

骨髓干细胞移植后 mdx 鼠腓肠肌病理 及 Dystrophin 的表达变化

卢锡林, 冯善伟, 姚晓黎, 于美娟, 欧翠华, 柳太云, 张 成
(中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】研究骨髓干细胞移植后 mdx 鼠腓肠肌组织病理变化及 dystrophin 的动态表达变化。【方法】7~9 周 mdx 鼠 20 只平均分为 4 组, 放疗后移植 1.2×10^7 个/只同种异基因全骨髓干细胞, 于移植后 4 周、8 周、12 周及 16 周应用 HE 染色观察细胞形态及核中心移位 (CNF), 免疫组化及 Western blot 方法检测 dystrophin 表达变化, C57 鼠和未治疗 mdx 鼠各 5 只作阳性和阴性对照。【结果】C57 鼠腓肠肌横切面可见肌细胞大小形态基本一致, 无核中移现象。各细胞移植治疗组和对照组 mdx 鼠均有大量的炎细胞浸润, 核中心移位明显。未治疗 mdx 鼠 CNF 最高, 可达 70% 左右, 移植后 4 周、12 周和 16 周, CNF 比例分别为 55%、50% 和 44%。免疫荧光结果 C57 鼠肌膜呈完整的网状绿色荧光, mdx 鼠肌膜基本未见绿色荧光; 移植后 4 周肌膜 dystrophin 阳性纤维数大约占细胞总数的 1%, 随时间延长表达渐渐增多, 8 周、12 周和 16 周时阳性细胞数分别占细胞总数的 5%、10% 和 15%。Western blot 结果 mdx 鼠无 dystrophin 的表达, 野生型 C57 鼠表达量最多, 移植后 4 周 mdx 鼠仅见微弱表达, 随时间延长表达量渐增, 移植后 16 周表达量较移植 8 周明显增加。【结论】骨髓干细胞移植后 mdx 鼠腓肠肌 CNF 随移植时间延长逐渐减少, dystrophin 的表达随时间延长增多, 提示骨髓干细胞移植后长久持续参与受损骨骼肌的修复与再生。

关键词: Dystrophin; mdx 鼠; 骨髓干细胞移植

中图分类号: R746.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)06-0630-04

Change of Morphology and Dystrophin Expression in mdx mice after Bone Marrow Stem Cells Transplantation

LU Xi-lin, FENG Shan-wei, YAO Xiao-li, YU Mei-juan, OU Cui-hua, LIU Tai-yun, ZHANG Cheng
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the change of morphology and dystrophin expression in mdx mice after the bone marrow stem cells transplantation. 【Methods】Twenty mdx mice (7-9 weeks old) were divided into 4 groups and bone marrow stem cells of C57 mice (6 to 8 weeks age) were injected intravenously into the mdx mice (7 to 9 weeks age), which were preconditioned with 7 Gy γ -ray. Morphology and centrally nucleated fibers were observed by HE stain, the rate of CNF was calculated. Dystrophin expression was detected in Gastrocnemius muscle using immunofluorescence and Western blot at 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks after transplantation, respectively. 5 C57 mice and mdx mice acted as positive and negative controls individually. 【Results】The myocytes of normal C57 mice is polygon and uniform in size. Nuclei are localized borderline of myocytes. No inflammation was found in intracellular substance. The myocytes of treated and untreated mdx mice were round in shape and various in size. The obvious abnormality was nucleus centralized. The rate of CNF in mdx mice was highest, up to 70%. The rate of CNF became lower than that of untreated mdx mice after 12 weeks and 16 weeks transplantation, decreased to 50% and 44%. The skeletal muscular membrane of C57 mice was stained strongly green fluorescein. There was no green fluorescein in mdx mice. At four weeks after MSCs transplantation, less than 1% of the myofibres expressed dystrophin. At 16 weeks after transplantation, as many as 16% of the muscle fibres within an

收稿日期: 2005-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370510); 广东省博士启动基金资助项目 (5300783); 广东省科技计划项目 (ZKM05501S)

作者简介: 卢锡林 (1967-), 男, 广东封开人, 主管技师, 在职硕士生; 张 成, 教授, 通讯作者. E-mail: czym@gzsums.edu.cn

individual mouse expressed dystrophin. No dystrophin was detected in mdx mice by Western blot. At 4 weeks after transplantation, the dystrophin expression in mdx mice were detected very low, but it expressed increasingly over time, at 16 weeks expressed much more than those of 8 weeks. 【Conclusion】 The allogenic bone marrow stem cells which were injected into mdx mice have a trend to reach the injured muscle tissues and differentiate to fibers which can express dystrophin and the expression increased over time. It indicated that the bone marrow stem cells can participate in the repair and regeneration of the injured tissues permanently and constantly.

Key words: dystrophin; mdx mice ; bone marrow stem cells transplantation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2006,27(6):630-633,643]

Duchenne型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种 X 连锁隐性遗传病,由于 dystrophin 基因突变导致患者骨骼肌功能严重受损,患者多于 20 岁左右死于呼吸和/或心力衰竭,目前没有有效的治疗方法。mdx 鼠是在 C57BL/10 小鼠 dystrophin 基因的 23 号外显子上插入终止码,使此基因功能缺失而构建的 DMD 模型鼠^[1],是目前最广泛使用的 DMD 动物模型。近年来国内外的研究表明干细胞移植对 mdx 鼠疾病的进展有延缓作用。我们应用骨髓干细胞移植治疗经射线预处理的 mdx 鼠,动态观察移植后组织病理改变及 dystrophin 的表达变化,为进一步临床骨髓干细胞移植治疗 DMD 提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 动物和材料

4~6 周龄 C57BL/L 鼠 (C57 鼠,供体鼠)20 只,10 周龄 C57 鼠阳性对照鼠 5 只,由中山大学实验动物中心供应。7~8 周龄 mdx 鼠 25 只,其中骨髓移植组 20 只,移植后 4 周、8 周、12 周及 16 周各 5 只,阴性对照组 5 只,购自美国 Maine 州 Jackson 实验室。Western blot 反应装置购自美国 Bio Rad 公司;一抗兔多克隆 dystrophin 购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠单抗 GAPDH 及抗兔 HRP 标记二抗购自美国 CST 公司;PVDF 膜、发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞分离培养以及细胞移植

细胞培养基分离方法见参考文献^[2],移植细胞数为 2×10^7 只,对 mdx 鼠进行移植前放疗预处理,照射剂量 7 Gy。

1.3 移植后模型鼠肌肉组织病理检测

分别取各组实验鼠和对照鼠腓肠肌组织约 $1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小,放入预冷的异戊烷 3~5 s 后,浸入液氮中冷冻,OCT 包埋,冰冻切片切

成 $5 \mu\text{m}$ 厚切片,做 HE 染色:冷丙酮固定 5 min, Harris 苏木素浸泡 3 min,流水 5 min,5 mL/L 的盐酸酒精分化数秒,流水 5 min,10 g/L 的伊红液中浸泡 1 min,蒸馏水洗 2 次,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、树脂封片;镜下观察结果并拍照。

观察内容为切片骨骼肌细胞的形态、排列、一致性、变性坏死情况、核中心移位纤维(centrally nucleated fiber, CNF) 比例、肌内束的排列完整情况等。核中心移位纤维比例=核中心移位纤维数/总肌纤维数。

1.4 Dystrophin 免疫荧光检测

取冰冻腓肠肌切片进行免疫荧光检测,大致步骤如下:空气风 15 min, PBS 水化 5 min \times 3 次,30 g/L H_2O_2 封闭 10 min,即用型山羊血清封闭 30 min,1:200 抗 dystrophin 抗体 4 孵育过夜,1:200 山羊抗兔 FITC-IgG 孵育 1 h。激光共聚焦显微镜照像,并用全自动图像分析系统进行图像分析,得出 dystrophin 阳性纤维数。

1.5 Western blot 检测

取 C57 鼠、对照组 mdx 鼠及移植后各个时间点 mdx 鼠腓肠肌,组织裂解液 (0.125 mol/L Tris/HCl buffer, pH 6.4; 100 mL/L 甘油; 40 g/L SDS; 100 mL/L β -巯基乙醇; 0.01 g/L 溴酚蓝; 1 g/L 蛋白抑制剂,终 pH 值为 6.8) 裂解组织提取蛋白,将裂解后的组织匀浆,入超声破碎仪破碎细胞 30 s,4 离心,12 000 $\times g$ 15 min,取上清沸水煮 5 min 备用。调整蛋白浓度约为 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,按每泳道 10 μL 蛋白进行 40~70 g/L 的梯度 SDS-PAGE 凝胶电泳,500 mA 恒流转膜 7~9 h 至 PVDF 膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h;一抗为兔多克隆 dystrophin 抗体 (以 1:600 稀释),二抗以 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:1000 稀释),最后以化学发光剂显色。另外制备 120 g/L 的分离胶做 GAPDH 的 Western blot 作为内参对照,二者均以预染 Marker 做对照。结果用紫外线透射凝胶图像扫描仪进行图像分析。

2 结 果

2.1 肌肉组织 HE 染色

正常 C57 鼠的组织横切面可见肌细胞大小形态基本一致,细胞呈多角形,细胞轮廓清晰、完整,肌细胞核位于细胞周边,未见有胞核中移现象,间质无炎细胞浸润;肌纤维间隙正常,肌内束、肌间束结构完整。而在各细胞移植治疗组和对照组

mdx 鼠肌肉中,均有大量的炎细胞浸润,肌细胞横截面积大小不一、有萎缩和肥大细胞,肌细胞失去正常的多角形形态,变成圆形,脂肪和纤维组织浸润不明显,而肌细胞核中心移位明显。计数含有中心移位细胞核的肌纤维和正常肌纤维,计算出核中心移位肌纤维比例(CNF)。未治疗 mdx 鼠 CNF 最高,可达 70%左右, MSC 移植后 4 周、12 周和 16 周, CNF 比例有减少趋势,分别为 55%、50%和 44%(图 1)。

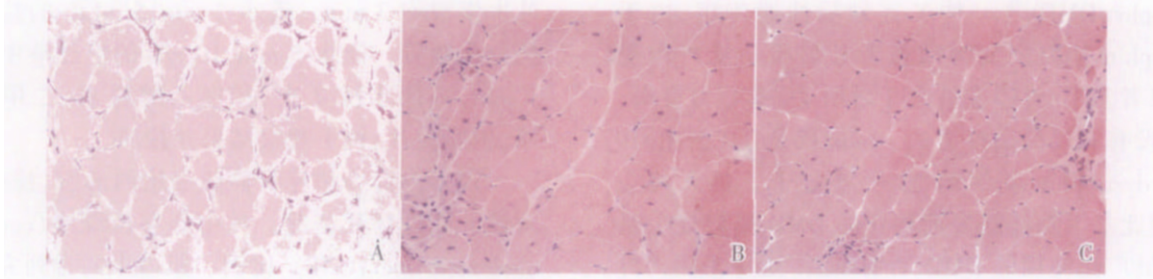


图 1 骨髓干细胞移植后肌肉组织冰冻切片的 HE 染色

Fig.1 Skeletal muscle HE staining after stem cells transplantation

A: C57 mice; B: control mdx mice; C: 16 weeks mdx mice after transplantation($\times 400$)

2.2 Dystrophin 免疫荧光染色

抗 dystrophin 抗体染色,对照组 C57BL/6 肌膜呈明显完整的网状绿色荧光,mdx 鼠肌膜基本未见绿色荧光。经全骨髓细胞移植治疗 mdx 鼠 4 周后肌膜开始出现少量 dystrophin 表达,大约占细胞总数的 1%, 随时间延长表达渐渐增多,8 周和 12 周时阳性细胞数分别占细胞总数的 3%和 10%, 多呈簇状分布;16 周时进一步增多, 约为 12%。mdx 鼠骨骼肌细胞为萎缩与肥大镶嵌存在,治疗组细胞呈大小不一(图 2)。

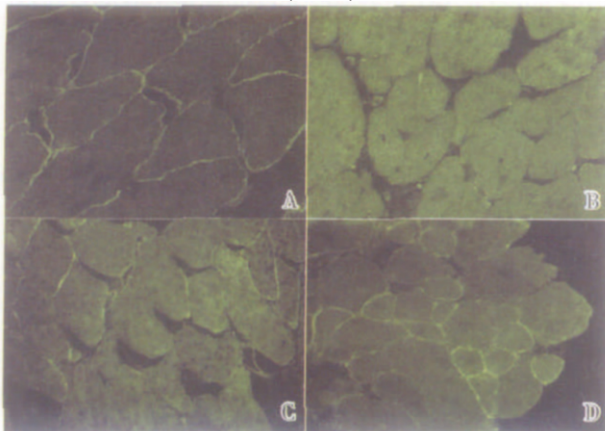


图 2 骨髓干细胞移植后 dystrophin 的表达

Fig.2 Dystrophin expression after stem cells transplantation

A:C57 mice; B:control mice; C:4 weeks mdx mice after transplantation; D: 16 weeks mdx mice after transplantation($\times 40$)

2.3 Dystrophin 的 Western blot

通过 Western 印迹分析 dystrophin 的表达水平,以 GAPDH 为内参,结果发现在蛋白浓度相同的情况下,正常对照 C57 鼠及阴性对照 mdx 鼠的蛋白表达分别为强阳性及阴性,移植后 4 周可见很微弱的表达,以后表达渐渐增强,至 16 周时最强(图 3)。

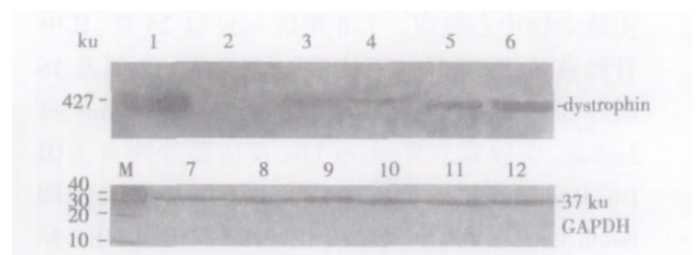


图 3 骨髓干细胞移植后 dystrophin 的 Western blot

Fig. 3 Dystrophin expression after marrow stem cells transplantation

M: marker; 1,7: C57 mice; 2,8: control mdx mice; 3,9: 4 weeks mdx mice after transplantation; 4,10: 8 weeks mdx mice after transplantation; 5,11: 12 weeks mdx mice after transplantation; 6, 12: 16 weeks mdx mice after transplantation

3 讨 论

3.1 骨髓干细胞可分化为骨骼肌细胞

骨髓干细胞主要包括造血干细胞和间充质干细胞,近几年的研究认为骨髓中的这两种干细胞都有向肌细胞分化的潜能。1998年Ferrari等^[3]将C57/M LacZ转基因鼠的全骨髓及将骨髓分离成粘附和非粘附成分分别注入放疗后的scid/bg鼠胫前肌及经尾静脉注射到scid/bg鼠体内,两周后均在胫前肌检测到 β -Gal⁺细胞核,Hoechst反染示该阳性细胞核或居于新生肌纤维中央或者居于成熟肌纤维周边,提示骨髓来源的成肌祖细胞可能经历一个漫长的分化过程,最终生长成熟并融合进入变性的肌纤维。以后众多学者^[4-6]也发现了类似现象。我们的实验也证明骨髓干细胞可分化为骨骼肌细胞,并表达肌特异性的抗肌萎缩蛋白,这为DMD的干细胞治疗提供了依据。

3.2 MSCs 移植入 mdx 鼠体内后肌肉病理变化

DMD是由于dystrophin基因缺陷导致肌细胞中不表达dystrophin蛋白,由此引起肌肉病理改变,mdx鼠的病理状况以肌肉的变性、坏死,炎症浸润为主,缺少纤维脂肪增生,主要的病理表现是肌细胞核中心移位(centrally nucleated fibers,CNF)。CNF的出现提示肌细胞经历了坏死与增生,故CNF是评价在再生之前细胞变性坏死程度的重要指标之一。

在本研究的肌肉病理检测中可以看到,不同年龄的C57BL/6鼠其肌细胞形态变化不明显,肌细胞大小形态基本一致,细胞呈多角形,细胞轮廓清晰、完整,肌细胞核位于细胞周边;肌纤维间隙正常,肌内束肌间束结构完整,核中心移位的纤维比例几乎为0;而mdx鼠的肌细胞核中心移位明显,应用骨髓干细胞移植可使受者肌肉中出现有dystrophin蛋白表达的肌细胞,并部分改变肌肉病理状况,移植后12周mdx鼠较对照未移植组的CNF比例下降。这说明dystrophin的表达对mdx鼠的骨骼肌坏死有保护作用,dystrophin的表达使骨骼肌纤维的变性坏死减少。在细胞移植后16周CNF比例虽然有继续减少的趋势,可能由于在16周时dystrophin的表达不足以阻止病情的进展。这与Ebihara等^[9]的研究一致,其利用腺病毒对新生的mdx鼠和成年鼠分别进行了dystrophin和Utrophin的转染,结果新生鼠的CNF明显下降,而成年鼠的CNF比例较对照组无明显变化。这也可能是由于随着DMD病程的进展,肌肉骨骼肌的变性坏死明显增多,而再生肌纤维减少,少量

dystrophin不足以阻止病情的进展。

3.3 分化的骨骼肌细胞表达完整的 dystrophin 蛋白

骨髓干细胞分化的骨骼肌细胞是否有完整的dystrophin蛋白表达是研究DMD的学者所感兴趣的问题,因为完整的dystrophin蛋白对治疗有重要意义。本实验研究从免疫荧光及Western blot发现dystrophin的阳性表达,并且结果较为一致。4周检测到少量肌纤维表达,随时间延长明显增多,至16周时dystrophin阳性细胞数已占全部肌纤维的12%,并且可见肌核核中移现象渐减少,居边增多,提示骨髓干细胞移植入mdx鼠成功,骨髓干细胞可随血流进入病变肌组织并渐成熟,表达dystrophin。核中心移位较同龄对照组mdx减少提示骨髓干细胞持久连续的参与mdx鼠肌细胞的修复和再生,并随时间延长新生的肌纤维逐渐成熟,核边居增多,dystrophin表达增多,并有效改善了mdx的运动功能^[2,10,11]。

3.4 骨髓干细胞分化为骨骼肌细胞的机制

众多学者对骨髓干细胞定向分化为骨骼肌细胞的机制进行了探讨,由于供体细胞只有在受者肌肉损伤或接受放疗后才能检测到,故推测由于损害了内源性肌祖细胞而使供者细胞受到肌纤维变性坏死信号的趋化作用并处于非正常的分裂环境中从而向肌细胞分化,这一过程包括迁移、细胞分裂、肌祖细胞的定向分化最终成熟并融合入变性的肌纤维或者形成新的肌纤维^[3,11];另外可能由于肌肉损伤后供者骨髓干细胞向肌卫星细胞分化从而进一步促进肌肉再生^[9]。但也不排除骨髓中存在另一种具有同样参与肌肉修复的细胞群体。

本研究从不同角度、不同方法均证明骨髓干细胞可分化为骨骼肌细胞,且可使mdx鼠肌肉组织病理得到改善,CNF下降;dystrophin蛋白长期表达,并随时间延长表达量增多,这为临床治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] DECONINCK AE, RAFAEL JA, SKINNER JA, et al. Utrophin - dystrophin - deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy [J]. Cell, 1997, 90(4): 717-727.
- [2] 陈松林,张成,黄文,等.骨髓干细胞移植治疗Duchenne型肌营养不良鼠的实验研究[J].中华神经

(下转第643页 to page 643)

- P玻璃微球对 S180 瘤细胞的细胞毒作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1):65- 68.
- [4] 陈规划, 杨 扬, 陆敏强, 等. 肝移植治疗原发性肝癌 60 例[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(7):413- 416.
- [5] 李锦清, 李国辉, 张亚奇, 等. 降低原发性肝癌术后复发率的研究[J]. 中山医科大学学报, 1997, 18(3): 161- 164.
- [6] 刘允怡. 肝移植在肝癌治疗中的地位与评价[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(5):265- 267.
- [7] KARAKAYALI H, MORAY G, SOZEN H. Expanded criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Transplant Proc, 2006, 38 (2):575- 578.
- [8] OLTHOFF K M. Surgical options for hepatocellular carcinoma: resection and transplantation [J]. Liver Transpl Surg, 1998, 4(5 Suppl 1):98- 104.
- [9] 王孟龙, 朱 斌, 杨甲梅, 等. 肝癌大鼠原位肝移植模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7):S15- 16.
- [10] 李齐根, 杨广顺, 卫立辛, 等. 大鼠肝癌肝移植模型的建立[J]. 中华肝胆外科杂志, 2004, 10(3):191- 195.
- [11] MATSUZAKI T, MURASE N, YAGIHASHI A, et al. Liver transplantation for diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Transplant Proc, 1992, 24(2):748- 751.
- [12] SCHLITT HJ, NEIPP M, WEIMANN A, et al. Recurrence patterns of hepatocellular and fibrolamellar carcinoma after liver transplantation [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(1):324- 331.
- [13] TAMURA S, KATO T, BERHO M, et al. Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation [J]. Arch Surg, 2001, 136(1):25- 30.
- [14] JONES S, BECHSTEIN W, STEINMULLER T, et al. Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2001, 33(5):1080- 1086.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 633 页 from page 633)

科杂志, 2003, 36(6): 443- 446.

- [3] FERRARI G, CUSELLA - DE ANGELIS G, COLETTA M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors [J]. Science, 1998, 279 (5365): 1528- 1530.
- [4] CORTI S, STRAZZER R, DEL BO R, et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse [J]. Exp Cell Res, 2002, 277(1): 74- 85.
- [5] LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury [J]. Cell, 2002, 111(4): 589- 601.
- [6] CORBEL SY, LEE A, YI L, et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle [J]. Nat Med, 2003, 9(12): 1528- 1532.
- [7] HAGIWARA H, OHSAWA Y, ASAKURA S, et al. Bone marrow transplantation improves outcome in a mouse model of congenital muscular dystrophy [J]. FEBS Lett, 2006, 580(18): 4463- 4468.
- [8] 陈松林, 张 成, 黄 文, 等. 骨髓干细胞移植对 dystrophin/utrophin 基因双敲除鼠骨骼肌微观结构的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1): 16- 19.
- [9] EBIHARA S, GUIBINGA G H, GILBERT R, et al. Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophin (mdx) mice [J]. Physiol Genom, 2000, 3(3): 133- 144.
- [10] AHMAD A, BRINSON M, HODGES B L, et al. Mdx mice inducibly expressing dystrophin provide insights into the potential of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(17): 2507- 2515.
- [11] BENABDALLAH B F, BOUCHENTOUF M, TREMBLAY J P. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal[J]. Transplantation, 2005, 79(12):1696- 1702.

(编辑 刘清海)