

# 脐血干细胞与创面修复

罗 瞳 李利平

(南华大学附属第一医院烧伤整形外科 湖南 衡阳 421001)

摘要 脐血干细胞是一类具有多向分化潜能的原始祖细胞,具备自我更新和增殖的能力,在特定条件诱导下可以分化为不同细胞,逐渐作为临床组织工程的来源细胞。近年来随着对脐血干细胞的不断研究,发现其在创面修复中具有明显的优势,成为创面临床治疗的一条新途径。本文从脐血干细胞的生物学特性、采集与冻存、体外扩增等方面对创面修复的研究进行综述。

关键词 脐血干细胞 创面修复 扩增

中图分类号 R813 R62 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)05-986-03

## Umbilical cord blood stem cell and wound repair

LUO Tong, LI Li-ping

(Dept. of Burns and plastic Surgery, The 1st Affiliated Hospital, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

ABSTRACT: Umbilical cord blood stem cells is a class of multi-differentiation potential of primitive progenitor cells, with the ability of self-renewal and proliferation, under certain conditions can be induced to differentiate into different cells, and gradually as the source of cells in clinical tissue engineering. In recent years, with the continuously research in umbilical cord blood stem cells, it has obvious superiority in the wound repair, and has become a new way of wound clinical treatment. This article will simply review the research in wound repair from umbilical cord blood stem cell biology, collection and freeze-stored, amplification in vitro etc.

Keywords: Umbilical cord blood stem cells; Wound repair; Amplification

Chinese Library Classification(CLC): R813 R62 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)05-986-03

如何有效的对创面进行修复(如大面积烧伤、创伤、糖尿病、褥疮等造成的皮肤正常组织结构和完整性的破坏而形成的创面)是目前创面临床治疗的难点。脐血干细胞是一类具有与骨髓干细胞相同的多向分化潜能的原始祖细胞,具有良好的多向分化潜能、活跃的增殖特性,能够在特定因素的诱导下,向各种细胞或组织分化<sup>[1]</sup>。近年来,随着对脐血干细胞研究的深入,国内外学者认为,通过脐血干细胞移植修复创面,可以较好的解决皮源供给以及皮肤结构、功能重建等问题。本文主要对近年来脐血干细胞与创面修复研究进展做一综述。

### 1 脐血干细胞生物学特性

脐血又称胎盘血或脐带血,是胎儿出生时经结扎脐带断脐,通过脐静脉穿刺或切开引流收集到的脐带内和胎盘近胎儿一侧血管内的血液。脐血中含有丰富的干细胞和前体细胞,其主要包含造血干细胞和间质干细胞。脐血干细胞具有很强的增殖、分化及形成集落的能力,受到刺激进入细胞周期的速度及对各种造血刺激因子的反应能力,均高于骨髓和外周血细胞,在适当的诱导条件下这些细胞可以多向分化为间质谱系内的各种细胞,如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和骨骼肌细胞,跨

系分化为外胚层的神经细胞,内胚层的肝细胞。CD34 分子是一种跨膜的唾液黏蛋白一直被视为干细胞的标志,脐血中 CD34<sup>+</sup> 数量占有核细胞数的 0.3%,占单个核细胞数的 0.36%-0.6%,少于骨髓中的比例(1.04%和 1.63%-3.11%),明显多于外周血(0.1%)<sup>[2,3]</sup>。因为早期造血前体细胞 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>和 CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>亚群比例高于骨髓和外周血,这提示这类细胞具有更强的增殖和分化能力<sup>[4]</sup>。脐血免疫系统相对不成熟,虽然脐血淋巴细胞数明显高于成人外周血,但脐血中 T 淋巴细胞比较原始,更具有幼稚性,免疫原性较弱,细胞毒性较低,发生移植物抗宿主病(GVHD)反应较少<sup>[5]</sup>。

### 2 脐血干细胞的采集与冻存

脐血的采集方法是在产妇分娩时,距新生儿脐部 5.0-7.0cm 处,用两把血管钳夹住脐带,随后在两钳中间断脐,暂不娩出胎盘,下垂结扎的脐带,消毒后以采血袋针刺胎盘侧脐静脉,伴随产妇产宫收缩,脐血直接流入 CPD 或 ACD 抗凝的采血袋中,轻轻摇匀,为了增加采集血,可以轻轻挤压胎盘及脐带。每份脐血采集的量约 60~120 mL,其中单个核细胞约为 1.6×10<sup>7</sup>/mL。脐血采集后进行生物学检测(活细胞计数、单个核细胞计数、CD34<sup>+</sup>计数、CFU-GM 计数等)、细菌污染检查、血型及 HLA 分型检测、血清学病毒检查(艾滋病病毒、巨细胞病毒、肝炎病毒、弓形体病毒等)以及遗传疾病的检测<sup>[6]</sup>。采集脐血后应及时分离并使用,最好在前 3 天进行分离和使用。目前最常采用沉降法来清除红细胞,并经密度梯度离心分离浓集有核细胞,减少脐血体积,再在经过计数、加工等步骤,最终冻存于 -196℃ 的液氮中保存。

作者简介:罗瞳(1982-),男,汉,研究生,医师, Tel:13787798170, E-mail:siweimutong@126.com

李利平,(1959-),男,汉,汉族,整形外科主任,教授,硕士生导师,加拿大访问学者,主任医师 Tel:13575259328, E-mail:drlpl@vip.sina.com

(收稿日期 2010-11-13 接受日期 2010-12-06)

### 3 脐血干细胞的体外扩增

目前研究较多的是应用体外无基质液体培养体系扩增纯化的 CD34<sup>+</sup>细胞或其亚群 CD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、HLA<sup>+</sup>、DR<sup>-</sup> 等。脐血干细胞的体外扩增与其内在特性如细胞亚群的生物学特性和外在因素均有关系<sup>[7]</sup>。

#### 3.1 细胞因子的合理组合

细胞因子在扩增中起着关键的作用,因此必须加入合适的细胞因子,干祖细胞才能有效增殖。目前的培养体系均为多种细胞因子联和应用。邱录贵等<sup>[8]</sup>应用 SCF+ IL-1 $\beta$ 、IL-3、IL-6、G-CSF、TPO+FL 扩增纯化脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞效果良好。这几种因子的组合有利于保持原始细胞的自我更新和增殖能力,并且在一定程度上抑制了分化,是扩增巨核细胞系、粒系祖细胞同时维持其体外活增殖潜能的最佳组合之一。经过 1 周培养后,能够实现各阶段的造血细胞均得到不同程度的扩增<sup>[9,10]</sup>: NC 总数扩增 100 倍,CD34<sup>+</sup> 细胞总数扩增 4.4 倍。SCF 又称为 c-kit 配体在早期造血调控中发挥重要作用,可以与 IL-3、GM-CSF 等发挥协同作用。FL 是 flt3/flk2 配体,对早期 HSC 的增殖、自我更新具有重要的调节作用。TPO 是 c-mpl 的配体,亦称巨核细胞生长发育因子,它能在体外刺激 CFU-MK、成熟巨核细胞以及血小板的生长分化。

#### 3.2 培养基的选择

培养基是维持体外细胞生存和生长的基本条件,是组织细胞培养的重要因素。培养基的选择直接影响细胞的扩增速度。培养液的条件:传统培养基多用含动物血清的培养基,最常用的是胎牛血清(FCS)。由于动物血清含有异种蛋白,容易导致变态反应可能增加病毒感染的危险,因此富含白蛋白、脂蛋白和转铁蛋白的无血清培养基近年来被广泛应用<sup>[11]</sup>。LamAC 等<sup>[12]</sup>研究显示无血清培养基 QBSF-60 (Quality biological) 和 stemspan SFEM (stem cell Technologies) 能支持早期祖细胞和 CFCs 的扩增,研究显示 CFU-GM 高达 407 倍,CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 细胞高达 330 倍,CFU-GEMM 高达 248 倍,BFU/CFU-E 可达 144 倍。

### 4 脐血干细胞与创面修复

创面修复是机体通过自身的再生能力,恢复其表面的完整性和连续性、维持内环境稳定的一系列复杂而有序的生物学过程。其本质是以干细胞为主,其主要来源于创面残存、血循环等部位,包括成内皮细胞、角质细胞等修复细胞在创面不断生长、扩增,进而完成对创面的修复<sup>[13]</sup>。脐血干细胞尤其是脐血间充质干细胞,与骨髓来源的间充质干细胞相比,具有更原始、更接近胚胎干细胞,有更大的分化潜能的优点,而且其免疫原性低,只表达少量的主要组织相容性复合体(MHC) Ⅱ型分子,极少表达或不表达 MHC Ⅱ型或 B7 共刺激分子,因此在临床创面修复中具有重要的应用价值。

作为组织工程的一种新型种子细胞脐血间充质干细胞在临床创伤修复方面的价值日益引起国内外学者的重视。脐血间充质干细胞虽然来源于中胚层,但在特定条件下,按照需要可分化为各胚层的多种细胞或组织,因此广泛用于肌肉、骨及软骨等缺损的修补。国外有文献报道<sup>[14]</sup>,脐血间充质干细胞在经

过维甲酸、角质细胞生长因子诱导下通过特殊培养方式,将其移植入 scid 小鼠体内,通过一段时间的观察发现中可见角蛋白和人囊性纤维化跨膜调节因子少量表达在小鼠气道上皮细胞中。在组织缺血损伤方面,Koponen 等<sup>[15]</sup>用脐带血分离出造血干细胞和间充质干细胞,在经过体外转染 VEGF-D/eGFP 后,移植入肌肉缺血模型的裸鼠体内。结果显示脐血祖细胞对缺血肌肉的再生有促进作用,尽管它们并不直接参与血管再生和肌形成,但是间接的提高了肌肉的再生能力。另有实验表明,在动物脊索损伤部位直接注射血 MSC 后,通过磁共振、体感诱发电位等方式对治疗效果进行评价。结果显示移植组动物的脊索修复效果及神经传导功能明显优于对照组,提示在治疗脊索损伤方面脐带血 MSC 移植可以作为一种新途径<sup>[16]</sup>。

在探索把脐血间充质干细胞作为种子细胞构建皮肤创面修复的研究中,韩冰教授等<sup>[17]</sup>人的研究表明:烧伤大鼠血清内含有的因子在诱导 MSCs 同时能向表皮细胞和血管内皮细胞两个方向分化。提示 MSCs 可能参与了组织损伤后的修复过程。如得到进一步证实,则 MSCs 必将因为具有在体外易于扩增、导入外源基因比较方便而且能长期稳定表达的优点而在创伤修复和组织工程方面发挥不可估量的作用。国内有学者<sup>[18]</sup>发现,在体外分离培养人脐带血 MSC,用绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP 转染并用 PKH26 标记示踪,通过流式细胞技术筛选 eGFP(+)/PKH26(+)细胞,然后注入受伤的 Balb/C 裸鼠体内。2 周后发现一定数量 eGFP(+)/PKH26(+)细胞在受者皮肤组织内被检测到,在经 sry 基因(Y 染色体性别决定区)和 HLA-1 检测进一步证实了在经济带血 MSC 定位的受者小鼠皮肤组织内,有角蛋白(K)8 和 K10 的表达,且证实了在创面再生皮肤附件的形成中有部分供体细胞参与了此过程。表明在皮肤损伤条件下的创面微环境中脐血间充质干细胞在体内可以被诱导并且能趋化至创面并向上皮细胞分化,进而促进上皮的再生,加快创面愈合速度,改善创面愈合质量,成为临床治疗损伤创面的一种新的细胞来源。

### 5 展望

随着人们对创面修复质量要求的不断提高,如何使受创组织从解剖修复到功能修复已成为当前组织修复中需要解决的重要问题。脐血干细胞相比具有来源丰富、采集简便的优势,并且脐血中含有丰富的间充质干细胞,且更为原始,具有更强的分化能力,免疫源性较低等特性<sup>[19]</sup>。总之,应用脐血干细胞促进创面修复是一种非常有应用前景的方法,但是其具体机制还有待于进一步研究,近、远期安全性问题,包括致瘤性、免疫排斥反应等以及引发的社会伦理方面的争议等亟待有效的解决方案,脐血干细胞应用于临床还有待进一步完善。

#### 参考文献(References)

- [1] JIN Yu, SHAN Gen-fa, ZHONG Hong. Research evolution of umbilical cord blood stem cells. [J]. Acta Universitatis Medicinalis Secondae Shanghai, 2004, 24(5): 389-391
- [2] CHEN Xiao-lan, HUANG Ren-bin, TANG Yin-juan, et al. Isolation and Culture of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood in Vitro [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice, 2006, 11(12): 921-922

- [3] Confer D, Robinett P. The US National donor program role in unrelated donor hematopoietic cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2008, 42(S3): S3-S5
- [4] Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, et al. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs [J]. Vet Sci, 2007, 8(3): 275-282
- [5] Li Fang-lan. Basic research and clinical application of umbilical cord blood stem cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(43): 8553-8556
- [6] Hows JM, Marsh JCW, Bradley BA, et al. Human cord blood: a source of transplantable stem cells? [J]. Bone Marrow Transplantation, 2006, 9: 109-113
- [7] JING Qiang, XIONG Xiao-hui, XIONG Qiang, et al. Study on preservation and ex vivo expansion of umbilical cord blood hematopoietic cells [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2004, 3(2): 46-55
- [8] Broxmeyer H.E. Chemokines in hematopoiesis [J]. Curropin Hematol, 2008, 15(1): 49-58
- [9] Bieback K, Kern S, Kluter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood [J]. Stem Cells, 2004, 22(4): 625-634
- [10] Harris DT, Rogers I. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007, 2(4): 301-9
- [11] Valbonesi M, Giannini G, et al. Cord blood (CB) stem cells for wound repair. Preliminary report of 2 cases [J]. Transfus Apher Sci, 2004, 30(2): 153-6
- [12] Lam AC, Li K, Zhang XB, et al. Preclinical Ex vivo Expansion of Cord Blood Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Duration of Culture, the Media, Serum Supplements, and Growth Factors Used; and Engraftment in NOD/SCID Mice [J]. Transfusion, 2001, 41 (12) : 1567-1576
- [13] Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, et al. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood [J]. Stem Cells, 2004, 22(4): 617-624
- [15] Buchheiser A, Liedtke S, Looijenga LH. Cord blood for tissue regeneration [J]. J Cell Biochem. 2009, 108(4): 762-8 2009
- [16] Koponen JK, Kekkarainen T, et al. Cord Blood-derived progenitor cells enhance muscle regeneration in mouse hindlimb ischemia Model [J]. Mol Ther, 2007, 15(12): 2172-2177
- [17] Veeravalli KK, Dasari VR, et al. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury [J]. Neurobiol Dis, 2009, 36(1): 200-12
- [18] Han Bing, Fu Xiao-bing, Chen Wei, et al. Dynamic effects of serum from burned rats on the gene expression of marrow mesenchymal stem cells [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(37): 7-10
- [19] Dai Y, LIJ et al. Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cell [J]. Burns, 2007, 33(4): 418-428
- [20] Li LH, Zheng LB. Perspective application of umbilical cord blood stem cells and placenta derived mesenchymal stem cells in gynaecology and obstetrics [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 15(11): 2940-2943