

大鼠骨髓间充质干细胞的PKH26标记和示踪☆

彭 艳, 何援利, 朱少芳

Rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled and tracked with PKH26

Peng Yan, He Yuan-li, Zhu Shao-fang

Abstract

BACKGROUND: Labeling of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are important links to the research of differentiation and migration *in vivo*.

OBJECTIVE: To label the BMSCs with PKH26 and to explore the effect of PKH26 labeling on the biological activity, differentiation *in vitro* and tracking *in vivo*.

METHODS: BMSCs were isolated and cultivated from the bone marrow of rats. The passage 2 BMSCs were cultured and labeled with PKH26. The proliferation, cycle and apoptotic of cells in labeled group and unlabeled group were evaluated. The BMSCs in labeled group were performed with osteoblasts and lipoblasts induction *in vitro*. The PKH26-labeled BMSCs were transplanted through vein and the distribution of BMSCs in rat endometrium was observed under fluorescence microscope at 6 weeks after transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: The influence of PKH26-labelled cells on cell proliferation, apoptotic and cycle was not significant. And the labeled cells still had biological characteristics of osteoblasts and lipoblasts. In endometrium, PKH26-labelled cells were mainly distributed in epithelial cells and stromal cells. It suggested that the PKH26 labeling method could be used to study the homing, plasticity and transplantation of BMSCs.

Peng Y, He YL, Zhu SF. Rat bone marrow mesenchymal stem cells labeled and tracked with PKH26. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2487-2490. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞标记是体内迁移分化研究的重要环节。

目的: 对大鼠骨髓间充质干细胞进行 PKH26 标记, 探讨 PKH26 标记对骨髓间充质干细胞的生长特征、分化的影响及体内示踪情况。

方法: 培养扩增大鼠骨髓间充质干细胞, 第 2 代细胞按 PKH26 标记程序进行细胞标记, 观察标记组和未标记组细胞的增殖、周期和凋亡情况, 对标记组细胞行成骨成脂体外诱导分化。尾静脉移植 PKH26 标记细胞, 6 周后荧光显微镜观察骨髓间充质干细胞在子宫内膜的分布情况。

结果与结论: PKH26 标记对细胞增殖、凋亡和周期无明显影响, 不影响成骨成脂诱导分化。子宫内膜组织中 PKH26 标记阳性的细胞分布于腺上皮和间质细胞。PKH26 标记技术可用于示踪骨髓间充质迁移转归和干细胞移植方面的实验研究。

关键词: 细胞标记; PKH26; 骨髓间充质干细胞; 移植; 迁移转归

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.004

彭艳, 何援利, 朱少芳. 大鼠骨髓间充质干细胞的 PKH26 标记和示踪[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2487-2490. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Peng Yan☆, Studying for doctorate, Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China pengyansi@126.com

Corresponding author: He Yuan-li, Chief physician, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China yahoo.com.cn

Received: 2011-08-26
Accepted: 2011-09-30

0 引言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是定居于骨髓微环境中的一种成体干细胞, 具有自我增殖、多向分化的潜能, 已成为组织工程的理想种子细胞。近年有报道骨髓来源干细胞可能是子宫内膜干细胞的来源^[1-2]。BMSCs 是否可以迁移至子宫内膜参与生理性更新和损伤修复成为研究热点。标记示踪细胞是干细胞移植研究的重要环节。本实验采用 PKH26 对大鼠 BMSCs 进行标记示踪, 观察其对细胞形态、增殖、凋亡、周期、诱导分化等生物学特征的影响, 并通过大鼠尾静脉移植观察其在大鼠子宫内膜组织中的

迁移情况, 寻找一种长期稳定直观而又不影响细胞分化能力的标记示踪方法, 为研究大鼠 BMSCs 在子宫内膜组织中分化转归奠定实验基础。

1 材料和方法

设计: 观察对比性实验。

时间及地点: 于 2011-03/06 在南方医科大学珠江医院再生医学研究所完成。

材料: 近交系 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 8 只, 4~6 周龄, 60~90 g; Wistar 雌性大鼠 10 只, 8~12 周龄, 100~140 g, 由南方医科大学动物中心提供, 许可证号 scxk(粤): 2006-0015。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

南方医科大学珠江医院妇产科, 广东省广州市 510282

彭艳☆, 女, 1978年生, 江苏省海门市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 主要从事子宫内异位症及干细胞的研究。
pengyansisi@126.com

通讯作者: 何援利, 主任医师, 教授, 南方医科大学珠江医院妇产科, 广东省广州市 510282
heyuanli310@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02487-04

收稿日期: 2011-08-26
修回日期: 2011-09-30
(20110720014/D·C)

主要试剂:

试剂	来源
DMEM-F12 培养基、胰蛋白酶	Hyclone 公司
胎牛血清	Gibco 公司
PKH26 试剂盒	Sigma 公司
CCK-8 试剂盒	同仁化学公司

方法:

BMSCs的分离、培养及扩增^[3-4]: 用3.6%的水合氯醛腹腔注射麻醉Wistar雄性大鼠后, 无菌条件下取出胫骨和股骨, 用DMEM-F12培养基冲洗骨髓腔, 得到细胞悬液, 转入离心管以1 000 r/min离心5 min, 倒去上清液, 沉淀用含体积分数10%胎牛血清的DMEM-F12培养基10 mL(添加青霉素100 U/mL、链霉素100 g/mL)混匀后, 各取5 mL接种于75 mL (25 cm²)培养瓶中, 置于37 ℃、体积分数5%CO₂培养箱中恒温培养。3 d后去除未贴壁细胞, 三四天换液1次。细胞80%融合时, 0.25%胰酶室温消化, 用含体积分数10%胎牛血清的培养液终止消化反应, 用吸管轻轻吹打瓶壁细胞, 促进细胞脱壁。转入离心管1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 细胞沉淀按1:3比例传代扩增培养。

BMSCs免疫表型分析: 取第2代的大鼠BMSCs制成单细胞悬液, 流式细胞仪检测CD34、CD44、CD45、CD29的表达。

PKH26标记BMSCs: 胰酶消化第2代大鼠BMSCs形成单细胞悬液, 取2×10⁷细胞于锥形离心管中, 用无血清培养基洗1次, 400 g离心5 min形成松散的细胞团。吸去上清, 细胞团上剩余液体小于25 μL。根据试剂盒说明书加1 mL稀释液C, 重悬细胞保证完全分散, 别震荡。染色前, 准备4×10⁻⁶ mol/L的PKH26染液(用稀释液C稀释)置于离心管中。尽快加1 mL的2×细胞到1 mL的2×染料, 立即用吸管均匀快速混合样品, 因为均匀的染色是在瞬间发生的。25 ℃孵育2~5 min, 定时轻轻颠倒离心管保证在25 ℃充分混匀。加入等量血清中止染色反应, 孵育1 min, 用等量含血清培养基稀释中止的反应液。25 ℃ 400 g离心10 min, 去上清。细胞团转入新试管中, 洗3次。加10 mL完全培养基, 离心, 重新悬置细胞到所需浓度, 荧光显微镜下观察细胞染色情况。随机选取5个视野, 计算标记率(暗视野下红色荧光细胞数/明视野下细胞总数), 平均值即为PKH26的即时标记率。留取部分细胞培养观察细胞复苏情况。

细胞增殖能力观察: 取第3代的未标记细胞和已标记细胞应用CCK-8试剂盒检测增殖能力, 连续检测7 d。

细胞凋亡及细胞周期检测: 收集第3代的未标记细胞和已标记细胞, 使用PI染色法检测细胞周期, Annexin-V法检测凋亡率。

BMSCs成骨成脂诱导及鉴定: 取第2代大鼠BMSCs进行PKH26荧光标记, 以2×10⁵个分别接种于25 cm²培养瓶内进行成骨和成脂诱导, 当细胞达到80%融合后将培养液更换诱导培养液。成骨诱导培养液成分为: 含体积分数10%胎牛血清的DMEM-F12培养基, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠, 0.05 mmol/L维生素C, 100 mmol/L地塞米松。每3 d更换诱导培养液, 诱导14 d后茜素红染色, 倒置显微镜下观察染色情况。成脂诱导培养液成分为: 含体积分数10%胎牛血清的DMEM-F12培养基, 1 μmol/L地塞米松, 0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤, 0.2 mmol/L吡啶美辛, 10 μmol/L胰岛素。每3 d更换诱导培养液, 诱导14 d后油红O染色, 倒置显微镜下观察染色情况。

PKH26标记的BMSCs在大鼠子宫内组织中的迁移分布: 实验组5只雌性大鼠尾静脉注射1×10¹⁰ L⁻¹PKH26标记的BMSCs 1 mL。对照组5只雌性大鼠尾静脉注射生理盐水1 mL。移植后6周, 取大鼠子宫冰冻切片后4, 6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染核, 荧光显微镜观察PKH26标记的BMSCs在子宫内组织的分布情况。

主要观察指标: ①BMSCs的鉴定。②PKH26标记细胞结果。③PKH26对细胞增殖、凋亡和周期的影响。④PKH26标记细胞的体外成骨成脂诱导分化情况。⑤标记细胞在子宫内膜的分布。

统计学分析: 用SPSS 13.0统计软件进行分析。计量资料用t检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs形态观察及生长情况 原代细胞接种后24 h, 部分细胞贴附于瓶底, 形态不规则, 细胞边缘呈小锯齿状。72 h后绝大部分细胞贴壁, 呈短梭形、多角形, 并有小集落形成。培养6~9 h后, 细胞生长融合成片, 铺满瓶底的80%, 可进行细胞的首次传代。经消化传代培养的细胞生长迅速, 3~5 h铺满瓶底的80%, 形

态趋于一致, 多为长梭状, 排列有序, 见图1。



Figure 1 Passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells (×200)
图1 第2代大鼠骨髓间充质干细胞(×200)

2.2 BMSCs表面标志的测定 培养至第2代, 99.86%的细胞CD29阳性, 99.49%的细胞CD44阳性, 而仅有2.16%的细胞CD34阴性, 1.26%的细胞CD45阴性, 证实为BMSCs, 见图2。

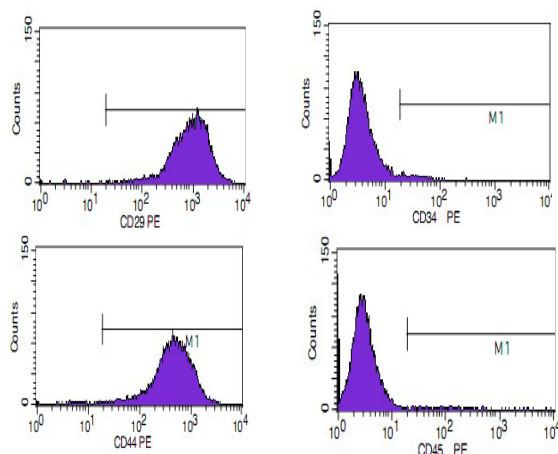


Figure 2 Flow cytometry analysis of passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells surface markers
图2 第2代骨髓间充质干细胞表面标志流式细胞仪检测结果

2.3 BMSCs标记结果 PKH26染色的大鼠BMSCs标记率达100%, 染料在细胞膜上分布均匀, 在倒置荧光显微镜下呈红色荧光, 细胞轮廓清晰, 见图3a。继续培养24 h后荧光显微镜下观察呈红色, 见细胞贴壁、形态及生长状态良好, 见图3b。

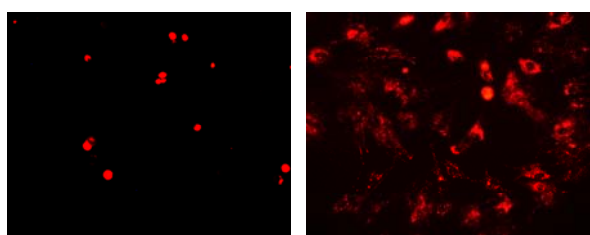


Figure 3 Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) labeled with PKH26 (×200)
图3 PKH26 标记骨髓间充质干细胞(×200)

2.4 BMSCs标记组和未标记细胞增殖能力的检测 两

组细胞各时间点的吸光值差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图4。

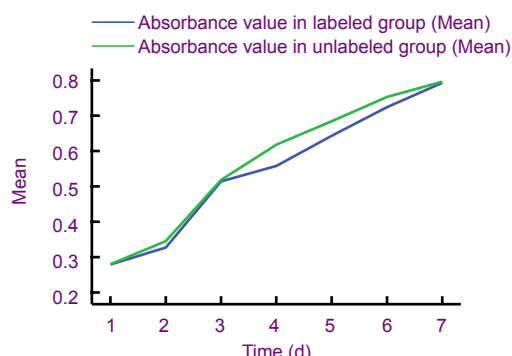


Figure 4 Growth curves of labeled and unlabeled bone marrow mesenchymal stem cells
图4 标记组与未标记组细胞生长曲线的比较

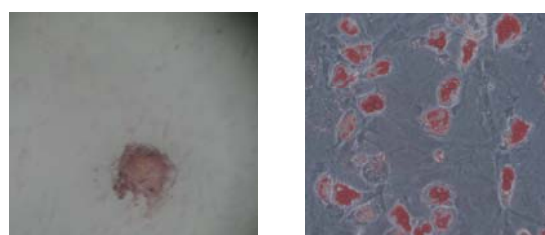
2.5 BMSCs标记组和未标记组的细胞凋亡检测 标记组与未标记组的细胞凋亡率分别(1.60 ± 0.30)%, (1.41 ± 0.21)%, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.6 BMSCs标记组和未标记组细胞的周期检测 大部分细胞处于静止期及DNA合成前期($G_0 \sim G_1$ 期), 只有少数处于DNA复制期(S期)、DNA合成后期及有丝分裂期($G_2 \sim M$ 期)。两组细胞各期的细胞比例差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 标记组与未标记组细胞的生长周期比较
Table 1 Comparison of growth cycles in labeled and unlabeled groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Percentage of cells (%)		
	$G_0 \sim G_1$	S	$G_2 \sim M$
Labeled	94.41 ± 0.34	2.18 ± 0.34	3.40 ± 0.30
Unlabeled	94.30 ± 0.29	1.97 ± 0.91	3.72 ± 0.21

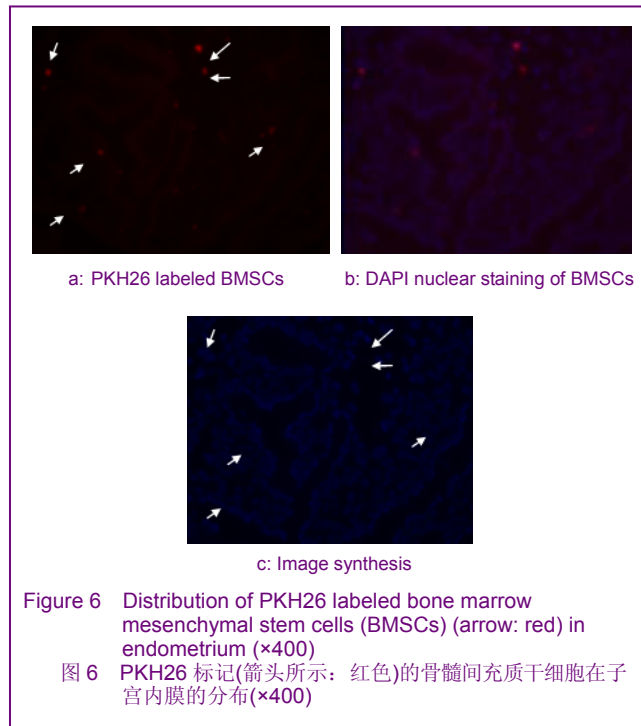
2.7 成骨成脂诱导及鉴定 成骨诱导后3 d, 细胞逐渐变成短梭形, 约10 d形成结节样结构, 诱导第14天茜素红染色为阳性, 见图5a。成脂诱导后3 d, 细胞回缩变为多角形, 内可见小脂滴, 诱导第14天油红O染色可见细胞内脂肪滴染色呈阳性, 见图5b。



a: Alizarin red staining after osteogenic induction
b: Oil red O staining after adipogenic induction

Figure 5 Osteogenic and adipogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells and identification by PKH26 (×200)
图5 PKH26 标记骨髓间充质干细胞的成骨成脂诱导及鉴定 (×200)

2.8 BMSCs移植后在大鼠子宫内膜组织中的分布 大鼠尾静脉移植BMSCs, 6周后荧光显微镜观察可见PKH26标记的BMSCs呈红色荧光, 可散在分布于子宫内膜的间质和腺上皮中, 见图6。对照组子宫内膜未见红色荧光。



3 讨论

BMSCs在组织工程中具有广阔的应用前景。间充质干细胞移植首先遇到的困难之一是如何标记移植细胞, 示踪其存活、生长、分化等的过程^[5-8]。目前已建立了较多的细胞标记技术, 包括BrdU标记、DAPI标记、GFP标记技术、Y 染色体标记、磁性标记技术等等。但是这些技术还存在一些问题。BrdU 的标记率不高且标记细胞凋亡或死亡后释放的BrdU则可掺入处于细胞周期S期的任何细胞, 难以区分移植细胞和宿主细胞, 假阳性高^[9]。DAPI标记时细胞分裂会导致DAPI淬灭, 示踪时间短。GFP 标记存在着转染效率不高以及转染后阳性克隆难以扩增^[10]。Y 染色体标记检测试剂价格昂贵^[11]。磁性标记技术对试剂和检测设备要求较高^[12]。因此, 需要寻找一种有效、稳定、实用的细胞标记技术示踪BMSCs在体内的迁移情况。

PKH26是一种亲脂性荧光染料, 与细胞膜发生不可逆性结合, 对细胞进行荧光标记, 其在551 nm波长处可被激发红色荧光。随着细胞分裂, 标记物也随之等份的分配给子细胞。PKH26标记的细胞移植后不会从死亡或凋亡的细胞中释放出来, 能够很好地区分移植细胞和宿

主细胞, 形成精确的荧光标记, 在体内甚至有标记神经干细胞超过1年的记录^[13]。目前广泛用于动物、植物细胞和其他含颗粒胞膜的标记, 细胞毒副作用不明显。本实验中PKH26标记不影响BMSCs的细胞增殖、凋亡和细胞周期, 仍保持其多分化潜能, 成为研究干细胞迁移示踪的理想工具。移植后6周在子宫内膜组织可见PKH26标记的BMSCs散在分布于间质和腺上皮, 有效示踪BMSCs在子宫内膜组织的迁移情况, 为其在子宫内膜组织中的分化转归研究提供有效途径。相对于其他标记方法, PKH26标记效率高、细胞毒性小、不影响细胞生长特性和分化、荧光保存的时间比较长、标记和观察都方便易行, 费用低廉且不会因为染料渗漏到周围细胞造成检测的假阳性。

综上所述, PKH26是BMSCs有效的标记方法, 稳定示踪在体内中的迁移情况, 为研究BMSCs在体内的分化转归等研究奠定基础。

4 参考文献

- [1] Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. 2007;25(8): 2082-2086.
- [2] Ikoma T, Kyo S, Maida Y, et al. Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(6): 608: e1-8.
- [3] Deng XL, Lau CP, Lai K, et al. Cell cycle-dependent expression of potassium channels and cell proliferation in rat mesenchymal stem cells from bone marrow. *Cell Prolif*. 2007;40(5):656-670.
- [4] Liu Y, Zhang X, Dai Y, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on learning and memory functional recovery in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2008;46(9):648-653.
- [5] Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-156.
- [6] Yoon YS, Wecker A, Heyd L, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005;115(2): 326-338.
- [7] Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germ line, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res*. 2002; 69(6):908-917.
- [8] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. *Transplantation*. 2006;82(2):170-174.
- [9] Burns TC, Ortiz-González XR, Gutiérrez-Pérez M, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. *Stem Cells*. 2006;24(4):1121-1127.
- [10] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002;297(5590):2256-2259.
- [11] O'Leary MT, Blakemore WF. Use of a rat Y chromosome probe to determine the long-term survival of glial cells transplanted into areas of CNS demyelination. *J Neurocytol*. 1997;26(4):191-206.
- [12] Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(8):899-907.
- [13] Modo M, Beech JS, Meade TJ, et al. A chronic 1 year assessment of MRI contrast agent-labelled neural stem cell transplants in stroke. *Neuroimage*. 2009;47 Suppl 2: 133-142.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 设计为彭艳、何援利, 实施为彭艳, 评估为朱少芳。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。
