

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0037-05

· 论 著 ·

胎肝 AFT024 细胞对脐血 CD34⁺ 细胞体外扩增及多药耐药基因转染的影响

张华玲, 温泽清, 兰守敏, 李长忠, 李建峰(山东大学山东省立医院妇科, 济南 250021)

[摘要] **目的:** 探讨胎肝 AFT024 细胞对人类脐血造血干细胞体外扩增的作用及对多药耐药基因(*MDR1*)转染效率的影响。**方法:** 应用 AFT024 细胞支持下体外长期培养的方法将人类 *MDR1* 基因转入脐血 CD34⁺ 细胞, 观察细胞扩增倍数来检测 AFT024 细胞对造血干/祖细胞的扩增能力, 采用 RT-PCR、流式细胞术及耐药集落检测的方法测定基因转染效率、P-糖蛋白(P-gp)的表达及其功能活性。**结果:** (1) 培养 21 d 后 AFT024 细胞对有核细胞总数(TNC)的扩增没有明显作用, 但 CD34⁺ 细胞和集落形成细胞(CFC)的扩增倍数[(37.9 ± 13.9) 倍和 (27.1 ± 13.3) 倍]均明显高于对照组[(9.1 ± 2.3) 倍和 (7.7 ± 3.6) 倍], 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。(2) RT-PCR 法可在 AFT024 组的转染细胞中检测到较高的 *MDR1* mRNA 水平, AFT024 组基因转染效率(46.0%)明显高于对照组(15.2%); 两组 P-gp 的表达分别为 $(31.7 \pm 10.2)\%$ 和 $(12.6 \pm 3.9)\%$; Rhodamine-123 排出试验显示, 具有 P-gp 功能活性的细胞分别为 $(35.5 \pm 11.4)\%$ 和 $(16.6 \pm 3.2)\%$, 组间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:** AFT024 细胞具有较强的扩增造血干/祖细胞的能力, 并能明显提高 *MDR1* 基因在脐血 CD34⁺ 细胞中的转染效率。

[关键词] 胎肝细胞; 多药耐药基因; 人类造血干细胞; 基因转染; 体外扩增

[中图分类号] R730 **[文献标志码]** A

Effect of fetal liver AFT024 cells on multidrug resistant gene 1 transfection efficiency and *in vitro* expansion of CD34⁺ cells derived from umbilical cord blood

ZHANG Hua-ling, WEN Ze-qing, LAN Shou-min, LI Chang-zhong, LI Jian-feng(Department of Gynecology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of fetal liver AFT024 cells on the transfection efficiency of multidrug resistant gene 1 (*MDR1*) and the *in vitro* expansion of CD34⁺ cells derived from umbilical cord blood. **Methods:** CD34⁺ cells were isolated from human umbilical cord blood by MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit and co-cultured with AFT024 cells (AFT024 group) or cultured alone (control group) for 7 days. During the subsequent 14 days, retrovirus carrying *MDR1* gene was supplemented twice a week to transfect CD34⁺ cells. On the 7th, 14th and 21st day after culture, the number of total nucleated cells (TNC) was counted, the ratio of CD34⁺ cells was assayed by flow cytometry (FCM) and the number of CD34⁺ cells was calculated, and colony-forming cells (CFC) were counted by methylcellulose cultures. RT-PCR method was used to detect the level of *MDR1* mRNA in the transfected cells. The expression and function of P-glycoprotein (P-gp) were evaluated by FCM assay and Rhodamine-123 efflux assay, respectively. The gene transfection efficiency was calculated by drug-resistant colony-forming cells assay. **Results:** (1) The *MDR1* mRNA level in AFT024 group than that in control group. The gene transfection efficiency in AFT024 group was significantly higher than that in control group (46.0% vs 15.2%, $P < 0.01$). The expressions of P-gp in AFT024 group and control group were $(31.7 \pm 10.2)\%$ and $(12.6 \pm 3.9)\%$, respectively ($P < 0.01$). P-gp efflux functions in AFT024 group and control group were $(35.5 \pm 11.4)\%$ and $(16.6 \pm 3.2)\%$, respectively ($P < 0.01$). (2) On the 7th day, the expansion folds of TNCs cells, CD34⁺ cells, and CFCs in control group were slightly higher than those in AFT024 group ($P > 0.05$). On the 14th day, the expansion fold of TNCs in control group was significantly higher than that in AFT024 group ($P < 0.05$), while the CD34⁺ cells in the AFT024 group were significantly more than those in control group ($P < 0.05$). There was no difference in the expansion folds of CFCs between the 2 groups. On the 21st day, the number of TNCs in

[基金项目] 山东省科学技术发展计划重点项目(No. 023130104)

[作者简介] 张华玲(1978-), 女, 山东省威海市人, 博士研究生, 主要从事妇科肿瘤诊治方面的研究

[通讯作者] 温泽清, E-mail: wenzeqing@hotmail.com

AFT024 group was higher than those in control group ($P > 0.05$). The expansion folds of CD34⁺ cells and CFCs in the AFT024 group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** AFT024 cells can facilitate *MDR1* gene transfection into CD34⁺ cells and improve the expansion of primitive hematopoietic cells *in vitro*.

[**Key words**] fetal liver cell line; multidrug resistant gene; human hematopoietic stem cells; gene transfer; expansion *in vitro*

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(1): 37-41]

化疗是目前治疗恶性肿瘤的重要手段之一,化疗药物杀伤恶性肿瘤细胞的效力在一定范围内与其剂量成正比,但其引起的骨髓抑制反应限制了大剂量化疗药物的应用。研究^[1]表明,人类多药耐药基因(*MDR1*)编码表达的P-糖蛋白(P-gp)可以将多种化疗药物泵出细胞。将*MDR1*基因转入造血干细胞,使之获得耐药表型,可在肿瘤大剂量化疗过程中起到保护骨髓的作用,提高肿瘤的治疗效果^[2]。但目前*MDR1*基因的转染效率不高,其在体内不能得到长期有效的表达,限制了在临床上的应用。本实验采用胎肝AFT024细胞支持下长期转染及扩增培养脐血CD34⁺细胞的体系,探讨AFT024细胞对*MDR1*基因转染效率及对造血干细胞扩增的作用。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

含有*MDR1* cDNA的逆转录病毒载体(pHaMDR1/A)由美国国立癌症研究所Gottesman教授惠赠。双嗜性包装细胞系PA317购于中国科学院上海细胞所,小鼠成纤维细胞系NIH3T3购于山东省医学科学院。小鼠胎肝细胞系AFT024由美国Princeton大学Moore教授惠赠,中国科学院动物研究所生物膜国家重点实验室保存。

1.2 病毒包装细胞的建立

包装细胞PA317加入含10%胎牛血清(FCS)的DMEM培养液,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。按照Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)所述转染方案将pHaMDR1/A导入PA317中,48 h后按1:10传代接种至含150 ng/ml秋水仙碱(Sigma公司)的DMEM培养液中,以后每2~3 d换液1次,连续培养14 d。将筛选出的细胞集落(PA317-HaMDR1)进行扩增并收集培养上清,0.45 μm过滤,离心91 392 × g 2 h,沉淀重悬于含10% FBS的IMDM中,-80℃冻存备用。按文献^[3]的方法测定病毒滴度。

1.3 CD34⁺细胞的分选

脐血样品取自本院产科足月分娩的健康胎儿的脐带,采血后2 h内进行分选。使用Ficoll-paque

plus(Amersham公司)密度梯度离心,将收集的界面单个核细胞利用MACS CD34⁺细胞分离试剂盒(Miltenyi公司)分离出CD34⁺细胞。流式细胞术(Beckman coulter Epics XL)检测CD34⁺细胞纯度,标记抗体为FITC标记的CD34单克隆抗体。

1.4 AFT024细胞的培养

AFT024细胞用含10% FBS、4 mmol/L谷氨酸、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、50 μmol/L 2-巯基乙醇的DMEM培养液,在37℃培养箱中培养。转染前先将AFT024细胞接种于用1%明胶(Sigma公司)包被的24孔细胞培养板中,当细胞生长至70%~80%时以2 000 cGy X射线照射,然后置37℃、5% CO₂的孵箱中待用。

1.5 病毒上清转染CD34⁺细胞

将新鲜分离的1 × 10⁴/ml的CD34⁺细胞接种到置于射线照射过的AFT024细胞滋养层之上的Transwell培养孔(孔径0.4 μm, Costar公司)中,培养体系为含15% FBS、4 mmol/L谷氨酸、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、100 ng/ml重组人干细胞生长因子(rhSCF, R&D公司)、100 ng/ml Flt-3配体(FL, R&D公司)、50 ng/ml重组人白细胞介素-3(rhIL-3, Biosource公司)、20 ng/ml促血小板生成素(TPO, Biosource公司)、10 ng/ml重组人白细胞介素-7(IL-7, R&D公司)的IMDM,在37℃、5% CO₂条件下培养。分别于第7天和第14天传代后进行转染。转染前将transwell培养孔用20 μg/cm²的CH-296(RetroNectin, Takara公司)包被,并与病毒上清共孵育4 h,使病毒与CH-296结合,然后将传代的细胞接种至孔中,仍置于AFT024滋养层之上。每周半量换液并补加病毒上清继续培养至21 d。设无AFT024细胞滋养层作为对照组。

1.6 RT-PCR法检测*MDR1* mRNA在转染细胞中的转录水平

用Trizol试剂(GIBCO/BRL公司)提取细胞总RNA,紫外分光光度计测定纯度并定量。取2.5 μg RNA,用RT-PCR试剂盒(Takara)逆转录成cDNA,行PCR扩增。*MDR1* PCR引物为:5'-CCCAT-CATTGCAATAGCAGG-3', 5'-GTTCAAACCTTCTGCTC

CTCA -3', 扩增产物长度为 157 bp。PCR 扩增反应体系为 25 μ l, 反应条件: 第 1 个循环为 94 $^{\circ}$ C 30 min; 后 35 个循环为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.7 流式细胞术检测转染细胞中 P-gp 的表达

分别收集各组转染前后的细胞, 制成单细胞悬液, 用 PE 标记的 P-gp 单克隆抗体 UIC-2 (Immunotech 公司) 标记后, 流式细胞术检测。

1.8 Rhodamine-123 (Rh-123) 排出试验

分别收集各组转染前后的细胞, 重悬于含 5% FBS 和终质量浓度为 0.2 μ g/ml Rh-123 的 IMDM 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 min, 离心收集细胞, 重悬于 IMDM 全培养液中, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 60 min, 以使细胞能泵出 Rh-123。PBS 洗涤 2 次, 用 1 μ g/ml PI 染色, 排除死细胞, 流式细胞术检测。

1.9 造血祖细胞集落的培养

分别在不含及含紫杉醇 (10 μ g/L) 的甲基纤维素半固体培养体系中测定各组细胞形成集落的能力。甲基纤维素半固体培养体系为: 12.5% FBS、12.5% 马血清、100 ng/ml rhSCF、50 ng/ml IL-3、50 ng/ml 重组人粒系集落刺激因子 (rhG-CSF, R&D 公司)、50 ng/ml 重组人粒-单系集落刺激因子 (rhGM-CSF, R&D 公司)、4 IU/ml 红细胞生成素 (EPO, R&D 公司)、1.3% 甲基纤维素的 IMDM 培养液。按每毫升体系接种 1×10^4 个细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和饱和湿度条件下培养 14 d, 计数造血祖细胞集落形成总数。按下列公式计算基因转导效率。

基因转导效率 (%) = 筛选耐药培养集落总数 / 非筛选耐药培养集落总数 $\times 100\%$

1.10 统计学处理

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS11.5 软件分析, 两样本均数的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 包装细胞系的建立及病毒滴度测定

用脂质体转染法成功将质粒 pHaMDR1/A 导入包装细胞 PA317 中。用含 150 ng/ml 秋水仙碱的培养液培养 14 d 后, 筛选出耐药细胞集落 PA317-HaMDR1。收集培养上清, 检测病毒滴度为 8×10^5 CFU/ml。

2.2 脐血 CD34⁺ 细胞的分选

脐血平均采集量为 100 ml, 密度梯度离心法分离出 4×10^8 个单个核细胞, 经 MACS 免疫磁珠分离系统分选出 4×10^6 个 CD34⁺ 细胞, 流式细胞仪检测

其纯度为 67.5% ~ 92.3%。

2.3 转染细胞中 MDR1 mRNA 的转录水平

RT-PCR 显示, 转染后 CD34⁺ 细胞、包装细胞 PA317-HaMDR1、NIH3T3-HaMDR1 及质粒 pHaMDR1/A 阳性对照均出现 MDR1 cDNA 特异性的 157 bp 扩增条带, 而未转染的 CD34⁺ 细胞无相应的条带。AFT024 转染组的条带灰度明显高于对照组, 表明 AFT024 转染组细胞 MDR1 mRNA 转录水平明显高于对照组 (图 1)。

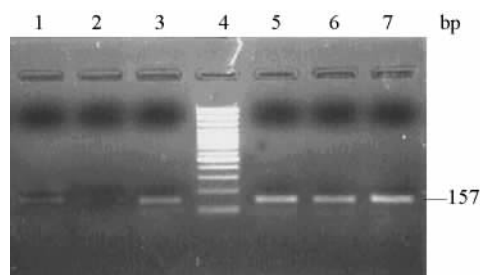


图 1 转染细胞中 MDR1 mRNA RT-PCR 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of MDR1 mRNA amplified by RT-PCR in transfected cells

1: Control group; 2: Untransfected cells; 3: AFT024 group; 4: DNA Ladder; 5: PA317-HaMDR1; 6: NIH3T3-HaMDR1; 7: Plasmid pHaMDR1

2.4 MDR1 基因转染前后 P-gp 蛋白的表达量及其功能活性

转染前 CD34⁺ 细胞 P-gp 表达量为 (3.2 \pm 0.9)%; 转染后 AFT024 组及对照组细胞 P-gp 表达分别增加至 (31.7 \pm 10.2)% 和 (12.6 \pm 3.9)% , 组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Rh-123 排出试验显示, AFT024 组及对照组具有 P-gp 糖蛋白功能活性的细胞分别为 (35.5 \pm 11.4)% 和 (16.6 \pm 3.2)% , 均明显高于转染前细胞的 (5.3 \pm 1.1)% , 组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 AFT024 细胞对 CD34⁺ 细胞体外扩增的影响

培养至第 7 天时, 对照组中有核细胞 (TNC) 总数、CD34⁺ 细胞和集落形成细胞 (CFC) 分别被扩增 (12.1 \pm 2.6)、(2.5 \pm 1.0) 和 (4.5 \pm 1.4) 倍, 而 AFT024 组中 TNC、CD34⁺ 细胞和 CFC 分别被扩增 (8.2 \pm 2.4)、(2.3 \pm 1.1) 和 (3.5 \pm 1.0) 倍, 虽然对照组中 3 种细胞扩增倍数均高于 AFT024 组, 但两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养至第 14 天时, 对照组中 TNC 的扩增倍数 (102.9 \pm 26.6) 仍高于 AFT024 组 (78.9 \pm 16.6), 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此时 AFT024 细胞表现出保持 CD34⁺ 细胞原始造血能力的优势, AFT024 组中

CD34⁺ 细胞和 CFC 分别被扩增了(16.2 ± 7.6)倍和(9.4 ± 4.0)倍,高于对照组的(6.6 ± 2.8)和(6.7 ± 2.1)倍,两组 CD34⁺ 细胞的扩增倍数比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),但两组 CFC 的扩增倍数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。培养至第 21 天时,AFT024 组中的 TNC、CD34⁺ 细胞、CFC 3 种细胞扩增倍数均超过对照组,分别扩增了(145.0 ± 26.8)、(37.9 ± 13.9)和(27.1 ± 13.3)倍,而对照组中 3 种细胞的扩增分别为(132.0 ± 26.7)、(9.1 ± 2.3)和(7.7 ± 3.6)倍,两组 TNC 的扩增倍数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而两组 CD34⁺ 细胞和 CFC 扩增倍数比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),表明 AFT024 细胞具有扩增原始造血细胞、减少分化的作用(图 2)。

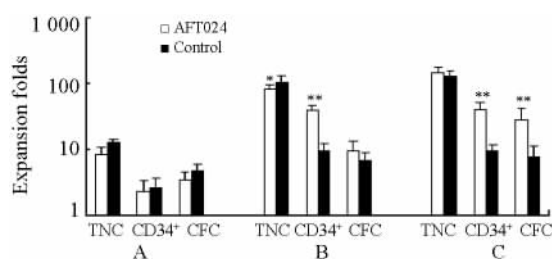


图 2 脐血 CD34⁺ 细胞体外培养后不同时间点 TNC、CD34⁺ 和 CFC 的扩增倍数

Fig. 2 Expansion folds of TNC, CD34⁺, and CFC at different time points after culture of CD34⁺ cells derived from umbilical cord blood

A: Day 7 after culture; B: Day 14 after culture;

C: Day 21 after culture

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

2.6 AFT024 细胞对 CD34⁺ 细胞转染效率的影响

将培养第 21 天的细胞分别在含及不含紫杉醇的甲基纤维素培养液中继续培养 14 d, AFT024 组细胞集落形成能力明显高于对照组,两组细胞的基因转染效率分别为 46.0% 和 15.2%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

自 1990 年 Mclachlin 等^[4]将 *MDR1* 基因导入鼠造血干细胞(HSC)获得成功,众多学者不断尝试使人类 HSC 也获得耐药表型,以使接受移植的肿瘤患者能够接受相对大剂量化疗而不出现骨髓抑制。HSC 具有自我更新及多向分化的能力,是基因转染理想的靶细胞^[5]。在正常情况下,人体 95% 的 HSC 均处于非分裂状态的 G₀/G₁ 期,此时基因转导效率

非常低。如何使大量 HSC 在体外进入分裂期,从而提高 RV 的转染效率,是 *MDR1* 基因转染 HSC 成功的关键问题。

虽然目前可以通过细胞因子刺激和(或)基质细胞共培养等方式促进部分细胞进入分裂周期,提高基因转染效率^[6-7],但体外长时间培养,使大部分 HSC 丧失了干细胞的特征,发生分化或丧失植入机体的能力^[8]。AFT024 细胞是近年纯化的小鼠胎肝细胞株,作为基质滋养层,可以在体外支持造血干细胞自我更新及分化至少 7 周^[9-10],从而成为一种体外模拟的支持造血干细胞的造血微环境。Punzel 等^[11-12]研究发现, AFT024 基质滋养层使脐血 CD34⁺ CD38⁻ 细胞广泛进入细胞周期,而且更多地进行不对称分裂。因此在 HSC 与 AFT024 细胞共培养过程中加入携带有目的基因的逆转录病毒上清,可增加细胞分裂时病毒进入细胞核中的概率,从而可能提高基因转入干细胞的效率。本研究证实了这一点。对照组细胞无 AFT024 细胞滋养层的支持,虽然 *MDR1* 基因也能转入造血干细胞中,但转染效率较低;而实验组在病毒转染后检测到 *MDR1* mRNA 的表达强度明显增高,表达 *MDR1* 基因产物 P-gp 的细胞数明显增多,且 P-gp 具有正常的生物学功能。同时,在含 10 μg/L 紫杉醇的培养基中 AFT024 组耐药集落长势旺盛,转染效率达 46.0%,而对照组仅有几个耐药集落。表明在 AFT024 细胞的支持下 *MDR1* 基因可有效地转入脐血 CD34⁺ 细胞,成功转录并高效地表达具有生物学活性的 P-gp。有学者^[13]应用 AFT024 细胞协同细胞因子预刺激外周血 CD34⁺ 细胞后进行基因转染,也观察到 AFT024 细胞能提高基因转染效率。

脐血造血干细胞具有较强的自我更新、增殖分化和体外扩增潜能^[14-15],而且其来源广、采集方便、移植物抗宿主病(GVHD)发生率低^[16],具有广阔的应用前景。但目前单份脐带血造血细胞数量不足以满足一个成人移植的需要,必须在体外进行扩增。Lewis 等^[17]研究表明 AFT024 细胞可以在体外扩增原始造血祖细胞,而且扩增的细胞仍保持了多向分化的能力。Nolta 等^[18]分别将 AFT024 细胞和人类骨髓基质细胞支持下培养的人类脐血 CD34⁺ CD38⁻ 细胞植入小鼠体内,结果表明, AFT024 细胞能够更好地在体外保持造血干细胞长期移植和多系造血的潜能。本研究中脐血在体外共培养 21 d, AFT024 组和对照组有核细胞总数分别扩增了 150 倍和 132 倍,足以满足临床移植的需要;细胞集落培养证实,培养 21 d 后, AFT024 组集落形成细胞远远高于对

对照组,证明了 AFT024 细胞扩增的造血祖细胞仍具有分化为成熟血细胞的功能。

AFT024 作为基质滋养层能够在体外支持 HSC,一方面是通过与 HSC 直接接触而产生细胞与细胞之间的信息交流^[10];另一方面,更重要的是通过分泌的多种可溶性细胞因子而发挥作用。因此,在非接触培养体系中同样可以观察到 AFT024 细胞对 HSC 原始造血能力的维持^[19-20]。本实验中将 HSC 培养在 Transwell 培养孔中,使 HSC 不直接与 AFT024 细胞接触,结果表明基因转染效率及造血祖细胞扩增能力均取得满意的效果。这种非接触培养方式可以避免鼠细胞混入人类细胞,从而更适合应用于临床实验。

本研究采用 AFT024 细胞作为基质滋养层,体外支持培养转染脐血 CD34⁺ 细胞 21 d,有效地将 *MDR1* 基因转入造血干/祖细胞,而且造血祖细胞得到明显的扩增,为 *MDR1* 基因转染脐血造血干细胞移植保护大剂量化疗患者提供了一种新的策略。

[参 考 文 献]

- [1] Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6(5): 610-617.
- [2] Hanania EG, Fu S, Roninson I, *et al.* Resistance to taxol chemotherapy produced in mouse marrow cells by safety-modified retroviruses containing a human MDR-1 transcription unit [J]. *Gene Ther*, 1995, 2(4): 279-284.
- [3] Kotani H, Newton PB 3rd, Zhang S, *et al.* Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5(1): 19-28.
- [4] Mclachlin JR, Eglitis MA, Ueda K, *et al.* Expression of a human complementary DNA for the human multidrug resistance gene in murine hematopoietic precursor cells with the use of retroviral gene transfer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(15): 1260-1263.
- [5] Halene S, Kohn DB. Gene therapy using hematopoietic stem cells: Sisyphus approaches the crest [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(9): 1259-1267.
- [6] Kiem HP, Andrews RG, Morris J, *et al.* Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor [J]. *Blood*, 1998, 92(6): 1878-1886.
- [7] Ando K, Nakamura Y, Chargui J, *et al.* Extensive generation of human cord blood CD34⁺ stem cells from Lin⁻CD34⁻ cells in a long-term *in vitro* system [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(6): 690-699.
- [8] Thiemann FT, Moore KA, Smogorzewska EM, *et al.* The murine stromal cell line AFT024 acts specifically on human CD34⁺CD38⁻ progenitors to maintain primitive function and immunophenotype *in vitro* [J]. *Exp Hematol*, 1998, 26(7): 612-619.
- [9] Kittler EL, Peters SO, Crittenden RB, *et al.* Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts [J]. *Blood*, 1997, 90(2): 865-872.
- [10] Moore KA, Ema H, Lemischka IR. *In vitro* maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 1997, 89(12): 4337-4347.
- [11] Punzel M, Liu DH, Zhang T, *et al.* The symmetry of initial divisions of human hematopoietic progenitors is altered only by the cellular microenvironment [J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(4): 339-347.
- [12] 刘代红, Punzel M, Ho AD. 造血微环境决定脐血造血干/祖细胞的早期分裂行为 [J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(10): 534-537.
- [13] van der Loo JC, Liu BL, Goldman AI, *et al.* Optimization of gene transfer into primitive human hematopoietic cells of granulocyte-colony stimulating factor-mobilized peripheral blood using low-dose cytokines and comparison of a gibbon ape leukemia virus versus an RD114-pseudotyped retroviral vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(11): 1317-1330.
- [14] Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, *et al.* A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow [J]. *Blood*, 1995, 86(10): 3745-3753.
- [15] Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(7): 526-532.
- [16] Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: Influence of CD34⁺ cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival [J]. *Blood*, 2002, 100(5): 1611-1618.
- [17] Lewis ID, Verfaillie CM. Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: Superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(9): 1087-1095.
- [18] Nolte JA, Thiemann FT, Arakawa-Hoyt J, *et al.* The AFT024 stromal cell line supports long-term *ex vivo* maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors [J]. *Leukemia*, 2002, 16(3): 352-361.
- [19] Punzel M, Wissink SD, Miller JS, *et al.* The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors *in vitro* [J]. *Blood*, 1999, 93(11): 3750-3756.
- [20] Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, *et al.* Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after *ex vivo* culture in a noncontact system [J]. *Blood*, 2001, 97(11): 3441-3449.

[收稿日期] 2006 - 10 - 25

[修回日期] 2007 - 01 - 15

[本文编辑] 韩 丹