第29卷 第2期
2008年 3月
中山大学学报(医学科学版)
JOURNAL OF SUN YAT-SEN UNIVERSITY(MEDICAL SCIENCES)
Vol.29 No.2
Mar. 2008

·基础研究·

MCP-1/CCR2通路参与骨髓基质细胞向脊髓全横断损伤区迁移的实验研究

丁 鹏[1,2], 路 钢[1,2], 杨智勇[1], 王进昆[1], 余化霖[1], 薛黎萍[3], 李园园[1,2], 冯忠堂[2], 林荣安[4]
(1. 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南 昆明 650032; 2. 昆明医学院生物医学工程研究中心脑研究室, 云南 昆明 650031; 3. 云南省第二人民医院, 云南 昆明 650021; 4. 新加坡国立大学解剖系, 新加坡 117597)

摘 要:【目的】探讨单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及其受体CCR2在骨髓基质细胞(MSC)体内、外迁移中的作用。【方法】体外培养、纯化大鼠MSC,取第五代MSC行免疫荧光鉴定;免疫组化、RT-PCR检测纯化MSC表达CCR2情况;Boyden小室法检测趋化因子MCP-1(5~500 ng/mL)对MSC的趋化迁移作用及其特异性。42只成年大鼠用于体内研究(脊髓全横断组24只,假手术组9只,正常大鼠9只),分别于术后1,3,7,14 d取材,行免疫组化检测MCP-1表达,或行MCP-1的Real-time PCR定量分析,或颈内静脉注射荧光标记的MSC,观察MSC向脊髓迁移情况。【结果】第5代MSC都表达间充质干细胞标记物Vimentin、Laminin及Fibronectin;细胞免疫荧光、RT-PCR证实MSC表达趋化因子受体CCR2;MCP-1(5~500 ng/mL)体外可趋化MSC迁移($P<0.05$),抗MCP-1抗体可对抗其趋化迁移作用($P<0.05$)。脊髓全横断组、对照组脊髓均表达MCP-1,但细胞分布、染色存在差异,影响MCP-1定量。脊髓损伤后趋化因子MCP-1 RNA在1d、3d及7d较对正常对照组差异有统计学意义($P<0.05$),术后14 d时MCP-1 RNA与正常对照相比差异无统计学意义($P>0.05$),伴随其变化,脊髓损伤区迁移MSC较对照差异有统计学意义($P<0.05$)。【结论】MCP-1体内、外可趋化MSC迁移,MCP-1/CCR2通路参与MSC向脊髓全横断损伤区的迁移。

关键词:骨髓基质细胞;趋化因子;迁移;脊髓损伤
中图分类号:R329.28 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-3554(2008)02-0121-05

MCP-1/CCR2 Pathway Mediates Migration of Marrow Stromal Cells into Lesion Site of Completely Transected Spinal Cord

DING Peng[1,2], LU Gang[1,2], YANG Zhi-yong[1], WANG Jin-kun[1], YU Hua-lin[1], XUE Li-ping[3], LI Yuan-yuan[1,2], FENG Zhong-tang[2], LING Eng-ang[4]
(1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 2. Brain Research Laboratory, Biomedical Engineering Research Centre, Kunming Medical College, Kunming 650031, China; 3. Department of Ophthalmology, Second People's Hospital of Yunnan Provincial, Kunming 650021, China; 4. Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medical, National University of Singapore, Singapore 117597)

Abstract:【Objective】To explore the roles of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptor CCR2 in trafficking of marrow stromal cells (MSC) migration.【Methods】Isolated and cultured MSC for 5 passages, then using Vimentin, Laminin, and Fibronectin to identify MSC. Using immunofluorescence and RT-PCR to detect whether MSC, in vitro, express CCR2. Using chemotaxis assay (Boyden method) to detect whether MCP-1 (5 -500 ng/mL) effect MSC migration in vitro. A total of 42 adult rats were used in vivo study (24 rats for completely transected spinal cord models, 9 rats for sham operation and 9 rats for normal control). At 1, 3, 7, and 14 days after operation, expression of MCP-1 was detected by immunofluorescence, or real-time PCR was executed, and some rats were intravenously injected CFDA-SE labeled MSC to detect the migration of MSC in vivo.【Results】 After 5

收稿日期:2007-09-26
基金项目:新加坡国防部DSO基金资助(DSO 20030208)
作者简介:丁 鹏(1976-),男,山东淄博人,博士,讲师,E-mail: pengdwfmc@163.com;冯忠堂,通讯作者,教授,博士生导师

passages, all MSC express Vimentin, Laminin, and Fibronectin. Immunofluorescence and RT-PCR show MSC expression, the respective receptors for MCP-1 and CCR2. MCP-1 in vitro induce the migration of MSC ($P < 0.05$), and which can be blocked by anti-MCP-1. MCP-1 was expressed in the spinal cord of experimental groups and control groups. The distribution and staining of MCP-1 were differential in both groups, which affected the results of quantitation of MCP-1. Real-time PCR results revealed that there was significant increase of MCP-1 at 1, 3, and 7 days after operation compared to that of the normal control ($P < 0.05$). Subsequently, at 14 days postoperation, the expression of MCP-1 decreased to normal ($P > 0.05$). Intravenously injected MSC migrate to the lesion site of completely transected spinal cord where MCP-1 was assayed to be increased after spinal cord injury ($P < 0.05$). 【Conclusion】 MCP-1/CCR2 pathway mediates the migration of MSC into the lesion site of completely transected spinal cord.

Key words: marrow stromal cells; chemokine; migration; spinal cord injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):121-125,180]

骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSC)是骨髓内造血干细胞以外的非造血干细胞，有多向分化潜能,在体内特定微环境或体外特定培养条件下,可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞、心肌细胞、神经元及胶质细胞等[1-3]。目前，MSC已被应用治疗脑缺血、脑损伤、脊髓损伤等中枢神经系统疾病,并取得良好的疗效[4-7]。MSC移植治疗中枢神经系统疾病主要有两种方式：一为通过静脉或动脉直接注射MSC[4,5],二为MSC损伤区局部注射[6,7]。Chen等报道[4,5]静脉或动脉直接注射MSC治疗脑缺血或脑损伤，可引起实验动物功能改善,但目前关于MSC向损伤区迁移的具体机制还不清楚。Wang等[8,9]报道单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)，白细胞介素-8 (interleukin-8,IL-8)及缺血脑组织提取液体外可诱导MSC迁移。但目前关于脊髓损伤后MCP-1的改变情况及静脉注射MSC向脊髓损伤区迁移情况未见报道。本研究拟观察体外培养MSC表达趋化因子受体CCR2情况，通过体外实验观察趋化因子MCP-1对MSC的趋化迁移作用，同时观察脊髓损伤后趋化因子MCP-1的变化及静脉直接注射MSC向脊髓全横断损伤区迁移的情况,以探讨MCP-1/CCR2通路在MSC体内、外迁移中的作用,为研究MSC在中枢神经系统疾病中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

纯种Wistar大鼠（新加坡国立大学实验动物中心提供，体外实验2只，体内实验42只），RNeasy Mini Kit,One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany),Light Cycler™-Faststart DNA Master SYBR Green I (Roche, Germany),CFDA SE Labeling Kit (Molecular Probes)。

1.2 大鼠MSC培养及免疫荧光鉴定

按我们文献报道方法体外培养MSC[6],细胞传至第五代分别以羊抗Vimentin多克隆抗体 (1∶200,Sigma)、兔抗Fibronectin多克隆抗体(1∶200, Chemicon) 及兔抗Laminin多克隆抗体 (1∶200, Sigma)行细胞免疫荧光鉴定。二抗为Cy3结合的兔抗羊(1∶200)及羊抗兔(1:200)荧光抗体,Olympus FluoView™ 500激光共聚焦显微镜观察、拍照。

1.3 体外培养MSC表达趋化因子受体CCR2情况的检测

1.3.1 细胞免疫荧光检测 以兔抗CCR2多克隆抗体 (1∶100,Torry pines biolabs) 检测体外培养MSC趋化因子受体CCR2的表达情况,二抗为Cy3结合的羊抗兔(1∶200)抗体,Olympus BX51荧光显微镜观察、拍照。

1.3.2 RT-PCR检测 按RNeasy Mini Kit (QIAGEN)说明提取MSC RNA,分光光度仪上定量及检测RNA纯度。参照One Step RT-PCR Kit (QIAGEN) 说明行RT-PCR,CCR2上游引物为：CGCAGAGTTGACAAGTTGTG，下游引物为：GCCATGGATGAACTGAGGTA，序列长度233 bp。PCR反应条件如下:94 ℃变性1 min,60 ℃退火45 s,72 ℃延伸1 min,36个循环。RT-PCR产物以20 g/L琼脂糖凝胶电泳，电泳结果在GENE GENUS数码成像及分析系统中观察、拍照。

1.4 趋化因子MCP-1对MSC的体外趋化迁移作用及其特异性检测

MSC体外趋化实验在 48-孔 Boyden 小室上进行。25 μL MCP-1 以 5 ng/mL、50 μng/mL 及 500 ng/mL 浓度(DMEM 条件培养基配置)加到趋化板的下层，对照组单纯添加 DMEM 条件培养基，以 8 μm 孔径的聚碳酸酯膜覆盖。消化 MSC，细胞计数后，含 5 g/L 牛血清白蛋白的 DMEM 条件培养基混匀细胞至 1.5×10^6 个/mL，50 μL 细胞悬液加到 Boyden 小室上层，37℃ CO_2 培养箱培养 10 h。10 h 后，取出聚碳酸酯膜，刮去上层未迁移的 MSC 及碎片，去离子水冲洗 3 次，40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，苏木精染色 10 min，封片。光镜下观察、计数、拍照。为验证趋化因子作用的特异性，480 μg/mL 抗 MCP-1 多克隆抗体及 5 ng/mL MCP-1 加到趋化板的下层，其他实验步骤同前。相同实验重复 3 次，计数 6 个高倍镜视野下(×400)细胞数，结果行统计学处理。

1.5　脊髓全横断损伤组及对照组趋化因子 MCP-1 的免疫组化检测

按我们文献报道方法制备脊髓全横断损伤模型 18 只[6]，70 mL/L 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉，无菌条件下依次切开皮肤、皮下筋膜及肌肉，咬骨钳咬除 T_8-T_{10} 棘突及椎板，脊髓拉钩剥离脊髓，无菌剪刀剪断脊髓 T_{10} 节段，明胶海绵止血，依次缝合切口。假手术组只打开椎板。脊髓全横断术后腹部挤压 3 次/d，以利大鼠排尿，直至大鼠自发性排尿反射建立；青霉素皮下注射(20 000 IU/L, Sigma)预防尿路感染 2 次/d，1 周后视有无尿路感染酌情应用；假手术组动物接受同样处理。手术后 1、7 及 14 d 各 3 只，另取 Wistar 大鼠 3 只作为正常对照，灌注、固定、取材(T_{9-11})、切片，片厚 20 μm，间隔 15 张取一张切片，每组 3 张。按 Vector ABC 试剂盒说明操作，以含 0.3%硫酸镍铵的 DAB 显色，甲基绿复染，脱水、透明后树胶封片，光镜下观察、拍照。

1.6　脊髓全横断损伤组及对照组趋化因子 MCP-1 的 RT-PCR 定量检测

1.6.1　脊髓 RNA 的提取　制备 12 只 Wistar 大鼠脊髓全横断模型，手术后 1、3、7 及 14 d，断头处死大鼠(每时间点各 3 只大鼠，另取 Wistar 大鼠 3 只作为正常对照)，按 Trizol 试剂盒说明提取脊髓(T_{9-11})RNA，分光光度仪上定量及检测 RNA 纯度。

1.6.2　反转录反应　将上述抽提 RNA 按 M-MLVRT试剂盒说明行反转录反应，产物置-20 ℃保存，以备 RT-PCR 定量。

1.6.3　RT-PCR 定量　Real-time PCR 反应体系如下：5 μL 反转录产物，5 μmol/L 目的基因引物各 1 μL，5 × 反应混合物 4 μL，加水定容至 20 μL。95 ℃预热 10 min 后，95℃变性 15 s，58 ℃退火 10 s，72℃延伸 20 s，反应 45 循环。MCP-1 上游引物为：TCTCTTCCTCCACCACTATGCA，下游引物为：GGCTGAGACAGCACGTGGAT；GAPDH 上游引物为：ACCACCATGGAGAAGGCTGG，下游引物为：CTCAGTGTAGCCCAGGATGC。RNA 定量以 Ct 值表示，即 PCR 产物到达指数增长期的循环数，同时以样本中内对照 GAPDH 的量来标化，实验结果以相对于正常脊髓 RNA 量的 2 倍为有统计学差异。

1.7　MSC 在脊髓全横断损伤组迁移情况的观察

1.7.1　脊髓全横断模型的制备　制备脊髓全横断损伤模型 3 只；另取 3 只 Wistar 大鼠作为正常对照。

1.7.2　MSC 的体外荧光标记　为观察 MSC 在体内的存活、迁移及分化，我们应用 5-(6-)羟基荧光素双乙酸琥珀酰亚胺酯[5-(and-6)-carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester，CFDA-SE]标记移植的 MSC，具体实验步骤参照 CFDA SE Labeling Kit 说明。

1.7.3　颈内静脉注射荧光标记 MSC　脊髓全横断术后 1 h，无菌条件下分离颈内静脉，将 CFDA-SE 荧光标记细胞悬液 1.0 mL(1×10^6 个/mL)经颈内静脉注入体内，正常对照接受相同处理。

1.7.4　MSC 体内迁移情况的观察　MSC 颈内静脉注射后 2 周，将实验动物灌注、固定、取材(T_{9-11})、切片，片厚 20 μm，间隔 15 张取一张切片，每组 3 张。荧光显微镜下观察、计数、拍照，结果行统计学处理。

1.8　统计学方法

所得数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组均数比较，应用 SPSS11.5 for Windows 统计软件包行 t 检验，$P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2　结　果

2.1　MSC 的体外培养及其细胞免疫荧光鉴定

第 5 代体外培养 MSC 都呈 Vimentin、Fibronectin、Laminin 阳性(图 1)；空白对照未见免

疫荧光着色。MSC 纯度高,可用于体外趋化迁移实验。

2.2 CCR2 表达情况的免疫荧光组化及 RT-PCR 鉴定

纯化 MSC 呈 CCR2 阳性(图 2),空白对照未见免疫荧光着色;RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳结果示:233 bp 特异性扩增条带,与预期趋化因子受体 CCR2 扩增片段一致(图 2)。

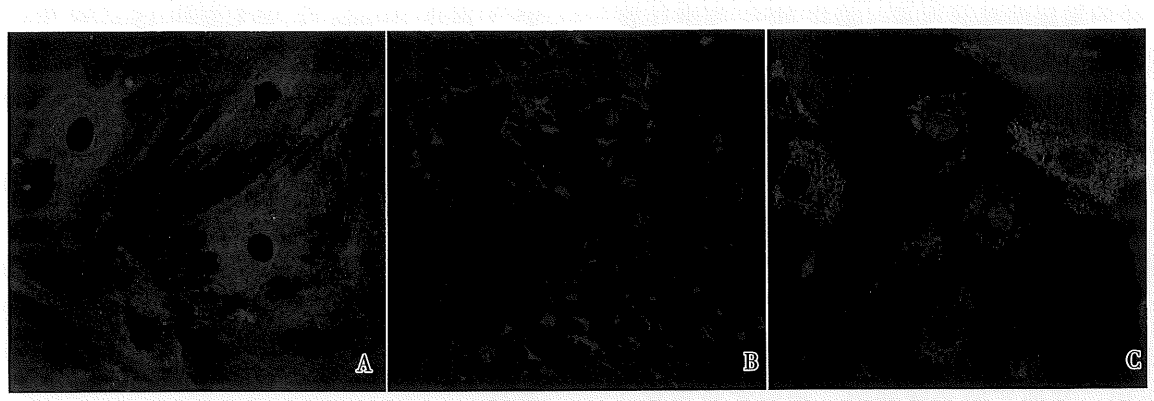


图 1 细胞免疫荧光鉴定骨髓基质细胞:Vimentin、Fibronectin 及 Laminin

Fig.1 Results of immunofluorescence: Vimentin, Fibronectin, and Laminin

A: positive of Vimentin; B: positive of Fibronectin; C: positive of Laminin; × 200

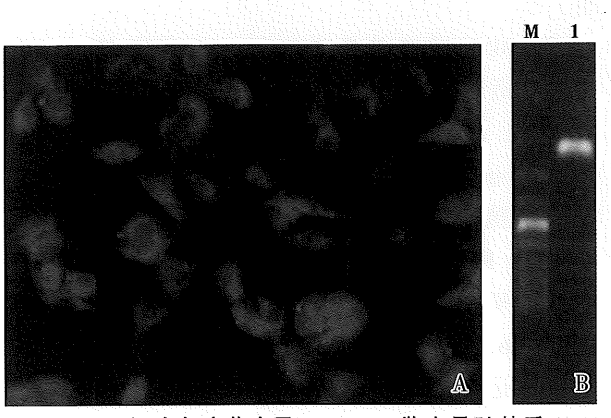


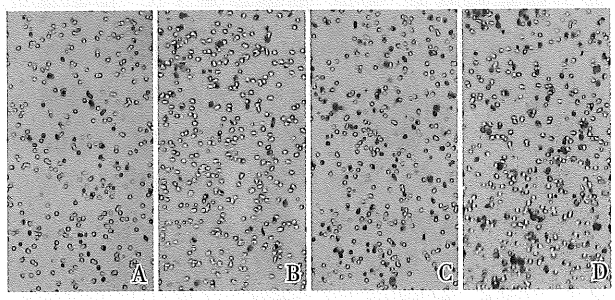
图 2 细胞免疫荧光及 RT-PCR 鉴定骨髓基质细胞表达趋化因子受体 CCR2

Fig.2 Results of immunofluorescence and RT-PCR.

A: positive of CCR2,× 200; B: results of RT-PCR; M: Marker;1: CCR2(233 bp)

2.3 趋化因子 MCP-1 对 MSC 体外趋化迁移实验

鉴于 MSC 体外可表达趋化因子受体 CCR2,我们用 Boyden 小室检测趋化因子 MCP-1 对 MSC 的趋化迁移作用。结果示:对照组 MSC 细胞迁移数目 (21.5 ± 2.4) 低于 MCP-1 5 ng/mL (26.2 ± 2.8,t=3.092, P=0.011)、50 ng/mL (35.5 ± 4.1,t=7.214,P=0.000)、500 ng/mL (55.3 ± 4.8,t=15.293, P=0.000)组(图 3)。为验证 MCP-1 对 MSC 趋化迁移的特异性,480 μg/mL 抗 MCP-1 多克隆抗体及 5 ng/mL MCP-1 加到趋化板的下层,观察趋化因子抗体对趋化迁移的对抗作用。实验结果显示:抗 MCP-1 多克隆抗体可对抗 MCP-1 对 MSC 的迁移作用,单纯 DMEM 组 (21.0 ± 2.4) 与加抗体组 (21.2 ± 2.6,t=0.113, P=0.912)无统计学差异。



对 MSC 的体外趋化迁移结果

Fig.3 Results of in vitro chemotaxis

A: control; B: 5 ng/mL MCP-1; C: 50 ng/mL MCP-1; D: 500 ng/mL MCP-1; × 200

2.4 趋化因子 MCP-1 的免疫组化和 Real-time PCR 检测

正常对照组及假手术组趋化因子 MCP-1 免疫组化结果示:脊髓(T_{9-11})中部分细胞呈 MCP-1 阳性,阳性反应物主要分布在细胞胞浆,阳性细胞排列规律,两者染色未见差异;脊髓损伤后,损伤区阳性细胞形态不一,排列无规律,免疫染色较对照组及假手术组深。鉴于脊髓损伤后免疫阳性细胞形态、分布无规律性及着色与对照组和假手术组

的差异，影响对 MCP-1 的定量，我们以 Real-time PCR 方法定量 MCP-1 变化，结果示：脊髓损伤后趋化因子 MCP-1RNA 在 1 d、3 d 及 1 周较对正常对照组有明显统计学差异（$P < 0.05$），第 3 天达高峰，2 周时 MCP-1 量恢复到正常水平(图 4)。

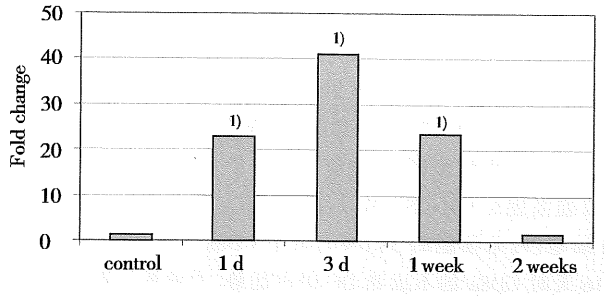


图 4　对照组及脊髓全横断损伤不同时间点趋化因子 MCP-1 的 Real-time PCR 统计结果

Fig.4　The statistical results of real-time PCR for MCP-1 in control group and completely transected spinal cord group

1) Compared with control group, $P < 0.05$

2.5　MSC 体内迁移情况的观察

经颈内静脉注射 MSC 2 周后，对照组脊髓切片未见或偶见 CFDA-SE 荧光标记细胞（图 5），实验组大鼠脊髓切片可见散在荧光标记 MSC（图 5）。正常对照组细胞迁移数(2.4 ± 1.4)低于脊髓全横断组(22.3 ± 3.4，t=16.223, P=0.000)。

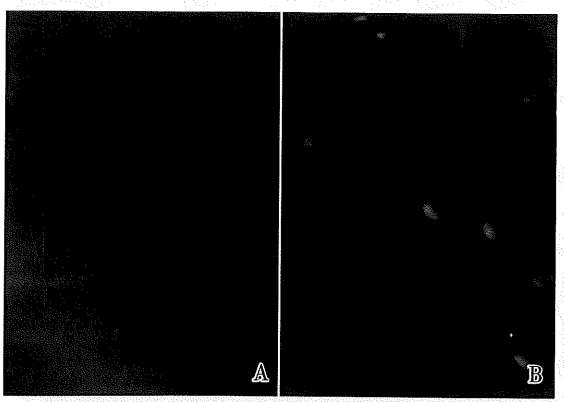


图 5　注射骨髓基质细胞体内迁移情况

Fig.5　In vivo migration of injected MSC

A：normal; B:experimental; ×200

3　讨　论

3.1　MCP-1 体外趋化 MSC 迁移

趋化因子(Chemokine)是指具有趋化作用的细胞因子，根据靠近分子氨基端(N 端)的前两个 C 间是否插入其它氨基酸，将它们分为 4 个亚类：α、β、γ 及 δ 类趋化因子。MCP-1 属于 β 类趋化因子，它通过与其表面受体 CCR2 特异性结合，发挥作用。在正常神经系统 MCP-1 量维持在较低水平，不发挥迁移趋化作用，主要由星形胶质细胞，小胶质细胞和神经元表达[10]。当中枢神经系统或外周神经系统受损伤或缺血时，可引起 MCP-1 水平的上调，趋化血液系统中的单核/巨噬细胞向损伤区迁移并发挥相应生物学效应[10]。MCP-1 在中枢神经系统疾病中起着双重作用：一方面，在病理状态下组织分泌的 MCP-1 可以诱导单核/巨噬细胞到受损部分，参与组织修复，是机体防御的重要组成部分；另一方面，组织局部产生的大量 MCP-1 又可引起过度的炎症反应，从而进一步加重组织损伤。

近来，研究表明：MSC 具有体内迁移特性，但目前关于其迁移的具体机制还不清楚[4,5]。为探讨 MSC 的迁移机制，本研究首先通过细胞免疫荧光及 RT-PCR 的方法证实 MSC 表达趋化因子受体 CCR2，然后通过 Boyden 小室法证实趋化因子 MCP-1(5 ~ 500 ng/mL)体外可趋化 MSC 迁移，其趋化作用与浓度成正相关；同时，我们还观察到抗 MCP-1 多克隆抗体可对抗 MCP-1 的趋化迁移作用，这从侧面证实了趋化因子 MCP-1 对 MSC 体外趋化迁移的特异性。

3.2　MCP-1/CCR2 通路参与 MSC 向脊髓全横断损伤区迁移

为探讨 MCP-1/CCR2 通路是否参与 MSC 向脊髓全横断损伤区迁移，在以上体外实验基础上，我们建立脊髓全横断损伤模型，利用 Real-time PCR 方法证实：脊髓损伤后趋化因子 MCP-1 RNA 在 1 d、3 d 及 1 周较对照组有明显统计学差异，第 3 天达高峰，2 周时 MCP-1 恢复到正常水平；同时，为观察 MSC 体内迁移情况，我们经静脉注射 MSC，观察到荧光标记 MSC 可向损伤脊髓的迁移，脊髓全横断组迁移细胞数高于正常对照组，考虑可能系损伤区升高的 MCP-1 趋化移植的 MSC 向损伤区迁移，但尚不能排除其他趋化因子及受体的参与。

MSC 取材方便，可快速体外扩增，适合于自体移植，在中枢神经系统疾病中应用取得了良好的效果，因此深入研究 MSC 的特性，对提高其在中

（下转第 180 页　to page 180）