

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.044

骨髓间充质干细胞在大鼠实验中的移植途径及比较 *

杨 波¹ 郑 盛² 左丽丽¹ 唐映梅¹ 杨晋辉^{1△}

(1 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰内科 云南 昆明 650101; 2 云南省第三人民医院消化内科 云南 昆明 650101)

摘要:骨髓间充质干细胞是具有自我更新能力和分化潜能的一类成体干细胞,经过局部微环境的诱导,可在体内外进行扩展,到晚期可分化成为多种细胞系。当组织受损伤时,可迅速到达损伤部位,分化为特异的组织细胞,参与组织修复。骨髓间充质干细胞这种惊人的分化及组织修复能力,为治疗退行性疾病和器官损伤性疾病提供广阔前景,故成为科研热点。国内外相关实验研究多以大鼠为动物模型,而骨髓间充质干细胞如何进入大鼠体内并定植,是实验成功的重要前提。因此如何找到最合适、最安全的移植途径将骨髓间充质干细胞有效地移植进入大鼠疾病模型体内的受损区域,是研究者关心的重点。本文就目前骨髓间充质干细胞在大鼠实验中不同移植途径进行综述,并比较各种途径的优缺点,希望能对临床科研工作提供参考,并期待能有更成熟的移植手段来推动骨髓间充质干细胞实验研究的进展。

关键词:骨髓间充质干细胞;移植途径;大鼠

中图分类号:Q95-3, Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)20-3967-03

Comparison of the Transplantation Channel of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Experiment of Rats*

YANG Bo¹, ZHENG Sheng², ZUO Li-li¹, TANG Ying-mei¹, YANG Jin-hui^{1△}

(1 Department of Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, 650101, China;

2 Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan, 650101, China)

ABSTRACT: Bone marrow mesenchymal stem cells are kinds of adult stem cells that have self-renewal capacities and differentiation potentials. They can be expanded and induced by local microenvironment, either in vitro or in vivo, to terminally differentiate into multiple lineages. When tissue damages, they can move to injury quickly and differentiate into specific tissues and cells, participate in repair. The amazing abilities of differentiation and tissue repair about bone marrow mesenchymal stem cells provide broad prospects for degenerative disease and organ damage disease, so they become hot spot of scientific research. Experimental researches of bone marrow mesenchymal stem cells at home and abroad often adopt animal models for rats. How to enter and engraftment in rat becomes an important prerequisite for success in the experiment about bone marrow mesenchymal stem cells. So how to transplant bone marrow mesenchymal stem cells into the damaged area of the disease model in rats with the most suitable and safest way is the key that researchers concerned. In this paper, different transplantation ways in rat experiments of bone marrow mesenchymal stem cells were summarized and compared in order to provide reference for scientific research. More mature transplant means are expected to promote the progress of the experimental study of bone marrow mesenchymal stem cells.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Transplantation channel; Rats

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3967-03

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多潜能的细胞,不管在体内还是体外,经过局部微环境的诱导,都可以进行扩展,到晚期可分化成为多种细胞系。MSCs 位于骨髓、血管周围、脂肪、皮肤、肌肉和其他组织中,在组织受损伤时,它们能分化成为该组织细胞,并修复受损部位,而源自骨髓的 MSCs 显示了惊人的多分化潜能。在 20 世纪 70 年代, Friedenstein 等学者首次发现骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)^[1]。随后的研究发现^[2], BMSCs

具有向各胚层来源组织细胞分化的能力,并且细胞数量多、获取方法简单、无伦理道德方面影响,因此受到科研工作者重视并迅速成为研究热点,其研究热度在几十年间持续增长。目前国内外对 BMSCs 的研究多集中在脑血管疾病、神经系统、视网膜以及内脏器官损伤修复等方面,大部分研究尚处于动物实验阶段,其动物模型多采用大鼠、小鼠、家兔、猪、犬等,尤以大鼠居多,而 BMSCs 通过何种移植途径进入大鼠模型,则是其在体内定植及发挥作用的重要前提,也是决定实验效果的关键部

* 基金项目:云南省科学技术厅青年项目基金项目(2012FD095);昆明医科大学研究生创新基金(2013N05)

作者简介:杨波(1985-),男,医师,硕士研究生,主要从事肝胆胰疾病的临床诊断与治疗研究,

电话:15288185336, E-mail:goodgoodyb@163.com

△通讯作者:杨晋辉,教授,硕士研究生导师, E-mail:yangjinhui_med@163.com

(收稿日期:2013-11-25 接受日期:2013-12-24)

分。故本文侧重于 BMSCs 在大鼠动物实验中的移植途径这一关键点,就目前国内外相关实验中所采用移植途径及各途径优缺点进行综述,以期对临床科研工作有所帮助。

1 BMSCs 移植研究理论基础

研究发现 BMSCs 在适宜的微环境里具有自我更新能力并能分化为中胚层衍生谱系细胞,包括骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞^[3],也有可能分化为成年人身体中几乎每一个主要的细胞类型,如肝细胞、胰腺细胞和类神经细胞^[4]等等。这种多胚层的分化能力,使得 BMSCs 为组织修复提供广阔前景,其在退行性疾病以及组织器官损伤等研究方面的潜力,令人期待。Chen Y 等学者^[5]研究 BMSCs 回应肝损伤信号时的迁移能力,将绿色荧光蛋白转染的 BMSCs 通过局部注射和尾静脉注射途径移植进入肝损伤组动物和正常组动物体内,再通过体内成像分析、PCR、流式细胞术和冰冻切片等技术跟踪分析移植后细胞的命运,结果显示 BMSCs 能顺利在肝脏损伤部位定植,且定植数量和分布范围明显优于正常组动物。更多的动物研究证实^[6,7]当组织受损信号发出时,骨髓中的 BMSCs 经动员后可迅速迁徙到达损伤部位,并分化为特异的组织细胞,进行组织修复。加之 BMSCs 具有取材方便、易培养、增殖快、低免疫原性等特点,在基础研究中受到广泛重视。

2 BMSCs 移植途径

BMSCs 动物实验研究中所采用的移植途径较多,尚无统一标准。现在普遍应用的移植途径有:静脉注射、动脉注射、局部注射、组织工程支架载体移植和腹腔注射等^[8],每种移植途径都有各自的特点。

2.1 静脉注射

在大鼠实验研究中静脉注射途径是采用较多的一种移植方式,多采用尾静脉注射和门静脉注射。Huang Y 等^[9]研究 BMSCs 对百草枯所致急性肺损伤疗效,实验组采用尾静脉注射 BMSCs,在百草枯造模 6 h 后注入。结果表明 BMSCs 移植后血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α),白细胞介素 1β (IL- 1β) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的水平明显降低,而白细胞介素 10 (IL-10) 水平升高。此外,移植的 BMSCs 也可以减少丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 消耗,从而降低百草枯中毒后肺组织湿/干重比。Guo JQ 等^[10]通过大鼠尾静脉途径移植 BMSCs,证实其能改善顺铂所致围绝经期大鼠颗粒细胞凋亡水平,为寻找除了雌激素替代疗法之外,新的更安全、更少副作用的治疗方式,提供了依据。BMSCs 静脉输注对扩张型心肌病治疗研究较少, Yang S 等^[11]通过大鼠尾静脉途径注入 BMSCs,发现扩张型心肌病大鼠血清脑钠肽水平明显降低,在整个实验周期中,大鼠死亡率也显著降低,表明静脉 BMSCs 移植可以干扰左心室重构并降低扩张型心肌病的死亡率,从而认为尾静脉移植骨髓间充质干细胞是具有吸引力的最小侵入性策略,可允许大量的细胞反复输注。Kanazawa H 等^[12]指出:尽管 BMSCs 的迁移能力较强,但外周静脉也并不是移植的最佳途径,而更好的方法可能是通过门静脉运送到肝脏。

2.2 动脉注射

Jiang H 等^[13]采用肠系膜上动脉途径移植 BMSCs 治疗大

鼠肠道缺血或再灌注损伤,发现 BMSCs 不仅有能力抑制促炎细胞因子释放,抑制促炎基因活化,而且能增加肠粘膜增殖细胞核抗原表达,有可能参与肠道粘膜细胞再生,从而减轻肠道缺血/再灌注损伤。Kunter U 等^[14]在大鼠肾小球肾炎模型中,通过左侧肾动脉途径和尾静脉途径分别注射 2×10^6 数量 BMSCs,实验结果显示 BMSCs 分泌大量的血管内皮生长因子 (VEGF) 和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$),肾动脉注射组和尾静脉注射组大鼠均能发现尿蛋白减少,肾小球损伤修复,这可能和 BMSCs 对生长因子的释放作用有关,但肾动脉注射组效果更优。

2.3 局部注射

Vaquero J 等^[15]将 BMSCs 分别通过局部注射和静脉注射途径治疗大鼠脊髓损伤,结果显示:直接注射到损伤部位组大鼠脊髓损伤后后肢运动功能评分 (BBB 评分)、冷喷雾试验和大腿周径等指标均显著优于静脉注射组,并呈现明显持续的功能恢复。日本学者 Saito H 等^[16]治疗大鼠脑梗死,将 BMSCs 定向移植到同侧纹状体,结果显示 BMSCs 在临近梗塞区域的大脑皮层分布明显,可增加神经元完整性并改善其功能。Wu T 等^[17]在大鼠大脑中动脉闭塞模型中,将 BMSCs 局部注射入脑或通过颈动脉和尾静脉移植,并体外成像监测示踪,发现局部注射方式可能会提供一个最佳的细胞移植和成像手段。

2.4 其他注射方式

其他移植方式包括组织工程支架载体移植和腹腔注射。虽然在脑出血后遗症等神经系统疾病治疗方面, BMSCs 疗法一直被认为是一个很有前途的方法,但 BMSCs 脑内给药后,在细胞外基质的影响下,大部分细胞死亡,而脑的 BMSCs 移植在富含血小板的 PRP 支架支持下,可减少移植细胞死亡,从而优化了细胞疗法^[18]。在国内外研究中,腹腔注射途径很少被采用。Zhao W 等^[19]为了研究比较 BMSCs 静脉、肝内和腹腔注射的治疗效果,将 45 只四氯化碳诱导的肝损伤大鼠分为三组:腹腔移植组,静脉移植组和肝内移植组,并对 BMSCs 进行体内示踪。结果表明静脉内注射与腹腔内及肝内注射相比,提供了最有效的治疗,可以防止肝纤维化,而腹腔注射方式并不能有效的改善肝功能及防止肝纤维化。

3 优缺点比较

静脉注射途径对动物损伤较小、且操作简便,是目前采用较多的移植方式。通过静脉移植 BMSCs 的相关实验研究尽管取得了较多成果,但也有不少学者提出了质疑。Quertainmont R 等^[20]在 BMSCs 移植改善成年大鼠脊髓损伤后恢复的实验研究中,同时研究了被移植细胞的命运。在通过尾静脉移植 7、14 和 21 天后,对受伤的脊髓进行 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 免疫组化,不幸的是,没有发现 BMSCs 的定植。静脉注射 BMSCs 时,由于其自身大小和具有粘附性的原因,大部分移植细胞被肺脏的微血管捕获,并被巨噬细胞吞噬后形成细胞碎片,容易导致肺梗死,甚至导致实验动物呼吸衰竭而死亡^[21],因此静脉注射一般不认为是最佳移植途径。但也有学者研究大鼠慢性心肌梗死后指出:虽然静脉注射后大多数的 BMSCs 被困于肺内,但 5×10^6 的细胞浓度是相对安全的,不会引起肺和肺功能恶化^[22]。

动脉注射方式与静脉注射方式相比损伤更大,操作技术有一定难度,并且容易出血,故应用相对少一些。但比利时科学家

Everaert BR 等^[23]在研究中采用不同的注射途径:中心静脉注射(CV),动脉内注射(IA)和肌肉注射(IM)。结果表明 IM 注入的 BMSCs 并没有迁移到组织受损部位。肺内细胞对 CV 注射的 BMSCs 大量捕获,此现象可以通过共聚焦显微镜以及荧光显微镜观察到。IA 注射 BMSCs 被证明是一种可行的,安全的策略,可以绕过肺循环。

局部注射是将 BMSCs 直接注射到损伤区域的一种移植方式,理论上应该是移植效率最高的方式。但有研究者认为:局部注射方式移植的 BMSCs 可能因为在体内缺乏足够的营养支持,存活时间有限,其能否起到明显治疗效果尚存疑点,而且局部注射方式所造成的组织损伤也不能忽视^[24]。同时还有实验证明,将移植细胞直接注射到脊髓损伤部位效率较高,但存在二次损伤、破坏脊髓内传导束、增加脊髓感染概率等缺点,如有多个病灶,直接注射也难以实现^[25]。

在腹腔注射途径中,由于 BMSCs 是由“淋巴系统 - 静脉 - 损伤部位”这一途径进行迁徙,路线复杂,且治疗效果并不优于其他移植途径,所以腹腔注射方式较少受到研究者关注。组织工程支架移植效果较佳,但是实施起来较为困难,中间步骤复杂,并且现阶段的研究尚未成熟。

4 小结与展望

综上所述,BMSCs 在大鼠实验研究中已取得大量成果,其在组织器官修复以及退行性疾病研究中的重要性也日益突出,这些积极的研究成果鼓舞了临床工作者,并期待能为广大患者带来希望。而在实验过程中,BMSCs 在受损组织中的归巢作用是论证实验效果的重要前提。对于受损组织而言,不同的移植途径可能影响 BMSCs 归巢至该组织的效率。因此,如何找到最合适、最安全的移植途径将 BMSCs 有效地移植进入大鼠疾病模型体内的受损区域,是研究者关心的重点。每一种移植途径都有相应的弊端,在将其应用于临床之前仍需仔细考虑,视具体情况分别对待。随着研究的不断深入,相信很快会有成熟的移植手段,使 BMSCs 实现向临床应用的大步跨越,为人类疾病的治疗起到重要作用。

参考文献(References)

- [1] Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells[J]. Cell Tissue Kinet, 1970, 3(4): 393-403
- [2] Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis[J]. Gut, 2009, 58(7): 929-939
- [3] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(4): 313-319
- [4] Zanini C, Bruno S, Mandili G, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype[J]. PLOS ONE, 2011, 6(12): e28175
- [5] Chen Y, Xiang LX, Shao JZ, et al. Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6B): 1494-1508
- [6] González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses[J]. Gastroenterology, 2009, 136(3): 978-989
- [7] Fisher-SY, Barhum Y, Sadan O, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in the EAE mouse model of MS[J]. J Mol Neurosci, 2012, 48(1): 176-184
- [8] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(3): 206-216
- [9] Huang Y, Yin W, Yu HY, et al. Combined treatment with bone marrow mesenchymal stem cells and methylprednisolone in paraquat-induced acute lung injury[J]. BMC Emerg Med, 2013, 13(Suppl 1): S5
- [10] Guo JQ, Gao X, Lin ZJ. BMSCs reduce rat granulosa cell apoptosis induced by cisplatin and perimenopause[J]. BMC Cell Biol, 2013, 14(1): 18
- [11] Yang S, Piao J, Jin L, et al. Does pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells with 5-azacytidine or double intravenous infusion improve their therapeutic potential for dilated cardiomyopathy [J]. Med Sci Monit Basic Res, 2013, 19: 20-31
- [12] Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19195
- [13] Jiang H, Qu L, Dou R. et al. Potential role of mesenchymal stem cells in alleviating intestinal ischemia/reperfusion impairment [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74468
- [14] Kunter U, Rong S, Djuric Z, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(8): 2202-2212
- [15] Vaquero J, Zurita M, Oya S, et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration[J]. Neurosci Lett, 2006, 398(1-2): 129-134
- [16] Saito H, Magota K, Zhao S, et al. 123I-Iomazenil Single Photon Emission Computed Tomography Visualizes Recovery of Neuronal Integrity by Bone Marrow Stromal Cell Therapy in Rat Infarct Brain [J]. Stroke, 2013, 44(10): 2869-2874
- [17] Wu T, Lang J, Sun X, et al. Monitoring bone marrow stem cells with a reporter gene system in experimental middle cerebral artery occlusion rat models[J]. J Nucl Med, 2013, 54(6): 984-989
- [18] Vaquero J, Otero L, Bonilla C, et al. Cell therapy with bone marrow stromal cells after intracerebral hemorrhage: impact of platelet-rich plasma scaffolds[J]. Cytotherapy, 2013, 15(1): 33-43
- [19] Zhao W, Li JJ, Cao DY, et al. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(10): 1048-1058
- [20] Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39500
- [21] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion[J]. Front Immunol, 2012, 3: 297
- [22] Wang W, Jiang Q, Zhang H, et al. Intravenous administration of bone marrow mesenchymal stromal cells is safe for the lung in a chronic myocardial infarction model[J]. Regen Med, 2011, 6(2): 179-190
- [23] Everaert BR, Bergwerf I, De Vocht N, et al. Multimodal in vivo imaging reveals limited allograft survival, intrapulmonary cell trapping and minimal evidence for ischemia-directed BMSC homing [J]. BMC Biotechnol, 2012, 12: 93
- [24] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8407-8411
- [25] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(18): 1971-1979