基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1152-03

间充质干细胞移植后在溃疡性结肠炎大鼠体内的迁移

段 征,徐艳华,陈小云,汪维伟
(重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室、干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)静脉移植后在体内的迁移。方法:SD 大鼠分为 A 组[免疫结合 TNBS/ethanol 诱导溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)模型]和 B 组(正常大鼠),均尾静脉注射 1 ml 荧光标记的 BMSCs。移植后第 3、7、14 d 各处死 5 只,取材做恒冷切片,荧光显微镜下观察 BMSCs 在骨髓、肺、肝、脾以及消化道内分布,测定荧光的积分光密度(Integral optical density,IOD)值。结果:BMSCs 移植后多分布于血管丰富器官,7 d 时肺内荧光 IOD 值最高,14 d 时骨髓内 IOD 值最高,但无统计学意义。14 d 时,A 组结肠的 IOD 值高于同组其余消化道各段以及 B 组结肠($P<0.05$)。结论:静脉移植的 BMSCs 早期主要分布在血供丰富的器官中,迁移至受损结肠的 BMSCs 高于正常结肠。

【关键词】骨髓间充质干细胞;移植;溃疡性结肠炎;大鼠
【中国图书分类法分类号】R574.1;R-332 【文献标识码】A 【收稿时间】2009-04-10

Endosomatic transference of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells in rat of ulcerative colitis

DUAN Zheng, et al
(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicina, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the transference of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rat of ulcerative colitis. *Methods*: SD rats were randomly distributed into group A colitis induced by immune-combined TNBS/ethanol and group B as control. All rats received caudal vein injection with 1 ml of fluorescence marked BMSCs, then 5 rats were sacrificed at day 3, 7 and 14 respectively in each group. Cryostat sections of bone marrow, lung, liver, spleen and gut were made to observe the distribution of BMSCs in these organs, and the fluorimetric integral optical density (IOD) were analyzed. *Results*: BMSCs were mainly distributed in organs which richs vessels. The highest IOD level of BMSCs in lung was on the 7th day, and was on the 14th day in bone marrow. On the 14th day, the IOD level of BMSCs in colon of group A were higher than those of other segments of digestive tube and also higher than those in group B ($P<0.05$). *Conclusion*: Transplanted BMSCs in earlier period were mainly distributed in the organs with rich blood supply, and BMSCs migrated to the injured colon are higher than those of normal colon.

【Key words】Bone marrow mesenchymal stem cells; Transplantation; Ulcerative colitis; Rat

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。1998 年,Lopez[1]等在对恶性血液病伴有 Crohn's 病患者进行异体造血干细胞移植治疗时,发现干细胞移植对炎症性肠病具有治疗作用,认为干细胞移植治疗炎性肠病很可能是未来发展的趋势。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)被认为是组织工程和细胞治疗研究的理想细胞[2,3],但仅段进粮等[4]报道了 BMSCs 移植治疗 UC 的实验,尚未见 BMSCs 移植后在 UC 模型各器官及在肠组织分布的报道。本实验将观察荧光标记的 BMSCs 移植后在 UC 模型大鼠体内的分布,为进一步研究 BMSCs 治疗炎症性肠病的可能性提供基础理论和实验依据。

作者介绍:段 征(1978-),女,硕士,
研究方向:干细胞分化。
通讯作者:汪维伟,女,教授,E-mail:wwwpzn@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康成年 SD 大鼠和新西兰家兔(2 kg/只)由重庆医科大学实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基(Hyclone),胎牛血清(杭州四季青),胰蛋白酶、三硝基苯磺酸(TNBS)、完全弗氏佐剂、Hoechst33342(HCT)均购自 Sigma。细胞培养箱(Forma),荧光显微镜(Olympus)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的培养、鉴定和标记 SD 大鼠脱颈处死,无菌取股骨和胫骨,冲洗出骨髓,离心后加入 DMEM-F12 重悬,调整细胞浓度到 5.0×10^5 个/ml,接种于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱培养,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 P3、P5 细胞,流式细胞仪检测 CD44、CD45 和 CD90 表达。取 P3 和 P5 的细胞,加入终浓度为 10 μg/ml 的 Hoechst33342(HCT),孵育 30 min 后 PBS 洗涤 6 次,胰酶消化收集细胞,备用于细胞移植。

1.2.2 UC 大鼠模型的建立和 BMSCs 移植 取兔结肠黏膜层制备匀浆,低温离心取上清液提纯,双缩脲法检测其蛋白含量为 20 mg/ml,与等量完全弗氏佐剂混合配成抗原乳化液。30 只大鼠随机分为 UC 模型移植 A 组和正常对照 B 组。相隔 14 d 在 A 组大鼠腹股沟、足跖处注射抗原乳化液(含抗原 8 mg)2 次。禁食 24 h,水合氯醛腹腔注射麻醉,将直径 2 mm 长 15 cm 的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。建模后 1 d,2 组大鼠均经尾静脉 1 min 内注射 1 ml HCT 标记的 BMSCs 悬液(1×10^6 个/ml)。移植后第 3、7、14 d 各处死 5 只,取骨髓、肺、肝、脾和食管、胃、小肠、结肠制成恒冷切片,荧光显微镜下观察,用 IPP 软件观测计算每组 10 个随机 20 倍视野下 HCT 荧光标记细胞的荧光阳性积分光密度值(Integral optical density,IOD)。

1.3 统计分析

SPSS12.0 统计软件对实验数据进行分析。组间比较用方差分析。

2 结 果

2.1 BMSCs 形态学特征和表型

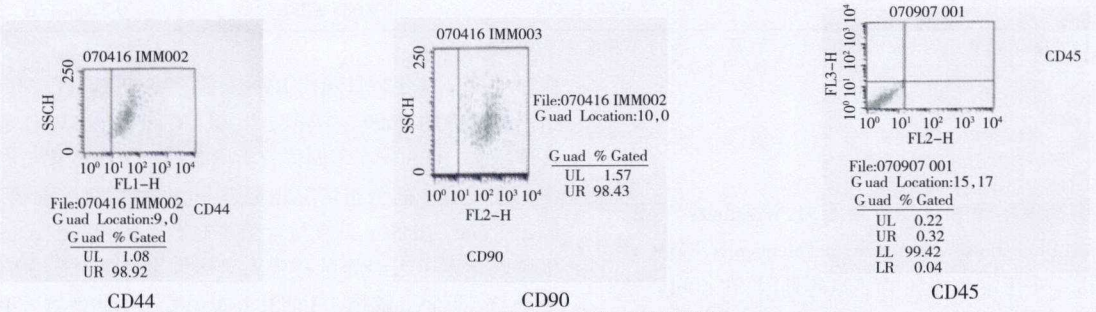
原代培养的 BMSCs 约 4 h 开始贴壁,传代纯化后大部分呈梭形,旋涡状生长(图 1)。流式细胞仪检测结果显示:P3、P5 的 BMSCs 均表达 CD44 及 CD90,均一性分别为 98.26%±0.48%及 98.68%±0.32%;不表达 CD45(图 2)。



图 1 培养第 3 代 BMSCs

2.2 BMSCs 移植后在各器官的分布

BMSCs 与 HCT 共同孵育 30 min 后,所有 BMSCs 的细胞核均被标记,发明亮蓝色荧光(图 3)。两组的肺、肝、脾、骨髓恒冷切片上分布较多荧光标记细胞,常呈团状分布(图 4)。两组消化道各段均有荧光标记细胞,主要分布于黏膜层及黏膜下层,偶见于肌层及外膜。A 组结肠 BMSCs 较多分布在在黏膜糜烂处和溃疡坏死病灶周边(图 5、6),且略多于非病变部位结肠黏膜。各器官的不同时间点荧光 IOD 值见表 1。7 d 时肺的 IOD 值最高,14 d 时骨髓的 IOD 值最高,2 组同一器官相同时间点荧光 IOD 值的差异无统计学意义。A、B 组结肠 IOD 峰值分别在 14 d 和 7 d。14 d 时,A 组结肠的 IOD 值高于同组其余消化道各段以及 B 组结肠($P<0.05$)。



CD44 CD90 CD45

图 2 P3-P5 BMSCs 的免疫表型分析

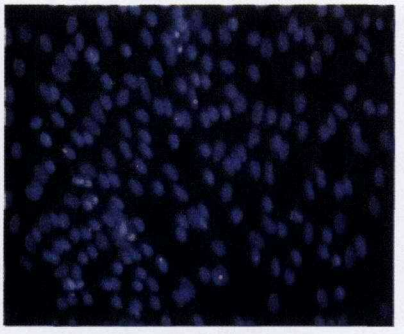


图 3 HCT 标记的 BMSCs (荧光显微镜,×200)



图 4 移植后 7 d 肺内 BMSCs(荧光显微镜,×100)

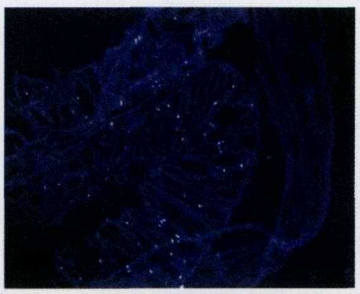


图 5 移植后 14 d A 组结肠内 BMSCs(荧光显微镜，×100)

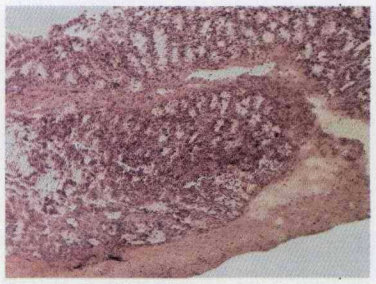


图 6 与左图相同部位(HE 染色，×100)

表 1 BMSCs 移植后不同时间点大鼠各器官荧光 IOD 值(n=5, $\bar{x} \pm s$)

器官	分组	移植后的检测时间		
		3 d	7 d	14 d
骨髓	A	11 248 ± 202	11 798 ± 287	13 196 ± 102
	B	11 211 ± 173	12 818 ± 154	13 705 ± 234
肺	A	11 711 ± 168	14 049 ± 143	12 986 ± 103
	B	11 750 ± 193	13 835 ± 278	12 596 ± 100
肝	A	10 083 ± 143	10 760 ± 224	9 612 ± 103
	B	9 618 ± 245	10 808 ± 482	9 367 ± 153
脾	A	12 099 ± 214	12 685 ± 102	11 586 ± 265
	B	12 310 ± 347	12 464 ± 375	11 519 ± 102
食管	A	7 992 ± 122	8 759 ± 218	8 135 ± 138
	B	8 135 ± 157	8 495 ± 214	8 303 ± 125
胃	A	8 449 ± 387	9 124 ± 104	8 204 ± 177
	B	8 465 ± 233	9 417 ± 466	7 381 ± 132
小肠	A	8 675 ± 354	9 180 ± 113	8 080 ± 358
	B	8 719 ± 134	9 500 ± 103	8 002 ± 353
结肠	A	9 159 ± 201	9 555 ± 112	11 642 ± 102*
	B	9246 ± 335	9 685 ± 236	9 370 ± 116

*P<0.05, 与培养 14 d 的结肠 B 组，以及培养 14 d 食管、胃、小肠的 A 和 B 组比较

3 讨 论

干细胞具有高度增殖和自我更新能力，Woodbury[2]等证实间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs)可以表达中胚层、外胚层和内胚层细胞的基因，在不同诱导条件下分化为多种类型的细胞。Liechty[3]等将人的 MSCs 移植于绵羊，证实异基因移植的 MSCs 不仅具有多向分化的能力，还具有特殊的免疫特点，能够在异基因环境中存活。目前已有 MSCs 移植治疗脑、心脏、肾脏等器官疾病的研究报道。关于移植 BMSCs 治疗炎症性肠病的研究报道较少[4]，尚未见 BMSCs 移植炎症性肠病模型后在全身各器官及在肠壁组织分布差异的报道。

国内外已有用 HCT 标记干细胞进行体内短期示踪研究，并可维持至少 4 周时间，其 IOD 值基本可代表标记细胞的多少[5,6]。本文将 HCT 标记的 BMSCs 经静脉移植入大鼠体内，见标记的 BMSCs 在体内广泛分布，其数量有一定时间规律性。7 d 时肺内 BMSCs 最多，14 d 时 BMSCs 在肺等器官中仍然呈团状分布，与血管分布密切相关，提示仍有干细胞在血循环中。14 d 时骨髓内 BMSCs 最多，2 组肺、肝、脾以及 B 组消化道内的 BMSCs 数量减少，但 UC 结肠内 BMSC 是数量逐渐增多。BMSCs 在不同器官不同时间点分布变化与白细胞在炎症发展中的分布情况相似，因此推测其归巢机制为：来源于骨髓的 BMSCs 具有与骨髓造血微环境相匹配、适应的细胞趋化因子[7]，经静脉移植入受体大鼠体内时随血流分布于全身各器官。移植 7 d 前其分布主要与机体各器官毛细血管丰富程度相关，在全身神经－体液免疫系统调控下 BMSCs 的粘附分子[8-10]表达逐渐增强、受损伤部位炎症介质的引导向损伤结肠部位附壁、游出、趋化，结肠内干细胞逐渐增多。但不是所有的移植 BMSCs 都聚集于损伤结肠，其余细胞在趋化因子的作用下逐渐归巢于骨髓，结肠以外器官内干细胞逐渐减少。

移植后 UC 大鼠的结肠中的 BMSCs 数量逐渐增多，至第 14 d 时明显高于正常移植鼠。BMSCs 多分布于结肠病变部位，黏膜糜烂处和溃疡坏死病灶周边均可见较多 BMSCs，而且溃疡周边黏膜层略多于非病变部位结肠黏膜。这提示病损的组织和器官对 BMSCs 可能有特异的趋化作用，而 BMSCs 的分布与组织损伤严重程度有关。本实验中 BMSCs 多分布

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1155-05

ERK 抑制对乳腺癌细胞(MCF-7)PCAF 的影响和意义

李苏华,邓华瑜,郑维萍
(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 ERK 抑制在雌激素对乳腺癌细胞 MCF-7 促细胞周期转化、抗凋亡过程中核受体辅激活因子 PCAF 及野生型 p53 蛋白的表达、转录水平变化,探讨 ERK 通过 PCAF 对雌激素受体信号通路的作用和机理。方法:以雌激素受体阳性乳腺癌细胞 MCF-7 为研究对象,实验分组为 17β-雌二醇(17β-estradiol, 17β-E_2)处理组、17β-E_2 + ERK 抑制剂 PD98059 处理组和细胞对照组。流式细胞术检测细胞凋亡、细胞周期;Western blot 检测 P-ERK1/2、PCAF 和野生型 P53 蛋白水平;RT-PCR 检测野生型 PCAFmRNA、p53mRNA 水平。结果:应用 ERK 磷酸化抑制剂 PD98059 后,能抑制 17β-E_2 抗 MCF-7 细胞凋亡的作用,使细胞早期凋亡率增加,其差异具有统计学意义($P<0.05$);能抑制 17β-E_2 促进 MCF-7 细胞周期转化作用,使 G_1 期细胞增加,S 期和 G_2 期细胞减少,其差异具有显著统计学意义($P<0.01$);PCAF 和 P-ERK1/2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),PCAFmRNA 转录水平差异无统计学意义($P>0.05$);野生型 P53 蛋白表达和 p53mRNA 转录水平升高($P<0.01$)。结论:ERK 在 17β-E_2 抗乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡、促细胞周期转化中的作用与 PCAF 增强雌激素受体信号及野生型 p53 蛋白表达和基因转录水平改变有关。

【关键词】17β-雌二醇;PD98059;ERK;PCAF;野生型 p53;乳腺癌
【中国图书分类法分类号】R737.9;R730.231+.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-04

The effect and significance of inhibitting ERK on PCAF in breast cancer cell MCF-7

LI Su-hua, et al
(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

作者介绍:李苏华(1970-),男,硕士,
研究方向:乳腺癌发病的信号转导机制。
通讯作者:邓华瑜,女,教授,E-mail: cqdenghy@yahoo.com.cn。

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanisms of ERK in affecting estrogen receptor signaling pathway by investigating the changes of the expression levels of nuclear receptor co-activator

于损伤较不严重黏膜,而非溃疡坏死部位,与相关文献报道一致[11,12],提示移植 BMSCs 优先趋向上皮再生部位迁移,其机制尚有待研究。

参 考 文 献

[1] Lopez-Cubero S O, Sullivan K M, McDonald G B. Course of crohn's disease after allogeneic marrow transplantaiton[J]. Gastroenterol, 1998, 114(3): 433-444.

[2] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop I B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-370.

[3] Liechty K W, Mackenzie T C, Shaaban A F, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nature Med, 2000, 6: 1282-1286.

[4] 段进粮,聂玉强,李瑜元,等.大鼠骨髓间充质干细胞移植后在溃疡性结肠炎模型肠道的定位[J].广州医学院学报,2006,34(1):1-4.

[5] Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, et al. A preclinical assessment model of rat autogenetic bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system[J]. Brain Res Protoc, 2004, 14: 37-44.

[6] Levy Y S, Bahat-Stroomza M, Barzilay R, et al. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease[J]. Cytotherapy, 2008, 10(4): 340-352.

[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] 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.

[9] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med, 2001, 226(6): 507-520.

[10] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair[J]. Bone, 2006, 39(4): 678-683.

[11] Alain C, Jean M, Morad B, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome[J]. Gene Med, 2003, 5(12): 1028-1038.

[12] Sabine F, Morad B, Moubarak M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1020-1029.

(责任编辑:冉明会)