基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0152-04

硝普钠促进静脉移植 BMSCs 向溃疡性结肠炎大鼠结肠的迁移

陈晓云,徐艳华,姜 蓉,汪维伟

(重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室、干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察硝普钠能否促进静脉移植的大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)向溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)大鼠结肠的迁移。方法:分离培养、4',6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)荧光标记 SD 大鼠 BMSCs。免疫复合法建立 UC 大鼠模型,1、2 组 UC 大鼠均经尾静脉注射 DAPI 标记 BMSCs 的细胞悬液,2 组细胞悬液还含 0.2 mg/kg 体重的硝普钠。移植后第 7、14 天各处死 5 只大鼠,取溃疡及非溃疡部位结肠做恒冷切片,荧光显微镜下分别计数各组 DAPI 标记 BMSCs 在溃疡及非溃疡部位结肠的细胞数。结果:移植第 7、14 天,2 组结肠溃疡部位阳性细胞数均明显高于非溃疡部位($P<0.01$);移植第 7 天,2 组溃疡及非溃疡部位的阳性细胞数均高于 1 组($P<0.05$)。结论:静脉移植 BMSCs 的同时给予硝普钠能促进 BMSCs 向结肠溃疡部位的迁移。

【关键词】骨髓间充质干细胞;移植;溃疡性结肠炎;硝普钠

【中国图书法分类法分类号】R574.1;R-332 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-08

Sodium nitroprusside promoting the migration of vein transplanted bone marrow mesenchymal stem cells to the colon of ulcerative colitis rat

CHEN Xiao-yun, et al

(*Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Sodium nitroprusside (SNP) in promoting the migration of vein transplanted bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)to the colon of ulcerative colitis rat. *Methods*: BMSCs of SD rat were isolated, cultured and marked with DAPI. Ulcerative colitis (UC) rat was induced with immune-combined TNBS/ethanol. UC rats in group 1 and 2 was received caudal vein injection of DAPI labeled BMSCs cell suspension; but 0.2 mg Sodium nitroprusside/kg body weight was also injected in group 2. 5 rats in each group were sacrificed on day 7 and 14 after injection. The colon of ulcerative or non-ulcerative parts were prepared as cryostat sections. The numbers of BMSCs both in colon of ulcerative or non-ulcerative parts were counted under fluorescent microscope respectively. *Results*: On the 7th and 14th day after injection, the number of marked BMSCs in the colonic ulcerative part was more than that in non-ulcerative parts ($P<0.01$) both in group 1 and 2; On the 7th day, the marked BMSCs number of group 2 both in the colon of ulcerative or non-ulcerative parts were higher than those in group 1 ($P<0.05$). *Conclusion*: SNP could encourage vein transplanted BMSCs migranting to the injured colonic tissue by the way that vein transplantion of BMSCs combined supply of SNP at the same time.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; transplantation; ulcerative colitis; sodium nitroprusside

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)为一种慢性结肠炎性疾病,难治愈,被世界卫生组织列为现代难治病之一。近年来,有报道干细胞移植对炎症性肠病具有治疗作用。Yujiro 等[1]报道了骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)局部注射移植治疗 UC 的实验,证实 BMSCs 能加快炎性肠病的愈合。Wei 等[2]证实了 BMSCs 和 HSCs 尾静脉移植治疗 UC 大鼠有一定疗效。但静脉移植后的干细胞常滞留在肺、肝、脾等血管丰富的器官[3]。Sigot 等[4]曾用硝普钠来促进经脾移植的肝细胞向肝迁移。本实验拟观察硝普钠对静脉移植 BMSCs 向 UC 大鼠结肠迁移的影响,为进一步研究 BMSCs 治疗炎症性肠病提供实验依据。

作者介绍:陈晓云(1980-),女,硕士,

研究方向:干细胞分化。

通信作者:汪维伟,女,教授,Email:wwwpzn@163.com。

基金项目:重庆医科大学自科预研课题(编号:NSFYY200705)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康 SD 大鼠，雌雄兼用，清洁级，重庆医科大学实验动物中心提供。3～4 周龄者用于提取 BMSCs；7～8 周龄者用于制作 UC 模型。DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司)；胎牛血清(杭州四青季)；4',6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)(Roth 公司)；小鼠抗大鼠 CD44-FITC、CD45-PE、CD90-PE 抗体(Serotec 公司)；胰蛋白酶、2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-tfinitrobenzene sulfonic acid,TNBS)、完全佛式佐剂(Sigma 公司)；硝普钠(北京双鹤现代医药技术有限责任公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的培养、鉴定 脱颈处死大鼠，无菌冲洗出股、胫骨骨髓，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，加入DMEM/F12 重悬细胞并计数调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml，接种于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中，置 37℃、5%的 CO_2 孵箱培养。每 3～4 d 换液 1 次，细胞长到 80%融合时，以 1:2 的比例传代培养。分别取第 3、5 代细胞各 5 例，制成 5.0×10^5 个/ml 的单细胞悬液，每例 3 管分别加入下列荧光标记的小鼠抗大鼠单克隆抗体：CD44-FITC、CD45-PE、CD90-PE、同型阴性对照小鼠抗人 IgG1-FITC/IgG2a-PE 各 20 μl，每管各加入细胞悬液 100 μl；混匀，室温下反应 20 min，加入 1.5 ml 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution,PBS)，混匀后离心 5 min 弃上清液，每管加入 500 μl PBS，流式细胞仪检测，Cell-Quest 软件分析。

1.2.2 DAPI 标记 取第 3 代 BMSCs，细胞培养至 50%～60%融合时，加入终浓度 40 μg/ml 的 DAPI 孵育 2 h 后，PBS 洗涤至少 6 次，收集细胞备用。

1.2.3 UC 大鼠模型制作 以段征[5]的免疫复合方法制作UC大鼠模型。制备兔结肠黏膜匀浆上清液，双缩脲法检测其蛋白含量，与等量完全佛式佐剂混合配成抗原乳化液。相隔 14 d 在 SD 大鼠腹股沟、足跖处注射抗原乳化液(含抗原 8 mg)2 次。禁食 24 h，麻醉后将硅胶管由肛门轻缓插入 8 cm，推入 0.65 ml 含 100 mg TNBS/kg 与 50%乙醇混合液灌肠。

1.2.4 BMSCs 移植 20 只 UC 大鼠随机分为 2 组，均经尾静脉注射 1 ml 液体：1 组为荧光标记的 BMSCs 悬液(5×10^6 个)；2 组悬液中增加了 0.2 mg 硝普钠/kg 体重。移植后第 7、14 天各处死 5 只，分别取结肠的溃疡部位和非溃疡部制成恒冷切片，荧光显微镜下观察，每张切片上随机取 4 个高倍镜视野，计数 DAPI 阳性细胞数。相同切片再经 HE 染色，观察形态。

1.3 统计分析

采用 SAS9.1 统计软件，数值以均数±标准差表示，对测量结果进行三因素析因设计资料的方差分析。

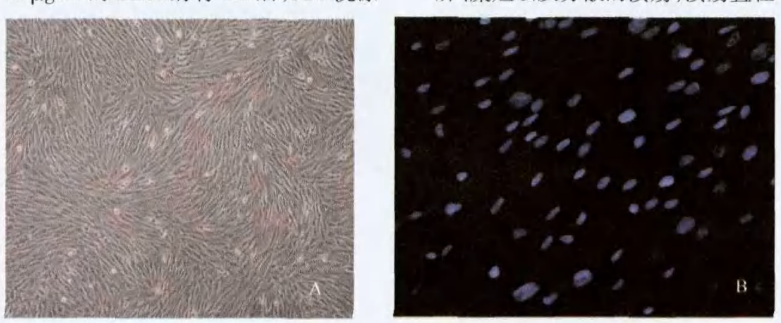
2 结 果

2.1 BMSCs 表型鉴定与标记

原代培养的 BMSCs 约 4 h 开始贴壁，传代纯化后大部分呈梭形，旋涡状生长(图 1A)。DAPI 标记 BMSCs 当天的标记率达 100%，细胞核均发明亮蓝色荧光(图 1B)。流式细胞仪检测结果显示：第 3 代 BMSCs 表达 CD44 及 CD90，均一性为 98.26%±0.48%及 98.68%±0.32%；不表达 CD45(图 2)。

2.2 UC 模型结肠病理改变

建模第 7 天，结肠标本见炎症及溃疡，黏膜出现充血、水肿、糜烂以及分散的溃疡，溃疡直径 3～5 mm(图 3A)。光镜



A. 为第 3 代 BMSCs(×100)；B. 为 DAPI 标记 BMSCs 后 1 d(×200)

图 1 大鼠 BMSCs 的光镜形态及 DAPI 标记

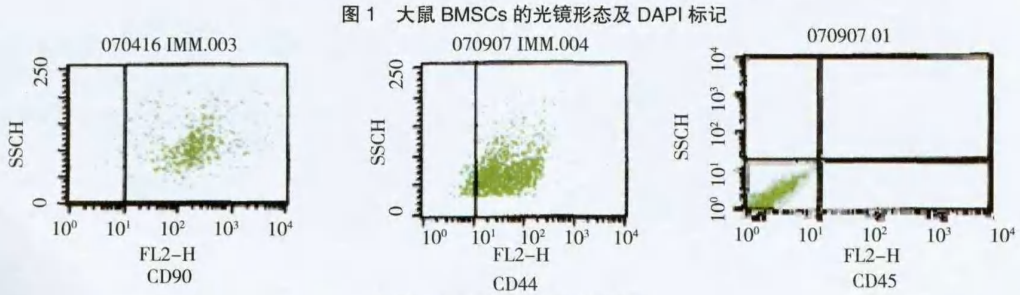
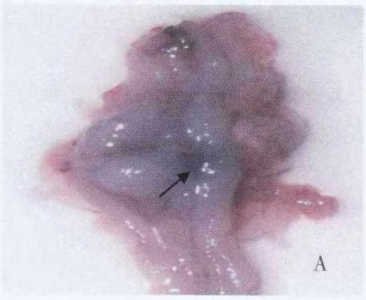


图 2 第 3 代 BMSCs 的表型

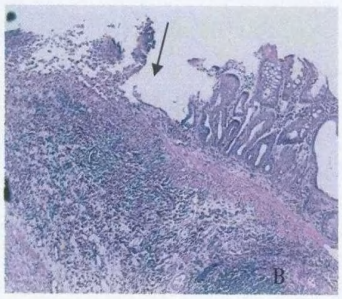
下可见溃疡及炎性渗出物，上皮细胞坏死脱落，黏膜下层及浆膜层广泛充血、水肿、大量炎症细胞浸润，局部坏死可深达肌层(图 3B)。

2.3　加或不加硝普钠移植的 BMSCs 在结肠分布

移植后 7、14 d，1、2 组大鼠结肠均见蓝色荧光标记的 BMSCs(图 4～6)，主要分布在黏膜和黏膜下层。统计结果(表 1)显示，移植第 7、14 天各组溃疡部位阳性细胞数明显高于非溃疡部位 (F=354.54，P < 0.01)；移植第 7 天，2 组的溃疡部位及非溃疡部位的细胞数均高于 1 组(F =15.00，P<0.05)。

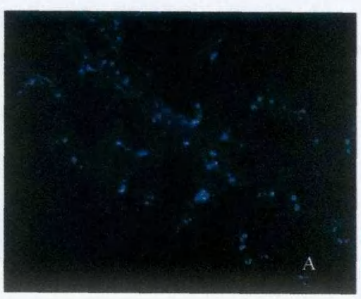


A. ↑示结肠黏膜溃疡、水肿



B. ↑示结肠黏膜的溃疡，HE (× 100)

图 3　建模第 7 天的结肠溃疡病变



A. 2 组

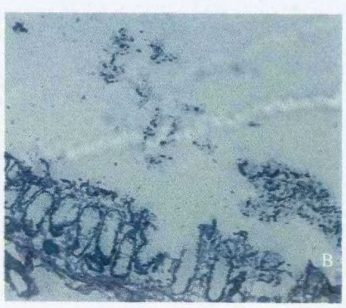


B.1 组 (× 100)

图 4　移植 7 d 非溃疡部位结肠内的 BMSCs，蓝色荧光为 DAPI 标记的 BMSCs



A. 溃疡部位结肠内蓝色荧光标记的 BMSCs

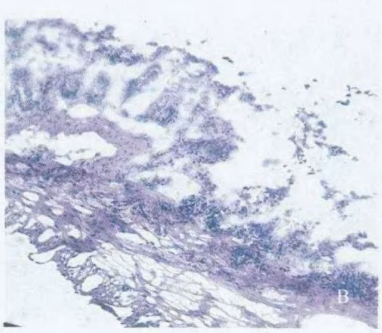


B. 同一切片的 HE 染色(× 100)

图 5　移植 7 d，2 组的溃疡部位结肠内的 BMSCs



A. 溃疡部位结肠内蓝色荧光标记的 BMSCs



B. 同一切片的 HE 染色(× 100)

图 6　移植 7 d 1 组的溃疡部位结肠

表 1 加或不加 SNP 移植的 BMSCs 在结肠的分布(n=12)($\bar{x} \pm s$)

组别	硝普钠	溃疡部位阳性细胞数		非溃疡部位阳性细胞数	
		7 d	14 d	7 d	14 d
1	0	37.2 ± 9.4[a]	37.9 ± 12.4[a]	10.0 ± 3.2	8.0 ± 2.3
2	0.2 mg/kg	47.6 ± 8.2[ab]	34.6 ± 9.8[a]	23.1 ± 9.5[c]	15.5 ± 8.0

注:[a]P< 0.01,各组溃疡部位与非溃疡部位比较;[b]P< 0.05,第 7 天,2 组溃疡部位与 1 组溃疡部位比较;[c]P< 0.05,第 7 天,2 组非溃疡部位与 1 组非溃疡部位比较

3 讨 论

干细胞治疗已日益成为生命科学研究的热点,BMSCs 移植后能进入损伤组织器官,参与受损组织器官的修复[6]。但静脉移植的细胞在受体中的数量有限,制约了 BMSCs 的应用。因此通过不同的方法增强移植的细胞向靶组织或器官的迁移,从而促进 BMSCs 的应用,也受到人们的关注。

机体器官受损后 BMSCs 可以感知靶器官的损害,自动迁移至受损区域。Hayashi Y 等[1]认为消化道上皮受损,骨髓干细胞可以进入消化道,进而分化成消化道上皮细胞。目前对于骨髓干细胞为何会在病损结肠中定居还不清楚,但推测可能与病损结肠微环境的影响有密切关系,一是体内病损组织存在某种趋化因子或炎症细胞的诱导作用,使骨髓干细胞向病损组织定向移动并分化[7];二是病损结肠局部的常常伴有血管损伤或炎症反应造成的血管通透性增加,这是有利于循环的 BMSCs 的漏出,以进入损伤部位;也有研究者认为这可能与 BMSCs 有趋向于损伤部位的能力有关[8,9]。本实验观察到,移植第 7、14 天,2 组溃疡部位和非溃疡部位结肠黏膜均可见蓝色荧光标记的 BMSCs;溃疡部位的阳性细胞数均明显高于非溃疡部位阳性细胞。这证实了病损的组织对 BMSCs 可能有特异的趋化作用,吸引 BMSCs 向病变部位迁移,并参与病变的修复。

静脉移植后的干细胞常滞留在肺、肝、脾等血管丰富的器官[3,10]。硝普钠是强有力的血管扩张药物,主要作用于小静脉,在同种异体肺移植再灌注过程中加入硝普钠,可降低肺血管阻力,改善移植肺的血液供应和生理功能[11]。Slehria 等[12]证实,α 受体阻断剂酚妥拉明与硝酸脂类药物硝酸甘油可扩大肝血窦容量,显著减少移植细胞在门静脉分支内的滞留。因此,我们在为 UC 大鼠静脉移植 BMSCs 的同时给予了硝普钠,以期能促进 BMSCs 向大鼠结肠的迁移。实验结果显示:移植第 7 天,硝普钠组溃疡及非溃疡部位的阳性细胞数均高于对照的 1 组(P<0.05);但移植第 14 天,2 组的差异不显著。这表明,静脉移植 BMSCs 的同时给以硝普钠,确实能促进 BMSCs 向大鼠结肠的迁移。但本实验是单次注射,硝普钠的药效持续时间有限,随着时间的延长,硝普钠的药效也逐渐消失。故到移植第 14 天,2 组差异已不显著。静脉移植 BMSC 时能否多次用硝普钠促进 BMSCs 向病变器官迁移,多次使用硝普钠有无其他副作用,都待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hayashi Y,Tsuji S,Tsujii M, et al. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats[J].J Pharmacol Exp Ther,2008,326(2): 523-531.

[2] Wei Y M,Nie Y Q,Lai J Y,et al. Comparison of the Population Capacity of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells in Experimental Colitis Rat Model[J]. Transplantation,2009,88(1):42-48.

[3] Ruster B,Gottig S,Ludwig R J,et al.Mesenchymal stem cells (MSCs) display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells[J]. Blood, 2006,108(12):3938-3944.

[4] Sigot V,Mediavilla M G,Furno G,et al.A simple and effective method to improve intrasplenic rat hepatocyte transplantation[J].Cell Transplant,2004,13(7-8):775-781.

[5] 段 征,汪维伟,姜 蓉.2 种溃疡性结肠炎大鼠模型的比较[J].重庆医科大学学报,2008,33(1):66-68.

[6] Hiroaki K, Jennifer A, James P,et al.Migration and Differentiation of Canine Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into the Developing Mouse Brain[J]. J Vet Med Sci,2010,72(3):353-356.

[7] Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M,et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors[J]. Stem Cells,2006,24(4):1030-1041.

[8] Komori M,Tsuji S,Murata H, et al.Involvement of bone marrow-derived cells in healing of experimental colitis in rats[J].Wound Repair Regen, 2005,13(1): 109-118.

[9] Komori M,Tsuji S,Murata H,et al.Efficiency of bone marrow-derived cells in regeneration of the stomach after induction of ethanol-induced ulcers in rats[J].J Gastroenterol,2005,40(6):591-599.

[10] Rajvanshi P,Kerr A, Bhargava K K,et al. Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidaseⅣ deficient rat and othe rodert recipients:cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule[J]. Hepatology,1996,23(3):482-496.

[11] Yamashita M,Sehmid R A,Ando K,et al. Nitroprusside ameliorates lung allograft reperfusion injury[J].Ann Thorac Surg,1996,62(3):791-797.

[12] Slehria S,Rajvanshi P,Ito Y,et al.Hepatic sinusoidal vasodilators improve tran-splanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver[J]. Hepatology,2002,35(6):1320-1328.

(责任编辑:张学颖)