

人脐带间充质干细胞移植治疗小鼠慢性输卵管炎

李 田^{1*}, 李小毛¹, 张 琪², 何 丹³, 潘黎捷⁴

(中山大学附属第三医院 1.妇产科; 2. 肝移植中心; 3. 病理科; 4. 疫苗研究所, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】观察人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)移植对小鼠慢性输卵管炎的治疗作用,为慢性输卵管炎的临床治疗提供新策略。【方法】从脐带中分离培养人脐带间充质干细胞,流式细胞术鉴定其免疫表型,并诱导成脂、成骨分化验证其多向分化潜能。通过阴道内接种沙眼衣原体建立小鼠输卵管炎模型,感染后 4 周随机分成 hUC-MSC 移植组及对照组。hUC-MSC 移植组小鼠阴道内接种人脐带间充质干细胞,对照组小鼠阴道内注射等体积 PBS。感染后 8 周,观察小鼠输卵管有无阻塞、积水等慢性输卵管炎表现,病理切片观察组织形态学改变。【结果】分离培养的人脐带间充质干细胞符合间充质干细胞的一般生物学特性。感染后 8 周,对照组小鼠均出现输卵管阻塞、积水等慢性输卵管炎表现,而 hUC-MSC 移植组仅 2 例出现输卵管阻塞及积水,对照组小鼠慢性输卵管炎的发生率明显高于 hUC-MSC 移植组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。hUC-MSC 移植组输卵管病理切片显示,输卵管周围炎症细胞浸润较少。【结论】hUC-MSC 移植可明显减少小鼠慢性输卵管炎的发生和减轻其炎症程度,有可能为输卵管性不孕的临床治疗提供新的途径。

关键词:间充质干细胞;脐带;输卵管炎。

中图分类号:R711.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)01-0025-07

Effect of Treatment with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Chronic Salpingitis in Mice

LI Tian^{1*}, LI Xiao-mao¹, ZHANG Qi², HE Dan³, PAN Li-jie⁴

(1.Department of Gynecology, 2.Department of Liver Transplantation, 3.Department of Pathology 4 Vaccine Research Institute, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSC) transplantation treatment on mice chronic salpingitis, and to provide new tactics for clinical therapy of chronic salpingitis.【Methods】hUC-MSCs were isolated from human umbilical cord and cultured in vitro. The phenotypic characteristics of hUC-MSC were determined by FACS and multi-lineage differentiation capacity was confirmed by induced adipogenesis and osteogenesis. The salpingitis models of mice were established by intravaginal inoculation of the Chlamydia trachomatis. All mice were randomly divided into hUC-MSC transplantation group and control group at 4 weeks after infection. Mice of hUC-MSC transplantation group were transplanted by hUC-MSCs through intravaginal inoculation, and control group were injected by PBS. At 8 weeks after infection, all mice were sacrificed to evaluate the status of oviduct occlusion or hydrosalpinx. Besides, histopathological changes of oviduct were examined by light microscopy.【Results】hUC-MSC cultured in vitro exhibited general biological properties of mesenchymal stem cells. At 8 weeks after infection, the incidence of salpingemphraxis and hydrosalpinx in control group was obviously higher than that of hUC-MSC transplantation group, and the difference was of statistical significance ($P < 0.01$). Moreover, tubal pathology section showed that inflammatory cells infiltration was less in hUC-MSC transplantation group than that of control group.【Conclusion】hUC-MSC transplantation could reduce the occurrence of mice chronic salpingitis and improve tubal inflammation, which may serve as a new method for the clinical treatment of tubal infertility.

Key words: mesenchymal stem cells; umbilical cord; salpingitis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(1):25-31]

收稿日期:2013-08-21

基金项目:广东省科技计划项目(2008B030301061)

作者简介:李田, * 通信作者, 博士, 副主任医师, 研究方向:间充质干细胞的临床应用, E-mail: sandy_litian@21cn.com

在女性不孕中, 输卵管因素是不孕症的主要原因, 多见于继发性不孕症患者。在不孕症中, 女性不孕占 60%, 其中输卵管因素约占 1/3^[1]。因此, 如何有效地治疗输卵管性不孕, 提高患者的妊娠率是当前临床迫切需要解决的问题。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有多项向分化潜能, 还能靶向迁移到损伤组织和慢性炎症部位^[2-3], 具有广阔的应用前景。脐带为分娩废弃物, MSC 含量丰富, 较骨髓来源的 MSC 扩增能力更强, 成为近来 MSC 研究及治疗的重要来源之一。本课题通过研究 hUC-MSc 移植治疗小鼠慢性输卵管炎, 探讨 hUC-MSc 治疗女性慢性输卵管炎的可能性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

脐带取自我院产科足月妊娠的 5 例健康剖宫产产妇(2011 年 9 月至 2011 年 10 月)。经产妇知情同意, 术前签署同意书, 自愿将胎盘、脐带等分娩废弃物交由医院处理或供科研所用。产妇产前行 HBV 抗原、抗 HBV 抗体、抗 HCV 抗体、抗 HIV 抗体、梅毒螺旋体及支原体等检测均阴性。无菌条件下采集脐带后, 置 4 ℃ 保存 4 h 内处理。

实验动物: 6 ~ 8 周龄雌性 C3H/HeN 小鼠, 平均体质量 16 ~ 18 g (北京维通利华实验动物技术有限公司)[生产动物许可证号: SCXY (京)2006-0009]。实验和对照组各 10 只。饲养于 SPF 级屏障系统内, 设施使用合格证号: SYXK (粤)2007-0083。

实验试剂: LG-DMEM (Gibco), RPMI1640 (Gibco), 胎牛血清 (Gibco), 胰蛋白酶 (Gibco), 台盼蓝 (Sigma), 甲基亚砷 (DMSO, Sigma)。氯胺酮注射液 (福建福田药业有限公司) 甲苯噻嗪 (xylazine, 美国 Sigma 公司)。

沙眼衣原体及细胞株: MoPn 株 (VR123) 购于美国 ATCC, McCoy 细胞由广东省皮肤性病防治中心实验室提供并保存传代。

1.2 方 法

1.2.1 hUC-MSc 的分离培养 采用组织块直接贴壁培养法。用含青霉素和硫酸链霉素的 PBS 缓冲液洗涤去除残存血, 剔除动静脉, 将脐带剪碎至 1 mm³ 的小块, PBS 冲洗, 200 ×g × 5 min 离心 2 次, 去除上清。将组织块平铺于六孔板中, 加入

10%FBS 的 LG-DMEM 培养基混匀, 并置 37 ℃、体积分数 5%CO₂ 培养箱中进行培养, 第 8 天后去除组织块, 全量换液。原代细胞培养至 10 ~ 14 d 后, 胰蛋白酶消化后传代, P1 后各代细胞达 90% 以上融合时传代。

1.2.2 hUC-MSc 免疫表型鉴定 取 P3 代 hUC-MSc 达到 80 ~ 90% 融合时, 用 0.125% 胰酶消化, 用 PBS 洗涤后重悬, 细胞浓度 2 × 10⁷ mL⁻¹。细胞传代至 P2 或 P3 代后, 消化洗涤, PBS 重悬, 至 FACS 专用管, 每管 1 × 10⁶ 个细胞, 100 μL, hUC-MSCs 经 CD31-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-FITC、CD105-FITC、HLA-DR-FITC (FITC, fluorescein isothiocyanate) 标记后, 流式细胞仪 (Calibur BD) 检测, Cell Quest 软件分析。

1.2.3 hUC-MSc 多项向分化潜能鉴定 取 P3 至 P5 代 hUC-MSc, 10%FBS 的 LG-DMEM 培养基重悬后, 接种于 24 孔板。加入商品化的间充质干细胞成脂、成骨诱导液 (Mesenchymal Adipogenesis Kit & Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit, Chemicon, Millipore)。待细胞达到 100% 融合时, 更换成脂及成骨诱导分化培养基, 诱导后行油红 O、茜素红染色鉴定。

1.2.4 输卵管炎动物模型的制备 MoPn 株体外培养、制备感染液。MoPn 株感染 McCoy 细胞, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行培养, 培养 48 ~ 72 h 后显微镜下观察多数细胞中包涵体形成后收集单层感染 McCoy 细胞, 超声破碎 30 s, 4 ℃ 下 500 ×g × 10 min 离心, 吸取上层液, 4 ℃ 30 000 ×g × 45 min 离心收集衣原体沉淀, 用蔗糖谷氨酸钾稀释液 (SPG) -70 ℃ 保存。以氯胺酮 (100 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (4 mg/kg) 腹腔注射麻醉 20 只雌性小鼠后, 用含 1 × 10⁷ IFU 的 MoPn 感染液 50 μL 通过阴道内接种感染。

在小鼠感染沙眼衣原体后, 分别于感染后 1、2、3、4、5、6、7、8 周对所有小鼠取阴道宫颈拭子, 接种在 24 孔板中的致密单层细胞 (McCoy 细胞) 中, 置于水平离心机, 3,000 ×g 离心 1 h, 孵育 2 h 后弃培养液, 加入含放线菌酮 (1 μg/mL) 和 70 g/L 聚乙二醇的 RPMI1640 培养基, 培养 48 ~ 72 h 后进行碘染色。光镜下被染色细胞胞质中有棕黑包涵体者为阳性, 计算培养的阳性率。

1.2.5 hUC-MSc 细胞移植及病理活检 取 P3 至 P5 代 hUC-MSc, 达到 80% ~ 90% 融合时, 用

0.125%胰酶消化,用 PBS 洗涤后重悬,细胞浓度 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

小鼠感染后 4 周,将感染小鼠随机分为两组,每组 10 只。腹腔注射麻醉后,hUC-MSC 移植组,每只小鼠阴道内注射 hUC-MSCs $50\mu\text{L}, 5 \times 10^5/\text{只}$;对照组每只小鼠阴道内注射 PBS $50 \mu\text{L}$ 。

感染 8 周即治疗 4 周后处死小鼠,观察小鼠输卵管有无炎症、阻塞、积水等表现。采集有病变的小鼠输卵管新鲜组织,中性甲醛固定,石蜡包埋,常规切片作 HE 染色,中性树脂胶封片,光镜下观察组织形态。

1.2.6 统计学方法 用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,两组间有效率的比较采用精确概率法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 hUC-MSC 的分离纯化及表型鉴定

原代培养的脐带间充质干细胞在培养的 5 ~ 7 d 于组织块间隙可见散在分布的长条索状纺锤型细胞,8 d 后去除组织块,培养 10 ~ 14 d,细胞集落可达 80%以上融合,可见贴壁细胞呈条索状簇集生长(图 1)。细胞免疫表型鉴定显示:高表达间质细胞标记 CD105、干细胞标记物 CD90 及表达粘

附分子受体标记物 CD44,而内皮细胞标记物 CD31 和造血干细胞标记 CD45 表达阴性,HLA-DR 表达阴性(图 2)。

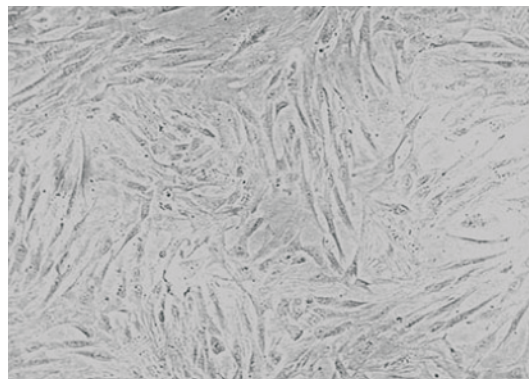


图 1 人脐带间充质干细胞的光镜下观察 ($\times 100$)

Fig.1 Morphology of hUC-MSC under light microscope ($\times 100$)

2.2 hUC-MSC 成脂及成骨细胞分化鉴定结果

hUC-MSC 向成脂细胞培养诱导后第 7 天,镜下见折光性强的小液滴,随着诱导时间延长,空泡渐增多,2 周后用油红 O 染色,高倍镜下可见胞浆中有大量被染成红色的液滴(图 3A)。hUC-MSC 向成骨细胞诱导后 21 d,茜素红染色可见细胞浆

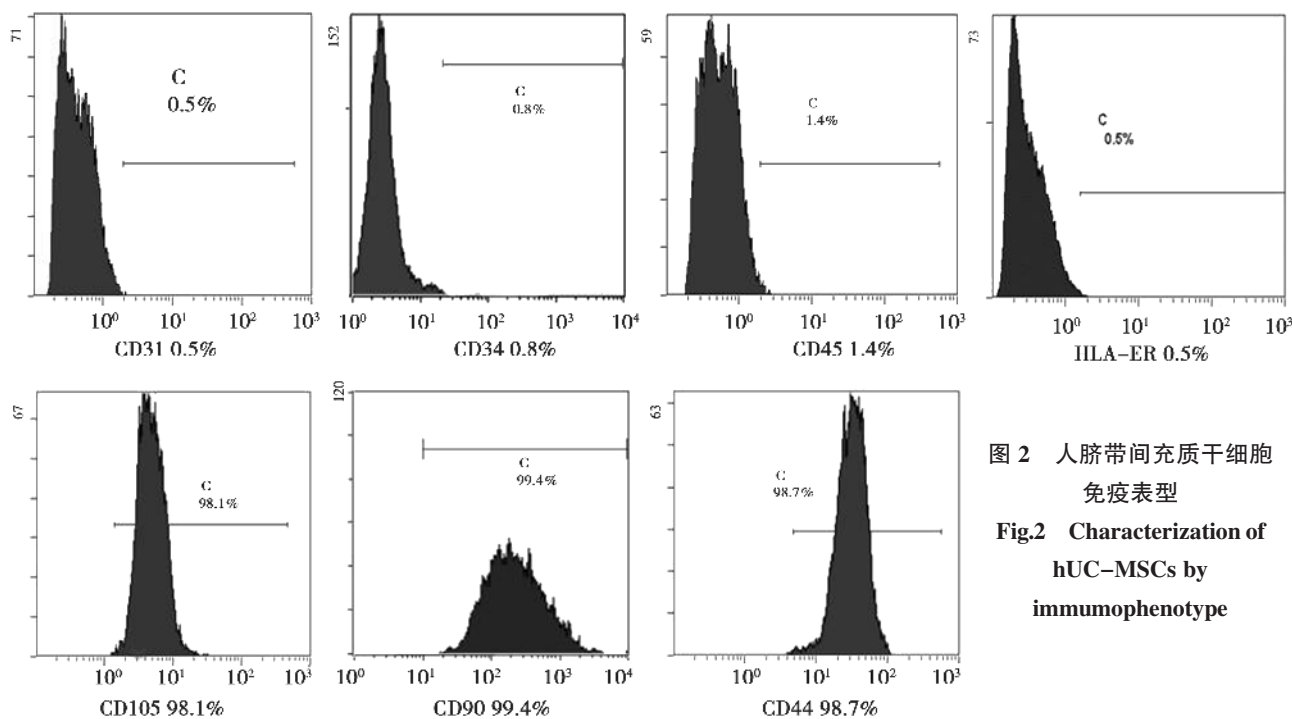


图 2 人脐带间充质干细胞免疫表型
Fig.2 Characterization of hUC-MSCs by immunophenotype

内有大量钙质沉积(图 3B)。

2.3 小鼠输卵管阻塞、积水情况的观察

小鼠在感染衣原体约 1 周左右,可见阴道口分泌脓性分泌物,持续约 2~3 周,阴道脓性分泌物渐减少,感染 4 周后,阴道分泌物少。所有小鼠

在感染衣原体后进行分泌物培养显示,感染后 1、2、3、4 周移植组培养阳性率为 100%、80%、50%、0%,对照组培养阳性率为 100%、70%、50%、0%,而感染后 5 周至 8 周移植组及对照组衣原体培养均为阴性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

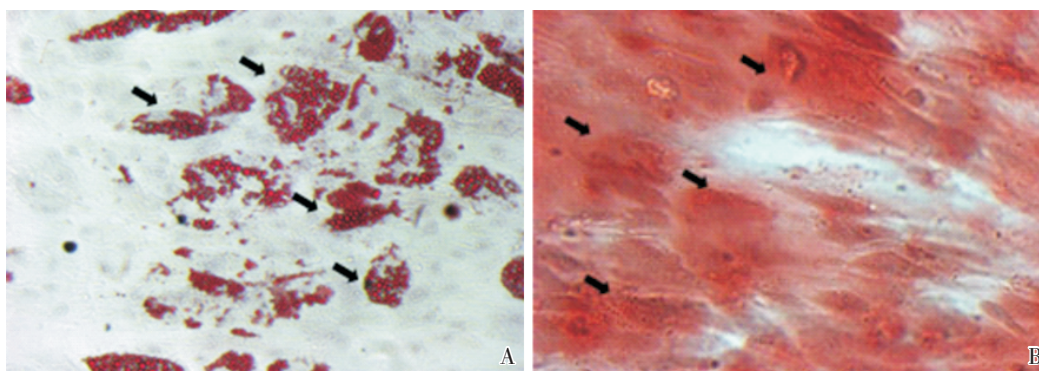


图 3 人脐带间充质干细胞体外诱导分化

Fig.3 Induced adipogenesis and osteogenesis of hUC-MSC in vitro

A: Positive for oil red O staining following adipogenic induction ($\times 200$); Positive for alizarin red staining following osteogenic induction ($\times 200$)

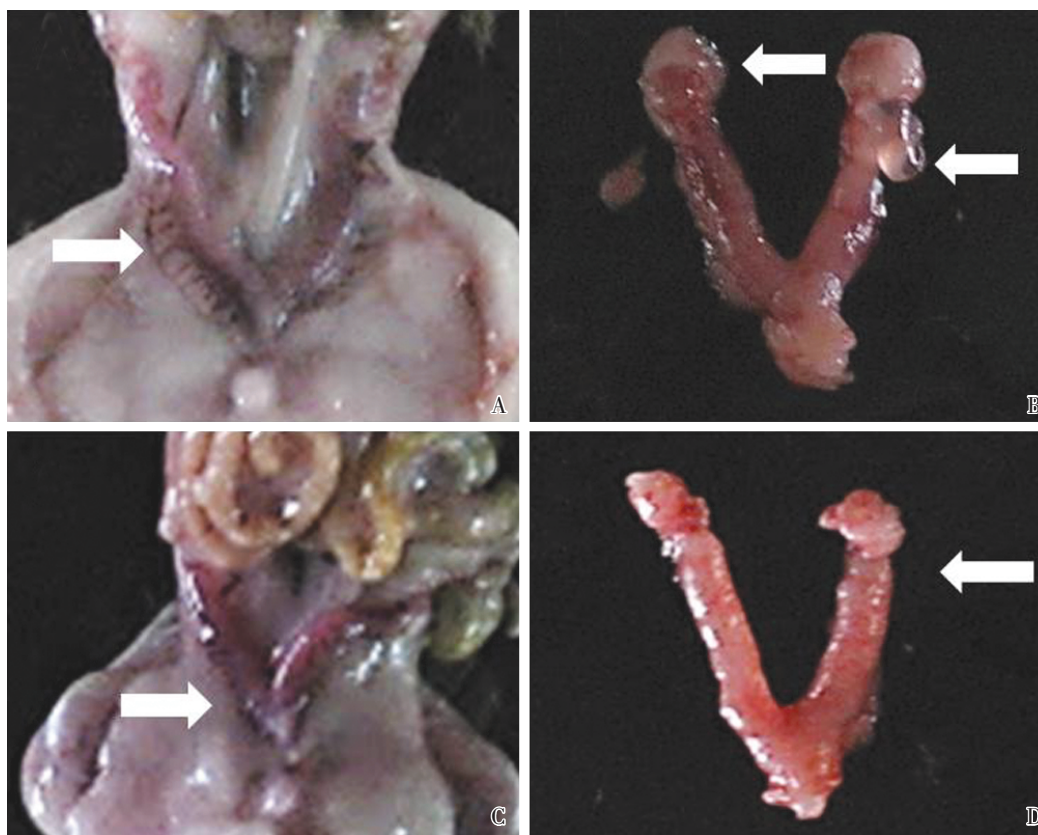


图 4 小鼠大体解剖图

Fig.4 Mice gross anatomy diagram

A: Control group; the fallopian tubes and uterus of mouse could be seen peripheral vascular proliferation. B: Control group; hydrosalpinx of mouse. C, D: hUC-MSC transplantation group; the fallopian tubes and uterus of mice could not be seen significantly vascular proliferation, and be morphologically normal.

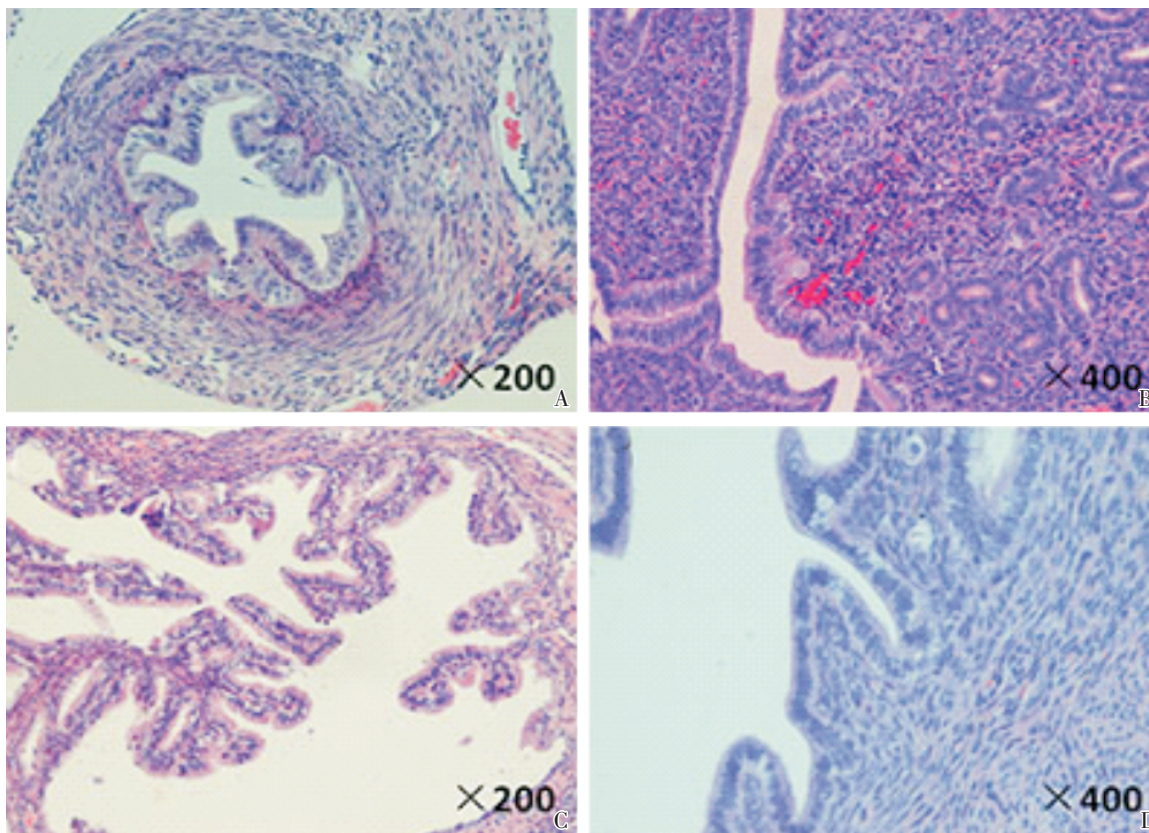


图 5 小鼠输卵管病理切片(HE 染色)

Fig.5 Oviduct pathological section of mouse (HE staining)

A: Control group: oviduct wall was thickening and hardening, and the mucosa fold was flat, lessen; B: Control group: blood capillary were dilate in oviduct serous membrane layer, and chronic inflammatory cells infiltrated; C: hUC-MSC transplantation group: oviduct wall structure is clear, the cilia were rich, and had branch; D: hUC-MSC transplantation group: Oviduct infiltrated by scattered lymphocytes.

对照组在感染衣原体 8 周后,10 只小鼠均出现输卵管阻塞、积水等并发症,部分可见输卵管及子宫周围血管增生,而 hUC-MSC 移植组在感染衣原体 8 周,hUC-MSC 移植后 4 周仅 2 例出现输卵管积水,其余 8 例均为正常输卵管改变(图 4),与对照组比较,差异有统计学意义(Fisher 检验, $P = 0.001$)。

2.4 小鼠输卵管病理改变观察

病理切片 HE 染色后显示,对照组呈现慢性输卵管炎表现,即输卵管纤维细胞及纤维母细胞增生,致管壁增厚硬化,粘膜皱襞变平、减少,严重者管腔狭窄甚至闭塞,部分输卵管管腔扩大,形成积水,浆膜层毛细血管扩张,淋巴细胞、浆细胞及少量酸性粒细胞等慢性炎症细胞浸润。而实验组中,2 例外观表现输卵管积水的小鼠,病理改变与对照组相同,另外 8 例呈现正常输卵管的组织结构,即输卵管管壁组织结构清晰,管腔通畅,纤毛

较丰富,并有分支,可见散在的淋巴细胞浸润(图 5)。

3 讨 论

MSC 是属于中胚层的一类多能干细胞,具有强大的增殖和多向分化潜能,以及免疫调节能力。人脐带来源的间充质干细胞取材方便,可以大量扩增,保持数代仍具有低免疫原性,且伦理限制少等优势^[4],是临床间充质干细胞移植的重要来源之一。

T 细胞是特异性调节免疫的主要执行者,研究发现 MSC 可以调节 T 细胞的功能,通过与 T 细胞直接接触、传递免疫抑制信号及产生可溶性因子等发挥抑制 T 细胞增殖和活化的作用^[5-8]。间充质干细胞可降调节 CD4⁺T 细胞的活化作用,从而将调节免疫反应^[9],且长期培养对 hUC-MSC 的免疫

调节功能无显著影响^[10]。MSC 还能够跨越胚层进行分化,选择性地迁移到损伤组织、慢性炎症部位或肿瘤部位^[2-3,11-12],具有广阔的应用前景。

不孕症受到全世界的广泛关注。世界卫生组织公布,不孕不育症已成为目前世界上继肿瘤和心脑血管病后的第三大疾病。输卵管因素的不孕症患者中,生殖道感染为主要致病因素,而衣原体一直被认为是主要的致病病原体^[13],在本研究中,我们以沙眼衣原体感染制备输卵管炎模型更接近临床所见。研究表明^[14],沙眼衣原体感染生殖道上皮细胞后,可诱导局部以 Th1 细胞介导为主的保护性细胞免疫反应,在清除病原体的同时,在一些淋巴细胞因子和炎症介质的作用下导致了以炎症细胞浸润及纤维增生为主的慢性输卵管炎的病理改变。

在本研究中,参照文献^[15]进行输卵管炎造模,对照组均出现输卵管积水、阻塞等慢性输卵管炎改变,说明以 1×10^7 -IFU 的 MoPn 感染液进行小鼠阴道内注射,可以成功造模。研究表明^[14],通过小鼠阴道内接种沙眼衣原体 MoPn 株,感染后 3 周内为急性炎症表现,感染 3 ~ 7 周,输卵管表现为慢性炎症,输卵管出现阻塞、积水等类似盆腔炎性疾病后遗症的表现,此为输卵管炎性不孕的病理基础。本研究在感染后 4 周,即输卵管慢性炎性期进行干预,在 hUC-MSC 移植组中,hUC-MSC 移植后能明显减轻输卵管周围炎细胞浸润的程度,促进输卵管损伤的修复,防止输卵管慢性炎症的发生,与对照组比较,仅 20% 出现输卵管积水改变,说明 hUC-MSC 移植对沙眼衣原体致慢性输卵管炎的治疗及预防作用明显。病理切片显示治疗组淋巴细胞浸润少,考虑其作用机制可能与 MSC 调节细胞免疫相关。

输卵管性不孕与其他因素引起的女性不孕相比较,具有治疗难度大,疗效不满意,或治疗费用高,成功率低等特点。目前多采用通液疗法、介入疗法、输卵管显微外科手术、辅助生殖技术等方法,取得了一定的疗效,但各种方法均有其局限性。腹腔镜手术和显微外科手术的妊娠率为 0 ~ 50%,但异位妊娠率达 9.10% ~ 12.5%^[16]。输卵管介入技术提高了再通率(93.87% ~ 98.09%),但术后再粘连率为 18.75% ~ 71.05%;异位妊娠率为 9.25% ~ 29.16%,对远端阻塞者(即输卵管积水)效果差^[17-18]。各种治疗不可避免地会遇到治疗后

输卵管再次粘连的问题。根据我们的研究结果,提示人脐带间充质干细胞的输卵管移植,有望预防慢性输卵管炎的发生,并防止输卵管复通后再粘连,为输卵管性不孕的患者提供治疗的新方法。

参考文献:

- [1] 罗世香,田书萍,姚书忠. 腹腔镜下原发不孕与继发不孕的相关因素探讨 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(7): 119-120.
Luo SX, Tian SP, Yao SZ. Related factors by laparoscopic primary infertility and secondary infertility [J]. Chin J Birth Health Hered, 2005, 13(7): 119-120.
- [2] Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells [J]. Gene Ther, 2008, 15(10): 730-738.
- [3] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [4] 杨卿,杨扬,刘剑戎,等. 人脐带间充质干细胞分离扩增方法的优化. 中山大学学报:医学科学版,2011,32(6):818-823.
Yang Q, Yang Y, Liu JR, et al. Optimized isolation of human mesenchymal stem cells from umbilical cord [J]. J Sun Yat-sen Uni: Med Sci, 2011, 32(6): 818-823.
- [5] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex [J]. Scand J Immunol, 2003, 57(1): 11-20.
- [6] Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway [J]. Eur J Immunol, 2005, 35(5): 1482-1490.
- [7] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness [J]. Blood, 2005, 105(5): 2214-2219.
- [8] Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation [J]. Blood, 2004, 103(12): 4619-4621.

- [9] Selleri S, Dieng MM, Nicoletti S, et al. Cord blood-derived mesenchymal stromal cells down-modulate CD4+ T-cell activation by inducing IL-10 producing Th1 cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(7): 1063-1075.
- [10] 毛文哲,许超,李扬秋,等.长期培养的人脐带间充质干细胞 PCNA、IL-6、IL-11 和 galectin-3 的表达 [J]. *中国病理生理杂志*,2012,28(6):1051-1056.
Mao WZ, Xu C, Li YQ, et al. Expression of PCNA, IL-6, IL-11 and galectin-3 in human umbilical cord mesenchymal stem cells during long-term culture [J]. *Chin J Pathol*, 2012, 28(6): 1051-1056.
- [11] Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(10):730-738.
- [12] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [13] Andersen B, Ostergaard L. Chlamydia and infertility [J]. *Ugeskr Laeger*, 2012, 174(41): 2452-2455.
- [14] 韩建德,陈木开,李斌,等.沙眼衣原体致小鼠输卵管的病理研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(5): 520-522.
Han JD, Chen MK, Li B, et al. Pathologic changes of experimental chlamydia trachomatis salpingitis in mice [J]. *J Sun Yat-sen Uni; Med Sci*, 2005, 26(5): 520-522.
- [15] 陈木开,韩建德,陈小红,等. MoPn 沙眼衣原体致小鼠生殖道感染模型的初步研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*,2004,20(8): 687-674.
Chen MK, Han JD, Chen XH, et al. Preliminary study on the murine model for genital infection with Chlamydia trachomatis MoPn [J]. *Chin J Zoon*, 2004, 20(8): 687-674.
- [16] 朱湘虹,葛春晓,汤晓秋.腹腔镜与显微外科手术治疗输卵管伞端粘连闭锁伴不孕的疗效分析 [J]. *生殖与避孕*,2005,25(2):96-98.
Zhu XH, Ge CX, Tang XQ. Analysis of laparoscopic and microsurgical operation for tubal fimbria adhesion atresia with infertility treatment [J]. *Reprod Contracept*, 2005, 25(2): 96-98.
- [17] 禚庆山,何耀娟,陈丽莎,等. 228 例输卵管不同部位阻塞性不孕介入治疗后结局分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*,2006,14(9):116-118.
Xuan QS, He YJ, Chen LS, et al. 228 cases in different parts of tubal obstruction infertility after interventional treatment outcome analysis [J]. *Chin J Birth Health Hered*, 2006, 14(9):116-118.
- [18] 孙志华. 输卵管介入再通治疗输卵管阻塞性不孕 40 例分析 [J]. *中国妇产科临床杂志*,2001,2(4):236-237.
Sun ZH. The effect of tubal interventional recanalization treatment of tubal obstruction infertility of 40 cases [J]. *Chin J Clin Obstetr Gynecol*, 2001, 2(4): 236-237.

(编辑 徐杰)