

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01015

骨髓间充质干细胞移植重建极重度放射损伤小鼠造血功能

刘凡凤,邱慧颖,解琳娜,章卫平,郑晓丽,高磊,王健民*

第二军医大学长海医院血液科,上海 200433

[摘要] 目的:探讨小鼠骨髓间充质干细胞(mouse bone marrow mesenchymal stem cell, mMSC)单独输注对重度放射损伤小鼠造血功能重建的影响。方法:将体外培养扩增的雄性 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞输注给受致死剂量全身照射(8 Gy)的雌性 C57BL/6 小鼠,检测移植后外周血象、骨髓有核细胞数、病理变化、粒-单核细胞系祖细胞集落(CFU-GM)计数及性染色体比例,以未输注 MSCs 的小鼠作对照。结果:对照组小鼠($n=6$)在照射后 20 d 内全部死于造血功能衰竭;MSCs 组移植后血象明显下降,但 2 周后迅速恢复,28 d 时恢复到照射前的 60%左右,42 d 外周血象基本恢复。MSC 促进骨髓有核细胞数及 CFU-GM 快速恢复,有利于骨髓组织学的明显恢复改善。移植后 42 d,仍可在受致死量照射的受体鼠内检测到供体 MSC,但不能长期植入。结论:小鼠骨髓间充质干细胞单独输注可促进重度放射损伤小鼠的造血功能恢复,其植入时间长短可能与输注的细胞量有关。

[关键词] 骨髓;间充质干细胞;放射损伤;造血系统

[中图分类号] R 818.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1015-05

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in reconstructing hematopoiesis function of mice with critical irradiation injury

LIU Fan-feng, QIU Hui-ying, XIE Lin-na, ZHANG Wei-ping, ZHENG Xiao-li, GAO Lei, WANG Jian-min*

Department of Hematology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (mMSC) infusion on the reconstruction of hematopoiesis function in mice with critical irradiation injury. **Methods:** Female C57BL/6 mice irradiated with 8 Gy ^{60}Co γ -rays were randomly divided into control group and mMSCs-treated group. Mice in the mMSCs-treated group received mMSC of male C57BL/6 mice. The peripheral leukocyte, platelet, and erythrocyte counts, the pathological lesions, granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM), and sex chromosome ratio were all examined. **Results:** All the animals in the control group ($n=6$) died of hematopoiesis exhaustion 20 days after irradiation. The peripheral leukocyte of mMSC-treated group decreased greatly after bone marrow transplantation and quickly recovered 2 weeks later; till 28 days after transplantation, it recovered to 60% of the pre-irradiation level. mMSCs infusion promoted the quick recovery of the nucleated bone marrow cells and CFU-GM, improving the marrow morphology. The transplanted mMSC could be detected in the recipients 42 days after transplantation. **Conclusion:** Solo-injection of mMSCs can enhance hematopoietic reconstitution in mice with critical irradiation injury. The period of imbedding is related to the dose of infusion.

[KEY WORDS] bone marrow; mesenchymal stem cells; radiation injuries; hematopoietic system

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(9):1015-1019]

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓基质细胞(脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞等)的共同前体细胞^[1],在体外易于传代扩增,且具有多向分化潜能^[1-2]。由骨髓基质细胞及细胞

外基质组成的造血微环境(hematopoietic microenvironment, HME)对造血干细胞自我更新及造血分化能力具有明显支持作用^[3]。由于 MSC 输注可改善因移植前预处理方案造成的 HME 严重损伤,因

[收稿日期] 2008-01-20 **[接受日期]** 2008-06-30

[基金项目] 国家“863”重大专项子课题(2002AA205051),上海市生物医药重大科技攻关项目(05DZ19327),上海市重大基础研究课题(03DJ14020)。Supported by Sub-project of the National “863” Key Subject(2002AA205051), the Key Science and Technology Project of Biological Medicine of Shanghai(05DZ19327), and the Key Basic Research Project of Shanghai(03DJ14020)。

[作者简介] 刘凡凤,硕士。E-mail:liufaner2003@163.com,现在无锡市南长区人民医院内科工作。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-25070545, E-mail:jmwang@medmail.com.cn

此可能对骨髓移植起到积极作用。研究结果表明 MSC 与造血干细胞共移植可促进造血干细胞的植入^[4],显著促进造血功能的恢复。但目前缺乏单独输注 MSC 对受体动物造血功能恢复影响的相关研究。本研究应用小鼠致死量全身照射模型,观察了 MSC 移植对极重度放射损伤小鼠造血功能重建的影响,以期放射损伤的救治提供新方法,并为造血干细胞移植的 MSC 造血支持提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 供体 C57BL/6(H-2b)小鼠,6 周龄,雄性,体质量(19.6±1.3)g;受体 C57BL/6(H-2b)小鼠,8 周龄,雌性,体质量(20.3±0.77)g,均购自上海生命科学院实验动物中心,饲养于第二军医大学实验动物中心 SPF 级动物室的层流架上,垫料、饲料及饮水全部经过消毒处理,受体小鼠从移植前 3 d 至移植后 14 d 给予庆大霉素饮水(225 U/L)。

1.2 小鼠 MSCs 的分离、培养、扩增与鉴定 参照文献^[5]方法进行相应操作。

1.3 照射和输注 给予受体小鼠⁶⁰Co 一次全身照射 8 Gy,源距 4 m,剂量率控制在 30 cGy/min。MSCs 组又分为 I、II、III 组(均 n=10),于照射后 6 h 内尾静脉输注 MSCs 0.4 ml,细胞数分别为 1×10⁶、2×10⁵、5×10⁴。照射对照组照射后不作处理(n=6)。

1.4 观察指标 (1)生存率;(2)第 3 日起首次球后静脉取血 20 μl(肝素抗凝,终浓度为 20 U/ml),此后从移植日算起,1 次/周,至 42 d,用血象分析仪(Sysmex K21)动态监测血象变化;(3)移植后第 10、28、42 日取小鼠的股骨,中性甲醛固定 24 h,换脱钙液 3~5 d 后,常规切片, H-E 染色观察其组织病理学改变;(4)另一根股骨用 RPMI 1640 培养液冲出骨髓制备单个核细胞悬液,计数骨髓有核细胞数。

1.5 骨髓细胞粒-巨噬细胞集落形成单位(CFU-GM)培养 CFU-GM 集落培养基:IMDM 培养液中含 30%血清、2 mol/L L-谷氨酰胺、1%牛血清白蛋白、100 μl 2-巯基乙醇、0.9%甲基纤维素、100 ng/ml 干细胞因子、20 ng/ml IL-3、20 ng/ml 粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μl,每组设 8 个平行孔。置 37℃、体积分数为 5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 14 d,计数各孔中细胞数>50 的集落数,取平均值。

1.6 染色体 R 显带技术分析受体小鼠骨髓性染色

体 参照文献^[5]处理,每组分析 2 只小鼠,每只分析 10~20 个核型。

1.7 统计学处理 数据用 SPSS 11.5 软件进行组间 t 检验,2 个以上样本的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 MSCs 移植对小鼠放射损伤的作用 照射后小鼠一般状态较差,少动、纳差,无脱毛、腹泻等症状,照射后 2~5 d 饮食活动明显减少,照射后 6~10 d,体质量明显减轻,平均减少(6.72±3.67)g;对照组小鼠在照射后 16~20 d 全部死亡,平均存活时间为(16.5±1.91) d,死亡前白细胞计数<0.5×10⁹/L,骨髓病理显示造血衰竭,表明预处理的照射剂量是致死性的;各 MSC 组小鼠在照射后 2 周一般状态逐渐恢复,体质量呈上升趋势,25 d 左右存活小鼠体质量平均恢复到(20.6±0.87)g(图 1)。3 个 MSCs 组观察期内的生存率分别为 100%(9/9)、90%(9/10)和 80%(8/10),3 组间无统计学差异。

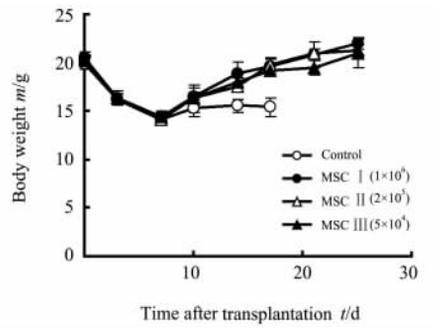


图 1 移植后小鼠体质量恢复情况
Fig 1 Body weight recovery after bone marrow transplantation(BMT)
n=10, $\bar{x} \pm s$

2.2 MSCs 移植对照射小鼠造血功能重建的影响 照射后各组小鼠外周血白细胞(WBC)、血红蛋白(Hb)、血小板(Plt)迅速减少,各 MSCs 组均于照射后 3 d 降至最低点(P=0.83)。对照组小鼠照射后外周血三系长时间维持在较低水平,7 d 及 14 d 时 WBC 分别为 0.47×10⁹/L 和 0.53×10⁹/L,并于 20 d 时全部死亡,死前 WBC 低于 0.5×10⁹/L, Hb 为(72±14.16)g/L,Plt 低于 100×10⁹/L,骨髓病理显示造血功能衰竭。各 MSCs 组照射后第 14 日 WBC、Plt 迅速恢复,第 28 日时恢复到照射前的 60%左右,第 42 日基本恢复到照射前水平,第 14、21 日时 MSC I 组 WBC 高于其他 2 个 MSCs 组(P=0.03),而在第 7、28、35、42 日与其他两组无统计学差异(P=0.05)。照射后第 28 日 Hb 基本恢复正常,照射后第 7、14、21、28、35、

42 日的 Hb 3 组均无差异 (P 值均 >0.05)。照射第 14 日后, Plt 逐渐恢复, 第 14 日时 MSC I 组 WBC 明显高于其他 MSCs 组 ($P=0.02$), 低剂量两组 MSC

组间无统计学差异, 第 21 日时 3 组间有统计学差异 ($P<0.05$), 而在照射后第 7、28、35、42 日 3 组间无统计学差异 (图 2)。

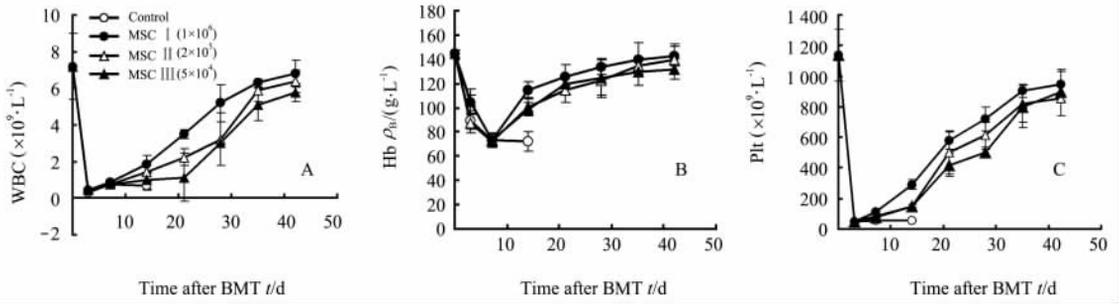


图 2 移植后小鼠白细胞(A)、血红蛋白(B)和血小板(C)的变化

Fig 2 Changes of WBC(A), Hb(B) and Plt(C) after BMT

$n=10, \bar{x} \pm s$

2.3 MSCs 移植后骨髓病理改变 照射后第 10 日, 对照组 (图 3A) 骨髓腔见髓窦充血、淤血, 造血组织明显减少, 仅在骨小梁周围有残存少量骨髓, 脂肪细胞充塞, 均死于骨髓衰竭; MSCs 组 (图 3B) 可见原始、幼稚细胞, 有多种造血细胞存在。照射后第 28

日 MSCs 组 (图 3C) 骨髓腔可呈现多处新生造血灶, 造血细胞较第 10 日明显增多, WBC、Hb、Plt 比例大致正常; 照后第 42 日 MSCs 组 (图 3D) 骨髓增生活跃, 可见 WBC、Hb、Plt 各期细胞, 各系比例正常。

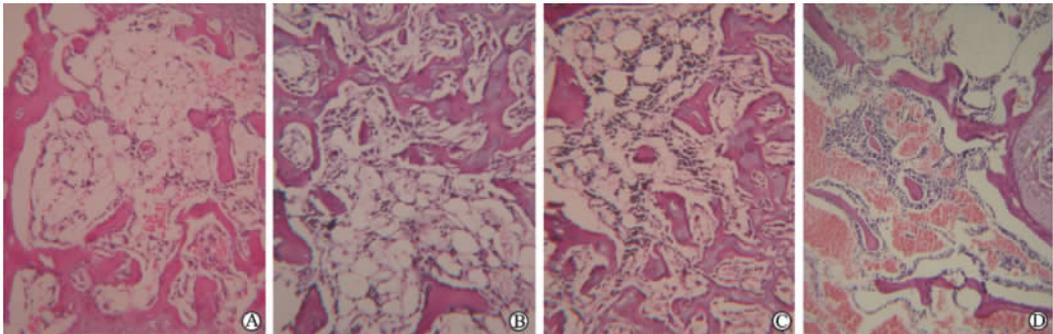


图 3 移植后骨髓的病理变化

Fig 3 Bone marrow pathology after BMT

A: Control group on day 10; B: MSC I group on day 10; C: MSC I group on day 28; D: MSC I group on day 42. Original magnification: $\times 100$

2.4 MSCs 移植后骨髓有核细胞计数及 CFU-GM 计数结果 输注后第 10 日, MSC I 组的骨髓有核细胞计数 (9.53) 明显高于 MSC II (4.26) 和 MSC III (4.00) 组 ($P<0.01$), MSC II 组和 MSC III 组差异无显著性, 且均明显高于对照组 (2.15, $P<0.01$); 输注后第 28 日及第 42 日, MSCs 组的骨髓有核细胞计数均回升, 3 组间无统计学差异。输注后第 10 日, MSC I、II、III 组 CFU-GM 计数 (6.13, 5.25, 5.00) 明显高于对照组 (1.00, $P<0.01$), 对照组形成的 CFU-GM 不仅计数少, 而且组成每个集落的细胞数目也少; 输注后第 28 日及第 42 日, CFU-GM 计数上升, 且 3 组间无统计学差异。图 4 显示了移

植后 12 d 时 CFU-GM 的生长情况。

2.5 MSCs 移植后在受体的植入成功率 输注后第 10 日, 各 MSCs 组在受体的骨髓均可查到供体来源的 Y 染色体 (图 5), MSC I 组植入可达 35%, MSC II 和 MSC III 组分别为 27%、17%。至移植后第 28 日, 除 MSC III 组外, MSC I 和 MSC II 两组中仍可查到供体来源的 Y 染色体, 植入率分别为 7.65%、6.3%。而在输注后第 42 日, 只有 MSC I 组可以查到供体来源的 Y 染色体, 植入率为 2.78%, 提示供体 MSC 能够在受体内生存一定时间, 但难以持久植入, 其植入比例可能与输注的 MSCs 数目有关。

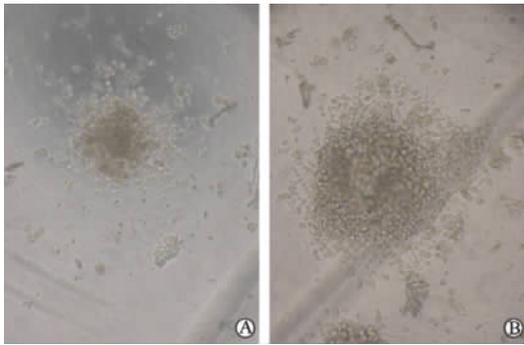


图4 CFU-GM移植后生长14 d时的情况

Fig 4 CFU-GM of two groups on day 14 after BMT

A: Control group; B: MSC III group. Original magnification: $\times 100$

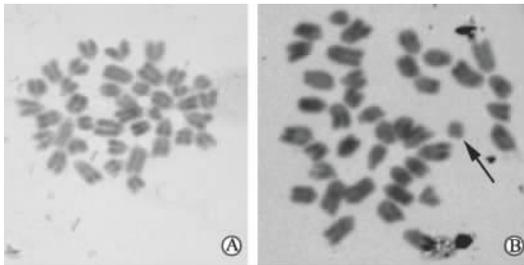


图5 移植后小鼠性染色体R显带分析结果

Fig 5 R lape of sex chromosome after BMT

A: Sex chromosome (XX) before bone marrow transplantation; B: Sex chromosome (XY) after bone marrow transplantation of MSC I group on day 42. Arrow shows Y lape. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

为达到简单、低成本获得高纯度小鼠骨髓间充质干细胞的目的,我们分别尝试采用 Ficoll (1.083 g/ml, 20°C 500 \times g 离心 10 min) 密度梯度离心法和 Percoll (1.082 g/ml, 20°C 500 \times g 离心 30 min) 密度梯度离心法,获得单个核细胞后直接贴壁;对全骨髓细胞进行红细胞裂解后直接贴壁,定期换液去除悬浮生长的造血细胞,但由于贴壁细胞数量较少,传代后细胞无法呈克隆样生长。因此,我们选用了全骨髓细胞法获得单个细胞,之后选用表面标记进行检测,结果提示小鼠骨髓间充质干细胞高表达 Sca-1、CD29、CD44、MHC I 类分子;中表达 CD13、CD90. 2 (Thy-1. 2, 在 C57BL/6 品系小鼠细胞中特异表达);低表达造血前体细胞标志 CD117 (c-kit)、CD45、Flk-1 (血管内皮生长因子受体)、MHC II 类分子,鉴定为高纯度的间充质干细胞。故我们的方法是将全骨髓贴壁法和克隆化培养相结合,能够达到低成本分离、纯化小鼠骨髓间充质干细胞的要求。应用上述方法,研究者在人类、大鼠、兔、

狒狒等多种哺乳动物中成功分离并鉴定出高纯度的间充质干细胞^[6]。

本研究建立了小鼠间充质干细胞移植模型, MSCs 组小鼠移植后白细胞、血红蛋白及血小板值均较照射对照稍高 ($P < 0.05$), 2 周后血象迅速恢复, 第 28 日恢复到照射前的 60% 左右, 证明间充质干细胞可减轻放射对小鼠的损伤, 加快照射后小鼠造血重建。有研究者^[7]将单个间充质干细胞移植到大鼠骨髓组织中, 发现它不但可以形成骨髓及血液细胞, 而且还可以进入肝、肺、皮肤、胃及肠等组织中, 并分化为相应组织类型的成熟细胞。他们认为, 间充质干细胞内存在有几套可以向几种终末细胞分化的储备基因, 当某种因素在一定条件下对它进行作用时, 就会诱导相应系列基因的表达, 使细胞向这一方向分化。然而, 他们将单个间充质干细胞移植到接受致死性照射的大鼠体内没有发现造血重建, 可能与照射后体内残存的造血干/祖细胞数量有关; 另外, 植入间充质干细胞的数量及其与体内残存的造血干/祖细胞数量的比例也是重要的影响因素。Drouet 等^[8]得出了相似的实验结果, 他们将致死性照射前收集的狒狒自体外周血干/祖细胞给予 2.5 Gy 照射后在含有抗细胞凋亡因子和间充质干细胞的无血清培养基中体外扩增 1 周后移植入动物体内, 结果显示: 体外扩增的 CD34⁺ 细胞以 $0.75 \times 10^6/g$ 和 $1.0 \times 10^6/g$ 与间充质干细胞共输注时显示了一个稳定的长期植入; 当输注的 CD34⁺ 细胞数量减少到 $0.4 \times 10^6/g$ 时造血恢复不确定, 然而与未经照射的单独移植组 ($0.5 \sim 1$) $\times 10^6/g$ 相比较, 共移植组明显加速血小板恢复。这项研究显示, 间充质干细胞能明显促进造血干/祖细胞造血重建, 其作用与体内残存的造血干/祖细胞数量成正比。

有实验证明, 辐射对骨髓基质细胞和造血微环境造成一定损伤, 并且恢复相当缓慢。骨髓型放射病骨髓损伤主要以细胞凋亡为主^[9]。鞠桂芝等^[10]观察 2 Gy 以上照射的小鼠骨髓均出现 G₁ 期、G₂/M 期阻滞及 DNA 合成抑制^[10]。另有实验表明, 虽然辐射损伤后体内细胞因子表达有一过性增高, 但由于辐射对细胞因子的受体损伤和细胞因子受体的耐受性提高, 使细胞因子数量相对不足, 而输入的骨髓间充质干细胞已经过体外实验证实可以分泌大量造血细胞生长因子, 弥补了体内细胞因子的不足。胡锴勋等^[11]的研究提示, 骨髓间充质干细胞通过其分泌的细胞因子抑制照射后 p53 蛋白表达, 促使细胞跳出 G₀/G₁ 阻滞, 加速 DNA 合成和有丝分裂, 减少细胞凋亡, 促进造血细胞增殖。

本研究的骨髓有核细胞计数及粒-巨噬细胞集落形成单位结果显示,骨髓有核细胞及粒系祖细胞辐射敏感性较高,下降迅速,但恢复也较快,MSCs组在辐射后第10日集落数均明显高于照射对照组($P < 0.05$),而且每个集落的细胞数比对照组多($P < 0.01$),提示骨髓间充质干细胞通过改善微环境和分泌细胞因子促进造血功能恢复。Katritsis等^[12]把10周龄胎儿的骨髓间充质干细胞在体外培养到第3代,经照射后,将人的脐血CD34⁺细胞(5×10^8 /管)加入,发现脐血干细胞在其中能生长到8周以上,并持续有粒-巨噬细胞集落形成单位,对照组中不加骨髓间充质干细胞,则干细胞培养2周后全部死亡,进一步将胎龄为3、6、9个月的骨髓间充质干细胞进行比较,3个月胎龄的骨髓间充质干细胞支持造血干细胞扩增能力最强。然而,Mourcin等^[13]从狒狒中分离的外周血CD34⁺细胞经照射4 Gy (⁶⁰Co),接种在含有干细胞因子(SCF)、FLT3 ligand(50 ng/ml)、促血小板生成素(TPO)和白介素-3(IL-3)的无血清培养基中,培养7 d后与MSC共输入动物体内,与单独培养组相比较,经过照射的共培养组体内发现了CD34⁺、CD34⁺、CD34⁺/Thy-1⁺、CD41⁺和MPO⁺细胞和超过正常14倍的红系集落形成单位。他们的研究显示间充质干细胞与CD34⁺细胞共培养能大大加速放射损伤后受体的造血功能恢复;研究还显示了间充质干细胞主要是通过减少细胞的凋亡和细胞与细胞间的直接接触而不是通过分泌可溶性细胞因子来发挥作用的。因此,间充质干细胞输注可能是极重度放射损伤干细胞支持治疗的重要手段,值得进一步研究。

综上所述,骨髓间充质干细胞对极重度放射损伤小鼠造血功能重建有一定的促进作用,这将为骨髓间充质干细胞临床应用于治疗一些血液系统恶性疾病提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284:143-147.
- [2] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418:41-49.
- [3] Torok-Storb B, Holmberg L. Role of marrow microenvironment in engraftment and maintenance of allogeneic hematopoietic stem cells[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1994, 14 (Suppl 4): S71-S73.
- [4] Fibbe W E, Noort W A. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 996:235-244.
- [5] 龚胜蓝, 薛永权, 王健民, 韩凤来, 许燕群, 李津婴. 二例伴有 i (20q-) 重复的骨髓增生异常综合征的临床和实验研究[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 1:35-37.
- [6] Lipsic E, van der Meer P, Voors A A, Westenbrink B D, van den Heuvel A F, de Boer H C, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20:135-141.
- [7] Mohyeddin-Bonab M, Mohamad-Hassani M R, Alimoghaddam K, Sanatkar M, Gasemi M, Mirkhani H, et al. Autologous *in vitro* expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction[J]. *Arch Iran Med*, 2007, 10:467-473.
- [8] Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Delaunay C, Mayol J F, Lataillade J J, et al. Mesenchymal stem cells rescue CD34⁺ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality[J]? *Bone Marrow Transplant*, 2005, 35: 1201-1209.
- [9] 彭瑞云, 王德文, 熊呈琦, 高亚兵, 杨红, 崔玉芳, 等. 辐射诱导骨髓细胞凋亡及相关基因表达研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2001, 21:19-20.
- [10] 鞠桂芝, 马淑梅, 刘树铮, 付士波, 刘树铮. 不同剂量 X 射线照射的细胞周期效应[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, 23:415-417.
- [11] 胡锴勋, 孙琪云, 艾辉胜, 范传波, 黄雅静, 郭梅, 等. 间充质干细胞治疗急性骨髓型放射病的实验研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25:221-224.
- [12] Katritsis D G, Sotiropoulou P, Giazitzoglou E, Karvouni E, Pampamichail M. Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells[J]. *Europace*, 2007, 9:167-171.
- [13] Mourcin F, Grenier N, Mayol J F, Lataillade J J, Sotto J J, Hérodin F, et al. Mesenchymal stem cells support expansion of *in vitro* irradiated CD34⁺ cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims[J]. *Radiat Res*, 2005, 164:1-9.

[本文编辑] 尹茶