

基于 GFP 荧光小鼠模型的唾液腺干细胞对放射性损伤的修复及免疫机制研究

丁洲 王万鹏 谢富洋 濮娟 刘艳艳 (通讯作者)

南京医科大学康达学院附属涟水人民医院 江苏 淮安 223400

【摘要】目的：研究源自 GFP 转基因 C57BL/6 雄性小鼠唾液腺的单克隆成体干细胞在修复放射性唾液腺损伤中的效果，并从局部组织再生和全身免疫调节的角度揭示其潜在机制。方法：通过结合组织块酶消化和差速贴壁的方法，分离供体小鼠的唾液腺细胞，然后运用有限稀释技术，建立出单克隆细胞系。利用流式细胞术识别干细胞的表面特征标识（CD49f 和 c-Kit 双阳性）。设计了一种模型，通过给雌性 C57BL/6 小鼠的头颈部进行 15Gy X 线单次照射，诱导唾液腺损伤。然后将 GFP⁺ 单克隆成体干细胞原位移植到受损腺体。在移植后的第 1 天、第 7 天和第 30 天，通过测定唾液流量、分析淀粉酶活性以及进行组织学染色（包括 HE 染色、PAS 染色和 PCNA 免疫组化）来评估修复效果。通过测量脾脏/胸腺指数、进行脾淋巴细胞的增殖实验、分析外周血中的淋巴细胞亚群、检测血清中的细胞因子以及分析脾脏中与免疫有关的转录因子的表达，来评估整体免疫调节的效果。结果：成功分离并验证唾液腺中具有自我再生能力的成熟干细胞。在移植后 30 天内，接受干细胞治疗的小鼠，其唾液流量和淀粉酶活性显著改善（ $P < 0.05$ ），而对照组的这些指标并未恢复正常。组织学分析结果表明：移植组的腺体结构损伤有所减轻，增殖细胞核抗原（PCNA）阳性的细胞数量显著提高，以及过碘酸雪夫（PAS）染色阳性腺泡的比例有所增加。研究结果显示，干细胞移植能够明显提高照射小鼠的胸腺指数和脾脏指数（ $P < 0.05$ ），促进脾淋巴细胞的增殖，调节外周血中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞的比例，显著下降血清中的促炎细胞因子（IL-1 β 、IL-6、IFN- γ ）浓度（ $P < 0.05$ ），并提升脾脏免疫调节性转录因子 GATA-3 的表达水平。结论：来自唾液腺的单克隆成体干细胞能够显著改善放射性唾液腺损伤，可能通过促进局部腺体再生和调节全身免疫稳态共同发挥作用。

【关键词】：源自唾液腺的细胞；放射性损伤；细胞移植；免疫调节；GFP 小鼠

DOI:10.12417/2705-098X.26.10.018

1 引言

在接受肿瘤放射治疗时，唾液腺损伤是一个普遍且严重的问题，严重影响患者的生活水平。这种损伤主要由于治疗头颈部肿瘤时，正常组织难免受到辐射影响而引发，常出现口干、吞咽困难等症状^[1]。现阶段的临床治疗主要以缓解症状为核心，对于损伤根源的修复措施仍然不足^[2]，因此需要寻找新的治疗方法。

最近几年，干细胞疗法凭借其多样的分化潜力以及修复组织的能力，成为研究的焦点，并为放射性唾液腺损伤的治疗带来了新的方向。本研究通过构建 GFP 荧光小鼠模型，旨在明确唾液腺单克隆成体干细胞在受损组织中的分化方向及修复机制，为临床应用奠定理论基础。

深入研究唾液腺的成体单克隆干细胞在修复和免疫调节中的角色，有助于进一步理解放射性唾液腺损伤的生物学特性。这将为优化现有治疗方法提供新的视角。这项研究不仅促进了干细胞治疗的转化应用，还为创新的临床治疗策略和提高患者生活质量打下了基础^[3]。

在此背景下，本研究旨在构建稳定的 GFP⁺ 唾液腺单克隆成体干细胞系，并深入探讨其在辐射损伤模型中的修复效果和免疫调节作用，以便为临床治疗提供相应的实验依据。

2 材料与方法

2.1 唾液腺单克隆成体干细胞的分离与鉴定

(1) 细胞分离与培养：取雄性 GFP-C57BL/6 小鼠，无菌条件下摘除唾液腺组织。采用机械分离与酶消化法制备单细胞悬液：组织置于含 1%BSA 的 Hank's 平衡盐溶液中，经 MACS 解离器机械消化后，于含 0.63 mg/mL 胶原酶 II (Sigma)、0.5 mg/mL 透明质酸酶(Sigma)及 6.25 mM 氯化钙的消化液中 37°C 消化 30 分钟（重复 2 次，消化体积按 20 mg 组织/mL 缓冲液）。离心收集细胞，经 Hank's 溶液/1%BSA 洗涤 2 次，过 100 μ m 滤网，重悬于改良 DMEM/F12 培养基（含青霉素/链霉素、20 ng/mL EGF、20 ng/mL FGF-2、N2、10 μ g/mL 胰岛素、1 μ M 地塞米松），以 4 \times 10⁵细胞/孔密度接种于 12 孔板。

(2) 单克隆细胞系建立：混合细胞悬液接种于 100 mm 培养皿（5%CO₂），2 小时后转移至新培养皿（重复 2 次）。待

通讯作者：刘艳艳，女（1979-），汉族，江苏省淮安市人，硕士研究生，南京医科大学康达学院附属涟水人民医院，肿瘤学硕士，副主任医师，肿瘤放疗科病区主任，研究方向：妇科及消化道恶性肿瘤综合治疗。

基金项目：淮安市自然科学研究项目（编号 HAB202251）。

单细胞来源克隆形成后，依次转移至6孔板、100 mm 培养皿及培养瓶扩增。

(3)流式细胞术鉴定：培养3天后，0.05%胰蛋白酶-EDTA (Gibco) 消化为单细胞悬液。4°C下以抗小鼠 CD117 (c-Kit) -PE (Biolegend)、CD49f-FITC (Biolegend)、CD24-FITC (BD Biosciences) 抗体标记20分钟。PBS/0.2%BSA 洗涤后，BD FACSCanto II 流式细胞仪分析。

(4)自我更新能力评估：取培养3-5天的细胞(0.05%胰蛋白酶-EDTA 消化)制备单细胞悬液(4×10⁵细胞/mL)。25μL 细胞悬液与50μL Matrigel 基质胶(BD Biosciences)混匀，接种于12孔板，37°C固化20分钟后覆盖培养基。2-3天观察球体形成，1周后以Dispase (1 mg/mL) 消化收集球体，计数后连续传代5次。球体形成过程经Zeiss 780 共聚焦显微镜延时拍摄(96小时)。

(5)细胞周期分析：单克隆球体消化后，分别以50 ng/mL CHIR-99021 或 DDK1 处理并传代4次。乙醇固定细胞，RNA 酶处理后PI染色(1×10⁶细胞/mL)，流式细胞术检测DNA含量。按公式计算：

$$S \text{ 期分数 (SPF, \%)} = [S / (G_0 / G_1 + S + G_2 / M)] \times 100\%$$

$$\text{增殖指数 (PI)} = [(S + G_2 / M) / (G_0 / G_1 + S + G_2 / M)] \times 100\%$$

2.2 动物模型构建与分组

模型构建：雌性C57BL/6小鼠(8-10周龄)接受15 Gy X线单次头颈部照射建立损伤模型。

实验分组：

空白对照组：未照射

模型组：照射+PBS注射

治疗组：照射+GFP⁺单克隆成体干细胞原位注射(4×10⁴细胞/10μL/腺体)

2.3 效应评估

功能学评价：唾液流率测定、淀粉酶活性检测

形态学评价：HE染色(组织结构)、PAS染色(腺泡功能)、PCNA免疫组化(细胞增殖)

细胞示踪：GFP抗体免疫荧光染色观察移植细胞定植

2.4 免疫机制研究

免疫器官指数：脾脏指数(脾脏重/体重)、胸腺指数(胸腺重/体重)

脾淋巴细胞增殖：MTT法检测ConA刺激下的增殖活性

外周血免疫细胞分析：流式细胞术检测T细胞亚群(CD4⁺/CD8⁺)

血清细胞因子检测：ELISA法检测IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6水平

脾脏免疫组化：检测转录因子T-bet与GATA-3表达

2.5 统计学分析

数据以均值±标准差表示，GraphPad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析，P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 唾液腺单克隆成体干细胞的分离与鉴定

从GFP小鼠唾液腺中分离出具有克隆形成能力的细胞群。流式细胞术显示：细胞高表达干细胞标志物CD49f(92.3%±2.1%)与c-Kit(85.7%±3.4%)，Sca-1阳性率达78.5%±4.2%(图1A)，证实其为干细胞富集体。

基质胶球体形成实验表明：单细胞可形成结构紧密的球体(P0代)，经连续传代(P1-P5代)后仍保持稳定形态(图1B)。初始成球率为12.5%±1.8%，证实其克隆形成能力。

细胞周期分析显示：Wnt/β-catenin 通路激动剂CHIR-99021处理后，S期分数(SPF)与增殖指数(PI)较对照组显著升高(*P<0.01)，表明其具有活跃增殖潜能(图1C)。

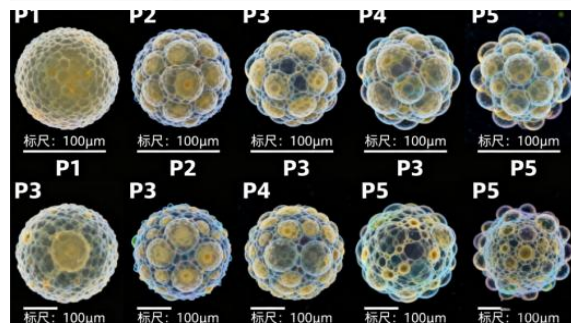
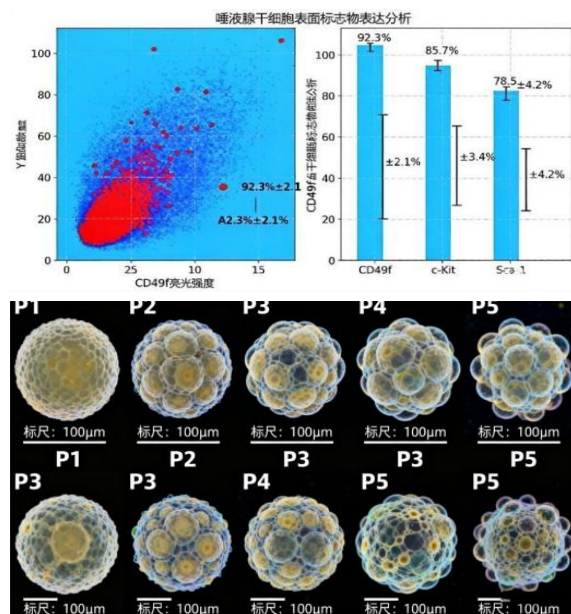


图1A 流式细胞术分析显示分离细胞高表达CD49f和c-Kit
图1B 基质胶中形成的单克隆成体干细胞球体(标尺:100μm)

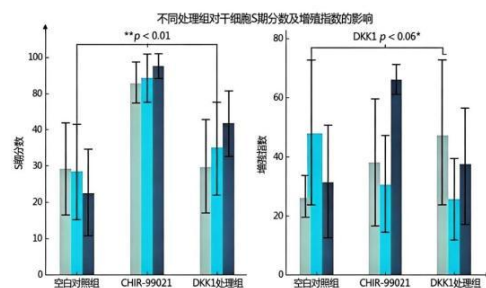


图1C 不同处理组细胞的S期分数与增殖指数统计图
(*p<0.05,**p<0.01 vs.对照组)

图 1C 中，使用流式细胞术分析细胞周期，计算出 S 期分数和增殖指数来评估细胞的增殖活性。在使用 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂 CHIR-99021 处理细胞后，细胞增殖明显增强，S 期分数和增殖指数显著提升 ($p < 0.01$)。相反，使用抑制剂 DKK1 处理后，细胞增殖明显受到抑制，这两个指数均显著低于对照组 ($p < 0.05$)。这些发现表明分离的干细胞具有较高的增殖能力，并且其增殖过程受 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节。

图 1 的综合数据显示，这种分离方法成功获得了高纯度的唾液腺单克隆成体干细胞。它们表现出显著的自我更新和强大的增殖潜力，为进一步的体内治疗研究提供了稳定且优质的细胞资源。

3.2 单克隆成体干细胞移植改善放射性损伤小鼠的唾液腺功能

与未经处理的对照组相比，模型组小鼠在照射后各时间点的唾液流率和淀粉酶活性显著降低。而接受单克隆成体干细胞治疗的小鼠移植 7 天后开始显示出改善的趋势，至第 30 天时，唾液流率和淀粉酶活性均显著高于模型组，恢复到正常水平的约 70% (图 2A, 2B)。

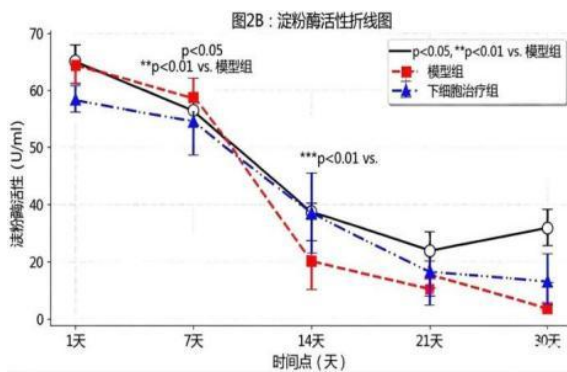
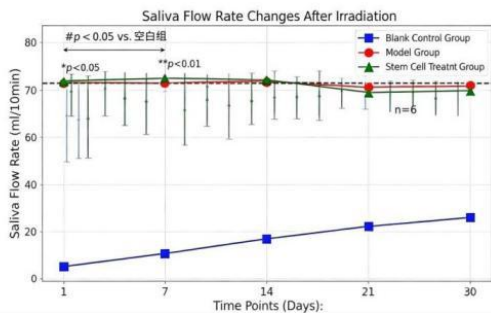


图 2A 各组小鼠在不同时间点的唾液流率变化图 2B. 各组小鼠在不同时间点的唾液淀粉酶活性变化

(数据表示为均值 \pm SD, $n=6$; # $p < 0.05$ vs. 空白组, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 模型组)

3.3 单克隆成体干细胞移植促进放射性损伤唾液腺的形态学修复

HE 染色观察发现，模型组小鼠的唾液腺结构受损严重，腺泡缩小并伴随空泡形成，组织纤维化显著，且大量炎症细胞浸润。而在干细胞治疗组中，腺体的结构恢复良好，可以看见多个形态正常的腺泡和导管 (图 3A)。通过 PAS 染色检测，

发现治疗组中 PAS 阳性腺泡的面积比例明显高于模型组 (图 3B)。增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化显示，治疗组中腺体内的增殖细胞数量远超模型组，表明组织再生能力相当活跃 (图 3C)。此外，GFP 免疫荧光验证显示，移植的 GFP⁺ 细胞成功在接受治疗的腺体内存活并扎根 (图 3D)。

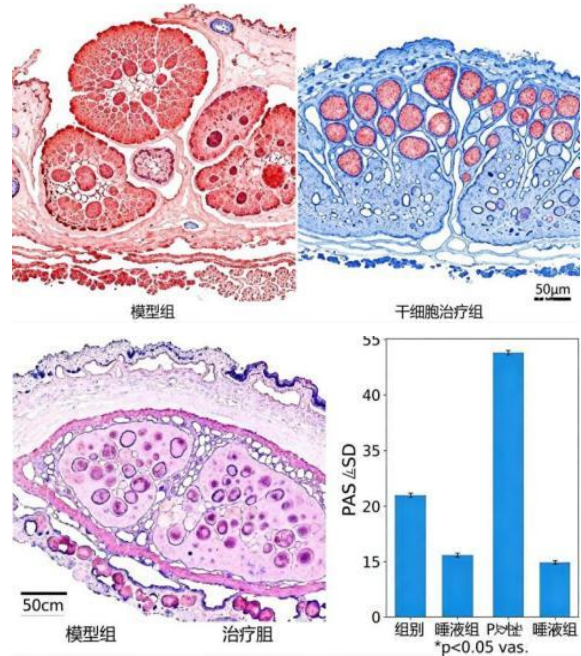


图 3A 各组唾液腺组织的 HE 染色 (标尺: 50 μ m) 图 3B. PAS 染色阳性区域定量统计图

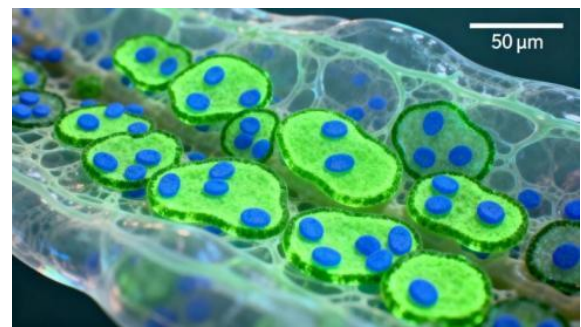
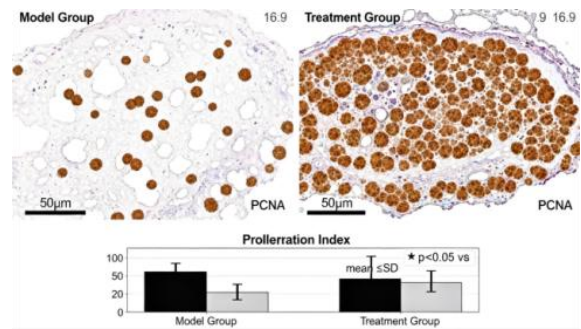


图 3C PCNA 阳性细胞计数统计图 图 3D. GFP 免疫荧光显示移植细胞 (绿色) 在受体腺体定植 (蓝色为 DAPI 核染)

3.4 单克隆成体干细胞调节全身免疫稳态

放射性伤害使小鼠的免疫系统受到显著抑制，通过单克隆

成体干细胞治疗，小鼠的胸腺和脾脏指数均得到明显提升（图4A），脾淋巴细胞对 ConA 的增殖反应也增强了（图4B）。流式分析表明治疗组能够恢复模型组中 CD4⁺/CD8⁺T 细胞的比例，并明显提高了NK 细胞的比例（图4C）。经过 ELISA 测试，移植单克隆成体干细胞大幅降低了血清中的促炎因子 IL-6 和 IFN- γ 水平，而抗炎因子 IL-4 的水平得到了提升（图4D）。免疫组化分析显示，治疗组的小鼠脾脏中与 Th2 细胞有关的转录因子 GATA-3 表达增加，而与 Th1 细胞相关的转录因子 T-bet 表达降低（图4E）。

图4E 脾脏GATA-3和T-bet免疫组化结果

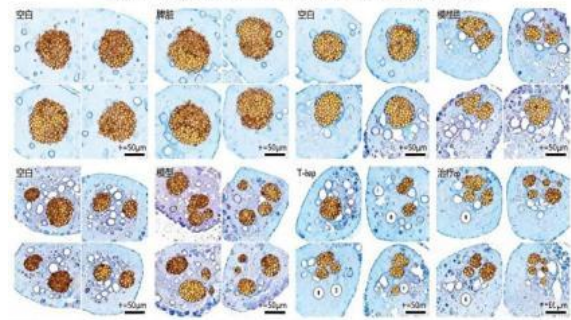


图4D 血清细胞因子水平图4E.脾脏 GATA-3 与 T-bet 表达的相对光密度值

（数据表示为均值 \pm SD，n=6；#p<0.05 vs.空白组，*p<0.05，**p<0.01 vs.模型组）

4 讨论

本研究成功构建了一种能够表达绿色荧光蛋白（GFP）的唾液腺单克隆成体干细胞（SASC）的稳定培养系统，并证明通过进行原位移植，能够有效改善放射性损伤的唾液腺的功能和形态修复。研究结果从以下三方面深化了对其作用机制的理解：

- （1）移植的 GFP⁺ 细胞成功在损伤区域定植，通过促进宿主细胞增殖和自身分化，直接参与腺体结构的重塑。
- （2）全面说明了单克隆成体干细胞治疗能够显著缓解因辐射损伤引起的系统免疫抑制状况。这种治疗方法旨在通过重建免疫器官的质量、促进淋巴细胞活性、优化 T 细胞亚群的分布以及调控细胞因子网络，帮助免疫系统从炎症与抑制同时存在的病理状况恢复到正常运作的平衡状态。脾脏中 GATA-3 与 T-bet 表达的比率发生变化，暗示其免疫调节功能可能与促进 Th2 型免疫反应的倾向有关。
- （3）唾液腺的单克隆成体干细胞不仅直接推动组织再生，还具有显著的免疫调节作用，为治疗放射性唾液腺损伤提供了多重靶点的策略。

主要研究结果显示，在使用 GFP 荧光小鼠模型时，唾液腺单克隆成体干细胞能有效修复放射性导致的唾液腺损伤。使用 GFP 标记的干细胞能够显著改善因放射损伤引起的唾液腺功能障碍。这种修复效果与干细胞在损伤区域内的定向分化能力有紧密联系。这一发现为治疗唾液腺损伤，尤其是提升放疗后患者的生活质量，提供了全新的角度^[4]。

实验结果表明，接受单克隆成体干细胞治疗的小鼠的唾液流速显著优于未治疗组，组织学修复也有明显好转。在治疗时注意到特定免疫因子的升高，表明该干细胞在维持免疫微环境平衡方面具有重要功能。流式细胞术分析揭示了在修复阶段多种免疫细胞亚群比例的显著调整，进一步支持了单克隆成体干细胞具有免疫调节功能，这一机制在放射损伤治疗中至关重要^[5]。

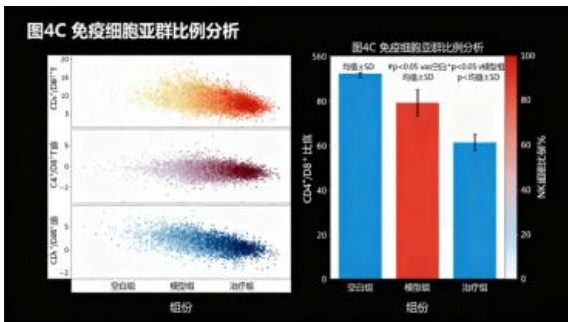
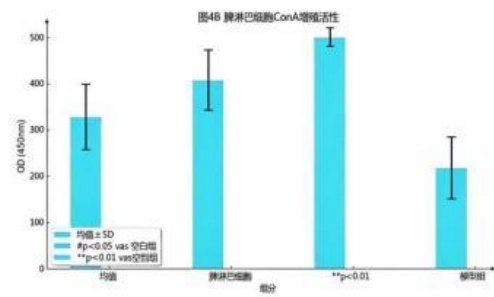
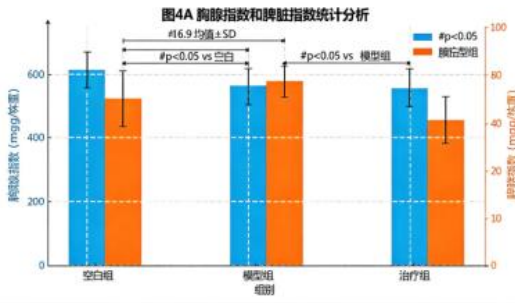
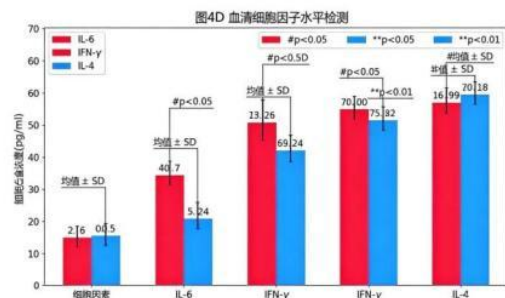


图4A 胸腺指数与脾脏指数图4B 脾淋巴细胞增殖指数图4C.外周血 CD4⁺/CD8⁺比值与NK 细胞百分比



研究显示,单克隆成体干细胞能通过旁分泌效应与宿主细胞之间的相互作用,显著缓解氧化应激及相关炎症,从而促进损伤区域的愈合进程。这为使用单克隆成体干细胞治疗辐射损伤提供了重要的理论支持。目前,这种疗法的临床应用仍在探索中,不过它在增强唾液腺功能和改善患者生活品质方面的潜力愈发显著,这与现有文献中提到的单克隆成体干细胞在再生医学中的潜力一致^[6]。

5 结论

这项研究顺利分离并识别了唾液腺内的单克隆成年干细胞,显示出其具备迅速增殖和独立更新的能力。

将这种单克隆成体干细胞原位移植能够大大提高放射性损伤小鼠的唾液分泌,并有助于腺体结构的修复。

这种干细胞的保护功能与其维持身体免疫系统的平衡、减少炎症反应过度以及改善免疫抑制状态密切相关。

本研究建议未来需要进一步研究唾液腺单克隆成体干细胞在修复辐射损伤中的机制。本研究初步展示了 GFP 标记的单

克隆成体干细胞在免疫微环境调节和腺体功能恢复增强方面的潜力。深入研究,尤其是识别和验证重要的旁分泌因子与细胞因子,将为优化干细胞疗法的临床应用奠定更可靠的理论基础。研究显示,旁分泌信号在激发细胞修复路径中起着重要作用。未来的研究应更专注于这些信号作用机制的细节及它们之间的调节关系。

类器官技术的使用有望提供更加精确的模型,促进对非肿瘤性疾病的发病机制和治疗策略的探索。类器官的构建能够更加真实地再现唾液腺的生理特征,为研究细胞间的相互作用和干细胞的持久性提供了全新的平台。这项技术的采用为单克隆成熟干细胞的应用拓展了新的发展前景^[7]。

目前单克隆成体干细胞的研究还面临许多局限性。未来的研究应该结合多种治疗方法,比如细胞疗法与小分子药物的创新联合,以增强治疗效果并减少风险。这些跨学科方法有望大幅提升放射性唾液腺损伤的临床整体疗效,并为未来的研究提供可靠基础^[8]。

参考文献:

- [1] 黄桂林.放射性唾液腺功能损伤的再生医学研究——从干细胞到无细胞治疗[J].口腔颌面外科杂志,2022,32(2):71-76.
- [2] Cui Tianning,Zhang Nini,Long Yuanzhu,Huang Guilin,Zhang Ligang,Tang Jianhong,Luo Qinliang.Study on Exosomes from Hypoxia-Preconditioned Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells for Repairing Radiation Damage in Salivary Glands[J].Journal Oral Medicine Research,2022,38(12):1145-1150.
- [3] Maimaituerxun Abudunaibi,Rezeiye Maimaitizunong,Xu Hui.Progress in Research on Stem Cell Therapy for Radiation-Induced Damage to Salivary Glands[J].Journal of Clinical Stomatology,2023,39(12):759-762.
- [4] Wang Bo,Mu Yabing,Zang Guangxiang.Progress in Research on Salivary Glands and Salivary Gland Tumor Organoids[J].Chinese Journal of Stomatology,2022,57(5):535-539.
- [5] Jiang Jin,Zhang Songling,Zhao Shuya,Feng Guoxing,Fan Saijun.Study on the Protective Effects and Mechanisms of Trehalose on Radiation-Induced Intestinal Injury in Mice[J].International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine,2024,48(4):244-256.
- [6] 白瀚哲,王丹,倪蕾,代雨鑫,王畅,商宇,杨玉.齐墩果酸对小鼠肠道免疫功能损伤的修复作用[J].牡丹江医学院学报,2023,44(3):5-8.
- [7] 安璐.丝素蛋白/壳聚糖支架结合脂肪来源干细胞对放射性皮肤损伤的修复作用及机制探讨[D].苏州大学,2022.
- [8] Zheng Jiachen,Yang Entong,Zhu Yizhou,Liu Fang.Adult stem cells from different germ layers repair peripheral nerve injury[J].Chinese Journal of Tissue Engineering Research,2025,29(19):4102-4110.