

[文章编号] 1000- 4718(2006)06- 1129- 04

大鼠骨髓间质干细胞对同种骨髓移植后造血重建和免疫重建的作用*

雷俊霞^{1,6}, 郭振宇², 赵东长³, 李红霞⁴, 余伟华¹, 张秀明⁶,
郑芹¹, 魏箐⁵, 李树浓¹, 项鹏^{6△}

(中山大学¹中山医学院病理生理教研室,⁶干细胞中心, 广东 广州 510080;

²中山大学附属第五医院器官移植科, 广东 珠海 519000; ³广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 510010;

⁴广州市公安局刑事科学技术研究所, 广东 广州 510030; ⁵中山大学附属第二医院医学中心, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 探讨大鼠骨髓间质干细胞(MSC)对同种异体骨髓移植造血重建和免疫重建的影响。方法: 建立大鼠同种异体骨髓移植模型, 通过生存率分析、外周血象检测、免疫细胞计数和受体免疫功能检测, 综合评价 MSC 对骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)后造血重建和免疫重建的作用。结果: (1) MSC 可促进 BMT 后造血重建: 移植后 30 d, 共移植组外周血白细胞、淋巴细胞和血小板数均高于单纯骨髓移植组; 共移植组骨髓细胞数也高于对照组。(2) MSC 可促进 BMT 后免疫重建: 移植后 30 d, 共移植组胸腺细胞数、脾细胞总数均高于骨髓单纯移植组; 共移植组对 ConA LPS 刺激的淋巴细胞增殖反应以及对第三体来源的同种混合淋巴细胞反应均强于单纯 BMT 组。结论: 大鼠 MSC 与骨髓共移植对同种异体骨髓移植造血重建和免疫重建有一定促进作用。

[关键词] 间质干细胞; 骨髓移植; 造血重建; 免疫重建

[中图分类号] R338.8

[文献标识码] A

Effects of cotransplantation of rat bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow on hematopoiesis

LEI Jun-xia^{1,6}, GUO Zhen-yu², ZHAO Dong-chang³, LI Hong-xia⁴, YU Wei-hua¹, ZHANG Xiu-ming⁶, ZHENG Qin¹, WEI Qing⁵, LI Shu-nong¹, XIANG Peng⁶

(¹Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical College, ⁶Stem Cell Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ²Department of Organ Transplantation The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; ³Department of Pediatrics, Guangdong Province Maternal and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China; ⁴Institute of Criminal Sciences, Public Security Bureau, Guangzhou 510030, China; ⁵Medical Center, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate effects of rBMSC on hematopoiesis and immune reconstitution after allo-hematopoietic stem cells transplantation (HSCT). **METHODS:** Allogeneic BMT model from Fischer344 rats (RT-1A1) to Wistar rats (RT-1Au) was established. The effects of MSCs on hematopoietic reconstitution and immune reconstitution were studied by observing the survival rate, peripheral blood counts, thymus counts, spleen counts, bone marrow counts and immune function analysis at 30 days after transplantation. **RESULTS:** 1. Cotransplantation of MSCs and bone marrow (BM) was demonstrated to improve hematopoietic reconstitution. Lymphocyte and platelet counts in peripheral blood in cotransplantation groups were higher than those in control groups. More bone marrow nucleated cells were also observed in cotransplantation groups. 2. Cotransplantation of MSCs and BM improved immune reconstitution. First, overall thymic cellularity and spleen cellularity significantly increased in cotransplantation groups at day 30. Secondly, cotransplantation improved immune functional recovery. Non-specific lymphocytes proliferation reaction induced by ConA and LPS increased in cotransplantation group, and so did for allogeneic mixed-lymphocyte reaction. **CONCLUSION:** Hematopoietic reconstitution and immune reconstitution were significantly enhanced by MSCs cotransplanted with BM.

[KEY WORDS] Mesenchymal stem cells; Bone marrow transplantation; Hematopoietic remodeling; Immune remodeling

由于移植相关死亡率及原发疾病复发率的下降, 目前造血干细胞移植(hematopoietic stem cell trans-

plantation, HSCT) 已越来越多地用于恶性血液病(白血病、淋巴瘤等)、恶性肿瘤(如神经母细胞瘤、肺癌

[收稿日期] 2005- 06- 29

[修回日期] 2005- 09- 29

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30100188); 广州市科技计划项目(No. 2002U13E0011) 资助

△通讯作者 Tel: 87335822; E-mail: Xiangp@mail.sysu.edu.cn

等)及某些遗传病的治疗。尽管造血干细胞移植已取得明显疗效,甚至也是某些疾病的唯一根治方法,但是,即使在造血干细胞成功植入后,致死性感染的发生率依然很高。据 McGlave 报道^[1]:在用无关供体而 HLA 匹配的供受者间进行骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)治疗慢性髓系白血病时,有 1/3 的患者死于感染。这种威胁生命的致死性感染被证实与骨髓移植后 T 细胞,尤其是 CD4⁺ T 细胞难以恢复密切相关。T 细胞重建困难既可导致严重感染,也成为移植后肿瘤复发的主要诱因,已成为困扰临床的一大难题。

最近,有报道骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)作为骨髓基质细胞的共同前体细胞,可明显促进造血干细胞的植入、分化^[2]。此外,还有发现 MSC 具有特殊的免疫调节效应,对 GVHD 有一定的抑制作用^[2-4]。但 MSC 对免疫重建的影响还未见系统报道,而这正是临床特别关注的问题。为此,本实验建立大鼠同种异体骨髓移植模型,在此基础上探讨 MSC 与 BM 共移植后免疫重建的特点。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 实验动物 中山大学中山医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂

①常规试剂 RPMI-1640、DMEM-LG(Gibco-BRL, Grand Island, NY), MTS/PTS(Promega, USA), 丝裂霉素、ConA、LPS(Sigma)。

②免疫荧光标记抗体 荧光标记小鼠抗大鼠抗体 MHC-I-FITC、MHC-II-FITC、CD86-FITC、CD80-PE、CD29-FITC、CD44-FITC、CD61-FITC、CD11b-FITC、CD71-FITC、CD45-FITC、CD45R-FITC(Pharmingin, San Diego, CA)。

③分子生物学试剂 Genomic DNA purification kit(G & T Biotech) PCR 引物由上海生物工程有限公司合成、Taq 酶(MBI)。

2 方法

2.1 MSC 的分离、扩增及鉴定 按本室常规方法操作,收获大鼠股骨骨髓,贴壁培养,经反复换液、弃悬浮细胞,待细胞传至第 5 代时,可获得纯的骨髓 MSCs。选择 P5-P10 代的细胞,用流式细胞技术分析细胞表面标记并进行成脂、成骨样细胞诱导鉴定。

2.2 大鼠 MSC 对同种异体骨髓移植后造血重建和免疫重建的影响

①供者大鼠的骨髓细胞制备取 6-8 周龄 Fischer344(F344, RT1A¹)雄性大鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下取出双侧股骨和腓骨,用注射器吸取 RPMI-1640 培养基冲出骨髓腔中细胞,Tris-NH₄Cl 溶解红细胞,台盼蓝染色计算细胞活力和数目,细胞活力应为 95%

以上,调节细胞浓度为 $1 \times 10^{11}/L$ 。

②受者大鼠预处理、分组 受者大鼠为体重 180-200 g 的雌性 Wistar(RT1A^u)大鼠,移植前 3 d 开始饮用含庆大霉素(320 g/L)和红霉素(250 g/L)的饮用水。移植当天采用 [⁶⁰Co] γ 射线全身照射法进行预处理。照射剂量为 8.5 Gy,剂量率为 0.7 Gy/min。照射后 6 h 内,经腹股沟静脉移植供体 MSC(5×10^6)和或骨髓细胞(0.8×10^8)。分组如下: A 组(单纯骨髓移植组),每只大鼠移植 0.8×10^8 个骨髓细胞; B 组(BM 与 MSCs 共移植组),每只大鼠移植 0.8×10^8 个骨髓细胞+ 5×10^6 个 MSCs; C 组(单纯照射组),预处理后不移植细胞,在股静脉注射等量的 NS。每组 10 只大鼠,移植后 30 d 取材。

③Fischer344 大鼠 BM 植入 Wistar 大鼠检测 在骨髓移植后 30 d,取单纯骨髓移植组与共移植组的外周血,提取 DNA,PCR 扩增 Y 染色体,扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。引物序列及退火温度如下: SRY 引物序列: P1, 5' - AGCAGCTGGATAT-CAGTGG- 3'; P2, 5' - TCTGGTTCCTGGAGGACTGG- 3'。退火温度为 55 °C。

④大鼠 MSC 对同种异体骨髓移植后造血重建和免疫重建的影响 (1)观察生存指征。(2)分别于移植后 15 d、30 d 断尾采集外周血,用血象分析仪动态检测血象变化。(3)取大鼠胸腺、脾脏、股骨,制备单个核细胞悬液(其中脾细胞悬液制备要求无菌操作),计数。部分脾细胞悬液调整浓度,用于细胞功能检测。(4)移植大鼠免疫功能检测: ConA、LPS 诱导的淋巴细胞增殖实验。无菌制备单个核脾细胞悬液,台盼蓝染色确定细胞活力 > 95%,调节细胞浓度为 4×10^9 cells/L 备用。将脾细胞加入 96 孔板, 4×10^5 cells/well, 并分别加入 ConA(终浓度为 5 mg/L), LPS(终浓度为 1 mg/L)进行诱导,培养基终体积为 200 μ L, 37 °C 5% CO₂ 培养 3 d 后进行 MTS/PTS 比色法测定。实验结果以刺激指数表示: 刺激组 3 孔平均值/对应未刺激组 3 孔平均值。

单向混合细胞培养: 将预处理后的刺激细胞(用浓度为 25 mg/L 的丝裂霉素, 37 °C 5% CO₂ 预处理 30 min)和反应细胞共同加入 96 孔板,两者终浓度分别为 2×10^5 cells/well、 4×10^5 cells/well。每组设 3 个复孔。37 °C 5% CO₂ 培养 5 d, MTS/PTS 比色法测定细胞增殖情况。

3 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件包处理,多组间比较采用方差分析,并绘制 Kaplan-Meier 存活曲线。

结 果

1 细胞的形态、表型及多向分化潜能

5-10 代的 MSC 呈宽大梭形,旋涡状生长,1:2 分瓶传代,2-3 d 即可见 80% 融合。细胞表面标志

为: MHC- I、MHC- II、CD80、CD86、CD11b、CD45 均为阴性; CD61、CD71 弱阳性; CD44 在不同样品可阳性,也可阴性。一定条件诱导后,细胞可向成骨、成脂及神经样细胞分化。

2 MSC 与 BM 共移植对移植后存活率的影响

单纯照射组 9 只大鼠在预处理后的第 2 周内全部死亡,平均存活时间为(12.1 ± 1.3) d。骨髓病理显示造血衰竭,各组动物的存活情况,见图 1。

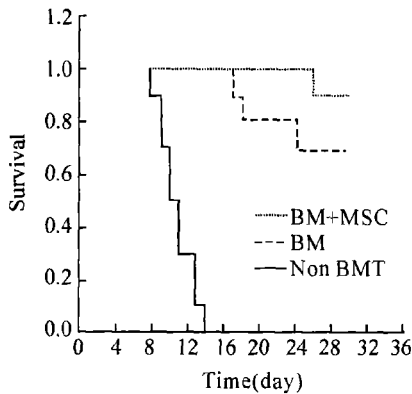


Fig 1 MSC cotransplantation increased survival.
图 1 骨髓移植后各组大鼠的生存曲线

3 MSC 与 BM 联合移植促进造血重建和免疫重建

3.1 F344 大鼠 BM 植入 Wistar 大鼠的指征 在骨髓移植后 30 d,单纯骨髓移植组与共移植组的外周血均显示 Y 染色体阳性。见图 2。

3.2 MSC 对大鼠同种异体骨髓移植外周血象恢复的促进作用 对大鼠外周血的动态观察表明(表 1),单纯骨髓移植组、骨髓与 MSC 共移植组的血红蛋白均恢复较快,+ 30 d 时即恢复正常。在同一检测时

点比较,共移植组的淋巴细胞、血小板数均高于单纯骨髓移植组。+ 30 d 时,共移植组血小板已恢复正常。

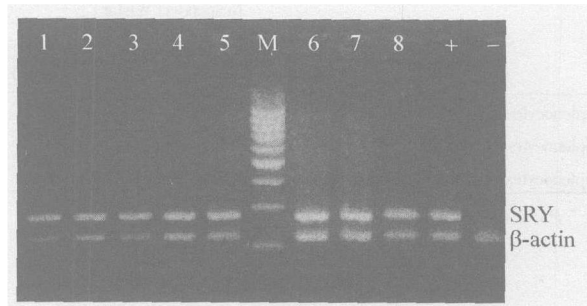


Fig 2 SRY gene expression in the recipients 30 days after IV injection of 5×10^6 MSCs + 0.8×10^8 bone marrow cells. M: marker; - : negative control, DNA of female rats peripheral blood; + : positive control, DNA of male rats peripheral blood; 1- 4: BM transplantation group; 5- 8: cotransplantation group transplanted with bone marrow and MSC.

图 2 移植鼠 SRY 基因表达

3.3 MSC 与 BM 共移植促进骨髓细胞数、胸腺细胞数和脾细胞数的恢复 移植后 30 d,共移植组骨髓有核细胞数明显高于骨髓单纯移植组,两者分别为 $(52.67 \pm 8.62) \times 10^6$ cells/根股骨、 $(35.38 \pm 6.16) \times 10^6$ cells/根股骨, $P < 0.05$;共移植组胸腺细胞总数明显高于单纯骨髓移植组,两组的胸腺细胞总数分别为 $(5.64 \pm 0.82) \times 10^8$ 、 $(3.26 \pm 0.73) \times 10^8$ ($P < 0.05$),正常为 $(7.16 \pm 0.79) \times 10^8$;共移植组脾细胞总数也高于单纯骨髓移植组,两组的脾细胞总数分别为 $(5.66 \pm 0.83) \times 10^8$ 、 $(4.01 \pm 0.55) \times 10^8$ ($P < 0.05$),正常为 $(7.83 \pm 1.21) \times 10^8$ 。

表 1 移植后外周血象的动态变化

Tab 1 Peripheral blood counts after allo- BMT ($\bar{x} \pm s$)

Peripheral blood	BM group		BM+ MSC group		Normal group (n= 10)
	+ 15 d (n= 10)	+ 30 d (n= 7)	+ 15 d (n= 10)	+ 30 d (n= 9)	
Hb(g/L)	50.35 ± 9.26	127.56 ± 14.04	79.03 ± 16.71*	135.83 ± 24.30	128.67 ± 11.46
WBC(× 10 ⁹ cells/L)	1.64 ± 0.31	5.47 ± 1.11	2.25 ± 0.51*	7.12 ± 1.70* [△]	9.88 ± 1.72
Lymph(× 10 ⁹ cells/L)	1.31 ± 0.32	4.66 ± 1.03	1.79 ± 0.56*	6.05 ± 1.39* [△]	8.41 ± 1.63
Plat(× 10 ⁹ cells/L)	35.14 ± 7.84	402.50 ± 63.70	83.52 ± 19.39*	594.33 ± 121.09*	676.67 ± 124.87

* $P < 0.05$ vs the corresponding item of BM group at the same time point; [△] $P < 0.05$ vs normal group.

3.4 MSC 与 BM 共移植有利于免疫功能的恢复

丝裂原诱导的淋巴细胞增殖反应与同种混合淋巴细胞反应被用来评价骨髓移植后免疫功能的恢复。移植后 30 d,共移植组的受体脾细胞、单纯骨髓移植组脾细胞分别与供体来源的脾细胞、受体来源的脾细胞共培养,两组均显示耐受状态。而共移植组的受体脾细胞对 ConA、LPS、第三体来源的脾细胞刺激均显示较对照组更高的刺激率,均 $P < 0.05$ 。见表 2、表 3。这表明共移植组的 T、B 淋巴细胞功能均较对照组恢复早。

表 2 移植后 30 d,大鼠脾细胞对 ConA、LPS 诱导的淋巴细胞增殖反应

Tab 2 MSC cotransplantation improved ConA and LPS stimulated proliferation compared to BM transplantation group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Mitotic response of splenocytes	
	To ConA	To LPS
BM (n= 7)	4.78 ± 1.17	2.11 ± 0.53
BM+ MSC (n= 9)	6.33 ± 1.25*	3.22 ± 0.62*
N (n= 10)	7.56 ± 1.36	5.25 ± 1.23

* $P < 0.05$ vs BM group.

表 3 移植后 30 d, 大鼠同种异体混合淋巴细胞反应
Tab 3 Alloreactivity of splenocytes on 30 days after transplant
($\bar{x} \pm s$)

Stimulator	Responder(Wistar)		
	BM (n= 7)	BM+ MSC (n= 9)	N (n= 10)
Splenocytes of normal F344	1.89 ± 0.41	2.02 ± 0.38	5.86 ± 1.21
Splenocytes of normal Wistar	2.79 ± 0.68	3.13 ± 0.64	1.16 ± 0.31
Splenocytes of normal SD	4.27 ± 0.92	5.95 ± 1.12* ▲	7.33 ± 1.37

* P < 0.05 vs BM group; ▲ P < 0.05 vs N group.

讨 论

在一些免疫缺陷动物模型, 如人造血干细胞绵羊宫内羊胎移植 NOD- SCID 鼠异种移植, MSC 已被证实促进造血干细胞移植后造血重建^[5,6]。为进一步探讨 MSC 对同种异体骨髓移植的影响, 本实验通过 F344- Wistar 大鼠的同种异体骨髓移植模型, 探讨 MSC 对同种异体骨髓移植后造血重建和免疫重建的影响。

移植后 30 d, 受体生存率、外周血象、骨髓有核细胞数均高于单纯骨髓移植组, 表明一定量骨髓细胞与 MSC 共移植可明显促进造血恢复。据认为 MSC 可能通过释放各种细胞因子、表达黏附分子、细胞外基质蛋白等促进造血干细胞的黏附、归巢, 并进一步支持其增殖、分化潜能^[2]。

MSC 在明显促进同种骨髓移植后造血恢复的同时, 对受体免疫功能的恢复也有积极作用。移植后 30 d, 共移植组胸腺细胞数、脾细胞数均较单纯移植组高。进一步免疫功能检测发现, 共移植组对 ConA 和 LPS 刺激的淋巴细胞增殖反应也高于单纯骨髓移植组。两组间受体对供体来源的混合淋巴细胞反应均产生耐受; 而共移植组受体对第三体来源的同种混合淋巴细胞反应较单纯 BMT 组增强。因此, MSC 可从数量和功能多方面促进淋巴细胞的重建。

MSC 对骨髓移植后免疫重建的促进作用可能与下列因素有关。

(1) MSC 可能通过降低 GVHD 对免疫重建发挥积极作用。MSC 可降低 GVHD 的发生率或减轻其严重程度^[2-4,8,11]。我们在实验中也观察到单纯骨髓移植组均表现出不同程度的 GVHD: 如体重减轻、腹泻、耳朵红斑和脱毛等; 而 MSC 与骨髓共移植组未观察到典型的 GVHD 症状。由于 GVHD 可选择免疫器官为攻击靶子, 导致淋巴器官萎缩或细胞减少; 严重干扰 CD4⁺ T 的发育并抑制 T、B 淋巴细胞功能。因此, MSC 通过降低 GVHD 对 BMT 后免疫重建有积极作用。(2) MSC 是否通过直接途径促进免疫重建? 一些相关的报道已表明: 骨髓基质细胞可借助 CD90、CD62L、CD44、CD117 等黏附未成熟胸腺细胞, 并支持这些细胞的体外存活、增殖^[9]; 骨片与骨髓移植后, 骨髓基质细胞可迁移至胸腺, 并参与胸腺细胞

的阳性选择^[7]。但是直接的证据是要进一步探讨 MSC 在免疫器官的分布。我们采用 PCR 技术曾检测到标记 MSC 在免疫器官的长期存在(本室资料); 也有报道^[10]采用 Real-time PCR 技术可检测 MSC 在免疫器官及其它脏器的长期定居。

目前 MSC 的临床应用依然是审慎的, 进一步通过体内实验动态检测 MSC 的体内分布, 尤其是采用 FISH 或免疫组化方法直接检测 MSC 在体内的分布; MSC 对机体免疫功能的动态影响, 将具有更重要意义, 也是我们以后在实验中特别关注的问题。

[参 考 文 献]

- [1] McGlave PB, Shu XO, Wen W, et al. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years experience of the national marrow donor program [J]. *Blood*, 2000, 95(7): 2219- 2225.
- [2] Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 996: 235- 244.
- [3] Dae- Chul Jeong, Nak- Gyun Chung, Sun- Young Kim. Mesenchymal stem cells might prevent lethal GVHD in MHC mismatched murine allogeneic bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 2003, 102(11): 5369(abstract).
- [4] Katarina LB, Ida R, Berit S, et al. Treatment of severe acute graft- versus- host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439- 1441.
- [5] Kruisselbrink AB, Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood- derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(8): 870- 878.
- [6] Almeida PG, Porada CD, Tran N, et al. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation [J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3620- 3627.
- [7] Li Y, Hisha H, Inaba M, et al. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in positive selection [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28(8): 950- 960.
- [8] 李浩威, 温冠媚, 肖庆忠, 等. 供者源性骨髓间充质干细胞对急性移植物抗宿主病的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(5): 577- 580.
- [9] Barda SM, Rozenszajn LA, Globerson A, et al. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis [J]. *Exp Hematol*, 1996, 24(2): 386- 391.
- [10] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates [J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2999- 3001.
- [11] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 321- 334.