

PKH26 荧光素标记脂肪间充质干细胞的生物学特性的研究

黄绍代^{1,2,3}, 王玉³, 鲁长风³, 陈鹏³, 王冲³, 刘雪剑³,
孙百川³, 张凯红³, 荆晓光³, 胡丹¹, 彭江³, 田建伟^{1,2}

摘要 目的 研究 PKH26 荧光素染料对脂肪间充质干细胞 (ADSCs) 生物学特性的影响。方法 分离培养新生 SD 大鼠的 ADSCs, 通过流式细胞仪、成脂、成骨、成软骨诱导鉴定 ADSCs 的免疫表型和多向分化的能力。用细胞膜荧光素染料 PKH26 对第二代脂肪干细胞进行标记, 通过倒置相差显微镜、荧光显微镜以及 CCK-8 法评估标记后细胞的形态、荧光强度以及增殖活性的变化。结果 成功分离和培养 ADSCs, 其纯度达 95% 以上, 并成功将 ADSCs 诱导成脂肪、骨、软骨; PKH26 标记 24 h 后, 在荧光显微镜下可见细胞膜上均匀分布的强红色荧光, 细胞的形态以及增殖活性与未标记的细胞无明显差异。结论 PKH26 荧光素染料标记后对 ADSCs 的形态及增殖活性无明显影响, 是一种理想的细胞标志物, 能够很好的应用于示踪间充质干细胞的迁移转归及干细胞标记等方面的研究。

关键词 脂肪间充质干细胞; PKH26; 细胞标记

中图分类号 R 329.33; R 349.89

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)09-1343-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.005

干细胞移植技术的广泛研究, 为临床上治疗各种疾病提供了新的思路。而种子细胞的选择是干细胞移植的基本要素, 脂肪干细胞具有来源丰富、取材方便、对供体损伤小、增殖分化能力强等优势, 是目前干细胞移植的理想选择。很多预临床实验都证实脂肪干细胞对缺血性心脏病有一定的治疗效果^[1-2], 但对于干细胞植入体内后的转归以及干细胞发挥作用的机制仍然不是很明确^[3]。因此, 提供一个简单高效的干细胞标志方法, 研究干细胞移植后在体内的存活率、迁移转归和分布已成为干细胞移植研究领域的热点之一。而一个好的细胞标志物需具备不易洗脱、不易被代谢、标记后的信号容易被

检测等特点^[4]。PKH26 是目前应用较多的一种亲脂性细胞标志物, 已有文献^[5-6]报道了 PKH26 用于示踪间充质干细胞以及神经干细胞的研究。该研究探讨 PKH26 荧光素染料对脂肪干细胞的生物学特性的影响, 为进一步研究干细胞的迁移转归及示踪提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级新生 SD 大鼠 8 只, 雌雄不限, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 实验试剂和设备 PKH26 荧光染料/二型胶原蛋白酶(美国 Sigma 公司); 低糖 DMEM/胎牛血清(美国 CORNING 公司); PBS(中国索莱宝公司); 双抗(美国 Gibco 公司); CD45/CD11b(美国 BD 公司); CD34/CD29/CD44/CD105(英国 Abcam 公司); 成脂诱导液/成骨诱导液/成软骨诱导液(中国 Cyagen 公司); CCK8 试剂盒(日本 DOJINDO 公司); 流式细胞仪(型号: FACSCelesta, 美国 BD 公司); 微量孔板分光光度计(型号: EPOCH TAKE3, 美国 Biotek 公司); DP70 荧光显微镜、IX70 倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司); YT-CJ-2NB 超净工作台(北京亚泰公司); 低速台式离心机(北京白洋公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADSCs) 的分离培养 取新生 SD 大鼠 8 只, 雌雄不限, 浸泡于体积分数 75% 的乙醇溶液中 5 min, 移入超净工作台, 乙醚麻醉, 小心剥离腹股沟区的皮下脂肪组织, 用眼科剪小心剥除筋膜组织, 转移至 PBS 溶液中清洗 2~3 次, 将洗净的脂肪组织转移至青霉素小瓶中, 用眼科剪剪成 1~3 mm³, 加入 8 ml 0.1% 的二型胶原蛋白酶, 置于磁力搅拌器 37 °C 消化 30~40 min。加入培养液终止消化, 1 700 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用配制好的低糖 DMEM 培养液制成单细胞悬液, 接种于培养瓶中, 放置于 37 °C 体积分数 5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。48 h 后换液去除未贴壁的细胞, 细胞达 80% 融合时, 用 0.25% 的胰酶消化传代, 按 1:3 比例进行扩增传代。

2018-05-10 接收

基金项目: 北京市科技专项(编号: Z161100005016059)

作者单位: ¹ 中国人民解放军空军总医院心血管内科, 北京 100142

² 安徽医科大学, 合肥 230032

³ 中国人民解放军总医院全军骨科研究所, 北京 100853

作者简介: 黄绍代, 男, 硕士研究生;

田建伟, 男, 博士后, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: tianjianwei029@aliyun.com

1.3.2 PKH26 标记 ADSCs 胰酶消化 P2 代的 ADSCs 形成 2×10^7 个/cm² 的细胞悬液,加入无血清培养基,800 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,使剩余液体低于 25 μ l,加入 1 ml 试剂盒中稀释液 C,制备完全离散的细胞悬液。配制染色液:将 4 μ l 的 PKH26 乙醇染料加入离心管中,再加入 1 ml 稀释液 C 制备染料溶液。尽快将离散的 1 ml 细胞悬液加入到配好的染液中,并用吸管均匀快速的混合,常温孵育 2~5 min,可轻轻颠倒混匀。加入 2 ml 的血清孵育 1 min 终止染色,再用 4 ml 含血清培养基稀释终止的反应液,800 r/min 离心 10 min,吸弃上清液。再加入 10 ml 完全培养基,重复离心 2 次,每次 800 r/min 离心 5 min,最后用 10 ml 完全培养基重悬到所需浓度,用合适的细胞浓度接种于培养瓶中,第 2 天在荧光显微镜下观察细胞被标记的情况。

1.3.3 ADSCs 的免疫表型分析 胰酶消化 P2 代的 ADSCs 制成细胞悬液,加入无血清培养基,800 r/min 离心 5 min,再用无血清培养基按照 5.0×10^5 个/ml 密度进行重悬,吸取 1 ml 细胞悬液分别加入到 7 个 15 ml 聚丙烯离心管中,800 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,留下约 200 μ l 的液体,加入 CD34-APC、CD45-PE、CD29-PE、CD44-APC、CD105-APC、CD11b-FITC 室温避光孵育 20 min,加入 PBS 清洗未结合抗体,用流式细胞仪检测各抗体的表达情况。

1.3.4 ADSCs 成脂诱导及鉴定 胰酶消化 P2 代 PKH26 标记和未标记的 ADSCs,以 2×10^4 个/cm² 的密度接种于六孔板中,每孔加入 2 ml 低糖 DMEM 完全培养液培养 24 h 后,吸弃完全培养液,每孔加入 2 ml 配好的成脂诱导 A 液(A 液基础培养基、胎牛血清、双抗、谷氨酰胺、胰岛素、3-异丁基-4-甲基黄嘌呤、罗格列酮、地塞米松),诱导 3 d 后,吸掉六孔板中的 A 液,加入 2 ml 配好的成脂诱导 B 液(B 液基础培养基、胎牛血清、双抗、谷氨酰胺、胰岛素),24 h 后,吸弃 B 液,换回 A 液继续诱导,A 液和 B 液交替诱导 3~4 次(8~10 d)。诱导结束后,吸走六孔板中的成脂诱导培养基,用 PBS 洗 1~2 次,每孔加入 2 ml 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,吸弃甲醛溶液,每孔加入 1 ml 配好的油红 O 染液染色 30 min,显微镜下观察染色结果。

1.3.5 脂肪干细胞成骨诱导及鉴定 胰酶消化 P2 代 PKH26 标记和未标记的 ADSCs,以 2×10^4 个/cm² 的密度接种于六孔板中,每孔加入 2 ml 低糖 DMEM 完全培养液培养 24 h 后,吸弃完全培养液,每孔加入 2 ml 配好的成骨诱导液(基础培养基、血清、双抗、谷氨酰胺、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松),之后每隔 3 d 换一次成骨诱导液,直至诱导

3 周。诱导结束后,吸走成骨诱导培养基,用 PBS 洗 1~2 次,每孔加入 2 ml 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,吸弃甲醛溶液,每孔加入 1 ml 茜素红染液染色 3~5 min,显微镜下观察染色结果。

1.3.6 脂肪干细胞成软骨诱导及鉴定 胰酶消化 P2 代 PKH26 标记和未标记的 ADSCs,用配制的预混液(基础培养基、地塞米松、抗坏血酸、ITS 添加物、丙酮酸钠、脯氨酸)以 5.0×10^5 个/ml 的密度进行重悬,吸取 1 ml 细胞悬液转移至 15 ml 的离心管中,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 0.5 ml 的成软骨诱导液(预混液,TGF- β 3),拧紧离心管盖,将其置于培养箱中培养,72 h 后小心更换诱导液,直至诱导 28 d。诱导结束后,软骨球经 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后切片,染色前先脱蜡和脱水,用阿利新蓝染液,染色 30 min,自来水冲洗 2 min 后水性封片剂封片,显微镜下观察染色效果。

1.3.7 CCK8 检测 ADSCs 的增殖能力 胰酶消化 P2 代 PKH26 标记和未标记的 ADSCs,以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ l 培养液,接种后连续培养 6 d,每天在相同时间选择 6 个孔(3 个标记的 ADSCs,3 个未标记的 ADSCs)加入 10 μ l 的 CCK8 液,再在培养箱中孵育 3 h,最后用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)。以 3 个孔 OD 值的平均值为纵坐标,对应的培养时间为横坐标,绘制出 ADSCs 的生长曲线。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 光镜下的形态学观察 倒置相差显微镜下观察原代培养的 ADSCs,细胞在未贴壁时大多呈圆形,折光性强,24 h 后基本贴壁,细胞贴壁呈长梭形、多角形(图 1A),48 h 后,可传 P1 代培养,传代后细胞仍呈长梭形,轮廓清晰,呈旋涡状或放射状排列生长(图 1B)。当细胞融合度达到 80%~90% 时,传 P2 代培养,传代后细胞排列紧密,呈鱼群样生长(图 1C)。细胞用 PKH26 标记后形态无明显变化,荧光显微镜下可见红色荧光染料呈颗粒状均匀分布于 ADSCs 的细胞膜上(图 1D)。

2.2 ADSCs 免疫表型鉴定结果 培养至 P2 代,流式细胞仪分析的结果显示:95.3% 的细胞 CD44 阳性,95.0% 的细胞 CD105 阳性,94.6% 的细胞 CD29 阳性,而仅有 0.2% 的细胞 CD34 阳性,5.4% 的细胞 CD45 阳性,0.2% 的细胞 CD11b 阳性,证实培养的

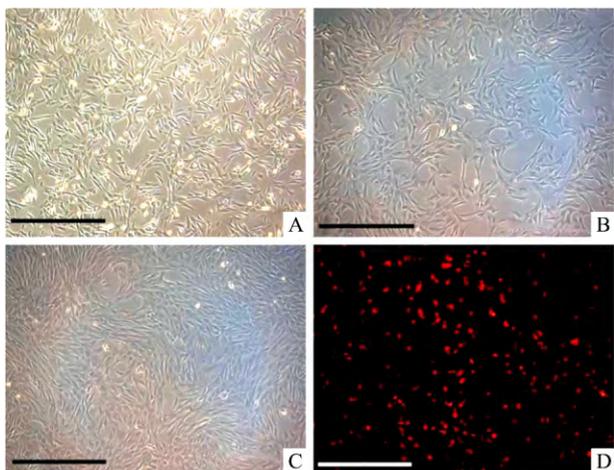


图1 原代培养 ADSCs 的生长情况和 PKH26 标记 ADSCs 后的形态 ×100

A: P0 代 ADSCs; B: P1 代 ADSCs; C: P2 代 ADSCs; D: PKH26 标记的 ADSCs

是 ADSCs, 见图 2。

2.3 PKH26 标记前后 ADSCs 分化能力情况 成

脂诱导后的 3 d 可见细胞逐渐回缩成多角形, 并可见少量的脂滴, 诱导 8 d 后的油红 O 染色可见细胞内脂滴呈红色(蓝色箭头, 图 3A 和图 3D)。成骨诱导后 3 d, 细胞逐渐变为长梭形, 约 10 d 左右可见少量的钙结节沉积, 诱导 21 d 后可见大量的钙结节, 茜素红染色可见橘红色的钙结节(黄色箭头, 图 3B 和图 3E)。成软骨诱导 72 h 后可见细胞逐渐聚集肉眼可见的小团, 诱导 14 d 后细胞团逐渐透明成软骨形态, 阿利新蓝染色后可见软骨组织中的内酸性粘多糖(红色箭头, 图 3C 和图 3F)。通过对比图 3A 和图 3D, 图 3B 和图 3E, 图 3C 和图 3F 发现, PKH26 对 ADSCs 的成脂、成骨、成软骨的分化能力无影响。

2.4 ADSCs 已标记与未标记的增殖能力比较

CCK8 结果分析显示, 细胞在第 2~4 天生长速度最快, 处于对数生长期, 之后进入平台期, 细胞生长曲线见图 4。分光光度计测定标记前后的细胞在各时间点的吸光度值见表 1, 统计分析结果显示, 细胞在标记前后各时间点的吸光度值的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

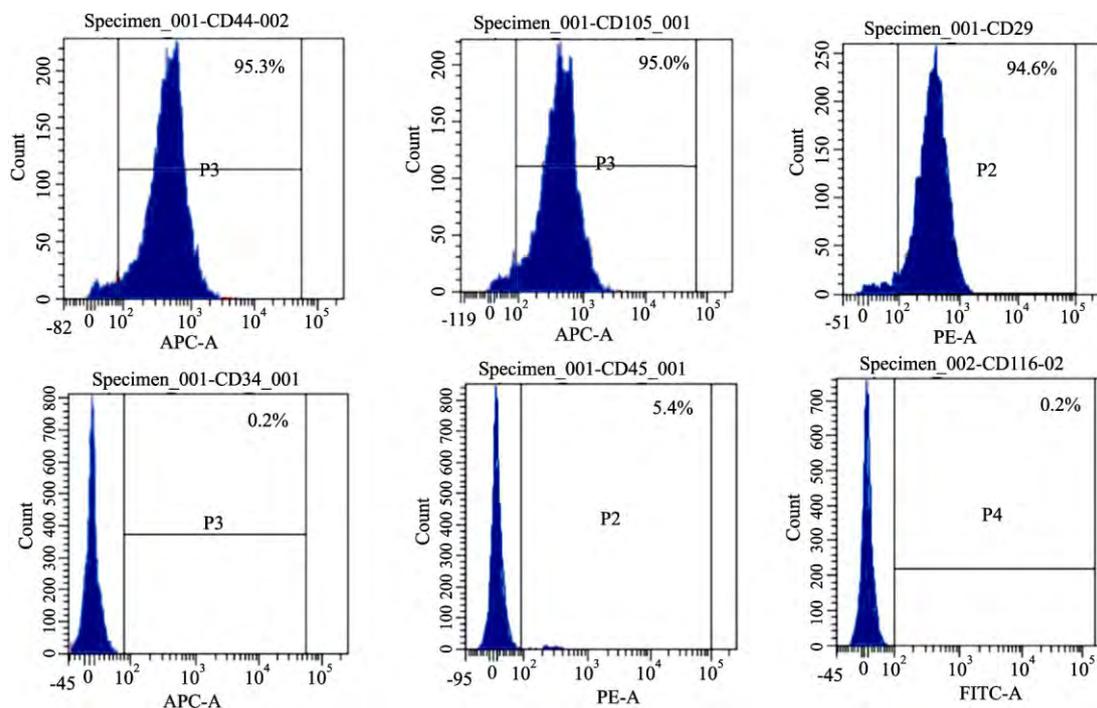


图2 P2 代 ADSCs 流式细胞仪检测结果

表1 PKH26 标记前后的细胞在各时间点的 OD 值 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
对照	0.61 ± 0.10	1.68 ± 0.23	2.81 ± 0.33	2.97 ± 1.22	3.36 ± 0.06	3.06 ± 0.23
PKH26	0.64 ± 0.06	1.56 ± 0.30	2.90 ± 0.25	3.09 ± 0.87	3.24 ± 0.89	3.20 ± 0.52
t 值	0.38	0.53	0.36	0.13	0.24	0.41

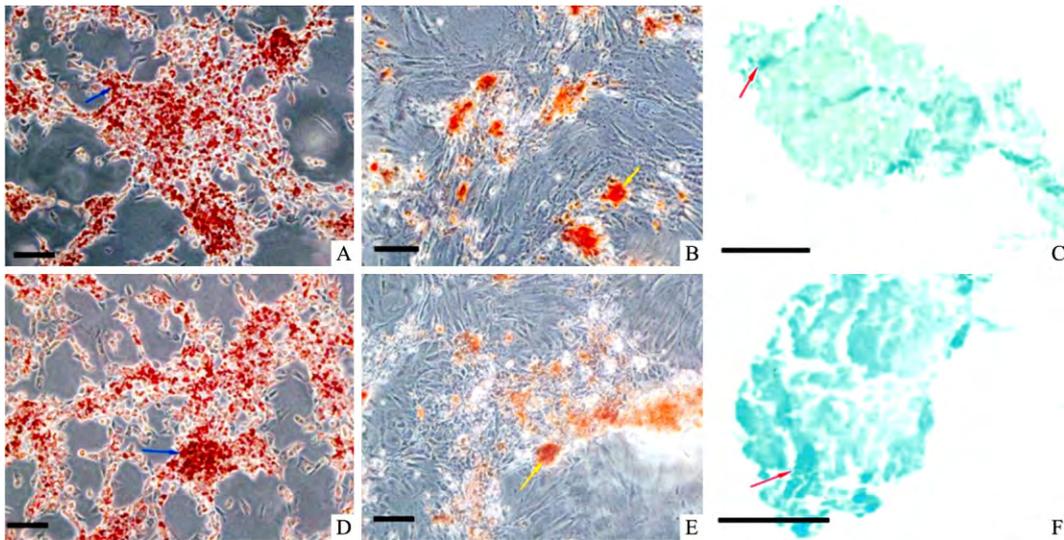


图3 PKH26 标记前后 ADSCs 成脂、成骨、成软骨诱导分化结果

A、D: PKH26 标记前后的 ADSCs 成脂诱导后油红 O 染色(蓝色箭头: 红色脂滴) × 100; B、E: PKH26 标记前后的 ADSCs 成骨诱导后茜素红染色(黄色箭头: 橘红色的钙结节) × 100; C、F: PKH26 标记前后的 ADSCs 成软骨诱导后的阿利新蓝染色(红色箭头: 软骨组织中的内酸性粘多糖) × 400

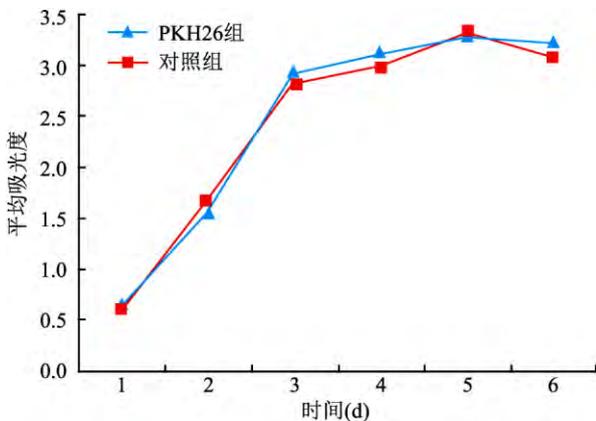


图4 PKH26 标记和未标记的 ADSCs 生长曲线

对照组: 未用 PKH26 标记的 ADSCs 的生长曲线; PKH26 组: PKH26 标记后的 ADSCs 的生长曲线

3 讨论

目前研究比较多的细胞标志物有 BrdU、放射性同位素、绿色荧光蛋白以及 PKH26^[7-8]。其中 PKH26 作为一种亲脂性荧光染料,能够不可逆地均匀的结合在细胞膜脂质双分子层上,荧光显微镜下可见红色荧光(激发光波长 551 nm)。另外,荧光保留时间长,标记细胞种类广泛,被标记的细胞在细胞分裂后,荧光染料也可均匀的分布于两个子细胞中,而且标记后对细胞的生物学功能和增殖活性无影响,已成为研究细胞的迁移转归及示踪的理想标志物。本研究从新生 SD 大鼠腹股沟区的皮下脂肪分离培养得到 ADSCs,经流式细胞仪和成脂、成骨、成

软骨鉴定了 ADSCs 的免疫表型和多向分化的能力,结果均符合 ADSCs 的生物学特征^[9-10]。用 PKH26 成功标记 ADSCs 后,光镜下的结果显示 PKH26 荧光素染料标记的 ADSCs 与未标记的 ADSCs 在形态上无明显差异。在标记 24 h 后荧光显微镜下也可观察到 ADSCs 细胞膜上均匀分布的强红色荧光。将 PKH26 标记的 ADSCs 进行成脂、成骨、成软骨诱导后发现 PKH26 并不影响 ADSCs 的多向分化能力,CCK8 检测结果显示 PKH26 标记后对 ADSCs 的增殖活性无明显影响。

近几年大量文献报道了关于 PKH26 标记细胞后示踪其在体内迁移转归的研究。例如, Garikipati et al^[11] 通过将 PKH26 标记的间充质干细胞植入大鼠心肌梗死模型中,用于示踪间充质干细胞移植后在梗死区域的停留率。同样的, Tang et al^[12] 也将 PKH26 标记的心脏干细胞移植于老鼠心肌梗死模型中,用于研究血管内皮生长因子对移植的心脏干细胞的影响。另外, Huang et al^[13] 将 PKH26 标记的 ADSCs 注入大脑中动脉梗塞的老鼠体内,研究 ADSCs 在移植后的体内分布情况。国内学者薛改等^[14] 通过 PKH26 标记人脐带间充质干细胞,观察人脐带间充质干细胞移植在肝硬化大鼠体内后的迁移情况,通过对 PKH26 标记的人脐带间充质干细胞进行传代培养发现每次传代后细胞荧光会逐渐衰减,但体外标记一次荧光可维持至 20 d 左右。这为干细胞的体内示踪研究提供了依据,研究者可通过活体荧光机追踪或者荧光显微镜下观察荧光信号的

分布,再结合相应的组织免疫荧光进行进一步分析。

参考文献

- [1] Naaijkens B A , van Dijk A , Kamp O , et al. Therapeutic application of adipose derived stem cells in acute myocardial infarction: lessons from animal models [J]. Stem Cell Rev , 2014 ,10(3) : 389 - 98.
- [2] Perin E C , Sanz - Ruiz R , Sánchez P L , et al. Adipose - derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE trial [J]. Am Heart J , 2014 ,168(1) : 88 - 95. e2.
- [3] Gneccchi M , Zhang Z , Ni A , et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy [J]. Circ Res , 2008 ,103(11) : 1204 - 19.
- [4] Li P , Zhang R , Sun H , et al. PKH26 can transfer to host cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Stem Cells Dev , 2013 ,22(2) : 340 - 4.
- [5] Fang J F , Jia C C , Zheng Z H , et al. Periprostatic implantation of neural differentiated mesenchymal stem cells restores cavernous nerve injury - mediated erectile dysfunction [J]. Am J Transl Res , 2016 ,8(6) : 2549 - 61.
- [6] Hosseini S M , Samimi N , Farahmandnia M , et al. The preventive effects of neural stem cells and mesenchymal stem cells intra-ventricular injection on brain stroke in rats [J]. N Am J Med Sci , 2015 ,7(9) : 390 - 6.
- [7] Dahia C L , Mahoney E , Wylie C. Shh signaling from the nucleus pulposus is required for the postnatal growth and differentiation of the mouse intervertebral disc [J]. PLoS One , 2012 ,7(4) : e35944.
- [8] Fang Z , Yang Q , Luo W , et al. Differentiation of GFP - Bcl - 2 - engineered mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus - like phenotype under hypoxia *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun , 2013 ,432(3) : 444 - 50.
- [9] Barberini D J , Freitas N P , Magnoni M S , et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow , adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential [J]. Stem Cell Res Ther , 2014 ,5(1) : 25.
- [10] Roman A , Soanc A , Florea A , et al. *In vitro* characterization of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from palatal subepithelial tissue grafts [J]. Microsc Microanal , 2013 ,19(2) : 370 - 80.
- [11] Garikipati V N , Jadhav S , Pal L , et al. Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an *in vivo* serial pinhole gated SPECT - CT study in rats [J]. PLoS One , 2014 ,9(6) : e100982.
- [12] Tang J M , Luo B , Xiao J H , et al. VEGF - A promotes cardiac stem cell engraftment and myocardial repair in the infarcted heart [J]. Int J Cardiol , 2015 ,183: 221 - 31.
- [13] Huang H , Lin F , Jiang J , et al. Effects of intra - arterial transplantation of adipose - derived stem cells on the expression of neurtin - 1 and its receptor DCC in the peri - infarct cortex after experimental stroke [J]. Stem Cell Res Ther , 2017 ,8(1) : 223.
- [14] 薛改, 李建立, 刘建芳, 等. PKH26 标记示踪人脐带间充质干细胞在肝硬化大鼠体内的迁移 [J]. 中华肝脏病杂志 , 2014 , 22(12) : 910 - 4.

In vitro study of biological characteristics of adipose tissue derived mesenchymal stem cells after PKH26-labeled

Huang Shaodai^{1 2 3}, Wang Yu³, Lu Changfeng³, et al

(¹Dept of Cardiovascular , General Hospital of Air Force PLA Beijing 100142; ²Anhui Medical University , Hefei 230032; ³Institute of Orthopedics , Chinese PLA General Hospital Beijing 100853)

Abstract Objective To investigate the effects of PKH26 fluorescent labeling on the biological characteristics of adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) . **Methods** The ADSCs were isolated from neonatal SD rats , the immunophenotype of ADSCs were identified by flow cytometry and the multilineage differentiation ability of ADSCs was detected by adipogenic , osteogenic and chondrogenic differentiation. The cell membrane of the second generation ADSCs was labeled with PKH26 , and then the morphology , fluorescence intensity and proliferation activity of the cells were evaluated by inverted phase contrast microscopy , fluorescence microscopy and CCK-8. **Results** The ADSCs with purity above 95% were successfully isolated from neonatal SD rats , and were successfully induced into fat , bone and cartilage. After labeled with PKH26 for 24 h , the red fluorescence was uniformly distributed on the cell membrane under fluorescence microscope. The morphology and proliferation of the cells were not significantly different from those of unlabeled cells. **Conclusion** PKH26 labeling had no significant effect on cell morphology and proliferation activity , PKH26 is an ideal cell marker , which can be used to study the migration and prognosis of mesenchymal stem cells.

Key words adipose derived mesenchymal stem cells; PKH26; cell labeling