文章编号:1000-5404(2011)21-2313-03

技术方法

SPIO、GFP双重标记猪骨髓间充质干细胞的研究

陈加荣,杨 柳,戴 刚,郭 林,林 肖,王凤玲,蔡长傧 (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科中心)

[摘要] **目的** 研究超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide,SPIO)、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)双重标记猪骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的可行性。**方法** 用慢病毒载体介导的GFP基因感染第3代猪BMSCs,并用SPIO标记。用荧光显微镜观察双标记BMSCs,流式分析GFP转染效率,普鲁士蓝染色、透射电镜鉴定SPIO标记效率。MTT法检测标记BMSCs的细胞增殖活力。**结果** 双标记BMSCs在荧光显微镜下发出绿色荧光,GFP在基因转染1 d后开始表达,3 d明显增加,5 d达顶峰,以后稳定表达。普鲁士蓝染色显示SPIO标记的BMSCs内有大量蓝染铁颗粒,细胞标记率达95%以上,透射电镜下细胞质内及部分次级溶酶体内可见高电子密度含铁囊泡和细小颗粒。MTT法检测发现GFP和SPIO双标记、单纯GFP标记、SPIO标记BMSCs的增殖活力与未标记BMSCs相比无改变($P>0.05$)。**结论** 携带绿色荧光蛋白基因的慢病毒和SPIO可以有效地标记猪的BMSCs。双标记BMSCs的活性、增殖能力与未标记BMSCs相比无改变。

[关键词] 超顺磁性氧化铁;慢病毒;绿色荧光蛋白;骨髓间充质干细胞
[中图法分类号] R331.2+2 [文献标志码] B

关节软骨缺损临床较为常见,但目前的保守治疗及手术方法均存在明显的缺陷。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)多能性的发现为临床再生医学提供了新思路,为关节软骨再生修复带来持续的临床效益[1]。移植BMSCs在软骨缺损区的迁移、转归情况缺乏有效的识别和追踪监测手段,因此如何示踪移植BMSCs并分析其分化,是研究的热点和难点。荧光显微镜下可从软骨组织切片上示踪绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)标记的BMSCs在软骨缺损区内的增殖、迁移和分化。超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide,SPIO)颗粒是被美国FDA认证的磁共振造影剂,可在体外标记BMSCs,用MRI可在活体上示踪移植到膝关节内的磁化标记BMSCs[2-3]。为更好地示踪移植BMSCs,实现同时在活体和离体情况下监测BMSCs,本实验尝试用GFP、SPIO外双标记BMSCs,并对其可行性进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料及动物

SPIO颗粒(成都国家生物材料研究中心合成,由艾华教授惠赠),DMEM/F12(1∶1)培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司),Percoll(1.073 g/L,Pharmacia公司),携带GFP基因的慢病毒载体(上海生博公司)。CO_2培养箱(Sheldo公司,美国),倒置荧光相差显微镜与激光扫描共聚焦显微镜(OLYMPUS公司,日本)。12月龄雄性贵州小香猪2只(第三军医大学实验动物中心提供)。

1.2 BMSCs的培养和扩增

参考文献[4],取12月龄贵州小香猪,用3%戊巴比妥钠10 ml静脉麻醉后,备皮。在无菌条件下,于髂前上棘处用骨穿针穿刺,用内含1 ml肝素钠生理盐水(1 200 U/ml)的注射器抽出骨髓15~20 ml,将骨髓吹打均匀后,将骨髓液按1∶1比例缓慢加至含密度为1.073 g/ml Percoll的离心管中行梯度离心分离,3 200 r/min,离心20 min,收获位于界面层的单个核细胞,用PBS培养液洗涤1次,1 000 r/min,离心5 min,弃上清,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬,以2×10^5 cm^2细胞数接种于100 ml玻璃培养瓶,置于5% CO_2、饱和湿度37 ℃培养箱。4~5 d首次换液,以后每隔3~4天换液1次,8~12 d细胞生长融合达80%以上时,0.25%胰蛋白酶消化,按1∶2传代后继续培养,倒置相差显微镜动态观察细胞。

1.3 携带GFP基因的慢病毒感染BMSCs

取第3代BMSCs,用0.25%胰蛋白酶消化,1 000 r/min,离心5 min,弃上清,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重悬,制成单细胞悬液,稀释至5×10^4/ml后,接种于2个24孔板中[每板6个病毒感染复数(MOI)梯度,每个梯度4个复孔,1板用于细胞流式检测,1板用于普鲁士蓝及电镜检查],每孔200 μl,培养24 h后,分别以0、25、50、100、200、400的MOI加入携带GFP的慢病毒载体,24 h后PBS冲洗3遍,换为不含慢病毒的完全培养基继续培养,此后每2~3天换液1次并观察荧光表达情况,培养1~2周后流式分析转染效率。

1.4 磁标记BMSCs

参考文献[5],17.4 mg/ml的聚乙酰胺(PEI)包覆的SPIO原液加入DMEM/F12无血清培养基中分别稀释为8.0 μg/ml备用。待GFP标记的BMSCs长至孔板85%面积时,弃去原含

[通信作者] 杨 柳,E-mail:jointsurgery@163.com

血清的培养液,PBS 冲洗 2 遍,取等量 PEI/SPIO 标记液予以等量换液,在 37 ℃,95% 空气,5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。继续培养 3 d 后流式分析对 GFP 转染效率的影响情况。

1.5 普鲁士蓝染色

取 1.4 部分细胞制作爬片贴壁 1 d 后,PBS 冲洗 2 次,然后用含肝素 10 U/ml 的 PBS 冲去细胞外游离的铁粒子,4% 多聚甲醛固定,Perl 反应液孵育 30 min,PBS 冲洗 1 次,核固红复染 1 ~ 2 min。以细胞质内可见蓝色颗粒计为染色阳性。100 倍显微镜下 10 个视野计数阳性细胞,测定各组 BMSCs 的标记阳性率:细胞染色阳性数/细胞总数 × 100% 。

1.6 透射电镜观察

双标记 BMSCs 经 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,向细胞沉淀中加入 2.5% 戊二醛溶液固定 30 min,然后用 1% 锇酸固定 30 min,再用 0.5% 醋酸铀 4 ℃染色固定过夜后,梯度乙醇脱水,EP812 包埋。超薄切片后,用醋酸铀复染,用 JEN-2M1220 型透射电镜观察。

1.7 MTT 法检测细胞增殖活性

将单纯 GFP、单纯 SPIO 标记及双标记的 BMSCs 用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 调整细胞数至 1×10^4/ml,取 200 μl 均匀接种于 96 孔板中,以相同浓度的未标记 BMSCs 为对照(共 7 板,每板 4 组,每组各 10 孔)。每天取出 1 板,每孔加入 MTT 液(0.2 mg/ml) 20 μl,置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中孵育 4 h,然后加入 200 μl DMSO,振荡 10 min,以充分溶解细胞代谢产物。分别于 1、2、3、4、5、6、7 d 时,在自动酶联免疫检测仪上测定 590 nm 波长下各孔光密度值[D(590)]。

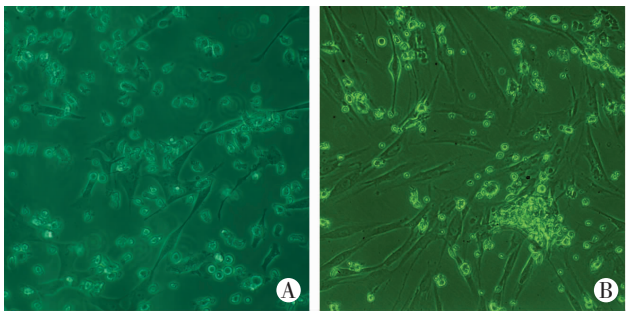
1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,标记细胞组与未标记细胞组间比较用配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养和扩增

培养 4 ~ 5 d 后细胞分裂增殖明显,出现形态均一的细胞增殖集落,培养至 8 ~ 12 d,80 % 以上细胞趋于融合(图 1A),经胰酶消化后 1∶2 传代,传代细胞呈典型的成纤维细胞样形态(图 1B),分布均匀,生长 3 d 后传代。

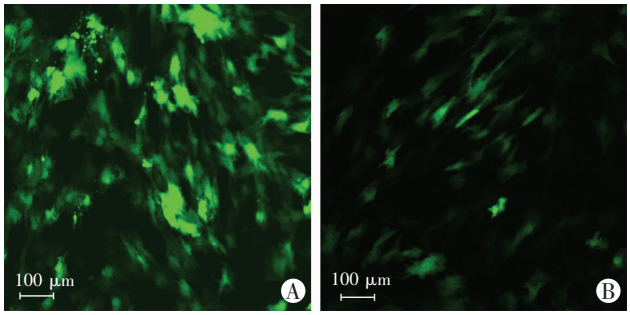


A:原代培养 5 d,大部分细胞呈圆形,少部分细胞呈梭形;B:培养至 3 代,大部分细胞呈长梭形

图 1 倒置显微镜观察 BMSCs 的培养 (×200)

2.2 慢病毒载体介导 GFP 感染 BMSCs

以 0、25、50、100、200、400 的 MOI 进行慢病毒转染 BMSCs 1 d 后,MOI 为 200 的感染组可见较弱的绿色荧光,其余组未见荧光;3 d 时,MOI 为 200 的感染组 GFP 表达明显增多,其余组仅少量表达;5 d 时 MOI 为 200 的感染组 GFP 表达达到高峰(图 2A),此后维持在较高水平,MOI 为 100 组及 MOI 为 400 组有较弱的绿色荧光(图 2B)。经流式细胞术分析,MOI 为 100、200 和 400 的感染组感染效率分别为(50.14 ± 5.35)%、(90.35 ± 7.25)% 和(78.68 ± 5.05)%。



A:MOI = 200;B:MOI = 100

图 2 倒置显微镜观察慢病毒载体介导 GFP 感染 5 d 后的 BMSCs

2.3 磁标记 BMSCs 的鉴定

SPIO 标记细胞普鲁士蓝染色可见细胞质内大量蓝色致密颗粒分布(图 3),BMSCs 的磁化标记有效率达 95% 以上,而未标记的 BMSCs 普鲁士蓝染色未观察到蓝染颗粒,呈阴性。透射电镜显示标记的 BMSCs 细胞质中有高密度的铁粒子密集,细胞质中存在的小囊泡状结构内摄入高密度的铁粒子(图 4)。

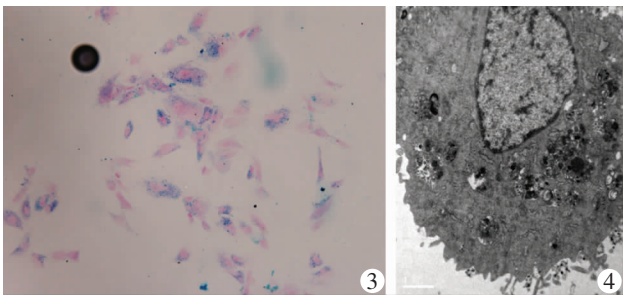


图 3 普鲁士蓝染色观察双标记 BMSCs (LM ×200)

图 4 透射电镜观察双标记 BMSCs (×10 000)

2.4 流式分析磁标记对 GFP 转染效率的影响

BMSCs 经 SPIO 标记后继续培养 3 d,经流式细胞术分析,MOI 为 200 的感染组感染效率为(90.58 ± 4.75)%,与标记前的(90.35 ± 7.25)% 相比并无明显差异(P > 0.05)。

2.5 MTT 法检测标记 BMSCs 的增殖活力

MTT 法测得 1 ~ 7 d 时单纯 GFP、单纯 SPIO 标记及双标记的 BMSCs 与未标记的 BMSCs D(590) 值比较无统计学差异(P > 0.05),绘制的生长曲线图亦无明显差异。表明用携带 GFP 基因的慢病毒和 SPIO 双标记 BMSCs 对其增殖活力无明显影响。

3 讨论

BMSCs来源于中胚层未分化的细胞,具有良好的体外扩增能力,且具有多向分化潜能,已成为体外构建组织工程软骨的重要种子细胞来源之一,许多实验表明移植入宿主体内的BMSCs能促进宿主体内缺损功能的修复[6-7]。目前困扰关节软骨组织工程技术临床应用的一个重要难题是对体内BMSCs在软骨缺损区的迁移、转归情况缺乏有效的识别和追踪监测手段,因而难以明确外源性BMSCs在软骨缺损修复中的作用和转归,体内新生软骨组织的细胞来源及细胞移植术的疗效等。因此亟需一种对体内BMSCs进行追踪和监测的安全、有效的手段,以促进组织工程软骨修复关节软骨缺损技术研究的深入。

目前追踪和监测活细胞的方法主要有基因标记法、磁标记法、5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)标记法、荧光染料标记法等。与其他标记方法相比,MRI示踪SPIO标记细胞方法具有显著的优越性,表现在:①不影响种子细胞生物学特性;②标记强度高;③标记时间长,能满足软骨缺损修复期的示踪;④非侵袭、无创、活体内直接动态示踪,适用于临床[8-9]。但它也存在一些亟待解决的问题:①干细胞增殖将稀释铁,导致磁标记强度降低,使MR的敏感性降低;②周围未标记的细胞吞噬死亡的标记细胞释放出的铁而产生假阳性;③磁标记BMSCs可被活体组织内的巨噬细胞和单核细胞吞噬而产生假阳性;④移植入组织内的标记干细胞产生的低信号与多种病理因素所致信号丢失产生的低信号难以区分[10]。上述问题可能影响磁共振示踪移植干细胞在活体内存活、分化情况等,因此,在干细胞移植过程中若能联合其他几种示踪方法,可以提高示踪效果。本实验证实通过分子克隆方法构建的GFP慢病毒载体和SPIO可以有效地标记体外分离培养的BMSCs。双标记BMSCs的增殖、分化活力与未标记BMSCs相比无改变,可以为进一步利用MRI活体示踪移植SPIO标记BMSCs在宿主体内的迁移,同时利用荧光显微镜从组织切片上观察到GFP标记BMSCs在宿主体内分布与转归分化奠定必要的实验基础,以建立一种新的细胞标记技术平台,为运用BMSCs移植治疗软骨缺损的研究提供了新方法。

本研究证明,细胞与SPIO共同孵育24 h后,光镜检查细胞内有普鲁士蓝染色呈蓝色的颗粒,电镜检查,表明含铁颗粒的囊泡位于细胞质中,说明标记成功;携带GFP基因的慢病毒转染BMSCs 1 d后在荧光显微镜下即可见GFP开始表达,3 d明显增加,5 d达顶峰,以后能稳定表达,说明GFP标记可行。而与未标记细胞相比,单纯GFP标记、单纯SPIO标记及双标记干细胞MTT测细胞增殖差异无统计学意义,说明了SPIO、GFP标记及适量双重标记均不影响BMSCs的增殖特性。研究发现利用本方法SPIO标记BMSCs的标记率达到了95%以上,单纯GFP标记在MOI为200时感染效率达90%以上;同时也设计验证了SPIO标记对GFP表达是否存在影响,发现单纯用GFP标记BMSCs GFP标记率与SPIO标记后GFP标记率并无明显差异($P>0.05$),说明两种标记方法之间并没有产生相互抑制作用。综上所述,双标记BMSCs方法是可行的,可能为干细胞移植治疗关节软骨缺损的研究奠定重要的实验基础。

参考文献:

[1] Koga H, Engebretsen L, Brinchmann J E, *et al*. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2009, 17(11): 1289-1297.

[2] Rogers W J, Meyer C H, Kramer C M. Technology insight: *in vivo* cell tracking by use of MRI[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006, 3(10): 554-562.

[3] Arbab A S, Bashaw L A, Miller B R, *et al*. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR Imaging[J]. Radiology, 2003, 229(3): 838-846.

[4] 段小军, 杨柳, 周跃, 等. 不同荧光蛋白标记技术对兔骨髓基质干细胞体外增殖的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(7): 731-734.

[5] Wang Z, Liu G, Sun J, *et al*. Self-assembly of magnetite nanocrystals with amphiphilic polyethylenimine: structures and applications in magnetic resonance imaging[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2009, 9(1): 378-385.

[6] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.

[7] 李忠, 杨柳. 骨组织工程学间充质干细胞研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(12): 766-768.

[8] Sykova E, Jendelova P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1049: 146-160.

[9] Brazelton T R, Blau H M. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells *in vivo*[J]. Stem Cells, 2005, 23(9): 1251-1265.

[10] 金旭红, 杨柳, 段小军, 等. 体外纳米磁标记骨髓间充质干细胞生物学特性及其MR成像[J]. 第三军医大学, 2008, 30(4): 275-279.

(**收稿**:2011-07-07;**修回**:2011-09-19)

(编辑 龙 亮)