

骨髓间充质干细胞靶向治疗大鼠烫伤创面愈合

王红梅¹ 郭光华^{3*} 曾小平² 黄永红¹ 徐方云¹ 李国辉³(南昌大学基础医学院,¹病理生理学教研室,²免疫学教研室,南昌 330006;³南昌大学第一附属医院烧伤科,南昌 330006)

摘要 用体外培养的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)治疗深 II 度烫伤大鼠。体外培养雄性 Wistar 大鼠 BMMSCs, 流式细胞仪鉴定。将 BMMSCs 分别通过创面局部、尾静脉注射移植给深 II 度烫伤的雌性大鼠。观察创面愈合情况; 不同时间点取组织标本制作石蜡切片, HE 染色观察; PCR 检测创面皮肤组织和骨髓中供体鼠 Y 染色体基因性别决定区(Sry)片段的表达。结果显示, 静脉注射组和创面局部注射组愈合速度均快于对照组($P < 0.05$), 但两治疗组之间比较差异无显著性($P > 0.05$)。HE 染色结果显示治疗组创面愈合质量均好于对照组。两治疗组动物创面组织及静脉注射组骨髓组织均有 Y 染色体基因的表达。因此, 大鼠供体骨髓 MSCs 对其受体皮肤深 II 度烫伤具有一定的治疗作用。烫伤促使 BMMSCs 向创面迁移并参与烫伤创面愈合。

关键词 骨髓间充质干细胞; 烫伤; 创面愈合; 多聚酶链式反应

目前, 细胞移植已成为治疗许多疾病的新方法, 在替代、修复、加强受损组织或器官的生物学方面有着巨大的作用。研究发现间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)广泛分布于人体各种器官和组织, 但最易得到、最富集和研究最多的是来源于骨髓^[1], 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)所具有的多分化潜能和强大的自我更新能力, 使之在细胞治疗和组织工程领域具有越来越广泛的应用前景^[2]。研究表明病损的组织和器官对骨髓干细胞可能有特异的趋化作用^[3,4]。本研究旨在观察 BMMSCs 在烫伤创面的靶向作用, 初步探讨其对烫伤创面促愈合的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 大鼠购自南昌大学医学院实验动物部。

1.2 主要试剂

L-DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司, 胰蛋白酶购自 Sigma 公司。荧光标记小鼠抗大鼠单克隆抗体 CD44、CD90、CD45 购自 PharMingen 公司, RNaseA、PI 染色液购于 Sigma 公司。Sry 上下游引物由上海生工工程技术有限公司合成。2×Taq PCR Master Mix 购自北京天为时代。

1.3 BMMSCs 的体外分离、培养和鉴定

无菌分离 3~6 周龄雄性 Wistar 大鼠双侧股骨和胫骨, PBS 反复冲洗骨髓腔, 制成单细胞悬液; 接

种于含 10% 小牛血清的 L-DMEM 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱饱和湿度培养。72 h 后倾掉非贴壁细胞更换培养基, 以后每 3~4 天换液一次。0.25% 胰蛋白酶消化传代。选取生长良好的第 3 代细胞进行实验。用流式细胞仪进行鉴定。

1.4 模型复制及实验分组

健康雌性成年 Wistar 大鼠 48 只, 体重 200~240 g, 随机分为 A 组: BMMSCs 局部注射治疗组; B 组: BMMSCs 尾静脉注射治疗组; C 组: 生理盐水组(对照组)。实验前 12 h 背部剃毛, 禁食, 自由饮水。戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠, 用南昌大学烧伤研究所设计的“控时控温控蒸汽压烫伤仪”在大鼠背部造成直径为 3 cm 的圆形皮肤烫伤(烫伤仪控制参数为: 压力 3 Mpa, 温度为 107 °C, 时间 7 s), 制备深 II 度烧伤模型(病理切片证实)。第 3 天, 将烫伤创面的皮肤切至肌筋膜, 创面止血。将第 3 代雄性大鼠的 MSCs 单细胞悬液, 浓度为 2×10⁶ 个/ml, 分别通过创面点状注射(A 组)或尾静脉(B 组)移植给烫伤大鼠, 接种数量为 2×10⁶ 个/只, 第 2 天重复一次。对照组分别在创面或尾静脉注入等量生理盐水。

1.5 观察指标的检测

动物分笼饲养, 每日观察其活动、进食、创面

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-01-08

江西省教育厅青年基金资助项目(No.GJJ09432); 南昌大学科技基金(医科类)资助项目

*通讯作者。Tel: 0791-8692572, E-mail: guogh2000@hotmail.com

变化、肉芽组织生长和创面愈合情况。于烫伤后7、14、21、28天用透明膜覆盖创面并沿创缘画膜,剪膜,置电子天平称重换算成面积。计算创面愈合率。创面愈合率=(初始烫伤面积-测量当日面积)/初始烫伤面积 \times 100%。每个时相点每组各活杀4只大鼠。取创面皮肤组织常规病理切片,HE染色镜检。

1.6 供体鼠 Y 染色体基因表达

取不同时相点创面皮肤和骨髓组织,提取基因组DNA。PCR检测Y染色体的性别决定区(Sry)片段,受体鼠为雌鼠本身无Y染色体,若无雄性供体鼠MSCs的植入则PCR结果为阴性。PCR上游引物:5'-AAA GTG CCA CAG AGG AGT TA-3';下游引物:5'-GGA AAG GGA TTG AAA TAG TC-3',长度为858 bp。50 μ l PCR反应体系,96 $^{\circ}$ C变性5 min,开始PCR循环:94 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 52 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳。

1.7 统计学处理

用SPSS统计软件对数据作统计分析和处理,各个时间点计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个样本均数比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 BMMSCs 的分离、培养和扩增

细胞原代接种培养后2~3天,相差显微镜下即可见有稀疏分布的单个细胞贴壁生长,呈纺锤形或纤维细胞样外观,培养至第5~7天时,细胞已长满培养瓶的底部。随着传代次数的增加,细胞逐渐呈形态较均一的长梭形(图1)。流式细胞术细胞周期检测S+G₂+M期的细胞约占10%,G₀/G₁期的细胞约占90%。表面标记鉴定CD90及CD44阳性,CD45阴性。

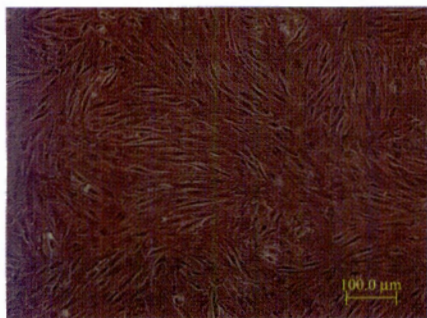


Fig.1 Morphology of the 3rd passage of BMMSCs

Table 1 The ratio of wound healing of all groups in different time ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	Time (day)			
	7	14	21	28
Group A	23.78 \pm 5.69	54.36 \pm 3.98*	94.32 \pm 1.79*	>95
Group B	23.26 \pm 4.67	55.78 \pm 3.69*	95.36 \pm 3.22*	>95
Group C	22.12 \pm 3.58	46.17 \pm 2.54	85.67 \pm 1.58	>95

* $P<0.05$, vs group C.

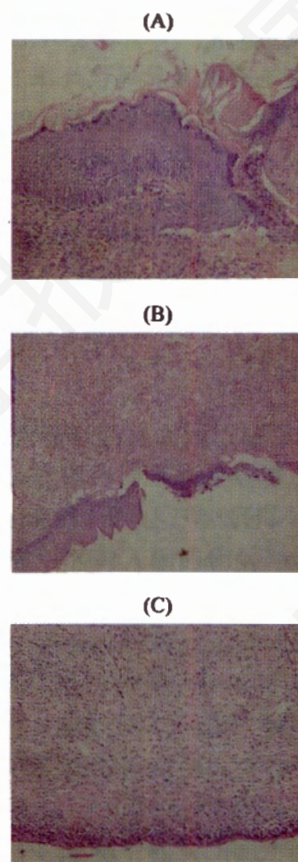


Fig.2 Histological examination of wound skin tissues at the 28th day (HE, 100 \times)

A: group A; B: group B; C: group C.

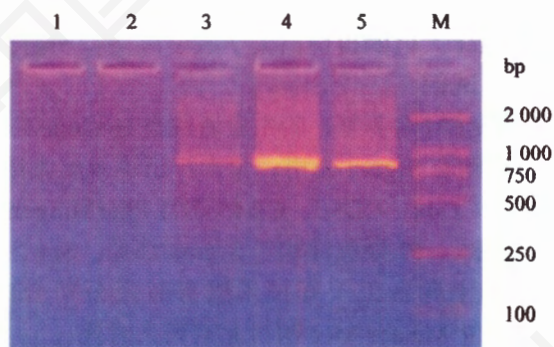


Fig.3 Detection of sry gene by polymerase chain reaction
M: marker (DL2000); 1: skin of group C; 2: marrow of group A; 3: marrow of group B; 4: skin of group A; 5: skin of group B.

2.2 BMMSC 移植治疗创面愈合观察

所有动物术后创面干燥, 面积逐日缩小, 无明显感染征象。以创面愈合率达 95% 为愈合标准。结果表明, 烫伤后 14 天和 21 天, A、B 组创面愈合率与 C 组比较差异均有显著性($P < 0.05$), 但 A、B 组之间比较无统计学意义($P > 0.05$)。21 天时, 治疗组基本愈合。见表 1。

2.3 组织形态学观察

伤后第 7 天, 镜下观察见 A 组和 B 组创面组织中的纤维母细胞、纤维细胞、毛细血管数量均较 C 组多; 第 14 天, 各组创面均形成肉芽组织层, A、B 组肉芽组织形成较 C 组丰富, 成纤维细胞、纤维细胞、毛细血管数量明显增多, 并有大量的红色胶原纤维, 排列有序; 第 21 天, A、B 组皮肤创面均有新生表皮覆盖; C 组皮肤创面细胞各层次不清楚, 表皮层有较多的坏死细胞。第 28 天, 治疗组的皮肤创面新生表皮各层分化良好, 有新生的毛细血管, 无充血现象, 而对照组相比之下较差些(图 2)。

2.4 PCR 检测结果

各时相点所取标本组织, 经琼脂糖凝胶电泳后 A、B 组大鼠皮肤组织 DNA 和 B 组大鼠骨髓 DNA, 在琼脂糖凝胶电泳上 858 bp 处, 可见 Sry 条带。对照组创面皮肤组织和骨髓 DNA, 858 bp 处没有出现条带。见图 3。

3 讨论

近年来, MSCs 在创伤修复方面的作用日益受到各国学者的关注。骨髓来源的 MSCs 具有多向分化潜能性, 易分离、培养, 且在培养扩增中不会自动分化, 及可诱导分化的特性, 为人类损伤或病变组织的修复提供了新的治疗方法。

烧伤能否促使 BMMSCs 向创面趋化, 并向烧伤创面修复所需要的细胞分化, 最终参与创面愈合? 本实验结果显示, BMMSCs 移植后在治疗组的创面组织和和静脉注射组的骨髓组织 DNA 中可检测到供体鼠 Y 染色体 Sry 片段; 表明 BMMSCs 经静脉或局部注射移植后, 可以在烫伤鼠体内定居、存活, 无明显的排斥反应。

Mackenzie 等^[5]和 Palumbo 等^[6]通过实验认为移植的 MSCs 具有向病变部位迁移并分化成机体所需要的相应细胞能力。本实验移植的 BMMSCs, 可在创面部位较长时间定居、存活并促进创面修复, 很可能是宿主的烧伤部位为 BMMSCs 的转化与增生提

供了一种微环境, 在这种应激状态下导致体内或创面上的细胞与细胞、细胞与基质、细胞与体液因子之间多种因素的相互作用来调节体内微环境的稳定, 体外分离的 BMMSCs 在这样适宜的细胞因子的刺激下, 能增殖并诱导分化成各种细胞, 因此可诱导供体骨髓 MSCs 向皮肤干细胞及附属器毛囊干细胞等转化、增殖、分化, 促进皮肤的修复。Liu 等^[7]研究表明 BMMSCs 表达表皮生长因子, 血管内皮生长因子, 成纤维细胞生长因子等, 这些因子在调节细胞表型和创建中起着重要的作用。多种细胞生长因子, 对皮肤伤口的纤维化、血管化和再上皮化有介导和调控作用, 促进创面愈合^[8]。而毛细血管的形成可能与血管内皮细胞表面酪氨酸激酶受体有关, 内皮细胞的增殖与迁移是由于损伤激活 ERK 完成的^[9]。ERK 是 MAPKs 家族重要成员, 是生长因子发挥作用的重要信号通路^[10]。细胞迁移需要细胞骨架重排和细胞粘合作用, FAK 属于酪氨酸激酶, 整合素通过影响其活性介导调节细胞连接和存活^[11]。移植 BMMSCs 可使创面组织 bFGF、ERK、c-fos 等表达增强, c-fos 增加又成为 FAK 表达的转录启动子, 最终加速肉芽组织血管的形成, 促进创面愈合。

骨髓是成体组织中最大的干细胞库, 通过干细胞的不断迁移、分化成为人体所需的细胞和组织, 在生理状态下完成组织的更新, 在病理状态下实现对组织的修复从而参与各种组织的更新和修复以维持机体组织形态的完整性和功能的稳定性, 其过程包括动员、归巢和分化三个环节。本实验中, 通过静脉注射给烫伤大鼠移植 BMMSCs, 不仅在损伤组织中能够找到供体的 BMMSCs, 而且也能够骨髓找到供体细胞, 这提示移植的 BMMSCs 可能在促进组织修复的同时, 也加速骨髓的造血重建, 移植的 BMMSCs 具有归巢的能力, 能够回到受者骨髓中并长期存活。

参考文献(References)

- 1 Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 2007; 11(1): 21-38.
- 2 Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24(3): 781-92.
- 3 Dorrell MI, Otani A, Aguilar E, Morenon SK, Friedlander M. Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina. *Blood*

- 2004; 103(9): 3420-7.
- 4 卢锡林, 姚晓黎, 冯善伟, 于美娟, 陈松林, 张为西, 等. 骨髓间充质干细胞移植后在 mdx 鼠体内的分布研究. 中国病理生理杂志 2008; 24(4): 763-6.
 - 5 Mackenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27(3): 601-4.
 - 6 Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombbetti S, Mondino A, *et al.* Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 2004; 164(3): 441-9.
 - 7 Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, *et al.* Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *J Surg Res* 2006; 136(2): 336-41.
 - 8 丁 韧, 汤学明. 创伤愈合的细胞生物学进展. 创伤外科杂志 2000; 2(1): 59.
 - 9 Pintucci G, Moscatelli D, Saponara F, Biernacki PR, Baumann FG, Bizekis C, *et al.* Lack of ERK activation and cell migration in FGF-2-deficient endothelial cells. *FASEB J* 2002; 16(6): 598-605.
 - 10 Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys* 2002; 21(3): 231-55.
 - 11 程 旻, 付小兵, 盛志勇, 顾小曼, 孙同柱. 外源性 bFGF 对深 II 度烫伤大鼠创面血管内皮细胞增殖与迁移的影响. 中国修复重建外科杂志 2004; 18(3): 200-4.

Targeting to Wound Healing of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Hong-Mei Wang¹, Guang-Hua Guo^{3*}, Xiao-Ping Zeng², Yong-Hong Huang¹, Fang-Yun Xu¹, Guo-Hui Li³

(¹Department of Pathophysiology, ²Department of Immunology, College of Basic Medical Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China; ³Department of Burns, The First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) cultured *in vitro* were used to treat the rats of deep partial thickness derma burn injury, Bone marrow-derived MSCs of male Wistar rats were isolated and cultured *in vitro* routinely and the 3rd passage was taken for identification of specific surface antigens by flowcytometry. The BMMSCs were injected into the female rats of deep partial thickness derma burn injury model through the wound sites (group A) or vena caudalis (group B). Then the rate of wound healing was observed. At the 7th, 14th, 21st, 28th day after burn injury, wound skin tissues were harvested and routinely paraffin-embedded and sectioned. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological examination. Furthermore genome DNA extracted from wound skin tissues and the bone marrow harvested was used to detect sry gene of Y chromosome by polymerase chain reaction (PCR). The results showed that the rate and quality of wound healing of the two treatment groups (group A and B) were better than that of the control group (Group C), but there was not significantly different between group A and group B. Y chromosome gene (Sry) could be detected in wound skin tissues of female rats transplanted with BMMSCs of male rats and the bone marrow of rats in group B by PCR. These results suggested that BMMSCs transplantation is effective in deep partial thickness derma burn injury in rats. It may be possible that BMMSCs can migrate to wounds and play a role during the course of wound healing.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; burn; wound healing; polymerase chain reaction

Received: November 9, 2009 Accepted: January 8, 2010

This work was supported by the Youth Foundation of The Education Department of Jiangxi Province (No.GJJ09432) and the Science and Technology Foundation of Nanchang University

*Corresponding author. Tel: 86-791-8692572, E-mail: guogh2000@hotmail.com