

• 论 著 •

## 异种脐血干细胞对胶原诱导关节炎小鼠滑膜组织形态结构影响的研究\*

牛广华, 高玉洁<sup>△</sup>, 高明利, 郭鹤, 明彩荣, 严峰

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**摘要:**目的 探讨异种、异基因脐血干细胞(HMSCs)移植对小鼠Ⅱ型胶原性关节炎(CIA)滑膜组织病理学的影响。方法 (1)应用美国 BD 公司 FAcscaliburTM 型分选式细胞分析仪,进行脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞分选。(2)弗氏完全佐剂+Ⅱ型胶原诱导 CIA 小鼠模型,随机分为正常对照组、模型组、单份 HMSCs 移植治疗组、双份 HMSCs 移植治疗组、甲氨喋呤治疗阳性对照组,每组 10 只小鼠。(3)采用尾静脉注射,除模型组、正常对照组用生理盐水,单份、双份人脐血所含的 CD34<sup>+</sup> 细胞数均为  $2 \times 10^5$ 。(4)观察 42 d 不同分组小鼠的关节症状及进行关节炎指数测定。(5)移植后第 42 天全部处死动物取踝关节进行病理组织学检测,收集数据并作统计分析。结果 双份 HMSCs 移植优于单份 HMSCs 移植治疗组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 双份 HMSCs 可作为一种新的替代细胞来源用于自身免疫性疾病的细胞移植治疗。

**关键词:**关节炎, 类风湿; 胶原; 滑膜; 脐血干细胞移植

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0385-03

Influence of heterogenous cord blood stem cell on the morphosis of synovial membrane histopathological in model mice with arthritis induced by collagen\*

Niu Guanghua, Gao Yujie<sup>△</sup>, Gao Mingli, Guo He, Ming Cairong, Yan Feng

(First Affiliated Hospital of Liaoning Triditional Chinese Medical University, Shenyang 110032, China)

**Abstract:** Objective To observe histopathological changes of synovial membrane in type II collagen-induced arthritis(CIA) modle mice, treated with transplantation of heterogenous allogeneic cord blood stem cells(HMSCs). **Methods** (1)CD34+ cord blood stem cells were selected and identified with FAcscaliburTM flow cytometry sorting system of BD company. (2) CIA modle mice were induced by Freund's adjuvant and type II collagen. All 50 mice were divided into 5 groups, including normal group, model group, mono-MSCs group, double-MSCs group and MTX group(10 mice for each group). (3)Mice in mono-MSCs and double-MSCs group were injected with MSCs, with CD34+ cells for  $2 \times 10^5$ , through caudal vein, but normal group and model group were infected instead with 0.9% normal saline. (4)Arthritis symptoms, osteoarthritis index and joint swelling degree of rheumatoid arthritis were observed for 42d in each group. (5)The histopathological change of synovial membrane on ankle joint was observed on the forty-second day, and the data was collected and analyzed. **Results** Double-MSCs transplantation was superior to mono-MSCs ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Double-MSCs could be a new source of cell transplantation for the therapy of auto-immune disease.

**Key words:** arthritis, rheumatoid; collagen; synovial membrane; cord blood stem cell transplantation

类风湿性关节炎(RA)是一种发病机制尚不十分明确的致残性自身免疫性疾病,在我国的发病率高达 0.36%。传统的治疗药物、免疫抑制剂、糖皮质激素、生物制剂等,虽能使部分患者的病情活动得以控制,但不能治愈;且有部分复发,另外难治性 RA 患者对上述治疗反应较差,临床疗效不满意。

人脐血干细胞(HMSC)移植作为一种安全、可靠和有效的移植方式已经受到了广泛认可和应用,是目前造血干细胞移植的主要形式之一<sup>[1-2]</sup>。但其所含有核细胞数低的问题严重制约了在临床上的应用。目前,只有大约 25%需行脐血移植的成人患者可找到符合细胞数的脐血供者。为此本组尝试异基因双份 HMSC 移植治疗 RA 这一难治性自身免疫性疾病,本项目利用异基因双份 HMSC 移植治疗小鼠Ⅱ型胶原性关节炎(CIA)的实验研究,观察 HMSC 可否有阻断滑膜炎性、抑制淋巴细胞浸润、促进软骨组织形成等作用。

## 1 材料与方

**1.1 材料** (1)牛Ⅱ型胶原(collagen from bovine nasal septum, C7809, 5mg, Sigma 公司);(2)弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, 098K8729-CAS 9007-81-2, 10 mL, Sigma 公

司);(3)流式细胞仪抗体 PE-CD34, FITC 标记的小鼠抗体(Pharmingen 公司);(4)甲氨喋呤,上海医药集团有限公司信通制药厂,产品批号 0902091。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 脐血的采集** 无菌取自健康足月妊娠产妇、自然分娩或剖宫产的胎儿脐血,要求母亲无遗传病家族史、输血史,无 HBV、HCV、HIV、梅毒等急慢性传染病,无妊娠合并症和妊娠期间服药史,婴儿无先天性畸形,所有标本均在 8 h 内进行处理。

**1.2.2 HMSC 的分离** 采用密度梯度离心法沉降、分离得单个核细胞。在超净工作台上,在无菌条件下,消毒穿刺部位,将 6%羟乙淀粉(HES)分别加入每份采血袋内(加入量为血量的 1/4),混匀,4℃自然沉降 2 h 分层,去除部分 RBC。将析出的上层液体低速离心后,取析出的细胞沉淀物,以 PBS 重悬,滴入等体积的 Ficoll(1.077)液中,梯度密度离心,吸出悬浮于中层的细胞即为 MNC。将 MNC 浓缩至约 5 mL,用 PBS 将其体积调整至 25 mL。重复步骤 3 次后,最终所得细胞以 PBS 调整体积至 5 mL。将所得有核细胞液(MNC)按 1:1 比例加入氯

化铵破红细胞液(NH<sub>4</sub>CL)5 mL,混匀,800 r/min 离心 10 min,弃去上清部分,将所得下层细胞以 PBS 反复洗涤 3 次后,调整其体积至 1 000 μL 备用。

(1) 计数有核细胞。用微量移液器吸取白细胞稀释液 0.49 mL,置于 EP 管内,加入细胞悬液 10 μL,混匀。在低倍镜下计算有核细胞数,将其总数×125,即得到 1 μL 悬液内的有核细胞数。

(2) 台盼蓝拒染试验测定细胞活力。用微量移液器吸取 PBS 液 0.49 mL 放入 EP 管中加入 10 μL 有核细胞悬液,混匀后加入 10 μL 0.5% 台盼蓝染液,混匀,2 min 后制片,镜检计数。

**1.2.3 干细胞分选及鉴定:**应用美国 BD 公司 FACscaliburTM 型分选式细胞分析仪,进行脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞分选。方法为(1)取 50 μL 样品加入上机试管底部;(2)加入单克隆 CD34-PE 10 μL,混匀;(3)室温避光孵育 20 min,加入 500 μL,红细胞裂解液充分混匀;(4)室温静置 20 min,加入 500 μL PBS 液,充分混匀;(5)上机检测。收集分选的 CD34<sup>+</sup> 阳性细胞,PBS 充分洗涤后,以生理盐水重悬,并调整浓度为 3×10<sup>5</sup>/mL 的细胞悬液。吸取 50 μL 单个核细胞(MNC)混悬液用流式细胞仪检测人源性 CD34<sup>+</sup> 细胞的含量。经处理完毕的采集物深低温冻存以备回输。

**1.2.4 实验分组** 近交系 C57BL/6(H-2b)小鼠 50 只,动物年龄 45~50 d,体质量(17±3)g,随机分为:正常对照组、模型组、单份 HMSC 移植治疗组、双份 HMSC 移植治疗组、甲氨蝶呤阳性治疗对照组。每组 10 只小鼠。

**1.2.5 建立 CIA 动物模型** 除正常组外,寒冷刺激 10 d 后,将 10 mg 牛 II 型胶原(BII C)与 5 mL 完全福氏佐剂研磨后,以每只 100 μL 于小鼠背部、踝部、尾根部皮内注射免疫,免疫注射 14 天按上述方法少量再次腹腔内注射,作为激发注射免疫。之后对各组小鼠的发病情况进行观察,主要为关节水肿、皮肤红斑及关节活动情况等。第 15 天开始移植治疗,于 42 d 对各组小鼠的膝及肘以下关节进行组织病理学分析。

**1.2.6 HMSC(输注)途径及剂量** 均采用尾静脉注射途径: CIA 小鼠二次免疫接种后第 2 天,除模型组、正常对照组用生理盐水,其余以 2×10<sup>5</sup> 细胞数/50 g 体质量的密度将 HMSC 注入小鼠尾静脉内。

**1.2.7 甲氨蝶呤(输注)途径及剂量** 采用每次甲氨蝶呤 0.0175 g/kg 对甲氨蝶呤治疗阳性对照组小鼠进行灌胃,每 5 d 1 次,直到实验倒数第 2 天。42 d 后处死小鼠进行取材。

**1.2.8 实验场所** 辽宁中医药大学动物实验中心、辽宁中医药大学病理技术实验中心。

**1.3 观察指标**

**1.3.1 小鼠关节肿胀度评估** (1)观察各组小鼠双后足爪各关节的肿胀程度。用游标卡尺对小鼠双侧后足关节进行测量,从造模时开始计时,每 5 d 1 次,直到取材前 1 d。(2)关节炎指数(arthritis index, AI)评定 0 分:无关节炎性(无红肿);1 分:有红色斑点或轻度肿胀;2 分:关节中度肿胀;3 分:关节重度肿胀;4 分:关节僵直甚至畸形,严重功能障碍。

**1.3.2 小鼠足部组织病理学分析及评分** (1)小鼠肢体关节的组织病理检查:取实验及对照组小鼠肢体,乙醚麻醉颈处死小鼠,除去病变关节的皮毛和多余的皮下组织,保留跖趾关节及趾间关节,从前肢和后肢膝关节内侧切下鼠爪,4%多聚甲醛固定 48 h 以上,10% EDTA 脱钙,常规脱水,石蜡包埋,制成 6 mm 的切片,HE 染色。常规光学显微镜观察,各个关节局

部的组织病理学改变。制定评分标准,进行病理学诊断。(2)评分标准按照 Hom 等的标准给每个小鼠进行评分。0 分:未见有任何改变;1 分:有轻度炎性增生;2 分:有低度炎性增生;3 分:有中度滑膜炎,轻度软骨及骨改变;4 分:有显著滑膜炎、纤维增生、软骨及骨破坏;5 分:严重滑膜炎,软骨破坏。

**1.4 统计学处理** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料用完全随机设计资料的方差分析和多重比较(LSD 法和 Tamhane's T2 法)。

**2 结 果**

**2.1 移植注射后比较各组关节炎指数及肿胀度程度** 见表 1。

表 1 各组小鼠关节肿胀指数的测定

| 组别          | n  | 关节肿胀指数         |
|-------------|----|----------------|
| 正常对照组       | 12 | 0±0.00         |
| C II-小鼠模型组  | 12 | 2.995±0.012**  |
| 甲氨蝶呤治疗组     | 11 | 1.186±0.012*   |
| 单份 HMSC 移植组 | 12 | 1.165±0.02**   |
| 双份 HMSC 移植组 | 12 | 0.510±0.05▲**△ |

与对照组比较,▲:无显著性差异(P>0.05);\*\* :有显著性差异(P<0.05);与模型组比较,\* :有显著性差异(P<0.05);与单份 HMSC 移植组比较,△:有显著性差异(P<0.05);与甲氨蝶呤治疗组比较,# :无显著性差异(P>0.05)。

用于 C II 诱导模型组,C II 注射诱导后第 2 d,小鼠注射足即有明显的肿胀,出现急性免疫反应。第 14~21 天后,C II 诱导模型组小鼠对侧足出现红肿。至第 35~42 天后足的肿胀更为明显,与正常对照组比较差异有统计学意义(P<0.01)。

甲氨蝶呤治疗组,治疗的第 3 天,小鼠注射足即有轻度的肿胀减轻,治疗后的第 5 天开始,能明显抑制关节局部的肿胀,治疗后的第 35 天,关节局部肿胀恢复,与模型组比较,差异有统计学意义(P<0.05),单份 HMSC 移植组,治疗后的第 3 天,能明显抑制关节局部的肿胀,治疗后的第 35 天,关节局部肿胀减轻,与甲氨蝶呤治疗组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。

双份 HMSC 移植组,治疗后的第 3 天,小鼠注射足即有轻度的肿胀减轻,治疗后的第 5 天开始,能明显抑制关节局部的肿胀,治疗后的第 35 天,关节局部肿胀恢复正常,与单份 HMSC 移植组比较,差异有统计学意义(P<0.05),与正常对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

**2.2 组织病理学变化** (1)正常组:镜下可见关节滑膜细胞排列整齐,呈扁平状,关节面光滑完整,滑膜层未见炎性细胞浸润,透明软骨细胞排列整齐,骨小梁粗壮、饱满,形态结构完整,成骨细胞排列致密,间质细胞较少。(2)模型组:C II 诱导模型组动物关节,关节滑膜大量炎性细胞浸润、血管翳形成,结缔组织增生、肿胀,骨及软骨组织结构破坏,大量的增生骨及软骨细胞,滑膜组织结构破坏,向关节腔突起。(3)甲氨蝶呤治疗组:镜下可见骨及软骨组织、滑膜表面有所修复,仍可见少量的骨及软骨,滑膜细胞轻度增生,间质细胞水肿,少量的炎性细胞浸润。(4)单份 HMSC 移植组:关节结缔组织、滑膜表面有所修复,骨及软骨细胞结构、滑膜细胞排列正常,但仍可见到少量的水肿、炎性细胞。(5)双份 HMSC 移植组:可见骨及软骨组织结构完整,滑膜细胞列整齐,间质细胞较少与正常相似,未见浸润的炎性细胞。

**2.3 病理组织学评分** 各组小鼠的关节炎组织病理学评分

为:对照组 0 分; C II 模型组为(3.8±0.3)分; 甲氨喋呤阳性治疗组关节组织学为(1.4±0.1)分; 单份 HMSC 移植组关节组织学为(1.3±0.2)分; 双份 HMSC 移植组关节组织学为(0.2±0.1)分; 各组评分结果比较:与模型组比较, 各组有非常显著性差异( $P < 0.01$ ); 与甲氨喋呤治疗阳性组比较, 单份 HMSC 移植组无显著性差异( $P > 0.05$ ); 与单份 HMSC 移植组比较, 双份 HMSC 移植组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与正常对照组比较, 双份 HMSC 移植组无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨 论

脐血干细胞是近年发现的一类具有与骨髓干细胞、外周血干细胞相同的多向分化潜能的原始祖细胞<sup>[3-4]</sup>。脐血干细胞具备自我更新和增殖的能力, 并能在特定因素的影响或诱导下, 向各种细胞或组织分化。是近年干细胞生物学研究中发现的重要细胞之一, 其优势包括: (1) 与骨髓干细胞移植相比, 对供受者之间 HLA 配型相合程度要求较低; (2) 可迅速获取供者干细胞; (3) 移植术后移植植物抗宿主病(GVHD)风险低; (4) 通过移植传播病毒的风险小; (5) 供者无风险等。 (6) 费用低, 伦理学争议少, 易于保存和运输<sup>[5]</sup>。但其所含有核细胞数低的问题严重制约了在临床上的应用。临床实践证实, 脐血中所含有的 TNC 以及 CD34<sup>+</sup> 细胞数是脐血移植后造血及免疫恢复以及移植效果的决定性因素<sup>[6]</sup>。据统计, 脐血移植中所含有的 TNC 最低值需大于  $2.5 \times 10^7/L$  (受者体质量), 若低于该值, 移植失败率及移植相关死亡率则明显升高。目前, 只有大约 25% 需行脐血移植的成人患者可找到符合细胞数的脐血供者<sup>[7]</sup>。为克服单份脐血所含有的 TNC 不足及大体重患者使用, 本组尝试异种异基因双份脐血干细胞移植治疗 RA 这一难治性疾病, 并取得了显著的疗效。

本组采用 C II 加 CFA 免疫成功地诱导了 CIA 小鼠。对照组未用 C II 免疫, 也未有 CIA 发生。CIA 主要组织病理学改变为滑膜水肿, 炎性细胞浸润, 滑膜层次增多, 血管翳形成, 软骨破坏。单份 HMSC 移植组与甲氨喋呤治疗组可明显减轻关节滑膜组织中炎性细胞的浸润、血管翳的形成和滑膜细胞的增生。而双份 HMSC 治疗组能显著改善关节的肿胀度, 明显减轻关节滑膜组织中炎性细胞的浸润, 有阻断滑膜炎、抑制淋巴细胞浸润、促进软骨组织形成等作用, 双份 HMSC 移植组与正常对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 发挥了 HMSC 移植以其来源丰富、取材方便、免疫原性较弱、能耐受更大程度上的 HLA 配型不符等优势。双份脐血和单份脐血移植相比较, 不仅有效地解决了单份脐血所含 TNC 不足的问题, 而且移植术后 GVHD 的发生率并没有增加, 干细胞修复滑膜组织的作用却有所增强。

迄今为止, 干细胞移植治疗的机制尚没有完全阐明, 异种双份脐血干细胞移植治疗 RA 国内外尚未见报道, 而众多学者都在研究。早在 90 年代初期, 国内就有学者<sup>[8]</sup>进行过双份脐血造血祖细胞体外混合培养试验。他们发现, 将双份不同胎儿的脐血细胞混合后体外培养, 并与单个胎儿脐血体外培养相比较, 两者在造血干细胞生成数量和生长特征方面无明显差异。动物试验更进一步证明了双份脐血移植的可行性。Nauta 等<sup>[9]</sup>报道将双份人脐血造血干细胞移植给 NOD/SCID 小鼠, 其中第 1 组小鼠输注单份人脐血, 所含的 CD34<sup>+</sup> 细胞数为  $1 \times 10^5$ ; 第 2 组小鼠输注双份人脐血, 其中每一份脐血所含的

CD34<sup>+</sup> 细胞数均为  $1 \times 10^5$ ; 第 3 组小鼠输注单份人脐血, 输注的 CD34<sup>+</sup> 细胞数为  $2 \times 10^5$ ; 观察不同组别小鼠术后造血免疫恢复情况。移植后 6 周通过流式细胞仪检测小鼠外周血、骨髓及脾脏所含的人源性 CD45<sup>+</sup> 细胞发现, 双份脐血移植组移植植物植入情况明显好于其他两组小鼠。此外, 他们还发现双份脐血移植组小鼠外周血和脾脏中, 人源性 CD45<sup>+</sup> 细胞表达远远高于单份脐血移植组, 且外周血血小板计数恢复明显也比单份脐血移植组提前( $P < 0.05$ )。此试验表明双份异基因小鼠脐血可在同一个受鼠体内产生混合嵌合体, 能重建同种异基因受鼠的免疫造血系统而不引起明显的 GVHD。

本项目利用双份 HMSC 移植技术, 发现双份脐血在造血祖细胞生成数量和生成人源性 CD45<sup>+</sup> 细胞表达远远高于单份脐血移植组, 此结果同国外 Nauta 等<sup>[9]</sup>报道较一致, 其疗效显著的可能机制与重建异基因受鼠的免疫造血系统和干细胞分化、修复滑膜组织的潜能有关。相似的临床报道还见于 Lima<sup>[10]</sup>和 Ooi 等<sup>[11]</sup>的报道。

该项研究对于那些亟须接受治疗的难治性 RA 及大体重患者等, 双份 HMSC 移植无疑是一种安全而高效的移植方式, 故可作为一种新的替代细胞来源用于自身免疫性疾病的细胞移植治疗。

### 参考文献

- [1] 孟强, 赵树铭. 提高脐血造血干细胞移植归巢的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 366-367.
- [2] 王广宇, 赵芳, 朱旅云. 脐血干细胞的免疫学特性概述[J]. 医学综述, 2010, 16(2): 184-185.
- [3] 李玉艳, 梁志清, 史常旭. 造血干细胞基因转染研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 355-357.
- [4] 党建红, 金志军. 脐血干细胞的生物学特性及其应用[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, (38)2: 89-92.
- [5] Lane TA. Umbilical cord blood grafts for hematopoietic transplantation in adults: a cup half empty or half full[J]. Transfusion, 2005, 45 (6): 1027-1034.
- [6] Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical cord blood from unrelated donors[J]. N Engl J Med, 2001, 344 (24): 1815-1822.
- [7] Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. A nnu Rev Med, 2006, 57(3): 403-417.
- [8] 汪赤字, 谢毅. 脐血造血祖细胞培养及 T 淋巴细胞亚群的研究[J]. 中华血液学杂志, 1994, 15 (4): 178-180.
- [9] Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, et al. Enhanced engraftment of umbilical cord blood-derived stem cells in NOD/SCID mice by co-transplantation of a second unrelated cord blood unit[J]. Exp Hematol, 2005, 33 (10): 1249-1256.
- [10] Lima MD, John LSS, Wieder ED, et al. Double-chimaerism after transplantation of two human leucocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units[J]. Br J Haematol, 2002, 119(3): 773-776.
- [11] Ooi J, Iseki T, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2004, 103(2): 489-491.