

· 论著 ·

小儿骨髓间充质干细胞的培养及多向分化潜能的研究

黎润光¹ 邵景范^{1*} 魏明发¹ 杨小进¹ 柴成伟¹ 覃宇冰¹ 康慧聪² 赵东明³ 杨 勇³

【摘要】 目的 研究小儿骨髓间充质干细胞(MSCs)的生物学特性及多向分化能力,为小儿 MSCs 的临床应用提供实验依据。 方法 经 Percoll 梯度分离接种获得小儿 MSCs,观察其形态、排列分布情况,用 MTT 法检测细胞增殖情况,并绘制生长曲线,用流式细胞仪检测细胞周期,诱导剂干预细胞,观察细胞的成骨、成脂肪、成神经等多向分化能力。 结果 小儿 MSCs 贴壁容易,呈细长梭形,增殖能力强,融合后旋涡状分布。MSCs 分别经各诱导剂诱导后,细胞形态均发生相应的变化,用化学染色、PCR、免疫细胞染色等方法检测成骨标志物(碱性磷酸酶、骨钙素 mRNA、钙结节)、脂肪标志物(脂滴、PPAR γ -2 mRNA)、以及类神经标志物(尼克氏体、NSE、NF-200)有明显的阳性。 结论 小儿 MSCs 能稳定增殖、传代,具有成骨、成脂肪、成神经等多方向的定向分化潜能,可以作为多方面组织工程的种子细胞。

【关键词】 小儿 / 髓间充质干细胞 / 增殖 / 多向分化

The experiment study of biological characteristics and multi-directional differentiation of children's bone marrow stem cells in vitro. LI Run-Guang, SHAO Jing-Fan, WEI Ming-Fa, et al. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China.

【Abstract】 **Objective** To study the biological characteristics and multi-directional differentiation of Children Bone Marrow Stem Cells in vitro in order to provide an experimental basis for the further clinical application of MSCs. **Methods** Children's MSCs were obtained by density gradient centrifugation and inoculation. The cell shape and arranged distribution were observed. Proliferation and cell cycle(osteogenic, lipogenic and neurogenic etc process) were respectively detected by MTT means and flow cytometry and drawing growth curve. Then, their differentiation potency through condition medium directional induction. **Results** Children MSCs adhered easily, shaped spindle slender, and had strong proliferative ability, integrating with whorl-distribution. Following inducing of MSCs with the different condition medium, the cell-shape corresponding would change. osteoblast markers (alkaline phosphatase, osteocalcin mRNA calcium nodules), adipocyte markers (lipid droplets, PPAR γ -2 mRNA) and nerve cell markers (Nich's body, NSE, NF-2) were detected with chemical staining, PCR and immunocyte staining methods. **Conclusions** Children MSCs growth can stably proliferate and have multi-directional differentiation into osteoblasts, adipocytes and nerve cell and so on. So it can be many of the seed cells for tissue engineering.

【Key Words】 Children; MSCs; Proliferation; multi-directional differentiation

骨髓间充质干细胞(MSCs)是骨髓中除造血干细胞以外的另一种干细胞类型,由于其取材方便,易于体外分离培养、扩增,且自体获取回输后不会发生免疫排斥反应,基因转染效率高,转染后表达稳定,因此骨髓MSCs被认为是组织工程和基因工程

的重要种子细胞^[1,2]。目前国内人骨髓间充质细胞多取材于成人细胞,关于小儿 MSCs 的研究较少,本研究拟分离培养小儿骨髓间充质细胞,并观察其生物学特性以及向成骨、成脂肪、成神经样分化的潜能。

材料和方法

一、主要仪器及试剂

主要试剂包括 DMEM 培养基(美国 Hyclone

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院小儿外科(武汉, 430030); 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科(武汉, 430030); 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(武汉, 430030)。通讯作者:邵景范, E-mail: shaojf65@yahoo.com.cn

公司), 优质胎牛血清(四季青公司), Sigma 公司提供的四甲基偶氮唑蓝(MTT), Amersco 公司提供的胰蛋白酶、二甲基亚砷(DMSO), 油红 O 粉末、 β -巯基乙醇(BME)、羟基丁酸苯甲醚(BHA)由同济医学院组胚教研室提供, 一抗 NSE、NF-200 由同济医学院病理教研室提供, 引物骨钙素(OC)及 PPAR γ -2 由上海英峻基因公司合成, RT 及 PCR 试剂盒由大连宝生物公司生产, 内参引物(GAPDH)由同济医院妇产科提供。

二、细胞取材与培养

骨髓间充质干细胞取自因髋关节发育不良行骨盆截骨术的患儿, 年龄 5~8 岁, 男 1 例, 女 2 例(均征得患者家属知情同意), 术中于髂嵴穿刺抽取骨髓 4~5 ml, 用 100 U/ml 肝素抗凝, Percoll 淋巴分离液密度梯度法分离 MSCs 细胞, 接种于 L-DMEM+10%胎牛血清+双抗(100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)中, 置 37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱原代培养, 定期换液传代, 反复贴壁进一步纯化。于倒置相差显微镜下观察细胞的形态学变化。

三、细胞增殖能力的检测以及生长曲线的绘制

取第 2 代细胞, 消化制备成细胞悬液, 按相同的细胞浓度接种于 7 个 96 孔板中, 每板细胞接种 4 孔, 每孔加入 200 μ L 细胞悬液, 置培养箱培养, 每 3 天换液 1 次。从第 2 天起, 连续 7 d, 每天在固定时间开始加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 混匀、孵育 4 h 后吸取培养液, 加入 150 μ L 的 DMSO, 室温振荡 10 min, 用酶标仪在 490 nm 处检测 4 个孔的吸光度值(OD), 结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 根据每日 MTT 的 OD 值描绘生长曲线。

四、细胞周期的检测

取第 3 代 MSCs, 以 $1 \times 10^5/2$ ml 的密度接种于六孔板, 待细胞贴壁融合约 90%时, 收集细胞, 吹打成细胞悬液, 以 1200 转/分的速度离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 洗涤, 80%冰乙醇固定。弃去固定液, 用预冷的 PBS 漂洗离心, 于 37℃下以 10 μ L 浓度为 10 mg/ml 的 RNaseA 处理, 加入荧光染料溴化丙锭(PI)溶液避光染色 30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期。

五、MSCs 向成骨细胞分化诱导

取第 3~5 代细胞, 用 0.25%胰酶消化, 吹打成细胞悬液, 以一定的密度接种于 6 孔板中, 待细胞融合覆盖培养板约 80%时, 将细胞分为两组, 诱导组加入含成骨细胞诱导剂(10 mmol/L 的 β -甘

油磷酸钠, 8~10 mmol/L 的地塞米松, 50 μ g/mL 的维生素 C)的培养基, 对照组加不含成骨细胞诱导液的培养基培养。每 3 天换液 1 次, 每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。继续培养 2 周后用 Gomori 钙钴法染色检测碱性磷酸酶(ALP), 3 周后收集细胞并裂解行 RT-PCR 检测骨钙素基因的表达(引物为: 正义链 5' ATGAGAGCCCTCA-CACTCCTC 3', 反义链 5' CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG 3', PCR 产物长度 303 bp, 退火温度 55℃), 4 周后行 Von Kossa 染色检测钙结节。

六、MSCs 向脂肪细胞分化诱导

细胞准备同上, 诱导组加入含成脂肪细胞诱导液(1 μ mol/L 的地塞米松, 0.5 mmol/L 的 IBMX, 10 mg/L 的胰岛素, 100 mmol/L 的吡啶酮辛)的高糖培养基, 对照组加入不含成脂肪细胞诱导液的低糖培养基培养, 继续培养 2 周后用油红 O 染色法检测细胞内脂肪油滴, 3 周后裂解细胞行 RT-PCR 检测 PPAR γ -2 的基因表达(引物为: 正义链 5' CATTCTGGCCCCACCAACTT 3', 反义链 5' CCTTGCATCCTTCACAAGCA 3', PCR 产物长度 372 bp, 退火温度为 55℃)。

七、MSCs 向神经细胞分化诱导

细胞准备同上, 诱导组加入含成 20%的胎牛血清(FBS)、3 mmol/L 的 β -巯基乙醇(BME)预诱导 24 h, PBS 洗涤 3 次, 再用含 20 g/L 的二甲基亚砷(DMSO)和 200 mmol/L 的羟基丁酸苯甲醚(BHA)培养基进行正式诱导, 对照组用正常的血清培养基培养。正式诱导 6 h 后, 收获细胞固定, 行甲苯胺蓝染色观察尼克氏体, 以及细胞免疫细胞化学染色检测神经元细胞特异性标志物 NSE、NF-200 表达情况。

结 果

一、MSCs 分离培养以及增殖的情况

原代 MSCs 呈圆形, 体积较大, 胞体透亮, 折光性强, 胞核呈卵圆形, 与周围一些血细胞互相混杂。MSCs 贴壁后 2~4 d, 形态渐为成纤维样的长梭形。第 3~4 天首次换液后即可见细胞迅速增殖, 呈克隆样生长, 经多次换液及 PBS 洗涤后, 造血细胞逐渐被清除。12~14 d 细胞融合达 80%, 细胞形态更趋于一致。传代后的 MSCs 生长速度增快, 7~10 d 可铺满培养瓶底, 旋涡状分布直至融和。取第 2 代细胞用 MTT 法检测细胞的增殖能力, 绘制生长曲线

(图 1)呈 S 形状,2~3 d 细胞进入指数生长期,6~7 d 后细胞进入生长平台期。

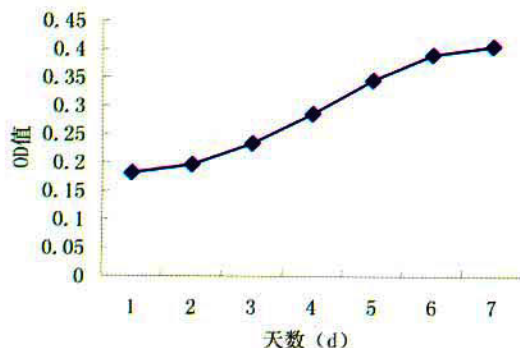


图 1 第二代小儿 HMSCs 生长曲线图

二、细胞周期的检测情况

用流式细胞仪测定小儿第三代 HMSC 的细胞周期,发现 $(89.35 \pm 0.92)\%$ 的细胞处于 G_0/G_1 期, $(4.85 \pm 0.46)\%$ 处于 S 期, $(5.80 \pm 1.31)\%$ G_2/M 期,增殖指数 $PI(S+G_2/M)$ 为 10.65 ± 0.92 。(图 2)。

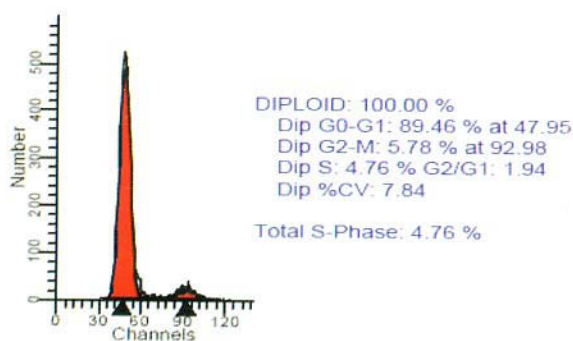


图 2 第三代小儿 HMSCs 细胞周期图

三、MSCs 经成骨诱导剂诱导后表现

MSCs 经成骨诱导第 3 天起,部分细胞由长梭形变为立体形,体积逐渐增大,进而变成多角形,随时间的延长,三角形或多角形的细胞比例逐渐增多,并呈现铺路石状复层生长,分泌较多结晶状颗粒。Gomori 钙钴法检测 ALP,可见细胞浆内有棕黑色颗粒沉淀,较对照组明显;RT-PCR 检测,诱导组骨钙素 mRNA 表达明显增强;Von Kossa 染色检测钙结节,可见诱导组细胞间有钙化结节存在(图 3)。

四、MSCs 经脂肪诱导剂诱导后表现

MSCs 经脂肪诱导剂诱导后,细胞形态渐变为圆形或类圆形,排列由漩涡状渐变为不规则,细胞增殖受到抑制,胞浆内出现细小脂滴,脂滴渐增大变透亮折光性强,胞核被挤到细胞一侧。诱导 2 周后,大部分细胞变为脂肪细胞样形态,油红 O 染色,能清楚地显示脂滴为红色。诱导 3 周后,RT-PCR 检测

PPAR γ -2 表达强烈,而对照组不表达(图 4)。

五、MSCs 经神经诱导剂诱导后表现



图 3 小儿 HMSCs 成骨诱导, A: HMSCs 诱导 2 周后, 钙钴法染色 ALP, 大体标本, 上排实验组, 下排对照组, 左孔没有复染, 中孔苏木精复染, 右孔伊红复染, 实验组孔颜色较对照组深。B~C 分别为 2 周后实验组以及对照组细胞 ALP 钙钴法染色图。D、E 图分别为 4 周后, 实验组钙结节染色, 对照组染色阴性图。F: 成骨诱导 3 周后的 HMSCs, RT-PCR 检测骨钙素 (条带: 实验组 OC, 实验组内参 GAPDH, 对照组 OC, 对照组内参 GAPDH)。

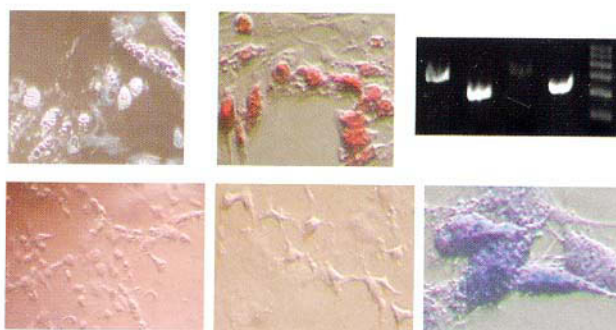


图 4 小儿 HMSCs 成脂肪诱导, A、B 分别为 HMSCs 经脂肪诱导 2 周, 实验组未染色及油红 O 染色图。C: 脂肪诱导 3 周后, RT-PCR 检测 PPAR (条带: 实验组 PPAR, 实验组内参 GAPDH, 对照组 PPAR, 对照组内参 GAPDH)。

MSCs 经神经向预诱导 24 h 后, 细胞形态发生皱缩, 边缘多个细长的突起。正式诱导后, 细胞进一步发生改变, 部分细胞呈圆锥形终端, 类似轴突结构, 正式诱导 6 h 后, 细胞形态趋向稳定。经 10% 甲醛固定后行甲苯胺蓝染色, 大部分细胞可观察到尼克氏体, 免疫细胞化学染色检测神经元细胞特异性标志物(NSE、NF-200)均呈阳性表达, 表现为胞浆不同程度弥漫性棕褐色颗粒。

讨 论

多向分化潜能被认为是 MSCs 最重要的生物学特征, 维生素 C 可以促进体外培养细胞合成胶原, 形成钙化, 能调节 ATP 及 ALP 活性和非胶原基

质蛋白的合成; β -甘油磷酸钠可以提供磷离子作为 ALP 的底物,促进生理性钙盐的沉积和钙化;地塞米松可以促进 MSCs 的 ALP 活性增强,促进其向成骨细胞分化,早期以促进基质合成为主,后期以促进钙化为主。ALP 是成骨细胞分化的早期标志酶,在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸;OC 是成骨细胞分化成熟的标志,主要维持骨的正常矿化速率,抑制异常羟基磷灰石结晶的形成,促进骨组织矿物质沉积的正常钙化。骨结节的形成则是成骨细胞体外成骨的重要标志,由基质堆积进而矿盐沉积并融合而成。本实验发现,小儿 MSCs 诱导 2 周后即出现 ALP 染色阳性,3 周后检测细胞骨钙素的基因明显增强,4 周后行 Von Kossa 染色检测出钙结节,说明小儿 MSCs 具有良好的向成骨细胞定向分化的能力,可以作为骨组织工程的种子细胞。

MSCs 诱导成脂肪细胞的具体机制尚不清楚,可能是几种诱导剂共同作用启动了与脂肪细胞定向诱导分化有关的基因表达^[3]。Hung SC 等^[4]用基因芯片等方法检测在 MSCs 分化为脂肪细胞过程中,发现有 88 个基因和 31 个基因表达分别增强了 5 倍及 2 倍以上。在脂肪细胞的分化调控中,核激素受体家族成员 PPAR γ -2、转录因子家族成员 C/EBP 以及脂肪决定分化因子 1 (ADD1-SRFT 3P) 起决定性作用。地塞米松通过激活核激素受体超家族成员糖皮质激素受体,诱导 C/EBP δ 的产生。同时降低脂肪细胞分化抑制因子 Preadipocyte factor-1(pref-1)的表达。IBMX 是磷酸二酯酶的特异性抑制剂,通过抑制 CAMP 的降解,而提高胞内 CAMP 的水平。CAMP 是一种十分重要的脂肪诱导剂,它可通过激活 CAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB) 来调控 C/EBP α 和 C/EBP β 表达,进而促进脂肪细胞的分化。胰岛素与 IGF-I 受体结合,也可通过激活 Akt、Ras、ERK₁/ERK₂ 等信号传导途径,以及降低核蛋白磷酸酶 PP2A 的活性来调节 CREB 的磷酸化和转录活性。CREB 的激活不仅可以促进 C/EBP 的表达,也能够增加 PPAR γ -2 的表达。油红 O 为特异性的脂质结合剂,本研究用其检测脂肪细胞,显示细胞含有丰富的脂肪颗粒;同时 RT-PCR 结果进一步证实了 MSCs 经脂肪诱导后出现脂肪特异性产物 PPAR γ -2 的表达。有学者^[5]研究发现,在适当诱导条件下 MSCs 可部分转化为脂肪细胞,另一部分转化为成骨细胞,两者分化存在一定的关系:分化

的脂肪细胞多,则成骨细胞少;分化的成骨细胞多,则脂肪细胞少,与诱导剂中地塞米松的浓度有重要关系。

最近研究表明, MSCs 不仅有向成骨细胞、成软骨、成脂肪细胞等中胚层细胞定向分化的能力,而且在特定的诱导条件下,还可向外胚层细胞分化。本研究参考 Woodbury 等^[6]的方法,先后应用 BME、DM-SO、BHA 等化学物质进行系列诱导,细胞表达了神经元细胞的标志物 NSE 和 NF-200,以及甲苯胺蓝染色显示尼克氏体,说明 MSCs 已成功的分化为神经元样细胞,具有了该细胞的抗原特性。

MSCs 具有高度的自我复制能力和多向分化潜能。然而,到目前为止,还没有发现其特异的细胞表面标志物,这为 MSCs 的鉴定带来极大的困难,国内外文献趋向于依靠 MSCs 的形态水平及多向分化特性,对 MSCs 进行逆向鉴定。本实验成功地诱导小儿 MSCs 分化为成骨细胞、脂肪细胞和神经细胞,也证明了分离所得到的细胞为小儿骨髓间充质干细胞,而非造血干细胞或其他细胞,从而为进一步研究小儿 MSCs 的其他生物学特性提供了鉴定依据。

参 考 文 献

- 1 Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization[J]. Handb Exp Pharmacol. 2006, (174):249-82.
- 2 Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, et al. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases [J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(12):1571-84.
- 3 Otto TC, Lane MD. Adipose development from stem cell to adipocyte[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2005, 40(4):229-42.
- 4 Hung SC, Chang CF, Ma HL, et al. Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells [J]. Gene, 2004, 340(1): 141-50.
- 5 黄定强, 杨大鉴, 黎万荣, 等. 骨髓间充质干细胞定向诱导条件下向脂肪细胞和成骨细胞诱导分化的关系[J], 中国临床康复杂志, 2006, 10(1): 31-33.
- 6 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. Neurosci Res, 2000, 61:364-370.

小儿骨髓间充质干细胞的培养及多向分化潜能的研究

作者: 黎润光, 邵景范, 魏明发, 杨小进, 柴成伟, 覃宇冰, 康慧聪, 赵东明, 杨勇
作者单位: 黎润光,邵景范,魏明发,杨小进,柴成伟,覃宇冰(华中科技大学同济医学院附属同济医院小儿外科,武汉,430030), 康慧聪(华中科技大学同济医学院附属同济医院神经内科,武汉,430030), 赵东明,杨勇(华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科,武汉,430030)
刊名: 临床小儿外科杂志 **ISTIC**
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2007, 6(2)
被引用次数: 5次

参考文献(6条)

1. Woodbury D;Schwarz E J;Prockop DJ Adult rat and human marrow stromal cells differentiate into neurons 2000
2. 黄定强;杨大鉴;黎万荣 骨髓间充质干细胞定向诱导条件下向脂肪细胞和成骨细胞诱导分化的关系[期刊论文]-中国临床康复杂志 2006(01)
3. Hung SC;Chang CF;Ma HL Gene expression profiles of early adipogenesis in human mesenchymal stem cells 2004(01)
4. Otto TC;Lane MD Adipose development:from stem cell to adipocyte 2005(04)
5. Reiser J;Zhang XY;Hemenway CS Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases 2005(12)
6. Beyer Nardi N;da Silva Meirelles L Mesenchymal stem cells:isolation,in vitro expansion and characterization 2006(174)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 邵景范.黎润光.魏明发.杨小进.柴成伟.覃宇冰.康慧聪.赵东明.杨勇.Shao Jing-fan.Li Run-guang.Wei Ming-fa.Yang Xiao-jin.Chai Cheng-wei.Qin Yu-bing.Kang Hui-cong.Zhao Dong-ming.Yang Yong 小儿骨髓间充质干细胞生物学特性及多向分化潜能-中国组织工程研究与临床康复2008, 12(12)

背景:国内报道人骨髓间充质干细胞多取材于成人细胞,小儿骨髓间充质干细胞的研究较少.目的:拟分离培养小儿的骨髓间充质干细胞,观察其生物学特性以及向成骨、成脂肪、成神经分化的潜能.设计:观察对比实验.单位:华中科技大学同济医学院.材料:实验于2006-03109在武汉同济医院骨科实验室完成,小儿骨髓间充质干细胞取自5~8岁因髋关节发育不良行骨盆截骨术的患儿,男1例,女2例,实验经过医院伦理委员会批准许可,并征得所有患儿家属知情同意.地塞米松、维生素C、 β -甘油磷酸钠、甲基异丁酸黄嘌呤、胰岛素、吡哆醚辛、羟甲基酸苯甲醚均为Sigma公司产品,二甲基亚砷为Amersco公司产品.方法:经Percoll梯度分离接种获得小儿骨髓间充质细胞,倒置相差显微镜下观察细胞形态、排列分布情况.分别采用成骨细胞诱导剂(β -甘油磷酸钠,地塞米松,维生素C)、成脂肪细胞诱导液(地塞米松,甲基异丁酸黄嘌呤,牛胰胰岛素,吡哆醚辛)及二甲基亚砷和羟甲基酸苯甲醚无血清培养诱导剂干预细胞向成骨、脂肪、神经细胞分化,经免疫组织化学染色、PCR、免疫细胞染色方法检测成骨标志物(碱性磷酸酶、骨钙素mRNA、钙结节)、脂肪标志物(脂肪、PPAR γ -2mRNA)、以及类神经标志物(尼克氏体、神经烯醇化酶、神经丝蛋白).主要观察指标:①d, JL骨髓间充质细胞形态以及增殖情况.②成骨、脂肪及类神经标志物检测结果.结果:①小儿骨髓间充质细胞贴壁容易,细胞细长梭形,增殖能力强,融合后呈旋涡状分布.②骨髓间充质细胞分别经各诱导剂诱导后,细胞形态均发生相应的变化,用化学染色、PCR、免疫细胞染色等方法检测成骨标志物、脂肪标志物及类神经标志物有明显阳性表达.结论:小儿骨髓间充质细胞生长具有稳定增殖、传代的能力,具有成骨、成脂肪、成神经等多方向的定向分化潜能.

2. 期刊论文 杜侃.栾佐.屈素清.刘卫鹏.汪兆艳.杨印祥.杨辉.DU Kan.LUAN Zuo.QU Su-qing.LIU Wei-peng.WANG Zhao-yan.YANG Yin-xiang.YANG Hui 骨髓间充质干细胞移植治疗小儿重度脑性瘫痪的疗效观察-临床儿科杂志2011, 29(1)

目的 观察自体骨髓间充质干细胞移植治疗重度脑性瘫痪儿童的临床疗效.方法 对50例重症脑性瘫痪患儿进行骨髓间充质干细胞移植,移植前、后6个月进行自身对照,比较患儿粗大运动和综合功能的进步程度,并随访移植后0、1、3、6、12个月患儿一般情况.结果 50例患儿自体骨髓间充质干细胞培养均成功.移植后6个月失访1例,至12个月失访4例,余46例完成观察.移植后6例患儿在术后3~5 d即出现显著临床改善,大部分患儿在移植后3个月左右运动能力进步,6个月之后进步幅度减缓.移植前6个月综合功能评估进步程度为(19.14 \pm 9.82)%,移植后6个月为(28.49 \pm 10.52)%,移植后进步显著大于移植前(P=0.001),其中以运动和认知改善明显.粗大运动功能评估总百分比从移植前的(23.80 \pm 10.64)%,上升到移植后(27.31 \pm 11.72)%,平均每月上升(1.05 \pm 0.49)%,显著大于移植前6个月进步幅度(P=0.001).结论 自体骨髓间充质干细胞移植对康复治疗效果不佳的重症脑瘫患儿有明显临床改善作用,能够有效促进患儿各功能区的发育.

3. 期刊论文 黎润光.邵景范.魏明发.洪振亚.谢柏臻.杨小进.张文.陈超.王子民.袁继炎.LI Run-guang.SHAO Jing-fan.WEI Ming-fa.HONG Zhen-ya.XIE Bo-zhen.YANG Xiao-jin.ZHANG Wen.CHEN Chao.WANG Zi-min.YUAN Ji-yan 体外小儿骨髓间充质干细胞对牵张应力早期应答反应的研究-中华小儿外科杂志2008, 29(5)

目的 观察体外小儿骨髓间充质干细胞(MSCs)对周期性牵张应力的早期应答反应.方法 分离并培养小儿MSCs,利用体外细胞牵张应力装置对第三~六代细胞加载短期力学信号,检测各组细胞内Oa2+以及早期反应基因蛋白(c-fos、c-jun和c-myc)的表达情况.结果 应力干预MSCs后,细胞内Ca3+浓度在受力1min后即增高,荧光强度是对照组的164.63%,3、5min升高更明显,干预10 min后Ca2+浓度升高的幅度有下降趋势;c-fos、c-jun和c-myc基因蛋白在未受力组细胞内不表达或微量表达,加载力学信号后,表达发生了明显的变化,随着时间的延长,均表现为增强-持续-回复原来水平.结论 周期性牵张应力影响MSCs内Ca2+的浓度及早期反应基因蛋白(c-fos、c-jun和c-myc)的表达,推测c-fos、c-jun和c-myc参与了MSCs响应力学的信号传导途径,可能依赖Ca2+通道的活化来调控.

4. 期刊论文 王子民.邵景范.黎润光.魏明发.杨小进.陈超.王小林.柴成伟 牵张应力对小儿体外骨髓间充质干细胞内钙离子的影响-临床小儿外科杂志2007, 6(6)

目的 观察牵张应力对小儿体外骨髓间充质细胞(HMSCs)内钙离子的影响.方法 分离并培养小儿骨髓间充质干细胞,利用体外装置对第3~6代细胞加载牵张应力,在细胞受力前加入钙离子拮抗剂(维拉帕米,20 μ mol/L)预处理30min,用fluo-4/AM荧光标记,检测不同时间刺激后细胞内游离钙离子的荧光值.结果 应力干预MSCs后,受力1min组细胞内钙离子浓度即升高,荧光强度是对照组的164.63%,干预3min组、5min组升高更明显,干预10min组钙离子升高幅度有下降趋势;应力干预前加入钙离子拮抗剂维拉帕米进行预处理,各组细胞内钙离子升高程度减轻.结论 MSCs受牵张应力刺激后,细胞内钙离子浓度发生明显变化,维拉帕米起部分阻断作用.

5. 期刊论文 黎润光.邵景范.魏明发.洪振亚.杨勇.杨小进.周学峰.陈超.冯杰雄.袁继炎.LI Run-guang.SHAO Jing-fan.WEI Ming-fa.HONG Zhen-ya.YANG Yong.yANG Xiao-jin.ZHOU Xue-feng.CHEN Chao.FENG Jie-xiong.YUAN Ji-yan 牵张应力对小儿体外骨髓间充质干

细胞向成骨、成脂肪分化的相关性研究-中华小儿外科杂志2009, 30(2)

目的 探讨周期性机械应力对小儿骨髓间充质干细胞(MSCs)分化方向的影响.方法 利用自行建立的机械牵张应力装置,对体外MSCs加载力学信号,并复合成脂肪诱导剂,选用化学染色、RT-PCR、免疫组化、Western Blot的方法检测MSCs干预后成骨指标(OC、BMP-2、I型胶原)和成脂肪分化的指标(PPART-2、脂肪).结果 MSCs受力后,细胞OC mRNA表达较对照组明显增高,而且与干预时间相关;干预7 d后,细胞内BMP-2、I型胶原蛋白表达较对照组明显增强;MSCs在成脂肪诱导过程中,接受应力后细胞脂肪的出现和PPAR γ -2 mRNA的表达均明显下降.结

论 适当的应力促进MSCs向成骨方向分化,抑制其向脂肪方向分化.

6. 学位论文 [王昭霞 急性淋巴细胞白血病儿童骨髓间充质干细胞对K562和K562/AO₂细胞株药物耐受性的影响](#) 2009

白血病(leukemia)是造血系统的恶性疾病,是小儿恶性肿瘤中发病率最高的一种,亦是儿童时期的主要死亡原因之一。小儿白血病90%以上为急性白血病,其中急性淋巴细胞白血病(ALL)约占2/3。近20年来,小儿急性白血病的治疗有了很大进展,尤其是ALL,其5年无复发生存率(EFS)达到70%~80%。

目前为止,白血病主要的治疗方法是化疗。然而部分患者在初始治疗便对化疗药物不敏感或经历了初始有效的治疗后仍将复发,其中最重要的原因就是白血病细胞对化疗药物产生了耐药性。化疗药物诱导的肿瘤细胞凋亡受阻常常是肿瘤细胞耐药的重要机制。耐药是成功治疗白血病的主要障碍,成为白血病治疗领域的难题。

以往对白血病的耐药研究一般关注于白血病细胞本身,近十年来越来越多的研究表明,白血病生存的微环境——骨髓造血微环境(HM)在白血病耐药中发挥了重要的作用,HM除了对正常造血有重要的调控作用外,对白血病细胞的生物学行为也有重要影响。现在推测,HM引起肿瘤耐药的主要途径为肿瘤细胞直接粘附导致的耐药(CAM-DR)和可溶性细胞因子介导的耐药、抗凋亡引起的耐药(SM-DR)。HM除了主要由骨髓基质细胞、细胞外基质和细胞因子组成外,HM中还含有少量的骨髓间充质干细胞(MSCs),MSCs为骨髓基质细胞的前体细胞,是骨髓中除了造血干细胞以外的一类干细胞。MSCs特征性表达CD29、CD44、CD73、CD105、CD166和HLA-A/B/C。在体外特异的培养条件下具有多向分化的潜能,并产生多种调节造血的细胞因子和生长因子,如IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、M-CSF等,虽然MSCs在骨髓中含量不多(占1/万~0.1/万),但近年来研究发现它对造血起重要的调控作用。

正常MSCs在机体正常造血发生过程中起重要作用,通过分泌可溶性细胞因子、细胞表面粘附分子、直接粘附等影响造血干细胞的增殖、分化、生存。研究结果提示, MSCs参与了白血病的发生、发展过程,并与白血病的耐药、抗凋亡等特性有关;同时对B淋巴细胞祖细胞和B淋巴细胞白血病的增殖、分化、生存均有重要影响。在对髓系白血病的研究中发现,正常人MSCs降低白血病细胞对化疗药物的敏感性,从而发挥其对白血病细胞的保护作用。基于MSCs能使白血病细胞免于药物诱导的凋亡,学者们称骨髓基质微环境为白血病细胞逃避常规化疗的“避风港”。但目前大多数研究集中在正常MSCs和已建系的基质细胞,而对于发生造血实质细胞恶性克隆变白血病患儿的MSCs研究尚无。

造血微环境抑制药物诱导白血病细胞凋亡的作用虽然得到肯定,但其相互作用,环节众多,错综复杂,难以彻底、系统的阐明参与其中的各种成分的具体作用及他们之间相互影响的细节。而在儿童急性淋巴细胞白血病中,患儿MSCs与白血病细胞之间相互作用在白血病细胞获得耐药、抗凋亡特性的过程的机制,尚待深入研究。因此,应用一种新的研究方法探索其机制,将推动此领域的深入研究,将有助于阐明ALL患儿MSCs保护白血病细胞获得耐药和抗凋亡特性的作用机制。

研究目的:

1. 探讨ALL儿童MSCs体外分离、扩增的方法。
2. 研究ALL儿童MSCs对白血病细胞株K562及耐阿霉素的K562细胞——K562/AO2增殖的影响,明确MSCs调控白血病增殖的特点。
3. 分析与MSCs粘附的白血病细胞对化疗药物敏感性变化及探讨其调控机制,为进一步研究白血病耐药提供实验依据,为临床提供帮助。

研究内容:

1. ALL儿童MSCs的体外分离、培养及鉴定。
2. MSCs与白血病细胞株K562、K562/AO2粘附共培养对白血病细胞增殖的影响。
3. 与MSCs粘附共培养的白血病细胞对化疗药物敏感性变化的研究。
4. MSCs诱导K562、K562/AO2细胞药物敏感性变化机制的研究。

研究方法:

- 1、ALL儿童骨髓2~5ml,分离、扩增、鉴定,以获得足量的MSCs。
- 2、实验分4组:1组白血病细胞株K562细胞单独悬浮培养组;2组K562细胞与MSCs粘附共培养组;3组耐ADM型白血病细胞株K562/AO2细胞单独悬浮培养组;4组K562/AO2细胞与MSCs粘附共培养组。
- 3、4组细胞培养6天,计数各组白血病细胞的增殖情况。
- 4、流式细胞仪检测各组白血病细胞的细胞周期情况。
- 5、1、2组白血病细胞,3、4组白血病细胞分别加入不同浓度的ADM作用24h,流式细胞仪检测各组白血病细胞的早期凋亡率。
- 6、各组白血病细胞提取RNA,FQ-PCR检测mdr1基因及RT-PCR检测Bcl-1和Bax基因。

研究结果:

1. 建立了比较成熟的ALL儿童MSCs体外分离、扩增方法。
2. 粘附生长的白血病细胞增殖缓慢,没有明显的对数生长期。
3. 流式细胞仪测定细胞周期,与单独悬浮培养的K562细胞相比,与MSCs粘附共培养的K562细胞G0-G1期细胞比例显著增多,S期细胞比例减少,而G2-M期细胞差异无统计学意义;MSCs粘附共培养的K562/AO2细胞与单独悬浮培养的K562/AO2细胞相比,G0-G1期细胞比例显著增多,S期细胞比例减少,而G2-M期细胞差异无统计学意义。
4. 2组K562细胞加入同浓度ADM,2组K562/AO2细胞加入同浓度ADM作用24小时后,收集细胞测定的早期凋亡率显示,早期凋亡细胞单独悬浮培养的K562细胞早期凋亡率要显著高于粘附共培养的K562细胞;单独悬浮培养的K562/AO2细胞中早期凋亡率要显著高于粘附共培养的K562/AO2细胞。
5. 采用FQ-PCR技术,单独悬浮培养的K562细胞和粘附共培养的K562细胞mdr1基因的表达量都极低,两者比较mdr表达差异无统计学意义;单独悬浮培养的K562/AO2细胞和粘附共培养的K562/AO2细胞都有明显的mdr1基因的表达,但2组K562/AO2细胞mdr1表达差异无统计学意义。采用RT-PCR技术,粘附共培养的K562细胞检测Bcl-1-2基因相对表达要明显强于单独悬浮培养的K562细胞;而Bax基因的相对表达两组差异无统计学意义;粘附组K562细胞Bcl-1-2/Bax比值显著高于单独悬浮组;共培养的K562/AO2细胞检测Bcl-1-2基因相对表达要强于单独悬浮培养的K562/AO2细胞;而Bax基因的相对表达两组差异无统计学意义;粘附组K562/AO2细胞Bcl-1-2/Bax比值要显著高于单独悬浮组;K562/AO2细胞Bcl-1-2基因相对表达要强于K562细胞。

结论:

1. 与ALL儿童MSCs共培养的白血病细胞株K562和K562/AO2细胞对ADM的敏感性降低,凋亡率下降。
2. 与ALL儿童MSCs粘附共培养,可以阻滞白血病细胞株K562和K562/AO2细胞周期进程,使大部分细胞停留在G0-G1期。
3. 白血病细胞株K562和K562/AO2对ADM产生耐药性可能与粘附共培养后Bcl-1-2基因表达增强有关,与MSCs粘附培养并没有使白血病细胞多药耐药基因mdr1的表达量增加。

7. 期刊论文 [关亦兵, Guan YB 小儿脑损伤与干细胞移植治疗 -中国组织工程研究与临床康复](#) 2007, 11 (42)

学术背景:小儿脑损伤后多采用高压氧、神经营养药物、细胞因子、中药及针灸等方法来治疗,但对于已经完全损伤的神经细胞,治疗效果很差.近年来随着干细胞移植的研究不断深入,为治疗此类疾病带来了希望.目的:介绍干细胞的生物学特性及移植的研究现状,展望其在小儿脑损伤治疗领域潜在的发展方向.检索策略:由作者应用计算机检索Proquest和Elsevier数据1992-01/2007-04相关文献,检索词为“astemcells transplan”,限定语言种类为“English”;同时检索维普中文期刊数据库、万方数据库1992-01/2007-06相关文献,检索词为“干细胞移植”,限定语言种类为中文.纳入标准:内容与神经干细胞、间充质干细胞移植有关并发表早期权威杂志.排除标准:较陈旧及重复文献,与小儿脑损伤及干细胞移植无关的文献.文献评价:共收集到56篇相关文献,排除26篇,30篇文献符合标准,其中13篇是综述和述评类文献,其余17篇为基础研究,30篇中11篇介绍干细胞的基本生物学特性,4篇与干细胞移植途径相关,15篇关于干细胞移植与缺血缺血性脑损伤有关的文献.资料综合:①神经干细胞可分成内源性和外源性,利用两者的互动效应及神经干细胞多潜能分化的特点,神经干细胞移植可能作为挽救性治疗手段,修复与防治小儿脑损伤.②间充质干细胞一定条件下可分化出具有生理功能的神经细胞,异体移植无免疫排斥反应,可通过血脑屏障.目前对胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、脐血间充质干细胞移植研究较多.结论:干细胞移植已经在动物实验上取得了令人鼓舞的进展,但仍有一些问题需要解决.随着分子生物学、发育生物学、临床学科等学科的相互协作和研究方法的进一步完善,干细胞移植将对于小儿脑损伤的治疗具有重要意义.

8. 期刊论文 [范应中, 张震, 苟丽, 张谦, 张大, 王家祥, 杨贺军, 李沪平, 原艳丽, 李正伟, FAN Ying-zhong, ZHANG Zhen, GOU Li, ZHANG Qian, ZHANG Da, WANG Jia-xiang, YANG He-jun, LI Lu-ping, YUAN Yan-li, LI Zheng-wei 兔骨髓间充质干细胞构建异种组织工程化尿道修复兔](#)

[尿道缺损 -中华小儿外科杂志](#) 2010, 31 (10)

目的 探索兔骨髓间充质干细胞为种子细胞构建异种组织工程化尿道修复兔尿道缺损的可行性.方法 60只兔随机数字法均分为实验组、对照组,实验组用种植有自体骨髓间充质干细胞的脱细胞猪尿道基质修复长约2 cm兔尿道缺损,对照组用脱细胞猪尿道基质修复.两组术后2、4、8、24周切取再造尿道标本,行组织学检查,术后24周行尿动力学检查,比较差异.结果 实验组术后再造尿道腔面光滑,可见与正常尿道类似的组织结构,对照组血管和平滑肌形成较少,再造尿道腔面不如实验组光滑.实验组的术后最大尿道压(25±2)cmH2O与术前(24±3)cmH2O比较,差异无统计学意义(P>0.05),对照组的术后最大尿道压(30±2)cmH2O与术前(24±2)cmH2O比较,差异有统计学意义(P<0.05).结论 以兔骨髓间充质干细胞为种子细胞,脱细胞猪尿道基质为支架,构建组织工程化尿道,移植修复兔尿道缺损,可形成类似于正常尿道的组织结构.

9. 学位论文 [吴晓娟 骨髓间充质干细胞体外向肠神经元的诱导分化及其机制的初步探讨](#) 2009

先天性巨结肠(Hirschsprung's disease, HD)是小儿消化道常见畸形,发病率为1/2000~1/5000,其疾病的发生目前一致认为这是由于多种原因使胚胎期神经嵴细胞在消化道移行受阻,直肠、结肠甚至小肠肠壁神经节细胞缺失,病变肠管痉挛收缩,肠内容物排出受阻,近端肠管继发性扩张形成巨结肠。迄今,手术仍然是最有效的治疗手段,虽然,手术方式的不断改进,微创手术的日益进步,但术后并发症仍困扰着患者和医护人员。而近年来研究的热点之一细胞移植有望成为治疗HD又一有效并且安全的方法,本课题将研究如何获得具有功能的细胞进行移植。

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)在体外容易分离、培养及纯化,多向分化潜能是其最主要的生物学特征之一,现在关于BMSC向神经方向分化的研究报道较多,许多研究表明BMSC在体外一定条件下可分化为神经细胞,移植于损伤脑或脊髓治疗神经系统疾病,这为BMSC治疗肠神经系统疾病提供了理论依据,并避免了神经干细胞、胚胎干细胞移植来源不足及伦理问题。目前BMSC向神经细胞分化的具体机制尚不清楚,可能与诱导剂的共同作用启动了向神经细胞定向分化有关的基因表达或使其表达增强有关。较常见的是用β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol, BME)、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)及维甲酸等化学物质进行诱导,也有用某些生长因子进行诱导的。神经营养因子的作用也已受到重视,一方面,神经营养因子可在一定培养条件下诱导BMSC向神经细胞分化;另一方面,神经营养因子具有神经保护和促进神经突起生长的作用,缺乏神经营养因子的支持可能导致神经细胞的凋亡发生。

本实验先从探讨BMSC向神经细胞分化的条件,以及有关神经营养因子表达的变化,如胶质细胞源神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor, GDNF, RET(rearranged during transfection)等开始,初步探讨了其分化的机制,其结果发现碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及表皮生长因子

(epidermal growth factor, EGF)可促进BMSC向神经细胞分化,在向神经细胞分化的过程中,GDNF表达增强,并且RET基因也有表达,GDNF可能在BMSC向神经细胞分化过程中起到重要作用。在BMSC向肠神经元分化的可行性实验研究中,将GDNF作为诱导因子与胎肠培养基(fetal gut condition medium, FGCM)共同作用,诱导BMSC分化为肠神经元,诱导后的细胞,不仅表达神经元标志物神经特异性烯醇化酶(neural specific enolase, NSE)以及肠神经标志物一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, nNOS),而且还能分泌肠神经递质肠道血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP),说明体外分化的肠神经元不仅具备形态学上的特征,而且具有一定程度的功能。为了提高BMSC向肠神经元的分化率,本实验还进行了GDNF基因转入BMSC的研究,结果显示,体外可成功构建表达GDNF的转基因BMSC,在FGCM的诱导下可分化为具有肠神经元表型的细胞,并且诱导分化率高于外源性GDNF组。但关于诱导后的肠神经元是否具备正常肠神经元的功能,移植于无神经节段后能否改善肠段的功能,还有待下一步的在体实验进一步研究。

第一部分 大鼠骨髓间充质干细胞的分离、培养、纯化和鉴定

目的: 体外分离培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC),并进行纯化和鉴定。

方法: 收集Sprague-Dawley (SD)大鼠的股骨骨髓,用含10[%]胎牛血清的DMEM培养基直接种植于培养瓶,反复传代贴壁法纯化细胞,流式细胞仪检测CD90及CD45。

结果: BMSC能在体外贴壁生长,经过反复贴壁,BMSC可融合生长,高表达BMSC标志物CD90 (93.4[%]),不表达造血干细胞标志物CD45。

结论: 体外可成功培养BMSC,经过反复贴壁法可纯化BMSC,可获得高纯度的细胞。

第二部分 骨髓间充质干细胞体外向神经细胞的诱导分化

目的: 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)向神经分化的条件,了解神经细胞标志物的表达情况及胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的表达变化。

方法: 体外培养大鼠BMSC,至少传至第4代,进行诱导分化。以10ng/ml碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)或/和10ng/ml表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在含10[%]胎牛血清的DMEM中诱导,7d后观察细胞形态的变化,免疫组化检测胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)及神经特异性烯醇化酶(neural specific enolase, NSE)的情况。RT-PCR检测GDNF及其受体RET mRNA的变化。

结果: 诱导7天后,实验组均可见GFAP及NSE的表达,而对照组为阴性。各实验组比较,bFGF组及bFGF+EGF组表达的NSE高于EGF组,而EGF组表达GFAP更高。RT-PCR检测示,BMSC向神经细胞诱导后,GDNF表达显著增强,RET基因也开始表达,以bFGF+EGF组最明显。

结论: bFGF及EGF可促进BMSC向神经细胞分化。在向神经细胞分化的过程中,能促进GDNF表达的增强,以及RET基因的表达,GDNF可能在BMSC向神经细胞分化过程中起到重要作用。

第三部分 骨髓间充质干细胞体外两种方法向肠神经元诱导分化及比较

目的: 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)向肠神经分化的条件及可行性,并比较两种方法的分化效率。

方法: 体外培养大鼠BMSC,传至第4代后,进行诱导分化。第一种方法: 以10ng/ml胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)及10[%]胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的稀释胎肠培养基(fetal gut condition medium, FGCM)诱导7天,免疫组化的方法进行鉴定诱导细胞的神经特异性烯醇化酶(neural specific enolase, NSE)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)及神经元一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)的表达。第二种方法: 提取新生大鼠肠组织mRNA,用逆转录PCR方法扩增GDNF全长cDNA,构建其真核表达载体PIRES2-EGFP-GDNF,酶切及测序鉴定,然后转染原代培养的大鼠BMSC,荧光免疫细胞化学及细胞形态学检测GDNF 的表达,转染后的细胞在稀释的FGCM条件下诱导分化。同样的方法检测VIP, nNOS。

结果: BMSC诱导7天后,两组实验组均可见NSE、VIP及nNOS的表达,而对照组为阴性。表达GDNF的BMSC被诱导分化的肠神经元NSE阳性,VIP

及nNOS阳性率高于外源性GDNF诱导的细胞。

结论: GDNF联合FGCM可诱导BMSC分化为肠神经元。表达GDNF的BMSC分化为肠神经元的效率更高。

第四部分 骨髓间充质干细胞向肠神经元分化后神经营养因子表达的变化及其机制的初步探讨

目的: 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)向神经分化过程中胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)及其受体RET以及c-kit基因表达的变化,并对其机制进行初步探讨。

方法: 同样的方法诱导BMSC为肠神经元,免疫组化的方法进行鉴定诱导细胞的神经特异性烯醇化酶(neural specific enolase, NSE)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, nNOS)的表达。RT-PCR检测GDNF、RET及c-kit mRNA的变化,Western Blot方法检测GDNF蛋白的表达情况。

结果: BMSC向肠神经元诱导后,免疫组化染色NSE、VIP及nNOS阳性,RT-PCR结果显示,诱导前低表达GDNF以及不表达RET、C-kit,诱导后GDNF表达显著增强,RET、c-kit基因表达,而且GDNF在蛋白水平上也有表达。

结论: GDNF联合FGCM可诱导BMSC分化为肠神经元,诱导后的细胞表达肠神经元标志物,其GDNF、RET及c-kit基因表达增强;GDNF-RET信号通路在诱导分化过程中起重要作用,c-kit在BMSC向肠神经元分化过程中的某个阶段发挥其作用。

10. 期刊论文 [沈伟. 杨屹. 王常林. 孙荣国. 于雪馨. SHEN Wei. YANG Yi. WANG Chang-lin. SUN Rong-guo. YU Xue-xin 输尿管梗阻大鼠肾脏肝细胞生长因子基因修饰的骨髓间充质干细胞移植 -中华小儿外科杂志](#)2010, 31 (1)

目的 观察携带肝细胞生长因子(HGF)基因的大鼠骨髓间充质干细胞静脉移植是否能够迁移、分布到单侧输尿管梗阻大鼠肾脏.方法 体外分离培养雄性大鼠骨髓间充质干细胞,并转染腺病毒-HGF (Ad-HGF),采用ELISA方法检测转染后HGF的表达情况;建立16只雌性单侧输尿管梗阻大鼠动物模型,随机分为移植组 and 对照组,移植组经鼠尾静脉注入Ad-HGF转染的骨髓间充质干细胞,对照组注入等量生理盐水,于术后7 d、14d取双侧肾脏,制作石蜡切片,Y染色体原位杂交方法检测雌性受体大鼠.肾脏中是否有骨髓间充质干细胞分布及分布情况.结果 移植组术后7 d梗阻侧肾脏可见Y染色体性别决定基因(Sty)阳性细胞,14d Sry阳性细胞数明显减少(P<0.05),主要分布在肾小管上皮细胞区,肾小球区未见Sry阳性细胞,而梗阻对侧及对照组双侧肾脏未见Sry阳性细胞.结论 鼠尾静脉移植携带HGF基因的骨髓间充质干细胞能够定居于输尿管梗阻侧肾脏,并分布到肾小管上皮细胞区.

引证文献(5条)

1. [黎润光. 邵景范. 魏明发. 赵东明. 王钢. 陈滨. 任高宏 维拉帕米在应力对体外骨髓间充质干细胞早期反应基因蛋白表达中作用的研究\[期刊论文\]-中国矫形外科杂志](#) 2009 (8)
2. [黎润光. 邵景范. 魏明发. 熊洋莉. 宣晓琪. 吴晓娟. 杨小进. 赵东明. 杨勇 机械牵张应力对骨髓基质干细胞氧自由基系统的影响\[期刊论文\]-中华创伤骨科杂志](#) 2008 (1)
3. [黎润光. 邵景范. 魏明发. 洪振亚. 谢柏臻. 杨小进. 张文. 陈超. 王子民. 袁继炎 体外小儿骨髓间充质干细胞对牵张应力早期应答反应的研究\[期刊论文\]-中华小儿外科杂志](#) 2008 (5)
4. [段巧艳. 段祥. 梁希英. 张焕相 诱导分化过程中不同融合状态大鼠骨髓间充质干细胞成骨的差异\[期刊论文\]-中国组织工程研究与临床康复](#) 2008 (38)
5. [王子民. 邵景范. 黎润光. 魏明发. 杨小进. 陈超. 王小林. 柴成伟 牵张应力对小儿体外骨髓间充质干细胞内钙离子的影响\[期刊论文\]-临床小儿外科杂志](#) 2007 (6)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200702009.aspx

授权使用: 黔南民族师范学院(gnnzsfxy), 授权号: 3a95fb76-7149-4138-ac17-9ed40110b9f9

下载时间: 2011年4月29日