

· 实验研究 ·

PKH26 标记人脂肪间充质干细胞及眼内示踪的可行性研究

郭凯¹ 罗燕² 李士清³ 田景毅²

¹内蒙古医科大学附属医院眼科, 呼和浩特 010059; ²中山大学中山眼科中心, 广州 510060; ³河南省人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003

通信作者: 郭凯, Email: gk1108@sina.com

【摘要】目的 评估 PKH26 对人脂肪间充质干细胞(hADSCs)进行体外标记及眼内标记的可行性。

方法 体外培养 hADSCs, 使用 PKH26 对 hADSCs 进行体外标记并观察标记结果。采用抽签法将 C57BL/6J 小鼠 18 只分为正常对照组(6 只)、标记细胞组(9 只)和未标记细胞组(3 只), 标记细胞组和未标记细胞组 C57BL/6J 小鼠玻璃体腔分别注射 2×10^5 /ml 标记细胞和未标记细胞各 1 μ l, 注射后 1 个月分别行视网膜铺片观察荧光标记结果。取正常对照组及标记细胞组小鼠视网膜进行苏木精-伊红染色及电子显微镜检查判定毒性反应。**结果** hADSCs 经 PKH26 体外标记后细胞膜呈红色荧光, 标记细胞组小鼠玻璃体腔注射标记细胞后 1 个月可见视网膜血管前红色强荧光, 标记细胞组小鼠视网膜苏木精-伊红染色及电子显微镜检查均未见细胞变性坏死及增生。hADSCs 体外、体内标记显影结果显示, 未标记细胞组均无荧光显色, 显色阳性率均为 0, 标记细胞组均出现红色荧光, 显色阳性率均为 100%。**结论** PKH26 可用于标记 hADSCs 及眼内示踪, 形态学评估显示其无毒性反应。

【关键词】 脂肪间充质干细胞; PKH26; 细胞标记; 毒性反应

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760173); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08014)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.005

The feasibility of PKH26-marked human adipose derived mesenchymal stem cells and intraocular trace

Guo Kai¹, Luo Yan², Li Shiqing³, Tian Jingyi²

¹Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; ²Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; ³Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Guo Kai, Email: gk1108@sina.com

【Abstract】Objective To evaluate the feasibility of PKH26 marked human adipose derived mesenchymal stem cells (hADSCs) *in vitro* and intraocular. **Methods** hADSCs were cultured *in vitro* and marked with PKH26. Eighteen C57BL/6J mice were divided into normal control group (6 mice), labeled cell group (9 mice) and unlabeled cell group (3 mice) by using sortition randomization method, labeled cells were injected intravitreally in C57BL/6J mice as labeled cell group, and the unlabeled cells were injected intravitreally in C57BL/6J mice as unlabeled cell group. After 1 month, retinal slab was checked to contrast the results of intraocular labeling. The retina was taken out for hematoxylin-eosin staining and electron microscopy to observe the toxicity. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** *In vitro*, red fluorescent was found in the cytomembranes after hADSCs were labeled by PKH26. Retinal patch of labeled cell group showed red fluorescence of hADSCs were in front of the retina. Hematoxylin-eosin staining of retinal tissue and optic ganglion cells showed that cell degeneration and proliferation were not found in labeled cell group. The hADSCs *in vivo* and *in vitro* marked enhancement results showed that, no fluorescent was found in the unlabeled cell group, the color positive rate were both 0, while red fluorescence was found in the labeled cell group, the color positive rate were both 100%. **Conclusions** PKH26 can be used to mark and intraocular trace of hADSCs. Also, it has no morphology toxic reaction.

【Key words】 Adipose derived mesenchymal stem cells; PKH26; Cell marker; Toxicity

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81760173); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2019MS08014)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.005

近年来,干细胞由于其独特的生物学和免疫学特性成为眼科学实验研究及临床应用的热点^[1]。随着临床间充质干细胞应用于视网膜变性类疾病的治疗,给更多不可逆性眼病患者带来了新的希望。脂肪来源的间充质干细胞具有获取简单和高分化增生潜能的特点^[2],应用前景广阔。在干细胞的研究中,如何从受体辨别移植细胞,有效观察其分化、转归、融合,一直存有争议。细胞标记是解决这类问题的手段之一^[3],可以对干细胞进行示踪观察。目前间充质干细胞标记示踪方法主要有同位素法、抗原法、荧光蛋白法、荧光染料法等,优缺点不同。为此,本研究使用标志物 PKH26 对人脂肪间充质干细胞(human adipose derived mesenchymal stem cells, hADSCs)进行荧光染料法细胞标记,观察其体外标记和眼内示踪的可行性及眼内应用的安全性,为干细胞移植的示踪研究提供方法学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 1 月龄 C57BL/6J 小鼠 18 只,体质量 18~20 g,雌雄各半,购自南方医科大学,饲养于中山大学中山眼科中心实验动物中心的 SPF 级环境。动物实验遵循国家科学委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);MCDB 培养基、PKH26、异硫氰酸荧光素-葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran)(FD2000S)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。37℃ 恒温、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司);微量注射器(美国 Hamilton 公司);荧光显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hADSCs 的提取及鉴定 由北京协和医学院组织工程中心提取并鉴定,提供冻存的第 2 代 hADSCs。

1.2.2 PKH26 对 hADSCs 的标记 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,细胞密度为 4×10^6 /ml。离心半径 6 cm,4 000 r/min 离心 5 min,无血清培养基清洗 1 次,再次离心 5 min,吸去上清液,剩余液体 < 25 μ l。加入 1 ml 稀释液 C,重悬细胞保证完全离散。染色前, 4×10^{-6} mol/L PKH26 用 1 ml 稀释液 C 稀释,置于离心管中。将细胞分为标记细胞组和未标记细胞组,标记细胞组将待标记细胞移到 PKH26 稀释液中,吸管均匀、快速混合。25℃ 孵育 3 min,加入等量血清中止染色,孵育 1 min。4 000 r/min 离心 10 min,去上清,细胞团转入新试管,清洗 3 次。加入培养基,重悬细胞到所需

浓度,使用 6 孔板置于荧光显微镜下观察 hADSCs 是否含有标记荧光,细胞膜呈红色荧光为标记成功。未标记细胞组将重悬细胞移到 1 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中快速混合,方法同标记组,后使用 6 孔板置于荧光显微镜下观察是否含有标记荧光,细胞膜呈红色荧光为标记成功。计算标记细胞阳性率:标记细胞阳性率 = 显影细胞数/全部细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 实验动物分组及处理 采用抽签法将 C57BL/6J 小鼠 18 只分为正常对照组(6 只)、未标记细胞组(3 只)和标记细胞组(9 只)。未标记细胞组小鼠右眼玻璃体腔注射未标记细胞 1 μ l,细胞密度为 2×10^5 /ml;标记细胞组小鼠右眼玻璃体腔注射标记细胞 1 μ l,细胞密度为 2×10^5 /ml。1 个月后分别取未标记细胞组小鼠 3 只和标记细胞组小鼠 3 只行眶内 FITC-dextran 注射,制备视网膜铺片,观察标记细胞示踪情况。另取正常对照组小鼠 6 只和标记细胞组小鼠 6 只,采用颈椎脱臼法处死小鼠,摘取右侧眼球,3 只眼球采用苏木精-伊红染色行组织病理学检查,3 只眼球在电子显微镜下观察视网膜超微结构。

1.2.4 小鼠玻璃体腔注射未标记细胞或标记细胞 C57BL/6J 小鼠腹腔内注射质量分数 2.5% 水合氯醛(1.2 ml/kg)进行麻醉。显微镜下沿睑裂分离上下睑缘,盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,复方托吡卡胺滴眼液扩瞳,暴露眼球,无菌穿刺针头前房穿刺放出部分前房水,33G 微量注射器角巩膜缘后 1 mm 行玻璃体腔穿刺,针头向视神经方向刺入玻璃体腔,推注液体 1 μ l,停留 30 s 出针,还纳眼球闭合眼睑,涂红霉素眼膏。

1.2.5 FITC-dextran 眶后注射视网膜铺片检测 参照文献[4]的方法,将 FITC-dextran 溶于 PBS 中,质量浓度为 50 g/L,4 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,过滤器过滤,全程避光。小鼠 2.5% 水合氯醛(1.2 ml/kg)腹腔内注射麻醉。暴露右眼,27G 注射器呈 45° 从其鼻侧穿入 2~3 mm 至眶后静脉窦周围,按照 9 ml/kg 的剂量缓慢注射 FITC-dextran。注射后 10 s,小鼠颈椎脱臼处死,摘除右侧眼球,质量分数 4% 多聚甲醛室温浸泡 30 min,显微镜下沿角巩膜缘剪除角膜、晶状体,分离视网膜。沿赤道部至锯齿缘做放射状切开,切成 4 瓣,视网膜平铺于载玻片,抗荧光衰减封片剂封片后荧光显微镜下观察并拍照,观察标记细胞的走行分布及其与视网膜是否融合。

2 结果

2.1 体外培养 hADSCs 的形态学变化

第 2 代 hADSCs 呈分散生长的梭形和紧密生长的多角形。传至第 3 代,多角形细胞基本消失,细胞呈梭形(图 1)。

2.2 hADSCs 体外标记的荧光显微镜下观察

荧光显微镜下观察可见,hADSCs 经 PKH26 体外标记后,细胞膜呈红色强荧光,细胞核未着色(图 2)。

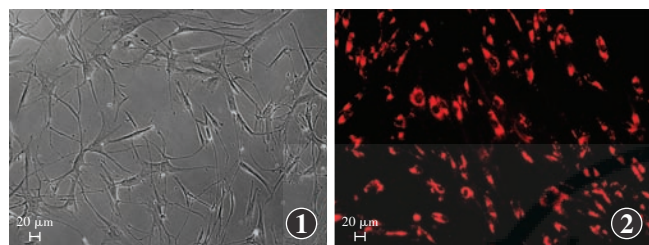


图 1 第 3 代 hADSCs 形态图(×20,标尺=20 μm) 第 3 代 hADSCs 呈梭形 图 2 荧光显微镜下 hADSCs 的 PKH26 体外标记(×20,标尺=20 μm) hADSCs 细胞膜呈红色强荧光,细胞核未着色

2.3 hADSCs 体内标记的视网膜铺片检测

未标记细胞组眼内注射后 1 个月,视网膜铺片可以检测到 FITC 标记的绿色荧光,为小鼠视网膜血管,无红色荧光显影(图 3A)。标记细胞组注射后 1 个月,视网膜铺片可以检测到 FITC 标记的绿色荧光,以及位于视网膜血管上方红色荧光标记的 hADSCs(图 3B)。

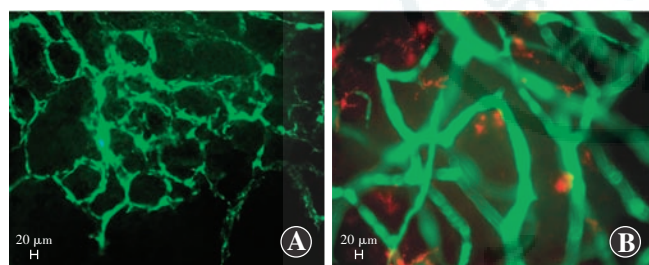


图 3 视网膜铺片检测 PKH26 体内标记情况(×40,标尺=20 μm) A:未标记细胞组可见 FITC 绿色荧光标示的小鼠视网膜血管 B:标记细胞组可见 FITC 绿色荧光标示的小鼠视网膜血管以及位于上方红色荧光的标记细胞

2.4 2 个组视网膜组织病理学变化

正常对照组小鼠视网膜各层结构正常,未见外核层及视锥、视杆细胞的变性及增生(图 4A)。标记细胞组注射后 1 个月,可见小鼠视网膜各层结构正常,未见外核层及视锥、视杆细胞的变性及增生,可见注射细胞位于视网膜表面玻璃体腔内(图 4B)。

2.5 2 个组视网膜神经节细胞超微结构观察

电子显微镜下检查可见,正常对照组视网膜神经节细胞较大,细胞核小,核膜清晰,染色质分散均匀,可见核仁,无变性坏死(图 5A);标记细胞组细胞注射后 1 个月可见视网膜神经节细胞较大,细胞核小,核膜清

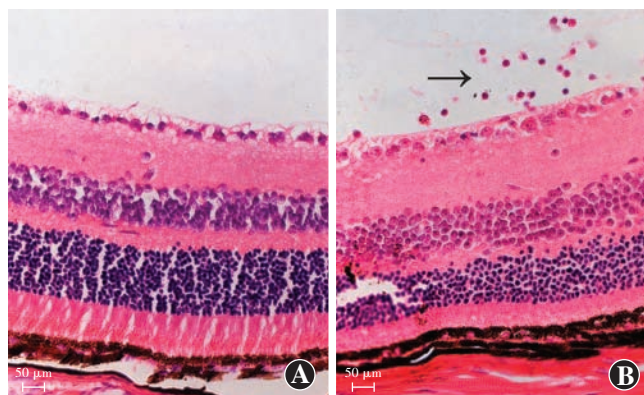


图 4 各组视网膜组织病理学变化(HE ×40,标尺=50 μm) A:正常对照组小鼠视网膜各层结构正常,未见外核层及视锥、视杆细胞变性及增生 B:标记细胞组可见小鼠视网膜各层结构正常,未见外核层及视锥、视杆细胞变性及增生,注射细胞位于视网膜表面玻璃体腔内(箭头)

晰,染色质分散均匀,可见核仁,无变性坏死,与正常对照组相比无明显变化(图 5B)。

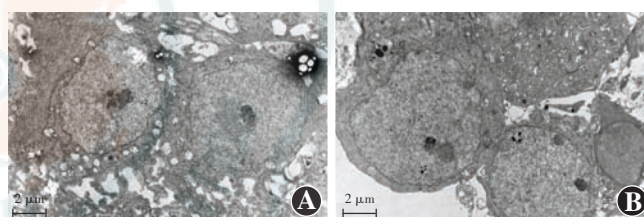


图 5 视网膜神经节细胞电子显微镜下检查(标尺=2 μm) A:正常对照组视网膜神经节细胞较大,细胞核小,核膜清晰,染色质分散均匀,可见核仁,无变性坏死 B:标记细胞组视网膜神经节细胞较大,细胞核小,核膜清晰,染色质分散均匀,可见核仁,无变性坏死

2.6 2 个组 hADSCs 体内外标记显影情况比较

体外标记显影结果显示,未标记细胞组均无荧光显色,显色阳性率为 0,标记细胞组出现红色荧光,显色阳性率为 100%。

体内标记显影结果显示,未标记细胞组未见红色荧光,显色阳性率为 0,标记细胞组均观察到红色荧光,显色阳性率为 100%。

3 讨论

干细胞具有自我更新、多分化潜能等生理学和免疫学特点,特别是针对疑难病的靶向治疗和免疫治疗,其意义重大。随着间充质干细胞应用于视网膜变性类疾病的临床治疗,间充质干细胞治疗给更多不可逆性眼病患者带来了新的希望。更好地进行眼内间充质干细胞的标记与示踪可以了解其移植入宿主后的走行、分布、分化情况,从而有助于其深入应用。

目前间充质干细胞标记示踪方法主要有同位素法、抗原法、荧光蛋白法、MRI 对比增强剂法和荧光染

料法等^[5]。其中,同位素检测方法比较复杂、受干扰因素较多,同时存在放射性污染隐患;抗原法存在一定的假阳性率,且最佳标记浓度及时间尚不明确^[6],检测相对费时费力^[7];荧光蛋白法的不足之处是对细胞有一定毒性、过程繁琐、检测低水平表达比较困难^[8];MRI 对比增强剂法常会受到设备条件的制约,而且同样会出现假阳性结果^[9];荧光染料法易操作,对细胞的增生和分化影响轻微,有其自身的优势。

荧光染料法是较常用的细胞标记示踪方法,染料包括 DAPI、DIL、PKH26 等。DAPI 标记细胞核,但存在荧光淬灭、标记时间短、假阳性的缺点^[10]。研究证实红色荧光染料 PKH26 是亲脂性膜结合染料,不可逆地结合细胞膜的脂质双层,PKH26 染色几分钟后即可在荧光显微镜下观察到细胞膜均匀染色,当 PKH26 染色细胞死亡时,PKH26 不会被其他细胞吞噬,因此,没有假阳性现象。研究证实 PKH26 毒性较小,对细胞增生无影响,可用于染色多种细胞,其不能传播到未染色细胞中,并且可以在体内保留长达 1 年^[11]。Shuai 等^[12]使用 PKH26 标记 hUCMSCs,结果显示体外传代后,随着细胞通道的增加,荧光强度逐渐降低,第 6 代 hUCMSCs 具有最小的荧光强度。体内研究中,Hou 等^[13]研究表明,经过 PKH26 标记的 MSCs 移植后 42 d 仍可观察到标记细胞,证明其体内标记的有效性。本研究中选用 PKH26 对 hADSCs 进行标记,并对标记细胞进行眼内示踪观察。体外结果显示标记后细胞膜呈红色高荧光,证实标记成功,眼内移植后 1 个月,可观察到红色高荧光的标记细胞,同时可以观察到其与宿主的位置关系,证实其可以应用于 hADSCs 眼内移植的标记及示踪。

本研究中同时观察了 PKH26 标记 hADSCs 眼内移植后的毒性反应,眼内移植后 1 个月,苏木精-伊红染色后光学显微镜及电子显微镜下观察均未发现视网膜组织结构的异常增生及细胞变性,形态学评估提示 PKH26 标记细胞短期应用的安全性较好。Lee 等^[14]研究表明,基质血管成分细胞经 PKH26 标记后移植到宿主内 8 周安全,也证实了标记的安全性。Kuriyan 等^[15]报道了 3 例年龄相关性黄斑变性患者分别在玻璃体腔注射干细胞后 2、3 和 7 d 出现玻璃体增生性眼部严重并发症,虽然不能确定与干细胞本身的增生、分化有关,但也提示了干细胞在应用中存在风险。间充质干细胞移植后的转归分化及其调控仍需进一步研究。

综上所述,本研究证实 PKH26 可以在体外对 hADSCs 进行细胞标记,标记细胞眼内移植后 1 个月形态学评估显示无毒性反应,更长时间的毒性反应和功

能学评估及其分化转归还需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lamba DA, Karl MO, Reh TA. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration[J]. Prog Brain Res, 2009, 175: 23-31. DOI:10.1016/S0079-6123(09)17502-7.
- [2] Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies [J]. Stem Cells, 2007, 25(4): 818-827. DOI:10.1634/stemcells.2006-0589.
- [3] Wu Y, Wang J, Scott PG, et al. Bone marrow-derived stem cells in wound healing; a review[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15 Suppl 1: S18-26. DOI:10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x.
- [4] 郭凯, 李士清, 李静, 等. 异硫氰酸荧光素-葡聚糖眶后注射观察鼠视网膜血管的可行性研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(1): 19-22. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.005.
- [5] Guo K, Li SQ, Li J, et al. Feasibility assessment for the observation of murine retinal vessel by retro-orbital injection of fluorescein isothiocyanate-dextran [J]. Chin Exp Ophthalmol, 2013, 31(1): 19-22. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.005.
- [6] Scott RW, Underhill TM. Methods and strategies for lineage tracing of mesenchymal progenitor cells [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1416: 171-203. DOI:10.1007/978-1-4939-3584-0_10.
- [7] Zhou SB, Chiang CA, Liu K, et al. Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells could effectively promote vascularization and skin regeneration in mechanically stretched skin [J]. Br J Dermatol, 2015, 172(5): 1278-1285. DOI:10.1111/bjd.13251.
- [8] Sauerzweig S, Baldauf K, Braun H, et al. Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker [J]. J Neurosci Methods, 2009, 177(1): 149-159. DOI:10.1016/j.jneumeth.2008.10.009.
- [9] Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, et al. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells [J]. Cell Transplant, 2008, 17(8): 911-922. DOI:10.3727/096368908786576444.
- [10] Bulte JW, Kraitchman DL. Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5(6): 567-584.
- [11] Gong L, Wu Q, Song B, et al. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2008, 36(7): 666-671. DOI:10.1111/j.1442-9071.2008.01857.x.
- [12] Mado M, Beech JS, Meade TJ, et al. A chronic 1 year assessment of MRI contrast agent-labelled neural stem cell transplants in stroke [J]. Neuroimage, 2009, 47 Suppl 2: T133-142. DOI:10.1016/j.neuroimage.2008.06.017.
- [13] Shuai H, Shi C, Lan J, et al. Double labelling of human umbilical cord mesenchymal stem cells with Gd-DTPA and PKH26 and the influence on biological characteristics of hUCMSCs [J]. Int J Exp Pathol, 2015, 96(1): 63-72. DOI:10.1111/iep.12111.
- [14] Hou HY, Liang HL, Wang YS, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions [J]. Mol Ther, 2010, 18(10): 1837-1845. DOI:10.1038/mt.2010.144.
- [15] Lee SH, Ko K, Choo MS, et al. The effect and safety of poly(lactic acid) and adipose-derived stromal vascular fraction cell as an injectable bulking agent in urologic field; a 24-week follow-up study [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015, 103(2): 440-447. DOI:10.1002/jbm.b.33221.
- [16] Kuriyan AE, Albini TA, Townsend JH, et al. Vision loss after intravitreal injection of autologous "stem cells" for AMD [J]. N Engl J Med, 2017, 376(11): 1047-1053. DOI:10.1056/NEJMoa1609583.

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-10-05)

(本文编辑:刘艳)