

人脐间充质干细胞治疗子痫前期的可行性体外实验

史丽[#] 赵喜娃[#] 李青梅² 董晓静³ 尹洁¹ 王娟¹ 姜秉芬¹ (1. 河北医科大学第四医院 妇产科, 河北 石家庄 050011; 2. 邯郸市永年第一医院 妇产科; 3. 元氏县医院 妇产科, 河北 元氏 051130)

摘要:目的 探讨人脐间充质干细胞(UC-MSCs)治疗子痫前期的可行性。方法 1)应用 DMEM 培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),分4组(每组 $n=30$)干预:分别应用含 15% 健康孕妇血清、含 15% 子痫前期轻度患者血清、含 15% 子痫前期重度患者血清(24 h 尿蛋白 $>2 \sim <4$ g, 简称低蛋白组)及含 15% 子痫前期重度患者血清(24 h 尿蛋白 >4 g, 简称高蛋白组)在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,处理后应用 Transwell 技术建立内皮细胞通透模型并计算通透系数;2)分别取上述干预后 4 组细胞的上清液,处理后加入 Transwell 小室下室,将第 5 代人脐间充质干细胞以 1×10^5 /mL 接种到 Transwell 小室的上室,在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,于 200 倍镜下随机计数 6 个无重叠细胞视野的透膜细胞数,取其平均数代表该组细胞的侵袭能力。结果 1)4 组的通透系数 [Pa(%)] 分别为: 110.3 ± 2.92 、 120.7 ± 2.93 、 141.4 ± 1.81 、 169.8 ± 2.63 ($P < 0.05$)。2)4 组透膜细胞数分别为(个): 11.00 ± 2.71 、 24.10 ± 2.92 、 35.32 ± 6.03 、 47.00 ± 1.93 ($P < 0.05$)。结论 子痫前期患者血清对脐静脉内皮细胞有明显损伤,损伤的内皮细胞会对产生趋化作用,而这种趋化作用随着随损伤程度的加重而增强。UC-MSCs 移植有可能成为治疗子痫前期的方法之一。

关键词:子痫前期;趋化性;人脐静脉内皮细胞;脐带间充质干细胞

中图分类号:R457.7 R714.24⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2013)06-0517-04

Feasibility test of UC-MSCs transplantation in vitro for the treatment of preeclampsia SHI Li¹, ZHAO Xiwa¹, LI Qingmei², DONG Xiaojing³, YIN Jie¹, WANG Juan¹, JIANG Bingfen¹. Equally contributed author; SHI Li¹, ZHAO Xiwa¹.

1. The Fourth Clinical Medical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Handan Yongnian First Hospital; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, Yuanshi County Hospital

Abstract: Objective To study the feasibility of UC-MSCs transplantation in vitro for the treatment of preeclampsia.

#共同第 1 作者

效产生的人群遗传基础数据。

参 考 文 献

- [1] Rozman P. Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transpl Immunol*, 2002, 10(2-3): 165-181.
- [2] De La Vega Elena CD, Noguez N, Fernandez Montoya A, et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. *Transfus Med*, 2008, 18(2): 83-90.
- [3] 刘孟黎, 蒋冬玲, 张克忍, 等. 西藏部分藏族 HPA、HNA-1 血型抗原基因分型. *中国输血杂志*, 2003, 16(1): 32-33.
- [4] NIBSC. http://www.nibsc.org/science/diagnostics/transfusion_transplantation/platelets/resources/pcr-ssp_protocol.aspx
- [5] Feng ML, Liu DZ, Shen W, et al. Establishment of an HPA-1- to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med*, 2006, 16(5): 369-374.
- [6] Wu GG, Kaplan C, Curtis BR, et al. Report on the 14th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop. *Vox Sang*, 2010, 99(4): 375-381.
- [7] Wu GG, Tang QM, Shen WD, et al. DNA sequencing-based typing of HPA-1 to HPA-17w systems. *Int J Hematol*, 2008, 88(3): 268-271.
- [8] 周丹, 张印则, 庄乃保, 等. 2458 名中国汉族人类 HPA-1 ~ 6、15 基因多态性的研究. *中国输血杂志*, 2012, 25(4): 300-3.
- [9] Hauck-Dlimi B, Hammon K, Eckstein R, et al. Human platelet antigen genotypes in Turkish and Caucasian blood donors in Germany. *Tissue Antigens*, 2012, 80(3): 214-218.
- [10] 范佳鑫, 吐尔洪·克维尔, 左宏莉, 等. 新疆柯尔克孜族人群血小板抗原 1 ~ 6、15 系统基因多态性分析. *新疆医科大学学报*, 2011, 34(8): 820-827.
- [11] Brouk H, Halle L, Bertrand G, et al. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue Antigens*, 2010, 75(6): 673-678.
- [12] Seo DH, Park SS, Kim DW, et al. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med*, 1998, 8(2): 129-132.
- [13] Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens*, 2005, 65(3): 295-298.
- [14] Hato T, Minamoto Y, Fukuyama T, et al. Polymorphisms of HPA-1 through 6 on platelet membrane glycoprotein receptors are not a genetic risk factor for myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol*, 1997, 80(9): 1222-1224.

(2013-04-08 收稿, 06-21 修回)

本文编辑:蔡辉

Methods 1) Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were planted , then incubated by DMEM with different contents of serum, which was divided into 4 groups ($n=30$), that is 15% serum of healthy pregnant women, 15% serum of patients with mild preeclampsia, 15% serum of patients with severe preeclampsia (whose 24 h urine protein $>2 \sim <4$ g), and 15% serum of patients with severe preeclampsia (whose 24 h urine protein >4 g). Endothelial permeability was measured. 2) Collected the culture solution in a sterile EP of the above 4 groups, then added the solution into the lower chamber of Transwell. The upper chamber of Transwell was filled with the 5th passage of UC-MSCs (1×10^5 /mL). After 24 h of incubation in 5% CO_2 at $37^\circ C$, the extent of invasion was determined by counting the number of stained cells on the membranes in 6 randomly selected, non-overlapping fields at 200 magnification under a light microscope. **Results** 1) The permeability (Pa%) of 4 groups were 110.3 ± 2.92 , 120.7 ± 2.93 , 141.4 ± 1.81 and 169.8 ± 2.63 ($P < 0.05$). 2) The number of stained cells on the membranes of 4 groups were 11.00 ± 2.71 , 24.10 ± 2.92 , 35.32 ± 6.03 and 47.00 ± 1.93 ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum of patients with preeclampsia could induce a significant increase in the Endothelial permeability, the effect on HUVE cells could increase the chemotactic characteristic of UC-MSCS to vascular endothelial cells incubated. UC-MSCs transplantation could be a kind of treatment for preeclampsia.

Key words: preeclampsia; chemotaxis; human umbilical veins endothelial cell; human umbilical cord mesenchymal stem cells

子痫前期是发生于妊娠 20 周后全身多系统、多器官功能的紊乱, 临床主要表现为高血压、蛋白尿, 其病理变化为全身小动脉痉挛, 中心环节为内皮细胞 (endothelial cells, EC) 功能损伤。如何修复损伤的 EC 从而缓解临床症状成为近年来研究的焦点。研究显示, 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 有向 EC 分化的潜能, 而脐 MSCs (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 比成人骨髓来源的 MSCs 有更强的增殖能力和较弱的免疫调控能力, 所以 UC-MSCs 向 EC 分化的潜能及组织修复功能的研究逐渐展开并备受重视。已有研究证实 UC-MSCs 在趋化因子的作用下可向受损部位移动并修复损伤^[1]。因此子痫前期的血管 EC 损伤或可通过移植 UC-MSCs 而得到修复; 而该治疗方法是否可行关键在于 UC-MSCs 是否能达到损伤部位? 我们通过体外实验对这一疗法的可行性作了研究, 现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组 选择 2011 年 10 ~ 2012 年 12 月在河北医科大学第四医院产科住院的子痫前期患者 90 名, 按文献[2]标准将子痫前期分为子痫前期轻度组 ($n=30$): 血压 (BP) $\geq 18.62/11.97$ kPa, 24 h 尿蛋白 $0.3 \sim <2$ g; 子痫前期重度低蛋白组 (简称低蛋白组, $n=30$): BP $\geq 21.28/14.63$ kPa, 24 h 尿蛋白 $2 \sim <4$ g; 子痫前期重度高蛋白组 (简称高蛋白组, $n=30$): BP $\geq 21.28/14.63$ kPa, 24 h 尿蛋白 ≥ 4 g。同期设随机正常孕晚期孕妇对照组 ($n=30$)。正常组年龄 (29.8 ± 3.11) 岁, 孕周为 (35.6 ± 1.61) 周; 子痫前期轻度组年龄 (30.0 ± 2.22) 岁, 孕周为 (35.1 ± 2.62) 周; 低蛋白组年龄 (30.5 ± 1.92)

岁, 孕周为 (35.3 ± 2.73) 周; 高蛋白组年龄 (30.7 ± 1.63) 岁, 孕周为 (35.5 ± 2.51) 周, 各组年龄及孕周具可比性 ($P > 0.05$)。入选孕妇均知情同意。

1.2 血样采集 各组孕妇均空腹 >12 h, 于清晨采肘静脉血 3 mL 注入肝素抗凝离心管中, 在 <30 min, $4^\circ C$ 应用离心机 (52A, 北京白洋) 以 2385 g 离心力离心 15 min 后, 取上清置于无菌 EP 管中 $-20^\circ C$ 冰箱 (BCD-216F TB, 青岛海尔) 保存。

1.3 实验材料 人脐静脉 EC (human umbilical veins endothelial cell, HUVEC) (Lot: 03913291)、高糖 DMEM 培养基 (Lot: 1098827)、胎牛血清 FBS (Lot: 608759)、胰酶 (Lot: 01129) 等 (购自上海迪奥生物科技有限公司); UC-MSCs 1×10^6 个/ cm^2 (该公司馈赠)。Transwell 小室 (分别为滤膜直径 6.5 mm 和孔径 0.4 μm , 滤膜直径 6.5 mm 和孔径 8 μm , 美国 Corning Costar 公司产品)。

1.4 EC 通透模型的建立及通透系数 Pa (%) 的测定 将 HUVEC 复苏计数后按 2×10^6 个/mL 接种在含 20% 的 FBS 的高糖 DMEM 培养基 (4 mL 内含 100 U/mL 青霉素和 125 μg /mL 链霉素) 的培养瓶中, $37^\circ C$ 、5% CO_2 孵箱 (SHELDON TC-2323, 美国) 培养 24 h; 取第 3 ~ 5 代 HUVEC 调整细胞数量以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 分成 4 个干预组: 分别含 15% 健康孕妇血清、15% 子痫前期轻度患者血清、15% 低蛋白组患者血清及 15% 高蛋白组患者血清, 培养 24 h; 调整 HUVEC 个数, 以 1×10^5 个/ cm^2 用含 20% FBS 高糖 DMEM 培养基 100 μL 接种到 Transwell 上室 (滤膜直径 6.5 mm、孔径 0.4 μm), 待细胞融合成单层后, 上室中加入 100 μL (1 mg/mL) 异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白 (Lot: 980901 FITC-BSA, 北京博奥森) 下室加无血清培养基 600

μL , 37°C 、5% CO_2 培养 45 min; 从每个 Transwell 小室的上室和下室分别取样 100 μL , 用荧光酶标仪 (gene Biotek Synergy2, 美国) 测定荧光强度。计算公式: $\text{Pa} = [A]/t \times 1/A \times V/[L]$ {式中 $[A]$ 为下室荧光蛋白浓度 (以荧光强度代表), t 为时间 (s), A 是滤膜面积 (cm^2), V 为下室室液体量, $[L]$ 为上室荧光蛋白浓度}; $\text{Pa}(\%) = \text{Pa 试验}/\text{Pa 对照} \times 100^{[3]}$

1.5 UC-MSCs 趋化性试验 取第 3~5 代 HUVEC, 以 1×10^5 个/mL 接种于培养基为 2 mL (含血清) 的 6 孔板, 分成 4 个干预组: 分别用含 15% 健康孕妇血清、15% 子痫前期轻度患者血清、15% 低蛋白组患者血清和 15% 高蛋白组患者血清, 培养 24 h; 取各组上清液 600 μL 于无菌 EP 管中, 常温下以 2 385 g 离心 20 min 后加入 Transwell 小室的下室, 取第 5 代 UC-MSCs, 用含 5% FBS 的培养基调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 接种到预处理后的 Transwell 小室的上室 (滤膜直径 6.5 mm, 孔径 8 μm), 将 Transwell 小室置于 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后, 取出小室, PBS 冲洗 3 遍, 用 PBS 浸湿的棉签擦去上室内滤膜上面的细胞, 将小室浸泡在 4% 多聚甲醛中固定 20 min, 再用 PBS 冲洗 3 遍, 1% 结晶紫染色后于 200 倍镜下 (TE-2000, 日本 NIKON) 随机计数 6 个无重复细胞视野的细胞数, 取其平均数代表该组细胞的侵袭力。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 进行数据处理和统计学分析, 计量资料采用“均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$)”, 多组间比较采用完全随机设计的方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 子痫前期患者血清对脐静脉内皮细胞通透性影响 见表 1。

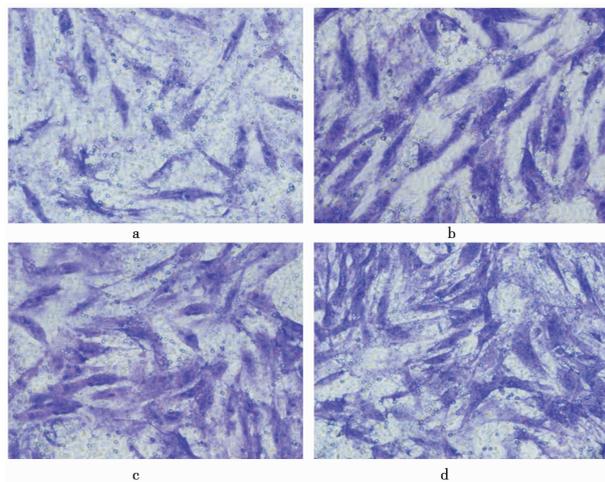
2.2 子痫前期患者血清作用于 HUVEC 诱导 UC-MSCs 透膜细胞数 见表 2, 图 1。

表 1 子痫前期患者血清及正常孕妇血清干预后脐静脉内皮细胞通透性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	$\bar{\text{Pa}}(\%)$	<i>F</i>	<i>P</i>
正常孕妇组	30	110.3 \pm 2.92	25.19	<0.01
轻度子痫前期组	30	120.7 \pm 2.93		
低蛋白组	30	141.4 \pm 1.81		
高蛋白组	30	169.8 \pm 2.63		

表 2 子痫前期患者血清及正常孕妇血清作用于 HUVEC 诱导 UC-MSCs 透膜细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

	<i>n</i>	UC-MSCs (个)	<i>F</i>	<i>P</i>
正常孕妇组	30	11.00 \pm 2.71	150	<0.01
轻度子痫前期组	30	24.10 \pm 2.92		
低蛋白组	30	35.32 \pm 6.03		
高蛋白组	30	47.00 \pm 1.93		



a 正常孕妇的透膜细胞; b 子痫前期轻度组透膜细胞; c 低蛋白组透膜细胞; d 高蛋白组透膜细胞

图 1 子痫前期患者血清及正常孕妇血清作用于 HUVEC 诱导 UC-MSCs 透膜细胞形态及数量

3 讨论

子痫前期是妊娠特有的多系统受累的疾病, 目前对其发病机制的认识和研究主要集中在 2 个阶段的功能失调: 首先, 由于孕早、中期子宫螺旋动脉重建受阻造成的胎盘低灌注引起胎盘缺血、缺氧导致胎盘产生一系列的细胞因子释放到血液循环; 进而这些进入母体血液循环中的各种细胞因子导致血管内皮细胞受损并应激性的提高血管压力, 最终导致子痫前期一系列临床症状的出现。因此, 血管内皮的完整性在维持机体正常生理功能中发挥着重要作用。Wang 等^[4]的研究发现, 子痫前期孕妇 EC 通透性较健康孕妇明显增高。本实验应用孕妇血清培养 HUVEC, 以 Transwell 小室建立了双室式单层细胞模型系统, 通过检测 HUVEC 通透性变化观察不同疾病程度对 HUVEC 损伤的情况, 在既往研究的基础上作了进一步考察: 随着疾病严重程度的加重, HUVEC 的通透系数 (Pa) 按正常孕妇 \rightarrow 子痫前期轻度患者 \rightarrow 子痫前期重度低蛋白患者 \rightarrow 子痫前期重度高蛋白患者依次增加 ($P < 0.05$) (表 1), 说明随着疾病的加重, HUVEC 损伤进一步加重。目前, 因 EC 通透性增高及功能失调所引起的子痫前期一系列症状临床尚无有效治疗方法。

UC-MSCs 因其具有免疫原性弱、可以归巢至受损组织 2 大特点近年来被广泛应用于修复医学和组织工程中, 进而对 UC-MSCs 向 EC 分化的研究亦日渐报道, 我们或可通过移植 UC-MSCs 来修复子痫前期疾病中损伤的 HUVEC, 来改善患者临床症状、延长孕周, 提高母儿生存率。而 UC-MSCs 治疗子痫前期的关键在于其能否向损伤的 EC 趋化。我们的体

外实验结果显示,经过正常孕妇、子痫前期轻度患者、子痫前期重度低蛋白患者及子痫前期重度高蛋白患者血清干预后的 HUVEC,在 Transwell 下室均观察到 UC-MSCs 穿透滤膜(表 2,图 1),证实 UC-MSCs 具有向 HUVEC 生长环境趋化的潜能,并且进一步说明,随着 EC 通透性增高、损伤加重,UC-MSCs 透膜细胞数增加、趋化性更强。结合既往的研究,我们认为 MSCs 可能通过以下趋化因子及途径实现向受损部位的归巢:1) 基质衍生因子-1(stromal cell derived factor-1 SDF-1)/CXCR4(cxc chemokine receptor 4)轴。SDF-1 是由骨髓基质产生只对 CXCR4 的配体做出移动反应的 1 种趋化因子。正常血管中无 SDF-1 表达,而血管损伤后平滑肌细胞则分泌 SDF-1,研究发现血浆 SDF-1 水平于血管损伤后 1 d 达高峰;Son 等^[5]发现培养维持到 15~18 代的骨髓 MSCs 表达 CXCR4,还有研究证实体外表达 CXCR4 的骨髓 MSCs 对 SDF-1 的浓度梯度有强烈的趋化作用^[6];在子痫前期的发病过程中,内皮细胞损伤是其核心机制,UC-MSCs 或可通过 SDF-1/CXCR4 轴向损伤的内皮迁移。2) HGF/c-met 轴。研究显示,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor HGF)和其高亲和受体 c-met 在心肌缺血再灌注损伤小鼠模型中表达明显增高^[7],Son 等^[5]发现骨髓 MSCs 表达 c-met 受体,因此可以认为 HGF/c-met 轴也参与骨髓 MSCs 定向迁移,HGF 诱导的化学趋化作用引导骨髓 MSCs 进入富含 HGF 的受损部位。3) 分形素(fractalkine CX3CL1)-CX3CR1(Fractalkine receptor CX3CL1)-CX3CR1(Fractalkine receptor CX3CL1)之间的相互作用,趋化因子 CX3CL1 为 1 种膜蛋白,CX3CR1 为其受体,近年来许多研究证实 CX3CL1 与 MSCs 的迁移有关^[8];而且 MSCs 存在 CX3CL1 的受体 CX3CR1,二者结合后能促进间质干细胞的体外迁移。Haese 等^[9]将人骨髓移植到大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型中,检测到 CX3CL1 的表达分布于缺血周围组织;而在子痫前期发病过程中,患者于孕早、中期就已发生因子宫螺旋动脉重建受阻造成胎盘低灌注引起胎盘缺血、缺氧导致胎盘产生一系列的细胞因子释放到血液循环,这些进入母体血液循环中的各种细胞因子导致血管 EC 受损引起全身各器官因缺血导致的功能受

损。因此,子痫前期可能通过 CX3CR1/CX3CL1 之间的相互作用使 MSCs 趋化至各受损部位。

综上所述,子痫前期患者血清对 HUVEC 有明显损伤,该损伤与疾病严重程度相关;而 UC-MSCs 对损伤的 HUVEC 具有趋化作用,这种趋化作用随着随损伤程度的加重而增强,UC-MSCs 可以通过多种趋化因子及途径实现向受损部位的归巢,移植 UC-MSCs 有可能成为治疗子痫前期的方法之一。但本研究仅为体外研究,还应进一步动物实验研究加以证实。

参 考 文 献

- [1] Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, et al. Inflammation and tumor micro-environments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*, 2008(10), 15: 730-738.
- [2] 苟文丽. 妊娠高血压疾病//乐杰. 妇产科学. 7 版, 北京: 人民卫生出版社, 2008: 92-99.
- [3] 庞花艳, 黄引平, 刘忠杰. 脂氧素对脂多糖诱导的脐静脉内皮细胞通透性的影响. *中华妇产科杂志*, 2011, 46(3): 199-204.
- [4] Wang Y, Gu Y, Granger DN, et al. Endothelial junctional protein redistribution and increased monolayer permeability in human umbilical vein endothelial cells isolated during preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 186(2): 214-220.
- [5] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and in vivo UC-MSCs secrete matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1254-1264.
- [6] Li Y, Yu X, Lin S, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(2): 780-784.
- [7] Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stree-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003, 112(6): 160-169.
- [8] Koizumi K, Saitoh Y, Minami T, et al. Role of CX3CL1/fractalkine in osteoclast differentiation and bone resorption. *J Immunol*, 2009, 183(3): 7825-7831.
- [9] D Haese JG, Demir IE, Friess H, et al. Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2010, 14(2): 207-219.

(2013-01-17 收稿, 06-13 修回)

本文编辑: 蔡辉