

人骨髓基质细胞输注裸鼠后的体内分布

邹维艳^{1,3} 邝晓聪¹ 韦 瑛¹ 朱名毅¹ 黄英华¹ 温冠媚^{2*}¹广西医科大学病理生理学教研室, 南宁 530021; ²广州医学院病理生理学教研室, 广州 510182;³蚌埠医学院组织胚胎学教研室, 蚌埠 233003)

摘要 采用密度梯度离心和差速贴壁法分离培养人骨髓基质细胞。对细胞进行形态观察、表型分析、细胞生长曲线和成骨分化潜能测定。然后将第4代细胞通过尾静脉输注到未经任何处理的裸鼠体内, 移植1周和4周后, 利用RT-PCR检测人 Alu 基因在裸鼠不同脏器组织中的表达以判断人源性供体细胞的植入情况。结果表明培养的人骨髓基质细胞为CD34⁺CD45⁻成纤维样细胞, 并具有向成骨分化的能力, 但第1至第5代人骨髓基质细胞增殖速度无显著性差异($P>0.05$)。经尾静脉输注后, 人源性供体细胞可在肺、肝、脾、肾、肌肉、心、肠、脑等多种脏器或组织中均有不同程度的分布。

关键词 骨髓; 基质细胞; 移植; 分布

骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)是存在于骨髓内的一种成体干细胞, 具有高度增值、自我更新和多向分化的能力。被认为是目前最理想的种子细胞之一。MSCs经静脉输注后, 在受体内分布与定居的研究, 主要是利用疾病模型分析细胞的归巢特性, 而对未经任何预处理的受体动物体内分布与安全性的研究较少。本研究将体外扩增的人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells, hBMSCs)经尾静脉输注到未经预处理的裸鼠体内, 观察移植细胞在体内相应脏器或组织中的分布情况, 旨在为hBMSCs临床移植的可行性和安全性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源和实验动物 人骨髓标本: 来源于广西医科大学第一附属医院, 无血液性疾病患者, 知情同意, 自愿捐献。骨髓取自髂后上棘采, 集量5~10 ml, 肝素抗凝终浓度为60 U/ml, 样品在采集后2 h内分选。共7例, 患者平均年龄 37 ± 2 岁。

实验动物: BALB/c 裸鼠8只, 雌雄各半, 体健, 4周龄, 平均体重 20 ± 2 g, 购自广西医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM-LG培养基(Gibco公司), 胎牛血清(Hyclone公司), FITC-抗人CD34、PE-抗人CD45 (PharMingen公司), 逆转录试剂盒、PCR试剂盒(Fermentas公司)。CO₂培养箱(Thermo

Forma公司), 荧光倒置相差显微镜(Carl Zeiss公司), 流式细胞仪(Coulter公司), 多通道PCR扩增仪PTC-220(美国MJ公司), Bio-Rad电泳仪Power/Pac 300和凝胶成像分析系统Gel Doc 2000(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 hBMSCs的体外分离、培养及鉴定 (1) hBMSCs分离培养 将无菌肝素化骨髓5 ml加入等体积的DMEM-LG-10%FBS培养液混合, 轻轻吹打分散细胞, 800 r/min室温下离心5 min, 弃上清液; 加入6~8 ml DMEM-LG-10%FBS培养液, 重悬细胞; 在离心管中加入等体积Ficoll(1.077 g/ml)分离液, 然后将上述骨髓细胞悬液分别轻轻叠加至分离液上, 2 000 r/min室温下离心20 min; 轻轻吸取离心管中的云雾状单个核细胞层, 转移至离心管中; 加入5 ml PBS溶液混合, 1 000 r/min室温下离心2次, 每次5 min, 弃上清液; 用DMEM-LG-10%FBS培养液重悬离心管中的单个核细胞, 计数单个核细胞数量, 以 1×10^6 个/ml的密度接种于塑料培养瓶中进行培养(37 °C、5% CO₂、100%饱和湿度), 以后每3~4天换液1次; 当细胞生长融合达90%时, 记录培养天数, 用0.25%胰蛋白酶消化分散细胞, 1:2传代培养。此时记为第

收稿日期: 2007-10-25 接受日期: 2007-12-11

广西自然科学基金(青0447026)、广西留学回国人员科学基金(桂科回0731016)资助

* 通讯作者。Tel: 020-80529295, E-mail: guanmeiwen@126.com

1代(P₁),每3~4天换液1次;此后的细胞传代同此方法,计数所得细胞数及每代扩增所需时间。

(2)表型分析(flow cytometry, FCM) 取P₄ hBMSCs用PBS洗涤3次。0.25%胰蛋白酶消化,调整细胞浓度为1×10⁷个/ml分别加入荧光标记抗体FITC-抗人CD34、PE-抗人CD45,设立FITC-小鼠IgG、PE-小鼠IgG同型阴性对照,室温温育30 min后,洗去未标记抗体。应用流式细胞术分析表型。

(3)MTT比色法绘制细胞生长曲线 分别取P₁、P₃、P₅人骨髓基质细胞,以密度1×10⁴个/ml种于96孔板中,每孔100 μl,5% CO₂、37℃饱和湿度培养。每天相同时间取6孔细胞,每孔加入噻唑蓝(MTT)试剂20 μl温育4~5 h,至观察到紫色沉淀物后再加入二甲基亚砷(DMSO)150 μl/孔,吹打混匀20 min后用酶标仪检测A₅₇₀吸光度值,连续检测7天,以时间为横轴,A₅₇₀吸光度为纵轴绘制生长曲线。

(4)成骨细胞诱导分化及鉴定 取P₄人骨髓基质细胞,以1×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中,实验组和对照组各3孔,48 h后全量换液,实验组加入成骨细胞诱导培养基(L-DMEM培养液、10% FBS、10⁻⁸ mol/L地塞米松、50 mg/L维生素C、10 mmol/L β-甘油磷酸钠),对照组加入L-DMEM-10%FBS培养基,每3~4天换液。诱导18天后,PBS洗涤2次后行茜素红染液浸染10 min后,再次PBS洗涤3次,显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 实验动物分组与hBMSCs移植 实验动物分组: BALB/c 裸鼠随机分为①hBMSCs移植组:取hBMSCs(P₄~P₅)作为供体细胞,以无血清DMEM-LG培养液调整的单细胞悬液1.25×10⁷个/ml,0.2 ml/只,尾静脉注射。②对照组:(a)实验对照组,仅注射等剂量的无血清DMEM-LG培养液;(b)空白对照组,不处理。

1.2.3 RT-PCR检测人Alu mRNA表达 各组实验动物分别于移植1周和4周后,取右脑、肝、脾、右肾、右肺、右心、右股四头肌、空肠组织-80℃保存。取50~80 mg标本进行组织匀浆,用Trizol试剂提取组织总RNA,各取2 μg RNA,按逆转录试剂盒说明合成cDNA,鉴定人Alu mRNA的表达,以GAPDH为内参照。人的Alu基因、GAPDH基因用国际互联网(网址: www.genome.wi.mit.edu primer picking) primer3 软件设计引物,由上海生物工程有限公司合成。Alu引物:5'-CACCTGTAATCCCAGCA-GTTT-3'和5'-CGCGATCTCGGCTCACTGCA-3'(221

bp),GAPDH引物:5'-TCATTGACCTCAACTACATG-3'和5'-GCAGTGATGGCATGGACTGT-3'(471 bp)。

PCR反应条件为:95℃5 min预变性,95℃30 s→56℃30 s→72℃1 min,循环30次。72℃延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,紫外灯下观察结果,图像分析系统进行电泳带的扫描分析。

1.2.4 统计学方法 计量资料用SPSS10.0进行t检验。

2 结果

2.1 细胞形态学特点

原代骨髓单个核细胞接种,24 h后细胞大部分已贴壁。48 h后偶见细胞展开呈短梭形。第5天贴壁展开细胞数量明显增多,细胞多为长梭形,核居中,有一至多个核仁不等。细胞生长有严格的方向性,紧密排列呈漩涡状、放射状,经换液可除去非贴壁悬浮细胞。传代细胞接种后1~2 h内即开始贴壁,初为圆形,12 h内完全贴壁,部分细胞展开呈长梭形,24 h内细胞增殖缓慢。P₁~P₅细胞呈长梭形,胞体略大于P₀,核大,伴有胞浆突起(图1)。

2.2 细胞的表型特点

流式细胞术结果显示P₄细胞均一性较好,CD34、CD45表达阴性(图2)。

2.3 细胞增殖动力学

P₁、P₃、P₅骨髓基质细胞采用MTT法测A₅₇₀吸光度做图(图3),细胞传代后生长迅速,增殖快,在渡过了1~2天的潜伏期后迅速进入对数生长期,持续3~5天后增殖速度减慢进入平台期;随着传代次数的增加,细胞增殖速度逐渐下降,但P₁与P₅ hBMSCs增殖速度无显著差异(P>0.05)。

2.4 培养细胞的诱导分化鉴定

骨髓基质细胞经成骨细胞诱导18天后,多角形、不规则形细胞增多,体积变大,含较多胞浆颗粒,茜素红染色可见胞质内矿化结节呈桔红色(图4,箭头所示)。

2.5 移植的hBMSCs在体内的分布检测的结果

RT-PCR检测人Alu mRNA表达情况:经凝胶电泳分析,hBMSCs移植1周、4周后,受体裸鼠各脏器Alu mRNA表达情况如表1,图5所示。

3 讨论

目前,分离MSCs常用的方法有贴壁法(全骨髓

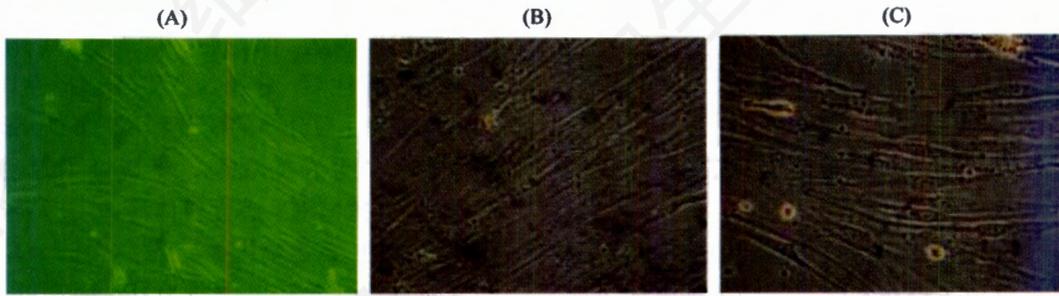


图1 hBMSCs的形态学特点(倒置相差显微镜, 200×)
(A) hBMSCs (P₀); (B) hBMSCs (P₁); (C) hBMSCs (P₃)。

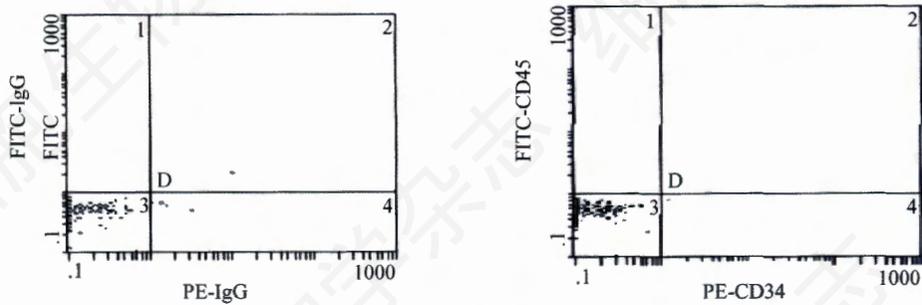


图2 hBMSCs的表型分析(FACS)

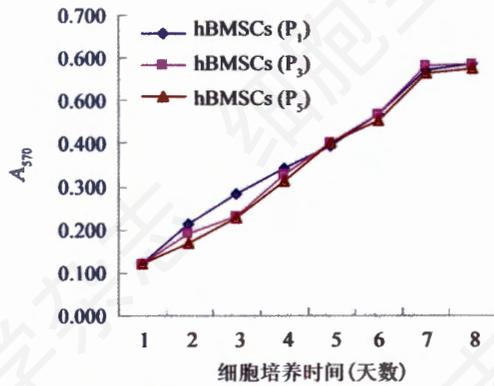


图3 hBMSCs的生长曲线

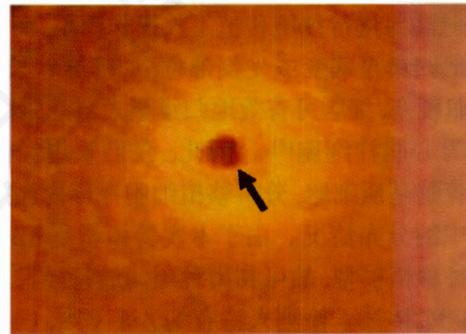


图4 hBMSCs(P₄)经成骨诱导18天后茜素红钙结节染色 (100×)

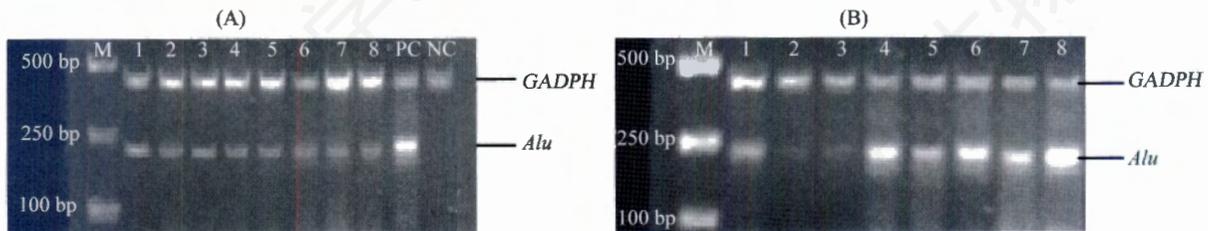


图5 人 *Alu* 基因凝胶电泳图

(A) hBMSCs 移植1周人 *Alu* 基因表达; (B) hBMSCs 移植4周人 *Alu* 基因表达。M: marker; 1: 脑; 2: 肝; 3: 脾; 4: 肺; 5: 心; 6: 肾; 7: 肌肉; 8: 空肠; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照。

表1 hBMSCs 移植后不同检测时间受体裸鼠各脏器人 *Alu* mRNA 表达情况

检测组织	脑	肝	脾	肺	心	肾	肌肉	空肠
移植1周后	+	+	+	+	+	+	+	+
移植4周后	+	±	±	+	+	+	+	+

“+”阳性表达;“±”弱阳性表达;“-”未检测到表达。

法和密度梯度离心法^[1],随着对MSCs研究的不断深入,近年来又出现了流式细胞术法和免疫磁珠法^[2]。运用贴壁法分离MSCs虽然可以获得较多细胞,但细胞类型混杂,其中掺杂有大量的成纤维细胞和成肌细胞样细胞。流式细胞仪法和免疫磁珠法虽然会获得较纯的细胞,但费用昂贵,操作复杂,且易引起细胞污染。鉴于此,本实验采用密度梯度离心法分离骨髓hBMSCs。由于MSCs具有黏附塑料和玻璃器皿的生长特性,而造血细胞呈悬浮生长,利用这种生长特性上的差异,再结合差速贴壁法可在细胞传代过程中进一步去除造血细胞,实现对hBMSCs的有效富集,由于缺乏特异性表面分子,目前尚无直接方法鉴定MSCs,以CD14、CD34、CD45阴性作为筛选根据^[3]。本实验采用流式细胞仪检测P₄ hBMSCs CD34、CD45的表达情况,两者均表达阴性,因此可基本排除CD34⁺CD45⁺造血系细胞污染。

静脉注射进行细胞移植不仅操作简单,而且细胞能有效地归巢至病变或受损部位,如静脉移植MSCs治疗心肌梗塞,细胞可有效地归巢至大鼠心肌梗死灶,并分化为心肌样细胞^[4]。因此,我们采用经静脉途径移植骨髓基质细胞,分析移植细胞在体内相应脏器或组织中的分布情况。由于本实验模型是hBMSCs-裸鼠异种移植模型,故可利用种属间的特异性进一步通过RT-PCR技术检测人特有的*Alu*基因,间接反映人供源细胞植入受鼠的分布情况。RT-PCR检测技术具有较高的灵敏度,且*Alu*基因是人特有的基因,位于第8号染色体上呈高度保守的重复序列,长度为300 bp,占总DNA的5%,可较好地应用于种属间的示踪研究。hBMSCs移植1周后,在受鼠脑、肝、脾、肺、心、肾、肌肉、空肠均有人*Alu* mRNA

表达;移植4周后,在脑、肺、心、肾、肌肉、空肠呈强阳性表达,但在肝、脾表达为弱阳性。提示hBMSCs输注后,分布具有脏器选择性。目前有关hBMSCs输注后分布的研究不多,如Devine等^[5]进行了细胞移植分布的观察,将转染了绿色荧光蛋白(GFP)的猕猴MSCs进行自体移植,在移植19.5个月检测GFP表达情况。在结肠、肺、胰腺、胸腺均有高表达,尤其以结肠为甚,而在肝、脾、肾、动脉中呈低表达,这与本实验结果相似,但前者属慢性长期实验。国内外也有学者进行了细胞移植后分布的短期研究。Meyerrose等^[6]利用绿色荧光蛋白GFP标记的脂肪来源MSCs经静脉移植给致死剂量照射(TBI)NOD/SCID小鼠,移植75天后,在受鼠脑、肝、脾、肺、心、肾、肌肉、肠等脏器和组织中检测到GFP表达。国内也有学者通过PCR技术检测雄性供体MSCs的性别染色体(Syr),反映供体细胞在TBI预处理雌性BALB/c小鼠体内的分布情况,移植15天后,在骨髓、脾脏检测到Syr,在移植30和60天后,肺、骨髓、脾均可检测到雄性供体细胞的植入^[7]。上述结果表明MSCs移植后,不仅具有迁移性,而且在体内分布具有一定的时空性,至于植入的供体细胞是否会影响受体重要脏器的结构和功能,以及植入后的细胞分化模式等问题皆有待深入探讨。值得注意的是,在本实验中受鼠脑组织中也检测到人*Alu*基因表达,提示hBMSCs可通过血脑屏障在脑组织中分布,植入的供源细胞是否会影响受体脑组织的结构和功能,以及细胞是否会发生恶性转化或成瘤等安全性评价都值得我们重视和进行深入研究。

参考文献(References)

- [1] Martin I et al. *J Biomed Mater Res*, 2001, **55**: 229
- [2] Quirici N et al. *Exp Hematol*, 2002, **30**: 783
- [3] Pittenger MF et al. *Science*, 1999, **284**: 143
- [4] 孟玲等. *中华老年心脑血管病杂志*, 2005, **7**: 184
- [5] Devine SM et al. *Blood*, 2003, **101**: 2999
- [6] Meyerrose TE et al. *Stem Cells*, 2007, **25**: 220
- [7] 周进明等. *中华放射医学与防护杂志*, 2002, **22**: 167

Distribution of Human Bone Marrow-derived Stromal Cells Following Intravenous Injection into Nude Mice

Wei-Yan Zou^{1,3}, Xiao-Cong Kuang¹, Ying Wei¹, Ming-Yi Zhu¹, Ying-Hua Huang¹, Guan-Mei Wen^{2*}

(¹Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; ²Department of Pathophysiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; ³Department of Histology and Embryology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

Abstract human bone marrow-derived stromal cells (hBMSCs) were isolated by gradient centrifugation and were *ex vivo*-expanded using adhesion culture method. Morphology, phenotypes, cell growth dynamics, and osteogenic differentiation of hBMSCs were analyzed prior to intravenous injection into unconditioned nude mice. Culture-expanded hBMSCs were subsequently infused into the unconditioned recipients via tail vein injection. The donor-derived engraftment was qualified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) targeting human Alu gene at one week and four weeks postsystemic injection. The current results demonstrated that *ex vivo*-expanded hBMSCs phenotypically and morphologically appeared as CD34⁻CD45⁻ spindle-shaped fibroblastic cells with the ability to give rise to osteogenic lineage *in vitro*. However analysis of growth dynamic of hBMSCs (P₁-P₅) showed no significant differences ($P > 0.05$). Infused cells were present in multiple organs or tissues recovered from the recipients including lungs, liver, spleen, kidneys, skeletal muscle, heart, small intestines, and brain at 7 days and 4 weeks after cell transplantation. These data indicate that *ex vivo*-expanded hBMSCs distribute broadly following systemic infusion.

Key words bone marrow; stromal cells; infusion; distribution

Received: October 25, 2007 Accepted: December 11, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi (No.0447026) and the Guangxi Scientific Research Foundation for Returned Oversea Scholars (No.0731016)

*Corresponding author. Tel: 86-20-80529295, E-mail: guanmeiwen@126.com