文章编号:1000-5404(2005)04-0279-03

论著

全身照射大鼠骨髓提取液对真皮多能干细胞趋化作用的实验研究

宗兆文,程天民,冉新泽,粟永萍,史春梦 (第三军医大学预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察5Gy γ射线全身照射后大鼠骨髓提取液对真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)的趋化作用,并定量分析尾静脉输注的dMSCs在大鼠体内的分布。**方法** 在Transwell培养体系中,观察骨髓提取液对dMSCs的趋化作用。^{3}H-TdR标记dMSCs,经尾静脉输注到大鼠体内后,液闪法测量各组织内dMSCs的含量。**结果** Transwell培养体系中,照射组骨髓提取液组从上层迁移到下层的细胞明显多于不照射的正常对照组和生理盐水组($P<0.01$)。照射后1周始,照射组骨髓dMSCs含量明显高于正常对照组($P<0.01$);伤后3周和4周,照射组单位重量骨髓dMSCs含量也明显高于同组的肺脏、肝脏等组织。**结论** 全身照射大鼠骨髓提取液对dMSCs有很强的趋化作用,从而促进静脉输注的dMSCs偏向分布于损伤的骨髓。

关键词: 全身照射;真皮多能干细胞;骨髓提取液;趋化
中图法分类号: R322.991; R329.25; R818.023 **文献标识码:** A

Experimental study of chemotactic effects of total body irradiation in rat bone-marrow extracts on dermal multipotent stem cells

ZONG Zhao-wen, CHENG Tian-min, RAN Xin-ze, SU Yong-ping, SHI Chun-meng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of bone-marrow (BM) extracts from rats with total body irradiation (TBI) on the migration of dMSCs and to measure the distribution of transplanted dMSCs in rats quantitatively. **Methods** A microchemotaxis chamber, Transwell system, was used to observe the effects of BM extracts on the migration of dMSCs. Rat dMSCs labeled with ^{3}H-TdR were transplanted into rats and the distribution in various organs were measured by liquid scintillation. **Results** BM extracts from TBI rats significantly increased dMSCs migration across the membrane of the microchemotaxis chamber as compared with those in the control group ($P<0.01$). From 1 week after injury, the amount of dMSCs in BM of TBI rats was larger than that of the non-injured rats ($P<0.01$). As far as per gram tissue was concerned, the amount of dMSCs in BM was greater than that of lung and liver in TBI rats at 3 and 4 weeks after TBI. **Conclusions** Our results suggest that BM extracts from TBI rats can enhance the migration of dMSCs, and thus promote the transplanted dMSCs to migrate to irradiation-injured BM.

Key words: total body irradiation; dermal multipotent stem cell; bone-marrow extract; chemotaxis

辐射损伤,多见于战时核爆炸、平时核事故以及手术辅以放射治疗等情况。此时,骨髓造血功能严重受抑,治疗相对棘手。近年,干细胞移植已成功用于造血系统的疾病,并取得良好的效果。由于辐射损伤时,骨髓来源的干细胞不同程度的受损,使造血干细胞和间充质干细胞自体移植的应用受到限制。在最近的实验中,我们成功地分离培养出大鼠真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)[1],并将之静脉输注给5 Gy剂量γ射线全身照射的大鼠,发现dMSCs可显著地促进骨髓造血功能的恢复[2,3]。但目前尚不清楚静脉输注的干细胞可否偏向性分布于全身照射大鼠的骨髓,以促进骨髓功能的恢复。对这个问题进行有益的探索,将有助于提高放创复合伤的疗效,同时提供关于干细胞移植后在动物体内分布的相关资料,丰富干细胞研究的理论知识。本实验采用Transwell培养体系,旨在观察全身照射大鼠骨髓提取液对dMSCs的趋化作用,并检测经尾静脉注射入大鼠体内的dMSCs在各组织器官内细胞的含量,以明确静脉输注的dMSCs

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205) Supported by the National Key Basic Research Development and Plan of China ("973" Project, G1999054205)
作者简介: 宗兆文(1975-),男,江苏省铜山县人,博士,助理研究员,主要从事脊髓损伤修复和放创复合伤组织修复方面的研究。电话:13883506677
通讯作者: 程天民,电话:(023)68752008
收稿日期: 2004-09-15;**修回日期:** 2005-01-15

可否偏向地分布于全身照射大鼠的骨髓。

1 材料与方法

1.1 大鼠 dMSCs 的分离培养、鉴定和标记

采用早期贴壁法分离 dMSCs，具体方法见文献[1]，但稍有改良：新生 1 d Wistar 大鼠 1 只，引颈处死，75% 乙醇消毒，剪取皮肤置于 0.25% 胰酶消化过夜。次日，Hanks 液清洗后，祛除表皮和皮下组织，将真皮组织剪成细胞碎片并吹打成细胞悬液，过滤后接种于培养瓶中。6 h 后，弃培养液和悬浮细胞，继续培养早期贴壁细胞。反复传代，至有集落样细胞群体生成，按常规方法接种和选取细胞克隆，并进行成骨、成脂和成软骨分化。鉴定好的 dMSCs 传代备用。

1.2 骨髓液的提取和及其趋化作用的研究

成年 Wistar 大鼠 8 只，分全身照射大鼠骨髓提取液组（A 组）；正常大鼠骨髓提取液组（B 组）（$n=4$）。另设生理盐水对照组（C 组）（$n=4$）。大鼠经总剂量为 5 Gy 的 γ 射线照射后 48 h 取双侧股骨，5 ml 注射器冲取骨髓，匀浆，离心取上清，滤纸过滤后微型过滤器过滤除菌备用。正常成年 Wistar 大鼠（2 只）骨髓提取液的提取方法同照射组大鼠。需要说明的是，之所以选择 5 Gy 的剂量照射大鼠，因为我们的前期的实验证实，5 Gy 剂量的 γ 射线全身照射大鼠后，主要引起骨髓的损伤[2,3]。

常规收集 dMSCs，制成细胞悬液，约 10^6/ml。取 100 μl 细胞悬液，接种于 Transwell 小室（Costar, USA）内。每组重复 6 个标本。约 1 h 后，Transwell 小室外加骨髓提取液组或生理盐水 400 μl。4 h 后，取出 Transwell 小室，磷酸盐缓冲液冲洗，用棉签轻轻擦去微孔膜上层的细胞，95% 乙醇固定微孔膜下层细胞，苏木精染色后高倍镜下计数。取 10 个视野的均数作为该样本从微孔膜上层迁移至下层的细胞数。

1.3 液闪法测量各组织器官内 dMSCs 的含量

成年 Wistar 大鼠 60 只，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，雌雄不拘，体质量 200～250 g，随机分为 2 组：A 组为照射组大鼠 + 细胞输注组，B 组正常大鼠 + 细胞输注组。观测时相点为伤后 3 d 和 1、2、3、4 周，每时相点 6 只。细胞移植：鉴定后的 dMSCs，传代时加入[甲基-^{3}H]胸腺嘧啶核苷（^{3}H-TdR）以标记 dMSCs，细胞长满后，收集并用磷酸盐缓冲液漂洗后，制成细胞悬液（密度为 1×10^7/ml），并经尾静脉输注入大鼠体内，1 ml/只。^{3}H-TdR 购自中科院上海原子核研究所。

观测的组织有骨髓、肺脏、肝脏和脾脏。于各时相点麻醉大鼠，生理盐水灌注，取材称重后，取 1 g 组织，用 $HClO_4$-H_2O_2 法 65 ℃水浴消化。消化完全后，用 1 mol/L 的 NaOH 中和消化液至 pH 7.0。取 0.1 ml 样本，加入含 1.5 ml 1∶1 乙二醇/乙醚的闪烁瓶中，随后加入 5 ml 闪烁液（二甲苯）闪烁 4 h 后，用西南医院核医学科 LS6500 Multi-purpose Sciutillation Counter（Beckman COULTERTM, USA）液闪法进行计数/分钟。计算方法：组织的总计数值为：测量所得计数值 × 脏器总重/样品重量 × 10 × 消化总体积；1 ml 细胞悬液总计数值：测量所得计数值 × 10 × 消化总体积；各组织 dMSCs 总百分含量：各组织所含细胞总计数值/ml 细胞悬液总计数值 × 100%；单位重量组织器官 dMSCs 百分含量：单位重量组织计数值/ml 细胞悬液总计数值 × 100%。

1.4 统计学分析

试验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 统计软件中采用单因素方差分析进行组间和组内分析。

2 结果

2.1 大鼠 dMSCs 的分离培养和鉴定

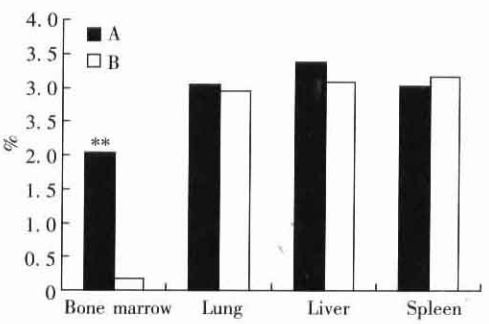
分离的原代细胞经过 6 h 的培养有少量的细胞贴壁，弃悬浮细胞后继续培养，可发现细胞呈集落样生长，经继续培养和传代，可见细胞形态比较均一，主要为梭形。经相应诱导剂作用后，分离培养的细胞可向成骨、成脂和成软骨分化（图略，见文献[1]）。

2.2 骨髓提取液对 dMSCs 的趋化作用

在全身照射 48 h 后骨髓提取液的作用下，从微孔膜上层迁移至下层的细胞数约为（114 ± 10.89），明显多于正常大鼠骨髓提取液组（24 ± 2.88）和生理盐水（16 ± 2.92）（$P<0.01$）。正常骨髓提取液组的细胞数稍多于生理盐水组，但无显著差异（$P>0.05$）。

2.3 dMSCs 在各组织器官分布的测定

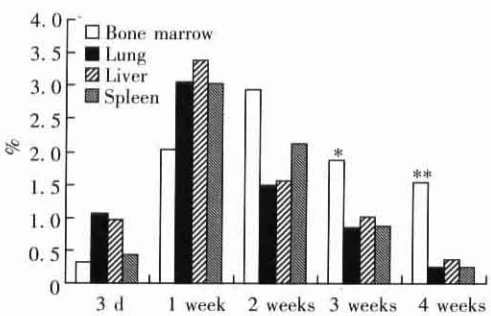
^{3}H-TdR 标记 dMSCs，经尾静脉输入大鼠体内后，液闪法测量结果显示，伤后 3 d，照射组大鼠骨髓 dMSCs 含量多于正常组，但无显著性差异（$P>0.05$）；照射后 1 周，前者含量（具体值）高于后者（具体值），相差非常显著（$P<0.01$）（图 1），并持续到 4 周。虽然在多个时相点上，肺脏、肝脏等脏器的总 dMSCs 含量较骨髓明显为高，但随时间的推移，肺脏等脏器的 dMSCs 含量逐渐降低，而骨髓的 dMSCs 含量降低不明显（图 2）。照射后 3 周，照射组大鼠单位重量骨髓的 dMSCs 含量高于同组肺脏等脏器单位重量的 dMSCs 含量，相差显著（$P<0.05$）；照射后 4 周，二者的差异非常显著（$P<0.01$）（图 2）。



**：$P<0.01$，*vs* group B at the same time point

图 1 1 周时两组大鼠各组织器官单位重量 dMSCs 百分含量（%）

Fig 1 Percentage of dMSCs in rat organs (per gram) in groups A and B at 1 week after irradiation



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* lung, liver, and spleen at the same time point

图 2 全身照射组大鼠各时相点各组织器官单位重量 dMSCs 百分含量（%）

Fig 2 Percentage of dMSCs in the organs (per gram) of TBI rats at different time points after irradiation

3 讨论

近年来,大量的实验研究和临床结果显示了成体和胚胎干细胞移植在治疗各种疾病中有良好的应用前景,但目前多集中于干细胞的分化,很少涉及干细胞移植入体内后的分布问题。实际上,移植干细胞在体内的分布是影响其疗效的重要因素之一。使用 5 Gy 剂量的 γ 射线全身照射后,主要引起大鼠骨髓的损伤,使此时采用造血干细胞和间充质干细胞自体移植受到限制,相对而言,此时皮肤损伤相对较轻,于是我们分离培养了大鼠的 dMSCs[1],并将其应用于全身照射的大鼠,发现其可有效地促进大鼠造血功能的恢复[2,3]。但尚不清楚静脉输注的干细胞可否偏向性分布于损伤相对较重的骨髓,以促进其功能恢复。用 ^{3}H-TdR 标记 dMSCs 后静脉输注到大鼠体内,液闪法测量各组织器官内 dMSCs 的含量,结果表明,伤后 1 周始,照射组骨髓 dMSCs 含量明显高于对照组骨髓的含量($P < 0.01$);伤后 3 周($P < 0.05$)和 4 周($P < 0.01$),照射组大鼠单位重量骨髓 dMSCs 含量也明显高于同组肺脏、肝脏等组织器官单位重量组织 dMSCs 含量,即输注的 dMSCs 相对更多地分布到了损伤较重的骨髓。

其它的一些实验也证实,输注的或内源性的干细胞可偏向地分布于损伤相对较重的组织或部位[4,5]。但其机制尚不明了。本实验的研究结果显示,损伤局部的微环境在输注细胞的偏向性分布中可能有重要作用:5 Gy 全身照射大鼠的骨髓提取液对 dMSCs 的趋化作用明显强于正常大鼠骨髓提取液和生理盐水。目前推测,损伤组织局部上调表达的某些细胞因子和化学趋化因子,如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattratant protein-1, MCP-1)和巨噬细胞炎性蛋白-1(macrophage inflammatory protein-1, MIP-1)等可能有至关重要的作用[4,5]。关于 dMSCs 移植后向损伤区偏向分布的可能机制,以及如何采取相应措施增加输注的干细胞在损伤局部的分布,进而提高干细胞移植的疗效等问题,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 史春梦, 程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1068 - 1070.

[2] Shi C M, Cheng T M, Su Y P, *et al*. Transplantation of dermal multipotent cells promotes the hematopoietic recovery in sublethally irradiated rats[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2004, 45(1): 19 - 24.

[3] Shi C, Cheng T, Su Y, *et al*. Transplantation of dermal multipotent cells promotes survival and wound healing in rats with combined radiation and wound injury [J]. Radiat Res, 2004, 162(1): 56 - 63.

[4] Barbash I M, Chouraqui P, Baron J, *et al*. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution [J]. Circulation, 2003, 108(7): 863 - 868.

[5] Torrente Y, El Fahime E, Caron N J, *et al*. Intramuscular migration of myoblasts transplanted after muscle pretreatment with metalloproteinases [J]. Cell Transplant, 2000, 9(4): 539 - 549.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2005)04-0281-01

个案与短篇

下颌升枝巨大囊肿 1 例报告

A case report of mandibular ramus huge cyst

李喜旺 (重庆师范大学医院,重庆 400047)

患者,男,30 岁,因左下牙痛伴左面部肿痛 3 月余入院。近 3 月来感左下后牙反复疼痛伴左面部肿胀,曾在当地医院依照冠周炎"抗炎"治疗有效,未作影像学检查。我院门诊就诊时口腔全景 X 光片检查发现,左侧下颌升枝囊性改变,范围包括整个升枝区域,向上至髁状突颈部,向下至 D_6,D_8 牙冠包含在升枝囊性病变内,囊腔内未见明显分隔样改变。以"左侧下颌升枝成釉细胞瘤伴感染"收入院。

入院后行下颌骨 CT 检查,见左侧下颌骨升枝内呈空腔,周边光滑、整齐,髁状突完整。经一周抗感染治疗,全身检查无手术禁忌征后,全麻下手术。经口腔内入路,左侧升枝前缘翼颌韧带处凿开升枝骨壁,刮取部分瘤腔内组织行冰冻活检,报告确认非成釉细胞瘤后,扩大凿骨窗,拔除 D_6,将腔内囊壁组织全部刮除,术区冲洗,止血后缝合。术后病理诊断:符合颌骨囊肿,囊壁化脓性炎症,局灶浆细胞肉芽肿。

讨论

下颌骨囊性病变临床常见,包括牙源性和非牙源性囊肿、肿瘤,最常见的是牙源性的颌骨囊肿和成釉细胞瘤。由于成釉细胞瘤具有沿骨小梁间浸润性生长,有高度的局部侵袭性的生物学特性,手术治疗方式与颌骨囊肿完全不同,术前明确诊断非常重要,目前临床常用的检查为下颌骨 X 线平片和面部 CT 检查[1,2]。尽管成釉细胞瘤具有多发生于下颌角及升枝部、范围较大、可有多个分隔、常造成邻近牙根的重度吸收等不同于颌骨囊肿的影像学表现,但术前依照临床表现和影像学检查难

(下转 286 页)

作者简介:李喜旺(1948 -),男,山西省静乐县人,主治医师,主要从事口腔颌面外科临床方面的研究。电话:023-65363401

收稿日期:2004-12-28;修回日期:2005-01-15