

间充质干细胞移植对放射性肠损伤修复作用的实验研究*

杨超¹⁾ 张晓梅²⁾ 宫媛¹⁾ 王昌正¹⁾ 韩颖^{3)**} 吴本俨^{1)**}

(¹⁾解放军总医院南楼消化内科, 北京 100853; (²⁾解放军总医院消化内科, 北京 100853; (³⁾军事医学科学院输血医学研究所, 北京 100850)

摘要 探讨了人间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植对 NOD/SCID 小鼠放射性肠损伤的修复作用。将雄性 NOD/SCID 小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 即 A 组为空白对照组, B 组为模型组, C 组为治疗组。B 组和 C 组小鼠全腹接受 5 Gy ⁶⁰Co γ 射线单次照射, 剂量率为 100 cGy/min。照射后 B 组小鼠经尾静脉注射生理盐水, C 组小鼠移植 MSCs。于移植后第 15 天取小鼠空肠标本, 通过免疫荧光方法检测 MSCs 在受损肠道的定植和分化情况。结果表明, 治疗组小鼠的生存状况明显好于模型组小鼠, 病理切片显示小肠黏膜得到修复, 免疫荧光结果显示 MSCs 可定植于辐射损伤的肠道, 并表达波形蛋白(vimentin)和 α -SMA。MSCs 移植入肠损伤的小鼠体内后可在受损肠道定植, 并向间质细胞分化, 参与辐射损伤的修复。

关键词 间充质干细胞, 放射, 肠损伤, 修复

学科分类号 R14, Q813

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00306

放射性肠损伤常见于核事故及战时的核爆炸, 也是临床腹部肿瘤放疗过程中最为常见的并发症之一。腹盆腔受到一定剂量的射线辐射后, 小肠因其黏膜上皮生长代谢活跃, 对电离辐射也最为敏感。在辐射过程中, 小肠隐窝干细胞的增殖受到抑制, 发生明显的凋亡, 导致肠屏障功能受损^[1-2], 发展为放射性肠损伤、肠瘘和肠梗阻, 最终导致内源性败血症或多器官功能衰竭等^[3-5]。虽然对放射性肠损伤的防治已进行了广泛研究, 但目前对放射性肠损伤的治疗手段仍以对症支持为主, 效果欠佳。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓中的非造血组织的多能干细胞, 具有高度增殖和多向分化潜能^[6-8]。此外, MSCs 具有来源和取材方便、易于体外培养扩增、体内植入反应低、无伦理问题的限制等特征, 是细胞治疗的理想种子细胞^[9-11]。本研究将人 MSCs 经体外扩增后以绿色荧光蛋白(GFP)示踪, 植入 NOD/SCID 小鼠放射性肠损伤的模型, 研究 MSCs 在小肠的定植及分化情况, 为放射性肠损伤的治疗提供实验基础和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒。293FT 细胞系购自 Invitrogen 公司; 携带加强型绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein, eGFP)基因的慢病毒载体 Pgc-IV、pHelper1.0 载体和 pHelper2.0 载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

1.1.2 主要试剂。高糖 DMEM、Opti-MEM® I 培养基和 α -MEM 培养基均购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 细胞培养板购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 人 MSCs 的体外分离培养与鉴定。采用密度

* 国家自然科学基金(B1070296)和中国博士后基金(2011M500155)资助项目。

** 通讯联系人。

韩颖. Tel: 010-66932200, E-mail: hanying1001@yahoo.com

吴本俨. Tel: 010-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

收稿日期: 2012-06-21, 接受日期: 2012-10-08

梯度离心法从健康成人志愿者骨髓分离 MSCs, 将其接种于 25 cm × 25 cm 的培养瓶中, 置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养. 3 天后更换培养基, 弃去未贴壁的细胞, 当细胞长至 80% 融合时, 进行传代扩增. 传代细胞用 0.25% 胰酶消化, 离心后收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100 μl PBS 中, 加入直标抗体: CD29、CD44、CD90、CD105、CD11b、CD34、CD45, 4℃ 避光反应 30 min 后, PBS 洗涤 3 次, 流式细胞仪分析. MSCs 接种于脂肪诱导体系(α-MEM, 10% FBS, 1 μmol/L 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX, 10 μmol/L 胰岛素, 200 μmol/L 吡哆美辛)培养 7~14 天, 油红 O 染色鉴定脂肪滴; 成骨诱导体系(α-MEM, 10% FBS, 0.1 μmol/L 地塞米松, 10 mmol/L β- 磷酸甘油, 0.2 mmol/L 维生素 C)培养 14 天后, 早期成骨鉴定用碱性磷酸酶试剂盒染色, 诱导 28 天后, 晚期成骨鉴定用 Von Kossa 染色.

1.2.2 慢病毒的包装. 向无菌离心管中加入 Pgc-IV 20 μg、pHelper1.0 载体 15 μg 和 pHelper2.0 10 μg, 在无血清 Opti-MEM® I 培养基中与 100 μl lipofectamine2000 混合均匀, 室温孵育 5 min, 形成 DNA-lipofectamine 2000 复合物. 293FT 包装细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 同时加入 0.1 mmol/L 非必需氨基酸(NEAA)、2 mmol/L L- 谷氨酰胺、1% 青- 链霉素和 500 mg/L G418 的培养基培养, 细胞长至 90% 汇合时, 用 0.25% 胰酶消化, 收集约 6×10⁶ 个细胞重悬于 5 ml 的生长培养基中, 与 DNA-lipofectamine 2000 复合物混匀, 加入含有 5 ml 生长培养基的细胞培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜, 次日用含 1 mmol/L 丙酮酸钠的完全培养基换液. 转染 48~72 h 后收集上清, 于 4℃, 3 000 r/min 离心 20 min 以去除细胞碎片, 病毒液用 0.45 μm 滤膜过滤后分装冻存于 -80℃ 冰箱.

1.2.3 稳定表达 eGFP 的 MSCs 获得. 取第 3 代 MSCs 以 3×10⁵/ml 密度接种于 6 孔板中, 待其长至 80% 汇合时每孔加入 2 ml 毒液, 同时加入 6 mg/L 聚凝胺(Polybrene)促进病毒的感染效率, 转染 6 h 后更换新鲜培养基, 继续培养至 72 h. 于荧光显微镜下观察细胞的感染效率, 收集细胞进行流式分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS), 获得高表达 eGFP 的 MSCs.

1.2.4 NOD/SCID 小鼠放射性肠损伤模型的建立. 6~8 周龄健康 SPF 级非肥胖糖尿病 / 重症联合免

疫缺陷(NOD/SCID)小鼠 18 只, 雄性, 体重 19.0~25.0 g, 购自北京维通利华公司[合格证号为 SCXK(京)2012-0001]. 实验前 3 天饲养于实验室以适应环境, 温度控制于 20~22℃, 并实行 12 h 光照和 12 h 黑暗交替. 将小鼠用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 仰卧于特制的固定盒中, 全腹部接受 5Gy ⁶⁰Co γ 射线照射, 上至胸骨剑突, 下至耻骨联合, 其余部位均用 5 cm 厚的铅砖屏蔽, 剂量率为 100 cGy/min. 照射后小鼠可自由活动及饮水, 并喂以标准鼠食.

1.2.5 细胞移植实验. 将 NOD/SCID 小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 即 A 组为空白对照组, B 组为模型组, C 组为治疗组. 于照射后 4 h 内进行尾静脉移植实验, B 组小鼠注射 200 μl 生理盐水, C 组每只小鼠移植 MSCs(1×10⁶ 个每 200 μl 生理盐水), 实验重复 3 次. 于照射前和照射后每天记录小鼠的生存情况和体重变化及有无腹泻、血便等. 小鼠死亡后立即取标本, 存活小鼠于照射后第 15 天处死取标本, 分别观察细胞在受损肠道的定植和分化情况.

1.2.6 肠黏膜形态结构的变化. 取空白对照组和实验组小鼠小肠组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 然后于光学显微镜下观察肠黏膜及绒毛组织的形态学变化.

1.2.7 组织冰冻切片的免疫荧光法检测. 分离的新鲜空肠组织用 OCT 包埋冷冻固定, 冰冻组织切片 5~8 μm, 冷丙酮固定后用 PBS 洗涤 3 次, 0.1% Triton X-100 破膜 15 min, PBS 洗涤 3 次, 用稀释的 10% 山羊血清室温封闭 30 min, 吸弃封闭血清后加入 PBS 稀释的 GFP 抗体和小鼠抗人波形蛋白(vimentin)抗体一抗反应液, 4℃ 孵育过夜. 吸弃一抗反应液后, 用 PBS 洗涤 3 次, 分别加入 PBS 稀释的荧光二抗, 室温反应 40 min, 吸弃二抗, PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 室温反应 1~2 min, PBS 洗涤 3 次, 用 50% 甘油封片后于荧光显微镜下观察细胞在受损肠道的定植和分化情况.

1.2.8 统计方法. 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 配对组间比较采用 *t* 检验, 组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 为显著性差异.

2 结 果

2.1 人 MSCs 体外扩增培养与鉴定

通过密度梯度离心的方法, 成功分离得到人骨髓 MSCs. 原代的 MSCs 除了长梭形之外, 还有圆

形细胞的存在, 通过连续传代(约 3 代)之后, 细胞呈现均一的长梭形, 状态良好(图 1a). 经流式细胞仪测定表型均一(图 1b~h): 不表达造血和内皮的标记(CD11b-CD34-CD45-), 表达间质细胞的标记(CD29+CD44+ CD90+CD105+). 人骨髓 MSCs 在

体外合适的诱导条件下能够形成明显的脂肪滴, 油红 O 染色成阳性(图 1i). 早期成骨分化能力碱性磷酸酶染色阳性(图 1j), 后期成骨钙化的骨结节 Von Kossa 染色呈阳性(图 1k).

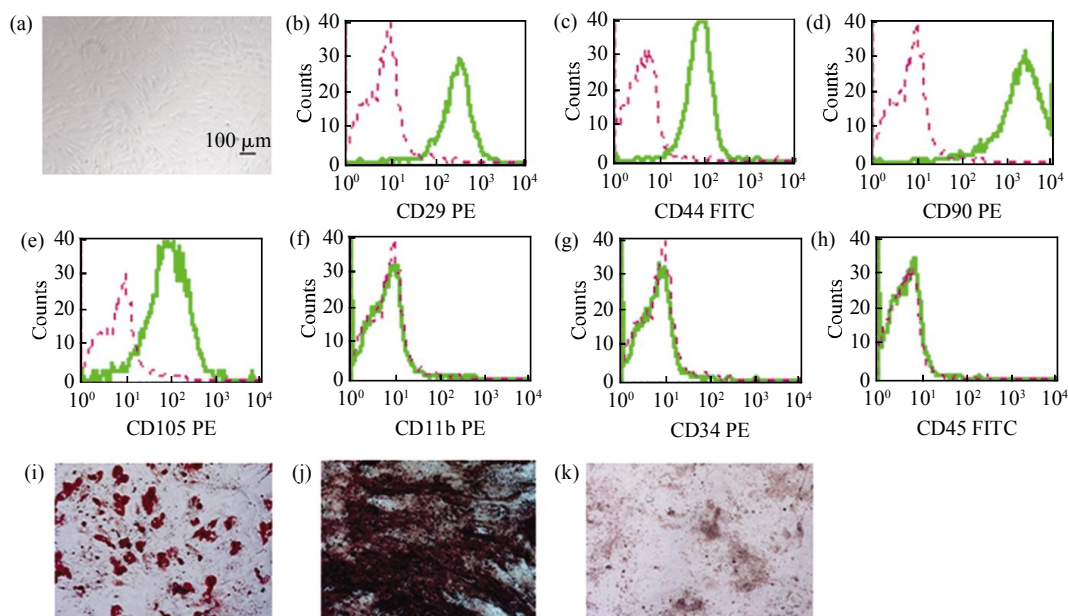


Fig. 1 Morphology and identification of MSCs from human bone marrow

The MSCs showed a morphology of typical fibroblast-like cells (a). Cell phenotype analysis showed that MSCs were positive for CD29, CD44, CD90, CD105 (b~e), but negative for CD11b, CD34 and CD45 (h~k). Multipotent differentiation of MSCs (i~k).

2.2 流式细胞术分选检测慢病毒感染的 MSCs

慢病毒转染 MSCs, 24 h 后于荧光显微镜下观察, 发现表达绿色荧光蛋白的细胞较少, 持续培养至 72 h 后, 表达 eGFP 的细胞逐渐增多. 为获得高表达慢病毒表达载体的细胞, 对感染 72 h 的 MSCs 进行流式分选, 获得强表达 eGFP 的细胞, 分选后的细胞于荧光显微镜下观察, 表达 eGFP 的细胞基本达 100%(图 2).

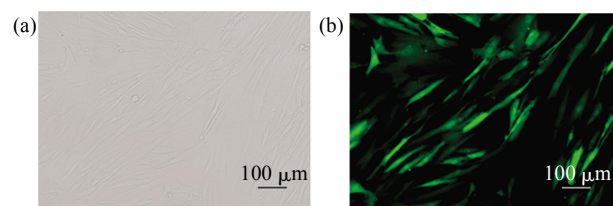


Fig. 2 eGFP expression of sorted transfected-MSCs

(a) The morphology of MSCs-eGFP in light field. (b) The morphology of MSCs-eGFP in fluorescence microscope.

2.3 小鼠的一般情况

照射后第 3 天可见 B 组小鼠出现弓背、脱毛, 精神及饮食欠佳, 活动减少, 腹泻导致肛周红肿、脱肛, 可见肉眼血便, 而 C 组小鼠较 B 组小鼠症状较轻(图 3). 便潜血试验显示 C 组小鼠较 B 组小鼠, 粪便潜血症状减轻(图 4).

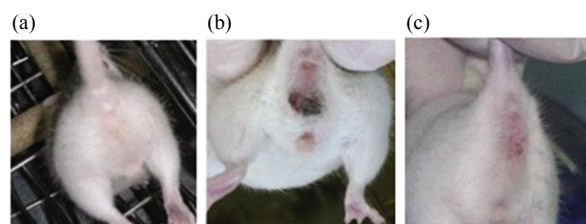


Fig. 3 Clinical findings of mice

(a) Control group. (b) Radiation group. (c) Treated group.

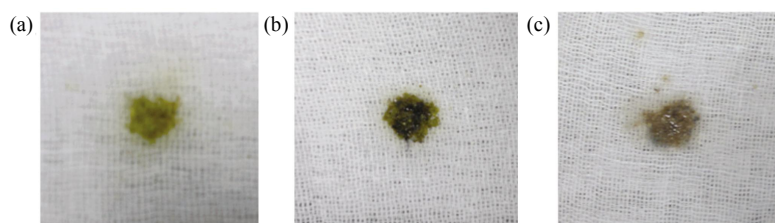


Fig. 4 Fecal occult blood tests

(a) Control group. (b) Radiation group. (c) Treated group.

2.4 小鼠的体重变化

由图 5 可见, 与 A 组相比 B 组小鼠体重下降显著, 具有统计学意义($*P < 0.05$), 而 C 组小鼠体重下降不明显, 与 A 组相比不具有统计学差异($P > 0.05$).

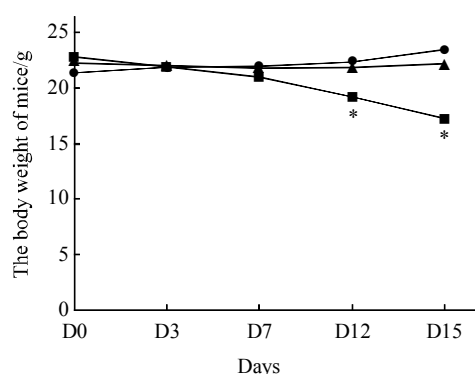


Fig. 5 The body weight change in mice

●—●: Control group; ■—■: Radiation group; ▲—▲: Treated group.

2.5 小鼠肠组织的病理学变化

解剖观察小鼠肠组织的标本, 肉眼可见: A 组小鼠肠管光滑, 色泽正常; B 组小鼠的肠壁肿胀、

颜色变暗且变粗或出血; C 组小鼠的症状较轻. 镜下观察与 A 组相比, B 组、C 组小鼠肠黏膜绒毛和腺体均受到损伤, B 组小肠绒毛宽大低平, 部分上皮脱落, 腺体萎缩, 隐窝缺失, 组织间有大量炎症细胞浸润, C 组小肠绒毛结构存在, 高度稍低于 A 组, 黏膜下层可见少量炎症细胞, 核分裂相增多 (图 6).

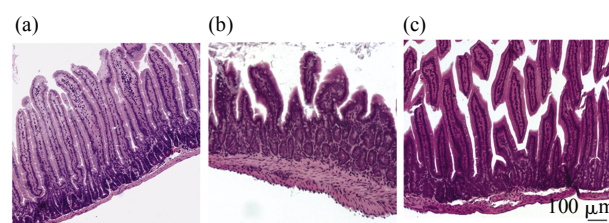


Fig. 6 Histological analysis of small intestines

(a) Control group. (b) Radiation group. (c) Treated group.

2.6 移植细胞的定植和分化检测

免疫荧光检测发现, C 组小鼠移植的 MSCs 可定植于受损肠道组织, vimentin 染色呈阳性 (图 7), 说明 MSCs 可向间质细胞分化, 并有部分表达 α -SMA, 提示 MSCs 可进一步向平滑肌细胞分化, 从而参与受损肠道的修复.

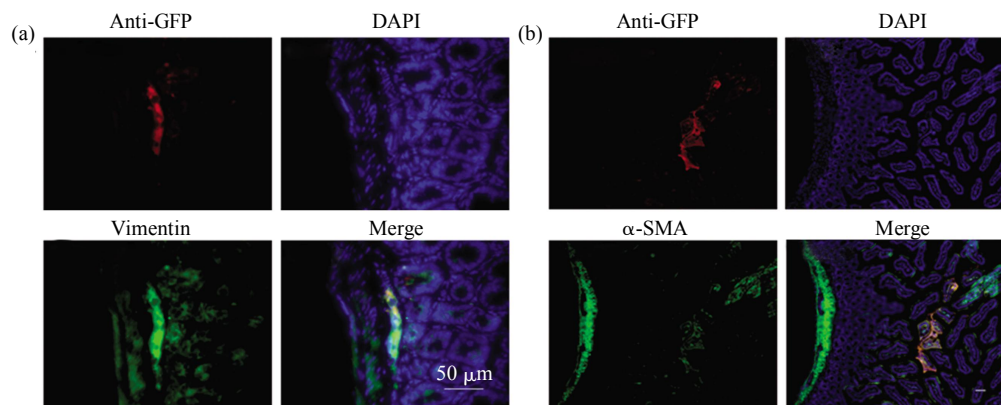


Fig. 7 Colonization and tissue-repairing effect of MSCs in radiation-induced intestinal

(a) The immunofluorescence staining for vimentin. (b) The immunofluorescence staining for α -SMA.

3 讨 论

放射性肠黏膜屏障损伤是由于腹盆腔受到电离辐射损伤后引起的。小肠隐窝存在着小肠上皮干细胞, 由于其生长代谢活跃, 对辐射极为敏感。机体受到一定剂量的射线辐射后, 小肠隐窝细胞增殖受到抑制、部分细胞发生变性坏死, 使绒毛上皮的更新缺乏来源, 进而破坏上皮结构的完整性, 导致肠屏障功能受损^[12]。放射性肠黏膜屏障损伤的发病机制复杂^[13-14], 目前尚未完全清楚。其主要病理改变为隐窝破坏、绒毛高度降低、黏膜萎缩、溃疡形成, 甚至肠瘘形成, 肠管粘连, 肠黏膜结构屏障受到破坏、易发生细菌移位、继发感染, 最终导致内源性败血症和多器官功能等并发症^[15-16]。MSCs 易于分离、培养和体外扩增, 具有多向分化潜能和低免疫原性及免疫调节能力, 使其在细胞治疗中具有良好的应用前景^[17-18]。本研究首先采用密度梯度离心法分离得到了人 MSCs, 其具有向脂肪和成骨分化的潜能。随后建立了 NOD/SCID 小鼠放射性肠损伤的动物模型, 可见辐射后小鼠出现弓背、脱毛现象, 精神及饮食欠佳, 活动减少, 体重下降, 腹泻导致肛周红肿、脱肛, 有的可见肉眼血便, 小肠组织的绒毛结构受到破坏, 黏膜下层及固有层可见炎症细胞浸润。以 GFP 为示踪蛋白, 将人 MSCs 通过尾静脉移植入放射性肠损伤的小鼠体内, 结果发现与模型组小鼠相比, 移植小鼠的体重下降不显著, 且一般状态良好。在重复实验中均发现移植的 MSCs 可在受损的小肠组织定植, 并表达 vimentin 和 α -SMA。vimentin 是细胞中间丝纤维的一种, 在间质细胞及其衍生细胞成纤维细胞中表达。 α -SMA 是沿微管组成细胞骨架的主要成分, 主要表达于平滑肌细胞中。这表明移植的 MSCs 在损伤的微环境下可在体内进一步向间质细胞分化, 在一定程度上参与了受损肠道的修复, 有可能为放射性肠损伤的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotons M C, *et al.* Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, **285**(3): 556-565
- [2] Scolapio J S, Ukleja A, Burnes J U, *et al.* Outcome of patients with radiation enteritis treated with home parenteral nutrition. *Am J Gastroenterol*, 2002, **97**(3): 662-666
- [3] Gavazzi C, Bhooi S, Lovullo S, *et al.* Role of home parenteral nutrition in chronic radiation enteritis. *Am J Gastroenterol*, 2006, **101**(2): 374-379
- [4] Vidal A, de la Cuerda C, Luis Escat J, *et al.* Chronic radiation enteritis after ovarian cancer: from home parenteral nutrition to oral diet. *Clin Nutr*, 2006, **25**(4): 701-704
- [5] Frisby C L, Fraser R J, Schirmer M B, *et al.* Role of muscarinic receptor subtypes in small intestinal motor dysfunction in acute radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, **293**(1): 121-127
- [6] Dong X J, Zhang H, Pan R L, *et al.* Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World J Gastroenterol*, 2010, **16**(26): 3267-3278
- [7] Lin X, Peng P, Cheng L, *et al.* A natural compound induced cardiogenic differentiation of endogenous MSCs for repair of infarcted heart. *Differentiation*, 2012, **83**(1): 1-9
- [8] Yeum C E, Park E Y, Lee S B, *et al.* Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, **1**(26): 1-13 (DOI: 10.1002/term.521.Epub)
- [9] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007, **25**(11): 2739-2749
- [10] Ringden O, Uzunel M, Rasmuson I, *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 2006, **81**(10): 1390-1397
- [11] Bernardo M E, Locatelli F, Fibbe W E. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, **1176**(1): 101-117
- [12] 赵元珍, 高春芳. 川芎嗪对大鼠急性放射性肠炎小肠的作用. *中国中西医结合外科杂志*, 2007, **13**(6): 229-231
- [13] Zhao Y Z, Gao C F. Chin J Tradit West Med, 2007, **13**(6): 229-231
- [14] Wang Y, Meng A, Lang H, *et al.* Activation of nuclear factor kappaB *in vivo* selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer Res*, 2004, **64**(17): 6240-6246
- [15] Khizhniak S V, Prokhorova A A, Stepanova L I, *et al.* Functioning of the antioxidant system in epithelial cells of small intestine under the influence of ionizing radiation of low dose rate. *Radiats Biol Radioecol*, 2011, **51**(6): 684-688
- [16] Villares J M, Zanuy M A, Rodrí guez S P, *et al.* Severe radiation-related enteritis: is home-based parenteral nutrition the best solution. *Nutr Hosp*, 2007, **22**(3): 382-384
- [17] Zimmerer T, Böcker U, Wenz F, *et al.* Medical prevention and treatment of acute and chronic radiation induced enteritis-is there any proven therapy?. *Z Gastroenterol*, 2008, **46**(5): 441-448
- [18] Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*, 2006, **8**(6): 559-561
- [19] Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*, 2007, **262**(5): 509-525

Protective Effects of Mesenchymal Stem Cells Against Radiation-induced Intestinal Injury*

YANG Chao¹⁾, ZHANG Xiao-Mei²⁾, GONG Yuan¹⁾, WANG Chang-Zheng¹⁾, HAN Ying^{3)**}, WU Ben-Yan^{1)**}

¹⁾ Gastrointestinal Department of Southern Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China;

²⁾ Department of Gastroenterology & Hepatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China;

³⁾ Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract The study was aimed to investigate the effects of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in the radiation-induced intestinal injury. MSCs were expanded, labeled with enhance green fluorescentprotein (eGFP). The NOD/SCID mice were randomly assigned to one of three groups: (A) without radiation; (B) and (C) received abdominal radiation with 5 Gy ⁶⁰Co γ -rays at the rate of 100 cGy/min. (B) i.v. transplanted with physiological saline, (C) i.v. transplanted with MSCs. Mice were weighed daily and observed for 15 days after irradiation. Intestines of mice were obtained in order to assay histological changes by hematoxylin and eosin staining. The immunofluorescence staining showed that the transplanted cells could differentiate into vimentin + α -SMA + fibroblastic-like cells *in vivo*. These data indicated that MSCs could engraft at the injured small intestine, and contribute to the repairment of irradiated intestine. This could provide a valuable strategy for radiation-induced enteritis.

Key words mesenchymal stem cells (MSCs), protective effects, radiation, intestine injury

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00306

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (B1070296) and The China Postdoctoral Science Foundation (2011M500155).

**Corresponding author.

HAN Ying. Tel: 86-10-66932200, E-mail: hanying1001@yahoo.com

WU Ben-Yan. Tel: 86-10-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

Received: June 21, 2012 Accepted: October 8, 2012