DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.007
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1134 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1134-03

创面微环境对植入骨髓间充质干细胞的影响研究

艾国平,粟永萍,闫国和,王 蒙,刘晓宏,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨创面局部微环境对植入的骨髓间充质干细胞(MSC)的影响。方法 采用常规的细胞培养传代技术、超微结构观察、免疫组化、RT-PCR和细胞增殖活性检测等方法。结果 将MSC植入到创面后,可见肉芽组织中有大量成纤维细胞形成,排列成"瀑布"状,成纤维细胞胞浆中有大量原胶原颗粒形成;免疫组化显示碱性成纤维因子(bFGF)、Ⅰ型胶原在新生的成纤维细胞中表达增强;伤口液促进MSC的增殖活性和迁移能力;局部微环境促进MSC基质源性因子(SDF-1)、IL-8、Ⅰ型胶原的基因表达。结论 MSC在创面局部微环境的作用下MSC表现出向成纤维细胞分化的表型。

关键词:间充质干细胞;成纤维细胞;基因表达;创面微环境
中图法分类号:R329.2 R818.74 文献标识码:A

Effects of wound microenvironment on transplanted mesenchymal stem cells derived from bone marrow

AI Guo-ping, SU Yong-ping, YAN Guo-he, WANG Meng, LIU Xiao-hong, CHENG Tian-min (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of wound microenvironment on transplanted mesenchymal stem cells derived from bone marrow. Methods Routine cell culture technology, electronic microscope, immunohistochemistry, RT-PCR and MTT methods were applied to observe the results. Results After MSCs were directly transplanted onto the wound surface with local irradiation, large number of fibroblasts in granulation tissue in the form of waterfall were found. Immunohistochemistry showed enhanced expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) and type Ⅰ collagen in the new fibroblasts. The wound exudation promoted the proliferation and immigration of MSCs and the wound microenvironment affected the gene expression of stromal cell-derived factor-1(SDF-1), interleukin 8, collagen type Ⅰ when MSCs were transplanted onto the wound surface. Conclusion MSCs show a phenotype to differentiate into fibroblasts under the local wound microenvironment.

Key words: mesenchymal stem cells; fibrocyte; gene expression; local wound microenvironment

骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSC)是中胚层来源的具有多向分化能力的干细胞。在一定诱导条件下具有向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、内皮细胞以及基质细胞等中胚层细胞分化的能力;同时,MSC还具有向外胚层神经元细胞和内胚层肝细胞、上皮细胞分化的能力[1~4]。针对放射损伤后修复细胞数量减少和功能障碍是导致创面难愈的关键问题,我们将小香猪自体骨髓间充质干细胞在体外扩增培养,移植到局部合并有放射损伤的创面后,发现MSC对创面有明显的促愈效应。那么创面局部微环境对植入的MSC有那些影响,我们就此问题进行了研究。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:艾国平(1969-),女,四川省隆昌市人,博士,讲师,主要从事肠道损伤与修复、干细胞组织工程方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68753663
收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-05-16

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

选用本校动物研究所提供的成年健康贵州小香猪,体质量(10±5) kg,共8只,3%戊巴比妥钠静脉麻醉,用6 MeV的电子线(美国,Varian 2300C/D)局部照射脊柱两旁的皮肤,深度1 cm,总吸收剂量为20 Gy,立即在受照射部位用打孔器制成直径为2 cm的圆形创面,深达皮肤全层,每侧8~10个创面。一侧为对照组:局部点状注射生理盐水0.3 ml;另一侧为MSC组:局部注射体外培养的自体MSC(MSC的培养鉴定见文献[5,6]) 0.3 ml,细胞数为(6~8)×10^6/ml;注射后用油纱覆盖,无菌纱布包扎,分别于伤后3、5、8、12、16、20、24、28 d取创面新生肉芽组织进行观察。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 愈合指标的观察 见文献[7]。

1.2.2 肉芽组织的电镜观察 取新生肉芽组织用3%的戊二醛磷酸缓冲液固定,再以1%锇酸固定,逐级丙酮脱水,环氧树脂618包埋,醋酸铀、柠檬酸铅双重电子染色,LKB超薄切片

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

机切片, JEM-2000EX 型透射电镜观察、照相。

1.2.3　bFGF、Ⅰ型胶原免疫组化检测　　取各时相点的肉芽组织经固定、包埋、切片, 参考武汉博士德公司提供的免疫试剂盒 S-P 法的实验步骤进行。

1.2.4　伤口液对 MSC 增殖、迁移的影响　　将无菌纱布置于合并局部放射损伤的皮下, 于伤后 48 h 取出纱布, 将伤口液挤入无菌试管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 上清分装在无菌的 Eppdenffor 管中, －70 ℃保存; 将 MSC 细胞按 1×10^5/ml 接种在 96 孔培养板中, 分别加入无血清 α-MEM 培养基(α-MEM 组), 伤口液(伤口液组), 每组 6 孔用 MTT 法(四甲基偶氮唑蓝)测定培养 12、24、48、60 h 后细胞增殖活性。将 MSC 接种在 12 孔培养板中, 待 70%～80%融合后, 用一自制刀在细胞层中纵向划痕, 造成培养细胞伤口模型。划痕后用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 2 次后, 加入无血清的 α-MEM 培养基(α-MEM 组)和伤口液(伤口液组), 分别于伤后 0、12、24、36、48、60 h 在倒置显微镜下(日本, Olympus 公司)用测微器测定伤口的宽度, 用残存宽度百分比代表细胞迁移快慢, 残存宽度百分比= 残存宽度/原始宽度×100%。

1.2.5　局部微环境对 MSC 基因表达的影响　　将体外培养的 MSC 按 1×10^6/ml 装入透析袋中, 每袋 2 ml, 植入到合并局部 20 Gy 照射的小香猪背部皮下为微环境组; 在体外继续培养的细胞为对照组。48 h 后分别提取经局部微环境作用和体外同时培养 MSC 的 RNA, 进行逆转录 PCR, 按照 Ampli Taq Golden™ Polymerase Chain Reaction Kit(美国 PE 公司产品)说明书进行, PCR 循环参数为: 97 ℃, 15 min; 94 ℃, 1 min; 60 ℃, 1 min; 72 ℃, 1 min; 72 ℃, 10 min, 共 33 个循环。引物序列的设计参照 Primer 引物设计程序: Ⅰ型胶原上游: 5′-CCTTTCTGCTCCTTTCTCCA-3′, 下游: 5′-AGCAACACAGTTACACAAGG-3′, 扩增产物为 430 bp; SDF-1 上游: 5′-CGTCAG CCGCATTGCCCGCT-3′, 下游: 5′-TCCTGAAAGGCGTACTGG-3′, 扩增产物为 380 bp; IL-8 上游: 5′-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3′, 下游: 5′-TCTCAGCCCTCTTCAAAA-3′, 扩增产物为 219 bp; GAPDH 上游: 5′-AACAGCGACACCCACTCCTC-3′, 下游 5′-GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT-3′, 扩增产物为 458 bp。取 10 μl PCR 扩增产物加 3 μl 上样缓冲液, 混匀上样, 电泳。根据电泳条带的数量和分子量大小来判定产物的特异性。以 GAPDH 为内参照, 凝胶扫描, 分析各产物的 D_{495} 值, 将目的基因的 D_{495} 值(D_{495})分别与同一样本的 GAPDH D_{495} 值相比较(R= 目的基因 D_{495}/GAPDH D_{495}), 所得比值 R 代表样本目的基因的相对表达量。

1.3　统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　电镜观察

合并局部放射损伤的创面, 电镜下见组织间隙增宽, 细胞肿胀, 部分细胞胞浆中有髓鞘样坏死, 线粒体肿胀、嵴消失, 内质网水肿, 部分细胞溶解坏死, 细胞器散入细胞间隙; 损伤晚期成纤维细胞胞核呈不规则形状, 形态多样, 有"放射状成纤维细胞"形成; 在 MSC 组中真皮层可见内皮细胞、成纤维细胞呈"瀑布状"分布, 在成纤维细胞周围可见有大量的胶原形成和沉积, 胞浆有丰富的粗面内质网和游离核糖体, 并可见单层膜包绕的原胶原颗粒, 有的正欲从胞浆向外分泌排除, 图 1、2。

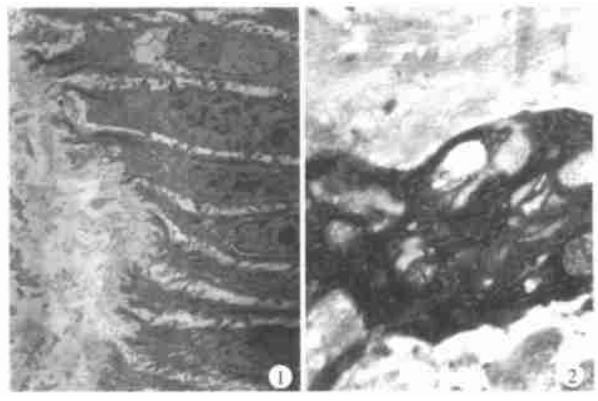


图 1　植入 MSC 后 12 d, 肉芽组织中成纤维细胞增生, 排列较规则(TEM× 2 500)

Fig 1　Proliferated fibrocytes arrayed regularly in the granulation 12 d after MSC transplantation (TEM× 2 500)

图 2　植入 MSC 后 12 d, 成纤维细胞胞浆中有大量原胶原颗粒形成(TEM× 8 000)

Fig 2　Massive procollagen granules in the cytoplasma of fibrocytes 12 d after MSC transplantation (TEM× 8 000)

2.2　MSC 植入后组织中 bFGF、Ⅰ型胶原表达增加

bFGF 主要分布在成纤维细胞的胞浆中, 新生肉芽组织中 bFGF 的表达明显增加, 以 MSC 植入后 8～12 d 新生肉芽组织中的成纤维细胞表达尤为明显; MSC 组基质沉积明显, 免疫组化显示植入 MSC 20 d 组织中Ⅰ型胶原表达比对照组丰富, 见图 3、4。

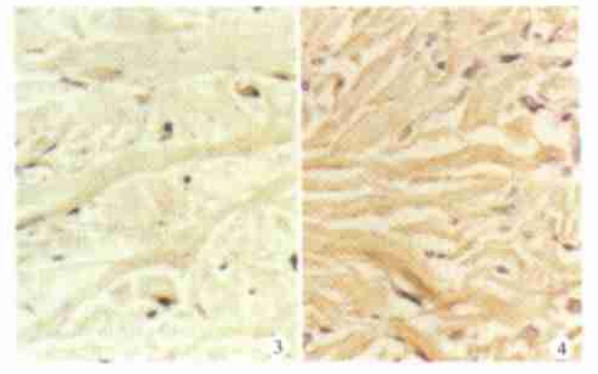


图 3　S-P 伤后 20 d, Ⅰ型胶原表达较弱(S-P× 330)

Fig 3　Lower expression of collagen Ⅰ in control 20 d after injury (S-P× 330)

图 4　植入 MSC 后 20 d, Ⅰ型胶原表达明显增加(S-P× 330)

Fig 4　Obviously increased expression of collagen Ⅰ in the wound 20 d after MSC transplantation (S-P× 330)

2.3　伤口液对 MSC 增殖和迁移的影响

在培养的 MSC 中加入伤口液后, 明显促进 MSC 细胞增殖和迁移, 与无血清组作用比较有显著差异($P<0.01$), 见表 1、2, 表明局部微环境对植入 MSC 的增殖和迁移起促进作用。

2.4　局部微环境对 SDF-1, IL-8, Ⅰ型胶原, GAPDH mRNA 表达的影响

将培养的 MSC 植入到皮肤组织作用 48 h 后取出, 检测 MSC 基因表达变化, 从表 3 可以发现 MSC 在局部微环境作用下,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

SDF-1 的表达量比体外培养 MSC 的表达量明显增高($P<0.01$)；IL-8 的表达量也升高($P<0.05$)；Ⅰ型胶原的表达在培养 MSC 是非常弱的，仅见微弱的一条带，而经体内作用后表达量增加；GAPDH 恒定表达；表明 MSC 在局部微环境作用下基因表达发生了一系列变化。

表 1 伤口液对 MSC 增殖的影响($\bar{x}\pm s$，%)

Tab 1 Effects of wound exudation on MSC proliferation($\bar{x}\pm s$，%)

Group	Different time (h)				
	12	24	36	48	60
Wounded exudation group	0.32±0.05△△	0.36±0.04△△	0.48±0.08△△	0.56±0.08△△	0.66±0.05△△
α-MEM group	0.15±0.01	0.21±0.06	0.28±0.05	0.36±0.09	0.35±0.02

△△：$P<0.01$ *vs* α-MEM group

表 2 伤口液对 MSC 迁移的影响($\bar{x}\pm s$，%)

Tab 2 Effects of wound exudation on MSC migration($\bar{x}\pm s$，%)

Group	Different time (h)				
	12	24	36	48	60
Wounded exudation group	77.0±1.5△△	55.7±1.4△△	33.2±0.8△△	11.4±0.8△△	0△
α-MEM group	93.5±0.1	71.7±1.0	54.8±2.5	31.6±0.9	11.6±1.2

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* α-MEM group

表 3 局部微环境对 MSC 基因表达变化的影响

Tab 3 Effects of local microenvironment on the expressions of SDF-1，IL-8 Collagen Ⅰ and GAPDH mRNA in MSC

Group	GAPDH	SDF-1		IL-8		Collagen Ⅰ	
	D_{495}	D_{495}	R	D_{495}	R	D_{495}	R
Microenvironment group	0.78	0.52	0.67**	0.46	0.59**	0.39	0.5**
in vitro group	0.76	0.36	0.47	0.32	0.42	0.12	0.16

**：$P<0.01$ *vs in vitro* group

3 讨论

放射损伤合并创伤多见于战时核爆炸与平时核事故以及肿瘤病人的放化疗中，一方面射线对全身损伤效应可影响局部创面的愈合，另一方面射线可直接作用于创面的修复细胞，导致局部修复细胞凋亡、坏死致数量减少，同时严重抑制修复细胞的增殖功能，难于生成健康的肉芽组织，形成难愈性创面和经久不愈的溃疡，给患者的生活和经济带来很大负担，因此，如何促进这类损伤的愈合一直是创伤领域研究的重要课题。

针对修复细胞数量减少和功能障碍是导致难愈的关键问题，我们将中胚层来源的自体骨髓间充质干细胞移植到局部合并放射损伤创面，观察到 MSC 能明显促进创面愈合，移植后的 MSC 分布在新生肉芽组织中[7]，表明 MSC 在局部微环境的作用下发挥了对创面的促愈作用。MSC 作为中胚层来源的干细胞，在一定情况下可向成骨、成软骨、成脂、成肌细胞等分化，Kopen 等[8]报道将人的 MSC 移植到新生小鼠的前脑和小脑，在局部微环境作用下 MSC 能演变为神经胶质细胞。因此，我们推测将 MSC 移植到局部创面，在局部微环境作用下 MSC 肯定会发生一系列变化。由于将单个细胞植入创面后无法再取出来进行研究，同时又由于 MSC 无特异的分子标记，首先，我们在体外证实了创面伤口液具有促进 MSC 增殖和迁移的作用；再次，将体外培养的 MSC 装入透析袋中埋入皮下，经微环境作用后，将细胞取出，MSC 经局部微环境作用后 SDF-1，IL-8 和Ⅰ型胶原的基因表达明显增强。SDF-1[9]是基质细胞源性因子，主要表达在骨髓基质细胞中，对骨髓细胞的定向归巢起重要的作用；IL-8 是重要的炎症细胞趋化因子，对巨噬细胞和中性粒细胞等有趋化作用；因此，我们认为植入的 MSC 在局部微环境作用下对细胞趋化起作用因子基因表达增加，这无疑对炎症细胞和修复细胞向伤口集聚有促进作用[10]。尤其值得注意的是经局部微环境作用后的 MSC 的Ⅰ型胶原基因表达比未作用组明显升高，我们推测 MSC 在局部微环境作用下可能直接分泌细胞外基质参与组织的修复，并且有可能在局部微环境作用下能演变成修复的主要细胞——成纤维细胞参与组织的修复，表明将自体骨髓间充质干细胞用于创面软组织的修复有良好的应用前景。

参考文献：

[1] Fibbe W E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair [J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(2): 29—31.

[2] Horwitz E M, Prockop D J, Gordon P L, *et al*. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta[J]. Blood, 2001, 97(5): 1227—1231.

[3] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, *et al*. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(3): 199—206.

[4] Crosby H A, Nijjar S S, Kelly D A, *et al*. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13(6): 397—403.

[5] 艾国平，粟永萍，闫国和，等. 骨髓间充质干细胞的分离与培养[J]. 第三军医大学学报，2001，23(5)：553—555.

[6] 艾国平，粟永萍，闫国和，等. 诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞和成软骨细胞分化[J]. 中国临床康复，2002，18(6)：2689—2670.

[7] 艾国平，粟永萍，闫国和，等. 骨髓间充质干细胞对放创复合伤创面的促愈作用[J]. 中华放射医学与防护杂志，2002，22(3)：21—23.

[8] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D J. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 969(19): 10711—10716.

[9] Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK)[J]. Blood, 2000, 95(3): 769—775.

[10] Nasreen N, Mohammed K A, Hardwick J, *et al*. Polar production of interleukin-8 by mesothelial cells promotes the transmesothelial migration of neutrophils: role of intercellular adhesion molecule-1[J]. J Infect Dis, 2001, 183(11): 1638—1645.

（编辑 栗 嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net