

建立 Duchenne 型肌营养不良鼠的骨髓移植模型

张为西, 张 成, 刘焯霖, 王 训, 刘晓蓉

(中山医科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立 Duchenne 型肌营养不良鼠(mdx 鼠)的骨髓移植模型, 摸索有效的放疗剂量。【方法】用体外培养的不同数量的 C57BL/6 雄鼠的骨髓细胞、骨髓基质细胞、骨髓悬浮细胞, 用不同方法移植给不同剂量放疗后的 mdx 鼠, 观察受体鼠的存活率及存活时间, 并对死亡鼠作 GVHD(移植植物抗宿主病)的病理学检测。【结果】16 只 mdx 鼠移植前 3 d 12 Gy γ 射线照射, 在移植后 7 d 内全部死亡, 且注射细胞数较多者, 存活时间相对较长; 8 只经 6 Gy γ 射线照射的 mdx 鼠, 移植后 60 d, 存活 4 只, 其中 1 例经腹腔注射骨髓细胞、1 例肌肉局部注射骨髓细胞, 移植后 7 d 内死亡; 而 8 Gy γ 射线照射的 14 只 mdx 鼠, 移植后 60 d 10 例存活, 4 例死亡。【结论】本实验条件下, 移植前 8 Gy γ 射线放疗较合理, 在有效剂量放疗破坏受体骨髓造血系统后, 静脉注射移植同种鼠的骨髓细胞、基质细胞、悬浮细胞, mdx 鼠存活率较高, 且移植细胞数量以 1×10^7 个/只鼠为佳。

关键词: 小鼠; 骨髓移植; 肌营养不良; 疾病模型, 动物

中图分类号: R746.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)02-0089-04

Establishment of Marrow Transplantation Model in Mice with Duchenne Muscular Dystrophy

ZHANG Wei-xi, ZHANG Cheng, LIU Zhuo-lin, WANG Xun, LIU Xiao-rong

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To establish an marrow transplantation model in mice with Duchenne muscular dystrophy(mdx), in order to study the effective irradiation dose.【Methods】Different amounts of bone marrow cells, stromal cells, suspension cells were cultured *in vitro* from C57BL/6 male mice, and the cells were transplanted into the irradiated mdx mice with different means. The survival rate and survival time were investigated. Histopathology of GVHD (graft versus host disease) was assessed for the died mice.【Results】16 mdx mice irradiated with 12 Gy γ -ray 3 d before transplantation died within 7 d, and the mice injected with more cells lived longer; 8 mice irradiated with 6 Gy, 4 of them survived 60 d after transplantation, one of them was transplanted by intraperitoneal injection with bone marrow cells, another was injected by local muscle, both of them died within 7 d after transplantation; 14 mice irradiated with 8 Gy, 10 of them survived 60 d after transplantation, 4 died.【Conclusion】This study shows that 8 Gy γ -ray is the best effective irradiation dose. After the hematopoietic system is destroyed by effective irradiation, mdx mice are able to survive longer after injection with syngeneic bone marrow cells, stromal cells, and suspension cells, and the better survive rate can be achieved by injection of 1×10^7 transplantation cells for each mouse.

Key words: mouse; marrow transplantation; muscular dystrophy; disease model, animal

收稿日期: 2000-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870804); 广东省自然科学基金资助项目(970061); 卫生部临床学科重点攻关项目(97040229); 中山医科大学 211 工程建设项目; 广东省卫生厅科研基金资助项目(B2000021)

作者简介: 张为西(1966-), 男, 安徽繁昌人, 在职博士生, 讲师。

迄今, Duchenne 型肌营养不良症(DMD)尚无特效疗法。最近, Gussoni 等^[1]通过骨髓移植、造血干细胞及肌肉 SP(side population)分别移植到 mdx 鼠后, 都可检测到 dystrophin 的表达, 并证实为供体来源。然而, Prockop^[2]认为骨髓基质细胞具有多潜能分化功能, 可诱导分化为肌肉细胞。为进一步探讨骨髓的何种细胞具有向肌细胞方向发展的潜能, 我们用同种鼠骨髓细胞、基质细胞(含间质干细胞)、悬浮细胞(含造血干细胞)移植到受体 mdx 鼠, 以建立良好的 mdx 鼠骨髓移植模型。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 供体鼠, 24 只, 6~8 周雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 18~24 g, 由中山医科大学动物实验中心供应, 有合格证号。受体鼠, 38 只, 6~20 周雌性 mdx 鼠, 体质量 17~23 g, 购自美国 Maine 州的 Jackson 实验室。

1.1.2 试剂 D-Hanks 液(自配); DMEM 培养基, Gibco-BRL 公司; 胎牛血清, Gibco-BRL 公司; 胰蛋白酶, Sigma 公司; 双抗(青霉素, 广州天心药业股份有限公司; 链霉素, 华北制药股份有限公司)。

1.1.3 培养器材 超净工作台、Harris CO₂ 恒温培养箱、Olympus 倒置相差显微镜、Zeiss 抽滤除菌装置、冷冻离心机等。

1.1.4 照射条件 采用⁶⁰Co γ 射线照射。Co 源距动物中线距离 80 cm, 剂量率分别为 0.9855 Gy/min、0.9880 Gy/min、0.9721 Gy/min, 受照鼠装入有机玻璃分隔照射盒内, 所有鼠受照时均为立式照射。

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓细胞培养 24 只 6~8 周雄性 C57BL/6 小鼠, 分 6 次, 每次 4 只。用引颈法处死小鼠, 75%酒精中浸泡数秒, 取四肢股骨、胫骨于无菌烧杯中, 去除肌肉, 用剪刀剪断骨的两端, 用 1 mL 注射器从一端骨髓开口处, 推入 D-Hanks 液冲去骨髓, 置于另一无菌烧杯中, 用吸管来回吸吹, 至骨髓分散为止, 再用 DMEM 溶液离心 2 次(500 g, 6 min), 去上清液, 然后加入体积分数为 15%的胎牛血清及双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)的培养液, 吹悬后接种于 2 个 50 mL 培养瓶中, 体积分数为 5%的 CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的二氧

化碳培养箱内静置培养, 每周半量换液 2 次。

1.2.2 骨髓基质细胞培养 上述培养的骨髓细胞每次换液时, 吸取悬浮细胞放在另一培养瓶中, 用 D-Hanks 液轻洗后, 再加培养液, 重复数次后, 贴壁细胞为骨髓基质细胞。

1.2.3 骨髓悬浮细胞培养 从骨髓细胞培养瓶吸取的悬浮细胞加入培养液培养 3 d 后, 再吸取悬浮细胞, 直至移植前制备符合要求的细胞浓度。

1.2.4 mdx 鼠 γ 射线照射 细胞培养至第 7 天, 骨髓基质细胞基本铺满瓶底时, 对 mdx 鼠放疗。根据不同的放疗剂量, 将实验分为 A、B、C 3 组, A 组受体鼠为 16 只 mdx 雌鼠, 移植前 3 d 全身照射 12 Gy γ 射线(每次 6 Gy, 间隔 3 h); B 组为 8 只 mdx 雌鼠, 移植前 3 d 1 次全身照射 6 Gy γ 射线; C 组为 14 只 mdx 雌鼠, 移植前 3 d 1 次全身照射 8 Gy γ 射线, 放疗后鼠放在空气流通的空调房间、带盖的鼠笼中饲养, 鼠笼、饲料、饮水均灭菌处理, 饮水中加 SMZco 预防感染, 移植 1 个月改为一般饲料。

1.2.5 细胞移植 移植前常规制备细胞悬液, 计数板计数后, 0.4%台盼蓝染色计数检查细胞活力达 95%以上为满足移植条件。A 组鼠放疗 3 d 后分别经鼠尾静脉注射 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个骨髓细胞(5 只鼠)、骨髓基质细胞(5 只鼠)、骨髓悬浮细胞(4 只鼠), 每只鼠输入不同细胞的量约 0.3 mL, 对照鼠(2 只鼠)输入 0.3 mL D-Hanks。B 组 6 只鼠经鼠尾静脉注射上述细胞, 另外, 1 只鼠经腹腔注射、1 只局部肌注约 1×10^6 个骨髓细胞。C 组鼠放疗后分别经鼠尾静脉输入 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 个骨髓细胞、骨髓基质细胞、骨髓悬浮细胞, 每只鼠输入量约 0.3 mL。术前及术后观察受体鼠的精神状况、饮食、体质量、有无腹泻、便血、弓背翘毛、脱毛、皮肤溃疡、抽搐、耳廓脚掌红斑等。

1.2.6 GVHD 的病理组织学变化 取小鼠的肝、小肠、皮肤作常规病理组织学检查, 并按 Thomas 病理组织学分级标准判定^[3]。

1.2.7 脾指数测定 将骨髓移植数天后小鼠称重, 死亡或死亡前取其脾于天平上称量, 求其指数, 脾指数 = 脾质量(mg)/体质量(g), 并用同样方法测定未移植小鼠的脾指数。

2 结 果

2.1 骨髓细胞培养的形态学观察

在本培养体系中,约24~40 h出现贴壁细胞,贴壁细胞呈梭型或星型,间有圆型。第3天其数量急剧增多且形态明显分化,到培养第5天,各类细胞的形态已很典型。骨髓基质细胞主要包括成纤维细胞、上皮样细胞、单核巨噬细胞、外膜网状细胞。而浮在液体中的悬浮细胞都是圆形细胞,约48 h开始形成集落的细胞团,形似葡萄串,大小不一,大多数悬浮,少数相对稳定位于贴壁层。2~7 d,上述各类细胞增多明显。

2.2 3组小鼠存活时间比较

A组mdx鼠在照射后放在无菌洁净的条件下饲养,移植后7 d全部死亡,考虑是致死性照射导致骨髓衰竭。死亡先后顺序:对照组>骨髓基质细胞组>骨髓悬浮细胞及骨髓细胞组。B组8只mdx鼠移植后60 d,死亡4只,存活4只,其中腹腔注射及肌肉注射各1只小鼠在移植后7 d内死亡,另1只注射基质细胞小鼠在移植后15 d死亡,1只注射悬浮细胞小鼠在移植后20 d死亡。C组14只mdx鼠在移植后60 d,2只注射基质细胞、2只注射悬浮细胞小鼠死亡,10只存活,并在观察中,表明此组同种异体骨髓细胞、基质细胞、悬浮细胞植入成功,宿主造血功能恢复正常。

2.3 3组小鼠照射后行为学观察

A组mdx鼠在放疗(12 Gy)后出现急性放射病(骨髓型合并胃肠型)的表现:受照后即表现精神萎靡,活动减少,约12 h出现活动增多;第2~3天呈稍兴奋状态,活动比受照前增多。第3天行细胞移植,第4~5天小鼠表现脱毛、精神萎靡、活动少、进食少、腹泻、消瘦寒颤;第6天注射D-Hanks液组先死亡,第7天基质细胞组开始死亡,第8~10天,其它鼠相继死亡。B组鼠放疗(6 Gy)后,2只非静脉注射鼠受照后10 d死于骨髓衰竭,另6只鼠受照后约15 d出现移植物抗宿主病(GVHD)的综合症的表现:精神萎靡,体质量减轻,进食少,步态不稳,弓状背,脱毛,毛发无光泽,腹泻,耳廓脚掌红斑,皮肤溃疡等表现。C组鼠放疗(8 Gy)后同样出现精神差,活动少,食欲差,约8 h后逐渐恢复;第2~3天稍兴奋,第3天行细胞移植:骨髓细胞(5只)、基质细胞(5只)、悬浮细胞(4只);第4天小鼠精神差,进食少,但约第14天稍好转;4只鼠在受照后12 d死亡,其它鼠出现移植物抗宿主病(GVHD)的综合症的部分表现:精神萎靡,体质量

减轻,进食少,步态不稳,弓状背,脱毛,毛发无光泽,但没有腹泻、耳廓脚掌红斑、皮肤溃疡等表现,约30 d后渐渐恢复。

2.4 GVHD的组织病理学改变

A组和C组部分死亡鼠皮肤检查有少量淋巴细胞浸润,肝细胞轻度水肿变性,小肠少量淋巴细胞浸润,病理改变为GVHD I级。B组死亡鼠出现皮肤基质层水肿变性、嗜酸性变,肝细胞变性坏死,胆小管闭塞,淋巴细胞浸润,小肠绒毛坏死脱落,肠腺减少,病理改变为GVHD II级。

2.5 脾指数测定

对死亡鼠(A组16只、B组4只、C组4只)按移植细胞类型进行脾指数测定,骨髓细胞移植组、悬浮细胞移植组、基质细胞移植组、正常对照组(20只)的脾指数的平均值分别为:5.2645、4.8678、4.7724、3.1194。不同细胞移植组之间的脾指数相比,无显著性差异($P > 0.05$),各细胞移植组分别与对照组相比,均有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来,基因治疗和成肌细胞移植被认为是治疗DMD富有前途的方法。由于基因治疗时病肌细胞转染dystrophin基因的表达效率低下,病毒载体的抗原性和导致肿瘤的可能性,限制了其在临床上的广泛应用。而成肌细胞移植虽然在动物实验及临床应用中,都可使dystrophin转阳,改善病侧肢体的肌力,但是它不能分布到所有病肌组织(包括心肌、膈肌、平滑肌)以及纠正智力缺陷。然而,Gussoni^[1]研究发现,骨髓细胞、造血干细胞、肌肉SP细胞移植到mdx鼠,5周后受体鼠有dystrophin的表达,肌组织的荧光原位杂交检测证实为供体核来源。骨髓移植的供体细胞通过血管系统播散到全身,提供系统而非局部的修复肌肉的方法,不仅可以修复全身骨骼肌,甚至可诱导心肌的再生^[4],从而为DMD甚至其它肌萎缩提供了一个潜在的治疗途径。

骨髓是由造血干细胞、骨髓基质细胞(60%~70%成纤维细胞,10%~20%上皮样细胞,10%~20%单核巨噬细胞,5%~10%外膜网状细胞)及其分泌的细胞外基质(蛋白多糖及胶原)及多种细胞因子组成;它们之间有复杂的相互作用关系^[3]。造血干细胞移植能够在mdx鼠表达dystrophin,具有

向肌细胞分化的潜能,而基质细胞可在体外培养分化成有收缩功能的肌管^[6],同样具有向肌细胞分化的潜能^[7],但是骨髓基质细胞移植后,受体鼠能否存活,是否能表达 dystrophin,改善病肌的肌力,尚不清楚。为此,我们将 C57BL/6 鼠的骨髓细胞、基质细胞、悬浮细胞体外培养后,分别移植到放疗后的 mdx 鼠后获得成功。而且输注全骨髓及悬浮细胞的受体存活时间较输注基质细胞为长,输注 D-Hanks 液对照组最先死亡,说明供体的骨髓及造血干细胞在受照后的骨髓造血重建中具有重要作用,而基质细胞只是造血微环境的主要成分,可能间接刺激宿主造血功能的重建。在经腹腔注射、肌肉局部注射骨髓细胞的受体鼠也很快死亡;对照组无供体来源的骨髓细胞的替代而最先死亡,说明致死剂量放疗破坏宿主造血功能后,腹腔注射、肌肉局部注射骨髓细胞不足以重建造血而致骨髓衰竭。在对移植鼠的脾指数测定中,受体鼠脾指数的增加也间接说明骨髓移植后脾结节及造血干细胞的增加,供体骨髓细胞的成活。

本实验采用国际公认的 DMD 模型鼠 (mdx 鼠)进行骨髓移植,移植前的放疗,一方面抑制免疫反应,另一方面使受体骨髓龛腾空,以利于异体骨髓的植入。由于 mdx 鼠对放疗剂量的敏感性、耐受性不同于一般小鼠,照射剂量过大,易造成急性放射病而发生骨髓衰竭以及肠道严重损伤而出现感染、贫血、出血及水电解质平衡紊乱而容易死亡;放射剂量不足,受体内残存的 T 细胞和 NK 细胞对供体活性细胞产生移植排斥反应,使植入的异体骨髓细胞不易存活。此外,由于移植物中含有活性细胞,供体和受体的组织相容性不同,供体的免疫细胞会对受体的组织细胞产生 GVHD,均是异体骨髓移植的主要并发症和死亡原因。本实验采用对骨

髓细胞经过短时间的体外培养,除去骨髓中的免疫活性细胞,减少或避免了 GVHD 的发生^[8]。在对放疗剂量的摸索中,发现 12 Gy γ 射线全身照射,mdx 鼠不能耐受致使骨髓衰竭而死。6 Gy γ 射线全身照射,因剂量不足而产生较重的 GVHD 的临床和病理组织学表现,而 8 Gy γ 射线一次照射,GVHD 的表现较轻,小鼠的成活率较高,是合适的放疗剂量。

参考文献:

- [1] Gussoni E, Soneoka Y, Strikland C D, *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation [J]. *Nature*, 1999, 401(6751): 390.
- [2] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [3] 陈 实. 移植免疫学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 104 ~ 109.
- [4] Bittner R E, Schofer C, Weipoltshammer K, *et al.* Recruitment of bone marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice [J]. *Anat Embryol*, 1999, 199(5): 391.
- [5] 郑德先, 吴克复, 栢建新. 现代实验血液学研究方法与技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999. 24 ~ 25.
- [6] Wakitani S, Saito T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-Azacytidine [J]. *Muscle Nerve*, 1995, 18(12): 1417.
- [7] Ferri G, Angelis G C, Coletta M, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors [J]. *Science*, 1998, 279(5356): 1528.
- [8] 赵泽坤, 丛建波. 短期培养小鼠骨髓细胞的增殖、分化及其移植效果 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 1986, 6(2): 99.

(编辑 刘清海)

·新成果·

肾移植术后巨细胞病毒感染诊断与防治系列研究

课题负责人 郑克立, 等

(中山医科大学附属第一医院, 广东 广州 510089)

人巨细胞病毒(HCMV)感染是肾移植术后早期常见的并发症和死亡原因之一。HCMV 感染一旦发生,治疗效果差。该成果对肾移植 HCMV 感染的诊断与防治进行了一系列研究,建立并开展了人巨细胞病毒抗原试验及半巢式荧光定量聚合酶链反应。该方法是目前早期快速诊断活动性 HCMV 感染的最佳指标,对潜伏性 HCMV 感染和抗 HCMV 治疗后暂时处于不活动的 HCMV,进行准确的诊断和较精确的定量;对决定抗 HCMV 治疗的疗程,停药时机和预测预后有一定的价值。同时,避免了以往的盲目性预防用药,减少药物耐受,减轻病人的负担,提高了对 HCMV 的治疗效果,减少了 HCMV 感染的病死率,使肾移植总的成功率提高 10%,取得了较大的社会效益。该成果为肾移植进一步向前发展做出了较大的贡献。该成果于 2000 年获广东省科技进步三等奖。

(陈丽芳)