

基础研究

DOI:10.11699/cyxb20130719

温敏型水凝胶加载基质细胞衍生因子-1的骨髓内控释促进造血

姚佳佳, 娄世锋, 张 萍, 晏 丽

(重庆医科大学附属第二医院血液内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:观察温敏型水凝胶加载基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)的体内外释放性能及对造血组织的影响。**方法:**(1)体外释放:用壳聚糖/明胶/甘油磷酸钠(chitosan-gelatin-glycerol phosphate, CS/G/GP)加载经 ^{125}I 标记的 SDF-1 并通过 γ 探测器测量其体外释放率。(2)体内释放:注射该缓释系统到 18 只 SD 大鼠股骨干中, 在第 1~6 天(每天 3 只)收集注射侧股骨头、股骨干、周围肌肉组织及对侧股骨头, 测量其释放量。(3)骨髓造血:将 10 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 实验组注射 0.1 ml CS/G/GP 加载 SDF-1 入 5 只大鼠股骨干, 对照组注射 0.1 ml CS/G/GP 入 5 只 SD 大鼠股骨干中。在第 7 天处死 10 只大鼠收集注射侧股骨头行活检, 观察造血活跃程度。**结果:**根据 γ 探测器测量值获得该缓释系统加载 SDF-1 的体外及骨髓内释放曲线。实验组骨髓造血活跃程度明显高于对照组, 两组间造血面积差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**加载 SDF-1 的可注射温敏型水凝胶第 2~5 天在股骨头局部维持稳定浓度且活跃骨髓造血组织。

【关键词】造血干细胞移植; 基质细胞衍生因子-1; 温敏型水凝胶; 药物控释

【中国图书分类法分类号】R551.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-11

Promotion of hematopoiesis by intra-bone marrow release of thermosensitive hydrogel containing stromal cell derived factor-1

YAO Jiajia, LOU Shifeng, ZHANG Ping, YAN Li

(Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the in vitro/vivo release of thermosensitive hydrogel containing stromal cell derived factor-1 (SDF-1) and its influences on hematopoietic tissue. **Methods:** (1) In vitro release: chitosan-gelatin-glycerol phosphate (CS/G/GP) hydrogel containing SDF-1 which was labeled by ^{125}I was used and gamma counter was applied to measure its in vitro release. (2) In vivo release: ^{125}I -labeled SDF-1 was injected to femoral shaft of 18 SD rats and vivo releases were collected from femoral shaft, femoral head, peripheral muscle tissues and offside femoral head and were measured (from the 1st-6th d, 3 rats each day). (3) Bone marrow hematopoiesis: 10 SD rats were divided into 2 groups, 5 rats in experiment group were injected with 0.1 ml CS/G/GP hydrogel containing SDF-1 and 5 rats in control group were injected with 0.1 ml CS/G/GP hydrogel without SDF-1. All 10 rats were killed at the 7th d and their femoral heads were collected to do bone marrow biopsy. **Results:** In vitro and in vivo release curves were obtained. Hematopoiesis was more active in experimental group than in control group ($P<0.05$). There were statistical differences in hematopoietic area between the two groups ($P<0.05$). **Conclusions:** CS/G/GP hydrogel containing SDF-1 could maintain stable concentration in femoral head and it could activate bone marrow hematopoiesis.

【Key words】hematopoietic stem cell transplantation; stromal cell derived factor-1; thermosensitive hydrogel; controlled release

造血干细胞移植技术中, 干细胞能否成功植入, 与组织配型、预处理方案、干细胞数量等因素有关, 其中骨髓中足够量干细胞的增殖至关重要^[1]。脐血干细胞来源广泛, 但因其干细胞含量不足限制其在成人中的应用。目前临床上静脉回输干细胞的方

法, 只能使少量的干细胞“归巢”至骨髓^[2], 因此如何提高其归巢效率, 是迫切需要解决的问题。基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)在招募干细胞中扮演着重要角色^[3], 其浓度梯度决定了 CD34⁺造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的移行方向。但因其半衰期短、分子量小易随血流扩散及易被二肽基肽酶^[4]和基质金属蛋白酶-2^[5]降解等特性, 很难在局部形成浓度梯度。因此, 利用有效载体系统加载 SDF-1 并使之在局部逐渐释放从而维持局部的有效浓度对于干细胞归巢有重要意

作者简介: 姚佳佳, Email: 371261596@qq.com,

研究方向: 白血病靶向治疗。

通信作者: 娄世锋, Email: loushifeng@hotmail.com。

基金项目: 重庆市科技攻关重点项目资金资助项目(编号: CSTC, 2009AB5215)。

义。

本文采用的壳聚糖/明胶/甘油磷酸钠(chitosan-gelatin-glycerol phosphate, CS/G/GP)体系具有良好的生物相容性及可降解性,在室温下呈液体,pH7.4左右当温度升至 37°C 左右时发生凝胶化作用,加入 1%明胶可缩短其凝胶化时间并增大其储能模量^[6]。本文将采用此缓释系统加载 SDF-1 并观察其体外、骨髓内的释放情况及其对造血组织的影响。

1 材料及方法

1.1 主要材料及仪器

壳聚糖(脱乙酰度 90%,北京索莱宝科技有限公司),甘油磷酸钠(美国 sigma 公司),明胶(北京索莱宝科技有限公司),SDF-1(美国 sigma 公司),PD-10 脱盐柱(美国 GE Healthcare 公司),Na¹²⁵I(成都中核高通同位素公司,18.2 GBq/ml),GC-911γ 放射免疫计数器(安徽科大创新公司),恒温水浴箱(上海跃进公司),电子 pH 计(上海雷磁公司),高压蒸汽灭菌箱(上海申安医疗器械厂)。

1.2 水凝胶的制备

将 2.5%的壳聚糖与 1%的明胶融入 0.1 mol/L 的乙酸溶液中经高压蒸汽灭菌(121°C,15 min),后将 44.4%的甘油磷酸钠经 0.2 μm 的过滤器过滤消毒后逐滴加入壳聚糖/明胶溶液中,并不断搅拌直至 pH 7.4 左右,将 CS/G/GP 溶液放于 4 °C 中储存备用^[6]。

1.3 ¹²⁵I 标记 SDF-1

利用传统的氯胺-T 法标记^[7]。首先,将 5 μl Na¹²⁵I 加入 200 μl SDF-1(0.1 mg/ml)溶液中。然后将溶于 0.5 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.5)的 0.2 mg/ml 的氯胺-T 溶液 100 μl 加入上述混合液中。室温下搅动 2 min,然后将 100 μl 含 0.4 mg 焦亚硫酸钠的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)溶液(pH7.5)加入反应液中以终止碘化反应。反应混合液经 PD-10 脱盐柱以移除未结合的游离 ¹²⁵I。

1.4 体外释放实验

将 25 μl 标记的 SDF-1 溶液分别加入 3 只装有 1 ml 水凝胶的试管中,充分混合后放入 37°C 恒温水浴中直至其形成凝胶,而后分别缓慢加入 1 ml PBS 缓冲液作为分散介质,分别在第 1~8 天取其上清液并补充入等体积的新鲜 PBS 溶液。利用 γ 放射免疫计数器测量每个上清液标本的放射量从而来计算 SDF-1 的释放情况。

1.5 体内释放实验

所有实验所需的 SD 大鼠均由重庆医科大学动物实验中心提供。所有手术及观察过程均在腹腔注射水合氯醛(0.35 ml/100 g)麻醉下进行。将 18 只 SD 大鼠[平均体质量(350 ± 20) g,雄性]剖开一侧股骨干皮肤,暴露股骨干,用 9 号腰穿针垂直穿入股骨干,缓慢注射 0.1 ml 载有 SDF-1 的水凝胶,后用医用生物胶及骨蜡封住穿刺点,缝合伤口。分别在第

1~6 天处死 1 组(每组 3 只)SD 大鼠,提取其穿刺侧股骨干、股骨头、股骨周围肌肉组织及对侧股骨头,通过 γ 放射免疫计数器测定组织放射量,从而计算其体内释放情况。

1.6 骨髓造血

将 5 μl 0.1 mg/ml SDF-1 溶液加载入 1 ml 水凝胶中。将 10 只 SD 大鼠分两组,用水合氯醛腹腔麻醉大鼠,向实验组大鼠股骨干中注入 0.1 ml 加载有 SDF-1 的水凝胶,向对照组大鼠股骨干中注入 0.1 ml 未加载 SDF-1 的水凝胶。在第 7 天,处死 10 只大鼠取其注射侧股骨头行塑料包埋活检,采用 YC.YX-2050 型医学形态学图像处理系统(骨髓活检)观察造血活跃程度。

1.7 数据处理

实验数据采用 SPSS 17.0 统计分析,计量资料以均数 ± 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 体外释放

通过绘制 SDF-1 的体外释放曲线(图 1),可见 SDF-1 在初期释放较快,在第 3 天累计释放已达到 47%,而后释放逐渐缓慢,第 7 天时达 62%。

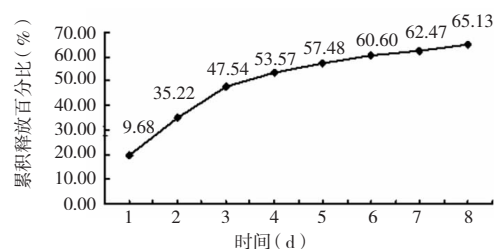


图 1 CS/G/GP 水凝胶加载 ¹²⁵I 标记的 SDF-1 的体外释放曲线

Fig.1 In vitro release curve of CS/G/GP hydrogel containing ¹²⁵I labeled SDF-1

2.2 骨髓内释放

通过绘制 SDF-1 体内释放曲线(图 2),可见 SDF-1 初期释放迅速,第 2 天就累计释放达 53%,第 6 天时达 80%,体内释放较体外释放更迅速,这可能因体内相关酶对水凝胶的降解所致。

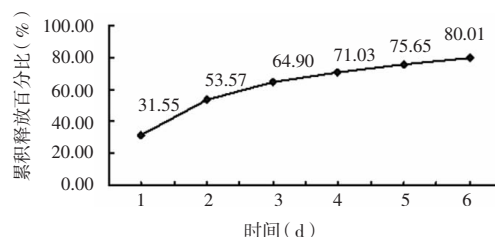


图 2 CS/G/GP 水凝胶加载 ¹²⁵I 标记的 SDF-1 在 SD-大鼠骨髓内的释放曲线

Fig.2 In vivo release curve of CS/G/GP hydrogel containing ¹²⁵I labeled SDF-1

2.3 股骨头与周围肌肉组织、对侧股骨头对比

从图 3 可见,股骨头中放射量明显高于周围肌肉组织及对侧股骨头,并且能在第 2~5 天处于一个较为稳定的浓度。

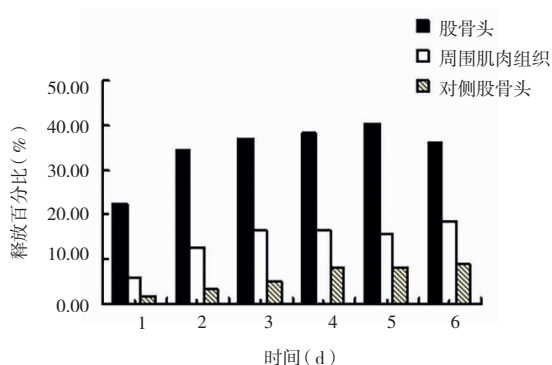


图 3 股骨头、周围肌肉组织及对侧股骨头中放射性浓度对比
Fig.3 Comparison of radioactive concentration between femoral head, peripheral muscle tissues and offside femoral head

2.4 促进造血

从表 1 可看出注射了加载 SDF-1 水凝胶的大鼠平均骨髓造血面积为 $(70.62 \pm 5.45)\%$, 注射未加载 SDF-1 水凝胶的大鼠平均骨髓造血面积为 $(46.67 \pm 4.36)\%$, 两组间有统计学差异 ($P < 0.05$), 且加载 SDF-1 组大鼠的增生程度均为 +++, 而未加载组增生程度为 ++, 图 4、图 5 的活检图片亦可看出明显差别。

表 1 注射了加载 SDF-1 水凝胶与未加载 SDF-1 水凝胶大鼠股骨头活检结果分析

Tab.1 Bone marrow biopsy of femoral heads with and without hydrogel containing SDF-1

组别	造血组织面积 (%)	脂肪组织面积 (%)	增生程度
实验组大鼠股骨头	70.62 ± 5.45	29.38 ± 5.45	++
对照组大鼠股骨头	46.67 ± 4.36	53.32 ± 4.36	+++

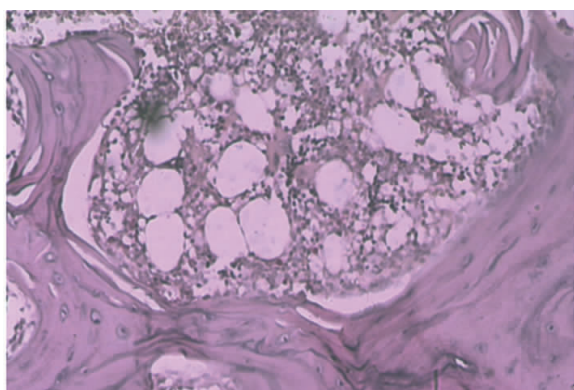


图 4 注射了未加载 SDF-1 的水凝胶后大鼠股骨头处的骨髓活检 (100×)

Fig.4 Bone marrow biopsy of femoral head without hydrogel containing SDF-1 (100×)

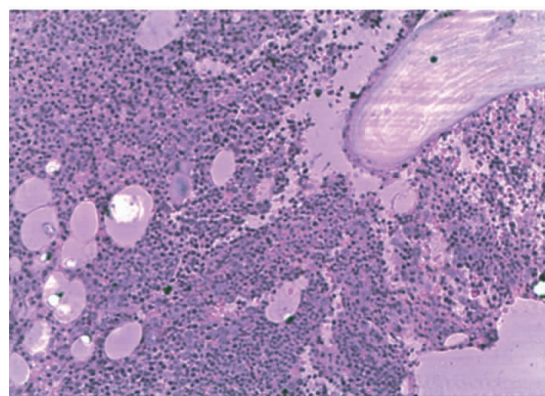


图 5 注射了加载 SDF-1 的水凝胶后大鼠股骨头处的骨髓活检 (100×)

Fig.5 Bone marrow biopsy of femoral head with hydrogel containing SDF-1 (100×)

3 讨论

SDF-1 是 CXC 趋化因子中的一员, 它由骨髓基质细胞分泌, 并与细胞表面 CXCR4 受体结合从而发挥其生物学功能^[8]。它是唯一体外调节纯化成年鼠骨髓干细胞迁移的趋化因子^[9]。CD34⁺造血祖/干细胞上表达 CXCR4, 在体内基质细胞持续表达 SDF-1 的条件下, 可被诱导归巢入骨髓^[10]。Sobkow 等^[11]证实, 局部一定浓度的 SDF-1 可以实现 HSC 的定向迁移。因此 SDF-1/CXCR4 轴是 HSC 归巢的核心作用环节。目前关于 SDF-1 的主要研究方向有两个, 一是利用基因工程技术如基因干扰、转基因等技术增加 SDF-1 的分泌^[12], 提高局部浓度, 促进干细胞归巢。但该方向受伦理或技术本身的限制, 短期内很难实现临床应用。另一研究方向则是通过载体携带 SDF-1, 人工的调节局部的 SDF-1 浓度, 引导造血干细胞的迁移及归巢, 该研究方向显然具有成本低、可操作性强、疗效可控的优点, 具有显著的实际意义。

近年来, 利用载体系统局部调节 SDF-1 水平, 提高归巢效率成为研究热点。水凝胶加载 SDF-1 已被广泛报道, Kimura 和 Tabata^[13]将 SDF-1 加载在明胶水凝胶上用于治疗肢体局部的缺血坏死^[13]。Rabbany 等^[14]将 SDF-1 加载于藻酸盐水凝胶中以用于加快外伤的治疗。但因它们均为凝胶状, 只能适用于表层浅部组织。可注射的温敏型水凝胶是目前研究最多的应用于组织工程及药物载体的材料, 而壳聚糖/甘油磷酸钠体系尤甚^[15]。CS/G/GP 释放体系在常温下呈液态, 因此可在常温下利用穿刺针送入深部组

织,减少创面。在 37℃ 时该系统逐渐转变为凝胶状,使加载药物有控制地原位释放,形成原位控释系统。该载体系统加入 1% 的明胶,凝胶化时间由 10 min 左右缩短为 4~5 min,并稳固了其疏松的结构,增大了其储能模量。

异基因干细胞移植后,干细胞归巢至骨髓的时间约在 2~5 d 左右。研发一种符合移植后干细胞归巢动力学规律的局部控释系统十分重要,过早释放完毕会影响生物学效应,过慢或长期释放会对造血形成持续刺激并导致副作用。研究结果表明(图 2),CS/G/GP 加载 SDF-1 在约 3.5 d 左右就可达 50% 的释放率,符合干细胞归巢的动力学规律。如图 3 所示,股骨头中 SDF-1 浓度在第 2~5 天能维持在一个较高浓度,并远高于周围肌肉组织及对侧股骨头中浓度,证实能有效形成浓度梯度,解决了 SDF-1 快速扩散,难以在局部形成有效浓度的问题。为证实其生物学效应,本实验进行了动物实验,将 CS/G/GP 加载 SDF-1 注射于正常大鼠股骨头,发现局部高浓度 SDF-1 的趋化作用可促进造血功能,推测因外周血中有少量 HSC 迁徙归巢所致。根据表 1 及图 4、图 5 可明显看出,注射了 CS/G/GP 加载 SDF-1 的 SD 大鼠的造血组织活跃程度明显高于仅注射了 CS/G/GP 的 SD 大鼠。

本研究发现 CS/G/GP 加载 SDF-1 能在骨髓腔内形成有效的 SDF-1 控释系统,并形成 SDF-1 稳定的浓度梯度,可促进局部造血功能活跃,其释放 SDF-1 动力学规律符合 HSC 归巢的规律,有显著的临床开发价值,值得建立动物移植模型进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chen B J, Cui X, Sempowski G D, et al. Hematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation[J]. *Blood*, 2004, 103(11): 4344-4352.
- [2] Yahata T, Ando K, Sato T, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow[J]. *Blood*, 2003, 101(8): 2905-2913.
- [3] Sierra M D, Yang F Q, Narazaki M, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1 α and stromal-derived factor-1 β explains functional diversity[J]. *Blood*, 2004, 103(7): 2452-2459.
- [4] Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides[J]. *Regul Pept*, 1999, 85(1): 9-24.
- [5] McQuibban G A, Butler G S, Gong J H, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43503-43508.
- [6] Cheng Y H, Yang S H, Su W Y, et al. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(2): 695-703.
- [7] Greenwood F C, Hunter W M, Glover J S. The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity[J]. *Biochem J*, 1963, 89: 114-123.
- [8] Zou Y R, Kottmann A H, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development[J]. *Nature*, 1998, 393(6685): 595-599.
- [9] Wright N, Lera T L, Garcia-Morujia C, et al. Transforming growth factor- β downregulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion[J]. *Blood*, 2003, 102(6): 1978-1984.
- [10] Mohle R, Bautz F, Rafii S, et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell derived factor-1[J]. *Blood*, 1998, 91(12): 4523-4530.
- [11] Sobkow L, Seib F P, Prodanov L, et al. Prolonged transendothelial migration of human haematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) towards hydrogel-released SDF-1[J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(8): 865-871.
- [12] Bakondi B, Shimada I S, Peterson B M, et al. SDF-1 α secreted by human CD133-derived multipotent stromal cells promotes neural progenitor cell survival through CXCR7[J]. *Stem Cells and Dev*, 2011, 20(6): 1021-1029.
- [13] Kimura Y, Tabata Y. Controlled release of stromal-cell-derived factor-1 from gelatin hydrogels enhances angiogenesis[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2010, 21(1): 37-51.
- [14] Rabbany S Y, Pastore J, Yamamoto M, et al. Continuous delivery of stromal cell-derived factor-1 from alginate scaffolds accelerates wound healing[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(4): 399-408.
- [15] Park M H, Joo M K, Choi B G, et al. Biodegradable thermogels[J]. *Acc Chem Res*, 2012, 45(3): 424-433.

(责任编辑: 关蕴良)