

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1462- 05

骨髓移植治疗 Duchenne 型肌营养不良 模型鼠的实验研究*

刘晓蓉, 张成[△], 张为西, 王展航, 陈松林
(中山大学第一附属医院神经内科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 观察骨髓移植治疗 Duchenne 型肌营养不良(DMD)模型鼠(mdx 鼠)后, 骨骼肌中抗肌萎缩蛋白的表达, 以及病理、生理和运动功能的变化情况, 从而正确评价骨髓移植治疗 DMD 的疗效。方法: 以正常 C57 鼠作为供者, 以致死剂量放疗后的 mdx 鼠作为受者进行骨髓移植, 在移植后 4 个月和 6 个月分别用荧光免疫组化法观察抗肌萎缩蛋白表达情况, 用 HE 染色观察并计算骨骼肌细胞核中心移位纤维比例(CNF), 同时进行 mdx 鼠腓肠肌电生理检查和运动功能检测。结果: 骨髓移植后的 mdx 鼠骨骼肌细胞膜上有部分抗肌萎缩蛋白表达, CNF 比例和肌肉湿重下降, mdx 鼠的被动运动功能增强。结论: 骨髓移植后, 骨髓干细胞在 mdx 鼠体内的骨骼肌和骨髓中定居, 并分化成可以表达抗肌萎缩蛋白的骨骼肌细胞, 使 mdx 鼠病理、生理得到部分改善, 最终导致了肌肉的运动功能的增强。说明骨髓移植治疗 DMD 是有一定价值的, 为临床应用提供实验基础。

[关键词] 骨髓移植; 干细胞; 肌营养不良症

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Experimental treatment of the model mice of Duchenne muscular dystrophy by bone marrow transplantation

LIU Xiao-rong, ZHANG Cheng, ZHANG Wei-xi, WANG Zhan-hang, CHEN Song-lin
(¹Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To detect dystrophin expression in skeletal muscles of mdx mice after bone marrow transplantation (BMT), and to evaluate the effect of BMT on Duchenne muscular dystrophy (DMD). **METHODS:** Bone marrow cells were cultured for three days, and then transplanted into mdx mice irradiated lethally through tail veins. After 4 and 6 months, dystrophin expression on myocytes membranes in mdx mice was detected by fluorescent immunohistochemical staining. The centrally nucleated fibers (CNF) were calculated by HE staining, and the physiologic parameters measured and the motor function detected by traction test, rotating rods test and rotating wheels test were also observed. **RESULTS:** Until 4 and 6 months after BMT, dystrophin was expressed partly on myocytes membranes in mdx mice, and the ratio of CNF decreased, physiologic functions improved, the motor ability reinforced in treated group. **CONCLUSION:** After BMT, marrow stem cells settled in injured skeletal muscles and bone marrow, then differentiated into myocytes with dystrophin expression and caused the improvement of pathology, physiology and motor function in treated group finally. These results give a powerful proof for the treatment of DMD with BMT.

[KEY WORDS] Bone marrow transplantation; Stem cells; Muscular Dystrophy

骨髓干细胞是一组存在于骨髓内的混合细胞群, 具有多向分化潜能和自我更新能力, 目前已知: 其可以分化成骨骼肌细胞、心肌细胞、神经元细胞、肝细胞、骨髓细胞、神经胶质细胞等, 从而为骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)治疗变性性、代谢性、遗传性及肿瘤性疾病带来了新的希望。但目前

前对骨髓移植治疗血液系统以外疾病的疗效尚缺乏客观评价。Duchenne 型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是最常见的遗传性肌肉病, 以进行性四肢近端骨骼肌萎缩无力、伴小腿腓肠肌假性肥大为主症, 患者均在未成年前死亡。其基本病因是抗肌萎缩蛋白(dystrophin, dys)基因突变, 导致

[收稿日期] 2004- 02- 09 [修回日期] 2004- 06- 02

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30170337); 卫生部临床学科重点基金资助项目(No. 97040229, No. 2001321); 教育部骨干教师基金资助项目(No. 20002349); 广东省卫生厅科研基金资助项目(No. B2003072)

[△]通讯作者 Tel: 020- 33315050; E-mail: happyxiaorong@tom.com

细胞骨架蛋白抗肌萎缩蛋白缺乏。目前该病的病因、病理变化、基因诊断以及产前诊断等都已十分明确,但其治疗始终是一大难题。而BMT是目前该病最有希望的治疗办法。本研究拟对DMD的动物模型mdx鼠进行骨髓移植治疗,并对病损骨骼肌的修复情况加以观察,从而客观评价BMT治疗DMD的价值。

材 料 和 方 法

1 实验对象

mdx成年鼠(8周)20只,体重16–22g,购于美国Maine州的Jackson实验室。正常C57BL成年鼠(8周)30只,体重16–22g,购于中山大学实验动物中心。实验共分3组:mdx鼠未治疗组、BMT组、正常C57鼠对照组。每组、每个时点动物为5只。在BMT组中,以正常C57鼠作为供者,以同龄mdx鼠作为受者。mdx鼠为敲除抗肌萎缩蛋白基因的C57BL品系小鼠,故与C57BL鼠具有相同的组织相容性抗原,引起的免疫排斥反应较小。

2 主要试剂

高糖DMEM培养基(Gibco-BRL公司),胎牛血清(浙江杭州四季青生物制品公司),山羊抗dys2多克隆抗体(Santa-Cruz公司),ABC-Cy3免疫组化试剂盒(福州迈新公司),多聚-L-赖氨酸及APES(Boster公司),OCT包埋剂(Leica公司)。

3 主要仪器

Harris CO₂恒温培养箱(美国);SW-CJ-IF净化工作台(苏州);Olympus倒置相差显微镜及自动摄影装置(日本);LeicaCM1850恒温冰冻切片仪(德国Leica公司);Leica DMCB荧光显微镜(德国);THERATRON PHOENIX放射治疗仪(加拿大);PCLab生物信号采集处理系统2.0(北京微信斯达有限公司);动物转轮运动仪、动物转棒运动仪(中山大学仪器厂)。

4 实验方法

4.1 骨髓细胞的培养 取C57BL鼠长骨骨髓用高糖DMEM培养基常规培养骨髓细胞,培养条件为5%CO₂ 37℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱中松口静置培养,培养3d的骨髓混合细胞用于移植。

4.2 骨髓移植前的动物放疗和骨髓移植 对于BMT组动物于移植前3d进行⁶⁰Co γ线8.0Gy致死剂量的一次性全身立式照射放疗^[1],剂量率为84.95cGy/min。于放疗后3d对BMT组动物一次性尾静脉注射骨髓细胞10⁶个/只,进行骨髓移植。

4.3 骨髓移植后的运动功能的观察 在BMT后4

个月和6个月,分别对各组小鼠按如下程序进行运动实验^[2]:牵引实验3min→转棒实验15min→转轮实验2h分别记录:小鼠在金属丝上掉落的次数、在金属丝上停留的最长时间、从转棒上掉落的次数、在棒上所停留的最长时间、转轮圈数。为减少误差,同样的运动实验连续进行3d,取其平均值。

4.4 骨髓移植后的生理检查 分别于BMT后4、6个月,用PCLab生物信号采集处理系统对BMT治疗组和未治疗组mdx鼠的腓肠肌以最适前负荷测Pt,刺激电压35V,分别测量单收缩肌力、收缩时间、半舒张时间、疲劳指数,然后测量肌肉湿重。

4.5 骨髓移植后mdx鼠骨骼肌抗肌萎缩蛋白免疫荧光染色 于骨髓移植后4个月和6个月,引颈法处死mdx鼠,取其腓肠肌进行冰冻切片,然后按常规ABC法进行抗肌萎缩蛋白的免疫荧光染色。荧光显微镜下观察,并摄片。

4.6 骨髓移植后mdx鼠骨骼肌病理变化(HE染色)

于骨髓移植后2、4、6、8个月,取各组动物的腓肠肌冰冻切片常规HE染色,观察病理变化情况,在镜下×200倍取5个视野,计数肌细胞核中心移位纤维(centrally nucleated fiber, CNF)数目,计算其占有肌纤维的比例。

5 统计学处理

所有结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用方差分析及LSD检验,显著性水准为 $P < 0.05$ 。所有数据采用SPSS(10.0)进行计算分析。

结 果

1 骨髓细胞的培养

骨髓细胞培养3d之后,根据在培养基上的生长特性,可分为两类细胞:贴壁细胞(主要含有骨髓间质干细胞)和悬浮细胞(主要含有造血干细胞)。间质干细胞于24h左右贴壁,形态各异,有梭形、星形、圆形和多角形,其中以梭形为主。造血干细胞悬浮生长,细胞多呈圆形,大小不一,体积较贴壁细胞小。3d左右形成细胞集落,成堆分布。本实验中用于移植的是混合培养的上述两种细胞。

2 BMT后抗肌萎缩蛋白的表达

图1–4分别为正常C57鼠、未治疗的mdx鼠和BMT治疗4个月和6个月的mdx鼠骨骼肌细胞膜上抗肌萎缩蛋白免疫荧光染色结果。可见在正常的C57鼠的骨骼肌细胞膜上的抗肌萎缩蛋白荧光相互连接呈网状,在细胞膜上分布均匀,荧光强度较强(见图1)。而未治疗的mdx鼠骨骼肌的细胞膜上没

有抗肌萎缩蛋白荧光(见图2)。在BMT后,mdx鼠的部分骨骼肌的细胞膜上出现抗肌萎缩蛋白荧光,但荧光强度较弱,分布不均匀(见图3、图4)。

3 BMT后mdx鼠骨骼肌病理变化

经HE染色后,计算出CNF比例,结果:C57鼠的CNF比例为0。

未治疗组和BMT组的CNF比例见图5:未治疗

组的4个月mdx鼠的CNF比例最高(70.35% ± 14.88%),明显高于其他组;而骨髓移植2个月和8个月的mdx鼠CNF比例(分别是45.99% ± 5.32%和27.83% ± 3.48%)明显少于同鼠龄的未治疗组的mdx鼠(分别是70.35% ± 14.88%和46.16% ± 13.23%)($P < 0.05$)。其他治疗组和未治疗组的相同鼠龄之间CNF比例比较无明显差别。

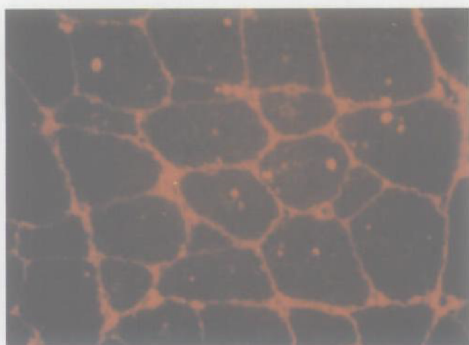


Fig 1 Dystrophin fluorescent immunohistochemical staining of skeletal muscle of C57 mouse ($\times 400$). Dystrophin expression on myocyte membrane of C57 mice becomes reticulate.

图1 C57鼠抗肌萎缩蛋白免疫荧光。C57鼠肌膜上均有抗肌萎缩蛋白表达



Fig 3 Dystrophin fluorescent immunohistochemical staining of skeletal muscle of mdx mouse after BMT 4 months ($\times 400$). Dystrophin expression on myocyte membrane of mdx mice after BMT 4 months becomes synechia.

图3 BMT 4个月(鼠龄6个月)抗肌萎缩蛋白免疫荧光



Fig 2 Dystrophin fluorescent immunohistochemical staining of skeletal muscle of untreated mdx mice ($\times 400$). No dystrophin expression on myocyte membrane of untreated mdx mice.

图2 mdx鼠抗肌萎缩蛋白免疫荧光。mdx鼠的肌膜上无抗肌萎缩蛋白表达

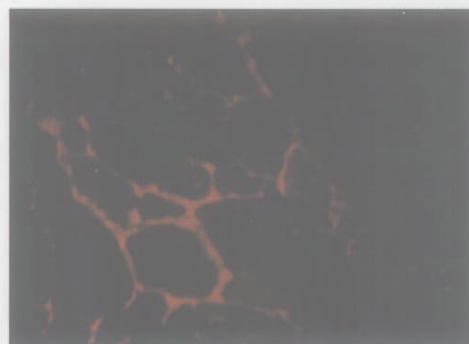


Fig 4 Dystrophin fluorescent immunohistochemical staining of skeletal muscle of mdx mouse after BMT 6 months ($\times 400$). Dystrophin expression on myocyte membrane of mdx mice after BMT 6 months is more than after BMT 4 months, but the fluorescent becomes still maldistribution.

图4 BMT后6个月(鼠龄8个月)抗肌萎缩蛋白免疫荧光

4 BMT后肌肉生理指标变化

通过对BMT后4个月和6个月的mdx鼠及同鼠龄未治疗组的mdx鼠的腓肠肌的电生理各项指标的测定及统计学分析(表1),可见BMT后肌肉的湿重明显下降。除BMT后6个月的mdx鼠的半舒张时间与同龄未治疗的mdx鼠延长($P < 0.05$)外,其余电生理指标无明显变化。

5 BMT后mdx鼠运动功能的变化

将BMT后4个月和6个月的mdx鼠的运动实验结果列于表2。

从表2中可以看出:在牵引实验中,BMT后4个月和6个月的mdx鼠与未治疗组的同龄mdx鼠比较,从金属丝上坠落的次数均明显减少($P < 0.05$)。而3 min内在金属丝上停留的最长时间明显延长($P < 0.05$)。在转棒实验中,BMT后6个月组的mdx鼠与同龄未治疗组的mdx鼠比较,其坠落次数明显减少($P < 0.05$),而BMT后4、6个月mdx鼠的棒上停留时间较同龄未治疗的mdx鼠均明显延长($P < 0.05$)。而转轮实验中,BMT治疗组与同龄未治疗组mdx鼠比较转轮的圈数无明显差别($P > 0.05$)。

表 1 BMT 后 4 个月和 6 个月 mdx 鼠腓肠肌生理指标变化

Tab 1 Change of physiologic parameters of gastrocnemius muscles after BMT 4 months and 6 months ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	Wet weight (mg)	Single contraction (g)	Fatigue index (%)	Contraction time (s)	Half-relaxation time (s)
Untreated (mdx mice aged 6 months)	22.45 ± 1.63	12.99 ± 0.57	37.56 ± 14.01	32.00 ± 2.94	79.00 ± 26.34
BMT (mdx mice aged 6 months after BMT 4 months)	15.28 ± 4.63*	9.45 ± 5.50	28.74 ± 8.10	28.50 ± 3.00	58.00 ± 13.31
Untreated (mdx mice 8 months)	24.05 ± 2.51	11.66 ± 5.34	34.20 ± 5.28	33.50 ± 5.97	70.25 ± 6.95
BMT (mdx mice aged 8 months after BMT 6 months)	9.72 ± 5.29*	6.07 ± 4.61	26.67 ± 8.33	39.33 ± 6.02	104.33 ± 20.02*

* $P < 0.05$ vs untreated group.

表 2 BMT 治疗 4 个月和 6 个月后 mdx 鼠的运动功能的变化

Tab 2 Change of motor function of mdx mice after BMT 4 months and 6 months ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	Dropping times in traction test	The max stay time on the wire (s)	Dropping times in rotating rod test	The max stay time on the rod (s)	Cycles in rotating wheels test
Untreated group (mdx mice aged 6 months)	71.50 ± 29.34	18.25 ± 21.02	17.25 ± 15.29	352.00 ± 282.87	502 ± 453
BMT group (mdx mice aged 6 months after BMT 4 months)	31.17 ± 25.59*	41.67 ± 31.80*	5.83 ± 8.18	725.67 ± 215.71*	392 ± 279
Untreated group (mdx mice aged 8 months)	59.00 ± 29.09	16.00 ± 10.30	9.40 ± 7.44	388.20 ± 220.17	985 ± 776
BMT group (mdx mice aged 8 months after BMT 6 months)	20.44 ± 19.69*	50.11 ± 26.55*	0.86 ± 1.57*	825.86 ± 141.79*	587 ± 825

* $P < 0.05$ vs untreated group.

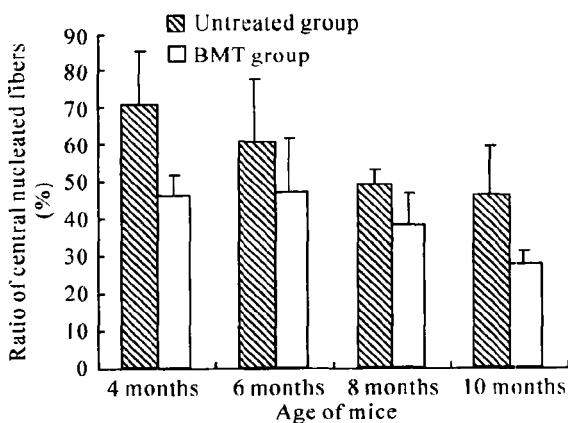


Fig 5 Comparison of central nucleated fibers of mdx mice between untreated group and BMT group. % . $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

图 5 BMT 治疗组和未治疗组 mdx 鼠的骨骼肌细胞核中心移位纤维的比例

讨 论

骨髓干细胞具有取材方便、来源丰富、多向分化能力强等特点,故日益成为干细胞研究的热点,而骨髓移植作为干细胞移植最简单可行的手段,应用越来越广泛。1995 年 Wakitani 等^[3]和 1999 年 Gussoni 等^[4]分别在体内、外证实了骨髓干细胞可以分化成骨骼肌细胞,这为 BMT 治疗遗传性肌病奠定了基础。2002 年,张为西等^[5]证实,在移植相同剂量细胞的前提下,全骨髓细胞移植较任何单一成分的造血干细胞或基质干细胞移植的 mdx 鼠体内的抗肌萎缩蛋白表达阳性率都高。故在肌病的治疗中多采用全骨髓

直接移植。本文采用此方法来治疗 DMD 的模型鼠 mdx 鼠,对其疗效进行客观分析。

本研究中,在 BMT 后 4 个月和 6 个月,mdx 鼠的骨骼肌细胞膜上有抗肌萎缩蛋白表达,其可能的表达机制有两种:一是骨髓干细胞定居于骨骼肌中,转变为肌卫星细胞,由后者逐渐进入肌细胞分化轨道;二是骨髓干细胞直接与病损的肌细胞相互融合,形成嵌合体来表达抗肌萎缩蛋白。而抗肌萎缩蛋白之所以能够在骨骼肌细胞膜上表达长达 6 个月之久,有两方面的原因:一是 BMT 后骨髓干细胞具有在特定的组织中长期定居并发挥功能的特性。Pereira 等^[6]发现,BMT 后骨髓干细胞在 1 个月内逐渐向不同的组织和器官分布,在 1 个月时基本分布完成,而这种分布比例可以稳定存在至少 5 个月之久。而 Liechty 等^[7]的研究中,移植的基质干细胞可在宿主体内多个器官存活长达 13 个月。二是骨髓干细胞首先重建受体的骨髓造血系统,使其成为含有抗肌萎缩蛋白基因的骨髓干细胞池。这种干细胞池不断释放干细胞入血,并定居在骨骼肌中分化为可表达抗肌萎缩蛋白的骨骼肌细胞,使体内骨骼肌的修复成为一个连续不断的长期过程^[8]。

对于 DMD 病人和 mdx 鼠来说,最主要病理变化是:抗肌萎缩蛋白的缺乏导致了骨骼肌进行性变性坏死,其最突出的表现是核中心移位。Abe 等^[9]发现细胞核的中心移位出生后进行性发展,3 个月时达高峰,约有 70% - 80% 的肌纤维出现 CNF。CNF 比例是评价在再生之前细胞变性坏死程度的重要指标

之一。在本研究中, C57 鼠没有 CNF, 没有肌纤维的变性坏死, 这与文献报道相符^[10]。而鼠龄 4 个月的 mdx 鼠 CNF 比例最高, BMT 后的 2 个月和 8 个月肌细胞核中心移位比例明显下降, 说明 BMT 后抗肌萎缩蛋白的表达使 mdx 鼠的骨骼肌细胞膜的通透性下降, 肌纤维变性坏死减少, 对细胞起到了保护作用。

mdx 鼠的骨骼肌由于肌肉变性坏死而导致肌纤维假性肥大, 骨骼肌重量和体积反而会比正常的 C57 鼠大^[11]。而本研究中, BMT 后的 mdx 鼠的骨骼肌的湿重小于未治疗组, 是肌纤维得到了修复, 使假性肥大的纤维减少所致。但由于 BMT 后抗肌萎缩蛋白表达量较少, 尚未达到使肌肉电生理功能明显改善的程度。Yang 等^[12]用病毒转染的方法使 mdx 鼠膈肌的抗肌萎缩蛋白阳性表达率达到了 51%, 但膈肌的强直收缩力并无明显改善, 这与本研究的结果有类似之处。这与几个因素有关: ①最主要的原因是抗肌萎缩蛋白的表达量低。今后研究的重点应是用增加移植的细胞量、减少免疫排斥等方法提高目的蛋白的表达量。②BMT 后是否会使骨骼肌功能得到改善受鼠龄、治疗前 mdx 鼠肌肉变性坏死程度、运动量大小等多方面因素的影响。尽管如此, BMT 的最大优点是静脉移植的骨髓干细胞分布范围广, 使全身的骨骼肌, 甚至包括病损的膈肌和心肌都可能表达抗肌萎缩蛋白, 目的蛋白分布广泛。这对 DMD 这种全身性疾病十分重要, 是以往基因治疗和成肌细胞移植治疗的局部多点肌肉注射等方法所无法替代的。

BMT 治疗的最终目的是使受体的运动功能得到改善。在本研究中, 牵引实验以检测前肢的肌力为主; 转棒实验需要小鼠四肢肌肉的协调运动, 是综合评价四肢, 尤其是后肢肌力的运动实验。两者都要求小鼠被动运动, 较能真实反映其运动能力。本研究中, BMT 治疗后 mdx 鼠的被动运动有所改善。而转轮实验主要反映小鼠的主动运动功能, 受中枢神经兴奋程度的影响较大, 且有正反馈作用, 对小鼠肌力反映灵敏性较差, 故本研究中并未见到治疗组与未治疗组之间有明显差别。BMT 后 mdx 鼠的运动实验说明 BMT 可能对 mdx 鼠的运动功能有部分改善, 这可能是 BMT 后的全身骨骼肌抗肌萎缩蛋白及其相关蛋白表达增加导致的综合效果。

综上所述, BMT 后, 骨髓干细胞在 mdx 鼠的骨骼肌和骨髓中长期定居, 分化成表达抗肌萎缩蛋白的

骨骼肌细胞, 起到了对病损骨骼肌的修复作用, 使肌肉的变性、坏死减少, 最终导致了肌肉运动功能的增强。本研究说明 BMT 对 DMD 的治疗有一定价值, 为其临床应用提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 张为西, 张 成, 刘焯霖, 等. Duchenne 型肌营养不良症模型鼠骨髓移植模型的建立[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(2): 89- 92.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 行为药理和学习记忆实验法 [A]. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 643- 674.
- [3] Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5- azacytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 417- 426.
- [4] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation [J]. Nature, 1999, 401(6751): 390- 394.
- [5] 张为西, 张 成, 刘焯霖, 等. Duchenne 肌营养不良模型鼠骨髓移植后 dystrophin 的表达[J]. 中华神经科杂志, 2002, 6(35): 356- 360.
- [6] Pereira RF, Hvalford KW, O' Hara MD, et al. Culture adherent cells from marrow can serve as long - lasting precursor cells for bone, cartilage , and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4857- 4861.
- [7] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site- specific differentiation after in utero transplantation in sheep[J]. Nature Med, 2000, 6(11): 1282- 1286.
- [8] Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem cell" status of muscle satellite cells[J]. Dev Biol, 2000, 218(2): 115- 124.
- [9] Abe S, Kasahava N, Amano M, et al. Histological study of masseter muscle in a mouse muscular dystrophy model mdx mouse[J]. Bull Tokyo Dent Coll, 2000, 41(3): 119- 122.
- [10] 张为西, 张 成, 刘焯霖, 等. 过量运动对肌营养不良模型鼠骨骼肌的损害作用[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(3): 363- 365.
- [11] Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, et al. The mdx skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1988, 14(4): 299- 314.
- [12] Yang L, Lochmuller H, Luo J, et al. Adenovirus- mediated dystrophin minigene transfer improves muscles strength in adult dystrophic(MDX) mice[J]. Gene Therapy, 1998, 5(3): 369 - 379.