

人前脑啡肽基因修饰骨髓间充质干细胞系的生物学特性

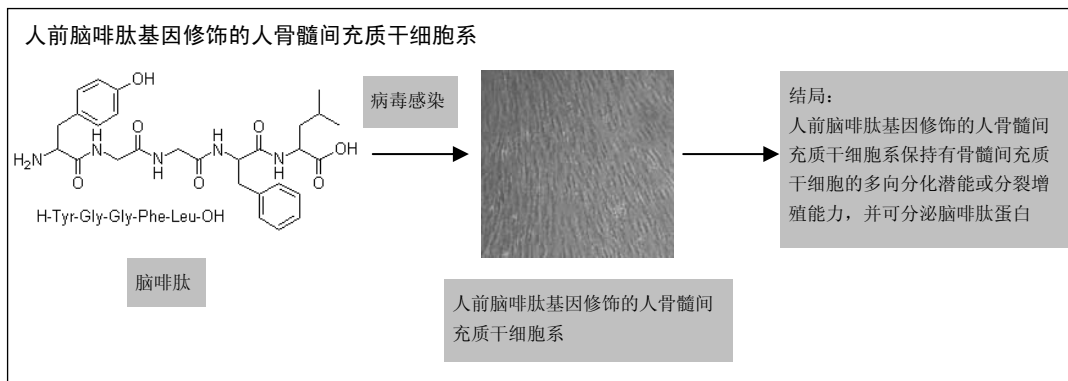
李新茂(南阳医学高等专科学校第一附属医院麻醉科, 河南省南阳市 473000)

引用本文: 李新茂. 人前脑啡肽基因修饰骨髓间充质干细胞系的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2741-2747.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.001

ORCID: 0000-0001-9444-2202(李新茂)

文章快速阅读:



李新茂, 男, 1975年生, 汉族, 河南省南阳市人, 2004年郑州大学毕业, 硕士, 主要从事临床麻醉工作。

通讯作者: 李新茂, 南阳医学高等专科学校第一附属医院麻醉科, 河南省南阳市 473000

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)19-02741-07

稿件接受: 2016-03-21

<http://www.crter.org>

文题释义:

脑啡肽: 属于内源性的阿片肽类的镇痛物质, 最早在猪大脑中发现, 脑啡肽由前脑啡肽原经酶切加工出亮氨酸脑啡肽和蛋氨酸脑啡肽, 两者通过与相应受体结合发挥镇痛作用。

细胞镇痛: 指移植体外培养的细胞株或者自体细胞至中枢神经系统疼痛调节部位, 使其持续分泌信号传导因子、镇痛蛋白等增加镇痛蛋白表达, 从而发挥镇痛作用。

摘要

背景: 有研究发现修饰的细胞株移植能够有镇痛效果, 但人前脑啡肽基因修饰骨髓间充质干细胞系的生物学特性的研究较少。

目的: 观察人前脑啡肽基因修饰骨髓间充质干细胞的生物学特性。

方法: 分离培养骨髓间充质干细胞, 建立人前脑啡肽基因修饰的人骨髓间充质干细胞系。

结果与结论: ①锥虫蓝染色: 冻存复苏后的 P4 代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE 和人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞活力差异无显著性意义($P > 0.05$); ②流式细胞仪检测: P4 代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE 和人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞的 CD29 和 CD44 的表达均呈阳性, CD34 和 CD45 的表达均呈阴性; ③成脂和成骨诱导: P4 代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE 和人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞之间脂肪细胞占总细胞的比例比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 成骨诱导分化后, 茜素红染色可见红色钙沉积; ④PCR 检测: 人前脑啡肽基因在 P4 代骨髓间充质干细胞-pBABE 细胞中高表达, 在 P4 代人骨髓间充质干细胞中低表达; ⑤免疫荧光染色: 转染重组质粒 pBABE-人前脑啡肽的人骨髓间充质干细胞中可见脑啡肽蛋白表达; ⑥结果表明, 人前脑啡肽基因修饰的人骨髓间充质干细胞系保持了骨髓间充质干细胞的多向分化潜能或分裂增殖能力, 并可分泌脑啡肽蛋白。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 脑啡肽; 疼痛; 基因; 镇痛; 骨髓间充质干细胞; 反转录; 病毒; 生物学特性

主题词:

干细胞; 组织工程; 脑啡肽类

Human proenkephalin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell line: its biological characteristics

Li Xin-mao (Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical University, Nanyang 473000, Henan Province, China)

Li Xin-mao, Master,
Department of
Anesthesiology, the First
Affiliated Hospital of
Nanyang Medical College,
Nanyang 473000, Henan
Province, China

Corresponding author: Li
Xin-mao, Department of
Anesthesiology, the First
Affiliated Hospital of
Nanyang Medical College,
Nanyang 473000, Henan
Province, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that the transplantation of modified cell lines exhibit analgesic effect. But little is reported on the biological characteristics of human preproenkephalin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell lines.

OBJECTIVE: To observe the biological characteristics of human preproenkephalin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured to establish human preproenkephalin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell lines.

RESULTS AND CONCLUSION: After freezing-thawing, passage 4 human bone marrow mesenchymal stem cells, human bone marrow mesenchymal stem cells-pBABE and human bone marrow mesenchymal stem cells-human preproenkephalin exhibited no significant changes in the cell viability ($P > 0.05$), as well as in the fat cell proportion after adipogenic induction ($P > 0.05$). Moreover, red calcium deposition was presented in all these cells by alizarin red staining after osteogenic induction. Flow cytometry results showed that passage 4 human bone marrow mesenchymal stem cells, human bone marrow mesenchymal stem cells-pBABE and human bone marrow mesenchymal stem cells-human preproenkephalin could express CD29 and CD44, but not express CD34 and CD45. Human preproenkephalin genes were highly expressed in human bone marrow mesenchymal stem cells-pBABE, but lowly expressed in passage 4 human bone marrow mesenchymal stem cells. Additionally, recombinant plasmid pBABE-preproenkephalin-modified human bone marrow mesenchymal stem cells could express enkephalin protein. In conclusion, human preproenkephalin gene-modified human bone marrow mesenchymal stem cell lines can maintain the pluripotent differentiation or proliferation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells, and secrete enkephalin protein.

Subject headings: Stem Cells; Tissue Engineering; Enkephalins

Cite this article: Li XM. Human preproenkephalin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell line: its biological characteristics. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2741-2747.

0 引言 Introduction

疼痛是目前医学尚未解决的问题,对人类的生活质量造成严重影响,目前临床的镇痛药物治疗效果不满意,生物镇痛能够模拟人体自身的生理分泌特点,具有显著优势,在未来的镇痛治疗中有重要意义,其中转基因细胞移植镇痛是发展潜力最大的镇痛研究方向。脑啡肽属于内源性的阿片肽类的镇痛物质,最早在猪大脑中发现,脑啡肽由前脑啡肽原经酶切加工出亮氨酸脑啡肽(LEK)和蛋氨酸脑啡肽(MEK),两者通过与相应受体结合发挥镇痛作用。20世纪80年代兴起了细胞镇痛,细胞镇痛指移植体外培养的细胞株或者自体细胞至中枢神经系统疼痛调节部位,使其持续分泌信号转导因子、镇痛蛋白等增加镇痛蛋白表达,从而发挥镇痛作用^[1-2]。安珂等^[3]实验发现人前脑啡肽原修饰的永生化大星形胶质细胞株移植能够成为“细胞微泵”,使其持续分泌和表达脑啡肽,达到镇痛的效果;刘惠宁等^[4]发现单纯疱疹病毒I型扩增子载体介导人前脑啡肽原表达,可以缓解炎性疼痛;国外也有研究通过异体肾上腺髓质移植治疗晚期癌性疼痛^[5]。

实验通过构建人前脑啡肽基因修饰的骨髓间充质干细胞系,并对其生物学特性进行研究,为基因移植治疗疼痛提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2011年3月至2013年4月在河南省南阳医学高等专科学校第一附属医院实验室完成。

1.3 材料 人骨髓标本来自河南省南阳医学高等专科学校第一附属医院,经患者同意并签订知情同意书的骨折切开修复的患者。

1.4 实验方法

1.4.1 人骨髓间充质干细胞的原代培养 将3 mL骨髓液置于含胎牛血清的 α -MEM培养液(Invitrogen公司)中在37 °C的条件下培养,72 h进行首次换液,以后每隔3 d进行1次换液。待细胞生长至90%以上融合时用胰酶进行消化, α -MEM培养液终止消化,离心,弃去上清液, α -MEM培养液重悬,重悬后细胞接种于培养瓶中(浓度为 1×10^6 个/cm),培养瓶中加入胎牛血清,每隔2 d进行1次换液,5 d进行传代,并在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.4.2 人骨髓间充质干细胞向脂肪细胞诱导分化 将100 mL含胎牛血清的 α -MEM培养液中加入地塞米松、胰岛素、IBMX和吡啶美辛制备诱导剂,滤膜过滤后保存备用。将生长良好的P4代细胞用胰蛋白酶进行消化,加入6孔板中爬片,细胞贴壁后,除去培养液,加入含

有诱导剂的培养液培养, 每隔3 d进行1次换液, 15 d后进行油红染色: 爬片细胞用PBS洗涤, 钙-甲醛进行固定, PBS洗涤, 油红进行染色, 加入异丙醇5 min, PBS洗涤, 苏木精染色, 水溶性封固胶封固。将未加入诱导剂的细胞作为对照组在显微镜下进行观察拍照。

1.4.3 人骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化 将100 mL含胎牛血清的 α -MEM培养液中加入地塞米松、维生素C、 β -甘油磷酸钠制备诱导剂, 滤膜过滤后保存备用。将生长良好的P4代细胞用胰蛋白酶进行消化, 在6孔板中爬片培养, 细胞贴壁后, 换成含有诱导剂的培养液继续培养, 每隔3 d进行1次换液, 培养至20 d时进行茜素红染色: 将培养细胞用PBS液洗涤, 乙醇固定, 蒸馏水洗涤, 加入茜素红-Tris-HCl液37 °C培养, 水溶性封固胶封固。将没有加入诱导剂的细胞作为对照组在显微镜下进行观察拍照。

1.4.4 细胞包装 将对数生长的PHOENIX-293T包装细胞(河南省南阳医学高等专科学校)接种到6孔板中培养, 每孔 1×10^4 个细胞, 使细胞达孔底面积的65%。在试管中配制DNA-脂质体Lipofactamine™ 2000复合物: 将质粒DNA(pBABE-人前脑啡肽和pBABE puro only) 4 μ g+Opti-MEM培养基250 μ L混合孵育5 min, 再将Lipofactamine™ 2000脂质体10 μ L和Opti-MEM培养基250 μ L混合置5 min, 将两种溶液混合置25 min, 加入DMEM/F-12无血清培养基500 μ L混合。用无血清DMEM/F-12培养基洗涤细胞, 在每个细胞培养孔中加入上述制成的溶液, 37 °C条件下培养, 约5 h换成正常生长培养基培养, 细胞生长至90%以上融合时进行传代培养, 同时设立对照组, 对照组中不加入质粒DNA。培养48 h后, 换成含有嘌呤霉素的选择培养基进行扩增培养, 生成hMSCs-PEN细胞系, 转染7 d后, pBABE-人前脑啡肽组细胞和pBABE puro only组细胞部分存活, 部分死亡, 对照组细胞都没有存活, 对没有死亡的细胞进行克隆, 传代培养。

1.4.5 分离单细胞克隆并培养 取pBABE-人前脑啡肽组和pBABE puro only组对数生长的细胞, 用胰蛋白酶消化后吹打成单个细胞悬液, 取少量细胞悬液进行锥虫蓝染色, 计数存活细胞, 然后将细胞稀释成5, 10, 50×10^3 L⁻¹的细胞悬液, 分别接种到96孔培养板中, 每个孔中加入含有嘌呤霉素的选择培养基进行培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 培养至5 d, 培养孔中出现大的克隆, 待生长至孔底面积的1/3-1/2时进行消化, 接种到24孔板中继续培养, 得到P293T-人前脑啡肽和

P293T-pBABE单克隆细胞。

1.4.6 建立人前脑啡肽基因修饰的人骨髓间充质干细胞系 取上述生长良好的稳定转染的P293T-人前脑啡肽组和P293T-pBABE组细胞, 以 5×10^5 /cm的密度接种于培养瓶中, 当细胞生长至达瓶底80%时, 用PBS洗涤, 加入含胎牛血清的 α -MEM培养液培养24 h, 收集病毒上清液, 用于感染细胞。将P3代生长良好的人骨髓间充质干细胞以 5×10^5 /cm的密度接种到6孔板中, 代细胞生长至达孔底约80%时, 加入上述病毒上清液感染人骨髓间充质干细胞, 将没有加入病毒上清液的人骨髓间充质干细胞作为对照组。感染48 h后, 用PBS洗涤, 用 α -MEM选择培养基培养, 约7 d时, 对照组所有细胞死亡, 转染病毒上清的人骨髓间充质干细胞部分存活, 约14 d出现阳性细胞集落, 嘌呤霉素扩增培养, 生成人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞系, 空载体组为人骨髓间充质干细胞-pBABE。取对数生长期的人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽和空载体组人骨髓间充质干细胞-pBABE转染细胞, 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 取少量悬液用锥虫蓝染色, 计算活细胞数量, 将细胞悬液在离心管中稀释成浓度5, 10, 50×10^3 L⁻¹, 将其分别接种到96孔培养板中, 加入含嘌呤霉素的选择培养基培养, 培养5 d右出现较大克隆, 待细胞生长达孔底1/3-1/2时进行消化, 然后接种到24孔培养板中继续扩大培养, 得到人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽人骨髓间充质干细胞-pBABE单克隆细胞。细胞浓度至80%融合时用胰酶消化, 加入含有胎牛血清的 α -MEM培养液终止消化, 离心, 弃去上清液, α -MEM培养液重悬细胞, 接种到培养瓶中培养, 2 d换液1次, 5 d开始传代培养, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。

细胞冻存: 选取对数生长的P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞和人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞, 制成单细胞悬液, 离心, 去上清液, 将冻存液加入离心管, 重悬细胞, 分装后常规冻存。

细胞复苏: 从液氮罐中取出冻存细胞, 37 °C水浴中解冻, 吸出细胞悬液, 置入离心管内, 加入培养液吹打悬浮, 离心, 弃去上清液, 加入含胎牛血清的培养液吹打, 分装至培养瓶中培养, 第2天进行换液。

1.4.7 锥虫蓝染色法检测细胞活力 将复苏后的细胞稀释成 1×10^9 L⁻¹, 进行锥虫蓝染色, 显微镜下计数活细胞和死亡细胞的数量, 镜下活细胞没有染色, 死亡细胞被染成淡蓝色。计算细胞存活率, 活细胞率=[活细胞总数/(活细胞总数+死亡细胞总数)] \times 100%。

1.4.8 流式细胞仪检测 选取对数生长的P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞和人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞, PBS洗涤, 胰蛋白酶消化, 离心, 吹打沉淀细胞, PBS洗涤, 制成 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 浓度的细胞悬液, 加入EP管中, 然后加入CD29, CD34, CD44和CD45抗体孵育30 min, PBS洗涤, 离心, 制成细胞悬液, 用流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

1.4.9 转染前后对细胞进行成脂诱导和成骨诱导 选取对数生长的P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞和人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞, 按上述方法进行诱导和染色, 显微镜下观察。随机选取8个视野进行观察, 取平均值。计算脂肪细胞比值, 脂肪细胞比值=脂肪细胞总数/(脂肪细胞总数+非脂肪细胞总数)。

1.4.10 PCR检测人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞系的人前脑啡肽mRNA的表达 采用异硫氰酸肌苯酚法提取总RNA, 总RNA反转录, 合成cDNA: RNA, 加入 H_2O , 再加入退火混合物中进行水浴和变性, 得到cDNA溶液, 实时PCR扩增, Primer 5.0软件设计引物, 上游引物为5'-GCT GTC CAA ACC AGA GCT T-3', 下游引物为5'-CTT CTG GCT CCA TGG GAT A-3', PCR产物片段长度161 bp。将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外分析仪上进行观察并拍照, 如果出现电泳条带, 表示有人前脑啡肽阳性表达。

1.4.11 免疫荧光法检测人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞系脑啡肽的表达 将处于对数其生长的人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞和人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞接种于含有多聚赖氨酸预处理的盖玻片孔板中, 待细胞长满时取出盖玻片, PBS洗涤, 甲醇固定, PBS洗涤, Triton-X100破膜, PBS洗涤。加入一抗稀释液: 兔抗人亮氨酸脑啡肽抗体, 过夜孵育, PBS洗涤, 加入羊抗兔二抗稀释液孵育, PBS洗涤, 加入DAPI稀释液孵育, PBS洗涤, 水溶性封固胶封固, 荧光显微镜下观察拍照。

1.5 主要观察指标 各组细胞的成脂和成骨诱导情况, 人前脑啡肽基因的表达及脑啡肽蛋白的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0软件进行数据处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料先进行正态和方差齐性检验, 两组间数据差异的比较采用t检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析或双因素析因分析, 组间数据的两两比较采用LSD法分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 培养的人骨髓间充质干细胞的形态 骨髓间充质干细胞原代培养24 h时开始出现贴壁细胞, 贴壁细胞多呈多角形或者长梭形, 贴壁细胞增殖比较快, 培养至第10天细胞达到90%以上融合。传代培养24 h内出现完全贴壁, 约第5天完全融合(图1A)。

2.2 反转录病毒包装和克隆筛选情况 经过转染后的PHOENIX-293T细胞筛选后3周, 实验组细胞一部分死亡, 一部分存活(图1B), 对照组细胞均死亡。存活细胞继续生长为抗性细胞克隆, 克隆的周围细胞呈多边形, 呈放射状, 中心细胞呈圆形, 出现融合。单个细胞继续扩大培养, 细胞呈现多边形, 继续扩大培养, 得到P293T-pBABE和P293T-人前脑啡肽单克隆细胞。

2.3 病毒感染后的人骨髓间充质干细胞抗性细胞形态 病毒感染后的人骨髓间充质干细胞筛选3周后, 实验组细胞一部分死亡, 一部分出现抗性细胞克隆, 对照组的细胞均死亡。克隆细胞四周呈长梭形, 出现放射性分布, 中心细胞呈多角形, 有融合现象, 单细胞克隆扩大培养后, 细胞呈多边形(图1C), 继续扩大培养, 得到人骨髓间充质干细胞-pBABE和-人前脑啡肽单克隆细胞。

2.4 细胞的生物学特性 经过转染后人骨髓间充质干细胞-pBABE和-人前脑啡肽细胞系为多边形或者梭形, 旋涡状分布。传代至15代, 细胞的冻存和复苏对细胞的形态和增殖没有影响。锥虫蓝检查冻存复苏后的P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE和-人前脑啡肽细胞活细胞的比例分别为(91.45±4.78)%, (89.87±4.15)%, (90.65±3.21)%, 组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。表明冻存和复苏不影响转染后细胞的活力。

2.5 人骨髓间充质干细胞的鉴定结果 流式细胞仪检测显示: P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE和-人前脑啡肽细胞的CD29和CD44的表达均呈阳性, CD34和CD45的表达均呈阴性, 且各组之间比较差异无显著性意义($P > 0.05$; 表1)。

2.6 转染前后各种细胞的成脂诱导和成骨诱导情况 培养第3天可以看草细胞内出现脂滴, 呈圆形或者椭圆形, 油红染色后出现橙红色, P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE和人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞之间脂肪细胞占总细胞的比例为(79.33±4.43)%, (81.24±7.22)%, (80.87±4.23)%, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。成骨诱导分化后, 茜素红染色可见红色钙沉积, 对照组未见红色钙沉积(图2)。表明3种细胞在体外均可诱导分化为脂肪细胞和成骨细胞。

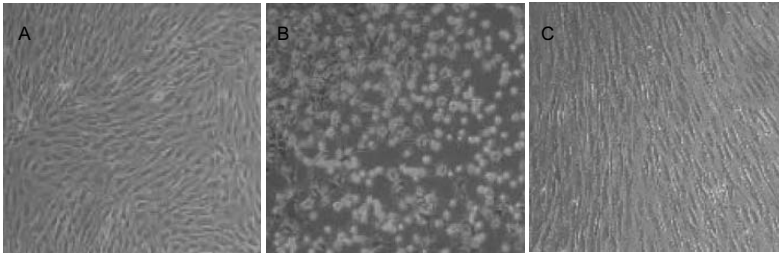


图1 感染前后的人骨髓间充质干细胞形态
Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells before and after transfection
图注: 图A为人骨髓间充质干细胞形态($\times 200$), 传代培养第5天人骨髓间充质干细胞达到完全融合, 贴壁细胞多呈多角形或者长梭形; B为PHOENIX-293T细胞($\times 100$), 筛选后5d, 部分细胞死亡; C为病毒感染后的人骨髓间充质干细胞形态($\times 100$), 细胞扩大培养后出现完全融合。

表1 各组人骨髓间充质干细胞表面标志物表达
($\bar{x} \pm s, n=5, \%$)

Table 1 Expressions of surface antigens in three kinds of bone marrow mesenchymal stem cells

表面标志物	P4代人骨髓间充质干细胞	人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞	人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞
CD29	100.32 \pm 2.15	101.87 \pm 2.76	100.45 \pm 2.43
CD34	0.34 \pm 0.11	0.45 \pm 0.32	0.59 \pm 0.42
CD44	96.98 \pm 1.23	97.01 \pm 1.79	95.41 \pm 2.02
CD45	1.99 \pm 0.45	1.67 \pm 0.42	1.84 \pm 0.51

表注: 各组人骨髓间充质干细胞表面标志表达均差异无显著性意义($P > 0.05$)。

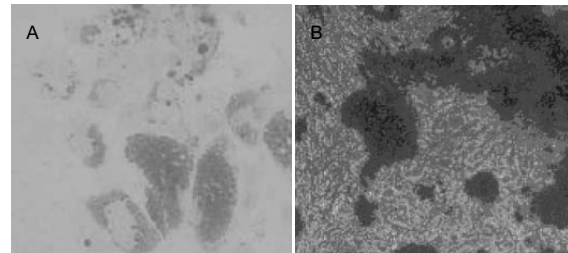


图2 人骨髓间充质干细胞向脂肪细胞和成骨细胞诱导分化($\times 400$)
Figure 2 Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiated into adipocytes and osteoblasts after adipogenic and osteogenic induction ($\times 400$)
图注: 图A为油红染色; B为茜素红染色。

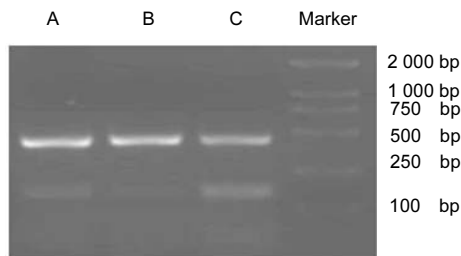


图3 PCR检测人前脑啡肽 mRNA 的表达
Figure 3 Expression of human preproenkephalin mRNA by PCR
图注: A为P4代人骨髓间充质干细胞; B为人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞; C为人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞。人前脑啡肽基因在人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞中高表达, 在P4代人骨髓间充质干细胞中低表达。

2.7 人骨髓间充质干细胞中人前脑啡肽基因的表达
PCR结果显示, P4代人骨髓间充质干细胞、人骨髓间充质干细胞-pBABE和人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞均有Homo-GAPDH mRNA表达, 3种细胞均可反转录出特异性161 bp基因条带(图3), 其中人前脑啡肽基因在人骨髓间充质干细胞-pBABE细胞中高表达, 在P4代人骨髓间充质干细胞中低表达。

2.8 人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞系脑啡肽表达
免疫荧光染色结果显示: 转染重组质粒pBABE-人前脑啡肽的人骨髓间充质干细胞中脑啡肽蛋白表达比较明显, 而空载体组人骨髓间充质干细胞中脑啡肽蛋白呈低表达(图4)。

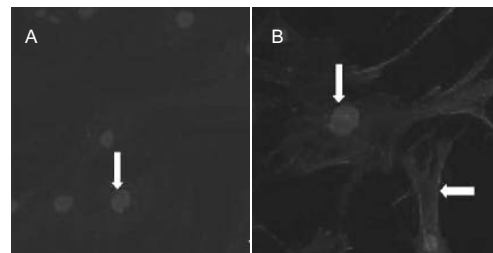


图4 人骨髓间充质干细胞-人前脑啡肽细胞系脑啡肽表达(免疫荧光染色, $\times 400$)
Figure 4 Expression of enkephalin protein in human bone marrow mesenchymal stem cells-human preproenkephalin (immunofluorescence staining, $\times 400$)
图注: 图A为空载体组; B为人前脑啡肽组。箭头所指代表细胞核。

3 讨论 Discussion

疼痛不仅对人们的生理和心理带来严重影响, 也严重影响生活质量, 尤其癌性疼痛占据了一大部分, 治疗主要以外源性的阿片类药物为主, 但外源性镇痛药物有不良反应大、成瘾性高等不少缺陷, 限制了其在临床的应用。随着医学的发展, 细胞镇痛在疼痛领域越来越受到重视, 嗜铬细胞和交感神经节细胞等植入椎管内能够持续分泌脑啡肽, 产生镇痛效果, 但这些细胞体外获得和培养比较困难, 临床应用受到限制。转基因细胞移植作为一种新的方法, 被广泛应用于各种疼痛的治疗中, 基因治疗包括下调疼痛基因和上调抗疼痛基因, 转基因移植治疗主要是通过上调抗痛基因的表达, 达到镇

痛的作用, 研究发现: 前垂体细胞 At T-20 细胞转染人前脑啡肽基因移植具有镇痛作用^[6]; 携带有人前脑啡肽原基因的慢病毒载体 PSB251(pLV-Ubc-人前脑啡肽原) 可以感染 HEK293 细胞^[7], MADB-106 大鼠乳腺癌细胞能够构建构建转移性骨癌疼痛模型^[8]。细胞移植镇痛治疗效果的好坏与移植细胞的选择有密切关系, 早期的嗜铬细胞等因细胞来源困难, 存活率低等缺点, 使其镇痛效果不稳定。转基因神经细胞及体细胞来源有限, 免疫排斥反应不可避免。干细胞具有增殖能力强, 可以多向分化, 在一定条件下可以分化为神经细胞, 使其在细胞移植镇痛中越来越受到重视。

骨髓间充质干细胞在 1867 年被首次提出^[9], 随后的研究发现骨髓间充质干细胞具有再生能力, 可以分化为其他谱系细胞^[10], 有研究发现骨髓间充质干细胞除了具有强大的多向分化和自我复制潜能外, 移植后基本不产生免疫抑制反应, 可移植性比较好^[11], 能够分泌生长因子促进局部损伤的修复^[12-15], 在临床被用于多种疾病的治疗研究^[16-18]。骨髓间充质干细胞的分离和培养方法简单^[19-21], 可通过流式细胞仪进行表面细胞标记的鉴定^[22-23]。骨髓间充质干细胞在体内基本不发生免疫排斥反应, 其机制可能为: 通过抑制细胞增殖发挥免疫抑制作用^[24], 也有研究认为骨髓间充质干细胞通过抑制 C3 活化作用降低免疫排斥反应^[25], 诱导 TREG 受体细胞的增殖和促进免疫耐受因子的表达抑制免疫反应^[26]。虽然目前对骨髓间充质干细胞的免疫排斥反应较弱的机制不是十分清楚, 但免疫反应弱的特点使其在临床具有广泛的应用。骨髓间充质干细胞在临床主要用于对肺部疾病^[27-28]、肝病^[29-30]、肾病^[31-33]、神经退行性疾病的治疗等方面^[34-38]。

因骨髓间充质干细胞是比较理想的移植细胞, 将构建的脑啡肽反转录病毒载体转染到人骨髓间充质干细胞构建表达脑啡肽蛋白的骨髓间充质干细胞体系为转基因细胞移植治疗疼痛提供了新的方法。实验发现人前脑啡肽基因修饰的人骨髓间充质干细胞系保持有骨髓间充质干细胞的多向分化潜能或分裂增殖能力, 能够分泌脑啡肽蛋白, 可能作为基因治疗的种子细胞用于疼痛的治疗。

作者贡献: 课题设计、实验实施及评估为第一作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验经患者和相关家属知情同意, 并签署知情同意书。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Yang XM, Liu J, Bi HS, et al. Study of analgesia following subarachnoid engraft with microencapsulated human chromaffin cells in rats. *Kongjun Yixue Zazhi*. 2004;(4):207-210.
- [2] 任同悦,任铁生.嗜铬细胞移植治疗慢性顽固性疼痛的研究进展[J].中国药物与临床,2004,4(1):57-58.
- [3] 安珂,田玉科,杨辉,等.鞘内移植人前脑啡肽原丛因修饰的永生化大鼠星形胶质细胞株对大鼠慢性神经痛的镇痛作用[J].中华医学杂志,2005,85(38):2711-2714.
- [4] 刘惠宁,周望远,杨勇,等.大鼠鞘内注射单纯疱疹病毒 I 型扩增子载体介导人前脑啡肽原基因的表达及对甲醛炎性痛的镇痛效应[J].中南大学学报,2006,31(5):742-746.
- [5] Eaton MJ, Santiago DI, Danseuse HA, et al. Lumbar transplants of immortalized serotonergic neurons alleviate chronic neuropathic pain. *Pain*. 1997; 72(1-2):59-69.
- [6] Wu HH, Wilcox GL, Mcloon SC. Implantation of At T-20 or genetically modified At T-20/h ENK cells in mouse spinal cord induced antinociception and opioid tolerance. *J Neurosci*. 1994;14(8):4806-4814.
- [7] 白凤,杨保仲,薛朝霞,等.人前脑啡肽基因修饰人胚胎肾细胞的构建[J].中华麻醉学,2012,32(6):673-675.
- [8] 李华艳,杨保仲,聂丽霞,等.应用MADB-106乳腺癌细胞构建大鼠转移性骨癌疼痛模型[J].肿瘤研究与临床,2011, 23(2):85-87.
- [9] Cohnheim J. Ueber entzündung und eiterung. *Vir Arch*. 1867;40(1):1-79.
- [10] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5): 267-274.
- [11] Yuehua J, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(1):41-49.
- [12] Mouiseddine M, Francois S, Semont A, et al. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *Br J Radiol*. 2007;80 spec No 1:S49-S55.

- [13] Chapel A, Bertho JM, Bensedhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003;5(12):1028-1038.
- [14] Shi M, Li J, Liao L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica.* 2007;92(7):897-904.
- [15] Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol.* 2006;34(8):967-975.
- [16] De Miguel MP, Fuentes-Julion S, Blazquez-Martinez A, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012;12(5):574-591.
- [17] Si Y, Zhao Y, Hao H, et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes.* 2012;61(6):1616-1625.
- [18] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience.* 2006;137(2):393-399.
- [19] 杨丽,张荣华,谢厚杰,等.建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(6):1064-1068.
- [20] Polissetti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol Indian.* 2010; 58(2): 201-208.
- [21] 李晓峰,赵劲民,苏伟,等.大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(10): 1721-1725.
- [22] 范萍,刘永琦,吴晓晶,等.不同条件下骨髓间充质干细胞分离培养及其生物学特性研究[J].细胞与分子免疫学杂志, 2010,(4):322-324.
- [23] 谢杏榕,李云静,李儒贵,等.胚胎肝细胞提取液体外诱导骨髓干细胞向肝系细胞分化的实验研究[J].现代预防医学, 2013,40(1):124-126.
- [24] Ramasamy R, Tong CK, Seow HF, et al. The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function. *Cell Immunol.* 2008,251(2):131-136.
- [25] Wang JW, Liu YB, Xu B, et al. The study on immunomodulation of donor mesenchymal stem cells on discordant liver xenotransplantation. *Zhonghua Waikexue Zazhi.* 2005;43(19):1254-1258.
- [26] 齐丙迪,孟宝玺,杨阳,等.第三方骨髓间充质干细胞诱导同种异体移植受体免疫耐受机制的研究[J].中华整形外科杂志,2011,27(3):207-212.
- [27] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiotensin 1. *PLoS Med.* 2007;4(9):e269.
- [28] 续玉林,李刚,吕小东,等.骨髓间充质干细胞移植调节TNF- α 和IL-10浓度减轻L-PS诱导的大鼠急性肺损伤[J].心肺血管病杂志,2012,31(3):324-327.
- [29] Parekkadan B, Van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One.* 2007;2(9):e941.
- [30] 周锐,周元平,郑玲,等.骨髓间充质干细胞移植对大鼠爆发性肝功能衰竭治疗作用的初步观察[J].中华传染病杂志, 2012,30(2):85-89.
- [31] Ito T, Suzuki A, Imai E, et al. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(12) 2625-2635.
- [32] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest.* 2003;112(1):42-49.
- [33] 董晨,杨焕丹,丰炳峰,等.骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠肾脏nephron表达的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(32):5897-5902.
- [34] Wu QI, Li YI, Feng ZT, et al. Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett.* 2007; 417(3):281-285.
- [35] 郭伟,杨景全,陈松芳,等.骨髓间充质干细胞移植对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的影响[J].温州医学院学报, 2008, 38(5):412.
- [36] Li LY, Li JT, Wu QY, et al. Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer disease. *J Mol Neurosci.* 2008; 34(2):157-163.
- [37] 陈丹丹,付文玉,庄宝祥,等.骨髓间充质干细胞黑质内移植对帕金森病大鼠的治疗作用[J].中国实验动物学报, 2013, (1):22-26.
- [38] 赵学俊.自体骨髓间充质干细胞移植在中枢神经系统疾病中的应用[J].中国实用神经疾病杂志,2012,15(8): 69-70.