

· 基础研究 ·

骨髓间充质干细胞移植治疗 Duchenne 肌营养不良型 mdx 小鼠后的肌电图和 dystrophin 蛋白表达改变

谢模英 杨慧民 褚倩 傅新巧 张苏明

【摘要】目的 研究骨髓间充质干细胞(MSCs)移植治疗 Duchenne 肌营养不良(DMD)模型鼠 mdx 鼠后肌电图改变及 dystrophin 蛋白表达变化。**方法** 分离培养正常小鼠 MSCs 局部肌肉注射移植入 DMD 模型鼠 mdx 鼠,数周后观察肌电图改变及 dystrophin 蛋白表达变化。**结果** MSCs 移植后 mdx 鼠肌电图明显改善, dystrophin 蛋白阳性表达肌纤维增加明显。**结论** MSCs 局部骨骼肌肌肉内细胞移植治疗 mdx 鼠有一定效果。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 细胞移植; 诱导分化

Electromyogram and dystrophin expression in mdx mice with mesenchymal stem cells transplantation XIE Mo-ying, YANG Hui-min, CHU Qian, FU Xing-qiao, ZHANG Su-ming. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To investigate the electromyogram and dystrophin expression as influenced by mesenchymal stem cells implantation into skeletal muscle in mdx mice (Duchenne muscular dystrophy model). **Methods** MSCs isolated from mice bilateral tibias were cultured and injected into the gastrocnemius muscle of mdx mice and normal mice, 16 weeks after implantation, the MUAP voltage and dystrophin protein expressing was analysed.

Results 16 weeks after implantation, MUAP voltage and dystrophin protein expressing improved significantly. **Conclusion** MSCs transplantation can be achieved by injecting MSCs into muscle and treat mdx mice.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Cell transplantation; Duchenne muscular dystrophy

迪谢纳肌营养不良 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD) 是最常见的致死性 X 连锁隐性遗传性肌病,发病率为男性活婴的 1/3 500。一般于儿童期起病,表现为进行性骨骼肌萎缩无力和小腿腓肠肌假性肥大,患者几乎均于 20 岁之前死于呼吸肌麻痹或心力衰竭。已发现 DMD 的致病基因为 dystrophin 基因的缺失,引起肌细胞膜结构蛋白 dystrophin 蛋白的缺乏。但其具体分子通路仍不明确。目前的治疗方法主要集中在基因治疗和细胞移植方面。

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是中胚层发育的早期细胞,具有向其他胚层分化的潜能。因其来源容易,且易于体外培养扩增及外源基因的转染和表达,移植排斥反应较弱,是很有前途的细胞工程和基因工程载体细胞之一。

本研究拟用电生理学和细胞免疫化学方法,观察骨髓间充质干细胞移植治疗对肌营养不良模型鼠 mdx 小鼠的病态肌肉的影响,初步探讨骨髓间充质干细胞移植对肌营养不良模型鼠 mdx 小鼠的疗效。

材料与方法

一、实验材料

4 ~ 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 1 只和 2 周龄 C57BL/6 小鼠各 5 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。2 周龄 mdx 雄性小鼠 5 只,购于美国 Maine 州 Jackson 实验室。Dystrophin 单克隆抗体为 Neomarker 公司产品。SABC-FITC 免疫荧光试剂盒购于 Sigma 公司。

二、实验方法

(一) MSCs 的分离、培养

小鼠骨髓 MSCs 的体外分离培养:将 4 ~ 6 周龄 C57BL/6 小鼠脱臼处死后置于 75% 酒精浸泡约 5 min,于无菌条件下分离出小鼠的股骨和胫骨。用注射器冲出骨髓细胞后,依次经 7 号和 4 号针头吹打,制成单细胞悬液备用。然后缓慢将单细胞悬液注入预先加有密度为 1.082 的 Percoll 细胞分离液的试管中,于 4℃ 500 g 离心 30 min,取中间的单个核细胞层,以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 清洗 2 次,再以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种于 α -MEM 培养基 (含青、链霉素各 100 U/ml,胎牛血清 20%),置于 5% CO_2 饱和湿度

基金项目:国家自然科学基金 (No. 30370505)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科

37℃培养。1 d 后更换培养液,去掉非贴壁细胞,以后每 3~4 d 换液 1 次。12~16 d 细胞生长融合,经 0.25% 的胰酶消化,以 $6 \times 10^3/\text{ml}$ 的密度传代培养。选取培养纯化的第 3 代细胞进行下列实验。

(二) 移植

制备 MSCs 细胞悬液 2 ml,细胞计数和活性测定后分别经局部肌肉注射。2 周 mdx 鼠左后腿腓肠肌注射 50 μl (约 $1 \times 10^6/\text{ml}$) 为治疗组,以同龄健康 C57/BL6 小鼠为正常组,以同只 mdx 对侧腿为对照组,腓肠肌注射等剂量磷酸盐缓冲液。

(三) 肌电图测定

移植治疗后 16 周采用 Nicolet 肌电及诱发电位仪,行肌电图 (electromyography, EMG) 检查。记录电极插入腓肠肌,地极置于背部皮下。小鼠呈仰卧位,轻牵拉一侧后肢,EMG 的测量指标是运动单位电位 (motor unit potential, MUP) 的波幅。

(四) 免疫荧光染色

移植治疗后 16 周小鼠麻醉下取腓肠肌中部, OCT 包埋,置液氮保存。肌肉切为 8 μm 的冰冻切片,以 1% BSA (小牛血清) 室温封闭 1 h,抗 dystrophin 单克隆抗体按比例稀释后孵育 1 h, PBS 洗 3 次, FITC 标记抗体孵育 1 h, 荧光显微镜观察并照像。计算 dystrophin 染色阳性纤维占总纤维的比例。

三、统计学分析

部分数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件行统计学分析,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、肌电图

对照组 mdx 小鼠 MUP 与正常组 C57/BL6 鼠比较,波幅差异有统计学意义 ($P < 0.05$),并可见肌强直电位。治疗组较对照组 MUP 波幅明显增高 ($P < 0.05$),波幅差异也有统计学意义。见表 1。

表 1 各组 MUP 波幅均值及 dystrophin 阳性细胞百分率

组 别	n	MUP 波幅 (μV , $\bar{x} \pm s$)	dystrophin 阳性细胞 百分率
正常组	5	342.4 $\pm$ 48.7	100
对照组	5	146.3 $\pm$ 22.1 [#]	1.1~2.9
治疗组	5	291.8 $\pm$ 36.2 [*]	11.6~14.2

注:与正常组比较,[#] $P < 0.05$,与对照组比较,^{*} $P < 0.05$

二、dystrophin 抗体免疫荧光染色

正常组 C57/BL6 dystrophin 抗体 (dys 抗体) 免疫荧光染色肌膜呈明显网状绿色荧光 (图 1)。对照组 mdx 鼠肌膜基本未见绿色荧光 (图 2)。经 MSCs 移植治疗 mdx 小鼠 16 周后肌膜呈绿色荧光恢复,荧光较正常组略弱,mdx 鼠骨骼肌细胞为萎缩与肥大镶嵌存

在,故治疗组细胞呈大小不一 (图 3)。

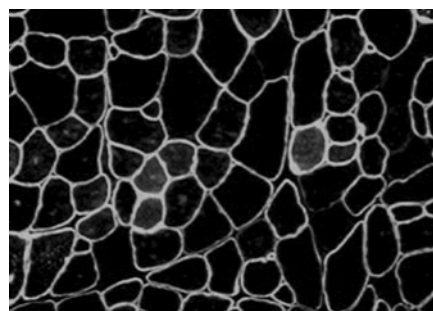


图 1 正常组 C57/BL6 小鼠 Dystrophin 抗体 (免疫荧光染色, $\times 200$)

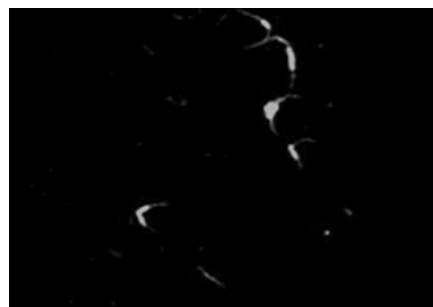


图 2 对照组 mdx 小鼠 Dystrophin 抗体 (免疫荧光染色, $\times 200$)

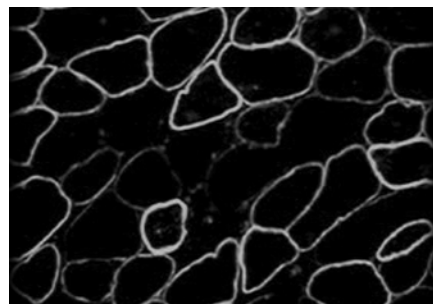


图 3 治疗组 mdx 小鼠 Dystrophin 抗体 (免疫荧光染色, $\times 200$)

讨 论

骨髓中的 MSCs 具有向所有间质组织来源的细胞分化的能力^[1]。已有多项研究表明,体外培养的 MSCs 具有多向分化的能力,移植体内的 MSCs 也能长期存活并保持其分化能力^[2]。把骨髓 MSCs 植入体内,它可在多种造血以外的组织如肺、骨、软骨和皮肤等处定位和分化。移植的 MSCs 可在体内长期存活,并保持其多分化潜能,进入局部组织微环境增殖分化。这为应用 MSCs 进行体外基因治疗以及移植 MSCs 替代体内受损的肌肉等间充质组织细胞提供了可能。

骨髓中 MSCs 的含量很低,约为 0.001%~0.01% 左右,要利用 MSCs 就必须实现 MSCs 的体外分离培养扩增。参照 Pereira 等^[3]贴壁分离骨髓 MSCs 方法,在我们的实验中,采用密度梯度分离和贴壁培养相结合的方法进行。利用 Percoll 将大部分的造血细胞和单

个核细胞分离开来,再经过体外贴壁培养换液去除悬浮生长的造血细胞,与单纯贴壁培养相比获得均一性更高的 MSCs。

细胞移植的疗效高低受很多因素影响,如移植细胞类型及数量、移植部位及途径、移植时机及宿主对移植细胞的免疫炎性反应、损伤对移植细胞的导向机制及局部微环境对移植细胞分化的影响等。以往成肌细胞移植治疗 mdx 鼠和 DMD 患者疗效不理想^[4,5]。MSCs 体外诱导为成肌细胞效率偏低,Bhagavati 等^[6]用 MyoD 和 Myf5 质粒转化后其分化效率才达 35%~46%。故 MSCs 体外定向成肌细胞分化后移植时机还不成熟。而 MSCs 心肌体内移植治疗心肌梗死的实验多表明疗效明显。本实验首次采用局部骨骼肌肉内移植来证实其治疗 DMD 的疗效。

骨髓间充质干细胞所引起的免疫排斥反应远比骨髓移植引起的免疫排斥反应弱,实验认为同种异体移植不必用免疫抑制剂和放射照射降低移植免疫。为进一步提高 MSCs 细胞移植效率和延长移植细胞存活时间,本实验应用近交系 C57BL/6 小鼠为供体,mdx 鼠为细胞移植受体,Muller 等认为此供受体之间的免疫排斥反应更小^[7]。

mdx 鼠是目前研究假性肥大型肌营养不良症即杜兴氏型肌营养不良较理想的小鼠模型。由于转基因技术的不断发展,mdx 鼠根据 dystrophin 基因敲除部位不同而品种较多,但大致表现相同。本试验采用的 mdx 鼠是在 C57BL/10 小鼠的 23 号外显子上插入终止码,使此基因功能缺陷而致蛋白不能合成,是经典的 DMD 的动物模型。新生 mdx 小鼠 10 d 后,开始出现肌纤维的变性,到第 3 周,几乎 100% 的肌纤维出现典型变性坏死与再生的改变,肌纤维膜缺乏正常的 dystrophin 表达。同时,有实验显示:mdx 鼠肌纤维的变性坏死时间从 1 个月到 14 个月(从幼年到老年)持续存在,这一点也十分类似于 DMD 患者肌纤维变性坏死时间持续较长的特点。由此 Wang 等^[8]认为,任何年龄 mdx 鼠都可作为研究 DMD 细胞移植的动物模型,且理论上 mdx 鼠 2 周龄细胞移植效果应最佳。

综合考虑以上因素,本实验采用近交系 C57BL/6 小鼠原代 MSCs 移植 2 周龄 mdx 鼠,最长观察 16 周 dystrophin 蛋白仍有表达,且表达效率可达 14.2%,接近改善 mdx 鼠和人 DMD 临床症状所要求的 20%。推测移植的间充质干细胞在肌肉局部存活和增殖,在自身分泌的细胞因子和肌肉微环境的相互影响作用下,可能通过分化或融合至受损肌细胞参与再生修复。其体内分化途径有待进一步探讨。

DMD 患者和 mdx 鼠均可见到肌源性受损的肌电图表现^[9]。包括运动单位平均时限缩短,运动单位电

位平均幅度下降,多相电位增加,重收缩时出现干扰相,运动单位范围缩小,运动单位电位最大幅度下降等,此外还可见到纤颤电位,正相电位等等^[10]。据统计,100 例假性肥大型肌营养不良症四头肌的肌电图,肌强直电活动出现率为 10%,纤颤或正相电位出现率为 70%,运动单位电位时限缩短,多相电位增加 95%,重收缩时出现干扰相及病理干扰相占 96%。mdx 鼠肌电图主要表现为运动单位电位波幅降低,治疗后运动单位电位波幅较对照组显著增高,说明病理肌电图明显改善。

骨髓间充质干细胞移植治疗 DMD 模型小鼠 mdx,使其骨骼肌细胞膜骨架蛋白 dystrophin 恢复,肌肉病理改变好转(另文讨论),肌病肌电图明显改善,且疗效持续到治疗后 16 周,提示骨髓间充质干细胞移植对 DMD 模型小鼠 mdx 治疗有效。进一步研究和改善注射途径对 DMD 模型小鼠 mdx 全身功能疗效,对骨髓间充质干细胞移植治疗应用到临床具有很大意义。

参 考 文 献

- 1 Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976, 4:267-274.
- 2 Liechty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 2000, 6:1282-1286.
- 3 Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:4857-4861.
- 4 Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, et al. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 1989, 337:176-179.
- 5 Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*, 1992, 356:435-438.
- 6 Bhagavati S, Xu W. Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitor cells from mouse bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318:119-124.
- 7 Mueller GM, O'Day T, Watchko JF, et al. Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in mdx mice. *Human Gene Ther*, 2002, 13:1081-1090.
- 8 Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:13714-13719.
- 9 Pastoret C, Sebillé A. Time course study of the isometric contractile properties of mdx mouse striated muscles. *J Muscle Res Cell Motil*, 1993, 14:423-431.
- 10 陈松林, 张成, 黄文, 等. 骨髓干细胞移植治疗 Duchenne 型肌营养不良鼠的实验研究. *中华神经科杂志*, 2003, 36:443-446.

(修回日期:2005-07-11)

(本文编辑:阮仕衡)