

MSCs 及其上清液预防大鼠佐剂性关节炎的实验研究

许键炜¹, 何志旭², 申长清³, 赵芳芳⁴

摘要 目的 探讨骨髓间充质干细胞(MSCs)及其上清液对大鼠佐剂性关节炎(AA)的预防作用。方法 培养扩增SD大鼠骨髓MSCs,收集MSCs及其上清液。将健康雄性SD大鼠右后足跖皮内一次性注射弗氏完全佐剂0.1 ml/只造模。造模后行MSCs及其上清液干预。造模前1 d、造模后7、14、21、28 d测量大鼠体重和足爪体积,同时观察大鼠生存状况。干预后第28天,行四肢关节X线片及病理检查。结果 MSCs干预组和上清液干预组大鼠,原发性炎症和继发病变均不明显,关节X线片和病理检查均未见明显异常,与模型组大鼠相比,体重和足爪体积差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MSCs及其上清液可有效干预弗氏完全佐剂诱导的大鼠AA的进展。

关键词 骨髓间充质干细胞; 上清液; 佐剂性关节炎

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0022-05

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一类以关节滑膜炎及对称性、破坏性的关节病变为主要特征的慢性全身性自身免疫性疾病^[1]。可致关节功能障碍,甚至残疾,其发病机制尚不十分明确。迄今临床缺乏根治RA的方案和预防的措施。传统的药物治疗仅能部分缓解病情,尚不能有效地逆转RA发生的病理生理改变。目前研究^[2]表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)及其上清液具有较好的免疫调节作用,能抗炎、抗纤维化及促进血管形成、修复受损组织。分离、培养以及扩增获取MSCs及其培养上清液简便、经济。采用弗氏完全佐剂建立与人类RA类似的大鼠佐剂性关节炎模型^[3],方法成熟。该研究采用骨髓MSCs及其上清液干预佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)大鼠模型,抑制AA发生的病理生理改变达到干预佐剂性

关节炎发生的目的,为RA的预防提供实验理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康SD雄性大鼠,SPF级,5周龄, (100 ± 20) g,共60只,由贵阳医学院实验动物中心提供。标准饲料喂养,自由饮水。

1.1.2 主要试剂 低糖DMEM培养基(美国Gibco公司);0.25%胰蛋白酶及10%胎牛血清(美国HyClone公司);弗氏完全佐剂(美国Sigma公司);倒置相差显微镜(日本Panasonic公司);CO₂培养箱(美国Thermo Forma公司);流式细胞仪(FACS Aria II,美国BD公司);移动式牙科X射线机(中国泰州中联公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠MSCs的体外分离、纯化、增殖培养、鉴定及收集 取5周龄SD大鼠,无菌条件下取双侧股骨,去除表面附着的软组织,用剪刀去除股骨、胫骨两端,暴露骨髓腔。7号针穿刺入骨髓腔,用含肝素的无血清DMEM混合液冲出骨髓腔中的骨髓至无菌平皿中。加入含有10%胎牛血清的L-DMEM稀释骨髓液,接种到底面积为25 cm²的细胞培养瓶中。37℃,饱和湿度下,5% CO₂培养箱培养。倒置相差显微镜逐日观察,3 d后半量换液,以后每3 d用含10% FBS的L-DMEM全量换液,待细胞融合至80%~90%后传代。倾去培养液后,用PBS液冲洗2~3遍,然后加入0.25%胰蛋白酶1 ml,常温下消化3 min,轻轻摇动,当见细胞出现皱缩,细胞间隙增宽,并有少许细胞脱落时立即加入含血清的培养液终止消化。收集细胞-酶溶液,1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入2 ml L-DMEM液,用吸管轻轻吹打成均匀的细胞悬液,计数并按每3 ml(0.5~1) × 10⁵密度接种于底面积为25 cm²的培养瓶中继续培养。如此联合应用密度梯度离心和贴壁筛选法分离纯化扩增细胞。传至第4代,应用流式细胞仪进行细胞膜表面分子CD29、CD34、CD45及CD71的水平检测分析^[4]。治疗前用胰酶消化,离心,生理盐水洗涤两遍重悬成细胞悬液备用。

2013-09-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30560159);贵阳医学院基金(编号:K2009-37号)

作者单位:贵阳医学院¹药理学教研室、²组织工程与干细胞实验中心,贵阳 550004

³ 济宁医学院附属医院儿科,济宁 272029

⁴ 蚌埠医学院微生物学教研室,蚌埠 233030

作者简介:许键炜,男,硕士,讲师;

何志旭,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hzx@gmc.edu.cn

1.2.2 上清液的收集 收集上述培养第4代细胞48 h的培养液,离心,超低温冰箱冻存备用。

1.2.3 实验分组 60只SD大鼠适应性饲养3 d后按照随机数字表法将大鼠随机分为5组:模型组($n=20$),正常对照组($n=10$),L-DMEM对照组($n=10$),MSCs干预组($n=10$),上清液干预组($n=10$)。

1.2.4 佐剂性关节炎大鼠模型的制备 模型组取弗氏完全佐剂^[3],充分振荡、混匀,75%酒精消毒大鼠右后足,无菌皮试针抽取佐剂,于右后足跖皮内一次性注射0.1 ml/只。正常对照组大鼠注射等量的生理盐水。观察5组大鼠的呼吸、精神状态、活动、进食、饮水、体重等情况。在造模第1、7、14、21、28天分别称量大鼠体重,称量体重固定时间点,称量前禁食禁水4 h。排水法测足爪体积,即在大鼠足部踝骨关节突出部位划一条线作为标记,用一特制量筒,灌满水后,将大鼠足爪插入,使踝关节骨上的标记处于水平面,另用一个烧杯接从量筒侧口排出的水,测量排出水的量(ml)即为所测大鼠足爪的体积。造模第21天从模型组随机分出10只大鼠,10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉后,四肢关节做X线片检查(采用移动式牙科X射线机,电压65 kV,电流7 mA,曝光时间0.10 ms)及常规HE染色病理切片,进行动物模型的鉴定^[5]。

1.2.5 MSCs及其上清液的干预 将上述5组大鼠做如下处理:模型组和正常对照组不做任何处理。MSCs干预组于造模后当天MSCs舌下静脉缓慢一次性注射 5×10^6 /ml的MSCs细胞悬液1 ml。上清液干预组于造模后当天用上清液2 ml舌下静脉缓慢注射,隔1 d注射1次,共治疗4次。L-DMEM培养液对照组注射L-DMEM培养液,方法同上清液干预组。

1.2.6 MSCs及其上清液干预后相关指标的检测 分别于造模当天(致炎前)、致炎后7、14、21、28 d测量大鼠体重、双侧踝关节周长和后足爪体积(方法同前)。并观察大鼠活动、食欲、毛色等情况。各组大鼠在干预后第28天麻醉后行四肢关节X线片检查(方法同前)。之后颈椎脱臼处死,取四肢关节做病理检查。

1.2.7 干预相关副作用的观察 全程观察各干预组大鼠有无过敏反应及毒副作用发生。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析。所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,在总体水平有差异的情况下,各组间比较采用

LSD法,组间比较采用SNK法。

2 结果

2.1 大鼠MSCs的分离、培养、鉴定及收集 倒置相差显微镜观察可见原代培养的细胞在培养24 h后贴壁,1周后集落迅速增多,扩大并融合,铺满培养瓶底面,予以传代培养。传至第3代,大部分细胞呈梭形,漩涡状生长。传至第4代,细胞更均匀,细胞形态无明显变化,无衰老征象,见图1。流式细胞仪检测结果显示大鼠MSCs:CD71⁺、CD29⁺,而CD34⁻、CD45⁻,符合MSCs的生物学特征,见图2。并收集制备成MSCs细胞悬液,台盼蓝染色计数活细胞数达90%以上。

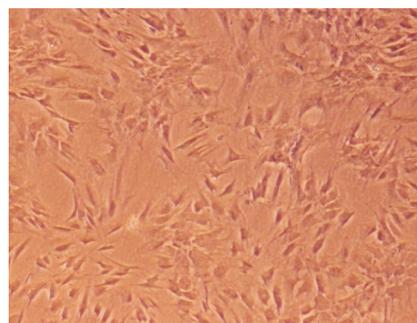


图1 第4代大鼠MSCs ×100

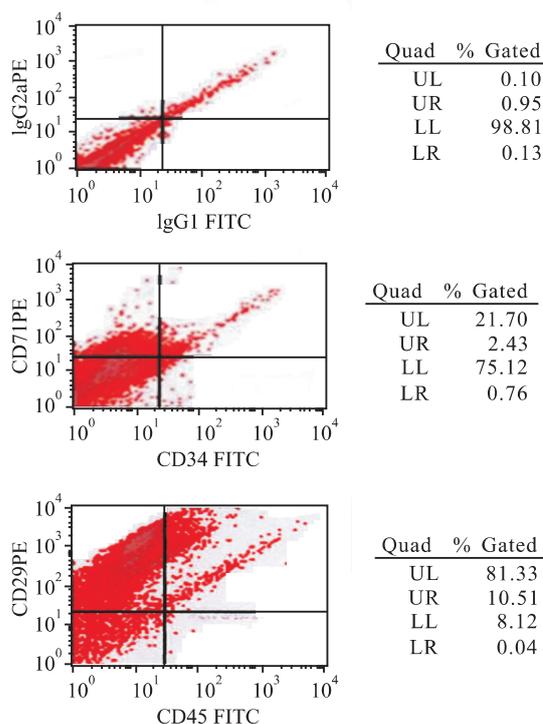


图2 大鼠MSCs表面抗原CD71、CD34、CD29、CD45流式细胞分析结果

2.2 上清液的收集 收集到的离心后的传至第 4 代的 MSCs 48 h 的培养液淡红、清亮。

2.3 各组大鼠生存状况及体重、足爪变化情况 在造模期间动物无死亡,模型组造模后动物较正常对照组动物活动明显减少,毛发直立,晦暗无光泽,食欲下降,关节肿胀且进行性加重,活动功能障碍。体重均有不同程度的增长,但模型组大鼠体重的增长明显小于正常对照组。注射佐剂侧原发病变主要表现为早期致炎部位的炎症反应,致炎后 3 d 右足肿胀达一个高峰,持续 4~5 d 后逐渐减轻,1 周后再度肿胀,继发病变出现于致炎后的 2 周左右,表现为同侧和对侧及前足肿胀,且进行性加重,行动不便,体重下降。L-DMEM 对照组未见明显好转,与模型组相近。MSCs 干预组和上清液干预组造模后 3 d 内局部(原发侧)略微出现红肿,活动无明显受限。继而于 1 周左右红肿消退,之后患侧、对侧及前肢在干预后的 28 d 内均未见明显红肿、强直、变形及活动受限,趋于正常对照组;体重与正常对照组体重增长相当,相对模型组体重有明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);足爪体积增长曲线较正常对照组基本吻合,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1~3。

2.4 影像学变化 与正常对照组相比,模型组可见周围软组织影增厚,骨性关节面模糊不清,欠光滑,有锯齿状改变,关节边缘骨质破坏,近关节处骨质疏松,关节间隙变窄,如图 3B 箭头所示。L-DMEM 培养液对照组关节 X 线片与模型组相近,未见明显好

转。MSCs 干预组和上清液干预组的周围软组织影未见明显增厚,骨性关节面光滑,关节边缘骨质未见明显破坏,关节间隙正常,与正常对照组无明显差异,见图 3。

2.5 关节组织病理学检查结果 常规 HE 染色病理切片显微镜检发现,模型组大鼠在右后足(即注射足)中观察到关节周围有大量的淋巴细胞浸润;

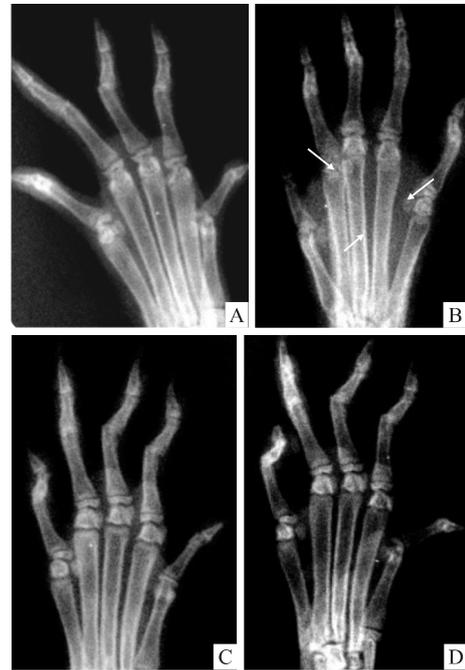


图 3 大鼠关节影像学表现

A: 正常对照组; B: 模型组; C: MSCs 干预组; D: MSCs 上清液干预组

表 1 大鼠体重变化($g, n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	致炎前	致炎后			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
模型	107.60 ± 9.24	118.80 ± 11.32	131.20 ± 21.48	151.20 ± 19.87	175.40 ± 28.47
正常对照	102.60 ± 9.10	121.00 ± 9.90	147.40 ± 7.40	175.20 ± 6.46*	208.60 ± 7.80*
L-DMEM 对照	103.60 ± 6.80	122.80 ± 6.38	142.40 ± 5.03	159.80 ± 9.96	177.60 ± 7.99
MSCs 干预	100.60 ± 9.18	120.20 ± 8.87	144.80 ± 13.92*	170.40 ± 13.22*	198.80 ± 22.24*
上清液干预	103.60 ± 8.79	127.00 ± 4.74	150.40 ± 8.76*	175.00 ± 6.82*	199.40 ± 8.96*

与模型组比较: * $P < 0.05$

表 2 大鼠右足体积变化($ml, n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	致炎前	致炎后			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
模型	0.84 ± 0.05	1.00 ± 0.14	1.18 ± 0.08	1.36 ± 0.05	1.58 ± 0.13
正常对照	0.84 ± 0.05	0.90 ± 0.07	0.96 ± 0.05*	1.00 ± 0.07*	1.02 ± 0.04*
L-DMEM 对照	0.92 ± 0.13	1.26 ± 0.15	1.48 ± 0.18	1.68 ± 0.23	1.78 ± 0.25
MSCs 干预	0.88 ± 0.10	0.90 ± 0.08*	0.93 ± 0.10*	0.98 ± 0.10*	1.05 ± 0.06*
上清液干预	0.85 ± 0.10	0.88 ± 0.12	0.93 ± 0.14	0.98 ± 0.32*	1.02 ± 0.08*

与模型组比较: * $P < 0.05$

表3 大鼠左足体积变化(ml, $n=10 \bar{x} \pm s$)

组别	致炎前	致炎后			
		第1周	第2周	第3周	第4周
模型	0.84 ± 0.05	0.96 ± 0.11	1.02 ± 0.08	1.14 ± 0.09	1.22 ± 0.13
正常对照	0.84 ± 0.05	0.90 ± 0.07	0.96 ± 0.05 [*]	1.00 ± 0.07 [*]	1.02 ± 0.04 [*]
L-DMEM 对照	0.92 ± 0.13	0.96 ± 0.09	1.06 ± 0.11	1.26 ± 0.17	1.38 ± 0.11
MSCs 干预	0.86 ± 0.09	0.90 ± 0.07	0.92 ± 0.08 [*]	0.98 ± 0.08 [*]	1.00 ± 0.07 [*]
上清液干预	0.86 ± 0.11	0.88 ± 0.13	0.94 ± 0.15	0.98 ± 0.11 [*]	1.02 ± 0.13 [*]

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

左后足(即对侧足)和前足病变关节中出现滑膜增生,可达6~8层,呈乳头状突起,细胞排列不规则,可见有淋巴细胞浸润,有些软骨帽消失,严重的甚至炎性细胞已侵蚀到软骨中,关节腔完全消失,纤维化,如图4B箭头所示。L-DMEM培养液对照组关节病理改变与模型组相近,未见明显好转。MSCs干预组和上清液干预组关节结构清楚,滑膜组织基本正常,未见明显增生及炎性细胞浸润;关节面较光滑,关节边缘骨质未见明显破坏,关节间隙正常,见图4。

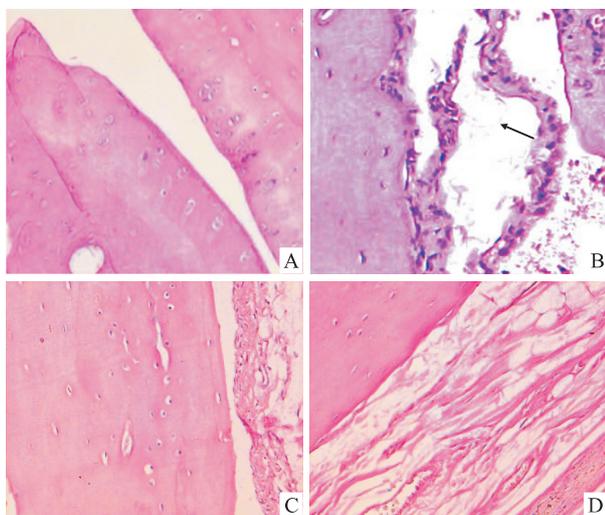


图4 大鼠关节病理切片染色 HE × 40

A: 正常对照组; B: 模型组; C: MSCs 干预组; D: MSCs 上清液干预组

2.6 干预后相关副作用的观察 本实验全程观察到 MSCs 干预组和上清液干预组大鼠实验过程中无呼吸急促,皮肤无皮疹出现,大便干燥、颗粒状,大鼠活动自如,食欲佳。毒副作用表现不明显,肝脏、肾脏、脾脏、胸腺及睾丸等各大脏器未见肿瘤发生。

3 讨论

该研究选用传代至第4代的 MSCs 及其上清液对大鼠 AA 进行干预,此时的细胞已纯化且增殖旺盛,该研究初步证实 MSCs 及其上清液对 AA 大鼠动

物模型具有干预作用,能改善 AA 大鼠的生存状况和相关症状,有效预防大鼠 AA 的发生。

RA 是一种致残率很高的疾病,其发生与免疫功能紊乱有关。传统的药物治疗多数仅能缓解症状,而难以治愈,更无有效预防 RA 的方法。有文献^[2,6]报道, MSCs 在体外的混合淋巴细胞反应体系中不诱发同种异体外周血单个核细胞的增殖,使 T 细胞的增殖几乎被完全抑制,提示 MSCs 具有较为独特的免疫原性和免疫调节性。研究^[7]显示,自体或异体的 MSCs 加入到有丝分裂原刺激的外周血淋巴细胞培养体系中,均能明显抑制 T 淋巴细胞的增殖活化。此外,有学者发现即使 MSCs 分化成其他类型的细胞,也继续保留它的免疫调节作用^[8],并能避免移植抗宿主病的发生^[9]。有文献^[10]报道,用人脐带 MSCs 治疗 RA 获得成功, MSCs 具有趋化作用,关节病变可以促进 MSCs 向病变滑膜聚集,修复损伤的关节组织^[11]。MSCs 阻止炎性介质的释放,减轻炎症反应,减轻组织损伤,有利于阻止病情进展。

MSCs 还能分泌多种细胞因子,具有营养作用,能促进干细胞的增殖和分化^[12]。有研究^[13]显示,在与淋巴细胞不产生物理接触的情况下 MSCs 仍可抑制淋巴细胞的增殖,说明 MSCs 产生了一些可溶性因子介导这一功能。吴涛等^[14]证实在无细胞接触条件下成人 MSCs 上清液对异体淋巴细胞增殖的负调控作用。MSCs 上清液能够抑制异体淋巴细胞增殖转化,且在外源性刺激源植物血凝素存在的情况下,其抑制效果明显增强,提示其负调控作用至少是通过部分分泌可溶性细胞因子而间接对淋巴细胞产生抑制的。冯鹏等^[15]通过体内干预实验发现 MSCs 上清液可以显著激活脑梗死后损伤原位内源性神经前体细胞的增殖、分化,可部分启动内源性修复机制。

MSCs 及其上清液对免疫系统的调节起重要的作用,有望从根本上调整患者病态免疫系统^[16];且 MSCs 作为成体干细胞,形成肿瘤的倾向极低,在目

前发表的资料中未见报道。本研究结果初步表明 MSCs 及其上清液预防 RA 的发生是有效、安全可行的。

参考文献

- [1] Wang D , Chang Y , Wu Y , et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with adjuvant arthritis [J]. *Clin Exp Immunol* , 2010 , 163 (12) : 225 - 34.
- [2] Chiesa S , Mrobelli S , Morando S , et al. Mesenchymal stem cells impair *in vivo* T-cell priming by dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2011 , 108 (42) : 17384 - 9.
- [3] 马玉琛 , 段斐 , 孟明 , 等. 改良弗氏完全佐剂制备大鼠类风湿性关节炎模型 [J]. *现代预防医学* , 2008 , 35 (10) : 1989 - 91.
- [4] Miyahara Y , Nagaya N , Kataoka M , et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction [J]. *Nat Med* 2006 , 12 (4) : 459 - 65.
- [5] 熊国林 , 黄海潇 , 谢玲 , 等. 类风湿性关节炎大鼠模型的制备 [J]. *解放军医学杂志* 2007 , 32 (2) : 121 - 3.
- [6] Cultler A J , Limbani V , Girdlestone J , et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation [J]. *J Immunol* , 2010 , 185 (11) : 6617 - 23.
- [7] 黄鹏 , 马廉. 人脐带间充质干细胞的应用研究现状 [J]. *中国输血杂志* 2009 , 22 (3) : 169 - 72.
- [8] Le Blanc K , Tammik C , Rosendahl K , et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated esenchymal stem cells [J]. *Exp Hematol* 2003 , 31 (10) : 890 - 6.
- [9] Le Blanc K , Frassoni F , Ball L , et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant , severe , acute graft-versus-host disease: a phase II study [J]. *Lancet* , 2008 , 371 (9624) : 1579 - 86.
- [10] 王黎明 , 周建军 , 白雯 , 等. 脐带间充质干细胞治疗 17 例类风湿性关节炎患者的临床疗效观察 [J]. *中国免疫学杂志* , 2010 , 6 (7) : 659 - 62.
- [11] Shi Y , Hu G , Su J , et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair [J]. *Cell Res* , 2010 , 20 (5) : 510 - 8.
- [12] Zhang J , Chen G H , Wang Y W , et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. *Chin Med J* , 2012 , 125 (19) : 3472 - 8.
- [13] 李慧 , 孙凌云. 间质干细胞的免疫调节及免疫治疗作用研究 [J]. *中华医学杂志* 2006 , 86 (7) : 501 - 2.
- [14] 吴涛 , 石静云 , 白海 , 等. 无细胞接触条件下成人骨髓间充质干细胞培养上清对异体淋巴细胞增殖的免疫调控作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* 2008 , 12 (43) : 8579 - 82.
- [15] 冯鹏 , 李光来 , 王飞. 骨髓间充质干细胞上清液治疗大鼠脑缺血的作用机制 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志* , 2008 , 6 (3) : 292 - 4.
- [16] Zhou C , Yang B , Tian Y , et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes [J]. *Cell Immunol* , 2011 , 272 (1) : 33 - 8.

Research on the intervention of bone marrow MSCs and MSCs supernatant to adjuvant arthritis in rat

Xu Jianwei¹ , He Zhixu² , Shen Changqing³ , et al

(¹Dept of Pharmacology , ²Center of Tissue Engineering and Stem Cell , Guiyang Medical University , Guiyang 550004; ³Dept of Pediatrics , The Affiliated Hospital of Jining Medical College , Jining 272029)

Abstract Objective To explore the effect of marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and MSCs supernatant to prevent adjuvant arthritis (AA) in rats and its mechanisms. **Methods** MSCs which had been cultured and cloned with supernatant would be collected. Rat's right rear paw of the model group was injected intracutaneously with 0.1 ml of Freund's complete adjuvant. After modeling , the rats were given MSCs and MSCs supernatant intervention. During the period , the rats' weights and hind paw volumes were measured on the 1st , 7th , 14th , 21st and 28th days respectively. And the rats' living conditions were observed. On the 28st day of the intervention , X-ray examination and pathological examination of rats' limb joints were carried out. **Results** After using MSCs supernatant to intervene adjuvant arthritis , primary inflammation and secondary lesions were not obvious , and joint X-ray and pathological examination showed no obvious abnormalities. Compared with model group , the differences of rats' weight and paw volume had statistically significant ($P < 0.05$) . **Conclusion** The results indicate that MSCs and MSCs supernatant can intervene the progress of AA.

Key words marrow mesenchymal stem cells; supernatant; adjuvant arthritis