

· 论 著 ·

## 骨髓源性干细胞在创面愈合中的募集作用\*

孙士锦<sup>1</sup>, 陈 强<sup>2</sup>, 杨在亮<sup>3</sup>, 麻晓林<sup>1</sup>, 张 波<sup>3△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1. 创伤中心;2. 麻醉科;3. 第四研究室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 观察 BALB/C 小鼠骨髓源性干细胞(BMSCs)在创面修复中的动员及募集作用,为进一步研究其向创伤部位募集机制进行前期探索。方法 采用差异性贴壁法分离纯化 BALB/C 雄性小鼠 BMSCs,取第 3 代 BMSCs 进行成脂、成骨诱导鉴定;另取第 3 代 BMSCs 用二醋酸羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFDA-SE)标记后,经尾静脉注射到 3.5Gy 放射性损伤后的雌性小鼠体内,小鼠背部皮肤制作一直径为 1.5cm 的创面,建立骨髓移植嵌合模型,分别于伤后 1、3、5、7、14d 获取创面组织,观察创面愈合过程中是否募集有 CFDA-SE 标记的细胞。结果 提取的 BMSCs 可以成功进行成骨、成脂诱导分化;骨髓移植后放射损伤实验动物全部存活,满足实验要求;皮肤创伤后创面组织中可以观察到 CFDA-SE 标记的细胞。结论 皮肤创伤愈合过程中 BMSCs 具有动员及向创面募集的作用,参与创面的愈合过程,提高这种募集作用有可能达到促进愈合的效果。

**关键词:**干细胞;创伤和损伤;修复;募集

中图分类号:R365.751

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)22-2819-03

## Recruitment of bone marrow derived stem cells in derma wound repair

SUN Shi-jin<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>, YANG Zai-liang<sup>3</sup>, et al.

(1. Trauma Center;2. Department of Anesthesiology;3. Department 4, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To explore the mobilization and recruitment of bone marrow derived stem cells (BMSCs) in the derma wound repair for further study on the mechanisms of BMSCs in wound healing. **Methods** BMSCs were isolated and purified from BALB/C male mice bone marrow on the basis of the different adherence of cells to the wall of culture flask. The third generation of BMSCs was used for inducing osteogenesis and adipogenesis. And other third generation of BMSCs was marked with Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE). Then, BALB/C female mice were transplanted with male BMSCs marked with CFDA-SE via the tail vein after 3.5Gy irradiation. The back skin wound was constructed in the bone marrow-chimeric mice in 4h after irradiation. Wound tissue was harvested in post-operation 1, 3, 5, 7, 14d in order to detect whether the CFDA-SE positive cells were exist in the derma wound. **Results** Osteogenesis and adipogenesis could be induced from BALB/C male mice BMSCs in vitro. The irradiated mice survived after BMSCs transplantation. The positive CFDA-SE cells were observed in the wound tissue after operation. **Conclusion** BMSCs exerts mobilization and recruitment in the wound area, as may be helpful for tissue repair.

**Key words:** stem cells; trauma and injury; repair; recruitment

创伤与修复是人类健康面临的一大难题。由于干细胞具有自我复制和多向分化的潜能,近 20 年来,干细胞研究一直是生命科学中的热点,其研究内容几乎涉及所有生命科学的领域,也为再生医学提供了广阔的应用前景。发现骨髓源性干细胞(bone marrow derived stem cells, BMSCs)参与创伤修复的规律及机制,有助于提高创伤救治水平。本研究通过骨髓放射损伤,建立骨髓移植嵌合体皮肤创面小鼠动物模型,观察 BMSCs 在参与皮肤创面修复中的动员及募集作用,为进一步揭示其作用机制提供研究基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要仪器及试剂** 6~8 周龄 SPF 级 BALB/C 小鼠(大坪医院实验动物中心提供);DMEM/F12 培养基,胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司;地塞米松、 $\beta$ -磷酸甘油、抗坏血酸、异丁基甲基黄嘌呤(IBMx)、吡啶美辛、胰岛素等常规试剂均购自西南药业公司;2%硝酸银、5%硫代硫酸钠水溶液、油红 O/异丙醇饱和液、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自重庆化学试剂总厂;Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit 购自美国 Invitrogen 公司(MP12883);倒置显微镜(Olympus, 日本),荧光显微

镜(Leica, 德国)。

**1.2 细胞培养** 雄性 BALB/C 小鼠,脱臼处死,无菌条件下取股骨、胫骨,暴露骨髓腔,DMEM/F12 基础培养液冲洗骨髓腔直至发白。收集冲洗液,反复吹打成单细胞悬液,离心后,弃上清液。DMEM/F12 完全培养液(含有青霉素 100IU/mL,链霉素 100 $\mu$ g/mL,10% FBS)重悬,以  $4 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup> 的密度接种培养。每 3 天换液,倒置显微镜下逐日观察细胞形态及生长情况。当细胞铺满皿底达 90% 融合(原代 7~10d,传代 5~7d),常规胰酶消化。按 1:2 比例进行传代培养,逐渐纯化所提取的细胞<sup>[1]</sup>。

**1.3 BMSCs 的诱导分化** 取生长旺盛的第 3 代 BMSCs 分别向成骨细胞和脂肪细胞诱导分化<sup>[1]</sup>,并染色鉴定<sup>[2]</sup>。成骨诱导:地塞米松  $10^{-7}$  mol/L,  $\beta$ -磷酸甘油 10mmol/L,抗坏血酸 0.2 mmol/L,10% FBS/HG-DMEM,每 3 天换液,诱导 3 周后,行矿化结节硝酸银染色,倒置显微镜下观察,钙盐沉积区域呈黑色。成脂诱导:地塞米松  $10^{-6}$  mol/L, IBMx 0.5mmol/L,吡啶美辛 0.2mmol/L,胰岛素 10 $\mu$ g/mL,10% FBS HG-DMEM,每 3 天换液,诱导 14d 后,行油红 O 染色,倒置显微镜下观察,脂滴

\* 基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目(2005CB522603)。△ 通讯作者,E-mail:zhangbo67184@163.com。

被染成红色。

**1.4 二醋酸羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFDA-SE)标记第3代 BMSCs** CFDA-SE 工作液的配制:CFDA-SE 用 DMSO 溶解成 10 mmol/L 的储存液, -20℃ 保存。临用前,取适量用预热至 37℃ 的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成 10 μmol/L 的工作液,备用。标记方法:取培养的第 3 代 BMSCs,当细胞达 90% 融合时,常规胰酶消化后,加入浓度为 10 μmol/L 的 CFDA-SE 工作液重悬细胞,37℃ 孵育 15min 后,离心,加入 10% FBS/DMEM/F12 培养基重悬细胞 37℃ 孵育 30min,保证染色充分,离心后,收集细胞,PBS 液漂洗 2 次,制成单细胞悬液,细胞浓度调整为  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^7$  /mL 备用(详见说明书)。

**1.5 动物模型的制备** 取 BALB/C 雌性小鼠  $n=16$ , 体质量  $(20.0 \pm 1.1)g$ ,  $^{60}Co$  照射致骨髓放射损伤后(照射剂量 3.5 Gy<sup>[3]</sup>), 2~4h 内无菌条件下尾静脉注射 CFDA-SE 标记的雄性 BMSCs。然后背部脱毛,8 只于背部制作一直径为 1.5cm 的创面,另 8 只移植后未做创面作为对照组。伤后 1、3、5、7、14d 分别切取创面组织及对对照组皮肤,观察组织中是否可以检测到 CFDA-SE 标记的细胞。

## 2 结 果

**2.1 BMSCs 的生长状况及形态特征** 细胞接种后镜下可见到圆形、大小不一、折光性强的 BMSCs 散在分布,24h 后可见少数贴壁细胞,大部分呈圆形。原代培养约 7~10d 可达到 90% 细胞融合,基本铺满瓶底部,呈漩涡状生长,漩涡中心细胞呈多层分布,细胞界限不清。刚传代的 BMSCs 呈圆形,48h 后细胞大小趋于均匀,以梭形细胞为主,部分呈不规则型。传代后细胞增殖迅速,5~7d 细胞达 90% 融合

**2.2 BMSCs 的诱导分化** 成骨诱导分化硝酸银染色细胞表型鉴定,细胞经成骨诱导 14d 时光镜下可见少量折光区域,为钙盐沉积晶体,诱导 20d 后可见明显折光颗粒,有些视野下细胞无法分清界限(图 1)。

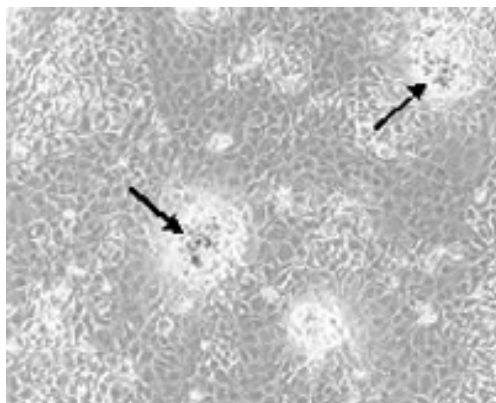


图 1 成骨诱导硝酸银染色( $\times 200$ )

成脂诱导分化:细胞经成脂诱导 6d 就可以发现细胞形态变得不规则,诱导 12d 后即可见部分细胞胞浆中有少量空泡形成,到 3 周时可见明显脂滴聚集,油红 O 染色呈现红色脂滴(图 2)。

**2.3 BMSCs 在创面的募集** 骨髓移植后小鼠全部存活,建立创面模型后,创面清洁干燥,1d 结痂,7d 后创面明显缩小,14d 后创面基本愈合。皮肤创伤后 1d 时,荧光显微镜下即见少量 CFDA-SE 标记阳性细胞呈绿色荧光;5d 创面组织中的 CFDA-SE 的荧光更加明显(图 3)。皮肤创伤后 14d,局部创面基本为正常组织取代,荧光显微镜下仍清晰可见 CFDA-SE 的绿色荧

光散在分布于组织全层。对照组皮肤切片中均看不到 CFDA-SE 标记的阳性细胞(图 3)。

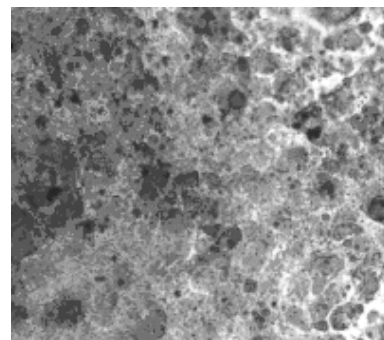


图 2 成脂诱导油红 O 染色( $\times 200$ )

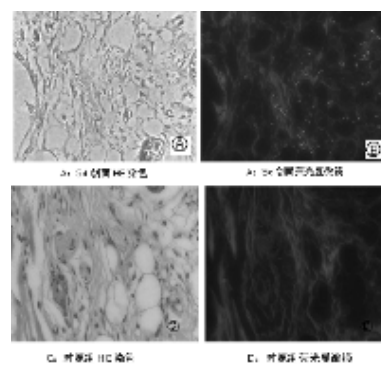


图 3 实验组 5d 创面和对对照组 HE 染色及荧光显微镜观察( $\times 400$ )

## 3 讨 论

骨髓是人体重要的器官之一,含有大量的 BMSCs,是组织损伤修复的重要细胞来源,因其取材方便,逐渐成为干细胞研究的焦点。BMSCs 的主要特点是具有自我更新和至少分化为一种成熟细胞的能力,它们的基本功能是具有在生理状态下完成组织的更新,在病理状态下参与损伤组织的修复和再生,这个过程包括动员、归巢、分化 3 个环节<sup>[4]</sup>。这种修复可能包括向 BMSCs 损伤组织募集<sup>[4-5]</sup>,但这种认识仅仅是一种推测,需要足够的实验证据来支持。近年来很多实验也证实 BMSCs 可以分化成多种组织细胞<sup>[6-7]</sup>,这给组织器官损伤修复带来了希望。因此有必要对 BMSCs 在创伤修复中发挥的作用进行深入研究,以期对创伤修复探索一条新的途径。

本实验正是基于这种推测,首先采用  $^{60}Co\gamma$  射线,全身一次性均匀照射 3.5Gy<sup>[3]</sup>,使骨髓产生放射性损伤,造成宿主骨髓灭活,移植培养不同性别的 CFDA-SE 标记的同种异体 BMSCs 后,背部制作创面,成功建立骨髓移植嵌合体模型,模拟自体 BMSCs 在伤后的动员和向创面募集的作用。

实验中移植前采用 10 μmol/L 浓度的 CFDA-SE 绿色荧光标记 BMSCs,对细胞进行示踪,CFDA-SE 标记细胞的方法简便、快捷、标记率高,而且标记细胞形态良好,增殖能力和表面标志的表达不受影响<sup>[8-10]</sup>,并且 CFDA-SE 标记的细胞无论在体外还是体内都不会使邻近细胞染色。即 CFDA-SE 荧光探针完成标记后不会从一个细胞转移到邻近细胞,从而避免了假阳性标记的发生。

实验通过伤后不同时相点分别切取创面组织及对对照组皮肤,检测组织中 CFDA-SE 标记细胞的存在,确切观察到移植后的 BMSCs 可以从骨髓中被动员出来,通过“干细胞大循环”

(great circulation of stem cell)<sup>[11]</sup> 进入创伤组织,证实了 BM-SCs 募集到创面,并参与了创面组织的修复与再生,这为临床上治疗各种创伤,实现创伤的早期愈合提供了新的研究思路。至于 BMSCs 动员及其在创伤局部组织募集的机制还不清楚,需要进一步深入研究,相信提高骨髓动员的效率及加强创伤局部组织募集干细胞的能力,将有利于提高创伤的救治效率,达到促进愈合的目的。

#### 参考文献:

- [1] Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, et al. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7):993.
- [2] Shibata T, Naruse K, Kamiya H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats[J]. *Diabetes*, 2008, 57(11):3099.
- [3] Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, et al. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage[J]. *Stem Cells*, 2006, 24:1020.
- [4] Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. [J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(3):441.
- [5] Dorrell MI, Otani A, Aguilar E, et al. Adult bone marrow-derived stem cells use R-cadherin to target sites of neovascularization in the developing retina[J]. *Blood*, 2004, 103(9):3420.
- [6] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. *Cell*, 2001, 105(3):369.
- [7] Shiota M, Heike T, Haruyama M, et al. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(5):1008.
- [8] Urbani S, Caporale R, Lombardini L, et al. Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(3):243.
- [9] 付霞霏,何援利,杨芳,等. BrdU, CFSE 和 GFP 标记大鼠间充质干细胞的比较[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(5):399.
- [10] 付霞霏,何援利. 大鼠间充质干细胞的体外分离培养及 CFSE 标记[J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(5):464.
- [11] Summary. Great circulation of stem cell [J]. *Science*, 2001, 294(5548):1785.
- (收稿日期:2009-08-13)
- 
- (上接第 2817 页)
- A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion[J]. *Brain Res*, 1999, 837(1-2):213.
- [7] Goni-de-Cerio F, Alvarez A, Caballero A, et al. Early cell death in the brain of fetal preterm lambs after hypoxic-ischemic injury[J]. *Brain Res*, 2007, 1151:161.
- [8] Trescher WH, Lehman RA, Vannucci RC. The influence of growth retardation on perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Early Hum*, 1990, 21:165.
- [9] Mallard C, Loeliger M, Copolov D, et al. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea pig following intrauterine growth restriction[J]. *Neuroscience*, 2000, 100(2):327.
- [10] De Haan HH, Gunn AJ, Williams CE, et al. Brief repeated umbilical cord occlusions cause sustained cytotoxic cerebral edema and focal infarcts in near-term fetal lambs [J]. *Pediatr Res*, 1997, 41:96.
- [11] Derrick M, Luo NL, Bregman JC, et al. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(1):24.
- [12] Inder T, Neil J, Yoder B, et al. Patterns of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care[J]. *J Child Neurol*, 2005, 20(12):965.
- [13] Yesilirmak DC, Kumral A, Baskin H, et al. Activated protein C reduces endotoxin-induced white matter injury in the developing rat brain[J]. *Brain Res*, 2007, 1164:14.
- [14] Edwards AD, Tan S. Perinatal infections, prematurity and brain injury[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2006, 18(2):119.
- [15] Yis U, Kurul SH, Kumral A, et al. Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 448(3):245.
- [16] Nüz JL, Alt JJ, McCarthy MM. A novel model for prenatal brain damage. II Long-term deficits in hippocampal cell number and hippocampal-dependent behavior following neonatal GABAA receptor activation [J]. *Exp Neurol*, 2003, 181(2):270.
- [17] Chen A, Dimambro N, Clowry GJ. A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7[J]. *Brain Res*, 2008, 1201:187.
- [18] Georgiadis P, Xu H, Chua C, et al. Characterization of acute brain injuries and neurobehavioral profiles in a rabbit model of germinal matrix hemorrhage[J]. *Stroke*, 2008, 39(12):3378.
- (收稿日期:2009-06-05)