

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

张雅妮, 张成, 于美娟, 王淑辉, 李美山, 黄慧, 熊符, 冯善伟, 柳太云, 卢锡林(中山大学第一医院神经科, 广东广州 510080)

摘要:目的 探讨骨髓干细胞移植对假肥大型肌营养不良症(DMD)模型鼠 -mdx 鼠膈肌的治疗效果。方法 取雄性 SD 大鼠骨髓干细胞经尾静脉植入放疗处理后的 8 周龄雌性 mdx 鼠($n=18$), 于移植后 4、8、12 周各取 6 只 mdx 鼠的膈肌行 HE 染色、抗肌萎缩蛋白(dystrophin)免疫荧光检测以及 dystrophin mRNA 的 RT-PCR 分析, 同时用正常 C57 鼠及放疗而未移植的 mdx 鼠作为对照, 另进行 PCR 反应检测实验鼠膈肌内 Sry(Y 染色体的性别决定区)基因。结果 移植后 mdx 鼠膈肌间质内炎症细胞浸润较放疗而未移植 mdx 鼠有所减少; 移植后核中心移位纤维比例[移植后 4、8、12 周分别为 $(15.58\pm 0.91)\%$ 、 $(12.50\pm 1.87)\%$ 、 $(10.17\pm 1.17)\%$]较未移植 mdx 鼠 $(19.5\pm 1.87)\%$ 显著减少。移植后 dystrophin 免疫荧光阳性细胞比例[移植后 4、8、12 周分别为 $(1.00\pm 0.32)\%$ 、 $(6.00\pm 1.05)\%$ 、 $(11.92\pm 1.11)\%$]较未移植 mdx 鼠 $(0.17\pm 0.41)\%$ 显著增加。RT-PCR 结果显示 C57 鼠膈肌的 dystrophin mRNA 相对含量 (0.63 ± 0.04) 最高; 而未移植 mdx 鼠的膈肌中未检测到 dystrophin mRNA; 移植后的 mdx 鼠膈肌中 mRNA 的表达水平(移植后 4、8、12 周分别为 0.19 ± 0.05 、 0.26 ± 0.06 、 0.36 ± 0.04) 随时间推移逐渐增高; 移植后各时间点 mdx 鼠膈肌 Sry 基因均为阳性。结论 骨髓干细胞系统移植 mdx 鼠可以恢复部分膈肌的 dystrophin 表达, 改善膈肌的病理, 骨髓干细胞移植有望成为全身治疗 DMD 的有效方法。

关键词: 假肥大型肌营养不良症; mdx 鼠; 膈肌; 骨髓移植; 抗肌萎缩蛋白

中图分类号: R392.4; R457.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)01-0053-06

Dystrophin expression and pathology of diaphragm muscles of mdx mice after xenogenic bone marrow stem cell transplantation

ZHANG Ya-ni, ZHANG Cheng, YU Mei-juan, WANG Shu-hui, LI Mei-shan, HUANG Hui, XIONG Fu, FENG Shan-wei, LIU Tai-yun, LU Xi-lin

Department of Neurology, First Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate the effect of bone marrow stem cell transplantation (BMT) on the diaphragm muscles of mdx mice, a mouse model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). **Methods** The bone marrow-derived stem cells from male SD rats was transplanted through the tail vein into 18 female 8-week-old mdx mice, which were sacrificed at 4, 8 and 12 weeks after BMT (6 at each time point), respectively. The diaphragm muscles of the mice were subjected to HE staining, immunofluorescence detection of dystrophin, reverse transcription (RT)-PCR analysis of dystrophin mRNA transcripts and PCR analysis of Sry (sex-determining region on the Y chromosome) gene, with age-matched female C57 mice and untreated mdx mice as the controls. **Results** The proportion of centrally nucleated fibers (CNF) in the diaphragm muscle of the recipient mdx mice was $(15.58\pm 0.91)\%$, $(12.50\pm 1.87)\%$ and $(10.17\pm 1.17)\%$ at 4, 8 and 12 weeks after BMT, respectively, significantly smaller than that of untreated mdx mice [$(19.5\pm 1.87)\%$], and the fibers after BMT showed less inflammatory infiltration. Compared with the untreated mice, the recipient mdx mice showed green fluorescence on significantly more diaphragm muscle cell membranes [with the proportion of dystrophin-positive fibers of $(1.00\pm 0.32)\%$, $(6.00\pm 1.05)\%$ and $(11.92\pm 1.11)\%$ at 4, 8, and

12 weeks after BMT]. RT-PCR of dystrophin mRNA also demonstrated significantly higher relative levels of dystrophin in the recipient mdx mice $(0.19\pm 0.05, 0.26\pm 0.06$ and 0.36 ± 0.04 at 4, 8 and 12 weeks after BMT) than in untreated mdx mice, and Sry gene was present in the recipient mice. **Conclusions** BMT can partially restore dystrophin expression and ameliorate the pathology in the diaphragm muscles of mdx mice, and has great potential to produce general therapeutic effect in patients with DMD.

Key words: Duchenne muscular dystrophy; mdx mice; diaphragm; bone marrow transplantation; dystrophin

收稿日期: 2005-10-20

基金项目: 国家自然科学基金(30370510, 30170337), 广东省自然科学基金(31693), 卫生部临床重点项目基金(2001321), 高等学校博士学科点专项科研基金(20030558058), 教育部骨干教师基金(082004)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30370510, 30170337), Natural Science Foundation of Guangdong Province (31693), Key Clinical Research Fund of Ministry of Health (2001321), Research Fund for Doctoral Program of Higher Education (20030558058) and the Foundation of Backbone Teachers of the Ministry of Education (082004).

作者简介: 张雅妮(1977-), 女, 在读博士研究生, 从事神经系统遗传性疾病研究, 电话: 13719090140, E-mail: zhangyanimonica@yahoo.com.cn

通讯作者: 张成, 电话: 020-86332387, E-mail: czym@gzsums.edu.cn

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 μ m, 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 $^{\circ}$ 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 μ l (1:200), 4 $^{\circ}$ 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 μ g 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:DNA 2.0 μ l, dNTP 0.2 mmol/L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, 10 \times Buffer 3.0 μ l, Taq 酶 1 unit, 引物各 0.5 μ mol/L, 去离子水补至总体积 30 μ l。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环, 72 $^{\circ}$ 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 扩增片断长度

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' ctcgtagctcctgccaga3'	444
	R: 5' gtttgactgccaaccactcg3'	
GAPDH	F: 5' accacagtcctcatgccatcac3'	451
	R: 5' tccaccacctgttctgta 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 $^{\circ}$ 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: DNA 1.0 μ l, dNTP 0.2 mmol/L, MgCl₂ 22.0 mmol/L, 10 \times buffer 3.0 μ l, Taq 酶 1 μ l, 引物各 0.5 μ mol/L,

去离子水补至总体积 30 μ l。循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 32 个循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。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)。

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 dys-

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).

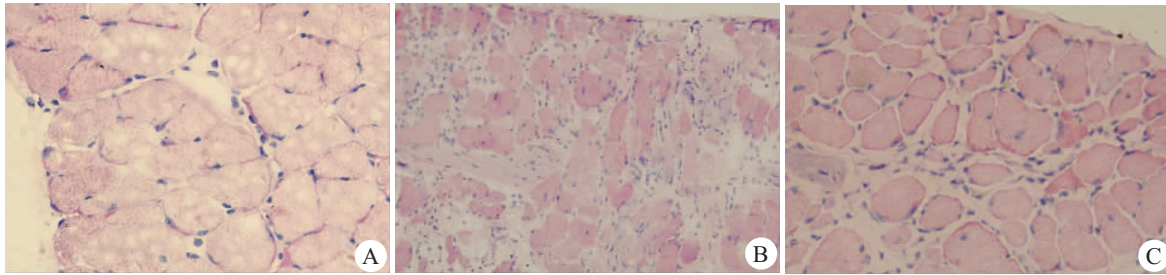


图 1 不同组间膈肌 HE 染色病理学检查

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: $\times 400$)

trophin 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 ($0.17\pm 0.41\%$) (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 $1.00\pm 0.32\%$, 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 ($6.00\pm 1.05\%$) 和 ($11.92\pm 1.11\%$) (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)。

2.2.2 膈肌 dystrophin 的 RT-PCR 结果 C57 鼠膈肌

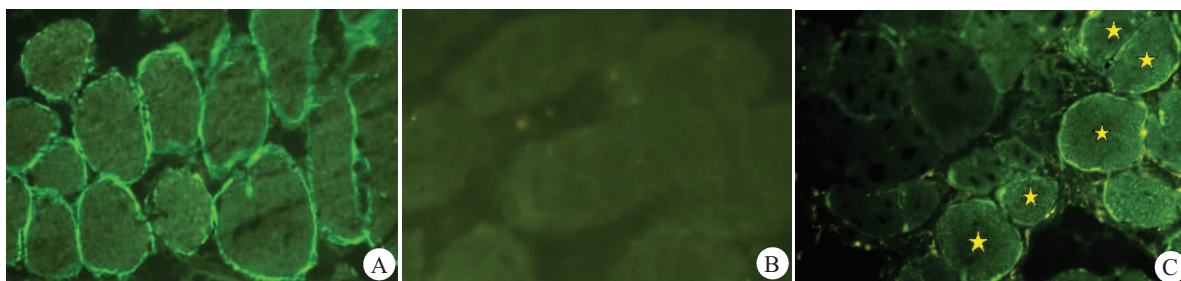


图 2 不同组间膈肌的 dystrophin 免疫荧光检测

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: $\times 400$).

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)。

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)。

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

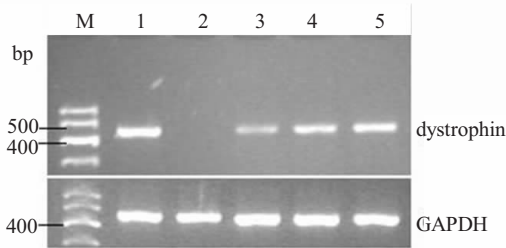


图 3 膈肌 dystrophin 及 GAPDH 的 RT-PCR 电泳结果

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

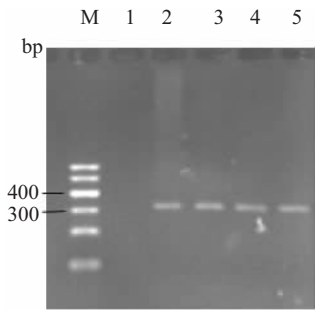


图 4 膈肌 Sry 基因 PCR 电泳结果

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

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 周后取肢前肌进行 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 基因部分序列观察雌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症趋化因子的吸引下, 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。

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.

(责任编辑: 吴锦雅)