

骨髓间充质干细胞在致敏小鼠体内的示踪归巢实验

洪冬玲¹, 吴燕峰², 许吕宏¹, 方建培^{1*}

(中山大学孙逸仙纪念医院 1.儿科,2.生物治疗中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】了解骨髓间充质干细胞在以异基因脾细胞输注致敏小鼠体内的归巢情况。【方法】正常同种异基因小鼠骨髓间充质干细胞的体外培养及鉴定后,体外予羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯荧光染料标志,经尾静脉注射到致敏组和非致敏组小鼠体内(每组 10 只),在 6 h、24 h 和 48 h 处死动物,分别应用冰冻切片和流式检测方法了解骨髓间充质干细胞在各个脏器的分布情况。【结果】冰冻切片和流式检测结果均表明骨髓间充质干细胞在致敏小鼠体内迅速和持久在脾、肝脏聚集,而非致敏动物却没有明显聚集到肝脾等脏器,而是最终归巢到了骨髓。其中流式细胞仪定量结果表明:6 h 时致敏小鼠脾脏荧光阳性细胞为(3.78 ± 0.66)%,与同期正常小鼠脾脏结果比较 $P < 0.05$,有统计学意义;而在 48 h 时致敏小鼠骨髓荧光阳性细胞为(0.43 ± 0.35)%,同期正常小鼠骨髓为(5.40 ± 1.58)%,两者比较 $P < 0.05$,有统计学意义。【结论】应用异基因脾细胞致敏的小鼠体内肝脾等免疫脏器明显受到致敏影响,其对骨髓间充质干细胞体内归巢的定位具有很高的趋化吸附作用,中止了骨髓间充质干细胞正常状态下向骨髓的归巢。

关键词:致敏小鼠;骨髓间充质干细胞;归巢示踪

中图分类号:R457 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2011)06-0708-05

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Homing in Sensitized Mice

HONG Dong-ling¹, WU Yan-feng², XU Lü-hong¹, FANG Jian-pei^{1*}

(1.Department of Pediatrics; 2.Biotherapy Center, Sun Yat-sen Memory Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To explore the homing characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in the allogeneic splenocytes sensitized mice. 【Method】After normal allogene bone marrow MSCs were cultured and evaluated, MSCs were labeled by 5-and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) in vitro. After injected CFSE labeled MSCs (CFSE + cells) through vena caudalis in 6, 24, and 48 h, homing trace were explored in the different organs both in the sensitized and normal mice group (each group 10 samples mice) through frozen section and flow cytometry (FCM) detection methods. 【Results】Both in the methods of frozen section and FCM, we discovered in the sensitized mice group MSCs were aggregated and homing in spleen and liver quickly and lastingly, while in the normal mice group MSCs were homing to the bone marrow in the end. Among those FCM quantitative result, in 6 h the percentage of spleen CFSE + cells in the sensitized mice group was (3.78±0.66)%, significant difference was found in spleen between the sensitized and normal group at the same time ($P < 0.05$); while in 48 h, the percentage of bone marrow CFSE+ cells in the sensitized and normal mice group were (0.43±0.35)% and (5.40±1.58)%, respectively ($P < 0.05$). 【Conclusion】Immunity organs such as liver and spleen, influenced by the sensitized of allogeneic splenocytod transfusion, had the orientating function in the normal allogene bone marrow MSCs homing, which interrupted the homing to the bone marrow in the normal condition.

Key words: sensitized mice; mesenchymal stem cells; homing trace

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(6): 708-712]

目前临床研究发现,对于进行实体器官移植或造血干细胞移植的不少患者由于移植前多次接受同种异基因输血而致敏,发生移植排斥的风险

明显增加^[1-3]。如何促进造血干细胞在致敏受者的植入是目前急需解决的问题。我们的前期研究利用异基因的脾细胞输注法建立了相关的输血致

收稿日期:2011-04-15

基金项目:国家自然科学基金(30872383)

作者简介:洪冬玲,博士,研究方向:小儿血液病及急救,现在广东省人民医院儿科工作; * 通信作者:方建培,教授,博士研究生导师,
E-mail: jpfang2005@163.com

敏模型^[4]。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有支持造血,自我更新和多向分化的潜能,同时它不表达主要组织相容性复合物 II (MHC-II)类分子,低表达共刺激分子(B7),被认为是一种免疫负调控的细胞低免疫原性细胞;但该作用亦受局部微环境的影响^[5-6]。目前临床及实验室已有研究显示 MSC 能抑制非致敏状态下的移植抗宿主病,从而促进造血干细胞的植入^[7-8],但能否促进致敏状态下造血干细胞移植的植入尚未见报道,值得进一步探讨和研究。为此,我们利用荧光标记示踪法首先了解正常同种异基因来源的骨髓 MSC 在反复脾细胞输注致敏的小鼠模型体内的归巢情况,为进一步研究 MSC 对致敏受者造血干细胞移植植入的影响提供前期实验学基础。

1 材料和方法

1.1 致敏动物模型的建立

参照已建立的方法^[4],断颈处死 C57BL/6 小鼠(体质量 20 g 左右),无菌操作下固定后开腹取脾脏,PBS 液反复冲洗过滤;取得脾细胞,离心沉淀细胞后,用 PBS 重悬细胞;分别于实验前第 14 天(d_{-14})及第 7 天(d_{-7})将 1×10^6 C57BL/6 脾细胞经尾静脉输注到 BALB/c 小鼠(体质量 20 g 左右)体内。 d_0 天为实验当天。

1.2 正常 BALB/C 小鼠骨髓 MSC 的体外培养与鉴定

将正常 BALB/C 小鼠脱臼处死,无菌条件下分离股骨和胫骨,制备单细胞悬液。 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 25 cm^2 塑料培养瓶内,加入完全 DMEM/F12 培养基(含青、链霉素各 100 u/mL,胎牛血清 10%),置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。48 h 后首次全量换液去除未贴壁细胞,以后每 2~3 d 全量换液。细胞达 90% 融合时以质量浓度 0.25% 胰酶+0.02% EDTA 消化,按 1:2 比例传代培养。取第 4 代(P4)MSCs 加入荧光标记的抗体包括 Anti-CD34-FITC、Anti-CD29-PE Anti-Sca1-FITC、Anti-CD86-FITC、Anti-CD80-PE 孵育后,流式细胞仪上机检测细胞表面标志。取 P4 代的 MSCs 加入成骨诱导剂(包括完全 DMEM/F12 培养液, $50 \mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸, $0.1 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸)成骨诱导 3 周,偶联法碱性

磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)鉴定。同时取 P4 代的 MSCs 加入成脂诱导液(A 液: 1 mmol/L 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX $10 \mu\text{g/mL}$ 的胰岛素 0.2 mmol/L 的吡啶美辛; B 液: $10 \mu\text{g/mL}$ 的胰岛素)。前 3 d 加 A 液、B 液 1 d、A 液和 B 液依此循环 2~3 次,出现脂肪小滴后予以油红 O 染色。

1.3 绿色荧光染料 CFSE 体外标记 MSCs

取绿色荧光染料羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺(5-and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)加入配套 DMSO,制备为 10 nmol/L 储备液- $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存,使用时应用无血清 DMEM/F12 培养液稀释成工作液 $10 \mu\text{mol/L}$ 。CFSE 在体外标记 MSC, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 后用 PBS 液悬浮,流式检测 CFSE 标志细胞(CFSE⁺ cells)比例,同时经尾静脉输注法分别注射到致敏动物(实验组, 10 只)和正常(非致敏)动物(对照组, 10 只)体内,每次为 1×10^6 CFSE⁺ cells。

1.4 MSC 归巢示踪的冰冻切片定性检测

CFSE⁺ cells 输注后,分别在 6 h、24 h 和 48 h 处死实验组和对照组动物(各 3 只),留取外周血,肝,脾,肺和肾等脏器进行快速冰冻切片,荧光显微镜下计数每个视野中荧光细胞数($\times 100$)。结果判定标准为:(-)未发现绿色荧光;(+)每个视野中仅发现 1~5 个阳性细胞;(++)每个视野中仅发现 6~10 个阳性细胞;(+++每个视野中仅发现 11~100 个阳性细胞;(++++每个视野中仅发现 100 个以上的阳性细胞。

1.5 MSC 归巢示踪的流式定量检测

CFSE⁺ cells 输注后,分别在 6 h、24 h 和 48 h 处死实验组和对照组动物(各 3 只)制备脾脏、股骨细胞悬液及眼静脉血,以 Tris-NH₄Cl 溶液溶解红细胞,FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测绿色荧光的频率(激发光波长为 488 nm)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件包处理,计量资料以均数 \pm 标准差表示。Student-Newman-Keuls 进行两组间比较,检验水准设 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠骨髓间充质干细胞培养与鉴定

经贴壁法培养的小鼠骨髓 MSC 传代到 P₄ 已呈成纤维细胞样形态,形态单一见图 1; P₄ MSC 的

流式检测结果见图 2, 所培养的 MSC 细胞表面标志为 CD34⁻为 (98.63±0.73)%、CD29⁺为 (96.50±0.85)%、Sca1⁺为 (95.50±0.93)%、CD86⁻为 (95.27±0.91)%、CD80⁻为 (87.53±1.01)% (细胞纯度大约 95%); 经成骨和成脂诱导后, ALP 鉴定阳性及细胞出现脂肪小滴, 油红 O 染色阳性见图 1B、C。综合上述方法表明所培养的细胞具有 MSC 特定的形态, 细胞表面标志及多向分化功能。

2.2 归巢示踪的冰冻切片定性检测结果

流式检测 CFSE⁺ cells 比例为 (95.8±3.2)%, 染色成功。表 1 为 CFSE⁺ cells 在致敏小鼠组和正常小鼠组体内不同时间, 不同组织的动态归巢情况。结果可见在致敏小鼠组中 CFSE⁺ cells 注射 6 h 时很快聚集到了肝脾, 24 h 及 48 h 仍见在肝脾的聚集(时间持久), 而正常对照小鼠组却是 6 h 及 24 h 未见肝脾的聚集, 而 48 h 最终归巢到了骨髓。

图 3 为 24 h 时在荧光显微镜下观察到的致敏小鼠和正常小鼠外周血, 肝及肾的荧光细胞的分布情况。

2.3 归巢示踪的流式细胞仪检测结果

结果见表 2 和图 4, 流式检测各组织荧光细胞 CFSE⁺ cells 在该组织的百分比情况, 结果与冰冻切片结果一致。其中流式定量结果表明: 6 h 时致敏小鼠脾脏阳性细胞为 (3.78 ± 0.66)%, 与同期正常小鼠脾脏结果为 (1.32 ± 0.17)%, 两者比较 $P < 0.05$, 有统计学意义; 而在 48 h 时致敏小鼠

骨髓阳性细胞为 (0.43 ± 0.35)%, 而同期正常小鼠骨髓结果为 (5.40 ± 1.58)%, 两者比较 $P < 0.05$, 有统计学意义。

3 讨 论

我们前期实验利用同种异基因的小鼠脾细胞致敏法建立的动物模型已证实是一良好而稳定的致敏模型^[4]。荧光染料 CFSE 是一种透膜荧光染料, 在 1 个增殖周期细胞群内, 各连续传代细胞的荧光强度以 1/2 递减, 对细胞正常生理活动无明显影响^[9]。目前已有报告其应用于研究淋巴细胞、干细胞等, 用于细胞移植及细胞分选等实验^[10-13]。本实验应用 CFSE 标志小鼠骨髓 MSC, 进行了致敏小鼠和正常小鼠体内归巢示踪检测, 进一步具体了解外源性 MSC 在致敏状态下的归巢情况。

我们利用绿色荧光染料 CFSE 标记小鼠骨髓 MSC (CFSE⁺ cells), 经尾静脉注入致敏小鼠和正常小鼠体内, 应用定性和定量方法检测 CFSE⁺ cells 在不同时间、不同脏器的分布情况。从冰冻切片及血涂片结果来看, CFSE⁺ cells 在 6 h 时已在致敏动物的肝脾脏器聚集, 时间持续到了 48 h 还很高, 而在相同时间时在正常动物体内未能观察到相同现象。我们同时利用流式检测方法进行定量分析时也对骨髓及肝脏两者比较, 基本有相同的结果。有趣的是, 我们在利用流式检测时发现, 48 h 在正常动物体内 CFSE⁺ cells 是在骨髓中较高表达 (与

表 1 CFSE⁺ 细胞不同时间时在体内各组织的分布强度(冰冻切片和血片结果)

Table 1 Intensity of fluorescent CFSE⁺ cells in frozen sections and blood smears

	Sensitized mice					Non-sensitized mice				
	Blood	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Blood	Lung	Liver	Spleen	Kidney
6 h	+	++	+++	+++	+	+	++	+	+	+
24 h	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	++
48 h	+	+	+++	+++	+	+	++	+	+	+

表 2 CFSE⁺ 细胞不同时间体内组织分布情况(流式检测结果)

Table 2 Percentage of CFSE⁺ cells in the organs of mice (FCM)

	Sensitized mice			Non-sensitized mice		
	Blood	Spleen	Bone marrow	blood	Spleen	Bone marrow
6 h	0.52 ± 0.20	3.78 ± 0.66 ¹⁾	0.19 ± 0.04	0.58 ± 0.06	1.32 ± 0.17 ¹⁾	0.07 ± 0.04
24 h	0.35 ± 0.23	3.99 ± 1.0 ¹⁾	1.48 ± 1.15	0.31 ± 0.15	1.46 ± 0.45 ¹⁾	2.11 ± 0.56
48 h	0.59 ± 0.15	5.00 ± 1.5 ¹⁾	0.43 ± 0.35 ¹⁾	0.43 ± 0.32	0.83 ± 0.22 ¹⁾	5.40 ± 1.58 ¹⁾

Each test included 3 samples. compared with non-sensitized mice at the same time point, 1) $P < 0.05$, others $P > 0.05$

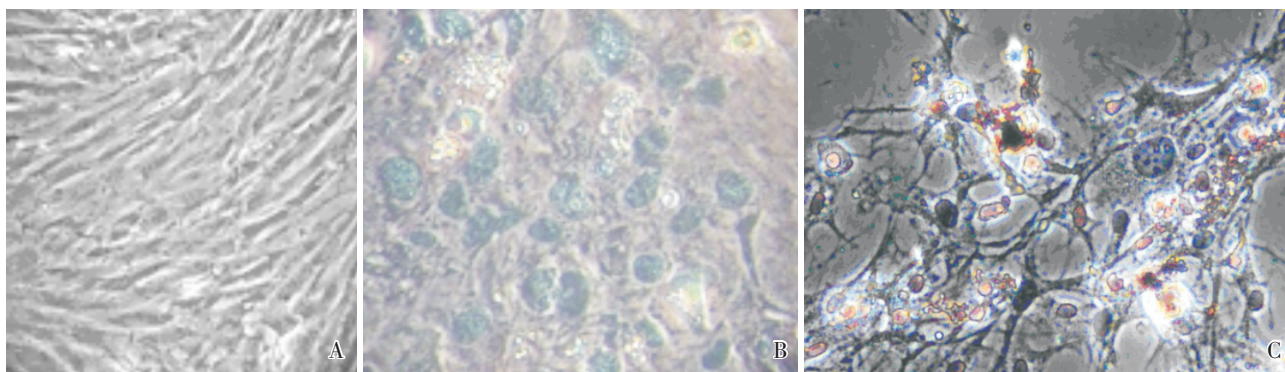


图 1 P₄小鼠骨髓 MSC 光镜照片形态

Fig.1 Morphology of mice bone marrow MSC in P₄

A; under inverted microscope, × 50; B; osteogenic differentiation, × 100; C; adipogenic differentiation(Oil red O), × 100

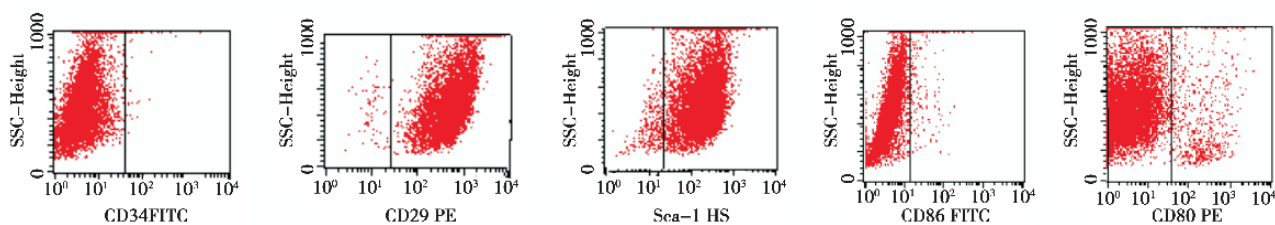


图 2 P₄小鼠骨髓 MSC 表面标志流式结果:CD29、CD34、Sca-1 和 CD80, CD86

Fig.2 FCM markers of the mice bone marrow MSC in P₄: CD29, CD34, Sca-1, CD80, and CD86

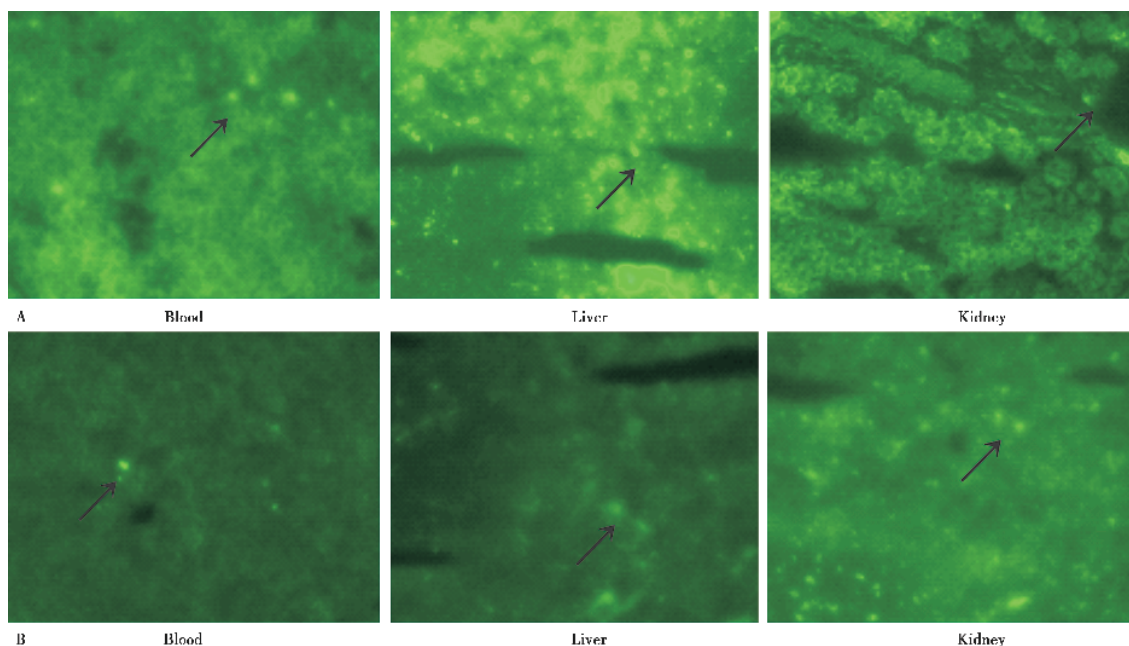


图 3 24 h 时外周血、肝、肾脏的绿色荧光染色细胞的组织分布

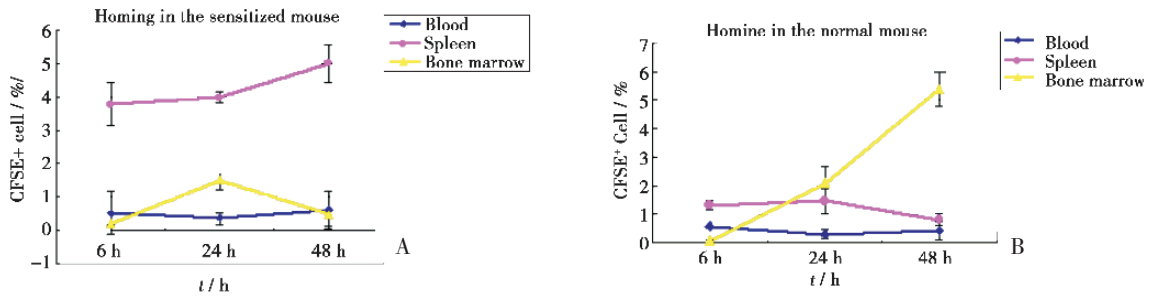
Fig.3 Fluorescent CFSE⁺cells in blood smear, liver and kidney in 24 h

A; sensitized mice; B; normal mice; fluorescence microscope, ×100.

自体其它组织比较, $P < 0.05$, 有统计学意义), 该结果表明在没有经过异基因脾细胞致敏的正常小鼠体内, 正常的外源性骨髓 MSC 最终是归巢到骨髓; 而在同样时间点上, 致敏小鼠却明显表现出

CFSE⁺cells 仍持久地聚集在肝脾等脏器, 与正常小鼠同一组织比较, $P < 0.05$, 有统计学意义。

我们分析该现象的原因认为, 在应用异基因脾细胞致敏小鼠体内, 肝脾等免疫脏器明显受到

图 4 CFSE⁺ cells 在不同时间点上归巢情况Fig.4 Homing of CFSE⁺ cells in different time points

A: sensitized mice; B: normal mice

致敏影响后,可能分泌相关细胞因子如肝细胞生长因子、白细胞介素-10、转化生长因子 β 等,对骨髓间充质干细胞的体内归巢起着定位和趋化吸附作用,中止了其向骨髓的归巢。而其归巢引导细胞因子具体如何很值得我们进一步研究。同时该现象也符合MSC易向受损伤部位迁移的特性,与其他报道相似^[14-15]。通过该实验我们虽然发现外源性骨髓MSC可通过静脉注射方式到达肝脾等靶器官,但同时也提出一个更为重要问题:到达肝脾等免疫器官的MSC在局部起的免疫调节作用如何?外源性正常骨髓MSC是否继续起着免疫抑制作用,还是被肝脾等致敏后的局部微环境所影响起免疫增强作用呢?这有待于我们进一步的研究。

参考文献:

- [1] Aki SZ, Sucak GT, Ozkurt ZN, et al. Allogeneic stem cell transplantation for severe aplastic anemia: graft rejection remains a problem [J]. *Transfus Apher Sci*, 2009, 40(1): 5-11.
- [2] Lucarelli G, Gaziev J. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia[J]. *Blood Rev*, 2008, 22(2): 53-63.
- [3] Locatelli F. Reduced-intensity regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: 398-401.
- [4] Xu LH, Fang JP, Huang WG, et al. Marrow graft rejection by repeated transfusions of allogeneic donor spleen cells [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 40(7): 691-698.
- [5] Guo Z, Li H, Li X, et al. In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 992-1000.
- [6] Asari S, Itakura S, Ferreri K, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation [J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(5): 604-615.
- [7] Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival [J]. *Am J Transplant*, 2007, 7(2): 408-415.
- [8] Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, et al. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation [J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3620-3627.
- [9] Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 243(1-2): 147-154.
- [10] Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience [J]. *J Intern Med*, 2007, 262(5): 509-525.
- [11] Ozawa K, Sato K, Oh I, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *J Autoimmun*, 2008, 30(3): 121-127.
- [12] Dooner M, Cerny J, Colvin G, et al. Homing and conversion of murine hematopoietic stem cells to lung [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1): 47-51.
- [13] Heinzlmann J, Enke U, Seyfarth L, et al. Development of a human model to study homing behavior of immune cells into decidua and placental villi under ex vivo conditions [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2009, 61(1): 19-25.
- [14] Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion [J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(2): 244-255.
- [15] Horwitz EM, Keating A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? [J]. *Cytotherapy*, 2000, 2(5): 387-388.

(编辑 张恩健)