

BrdU体外标记大鼠骨髓间充质干细胞的研究

冯善伟, 姚晓黎, 李中, 柳太云, 黄文, 张成 (中山大学第一附属医院神经内科, 广东广州 510080)

摘要:目的 探讨连续培养的骨髓间充质干细胞(MSCs)的5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)最佳标记时间、剂量。方法 差速贴壁法对SD鼠MSCs进行体外传代培养;第6代细胞行流式细胞仪鉴定细胞的表面抗原;以终浓度分别为5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的BrdU检测最佳标记剂量;在细胞生长融合前72、48、36、24、12、3 h加入BrdU,使终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,并分别孵育至细胞融合,测定BrdU的标记率,找出最佳标记时间;免疫组化分析BrdU标记率。结果 流式细胞仪检测所标记的细胞表达CD29和CD44,不表达CD11b和CD45;终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 和孵育48 h BrdU标记率均>98%,并且连续传5代均可检测到。结论 传代后贴壁生长的梭形细胞为MSCs,终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 和孵育48 h BrdU标记率均>98%,且可以连续检测到,提示BrdU标记可用于MSCs移植入体内后存活、生长和分化的动态观察。

关键词:尿嘧啶核苷酸类;流式细胞术;细胞,培养的;细胞分离;造血干细胞;骨髓细胞

中图分类号:R329.24 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)02-0184-03

In vitro bromodeoxyuridine labeling of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells

FENG Shan-wei, YAO Xiao-li, LI Zhong, LIU Tai-yun, HUANG Wen, ZHANG Cheng

Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: **Objective** To study the optimal dosage and timing for bromodeoxyuridine (BrdU) labeling of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) *in vitro*. **Methods** Bone marrow-derived MSCs of SD rats were cultured *in vitro* routinely and the sixth passage was taken for identification of specific surface antigens by flow cytometry. Before reaching cell confluence, the purified MSCs were incubated with BrdU at different concentrations (5, 10, and 15 $\mu\text{mol/L}$) for different incubating time (3, 12, 24, 36, 48, and 72 h) with 10 $\mu\text{mol/L}$ BrdU, to identify the optimal BrdU concentration and incubating time for cell labeling. Immunohistochemistry was performed to calculate the labeling index (LI). **Result** Flow cytometry showed that MSCs expressed CD29 and CD44 but not CD11b or CD45. Incubation of the MSCs with BrdU at 10 $\mu\text{mol/L}$ and for an optimal length of 48 h appeared to achieve the highest LI, both of which exceeded 98%, with the labeling identifiable in five consecutive passages. **Conclusions** The continually passaged cells are MSCs, the incubation of which with 10 $\mu\text{mol/L}$ BrdU for 48 h may achieve a LI over 98% without producing obvious cell damages. The results suggest that BrdU labeling provides a feasible means for a dynamic *in vivo* observation of the survival, growth and differentiation of the implanted MSCs.

Key words: uracil nucleotides; flow cytometry; cells, cultured; cell separation; hematopoietic stem cells; bone marrow cells

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,与氘胸腺嘧啶核苷($^3\text{H-TdR}$)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。

收稿日期:2004-11-08

基金项目:国家自然科学基金(30370510)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30370510)

作者简介:冯善伟(1973-),女,在读博士研究生,主要从事神经遗传病的研究

通讯作者:张成, E-mail: czym@gzsums.edu.cn

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

CO₂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大鼠颈动脉处死后置于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 cm² 的培养瓶,置于 37 ℃、5%CO₂ 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 1×10⁵/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 1×10⁵/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 μmol/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 μmol/L,并分别孵育至细胞融合,测定 BrdU 的最佳标记时间;以 10 μmol/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(×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% H₂O₂ 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 ℃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)。

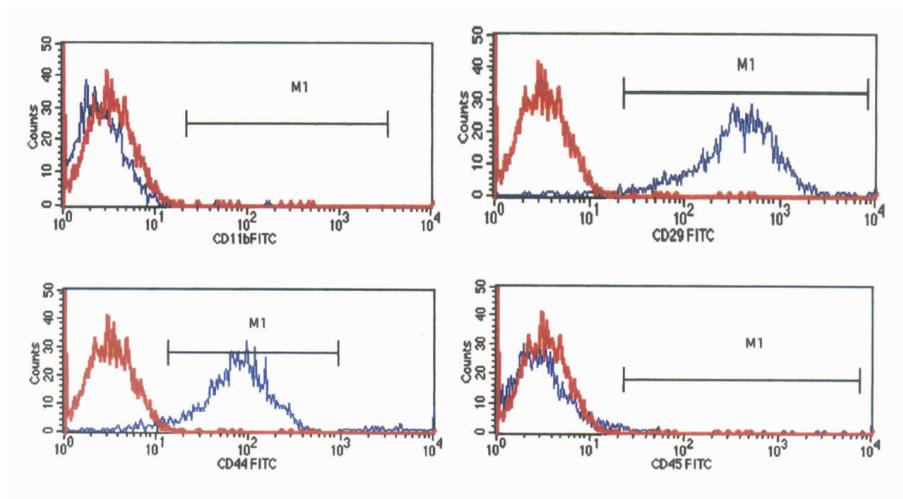


图 1 大鼠 MSCs 表面标志抗原表达
Fig.1 Expressions of cell surface antigens on rat MSCs

2.3 BrdU 标记率

以不同浓度标记发现,10 μmol/L 的 BrdU 标记率 >98%,与 15 μmol/L 的 BrdU 没有显著差别($P>0.05$),与 5 μmol/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 μmol/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。

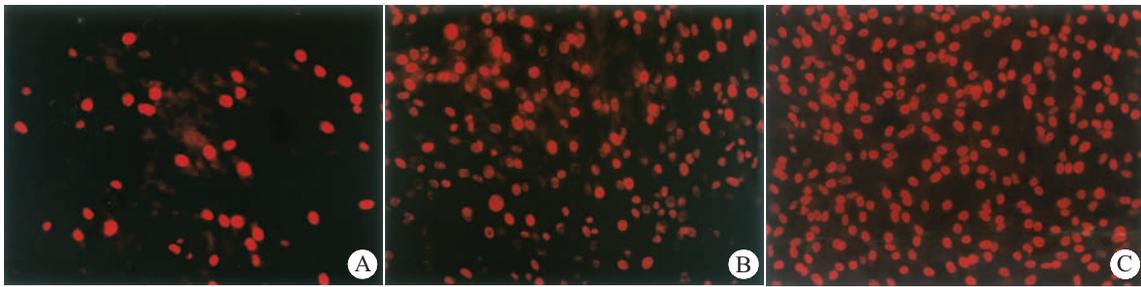


图 2 细胞融合前 BrdU 与 MSCs 孵育不同时间的阳性细胞 (原放大倍数: ×200)

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

A: 3 h; B: 24 h; C: 48 h

3 讨论

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^[2-4]、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, Vuorio 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 bromodeoxyuridine (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.