

· 论 著 ·

超声联合微泡促进骨髓间充质干细胞迁移的实验研究

范国峰¹, 沙杜鹃¹, 徐 鹏¹, 张 均¹, 童嘉毅², 钱 健³, 李 鹏², 潘 涛¹

[摘要] **目的** 探讨体外超声联合微泡对骨髓间充质干细胞迁移的影响,为超声微泡促进干细胞迁移的体内研究提供依据。**方法** 体外培养大鼠骨髓间充质干细胞,分为超声联合微泡组、单纯超声组、单纯微泡组及空白对照组。超声探头频率 1 MHz,强度 1 W/cm²,进行脉冲超声辐射,采用 transwell 小室培养法,观察超声联合微泡对骨髓间充质干细胞运动的影响。**结果** 空白对照组、单纯微泡组骨髓间充质干细胞的迁移能力较低,超声联合微泡组与单纯超声组细胞的迁移能力无显著差异($P>0.05$),但两者比空白对照组、单纯微泡组迁移能力有显著差异($P<0.01$)。**结论** 超声及超声联合微泡作用能明显增强间充质干细胞的迁移能力。

[关键词] 超声微泡;骨髓间充质干细胞细胞;迁移

[中图分类号] R329 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.01.006

Effect of ultrasound mediated microbubbles on migration of bone marrow mesenchymal stem cells

FAN Guo-feng¹, SHA Du-juan¹, XU Peng¹, ZHANG Jun¹, TONG Jia-yi², QIAN Jian³, LI Peng², PAN Tao¹. 1. Department of Emergency, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 3. Drum Tower Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of ultrasound mediated microbubbles on migration of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells were cultured in vitro. The subjects in this study were divided into ultrasound mediated microbubbles group, ultrasound radiation group, microbubbles group and control group. Ultrasound (frequency 1.0 MHz, intensity 1.0 W/cm²) was used. The effect of ultrasound mediated microbubbles on BMSCs migration was observed by applying transWell Chemotaxis. **Results** There was no obvious difference in control group and microbubbles group ($P>0.05$). Both ultrasound mediated microbubbles and ultrasound radiation group are different from control group and microbubbles group ($P<0.01$). **Conclusion** ultrasound radiation and ultrasound mediated microbubbles promote the migration of BMSCs.

[Key words] microbubbles; bone marrow mesenchymal stem cells; cell migration

心脑血管疾病是严重威胁人类健康的常见病,心肌梗死或脑梗死后细胞不可逆性损伤是功能受损的主要原因。如何促进心肌细胞或脑细胞再生,改善心脏或脑功能,提高患者生存质量,为临床和科研工作最大的挑战之一。近年来,许多临床研究提示干细胞移植治疗缺血性心脏病和脑梗死,能够改善心肌功能和神经功能,但治疗效果尚不肯定,甚至相互矛盾。本课题组初步动物实验结果表明,超声介导微泡能够增加猪骨髓单个核干细胞归巢至局部梗死心肌的能力,远期心功能亦可得到明显改善^[1-2],

并且对移植干细胞增殖、凋亡和细胞周期无不良影响^[3]。然而,超声介导微泡增强移植干细胞靶向归巢的具体机制仍不明确,本实验通过观察超声联合微泡对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响,了解其增效干细胞治疗的机制,从而进一步推动实验和临床研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备 胎牛血清(美国 Hyclone 公司),胰蛋白酶(1:25, Sigma),淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque,天津灏洋生物公司),纤维连接蛋白(fibronectin Fn,美国 Chemicon 公司),含氟碳气体脂质体微泡(东南大学生物工程材料国家重点实验室制备),XDS-1B 型倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂),E800 型荧光正立显微镜(日本 Nikon 公司),BJS2DM-200B 型超声波治疗仪(北京中西远大化玻仪器有限公司),100~150 g 雄性 SD 大鼠数只

基金项目: 江苏省卫生厅青年科研课题(Q201306);南京大学医学院附属鼓楼医院青年启动基金(QJ2013002);南京市医学科技发展项目基金(YKK12071)

作者单位: 1. 210008 江苏南京,南京大学医学院附属鼓楼医院急诊中心;2. 210009 江苏南京,东南大学附属中大医院心脏科;3. 210008 江苏南京,南京医科大学鼓楼临床医学院

通讯作者: 潘 涛, E-mail: pantao1969@sina.com

[鼓楼医院实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(苏)2009-0017]。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞分离、培养 取 100 ~ 150 g 雄性 SD 大鼠,无菌收集股骨、胫骨骨髓,以 1.073 g/ml 的 Percoll 分离液分离骨髓细胞悬液,收集界面层,用含有 10% 胎牛血清的 L-DMEM 重悬,于 37 ℃、5 % CO₂ 培养箱内培养 48 h 后换液,弃未贴壁细胞;后一周换液两次,待细胞达 80% ~ 90% 融合时,用 25% 胰蛋白酶消化后按 1:2 传代,一周换液 2 次,达到基本融合后再次消化传代,进行体外扩增和富集。

1.2.2 对大鼠骨髓间充质干细胞的干预 取对数生长期大鼠骨髓间充质干细胞(图 1) 分为 4 组,分别为:空白对照组,单纯微泡组,单纯超声组,超声联合微泡组。首先用 50 mg/L atrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,4℃ 风干;然后取细胞悬液 200 μl 加入 Transwell 小室,向 24 孔板下室加入含 10% 胎牛血清的培养液 500 μl。培养 12 h,单纯微泡组和超声联合微泡组加入超声微泡,空白对照组和单纯超声组加入等量磷酸盐缓冲液(PBS)。最后,按照超声探头频率 1 MHz,强度 1 W/cm²,对单纯超声组和超声联合微泡组细胞进行脉冲辐射 2 min 后继续培养 24 h。

1.2.3 大鼠骨髓间充质干细胞的迁移评估 大鼠骨髓间充质干细胞干预后取出小室,用棉签擦去上室内的细胞,用无水乙醇固定细胞 30 min,风干,以 0.1% 结晶紫染色 10 min,用 PBS 冲洗,倒置显微镜下观察、计数。随机选取 10 个视野,进行细胞计数^[4]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学处理,计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

超声联合微泡组细胞迁移数为(32.71 ± 7.10) 个,单纯超声组细胞迁移数为(26.44 ± 7.21) 个,单纯微泡组细胞迁移数为(4.60 ± 2.50) 个,空白对照组细胞迁移数为(4.80 ± 2.52) 个(图 2 ~ 5)。超声联合微泡组与单纯超声组细胞的迁移能力无显著差异($P > 0.05$);但两者比空白对照组、单纯微泡组迁移能力有显著差异($P < 0.01$)。

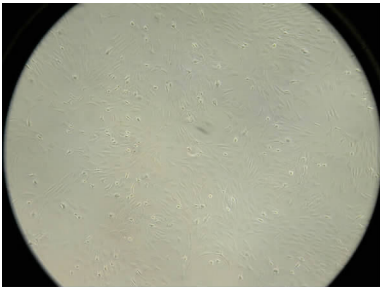


图 1 大鼠骨髓间充质干细胞(结晶紫 ×100)

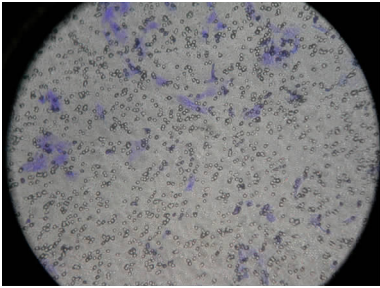


图 2 超声联合微泡作用下的细胞迁移(结晶紫 ×100)

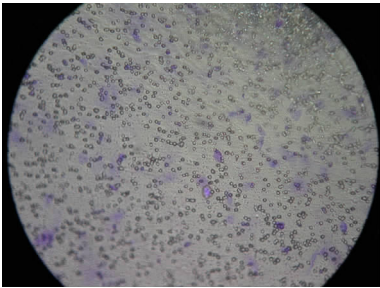


图 3 单纯超声作用下的细胞迁移(结晶紫 ×100)



图 4 单纯微泡作用下的细胞迁移(结晶紫 ×100)

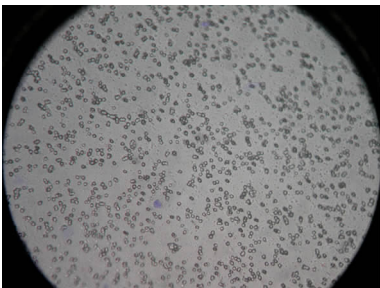


图 5 空白对照组中细胞的迁移(结晶紫 ×100)

3 讨 论

一些基础和临床研究均提示干细胞移植治疗

能够改善缺血性心脏病、脑梗死等的功能预后^[5-6], 进一步研究提示, 超声联合微泡能够促进间充质干细胞归巢, 改善远期心功能^[1-2], 但具体机制尚不明确。本实验提示, 超声联合微泡及单纯超声均能促进骨髓间充质干细胞迁移, 进一步观察细胞迁移后的形态及分布, 发现间充质干细胞迁移呈片状分布, 可能是干细胞归巢能力增强的原因之一。间充质干细胞迁移能力增强, 可能与超声联合微泡作用下大鼠骨髓间充质干细胞旁分泌某些细胞因子增多, 作用于周围细胞, 促进其共同迁移。本课题组已有实验表明, 超声联合微泡作用下, 干细胞通过合成途径和非合成途径生成一氧化氮 (nitric oxide, NO) 明显增加, 各亚型一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性均有增强^[7-8]。另有文献报道^[9], 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 能够促进间充质干细胞向缺血心肌迁移, 可能通过基质细胞衍生因子 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 来实现的。Sasaki 等^[10]应用 eNOS 增强子 AVE9488 体外预处理干细胞, eNOS mRNA 表达增加, 相应酶活性增强, 结果使干细胞迁移能力明显提高; 体内实验表明, 上述预处理移植干细胞能够明显增加缺血后肢新生血管密度和血流灌注, 改善后肢运动功能。此外, 内源性及外源性骨髓间充质干细胞在损伤局部表达的炎症因子如 SDF-1、单核细胞诱导蛋白-1、白细胞介素-8 等作用下, 可向缺血坏死区迁移, 对缺血性损伤进行修复, 而 SDF-1 通过与趋化因子 CXCR4 结合可改变骨髓干细胞的遗传信息, 产生肌动蛋白快速、短暂聚合等生物效应, 引起间充质干细胞的定向迁移, 而此过程是通过 NO 和其他第二信使来完成的^[11]。

超声联合微泡因为其特殊的机械和生物学效应, 具有溶栓、促进血管新生、能够携带治疗基因或药物, 能够促进干细胞归巢等治疗作用, 同时有无创、方便、可重复使用等优点, 在缺血性疾病的治疗中有广泛的应用前景^[12]。本实验结果进一步表明其具有增效干细胞迁移的作用, 但实验为体外研究, 虽尽量模拟体内环境, 但不能完全相同, 仍有待进一步进行体内实验证实并探讨增效迁移的机制。

【参考文献】

- [1] 童嘉毅, 马根山, 冯毅, 等. 超声波促骨髓间充质干细胞心肌内归巢的实验研究[J]. 中国心血管病研究杂志, 2008, 6(10): 771-773.
- [2] 徐琢, 冯毅, 童嘉毅, 等. 超声微泡辅助干细胞移植治疗急性心肌梗死的实验研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(3): 192-194.
- [3] 范国峰, 冯毅, 童嘉毅, 等. 超声联合微泡对内皮祖细胞体外增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. 东南大学学报: 医学版, 2009, 30(2): 109-112.
- [4] 郑丽芳, 梅元武, 张小乔, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 促进骨髓间充质干细胞迁移与上调 Snail 表达有关[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(23): 4256-4256.
- [5] 章仁品, 宋晓蓉, 翟志敏, 等. 超声观察骨髓间充质干细胞移植对兔心肌梗死心功能的影响[J]. 东南国防医药, 2010, 12(3): 193-196.
- [6] 郭芮兵, 徐格林. 内源性干细胞修复脑损伤的研究进展[J]. 东南国防医药, 2010, 12(2): 132-136.
- [7] 王秀珠, 范国峰, 童嘉毅, 等. 超声联合对比剂对内皮祖细胞一氧化氮生成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(40): 7554-7557.
- [8] 魏红, 童嘉毅, 范国峰, 等. 超声介导微泡对内皮祖细胞一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(10): 806-808.
- [9] Li N, Lu X, Zhao X, et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha[J]. Stem Cells, 2009, 27(4): 961-970.
- [10] Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(39): 14537-14541.
- [11] Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C[J]. Blood, 2000, 95(8): 2505-2513.
- [12] 施晓宇, 范国峰, 童嘉毅. 超声微泡在缺血性疾病治疗中的应用研究进展[J]. 东南大学学报: 医学版, 2009, 28(6): 536-539.

(收稿日期: 2013-09-17; 修回日期: 2013-11-05)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)