



异体骨髓干细胞移植后假肥大型肌营养不良症模型鼠膈肌dystrophin表达及病理改变

假肥大型肌营养不良症(DMD)是一种致死性X-连锁隐性遗传病,由位于染色体Xp21.2的抗肌萎缩蛋白(dystrophin)基因突变导致肌细胞膜的骨架蛋白dystrophin缺乏所致。患者常在12岁左右不能行走,20岁左右死于呼吸衰竭或心力衰竭,其中绝大多数患者由于膈肌萎缩而死于呼衰。对DMD的治疗至今仍无良方,只有纠正或弥补其基因缺陷才能从根本上治疗DMD。基于此点,细胞治疗日受瞩目。成肌细胞移植只能用于局部注射,治疗部位局限,难以治疗心肌与膈肌损害,静脉移植时dystrophin表达量少且易造成血管栓塞,同时免疫排斥反应强烈而难以持久表达,而骨髓干细胞被认为是目前最有前途的候选细胞之一。

骨髓中的造血干细胞和间充质干细胞经实验证实具有自我更新和多向分化潜能,可分化成包括肌肉组织在内的多种组织。1999年,Gussoni等[1]将C57雄鼠的骨髓细胞经尾静脉注入放疗后的雌性mdx鼠,观察到供体来源的dystrophin表达,建立了骨髓移植治疗DMD的方法。mdx小鼠是目前应用最广泛的DMD模型鼠,过去的DMD细胞治疗实验侧重观察mdx鼠的肢体骨骼肌,忽视了对膈肌疗效的评价,而后者对移植疗效和预后的评价可提供不可忽视的证据。

本实验采用大鼠骨髓干细胞经尾静脉对放疗后的mdx鼠进行移植,观察移植后膈肌的病理改变和抗肌萎缩蛋白的表达情况,以评价骨髓干细胞系统移植对mdx鼠膈肌的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

原代纯合子mdx配种鼠(C57BL/10ScSn-DMD mdx)购于美国Jackson实验室,实验所用mdx鼠为原代配种所生。雄性SD大鼠(60-80g)10只作为供体鼠;正常野生型C57BL/6雌性小鼠6只(12-16周龄)作正常对照组;雌性mdx鼠(8周龄)18只进入移植治疗组;经放疗但未治疗的雌性mdx鼠(12-16周)6只作未治疗组。上列实验用鼠均有动物合格证。

1.2 主要实验试剂

兔抗鼠dystrophin多克隆抗体、山羊抗兔-FITC IgG二抗(Santa Cruz公司),引物合成(上海生物工程技术服务有限公司),TRIzol(Invitrogen公司),逆转录试剂盒(Fermentas),DNA提取试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),Tag酶(MBI公司),低糖DMEM细胞培养液(GIBCO公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 mdx鼠移植前放疗预处理方案 在细胞移植前3天对mdx鼠进行放疗预处理:放疗视野30.0 cm×30.0 cm,治疗距离80.0 cm,治疗深度2.0 cm,照射剂量7 Gy,剂量率73.19 cGy/min。实验鼠于照射前后隔离运输,照射后送校实验动物中心隔离饲养。加氟哌酸、复合维生素B等入饲料水,并加鸡蛋、葵花子饲养,2周后改为一般饲料。

1.3.2 骨髓干细胞移植 放疗同日取供体SD大鼠10只,乙醚麻醉后引颈处死,取后肢股骨、胫骨髓

干细胞培养, 方法同文献[2]。细胞培养3 d 后, 将培养液及悬浮骨髓干细胞移入15 ml 试管。培养瓶内加少许无血清低糖DMEM培养基, 反复冲洗贴壁细胞; 将冲洗后的细胞悬液移入15 ml 试管, 3 000 r/ min离心5 min。弃上清, 再用无血清低糖DMEM培养基重悬细胞并离心, 重复2 次, 制备适量细胞悬液, 并计数细胞, 检测细胞活力达98 %以上。取8周龄经放疗预处理的mdx鼠经尾静脉进行移植, 移植细胞数为 1.0×10^7 个/只, 每只注射0.4 ml, 每次吸取细胞液前将其混匀, 注射顺利、无外渗为移植成功。对照组6只经放疗预处理的mdx鼠从尾静脉注入等体积无血清DMEM作空白对照。

1.3.3 移植后模型鼠膈肌组织HE染色 分别取移植后4、8、12周的治疗鼠和对照鼠膈肌用OCT包埋, 投入在液氮中预冷的异戊烷7-8 s后, 放入冰冻切片机制片, 厚度为5 μm , 将切片在冷丙酮固定10 min后行常规HE染色, 中性树脂封片, 镜下观察结果并拍照。镜下观察内容为肌细胞的形态、排列、一致性、变性坏死情况、核中心移位纤维(CNF)比例等。CNF比例=CNF细胞数/总纤维数。每只鼠观察6张切片, 每张切片连续取6-10个非重叠视野, 取其均值作结果。

1.3.4 移植后肌肉组织的dystrophin免疫荧光检测 取移植后4、8、12周mdx鼠及对照鼠的膈肌做冰冻切片(具体同前), 用冷丙酮固定10 min后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。具体方法为: PBS洗 3×5 min; 3% H_2O_2 封闭10 min, PBS洗 3×5 min; 正常山羊血清于室温湿盒内封闭30 min, 甩去封闭血清, 每种切片滴加兔抗鼠dystrophin 50 μl (1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 室温放置30 min, PBS洗 3×5 min; 滴加山羊抗兔IgG-FITC(1:200), 室温下湿盒内孵育60 min, PBS洗 3×5 min。Olympus荧光显微镜观察结果并拍照, 每只鼠观察6张切片, 每张切片连续取6-10个非重叠视野, 计算荧光阳性纤维占总纤维比例, 取其均值作结果。

1.3.5 移植后膈肌组织dystrophin的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 取新鲜C57鼠、对照组mdx鼠以及治疗组各个时间点的mdx鼠的膈肌按照TRIzol法制备RNA, 分别取1 μg RNA进行逆转录。大鼠dystrophin及内参GAPDH的cDNA引物使用Oligo 5.0自行设计, 引物序列见表1。将dystrophin与GAPDH分别扩增, PCR扩增体系完全相同: DNA2.0 μl , dNTP0.2 mmol/L, MgCl₂2.0 mmol/L, 10 \times Buffer3.0 μl , Taq酶1unit, 引物各0.5 $\mu\text{mol/L}$, 去离子水补至总体积30 μl 。循环参数为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 34个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, Gel2Doc200 型凝胶成像分析仪拍照, 使用alpha-imager 2800软件分析条带的灰度值, dystrophin的相对量用dystrophin灰度/GAPDH灰度表示, 从而进行半定量分析。

表 1 dystrophin 及 GAPDH 的 cDNA 引物序列及
RT-PCR 扩增片段长度

Tab.1 Primer sequence of dystrophin and GAPDH
cDNA and fragment length after RT-PCR

Exon	Primer sequence for CDNA	Fragment length(bp)
Dystrophin	F: 5' ctcgtagtctctgcccaaga3'	444
	R: 5' gttgactgccaaccactcg3'	
GAPDH	F: 5' accacagtccatgccatcac3'	451
	R: 5' tccaccacctgttgctgta 3'	

1.3.6 移植后膈肌组织大鼠Sry基因的PCR检测 取冻存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱的移植后各时间点及未移植mdx鼠与雄性SD大鼠膈肌, 按照试剂盒说明提取并保存DNA。大鼠Sry基因引物序列F: 5' CTGGCTCTGC T CCTACCT3'; R: 5' GCTGTTTGCTGCCTTTGA3'。PCR扩增体系: DNA1.0 μl , dNTP 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 10 \times buffer 3.0 μl , Taq酶1 μl , 引物各0.5 $\mu\text{mol/L}$, 去离子水补至总体积30 μl 。循环参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸50 s, 32 个循环后再72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7min。反应产物经2 %琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, Gel2Doc200 型凝胶成像分析仪拍照, 所得片段大小应为325

bp。

1.4 数据统计

均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用SPSS 11.0统计软件行单因素方差分析，方差齐者组间比较用S-N-K检验，方差不齐者用Games-Howell检验， $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓移植后mdx鼠的膈肌病理检测

正常C57鼠的膈肌可见肌细胞大小形态基本一致，细胞排列紧密，细胞多呈多角形，少数为椭圆形，细胞轮廓清晰、完整，未见变性坏死肌细胞，胞核位于细胞周边，CNF比例为 $(0.83 \pm 0.68)\%$ ，间质无炎性细胞浸润，纤维结缔组织含量少。未治疗的mdx鼠膈肌内可见大量炎性细胞浸润，肌细胞数量明显减少，肌细胞横截面积大小不一，有萎缩和肥大细胞，多角形细胞减少，细胞多成椭圆形，大量脂肪和纤维组织浸润，炎性细胞浸润明显增多，肌细胞核中心移位明显，CNF比例为 $(19.5 \pm 1.87)\%$ 。移植后膈肌细胞较非移植组炎性浸润有所减少，CNF比例显著低于非移植组，且随时间推移递减[移植后4、8、12周分别为 $(15.58 \pm 0.91)\%$ 、 $(12.50 \pm 1.87)\%$ 、 $(10.17 \pm 1.17)\%$]。经两两比较后，各组间差异均有显著性(表2、图1)。

表 2 各组间膈肌 CNF 比例、免疫荧光阳性细胞比例、dystrophin mRNA 相对量列表

Tab.2 The percentage of centrally nucleated fibers (CNF), fibers with dystrophin immunofluorescence and relative level of dystrophin mRNA

($n=6$, Mean \pm SD)

Group	Percentage of CNF(%)	Percentage of fibers with dystrophin immunofluorescence(%)	Relative level of dystrophin mRNA
C57	0.83 \pm 0.68	100.00	0.63 \pm 0.04
Untreated mdx	19.50 \pm 1.87	0.17 \pm 0.41	0
4 weeks after BMT	15.58 \pm 0.91	1.00 \pm 0.32	0.19 \pm 0.05
8 weeks after BMT	12.50 \pm 1.87	6.00 \pm 1.05	0.26 \pm 0.06
12 weeks after BMT	10.17 \pm 1.17	11.92 \pm 1.11	0.36 \pm 0.04

There were significant differences in the percentage of CNF in the diaphragm muscles between any two groups ($P < 0.01$ between 4 and 8 weeks after BMT, $P < 0.05$ between any two of the rest groups). There were significant differences in the percentage of fibers with dystrophin fluorescence in the diaphragm muscles between any two groups ($P < 0.05$ between untreated mice and recipient mice 4 weeks after BMT, $P < 0.01$ between any two of the rest groups). There were also significant differences in the relative level of dystrophin mRNA in diaphragm muscles between any two groups ($P < 0.05$ between the recipients 4 and 8 weeks after BMT, and between the recipients 8 and 12 weeks after BMT; $P < 0.01$ between any two of the rest groups).

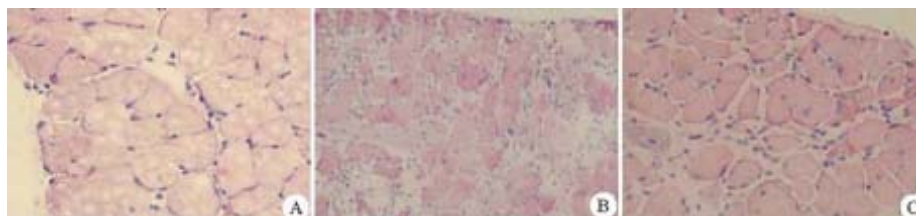


图1 不同组间膈肌HE染色病理学检查

Fig.1 Pathology of the diaphragm muscles (HE staining)

A: The diaphragm muscle fibers of C57 mice in the cross sections are polygon or oval in shape, with clear and intact margin and nuclei in the peripheral portion. There was no inflammatory and connective tissue infiltration (Original magnification: $\times 400$); B: In the diaphragm muscle of untreated mdx mice, the size of the fibers in transverse sections varied enormously with atrophy or hypertrophy. Some fibers showed degenerative and necrotic changes. Obvious inflammatory cell infiltration and replacement by fat and connective tissue can be seen (Original magnification: $\times 200$); C: Diaphragm muscles of a recipient mouse 12 weeks after BMT the percentage of CNF in the treated mdx mice significantly decreased as compared with untreated mdx mice. The fibers were in more orderly alignment with less inflammatory cell infiltration; (Original magnification: $\times 400$)

2.2 移植后mdx鼠膈肌组织dystrophin表达的动态变化

2.2.1 免疫荧光检测dystrophin的表达变化 dystrophin免疫荧光检测后可见C57鼠膈肌肌膜呈均匀完整的绿色荧光，荧光阳性细胞比例为100% (图2A)；未治疗mdx鼠膈肌肌膜基本未见绿色荧光 (0.17 ± 0.41)% (图2B, 表2)；mdx鼠治疗后4周膈肌内可见孤立分布的肌膜dystrophin阳性细胞，约占细胞总数的 1.00 ± 0.32 %，荧光较弱且不均，胞膜着色不全。随时间延长阳性细胞逐渐增多，到移植后8周和12周时分别达到细胞总数的 (6.00 ± 1.05) %和 (11.92 ± 1.11) % (图2C, 表2)，自移植后8周开始可见部分荧光阳性细胞成簇状分布，荧光较移植后4周强，虽胞膜着色仍欠均匀，但荧光强度及完整性增强。两两比较后发现各组间阳性细胞比例差异均有显著性意义 (表2)。



图2 不同组间膈肌的dystrophin免疫荧光检测

Fig.2 Immunofluorescent detection of dystrophin in the diaphragm muscles

A: Homogenous green fluorescence shown on all the fiber membranes of C57 mice (Original magnification: $\times 400$); B: Very little fluorescence in the untreated mdx mice (Original magnification: $\times 400$); C: Dystrophin expression in the diaphragm of a recipient mdx mice 12 weeks after BMT (Yellow asterisks indicate fibers with dystrophin expression on the fiber membrane; original magnification: $\times 400$).

2.2.2 膈肌dystrophin的RT-PCR结果 C57鼠膈肌的dystrophin mRNA相对含量最高 (0.63 ± 0.04)；未移植的mdx鼠膈肌中未检测到dystrophin mRNA；经移植治疗的mdx鼠膈肌mRNA的表达水平随时间推移逐渐增高 (移植后4、8、12周分别为 0.19 ± 0.05 、 0.26 ± 0.06 、 0.36 ± 0.04)。两两比较后各组间差异均有显著意义 (表2、图3)。

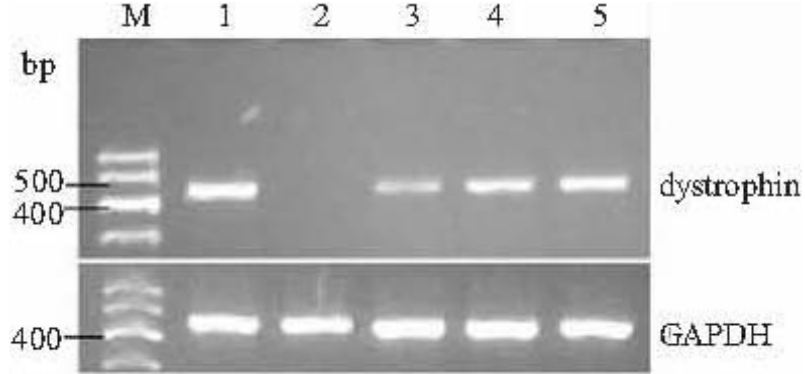


图3 膈肌dystrophin及GAPDH的RT-PCR电泳结果

Fig.3 Representative result of RT-PCR analysis of dystrophin and GAPDH mRNA in the diaphragm

M: Marker; Lane 1: C57 mouse; Lane 2: Untreated mdx mouse; Lane 3: Recipient mdx mouse 4 weeks after BMT, 4: Recipient mdx mouse 8 weeks after BMT; 5: Recipient mdx mouse 12 weeks after BMT

2.2.3 膈肌Sry基因检测 各组mdx雌鼠膈肌DNA经PCR扩增Sry基因片段，结果显示未移植小鼠膈肌内无Sry基因，而移植后各时间点的mdx鼠膈肌内均存在Sry基因(图4)。

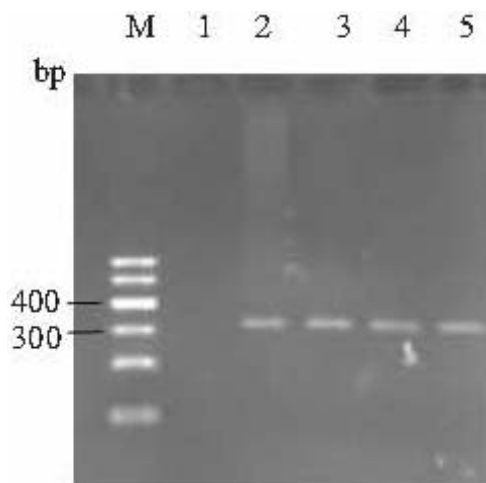


图4 膈肌Sry基因PCR电泳结果

Fig.4 Representative result of PCR analysis of Sry gene in the diaphragm

M: Marker; Lane 1: Untreated mdx mouse; Lane 2: Male SD rat; Lane 3: Recipient mdx mouse 4 weeks after BMT; Lane 4: Recipient mdx mouse 8 weeks after BMT; Lane 5: Recipient mdx mouse 12 weeks after BMT

3 讨论

骨髓干细胞内含有多种类型的细胞，包括间充质干细胞、造血干细胞等，以往的研究证实它们具有多向分化的潜能，可在体内或体外分化为包括肌肉组织在内的多种组织[3][4]，并可自我更新。同时输注混合干细胞可以利用细胞间的相互协同支持作用，尽早恢复造血功能，最大程度的达到治疗目的。研究表明骨髓干细胞包括间充质干细胞和造血干细胞均可向病灶器官和组织定向迁移，其机制尚不明确，推测可能为干细胞受到病变局部的某些物质的吸引而定向迁移到该区域并定居。有人[5]发现大鼠脑卒中模型的卒中脑组织匀浆液可以在体外有效的吸引经培养纯化的骨髓间充质干细胞。另有研究发现造血干细胞可以定向迁移到心肌梗死大鼠

的病变心肌组织[6]。骨髓干细胞的多向分化、自我更新潜能以及向病变组织的定向迁移的特点,使其成为细胞移植治疗DMD的理想候选。

mdx鼠(C57BL/10ScSn-Dmd,mdx;X-linked muscular dystrophy)是基于C57BL/10的突变小鼠,位于dys基因的3185位碱基发生了无义突变(C→T),导致dystrophin蛋白的合成提前终止。mdx鼠出生后3-4周开始出现骨骼肌病变,其中膈肌的坏死最先发生。肌肉组织循环出现坏死-再生,CNF便是再生而又不成熟的肌细胞。mdx鼠包括腓肠肌在内的大部分骨骼肌细胞的病理与人类DMD有所不同,变性、坏死、炎性细胞浸润为主,而脂肪和结缔组织增生不明显。但其膈肌的病变类似于人类DMD,3周左右出现病变后将逐渐加重,最终膈肌细胞被大量脂肪和结缔组织替代。mdx心肌细胞的病变早期较轻微[7]。由于mdx鼠的膈肌病变更类似于人类DMD的骨骼肌病变,应在今后的模型鼠研究中更好的加以研究和利用。本实验中未治疗组mdx鼠膈肌冰冻切片的病理结果进一步支持上述研究结果,可见大量炎性细胞浸润,肌细胞数量明显减少,肌细胞横截面积大小不一,有萎缩和肥大细胞,可见变性坏死纤维,脂肪和纤维结缔组织增生明显,核中移肌细胞明显增多[CNF比例为(19.50±1.87)%],与Liu[8]的研究结果相似。

1999年,Gussoni[1]等将C57雄鼠的骨髓造血干细胞、全骨髓细胞以及SP细胞经尾静脉移植入雌性mdx鼠,分别于5、8、12周后取胫前肌进行dystrophin免疫荧光检测。在全骨髓移植后的第8周观察到供体来源的dystrophin表达,dystrophin阳性细胞数为1%,12周后达到10%。实验结果同时表明骨髓造血干细胞和SP细胞均可以在体内分化为骨骼肌细胞。本课题组以往的研究[9]也证实骨髓细胞移植可以使mdx小鼠的后肢肌肉表达dystrophin。然而以往报道中未见骨髓移植对于膈肌的治疗效果。本实验中,骨髓干细胞移植后4周可见mdx小鼠的膈肌中有dystrophin免疫荧光阳性肌细胞,占肌细胞总数的1%左右,随时间延长逐渐增加,到8周和12周分别增加到(6.00±1.05)%和(11.92±1.11)%,显著高于未移植鼠,证明增多的dystrophin阳性肌细胞归功于干细胞移植;RT-PCR也从RNA水平证实了dystrophin的存在,其mRNA的表达量也随时间推移逐渐增加,与免疫荧光检测结果一致。同时在未经治疗的mdx鼠的膈肌也发现了极少量的dystrophin阳性纤维(0.17±0.41)%,应为可回复肌纤维,与Crawford等[10]的报道一致。HE染色后发现移植后mdx小鼠的膈肌较移植前有所改善,细胞间质内炎性细胞浸润有所减少,核中心移位细胞数随时间延长递减,说明外源性的dystrophin表达使mdx鼠膈肌的变性坏死减少,起到一定的保护作用,这与Feng[8]的研究一致。本实验结果进一步证实骨髓干细胞在体内可以分化为骨骼肌细胞,并且经系统移植后可以分布到mdx鼠病理改变最严重与最典型的膈肌。

我们选择大鼠Y染色体特异的Sry基因作为遗传标志,采用PCR技术通过扩增Sry基因部分序列观察雄性供体细胞在雌性受体内的表达,结果在移植后各时间点的mdx小鼠膈肌均检测到Sry基因,进一步证实移植组mdx鼠膈肌内日益增多的dystrophin阳性肌细胞来源于供体雄鼠,证实移植成功。

LaBarge[11]等追踪运动致肌肉损伤时GFP+骨髓干细胞移植分化为肌细胞的动态变化,发现骨髓干细胞不仅转化为肌细胞而且可转化为肌卫星细胞,尤其当接受后肢放疗使体内卫星细胞破坏时GFP+细胞与卫星细胞池结合的能力增强,提示骨髓干细胞移植后向肌细胞的演变过程可能与健康肌细胞的发育过程基本相同,即先成为肌卫星细胞,而后逐步发育为肌细胞。据此,我们推论,外源性骨髓干细胞经静脉移植mdx鼠后(大部分归巢到骨髓),在严重病变的膈肌所表达的炎性趋化因子的吸引下,动员入血、穿过膈肌血管到达膈肌,先转变为肌卫星细胞,随后在局部刺激因素的作用下逐步发育成肌细胞。

总之,本实验采用大鼠骨髓干细胞经尾静脉移植治疗DMD模型鼠mdx鼠,从肌肉病理、免疫荧光和mRNA、DNA的水平证实供体细胞成功植入受体小鼠的膈肌,进一步证实了骨髓干细胞移植有希望在今后成为全身治疗DMD的有效方法。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

[1]Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation[J]. Nature,1999, 401(6751): 390-4.

[2]张为西,张成,刘焯霖,等.建立Duchenne型肌营养不良鼠的骨髓移植模型[J].中山医科大学

学报, 2001, 22(2): 89-92.

Zhang WX, Zhang C, Liu ZL, et al. Establishment of marrow transplantation model in mice with Duchenne muscular dystrophy[J]. Acad J SUMS, 2001, 22(2): 89-92.

[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): 1417-26.

[4]Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. Science, 1998, 279(5356): 1528-30.

[5]Wang L, Li Y, Chen J, et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture[J]. Exp Hematol, 2002, 30(7): 831-6.

[6]Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1395-402.

[7]Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, et al. Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings[J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14(8-9): 491-6.

[8]Liu F, Nishikawa M, Paula RC, et al. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd (mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA[J]. Mol Ther, 2001, 4(1): 45-51.

[9]陈松林, 张成, 黄文, 等. 亚致死量放疗对Duchenne型肌营养不良鼠骨髓干细胞移植的影响[J]. 中山大学学报:医学版, 2003, 24(2): 109-112.

Chen SL, Zhang C, Huang W, et al. The effects of sublethal dose radiotherapy on bone marrow stem cells transplantation for mice with Duchenne muscular dystrophy[J]. J Sun Yat-Sen Univ(Med Sci), 2003, 24(2): 109-112.

[10]Crawford GE, Lu QL, Partridge TA, et al. Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of a functional dystrophin[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(24): 2745-50.

[11]LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury[J]. Cell, 2002, 111(4): 589-601.