论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1004-03

真皮多能干细胞移植后向全身照射大鼠骨髓优势分布的机制研究

宗兆文,程天民,粟永萍,李 楠,董世武,艾国平,冉新泽,徐 辉 (第三军医大学军事预防医学院预防医学教研室,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 探讨静脉输注的真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)向全身照射(total body irradiation, TBI)大鼠骨髓优势分布的机制。**方法** RT-PCR和荧光免疫化学检测骨髓中基质细胞源性细胞因子(stromal-derived factor-1, SDF-1)的表达水平,以及dMSCs中SDF-1的受体CXCR4的表达水平。Transwell培养体系中,观察SDF-1对dMSCs的趋化作用。**结果** TBI大鼠骨髓SDF-1的表达水平明显高于正常大鼠,同时dMSCs表达CXCR4。体外趋化实验发现,SDF-1对dMSCs有很强的趋化作用,而使用SDF-1的中和性抗体后,TBI大鼠骨髓提取液对dMSCs的趋化作用明显下降($P<0.05$)。**结论** TBI大鼠骨髓局部上调表达的SDF-1在移植dMSCs向骨髓的优势分布中有重要作用。

关键词: 真皮多能干细胞;全身照射;分布;基质细胞源性因子-1

中图法分类号: R322.991;R329.28;R339.57 **文献标识码:** A

Mechanism of preferential distribution of transplanted dermal multipotent stem cells to bone marrow in rats exposed to total body irradiation

ZONG Zhao-wen, CHENG Tian-min, SU Yong-ping, LI Nan, DONG Shi-wu, AI Guo-ping, RAN Xin-ze, XU Hui (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 explore the mechanism of preferential distribution of transplanted dMSCs to bone marrow (BM) in rats exposed to total body irradiation (TBI). **Methods** The expression of SDF-1 in BM of normal rats and TBI rats, and the expression of CXCR4 (the only known receptor of SDF-1) in dMSCs were examined by using RT-PCR and fluorescent immunochemistry. The chemotactic effect of SDF-1 on dMSCs was evaluated in Transwell system. **Results** The expression of SDF-1 in BM of rats with TBI was upregulated more significantly than that of normal rats, and dMSCs expressed CXCR4. SDF-1 had a strong chemotactic effect on dMSCs, and when neutralized antibody to SDF-1 was added, the chemotactic effect of BM extracts from TBI rats on dMSCs was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** The upregulated expression of SDF-1 plays an important role in the preferential distribution of transplanted dMSCs to BM of rats with TBI.

Key words: dermal multipotent stem cell; total body irradiation; distribution; stromal-derived factor-1

在本研究所前期的工作中,我们分离培养鉴定了大鼠真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells, dMSCs)[1],然后将其以经尾静脉输注的方式移植到5 Gy γ射线全身照射大鼠体内,发现移植的dMSCs可优势分布到骨髓[2],并可促进造血功能的恢复[3]。进一步的研究表明,TBI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优势分布到损伤的骨髓。但目前尚不清楚骨髓提取液中的哪些因素发挥主要作用。在尚未发表的研究结果中,我们通过基因芯片和抑制消减杂交的方法,发现SDF-1在TBI大鼠的骨髓中表达上调,而SDF-1与其受体CXCR4之间的相互作用被证明在多种涉及细胞趋化和细胞迁移过程中有重要作用,因而本研究拟重点探讨SDF-1/ CXCR4在移植dMSCs向TBI大鼠骨髓优势分布中的作用。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2005CB522605);国家自然科学基金资助项目(30500141);第三军医大学校科研基金资助项目(XG200509)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605), the National Natural Science Foundation of China(30500141) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (XG200509)

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,发表论文10余篇。电话:13883506677,E-mail: zongzhaowen2004@sina.com

收稿日期: 2005-10-20;**修回日期:** 2005-12-02

1　材料与方法

1.1　主要试剂和实验动物

Tripure 购自 Roche 公司，RNA PCR Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司。一抗兔抗 CXCR4 和 SDF-1 购自 Santa Cruz 公司，藻红蛋白（phycoerythrin，PE）结合的抗兔二抗购自 Sigma-Aldrich 公司。Transwell 培养小室购自 Cornig 公司，重组人 SDF-1α 购自 Peprotechec 公司。实验动物 Wistar 大鼠购自第三军医大学实验动物中心。其中，用于分离 dMSCs 的为新生 1 d 大鼠（体质量约 50 g），用于检测骨髓中 SDF-1 表达情况的大鼠为成年大鼠，共 8 只，雌雄不拘，体质量约 200 g。

1.2　大鼠 dMSCs 的分离培养鉴定以及 CXCR4 表达情况的检测

参照本研究所建立的方法进行 dMSCs 的分离培养和鉴定[1,2]，采用 RT-PCR 和荧光细胞免疫化学检测 dMSCs 的 CXCR4 表达情况。

1.2.1　RT-PCR　参照试剂盒的说明书，用 Tripure 提取 dMSCs 的总 RNA，并取 1 μg 进行两步法 RT-PCR 扩增 CXCR4。PCR 的上游引物为 5′-AGTGGGCAATGGGTTGGTAAT-3′，下游引物为 5′-TCAGGGATAGTCAGGAGGAGGG-3′，产物 354 bp。灭菌蒸馏水和 293 细胞总 RNA 作为对照。

1.2.2　荧光细胞免疫化学　12 孔培养板制备贴壁细胞，无水乙醇固定 30 min，5% BSA 封闭液室温孵育 30 min，倾去封闭液，加兔多克隆抗 CXCR4 抗体，4 ℃孵育过夜。次日加入荧光二抗，孵育约 30 min，荧光显微镜下观察。上述每个步骤之间用 PBS 充分漂洗。不加一抗的 dMSCs 作为阴性对照。

1.3　大鼠骨髓中 SDF-1 表达情况的检测

采用 RT-PCR 和免疫组织化学检测正常大鼠（4 只）和全身照射大鼠（4 只）骨髓的 SDF-1 表达情况。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，一部分制作骨髓涂片，一部分用以提取总 RNA。

1.3.1　RT-PCR　使用 Tripure 提取骨髓的总 RNA，精确定量后，取 1 μg 总 RNA 两步法 RT-PCR 扩增 SDF-1。上游引物为 5′-CCAATCAGAAATGGGAACAAGA-3′，下游引物为 5′-GAGGCTTACAGCACGAAACAG-3′，产物 377 bp。以 HPRT 作为参照物，其上游引物为 5′-TCATCAGCGAAAGTGGAAA-3′，下游引物为 5′-TGTCTGTCTCACAAGGGAAGT-3′，产物为 270 bp。反应结束后，将 6 μl SDF-1 扩增产物和 4 μl HPRT 扩增产物混匀，1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.3.2　荧光免疫组织化学　取上述制备的骨髓涂片，4% 多聚甲醛固定 1 h 后，3% 过氧化氢孵育 10 min，其余步骤同荧光细胞免疫化学。

1.4　SDF-1 对 dMSCs 趋化作用的检测

趋化作用的检测在 Transwell 培养系统中完成，具体方法见文献[2]。简述如下：取 100 μl dMSCs 细胞悬液（约含细胞 10^4 个），接种于 Transwell 小室上层。约 1 h 后，按分组不同将 400 μl相应的标本加入 Transwell 小室下层。孵育 4 h 后，取出 Transwell 小室，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观察。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。每组重复 3 个标本。

实验设 7 组：A-D 组小室下层分别加 12.5、25、50、100 ng/ml 的重组 SDF-1；E 组小室下层加 TBI 大鼠的骨髓提取液；F 组小室下层加 TBI 大鼠的骨髓提取液和 480 ng/ml 的抗 SDF-1 抗体；G 组小室下层加生理盐水。骨髓提取液的制备方法参见文献[2]，简述如下：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。需要说明的是，之所以选择 5 Gy的剂量照射大鼠，是因为我们前期的实验证实 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]。

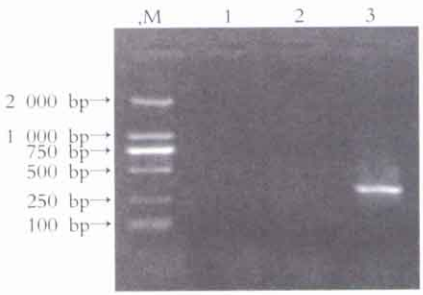
1.5　统计学分析

实验结果均以 $x \pm s$ 表示，用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　分离培养的 dMSCs 表达 SDF-1 的受体 CXCR4

以 dMSCs 的总 RNA 为模板，经 RT-PCR 可扩增出 CXCR4 片段（354 bp 左右），而以对照细胞 293 细胞则未能扩增出 CXCR4 片段（图 1）。免疫荧光染色后，在荧光显微镜下，可观察到红色的阳性细胞（图 2）。RT-PCR 和免疫细胞化学的结果证明，dMSCs 表达 SDF-1 的受体 CXCR4。



M：DNA 电泳分子量标准（DL2000）；1：阳性对照（蒸馏水）；2：阴性对照（293 细胞）；3：dMSCs.

图 1　RT-PCR 检测 dMSCs 中 CXCR4 的表达情况

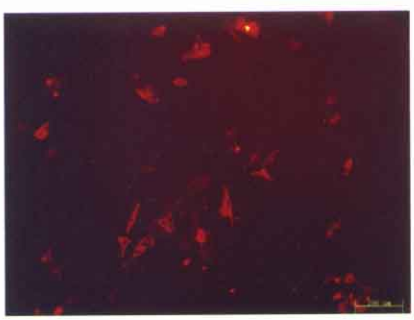


图 2　细胞免疫荧光化学检测 dMSCs 中 CXCR4 的表达情况（×200）

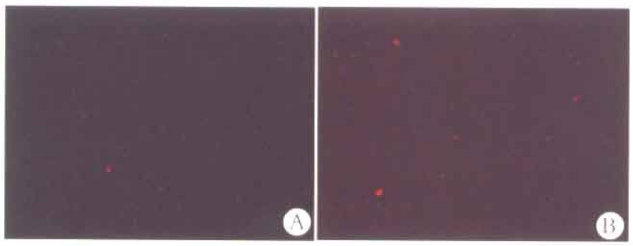
2.2　全身照射大鼠骨髓中 SDF-1 的表达明显上调

以抗兔藻红蛋白为二抗，阳性细胞为红色。结果表明，伤后 2 d 骨髓的 SDF-1 阳性细胞数明显多于正常大鼠骨髓（图 3）。以伤后 2 d 骨髓的总 RNA 为模板，扩增到 SDF-1 的强度高

于正常大鼠骨髓。上述结果表明，和正常大鼠骨髓相比，全身照射大鼠骨髓中 SDF-1 的表达明显上调。

2.3 SDF-1 对 dMSCs 有很强的趋化作用

我们观察了 12.5、25、50、100 ng/ml 4 个浓度的 SDF-1 对 dMSCs 的趋化作用。结果显示，在 12.5 ng/ml SDF-1 的作用下，平均每个高倍视野从小室上层迁移到下层的 dMSCs 数量为(48.7±4.5)个，明显高于在生理盐水的作用下迁移到下层的 dMSCs 数量[(15.8±2.7)个，$P<0.05$]。在 100 ng/ml 的范围内，迁移到小室下层的 dMSCs 数量随 SDF-1 浓度的增加而增加：在 25、50、100 ng/ml SDF-1 的作用下，迁移到小室下层的 dMSCs 数量分别为(85.9±5.6)、(136.1±6.7)、(175.7±5.9)个。



A：正常大鼠骨髓中 SDF-1 的表达；B：TBI 大鼠骨髓中 SDF-1 的表达

图3 免疫荧光组织化学检测骨髓中 SDF-1 的表达 (×200)

和我们以前的发现类似，TBI 大鼠伤后 2 d 骨髓提取液对 dMSCs 有很强的趋化作用[2]。在其作用下，迁移到小室下层的 dMSCs 数量为(124.9±3.8)个。而向骨髓提取液中加入 SDF-1 的抗体后，迁移到小室下层的 dMSCs 数量为(87.3±4.9)个，二者相差显著($P<0.05$)；但在加入抗体后，骨髓提取液对 dMSCs 的趋化作用没有完全消失，提示仍有其他因素参与骨髓提取液对 dMSCs 的趋化作用。

3 讨论

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，成体干细胞已经从大多数组织中被分离和鉴定，并且有大量的实验结果表明，将成体干细胞应用于损伤组织的修复，可取得良好的效果。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。所以，在本研究所前期的工作中，我们分离培养鉴定了大鼠 dMSCs[1]，然后将其以经尾静脉输注的方式移植到 5 Gy γ 射线全身照射大鼠体内(此剂量的 γ 射线全身照射主要引起骨髓的损伤)，发现移植的 dMSCs 可优势分布到骨髓[2]，并可促进造血功能的恢复[3]。但目前尚不清楚这种优势分布的机制，而对其机制的探讨将不仅丰富干细胞移植的理论知识，同时还对干细胞移植的应用具有重要意义，因为我们前期研究发现，即使移植的 dMSCs 可向 TBI 大鼠骨髓优势分布，但其数量仍相对有限(约为移植细胞总量的 2%)[2]，因而有必要寻找适当的措施，增加移植的干细胞向损伤组织的分布，以进一步提高 dMSCs 的治疗效果，而这依赖于对移植干细胞优势分布现象的机制研究。

在本研究所前期的工作中，通过基因芯片和抑制消减杂交的方法，我们发现 SDF-1 在全身照射大鼠的骨髓中表达上调。SDF-1 属于 CXC 族趋化性细胞因子，CXCR4 是其唯一受体。SDF-1 与 CXCR4 之间的相互作用被证明在多种涉及细胞趋化和细胞迁移过程中发挥作用[4,5]。胚胎发育晚期，造血干细胞在 SDF-1 的化学趋化作用下，逐渐由肝脏向骨髓和脾脏迁徙，完成了造血器官由肝脏向骨髓和脾脏的转变[4]。Abbott 等[5]的研究表明梗死心肌处可上调表达 SDF-1，并趋化经静脉移植的间充质干细胞更多地分布到损伤的心肌，参与梗死心肌的修复。因而，本研究重点探讨 SDF-1 在移植 dMSCs 优势分布中的作用。结果表明，TBI 大鼠骨髓 SDF-1 的表达较正常骨髓上调；同时，dMSCs 表达 SDF-1 的受体 CXCR4，而 Transwell 培养小室中趋化实验证实，SDF-1 对 dMSCs 有很强的趋化作用；而使用 SDF-1 的性抗体后，骨髓提取液对 dMSC 的趋化作用明显下降，表明 SDF-1 在 TBI 大鼠骨髓提取液对 dMSCs 的趋化作用和移植 dMSCs 的优势分布中起到重要的作用。当然，损伤骨髓中存在的其他物质(比如单核细胞趋化蛋白-1 和巨噬细胞炎性蛋白-1 等)在对 dMSCs 的趋化中也有一定的作用。因为，向 TBI 大鼠骨髓提取液中加入 SDF-1 的抗体后，其对 dMSCs 的趋化作用并为完全消失。我们将在以后的实验中，对其进行进一步的探讨。

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] 宗兆文，程天民，冉新泽，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2005，27(4)：279-281.

[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] HATTORI K，HEISSIG B，RAFII S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1 [J]. Leuk Lymphoma，2003，44(4)：575-582.

[5] ABBOTT J D，HUANG Y，LIU D，*et al*. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury [J]. Circulation，2004，110(21)：3300-3305.

(编辑 栾 嘉)