

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.011

骨髓单个核细胞移植对大鼠溃疡性结肠炎的作用*

陈刚¹ 邱冰² 颜玉¹ 鲍秀琦¹ 韩宇鹏¹ 吴宇¹ 王雪¹ 姜威^{1Δ}

(1 佳木斯大学附属第一医院 黑龙江 佳木斯 154002; 2 黑龙江省医院 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的:探讨同种异体骨髓单个核细胞(BM-MNCs)移植大鼠溃疡性结肠炎模型的作用。**方法:**将 DAPI 标记的同种异体大鼠骨髓单个核细胞(BM-MNCs)经尾静脉注射移植到大鼠溃疡性结肠炎(UC)模型体内(模型组),以尾静脉注射等量 PBS 的 UC 大鼠作为对照组。光镜观察大鼠结肠组织病变改变,荧光显微镜观察标记 DAPI 的 BM-MNCs 在结肠组织中的定植及分布情况,免疫荧光检测 BM-MNCs 中 CK19、CD34 的表达情况。**结果:**移植组大鼠结肠组织可见新生黏膜上皮及腺体,黏膜下有新鲜至成熟肉芽组织生成,明显优于对照组;移植 14 天,大鼠结肠组织中可观察到 DAPI 标记的 BM-MNCs 细胞;DAPI 标记的细胞可表达血管内皮细胞特异性表达蛋白 CD34 或黏膜上皮细胞特异性表达蛋白 CK19。**结论:**BM-MNCs 可向受损病变部位结肠组织迁移和定植,且分化为血管内皮细胞和黏膜上皮细胞。

关键词:骨髓单个核细胞;溃疡性结肠炎;迁移;分化

中图分类号:R-33;R574.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-53-04

Effect of BM-MNCs Transplantation on the Ulcerative Colitis in Rats*

CHEN Gang¹, QIU Bing², YAN Yu¹, BAO Xiu-qi¹, HAN Yu-peng¹, WU Yu¹, WANG Xue¹, JIANG Wei^{1Δ}

(1 The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154002, China;

2 Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) transplantation on the ulcerative colitis in rats. **Methods:** BM-MNCs labeled with DAPI were transplanted into UC rat (model group) through caudal vein, the rats injected with the same amount of PBS were used as the control group. The pathological changes of colon tissues was observed by light microscope; and the planting and distributed conditions of the BM-MNCs labeled DAPI in colon tissues were detected by fluorescence microscope, the expressions of CK19 and CD34 in BM-MNCs were detected by immunofluorescence. **Results:** The neogenetic mucosal epithelium and gland submucous neogenetic and ripe granulation tissue were observed in the transplanting group, which were obviously better than those of the control group; DAPI labeled BM-MNCs cells can express CD34 and CK19. **Conclusions:** BM-MNCs can transfer and plant into the injured colon tissues and differentiate into the vascular endothelial cell and mucosal epithelial cell.

Key words: BM-MNCs; Transplantation; Ulcerative Colitis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R574.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-53-04

前言

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)主要累及结肠黏膜层甚至到黏膜下层,表现为腹痛伴腹泻、粘液及脓样血便、肠道营养物质吸收障碍及肠外其他系统并发症,治愈效果不佳难度大,其病程漫长且常反复发作,是世界范围内的现代难治病之一^[1-5]。越来越多的难治性疾病被应用于干细胞治疗,研究者把UC的治疗着眼于干细胞移植,为其提供高效低毒治疗的新方向。

骨髓单个核细胞(Bone Marrow Mononuclear Cells, BM-MNCs)是一种成体的干细胞,造血和骨髓间充质干细胞等均属于 BM-MNCs,不仅具有细胞的自我更新、组织的定向移植和分化潜能,又能释放促进神经、血管再生的许多细胞因子^[6-12]。本研究将 BM-MNCs 移植大鼠溃疡性结肠炎(UC)模型鼠,试图探讨 BM-MNCs 对 UC 模型大鼠结肠病变组织的修复作用。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性成年 SD 大鼠,体重 250±10 g(哈尔滨医科大学实验动物学部);弗氏完全佐剂(sigma,美国);三硝基苯磺酸(TNBS, sigma, 美国);DAPI(北京华迈科世纪公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 健康成年 SD 大鼠 54 只(雄性,体重在 250±10 g),其中 36 只采用免疫复合法制备 UC 模型后随机分为 2 组:移植组及对照组,剩余大鼠用于制备骨髓单个核细胞。

1.2.2 DAPI 标记 BM-MNCs 用含 DAPI (终浓度为 50 μg/mL) 的 DIEM 培养基重悬细胞,于含 5% CO₂ 饱和湿度、37℃培养箱中染色 2h,收集细胞并计数。

1.2.3 UC 模型制备及 BM-MNCs 移植 0.4 mL 抗原乳化剂充分涡旋混匀后,于 1 天和 14 天注射于大鼠下腹部腹股沟和下肢足跖处,并于末次注射后 24 h 内严格禁食但不禁水,麻醉大鼠(10%水合氯醛,IP 注射),将硅胶管(直径 2 mm×长 15

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(H201367);黑龙江省卫生厅科研基金项目(2013245);

国家级大学生创新创业训练计划项目(201610222023)

Δ 通讯作者:姜威(1977-),男,硕士,副主任医师,硕士研究生导师,主要从事溃疡性结肠炎的基础与临床研究, E-mail: 11096057@qq.com

(收稿日期:2017-09-07 接受日期:2017-09-30)

cm)液体石蜡润滑,自肛门轻缓插入肛管内约 8 cm,缓慢推入灌注液(含有 100 mg TNBS/kg 与 50%乙醇的混合液)。固定大鼠至自然清醒,期间身体保持平躺且臀部轻轻抬高。15 天,移植组大鼠给予 IV 注射 1 mL 细胞悬液(BM-MNCs 为 3×10^6 个/ml);对照组大鼠注射 1 mL PBS。

1.2.4 荧光显微镜观察骨髓单核细胞分布 避光条件下,取已固定的移植组结肠组织块经冰冻切片包埋剂包埋后制作冰冻切片(20 μ m),部分切片风干后加荧光淬灭剂,封片。荧光显微镜下观察结肠组织中,细胞核成蓝色荧光,即为 DAPI 标记的 BM-MNCs。

1.2.5 组织 HE 染色 各取大鼠麻醉后处死,剖取多段长度为 2 cm 的结肠,包埋剂包埋后制作石蜡切片(5 μ m),HE 染色,镜下观察和采集大鼠结肠组织的病理学变化。

1.2.6 大鼠骨髓单个核细胞 CD34 和 CK19 蛋白表达 避光条件下,冰冻组织切片各取 2 张经 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;置于湿盒内,加 5%BSA,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中孵育 20 min;弃封闭血清后分别加入兔抗大鼠细胞角蛋白 19(CK19)多克隆抗体和兔抗大鼠细胞 CD34 单克隆抗体(1:50),阴性对照组加 PBS,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,加 CY3 标记羊抗兔 IgG(1:100),37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中孵育 20 min;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,风干后加荧光淬灭剂,封片。激光共聚焦显微镜下观察结肠组织中细胞浆为红色荧光,即为 CK19 或 CD34 阳性细胞。

1.3 统计学处理

采用统计学软件 SPSS 21.0 进行统计学分析,计量资料结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机设计成组 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察骨髓单核细胞的分布

移植后 14 d,结肠组织中标记的 BM-MNCs 数量较多,且主要分布在黏膜溃疡的边缘(见图 1)。

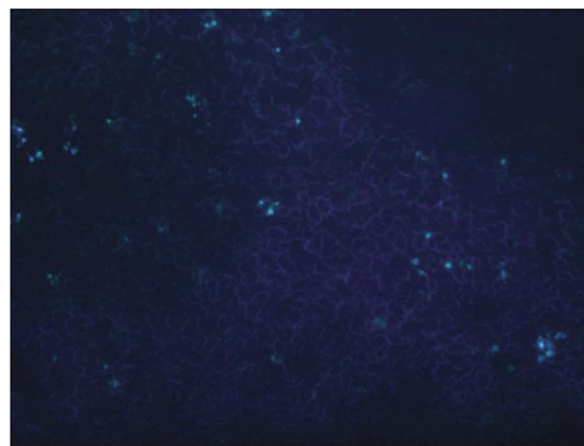


图 1 BM-MNCs 在大鼠结肠分布情况($\times 100$)

Fig.1 The disstribution of BM-MNCs in rats'colon($\times 100$)

2.2 结肠组织的 HE 染色

移植 3 d 后,移植组及对照组大鼠结肠组织在光镜下:在结肠黏膜至浅肌层出现凝固性坏死组织和出血,部分的黏膜下和固有层血管壁内皮细胞肿胀、充血和扩张,浆膜层有广泛的纤维素物质渗出(见图 2-A、2-B)。移植组及对照组 7 d 的大鼠结肠组织黏膜下层单核、淋巴等炎细胞广泛浸润,血管壁明显扩张,肉芽增生可鉴隆起,浆膜层有广泛的纤维素物质渗出及增生较少,但对照组肉芽增生隆起不明显(见图 2-C、2-D)。移植 14 d 后,移植大鼠结肠组织中有黏膜上皮何腺体的新生,新鲜甚至成熟的肉芽组织隆起,炎性细胞渗出广泛减少(见图 2-E);对照大鼠结肠组织坏死,炎性细胞渗出仍然存在,亦可见肉芽隆起(见图 2-F)。

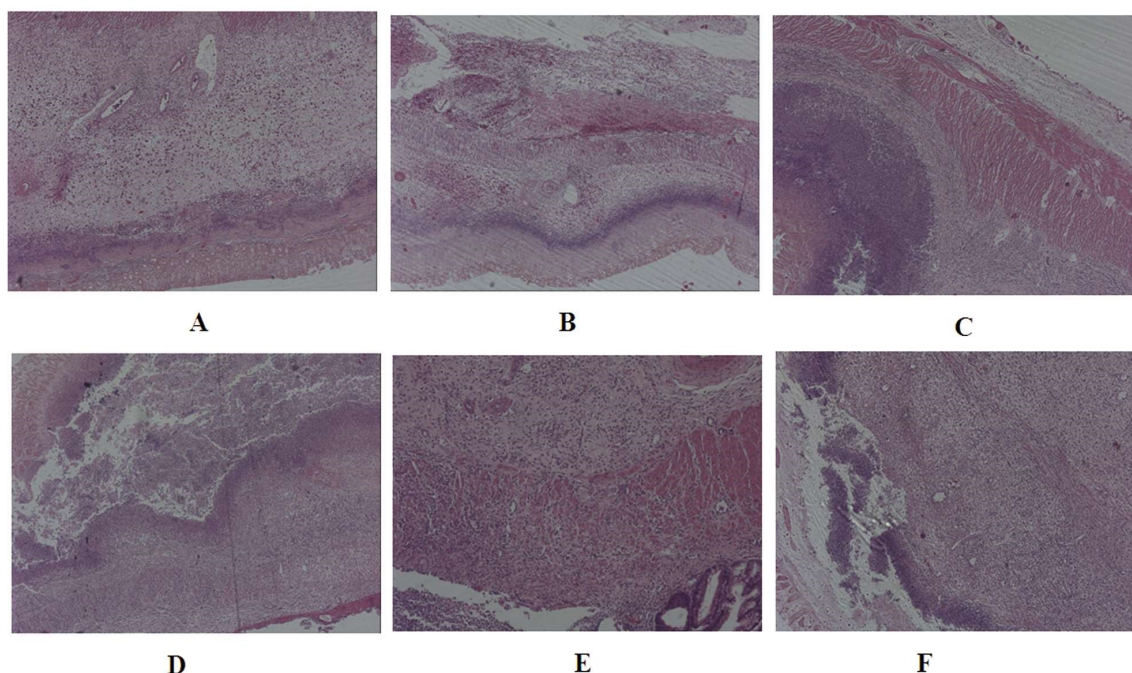


图 2 大鼠结肠黏膜的 HE 染色($\times 100$)

Fig.2 HE staining of colonic mucosa in rat ($\times 100$)

Note: A: the transplanting groups of 3 days; B: the PBS groups of 3 days; C: the transplanting groups of 7 days; D: the PBS groups of 7 day; E: the transplanting groups of 14 days; F: the PBS groups of 14 days

2.3 大鼠骨髓单个核细胞 CD34 和 CK19 蛋白表达

在移植后 14 d 组中,大鼠结肠黏膜下层可见细胞核呈蓝色荧光,同时细胞浆呈红色荧光,即 DAPI 及 CD34 同时表达的阳性细胞,表明 DAPI 标记的 BM-MNCs 可向血管内皮细胞分化(见图 3)。在移植后 14 d 组中,大鼠结肠黏膜上皮可见细胞核呈蓝色荧光,同时细胞浆呈红色荧光,即 DAPI 及 CK19 同时表达的阳性细胞,表明 DAPI 标记的 BM-MNCs 可向黏膜上皮细胞分化(见图 4)。

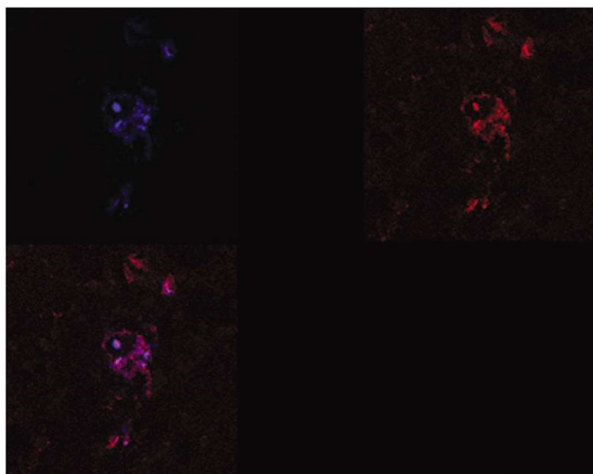


图 3 DAPI 及 CD34 同时表达阳性的 BM-MNCs(免疫荧光,× 60)
Fig.3 DAPI and CD34 expression simultaneously positive BM-MNCs
(immunofluorescence,× 60)

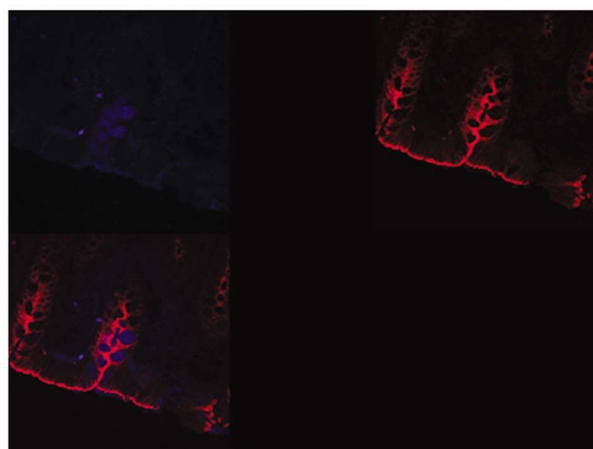


图 4 DAPI 及 CK19 同时表达阳性的 BM-MNCs(免疫荧光,× 60)
Fig.4 DAPI and CK19 express simultaneously positive BM-MNCs
(immunofluorescence,× 60)

3 讨论

UC 的发病被认为与遗传、环境、免疫功能改变及其相互作用有关^[13-16]。目前,关于 UC 的治疗有药物诱导缓解治疗、药物维持治疗及外科手术治疗等传统的对症治疗,对于此病难以有效控制,且副作用和并发症等问题较多^[17-21]。因此,探索和明确新的、有效的治疗 UC 的手段已成当前医学急需解决的问题。

早在 1998 年,Lopez 等^[22]给予恶性血液病伴有克罗恩病的患者的异体造血干细胞移植治疗,发现其恶性血液病症状好转的同时克罗恩病的病情也得到缓解,提示干细胞的移植可能成

为炎症性肠病的治疗一种新策略。近年来,国内外学者对 BM-MNCs 治疗 UC 进行了大量的实验研究^[23-27],发现 BM-MNCs 可借助于受损部位的细胞因子、黏附因子等的趋化作用向病变部位迁移,实现其向损伤组织的定植和归巢功能。迁移、定植来的 BM-MNCs 可途径肠道黏膜干细胞而分化为修复肠道受损黏膜的肠道黏膜上皮细胞。BM-MNCs 还具有免疫调节功能,其可与各种免疫细胞相互作用,抑制促炎细胞因子的释放,下调炎症反应以实现对组织的修复作用。还有研究显示 UC 发生时,肠道局部及全身免疫功能紊乱,微环境破坏严重,肠道黏膜干细胞增殖、分化受限,而 BM-MNCs 通过促进肠道血管的再生,改善肠道黏膜微环境,可恢复肠道黏膜干细胞增殖、分化能力。本实验通过对移植组及 PBS 对照组大鼠的组织病理学观察进行分析,发现移植组各项指标明显优于对照组,两者差异显著,光镜观察可见移植后 3 d 及 7 d,移植组与对照组大鼠结肠标本无明显差异。移植后 14 d,移植 BM-MNCs 大鼠结肠组织出现黏膜上皮及腺体的新生,新鲜甚至成熟的肉芽组织隆起,单核等炎性细胞减少;对照大鼠结肠仍有坏死和炎性渗出,亦可见肉芽隆起。病理学结果提示 BM-MNCs 移植有修复溃疡性结肠炎损伤的黏膜作用。

BM-MNCs 向受体结肠病变部位迁移和定植是修复 UC 肠道组织损伤的基础。BM-MNCs 的归巢特性表现为在细胞因子、黏附因子的作用下向受损部位的趋化作用,表现为定向迁移至损伤部位。有研究表明自体骨髓 MSCs 有组织定向迁移和修复心、肝等受损组织的能力,可能有基质细胞衍生因子(SDF-1)和 Wnt 信号通路的参与,Hayashi^[28]等研究发现 BMSCs 可以定植修复在大鼠受体结肠的受损肠黏膜。2009 年,Wei^[29]等也验证了同样的实验结果。以上结果表明 BM-MNCs 可以在移植受体结肠黏膜上定植,并向病变组织迁移,对 UC 有治疗作用。本研究结果显示移植后 14 d,结肠组织中标记的 BM-MNCs 数量较多,且主要分布在黏膜溃疡的边缘,提示 BM-MNCs 在 UC 模型大鼠病变部位结肠黏膜上定植,可为 BM-MNCs 修复结肠组织提供条件。

正常肠道上皮细胞能够不断地自我更新及修复,这是由于肠道黏膜干细胞具有增殖及分化的能力。BM-MNCs 在移植受体结肠黏膜定植后,可分化为肠道黏膜干细胞,进而分化为肠道黏膜上皮细胞,修复受损的肠道黏膜。2008 年,Nishida^[30]等在乙酸诱导的胃溃疡模型中移植肠道黏膜干细胞,发现肠道黏膜干细胞可分化为血管内皮细胞或黏膜上皮细胞,完成溃疡的修复。而本研究结果显示移植后 7 d 及 14 d,移植组大鼠结肠黏膜下层及结肠黏膜上皮均可见 DAPI 标记细胞表达血管内皮细胞特异性表达蛋白 CD34 或黏膜上皮细胞特异性表达蛋白 CK19,表明 DAPI 标记的 BM-MNCs 已分化为血管内皮细胞或黏膜上皮细胞。由此可见,BM-MNCs 移植可为治疗 UC 修复受损肠道黏膜上皮细胞提供一定的基础。

参考文献(References)

- [1] Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, et al. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis[J]. J Crohns Colitis, 2008; 21-23
- [2] Martin Bürger, Carsten Schmidt, Niels Teich, et al. Medical Therapy of Active Ulcerative Colitis[J]. Viszeralmedizin, 2015, 31(4): 236-245

- [3] Renée Marchioni Beery, Sunanda Kane. Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis[J]. Clin Exp Gastroenterol, 2014, 7: 111-132
- [4] Jan Wehkamp, Martin Götz, Klaus Herrlinger, et al. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Dtsch Arztebl Int, 2016, 113(5): 72-82
- [5] Satoshi Tanida, Tsutomu Mizoshita, Keiji Ozeki, et al. Advances in refractory ulcerative colitis treatment: A new therapeutic target, Annexin A2[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(29): 8776-8786
- [6] Vulliamt PR, Greeley M, Halloran SM, et al. Intracoronary arterial injection of stromal cell and microinfarction in dogs[J]. Lancet, 2012, 363 (9411): 783-784
- [7] Agnieszka A. Janeczka, Rahul S. Tare, Edoardo Scarpa, et al. Transient Canonical Wnt Stimulation Enriches Human Bone Marrow Mononuclear Cell Isolates for Osteoprogenitors [J]. Evans Stem Cells, 2016, 34(2): 418-430
- [8] Akihiko Taguchi, Chiaki Sakai, Toshihiro Soma, et al. Intravenous Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Stroke: Phase1/2a Clinical Trial in a Homogeneous Group of Stroke Patients[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(19): 2207-2218
- [9] Fernanda F. Cruz, Zachary D. Borg, Meagan Goodwin, et al. CD11b+ and Sca-1+ Cells Exert the Main Beneficial Effects of Systemically Administered Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in a Murine Model of Mixed Th2/Th17 Allergic Airway Inflammation [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(4): 488-499
- [10] Ramesh Tiwary, Amarpal, Hari Prasad Aithal, Prakash Kinjavdekar, et al. Effect of IGF-1 and Uncultured Autologous Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cells on Repair of Osteochondral Defect in Rabbits[J]. Cartilage, 2014, 5(1): 43-54
- [11] Lei Shu, Eric Beier, Tzong Sheu, et al. High-fat Diet Causes Bone Loss in Young Mice by Promoting Osteoclastogenesis through Alteration of the Bone Marrow Environment[J]. Calcif Tissue Int, 2015, 96 (4): 313-323
- [12] Ken Matsui, Neelam Giri, Blanche P. Alter, et al. Cytokine production by bone marrow mononuclear cells in inherited bone marrow failure syndromes[J]. Br J Haematol, 2013, 163(1): 81-92
- [13] Isabelle Cleynen, Gabrielle Boucher, Luke Jostins, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study[J]. Lancet, 2016, 387(10014): 156-167
- [14] Jan Wehkamp, Martin Götz, Klaus Herrlinger, et al. Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Dtsch Arztebl Int, 2016, 113(5): 72-82
- [15] Nobin Babu Kalappurayil, Jino Thomas, Baburajan Mankuni, et al. Assessment of Disease Severity and Role of Cytomegalovirus Infection in Patients with Ulcerative Colitis[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11 (3): EC07-EC11
- [16] Marco Scarpa, Ignazio Castagliuolo, Carlo Castoro, et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(22): 6774-6785
- [17] Martin Bürger, Carsten Schmidt, Niels Teich, et al. Medical Therapy of Active Ulcerative Colitis [J]. Viszeralmedizin, 2015, 31 (4): 236-245
- [18] Dominika Głowska, Dominika Guzek, Paulina Zakrzewska, et al. Lycopene, Lutein and Zeaxanthin May Reduce Faecal Blood, Mucus and Pus but not Abdominal Pain in Individuals with Ulcerative Colitis Nutrients, 2016, 8(10): 613
- [19] Sung Chul Park. Yoon Tae Jeon Current and Emerging Biologics for Ulcerative Colitis[J]. Gut Liver, 2015, 9(1): 18-27
- [20] Nidhi, Muzamil Rashid, Veerpal Kaur, et al. Microparticles as controlled drug delivery carrier for the treatment of ulcerative colitis: A brief review[J]. Saudi Pharm J, 2016, 24(4): 458-472
- [21] Gary R. Lichtenstein, Stephen B. Hanauer, William J. Sandborn. Emerging Treatment Options in Mild to Moderate Ulcerative Colitis [J]. Gastroenterol Hepatol, 2015, 11(3 Suppl 1): 1-16
- [22] Lopez CSO, Sullivan KM, McDonald GB. Course of celiac disease after allogeneic marrow transplantation [J]. Gastroenterology, 1998, 114(3): 433-440
- [23] Wu Y, Wang J, Scott PG, et al. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(1): 18-26
- [24] Kuo T K, Hung S P, Chuang C H, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow-mesenchymal stem cells[J]. Gastroenterology, 2008, 134(7): 2111-2121
- [25] Ryan JM, Barry F, Murphy JM et al. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149: 353-363
- [26] Takaaki Kawaguchi, Maiko Mori, Keiko Saito, et al. Food antigen-induced immune responses in Crohn's disease patients and experimental colitis mice[J]. J Gastroenterol, 2015, 50(4): 394-405
- [27] Jing Zhang, Bing Wang, Wen Zhang, et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Ameliorates Murine Experimental Colitis via the Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70828
- [28] Hayashi Y, Tsuji S, Tsuji M, et al. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 326(2): 523-531
- [29] Wei Y M, Nie Y Q, Lai J Y, et al. Comparison of the population capacity of hematopoietic and mesenchymal stem cells in experimental colitis rat model[J]. Transplantation, 2009, 88(1): 42-48
- [30] Nishida T, Tsuji S, Tsuji M, et al. Cultured bone marrow cell local implantation accelerates healing of ulcers in mice[J]. J Gastroenterol, 2008, 43(2): 124-135