

研究报告

# 人 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的造血重建

金慧丽, 蔡海波, 杨施, 谭文松

华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘要:** 利用非肥胖糖尿病型重症联合免疫缺陷型(NOD/SCID)小鼠模型, 比较了新鲜及培养后的 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞在体内植入及重建造血能力。从新鲜脐血及培养后的单个核细胞(MNC)中分离出 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞, 经尾静脉输入经亚致死剂量照射的 NOD/SCID 小鼠体内, 6 周后处死存活的小鼠, 取其骨髓、脾脏和外周血细胞, 分别进行细胞表型分析、造血集落形成单位和人特异性基因的检测。经检测, 输注 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠, 其体内 CD45<sup>+</sup>细胞及人源各系血细胞的含量相近, 两者均远远高于输注 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠。输注培养后 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠饲养 6 周后全部死亡, 输注培养后 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠存活率约为 66.7%, 而输注培养后混合细胞的小鼠全部存活, 且在两组存活的小鼠体内均能检测到 CD45<sup>+</sup>细胞及人源各系血细胞。结果表明: 无论是新鲜还是培养后的 CD34<sup>+</sup>细胞均具有在 NOD/SCID 小鼠体内植入和重建造血能力, 而 CD34<sup>-</sup>细胞不具有该能力, 但 CD34<sup>-</sup>细胞与 CD34<sup>+</sup>细胞同时输注有助于提高小鼠的存活率, 说明其对 CD34<sup>+</sup>细胞在小鼠体内发挥植入和造血重建能力有一定的辅助作用。

**关键词:** CD34<sup>-</sup>细胞, CD34<sup>+</sup>细胞, NOD/SCID 小鼠, 造血重建能力

## Hematopoietic Repopulating Ability of Human CD34<sup>+</sup> Cells and CD34<sup>-</sup> Cells in NOD/SCID Mice

Huili Jin, Haibo Cai, Shi Yang, and Wensong Tan

The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** The hematopoietic repopulating ability of fresh and cultured CD34<sup>+</sup> cells and CD34<sup>-</sup> cells derived from cord blood were compared by nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mouse model. Fresh CD34<sup>+</sup> cells and CD34<sup>-</sup> cells were isolated from fresh cord blood. Cultured CD34<sup>+</sup> cells and CD34<sup>-</sup> cells were separated from cultured mononuclear cells (MNC). We transplanted these cells into sublethally irradiated NOD/SCID mice via the tail vein and sacrificed surviving mice after 6 weeks. The peripheral blood, spleen and bone marrow from each mouse were harvested for flow cytometry, colony-forming cells and human Alu sequences analyses. The proportions of CD45<sup>+</sup> cells and human multilineage hematopoietic cells in NOD/SCID mice received CD34<sup>+</sup> cells were close to that in the mice received both CD34<sup>+</sup> cells and CD34<sup>-</sup> cells, while it was significantly higher than that in the mice received CD34<sup>-</sup> cells. Six weeks after transplantation, all the mice injected with cultured CD34<sup>-</sup> cells dead. The survival rate of mice injected with cultured CD34<sup>+</sup> cells was 66.7%. All of the mice injected with both cultured CD34<sup>-</sup> and CD34<sup>+</sup> cells survived. Moreover, CD45<sup>+</sup> cells could be detected in all surviving mice, and human CD34, CD3, CD19, CD33 and CD71 antigen also could be detected on these CD45<sup>+</sup> cells. The results showed that both fresh and cultured CD34<sup>+</sup> cells had the capability of engraftment and hematopoiesis reconstitution, but CD34<sup>-</sup> cells hadn't the ability. However, CD34<sup>-</sup> cells had assistant effect on the

**Received:** January 6, 2008; **Accepted:** June 3, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 20776043) and Shanghai Biological and Pharmaceutical Foundation (No. 074319109).

**Corresponding author:** Haibo Cai. Tel: +86-21-64253394; Fax: +86-21-64252250; E-mail: caihaibo@ecust.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20776043)和上海市生物医药科技攻关项目(No. 074319109)资助。

hematopoietic repopulating ability of CD34<sup>+</sup> cells.

**Keywords:** CD34<sup>-</sup> cell, CD34<sup>+</sup> cell, NOD/SCID mice, hematopoietic repopulating ability

造血干细胞(Hematopoietic stem cell, HSC)是人体造血组织中能自我更新,又能分化产生各系血细胞的一类细胞。CD34 抗原是人们普遍认同的造血干/祖细胞的代表性表面标志<sup>[1]</sup>,它是一个高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白,具有调节细胞粘附性的作用,能促进细胞对骨髓基质的粘附<sup>[2]</sup>。但也有研究表明,某些能够在体内长期重建造血和免疫功能的造血干细胞不仅缺少谱系特异性标志,也不表达 CD34 分子<sup>[3-5]</sup>,推测在 CD34<sup>-</sup>细胞群体中,也可能存在造血干/祖细胞。

造血干/祖细胞在恶性血液疾病、遗传性疾病、重症免疫缺陷及肿瘤化疗所致的造血功能低下等领域具有广泛的用途。脐血因为其具有高含量的原始干/祖细胞<sup>[6]</sup>,较低的同植物抗宿主病(GVHD)的发生率<sup>[7]</sup>等优点,已经成为了一种备受关注的造血干细胞来源<sup>[8]</sup>。由于单份脐血中造血干/祖细胞数量有限,只能满足儿童移植的需要,因此有必要通过造血干/祖细胞的体外扩增来扩大其临床应用的范围,并加快移植后造血和免疫系统的恢复<sup>[9]</sup>。有研究认为经体外扩增后的造血干/祖细胞在生理功能上会发生一些变化,体外培养环境会对造血干/祖细胞的增殖、分化、归巢效率等方面产生一定的影响<sup>[10]</sup>,这些问题直接影响了造血干/祖细胞移植的效果。

因此,本研究以 NOD/SCID 小鼠为模型,比较了培养前后 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞在体内生理功能上的差异,考察了 CD34<sup>-</sup>细胞在造血干/祖细胞移植中的作用,为扩增后造血干/祖细胞应用于临床提供技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 脐血的采集和制备

脐血由上海国际和平妇幼保健院提供,脐血采集量为 50~120 mL。用磷酸盐缓冲液 1:1 稀释新鲜脐血,经 1.077 g/mL Ficoll 密度梯度离心后收集 MNC,洗涤备用。采用 MiniMACS 免疫磁性吸附柱分离装置,用 CD34<sup>+</sup>细胞选择试剂盒(Miltenyi Biotech 公司)按其说明进行 CD34<sup>+</sup>细胞的分离与纯化<sup>[11]</sup>,采用流式细胞术对分离得到的 CD34<sup>+</sup>细胞进行纯度分析,

结果均在 95%以上。

### 1.2 细胞因子

细胞因子均为人重组蛋白,酪氨酸激酶受体 3 配基(Flt-3)、促血小板生成因子(TPO)由美国 Peprotech 公司生产,购自联科生物技术有限公司;干细胞生长因子(SCF)购于北京军事医学科学院生物工程研究所;白细胞介素 3(IL-3)购于北京大学医学院免疫学教研室;白细胞介素 6(IL-6)购于北京宝赛生物技术有限公司;粒-巨系集落刺激因子(GM-CSF)购于上海海济生物制药有限公司;粒系集落刺激因子(G-CSF)购于杭州九源基因工程有限公司。

### 1.3 细胞的体外培养

IMDM(Gibco 公司)培养基添加 20%(V/V)的胎牛血清(FBS)、 $5 \times 10^{-5}$  mol/L 2-巯基乙醇,其中细胞因子组合为:SCF(50 ng/mL)、Flt-3(50 ng/mL)、TPO(20 ng/mL)<sup>[12]</sup>。细胞培养在 24 孔板中进行,每孔装 2 mL 培养液,MNC 接种密度为  $1 \times 10^6$  个/mL,置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养。每 4 d 半量稀释换液 1 次,培养到第 7 天时,收获细胞,分离 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞,悬浮于 IMDM 培养基中,待注射于小鼠体内。

### 1.4 小鼠移植实验

实验小鼠为 6 周龄的 NOD/SCID 鼠,由中国科学院上海实验动物中心提供。进行细胞移植前,对小鼠进行 2.7 Gy 亚致死剂量的铯源照射。移植时,将收获的细胞悬浮于 0.3 mL 的 IMDM 培养基中,经尾静脉输入小鼠体内,饲养 6 周后,取外周血、骨髓和脾脏细胞做进一步检测。

### 1.5 造血干/祖细胞集落检测

集落形成单位(CFC)检测在含 0.9%甲基纤维素的 IMDM 半固体培养体系中进行,添加 20%的 FBS 以及 SCF(50 ng/mL)、IL-3(20 ng/mL)、IL-6(20 ng/mL)、G-CSF(20 ng/mL)、GM-CSF(14 ng/mL)和 EPO(2 u/mL)。人血细胞以  $1.0 \times 10^4$  个/孔、小鼠细胞以  $1.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 24 孔板中,每孔加 0.5 mL 半固体培养基,然后置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中,培养 14 d 后计数。

## 1.6 细胞表面抗原检测

流式细胞术检测存活小鼠骨髓和脾脏细胞的 CD45、CD3、CD19、CD33、CD34 和 CD71 阳性细胞的含量,外周血的 CD45 阳性细胞含量。抗体均为 Pharmingen 公司产品,按产品说明书方法标记,标记细胞用流式细胞仪(BD 公司)分析,结果用 WinMDI 软件处理。

## 1.7 聚合酶链反应(PCR)法检测人特异的 Alu 序列

提取小鼠骨髓细胞中的 DNA,进行人 Alu 序列的 PCR 检测。PCR 检测人 Alu 序列时以人外周血白细胞基因组 DNA 作为阳性对照,正常 NOD/SCID 小鼠细胞基因组 DNA 作为阴性对照。Alu 序列引物<sup>[13]</sup>如下: P1(正义链)5'-CAC CTG TAA TCC CAG CAG TTT-3'; P2(反义链)5'-CGC GAT CTC GGC TCA CTG CA-3',反应条件:94°C 预热 4 min,循环参数:94°C、1 min 变性,55°C、45 s 退火,72°C、1 min 延伸,共 21 个循环,72°C 延伸 5 min,扩增片段长为 221 bp,用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,以 50 bp DNA Ladder 为标准。

## 1.8 统计学分析

实验数据以平均值  $\pm$  标准方差(mean $\pm$ SD)表示;采用 *t* 检验分析数据的统计学差异, $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 脐血中 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞植入和重建造血能力比较

将接受亚致死剂量照射的 NOD/SCID 小鼠分成 4 组,每组 4 只。其中,对照组小鼠每只注射 0.3 mL IMDM 培养基(Control);实验 1 组小鼠每只注射  $4 \times 10^5$  个新鲜分离的 CD34<sup>+</sup>细胞(Fresh CD34<sup>+</sup> cells);实验 2 组小鼠每只注射  $5 \times 10^6$  个 CD34<sup>-</sup>细胞(Fresh CD34<sup>-</sup> cells);实验 3 组小鼠每只注射  $4 \times 10^5$  个 CD34<sup>+</sup>细胞和  $5 \times 10^6$  个 CD34<sup>-</sup>细胞(Fresh mixed cells)。接受细胞移植的 NOD/SCID 小鼠于无特定病原体环境下饲养 6 周,从小鼠存活率、体内植入和造血重建能力 3 个方面比较了 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞生理功能上的差异。

小鼠存活情况如表 1 所示,细胞移植 2 周后,对照组小鼠全部死亡,单独注射 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠存活率为 50%,输注 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠均

存活;4 周后,输注 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠存活率为 25%,输注 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠存活率为 50%;6 周后,单独注射 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠存活率均为 25%,注射混合细胞的小鼠存活率为 50%。结果表明移植 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>混合细胞更有利于小鼠的存活。

表 1 照射 6 周后 NOD/SCID 小鼠的存活数量  
Table 1 The number of survival NOD/SCID mice irradiated after 6 weeks

	2 weeks	4 weeks	6 weeks
Control	0/4	0/4	0/4
Fresh CD34 <sup>+</sup> cells	4/4	2/4	1/4
Fresh mixed cells	4/4	2/4	2/4
Fresh CD34 <sup>-</sup> cells	2/4	1/4	1/4

CD45 是人类白细胞特异性表面抗原,受体鼠中 CD45<sup>+</sup>细胞的含量是表征人造血干/祖细胞在小鼠体内移植效果的重要指标。为验证小鼠存活是移植了人造血细胞的结果,检测了接受细胞移植 6 周后的 NOD/SCID 小鼠骨髓、脾脏和外周血中 CD45<sup>+</sup>细胞的百分含量,结果如表 2 所示。输注 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>混合细胞的小鼠体内 CD45<sup>+</sup>细胞的含量与输注 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠相近,而输注 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠体内 CD45<sup>+</sup>细胞的含量远远低于前两组。

表 2 NOD/SCID 小鼠体内人源细胞的百分含量  
Table 2 Levels of human engraftment in NOD/SCID mice

	The proportions of human CD45 <sup>+</sup> cells (%)		
	Spleen	Bone marrow	Peripheral blood
Fresh CD34 <sup>+</sup> cells	65.30	87.59	4.64
Fresh mixed cells	63.53 $\pm$ 4.23	86.73 $\pm$ 2.89	5.02
Fresh CD34 <sup>-</sup> cells	1.04	1.49	0.36

为了进一步探明人造血/祖细胞是否植入到 NOD/SCID 小鼠体内,对小鼠的骨髓细胞进行了人源特异性 Alu 序列的检测。提取了所有存活 NOD/SCID 小鼠的骨髓细胞的 DNA 进行 PCR 分析,结果如图 1 所示,对照组和输注 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠骨髓细胞中没有检测出 Alu 序列,而输注 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠体内均能检测出长为 221 bp 的 Alu 序列。可见,仅注射 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠体内不存在人源细胞,尽管流式细胞术检测到小鼠体内有少量 CD45<sup>+</sup>细胞的,但是含量极低,仅为 1%左右,推测应该是检测系统误差所致,因此,认为 CD34<sup>-</sup>细

胞在小鼠体内不具有植入能力。

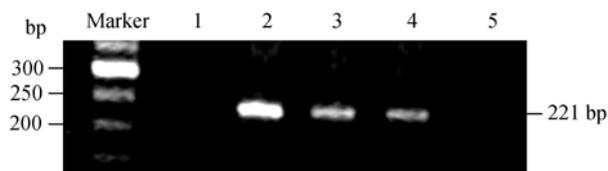


图 1 NOD/SCID 小鼠骨髓细胞中人源 Alu 序列的表达  
Fig. 1 The expression of human Alu sequences in DNA extracted from bone marrow cells of NOD/SCID mice

1: cells of the mice injected with the same volume IMDM; 2: human cord blood cells; 3: cells of the mice injected with fresh CD34<sup>+</sup> cells; 4: cells of the mice injected with fresh mixed cells; 5: cells of the mice injected with fresh CD34<sup>-</sup> cells

为了考察植入的人脐血细胞在小鼠体内的多系造血重建能力, 检测了各组 NOD/SCID 小鼠骨髓中各系人源造血细胞的比例, 图 2 为采用流式细胞术检测输注 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠骨髓中各系人源造血细胞含量的结果, 其中 CD34、CD3、CD19、CD33 和 CD71 分别为造血干/祖细胞、T 细胞、B 细胞、髓系和红系细胞的表面标记。

各组 NOD/SCID 小鼠骨髓中各系人源造血细胞含量的检测结果见表 3, 结果显示在每组存活的小鼠体内均能检测到各系人源造血细胞。输注 CD34<sup>+</sup>细胞和输注 CD34<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>混合细胞的小鼠骨髓中各系人源造血细胞的含量相近, 没有明显差异; 而输注 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠骨髓中各系人源造血细胞的含量非常低, 远远低于输注了 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠, 说

明 CD34<sup>+</sup>细胞具有在体内重建造血的能力, 而 CD34<sup>-</sup>细胞则不具有这个能力。

表 3 NOD/SCID 小鼠骨髓中各系人源造血细胞的百分含量 (%)

Table 3 The co-expression of lineage markers in the CD45<sup>+</sup> population of bone marrow in NOD/SCID mice (%)

	CD34 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD33 <sup>+</sup>	CD71 <sup>+</sup>
Fresh CD34 <sup>+</sup> cell	12.97	0.30	52.34	2.81	1.20
Fresh mixed cells	11.62±1.53	0.27±0.05	48.45±4.05	2.9±0.31	2.81±0.35
Fresh CD34 <sup>-</sup> cell	0.55	0.02	0.17	0.02	0.02

此外, 对各实验组中存活的小鼠骨髓和脾脏细胞集落形成能力进行了检测, 结果发现, 移植 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠, 其骨髓和脾脏细胞的 CFC 集落密度相近, 均远远高于移植 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠(见表 4)。进一步说明了 CD34<sup>+</sup>细胞可以在小鼠体内植入并分化成各系造血细胞, 而 CD34<sup>-</sup>细胞不具备支持小鼠恢复造血的能力。

表 4 NOD/SCID 小鼠骨髓和脾脏细胞的集落密度  
Table 4 Colony formation of bone marrow and spleen cells in NOD/SCID mice

	Colonies/10 <sup>5</sup> cells		
	Fresh CD34 <sup>+</sup> cells	Fresh mixed cells	Fresh CD34 <sup>-</sup> cells
Bone marrow	74.5±2.1	94±8.49	2±1.41
Spleen	1.5±0.7	3±1.41	ND

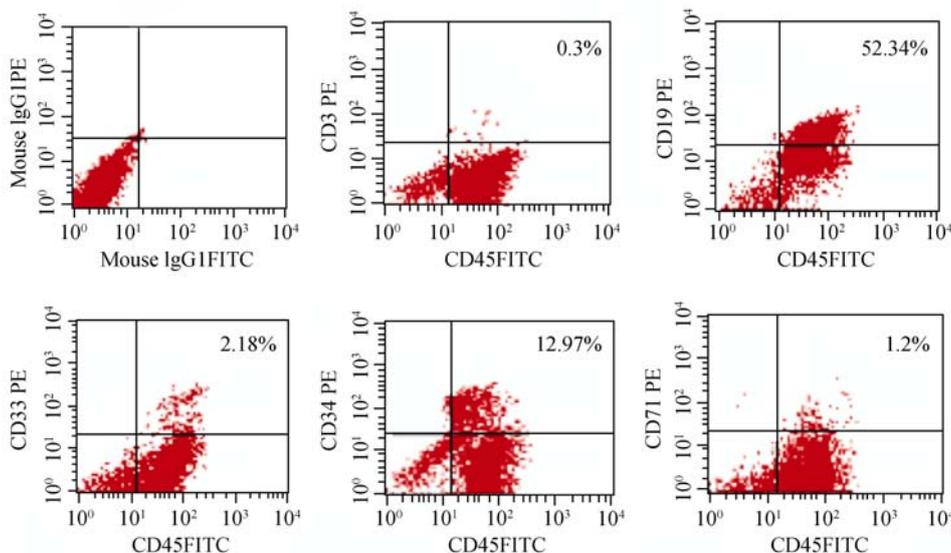


图 2 输注 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠骨髓中各系人源造血细胞的百分含量

Fig. 2 Human multilineage engraftment in bone marrow of NOD/SCID mice injected with fresh CD34<sup>+</sup> cells

### 2.2 培养后 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞植入和造血重建能力检测

进一步比较扩增后 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞植入和造血重建能力,取 3 份脐血,分别以单个核细胞为起始细胞,按 1.3 所述方法进行体外培养,实验结果如图 3 所示。其中,总细胞、CD34<sup>+</sup>细胞和集落形成细胞扩增倍数的均值分别为 1.33 倍、2.05 倍和 1.78 倍。

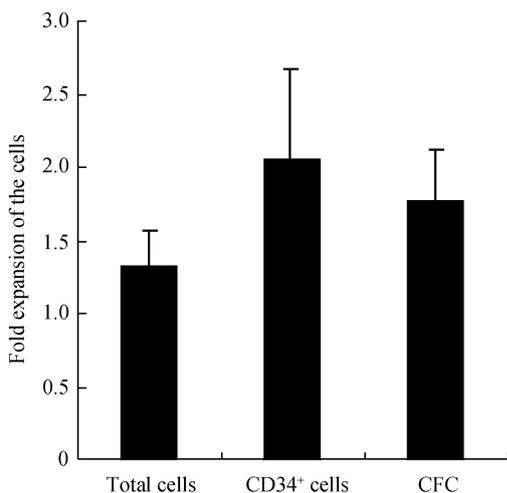


图 3 培养 7 d 时细胞的扩增倍数  
Fig. 3 The fold expansion of the cells at day 7

从培养物中分离出 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞,将经半致死剂量照射的 NOD/SCID 小鼠分为 4 组,对照组小鼠每只注射 0.3 mL IMDM 培养基(Control),实验 1 组小鼠每只注射 4×10<sup>5</sup> 个 CD34<sup>+</sup>细胞(Cultured CD34<sup>+</sup> cells);实验 2 组小鼠每只注射 5×10<sup>6</sup> 个 CD34<sup>-</sup>细胞(Cultured CD34<sup>-</sup> cells);实验 3 组小鼠每只注射 4×10<sup>5</sup> 个 CD34<sup>+</sup>细胞和 5×10<sup>6</sup> 个 CD34<sup>-</sup>细胞(Cultured mixed cells)。

NOD/SCID 小鼠接受细胞移植 6 周后,对照组和输注培养后的 CD34<sup>-</sup>细胞的小鼠全部死亡;输注培养后的 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠存活率为 66.7%;输注混合细胞的小鼠全部存活(见表 5)。可见,培养后的 CD34<sup>-</sup>细胞不支持 NOD/SCID 小鼠的存活,但与 CD34<sup>+</sup>细胞同时输注有助于提高小鼠的存活率。

为评价培养后脐血细胞在 NOD/SCID 小鼠体内的植入能力,采用流式细胞术检测了存活小鼠体内 CD45<sup>+</sup>细胞的含量,结果如表 6 所示。在输注培养后 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠体内都能检测到较高含量的 CD45<sup>+</sup>细胞,两组小鼠在外周血和骨髓中

检测到的数据相近,说明培养后的 CD34<sup>+</sup>细胞仍具有良好的体内植入能力,且 CD34<sup>-</sup>细胞对 CD34<sup>+</sup>细胞在体内的植入没有产生显著影响。

表 5 照射 6 周后 NOD/SCID 小鼠的存活数量  
Table 5 The number of survival NOD/SCID mice irradiated after 6 weeks

	2 weeks	3 weeks	6 weeks
Control	0/4	0/4	0/4
Cultured CD34 <sup>+</sup> cells	3/3	2/3	2/3
Cultured CD34 <sup>-</sup> cells	3/5	0/5	0/5
Cultured mixed cells	3/3	3/3	3/3

表 6 NOD/SCID 小鼠体内人源细胞的百分含量  
Table 6 Levels of human engraftment in NOD/SCID mice

	The proportions of human CD45 <sup>+</sup> cells (%)		
	Spleen	Bone marrow	Peripheral blood
Cultured CD34 <sup>+</sup> cells	40.4±3.28	81.3±3.15	32.3±12.03
Cultured mixed cells	24.62±0.54*	78.74±4.77	40.8±9.02

\* indicates experiments group showed a statistically significant difference compared with cultured CD34<sup>+</sup> cells (P<0.05)

检测存活的 NOD/SCID 小鼠的骨髓细胞中人源特异性 Alu 序列,结果如图 4 所示。在所有存活的 NOD/SCID 小鼠体内都能检测到 Alu 序列,证明了培养后的人 CD34<sup>+</sup>细胞仍具有在小鼠体内的植入能力。

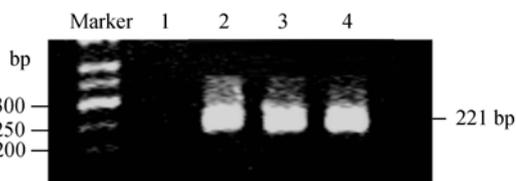


图 4 NOD/SCID 小鼠骨髓细胞中人源特异性 Alu 序列的表达

Fig. 4 The expression of human Alu sequences in DNA extracted from bone marrow cells of NOD/SCID mice  
1: cells of the mice injected with the same volume IMDM; 2: human cord blood cells; 3: cells of the mice injected with cultured CD34<sup>+</sup> cells; 4: cells of the mice injected with cultured mixed cells

进一步检测 NOD/SCID 小鼠骨髓中各系人源血细胞的含量,以评价输注细胞的多系造血重建能力,结果见表 7。发现在存活 NOD/SCID 小鼠骨髓中均能检测出人 CD34、CD3、CD19、CD33 和 CD71 细胞,且移植培养后 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠骨髓中各系人源造血细胞的比例与移植混合细胞的小鼠相近,无显著差异,表明培养后 CD34<sup>+</sup>细胞仍可在小鼠体内实现多系造血。

表 7 NOD/SCID 小鼠骨髓中各系人源造血细胞的百分含量 (%)

Table 7 The co-expression of lineage markers in the CD45<sup>+</sup> population of bone marrow in NOD/SCID mice (%)

	CD34 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD33 <sup>+</sup>	CD71 <sup>+</sup>
Cultured CD34 <sup>+</sup> cells	79.66±2.96	1.23±0.55	0.42±0.26	0.6±0.18	0.41±0.20
Cultured mixed cells	72.25±8.58	0.31±0.27	0.23±0.10	0.21±0.16	0.61±0.72

通过对 NOD/SCID 小鼠骨髓和脾脏细胞体外造血集落形成单位的检测, 比较了两组 NOD/SCID 小鼠骨髓和脾脏细胞的集落形成能力, 结果如表 8 所示。移植培养后的 CD34<sup>+</sup>细胞和混合细胞的小鼠, 其骨髓和脾脏细胞都可以在体外形成集落, 且两者的集落密度相近, 进一步证明了扩增后的 CD34<sup>+</sup>细胞具有在小鼠体内重建多系造血的能力, 且扩增后的 CD34<sup>-</sup>细胞对 CD34<sup>+</sup>细胞在小鼠体内的重建造血没有产生显著影响。

表 8 NOD/SCID 小鼠骨髓和脾脏细胞的 CFC 密度

Table 8 Colony formation of bone marrow and spleen cells in NOD/SCID mice

	Colonies/10 <sup>5</sup> cells	
	Bone marrow	Spleen
Cultured CD34 <sup>+</sup> cells	71.5±9.19	1.75±0.35
Cultured mixed cells	67.33±3.06	3.50±1.50

### 3 讨论

目前, 造血干细胞通常被认为是表达 CD34 阳性和各系阴性<sup>[4]</sup>, 而近年来也有研究表明, 存在 CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>的造血干细胞群体<sup>[11]</sup>, 可能是更原始的造血干细胞, 关于 CD34<sup>+</sup>细胞前体的存在和本质问题仍有待探讨。通过对新鲜脐血中 CD34<sup>+</sup>和 CD34<sup>-</sup>细胞的生理功能的比较, 可以看出新鲜分离的 CD34<sup>+</sup>细胞能在 NOD/SCID 小鼠体内植入, 并且分化成各系血细胞, 在小鼠体内重建造血, 而 CD34<sup>-</sup>细胞不具备植入和重建造血能力。另外, 当 CD34<sup>-</sup>细胞与 CD34<sup>+</sup>细胞同时输入小鼠体内时, 在小鼠体内的植入和造血重建水平与 CD34<sup>+</sup>细胞相近, 但 NOD/SCID 小鼠的存活率高于单独移植 CD34<sup>+</sup>细胞的小鼠, 这可能是由于 CD34<sup>+</sup>细胞在体内分化成各系血细胞需要一定的时间, 在细胞移植初期, CD34<sup>-</sup>细胞中较成熟的细胞可以在短时间内对支持小鼠存活起到辅助作用, 而小鼠的长期存活则取决于 CD34<sup>+</sup>细胞在体内的自我更新和分化能力。因此, 虽然 CD34<sup>-</sup>细胞自身不具备植入和重建造血能力, 但对 CD34<sup>+</sup>细胞在体内发挥生理功能具有一定的辅助作用。

考虑到经体外培养后的造血干/祖细胞的生物学特性可能会发生一些变化, 会影响其在体内的生理功能<sup>[10]</sup>, 为此本试验还评价了培养后的 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞在体内植入和造血重建能力。结果发现培养的 CD34<sup>+</sup>细胞在体内仍然具有生理功能, 可成功植入小鼠体内并能分化成各系血细胞, 实现造血重建。同时移植培养后 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞到小鼠体内, CD34<sup>-</sup>细胞不影响 CD34<sup>+</sup>细胞在体内的植入和重建造血能力, 但能提高小鼠的存活率。这与新鲜分离的细胞结果相一致。

可见, 无论是新鲜分离还是培养的 CD34<sup>+</sup>细胞均具有在 NOD/SCID 小鼠体内植入和重建造血能力, 而 CD34<sup>-</sup>细胞不具有该能力, 但 CD34<sup>-</sup>细胞与 CD34<sup>+</sup>细胞同时输注有助于提高小鼠的存活率, 说明其对 CD34<sup>+</sup>细胞在小鼠体内发挥植入和造血重建能力有一定的辅助作用。

### REFERENCES

- [1] Yao CL, Chu LM, Hsieh TB, *et al.* A systematic strategy to optimize *ex vivo* expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Exp Hematol*, 2004, **32**(8): 720-727.
- [2] Guzman PF, Rodriguez MG, Mayani H. *In vivo* proliferation, expansion and differentiation of a CD34<sup>+</sup> cells- enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch Med Res*, 2002, **33**(2): 107-114.
- [3] Foraz N, Pettengell R, McGuckin CP. Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for *ex vivo* expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells*, 2004, **22**(1): 100-108.
- [4] Wang J, Kimura T, Asada R, *et al.* Scid-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34<sup>-</sup> cells accrued by intra-bone marrow injection. *Blood*, 2003, **101**(8): 2924-2931.
- [5] Osawa M, Hanada K, Hmada H, *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 1996, **273**(5272): 242-245.
- [6] Nauta AJ, Krusselbrink AB, Lurvink E, *et al.* Enhanced engraftment of mbilical cord blood-derived stem cells in NOD/SCID mice by cotransplantation of a second unrelated cord blood unit. *Exp Hematol*, 2005, **33**(10): 1249-1256.

- [7] Rocha V, Cornish J, Sievers EL, *et al.* Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 2001, **97**(10): 2962–2971.
- [8] van Hensbergen Y, Schipper LF, Brand A, *et al.* *Ex vivo* culture of human CD34<sup>+</sup> cord blood cells with thrombopoietin (TPO) accelerates platelet engraftment in a NOD/SCID mouse model. *Exp Hematol*, 2006, **34**(7): 943–950.
- [9] Jaroscak J, Goltry K, Smith A, *et al.* Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo* expanded UCB cells: results of a phase I trial using the AastromReplicell system. *Blood*, 2003, **101**(12): 5061–5067.
- [10] Law P, Traylor L, Recktenwald DJ. Cell analysis for hematopoietic stem/progenitor cells transplantation. *Cytometry*. 1999, **38**(2): 47–52.
- [11] Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of *ex vivo* expanded human CD34<sup>+</sup> cord blood cells. *Exp Hematol*, 2000, **28**(12): 1470–1480.
- [12] Danet GH, Lee HW, Luongo JL, *et al.* Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells after *ex vivo* expansion. *Exp Hematol*, 2001, **29**(12): 1465–1473.
- [13] Xu MJ, Tsuji K, Ueda T, *et al.* Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. *Blood*, 1998, **92**(6): 2032–2040.
- [14] Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, *et al.* Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells *in vivo*. *Blood*, 1996, **88**(11): 4102–4109.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 太湖蓝藻的历史发展与水华灾害（精装）

谢平 著

978-7-03-022291-6 ¥98.00 2008年8月25日出版

本书是一部从淡水生态学、环境地球化学、遥感、水动力学等视点分析太湖蓝藻的历史发展与水华灾害的专著。全书共分为10章，第一章描述太湖蓝藻的历史演变和空间格局，第二章介绍太湖湖水和水产品中蓝藻的次生代谢产物——微囊藻毒素（CMC）的污染现状，第三章描述太湖沉积物中的氮、磷分布格局，第四章介绍氮、磷输入和太湖湖水中TN和TP浓度的历史变化和未来趋势，第五章分析“引江”是否真能“济太”，第六章描述2007年无锡贡湖水厂取水口污染事件，第七章讨论2007年太湖整体水环境是否发生了巨变，第八章描述贡湖湾生态系统的灾变历程，第九章分析侵袭贡湖水厂取水口的污水团为何物、来自何方，第十章讨论拿什么来拯救太湖。本书重点在2007年无锡贡湖水厂出现的水污染事件之谜，试图分析拿什么拯救太湖以及何时能使太湖摆脱蓝藻威胁。

本书可供湖泊学、环境生物学、环境地球化学、水环境工程、藻类学、生态学、生态水文学、水环境遥感、水产学等相关领域的研究人员和管理人员、大专院校师生参考。



### 青藏高原维管植物及其生态地理分布（精装）

吴玉虎 著

978-7-03-020584-1 ¥280.00 2008年8月25日出版

本书是以整个青藏高原主体（横断山区除外）范围为研究区域的植物系统分类学专著。详细列举了研究区内目前所知的每一维管植物科、属、种的中文、拉丁文名称，每一属、种的原始文献，每种的原产地精确到县级，包括海拔范围的生态环境，国内外地理分布等。

本书可供植物学、农林学、地理学以及环境和资源等相关学科的工作者以及大专院校相关专业师生在研究、教学、生产、应用和科学传播等方面参考。



### 华东鸟类物种和亚种分类名录与分布（精装）

朱曦 姜海良 吕燕春 著

978-7-03-022157-5 ¥70.00 2008年8月25日出版

本书是一部我国华东鸟类分类系统，以及种和种下分类与分布的专著。全书共收录华东鸟类661种498亚种，隶属22目，84科293属。书中给出了每个种的中文名和英文名，以及种和亚种的拉丁学名、分布区（省、市、县）。书末附有华东鸟类文献，以及拉丁学名、英文名和中文名索引，以便读者检索。

本书可供从事鸟类学研究和教学、农业、林业、环境保护、航空鸟击防治、卫生防疫、野生动物管理、进出口贸易、商检、司法、海关、工商行政管理等领域的专业人员使用，也可供大专院校有关专业的师生参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>