

BrdU体外标记大鼠骨髓间充质干细胞的研究

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记法作为一种简便、敏感、特异的检测方法,在肿瘤生物学、分子生物学、遗传学、药物代谢动力学、核医学等领域得到广泛应用。BrdU是胸腺嘧啶核苷的类似物,可与内源性胸腺嘧啶核苷竞争掺入细胞S期核酸序列,与氚胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-TdR}$)掺入机制相似,因此作为反映细胞增殖活性的指标确切可靠。本实验的目的是应用BrdU体外标记连续传代的大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),观察最佳标记时间及标记剂量,从而为追踪BrdU标记的MSCs移植入体内后的存活、生长及分化的动态变化过程打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基(Gibico公司), 10%优质胎牛血清(杭州四季青), 胰酶(Sigma公司), BrdU(Sigma公司), 抗-BrdU抗体及山羊抗小鼠-cy3均购自武汉博士德公司。

1.2 实验动物

健康SD大鼠, 体质量60~80 g, 购于中山大学北校区动物实验中心。

1.3 主要仪器

CO_2 培养箱, 荧光倒置显微镜(Olympus公司)等。

1.4 方法

1.4.1 大鼠骨髓MSCs的体外分离培养 将SD大鼠引颈处死后置于75%酒精浸泡约1 min, 无菌条件下分离出大鼠的股骨和胫骨, 用注射器冲出骨髓细胞后经4号针头吹打, 制成单细胞悬液。1 000 r/min离心5 min, 弃去上清。用加有10%胎牛血清的DMEM重悬细胞, 接种于25 cm^2 的培养瓶, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养。3 d后更换培养液, 以后每3~4 d换液1次。7~10 d细胞生长融合, 经0.25%胰酶消化, 以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度传代培养。其后一般3 d传代1次, 至P4代时杂细胞较少, 选取生长良好的P6代细胞进行下列实验。

1.4.2 传代后大鼠MSCs的鉴定 胰酶消化P6代细胞, PBS洗涤3次, 加入荧光标记抗体, 室温避光孵育。应用流式细胞仪检测MSCs的表面标记。

1.4.3 BrdU标记方法 每日观察细胞生长状况, 绘制大鼠MSCs的生长曲线。以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 将MSCs接种于爬片处理的6孔板中, 并以终浓度分别为5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU检测MSCs最佳标记剂量; 在细胞生长融合前72、48、36、24、12、3 h掺入BrdU, 使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$, 并分别孵育至细胞融合, 测定BrdU的最佳标记时间; 以10 $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记MSCs P6代细胞, 待80%融合时, 1:2传代观察BrdU在连续分裂细胞内的标记时间。设正常对照组观察BrdU有无细胞毒性。随机数取10个非重叠视野($\times 100$), 计算BrdU阳性细胞数占总细胞数的比例。

1.4.4 BrdU标记免疫组化染色 操作步骤: (1)4%多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗5 min, 3次; (2)3% H_2O_2 于室温封闭内源性过氧化氢酶10 min, PBS冲洗5 min, 3次; (3)2N HCl于室温变性30~45 min, PBS冲洗5 min, 3次; (4)1:20正常山羊血清封闭20 min, 甩去多余的液体不洗; (5)抗BrdU一抗(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中过夜, PBS冲洗5 min, 3次; (6)山羊抗小鼠-cy3孵育45 min, PBS冲洗5 min, 3次; (7)DAPI复染, 荧光倒置显微镜观察。

1.4.5 对照试验 阳性对照为BrdU标记的MSCs, 阴性对照为未经BrdU标记的MSCs, 空白对照以PBS替代一抗。

1.5 统计学处理

各组BrdU标记率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MSCs的传代、扩增与纯化

单个骨髓细胞悬液接种于25 cm²塑料培养瓶，发现细胞24 h开始贴壁，在瓶底呈散在圆形分布；72 h后可见球形和梭形细胞贴壁生长，换液去除未贴壁细胞。培养5~7 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10 d左右，90%以上细胞趋于融合。经胰酶消化后1:2传代，传代后6~8 h内细胞基本贴壁，24 h后开始增殖，细胞集落增多，呈“旋涡状”生长。3 d可传代，连续传4~5代MSCs趋于纯化，P6代细胞传代1次细胞数目增加约2.5倍，群体倍增时间约为34 h。

2.2 MSCs表面标志测定

流式细胞仪结果显示细胞均一性较好，达95%以上。造血干细胞的表面标记CD11b和CD45表达阴性，而CD29和CD44表达阳性，说明传代贴壁生长的梭形细胞为MSCs(图1)。

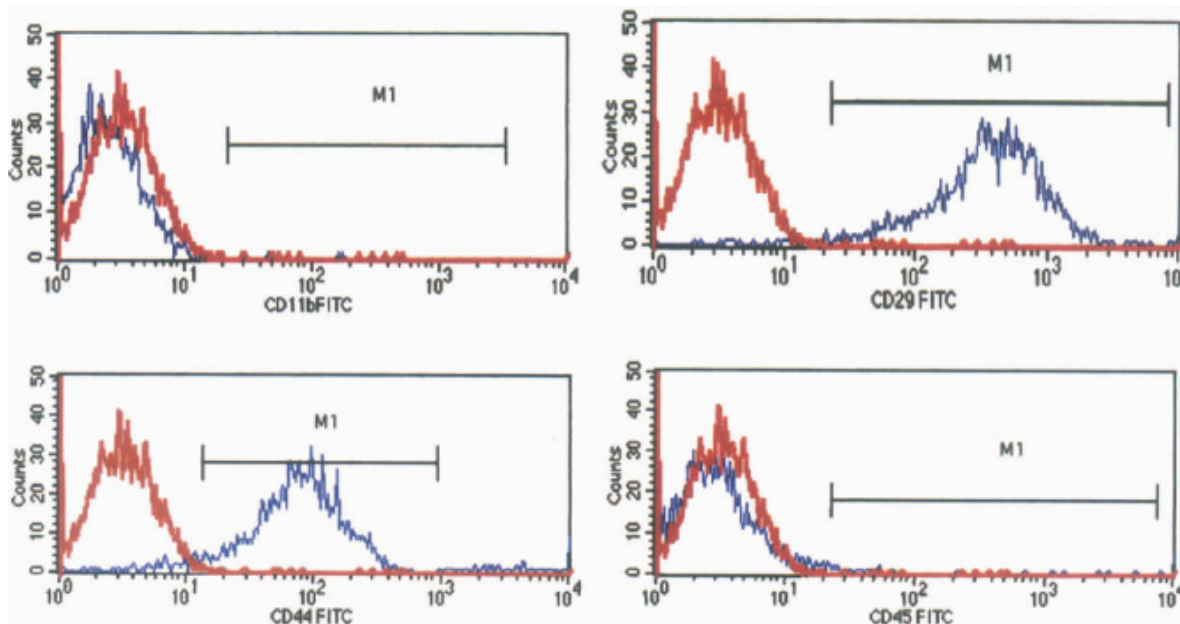


图1 大鼠MSCs表面标志抗原表达

Fig.1 Expressions of cell surface antigens on rat MSCs

2.3 BrdU标记率

以不同浓度标记发现，10 $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU标记率>98%，与15 $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU没有显著差别($P>0.05$)，与5 $\mu\text{mol/L}$ (LI约70%)有显著差异(LI约75%， $P<0.05$)。不同孵育时间标记发现(图2)，孵育3 h即可见较多BrdU阳性染色细胞，标记率约为12%；随着标记时间延长阳性细胞数增多，标记48 h细胞阳性率>98%。但标记时间继续延长标记细胞数目无明显增多，标记72 h组与48 h组之间的阳性细胞数无差异($P>0.05$)。为此，我们发现选用标记48 h、终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 作为最佳标记时间和浓度进行后续试验，完全能够满足移植细胞的标记需要，连续传代5次后仍可见BrdU免疫染色阳性。在相差显微镜下观察细胞的形态、生长、增殖与对照组相比未见差异。

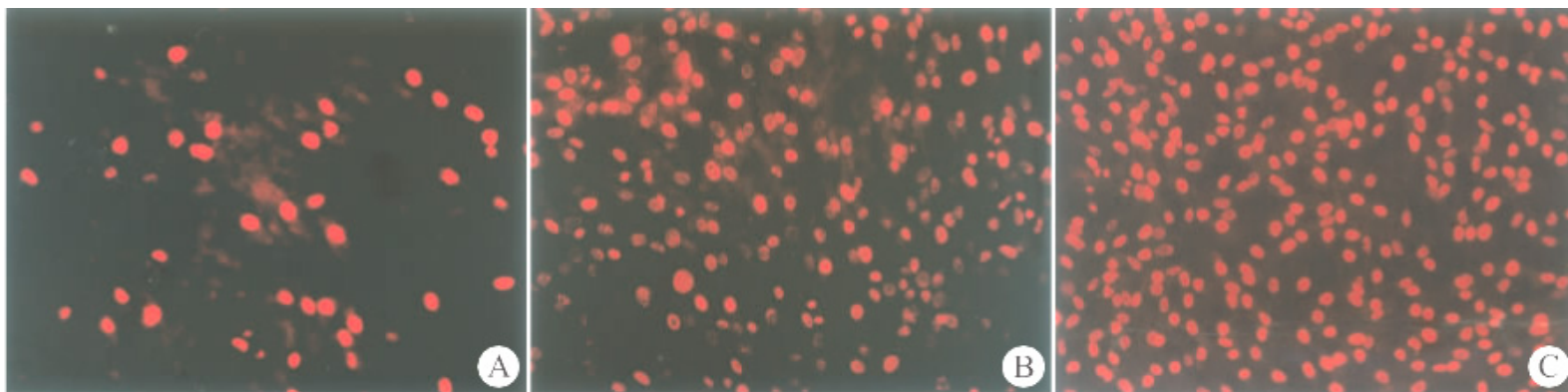


图2 细胞融合前BrdU与MSCs孵育不同时间的阳性细胞 (原放大倍数: $\times 200$)

Fig.2 Positive MSCs before reaching confluence incubated with BrdU for different lengths of time (Original magnification: $\times 200$)

MSCs是一种多能干细胞,具有自我更新和多向分化潜能,同时也是一组遗传异质性的细胞群体,兼有间质细胞、上皮细胞和内皮细胞的特点,表达整合素家族成员CD29、粘附分子CD44、CD105、CD166,而不表达淋巴细胞表面抗原CD11a、CD11b,也不表达造血干细胞标志抗原CD34、泛白细胞标志抗原CD45等[1]。本研究显示体外培养细胞经流式细胞仪检测细胞均一性好,表达CD29和CD44,但不表达CD11b和CD45,符合MSCs的特点。由于MSCs在体内外特定环境诱导下可分化成骨细胞[2][3][4]、软骨细胞[2][3][5]、脂肪细胞[1][6]、神经细胞[7]、骨骼肌细胞[8][9]等多种组织细胞,故可利用MSCs作为各种组织工程的细胞来源,但是体内细胞移植的问题之一是如何简便有效地标记移植细胞并跟踪其在体内的存活、生长和分化过程。

细胞标记方法有酶联标记、³H-TdR标记、荧光标记、BrdU标记及特定基因标记等。BrdU是一种嘧啶类似物,其胸腺嘧啶的碱基嘧啶环与5位C原子连接的甲基被溴代替。当细胞处于DNA合成期而同时又有BrdU存在时,BrdU就会掺入到新合成的DNA中。与同位素和荧光标记技术相比较,BrdU抗体不与胸腺嘧啶发生交叉反应,经免疫组织化学染色可观察BrdU在细胞内的掺入情况,故BrdU标记和检测的准确性高、标记率高、方法简便、安全,是反映细胞增殖及跟踪监测移植细胞动态变化的理想指标[7][10][11]。本实验采用BrdU标记MSCs,并用抗BrdU单克隆抗体进行免疫细胞化学染色,细胞的形态、生长、增殖及分化均不受影响,故应用BrdU标记细胞较为安全可靠。BrdU标记细胞48 h、终浓度为10 μmol/L时标记率>98%,且传代细胞可连续标记,提示移植细胞可在体内连续追踪观察,为进一步追踪活体内的移植细胞的动态变化提供了理论指导。

总之,用BrdU标记MSCs的优点是:(1)简单、快速、安全,检测敏感性好;(2)BrdU既可用于活体标记,亦可用于细胞或组织细胞增殖、分化的标记;(3)使用BrdU对标记细胞、活体动物无毒副作用,为动态观察移植细胞在动物体内的生存、生长和分化过程提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
- [2] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(11): 4857-61.
- [3] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro[J]. *Cell Transplant*, 1997, 6(2): 125-34.
- [4] Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction[J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(6): 900-8.
- [5] Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4397-402.
- [6] Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse[J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(5): 700-9.
- [7] Munoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(4): 437-48.
- [8] Ferrari G, Cusella-de Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. *Science*, 1998, 279(5356): 1528-30.
- [9] LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury[J]. *Cell*, 2002, 111(4): 589-601.
- [10] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication[J]. *Science*, 1982, 218(4571): 474-5.
- [11] Nakamura S, Takeda Y, Kanno M, et al. Application of bromo-deoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemia cells in bone marrow[J]. *Oncology*, 1991, 48(4): 285-9.

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.

- [2] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11): 4857-61.
- [3] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro[J]. Cell Transplant, 1997, 6(2): 125-34.
- [4] Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction[J]. J Orthop Res, 1999, 17(6): 900-8.
- [5] Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(7): 4397-402.
- [6] Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(5): 700-9.
- [7] Munoz-Elias G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions[J]. Stem Cells, 2003, 21(4): 437-48.
- [8] Ferrari G, Cusella-de Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. Science, 1998, 279(5356): 1528-30.
- [9] LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury[J]. Cell, 2002, 111(4): 589-601.
- [10] Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication[J]. Science, 1982, 218(4571): 474-5.
- [11] Nakamura S, Takeda Y, Kanno M, et al. Application of bromo-deoxyuridine (BrdU) and anti-BrdU monoclonal antibody for the in vivo analysis of proliferative characteristics of human leukemia cells in bone marrow[J]. Oncology, 1991, 48(4): 285-9.