

同种异体大鼠骨髓间充质干细胞移植对放射性空肠损伤的修复作用

宋祥福¹, 孙冰雪², 张静春³, 龚守良¹

(1. 吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室, 长春 130021;
2. 吉林大学生命科学院药物制剂, 长春 130021;
3. 吉林大学中日联谊医院检验科, 长春 130033)

【摘要】 目的 观察同种异体骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对放射性空肠的修复作用。方法 全骨髓贴壁体外培养大鼠 MSCs 并进行 DAPI 标记。对大鼠行 5 Gy X 线全腹部照射, 每隔 72 h 照射 1 次, 共 5 次, 制备放射性空肠损伤动物模型。取 40 只大鼠, 随机分成正常对照组、模型及 MSCs 治疗组及 DAP 标记组。激光共聚焦显微镜下观察 DAPI 标记的 MSCs 在空肠组织中富集情况。病理学观察 MSCs 对放射性空肠损伤的修复作用。结果 正常大鼠空肠黏膜结构清楚, 隐窝深遂, 腺体丰富。模型组 7 d 黏膜上皮细胞坏死脱落, 隐窝几乎完全破坏, 治疗组 7 d 黏膜坏死组织较少, 黏膜增厚, 30 d 治疗组核分裂相增加, 较模型组增加明显。结论 成功建立放射性空肠损伤动物模型, MSCs 可以促进空肠再生与修复。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 辐射; 空肠; 组织修复

【中图分类号】 R329.2; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0063-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.016

Repairing Effect of Allogeneic Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Jejunal Radiation Damage

SONG Xiang-fu¹, SUN Bing-xue², ZHANG Jing-chun³, GONG Shou-liang¹

(1. Key Laboratory of Radiobiology, Ministry of Health, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021;
2. School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130021;
3. China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033)

【Abstract】 Objective To observe the repairing effects of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on jejunal radiation damage in rats. **Methods** Rat MSCs were isolated, purified and cultured in vitro. The model of ileal radiation damage was made. Sixty rats were randomly divided into normal control group, model group, and MSCs group ($n = 12$). The enrichment of MSCs in the jejunum were observed under laser scanning confocal microscope. Pathological changes of the jejunum were examined. **Results** The structure of normal rat jejunal mucosa was clear, with deep crypts and glands. In the model group at 7 days after irradiation, the epithelial cells were necrotic and the crypts were almost completely destroyed. But mucosal necrosis was less severe, the mucosa got thickening, and mitotic activity was significantly increased in the treatment group, compared with that of model group at 30 days after irradiation. **Conclusions** The model of jejunal radiation damage is successfully established. MSCs can promote the regeneration and repairment of the jejunal radiation damages.

[作者简介] 宋祥福(1964-) 男, 高级工程师, 研究方向: MSCs 与组织修复。

[通讯作者] 张静春, E-mail: Jingying0718@sina.com。

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cells; Radiation; Jejunum; Tissue repair; Rat

腹部接受一定剂量射线照射后,小肠因其黏膜上皮生长代谢活跃,对电离辐射最为敏感,而成为受损伤的主要器官。放射性肠损伤疾病在治疗中存在着很大的困难,目前多以对症治疗为主。MSCs 具有强大的增殖能力和多向分化潜能,免疫原性弱,易从骨髓中分离、纯化及体外扩增等特点,因此是异体组织修复的理想种子细胞。创伤可以刺激 MSCs 迁移至受损器官或组织,并有助于受损组织修复和重建^[1]。为此,本研究拟通过体外培养扩增大鼠 MSCs 后注入放射性空肠损伤模型大鼠,观察其移植后对空肠组织修复情况,为其临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

DMEM 培养基 (Gibco 公司)、胎牛血清 (Hyclone 公司)、胰蛋白酶 (Gibco 公司) 和 4,6-二苯基吲哚 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Sigma 公司)。倒置显微镜 (日本 Olympus)、冰冻切片 (德国莱卡)、激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus)。

1.2 MSCs 分离、纯化与体外培养与标记

选用 5 d 大鼠乳鼠 (8.0~10.0 g),颈椎脱臼法处死,75% 酒精浸泡 5 min,无菌条件下快速分离股骨和肱骨,剪除骨两端,用 5.0 mL L-DMEM 培养基,反复冲洗骨髓腔内骨髓于培养皿内,经反复吹打制成单细胞悬液,加入 L-DMEM 培养液 (含 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素) 以 1.0×10^5 /mL 接种于 50 mL 培养瓶中,37℃ 5% CO₂ 饱和湿度孵箱培养 3 d 后第一次半量换液,以后换液依具体情况而定,细胞接近 90% 融合时,按 1.5×10^4 /mL 传代。倒置显微镜逐日观察,直至贴壁细胞融合铺满瓶底,重复以上操作,反复传代扩增。参照文献 [2] 的方法选取第三代 MSCs 于注入前 1 d 进行标记的 MSCs DAPI 标记,并应用流式细胞术检测细胞表型,应用成骨细胞诱导液和脂肪样细胞诱导液诱导 MSCs 定向分化,鉴定其分化能力。

1.3 放射性肠损伤动物模型制作

选用成年 Wistar 雌性大鼠 40 只,清洁级,合格证号 SCXK(吉) 2003-0007 体重 240~260 g。动物称重后 10% 水合氯醛麻醉 (3.5 mL/kg),仰卧在特制的固定盒中,以贵阳医疗仪器厂生产的 X. S. S. Z

250 型深部 X 线机给予全腹部照射,大鼠腹部给予 1 cm 的组织补偿,从剑突到耻骨联合,照射面积 8.5 cm × 8.5 cm,源皮距 60 cm,单次照射剂量 5 Gy,每隔 72 h 照射 1 次,共 5 次。

1.4 动物分组及处理

将辐射大鼠随机分为 MSCs 治疗组 (12 只) 和模型组 (12 只) 和 DAPI 标记组 (4 只),另设正常对照组 (12 只)。取 4 只模型大鼠,于第 3 次照射后静脉注射 DAPI 标记的 MSC,分别在照射后 2 和 7 d 取空肠,共聚焦显微镜观察富集情况,每个时间点 2 只。MSCs 治疗组大鼠分别于第 3、4、5 次照射后,当日尾静脉注射同种异体间充质干细胞 1 mL,浓度 1×10^6 细胞/mL。正常对照组和辐射组不做其他处理,于最后一次注射 MSCs 后 7 d 和 30 d 处死各組动物,病理学观察空肠组织结构。

2 结果

2.1 大鼠骨髓 MSCs 的分离培养

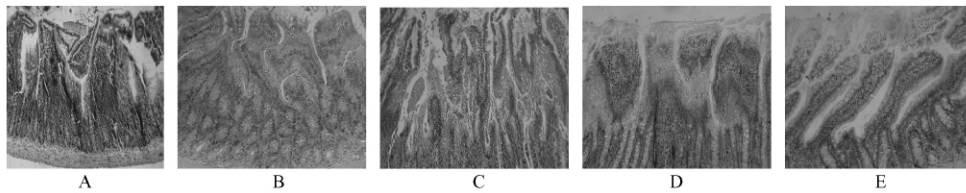
培养 1 d 后,大部分细胞呈圆形贴壁,2 d 可见有少数细胞开始伸出突起,呈梭形和多形性,3 d 后,许多细胞呈梭形贴壁,部分细胞可见脂肪滴样空泡,待换液后细胞生长速度加快,潜伏期约为 6~24 h,对数生长期约为 2~5 d,接种后 6~7 d 进入平台期。细胞到第 3 代时,细胞长梭形,折光性强,细胞边界清楚,细胞排列有一定的方向性,呈放射状、或漩涡样排列。经流式细胞仪检测 MSCs 表面不表达 CD34,成骨样细胞诱导体系诱导后,碱性磷酸酶染色深染,脂肪诱导体系后,细胞内可见脂滴 (图 1,见彩插 3)。体外 DAPI 标记的 MSC 胞核呈明亮蓝色荧光。

2.2 MSCs 在大鼠空肠组织内的富集

激光共聚焦显微镜观察发现 MSCs 注入 2 d 切片背景出现荧光;7 d 时切片小血管壁呈现较强荧光 (图 2,见彩插 3)。

2.3 各组大鼠空肠组织学观察

正常大鼠空肠黏膜结构清楚,隐窝深邃,腺体丰富;模型组 7 d 黏膜上皮细胞坏死脱落,隐窝几乎完全破坏,治疗组 7 d 黏膜坏死组织较少,黏膜增厚;30 d 模型组小肠出现间质纤维增多;30 d 治疗组核分裂相增加,黏膜增厚,绒毛逐步再生,较模型组增加明显。间质纤维增多减少,隐窝结构基本清楚 (图 3)。



A: 正常组; B: 模型组 7 d; C: MSCs 治疗组 7 d; D: 模型组 30 d; E: MSCs 治疗组 30 d

图 3 普通光学显微镜下各组小鼠空肠组织学形态

A: Normal group; B: Irradiation group, 7 d; C: MSCs group, 7 d; D: Irradiation group, 30 d; E: MSCs group, 30 d

Fig. 3 Histological appearance of the jejunal tissue. HE staining

3 讨论

肠黏膜受损后肠道干细胞可沿着隐窝绒毛轴分化为成熟细胞,取代受损脱落和凋亡的细胞,参与肠道损伤的修复^[3]。据此推测,在肠道发生急慢性损伤时,调整小肠干细胞的再生或外源性输入干细胞可能成为一种新型的治疗方法,有望加速黏膜上皮修复和胃肠功能的恢复。

MSCs 是一种成体多能干细胞,具有巨大增殖潜能,能向多种类型的细胞分化。王蓓等^[4]用肠壁固有层和黏膜下层的结缔组织成功诱导 MSCs 分化为上皮细胞,并具有肠上皮细胞的表型。Jiang 等^[5]发现,在体外诱导条件下,小鼠 MSCs 能横向分化成胃肠道上皮细胞。既然骨髓间充质干细胞在体外可以在诱导因子的作用下向肠上皮细胞转化。那么,也有理由认为,骨髓间充质干细胞进入体内后,也可以在适当的体内诱导环境中,根据生命体的需要向其急需的有再生需求的肠上皮细胞转化,并增殖分化替代损伤或坏死的细胞,使得受损组织得以恢复。骨髓来源的 MSC 能够在移植后准确定位于损伤部位,促进损伤部位的愈合^[6]。研究者将同种异体骨髓间充质干细胞移植在肠缺血-再灌注损伤的动物模型中,发现骨髓间充质干细胞可在受体肠道内定植,并可加速肠道损伤的恢复^[7]。曹晓沧等^[8]将人脐带间充质干细胞移植对小鼠放射性肠道损伤模型体内 5 周后,发现移植细胞分布于肠黏膜淋巴组织内和腺上皮细胞间,小鼠的一般状况和肠道病理学表现明显改善。本研究结果与上述报道一致,把 DAPI 标记的 MSCs 移植入放射性空肠损伤的大鼠体内 2 d 后,切片可见蓝色荧光,7 d 时小血管壁呈现较强荧光,说明移植的 MSCs 通过血液循环迁移至受损的肠组织并参与再生修复,并且病理可见 MSCs 输入后 7 d 黏膜坏死组织较少,黏膜增厚,30 d 核分裂相增加,间质纤维增多减少,隐窝

结构基本清楚,说明 MSCs 被趋化到受损伤的空肠组织,参与了肠道黏膜的修复过程。

有研究表明:移植的 MSCs 通过血液循环迁移至受损组织,能够减轻炎症对肠组织的损伤^[9],并且在损伤的局部 MSCs 能够促进新生血管的生成,从而促进组织细胞的增殖^[10]。也有研究者认为 MSCs 细胞也通过自分化、旁分泌和启动内源性修复机制参与再生修复^[11]。关于 MSCs 的对损伤组织的修复机制仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing [J]. *Cell Physiol*, 2003, 196(2): 245-250.
- [2] 朱勇, 陈良万, 林若柏, 等. SD 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养、表型鉴定及标记 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2009, 35(2): 326-331.
- [3] Anisa S, Deborah CR. Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche [J]. *Transl Res*, 2010, 156(3): 180-187.
- [4] 王蓓, 汪维伟. 胎儿肠壁结缔组织对骨髓间充质干细胞的分化诱导 [J]. *重庆医科大学*, 2006, 34-35.
- [5] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- [6] Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2648-2659.
- [7] 高广周, 李大伟, 李欣, 等. 同种异体大鼠骨髓间充质干细胞移植在肠缺血-再灌注损伤肠道中的定植及其分化效应 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(23): 4262-4267.
- [8] 曹晓沧, 王邦茂, 赵辉, 等. 脐带间充质干细胞移植对肠放射性损伤模型鼠治疗作用的实验研究 [J]. *中国辐射卫生*, 2010, 19(3): 257-262.
- [9] Victoni T, Coelho FR, Soares AL, et al. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2010, 199(1): 35-42.
- [10] Alison MR, Lovell MJ, Direkze NC, et al. Stem cell plasticity and tumor formation [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(9): 1247-1256.
- [11] 薛小军, 涂小煌, 等. 间充质干细胞对肠屏障的保护作用 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(2): 138-142.

(修回日期)2011-05-18

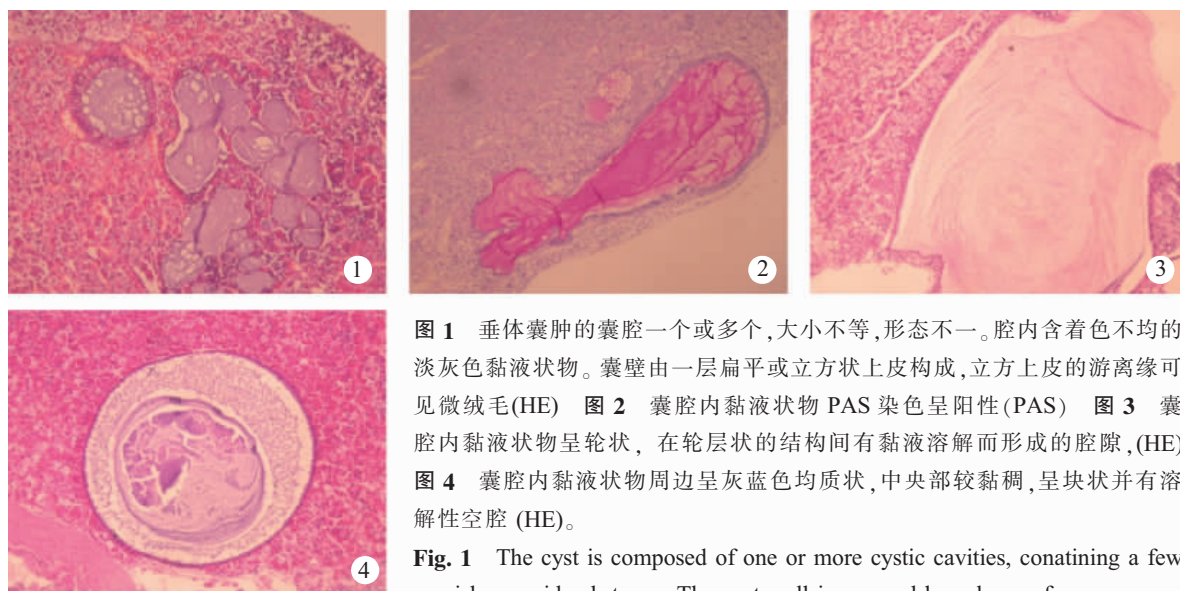
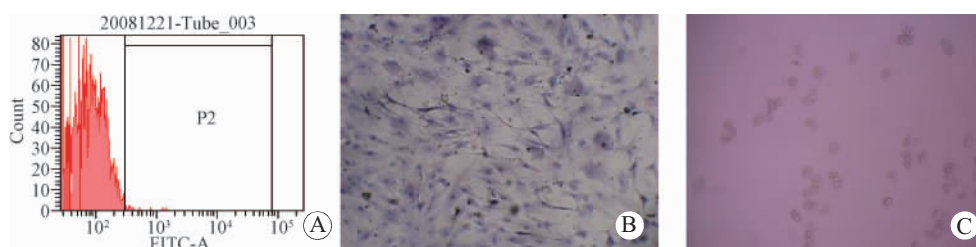


图 1 垂体囊肿的囊腔一个或多个,大小不等,形态不一。腔内含着色不均的淡灰色黏液状物。囊壁由一层扁平或立方状上皮构成,立方上皮的游离缘可见微绒毛(HE) 图 2 囊腔内黏液状物 PAS 染色呈阳性(PAS) 图 3 囊腔内黏液状物呈轮状,在轮层状的结构间有黏液溶解而形成的腔隙,(HE) 图 4 囊腔内黏液状物周边呈灰蓝色均质状,中央部较黏稠,呈块状并有溶解性空腔(HE)。

Fig. 1 The cyst is composed of one or more cystic cavities, containing a few greyish mucoid substance. The cyst wall is covered by a layer of squamous or cuboidal epithelium. Sometimes microvilli can be seen (HE) **Fig. 2** The content of the cyst is stained red by PAS staining (PAS) **Fig. 3** The content of the cyst shows somehow wheel-like appearance (HE) **Fig. 4** Some parts of the cyst content were stained blue, and some show clump-like appearance (HE)

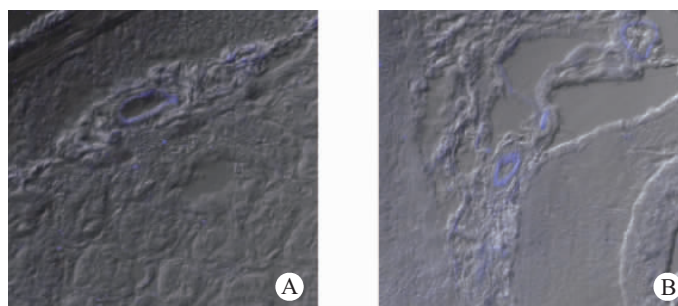


A: MSCs 表面 CD34 的表达; B: 碱性磷酸酶染色的 MSCs 诱导成骨样细胞; C: MSCs 分化为脂肪样细胞

图 1 MSCs 的鉴定

A: The expression of surface marker CD34 of MSCs; B: The osteoblast-like cells stained by alkaline phosphatase; C: The induced adipocyte-like cells

Fig. 1 Identification of MSCs



A: MSCs 注入 2 d; B: MSCs 注入 7 d

图 2 激光共聚焦显微镜下观察 MSCs 在大鼠空肠组织内的迁徙及定位

A: Two days after MSCs injection; B: Seven days after MSCs injection

Fig. 2 Migration and colonization of DAPI-labeled MSCs in the jejunum tissue, observed under laser scanning confocal microscope