

论著·基础研究

2 类小鼠胎肝基质细胞的生物学特征及表达谱分析

王汭汉¹, 迟亚男¹, 杨冠恒², 范书玥¹, 马 姬¹, 薛 燕^{1,2#}, 曾凡一^{1,2#}

1. 上海交通大学基础医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学附属儿童医院上海医学遗传研究所, 国家卫生健康委员会医学胚胎分子生物学重点实验室, 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

[摘要] **目的**·探究不同类型小鼠胎肝基质细胞在细胞形态、分子特征和生物学功能上的差异。**方法**·通过体外贴壁培养的方式获取 13.5 d 小鼠胎肝基质细胞, 根据细胞形态及其表面标志物 CD44、CD29、CD106、CD45 及 Sca-1 的表达差异, 区分不同的细胞类型。使用小鼠基因组阵列 430 2.0 基因芯片在 $P < 0.05$ 、差异倍数 > 3 或 < -2 的标准下筛选差异基因, 并使用 IPA (ingenuity pathway analysis) 软件对典型信号通路和生物学功能进行分析。**结果**·依据细胞形态的不同, 分离出 2 类胎肝基质细胞, 即短梭形细胞 (CD45⁺CD106⁺CD29⁺CD44⁺Sca-1⁻) 和成纤维样细胞 (CD45⁺CD106⁺CD29⁺CD44⁺Sca-1⁻)。前者共筛选出 1 485 个高表达基因, 主要参与免疫炎症相关的信号通路; 后者共筛选出 3 374 个高表达基因, 主要参与细胞外基质形成及细胞间黏附。**结论**·小鼠胎肝基质细胞在生物学特征及功能上具有较强的异质性, 在促进造血干细胞的增殖方面可能存在差异。

[关键词] 胎肝; 基质细胞; 造血干细胞; 流式细胞术; 基因芯片; IPA 软件

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.11.002 **[中图分类号]** Q291 **[文献标志码]** A

Biological characteristics and gene expression profile analysis of two kinds of mouse fetal liver stromal cells

WANG Yun-han¹, CHI Ya-nan¹, YANG Guan-heng², FAN Shu-yue¹, MA Ji¹, XUE Yan^{1,2#}, ZENG Fan-yi^{1,2#}

1. Department of Histoembryology, Genetics & Development, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, National Health Commission of the People's Republic of China Key Laboratory of Medical Embryogenesis and Developmental Molecular Biology, Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

[Abstract] **Objective**·To explore the differences in morphology, molecular characteristics and biological functions of different types of mouse fetal liver stromal cells. **Methods**·E13.5 mouse fetal liver stromal cells were obtained by adherent culture, and different cell types were distinguished by morphology and expression of surface markers, such as CD44, CD29, CD106, CD45 and Sca-1. Then microarray assay was conducted by Mouse Genome 430 2.0 Array and analyzed at $P < 0.05$, fold change > 3 or < -2 to identify differential expression genes. Canonical pathway and biological function analyses were performed by using ingenuity pathway analysis (IPA software). **Results**·Spindle-like (CD45⁺CD106⁺CD29⁺CD44⁺Sca-1⁻) and fibroblast-like (CD45⁺CD106⁺CD29⁺CD44⁺Sca-1⁻) fetal liver stromal cells were isolated in this study according to the cell morphology. The 1 485 highly-expressed genes in spindle-like cells mainly involved in immune and inflammation-related signaling pathways; while the 3 374 highly-expressed genes in fibroblast-like cells mainly involved in extracellular matrix formation and cellular adhesion. **Conclusion**·Mouse fetal liver stromal cells have strong heterogeneity in biological characteristics and functions, especially in hematopoietic promoting capability.

[Key words] fetal liver; stromal cell; hematopoietic stem cell (HSC); flow cytometry; microarray; ingenuity pathway analysis (IPA)

作为临床应用最为广泛的成体干细胞, 造血干细胞 (hematopoietic stem cells, HSCs) 已被应用于治疗各类急性与慢性白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血、地中海贫血、重症联合免疫缺陷等血液和免疫系统疾病^[1-5]。而来源于外周血、骨髓 (bone marrow, BM) 和脐带血的 HSCs

存在较为稀缺且配型困难的问题, 使得大量患者无法及时进行 HSCs 移植^[6-9]。因此, 如何在体外获得大量的 HSCs 成为了该领域的研究热点。

目前, 体外获取 HSCs 的主要方法之一即为将多能干细胞与各种组织来源的基质细胞共培养, 诱导多能干细胞

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (2014CB964701, 2014CB964703); 国家自然科学基金 (31871484); 上海市“重中之重”临床重点学科建设项目 (2017ZZ02019); 上海市自然科学基金 (16ZR1428600) (National Program on Key Basic Research Project of China, 2014CB964701, 2014CB964703; National Natural Science Foundation of China, 31871484; Shanghai Top-Priority Clinical Key Disciplines Construction Project, 2017ZZ02019; Natural Science Foundation of Shanghai, 16ZR1428600)。

[作者简介] 王汭汉 (1991—), 男, 硕士生; 电子信箱: wyhauannng@163.com。

[通信作者] 曾凡一, 电子信箱: fzenng@sjtu.edu.cn。薛 燕, 电子信箱: yolandaxue@163.com。[#] 为共同通信作者。

分化为 HSCs^[10-12]。由于胎肝 (fetal liver, FL) 造血时期是哺乳动物的 HSCs 成熟和快速扩增的关键时期^[13-14], 且 FL 基质细胞是 HSCs 所处造血微环境中的主要细胞, 因此 FL 基质细胞在这一应用中具有巨大优势。研究^[15-16]显示, 基质细胞是异质性很强的细胞群, 不同的 FL 基质细胞在促进 HSCs 增殖的能力上存在较大差异。因此, FL 基质细胞包含哪些细胞亚群, 不同细胞亚群具有哪些特征和功能, 且究竟是哪一亚群能够促进 HSCs 增殖分化, 仍值得进一步细致研究。本研究采用贴壁培养和流式细胞术分选的方法分离得到 2 类形态及表面标志表达不同的 FL 基质细胞, 通过基因芯片技术和 IPA (ingenuity pathway analysis) 软件对上述细胞进行表达谱和系统生物学分析, 初步揭示其在生物学功能上的差异, 为体外获取和扩增 HSCs 提供理论基础。

1 对象与方法

1.1 实验动物及细胞

BM 基质细胞来源于 C57BL/6 雌鼠, FL 基质细胞来源于 C57BL/6 雌鼠与雄鼠交配后怀孕 13.5 d (E13.5) 的胎鼠。小鼠购置于上海灵畅生物科技有限公司 [生产许可证: SCXK (沪) 2013-0018], 饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部 [使用许可证: SYXK (沪) 2013-0050]。整个动物实验符合动物福利原则。

1.2 主要仪器及试剂

高糖及低糖 DMEM、青/链霉素 (上海源培生物科技股份有限公司), 胎牛血清 (Gibco, 美国), β -巯基乙醇 (Sigma, 美国), 淋巴细胞分离液 (Stemcell, 美国), CD44、CD29、CD106 [血管细胞附着分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, *Vcam-1*)], CD45.2、Sca-1 抗体及流式细胞仪 (BD, 美国), TRIzol (Invitrogen, 美国), 微量 RNA 质检试剂盒 (Agilent, 美国), 小鼠基因组阵列 430 2.0 基因芯片 (Mouse Genome 430 2.0 Array) 及相关试剂盒、基因芯片杂交炉、基因芯片流体工作站、高密度芯片扫描仪 (Affymetrix, 美国), 反转录试剂盒 (Roche, 瑞士), 定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 试剂盒 (TaKaRa, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 基质细胞的获取及体外培养 颈椎脱臼处死孕鼠。FL 基质细胞获取步骤如下: 于无菌条件下取出 FL 并用移液器吹打为细胞悬液, 采用 30 μ m 滤网制备单细胞悬液, 再用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 以

($0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$)/cm² 的密度接种于培养皿中 (培养液包含高糖 DMEM、15% 胎牛血清、1% 青/链霉素、0.1 mmol/L β -巯基乙醇), 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。接种 24 h 后初次换液, 除去不贴壁的血系细胞, 此后每 2 ~ 3 d 换液 1 次, 最后得到的贴壁生长的细胞即为 FL 基质细胞。当细胞汇聚程度达 80% 左右时, 按照 1:2 传代培养。

BM 基质细胞取自小鼠胫骨及股骨, 即用注射器将 BM 细胞冲出, 并采用与 FL 基质细胞一致的方法进行处理及培养 (培养液成分中, 替换高糖 DMEM 为低糖 DMEM, 其余相同)。

1.3.2 基质细胞表面标志物的检测 取培养 1 ~ 4 代的 FL 及 BM 基质细胞, 用 0.25% 的胰酶溶液消化细胞, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 1 次, 再加入 CD44、CD29、CD106、CD45.2 及 Sca-1 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 25 min, PBS 洗涤 2 次后采用流式细胞仪进行分析。

1.3.3 FL 基质细胞表达谱分析 在表面标志物表达的检测中发现, 基质细胞可根据是否表达 CD45 [蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体型 C (protein tyrosine phosphatase, receptor type C, *Ptpre*)] 被分为两群。基于此, 为探究这 2 类细胞的表达谱差异, 本研究使用流式细胞仪将培养的第 1 代 FL 基质细胞按照 CD45⁺ 和 CD45⁻ 进行分选, 2 类细胞各 3 个重复。用 TRIzol 提取总 RNA, 用微量 RNA 质检试剂盒 (Agilent RNA 6000 Nano Kit) 检测 RNA 质量, 使用 cDNA 合成和纯化试剂盒 (One-Cycle cDNA Synthesis Kit, Sample Cleanup Module) 合成 cDNA 并进行纯化, 再用体外转录试剂盒 (GeneChip IVT Labeling Kit) 合成 cRNA, 采用纯化试剂盒中的片段化缓冲液使 cRNA 片段化。最后, 使用杂交试剂盒 (GeneChip[®] Hybridization, Wash and Stain Kit) 将片段化的 cRNA 和 Mouse Genome 430 2.0 Array 进行杂交, 并于高密度芯片扫描仪上进行检测, 获得 CD45⁺ 和 CD45⁻ 细胞的表达谱数据。

采用转录组分析控制台 (TAC4.0) 软件分析上述表达谱数据, 按照 $P < 0.05$ 、差异倍数 > 3 或 < -2 的标准 (CD45⁺ 比 CD45⁻) 进行差异基因筛选, 再使用 IPA 软件对经筛选获得的差异表达基因行典型信号通路和生物学功能分析。

1.3.4 qPCR 验证差异表达基因 将提取的 CD45⁺ 和 CD45⁻ 细胞的 RNA 反转录为 cDNA, 选取 5 个基因芯片筛选出的差异表达基因进行 qPCR 验证, 反应程序设置为: 50 $^{\circ}$ C, 2 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s) \times 40 个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 1 min。引物序列如表 1 所示。

表 1 qPCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for qPCR

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
<i>C1qa</i>	GGAGCCAGGAGCTGCTGG	TTGCCTGGATTGCCTTTCAC
<i>Cd36</i>	ATATTGGTCAAGCCAGCTAGAAAA	CCCAGTCTCATTAGCCACAGTATA
<i>Csf2rb2</i>	GGAGCGAGTGGAGCAATGAG	GAGCAAGGTGAAGATGAGAAAGAC
<i>Krt8</i>	GAGAATGAATTTGTCTCATCAAG	CCATAGACGCACCACAGACG
<i>Smoc2</i>	CTCTGACCCCTCTCTCTTCT	TTTGGGCTTGGATTCTTTC

注: *C1qa* (complement component 1, q subcomponent, α polypeptide) 为补体成分 1, q 子成分, A 链; *Csf2rb2* (colony stimulating factor 2 receptor, $\beta 2$) 为集落刺激因子 2 受体, $\beta 2$; *Krt8* (keratin 8) 为角蛋白 8; *Smoc2* (SPARC related modular calcium binding 2) 为酸性半胱氨酸丰富分泌蛋白 (骨粘连蛋白) 相关组件钙结合 2

1.4 统计学分析

使用 Graphpad Prism 7.0 软件对实验数据进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验分析组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

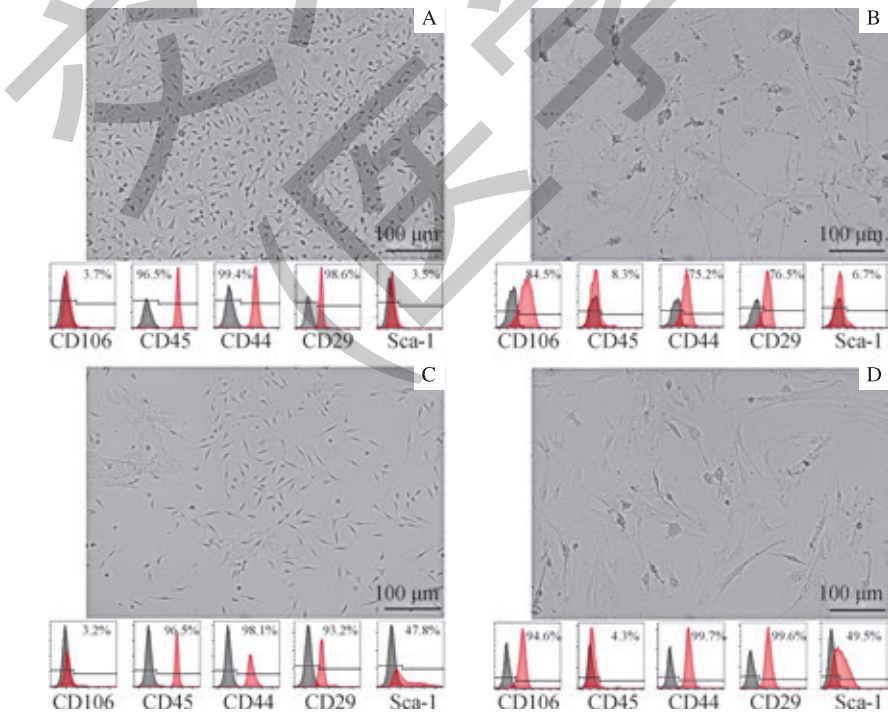
2.1 基质细胞的形态学分析

原代细胞接种 24 h 后, 于显微镜下即可观察到有贴壁的基质细胞出现, 即原代培养的基质细胞形态多为近圆形、短梭形和成纤维样, 也存在一些不规则的、有突起的细胞, 在后续培养过程中细胞形态会向短梭形过渡 (数据未列出); 随着培养的进行, FL 和 BM 基质细胞形态最终

均可分为短梭形和成纤维样 2 类 (图 1)。

2.2 基质细胞表面标志物检测

流式细胞术结果 (图 1) 显示: 所有类型的 FL 和 BM 基质细胞均高表达黏附分子 CD29 和 CD44 (阳性率 $> 75\%$), 符合基质细胞的表达特性。有所不同的是, FL 基质细胞不表达 Sca-1, 阳性率仅为 5% 左右, 但 BM 基质细胞的 Sca-1 阳性率接近 50%; 同时本研究还发现, 短梭形和成纤维样基质细胞在 CD106 和 CD45 的表达量上成相反的状态, 即不论 FL 还是 BM 的短梭形细胞均高表达 CD45, 而成纤维样细胞则高表达 CD106。鉴于 CD45 是血系细胞的标志物, 而 CD106 是一种黏附分子, 进而推测, 与成纤维样细胞相比, 短梭形基质细胞与造血系统的关系更为密切。



注: A. 短梭形 FL 基质细胞; B. 成纤维样 FL 基质细胞; C. 短梭形 BM 基质细胞; D. 成纤维样 BM 基质细胞。其中显微图像展示细胞形态, 下方的流式图表示细胞表面标志物表达情况

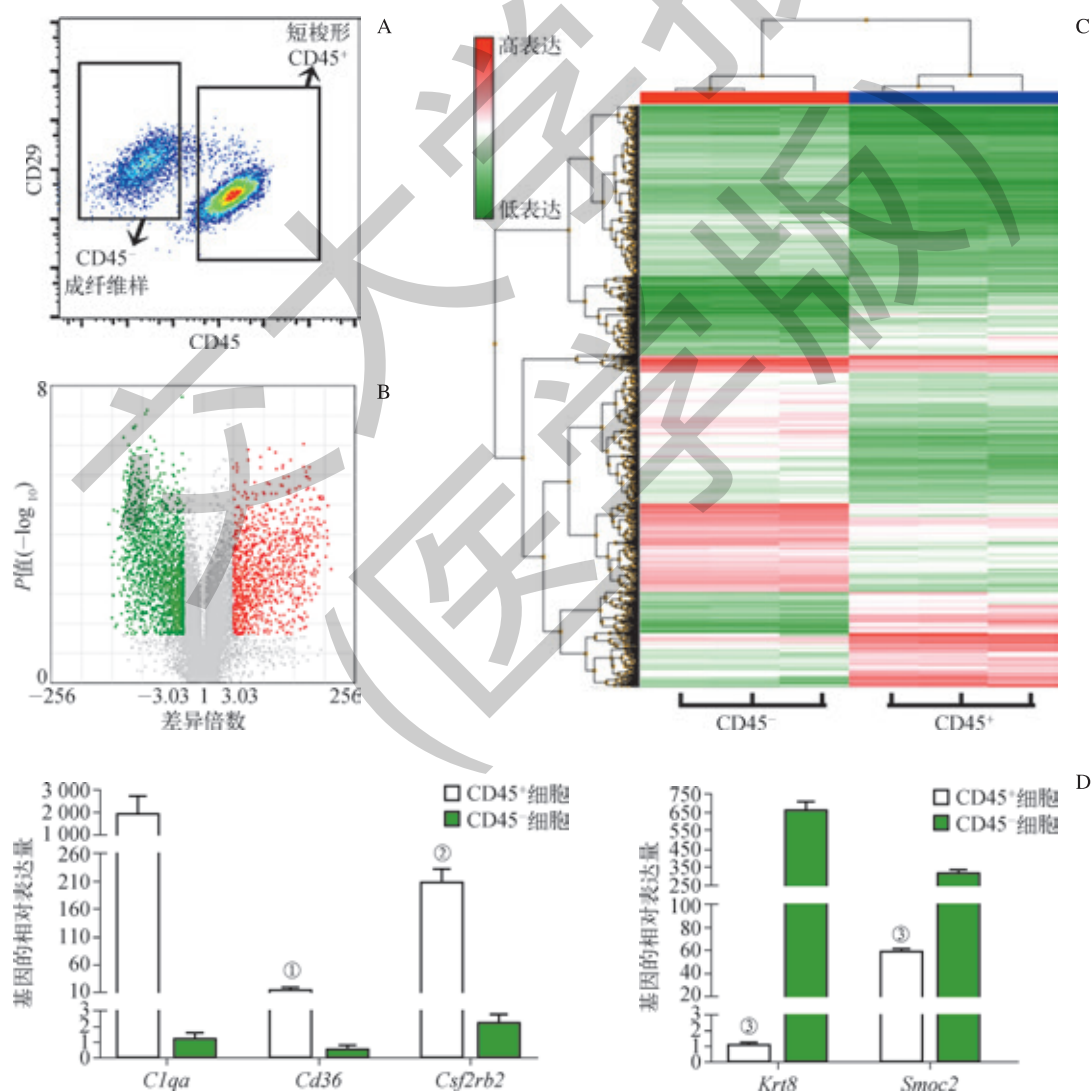
图 1 小鼠基质细胞的形态及表面标志物的表达 ($\times 100$)
Fig 1 Morphology and expressions of surface markers of mouse stromal cells ($\times 100$)

2.3 2 类 FL 基质细胞的差异表达基因筛选

为进一步探究短梭形和成纤维样 FL 基质细胞在基因表达上有何差异, 本研究首先通过流式细胞术将体外培养第 1 代的 FL 基质细胞 (2 种形态的基质细胞同时存在) 按照 CD45 表达与否分为两群; 用 Mouse Genome 430 2.0 Array 进行检测, 在 $P < 0.05$ 、差异倍数 > 3 或 < -2 的标准 ($CD45^+$ 比 $CD45^-$) 下, 共得到 1 485 个上调基因和 3 374 个下调基因; 经聚类分析发现, 2 类细胞基因的表达模式差异很大, 继而推测该 2 类细胞可能具有截然不同的生物学功能 (图 2 A ~ C)。在短梭形 FL 基质细胞的高表达基因中, *Clqa*、*Clqb*、*Clqc* 共同编码补体 C1q, *Cd36* 和血小板激酶底物 (pleckstrin, *Plek*) 均在血小板中高表达, 而 *Csf2rb2* 则编码集落刺激因子受体, 进而推测这类

细胞可能与血液系统存在密切的联系; 而在成纤维样基质细胞的高表达基因中, *Krt8* 编码角蛋白, *Has2* 编码透明质酸合成酶 2 (hyaluronan synthase 2), *Smoc2*、胶原和钙结合表皮生长因子域 1 (collagen and calcium binding EGF domains 1, *Ccbe1*) 与细胞外基质组装及内皮细胞的增殖和迁移有关, 进而推测这类细胞可能是一种间质细胞, 参与细胞黏附与细胞外基质的合成 (表 2)。

选取在基因芯片实验中 $CD45^+$ 细胞高表达的基因 *Clqa*、*Cd36*、*Csf2rb2* 和 $CD45^-$ 细胞高表达基因 *Krt8*、*Smoc2* 进行 qPCR 验证, 结果 (图 2D) 显示与基因芯片获得数据的相一致; 此外在基因芯片得到的结果 (表 2) 中, *Cd45* 和 *Cd106* 的差异倍数分别为 31.34 和 -8.46, 与流式细胞术结果相符, 表明基因芯片分析结果准确。



注: A. 流式细胞术分选 $CD45^+$ 和 $CD45^-$ 细胞; B. TAC4.0 软件筛选差异表达基因 ($CD45^+$ 细胞比 $CD45^-$ 细胞), 红色为上调基因, 绿色为下调基因; C. 差异基因聚类分析, $CD45^-$ 和 $CD45^+$ 细胞均为 3 个样本 (纵列); D. qPCR 验证芯片结果, ① $P=0.028$, ② $P=0.001$, ③ $P=0.000$, 与该基因在 $CD45^-$ 细胞中表达比较

图 2 小鼠短梭形和成纤维样 FL 基质细胞的基因表达谱分析

Fig 2 Gene expression profile analysis of mouse spindle-like and fibroblast-like FL stromal cells

表 2 基因芯片筛选得到小鼠短梭形和成纤维样 FL 基质细胞差异表达基因 (前 10 位及 CD45、CD106)
Tab 2 Differentially expressed genes of mouse spindle-like and fibroblast-like FL stromal cells by microarray (top 10, CD45 and CD106)

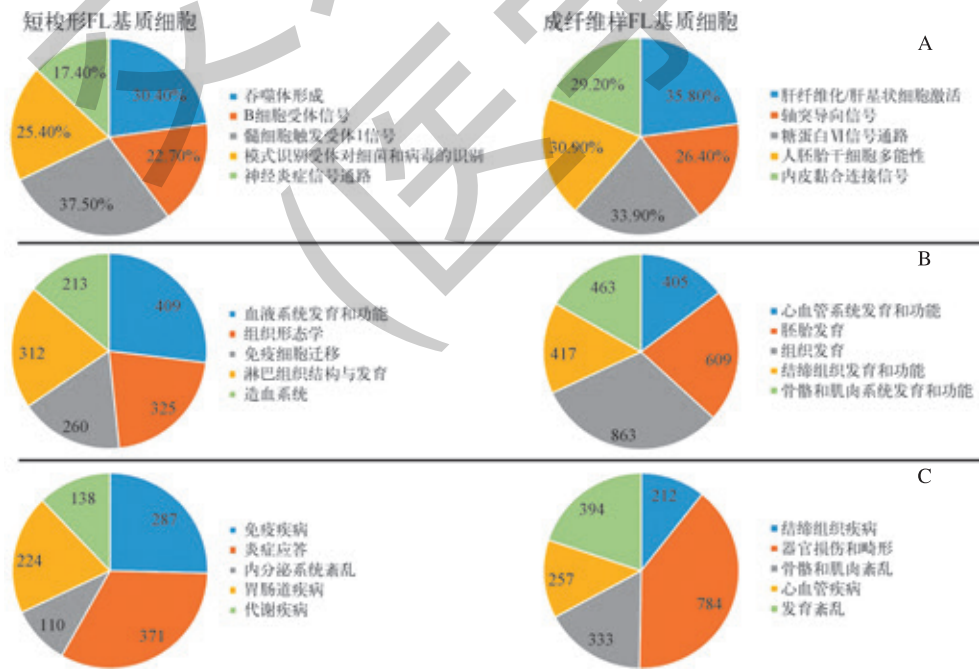
短梭形 FL 基质细胞		成纤维样 FL 基质细胞	
基因	差异倍数	基因	差异倍数
<i>C1qa</i>	107.74	<i>Krt8</i>	31.37
<i>C1qc</i>	95.86	<i>Smoc2</i>	28.11
<i>Cd36</i>	94.45	<i>Ccbe1</i>	27.86
<i>C1qb</i>	92.92	<i>Slc38a4</i>	26.73
<i>Csf2rb2</i>	92.60	<i>Tfpi2</i>	26.68
<i>Plek</i>	87.64	<i>Has2</i>	26.53
<i>Myo1f</i>	84.25	<i>Slpr3</i>	26.16
<i>C3ar1</i>	81.21	<i>Crabp1</i>	25.82
<i>Cd68</i>	80.15	<i>Cyp7b1</i>	24.58
<i>Tm6sf1</i>	77.63	<i>Il1rl1</i>	23.30
...
<i>Ptprc (Cd45)</i>	31.34	<i>Vcam-1 (Cd106)</i>	8.46
...

注: *Myo1f* (myosin IF) 为肌球蛋白 IF; *C3ar1* (complement component 3a receptor 1) 为补体成分 3a 受体 1; *Tm6sf1* (transmembrane 6 superfamily member 1) 为跨膜 6 超族 1; *Slc38a4* (solute carrier family 38, member 4) 为溶质载体 38-4; *Tfpi2* (tissue factor pathway inhibitor 2) 为组织因子途径抑制因子 2; *Slpr3* (sphingosine-1-phosphate receptor 3) 为鞘氨醇 1 磷酸受体 3; *Crabp1* (cellular retinoic acid binding protein 1) 为细胞视黄酸结合蛋白 1; *Cyp7b1* (cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1) 为细胞色素 P450, 7B 肽 1; *Il1rl1* (interleukin 1 receptor-like 1) 为白细胞介素 1 受体样 1

2.4 差异表达基因典型信号通路生物学功能分析

本研究采用 IPA 对基因芯片实验得到的差异表达基因进行典型信号通路和生物学功能分析, 结果 (图 3) 显示: 短梭形 FL 基质细胞高表达基因参与的通路几乎都与炎症和免疫有关, 而成纤维样细胞则参与纤维化和细胞连接等与

细胞外基质相关的通路; 对差异基因参与的生理功能进一步分析发现, 短梭形 FL 基质细胞与造血系统的发育密切相关, 而成纤维样基质细胞则与多种组织器官发育以及组织间的相互连接有关; 同时, 差异基因对应的相关疾病也显示, 两者分别与血液系统、组织器官发育方面存在相关性。



注: A. 差异表达基因参与的典型信号通路覆盖度, 百分数表示差异基因中该通路基因数量占该通路基因总数的百分比; B. 差异表达基因对应的主要生理功能, 数字表示与该生理功能相关的基因数; C. 与差异表达基因相关的疾病, 数字表示与该疾病相关的基因数

图 3 小鼠 FL 基质细胞中差异表达基因的典型信号通路和生物学功能分析
Fig 3 Canonical pathway and biological function analysis of differentially expressed genes in mouse FL stromal cells

3 讨论

基质细胞最早由 Friedenstein 等^[17]从豚鼠 BM 中分离得到; 与造血细胞不同, 其是一类可以在塑料材质器皿上贴壁生长的成纤维样细胞, 后来该类细胞被发现可以向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化^[18-20], 因此基质细胞逐渐被称为间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)。目前, 由于国内外不同研究者分离的 MSC 差异很大, 使得对小鼠 MSCs 的认定缺乏统一的标准。在表面标志物表达方面, 一般认为 MSCs 不表达血系标志 CD45, 但也有研究者分离到 CD45⁺ 的小鼠 BM MSCs^[21-22], 且本研究培养获得的短梭形基质细胞的 CD45 阳性率高达 90% 以上; CD34 作为一种造血细胞的标志物同样被认为不在 MSCs 中表达^[21, 23-24], 但 Peister 等^[25]得到的 B1/6 小鼠 BM MSCs 中 CD34 阳性率超过 75%; CD44 为透明质酸的受体, 在基质细胞中高表达是比较肯定的观点, 但仍有研究者培养得到的 2 类基质细胞都不表达 CD44^[26]; Sca-1 是小鼠 HSCs 的标志物, 其在 Post 等^[26]得到的 BM MSCs 中表达阳性率高达 90%, 在张荣耀等^[21]的研究中仅有 32%, 而在 Saeed 等^[27]分离得到的 BM MSCs 中的阳性率则介于 60% ~ 90% 之间。但需要指出的是, MSCs 高表达整联蛋白 CD29、不表达淋巴细胞标志 CD11b 是当前该领域公认的观点。在细胞形态和功能上, 研究者获取的基质细胞也存在很大差异, 惠大阳等^[28]培养获得的纺锤多边形细胞具有成脂、成骨双向分化能力, 而扁圆形细胞仅能向脂肪细胞分化, 长梭形细胞仅能向成骨细胞分化; 苑春慧^[15]分离得到的上皮形 FL 基质细胞比成纤维样基质细胞具有更强的促进造血细胞增殖功能, 这与本研究结果相一致。由

此可见, 不论是基质细胞还是 MSCs, 依然是较为笼统的概念; 因此, 只有通过深入研究不同基质细胞亚群在生物学特征和功能上的差异, 才能准确地在具体应用中选择最合适的细胞。

目前, MSCs 因具有多向分化能力和低免疫原性, 更多被应用于心血管疾病的细胞替代治疗和 HSCs 移植后的移植抗宿主病^[29-31]。而基于 FL 基质细胞优秀的造血促进能力, 其被作为饲养层细胞以促进 HSCs 的增殖分化仍是该类细胞主要的应用领域。例如赵惠萍等^[32]发现与卵黄囊以及胚胎 BM 基质细胞相比, 拟胚体细胞与 FL 基质细胞共培养分化得到的 Flk1、CD34 和 CD45 阳性细胞的比例高出 10 倍以上。近年来, 虽然通过导入关键转录因子将胚胎干细胞、诱导的多能干细胞和成纤维细胞等其他类型的细胞诱导或重编程为 HSCs 已取得了阶段性成果^[33-34], 但在诱导过程中仍需要与内皮细胞等基质细胞共培养^[35-36], 同时由转基因本身带来的风险也是该技术应用于临床的阻碍之一。因此, 虽然来源和伦理问题限制了 FL 基质细胞直接应用于临床治疗, 但临床上对于 HSCs 的迫切需求使得研究者们更加努力地寻找促进造血的关键因子和基因。

在本研究中, 通过 CD45 和 CD106 这 2 个表面标志物首次区分出了短梭形和成纤维样 2 类 FL 基质细胞, 并通过表达谱分析初步揭示了两类分别与造血系统发育和组织器官发育有密切联系。未来, 本课题组将继续探索短梭形 FL 基质细胞在体外和体内是否具有造血促进作用, 并找出关键的细胞因子及基因, 为解决 HSCs 的来源匮乏、改善 HSCs 移植中宿主的造血微环境提供理论和实践基础。

参·考·文·献

- [1] 朱玲, 薛梅, 阎红敏, 等. 非血缘供者异基因外周血造血干细胞移植治疗急性慢性白血病 37 例疗效分析 [J]. 中国全科医学, 2013, 16(8): 2753-2756.
- [2] 尹, 邱志祥, 李渊, 等. 异基因造血干细胞移植挽救性治疗复发难治淋巴瘤临床研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2017, 25(2): 418-425.
- [3] 周健, 符粤文, 梁利杰, 等. 异基因造血干细胞移植治疗重型再生障碍性贫血 II 型 22 例的疗效分析 [J]. 临床血液学杂志, 2017, 30(3): 206-209.
- [4] 阳文景, 廖建云, 温建芸, 等. MRI 定量肝脏及心脏铁过载对地中海贫血全相造血干细胞移植的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(33): 5293-5298.
- [5] 王坚敏, 陈同辛, 陈静, 等. 造血干细胞移植治疗 X-连锁重症联合免疫缺陷病临床观察 [J]. 内科理论与实践, 2010, 5(1): 48-52.
- [6] Cheng H, Ang HY, A El Farran C, et al. Reprogramming mouse fibroblasts into engraftable myeloerythroid and lymphoid progenitors [J]. Nat Commun, 2016(7): 13396.
- [7] Riddell J, Gazit R, Garrison BS, et al. Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors [J]. Cell, 2014, 157(3): 549-564.
- [8] Tan YT, Ye L, Xie F, et al. Respecifying human iPSC-derived blood cells into highly engraftable hematopoietic stem and progenitor cells with a single factor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(9): 2180-2185.
- [9] Sfougataki I, Grafakos I, Varela I, et al. Reprogramming of bone marrow derived mesenchymal stromal cells to human induced pluripotent stem cells from pediatric patients with hematological diseases using a commercial mRNA kit [J]. Blood Cells Mol Dis, 2019, 76: 32-39.
- [10] 蔡耘, 张绪超, 陈惠芹, 等. 含人 AGM 区、胎肝及骨髓基质细胞培养体系程序化诱导小鼠胚胎干细胞向造血干细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(27): 4969-4974.
- [11] Hatada S, Walton W, Hatada T, et al. Therapeutic benefits in thalassemic mice

- transplanted with long-term-cultured bone marrow cells[J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(3): 375-383.
- [12] Chateaufvieux S, Ichanté JL, Delorme B, et al. Molecular profile of mouse stromal mesenchymal stem cells[J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29(2): 128-138.
- [13] Chabord P, Pouget C, Binder H, et al. A systems biology approach for defining the molecular framework of the hematopoietic stem cell niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(3): 376-391.
- [14] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology[J]. *Cell*, 2008, 132(4): 631-644.
- [15] 苑春慧. 胎肝基质细胞诱导胚胎干细胞体外造血分化的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2003.
- [16] Moore KA, Ema H, Lemischka IR. *In vitro* maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells[J]. *Blood*, 1997, 89(12): 4337-4347.
- [17] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1970, 3(4): 393-403.
- [18] Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, et al. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow[J]. *Exp Hematol*, 1985, 13(4): 237-243.
- [19] Caplan AI. Molecular and cellular differentiation of muscle, cartilage, and bone in the developing limb[J]. *Prog Clin Biol Res*, 1986: 307-318.
- [20] 陈晓婷, 高艳虹. 间充质干细胞成骨分化中多种调控因子的交互作用及其机制[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2017, 37(5): 694-698.
- [21] 张荣耀, 毕晓娟, 马艳, 等. 全骨髓法培养 C57 小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1): 45-50.
- [22] 贺继刚, 沈振亚, 滕小梅, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞 SCA-1⁺/CD45⁻/CD31⁺ 亚群在心肌梗死中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(22): 3706-3708.
- [23] 赵继学, 王广义, 张海玉, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养、纯化及鉴定[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(1): 11-13.
- [24] 曹亮. 骨髓间充质干细胞定向肝细胞分化及不同细胞外基质对分化率的影响[D]. 大连: 大连医科大学, 2005.
- [25] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential[J]. *Blood*, 2004, 103(5): 1662-1668.
- [26] Post S, Abdallah BM, Bentzon JF, et al. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Bone*, 2008, 43(1): 32-39.
- [27] Saeed H, Taipaleenmäki H, Aldahmash AM, et al. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) exhibit a similar but not identical phenotype to bone marrow stromal stem cells (BMSC)[J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(2): 318-328.
- [28] 惠大阳, 郭振宇, 卢志杰, 等. 三种不同型别小鼠骨髓来源间质干细胞的生物学特性分析[J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2011, 32(2): 169-174.
- [29] Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease[J]. *Circ Res*, 2011, 109(8): 923-940.
- [30] Suzuki G. Translational research of adult stem cell therapy[J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(11): 707-718.
- [31] Chou SH, Lin SZ, Day CH, et al. Mesenchymal stem cell insights: prospects in hematological transplantation[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4): 711-721.
- [32] 赵惠萍, 赵海军, 林戈, 等. 不同造血微环境对诱导人胚胎干细胞向造血细胞分化的影响[J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2007, 32(6): 992-996.
- [33] Ivanovs A, Rytsov S, Ng ES, et al. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish[J]. *Development*, 2017, 144(13): 2323-2337.
- [34] Ebina W, Rossi DJ. Transcription factor-mediated reprogramming toward hematopoietic stem cells[J]. *EMBO J*, 2015, 34(6): 694-709.
- [35] Lis R, Karrasch CC, Poulos MG, et al. Conversion of adult endothelium to immunocompetent haematopoietic stem cells[J]. *Nature*, 2017, 545(7655): 439-445.
- [36] Sandler VM, Lis R, Liu Y, et al. Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction[J]. *Nature*, 2014, 511(7509): 312-318.

[收稿日期] 2019-03-08

[本文编辑] 邢宇洋