基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.005

重组人表皮生长因子在食管黏膜损伤部位对骨髓间充质干细胞招募及定居影响的研究

哈伟杰，温剑虎
（重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察重组人表皮生长因子（Recombinant human epidermal growth factor，rhEGF）在食管黏膜损伤部位对骨髓间充质干细胞（Marrow mesenchymal stem cells，MSCs）招募及定居，探讨 MSCs 对食管黏膜损伤部修复的影响。方法：实验大鼠随机分组，将传代 MSCs 经 DAPI 标记后移植入实验大鼠体内。2 周后取食管组织切片，激光共聚焦显微镜下观察植入 MSCs 的招募及定居情况。结果：局部移植组，食管损伤且给予 rhEGF 组可见较多量 DAPI 标记的细胞，未给予 rhEGF 的损伤组见少量 DAPI 标记的细胞，二者比较差异有统计学意义（$P<0.05$），与正常对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。尾静脉移植组：仅有极少量 DAPI 标记的细胞。给予 rhEGF 的损伤组与正常对照组间比较差异有统计学意义（$P<0.05$），给予 rhEGF 的损伤组与未给予 rhEGF 组比较有统计学意义（$P<0.05$），未给予 rhEGF 的与正常对照组比较无统计学意义（$P>0.05$）。结论：MSCs 可在损伤的大鼠食管组织中被招募并定居，局部移植与尾静脉移植途径有差别，rhEGF 对于 MSCs 在损伤的大鼠食管组织招募及定居具有一定的影响。

【关键词】骨髓间充质干细胞；食管黏膜损伤；干细胞招募；干细胞定居
【中国图书分类法分类号】R605 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-17

Influence of the RhEGF on the recruiting and settling of the MSCs on injured part of the esophageal mucosa

HA Wei-jie，WEN Jian-hu
（*Department of Cardiothoracic Surgery，the First Affiliated Hospital，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To observe the influence of the RhEGF on the recruiting and settling of the MSCs on injured part of the esophageal mucosa. *Methods*：The SD rats were investigated and divided into groups randomly. SD rat MSCs marked by DAPI were transplanted into the experimental groups and control groups rats by tail vein injection and local injection respectively. The experimental groups were given rhEGF. After 2 weeks，the esophageal tissues were taken to observe the recruitment and settlement of implanted cells with the laser scanning microscope. *Results*：Locally injected group，the group with esophageal injury and given rhEGF could be seen to be with more DAPI labeled cells；the group without rhEGF could be seen to be with DAPI less labeled cells. There was significant difference between these two groups（$P<0.05$）. There was significant difference between the normal group and locally injected group（$P<0.05$），both in rhEGF given rats and rats without rhEGF. Tail vein graft group：There were few DAPI labeled cells observed. There was significant difference between the tail vein graft group with rhEGF and normal group（$P<0.05$），and there was no significant difference between the tail vein graft but without rhEGF group and normal group（$P>0.05$）. *Conclusion*：MSCs can be recruited and settled in rat damage esophagus tissue. There are different results between tail vein and local injection. rhEGF can influence the recruitment and settlement of MSCs in rat injury esophagus.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cell；esophageal mucosal injury；stem cell recruitment；stem cell settlement

食管黏膜长期反复损伤修复导致黏膜上皮异型增生和肠柱状上皮化被公认是食管癌癌前病变。骨髓间充质干细胞（Marrow mesenchymal stem cells，MSCs）具有极强的自我复制能力和多向分化潜能，体内存在损伤部位对其具有招募和趋化性。表皮生长因子（Epidermal growth factor，EGF）具有可诱导细胞分化、促进上皮生长、促进组织损伤修复等生物学作用。用标记的同种异体 SD 大鼠的 MSCs 移植到食管损伤模型和对照组模型，局部给予重组人表皮生长因子（Recombinant human epidermal growth factor，rhEGF）干预，激光共聚焦显微镜观察 MSCs 在食管组织的招募及定居，观察食管损伤黏膜对 MSCs 招募和归巢、定居；探讨 MSCs 对食管黏膜损伤部修复的影响。

作者介绍：哈伟杰（1984-），男，硕士，
研究方向：胸部肿瘤。
通信作者：温剑虎，男，教授，Email：tigerool@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康清洁级 SD 大鼠，雌雄各半，体重 200 g 左右，重庆医科大学实验动物中心提供。随机分组：A 组（损伤局部给予 rhEGF）；A1 组 7 只，尾静脉途径移植；A2 组 7 只，局部注射；A3 组 7 只，局部注射无细胞的等量基础培养基；B 组（损伤局部不给予 rhEGF）；B1 组 7 只，尾静脉途径移植；B2 组 7只，局部注射；B3 组 7 只，局部注射无细胞的等量基础培养基；C 组（正常对照）正常饲养；C1 组 7 只（局部给予 rhEGF），MSCs 局部注射；C2 组 7 只（局部不给予 rhEGF），MSCs 局部注射。C3 组 7 只，局部注射无细胞的等量基础培养基。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 灌注大鼠食管损伤模型 建立 SD 大鼠溶血卵磷脂加酸灌注食管损伤模型[1]。术前 12 h 禁食 8 h 禁饮，以安定 1.6 mg/kg 肌注镇静，催眠。Forley 2.7 mm 婴儿双腔气囊导尿管自行改装食管 灌注管，插入到胃，气囊注入 0.6~1.0 ml 气体，暂时阻断贲门入口。50 mmol/L HCl+2 mg/ml 溶血卵磷脂从导管注入食管，维持 30 min，开放贲门入口，胃内注入牛奶 2 ml，中和溶血卵磷脂对胃的损伤。每周 1 次，连续灌注 4 周。观察大鼠的饮食及活动情况，于 4 周后各组随机处死 2 只，取出食管行纵行剖开，观察大体形态的改变。纵切食管呈条状置于 10%甲醛溶液中固定，石蜡包理，HE 染色，光镜观察组织学改变。参照 Hetzel-Dent 食管黏膜损伤分级[2]，制定本实验食管黏膜损伤指数评分标准，符合黏膜损伤标准，为成功实验用模型，给予 MSCs 移植。

1.2.2 局部注射方法 术前 12 h 禁食 8 h 禁饮，以安定 1.6 mg/kg 肌注镇静，催眠，固定大鼠于鼠板上，腹部备皮、消毒、铺巾，0.5%利多卡因 0.5 ml 局麻，腹部正中切口进入腹腔，暴露贲门，取 MSCs 悬液 0.5 ml/100 g，单点缓慢注入贲门处食管黏膜下层，rhEGF 0.5 ml（1 000 IU）采用同样方法相同部位注入。术后均常规饲养观察，2 周后处死。

1.3 MSCs 的获取、培养、传代、鉴定、标记

1.3.1 MSCs 的获取、培养、传代 SD 青年大鼠断颈处死，无菌条件下取出大鼠股骨，收集骨髓细胞悬浮液，接种在塑料培养瓶中，37℃，5%CO_2 培养。10~14 d 后待悬液细胞长到 80%以上融合时，按 1:2 传代至玻璃培养瓶，37℃ 5%CO_2 培养箱接种传代。

1.3.2 MSCs 的鉴定 免疫组织化学染色初步测定是否提取出 MSCs，后用异硫氰酸荧光素（Fluoresceine isothiocyanate，FITC）或藻红素（Phycoerythrin，PE）标记的表面分子 CD34、CD44、CD71 抗体，对传 3 代的 MSCs 行流式细胞鉴定，传代细胞 CD44 阳性，CD34 及 CD71 阴性。

1.3.3 MSCs 的体外标记 取第 4 代 SD 大鼠 MSCs，于培养液中加入无菌的 DAPI 至浓度为 50 g/L，放入 37℃细胞培养箱孵育 1 h，离心后反复以 PBS 洗涤 6 次以上去除未结合 DAPI，收集细胞，部分细胞于紫外光显微镜下观察细胞染色情况，其余细胞以无血清 DMEM 液调整至浓度为 2×10^6 个/ml 放入冰浴中备用，且于 1 h 内将备用细胞移植入大鼠体内。

1.4 MSCs 移植及用量

取 DAPI 标记的备用传 4 代大鼠 MSCs 悬液，按实验分组进行移植，MSCs 悬液移植量为 0.5 ml/100 g，尾静脉或局部注射。

1.5 实验结果观察

取处死大鼠食管下段 3 处和食管中上段 3 处组织（1 mm^3）经新鲜配置的多聚甲醛固定冰冻切片，以激光共聚焦显微镜观察移植 MSCs 在食管组织中的分布定居情况并拍摄照片，测定积分光密度值（Integrated optical density，IOD），采用 SPSS 15.0 统计软件，进行单因素方差分析（ANOVA），组间比较采用 *Tamhane* 检验。

2 结 果

2.1 MSCs 的培养及鉴定

SD 大鼠骨髓中分离提取的原代 MSCs 接种后贴壁生长，细胞多为圆形，少量为三角形或梭形，1 周后圆形细胞减少，其他类型细胞增多，并见细胞呈集落样生长，12~14 d 基本融合。传代后细胞贴壁性较好，细胞呈比较均一的梭形，具有一定的方向性，呈现出漩涡样生长，增殖速度加快，4 d 左右可传代。免疫组织化学染色法初步检测传 3 代 MSCs 结果为 CD34 表达阴性，CD44 表达阳性。流式细胞仪检测结果显示培养的第 3 代大鼠 MSCs 表达 CD44（87.5%），而 CD34 和CD71 无表达，表明所获得的细胞为大鼠骨髓间质来源的的干细胞。

2.2 大鼠食管组织的形态观察

对食管正常饲养组及损伤组食管 HE 染色形态观察，可见正常饲养组未见异常，损伤组食管黏膜下大量炎细胞浸润，食管黏膜出现溃疡，参照 Hetzel-Dent 食管黏膜损伤分级应属中-重度损伤，符合本实验的模型要求。

2.3 MSCs 在大鼠食管组织内的分布

观察标记好的 MSCs 移植入 SD 大鼠体内 2 周后 HE 染色形态，可见给予培养基组未见明显异常，未给予 rhEGF 的损伤组食管黏膜下仍有较多炎细胞浸润，食管黏膜未出现溃疡，给予 rhEGF 的损伤组食管黏膜下有少量炎细胞浸润，管黏膜未出现溃疡，见图 1~3。

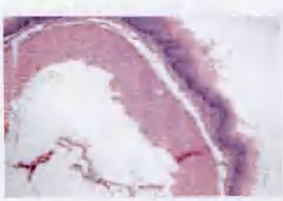


图 1 局部给予培养基组（HE 染色，×100）

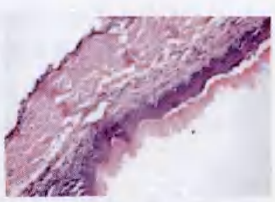


图 2 未给予 rhEGF 的损伤组（HE 染色，×100）

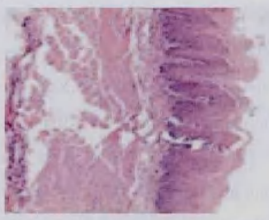
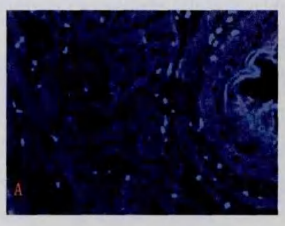


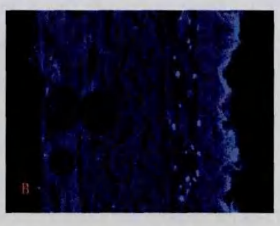
图 3 给予 rhEGF 的损伤组（HE 染色，×100）

2.4 激光共聚焦观察 MSCs 在大鼠食管组织内的分布

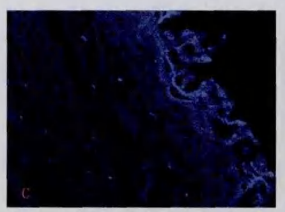
DAPI 标记的 MSCs 在荧光显微镜下细胞核为圆形的蓝色发光点，胞质不显示。将 DAPI 标记好的 MSCs 移植入 SD 大鼠体内 2 周后，激光共聚焦显微镜可见部分组的大鼠食管组织内有荧光标记的细胞，细胞核椭圆形散在分布，主要分布在食管黏膜下层和肌层，而给于培养基的对照组未发现 MSCs 趋化定居，见图 4。



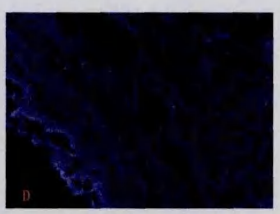
A. 损伤局部给予 rhEGF，MSCs 局部移植



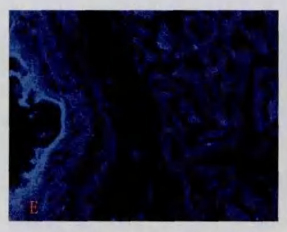
B. 损伤局部未给予 rhEGF，MSCs 局部移植



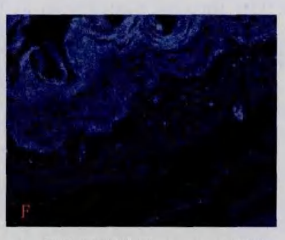
C. 损伤局部给予 rhEGF，MSCs 尾静脉移植



D. 损伤局部未给予 rhEGF，MSCs 尾静脉移植



E. 损伤局部未给予 rhEGF 对照组



F. 损伤局部给予 rhEGF 对照组



G. 给予培养基的对照组

图 4 激光共聚焦显微镜观察 MSCs 在大鼠食管组织内的分布

2.5 各组 IOD 数值测定

根据分组分别进行激光共聚焦观察各组食管组织内有无标记的 MSCs 趋化及定居，并测定各组荧光 IOD 数值，其结果见表 1。

表 1 不同试验组激光共聚焦图片测定的 IOD 值

组别		IOD 值（$\bar{x}\pm s$）
A组（损伤局部给予 rhEGF）	A1（尾静脉途径）	4 066.364 0 ± 374.652 8
	A2（局部注射）	17 496.210 0 ± 2 187.368 0
	A3（注射培养基）	106.595 9 ± 13.581 7
B组（损伤局部未给予 rhEGF）	B1（尾静脉途径）	119.578 7 ± 18.695 2
	B2（局部注射）	8 362.226 0 ± 1 189.782 0
	B3（注射培养基）	128.840 8 ± 16.715 5
C组（正常饲养）	C1（局部给予 rhEGF）	14 075.070 0 ± 2 830.393 0
	C2（局部不给予 rhEGF）	6 835.020 0 ± 1 134.412 0
	C3（注射培养基）	117.480 0 ± 17.786 9

2.6 大鼠食管组织内定居情况比较

MSCs 移植入大鼠体内 2 周后，尾静脉移植途径：损伤且给予 rhEGF（A1）组较未给予 rhEGF（B1）组，差异有统计学意义（F=4.02，P<0.05），与对照（A3、B3、C3）组相比较，差异有统计学意义（F=31.2，P<0.05）；损伤未给予 rhEGF（B1）组与对照（A3、B3、C3）组比较，差异无统计学意义（F=46.6，P>0.05）。局部移植：损伤且给予 rhEGF（A2）组较未给予 rhEGF（B2）组，差异有统计学意义（F=9.43，P<0.05），与给予 rhEGF 的正常对照（C3）组比较，差异无统计学意义（F=25.6，P>0.05），与对照（A3）组相比较，差异有统计学意义（F=7.83，P<0.05）；损伤未给予 rhEGF（B2）组较对照（C3）组，差异有统计学意义（F=35.8，P<0.05）。局部移植与尾静脉移植各组间比较，差异有统计学意义（F=20.5，P<0.05）。

3 讨 论

食管长期反复损伤修复导致食管黏膜上皮异型增生和肠柱状上皮化（Barrett 食管，Barrett's esophagus，BE）被公认是食管癌癌前病变[3]。癌变的风险比一般人群高 34~125 倍[4,5]。细胞疗法（Cell therapy）近年来成为治疗多种难治性疾病的新策略，其中应用最多的靶细胞即 MSCs，其具有极强的自我复制能力和多向分化潜能[6,7]。MSCs 无移植排斥反应，且易分离得到，因此经体外纯化和扩增后，可进行同种异体移植或自体移植，是组织工程理想的种子细胞[8,9]。有文献报道，MSCs 通过循环途径进入体内后，在损伤部位招募下，可以在病变部位定居、分化并对损伤进行修复[7,8]。目前国内外应用干细胞移植治疗血管疾病，神经系统疾病和许多疑难杂症，并且取得很好应用前景。

EGF 具有诱导细胞分化，促进上皮生长，促进组织损伤修复等生物学作用。近年的研究证实了 EGF 在黏膜上皮完整性的维持中发挥重要作用[10]，EGF 对肠上皮屏障有保护效

应[11,12]。rhEGF 就是利用基因重组技术制备的外源性人类表皮生长因子，其结构和生物学活性与人体内源性表皮生长因子高度一致。临床研究表明，rhEGF 可启动创面修复过程，具有促进上皮组织再生、加速创面愈合作用。

将 DAPI 标记的 MSCs 移植入 SD 大鼠食管损伤模型，观察 MSCs 在损伤食管组织内的招募和定居情况，同时用rhEGF 进行人为干预，研究 rhEGF 在食管黏膜损伤部位对 MSCs 招募及定居有无影响。MSCs 移植入大鼠体内 2 周后，观察到通过尾静脉移植组只有少数大鼠食管组织内有极少量的 DAPI 标记的细胞，细胞分布无明显规律，而局部移植组可见较多量的 DAPI 标记的细胞，细胞多分布在食管黏膜下层和肌层内。通过统计学检测发现通过尾静脉移植途径：损伤且给予 rhEGF(A1)组较未给予 rhEGF(B1)组，差异有统计学意义（$P<0.05$），与对照(A3、B3、C3)组相比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；损伤未给予 rhEGF(B1)组与对照(A3、B3、C3)组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。局部移植：损伤且给予 rhEGF(A2)组较未给予 rhEGF(B2)组，差异有统计学意义（$P<0.05$），与给予 rhEGF 的正常对照(C3)组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），与对照(A3)组相比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；损伤未给予 rhEGF(B2)组较对照(C3)组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。局部移植与尾静脉移植各组间比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）。以上统计结果说明MSCs 可在损伤的大鼠食管组织中被招募并定居，局部移植与尾静脉移植途径之间有差别，rhEGF 在 MSCs 的招募和定居中具有一定的积极作用。

目前多数学者认为 MSCs 的分化受其所处微环境的影响和制约，在局部细胞因子的作用下可分化为成骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞及多种血管内皮细胞，还可形成神经、胶质细胞、心肌细胞、肺组织和消化道上皮组织，从而修复损伤组织，在治疗一些难治性疾病方面获得较大进展[13-15]。rhEGF 影响 MSCs 的迁移、招募和定居，其具体途径和机制以及 MSCs 分化为其他组织类型细胞的机制尚不清楚，因此 rhEGF 与 MSCs 二者之间的具体作用途径和机制，及 MSCs 细胞在食管定居后分化为何种细胞类型以及是否确实有助于食管损伤的修复仍有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Li Y, Martin R C. Reflux injury of esophageal mucosa: experimental studies in animal models of esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. Dis Esophagus, 2007, 20(5): 372-378.

[2] Yaghoobi M, Padol S, Yuan Y, et al. Impact of oesophagitis classification in evaluating healing of erosive oesophagitis after therapy with proton pump inhibitors: a pooled analysis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010, 22(5): 583-590.

[3] Ong C A, Lao-Sirieix P, Fitzgerald R C. Biomarkers in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: predictors of progression and prognosis[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(45): 5669-5681.

[4] Solaymani-Dodaran M, Logan R F, West J, et al. Mortality associated with Barrett's esophagus and gastroesophageal reflux disease diagnoses-a population-based cohort study[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(12): 2616-2621.

[5] Bhat S, Coleman H G, Yousef F, et al. Risk of malignant progression in barrett's esophagus patients: Results from a large population-based study[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(13): 1049-1057.

[6] Ribeiro C A, Salgado A J, Fraga J S, et al. The secretome of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned media varies with time and drives a distinct effect on mature neurons and glial cells (primary cultures)[J]. Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(8): 668-672.

[7] Haack-Sorensen M, Friis T, Bindslev L, et al. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(3): 192-203.

[8] Goedecke A, Wobus M, Krech M. Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro[J]. Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(8): 648-654.

[9] Jin G, Prabhakaran M P, Ramakrishna S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering[J]. Acta Biomater, 2011, 7(8): 3113-3122.

[10] Banan A, Fields J Z, Zhang Y, et al. Phospholipase C-gamma inhibition prevents EGF protection of intestinal cytoskeleton and barrier against oxidants[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver hysiol, 2001, 281(2): G412-423.

[11] Sheth P, Seth A, Thangavel M, et al. Epidermal growth factor prevents acetaldehyder-induced paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer[J]. Alcohol Clin & Exp Res, 2004, 28(5): 797-804.

[12] Banan A, Fields J Z, Zhang Y, et al. Key role of PKC and Ca^{2+} in EGF protection of microtubules and intestinal barrier against oxidants [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(5): G828-843.

[13] Noort W A, Feye D, Van Den Akker F, et al. Mesenchymal stromal cells to treat cardiovascular disease: strategies to improve survival and therapeutic results[J]. Panminerva Med, 2010, 52(1): 27-40.

[14] Tu Q, Valverde P, Li S, et al. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone[J]. Tissue Eng, 2007, 13(10): 2431-2440.

[15] Syková E, Jendelová P, Urdzíková L, et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels-two strategies for spinal cord injury repair[J]. Cell Mol Neurobiol, 2006, 26(7-8): 1113-1129.

（责任编辑：冉明会）