

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.17.001

间充质干细胞移植促进放射性肠损伤肠绒毛的结构修复*

王彦, 郭梦征, 徐畅, 杜利清, 龚伟, 刘强[△]

(中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津 300192)

[摘要] **目的** 研究人脐带间充质干细胞(hMSCs)对放射性肠损伤小鼠存活率的影响及其对肠道损伤修复的作用。**方法** 选取成年 C57BL/6J 小鼠,分为空白对照组,腹部照射+PBS组(IR+PBS)和腹部照射+hMSCs 移植治疗组(IR+hMSCs)。13 Gy γ 射线腹部照射造成肠损伤模型,检测 30 d 存活率,另外分别于照射后的第 3.5 天和第 5.0 天,HE 染色观察各组十二指肠、空肠和回肠的绒毛结构改变和肠隐窝的数量变化。**结果** 相较于 IR+PBS 组的小鼠,IR+hMSCs 组的小鼠存活率明显提高($P<0.05$)。与空白对照组比较,13 Gy γ 射线腹部照射后第 3.5 天,IR+PBS 组的十二指肠、空、回肠绒毛均发生断裂、长度变短且数目稀少,而 IR+hMSCs 组肠损伤减轻。至照射后第 5.0 天,IR+PBS 组小肠结构完整性有所改善,但达不到 IR+hMSCs 组的水平($P<0.01$)。照射后的第 3.5 天和第 5.0 天,IR+hMSCs 组小鼠肠隐窝的数目明显多于 IR+PBS 组,但低于空白对照组(均 $P<0.01$)。**结论** MSCs 可以提高放射性肠损伤小鼠存活率并且对损伤肠道具有促修复作用,其有望用于放射性肠损伤的治疗。

[关键词] 间质干细胞;辐射损伤;肠;存活率;肠隐窝**[中图分类号]** R818.03**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2253-04

Mesenchymal stem cells transplantation promote the structural repair of mice intestinal injury induced by radiation*

WANG Yan, GUO Mengzheng, XU Chang, DU Liqing, GONG Wei, LIU Qiang[△]

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hMSCs) on the survival rate of mice with radiation-induced intestinal injury and its effect on the repair of intestinal damage. **Methods** Adult C57BL/6J mice were selected and divided into control group and abdomen irradiation + PBS(IR + PBS) group and abdominal irradiation+hMSCs transplantation treatment (IR+hMSCs)group. Intestinal injury model was induced by abdominal irradiation at 13 Gy of T ray and the 30-day survival rate was recorded. On the 3.5th and 5.0th day after irradiation, HE staining was used to observe changes in the villus structure and the number of intestinal crypts in each segment of the small intestine(duodenum, jejunum, and ileum). **Results** The survival rate of IR+hMSCs group was significantly higher than that of IR+PBS group ($P<0.05$). On the 3.5th day after 13 Gy of abdomen irradiation, the duodenum, cavities and ileum villus in IR+PBS group were all fractured, the length was shortened, and the numbers were sparse when compared with the control group, while the hMSCs reduced the intestinal damage. On the 5.0th day after irradiation, the structural integrity of the small intestine in IR+PBS group was repaired slightly, but it still more serious than that of IR+hMSCs group ($P<0.01$). The amount of intestine crypts were significantly higher in IR+hMSCs group than that of IR+PBS group, but were significantly lower than that of control group ($P<0.01$) at 3.5th day and 5.0th day after radiation. **Conclusion** Transplantation of hMSCs can improve the survival rate and promote the repair of intestinal injury induced by radiation in mice. MSCs are hopeful to be used on the treatment of radiation-induced intestinal injury.

[Key words] mesenchymal stem cells; radiation injury; intestines; survival rate; intestine crypt

众所周知,盆腔、腹腔或腹膜后恶性肿瘤经放射 治疗后会引引起肠道并发症,称为放射性肠损伤,可累

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31670859);中国医学科学院“中央级公益性科研院所基本科研业务费”(2016ZX310198, 2016RC310019,2016RC310017);中国医学科学院放射医学研究所创新团队基金(1650)。 作者简介:王彦(1975-),副研究员,硕士,主要从事放射生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail:liuqiang@irm-cams.ac.cn。

及小肠、结肠和直肠,其中小肠是受损的主要部位。根据辐射剂量的大小、时间的长短、发病的缓急,一般分为急性和慢性两种。早期主要表现为肠上皮更新受到抑制,随后小动脉壁肿胀、闭塞,引起肠壁缺血,黏膜糜烂;晚期则表现为肠壁纤维化,肠腔狭窄或穿孔等^[1-2]。

目前,以间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为基础的细胞治疗,获得越来越多的关注,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hMSCs)是 MSCs 中的一种,属于多能干细胞。hMSCs 增殖能力强、自我更新快、免疫原性低,移植后几乎不会发生排斥反应,而且来源丰富、采集简便、数量多、不易突变、使用安全可靠,这些优势促使 hMSCs 具有更广泛的应用前景。因此本研究主要利用放射性肠损伤动物模型来探索 hMSCs 对受损小肠组织的保护与修复作用。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂和仪器

6~8 周龄雄性 C57BL/6/J 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。hMSCs 由细胞产品国家工程研究中心赠送,DMEM/F12 培养基、D-HANK's(美国 Thermo),胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(美国 Gibco),胰蛋白酶(trypsin)、磷酸盐缓冲液(PBS)、荧光抗淬灭剂(北京索莱宝生物科技有限公司),即用型羊血清工作液、DAB 反应液(北京中杉金桥生物技术有限公司),中性甲醛、苏木素、伊红、二甲苯、乙醇、水、甘油、过氧化氢(H₂O₂)、枸橼酸缓冲液(华北理工大学附属医院病理科提供)。¹³⁷Cs γ 射线照射源(USD,加拿大)照射盒和铅版均为自制。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

C57BL/6/J 小鼠放置在中国医学科学院放射医学研究所动物实验中心无特定病原体(SPF)环境下饲养 1 周后用于实验。20 只小鼠分为两组,腹部照射+PBS 组(IR+PBS 组)和腹部照射+hMSC 组(IR+hMSCs 组),用于观察小鼠存活率。15 只小鼠分为 3 组,空白对照组、IR+PBS 组和 IR+hMSCs 组,用于观察小肠病理改变和隐窝数量。C57BL/6J 小鼠生存所需的垫料、饲料和饮用水均经过高温高压灭菌处理。所有进入实验室的人和动物均经严格的微生物控制。

1.2.2 放射性肠损伤小鼠模型的建立及 hMSCs 移植

除了空白对照组,其余每组小鼠照射前 10 min 给予 3.5%水合氯醛麻醉(剂量 10 μ g)。麻醉后 5 min 内,观察小鼠呼吸频率,无菌棉签轻触小鼠眼结膜,观察结膜反射是否存在。待小鼠四肢松软后,将其放入自制的照射盒中,剑突以上、耻骨联合以下使用铅板遮蔽(尽量遮蔽肝和脾),采用 γ 射线(以剂量率 1 Gy/min)进行照射,照射剂量为 13 Gy。照射后 2 h 内,经鼠尾静脉注入 1×10^6 个 hMSCs。

1.2.3 30 d 存活率

给予小鼠腹部照射后 30 d 内,记录每天体质量和存活情况。

1.2.4 HE 染色

当小鼠体质量平均达到 23~24 g 时,随机分组,腹部照射后 3.5 d 及 5.0 d,处死小鼠,将小肠取出按 3:1:2 分为十二指肠、空肠和回肠,分置固定液中,每段分别取 3 块组织。使用标准方法进行脱水、石蜡包埋。每个标本制作厚约 3 μ m 的连续切片,68 $^{\circ}$ C 烤片 2 h。常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水(二甲苯 I 和 II 各 20 min,二甲苯 III 15 min,100%乙醇 I 和 II 各 10 min,95%乙醇、80%乙醇和 75%乙醇各 5 min,蒸馏水洗 2 min)。苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化 30 s,自来水浸泡 15 min,置伊红液 2 min,常规脱水,透明,封片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 30 d 存活率及体质量变化比较

IR+PBS 组的小鼠存活率只有 30%,而 IR+hMSCs 组的小鼠存活率为 100%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1A;同时,30 d 内每天对小鼠进行称体质量,小鼠受照后,体质量急剧降低,但第 5 天后,直至第 10 天,两组小鼠体质量均出现回升情况,IR+hMSCs 组的小鼠体质量回升更多;第 10 天后,体质量再次降低,IR+PBS 组最明显;第 15 天后,体质量重新上升,最终趋于平稳,见图 1B。虽然体质量两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),但从总体趋势观察发现 hMSCs 阻止了小鼠体质量下降,因此推测 hMSCs 对照射小鼠具有防护作用。

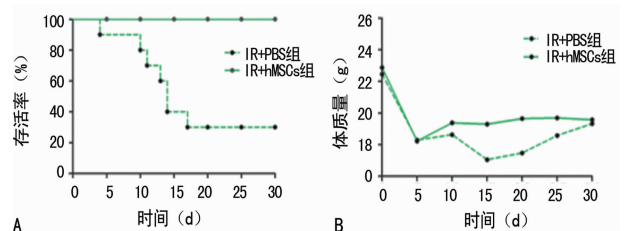
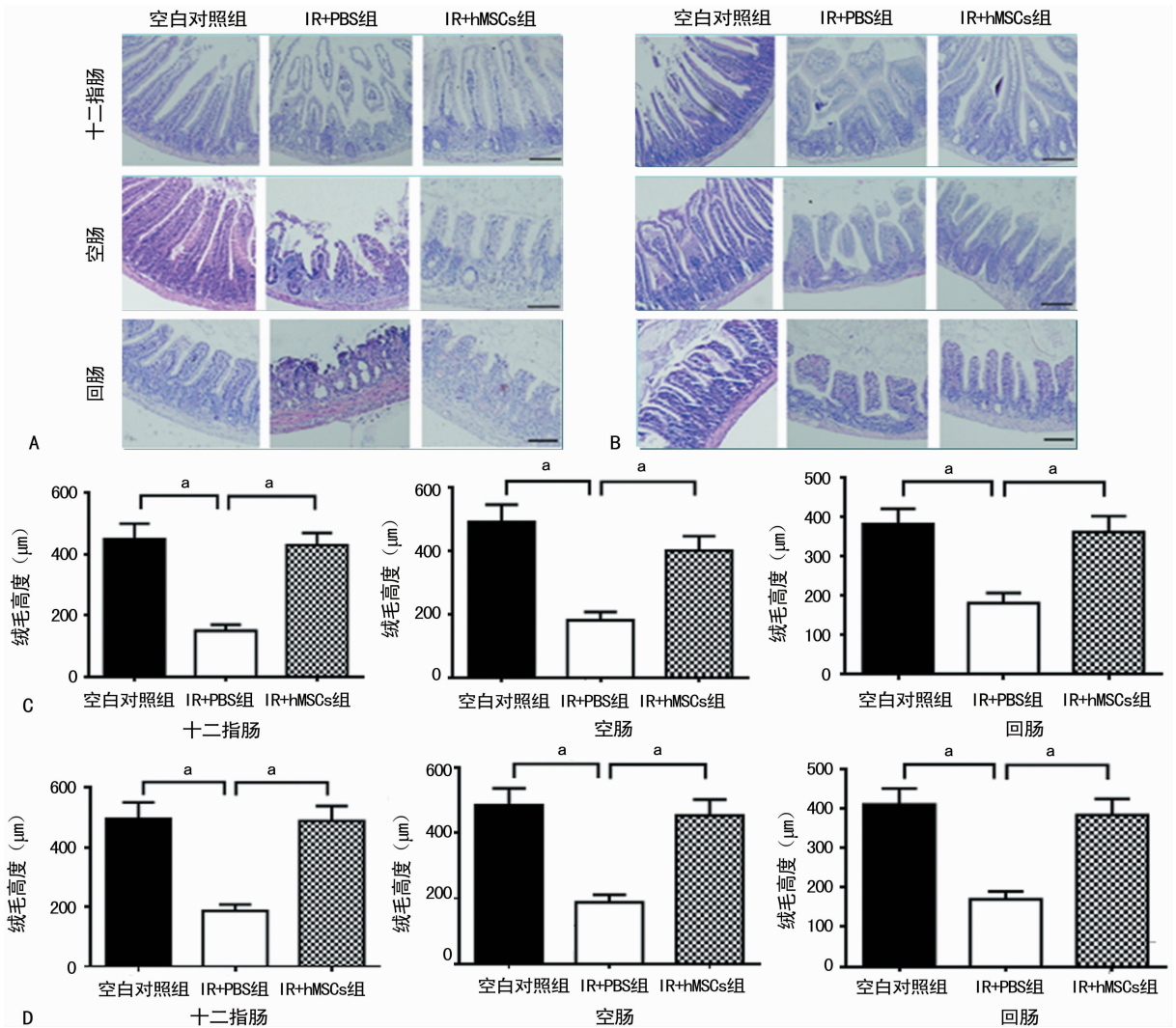


图 1 不同处理组小鼠 30 d 存活率情况及体质量变化趋势

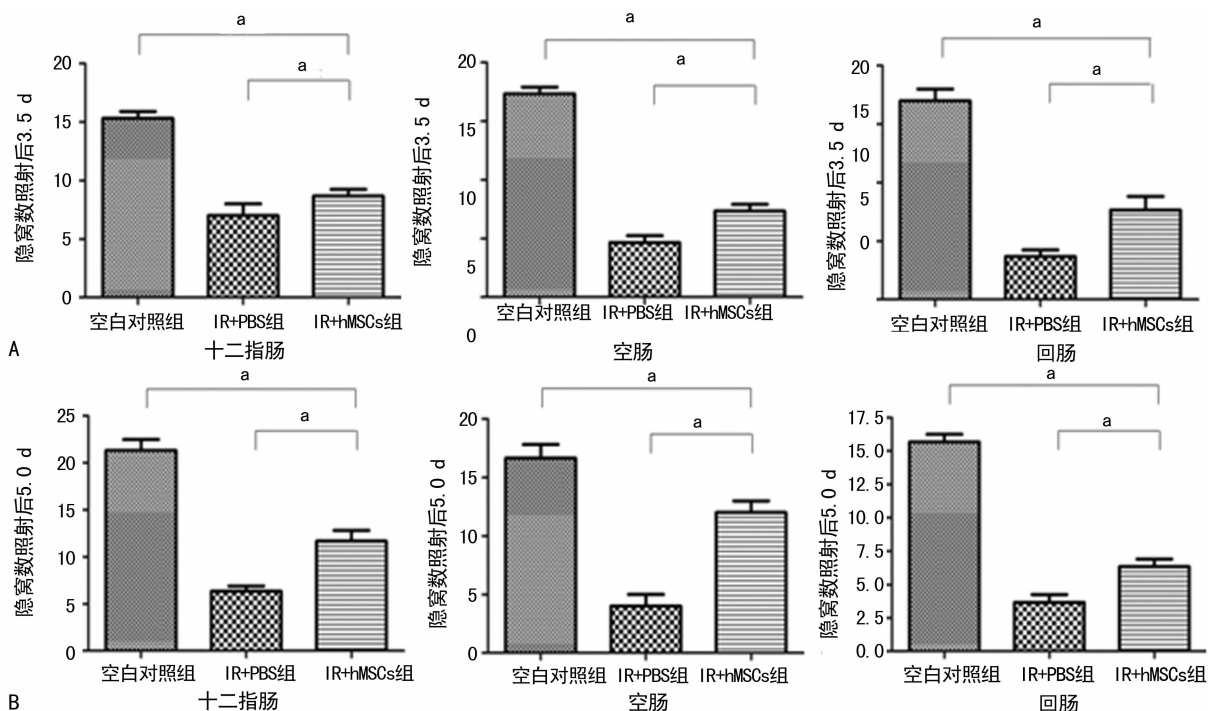
2.2 hMSCs 促进肠损伤的修复

13 Gy γ 射线腹部照射 3.5 d 后,与空白对照组比较,IR+PBS 组十二指肠空肠、回肠的绒毛均发生断裂、长度变短且数目稀少,而给予 hMSCs 可以减轻辐射诱发产生的肠损伤,见图 2A、C。13 Gy γ 射线腹部照射 5.0 天后,虽然 IR+PBS 组小肠结构完整性较前有所改善,但是仍不如 IR+hMSCs 组,见图 2B、D。除了肠绒毛的变化,笔者进一步观察了隐窝数目的变化。无论是照射后 3.5 d,还是照射后 5.0 d,给予 hMSCs 处理的 IR+hMSCs 组小鼠整个小肠结构所剩肠隐窝的数目均多于 IR+PBS 组,但不及空白对照组,见图 3。这些结果总体上显示,hMSCs 促进了肠损伤的修复。



A, C: 照射后 3.5 d; B, D: 照射后 5.0 d; *, $P < 0.01$

图 2 小肠各段(十二指肠、空肠和回肠)绒毛的变化情况



a: $P < 0.01$

图 3 小肠隐窝数量的变化情况

3 讨论

众所周知,放射治疗是肿瘤治疗的有效手段之一,约 70% 的癌症患者在治疗过程中需要放射治疗。但是,射线在杀死肿瘤的同时,对周围正常组织也会造成损伤,例如在腹部或盆腔肿瘤放疗过程中,会对肠道造成不同程度的损伤。同时,随着原子能事业的不断发展,放射性核素在社会其他领域也得到了广泛应用,如工业、农业、科研等。但是,核与辐射资源在造福人类的同时,也给我们带来了许多安全隐患。近年来,全球范围内的核事故时有发生,导致人员受到较大剂量照射^[3-6]。更新活跃、增殖旺盛的细胞或组织对辐射高度敏感,最易受到损伤^[7],例如肠道,一旦受到照射,就会产生急性综合征^[8],严重影响受害者的生活质量。无论是肿瘤放疗还是核事故导致的放射性肠道损伤,目前尚无有效的治疗方法。寻找放射性肠损伤有效的预防或治疗方法,得到越来越多的关注。

hMSCs 属于多能干细胞,与其他来源的 hMSCs 相比,hMSCs 增殖能力强、自我更新快、免疫原性低,并且更适合大批量生产。目前,临床研究发现移植 hMSCs 具有一定的安全性及可行性,越来越多的关于 hMSCs 研究正在进行^[9-12]。本课题组早前研究发现 MSCs 具有促进放射性肠损伤修复的作用^[13],基于此背景,笔者期望通过建立的放射性肠损伤模型,进一步验证 hMSCs 对肠的辐射保护作用及其作用机制,从而为 hMSCs 作为一种有效的辐射保护措施提供依据。

在本研究中,hMSCs 移植的小鼠 30 d 存活率明显提高,说明 hMSCs 移植对于放射性肠损伤的治疗是有效的。同时,发现照后 5.0 d hMSCs 移植后小鼠的体质量有所提高。结合小鼠存活率及体质量变化趋势显示,hMSCs 移植发挥了辐射防护作用。随后,笔者于 13 Gy γ 射线腹部照射后的 3.5 d 和 5.0 d 检测小鼠小肠组织的病理变化情况,包括十二指肠、空肠和回肠,发现照后 3.5 d 和 5.0 d,IR+PBS 组整段小肠的绒毛均发生断裂、长度变短且数目稀少,而给予 hMSCs 可以减轻辐射诱发产生的肠损伤,说明 hMSCs 促进了小鼠肠道结构的恢复。除此之外,笔者还发现 hMSCs 移植治疗后,小鼠肠隐窝数目明显增加,说明 hMSCs 移植促进了小鼠肠道上皮隐窝干细胞的增殖,这种增殖能有效促进肠绒毛的修复,进而改善肠道的病理变化,促进模型鼠的整体恢复。肠隐窝的改变是评价肠道损伤和修复的重要指标^[14],已有研究发现,隐窝受照后主要表现为体积膨大、数目减少^[15],本研究病理结果与之大体一致,而这种隐窝损伤在 hMSCs 移植后得到明显改善。

综上所述,本研究证明 hMSCs 干细胞移植可明显促进放射性肠损伤模型鼠肠道的修复,为 MSCs 用于临床上肠道损伤的患者提供了实验依据,但 hMSCs 促进放射性肠损伤修复的具体机制尚不明确,有待更多的研究深入探索。

参考文献

[1] THEIS V S, SRIPADAM R, RAMANI V, et al. Chronic

radiation enteritis[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2010, 22(1):70-83.

- [2] CHRISTENSEN D M, IDDINS C J, SUGARMAN S L. Ionizing radiation injuries and illnesses[J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2014, 32(1):245-265.
- [3] YAN W, LIQING D, CHANG X, et al. Learning from biomarkers in victims accidentally exposed to ionizing radiation[J]. *International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine*, 2016, 40(2):128-132.
- [4] SHI C, LV T, XIANG Z, et al. Role of Wnt/beta-catenin signaling in epithelial differentiation of lung resident mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8):1532-1539.
- [5] ALIMPERTI S, YOU H, GEORGE T, et al. Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt12):2627-2638.
- [6] ULIVI V, TASSO R, CANCEDDA R, et al. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(16):1858-1869.
- [7] VOGIN G, FORAY N. The law of Bergonie and Tribondeau: a nice formula for a first approximation[J]. *Int J Radiat Biol*, 2013, 89(1):2-8.
- [8] SPYROPOULOS B G, MISIAKOS E P, FOTIADIS C, et al. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(2):285-94.
- [9] LI T, XIA M, GAO Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(9):1293-1306.
- [10] LINERO I, CHAPARRO O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration[J]. *PLoS One*, 2014, 23(9):e107001.
- [11] LIANG X, DING Y, ZHANG Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23:1045-1059.
- [12] NICOLAY N H, LIANG Y, LOPEZ PEREZ R, et al. Mesenchymal stem cells are resistant to carbon ion radiotherapy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4):2076-87.
- [13] 王彦, 刘强, 杜利清, 等. 肠辐射损伤模型鼠的间充质干细胞移植研究[J]. *陕西医学杂志*, 2011, 40(8):939-941, 947.
- [14] 王津晗, 徐畅, 王彦, 等. 放射性肠损伤模型及其评价研究进展[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2017, 41(1):33-40, 44.
- [15] METCALFE C, KLJAVIN N M, YBARRA R, et al. Lgr5⁺ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(2):149-159.

(收稿日期:2017-12-18 修回日期:2018-02-21)