

• 论 著 •

猕猴异体间充质干细胞输注安全性评价及异体存活分析

刘丽辉¹, 孙琪云¹, 胡锴勋¹, 范传波¹, 黄雅静¹, 郭梅¹, 孙昭², 赵春华², 艾辉胜^{1*}

(1. 军事医学科学院附属医院内一科, 北京 100039; 2. 中国医学科学院基础医学研究所组织工程中心, 北京 100073)

[摘要] **目的:**探讨经静脉或骨髓内输注异体猕猴间充质干细胞(MSCs)的安全性以及异体 MSCs 是否能归巢骨髓并长期存活。**方法:**用密度梯度离心和贴壁筛选法分离、培养猕猴骨髓中的 MSCs, 观察其生物学特性。用流式细胞仪检测 MSCs 的细胞表型, 采用不同培养条件诱导多向分化, 用特异性染色鉴定; 将雄性猕猴的 MSCs 经静脉输注或骨髓内输注给雌性猴, 评价其不良反应和移植物抗宿主病(GVHD)表现, 用 PCR 法检测受者骨髓中的 Y 特异性序列, 评价 MSCs 在异体存活情况。**结果:**成功培养了猕猴的 MSCs, 多向分化实验证明其可分化为脂肪和成骨细胞; 输注后未见急、慢性毒性反应和 GVHD 表现, 部分雌性猕猴体内可检出 Y 特异性序列。**结论:**猕猴异体静脉或骨髓内输注 MSCs 未见急、慢性不良反应和 GVHD, MSCs 可在异体骨髓内存活。

[关键词] 间充质干细胞; 骨髓移植; 输注, 骨髓内; 输注, 静脉内

[中图分类号] R 392.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0263-04

Safety evaluation of allogenic rhesus mesenchymal stem cells infusion and detection of chimerism

LIU Li-hui¹, SUN Qi-yun¹, HU Kai-xun¹, FAN Chuan-bo¹, HUANG Ya-jing¹, GUO Mei¹, SUN Zhao², ZHAO Chun-hua², AI Hui-sheng^{1*} (1. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Academy of Military Medicine Science, Beijing 100039, China; 2. Center of Tissue Engineering, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100073)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the safety of intravenous (IV) and intra-bone marrow (IBM) infusion of allogenic rhesus mesenchymal stem cells (MSCs), and study the allogenic MSCs homing and living. **Methods:** MSCs were isolated and cultured; their biological characteristics were studied. The phenotypes of MSCs were detected by flow cytometry and the differentiated cells were identified with relevant specific staining. MSCs from male rhesus monkeys were infused into female rhesus monkeys via IV or IBM and the toxicity and graft-versus-host disease (GVHD) were evaluated. Y special sequence in recipients bone marrow was analyzed by polymerase chain reaction to evaluate the survival of MSCs. **Results:** Rhesus MSCs were successfully cultivated and they were capable of differentiating into lipocyte and osteoblast. No toxicity and GVHD were found by infusion of MSCs, and Y special sequence was detected in some recipient bone marrow. **Conclusion:** These data show that allogenic rhesus MSCs are not associated with significant toxicity and GVHD and are capable of establishing residence within the bone marrow following infusion via IV or IBM.

[KEY WORDS] mesenchymal stem cells; bone marrow transplantation; infusions, intraosseous; infusions, intravenous

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 263-266]

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种具有多向分化潜能的干细胞, 易分离、培养, 经多代扩增后仍保持干细胞活性, 可以分化为多种细胞, 具有支持造血的能力和特殊的免疫学特性, 在造血重建、组织修复、基因治疗等方面有广阔的临床应用前景。猕猴是与人最接近的非人灵长类之一, 是研究移植的最好模型。本研究观察了猕猴骨髓来源 MSCs 的生物学特性, 评价了异体 MSCs 输注的安全性和骨髓内存活情况, 为以后的移植模型和临床应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 由中国军事医学科学院动物中心

购进无关健康成年猕猴 7 只, 年龄 2~6 岁, 体质量 2~8 kg, 雄性 3 只, 雌性 4 只, 动物合格证号 SCXK-(军)2002-001。以雄性作为供者, 雌性作为受者, 雌雄配对 (部分受者用同一雄性供者)。

1.2 MSCs 的分离和培养 速眠新 0.1 ml/kg 肌注麻醉, 每次从猴股骨穿刺抽取骨髓约 5 ml, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分层液 (密度 1.077 g/ml) 离心分离 (400×g, 30 min), 取白膜以上细胞部分, PBS 洗

[基金项目] 国家高新技术发展规划 (“863” 计划) 课题 (2002AA216081)。

[作者简介] 刘丽辉 (1971-), 女 (汉族), 博士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: aihs307@medmail.com.cn

2次,用DMEM/F12、40%MCDB-201、2%胎牛血清(Gibco BRL,美国)培养液,置37℃,5%CO₂培养箱培养,48h后弃去非贴壁细胞,以后每3d半量换液。当细胞达80%~90%融合时,0.125%胰酶(Sigma,美国)常规消化传代到第2代,细胞长到80%融合后消化冻存。当细胞达到要求数目后复苏,生理盐水洗2次,计数,锥虫蓝拒染法判断细胞活性在95%以上,重悬于生理盐水中备用。将每次培养MSCs的上清液进行细菌、真菌培养,PCR进行支原体检测。

1.3 MSCs的细胞表型鉴定 用流式细胞术检测MSCs的细胞表型,简述如下:用直接免疫荧光法检测猕猴骨髓来源的MSCs的细胞表型。为检测细胞表面抗原,将第5代MSCs用胰酶消化后,用含0.5%牛血清白蛋白的PBS洗2次,加入鼠抗人CD29、CD33、CD34、CD44、CD45、CD105、CD166单抗(BD公司),4℃孵育30min。为检测细胞内抗原Flk-1,将细胞用1%多聚甲醛4℃固定15min,并在室温下用0.1%的皂角素透膜1h,加入Flk-1单抗,4℃孵育30min。细胞用PBS洗2次,并悬浮在500μl的PBS中,选用同种同型非相关IgG抗体作为阴性对照,上流式细胞仪检测。

1.4 体外诱导分化 当第3代细胞达80%融合时,以5×10³/cm²接种于25cm²培养瓶和直径6cm的培养皿。成骨分化体系为10⁻⁷mol/L地塞米松、10mol/Lβ-磷酸甘油、0.05mol/L维生素C和10%FCS的IMDM;脂肪分化体系含10⁻⁶mol/L地塞米松、0.5mmol/L3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx)、0.1mmol/L维生素C和10%FCS的IMDM。在第4、第8、第12和第16天检查钙化小结、脂肪滴,做Von Kossa染色、油红O染色。

1.5 MSCs的体内输注 猕猴分为2组:静脉输注组(2只)和骨髓内输注组(2只)。静脉输注组:将猕猴固定,选取上肢或下肢静脉建立静脉通路,输注生理盐水,将培养的MSCs过4号针尖(防止细胞团),从静脉输入(去除滤器),再用生理盐水冲管。骨髓内输注:将受体猕猴用速眠新0.05ml/kg肌注麻醉,从猴股骨下段穿刺,抽取骨髓约0.5ml,将重悬于0.5ml生理盐水的MSCs骨髓内注入,再注入0.5ml生理盐水,拔除骨穿针,局部压迫5min止血。

1.6 急、慢性毒性反应和GVHD观察 输注后观察心率、呼吸、血压、体温、皮疹、精神、大小便等,以后每周查血常规、肝肾功能,观察有无急、慢性毒性反应和GVHD表现。

1.7 异体输注后Y特异性序列的检测 异体输注后抽取1h、2h、4h、8h、24h、2d、7d、14d、28d、60d的外周血,1d、7d、14d、30d、60d的骨髓,检测Y特异性序列;7d、14d、30d、60d抽取骨髓(骨髓内输注组抽取注入侧和对侧股骨)约3ml,再次培养MSCs,检测Y特异性序列,参考文献[1]进行,简述如下:提取基因组DNA,用Y特异性引物(上游序列:5'-GAA AGA ACA TAA AGG ACC TA-3';下游序列:5'-GGT AGA ATT AAT ATG ACC TAA G-3')进行PCR扩增,雄性供体DNA标本作为阳性对照,未进行MSCs输注的雌性猕猴DNA标本和不加DNA模板的反应体系作为阴性对照。反应条件:96℃变性2min后,94℃变性1min、50℃退火1min、72℃延伸1min共30个循环,最后72℃延伸7min。扩增产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色、凝胶成像分析仪扫描分析。敏感性实验:人工调整雄性和雌性DNA浓度为不同比例,扩增Y特异性序列,检测本实验的敏感性为0.05%左右。

2 结果

2.1 MSCs的生物学特性 采用含2%FCS的DMEM/F12、40%MCDB-201培养液培养的猕猴骨髓单个核细胞,大部分细胞于24h内即贴壁,倒置显微镜下可见贴壁细胞呈圆形,有小的胞质突起。72h后,大多数细胞有胞质突起,部分呈梭形,1周后以梭形细胞为主,胞质丰富,核大,核染色质细,核仁明显,细胞呈平行或漩涡状生长,见图1。猕猴的MSCs较人的稍粗短,连续传代10代形态无明显改变。将培养MSCs的上清液进行细菌、真菌培养,PCR检测支原体均为阴性。

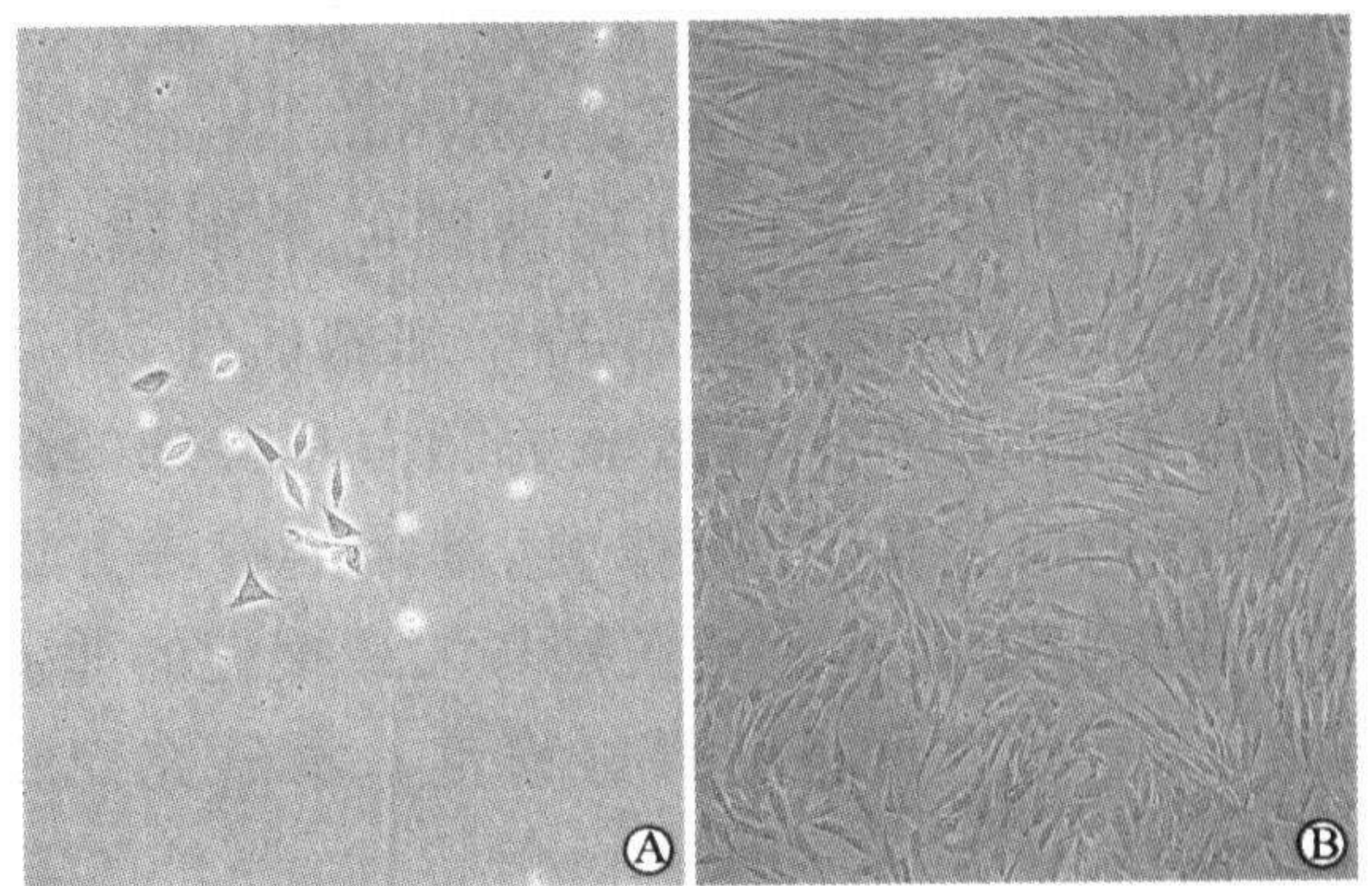


图1 倒置显微镜下猕猴MSCs的形态

Fig 1 Morphologic feature of rhesus MSCs(×100)

A: 3 d after culture; B: 9 d after culture

用流式细胞术检测培养第5代MSCs的细胞表

型: MSCs 特异性抗原高表达 (Flk-1: 73.71%, CD29: 99.81%, CD105: 84.0%, CD166: 84.2%, CD44: 30.66%), 造血系抗原低表达 (CD33: 0.21%, CD34: 0.08%, CD45: 4.28%), 见图 2。MSCs 向成骨分化过程中, 细胞形态发生明显变化, 纺锤形的突起逐渐消失, 胞体增大, 形态近方形或多

边形, 部分细胞呈聚集生长, 随细胞生长密度的增长形成多层的结节结构, 逐渐形成 Von Kossa 阳性的骨结节。在脂肪诱导体系中, 可见细胞由成纤维样逐渐缩短, 胞质中逐渐出现脂肪滴, 脂肪滴逐渐增大、增多, 充满整个细胞胞质, 油红 O 染色可见红色的脂肪颗粒, 见图 3。

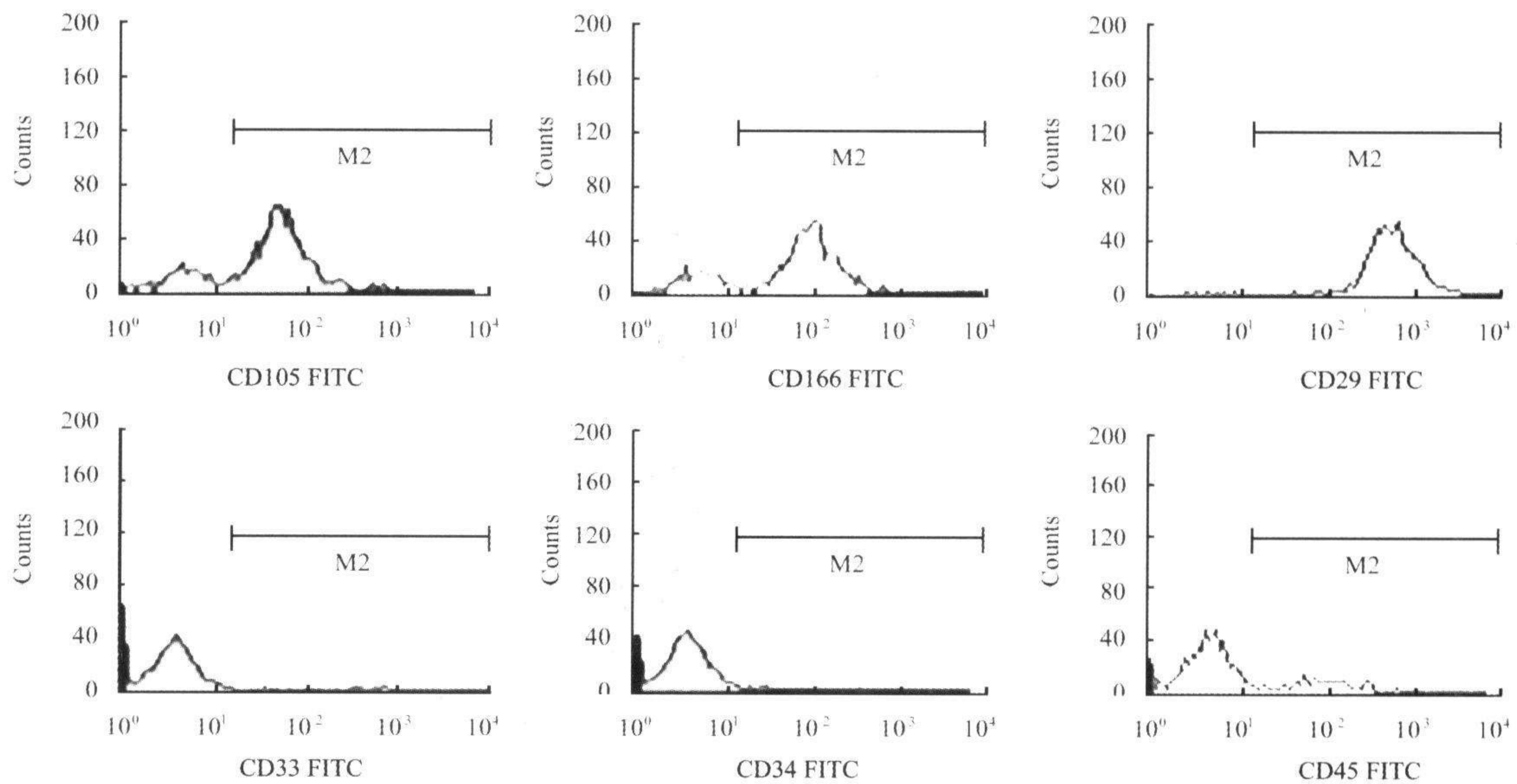


图 2 流式细胞术检测猕猴 MSCs 的细胞表型

Fig 2 Phenotype of rhesus MSCs by flow cytometry

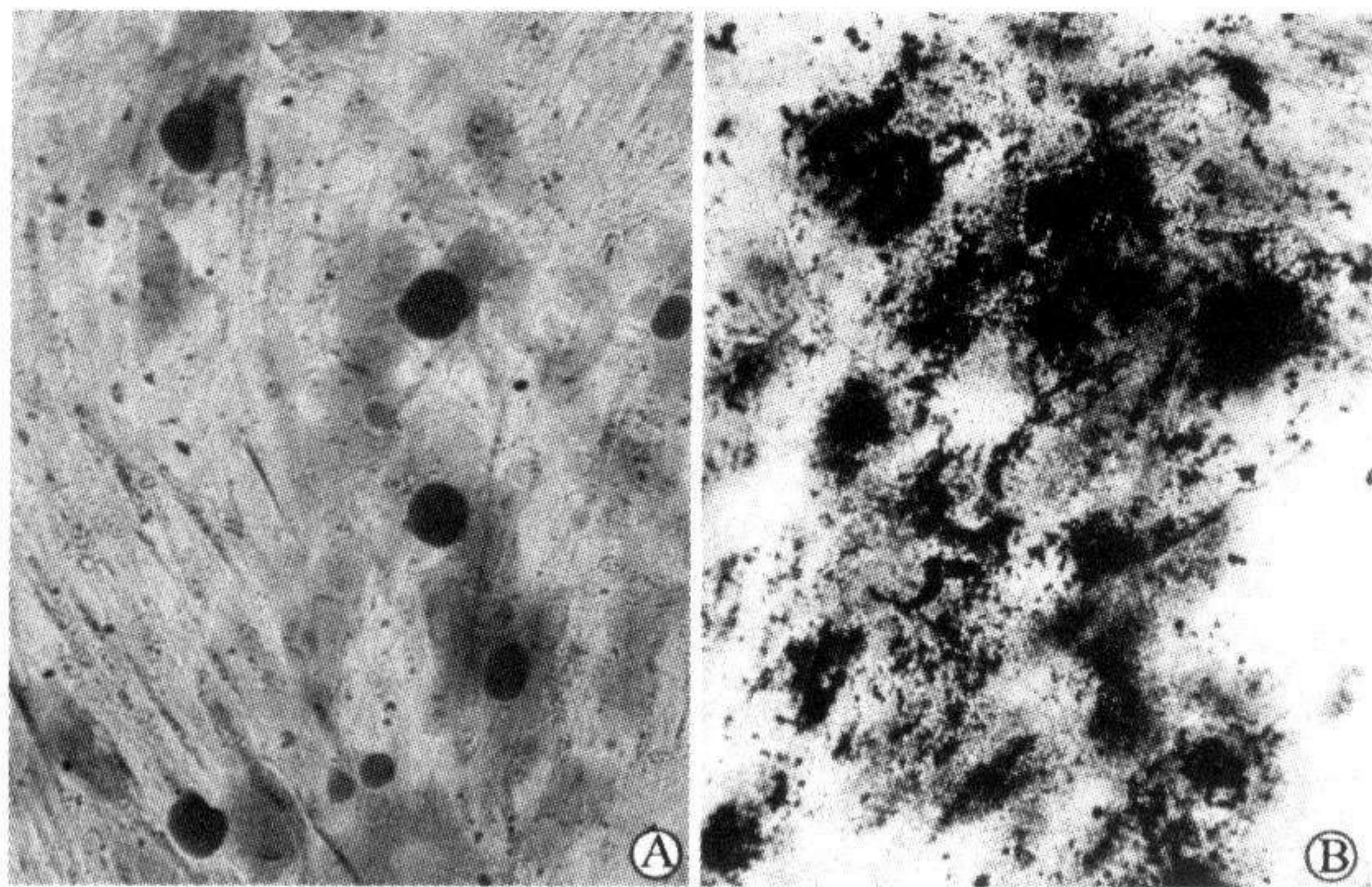


图 3 MSCs 向脂肪细胞分化(A)和成骨细胞(B)分化

Fig 3 MSCs differentiating into

lipocyte (A, $\times 200$) and osteoblast (B, $\times 400$)

2.2 MSCs 的输注实验 异体 MSCs 经静脉输注、髓内输注后, 观察心率、呼吸、血压、体温、皮疹、精神、大小便等, 随后观察 2 个月血常规、肝肾功能, 均未见明显变化, 未见急、慢性毒性反应和 GVHD 表现, 注射局部未见红肿, 下肢活动无障碍。

2.3 异体输注 MSCs 后 Y 特异性序列的检测 异体静脉输注 2 例, 细胞数分别为 $4 \times 10^5/\text{kg}$ (例 1) 和 $1 \times 10^6/\text{kg}$ (例 2), 均未检出 Y 特异性序列扩增, 考

虑到全身照射 (TBI) 后骨髓损伤可能有利于 MSCs 的归巢, 将例 1 第 1 次输注后 60 d 用 ^{60}Co 全身照射 2 Gy, 再次静脉输注 MSCs $2 \times 10^6/\text{kg}$, 在输注后 1 h 外周血和输注后 30 d 骨髓中检出 Y 特异性序列, 余时间点未检出 Y 特异性序列, 见图 4。异体骨髓内输注 2 例, 细胞数分别为 $4 \times 10^5/\text{kg}$ (例 3) 和 $1.8 \times 10^6/\text{kg}$ (例 4), 例 3 未检出 Y 特异性序列, 例 4 在输注后 30 d、60 d 骨髓检出 Y 特异性序列, 余时间点未检出。输注后 7 d、14 d、30 d、60 d 再次抽取受者骨髓培养的 MSCs, 生长良好, 但均未检出 Y 特异性序列。

3 讨论

MSCs 是一种具有多向分化潜能的干细胞, 在造血干细胞移植中, MSCs 可增加造血细胞植入率、促进造血恢复、抑制免疫, 防治 GVHD, 具有广阔的应用前景^[2,3]。

本研究用密度梯度离心和贴壁筛选法分离培养的猕猴 MSCs, 形态为典型的成纤维细胞样, 比人的 MSCs 稍短粗, 细胞表型测定为高表达 CD29、CD105、CD166、Flk-1 等 MSCs 特异性标志, 低表达

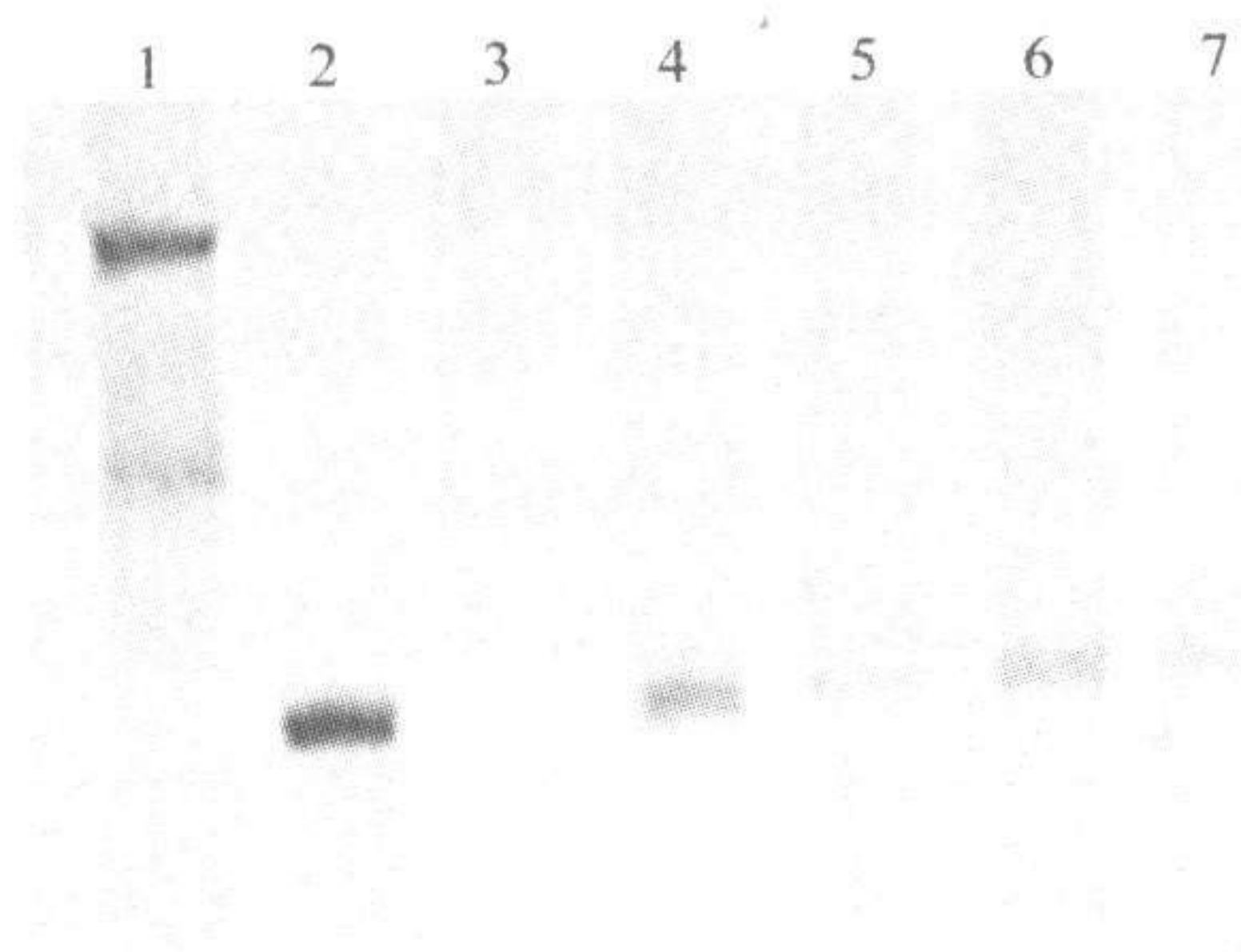


图4 MSCs的异体输注后Y特异性序列的检测

Fig 4 Y sequence detection after infusion of allogenic MSCs

1: Marker, 250 bp; 2: Postive control; 3: Negtive control; 4: Case 1 after 2 Gy irradiation, 30 d bone marrow; 5: Case 1 after 2 Gy irradiation, 1 h peripheral blood; 6: Case 4 30 d bone marrow; 7: Case 4 60 d bone marrow

CD33、CD34、CD45等造血细胞标志,与文献报道人的MSCs表型相似^[4],但CD44表达较低,可能与鼠抗人CD44单抗与猕猴的交叉性不好有关;猕猴MSCs的Flk-1高表达,与我们实验室用2%的低血清培养的人、小鼠MSCs表型一致,我们以前的实验证明Flk-1阳性的小鼠MSCs可重建致死照射小鼠的造血,说明其可能为具有更高分化潜能的干细胞。多向分化实验证明猕猴MSCs可分化为脂肪和成骨细胞,也证明其具有干细胞特性。

最近文献报道, MSCs表达MHC-I类抗原,但仅表达极少量的MHC-II和FasL,不表达共刺激因子B7-1、B7-2、CD40、CD40L等,因此,免疫原性弱,可跨越MHC屏障, MHC不相合的异体输注无毒性反应和GVHD表现,可在异体体内存活^[5]。本研究在猕猴实验中取得同样的结果,无论静脉输注或骨髓内注入均未见急、慢性毒性反应和GVHD表现。本研究在静脉和骨髓内输注组均有部分猕猴检出Y特异性序列,最长在60 d检出,说明MSCs可能在异体骨髓内存活。

Gao等^[6]报道小鼠骨髓来源的MSCs经静脉输注后,容易阻留于肺循环,影响其归巢骨髓,因为MSCs细胞体积比最小的肺毛细血管直径还大; Ikehara^[7]曾报道将异体动物的骨髓细胞直接注入受者骨髓可重建造血,效果优于静脉输注,并且经骨髓输注的供者造血细胞可以最终分布到全身的骨髓。因此本研究评价了MSCs经骨髓内输注的安全性,并进一步检测其在异体骨髓的存活情况,试图探讨经骨髓输注是否优于静脉输注;结果经骨髓输注MSCs的猕猴,在30 d、60 d用Y特异性序列检测

为阳性,而经静脉输注组输注同样的细胞数未能检出,考虑经骨髓输注可能有利于MSCs归巢骨髓,而经静脉输注的MSCs,可能部分阻留于肺循环,不能完全归巢骨髓。例1在2 Gy照射后30 d检出Y特异性序列,说明照射可能有利于MSCs的植入,与文献报道一致^[8]。另外,本实验例数尚少,输注的细胞数较少,实验的敏感性有限, MSCs输注后可能在体内分布不均匀,都可能导致异体MSCs的不能检出,需要进一步的实验证明。

总之,本研究成功分离、培养了猕猴的MSCs,在非人灵长类猕猴证明MSCs经静脉输注、骨髓内输注均安全,未见急、慢性不良反应和GVHD发生,经骨髓输注可能有利于在异体骨髓内植活,为临床应用MSCs奠定了基础。

[参考文献]

[1] Reitsma MJ, Harrison MR, Pallavicini M, et al. Detection of a male-specific sequence in nonhuman primates through use of the polymerase chain reaction[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1993, 64(3-4): 13-16.
 [2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
 [3] MacMillan ML, Ramsay NKC, Atkinson K, et al. Ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood: result of a phase I-II clinical trial[J]. *Blood*, 2002, 100(Suppl): 836a.
 [4] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
 [5] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non-human primates[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2999-3001.
 [6] Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion[J]. *Cells Tissue Organs*, 2001, 169(1): 12-20.
 [7] Ikehara S. New strategies for BMT, organ transplantation, and regeneration therapy[J]. *Hematology*, 2003, 8(2): 77-81.
 [8] Polchert D, Moadsiri A, Napoles P, et al. Mesenchymal stem cells can facilitate engraftment across MHC barriers and can rescue lethally irradiated recipients[J]. *Blood*, 2002, 100(Suppl): 108a.

[收稿日期] 2004-08-10

[修回日期] 2004-11-25

[本文编辑] 孙岩