

# 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋

## ■背景资料

随着骨髓干细胞研究的不断深入, 为肝细胞移植提供了新的种子细胞。致力于研究骨髓干细胞移植的众多学者, 多数采用门静脉和外周静脉移植细胞, 这两种途径都可以使移植的细胞定居于肝脏并分化为肝细胞, 但是两种途径迁移到肝脏的细胞数是否有差异, 相关报道较少。

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省自然科学基金项目, No. D200536

通讯作者: 穆丽雅, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. lqz321521@163.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-27

## Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein

Li-Ya Mu, Ming-Zi Han, Jin-Feng Qi

Li-Ya Mu, Ming-Zi Han, Jin-Feng Qi, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D200536

Correspondence to: Dr. Li-Ya Mu, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. lqz321521@163.com

Received: 2006-04-06 Accepted: 2006-04-27

## Abstract

**AIM:** To explore the amount of bone marrow mononuclear cells migrating to the liver during allografting in mice.

**METHODS:** Bone marrow stem cells were isolated from the bone marrow of mice by lymphocyte separation medium and labeled with PKH26. The labeled cells were subsequently infused into the caudal or portal veins of different mice with homogeneity, in which hepatic injury was induced by carbon tetrachloride and 2-acetylaminofluorene. Two weeks after transplantation, the migration status of the cells was studied by fluorescence microscopy.

**RESULTS:** Liver cells were found at portal region and central veins of hepatic lobules in all the mice. The PKH26 labeled cells appeared at an average frequency of 175.4 per section from the livers of mice received transplantation via

portal veins, and at an average frequency of 172.9 per section from the livers of mice underwent transplantation via caudal veins. There was no significant difference between them ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Bone marrow stem cells are able to migrate to liver, the numbers of which have no correlation with the approach of transplantation.

**Key Words:** Bone marrow stem cell; Transplantation; Vein

Mu LY, Han MZ, Qi JF. Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1408-1411

## 摘要

**目的:** 探索小鼠骨髓干细胞, 在同种异体不同途径移植后向受体肝脏迁移的情况。

**方法:** 以红色荧光染料PKH26标记从小鼠骨髓中分离出的干细胞, 分别从小鼠的尾静脉和门静脉注入同种异体的CCL4-AAF造成肝损伤的小鼠体内, 移植2 wk后分别取肝组织, 通过荧光显微镜观察两种移植途径对小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的影响。

**结果:** 两组鼠的肝小叶中央静脉及汇管区均可见新生的肝细胞, PKH26标记阳性的细胞在门静脉移植组20倍镜下每张切片平均为175.4个, 在尾静脉移植组平均172.9个( $P > 0.05$ )。

**结论:** 骨髓干细胞向肝脏迁移的细胞数与移植途径无关。

**关键词:** 骨髓干细胞; 移植; 静脉

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋. 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较. *世界华人消化杂志* 2006;14(14):1408-1411

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1408.asp>

## 0 引言

国内外众多文献报道<sup>[1-7]</sup>, 存在骨髓中的干细胞

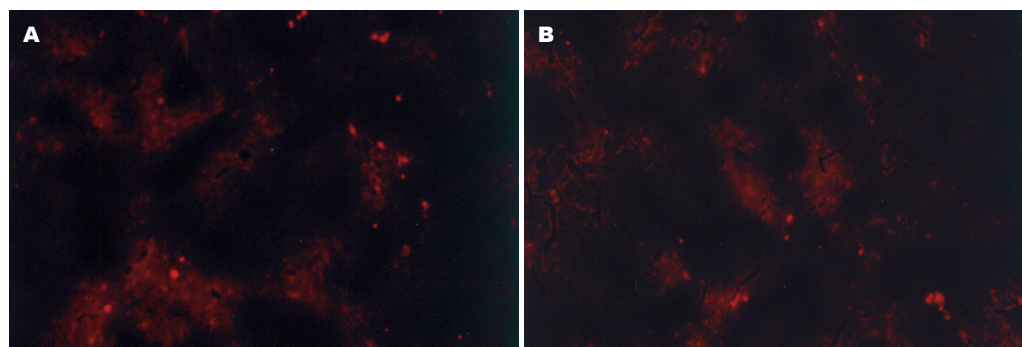


图1 小鼠肝组织中散在的PKH26标记的骨髓干细胞( $\times 20$ ). A: A组; B: B组.

#### ■ 研究前沿

骨髓干细胞可以分化成肝细胞已成定论, 但是其具体的分化机制以及分化率, 各学者观点不一, 而且这种分化在没有肝损伤的条件下是否能够发生, 以及最佳的移植途径, 仍待进一步研究.

在体内外均可以分化为功能完备的肝细胞, 用骨髓干细胞替代成熟肝细胞进行细胞移植治疗肝病, 有望使细胞移植在肝病治疗方面取得重大突破. 目前骨髓移植选择的途径多为门静脉, 但此途径需要导管介入或手术暴露门静脉, 比较复杂. 我们就门静脉和尾静脉两条途径加以对比, 为骨髓干细胞移植临床应用探索简易可行的移植途径.

## 1 材料和方法

1.1 材料  $\delta$  BALB/c小鼠, 体质量18-22 g, 购买和饲养于哈尔滨医科大学动物实验中心. 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司), 四氯化碳(哈尔滨市鑫鹏化学试剂厂), 2-乙酰氨基苄(2-Acetamidofluorene, Fluka Biochemika), 红色荧光染料PKH26(Sigma公司), 聚乙二醇-400(天津天泰精细化学品有限公司), DMEM(Dubecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养基及胎牛血清(Invitrogen公司). 将溶于聚乙二醇的2-乙酰氨基苄按20 mg/kg ig共7 d, 8 d ip 1 g/L  $\text{CCl}_4$ 橄榄油溶液20 mL/kg, 9 d行骨髓移植, 10 d起2-乙酰氨基苄20 mg/kg ig共7 d, 制备肝损伤模型.

1.2 方法 无菌手术取出供体鼠双侧股骨, 用肝素生理盐水冲出骨髓, 再经过7 $\rightarrow$ 5号针头后, 3000 r/min离心5 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬, 然后用淋巴细胞分离液分离, 吸取界面上灰白色细胞, 用PBS洗2遍, 得骨髓单核细胞, 采用4  $\mu\text{mol/L}$  PKH26标记所分离出来的骨髓单核细胞, 骨髓干细胞体外标记方法按说明书操作. 骨髓干细胞移植: (1)台盼蓝拒染试验检验细胞活性, 均达到95%以上, 可用于细胞移植; (2)A组小鼠12只, 用10 g/L戊巴比妥钠以50 mg/kg麻醉后, 取腹部正中切口, 经门静脉穿刺注射骨髓干细胞悬液0.3 mL, 并用11-0无损伤缝合线缝合裂口, 同时ip1万U青霉素, 然后关闭腹腔. B组小

鼠12只, 碘氟消毒尾部皮肤, 经尾静脉注入骨髓干细胞悬液(细胞数均为 $3 \times 10^6$ /只)0.3 mL. 移植2 wk后处死小鼠, 取所有鼠的最大肝叶组织, 一部分置液氮中速冻, 然后置 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 待制备等面积的肝组织冰冻切片. 另一部分在 $4^\circ\text{C}$ 下用40 g/L多聚甲醛固定, HE染色观察其病理变化.

统计学处理 20倍镜下, 将每张冰冻切片上的荧光标记阳性细胞数相加, 计算其平均值 $\pm$ 标准差,  $t$ 检验.

## 2 结果

2.1 荧光染色组织学检查 PKH26吸收551 nm的绿色激发光后, 发出红色荧光, 在荧光显微镜下发现, 各组小鼠肝组织切片中均可见散在的红色荧光标记(表1)(图1), 多数分布在肝细胞索内, 提示体外PKH26标记的骨髓细胞能够移居肝脏. 这种PKH26标记阳性的细胞在A组每张切片20倍镜下总数平均值为175.4个, B组为172.9个, 经统计学分析, A组和B组比较, 无显著差异( $P>0.05$ ).

2.2 常规病理检查 常规石蜡切片HE染色观察, A, B组鼠的肝细胞均呈弥漫性肝细胞疏松化, 但A组要重于B组(图2-3). 此外, A, B两组鼠的肝小叶中央静脉及汇管区均可见新生的肝细胞(图4), 而且A, B两组这种新生的肝细胞数没有明显差异.

## 3 讨论

骨髓干细胞是具有巨大分化潜能的细胞, 它基本上为单个核细胞, 通常用Ficoll和Percoll分离液分离全骨髓而得, 此方法得到的骨髓单个核细胞不全是干细胞, 但干细胞都包含在骨髓单个核细胞内, 并且用密度梯度离心法分离细胞简单易行, 因而许多研究骨髓干细胞的实验都选择了用Ficoll, Percoll分离液通过密度梯度离



## ■相关报道

张刚庆, 方驰华, 颜政. 同种异体 MSC 移植在大鼠肝内定居的病理检测. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1198-1201

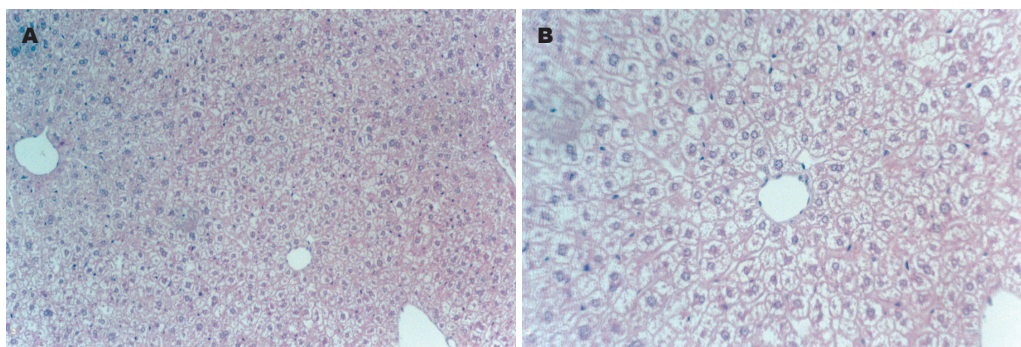


图 2 A组鼠的肝细胞呈弥漫性肝细胞疏松化. A:  $\times 20$ ; B:  $\times 40$ .

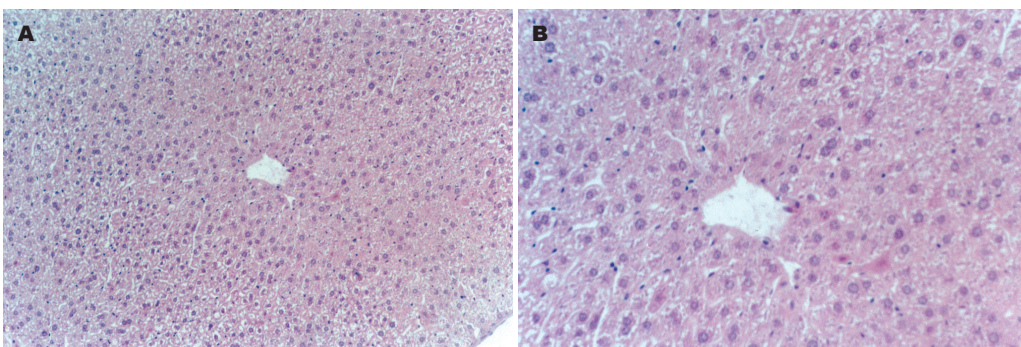


图 3 B组鼠的肝细胞呈弥漫性肝细胞疏松化. A:  $\times 20$ ; B:  $\times 40$ .

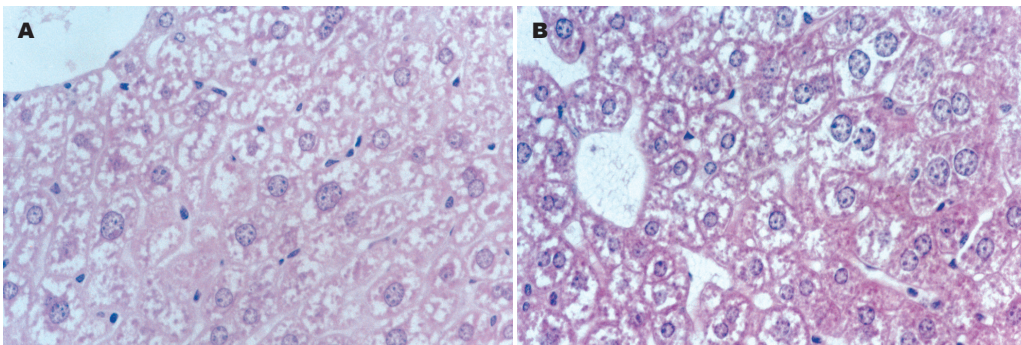


图 4 小鼠肝组织中可见新生肝细胞. A: A组; B: B组.

表 1 A、B两组肝脏冰冻切片红色荧光细胞数 (mean  $\pm$  SD)

组别	n	红色荧光细胞数 (个/切片)
A组	12	175.4 $\pm$ 40.42
B组	12	172.9 $\pm$ 30.53

心来分离. PKH26是一种标记细胞膜的带有长脂肪族末端的红色荧光染料, 可以与细胞膜上的脂类区域稳定结合, 染色速度快, 通常仅需 2-5 min即可使活体细胞均匀着色, 其性质稳定, 对活体细胞没有毒性, 而且不从已标记的细胞转移到未标记细胞, 随着细胞的分裂, 标记物也几乎等份地分配给两个子细胞, 其荧光衰减速度慢, 是骨髓干细胞研究中常用的标记物.

我们采用淋巴细胞分离液进行密度梯度法分离出骨髓单个核细胞, 体外PKH26标记后分别经门静脉和尾静脉回输到CCL<sub>4</sub>-AAF肝损伤模型受体鼠体内, 在荧光显微镜下观察肝组织的冰冻切片, 均可见发出红色荧光的细胞, 并且两组的细胞数差异无显著性, 说明经过两种途径移植的细胞都迁移到了肝脏并在肝脏定居. 许多研究骨髓干细胞移植的实验都采用门静脉<sup>[8-12]</sup>的途径直接将细胞注入肝内, 使更多的细胞定居肝脏. 因为有些学者认为<sup>[13-14]</sup>, 若细胞从外周血管进入体内, 经过全身循环后可能只有少量进入肝脏定向分化. 但是Lagasse *et al*<sup>[15]</sup>经外周静脉移植骨髓造血干细胞治疗 I 型酪氨酸蛋白血症模型小鼠, 结果发现, 正是骨髓中的造

血干细胞在体内转分化为肝细胞, 使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。本实验正说明了骨髓干细胞迁移并定居于肝脏的细胞数, 与移植途径无关, 可能靶器官受损可导致机体产生某些使干细胞趋化、定植的因素, 具体机制有待进一步研究。此外, 我们还发现, 经门静脉移植后的受体鼠的肝细胞疏松化要重于经尾静脉移植鼠, 这种肝损伤的加重是由于注射速度过快所致, 还是存在其他的未知干扰因素, 还需要实验的进一步证明。

#### 4 参考文献

- 1 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
- 2 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 3 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- 4 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- 5 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 6 李文昕, 段芳龄, 马军, 朱武凌, 高天慧, 陈香宇, 颜伏归, 李蔚, 韩娜, 王晓, 孙艳, 孙嫣. 人骨髓单个核细胞向肝细胞诱导分化的体外研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2003; 12: 144-147
- 7 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 8 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 9 王崧芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙烯醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝病杂志* 2005; 13: 274-277
- 10 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝病杂志* 2003; 11: 673-675
- 11 Avital I, Ferrareso C, Aoki T, Hui T, Rozga J, Demetriou A, Muraca M. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery* 2002; 132: 384-390
- 12 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
- 13 王平, 王建华, 颜志平. 骨髓干细胞移植: 肝功能衰竭治疗的一个新研究方向. *中华放射学杂志* 2004; 38: 202-205
- 14 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 15 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234

#### ■应用要点

本文就门静脉和尾静脉相比较, 结果发现两种途径骨髓干细胞迁移到肝脏的细胞数没有差异; 那么, 尾静脉相对门静脉来说, 就是一条简易可行的移植途径, 可以作为骨髓干细胞移植研究的首选途径。

电编 李琪 编辑 潘伯荣