

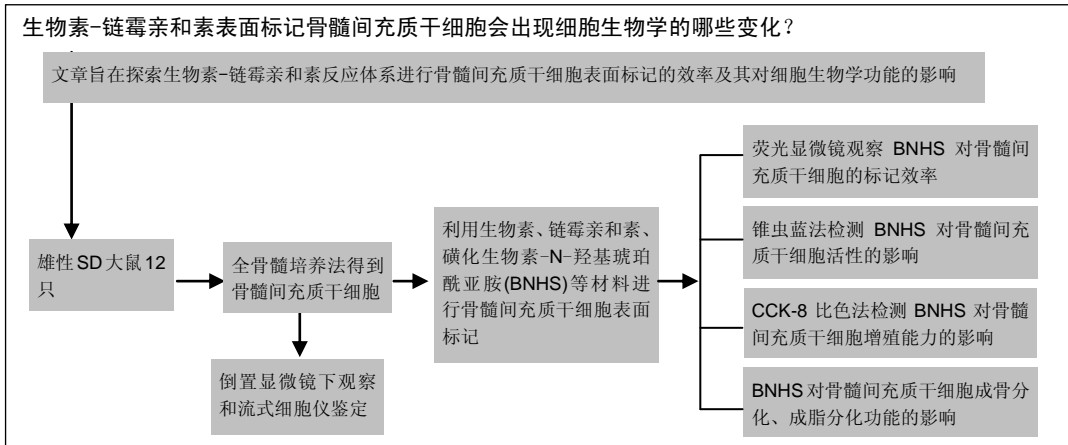
利用生物素-链霉亲和素进行骨髓间充质干细胞的表面标记

杨林¹, 罗富里², 李赞¹, 文君¹, 徐洋³(¹江西省人民医院肾脏内科, 江西省肾脏病重点实验室, 江西省南昌市 330006; ²江西中医药大学附属医院肾病科, 江西省南昌市 330000; ³南昌大学医学院, 江西省南昌市 330000)

引用本文: 杨林, 罗富里, 李赞, 文君, 徐洋. 利用生物素-链霉亲和素进行骨髓间充质干细胞的表面标记[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(10):1382-1388.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.10.002 ORCID: 0000-0002-9556-3302 (杨林)

文章快速阅读:



杨林, 男, 1961年生, 江西省九江市人, 汉族, 2005年获美国 ECFMG 医学博士同等学历证书, 主任医师, 主要从事肾脏疾病相关研究。

并列第一作者: 罗富里, 男, 1988年生, 江西省上栗县人, 汉族, 2015年南昌大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事肾脏疾病方面研究。

通讯作者: 李赞, 主任医师, 江西省人民医院肾脏内科, 江西省肾脏病重点实验室, 江西省南昌市 330006

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)10-01382-07

稿件接受: 2016-01-18

http://www.crter.org

文题释义:

生物素-亲和素系统: 是20世纪70年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。随着各种生物素衍生物问世, BAS很快被广泛应用于医学各领域。近年大量研究证实, 生物素-亲和素系统几乎可与目前研究成功的各种标记物结合。生物素与亲和素之间高亲和力的牢固结合以及多级放大效应, 使生物素-亲和素系统免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。它已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。

亲和素(或链霉亲和素)的标记作用: 几乎所有用于标记的物质均可以同亲和素或链霉亲和素结合。亲和素或链霉亲和素均为大分子蛋白, 其与酶的标记结合物的制备除可用普通酶标记蛋白质分子直接标记法外, 由于其特有的与生物素结合的性能, 还可以通过与生物素化酶复合物中的生物素结合, 间接地与酶形成结合物。链霉亲和素因表面所带正电荷少, 且不含糖基, 在实验中的非特异性结合远低于亲和素, 因此目前以链霉亲和素标记的酶结合物更为常用。

摘要

背景: 目前尚缺乏高效、无创的方式将干细胞植入靶器官, 探索引导干细胞到达靶器官或组织的途径以及提高干细胞归巢效率是现今干细胞研究的重点领域之一。

目的: 利用生物素-链霉亲和素反应体系建立一种简单可行的细胞表面化学修饰方法, 并评价此方法进行骨髓间充质干细胞表面标记的效率及其对细胞生物学功能的影响。

方法: 全骨髓培养法得到第3代骨髓间充质干细胞, 采用流式细胞仪鉴定; 以碘化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺、生物素、链霉亲和素将黏附分子配体唾液酸化的路易斯抗原装备到骨髓间充质干细胞表面; 通过荧光显微镜评估骨髓间充质干细胞表面标记的效率, 锥虫蓝染色法检测骨髓间充质干细胞的活性, CCK-8比色法检测骨髓间充质干细胞的增殖功能; 成脂、成骨诱导检测骨髓间充质干细胞多分化功能。

结果与结论: ①全骨髓培养法培养2周, 可得到第3代骨髓间充质干细胞, 细胞表达CD90, CD29, 不表达CD34和CD45。②以生物素及链霉亲和素成功将黏附分子配体唾液酸 LewisX(SleX)装备到骨髓间充质干细胞表面, 且对细胞活性、增殖、分化功能影响不大。③运用这种方法对细胞进行表型修饰, 操作技术简单, 修改效率可达88%, 有望提高骨髓间充质干细胞的归巢率, 未来会有广泛和重要的应用价值。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 生物素-链霉亲和素; 骨髓间充质干细胞; 碘化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺; 唾

Yang Lin, M.D., Chief physician, Department of Nephrology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Kidney Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Luo Fu-li, Master, Physician, Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Yang Lin and Luo Fu-li contributed equally to this work.

Corresponding author: Li Yun, Chief physician, Department of Nephrology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Kidney Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

液酸化的路易斯抗原; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 生物素; 琥珀酰亚胺类; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81260115); 江西省自然科学基金资助项目(20122BAB205005)

缩略语:

磺化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺: biotin N-Hydroxysuccinimide, BNHS

Surface labeling of bone marrow mesenchymal stem cells by biotin-streptavidin

Yang Lin¹, Luo Fu-li², Li Yun¹, Wen Jun¹, Xu Yang³ (¹Department of Nephrology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Kidney Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China; ²Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China; ³Nanchang University School of Medicine, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Currently, there is a lack of efficient, non-invasive way to transplant stem cells to the target organ or tissue. Exploring a way to guide targeting transplantation of stem cells and to improve the efficiency of stem cell homing is now one of focuses in the field of stem cells research.

OBJECTIVE: To establish a simple and feasible method to chemically modify the cell surface using biotin-streptavidin reaction system, and to evaluate the efficiency of this method to label bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and its effects on cell biological functions.

METHODS: Passage 3 BMSCs were obtained by whole bone marrow culture method and verified by flow cytometry. Biotin, streptavidin, sulfonated biotin-N-hydroxy-succinimide were used to equip the adhesion molecule ligand, sialyated LewisX (SLeX), to the BMSCs surface. The labeling rate of BMSCs was assessed using fluorescence microscope, the vitality of BMSCs was evaluated by trypan blue staining, and the proliferation of BMSCs was evaluated by cell counting kit-8 assay. Adipogenic and osteogenic inductions were used to evaluate the effect of the method on the multi-differentiation function of BMSCs.

RESULTS AND CONCLUSION: After culture for 2 weeks, passage 3 BMSCs were obtained and confirmed by expressing CD90, CD29 and lack of CD34, CD45. Biotin, streptavidin, sulfonated biotin-N-hydroxy-succinimide were successfully used to equip sialyated LewisX (SLeX) to the BMSCs surface and had minor effects on the vitality, proliferation, and differentiation of BMSCs. This method was simple for surface modification and had a high modification rate of 88%. The homing of BMSCs modified by this method to the target organ or tissue could be greatly enhanced. Therefore, this method potentially could have extensive and important applications.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Biotin; Succinimides; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81260115; the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 20122BAB205005

Cite this article: Yang L, Luo FL, Li Y, Wen J, Xu Y. Surface labeling of bone marrow mesenchymal stem cells by biotin-streptavidin. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(10):1382-1388.

0 引言 Introduction

间质干细胞,也称为多能间充质基质细胞,是具有自我更新和多向分化能力的细胞,它存在于几乎所有的器官和组织^[1]。间质干细胞可以根据实验或治疗的预期目的,从脂肪组织、脐血、骨骼和其他组织分离获得^[2]。间质干细胞分离方便、缺乏免疫原性,具有多分化性,这些特性为间质干细胞移植治疗的研究奠定了理论基础。干细胞治疗的效果受到多种因素的影响和限制,其中在体内条件下低植入(归巢)率是高效使用干细胞治疗的主要障碍^[3]。如何将干细胞有效地输送到靶器官是当前面临

的一项巨大挑战。

探索引导干细胞到达靶器官或组织的途径以及提高干细胞归巢效率是现今干细胞研究的重点领域之一。目前白细胞向炎症部位的归巢研究已较全面^[4]。归巢是一个级联事件。最初,在靶组织,流动的细胞和血管内皮细胞之间产生能抵抗流体剪切力的黏附作用,这个过程是由循环细胞所表达的黏附分子配体和内皮细胞表面的黏附分子所介导,黏附作用使循环细胞在内皮细胞表面滚动进而栓停,下一步通常是趋化因子激活的整合素介导的黏附及牢固黏附,最后是外渗出血管^[5]。

骨髓间充质干细胞静脉输注后归巢比例相对较小, 最低仅3%, 最高才22%^[6-8]。研究提示骨髓间充质干细胞在体外培养过程中其表面的黏附分子表达下调, 这可能是其归巢能力低下的关键原因^[9-11]。

有研究报道磺化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺(BNHS)中的N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)与细胞表面游离的氨基进行共价结合后可提供链霉亲和素的结合位点, 利用生物素-链霉亲和素反应体系可以将细胞黏附分子配体添加到细胞表面以提高干细胞的归巢率^[12], 这种化学方法进行细胞表面修改的步骤如下: 首先用磺化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺处理细胞并在细胞表面引入生物素; 第2步, 链霉亲和素结合细胞表面的生物素同时提供未结合的位点; 第3步, 生物素化的黏附分子配体唾液酸LewisX(sialyl-LewisX, SleX)通过链霉亲和素未结合的位点被装备到细胞表面(图1)。作者以大鼠骨髓间充质干细胞为实验对象, 以磺化生物素-N-羟基琥珀酰亚胺、生物素、链霉亲和素为材料, 将黏附分子配体SLeX装备到骨髓间充质干细胞表面, 制备了“化学工程细胞”(图1), 并证实了化学表面修改的效率及其对细胞生物学特性的影响。该方法为促进骨髓间充质干细胞归巢的体内实验奠定了研究基础, 在国内尚未见报道, 现报道如下。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察。

1.2 时间及地点 于2013年4月至2014年3月在江西省人民医院干细胞重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 2周龄的雄性SD大鼠12只, 体质量约50 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, SPF/VAF级, 许可证号SCXK(湘)2011-0003。

1.3.2 主要试剂和仪器 F12-DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司), 大鼠骨髓间充质干细胞成骨培养基、大鼠骨髓间充质干细胞成脂培养基(美国Cyagen公司), 大鼠抗CD34、CD90、CD29、CD45(美国Abcam公司), 罗丹明-链霉亲和素(美国Thermo公司), 生物素化的唾液酸化路易斯抗原(美国Glycotech公司), 生物素(美国Sigma公司), 茜素红染液、油红O染液(武汉谷歌试剂公司), 荧光显微镜、倒置相差显微镜(德国Leica公司), 超净工作台(苏宁集团安泰公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞分离、体外扩增、鉴定 2周

龄雄性SD大鼠脱臼处死, 体积分数为75%乙醇浸泡5 min, 迅速游离双侧后肢股骨和胫骨。用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基冲洗骨髓腔, 反复吹打混匀后将冲洗液移入25 cm²细胞培养瓶中, 于37 °C、体积分数为5% CO₂条件下培养, 24 h后半量换液, 48 h后全量换液。待第3代骨髓间充质干细胞培养到80%–90%汇合时, 采用流式细胞术鉴定细胞表面标志物表达: 胰酶消化细胞, 37 °C孵育2 min, 以1倍胰酶体积的含体积分数为10%胎牛血清的培养液终止消化, 培养瓶中液体转移至15 mL离心管, 1 000 r/min离心5 min, 小心弃上清。使用冰PBS重悬细胞, 光学显微镜下细胞计数, 调整细胞浓度至1×10¹⁰ L⁻¹。在流式上样管中加入49 μL上述细胞悬液和1 μL荧光标记的单克隆抗体(CD29、CD90、CD34、CD45), 37 °C避光孵育30 min, 离心去上清液, PBS清洗2次, 加入500 μL PBS重悬细胞, 振荡混匀后流式细胞仪上以PE或FITC激发, 检测阳性细胞比率。

1.4.2 利用生物素-链霉亲和素进行骨髓间充质干细胞表面标记 简化流程图见图1。①取第3代骨髓间充质干细胞胰酶消化后以5×10⁵细胞数接种到25 cm²细胞培养瓶, 置37 °C, 体积分数为5% CO₂培养箱过夜以便细胞附着。②移去培养瓶中培养液, PBS清洗细胞后加1 mL BNHS溶液, 37 °C孵育10 min。③移去BNHS溶液, PBS清洗细胞以移去非特异性结合的BNHS, 加1 mL 50 mg/L链霉亲和素, 37 °C孵育10 min。④移去链霉亲和素溶液, PBS清洗细胞以移去未反应及非特异性结合的链霉亲和素, 加1 mL 5 mg/L生物素化唾液酸LewisX(sialyl-LewisX-PAA-Biotin, BSLex)溶液, 37 °C孵育10 min。⑤移去BSLex溶液, 用PBS清洗细胞。⑥收获细胞: 每25 cm²培养瓶中加入1 mL非酶细胞松解液, 于37 °C孵育5 min, 轻轻吹打细胞后, 将细胞悬液移至离心管, 室温下以1 500 r/min离心3 min。⑦移去上清液, 用1 mL培养液再悬浮细胞, 光学显微镜下细胞计数后用于后续检测。

1.4.3 荧光显微镜观察BNHS对骨髓间充质干细胞的标记效率 ①接种5×10³骨髓间充质干细胞到96孔板, 并加入10 μL DMEM/F12, 置37 °C, 体积分数为5% CO₂培养箱3–12 h待细胞贴壁。②移去培养液, 用PBS洗细胞, 加入100 μL 1 mmol/L BNHS溶液, 室温下孵育10 min。同时设立两个对照组(PBS+链霉亲和素组和生物素+链霉亲和素组), 分别用100 μL PBS和100 μL 1 mmol/L生物素溶液, 室温孵育10 min。③移去BNHS、

PBS、生物素溶液, 用PBS清洗细胞以移去未反应的BNHS。④为了验证细胞表面是否被BNHS、生物素标记或直接被链霉亲和素标记, 在96孔板中加入50 μL 罗丹明-链霉亲和素(罗丹明-S), 在避光的条件下孵育10 min。⑤移去罗丹明-链霉亲和素溶液后, 用PBS洗板2次。⑥每孔中加入100 μL DAPI染液, 避光孵育5 min, 移去DAPI溶液后, 用PBS洗板2次, 洗去未反应的和非特异性结合的DAPI。⑦96孔板每孔加入100 μL DMEM/F12, 置37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5% CO_2 培养箱培养10 min。⑧通过荧光显微镜激发波长, 发射波长630 nm观察红色荧光, 同一视野条件下激发波长, 发射波长340 nm观察蓝色荧光, 均保存图片。⑨结果分析: 用Photoshop将同一视野下蓝色荧光和红色荧光图片进行叠加, 标记成功率=蓝色荧光周围红色荧光细胞数/蓝色荧光细胞数, 计算过程采用Image pro-Plus 5.1。

1.4.4 锥虫蓝法检测BNHS对骨髓间充质干细胞活性的影响 BNHS处理细胞组加1 mmol/L的BNHS溶液1 mL, 室温下孵育10 min, 同样方法用PBS和生物素溶液处理细胞作为对照组(PBS处理组和生物素处理组)。将上述各组细胞制备单细胞悬液, 将90 μL 细胞悬液和10 μL 锥虫蓝染液混匀后, 倒置显微镜下血球计数板计数, 计算活细胞和死细胞数(着色细胞)。各组细胞在24, 48 h行细胞活性检测, 细胞活力(%)=(细胞总数-着色细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.4.5 CCK-8比色法检测BNHS对骨髓间充质干细胞增殖能力的影响 ①0.25%胰酶消化生长状态良好的第3代骨髓间充质干细胞, 以同样的密度将骨髓间充质干细胞接种于3个25 cm^2 培养瓶, 同步化24 h。②BNHS处理细胞: 加1 mmol/L的BNHS溶液1 mL, 室温下孵育10 min, 同样方法用PBS和生物素溶液处理细胞作为对照组。③铺板: 处理完细胞后, 用0.25%胰酶消化细胞, 以 $5 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度将细胞接种于96孔板中, 每孔中加入200 μL DMEM/F12。每组设12, 24, 48, 72 h 4个时间点, 每组各时间点均设4个复孔。④比色: BNHS组, PBS组和生物素组分别培养12, 24, 48, 72 h取出相应的96孔板, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 置37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5% CO_2 培养箱2 h后, 于450 nm波长下检测各孔的吸光度值。

1.4.6 骨髓间充质干细胞成骨、成脂诱导分化及鉴定 按上述方法用BNHS处理第3代骨髓间充质干细胞, 对照组采用PBS处理, 两组均进行成骨、成脂分化潜能鉴定。取处理好的细胞, 用胰酶消化后制成细胞悬液,

按 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种在无菌的盖玻片上, 置于6孔培养皿中用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养液进行培养。①成骨诱导分化及鉴定步骤: 培养待细胞融合到80%左右使用成骨诱导液进行成骨细胞定向诱导分化, 每3 d换液1次。诱导至第3周, 显微镜下观察可见黑色结节时, 取出盖玻片, PBS冲洗细胞后用950 g/L多聚甲醛固定10 min, 茜素红染液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 弃去染料, 蒸馏水充分冲洗。中性树胶封固, 光学显微镜观察摄片。②成脂诱导分化及鉴定: 按上述方法接种、培养细胞, 待细胞长满板孔后使用成脂诱导液培养3 d, 然后换维持液培养1 d, 再换诱导培养液培养3 d, 进行2个循环后, 转为诱导液培养7 d。显微镜下观察有成串脂滴形成后, 取出盖玻片, PBS冲洗细胞后, 用950 g/L多聚甲醛固定10 min, 油红O染色液染色10 min, 弃去染料, 蒸馏水充分冲洗, 光学显微镜观察摄片。

1.5 主要观察指标 ①流式细胞仪进行骨髓间充质干细胞免疫表型鉴定。②荧光显微镜下观察BNHS进行骨髓间充质干细胞表面标记的效率。③BNHS对骨髓间充质干细胞活性的影响。④BNHS对细胞的活性、增殖、成骨分化、成脂分化功能的影响。

1.6 统计学分析 用SPSS 19.0软件进行数据分析, 正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较运用独立样本 t 检验。计数资料应用构成比表示, 运用 χ^2 检验; P 值采用双尾分布, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的原代培养、扩增与鉴定结果 原代细胞接种于培养瓶后, 倒置显微镜下观察可见大量圆形悬浮细胞, 少量贴壁细胞, 24 h半量换液后可去除大量悬浮细胞, 48 h后全量换液, 10 d左右可见细胞呈长梭形, 集落式生长, 待细胞长满融合到90%, 按1:2传代。随着换液次数增多, 细胞得到纯化, 待培养到第3代后进行流式细胞仪鉴定。流式细胞仪鉴定结果符合骨髓间充质干细胞表型, 结果如下: CD90阳性表达率为99.9%, CD29阳性表达率为99.8%, CD34阳性表达率为0.1%, CD45阳性表达率为0%。

2.2 荧光显微镜下观察BNHS进行骨髓间充质干细胞表面标记的效率 DAPI将骨髓间充质干细胞细胞核染成蓝色, DAPI标记率近100%, 骨髓间充质干细胞形态仍为长梭形, 细胞形态良好。处理后的图片可观察到BNHS+链霉亲和素组骨髓间充质干细胞蓝色荧光被大

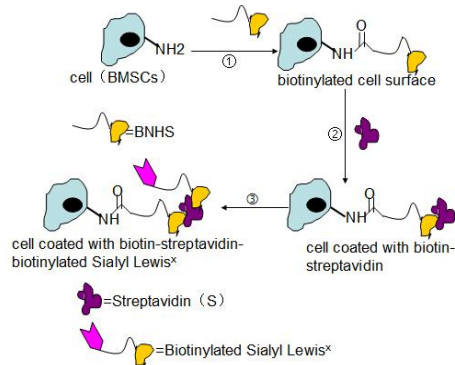


图 1 使用生物素和链霉亲和素对骨髓间充质干细胞进行表面标记
Figure 1 Surface labeling of bone marrow mesenchymal stem cells by biotin-streptavidin

图注: ①BNHS 与细胞表面氨基结合。②链霉亲和素和生物素结合。③生物素化的 SLeX 与链霉亲和素未结合的位点结合。

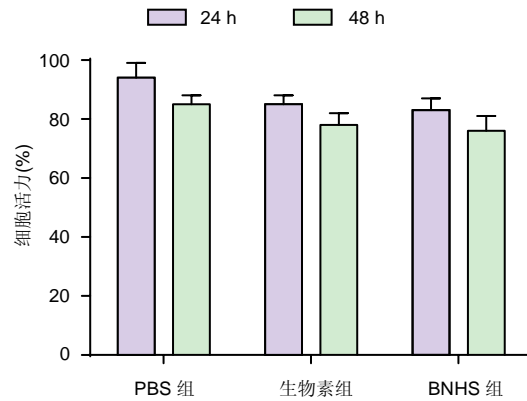


图 3 骨髓间充质干细胞经 BNHS 处理后 24 h 和 48 h 的细胞活力

Figure 3 Viability of bone marrow mesenchymal stem cells 24 or 48 hours after BNHS labeling

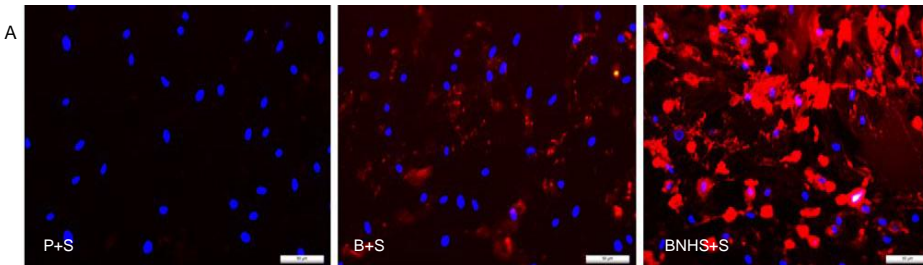


图 2 BNHS 进行骨髓间充质干细胞标记的效果

Figure 2 BNHS labeling of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为带罗丹明荧光的链霉亲和素(S)检测骨髓间充质干细胞的标记效率($\times 400$); B 为各组骨髓间充质干细胞标记百分率。BNHS+S: 骨髓间充质干细胞用 BNHS 处理; B+S, 骨髓间充质干细胞用生物素处理, P+S: 骨髓间充质干细胞用 PBS 处理。

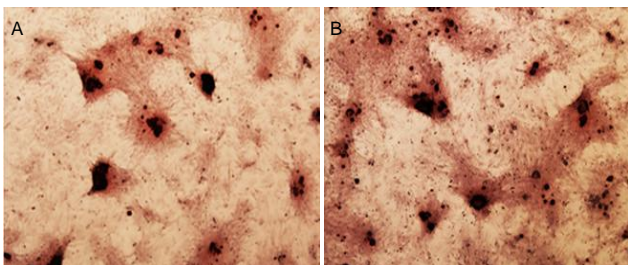


图 5 BNHS 标记或 PBS 处理的骨髓间充质干细胞经成骨诱导分化后进行茜素红染色($\times 400$)

Figure 5 Osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells labeled with BNHS (B) or treated with PBS (A) (alizarin red staining, $\times 400$)

图注: 茜素红染色显示骨髓间充质干细胞能分化为成骨细胞并产生矿化结节。PBS 处理的骨髓间充质干细胞(A)和 BNHS 处理的骨髓间充质干细胞(B)染色结果相同。

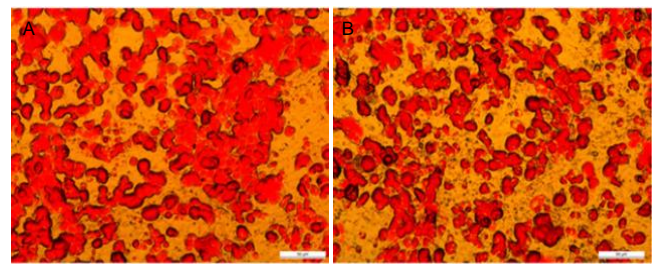


图 6 BNHS 标记或 PBS 处理的骨髓间充质干细胞经成脂诱导分化后进行油红 O 染色($\times 400$)

Figure 6 Adipogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells labeled with BNHS (B) or treated with PBS (A) (oil red O staining, $\times 400$)

图注: 油红 O 染色显示骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞并产生脂肪。PBS 处理的骨髓间充质干细胞(A)和 BNHS 处理的骨髓间充质干细胞(B)染色结果相同。

量红色荧光包绕, 荧光强度大。而生物素+链霉亲和素组红色荧光范围和强度明显比BNHS+链霉亲和素组弱, PBS+链霉亲和素组细胞基本看不到红色荧光, 以蓝色细胞核周围有红色荧光记录为标记成功, BNHS+链霉亲

合素组细胞表面标记成功率达(87.8 ± 3.1)%, 明显高于生物素+链霉亲和素组(33.2 ± 1.3)%和PBS+链霉亲和素组(6.4 ± 1.3)%, 差异有非常显著性意义($P < 0.001$), 见图2。

2.3 锥虫蓝法检测BNHS对骨髓间充质干细胞活性的影响 BNHS处理骨髓间充质干细胞后分别培养24 h和48 h, 细胞活力分别为(83±4)%和(76±5)%, 生物素处理后细胞活力分别为(85±3)%和(78±4)%, 而用PBS处理的骨髓间充质干细胞活力分别为(94±5)%, (85±3)%, 见图3, BNHS组24 h和48 h后细胞活性均明显低于PBS处理组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 CCK-8法检测BNHS对骨髓间充质干细胞增殖能力的影响 CCK-8法检测BNHS处理骨髓间充质干细胞12, 24, 48, 72 h吸光度值, 并以PBS处理骨髓间充质干细胞作为对照组。PBS处理的细胞在72 h时吸光度值为1.25±0.17, 而BNHS处理细胞吸光度值为0.97±0.18, 差异有显著性意义($P=0.017$), 可见BNHS标记对细胞增殖功能有一定影响, 见图4。

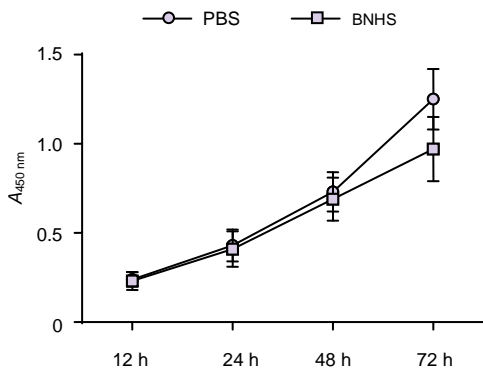


图4 骨髓间充质干细胞经BNHS处理3 d内的增殖情况
 Figure 4 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells within 3 days after BNHS treatment

2.5 生物素和链霉亲和素标记的骨髓间充质干细胞成骨分化情况 BNHS修饰的骨髓间充质干细胞和PBS处理后的骨髓间充质干细胞在成骨诱导培养第7天, 倒置显微镜下可观察到细胞质内出现矿化结晶, 成骨诱导培养23 d后, 茜素红染色后均可见明显深红色矿化结节, 见图5。

2.6 生物素和链霉亲和素标记的骨髓间充质干细胞成脂分化情况 BNHS修饰的骨髓间充质干细胞和PBS处理后的骨髓间充质干细胞成脂诱导培养第10天, 倒置显微镜下可观察到细胞质内有圆形脂粒, 细胞呈圆形。随着诱导分化时间延长, 脂肪细胞数目逐渐增多, 诱导23 d进行油红O染色, 可见大量脂质沉淀, 见图6。

3 讨论 Discussion

生物素-链霉亲和素反应体系的主要工作原理是骨髓间充质干细胞表面游离的氨基可以和碘化生物素-N-

羟基琥珀酰亚胺(BNHS)中的N-羟基琥珀酰亚胺自由结合, BNHS为水溶性不能自由通过细胞膜有助于N-羟基琥珀酰亚胺与骨髓间充质干细胞表面充分接触, 通过N-羟基琥珀酰亚胺将生物素(biotin, B)引入细胞表面, 然后将链霉亲和素(streptavidin, S)结合到生物素化的骨髓间充质干细胞表面, 链霉亲和素和生物素的结合非常稳定同时可以提供多个未结合的位点, 最后再将生物素化的黏附分子配体BSLeX通过链霉亲和素提供的未结合位点装备到细胞表面^[12]。

为了评价BNHS对骨髓间充质干细胞的修改效率, 实验设计先在骨髓间充质干细胞表面标记BNHS, 然后通过引入带红色荧光的链霉亲和素来证实BNHS的修改效率, 由于生物素和链霉亲和素的结合是非常高效、稳定的, 如果骨髓间充质干细胞已经与N-羟基琥珀酰亚胺成功结合, 则细胞可以激发出红色荧光。为了进一步统计BNHS的标记效率, 采用DAPI进行细胞核标记, 采集同一视野的红色荧光图片和蓝色荧光图片, 通过Photoshop分析叠加图片后, 若蓝色荧光周围出现红色荧光即可提示细胞标记成功。通过上述方法, 已经证实BNHS进行细胞标记有较高的效率, 标记成功率达88%。

锥虫蓝染色提示生物素对骨髓间充质干细胞的活性有一定的影响, BNHS处理后48 h细胞活性为76%, 生物素处理后48 h细胞活性为78%, 而PBS处理后48 h细胞活性为85%, 提示BNHS对细胞可能有一定的毒性, 造成细胞活性降低可能因素还包括标记实验本身的影响。由于生物素的引入是必须的, 且骨髓间充质干细胞的成骨、成脂分化功能并未受到影响, 因此这种影响还在可以接受的范围。

CCK-8是一种检测细胞增殖的方法, 其原理与MTT比色法相同, 不同之处在于CCK-8法生成的甲臞是水溶性的, 省去了吸出培养基和加入有机溶剂这一步, 这样可以减少一定的误差^[13]。实验将骨髓间充质干细胞以 1×10^3 /孔的密度接种于96孔板中, 因为该密度细胞约1周铺满孔底, 可以较好的检测细胞增殖能力。CCK-8比色法检测骨髓间充质干细胞增殖能力提示BNHS对细胞增殖能力有一定的影响, 但镜下观察细胞形态无明显变化, 可能是由于标记组细胞基数更小导致增殖数目更少所致。

生物素-链霉亲和素反应体系操作简单、反应条件温和、标记率高可达88%, 对细胞的活性、增殖功能影响不大这与国外研究类似^[14]。它是一种简单的反应体系可以将标记物高效的装备到细胞表面, 相对于基因工程

技术, 它在提高细胞表面标记物表达方面有较大的优越性, 若此反应体系在体内疾病模型中得到确切证实, 此技术将会被广泛运用到多种疾病模型中。生物素-链霉亲和素反应体系可以将感兴趣的标记物装备到细胞表面, 甚至可以将特异性抗体装备到细胞表面进行靶向治疗, 进而提高细胞的归巢率或者促进其靶向运输。目前此项技术尚未得到体内实验的证实, 将“化学工程细胞”进行体内输注探讨其在多种人类疾病动物模型中的归巢效果或者将这种化学修饰方法运用到其他领域进行细胞表型修饰是下一步研究的重点。

该研究通过生物素-链霉亲和素反应体系成功将黏附分子配体装备到骨髓间充质干细胞表面。用此方法进行细胞表面标记, 操作简单、反应条件温和、效率高, 而且对细胞的毒性小, 对细胞增殖、分化功能无明显影响。这项技术可能有助于促进干细胞在急性肾损伤及其他组织损伤中的归巢, 对于针对特定组织的细胞靶向治疗具有广泛的运用前景。

致谢: 感谢江西省人民医院临床研究中心主任胡国柱教授对本研究的指导。

作者贡献: 杨林负责实验设计、实验指导、论文校对, 罗富里负责主要实验实施及论文撰写, 文君、徐洋负责部分实验操作, 李赟负责课题设计、实验指导、论文校对。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经江西省人民医院医学伦理委员会批准, 批准号为: 2012016。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells*. 2011; 29(1):5-10.
- [2] Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006; 1(3): 365-369.
- [3] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4): 430-436.
- [4] Lange C, Tögel F, Ittrich H, et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*. 2005;68(4):1613-1617.
- [5] Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, et al. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007;137(6): 491-502.
- [6] Tögel F, Zhang P, Hu Z, et al. VEGF is a mediator of the renoprotective effects of multipotent marrow stromal cells in acute kidney injury. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2109-2114.
- [7] Morigi M, Introna M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*. 2008;26(8):2075-2082.
- [8] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*. 2003;112(1):42-49.
- [9] Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J*. 2007;21(12):3197-3207.
- [10] Sarkar D, Zhao W, Gupta A, et al. Cell surface engineering of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:505-523.
- [11] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004;104(12):3581-3587.
- [12] Sarkar D, Vemula PK, Zhao W, et al. Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting. *Biomaterials*. 2010;31(19): 5266-5274.
- [13] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. *激光生物学报*, 2007, 16(5):559-562.
- [14] Yago T, Leppänen A, Qiu H, et al. Distinct molecular and cellular contributions to stabilizing selectin-mediated rolling under flow. *J Cell Biol*. 2002; 158(4):787-799.