

·基础研究·

放射损伤对外源骨髓间充质干细胞迁徙定植的影响

罗向阳¹, Mohi Rezvani², 夏焱¹, 岑丹阳¹, 何展文¹, 李栋方¹, Uday Tirlapur³

(1. 中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州; 2. 牛津大学邱吉尔医院研究所; 3. 牛津大学医学工程部, 牛津 英国)

摘要:【目的】研究机体中枢神经系统受放射损伤时骨髓间充质干细胞(MSCs)的迁徙定植特性的改变, 从而为应用 MSCs 治疗中枢神经系统放射损伤提供理论和实验依据。【方法】用 8 周龄 SD 大鼠接受 22GyX 线照射制作中枢神经系统放射损伤模型; 从 GFP 鼠抽取骨髓, 分离和扩增 MSCs。中枢神经系统受放射损伤的 SD 大鼠 4 个月后予静脉输注 GFP-MSCs。于移植后几个时间点取脑、骨髓、肝、脾等做冰冻切片, 用双光子共聚焦红外脉冲激光显微镜检测 GFP-MSCs。【结果】在最早 24 h 内实验组和对照组的骨髓中检测到外源性 GFP 阳性细胞, 至第 7 天后实验组骨髓中 GFP 阳性细胞显著多于对照组。脑内第 1 天未检测到外源性 GFP 阳性细胞, 第 4 天后中枢神经系统受放射损伤的 SD 大鼠, 脑组织检测到带绿色荧光的外源性 GFP 阳性细胞; 而对照组脑内一直未检测到带绿色荧光的外源性 MSCs。实验组和对照组脾脏在输注 MSCs 后第 1 天即检测到大量 GFP 阳性细胞, 并持续存在, 第 21 天实验组 GFP 阳性细胞较对照组减少。【结论】在放射损伤条件下外源性 MSCs 可透过血脑屏障到达脑组织, 中枢神经系统放射损伤可诱导外源性 MSCs 向脑组织迁徙定植。

关键词: 放射损伤; 中枢神经系统; 骨髓间充质干细胞

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)05-0512-04

Homing and Magratration of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Irradiated Central Nervous System

LUO Xiang-yang¹, Mohi Rezvani², XIA Yan¹, CEN Dan-yang¹,
HE Zhan-wen¹, LI Dong-fang¹, Uday Tirlapur³

(1. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Research Institute, Churchill Hospital, Oxford University; 3. Department of Medical Engineering, Oxford University, Oxford, UK)

Abstract: 【Objective】 To observe the character of the mesenchymal stem cells (MSCs) migrating and homing in the rats after irradiation, to seek the cue and evidence of the treatment for irradiating damage in central nervous system(CNS) with MSCs. 【Methods】 Brains of 8-week old Sprague-Dawley rats were irradiated with 22 Gy single dose of X-ray. Mesenchymal stem cells extracted from green florescent protein (GFP) expressing rats were extracted, expanded, and transplanted iv to SD rats around 4 months after irradiation of brain. At certain time points after transplantation the brain, bone marrow and other tissues were removed and frozen. Cryostat sections were prepared and examined by two photon confocal microscopy. 【Results】 GFP cells were observed in bone marrow of irradiated animals and unirradiated animals 24 h after transplantation. No GFP cells were observed in irradiated and unirradiated brains at early time point of 24 h after transplantation. It appeared positive for GFP cells in CNS of irradiated SD rats at day 4 after transplantation. In spleens, a lot of GFP cells were observed in irradiated and unirradiated animals of all time and at the 21st day, the amount of GFP cells were reduced compared with control. 【Conclusions】 Irradiation may enhance passing through blood-brain barrier of MSCs and induce the homing and migration of the MSCs in the irradiated rats.

Key words: irradiation; central nervous system; mesenchymal stem cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5):512-515;525]

收稿日期: 2008-03-15

基金项目: 国家留学基金资助项目(2003844076)

作者简介: 罗向阳(1962-), 男, 湖南桂阳人, 博士, 副教授, 硕士生导师, E-mail: luox33@hotmail.com

随着干细胞工程研究的深入,细胞替代治疗已成为治疗损伤、遗传缺陷性或退行性疾病的新途径。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是目前备受关注的一类来源于骨髓单个核细胞群,具有多向分化潜能的组织干细胞。MSCs特性稳定,连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能。在体外特定的诱导条件下, MSCs可以分化为骨、软骨、脂肪、肌腱、韧带等多种细胞^[1-4]。作为神经系统疾病细胞治疗的供体细胞应容易获得,能够迅速扩增,能够在宿主脑内长期存活,易于外源基因的转染和长期表达^[5,6]。其中骨髓细胞是可能的来源之一。有实验表明^[7],骨髓单个核细胞能够穿过血脑屏障,而且有助于小胶质细胞的正常转化。而在中枢神经受损伤的状态下,外源 MSCs在体内的移行和定植特性尚未有研究报道。本文观察到机体中枢神经系统受放射损伤状态下 MSCs的一些迁徙定植特性,可能为应用 MSCs 治疗中枢神经系统放射损伤和其他损伤提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂

1.1.1 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 50 只,平均体质量 280 g,随机分放射实验组和对照组,每组分 5 个时间点。绿色荧光蛋白鼠 10 只,平均体质量 220 g,作 MSCs 供体。实验动物均源自英国牛津大学实验动物部。

1.1.2 实验试剂 含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM (GIBCO 公司)、胰蛋白酶、抗 CD29 单抗、抗 CD44 单抗、抗 CD34 单抗、抗 CD45 单抗(Sigma 公司)、碘化丙啶(Anresco 公司)。

1.1.3 主要仪器 双光子共聚焦红外脉冲激光显微镜(800 nm near infra-red femto-second pulse laser)(ZEISS 公司)、Leica CM1850 冷冻切片仪(Leica 公司)、实验 X 线照射仪-50MA(SMAM 公司)、CO₂ 培养箱(Forma 公司)。

1.2 骨髓间充质干细胞分离与诱导

1.2.1 MSCs 的原代培养 无菌条件下取绿色荧光蛋白鼠股骨骨髓,加入含有 1.5 mL 的 10%肝素液的离心管中,充分混匀。加入适量 PBS 液混匀,以 1 000 r/min ($r=15$ cm) 离心 10 min,吸净上液;再用 PBS 液洗一遍(方法同前),用含 100 mL/L 胎牛血清的完全培养液悬浮细胞,将其接种在 25 cm²

培养瓶中,37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中原代培养。倒置相差显微镜下每日观察 1 次。原代 MSCs(P₀)约 90%贴壁细胞接近融合时,用 PBS 冲洗 2 次以除去培养瓶中的含血清培养基。以适量 2.5 g/L 胰蛋白酶-EDTA 室温消化 1~2 min(冬季室温较低,可放入温箱 37 ℃孵育 30 s),倒置相差显微镜下观察,见到细胞变圆、间隙增宽、有部分细胞悬浮时即可加入含有血清的完全培养基终止消化。并用吸管轻轻吹打,使细胞进一步脱落。将细胞悬液移入无菌离心管中,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入适量完全培养基悬浮细胞,将细胞悬液以 1:3 接种于塑料培养瓶中,置 CO₂ 培养箱中继续培养。即为细胞 P₁ 代。待 P₁ 代细胞生长融合达 90%时,可继续传代^[8]。

1.2.2 MSCs 的鉴定 MSCs 培养至 P5 代时,约 90%贴壁细胞接近融合时,用 PBS 洗 2 次除去培养瓶中含血清的培养基,以适量 0.25%胰蛋白酶-EDTA 室温消化 1~2 min 倒置相差显微镜下观察,见到细胞变圆、间隙增宽、有部分细胞悬浮时即可加入含有血清的完全培养基终止消化。并用吸管轻轻吹打,使细胞进一步脱落。用 PBS 洗 2 次后送流式细胞仪室检测 CD34、CD44、CD29。

1.3 放射损伤

50 只雄性 SD 鼠在 13 周龄随机分成 2 组:实验组 脑局部接受 X 线照射;对照组作假照射。在乙醚麻醉下,实验组以 1.4 Gy/min 的放射速率,接受 20 Gy 的 X 线照射,X 线透过一个在 3 mm 厚铅板上直径 20 mm 的孔,保证大脑、小脑和脑干均接受 X 线照射,而其他部位免于 X 线照射^[9]。该方法可以导致胼胝体、内囊等在照射后 16~20 周间发生迟发性坏死。

1.4 间充质干细胞移植与检测

取扩增第 5 代的 MSC,去掉培养液,PBS 洗 2 遍,用 1:1 的 2.5 g/L 的胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 混合液消化,用含 20 g/L BSA 的 PBS 洗涤后制成浓度为 1.0×10^6 /mL 的单细胞悬液。每只实验鼠和对照鼠在 29 周龄时(即放射处理后 16 周),从尾静脉注入 MSC 细胞悬液 0.3 mL,细胞数 3.0×10^5 。

移植后分别在第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天将 2 只实验鼠和对照鼠处死,取脑、肝、脾、肾、骨髓,标本置液氮后作冰冻切片,检测

GFP-MSCs 在各组织的分布情况。切片以碘化丙啶染色(propidium iodide),用甘油封片,为减少荧光物质的光漂白作用,用双光子共聚焦红外脉冲激光显微镜(800 nm near infra-red femto-second pulse laser)检测。

2 结果

2.1 MSCs 的鉴定结果

培养至 P5 代的 MSCs 生长旺盛、贴壁良好、呈均匀一致的旋涡状,移植前取 1 mL 细胞悬液用流式细胞仪检测细胞表面标志显示 CD29、CD44 阳性,CD34、CD45 阴性。

2.2 放射损伤结果

对实验组以 1.4 Gy/min 的放射速率进行 X 线照射,造成海马和内囊变性。组织学检查显示,与对照组比较,实验组海马变性、神经元减少。

2.3 间充质干细胞移植后迁徙和定植情况

移植后分别在第 1 天、第 4 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天,取脑、肝、脾、肾、骨髓,作冰冻切片,

用双光子共聚焦红外脉冲激光显微镜检测 GFP-MSC 在各组织的分布情况,每个样本数 5 个视野 GFP 阳性细胞数,计算其平均值。结果显示:实验组和对照组在输注 MSCs 后第 1 天脑内均未检测到绿色荧光阳性的外源性 GFP 阳性细胞。移植后第 4 天实验组海马出现 GFP 阳性细胞,第 7 天最为明显;而对照组脑组织中未见有 GFP 阳性细胞(图 1),经秩和检验,两组差异有显著性。实验组和对照组在移植后第 1 天脾脏组织中出现大量的 GFP 阳性细胞,并且一直持续至 21 d,在第 21 天对照组脾脏 GFP 阳性细胞明显高于实验组,经 *t* 检验差异有显著性。实验组和对照组骨髓均在移植后第 1 天即出现 GFP 阳性细胞,但实验组多于对照组,经 *t* 检验,在第 7 天、第 14 天、第 21 天两组差异有显著性意义。肝脏在输注 MSCs 后第 1 天即在实验组和对照组出现 GFP 阳性细胞,之后各时间点均见 GFP 阳性细胞,且实验组和对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。肾脏仅在第 4 天时间点出现 GFP 阳性细胞,且两组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 移植后不同天数几种组织中实验组与对照组 GFP-MSC 的细胞数比较

Table 1 The amount of GFP-MSC in tissues at several time points after transplantation (n=5)

	1 st day		4 th day		7 th day		14 th day		21 st day	
	Irradiated	Control	Irradiated	Control	Irradiated	Control	Irradiated	Control	Irradiated	Control
Hippocampus	0	0	15.92±0.23 ¹⁾	0	20.38±1.50 ¹⁾	0	18.90±1.07 ¹⁾	0	19.25±0.81 ¹⁾	0
Liver	8.21±0.23	7.33±0.90	13.50±1.39	9.88±1.39	22.86±3.01	19.00±3.04	19.31±2.97	15.10±2.07	9.74±1.23	5.61±0.34
Spleen	24.69±7.65	25.86±3.71	32.36±3.05	35.86±3.08	34.91±5.53	37.76±8.70	19.95±3.23	22.08±3.91	17.92±4.00 ²⁾	21.77±3.01
Kidney	0	0	3.91±0.90	5.49±1.09	0	0	0	0	0	0
BW	16.01±3.23	13.31±1.09	21.32±5.17	19.59±4.13	31.99±3.78 ³⁾	19.42±2.73	19.97±3.03 ³⁾	10.12±1.53	20.85±3.54 ³⁾	8.93±1.03

1)compared with control group by rank sum test, $P < 0.005$; 2)compared with control group by *t*-test, $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$

3 讨论

神经元的特性决定了神经元在损伤坏死后难以再生。随着细胞移植研究的不断深入和应用,细胞替代治疗已成为治疗损伤、遗传缺陷性或退行性疾病的新途径,使神经组织的再生成为可能。以往在神经领域的细胞移植研究多数用相应神经部位的直接注射,这种方法在动物实验有较好的可行性,但在临床应用时有很大的局限性和危险性。有实验表明^[7],骨髓单个核细胞能够

穿过血脑屏障。根据这一特性,应用 MSCs 外周移植治疗中枢神经系统损伤存在着可能。本文在原有对放射性脑损害研究的基础上,观察中枢神经放射损伤对 MSCs 外周移植后迁徙定植特性的影响。

3.1 外源性 MSCs 的迁徙

本研究显示在输注 GFP-MSCs 后 24 h 内,实验组和对照组骨髓中均检测到 GFP 阳性细胞,推测性 MSCs 可以直接向骨髓迁徙。比较放射照射组和对照组脑内 GFP 阳性细胞可反映出外源性 MSCs 在中枢神经放射损伤下的迁徙特性。结果显

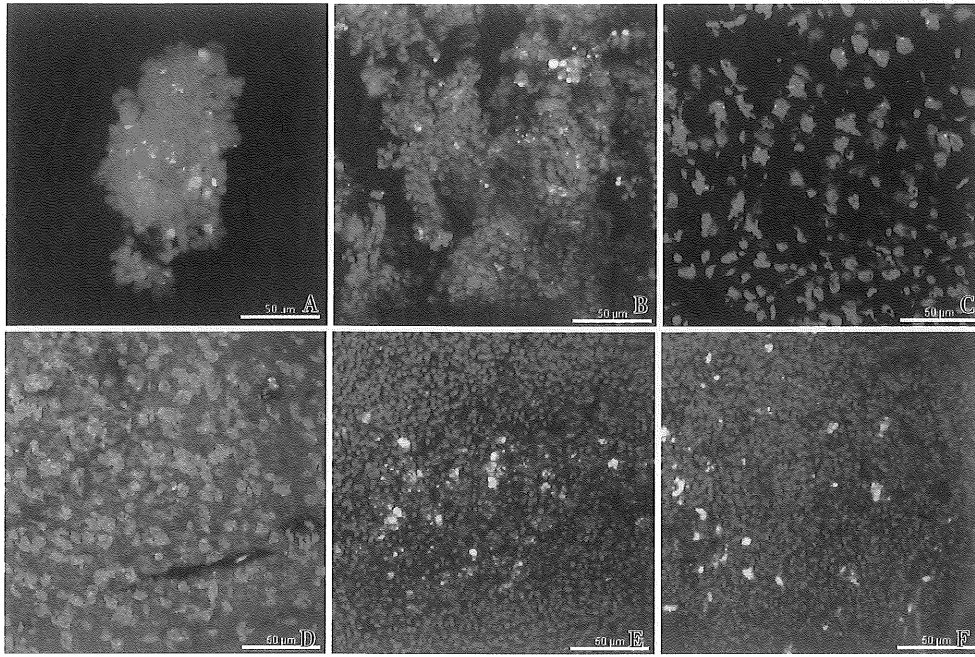


图1 移植后第4天各组出现 GFP 细胞的情况

Fig.1 GFP cells of every group at day 4 after transplantation(200×)

A: bone marrow of control group (GFP positive); B: bone marrow of experimental group (GFP positive); C: hippocampus of control group (GFP negative); D: hippocampus of experimental group (GFP positive); E: spleen of control group (GFP positive); F: spleen of experimental group (GFP positive)

示:放射照射组在外周输注 GFP-MSCs 后第4天在海马区检测到 GFP-MSCs,第7天最为明显;而未受到放射照射的对照组,移植后脑内一直未检测到外源的 GFP 阳性细胞。可见,一方面外源性 MSCs 有穿过血脑屏障的能力,这与以往文献报道相符^[7],但在对照组未见有外源性 MSCs 穿过血脑屏障到达脑组织,这说明只有在损伤等因素改变了血脑屏障特性使之一定程度开放的前提下,外源性 MSCs 才能穿过血脑屏障;另一方面,观察到外源性 MSCs 穿过血脑屏障后有向病损部位定向迁徙的特性。Eglitis 和 Mezey^[10]把成年雄性小鼠的骨髓或反转录病毒载体标记的骨髓移植给亚致死量放射线照射的雌性小鼠,3 d 后便在受体雌鼠的脑内发现供体骨髓来源的神经细胞,以后供体骨髓来源的神经细胞逐渐增多。原位杂交和免疫组化法检测发现,供体骨髓来源的神经细胞表达小胶质细胞和星形胶质细胞的特异性标志。Son BR 等^[11]研究显示基质源因子-1(SD-1)有促进 MSCs 向受损组织迁徙的作用。

3.2 外源性 MSCs 的定植

外源性 MSCs 在受体内的定植很大程度上决定于其在骨髓的定植情况。本研究显示:与对照组

比较,实验组骨髓中外源 GFP 阳性细胞明显增多。可见放射损伤有诱导外源性 MSCs 在骨髓的定植作用,其机理尚未明了,可能在放射损伤时存在趋化因子受体(CXCR4)的高表达,而后者有促进 MSCs 向骨髓中迁徙融合的作用^[11,12]。此外,实验组和对照组从移植后第1天,脾脏均见大量 GFP-MSCs,两组无差异。这种现象一直持续至第21天,两组脾脏仍可见大量 GFP-MSCs。可见,外源性 MSCs 移植后大量细胞将在脾脏被清除,而且这一状态一直持续,这关乎着外源细胞的永久定植的可能性。比较一致的研究结果是 MSCs 移植后具有免疫耐受性不会引起宿主的免疫排斥反应。有报道表明^[13,14],MSCs 和 ES 细胞均表达组织相容性复合物 I 而缺乏组织相容性复合物 II,免疫原性较弱。但异体 MSCs 在受体内的远期归宿仍然没有定论。本研究显示实验组和对照组在各时间点都有大量 GFP-MSCs 在脾脏持续存在,这是否是 MSCs 在受体中的归宿有待进一步研究。而在第21天实验组脾脏中 GFP-MSCs 较对照组显著减少,这是否提示经放射处理的大鼠在输注 MSCs 后,其后期 MSCs 的廓清减少而有利于

(下转第 525 页 to page 525)