造血干细胞功能异质性研究的“金标准”——单细胞移植技术的建立和优化

王晓芳, 董芳, 郝莎, 程涛, Hideo Ema*

中国医学科学院&北京协和医学院血液病医院(血液学研究所), 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020

* 联系人, E-mail: hema@ihcams.ac.cn

收稿日期: 2017-10-05; 接受日期: 2017-10-30; 网络版发表日期: 2017-12-14

摘要 造血干细胞(HSC)是发现最早、在临床中广泛应用并一直发挥范式作用的一类重要的成体组织干细胞。HSC是一个由不同功能亚群组成的高度异质性群体, 其自我更新和多向分化潜能主要通过HSC移植这一“金标准”的实验流程来评估和判断。细胞群体水平的研究无法深入探讨其生物学功能, 从而使HSC单细胞水平的研究成为必需。为了更好地研究HSC的异质性, 本文将详细介绍HSC单细胞移植实验流程及结果检测和分析, 旨在促进相关科研人员对于单细胞移植适用性的了解以及具体实验操作的掌握, 客观评判具有高度异质性干细胞群体功能, 为其他具有高度异质性的干细胞群体的功能研究和评价提供例举和参考。

关键词 造血干细胞, 单细胞移植, 长周期造血干细胞, 短周期造血干细胞

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是目前发现最早的、研究历史最长、最具有临床价值同时应用最为广泛的成体干细胞类型之一。20世纪60年代, 两位科学家利用经典的脾脏克隆形成单位(CFU-S)实验揭示了HSC具有自我更新和多向分化潜能^[1,2]。HSC在成体中的数量非常少, 约占骨髓细胞的0.05%^[3~5]。成体HSC是一个功能异质性细胞群体, 根据自我更新和多向分化潜能不同可分为长周期造血干细胞(long-term HSC, LT-HSC)、短周期造血干细胞(short-term HSC, ST-HSC)和多能祖细胞(multi-potent progenitor, MPP)^[6,7]。根据分化谱系不同, 分为偏向髓系的HSC(myeloid-biased HSC)、偏向淋系的HSC(lymphoid-biased HSC)和平衡型的HSC(balance HSC)^[8]。Eaves的

研究也根据HSC的分化谱系将其分为主要向髓系分化的 α -HSC, 向髓系和淋系分化的 β -HSC, 主要向淋系分化的 γ 和 δ 型HSC^[9]。由于既往分离纯化方式的限制, 对于HSC的认识大都是在群体细胞层面。越来越多的研究表明, 许多血液系统疾病的发生发展都是在单细胞水平发生的^[10~12], 基于群体细胞的研究策略显然具有很大的局限性。近年来, 单细胞生物学的研究引起了广泛的关注, 单细胞相关测序技术, 如单细胞全外显子测序, 单细胞转录组测序的迅猛发展解析单细胞生物学功能提供了强有力的手段。对于像HSC这样的高度异质性细胞群体来讲, 单细胞水平的功能研究也势在必行。

HSC单细胞水平的功能研究方法主要包括体外单

引用格式: 王晓芳, 董芳, 郝莎, 等. 造血干细胞功能异质性研究的“金标准”——单细胞移植技术的建立和优化. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1353–1362
Wang X F, Dong F, Hao S, et al. Single cell transplantation—Golden standard of hematopoietic stem cell heterogeneity study (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 1353–1362, doi: [10.1360/N052017-00279](https://doi.org/10.1360/N052017-00279)

细胞培养和体内单细胞移植, 其中单细胞移植是目前国际公认的研究HSC功能异质性的“金标准”。单细胞移植是利用HSC的自我更新和多向分化能力, 将单个HSC加之一定数量的保护细胞(也称为竞争细胞, 一般选择与受体同源的全骨髓细胞)一同移植给致死剂量照射的受体, 观察单个供体细胞能否重建受体的整个造血系统, 在移植后不同时间点检测受体外周血中供体来源细胞的重建情况。相对于群体细胞移植, 单细胞移植可以再现单个HSC移植后功能的动力学变化过程。同时, 单细胞移植结果结合单细胞组学分析可以更准确揭示对于HSC命运决定的关键调控因素, 为HSC的体外扩增和再生策略提供新的干预靶点。

单细胞移植实验周期较长(6~12个月), 工作量大, 移植后检测时间点较多, 而且效果评价标准比较严苛, 目前在国内相关的实验室还未广泛开展。本研究组多年来一直从事HSC的单细胞水平研究^[13], 已建立了一套从HSC分离、分选到移植、检测的完整实验操作体系, 其中流式细胞分选效率(大于90%)以及单细胞移植效率(~30%)均达到国际水平。本文将通过实验结果详细介绍单细胞移植的实验流程及结果检测和分析, 旨在促进科研人员对单细胞移植适用性的了解以及实验操作的掌握。

用于HSC纯化的表面标记物近年来不断被更新和完善。研究表明, CD34⁺KSL细胞中的CD150⁺亚群具有长期造血以及向髓系分化的能力, 而CD150⁺CD34⁻

KSL细胞中CD41⁺亚群主要是髓系分化潜能的细胞, 但是其重建效率较低^[14,15]。CD48在造血谱系分化的细胞中广泛表达, 但是在HSC中表达很低^[9,14]。造血祖细胞(hematopoietic progenitor cells, HPCs)是在造血级联系统中处于HSCs的下游, 与MPP存在表面标记及功能上的交叉^[16]。前期研究发现, CD34⁺LSK细胞中CD41和CD150双阳性细胞记为HPC1, 功能上主要为重建能力较低的髓系分化HPC。CD34⁺LSK细胞又可根据CD41和CD150表达分为HPC2 (CD41⁺CD150⁺CD34⁺LSK)和HPC3 (CD41⁻CD150⁻CD34⁺LSK), 功能上HPC2代表脾脏中克隆形成单位, 而HPC3则代表向淋系分化的多能祖细胞(SZ, unpublished data, 2017)^[16-18]。本文综合了CD48, CD41和CD34等表面标记, 将CD150⁺CD41⁻CD48⁻CD34⁻KSL细胞记为LT-HSC (记为HSC1), CD150⁻CD41⁻CD48⁻CD34⁻KSL细胞为ST-HSC (记为HSC2), 以及3个不同分化潜能的HPC亚群(记为HPC1, HPC2和HPC3)(流式分选如图1所示), 分选这五群细胞(HSC1 20 cell/mice, HSC2 20 cells/mice, HPC1 60 cells/mice, HPC2 120 cells/mice, HPC3 1200 cells/mice), 加上每只小鼠(*Mus musculus*) 5×10⁵全骨髓细胞, 共同移植进入致死剂量照射的小鼠体内, 观察其重建水平的动力学变化和长期的谱系分化情况以比较各群细胞在功能上的主要差异(图2)。接着进行了HSC1这一亚群的单细胞移植, 实验结果显示, HSC1虽然在群体细胞水平呈现长周期造血的特

图1 HSC/HPC各亚群流式图

小鼠全骨髓单个核细胞富集后进行抗体标记, 利用多种表面标记组合进行细分群和分选。A: 用c-Kit和Lin表达的流式图圈出Lin⁻细胞; B: 在Lin⁻细胞中用CD34和c-Kit表达的流式图圈出CD34⁺Lin⁻细胞; C: 在CD34⁺Lin⁻细胞中用c-Kit和Sca-1的表达圈出CD34⁺KSL细胞; D: 在CD34⁺Lin⁻细胞中用c-Kit和Sca-1的表达圈出CD34⁺KSL细胞; E: 在CD34⁺KSL细胞用CD150和CD48的表达圈出CD48⁻CD34⁺KSL细胞; F: 在CD48⁻CD34⁺KSL细胞中用CD150和CD41圈出HSC1, HSC2和HPC1; G: 在CD34⁺KSL细胞用CD150和CD48的表达圈出HPC2和HPC3

图2 移植后HSC/HPC各亚群细胞后受体小鼠外周血CD45.1细胞的重建效率

将20个HSC1细胞, 20个HSC2细胞, 60个HPC1细胞, 120个HPC2细胞和1200个HPC3细胞分别与 5×10^5 全骨髓细胞联合移植至经致死剂量照射的受体小鼠体内。移植后分别于1, 2, 4, 6, 8, 10, 12月采集受体小鼠外周血分析供体来源细胞比例及谱系分化。每组小鼠: 5~6只。图A为移植后2个月各组小鼠外周血供体来源CD45.1细胞比例。图B为移植后1~12个月受体小鼠外周血供体CD45.1来源细胞的谱系分化

征, 在单细胞水平仍然是一个高度异质性的细胞群体, 包含了不同亚型HSC。最后讨论了单细胞移植技术在研究HSC功能异质性的局限性和展望。

1 材料与方法

实验动物。供体为B6.SJL (白细胞抗原表型为CD45.1): B6-Ly5.1, 受体为C57BL/6J (白细胞抗原表型为CD45.2): B6-Ly5.2。所有实验用小鼠均饲养于中国医学科学院血液学研究所SPF级动物房; 所有实验涉及的小鼠均得到中国医学科学院血液学研究所伦理委员会的管理与批准。一般情况下选取8~9周龄的小鼠作为供体或者受体。照射后小鼠给予含有抗生素(拜诺

欣: Baytril 10%, 拜耳)的水喂养7天。

材料。富集用试剂: anti-mouse c-Kit (CD117) magnetic beads (130-091-224, Miltenyi biotec), anti-mouse lineage magnetic beads (130-090-858, Miltenyi biotec); 磁力分选器; LS/MS column, 购自美天尼公司。流式细胞术分选及分析所需荧光素标记的单克隆抗体: 购自BD公司或ebioscience公司。细胞培养用试剂: S-clone SF-O3 (SS1303, S110124)培养基, 购自Sanko Junyaku公司。

实验流程。小鼠骨髓HSC的单细胞移植主要包括全骨髓细胞的获取, 干祖细胞的富集, HSC的分选, HSC的移植以及移植后检测等步骤(图3), 以下将详细介绍。

图3 HSC单细胞移植流程示意图

1.1 小鼠全骨髓细胞获取

B6.SJL (B6-Ly5.1)小鼠处死取双下肢, 剔去胫骨、股骨和髌骨的肌肉, 用1 mL注射器吸取缓冲液PBE (缓冲液: phosphate buffer saline, PBS+2 $\mu\text{mol/L}$ EDTA+2% fetal bovine serum, Hyclone)冲出骨髓细胞, 制备单细胞悬液。1只8周龄左右的雌性B6.SJL小鼠, 双侧后肢的胫骨、股骨和髌骨, 大约可计数得到 10^8 的骨髓单个核细胞。

1.2 CD117磁珠富集或Lin-细胞的富集

阳选. 将全骨髓细胞离心(4°C , $453\times g$, 5 min), 加入CD117 microbeads, 一般根据细胞计数 1×10^8 骨髓单个核细胞加入anti-CD117磁珠10~15 μL 磁珠, 充分混匀, 避光冰上孵育15 min。孵育结束后加入PBE清洗、离心后弃上清, 去除多余的磁珠, 用500 μL PBE重悬细胞。按照MS或者LS说明书操作, 阳选CD117⁺骨髓细胞。

阴选. 将全骨髓细胞离心($453\times g$, 5 min), 加入Biotin-lineage microbeads, 每只小鼠30 μL , 冰上孵育15 min后再加入60 μL anti-Biotin microbeads, 冰上继续孵育20 min。孵育结束后加入PBE清洗、离心后弃上

清去除多余的磁珠, 用500 μL PBE重悬细胞。按照MS或者LS说明书操作, 阴选lineage⁻骨髓细胞。

1.3 抗体标记

富集之后的骨髓细胞, 加入适量的抗体(抗体详细信息见表1): APC-eFluor780 anti-lineage cocktail (Mac-1, Gr-1, B220, Ter119, CD3, CD4, CD8), PE-Cy7 anti-Sca-1, APC anti-c-Kit, PE anti-CD150, Percp-eFluor710 anti-CD41, FITC anti-CD34, BV421 anti-CD48。冰上孵育1 h, PBE洗两遍, 重悬细胞, 准备流式分选。

1.4 流式细胞仪分选HSC和HPC各亚群

使用Aria III (BD)进行细胞分选, 使用前调节机器状态, 使液流稳定。根据接收细胞的容器调整液滴位置。按照抗体组合分选HSC 1 (CD34⁺KSL CD150⁺CD48⁻CD41⁻), HSC 2 (CD34⁺KSL CD150⁻CD48⁻CD41⁻), HPC 1 (CD34⁺KSL CD150⁺CD48⁻CD41⁺), HPC 2 (CD34⁺KSL CD150⁺CD41⁺), HPC 3 (CD34⁺KSL CD150⁻CD48⁻CD41⁻) (图1)。收集板为96孔细胞培养板, 少量群体细胞培养使用purity模式分选, 单细胞分选使用single cell模式分选。

表 1 HSC分选用抗体信息

抗体	荧光素	克隆号	厂家
Anti-c-Kit	APC	2B8	eBioscience
Anti-Sca-1	PE-cy7	D7	eBioscience
Anti-CD150	PE	TC15-12F12.2	Biolegend
Anti-CD41	Percp-eFluor780	MWReg30	eBioscience
Anti-CD48	BV421	HM48-1	eBioscience
Anti-lineage	APC-eFluor780		eBioscience
Anti-CD34	FITC	RAM34	eBioscience

1.5 HSC体外无血清培养基收集分选细胞

无菌SFO3中加入1% BSA (bovine serum albumin) 配制收集培养基. 96孔圆底板中间60个孔加入培养基(200 μ L/well)用来收集分选细胞. 分选后细胞于圆底96-孔板中, 放在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂孵箱中静置片刻, 每个孔中加入 $2\times 10^5\sim 5\times 10^5/50$ μ L保护细胞(来自B6-Ly5.2的骨髓单个核细胞)并进行后续移植实验.

1.6 HSC细胞移植

受体动物致死剂量照射: 选取8周龄左右B6-Ly5.2小鼠, 分两次使用X-Ray辐照仪进行照射, 总剂量9.5Gy, 两次照射间隔3 h^[19], 第二次照射后4 h进行尾静脉移植. 照射后动物给予抗生素水喂养持续7天.

细胞移植: 用红外线加热器加热鼠尾, 并用75%的酒精消毒. 将HSC/HPC亚群细胞与保护细胞混合均匀, 用1 mL注射器吸取所有的细胞, 注意尽量避免产生气泡, 将细胞混合液缓慢注射进入小鼠的尾静脉, 注射完毕之后缓慢拔出针头, 并做上标记.

1.7 移植后外周血检测

移植后分别于1, 4, 6, 10及12 m收集受体小鼠外周血进行供体细胞重建比例和谱系分化的检测. 准备含有200 μ L PBE的流式管, 使用采血针从受体小鼠的尾部取约20 μ L的外周血, 放入流式管中混匀并编号. 每一管外周血中加入1 mL红细胞裂解液, 室温孵育6~10 min. 453 $\times$ g, 离心5 min, 弃上清, 用1 mL PBE清洗去除多余的红细胞裂解液, 453 $\times$ g, 离心5 min. 加入不同谱系的流式抗体(表2), 冰上孵育 30 min. 用1 mL PBE/tube清洗多余的抗体, 453 $\times$ g, 离心5 min, 弃上清. 最后用PBE (含有1 μ g/mL DAPI)每管100~200 μ L重悬,

上机检测(Canto II, BD)(图4A).

2 结果

2.1 HSC/HPC各亚群群体细胞移植后体内重建分析

群体细胞移植成功的小鼠检测标准是在移植后任何时期外周血中有供体来源的成熟细胞比例大于0.5%. 在移植之后不同时间点(1个月, 2个月, 4个月, 6个月, 8个月, 10个月, 12个月)检测各HSC/HPC亚群移植小鼠外周血可发现HSC/HPC各亚群重建水平及各谱系重建效率存在明显差异(图2A和B). 在各谱系细胞检测方面, B220代表B细胞, CD4/CD8代表T细胞, Mac-1/Gr-1代表髓系细胞.

(1) HSC1移植的小鼠6只, 移植后2个月检测外周血供体来源细胞, 重建效率为100% (6/6), 重建水平为3.63% $\pm$ 0.82%, 在6个月之后仍可在PB中检测到较高水平的供体来源细胞, 并且从6~12个月, 其重建水平不断升高, 在谱系分化方面保持向髓系、B系和T系的三系分化能力, 提示该细胞群包含具有长期造血重建能力的LT-HSC.

(2) HSC2移植的小鼠5只, 移植后2个月检测外周血供体来源细胞, 重建效率为100% (5/5), 重建水平为3.718% $\pm$ 1.35%, 并且出现髓系和淋系细胞共同分化, 在6个月之后重建水平有所下降, 谱系分化主要倾向于淋系细胞,

(3) HPC1移植的小鼠5只, 移植后2个月检测外周血供体来源细胞重建效率为100% (5/5), 重建水平为4.068% $\pm$ 0.7696%, 并且随移植后时间的延长, 其重建水平亦较稳定. 在谱系分化方面, 该群细胞也与HSC1细胞类似, 具有向三系分化能力, 但是长期重建水平低

表 2 移植后外周血检测抗体信息

抗体	荧光素	克隆号	厂家
Anti-Mac-1/Gr-1	APC-eFluor780	M1/70;RB6-8C5	eBioscience
Anti-CD4	PE-cy7	GK1.5	eBioscience
Anti-CD8	APC	53-6.7	eBioscience
Anti-B220	Percp-cy5.5	RA3-6B2	eBioscience
Anti-CD45.1	FITC	A20	eBioscience
Anti-CD45.2	PE	104	eBioscience

于HSC1.

(4) HPC2和HPC3移植之后重建能力较差. HPC2在1~12个月重建效率为20% (1/5), 在移植后1~2个月出现一过性髓系细胞分化, 2个月时重建水平为0.3446%±0.27%. HPC3重建效率随着移植时间逐渐减低, 其重建效率从2个月的100% (5/5)到4个月的20% (2/5)再到8个月的0% (0/5), 在1~2个月出现一过性淋系细胞分化.

2.2 HSC单细胞体内移植后体内重建分析

进一步在单细胞水平研究HSC1群体的功能, 分选30个HSC1细胞, 联合 5×10^5 保护细胞, 分别移植进入30只小鼠体内(实验流程如图3), 随后连续检测PB 10个月来观察供体细胞的重建比例和谱系分化(图4A). 单细胞移植重建成功的标准是移植后任何时期外周血中有供体来源的成熟细胞比例大于0.1%^[13]. 重建水平的动态监测显示, 总体来看, 在30只移植受体小鼠中, 移植后1个月成功重建的小鼠(大于0.1%)比例为11/30 (36.7%), 大于1%的比例为7/30 (23.3%)(图4B). 其中7/11只在移植后10个月仍可以检测到, 4/11只在移植后10个月PB已经检测不到供体来源的细胞. 每个细胞移植后的重建趋势也不尽相同: No.1小鼠外周血重建比例从1~8个月一直呈上升趋势, 甚至在8个月的时候可以达到53%左右的重建水平, 8月至10月水平略有降低; No.2小鼠在1~6个月呈上升趋势, 从6个月开始下降, 相比于No.1重建水平较低(6个月: 20.4%, 8个月: 11.2%); No.3, 4, 5, 6, 7小鼠外周血重建水平从1~10个月呈现递减的趋势; No.8, 9小鼠外周血在1~3个月呈现上升趋势, 在3个月之后到10个月重建水平又逐渐下降. No.5小鼠外周血重建在1个月的时候为5.09%, 3~6个月下降至1.9%, 在10个月的时候又出现上升至4.27%的波浪形变化趋势.

在谱系分化方面, 统计供体来源细胞中粒细胞+单核细胞比例, B和T淋巴细胞比例(GM/(B+T)), 若GM/(B+T)≥2则记为 α -HSC; 若GM/(B+T)在0.25~2则记为 β -HSC; 若GM/(B+T)≤0.25又根据GM比例是否大于1%分为 γ -HSC(GM≥1%)和 δ -HSC(GM≤1%)(图4C和D)^[9,20,21]. 移植后6个月检测发现, 在11只成功重建的受体小鼠中, No.5小鼠为 α -HSC, No.1, 2, 8, 9号小鼠为 β -HSC, No.4, 7, 10, 11号小鼠为 γ -HSC, No.3, 6号小鼠为 δ -HSC (图4D). 以上实验提示, 高度纯化的HSC1仍为一个具有明显异质性的细胞群体.

3 讨论

HSC和HPC亚群间在功能上存在很大的差异, 在多细胞移植(multi-cell transplantation assay)实验中, HSC1可以维持长周期(>12个月)的多谱系造血重建, 并且以髓系重建占主要成分, 提示其主要为富集的偏向髓系分化的LT-HSC群体, HSC2群体虽然也可维持长时间的造血重建, 但是其重建水平比HSC1群体显著下降, 并且在谱系分化方面主要为偏向淋系分化, 提示其为富集的偏向淋系分化的HSCs. 在本次实验中, HPC1在6个月之后仍维持高水平的造血能力, 而且也以髓系偏向的谱系分化为主, 与HSC1的表现特征非常类似. 这种现象一方面不能排除由于CD41抗体的流式信号不稳定导致的HSC1细胞的污染, 另一方面也提示在造血级联的顶端确实存在具有谱系分化潜能的HSC的存在(在这次实验中称之为HPC1). 既往Gekas和Graf^[22]报道所有的造血干细胞均表达CD41 marker也在一定程度上支持了本研究结果. 群体细胞移植相对于单细胞移植, 检测的细胞数目较大, 其中不排除有主导造血的干细胞存在, 这些干细胞或存在增殖分化优势, 会掩盖其他干细胞的功能表型. 在这一点上, 单

图 4 HSC1单细胞移植

将单个HSC1细胞与 5×10^5 全骨髓细胞联合移植至经致死剂量照射的受体小鼠体内。移植后分别于1, 3, 6, 8, 10个月收集受体小鼠外周血进行检测。(单细胞移植成功标准: 外周血CD45.1 $\geq 0.1\%$, 阳性小鼠共有11只/30只)。A: 移植后外周血流式检测示意图; B: 移植后1, 3, 6, 8, 10个月受体小鼠外周血供体来源CD45.1细胞比例; C: 移植后1~10个月受体小鼠外周血供体来源CD45.1细胞的谱系分化; D: 比例图显示移植成功的11只小鼠在移植后6个月供体来源细胞谱系分析。根据GM/(B+T)的比例将HSC分为3种不同的类型: GM/(B+T) >2.0 为 α -HSC; GM/(B+T)介于0.25~2.0为 β -HSC; GM/(B+T) <0.25 为 γ -HSC (GM $\geq 1\%$)和 δ -HSC (GM $<1\%$)

细胞移植可以弥补这一不足。但是单细胞移植能检测到的细胞群体数目较少,成功率较低,时间金钱投入巨大,不利于大量开展实验分析。

Osawa等人^[23]首次用单个CD34^{low/neg}的HSC细胞移植实验证明其可长期重建整个造血系统。相对于群体细胞移植,单细胞移植可以更准确地反映单个HSC的造血重建能力。另外,利用单细胞移植检测HSC分裂能力及子代细胞的自我更新能力可以反向推导HSC分裂方式及向不同谱系定向分化等。有文献报道,用小鼠单个CD34-KSL检测HSC长期重建的成功率为20%~40%,而近来的文献报道中则可以达到60%~70%^[24]。这可能是由于不同实验中对HSC的纯化效率不同以及所采用的移植方法差异所导致的。

在单细胞移植实验中,成功检测到的小鼠为11/30(约30%成功率),如何提高单细胞移植效率对于研究HSC生物学行为具有重要意义(图4)。有一种可能是现有的HSC marker还不够纯化。有研究表明,依靠FACS分离出的HSC中只有7%~35%是LT-HSC^[25]。近年来,许多研究致力于发现特异性表达在HSC上的基因,由此研究者找到了如Hoxb5^[25], Fgd5^[26], a-catulin^[27], Evi1^[28], Tie2^[24]等标记。这种利用特异基因标记的方法获得的HSC具有更高的纯度,并且可在体内追踪定位HSC,对于研究HSC的分裂方式和发育等生物学功能带来了极大的便捷。然而这些标记都是基于基因操作获得转基因小鼠,实际上造成的插入突变有可能会影响基因的功能。并且在移植后体内,单个HSC移植后在体内命运决定和行为方式的动态变化还未可知。

从技术操作层面来讲,单细胞移植技术涉及细胞富集、分选、受体动物移植前预处理及细胞注射等多个环节,每一个步骤均存在诸多技术要领。首先,单细胞移植的细胞常用的表面标记有CD34-LSK, ESLAM^[29], CD150+CD48-LSK等。其次,高效的单细胞获得效率是保证单细胞移植成功和准确的关键。准确获得活性良好的单个HSC的方法有多种,如借助于高

精密仪器收集细胞的流式细胞术, DEPArray^[30,31]等,以及在获得高度富集的HSC后依靠简单的口吸管或者micromanipulator小仪器实现单个细胞分离。其中流式细胞术以其快速、多色标记和高精准的单细胞分选效率等特点成为获得单个HSC的最常用方法,流式分选后在显微镜下对单个细胞进行确认和活性评判能够更进一步提高单细胞移植的效率。在流式分选的基础上,还可以结合口吸管分离实现对少量细胞条件下单个细胞的准确获取,如单个HSC在几次细胞分裂后的单个细胞的准确分离。再次,尽可能保证单个细胞的准确移植是单细胞移植效率的保障。影响单细胞的成功植入因素包括移植前处理造成的微环境损伤,单细胞成功注射,以及保护细胞的数量等方面。移植前预处理常用的方式是对受体小鼠进行致死剂量照射,B6背景小鼠一般照射总剂量为9.5Gy,可分两次照射。对照射时间和移植时间的优化研究表明,照射后4h进行群体细胞注射所获得移植成功效率最高^[19]。实验操作中可根据实际照射源的类型(钴60或者X-ray)以及小鼠的耐受程度和实验的可操作性等方面协调进行。照射造成微环境损伤的“旁观者效应”会对移植细胞的成功植入造成损伤,降低ROS等抗氧化干预可显著提高移植细胞的植入效率^[32]。保护细胞一般选择 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个与受体同源的全骨髓细胞。保护细胞数量过多会降低供体来源细胞的检出效率,过少则无法保证致死剂量照射小鼠短期的存活^[33]。

近年来,单细胞相关技术的发展为异质性细胞群体在单细胞水平的研究奠定了重要基础。本文主要介绍的单细胞分离技术和单细胞移植技术,加上单细胞克隆形成分析^[13,34],单细胞实时定量PCR技术^[35-38],以及单细胞测序技术(基因组^[39]、转录组^[40,41]),这些技术方法的综合应用已为干细胞领域的研究提供了更为广阔的研究策略和提升空间,也为更深层次、更高水平地探寻细胞的奥妙奠定了坚实的基础。随着这些技术的提升、优化及联合应用,干细胞乃至生命的奥秘将逐步被揭开。

参考文献

- 1 Siminovitch L, McCulloch E A, Till J E. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*, 1963, 62: 327-336
- 2 Becker A J, McCulloch E A, Till J E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 1963, 197: 452-454

- 3 Kreipe H, Radzun H J, Heidorn K, et al. Lineage-specific expression of c-fos and c-fms in human hematopoietic cells: discrepancies with the in vitro differentiation of leukemia cells. *Differentiation*, 1986, 33: 56–60
- 4 Spangrude G J, Heimfeld S, Weissman I L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 1988, 241: 58–62
- 5 Uchida N, Weissman I L. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med*, 1992, 175: 175–184
- 6 Lagasse E, Shizuru J A, Uchida N, et al. Toward regenerative medicine. *Immunity*, 2001, 14: 425–436
- 7 Morrison S J, Weissman I L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1994, 1: 661–673
- 8 Muller-Sieburg C E, Cho R H, Karlsson L, et al. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood*, 2004, 103: 4111–4118
- 9 Dykstra B, Kent D, Bowie M, et al. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 218–229
- 10 Lottaz C, Beier D, Meyer K, et al. Transcriptional profiles of CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res*, 2010, 70: 2030–2040
- 11 Sarry J E, Murphy K, Perry R, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ -deficient mice. *J Clin Invest*, 2011, 121: 384–395
- 12 Shackleton M, Quintana E, Fearon E R, et al. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 2009, 138: 822–829
- 13 Ema H, Morita Y, Yamazaki S, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2979–2987
- 14 Kiel M J, Yilmaz O H, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 2005, 121: 1109–1121
- 15 Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*, 2010, 207: 1173–1182
- 16 Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*, 2013, 154: 1112–1126
- 17 Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 2014, 42: 74–82.e2
- 18 Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential. *Cell*, 2005, 121: 295–306
- 19 Ishida T, Suzuki S, Lai C Y, et al. Pre-transplantation blockade of TNF- α -mediated oxygen species accumulation protects hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, 2017, 35: 989–1002
- 20 Benz C, Copley M R, Kent D G, et al. Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 273–283
- 21 Ye H, Wang X, Li Z, et al. Clonal analysis reveals remarkable functional heterogeneity during hematopoietic stem cell emergence. *Cell Res*, 2017, 27: 1065–1068
- 22 Gekas C, Graf T. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, 2013, 121: 4463–4472
- 23 Osawa M, Hanada K I, Hamada H, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 1996, 273: 242–245
- 24 Ito K, Turcotte R, Cui J, et al. Self-renewal of a purified *Tie2*⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science*, 2016, 354: 1156–1160
- 25 Chen J Y, Miyaniishi M, Wang S K, et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*, 2016, 530: 223–227
- 26 Gazit R, Mandal P K, Ebina W, et al. *Fgd5* identifies hematopoietic stem cells in the murine bone marrow. *J Exp Med*, 2014, 211: 1315–1331
- 27 Acar M, Kocherlakota K S, Murphy M M, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*, 2015, 526: 126–130
- 28 Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, et al. Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J Exp Med*, 2011, 208: 2403–2416
- 29 Balazs A B, Fabian A J, Esmon C T, et al. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone

- marrow. *Blood*, 2006, 107: 2317–2321
- 30 Pestrin M, Salvianti F, Galardi F, et al. Heterogeneity of *PIK3CA* mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol*, 2015, 9: 749–757
- 31 Peeters D J E, De Laere B, Van den Eynden G G, et al. Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer*, 2013, 108: 1358–1367
- 32 Hu L, Cheng H, Gao Y, et al. Antioxidant *N*-acetyl-*L*-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. *Blood*, 2014, 124: e45–e48
- 33 Ema H, Uchinomiya K, Morita Y, et al. Repopulation dynamics of single haematopoietic stem cells in mouse transplantation experiments: importance of stem cell composition in competitor cells. *J Theor Biol*, 2016, 394: 57–67
- 34 Clarke M F, Dick J E, Dirks P B, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66: 9339–9344
- 35 Cheng T, Shen H, Giokas D, et al. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13158–13163
- 36 Brady G, Billia F, Knox J, et al. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol*, 1995, 5: 909–922
- 37 Sanchez-Freire V, Ebert A D, Kalisky T, et al. Microfluidic single-cell real-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns. *Nat Protoc*, 2012, 7: 829–838
- 38 Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5847–5851
- 39 Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*, 2011, 472: 90–94
- 40 Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e42
- 41 Tang F, Barbacioru C, Nordman E, et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc*, 2010, 5: 516–535

Single cell transplantation—Golden standard of hematopoietic stem cell heterogeneity study

WANG XiaoFang, DONG Fang, HAO Sha, CHENG Tao & EMA Hideo

State Key Laboratory of Experimental Hematolog, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

Hematopoietic stem cells (HSC) are one of the earliest, and most extensively studied stem cells that have been used in clinical medicine and serve as an excellent model in stem cell study. HSC are a heterogeneous population consisting of functionally different subsets. HSC transplantation is a golden standard for detection of self-renewal and multi-potential differentiation ability. Nowadays, population-based research cannot meet the need for deep understanding of biological functions and it is necessary to study at the single cell level. In this article, we introduce experimental procedures and data analysis of single cell transplantation. Researchers in related fields may find these technologies useful in their studies. As such, single cell biology is expected to increasingly expand for understanding of fundamental basis in medical science, understand applicability of single cell transplantation, acquire specific experimental operation, and promote wide applications, thus acting as a paradigm and reference for the study of other heterogeneous stem cell population.

hematopoietic stem cells, single-cell transplantation, long-term HSC, short-term HSC

doi: [10.1360/N052017-00279](https://doi.org/10.1360/N052017-00279)