

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.08.007

论著·临床研究

阵发性睡眠性血红蛋白尿症患儿骨髓 CD34⁺CD59⁺细胞的体外扩增及克隆变化趋势的研究

肖娟¹ 武永吉² 韩冰² 董红艳³ 陈实平³

(中国医学科学院北京协和医院 1. 儿科; 2. 血液科; 3. 基础医学研究所细胞实验室, 北京 100730)

[摘要] **目的** 研究阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患儿骨髓 CD34⁺CD59⁺细胞的分离、纯化及体外扩增的条件,并对扩增后细胞的长期造血能力进行评估,为探索 PNH 患儿新的治疗途径提供实验依据。**方法** 采用磁珠-流式细胞仪二步分选法,从 PNH 患儿骨髓中分选出 CD34⁺CD59⁺细胞,在不同细胞因子组合条件下进行体外扩增,并培养集落形成细胞(CFCs)及长期培养始动细胞(LTC-IC)。**结果** 体外扩增最适宜的细胞因子组合为干细胞因子+白细胞介素(IL)-3+IL-6+FLT3配基+巨核细胞生成素+红细胞生成素,最适宜的扩增时机为第7天,此时 CD34⁺CD59⁺细胞的扩增倍数为 30.4±6.7倍。CD34⁺CD59⁺细胞在扩增以后,仍为 CD59⁺细胞,能保持较好的形成 CFCs 的能力,仍能形成 LTC-IC,与扩增前相比差异无统计学意义;但 PNH 患儿 CD34⁺CD59⁺细胞的扩增能力低于正常对照的 CD34⁺细胞($P<0.01$)。**结论** PNH 患儿的 CD34⁺CD59⁺细胞能够进行体外扩增,扩增后的细胞仍然具备长期造血重建的能力,并且无向 PNH 克隆转化的趋势,说明对 PNH 患儿进行自体移植在临床上具有可行性。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(8): 627-632]

[关键词] 阵发性睡眠性血红蛋白尿症; 体外扩增; 造血干细胞; 儿童

Ex vivo expansion and clonal variation of CD34⁺CD59⁺ cells from bone marrow in children with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

XIAO Juan, WU Yong-Ji, HAN Bing, DONG Hong-Yan, CHEN Shi-Ping. Department of Pediatrics, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China (Email: xiaoj82108@aliyun.com)

Abstract: Objective To investigate the isolation, purification and ex vivo expansion of CD34⁺CD59⁺ cells from the bone marrow of children with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), to evaluate the capability of long-term hematopoietic reconstruction of the expanded CD34⁺CD59⁺ cells, and to provide a laboratory basis for novel treatment of PNH. **Methods** CD34⁺CD59⁺ cells were isolated from the bone marrow mononuclear cells of children with PNH using immunomagnetic beads and flow cytometer in sequence. The isolated cells were subjected to ex vivo expansion in the presence of different combinations of hematopoietic growth factors for two weeks. The colony-forming cells and long-term culture-initiating cells (LTC-ICs) were cultured and counted. **Results** The optimal combination of hematopoietic growth factors for ex vivo expansion was stem cell factor+interleukin (IL)-3+IL-6+FLT3 ligand+thrombopoietin+erythropoietin, and maximum expansion (30.4±6.7 folds) was seen on day 7 of days 4 to 14 of ex vivo expansion. After ex vivo expansion, CD34⁺CD59⁺ cells remained CD59-positive, retained strong capability of forming colony-forming units, and could still form LTC-ICs. There was no significant difference in capability of forming LTC-ICs between CD34⁺CD59⁺ cells before and after expansion. The expansion capability of CD34⁺CD59⁺ cells from children with PNH was significantly lower than that of CD34⁺ cells from normal controls ($P<0.01$). **Conclusions** The CD34⁺CD59⁺ cells from children with PNH can be expanded in vitro. Post-expansion CD34⁺CD59⁺ cells retain capability of long-term hematopoietic reconstruction. CD34⁺CD59⁺ cells showed no trend towards PNH clone during culture. Ex vivo expansion of CD34⁺CD59⁺ cells from children with PNH might be practical in performing autologous transplantation clinically for these children.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(8): 627-632]

Key words: Proxysmal nocturnal hemoglobinuria; Ex vivo expansion; Hematopoietic stem cell; Child

[收稿日期] 2013-03-22; [修回日期] 2013-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(编号: 81041035)。

[作者简介] 肖娟, 女, 博士, 主任医师。

阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 是一种克隆性造血干细胞疾病, 临床上常表现为血管内溶血、不同程度的全血细胞减少和血栓形成^[1]。已知 PNH 患者体内由于获得性 X 连锁的 PIG-A 基因突变导致糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定蛋白的缺失, 如: CD59、CD55 等, 而这些蛋白均属于补体调节蛋白, PNH 血细胞表面因部分或完全缺乏这些补体调节蛋白, 从而增加了血细胞对补体的敏感性, 临床上出现溶血和血栓。目前, 应用流式细胞仪技术对 PNH 患者血细胞表面 CD55、CD59 抗原的检测已经取代了过去的酸溶血试验、糖水试验等, 成为 PNH 早期诊断的重要手段。PNH 患者体内正常造血细胞与 PNH 克隆 (即血细胞表面缺乏 CD59、CD55 等) 共存^[2]。

儿童 PNH 在临床上是一个少见的疾病, 目前的治疗方法主要包括输血、应用糖皮质激素 / 免疫抑制剂 (如: 环孢素等)、同种异体骨髓移植等^[3]。同种异体骨髓移植是目前唯一的根治方法, 但由于人白细胞抗原相合供体的缺乏, 以及异基因骨髓移植本身具有较大的治疗风险, 而无法广泛开展^[4]。由于 PNH 患者呈异常造血 (CD59⁻ 细胞) 与正常造血 (CD59⁺ 细胞) 并存的状态, 如果能够利用 PNH 患儿自身的正常造血部分进行自体骨髓移植 (ABMT) 或自体外周血干细胞移植 (APBSCT), 那么就既能避免异基因骨髓移植中的移植物抗宿主病, 又不存在相合供体缺乏的问题, 从而能安全有效地治疗甚至根治 PNH。根据预实验的结果,

PNH 患儿骨髓中的造血干 / 祖细胞主要为 CD59⁻ 细胞, 仅有一小部分为 CD59⁺ 的正常细胞, 欲收集到足够的正常干 / 祖细胞进行 APBSCT 或 ABMT 是非常困难的。因此, 本研究设想在体外将异常细胞去除, 对正常造血干 / 祖细胞进行体外扩增, 以供 PNH 患儿干细胞移植之需。

本研究探索在体外将 PNH 患儿骨髓的 CD34⁺CD59⁺ 细胞及 CD34⁺CD59⁻ 细胞高效分开的方法, 并分别进行体外扩增, 探索其最大可扩增性, 并且评估扩增后的 CD34⁺CD59⁺ 细胞是否仍具有增殖、再扩增及向多系分化的能力, 以及 CD34⁺CD59⁺ 细胞是否有向 PNH 克隆演化的趋势, 为研究 PNH 患儿新的根治途径提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取于我院门诊就诊并住院的 5 例 PNH 患儿为研究对象, 诊断标准参考文献^[5], 经髂骨穿刺获取骨髓。正常骨髓取自本院胸科非血液病患者手术切除的肋骨, 经骨髓涂片检查证实其形态学正常。PNH 患儿的临床资料见表 1。

1.2 骨髓单个核细胞的分离

正常及 PNH 患儿骨髓均以肝素抗凝, 应用 Ficoll 淋巴细胞分离液 (d=1.077), 400 g 离心 25 min, 吸取单个核细胞 (MNC) 层。

表 1 PNH 患儿的临床资料

病例号	年龄 (岁)	性别	诊断	病程 (年)	血红蛋白 (g/dL)	白细胞 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	血小板 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	Ham's 试验	外周血 CD59 ⁻ (%)
1	8	男	PNH	2.5	9.1	3.5	11.4	-	18.3
2	11	男	PNH	3	7.3	4.6	19.0	+	24.5
3	7	女	PNH	1.5	8.5	2.5	4.1	+	40.0
4	12	男	PNH	4	8.8	3.6	9.8	+	37.0
5	13	女	PNH	5	7.2	6.4	37.4	+	44.8

1.3 间接免疫磁珠法分离纯化 CD34⁺ 细胞

间接免疫磁珠法参考文献^[6]。

1.3.1 CD34 单抗标记与免疫磁珠结合 先对 MNC 进行有核细胞计数, 然后加入抗 QBEND-10 (QBEND-10 为 CD34 抗原的一个抗原决定簇) 的 CD34 单抗 (Pharmingen 公司, 美国), 终浓度为 100 $\mu\text{L}/10^8$ 细胞。

1.3.2 MiniMACS 分选 CD34⁺ 细胞 将 MiniMACS 分离柱 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 德国) 置于带磁场 (磁场强度 0.6 Tesla) 的分离器上, 将

细胞悬液加于柱顶通过分离柱, 将分离柱移出磁场, 加 1 mL 缓冲液于柱顶使 CD34⁺ 细胞洗脱下来, 收集 CD34⁺ 细胞并进行计数。

1.4 流式细胞仪分离纯化 CD34⁺CD59⁺/CD34⁺CD59⁻ 细胞

1.4.1 免疫荧光标记 将正常人及 PNH 患者分离纯化后的 CD34⁺ 细胞进行标记。分别加入 PE 标记的抗 HPCA-2 (HPCA-2 为 CD34 抗原的另一抗原决定簇) 的 CD34 单抗 (Pharmingen 公司, 美国) 以及 FITC 标记的 CD59 单抗 (Pharmingen 公司,

美国), 阴性对照则分别加入 PE 标记及 FITC 标记的无关鼠单抗 (Pharmingen 公司, 美国)。

1.4.2 流式细胞仪分选 先将流式细胞仪各管道做无菌处理, 用标准荧光微球调出最适的 delay 值。然后建立分选程式 (protocol), 设立 CD34⁺CD59⁺ 细胞的分选窗为 G 窗, CD34⁺CD59⁻ 细胞的分选窗为 H 窗, 正常人 CD34⁺ 细胞的分选窗为 G 窗。启动 Autoclone, 分选速度为 2000 个 /s, 在 96 孔板中各孔打入所需的 CD34⁺CD59⁺、CD34⁺CD59⁻ 或正常人 CD34⁺ 的细胞数。分选结束时, 检测收集的 CD34⁺CD59⁺、CD34⁺CD59⁻ 细胞的纯度。

1.5 流式细胞仪测定 CD34⁺CD59⁺/CD34⁺CD59⁻ 细胞的比例

1.5.1 免疫荧光标记 取扩增培养不同时间的有核细胞进行标记, 方法同 1.4.1。

1.5.2 流式细胞仪测定 流式细胞仪 (EPICS Elite-ESP, Coulter, 美国) 测定时先以标准荧光微球校准仪器。资料以 Listmode 方式获取, 结果以二维点图表示, 每份样品测定 10000 个细胞。

1.6 CD34⁺CD59⁺/CD34⁺CD59⁻ 细胞及正常人 CD34⁺ 细胞的体外液体培养

1.6.1 CD34⁺CD59⁺、CD34⁺CD59⁻ 及正常人 CD34⁺ 细胞体外液体扩增体系 分别将正常人 CD34⁺ 细胞、CD34⁺CD59⁺ 细胞、CD34⁺CD59⁻ 细胞按 $1.5 \times 10^3/200 \mu\text{L}$ 的密度接种于 96 孔板中, 每孔预先加入含 20% 胎牛血清、1% BSA 及重组造血生长因子 (各种因子浓度见 1.6.2) 的 IMDM 培养基 200 μL , 并设复孔。37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度的条件下培养。于第 4 天, 将半量培养体系转移至 24 孔板中, 每孔 1 mL, 以后分别于第 7、10、14 天半量换液, 补充上述含相同细胞因子的 IMDM 培养基, 换液前将细胞充分混匀, 取出的细胞充分混匀并冲洗, 然后做有核细胞计数、台盼蓝染色, 行 CD34⁺、CD59⁺ 细胞比例的测定 (步骤同 1.5) 及各系造血祖细胞检测。

1.6.2 实验分组 所有重组造血生长因子 (rHGFs) 购自美国 R&D 公司。根据干细胞因子 (SCF, 100 ng/mL)、白细胞介素 -3 (IL-3, 50 ng/mL)、IL-6 (20 ng/mL)、粒 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF, 50 ng/mL)、红细胞生成素 (EPO, 2 U/mL)、巨核细胞生成素 (TPO, 100 ng/mL)、FLT3 配基 (FL, 100 ng/mL) 的不同组合 (参照文献^[7]) 分为以下 3 个实验组: SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO (实验 1 组); SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO+EPO (实验 2 组); SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO+EPO+GM-CSF (实验 3 组)。

1.7 造血祖细胞集落培养

将 CD34⁺CD59⁺、CD34⁺CD59⁻ 细胞及正常人的 CD34⁺ 细胞 ($1.5 \times 10^3/\text{mL}$) 或扩增培养不同时间的有核细胞 [$(3\sim 10) \times 10^3/\text{mL}$] 接种于 24 孔板中, 每孔预先加入含 30% 胎牛血清、1% BSA、 $5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 的 2- 巯基乙醇、0.9% 甲基纤维素及 4 种细胞生长因子 (50 ng/mL SCF、50 ng/mL IL-3、2 U/mL EPO 及 40 ng/mL GM-CSF) 的 IMDM 培养基 500 μL , 并设复孔。置 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱内培养 14~16 d, 在倒置显微镜下计数细胞数 ≥ 50 个聚集形成的集落, 按文献^[8]介绍的方法辨认不同类型的集落, 粒单系 - 集落形成单位 (CFU-GM) 10~12 d 计数, 红系 - 爆式集落形成单位 (BFU-E) 及粒、红、巨核混合系 - 集落形成单位 (CFU-Mix) 14~16 d 计数, 其总数为造血集落形成细胞 (CFCs) 数。部分集落用 10 μL 微量加样枪吸出涂片作瑞氏染色以明确集落的类型。

1.8 长期培养始动细胞分析

用于长期培养始动细胞 (LTC-IC) 分析的滋养基质细胞层为 20 Gy 照射的正常人骨髓基质细胞。将悬浮于 Dexter's 长期骨髓液体培养基中的待分析细胞接种于已铺好基质细胞层的 24 孔培养板中。接种细胞为 $(2\sim 5) \times 10^3/\text{mL}$ 的纯化 CD34⁺ 细胞, $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ 的未扩增的 NC, $(5\sim 20) \times 10^4/\text{mL}$ 的扩增后细胞。每周半量换液 1 次, 培养 6 周后用 2.5 g/L 胰蛋白酶 -EDTA 消化, 收集所有细胞洗涤 1 遍后, 按上述集落培养方法作祖细胞分析, 至第 14 天计数所有集落, 即为 LTC-IC^[9]。

1.9 统计学分析

运用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间的比较用 *t* 检验; 多组间的比较采用单因素方差分析或两因素随机区组的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常干 / 祖细胞分离纯化和体外扩增

2.1.1 CD34⁺CD59⁺ 细胞分选 5 例 PNH 患儿以 Ficoll 液密度梯度离心分离 MNC, 流式细胞仪检测其 CD34⁺ 细胞的比例为 $0.82\% \pm 0.31\%$ 。用 MACS 系统纯化富集后, CD34⁺ 细胞的比例提高至 $98.4\% \pm 1.8\%$, 富集倍数为 126 ± 27 倍, 完成富集后再经流式细胞仪分选, CD34⁺CD59⁺ 细胞经分选后纯度为 $97.6\% \pm 1.5\%$, CD34⁺CD59⁻ 细胞经分选后纯度为 $98.2\% \pm 1.7\%$ 。

2.1.2 不同细胞因子组合对有核细胞的扩增作用

体外液体扩增体系培养第4天,实验1组有核细胞数扩增 23 ± 4 倍,实验2组扩增 39 ± 7 倍,实验3组扩增 44 ± 9 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着培养时间的延长,培养体系中的有核细胞数迅速倍增。

2.1.3 不同细胞因子组合对集落形成细胞的扩增作用

实验第7天时CFCs的扩增达到高峰,其中实验1组扩增 21 ± 5 倍,实验2组扩增 39 ± 8 倍,实验3组扩增 29 ± 6 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着培养时间的延长,CFCs的扩增倍数逐渐下降。

2.1.4 不同细胞因子组合对CD34⁺CD59⁺细胞的扩增作用

实验第7天时,CD34⁺CD59⁺细胞扩增达到高峰,其中实验1组扩增 18.7 ± 4.2 倍,实验2组扩增 30.4 ± 6.7 倍,实验3组扩增 21.7 ± 4.9 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。以后随着培养时间的延长,细胞扩增倍数逐渐下降。见表2。

2.2 扩增后细胞的性能评估及鉴定

上述实验结果提示实验2组在实验第7天时CFCs及CD34⁺CD59⁺细胞的扩增倍数均高于其他两组($P < 0.05$),因此以下未经标示均以实验2组的细胞因子组合方式进行实验。

2.2.1 体外扩增对CD34⁺CD59⁺细胞分化的影响

扩增前CD34⁺CD59⁺细胞形成CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix比例分别为 $59.8\% \pm 4.2\%$ 、 $35.4\% \pm 3.1\%$ 、 $3.6\% \pm 1.4\%$,经过7d扩增,CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix的比例分别为 $79.8\% \pm 6.8\%$ 、 $18.7\% \pm 2.9\%$ 、 $1.8\% \pm 0.7\%$,至14d时,CFU-GM、BFU-E、CFU-Mix的比例分别为 $96.3\% \pm 3.2\%$ 、 $2.1\% \pm 1.2\%$ 、 $0.8\% \pm 0.3\%$ 。各系的不同时间段比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.2 扩增前、后CD34⁺CD59⁺细胞增殖及扩增性能的比较

将扩增第7天收集到的

表2 不同细胞因子组合对CD34⁺CD59⁺细胞扩增倍数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	4d	7d	10d	14d
实验1组	5	7.3 ± 0.9^a	18.7 ± 4.2^a	9.4 ± 1.0^a	6.0 ± 0.7^a
实验2组	5	17.2 ± 3.3	30.4 ± 6.7	22.8 ± 8.1	16.2 ± 1.5
实验3组	5	9.5 ± 1.7^a	21.7 ± 4.9^a	11.8 ± 1.5^a	8.1 ± 1.4^a
F值		123.37	14.67	15.71	168.69
P值		<0.01	0.001	<0.01	<0.01

注:实验1组为SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO;实验2组为SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO+EPO;实验3组为SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO+EPO+GM-CSF;其中SCF为干细胞因子,IL为白细胞介素,FL为FLT3配基,TPO为巨核细胞生成素,EPO为红细胞生成素,GM-CSF为粒-巨噬细胞集落刺激因子。a:与实验1组和实验2组比较, $P < 0.05$ 。

CD34⁺CD59⁺细胞进行再次分离和纯化,将扩增后分选到的CD34⁺CD59⁺细胞与骨髓来源的初始CD34⁺CD59⁺细胞进行体外扩增比较,虽然在扩增后第7天有核细胞数、CD34⁺CD59⁺细胞数及CFCs的扩增倍数较扩增前略低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),说明扩增前、后细胞在增殖及扩增性能方面无明显差异。见表3。

2.2.3 PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞与正常人CD34⁺细胞的扩增倍数的比较

扩增第7天时,不同细胞因子组合条件下(实验1~3组),正常人CD34⁺细胞的扩增倍数均明显高于PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞的扩增倍数,差异有统计学意义(分别 $t = 9.68$ 、 8.62 、 12.87 ,均 $P < 0.01$)。

2.3 扩增后CD34⁺CD59⁺细胞体外重建造血能力变化

对扩增后分选到的CD34⁺CD59⁺细胞与扩增前骨髓来源的初始CD34⁺CD59⁺细胞进行体外长期培养,均有一定数量LTC-IC的形成,虽然扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞形成LTC-IC倍数的绝对值较扩增前略低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表4。

2.4 PNH克隆的演变趋势

在体外扩增培养体系中,随着培养时间的延长,虽然有核细胞数逐渐增加,但CD34⁺细胞的比例逐渐下降,由第4天的 $53.4\% \pm 3.7\%$ 下降至第14天的 $0.8\% \pm 0.4\%$;CD59抗原表达在扩增前达到95%以上,在扩增的不同时段仍维持在90%以上,没有CD59抗原的明显丢失。说明扩增后CD59⁺细胞并无向PNH克隆演变的趋势。

表3 扩增后7d CD34⁺CD59⁺细胞扩增潜能的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	有核细胞	CD34 ⁺ CD59 ⁺ 细胞	集落形成细胞
扩增前	5	142 ± 25	30 ± 7	39 ± 8
扩增后7d	5	134 ± 25	28 ± 6	36 ± 7
t值		0.57	0.62	0.74
P值		0.515	0.426	0.634

注:CD34⁺CD59⁺细胞的扩增潜能以有核细胞、集落形成细胞及CD34⁺CD59⁺细胞的扩增倍数来表示。

表4 扩增前、后CD34⁺CD59⁺细胞形成LTC-IC倍数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD34 ⁺ CD59 ⁺ 细胞	LTC-IC
扩增前	5	30 ± 7	3.6 ± 0.8
扩增后	5	28 ± 6	3.2 ± 0.9
t值		0.62	0.81
P值		0.781	0.224

3 讨论

本研究采用磁珠-流式细胞仪二步分选法首次成功地从PNH患儿骨髓单个核细胞中分选出CD34⁺CD59⁺细胞,并且CD34⁺CD59⁺细胞的纯度高达95%以上,为进一步研究CD34⁺CD59⁺细胞的体外扩增奠定了基础。

PNH是后天获得性造血干细胞PIG-A基因突变所致溶血病,异常血细胞膜缺乏包括CD59在内的多种GPI连接蛋白,PNH细胞缺乏CD59是容易遭受补体破坏的关键原因之一。本研究采用FITC标记的CD59单抗检测正常人骨髓MNC,结果表明几乎所有细胞均表达CD59,而PNH患儿骨髓MNC存在CD59⁺及CD59⁻两群细胞,说明患儿体内正常造血及异常克隆同时存在。对PNH患儿骨髓来源的CD34⁺细胞的组成分析显示:CD34⁺CD59⁺细胞所占比例明显低于CD34⁺CD59⁻细胞。Nishimura等^[10]对PNH患者骨髓的检测显示CD34⁺CD38⁻细胞中亦主要为CD59⁻。因此,欲从骨髓或外周血收集到足够的正常干/祖细胞(CD34⁺CD59⁺细胞),以供ABMT或APBSCT之需是非常困难的,必须对PNH患者的CD34⁺CD59⁺细胞进行体外扩增。

关于对PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞的体外扩增的研究,国内外鲜见文献报告,本研究参考文献^[7,11-12]中对脐血及骨髓造血干/祖细胞进行体外扩增的方法,在体外扩增体系中经不同组合细胞因子作用4~14d,结果显示PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞在体外能得到有效的扩增,其中SCF+IL-3+IL-6+FL+TPO+EPO为最适细胞因子组合,在4~14d的扩增期,CD34⁺CD59⁺细胞于第7天扩增达到最高水平(30.4±6.7倍),故适宜的扩增时机应在第7天。

CD34⁺CD59⁺细胞的数量已得到了有效地扩增,为验证扩增后CD34⁺CD59⁺细胞的质量,本研究对在最适细胞因子组合时不同扩增时间段收集到的CD34⁺CD59⁺细胞的造血性能进行评估和鉴定,以明确扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞能否承担起长期重建造血的重任。将扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞再次进行纯化和扩增,与骨髓来源的初始的CD34⁺CD59⁺细胞比较,在扩增后第7天,实验2组的有核细胞数、CD34⁺CD59⁺细胞数及CFCs的扩增倍数差异均无统计学意义($P>0.05$),因此说明扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞仍具有形成集落的能力,具备一定的重建造血的能力。对扩增前、后的CD34⁺CD59⁺细胞进一步行体外长期培养,计

数LTC-IC,结果差异无统计学意义($P>0.05$),说明扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞造血性能没有明显的变化,仍然具备长期造血重建的能力。由于体外与体内的条件并不相同,扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞能否在体内长期重建造血,还需要通过动物模型得到证实。

Brodsky等^[13]认为PNH克隆在体内有生长优势,能抵抗细胞凋亡,PNH克隆有逐渐增多的趋势。Savage等^[14]用甲基纤维素培养的方法,检测骨髓来源的MNC的CD59抗原的变化,发现CD59⁺细胞形成BFU-E、CFU-GM的子代细胞为CD59⁺及CD59⁻两群。本研究中,从PNH骨髓中分离出CD34⁺CD59⁺细胞进行体外液体培养,在对CD34⁺CD59⁺细胞进行扩增的同时,也伴有部分的分化,对在不同扩增时间段收集的细胞进行测定,90%以上均为CD59⁺细胞,并没有CD59抗原的明显丢失,说明在CD34⁺CD59⁺细胞体外扩增、增殖、分化过程中,仍保持为CD59⁺细胞,无GPI锚定蛋白的丢失,说明扩增后CD59⁺细胞可能无向PNH克隆演变的趋势。从这个角度可将扩增后的细胞视为“正常”细胞回输给ABMT或APBSCT的PNH患儿。

既往的研究已证明PNH病变在干细胞水平,患者体内正常造血细胞与异常克隆并存^[15]。那么,PNH患儿体内的CD59⁺细胞与正常人的细胞是否完全相同呢?我们用磁珠-流式细胞仪法,分别将PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞及正常对照CD34⁺细胞分选出来,使PNH患儿的CD34⁺CD59⁺细胞与正常对照CD34⁺细胞在数量上相等的情况下进行比较。结果显示:PNH患儿CD34⁺CD59⁺细胞在扩增能力上明显低于正常对照的CD34⁺细胞,说明PNH患儿的CD34⁺CD59⁺细胞并非完全正常的细胞。

总之,PNH患儿的CD34⁺CD59⁺细胞在体外能够被分离、纯化和分选,并且得到有效地扩增,扩增后的CD34⁺CD59⁺细胞仍然能够保持增殖、再扩增及长期造血的能力,并无向PNH克隆转化的趋势,说明对PNH患儿进行ABMT或APBSCT在临床上具有一定的可行性。但是,PNH患儿的CD34⁺CD59⁺细胞并非完全正常的造血干/祖细胞,它们与正常干/祖细胞在造血方面的差异及其原因尚需进一步深入地研究。

[参 考 文 献]

- [1] Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Curr Opin

- Hematol, 2012, 19(3):141-148.
- [2] Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Blood Rev*, 2008, 22:65-74.
- [3] Curran KJ, Kernan NA, Prockop SE, Scaradavou A, Small TN, Kobos R, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric patients[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 59(3):525-529.
- [4] Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. *Haematologica*, 2012, 97(11):1666-1673.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准 [M]. 第3版, 北京: 科学出版社, 2007: 32-33.
- [6] Kimura T, Minamiguchi H, Wang J, Kaneko H, Nakagawa H, Fujii H, et al. Impaired stem cell function of CD34⁺ cells selected by two different immunomagnetic beads systems[J]. *Leukemia*, 2004, 18(3):566-574.
- [7] Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation[J]. *Blood*, 2008, 111: 3415-3423.
- [8] O'Connor MD, Kardel MD, Eaves CJ. Functional assays for human embryonic stem cell pluripotency[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 690:67-80.
- [9] Lesinski DA, Heinz N, Pilat-Carotta S, Rudolph C, Jacobs R, Schlegelberger B, et al. Serum- and stromal cell-free hypoxic generation of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells in vitro, capable of multilineage repopulation of immunocompetent mice[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(8): 581-591.
- [10] Nishimura J, Ware RE, Burnette A, Pendleton AL, Kitano K, Hirota T, et al. The hematopoietic defect in PNH is not due to defective stroma, but is due to defective progenitor cells[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 29(2): 159-167.
- [11] Haylock DN, Nilsson SK. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2007, 2: 324-335.
- [12] 刘莎, 郝文革, 黄永兰, 孙新. 脐血总有核细胞数对脐血移植疗效的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12 (7): 551-556.
- [13] Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2008: 111-115.
- [14] Savage WJ, Barber JP, Mukhina GL, Hu R, Chen G, Matsui W, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(1): 42-51.
- [15] Roeder I, Horn K, Sieburg HB, Cho R, Muller-Sieburg C, Loeffler M. Characterization and quantification of clonal heterogeneity among hematopoietic stem cells—a model-based approach[J]. *Blood*, 2008, 22.

(本文编辑: 万静)