 515-527.
- [35] Ohgiya D, Matsushita H, Onizuka M, et al. Association of Promyelocytic Leukemia Protein with Expression of IL-6 and Resistance to Treatment in Multiple Myeloma. *Acta Haematol.* 2012;128(4):213-222.