基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0845-04

移植骨髓间充质干细胞在溃疡性结肠炎大鼠结肠的分布

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 重庆市干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察不同数量大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells,BMSC)移植于溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)大鼠模型,探讨 BMSC 移植的最适数量。方法:分离培养、DAPI 荧光标记 SD 大鼠 BMSCs。免疫复合法建立大鼠 UC 模型,分 A、B、C 组分别经尾静脉注射 1×10^6、5×10^6、1×10^7 个 DAPI 标记的 BMSCs。移植后第 7、14 d 各处死 5 只大鼠,取结肠做恒冷切片,荧光显微镜下记数各组 DAPI 标记 BMSCs 在病灶部位和周围正常部位的细胞数。结果:移植 7、14 d,各组均见 BMSCs 分布于结肠黏膜,溃疡部位阳性细胞数明显高于非溃疡部位阳性细胞数($P<0.05$)。移植 7、14 d,B 组损伤部位的荧光标记细胞多于 A 组($P<0.05$),但 B 组与 C 组间差异不明显。结论:经静脉给 UC 大鼠移植 BMSCs 的最适数量为 5×10^6 个。

【关键词】骨髓间充质干细胞;移植;溃疡性结肠炎
【中国图书法分类法分类号】R574.1;R332 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-19

Distribution of transplanted bone mesenchymal stem cells in 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 optimal dose of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) for the ulcerative colitis rat. *Methods*: The BMSCs of SD rat were isolated, cultured and labelled with DAPI. Colitis of rat was induced with immune-combined TNBS/ethanol in group A, B. and C. Each rat in 3 groups received caudal vein injection of fluids containing 1×10^6, 5×10^6, and 1×10^7 BMSCs respectively. 5 rats in each group were sacrificed at day 7 and 14 after injection. Cryostat sections of colon were prepareted. The numbers of BMSCs in focal area of colitis and surrounding normal tissue were counted under fluorescent microscope. *Results*: The DAPI marked BMSCs could been seen in the colic mucosa in each group on day 7 and 14. The number of BMSCs in the ulcerated area was bigger than that in the surrounding normal tissue ($P<0.05$). At day 7 after transplantation, there were more DAPI marked BMSCs in the infected area in group B than in group A ($P<0.05$), but the number did not have significant difference between group B and C. *Conclusion*: The dose of 5×10^6 was optimal density of transplanted BMSCs through caudal vein injection in ulcerative colitis rat.

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

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 等在对恶性血液病伴有 Crohn's 病患者进行异体造血干细胞(Haemopoietic stem cells,HSCs)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。近年来 Yujiro 等[1]报道骨髓间充质干细胞(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]报道了 BMSCs 和 HSCs 尾静脉移植治疗 UC 大鼠的实验。本实验将移植不同数量荧光标记的 BMSCs,观察其进入 UC 大鼠结肠的数量,找出移植的最适数量,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:干细胞方面。
通讯作者:汪维伟,女,教授,E-mail: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,3~4 周龄,体重约 50 g 用于提取间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs);7~8 周龄,体重约 200 g,用于制作 UC 动物模型,清洁级,均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(杭州四青季);小鼠抗大鼠 CD44-FITC、CD45-PE、CD90-PE 抗体,同型阴性对照抗体 IgG1-FITC/IgG2a-PE

（Serotec）；胰蛋白酶（Sigma）、TNBS（Sigma）、完全佛式佐剂（Sigma）、DAPI（Roth），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　脱颈处死大鼠，无菌取股、胫骨，冲洗出骨髓，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/IgG 2a-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 PBS，混匀后 1 800 r/min 离心 5 min，弃上清液，每管加入 500 μl PBS，流式细胞仪检测，CellQuest 软件分析。

1.2.2　DAPI 标记　取第 3 代 BMSCs，细胞 50%～60% 融合时，加入终浓度 40 μg/ml 的 DAPI 孵育 2 h 后换液，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[7]的免疫复合方法制作 UC 大鼠模型。

1.2.4　BMSCs 移植 30 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C 3 组，尾静脉注 1 ml DAPI 标记的 BMSCs，细胞量分别为 1×10^6、5×10^6、1×10^7 个。移植后第 7、14 d 各处死 5 只，取结肠的溃疡部位和非溃疡部制成恒冷切片，荧光显微下观察，并于每张切片上随机取 4 个高倍镜视野，计数每个视野 DAPI 阳性细胞数，求其均值。相同切片再经 HE 染色，观察形态。

1.3　统计分析

采用 SAS 9.1 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，计算 F 值、P 值，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

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 1）。DAPI 标记 BMSCs 当天的标记率达 100%，细胞核均发明亮蓝色荧光（图 2）。流式细胞仪检测结果显示：P3 代的 BMSCs 表达 CD44 及 CD90，均一性为 98.26 % ± 0.48 % 及 98.68 % ± 0.32 %；不表达 CD45（图 3）。

2.2　UC 模型结肠病理改变

建模第 7 d，病变肠黏膜出现充血水肿、上皮脱落、坏死、溃疡形成、黏膜下层有大量的炎性细胞浸润（图 4）。

2.3　不同数量 BMSCs 移植后在结肠的分布

移植后 7、14 d，各组大鼠结肠均见蓝色荧光标记的 BMSCs（图 5～8），主要分布于黏膜层及黏膜下层，偶见于肌层及外膜。基本统计结果见（表 1），析因方差分析结果显示（表 2），移植第 7、14 d 各组溃疡部位阳性细胞数明显高于非溃疡部位阳性细胞数（$F=65.17$，$P<0.01$），移植第 7、14 d，相同部位分布的移植细胞数差异不显著（$F=0.43$，$P>0.05$），移植第 7、14 d，B 组病灶处的细胞数均高于 A 组（$F=13.06$，$P<0.05$），B 组与 C 组差异不明显（$F=0.10$，$P>0.05$）；B 组非溃疡部位的细胞数均高于 A 组（$F=16.85$，$P<0.01$），但 B 组与 C 组差异不明显（$F=0.46$，$P>0.05$）。

3　讨　论

骨髓间充质干细胞是多能干细胞之一，具有自我更新和多向分化潜能，在一定诱导条件下 MSCs 可以向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、脂肪细胞、肌腱细胞及基质细胞等中胚层细胞分化，还可以向外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆细胞分化[3-5]，是组织工程的理想候选细胞。本实验分离培养的 BMSCs 经流式细胞仪鉴定表达 CD44、CD90，不表达 CD45，与文献报道的研究一致[6]。



图 1　培养第 3 代 BMSCs 呈漩涡状（×200）

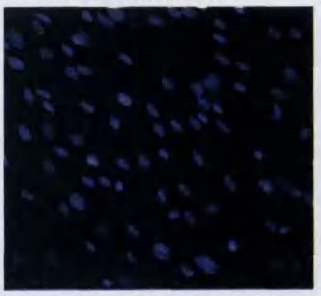


图 2　DAPI 标记 1 d 的 BMSCs（×200）

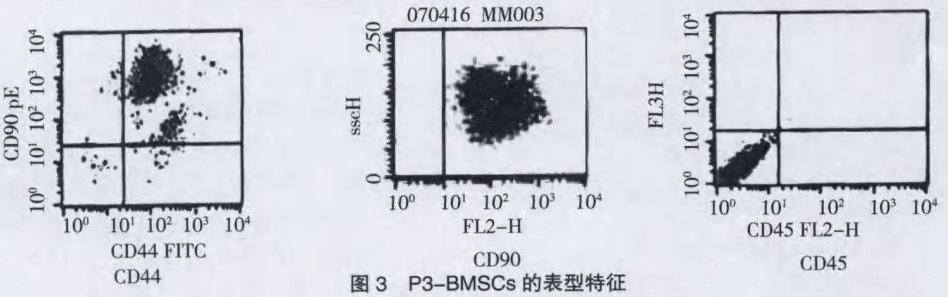


图 3　P3-BMSCs 的表型特征

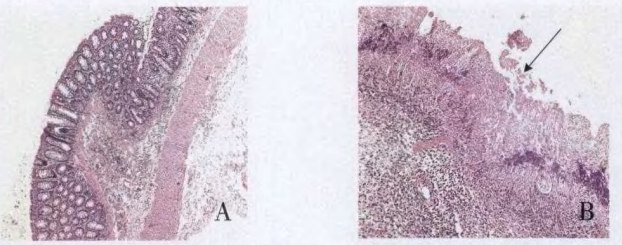


图 A 为正常结肠，图 B 为建模后第 7 d UC，箭头（↑）示黏膜上皮脱落，黏膜充血水肿，黏膜下层有大量的炎性细胞浸润

图 4　正常与 UC 病变结肠黏膜（HE × 100）

表 1　不同数量 BMSCs 移植后在结肠的阳性细胞数的基本统计量（n=20）（$\bar{x} \pm s$）

组别	移植细胞	n	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
A 组	1×10^6	20	30.1 ± 8.61	34.5 ± 13.9	16.8 ± 11.8	15.2 ± 10.5
B 组	5×10^6	20	37.2 ± 9.39	37.9 ± 12.4	23.1 ± 9.5	15.5 ± 8.0
C 组	1×10^7	20	37.4 ± 18.1	41.8 ± 13.6	23.7 ± 11.3	16.7 ± 6.0

表 2　析因方差分析结果

因素及组合	SS	df	MS	F	P
组别	1 412.658	2	706.329	4.17	0.001 6
时间	72.600	1	72.600	0.43	0.513
部位	11 043.266	1	11 043.266	65.17	<0.001
组别 × 时间	236.425	2	118.213	0.70	0.498 8
组别 × 部位	3 377.058	2	1 688.529	9.96	<0.001
时间 × 部位	229.618	1	229.618	1.36	0.244 0

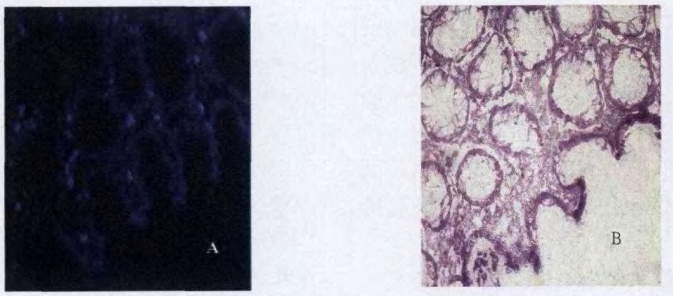


图 5　A 组移植第 7 d 非溃疡部位结肠图



图 6　B 组移植第 14 d 溃疡部位结肠图

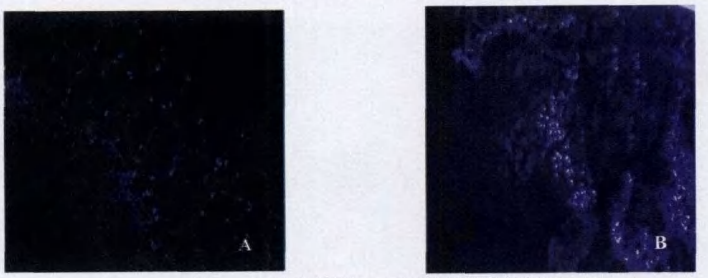


图 7　B 组移植第 7 d 非溃疡部位结肠图



图 8 A 组移植 14 d 非溃疡部位结肠图

影响静脉移植细胞归巢的因素有几方面：①移植细胞的数量；②细胞因子和趋化因子的影响；③机体器官受损后骨髓间充质干细胞可以感知靶器官的损害，自动迁移至受损区域。本实验主要研究移植细胞数量对 BMSCs 归巢的影响，文献报道静脉移植 BMSCs 治疗 UC 的细胞数量存在较大差异，段征等[7]、段进粮等[8]移植细胞量分别为 1×10^6 个和 2×10^6 个；Yujiro 等[1]有报道在溃疡部位周围 3 个部位的黏膜下层移植细胞总量 1×10^7 个。根据报道所用的细胞数量，本实验选用 1×10^6、5×10^6、1×10^7 个 3 个数量梯度，观察移植细胞数量与其在结肠的分布的关系，以期找到治疗 UC 的最佳静脉移植细胞数量。在将 DAPI 标记的 BMSCs 移植入 UC 动物模型的第 7、14 d 时，3 个浓度组迁移至损伤部位的细胞数量均明显高于周围的正常部位，这可能与 BMSCs 有趋向于损伤部位的能力有关[9,10]。但 3 组迁移至损伤部位的细胞数量有差异，中剂量组明显高于低剂量组，而中剂量组与高剂量组区别不大。这一结果与移植细胞数量越多，迁移到损伤部位细胞数越多的推测不一致。这可能是由于静脉移植细胞数量超过一定限度，归巢到骨髓的细胞量也增多，所以中剂量组与高剂量组没区别。因此，静脉移植 BMSCs 修复 UC 的移植量并不是越大越好，本实验结果提示 5×10^6 是比较适宜的移植细胞量。

Hendrikx 等曾报道[11]，随着坏死灶周围强烈的炎症反应的减弱和“归巢”现象的消失，移植部位的干细胞的数量不再发生变化。本实验观察到，移植第 7 d 和 14 d，相同部位分布的移植细胞数差异不显著。这除了考虑结肠病灶炎症反应的减弱，继续迁移入病灶的细胞减少外，还可能与 DAPI 的标记会随着细胞分裂逐渐衰减有关。

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] Sottile V, Halleux C, Bassilana F, et al. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells[J]. Bone, 2002, 30(5): 699-704.

[4] Baksh D, Song L, Tuan R S, et al. Adult mesenchymal stem cells: characteriazation, differentiation, and application in cell and gene therapy [J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(3): 301-316.

[5] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation[J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1701-1710.

[6] Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression and transcriptome stability [J]. Stem cells, 2005, 23(9): 1357-1366.

[7] 段 征，姜 蓉，汪维伟，等. 两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.

[8] 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.

[9] 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.

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

[11] Hendrikx P J, Martens C M, Hagenbeek A, et al. Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells[J]. Exp Hematol, 1996, 24(2): 129-140.

（责任编辑：关蕴良）

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127